



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Esta tesis doctoral contiene un índice que enlaza a cada uno de los capítulos de la misma.

Existen asimismo botones de retorno al índice al principio y final de cada uno de los capítulos.

[Ir directamente al índice](#)

Para una correcta visualización del texto es necesaria la versión de [Adobe Acrobat Reader 7.0](#) o posteriores

Aquesta tesi doctoral conté un índex que enllaça a cadascun dels capítols. Existeixen així mateix botons de retorn a l'índex al principi i final de cadascun dels capítols .

[Anar directament a l'índex](#)

Per a una correcta visualització del text és necessària la versió d' [Adobe Acrobat Reader 7.0](#) o posteriors.

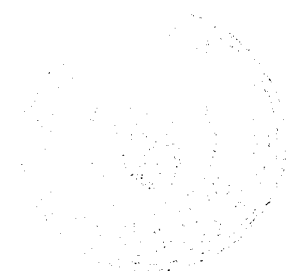


Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

UNIVERSIDAD DE ALICANTE
PROGRAMA DE DOCTORADO EN NEUROCIENCIAS

**CARACTERIZACION FUNCIONAL DEL
RECEPTOR DIHIDROPIRIDINICO MITOCONDRIAL
ADRENOMEDULAR BOVINO**

MEMORIA
que para optar al grado de doctora en
Ciencias Biológicas
presenta
MERCEDES PALMERO CABEZAS





Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

D. Salvador Viniegra Bover, profesor titular de Bioquímica y Biología Molecular, y D.Juan José Ballesta Payá, profesor titular E.U. de Farmacología de la Universidad de Alicante

CERTIFICAN:

Que el trabajo experimental correspondiente a la presente memoria titulada "Caracterización funcional del receptor dihidropiridínico mitocondrial adrenomedular bovino", ha sido realizado por Mercedes Palmero Cabezas bajo nuestra dirección y que, a nuestro juicio, reúne las condiciones adecuadas para ser presentada y juzgada por el tribunal correspondiente para aspirar al grado de doctora en Ciencias Biológicas.

Alicante, 22 de Octubre de 1992.

Fdo.: Dr. S. Viniegra Bover.

Fdo.: Dr. J.J. Ballesta Payá.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Este trabajo ha sido financiado con ayuda de la Dirección General de
Investigación Científica y Técnica (PB 87-0093).



AGRADECIMIENTOS

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Quisiera expresar mi agradecimiento al grupo de investigación con el que he tenido la suerte de desarrollar este trabajo porque no cabe duda, que el apoyo, ayuda e idea de equipo que desde el principio mostraron, y sobre todo la amistad de cada uno de ellos, han hecho posible la estancia en el laboratorio durante estos años, los cuales gracias a ellos recordaré siempre.

En primer lugar, quisiera agradecer a Juan Antonio Reig la oportunidad de incorporarme a su equipo. Trabajar bajo la dirección de Salvador Viniegra y Juanjo Ballesta ha hecho que los momentos más difíciles sean incluso agradables y recordados con añoranza. He tenido la suerte de aprender a trabajar con Juanjo y compartir con él muchas horas en el laboratorio/despacho e incluso en la autovía Alicante-Murcia; y también cómo no, de trabajar junto a Luis Miguel Gutierrez, quien incluso desde Chicago, estuvo siempre presente en el laboratorio. El haber tenido a mi lado a Pepa Hidalgo, dentro y fuera del laboratorio, no sólo han acertado las eternas horas de trabajo, sino que han consolidado una relación de verdadera y sincera amistad.

También quiero agradecer la ayuda desinteresada en todo momento del grupo de Neurotoxicología, Jose Barril, Eugenio, Miguel Angel, Victoria y en especial las interminables tardes de trabajo compartidas, a veces a voces, junto a Nuria Diaz-Alejo; y en general, a todos los miembros del Departamento de Neuroquímica.

Por último, quiero dar las gracias a mi familia. Ajena al trabajo, ha compartido todos estos años con cariño y mucha paciencia, ayudandome a superar los momentos mas difíciles.



INDICE

INTRODUCCION	1
1.- ESTRUCTURA	4
2.- TRANSPORTADORES DE MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA	6
3.- FUNCION DE LAS MITOCONDRIAS	7
4.- PAPEL DEL CALCIO EN MITOCONDRIAS	9
5.- SISTEMAS DE TRANSPORTE DE CALCIO EN MITOCONDRIAS	11
5.1- UNIPORTADOR DE Ca^{2+}	11
5.2.- SALIDA DEL CALCIO MITOCONDRIA	16
5.2.1.- Intercambio Na^{+}/Ca^{2+}	17
5.2.2.- Salida de Ca^{2+} independiente de Na^{+}	22
6.- CICLO DEL CALCIO MITOCONDRIAL	24
7.- DIHIDROPIRIDINAS	24
7.1.- CARACTERIZACION DEL RECEPTOR DIHIDROPIRIDINICO MITOCONDRIAL	27
7.2.- IMPORTANCIA FUNCIONAL DEL RECEPTOR DIHIDROPIRIDINICO MITOCONDRIAL	31
8.- LA CELULA CROMAFIN COMO MODELO EXPERIMENTAL	33
8.1.-RECEPTORES DIHIDROPIRIDINICOS PRESENTES EN LA CELULA CROMAFIN	34
OBJETIVOS	37



MATERIAL Y METODOS	41
1.- AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS	43
2.- AISLAMIENTO DE MEMBRANAS MITOCONDRIALES	45
3.- AISLAMIENTO DE GRANULOS CROMAFINES	45
4.- MOVIMIENTOS DE CALCIO MITOCONDRIALES	46
4.1.- CAPTACION DE CALCIO	46
4.2.- BLOQUEO DE LA CAPTACION	48
4.3.- SALIDA DE CACLICIO INTRAMITOCONDRIAL	48
5.- CONSUMO DE OXIGENO	50
6.- ESTUDIOS DE FIJACION DE [³ H]NITRENDIPINA	52
MATERIALES	53
 RESULTADOS Y DISCUSION	 55
1.- PUESTA A PUNTO DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES	57
1.1.- FACTORES EXTERNOS QUE INFLUYEN SOBRE EL TRANSPORTE DE Ca ²⁺	59
2.- CAPTACION DE Ca ²⁺	69
2.1.- CAPTACION DE Ca ²⁺ EN GRANULOS CROMAFINES	73
3.- EFECTO DEL ROJO RUTENIO SOBRE EL UNIPORTADOR DE Ca ²⁺	75
4.- SALIDA DE Ca ²⁺	77
4.1.- EFLUJO BASAL DE Ca ²⁺	77
4.2.- INTERCAMBIO Na ⁺ /Ca ²⁺	80
4.3.- SALIDA DE Ca ²⁺ INDEPENDIENTE DE Na ⁺	90



5.- EFECTO DE FARMACOS SOBRE LOS MOVIMIENTOS DE Ca ²⁺	93
5.1.- CAPTACION DE Ca ²⁺	95
5.2.- SALIDA DE Ca ²⁺	98
5.2.1.- Efecto de nitrendipina sobre el intercambio Na ⁺ /Ca ²⁺	106
5.2.2.- Efecto de nitrendipina sobre el eflujo de Ca ²⁺ independiente de Na ⁺	109
6.- RESPIRACION MITOCONDRIAL	111
6.1.- EFECTO DE LOS MOVIMIENTOS DE Ca ²⁺ SOBRE LA RESPIRACION MITOCONDRIAL	113
6.2.- EFECTO DE NITRENDIPINA SOBRE LA RESPIRACION MITOCONDRIAL	117
7.- ESTUDIOS DE FIJACION DE [³ H]NITRENDIPINA	119
7.1.- ESTUDIOS EN EL EQUILIBRIO	119
7.2.- DESPLAZAMIENTO DE [³ H]NITRENDIPINA POR NITRENDIPINA NO MARCADA	121
7.3.- MODULACION DE LA FIJACION DE [³ H]NITRENDIPINA A MITOCONDRIAS INTACTAS	124
7.4.- COMPARACION ENTRE LOS ESTUDIOS FUNCIONALES Y DE FIJACION DE [³ H]NITRENDIPINA	130
CONCLUSIONES	133
BIBLIOGRAFIA	137



LISTA DE ABREVIATURAS

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

- ADP: adenosina-5'-difosfato.
- ATP: adenosina-5'-trifosfato.
- Bmax: número de receptores.
- BSA: albúmina sérica bovina.
- BTZ: benzotiazepinas.
- CCDV: canales de calcio dependientes de voltaje.
- CHAPS: 3-[(colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato.
- DCCD: dicitclohexilcarbodiimida.
- DHP: dihidropiridina.
- DHPr: receptor dihidropiridínico.
- DPA: difenilalquilaminas
- DMSO: dimetilsulfóxido.
- EC₅₀: concentración a la que se obtiene el 50% de la estimulación máxima.
- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.
- EGTA: ácido etilenglicol-bis(eter b-aminoetilo) N',N',N',N' tetraacético.
- IC₅₀: concentración a la que se obtiene el 50% de la inhibición máxima.
- IMAC: canal aniónico de membrana mitocondrial interna.
- Kd: constante de disociación.
- K_i: constante de inhibición.
- Km: constante de Michaelis.
- Pi: fosfato inorgánico.
- PIPES: ácido 1,4-piperazinadietanosulfónico.
- RR: rojo rutenio.
- Tris: tris(hidroximetil)-aminometano.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

INTRODUCCION



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Gran parte de la capacidad de generar energía en muchas células reside en las mitocondrias presentes en todas las células eucariotas aerobias. El número de mitocondrias, que refleja la función fisiológica del tejido y determina su capacidad para llevar a cabo funciones metabólicas aerobias, es relativamente constante y característico para cualquier tipo de célula determinado, pero puede cambiar con el estado de desarrollo o con la actividad funcional del tejido, pudiendo constituir una fracción relativamente elevada del volumen citoplásmico.

Estas organelas están localizadas generalmente en las proximidades de las estructuras que necesitan ATP o se hallan cerca de una fuente de combustible de la que dependen. Las mitocondrias se distribuyen de forma típica en los diferentes tipos celulares; por ejemplo, en células muy activas se disponen de forma más o menos fija, en hileras a lo largo de las miofibrillas, o bien adyacentes a las vacuolas lipídicas citoplásmicas, que actúan como fuente de combustible (Ernster y Schatz, 1981).

El tamaño y forma de las mitocondrias también varían según los tipos celulares de los que proceden, siendo más o menos esféricas en células de levadura, elipsoides en células hepáticas, cilíndricas en células renales, etc. No son estructuras rígidas, sino que presentan gran plasticidad (experimentando cambios rápidos en su forma y volumen según el estado metabólico de la célula) y movilidad, desplazándose por el citoplasma, de forma que aparecen a menudo asociadas a los microtúbulos del citoesqueleto.

Las mitocondrias son las únicas organelas celulares que presentan su propio sistema genético y maquinaria para la síntesis de proteínas. Sin embargo menos de un 10% de las proteínas mitocondriales son sintetizadas por el ADN mitocondrial. Todas las proteínas de la membrana mitocondrial externa, espacio intermembranoso, matriz y algunas de la membrana mitocondrial interna son sintetizadas por el genoma nuclear y tan sólo los componentes hidrofóbicos de la cadena respiratoria mitocondrial son codificadas por el ADN mitocondrial (Pfaner y Neupert, 1990; Hartl y Neupert, 1990).

Las mitocondrias están limitadas por dos membranas constituidas por una bicapa lipídica, que definen dos compartimentos mitocondriales separados; la matriz, espacio delimitado por la membrana mitocondrial interna, y un espacio intermembranoso más



estrecho entre la membrana mitocondrial interna y la externa. Cada una de estas regiones contiene diferentes proteínas adaptadas para desarrollar funciones específicas.

1.- ESTRUCTURA

A.- MEMBRANA MITOCONDRIAL EXTERNA.

Presenta una relación lípido/proteína relativamente elevada y una relación superficie/volumen baja debido a la ausencia de invaginaciones (LaNoue y Schoolwerth, 1979). Entre las proteínas de membrana contiene porina (Freitag y col., 1982), que forma grandes canales a través de la bicapa lipídica. Esta membrana es permeable a iones y moléculas de menos de 5.000 daltons de peso molecular (Schoolwerth y LaNoue, 1985). Entre las funciones principales de esta membrana destacan la oxidación de aminas aromáticas neuroactivas asociada al enzima monoamino oxidasa, síntesis de cardiolipina y el transporte de proteínas codificadas por el ADN nuclear y sintetizadas en el citoplasma (Rickwood y col., 1987).

B.- ESPACIO INTERMEMBRANOSO.

Debido a la impermeabilidad de la membrana mitocondrial interna, el espacio intermembranoso es químicamente semejante al citoplasma respecto a las pequeñas moléculas que contiene. En este espacio se mantiene el balance de los nucleótidos de adenina mediante la actividad de los enzimas adenilato quinasa y nucleosidos mono y difosfoquinasa, la transferencia de electrones del complejo III al IV de la cadena respiratoria a través del citocromo c (Darley-Usmar y col, 1987) y el procesamiento de las proteínas procedentes del citoplasma (Tzagoloff y Myers, 1986).



C.- MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA.

La membrana mitocondrial interna está plegada en numerosas crestas que aumentan su superficie total y experimenta notables cambios de forma según el estado respiratorio de la mitocondria. El contenido lipídico en la membrana interna (aproximadamente un 30%) es menor que en la externa. Los componentes lipídicos mayoritarios son fosfatidilcolina (40%), fosfatidil-etanolamina (35%) y una proporción elevada de cardiolipina (superior al 10%) lo que posiblemente contribuye a hacerla muy impermeable a los iones, propiedad que caracteriza a dicha membrana.

Un 70% de su contenido son proteínas, por lo que la relación lípido/proteína de la membrana mitocondrial interna es baja (LaNoue y Schoolwerth, 1979). Existen diversas proteínas de transporte que le confieren una permeabilidad altamente selectiva a pequeñas moléculas (DePierre y Ernster, 1977). Entre el 20 y 25% de la proteína total de la membrana interna está constituida por proteínas enzimáticamente activas.

Los tres tipos principales de proteínas constituyentes de esta membrana son las que catalizan las reacciones de oxidación de la cadena respiratoria; el complejo enzimático ATP sintetasa, que cataliza la síntesis de ATP en la matriz y proteínas de transporte que regulan el paso bidireccional de metabolitos por la membrana.

D.- MATRIZ MITOCONDRIAL.

La matriz mitocondrial experimenta cambios en su organización durante las variaciones de actividad respiratoria, de forma que al aumentar el número de crestas mitocondriales, disminuye el volumen de la matriz, y viceversa.

Contiene una mezcla muy concentrada de cientos de enzimas diferentes, incluidos los que metabolizan el piruvato y los ácidos grasos, los enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, enzimas de parte del ciclo de la urea, enzimas que protegen contra la formación de radicales superóxido, proteasas específicas para el procesamiento de las proteínas sintetizadas en el citoplasma, DNA polimerasas, etc. (Srere, 1980).



2.- TRANSPORTADORES DE MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA.

Han sido identificadas más de doce proteínas transportadoras en la membrana interna de mitocondrias de células animales (Halestrap, 1978; LaNoue y Schoolwerth, 1979; Schoolwerth y LaNoue, 1985). La actividad de los transportadores de la membrana mitocondrial interna reflejan las necesidades metabólicas y requerimientos energéticos en los diferentes tejidos.

Los sistemas de transporte mitocondriales, presentan cinéticas de saturación y muestran un grado marcado de especificidad por sus sustratos. Muchos son inhibidos por toxinas naturales o análogos sintéticos del sustrato y por reactivos específicos de grupos sulfidrilos.

Los transportadores no son simples canales y en muchos de ellos, los protones intervienen como co-sustratos de transporte, dependiendo dichos transportadores del gradiente de pH mitocondrial.

Estos sistemas de transporte se han clasificado según su interacción con el gradiente electroquímico de protones, en:

- 1.- Transporte electroneutro compensado por protones. En este grupo se incluyen el transportador de fosfato, glutamato, piruvato y el transportador de ornitina y aminoácidos catiónicos.
- 2.- Intercambio electroneutro de aniones que incluye el intercambio de ácidos di y tricarboxílicos, tales como citrato, malato y α -cetoglutarato.
- 3.- Transporte electroneutro de metabolitos tales como carnitina, glutamina y aminoácidos neutros, en el cual no intervienen los protones.
- 4.- Transporte electrogénico: lanzaderas, malato-aspartato y glicerol-fosfato, y transportador de nucleótidos de adenina.



3.- FUNCION DE LAS MITOCONDRIAS.

La función principal de las mitocondrias es generar la mayor parte del ATP celular para impulsar las reacciones energéticamente desfavorables.

Los principales sustratos del metabolismo aerobio oxidativo mitocondrial son los ácidos grasos y el piruvato. Ambos combustibles son transportados selectivamente desde el citosol hacia la matriz mitocondrial, donde son transformados en acetil CoA.

Con la condensación de acetil CoA y ácido oxalacético para producir ácido cítrico se inicia el **Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT)**. Cada ciclo produce dos moléculas de CO_2 , tres de NADH, una de FADH_2 y una molécula de ATP a partir de GTP, mediante fosforilación a nivel de sustrato. La contribución más importante de las mitocondrias al metabolismo consiste en la extracción de electrones de alta energía de los sustratos oxidados por NAD^+ y FAD. Dichos electrones, unidos a NADH y FADH_2 , pasan a la **cadena respiratoria de la membrana mitocondrial interna** y son transferidos hasta el oxígeno molecular. La energía liberada en la transferencia de electrones a lo largo de la cadena respiratoria, desde NADH y FADH_2 hasta el O_2 es utilizada para bombear H^+ desde la matriz hasta el espacio intermembrana a través de la membrana interna, creando un gradiente electroquímico de protones.

Una vez que los electrones alcanzan el final de la cadena respiratoria, las cargas negativas creadas se neutralizan por la adición final de los electrones a la molécula de oxígeno, haciendo que los H^+ sean bombeados hacia la matriz mitocondrial a través del enzima ATPasa-sintetasa impulsando la conversión de ADP y P_i en ATP mediante el proceso denominado **Fosforilación oxidativa**. La mayor parte del ATP celular es sintetizado a partir de ADP en la matriz mitocondrial por la ATPasa de la membrana mitocondrial interna (Hatefi, 1985).

Aproximadamente el 50% de las proteínas de la membrana mitocondrial interna están asociadas con el sistema enzimático que cataliza la fosforilación oxidativa, que funcionalmente está compuesto por los siguientes complejos enzimáticos que interaccionan entre sí:



- Complejo I: NADH:Ubiquinona oxidorreductasa.
- Complejo II: Succinato: ubiquinona oxidorreductasa.
- Complejo III: ubiquinona: ferrocitocromo oxidorreductasa.
- Complejo IV: ferrocitocromo c: oxígeno oxidorreductasa.
- Complejo V: ATP sintetasa.

De los cinco complejos enzimáticos, los complejos I, II, III y IV junto con ubiquinona y citocromo c constituyen la cadena respiratoria. Los transportadores de electrones de la cadena respiratoria son estructuras quinónicas (FMN, FAD, ubiquinona) y complejos metálicos de transición con las estructuras quinónicas (centros hierro-sulfurados, grupos hemo y proteínas que unen cobre).

Los complejos I, III y IV coinciden con tres regiones donde la energía oxidativa se conserva por medio del acoplamiento de la translocación vectorial de protones con la creación de un gradiente electroquímico de protones en la membrana, y la energía protónica así creada es utilizada para la síntesis de ATP.

El sistema de transporte de electrones es reversible hasta el nivel del citocromo c. El paso final de la transferencia de electrones a nivel del citocromo a_3 al oxígeno es irreversible desplazando el equilibrio del sistema hacia la síntesis de ATP. Mediante aislamiento de los tres complejos anteriormente citados y su incorporación en vesículas lipídicas, se demostró que la transferencia electrónica a través de ellos está acoplada a la translocación de protones (Wikström y col., 1981; Hatefi, 1985).

El complejo V está constituido por F_1F_0 ATPasa. Es un complejo enzimático reversible que cataliza la síntesis de ATP mediante fosforilación oxidativa, utilizando el gradiente de H^+ generado por las reacciones de oxidación. Esta ATPasa de membrana mitocondrial interna está integrada por dos componentes estructural y funcionalmente diferentes, F_1 y F_0 . El sector F_1 constituye la subunidad catalítica del complejo, con uno o dos sitios catalíticos, y el sector transmembrana F_0 , compuesto por proteínas hidrofóbicas, constituye la vía de transporte de H^+ hacia el interior mitocondrial (Senior, 1988).



En la síntesis de ATP están implicados tres sitios catalíticos de la subunidad F_1 , aunque todavía no existen datos convincentes sobre la necesidad e implicación de estos 3 sitios (Cross, 1981; Gresser y col., 1982). Durante la síntesis de ATP, se requiere energía para disminuir la elevada afinidad con que el ATP está unido al primer sitio catalítico y posterior liberación del ATP a la matriz mitocondrial, que es generada por el gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna (Penefsky, 1985).

4.- PAPEL DEL CALCIO EN LAS MITOCONDRIAS.

La gran diferencia entre las concentraciones extra e intracelular de calcio, del orden mM y sub μ M respectivamente, crea un gradiente electroquímico muy pronunciado a través de la membrana plasmática de la célula, de forma que, la entrada de un número relativamente pequeño de iones calcio (Ca^{2+}) al interior celular, incrementa de forma drástica la concentración intracelular del Ca^{2+} , iniciando, según el sistema biológico y la situación funcional de la célula, una serie de acciones fisiológicas.

Debido a este gradiente electroquímico tan elevado existen por tanto en la célula una serie de mecanismos para regular y modular la distribución espacial y temporal de las variaciones transitorias en la concentración intracelular del Ca^{2+} .

Este control es llevado a cabo por una serie de proteínas citosólicas solubles que, además, están implicadas en el procesamiento de la señal intracelular del Ca^{2+} ; por ello se les denomina "proteínas moduladas por calcio" y entre ellas destacan la troponina C, parvalbúmina y calmodulina.

Pero, principalmente, la regulación y mantenimiento de la concentración de Ca^{2+} intracelular en el orden submicromolar, es llevado a cabo por una serie de proteínas intrínsecas de membrana que transportan calcio. Estos sistemas se localizan en membrana plasmática, retículo endoplásmico/ sarcoplásmico, mitocondrias y también en núcleo. Las diferencias entre estos sistemas de transporte son su afinidad por el



calcio y capacidad de transporte (Carafoli, 1987; Rasmussen y Waisman, 1983).

Entre los organelas celulares que intervienen en la homeostasis del calcio, los **retículos endoplásmico y sarcoplásmico** son los más importantes en la regulación de la homeostasis del calcio citosólico en condiciones fisiológicas, siendo además la principal reserva de calcio intracelular (Somlyo y col., 1985). Ambos retículos presentan una Ca^{2+} -ATPasa dependiente de Mg^{2+} con alta afinidad por el Ca^{2+} y capacidad de transporte, acumulando 2 iones Ca^{2+} simultáneamente a la hidrólisis de ATP (Fabiato, 1985).

En condiciones fisiológicas, la importancia de la **mitocondria** como tampón del calcio citosólico es menor que la del retículo endoplásmico, debido a la baja afinidad de las mitocondrias por el Ca^{2+} (K_m entre 5 y 30 μM) (Richter y Kass, 1991) y a la lenta velocidad de captación (Scarpa, 1976). Además, utilizando sondas sensibles al calcio, se ha demostrado, mediante microscopía electrónica, que el contenido total de Ca^{2+} en mitocondrias es demasiado bajo para que actúen como depósitos de Ca^{2+} (Somlyo y col., 1985).

El estudio de los sistemas de transporte de calcio en mitocondrias puso de manifiesto el papel del calcio mitocondrial como activador potente del metabolismo oxidativo (Hansford, 1985; Denton y McCormack., 1990). Al aumentar la concentración de Ca^{2+} mitocondrial en un intervalo de 0,1-10 μM , se produce la activación de varios enzimas dependientes de Ca^{2+} intramitocondrial como las tres deshidrogenasas claves en la regulación del metabolismo oxidativo: Piruvato deshidrogenasa (PDH), NAD-isocitrato deshidrogenasa (NAD-ICDH) y 2-oxoglutarato deshidrogenasa (OGDH) (McCormack, 1985; Hansford, 1991).

Diversos estímulos hormonales actúan sobre las células produciendo un aumento de calcio citosólico y subsecuentemente una demanda de ATP. De los estudios realizados con tejido cardíaco y hepático, parece razonable suponer que esta demanda energética se satisface por el estímulo del metabolismo oxidativo producido por el aumento de calcio mitocondrial (Crompton y col., 1983), ya que se ha demostrado que el aumento de calcio citoplasmático, producido por dichas hormonas y por otros



estímulos externos, da lugar a un rápido aumento en la actividad de PDH y OGDH, ciclo del ácido cítrico y consecuentemente, de la respiración mitocondrial (McCormack y col., 1990; Hansford, 1991). Dada la importancia de la función mitocondrial en el control de la energía celular, recientemente ha sido estudiado el comportamiento de las mitocondrias en células intactas, observándose que los cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} ante estímulos fisiológicos, da lugar paralelamente a cambios significativos en la producción de energía mitocondrial (Duchen, 1992; Rizzuto y col., 1992).

5.- SISTEMAS DE TRANSPORTE DE CALCIO EN MITOCONDRIAS.

El sistema de transporte de Ca^{2+} en la membrana mitocondrial interna tiene dos rutas separadas. La captación de Ca^{2+} tiene lugar a través de un uniportador electrogénico, como consecuencia del potencial eléctrico a través de la membrana interna originado por la actividad de la cadena respiratoria (Rottenberg y Scarpa, 1974), mientras que la salida de Ca^{2+} intramitocondrial, en la mayoría de los tejidos, ocurre por un intercambio con Na^+ . Así pues, el ciclo del Ca^{2+} a través de la membrana interna mitocondrial dependerá de la actividad de ambas rutas.

5.1.- UNIPORTADOR DE Ca^{2+} .

Al igual que en todas las funciones mitocondriales dependientes de energía, la principal fuente utilizada para la acumulación de Ca^{2+} es la respiración (Lehninger y col., 1967).

En la hipótesis quimiosmótica de Mitchell se estableció que el transporte electrónico y la síntesis de ATP están acoplados mediante un gradiente electroquímico de H^+ generado por un transporte activo de H^+ desde la membrana interna mitocondrial al exterior que, a su vez genera una diferencia de potencial entre la membrana mitocondrial y el citoplasma, negativo en el lado mitocondrial interno (-180 mV)



(Mitchell, 1966). Esta diferencia de potencial constituye la fuerza protomotriz que promueve el transporte de Ca^{2+} desde el citoplasma hacia el interior mitocondrial (Carafoli, 1982). La estequiometría del proceso de bombeo de H^+ al exterior mitocondrial y entrada de Ca^{2+} (2:1) corrobora que la captación de calcio disipa la diferencia de potencial generada por el bombeo de H^+ al exterior (Reynafarje y Lehninger, 1977).

Existe una relación lineal entre la velocidad de captación de Ca^{2+} y el potencial de membrana mitocondrial, de forma que es necesario un cambio muy grande en el potencial de la misma para modificar la actividad del uniportador (Akerman, 1978a; Crompton y col., 1983).

Durante muchos años el papel de la mitocondria como orgánulo controlador en la homeostasis del Ca^{2+} citoplásmico fue sobreestimada. Los estudios detallados de los parámetros cinéticos de captación demostraron la baja afinidad del uniportador por el Ca^{2+} , que dependiendo de las condiciones experimentales y del tejido del que procedan, presenta valores de K_m alrededor de $10 \mu\text{M}$, y en las condiciones experimentales más favorables la V_{max} del proceso es de $0,6 \mu\text{moles de Ca}^{2+}/\text{mg de proteína y por minuto}$ (Vercesi y col., 1978). Por otro lado, utilizando sondas sensibles al Ca^{2+} , mediante microscopía electrónica, se comprobó que el contenido total de Ca^{2+} en mitocondrias es demasiado bajo para que actúen como depósitos de Ca^{2+} (Somlyo y col., 1985).

La capacidad de captación y acumulación de Ca^{2+} aumenta en presencia de fosfato inorgánico (Pi) (Rossi y Lehninger, 1964; Fiskum y Lehninger, 1980) debido a la formación de un complejo insoluble de fosfato cálcico en la matriz sin provocar cambios estructurales y funcionales de las mitocondrias, incluso con niveles elevados de carga de Pi y Ca^{2+} (Carafoli, 1987).

El uniportador de calcio presenta especificidad por otros cationes divalentes como Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} . (Scarpa y Azzone, 1970; Bragadin y col., 1979; Affolter y Carafoli, 1981). Como se resume en la tabla 1, la actividad del uniportador de calcio es ampliamente modulada.



La presencia de Mn^{2+} en el medio estimula la captación de Ca^{2+} (Hughes y Exton, 1983). Este efecto estimulador, se ve potenciado en presencia de fosfato (2 mM) y Mg^{2+} (3 mM) (Vinogradov y Scarpa 1973; Hughes y Exton, 1983).

La presencia de Sr^{2+} en el medio de incubación de las mitocondrias presenta el mismo efecto estimulador sobre la captación de Ca^{2+} que el Mn^{2+} pero sin precisar la presencia de Mg^{2+} (Hughes y Exton, 1983).

El Mg^{2+} afecta a la cinética del uniportador enlenteciendo la velocidad inicial de captación y transformando la cinética del proceso en sigmoidea (Akerman y col., 1977; Bragadin y col., 1979; Akerman y Nicholls, 1983), fijando de esta forma, la concentración de Ca^{2+} extramitocondrial en la que se alcanza el equilibrio (del ciclo del Ca^{2+}) a niveles mucho mayores (Nicholls, 1978a).

La concentración de Mg^{2+} necesaria para observar su efecto inhibitor sobre el uniportador varía en los diferentes tejidos, por lo que se especuló que las mitocondrias de los distintos tejidos han adaptado su sistema de transporte de calcio a sus medios intracelulares específicos (Favaron y Bernardi, 1985).

El uniportador de calcio es bloqueado por lantánidos y rojo rutenio, un inhibidor selectivo del uniportador (Moore, 1971). Tanto los lantánidos como el rojo rutenio inhiben la captación de Ca^{2+} a concentraciones muy bajas (del orden de 10^{-7} M), actuando probablemente de forma directa sobre el uniportador de Ca^{2+} sin afectar ni a la respiración ni a la fosforilación oxidativa mitocondrial (Pedersen y Coty, 1972; Reed y Bygrave, 1974; Puskin y col., 1976).

La actividad del uniportador también es inhibida por anticuerpos antiglicoproteínas (Panfili y col., 1976, 1981), por lo que se supuso la presencia de restos glucídicos en el uniportador, lo cual está en concordancia con la inhibición específica del mismo por rojo rutenio.

Otros inhibidores de la captación de Ca^{2+} , pero que actúan de forma indirecta, son los agentes desacoplantes tales como 2,4-dinitrofenol y carbonil cianida p-trifluoro metoxifenil- hidrazona, que aumentan la captación de H^+ por la mitocondria y disipan el gradiente de H^+ . Los inhibidores respiratorios antinomocina A y cianuro actúan a



través del bloqueo del transporte electrónico (Pedersen y Coty, 1972; Brinley y col., 1978). Otros bloqueadores del transporte de calcio son compuestos mercuriales orgánicos como mersalil, y p-mercuriobenzoato que inhiben todos los procesos dependientes de Pi localizados en la membrana mitocondrial interna o en la matriz mitocondrial (Pedersen y Coty, 1972).

Entre los antagonistas del calcio, existen pocos datos a nivel de su acción sobre el uniportador, así por ejemplo, los derivados dihidropiridínicos, nitrendipina y nimodipina, inhiben la captación a concentraciones elevadas, en el orden μM (Buss y col., 1988). Sin embargo, el agonista BayK 8644, parece ser que ejerce un efecto activador sobre la captación de Ca^{2+} y que este efecto no es directo sobre el uniportador sino que mas bien está relacionado con un aumento global en la acumulación de Ca^{2+} debido a un cambio en el balance entre la entrada y eflujo de Ca^{2+} en la mitocondria (Baydoun y col., 1990).

Entre los demás antagonistas del Ca^{2+} , el bepridil, del grupo de las arilalquilaminas, inhibe a concentraciones elevadas la captación de Ca^{2+} probablemente debido a que, a dichas concentraciones, el bepridil estimula la actividad ATPasa y desacopla la fosforilación oxidativa del transporte electrónico (Matlib, 1985).

Igualmente, otros antagonistas del Ca^{2+} como verapamil y diltiazem inhiben la captación de Ca^{2+} en un orden de concentración aún más elevado del que lo hacen los derivados dihidropiridínicos (Buss y col., 1988).

También ha sido observado, que el sistema de captación de Ca^{2+} mitocondrial está sujeto a regulación hormonal mediante un mecanismo aún desconocido (McCormack y col., 1990) así, los agonistas α_1 -adrenérgicos estimulan la actividad del uniportador de Ca^{2+} en mitocondrias hepáticas y cardiacas (Crompton y col., 1983).

Recientemente ha sido descrito el efecto activador sobre el uniportador de poliaminas tales como espermina o espermidina (Jensen y col., 1989) y de antibióticos aminoglucósidos (Kröner, 1990).

TABLA 1.- MODULACION DEL UNIPORTADOR DE Ca²⁺.

	EFECTO	REFERENCIA
ACCION DIRECTA		
- Cationes divalentes:		
Mn ²⁺	estimulación	1
Sr ²⁺	estimulación	1
Mg ²⁺	Inhibición	2
- Rojo rutenio	Inhibición	3
- Lantano	Inhibición	3,4
- Anticuerpos de glicoproteínas		
	Inhibición	5
- Aminoglucósidos	Estimulación	6
- Poliaminas	Estimulación	7
ACCION INDIRECTA		
- Desacoplantes	Inhibición	3,8
- Inhibidores respiratorios	Inhibición	3,6
- Inhibidores del Pi	Inhibición	3
- Fármacos inhibidores:		
Bepriidil	IC ₅₀ = 93 μM	9
Nitrendipina	IC ₅₀ = 216 μM	10
Nimodipina	IC ₅₀ = 194 μM	10
Verapamil	IC ₅₀ = 763 μM	10
Diltiazem	IC ₅₀ = 1030 μM	10
- Fármacos estimuladores:		
BayK 8644	EC ₅₀ = 18,9 μM	11
Agonistas α adrenergicos		12,13

1) Hughes y Exton, 1983; 2) Akerman y col., 1977; 3) Pedersen y Coty, 1972; 4) Puskin y col., 1976; 5) Panfili y col., 1976; 6) Kröner, 1990; 7) Jensen y col., 1989; 8) Brinley y col., 1978; 9) Matlib, 1985; 10) Buss y col., 1988; 11) Baydoun y col., 1990; 12) Kessar y Crompton, 1981; 13) Crompton y col., 1983.



5.2.- SALIDA DE CALCIO MITOCONDRIAL.

La mitocondria no puede retener cantidades ilimitadas de Ca^{2+} y, para evitar la calcificación de la misma, la velocidad de salida del Ca^{2+} debe ser comparable a la de captación. Hechos tales como que el proceso de captación sea electrogénico; que la actividad del gradiente sea menor que el predicho por la ecuación de Nernst y que el potencial de membrana es estable bajo condiciones fisiológicas, condujeron a la conclusión de la existencia de rutas distintas para la captación y salida de Ca^{2+} intramitocondrial, operando esta última de forma independiente del potencial de membrana. Han sido descritos dos sistemas de eflujo de Ca^{2+} , uno estimulado por Na^+ y otro independiente de éste.

En 1969 se tuvo la primera evidencia sobre la capacidad del Na^+ para disminuir la acumulación del Ca^{2+} en mitocondrias procedentes de tejido muscular (Dransfield y col., 1969). Posteriormente se demostró que el efecto del Na^+ (y también Li^+) era estimular la salida del Ca^{2+} preacumulado por las mitocondrias (Carafoli y col., 1974). Este fenómeno se atribuyó a la existencia de una ruta de salida de Ca^{2+} intramitocondrial distinta de la ruta de entrada, el transportador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Crompton y col, 1976a).

La capacidad del Na^+ en inducir el eflujo de Ca^{2+} planteó la duda de si tal eflujo provocaría movimientos de Na^+ , por lo que Crompton y col. (1976a) estudiaron los movimientos de Na^+ a través de las membranas mitocondriales. Observaron que, al incubarse las mitocondrias con Na^+ en ausencia de Ca^{2+} , el Na^+ se acumulaba en la matriz y, tras estimular la respiración mitocondrial, salía de la mitocondria para ser recaptado de nuevo. Sin embargo, si se preincubaban las mitocondrias con Ca^{2+} y se estimulaba la respiración, tras añadir Na^+ el movimiento de éste era hacia el interior mitocondrial y proporcional a la concentración de Ca^{2+} añadido.

La entrada de Na^+ al interior mitocondrial en intercambio con H^+ fue propuesta en el año 1967 en mitocondrias de hígado, y atribuida a la existencia de un intercambio Na^+/H^+ (Mitchell y Moyle, 1967). La existencia de este sistema de intercambio en

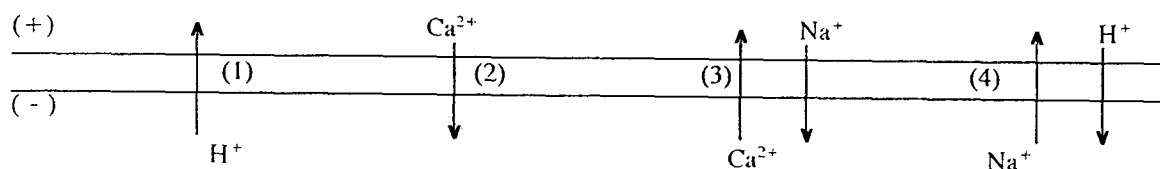


mitocondrias de corazón podría explicar la dependencia de energía para la salida de Na^+ intramitocondrial observada por Crompton y col. (1976a), ya que la respiración crea un gradiente de pH a través de la membrana interna, alcalino en el interior, por lo que podría ser establecido el intercambio entre Na^+ hacia el exterior mitocondrial y H^+ hacia el interior.

5.2.1. Intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

En un principio se pensó que la capacidad del Na^+ de inducir el eflujo del Ca^{2+} intramitocondrial era mediante la modulación del intercambio de Ca^{2+} por H^+ . Así pues, el intercambio global de 2H^+ por Ca^{2+} durante el estímulo de Na^+ era secuencial en el que intervendrían el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y el Na^+/H^+ .

Un segundo modelo hipotético sobre el papel del Na^+ , incluía a éste como sustrato del intercambio (Crompton y col., 1976a), implicando también al intercambio Na^+/H^+ , integrándolo en el circuito quimiosmótico de H^+ :



(1) bombeo de H^+ por respiración mitocondrial

(2) uniportador de Ca^{2+} ; (3) $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; (4) Na^+/H^+ .

El movimiento de Na^+ , Ca^{2+} y H^+ a través de la membrana mitocondrial interna da lugar al desacoplamiento entre la respiración y la fosforilación oxidativa.

Según el modelo de intercambio, el eflujo de Ca^{2+} intramitocondrial en contra del gradiente electroquímico del Ca^{2+} se produce gracias al gradiente del Na^+ creado



a través de la membrana mitocondrial interna y mantenido por el intercambio Na^+/H^+ (Crompton y Heid, 1978). La fuerza motriz para el intercambio es proporcionada por la diferencia entre el gradiente electroquímico de ambos cationes, Na^+ y Ca^{2+} , con una estequiometría de $n \text{Na}^+ : \text{Ca}^{2+}$ (Crompton, 1985) siendo necesaria la energía procedente de la respiración mitocondrial para la actividad del transportador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Crompton y col., 1976a). Este modelo, en el que se incluye al Na^+ como sustrato de intercambio, ha servido de base para los estudios del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Inicialmente se pensó que el transportador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ estaba presente únicamente en tejidos excitables (Crompton y col., 1978), pero posteriormente se demostró su presencia en tejidos no excitables como hígado o riñón, aunque en estos tejidos la capacidad del transportador es escasa por lo que presenta poca importancia funcional (Haworth y col., 1980).

Las mitocondrias procedentes de corazón y corteza adrenal son las que presentan la mayor actividad del transportador (Crompton y col., 1976a; 1978; Nicholls, 1978b). La eficacia del intercambio es intermedia en mitocondrias aisladas a partir de tejido adiposo, glándulas paratoideas y músculo esquelético, mientras que es relativamente baja en hígado, riñón y músculo íleo (Crompton y col., 1978; Nedergaard y Cannon, 1980; Haworth y col., 1980; Hefron y Harris, 1981).

El estudio y caracterización de este sistema ha sido realizado principalmente en mitocondrias de tejido cardiaco, donde la salida de Ca^{2+} independiente de Na^+ es muy lenta, representando tan solo un 2% del eflujo estimulado por Na^+ en condiciones fisiológicas (Hayat y Crompton, 1982; Crompton y col., 1978).

El papel fisiológico del transportador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en mediar la salida de Ca^{2+} intramitocondrial viene determinado por sus constantes cinéticas. La afinidad del intercambiador por sus sustratos Na^+ externo y Ca^{2+} interno podría determinar el papel del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en mantener reducida la concentración de Ca^{2+} en la matriz durante el ciclo del Ca^{2+} mitocondrial.

La velocidad de salida de Ca^{2+} estimulada por Na^+ extramitocondrial, presenta una dependencia sigmoideal de la concentración de Na^+ , lo que podría reflejar la



participación de más de un catión Na^+ en el proceso (Crompton y col., 1976b; Hayat y Crompton 1982).

El comportamiento cinético observado *in vitro* por varios autores, se correlaciona con modelos en los que se observa cooperatividad positiva, con un coeficiente de Hill entre 2 y 3. Comparando con la estequiometría $3 \text{Na}^+ : 1 \text{Ca}^{2+}$ del intercambio $\text{Na}^+ : \text{Ca}^{2+}$ de sarcolema (Pitts, 1979; Reeves y Sutko, 1980), es posible que la estequiometría sea mayor de 2, e incluso 3 y, por lo tanto, que el transportador se comporte de modo electrogénico (Hayat y Crompton, 1982; Crompton y col., 1976b, Crompton, 1985). Sin embargo, el valor empírico de n no puede usarse para diagnosticar la estequiometría del proceso puesto que además de no dar información sobre el número de iones Ca^{2+} intercambiados, la sigmoidicidad del intercambio puede ser influida por el procedimiento de purificación de las mitocondrias y condiciones de ensayo del intercambiador (Wolkowicz y col., 1983).

La concentración citoplásmica del ión Na^+ está dentro del intervalo óptimo para activar la salida de Ca^{2+} intramitocondrial, de forma que la concentración necesaria de Na^+ para estimular el intercambio $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ no perjudica la transducción de energía mitocondrial, ni la integridad de su estructura, incluso a concentraciones elevadas de Na^+ (20-120 mM) (Crompton 1985).

Este transportador actúa de modo asimétrico en la mitocondria, presentando mayor afinidad por el Na^+ externo y Ca^{2+} interno que sobre Na^+ interno y Ca^{2+} externo (Hayat y Crompton, 1982). Relacionando el intercambio $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ mitocondrial con el existente en membrana plasmática, Crompton (1985) postuló que el ATP matricial podría ser el responsable de esta asimetría, al igual que ocurre con el transportador de membrana plasmática, donde el ATP intracelular aumenta la afinidad del transportador por el calcio intracelular. Sin embargo, todavía no existe evidencia del papel del ATP matricial, pero podría ser el responsable de la mayor afinidad del intercambiador por el Ca^{2+} intramitocondrial.

La actividad del intercambiador es sensible al Ca^{2+} extramitocondrial. Estudios *in vitro* sobre la actividad del transportador revelaron la existencia de sitios reguladores



localizados en la superficie externa de la membrana mitocondrial interna para el Ca^{2+} , distintos de los sitios de unión del calcio como sustrato de transporte a través de la membrana. Así pues, existe una relación competitiva entre Na^+ y Ca^{2+} externos por su unión al transportador como sustratos de intercambio, mientras que la unión de Ca^{2+} al sitio regulador no es competitiva con respecto al Na^+ , disminuyendo la V_{max} del intercambio en un 70%. Además, la actividad del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es estimulada alostericamente por K^+ , mientras que dicho catión carece de efecto sobre la inhibición del intercambio por Ca^{2+} externo (Hayat y Crompton, 1982).

La actividad del transportador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es muy sensible a la concentración de H^+ en la matriz mitocondrial, de forma que cualquier cambio en el pH interno, puede contribuir a la regulación de los niveles de Ca^{2+} intramitocondriales (Baysal y col., 1991).

La inhibición del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ también se produce por lantánidos, siendo el transportador menos sensible que el uniportador (Crompton y Heid, 1978; Crompton y col., 1979).

El estudio sobre la modulación del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ha estado muy limitado debido a la inexistencia de inhibidores selectivos del intercambiador. Los datos más recientes sobre la modulación del intercambiador implican a fármacos agonistas o antagonistas del calcio, pero hasta ahora éstos son escasos e incluso algunos de ellos contradictorios (tabla 2).

Entre los antagonistas del calcio, diltiazem, prenilamina, verapamil y nifedipina inhiben el eflujo de Ca^{2+} estimulado por Na^+ con valores de IC_{50} en el orden μM . Estos actúan de forma selectiva sobre el intercambiador, sin afectar ni a la fosforilación oxidativa, ni al eflujo de Ca^{2+} estimulado por ionóforos ni al uniportador (Vaghy y col., 1982). De los fármacos mencionados, el más potente parece ser el diltiazem, que actúa de modo estereoespecífico. También ciertas benzodiazepinas (Clonazepam y Diazepam) inhiben el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ con valores de IC_{50} en el orden μM (Matlib y col., 1983; Chiesi y col., 1988).

TABLA 2.- MODULACION INTERCAMBIO $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

EFECTO	REFERENCIA
INHIBICION	
- $[\text{Ca}^{2+}]$ citoplásmico	1
- La^{3+}	2
- pH matricial > 7,5	3
- Fármacos:	
Diltiazem (IC ₅₀ = 7 μM)	4,5
Verapamil (IC ₅₀ = 150 μM)	4
Prenilamina (IC ₅₀ = 12 μM)	4
Clonazepan (IC ₅₀ = 6 μM)	5
Diazepan (IC ₅₀ = 40 μM)	5
Nifedipina (IC ₅₀ = 66 μM)	4
Nimodipina (IC ₅₀ = 98 μM)	6
Nitrendipina (IC ₅₀ = 28 μM)	6
Bepridil (IC ₅₀ = 11 μM)	7
ESTIMULACION	
- K^+	1
- Fármacos	
Bay K 8644	8
Nitrendipina (EC ₅₀ = 57 μM)	8
Agonistas β adrenérgicos	9

1)Hayat y Crompton, 1982; 2)Crompton y col., 1979; 3)Baysal y col.,1991; 4)Vaghy y col., 1982; 5)Matlib y col., 1983; 6)Buss y col., 1988; 7)Matlib 1985; 8)Baydoun y col., 1990; 9)Goldstone y Crompton, 1982.



Resultados posteriores sobre la acción de antagonistas del Ca^{2+} demostraron el efecto inhibitor de los derivados dihidropiridínicos nitrendipina y nimodipina, con valores de IC_{50} también en el orden μM . Sin embargo, no observaron efecto de verapamil sobre el intercambio (Buss y col., 1988).

Posteriormente, los resultados de Baydoun y col. (1990) sugirieron un efecto activador de nitrendipina sobre el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mientras que para el agonista Bay K 8644 fue descrito un efecto inhibitor.

Por último, el bepridil, derivado de arilalquilaminas, posee también un efecto inhibitor a concentraciones inferiores a las necesarias para inhibir la captación, por lo que también se supone que actúa directamente sobre el intercambiador (Matlib, 1985).

Al estudiar los movimientos de Ca^{2+} en mitocondrias procedentes de hígado, en presencia de agonistas β adrenérgicos, se observó una estimulación sobre el eflujo de Ca^{2+} en presencia de Na^+ mientras que no se observaba variación sobre el eflujo independiente de Na^+ . Estos estudios supusieron además una prueba adicional de que el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y el eflujo de Ca^{2+} independiente de Na^+ son rutas distintas (Goldstone y Crompton, 1982).

5.2.2. Salida de Ca^{2+} independiente de Na^+ .

Las mitocondrias que poseen una actividad del transportador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ muy baja, presentan un sistema de eflujo de Ca^{2+} independiente de Na^+ cuantitativamente importante. Por ello el estudio de este sistema de eflujo de Ca^{2+} ha sido realizado principalmente en hígado, y otros tejidos similares, debido a la escasa sensibilidad de las mitocondrias al Na^+ externo para producir salida de Ca^{2+} .

En un principio se pensó que este sistema se trataba de un intercambio electroneutro entre Ca^{2+} y H^+ con una estequiometría de 1:2 (Lehninger y col., 1978; Akerman, 1978b; Fiskum y Lehninger, 1979). Posteriormente se demostró que esta estequiometría sólo se observaba a pH próximo al fisiológico, y que la fuerza conductora del intercambio no era el gradiente de pH a través de la membrana



mitocondrial interna (Gunter y col., 1983).

Ante la ausencia de inhibidores específicos de este hipotético transportador, y la ineficacia del La^{+3} (Crompton y col., 1979), se postuló que el eflujo de Ca^{2+} independiente de Na^{+} no era mediado por un transportador.

Esta hipótesis fue defendida por quienes observaron que la intolerancia de las mitocondrias a la sobrecarga de Ca^{2+} , da lugar con el tiempo, a un cambio en las propiedades de permeabilidad de la membrana mitocondrial interna, llegando a ser permeables a solutos de bajo peso molecular, produciéndose el desacoplamiento, hinchamiento y pérdida de constituyentes de la matriz de bajo peso molecular además de la disipación del potencial de membrana. También se observó que una gran variedad de agentes potencian o disminuyen la sensibilidad de la matriz al Ca^{2+} (Beatrice y col., 1980).

Los cambios en la permeabilidad de la membrana se relacionaron con la acción de fosfolipasa A_2 dependiente de Ca^{2+} implicada en el ciclo de acilación/desacilación de los fosfolípidos de membrana (Beatrice y col, 1982).

Sin embargo no existe evidencia directa que indique que la salida de Ca^{2+} ocurra por la permeabilidad de la membrana interna, en adición es posible evitar el daño en la integridad de la mitocondrias in vitro, por ejemplo con agentes quelantes del Ca^{2+} como EGTA (Fiskum y Lehninger, 1979) y además se demostró que en presencia de rojo rutenio las mitocondrias permanecían impermeables y acopladas (Nicholls, 1978b).

Así pues, fue razonable pensar en la mediación de un transportador cuya función principal posiblemente no sea el transporte de Ca^{2+} (Crompton, 1985).



6.- CICLO DEL CALCIO MITOCONDRIAL.

Nicholls propuso una regulación cinética del ciclo del Ca^{2+} tratando de integrar los diferentes movimientos de Ca^{2+} (Nicholls, 1981). Para ello se basó en la suma algebraica de la tasa de salida de calcio inducida por sodio (hasta concentraciones relativas de Ca^{2+} en la matriz de $60 \mu\text{M}$), y la entrada de calcio a través del uniportador, que depende de la concentración de calcio citosólico. De sus cálculos se deduce que para una concentración de Ca^{2+} citosólica en el orden de $1 \mu\text{M}$, el balance de entrada y salida sería neutro, mientras que, para concentraciones de calcio citosólico mayores predominaría la ruta de entrada, y por el contrario, a concentraciones de calcio citosólico menores, predominaría la ruta de salida de calcio, volviendo las concentraciones de este ión a su punto de origen.

El ciclo del calcio modula la concentración del Ca^{2+} en la matriz mitocondrial, controlando de manera muy precisa la actividad de las deshidrogenasas claves del metabolismo mitocondrial que, a su vez controlan la actividad respiratoria mitocondrial y por tanto la producción de ATP mediante la fosforilación oxidativa.

7.- DIHIDROPIRIDINAS.

Desde mediados de la década de los 60 se sabía que ciertos fármacos poseían unos efectos peculiares sobre el acoplamiento excitación-contracción en corazón y músculo liso, ya que se comportaban como si en el medio no hubiese calcio y sus efectos inhibitorios se neutralizaban al aumentar la concentración extracelular del mismo. A partir de entonces se sintetizaron nuevos fármacos con efectos similares, existiendo actualmente un grupo heterogéneo con la característica común de inhibir los efectos del Ca^{2+} en diversos órganos y sistemas. Actualmente está demostrado y admitido que el efecto de todos estos fármacos se produce mediante la inhibición de la corriente de Ca^{2+} a través de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV), denominándose a estos fármacos antagonistas o bloqueadores del Ca^{2+} (Rampe y col.,



1985; Nowicky y col., 1985).

Las dihidropiridinas (DHP), difenilalquilaminas (DPA) y benzotiazepinas (BTZ) son selectivas de los CCDV, por lo que han sido ampliamente utilizados en el estudio de las propiedades farmacológicas y funcionales de los CCDV en tejidos neuronales y no neuronales. Se ha demostrado que el grupo de los derivados DHP son los más potentes y eficaces en todos los modelos estudiados (Advenier y col., 1984; Spedding, 1985; Flaim y col., 1985; Gandía y col., 1987).

Mediante estudios de fijación de radioligandos se describió la presencia de un sitio de unión específico de alta afinidad para DHP ubicado en la membrana plasmática y asociado a los CCDV en los diversos tejidos estudiados, tanto en tejidos musculares (Ferry y Glossmann, 1982) como neurosecretores (Ballesta, 1990).

Recientemente se ha demostrado que las DHP, además de su interacción con el canal de calcio tipo L, también interaccionan con otros receptores presentes en diferentes organelas celulares (tabla 3) aunque a concentraciones mucho mayores.

Los estudios de fijación de [^3H]DHP han permitido identificar en varios tejidos, además del sitio de alta afinidad, un segundo sitio de baja afinidad no caracterizado farmacológicamente en diferentes órganos y tejidos como corazón (Sarmiento y col., 1987), cerebro (Janis y col., 1984) y células PC12 (Kunze y col., 1987). En un principio se pensó que este nuevo sitio de fijación era el candidato ideal para mediar los efectos de nitrendipina que no podían ser explicados únicamente por su interacción con los canales de calcio tipo-L (Zernig y col., 1988).

Recientemente, utilizando [^3H]nitrendipina como ligando, estos sitios de baja afinidad han sido caracterizados y localizados en mitocondrias de corazón (Brush y col., 1987); hígado, riñón (Zernig y Glossmann, 1988) y médula adrenal (Ballesta y col., 1990).

En la mayoría de los sitios intracelulares de interacción con DHP, esta acción ha sido estudiada sólo mediante experiencias funcionales o estudios de fijación de radioligandos, por lo tanto es necesaria la correlación entre ambos tipos de estudios para una perfecta caracterización.



TABLA 3.- EFECTO DE DIHIDROPIRIDINAS SOBRE ESTRUCTURAS DIFERENTES A LOS CCDV.

ESTRUCTURA	EFEECTO	REFERENCIA
- Calmodulina	Inhibición	1,2
- Fosfodiesterasa de AMPc (dependiente de calmodulina)	Inhibición	3-5
- ATPasa Na ⁺ /K ⁺	Activación	6
- Ca ²⁺ -ATPasa	Activación	7
- Glucoproteína P (de resistencia a fármacos)	Marcaje con [³ H]azidopina	8
- Intercambio Na ⁺ /Ca ²⁺ mitocondrial	Inhibición	9
- Receptor BTZ periférico (mitocondrial)	Inhibición fijación de radioligandos	10
- Transportador de nucleótidos	Inhibición	11

1) Bostron y col., 1981; 2) Zimmer y Hofmann, 1987; 3) Epstein y col., 1982; 4) Norman y col., 1983; 5) Schaechtele y col., 1987; 6) Pan y Janis, 1984; 7) David-Duflho y col., 1984; 8) Safa y col., 1987; 9) Vaghy y col., 1982; 10) Cantor y col., 1984 ; 11) Striessnig y col., 1985.



7.1.- CARACTERIZACION DEL RECEPTOR DIHIDROPIRIDINICO MITOCONDRIAL.

Mediante centrifugación diferencial y gradientes de sacarosa se demostró que este receptor se localiza concretamente en la membrana mitocondrial interna (Zernig y Glossmann 1988; Ballesta y col., 1990).

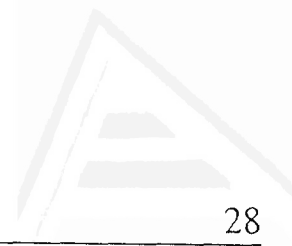
Los estudios de fijación en equilibrio determinaron los parámetros que definen la unión de [³H]nitrendipina a su receptor. Este se denomina de **baja afinidad y alta capacidad** debido a que la fijación de nitrendipina posee una constante de disociación (Kd) elevada, en el orden submicromolar o incluso submilimolar, y una densidad de receptores (Bmax) muy elevada, unas mil veces superior a lo sitios de alta afinidad (Zernig y Glossmann, 1988; Ballesta y col., 1990).

Mediante estudios cinéticos de fijación se comprobó que la unión de [³H]nitrendipina al receptor de baja afinidad presenta cinéticas de asociación y disociación monoexponenciales (Zernig y Glossmann, 1988; Ballesta y col., 1990), por lo que aparentemente el modo de interacción DHP-receptor se corresponde con una reacción bimolecular simple de pseudoprimer orden (Weiland y Molinoff, 1981).

Otra característica que lo define es la **termoestabilidad**, ya que el precalentamiento de las membranas mitocondriales a temperaturas elevadas no altera la fijación de [³H]nitrendipina (Zernig y Glossmann, 1988; Ballesta y col., 1990), lo que podría indicar que estos sitios son estructuras rígidas, por la posible presencia de un gran número de puentes disulfuro en su estructura (Zernig y Glossmann, 1988; Zernig, 1990).

La fijación de [³H]nitrendipina presenta una marcada **dependencia de fuerza iónica** (Brush y col., 1987; Zernig y Glossmann, 1988; Ballesta y col., 1990). La **dependencia de pH** varía según los autores, siendo el pH óptimo de la fijación de 6 en presencia de fuerza iónica alta (Ballesta y col., 1990) mientras que en mitocondrias cardíacas, la fijación de [³H]nitrendipina presenta una dependencia de pH en forma concava con un mínimo a pH 7 (Zernig y Glossmann, 1988).

La interacción de DHP con el receptor dihidropiridinico (DHP_r) de baja afinidad



no presenta diferencias de afinidad entre isómeros puros de distintos derivados DHP en los diferentes tejidos estudiados, lo que sugiere que la unión de DHP al receptor mitocondrial se realiza de manera no estereoselectiva, (Brush y col., 1987; Zernig y Glossmann, 1988; Ballesta y col., 1990), al contrario de lo que ocurre en el DHPr asociado a los CCDV.

La fijación de [3H]nitrendipina aumenta ligeramente en presencia de cationes ($\text{La}^{3+} > \text{Cd}^{2+} > > \text{Co}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$..) y aniones como NO_3^- , Cl^- mientras que PO_4^{3-} y SO_4^{2-} inhiben ligeramente la unión (Zernig y Glossmann, 1988).

Otra característica del DHPr mitocondrial es la ausencia de modulación por benzotiazepinas (diltiazem), observado tanto en tejido neuronal (Ballesta y col., 1990) como no neuronal (Brush y col., 1987; Zernig y Glossmann, 1988). Sin embargo las fenilalquilaminas (verapamil) inhiben la unión de manera alostérica, reduciendo la afinidad del ligando por su receptor pero sin modificar el número de receptores (Zernig y Glossmann, 1988). Mediante estudios cinéticos se demostró que la disminución en la afinidad es consecuencia de un aumento en la constante cinética de disociación de nitrendipina al receptor (Ballesta y col., 1990).

La ausencia de la modulación por benzotiazepinas de la fijación de radioligandos y/o de la función correspondiente al sistema estudiado se ha atribuido a las condiciones experimentales y no a la ausencia de este sitio de unión (Zernig, 1990).

Los nucleótidos de piridina y purina también inhiben de forma alosterica no competitiva la fijación de [3H]nitrendipina al DHPr mitocondrial, siendo el ATP y ADP los más activos con valores de IC_{50} en el orden μM (Zernig y col., 1988). Mediante estudios cinéticos, el ATP disminuye la constante de velocidad de asociación y enlentece la disociación del complejo, resultando en una ligera disminución de la constante de disociación, coincidiendo con los experimentos realizados en equilibrio (Zernig y col., 1988). A pesar de que la unión de nitrendipina al receptor mitocondrial es modulado por nucleótidos, los mismos autores demostraron que el DHPr no estaba asociado con el complejo enzimático ATPasa ni con el transportador de ADP/ATP existentes en la membrana mitocondrial interna.



A partir de las características expuestas del DHP_r mitocondrial y comparadas con el receptor DHP asociado a los CCDV (tabla 4), se descarta el hecho de que se trate de dos subpoblaciones diferentes de un mismo receptor ya que presentan claras diferencias bioquímicas y farmacológicas en los diferentes tejidos estudiados.

TABLA 4.- CARACTERISTICAS DE LOS RECEPTORES DIHIDROPIRIDINICOS.

	ALTA AFINIDAD	BAJA AFINIDAD
Kd	nM	μ M
Bmax	fmol mg ⁻¹	pmol mg ⁻¹
Temperatura	sensible	resistente
Estereoselectividad	si	no
Regulación de la fijación:		
- α -Glucosidasa	sensible	resistente
- Tripsina	sensible	sensibilidad relativa
- Cationes divalentes	+	+
- Diltiazem	< Kd	0
- Verapamil	> Kd	> Kd
- Fuerza iónica	0	+
- pH	> 7	< 7
- Nucleótidos de adenina	0	+

Referencias utilizadas para la elaboración de la tabla: Ehlert y col (1982); Janis y col. (1984); Bolger y Skolnick (1986); Brush y col. (1987); Zernig y col. (1988); Ballesta y col. (1990). Se representa con (+) y (0) a la presencia y carencia de efecto respectivamente.



El sitio de unión mitocondrial para DHP ha sido solubilizado por extracción con CHAPS (Hidalgo, 1991), siendo necesaria la presencia de fuerza iónica alta y estabilizantes como asolectina con el fin de mantener un mayor porcentaje tanto de proteína recuperada como de sitios de fijación de [³H]nitrendipina.

En estas condiciones, los parámetros cinéticos de asociación, disociación y constante de disociación en equilibrio se mantienen similares a los de membrana mitocondrial nativa (Hidalgo, 1991).

La purificación parcial del DHPr mitocondrial se llevó a cabo mediante cromatografía de filtración en gel y posterior cromatografía de afinidad con amlodipina. Se detectó una banda mayoritaria de 52 kDa de peso molecular mediante la electroforesis correspondiente a las fracciones purificadas .

Paralelamente, el análisis electroforético de las membranas mitocondriales nativas fotoactivadas con [³H]PN 200-110 demostró la presencia de distintos polipéptidos. Entre éstos tan sólo el marcaje correspondiente al polipéptido de 50kDa era desplazable con nitrendipina no marcada, mientras que en otros polipéptidos de pesos moleculares de 170, 65, 52, 41 33 y 20 kDa, el marcaje se desplazó parcialmente en presencia de nitrendipina. Esto sugirió que, dado el carácter hidrofóbico de las DHP, éstas se unirían inespecíficamente a otras proteínas de la membrana mitocondrial.

La coincidencia de pesos moleculares entre los polipéptidos de 50-52 kDa obtenidos tras marcaje por fotoactivación de membranas nativas con el obtenido tras la cromatografía de afinidad, sugirió que se trataba de la misma proteína y que ésta pudiera ser el lugar donde las DHP ejercen su acción con mayor afinidad y especificidad, formando parte del DHPr (Hidalgo, 1991).



7.2.- IMPORTANCIA FUNCIONAL DEL RECEPTOR DIHIDROPIRIDINICO MITOCONDRIAL.

En los últimos años se ha demostrado la capacidad que tienen los antagonistas del calcio para acumularse en el interior celular, y poder ejercer acciones secundarias sobre sitios internos de las células musculares como por ejemplo sobre el retículo sarcoplásmico. Puesto que las DHP son sustancias altamente hidrofóbicas, se acumulan principalmente en compartimentos hidrofóbicos tales como el interior del plasmalema y otras membranas celulares (Lüllman y col., 1979; Pang y Sperelakis, 1983) interaccionando sobre diferentes estructuras celulares y ejerciendo diferentes efectos, pero a concentraciones muy altas y muy alejadas de la concentración necesaria para actuar sobre los CCDV.

Probablemente, el mejor argumento a favor de la importancia de los sitios de unión de baja afinidad para antagonistas del calcio sea el obtenido en estudios clínicos. Concretamente, en los casos de isquemia se producen lesiones tisulares irreversibles debidas en gran parte a un incremento excesivo de la concentración intracelular de Ca^{2+} , que altera el control del Ca^{2+} intracelular por parte de las organelas subcelulares y repercute concretamente en la integridad estructural y funcional de las mitocondrias, y por tanto, en las necesidades energéticas celulares.

Recientemente se ha demostrado que periodos cortos de anoxia, inferiores a 30 minutos, tienen graves consecuencias sobre la función mitocondrial, dando lugar al cese del transporte electrónico y, como consecuencia, a la pérdida del gradiente de potencial de membrana, desacoplamiento mitocondrial y, por tanto, alteración de todos los sistemas de transporte en las mitocondrias, destacando entre ellos al uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (Aw y col., 1987a).

Recientemente se ha demostrado que la disminución del contenido en Ca^{2+} , produce una inhibición de la actividad ATPasa, repercutiendo sobre la gran mayoría de funciones celulares dependientes de energía (Aw y col., 1987b).

Por otro lado, los antagonistas del calcio, además de sus efectos sobre los



CCDV que determinan sus propiedades hipotensoras, antiarrítmicas, etc., poseen ciertos efectos citoprotectores que pueden ser de gran utilidad en el tratamiento de patologías isquémicas (Henry y col., 1977; Wolkowicz y col., 1983; Kloner y col., 1987). Así, en isquemias experimentales, los antagonistas del calcio pueden reducir el tamaño del área de necrosis y prevenir los cambios postisquémicos, que se postuló que eran debidos a una disminución del consumo de oxígeno.

En los últimos años, se han presentado datos que apuntan la posibilidad de que los antagonistas del calcio puedan jugar un papel importante en la modulación de los movimientos de Ca^{2+} mitocondriales (Vaghy y col., 1982; Buss y col., 1988). Además, se ha demostrado recientemente la presencia de lugares específicos de unión para antagonistas del Ca^{2+} en mitocondrias (Brush y col., 1987; Zernig y Glossmann, 1988; Ballesta y col., 1990).

Debido a la importancia del Ca^{2+} a nivel celular y más concretamente a nivel mitocondrial, los antagonistas del calcio, podrían tener un importante valor terapéutico a nivel de su interacción con el DHPr mitocondrial.

Recientemente ha sido descrito un canal aniónico en la membrana mitocondrial interna (IMAC) (Garlid y Beavis, 1986; Beavis y Garlid, 1987) cuyo papel fisiológico fue relacionado por los mismos autores con el estrés isquémico. En la patología isquémica, el bombeo de H^+ hacia el exterior mitocondrial limita al uniportador mitocondrial de Ca^{2+} , sin embargo la permeabilidad de aniones a la matriz a través del IMAC, anularía cualquier restricción teórica sobre el acúmulo de Ca^{2+} .

Bajo ciertas condiciones experimentales, Zernig y col. (1990) intentaron relacionar el DHPr mitocondrial con este canal, dado el papel protector de los antagonistas del calcio sobre el daño isquémico, ya que la inhibición del IMAC podría prevenir el daño estructural mitocondrial por sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial, recuperando así las mitocondrias su tamaño normal.

Sin embargo, el papel modulador de los antagonistas del Ca^{2+} sobre el ciclo del Ca^{2+} mitocondrial (Vaghy y col., 1982), sugiere la idea de que el receptor dihidropiridinico mitocondrial esté asociado con el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.



8.- LA CELULA CROMAFIN COMO MODELO EXPERIMENTAL.

La médula adrenal constituye uno de los modelos catecolaminérgicos mejor estudiado por ser el mayor acúmulo de células cromafines del organismo. La importancia de estas células radica en que su función principal es la síntesis, almacenamiento y liberación de catecolaminas al torrente sanguíneo (Burgoyne, 1984).

La síntesis de catecolaminas se realiza en el citoplasma y vesículas cromafines, a través de una vía multiseccional en la que están implicadas una serie de enzimas entre los que destaca tirosina hidroxilasa por ser el que cataliza el paso limitante del proceso (Levitt y col., 1965).

El acúmulo de catecolaminas tiene lugar en las vesículas cromafines, desde donde son liberadas al exterior celular mediante un mecanismo de exocitosis, proceso por el cual el contenido intravesicular es secretado al espacio extracelular tras la fusión de las membranas vesiculares y plasmática (de Robertis y Vaz Ferreira, 1957).

La secreción de catecolaminas en las células cromafines se produce por un mecanismo denominado "acoplamiento excitación-secreción" (Douglas y Rubin, 1961) que consiste en una serie de acontecimientos que ocurren entre la llegada del mensaje excitatorio a la célula y la descarga del contenido vesicular al torrente sanguíneo.

Entre los mecanismos que gobiernan el acoplamiento excitación-secreción en células cromafines, el aumento de concentración intracelular de calcio, producido por el influjo de los iones calcio al citoplasma desde el medio extracelular a través de los CCDV, juega un papel crucial en dicho proceso (Ceña y col., 1983; Garcia y col., 1984; Gandía y col., 1987).

Los procesos de captación de Ca^{2+} y secreción de catecolaminas en la célula cromafin adrenomedular bovina son modulados por DHP (Ceña y col., 1983; Garcia y col., 1984) por lo que se sugirió la existencia de un DHPr acoplado a los CCDV en médula adrenal.



8.1.- RECEPTORES DIHIDROPIRIDINICOS PRESENTES EN LA CELULA CROMAFIN.

Mediante aislamiento y purificación de las distintas fracciones subcelulares de médula adrenal bovina y estudios de fijación de radioligandos, se detectó y caracterizó un receptor **DHP de alta afinidad ubicado en la membrana plasmática**, con un valor de Kd en el intervalo nM y baja densidad de receptores (Ballesta y col., 1990).

Los valores de Kd obtenidos mediante estudios de fijación de radioligandos, se hallan muy próximos a los valores de IC₅₀ de nitrendipina sobre la inhibición del influjo de Ca²⁺ evocada por despolarización con K⁺ en células cromafines de médula adrenal bovina, por lo que se sugirió la asociación de dicho receptor con los CCDV tipo L presentes en estas células (Ballesta y col., 1990). Estos datos son coincidentes con los descritos en otros tejidos ya que las propiedades del receptor de membrana plasmática de las células cromafines, están en concordancia con las propiedades del receptor de alta afinidad definidas en los diferentes tejidos (Ballesta y col., 1990). Por otro lado, estudios electrofisiológicos demostraron la modulación por derivados DHP sobre los CCDV tipo L en células cromafines (Artalejo y col., 1991).

El segundo sitio denominado de **baja afinidad**, se localizó en la **membrana mitocondrial interna** con valores de Kd en el intervalo μ M y una elevada densidad de receptores (Ballesta y col., 1990).

Con respecto al receptor DHP mitocondrial, hasta ahora sólo había sido descrito en tejidos no neuronales, y las propiedades que lo definen en médula adrenal no difieren de las propiedades del DHPr mitocondrial de tejidos no neuronales (Zernig y Glossmann, 1988).

Al igual que en los demás tejidos estudiados, el DHPr mitocondrial y el de membrana plasmática de médula adrenal bovina, presentan claras diferencias en sus constantes cinéticas y sus propiedades bioquímicas y farmacológicas, apoyando la idea de que se trate de entidades completamente diferentes.



Sin embargo la importancia funcional y la estructura a la que pueda estar asociada el DHPr mitocondrial sigue todavía sin determinarse. Recientemente se ha demostrado que el calcio procedente de los almacenes intracelulares, entre los que se encuentran las mitocondrias, no está implicado en la secreción de catecolaminas en las células cromafines (Kim y Westhead, 1989). Por otro lado, el papel fisiológico del DHPr mitocondrial adrenomedular, podría tener lugar sobre los movimientos de calcio mitocondriales, y mas concretamente estar asociado al transportador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, debido a la acción moduladora de los antagonistas del calcio sobre dicho transportador (Vaghy y col., 1982; Buss y col., 1988), o tal vez, debido al papel modulador del Ca^{2+} mitocondrial sobre las tres deshidrogenasas de la matriz y sobre la fosforilación oxidativa, la modulación del transporte de Ca^{2+} por parte de las DHP podría repercutir sobre el metabolismo, no descartandose por tanto un posible papel metabólico, aunque indirecto, de las DHP.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

OBJETIVOS



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



En la célula cromafín adrenomedular bovina existen dos sitios de unión para los derivados dihidropiridínicos. Mediante su unión al receptor de alta afinidad localizado en la membrana plasmática y asociado al canal de calcio tipo L, las DHP ejercen su acción moduladora sobre el proceso secretor de catecolaminas.

Sin embargo, se desconoce la importancia funcional del sitio de unión de baja afinidad para los derivados dihidropiridínicos localizado en la membrana mitocondrial interna de dichas células.

El objetivo general de la presente memoria es la caracterización funcional del receptor dihidropiridínico de mitocondrias de médula adrenal bovina, para lo cual nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

- 1.- Caracterización de los sistemas de transporte de Ca^{2+} mitocondriales.
- 2.- Modulación de los sistemas de transporte de Ca^{2+} mitocondriales por diferentes fármacos bloqueantes y activadores del Ca^{2+} .
- 3.- Estudios de fijación de [^3H]nitrendipina en mitocondrias intactas de médula adrenal bovina.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

MATERIAL Y METODOS



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



1.- AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS.

Para el aislamiento de mitocondrias se utilizaron entre 10 y 15 glándulas adrenales obtenidas de reses bovinas recién sacrificadas en un matadero local. Las glándulas extraídas se mantuvieron en hielo hasta la llegada al laboratorio.

Todo el procedimiento de aislamiento se realizó a 4°C, siguiendo el protocolo descrito por Ballesta y col., (1990). El aislamiento comenzó limpiando la grasa periadrenal, disecando y troceando las médulas. Seguidamente, se sumergieron en 6 volúmenes (peso húmedo:volumen) de tampón de homogenización (sacarosa 0,32 M, EDTA 1 mM, BSA 0,5 mg/ml, Tris/ClH 50 mM pH 7,2) y se homogenizaron dos veces en un homogenizador Polytron (Kynematica GmbH, Suecia) ajustado a 4 durante 15 segundos, con un intervalo de 2 minutos entre cada homogenización.

El homogenizado se centrifugó a 1.000xg durante 15 minutos en una centrífuga refrigerada (Beckman J2 21). El sobrenadante resultante se centrifugó a 9.800xg durante 15 minutos. De esta segunda centrifugación se descartó el sobrenadante, y el precipitado se resuspendió en 10 ml de tampón de homogenización, y se sometió a un gradiente discontinuo de sacarosa (5 ml de precipitado resuspendido: 15 ml de sacarosa 1,6 M) durante una hora a 100.000xg en una ultracentrífuga (Beckman L8 70) con el fin de separar mitocondrias de las vesículas cromafines. La interfase 0,32 M:1,6 M. (fracción mitocondrial) se resuspendió en tampón de ensayo (manitol 220 mM, sacarosa 70 mM, BSA libre de ácidos grasos 0,5 mg/ml, ClK 30 mM, Tris/ClH 50 mM, pH 7,2) y se centrifugó 2 veces a 9.800xg durante 15 minutos realizando el primer lavado en presencia de EDTA 1 mM, y el segundo lavado en su ausencia. El precipitado final se resuspendió en el mínimo volumen posible (1-1,5 ml) de tampón de ensayo, manteniéndose a 4°C hasta el momento de su utilización (figura 1).

El rendimiento obtenido durante este proceso fue del orden de 5 mg de proteína por gramo de médula.

Todos los experimentos en los que se utilizaron mitocondrias, fueron realizados el mismo día de su aislamiento.

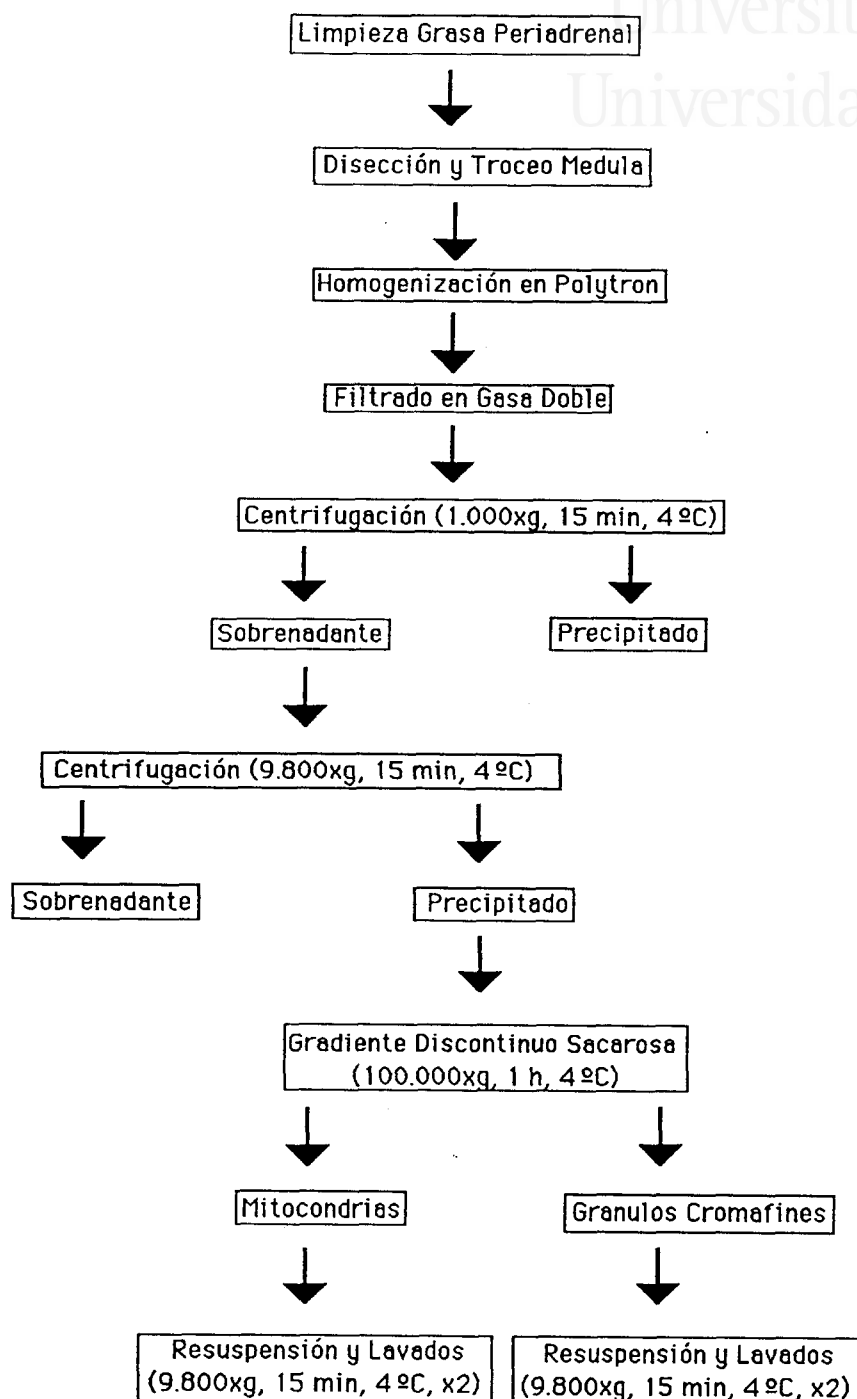


FIGURA 1.- PROTOCOLO DE AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS, MEMBRANAS MITOCONDRIALES Y GRANULOS CROMAFINES.



2.- AISLAMIENTO DE MEMBRANAS MITOCONDRIALES.

Para la preparación de los distintos lotes de membranas, se utilizaron de 15 a 20 glándulas. Se siguió el mismo protocolo que para el aislamiento de mitocondrias, con las siguientes variaciones:

- 1.- Los tampones utilizados contenían iodoacetamida 2 mM y fenilmetilsulfonyl fluoruro (PMSF) 0,1mM como inhibidores de proteasas.
- 2.- La homogenización se realizó en tampón Tris/ClH 50 mM, sacarosa 0,32 M pH 7,4. Se homogenizó tres veces en un homogenizador Polytron ajustado a 4 durante 15 segundos, con intervalos de 2 minutos entre cada una de ellas.
- 3.- El procedimiento de centrifugación fue el mismo que el descrito en el apartado anterior. Se lavó 2 veces la interfase resultante del gradiente discontinuo de sacarosa con Tris/ClH 50 mM pH 7,4. Siendo éste el tampón de resuspensión de las membranas mitocondriales.
- 4.- Las membranas mitocondriales se conservaron a -80°C hasta su utilización.

El rendimiento obtenido fue de 1,5 a 3 mg de proteína por gramo de médula.

3.- AISLAMIENTO DE GRANULOS CROMAFINES.

El aislamiento de los gránulos cromafines se llevó a cabo paralelamente al aislamiento de las mitocondrias, utilizando el mismo tampón de homogenización y de ensayo.

A partir del gradiente discontinuo de sacarosa, se separaron las mitocondrias de los gránulos cromafines, quedando la fracción mitocondrial en la interfase de sacarosa 0,32 M:1,6 M y los gránulos en el precipitado (figura 1).

La resuspensión y lavados de la fracción granular se llevó a cabo tal y como se describe para las mitocondrias. El precipitado final se resuspendió en 3-4 ml de tampón de ensayo, manteniéndose igualmente a 4°C hasta el momento de ser utilizados, siempre durante el mismo día de su aislamiento.



El rendimiento obtenido durante este proceso fue del orden de 15 mg por gramo de médula.

La determinación de proteínas se realizó utilizando el método de Lowry (Lowry y col., 1951), empleando BSA como proteína estándar.

4.- MOVIMIENTOS DE CALCIO MITOCONDRIALES.

El estudio de los movimientos de Ca^{+2} se realizó utilizando $^{45}\text{Ca}^{+2}$ como trazador ($1,4 \mu\text{Ci } ^{45}\text{Ca}/\text{ml}$). El tampón de captación en el que se realizaron los experimentos de captación y salida de Ca^{+2} consistió en tampón de ensayo suplementado con los siguientes sustratos: succinato 5 mM, rotenona $4 \mu\text{M}$, ADP $16 \mu\text{M}$, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,2 mM y acetato potásico 10 mM.

4.1.- CAPTACION DE CALCIO.

Las mitocondrias se incubaron en tampón de captación (1 mg/1 ml, volumen final) durante 5 minutos a 25°C y con agitación constante.

La captación comenzó añadiendo al medio Ca^{2+} $25 \mu\text{M}$. A tiempos cortos crecientes se tomaron alícuotas de 0,1 ml y se filtraron mediante vacío a través de filtros de fibra de vidrio Whatmann GF/C, que seguidamente se lavaron 2 veces con 2 ml de tampón de lavado frío (Tris/ClH 50 mM pH 7,2).

La radioactividad que quedó retenida se cuantificó sumergiendo a continuación los filtros en 4 ml de líquido de centelleo, y se midió en un contador de centelleo líquido Beckman LS 2800 durante un minuto, expresándose los resultados en cpm y transformados posteriormente a nmoles de Ca^{2+}/mg de proteína.

El análisis de los datos experimentales resultantes del estudio cinético sobre los movimientos de Ca^{2+} se realizó analizando los datos mediante la ecuación:

$$[\text{Ca}]_i = ([\text{Ca}]_i)_{\text{eq}} (1 - e^{-kt})$$



en la que $[Ca]_i$ corresponde a el Ca^{2+} captado en un tiempo t , $([Ca]_i)_{eq}$ representa el Ca^{2+} intramitocondrial cuando el proceso alcanza el equilibrio, y k la constante de velocidad. La linearización de los datos experimentales se realizó de acuerdo a una cinética de pseudoprimer orden según la siguiente ecuación:

$$\frac{\ln (([Ca]_i)_{eq} - ([Ca]_i))}{([Ca]_i)_{eq} - ([Ca]_i)} = K_{obs} t$$

donde K_{obs} es la pendiente de la recta.

Los parámetros cinéticos del uniportador de Ca^{2+} (V_{max} y K_m) se obtuvieron mediante el ajuste y análisis de los datos experimentales mediante la ecuación de Michaelis-Menten que fueron linearizados posteriormente mediante la ecuación de Eadie-Hofstee

$$v = - K_m (v/[S]) + V_{max}$$

Para estudiar el efecto de los bloqueantes y activadores del calcio sobre los movimientos de Ca^{2+} , las mitocondrias (1mg/ml) se incubaron a 25°C con distintas concentraciones de los fármacos estudiados durante 15 minutos, previamente a la adición del Ca^{2+} al medio de ensayo. En el caso de fármacos dihidropiridínicos, los ensayos se realizaron con luz de sodio utilizando tubos de vidrio. Los derivados dihidropiridínicos se disolvieron en dimetilsulfoxido (DMSO), y a partir de una solución concentrada (10 mM), se prepararon las distintas disoluciones de forma que la concentración de DMSO en el medio de captación nunca fue superior al 1%, concentración que no afecta al influjo y retención de Ca^{2+} por mitocondrias, tal como se estableció en controles previos.

El número de experimentos $n=2$, representados en la sección de resultados y discusión, corresponde a aquellos en los que el error estandar de la media no superó el 10%.



4.2.- BLOQUEO DE LA CAPTACION.

Tras la captación de Ca^{2+} , se midió el contenido del mismo acumulado por las mitocondrias, bloqueando seguidamente el uniportador de calcio con el colorante rojo rutenio $2 \mu\text{M}$ en combinación con ADP $16 \mu\text{M}$. Se tomaron alícuotas de $0,1 \text{ ml}$ a distintos tiempos que se filtraron y lavaron como se acaba de describir, midiendo de esta forma el Ca^{2+} que quedaba retenido por las mitocondrias tras el bloqueo del uniportador de Ca^{2+} .

4.3.- SALIDA DE CALCIO INTRAMITOCONDRIAL.

Para estudiar el eflujo de Ca^{+2} , se incubaron las mitocondrias (1 mg/ml) en tampón de captación, durante 5 minutos a 25°C . En estos experimentos se utilizó una concentración de Ca^{2+} de $50 \mu\text{M}$. El periodo de captación se eligió en función del tiempo en el que el influjo de Ca^{+2} se hallara en estado estacionario y del nivel de Ca^{+2} acumulado (superior al 50% del Ca^{+2} añadido), quedando finalmente establecido en 2 minutos.

Seguidamente se bloqueó el uniportador de Ca^{+2} con rojo rutenio $2 \mu\text{M}/\text{ADP } 16 \mu\text{M}$ (RR/ADP) durante 2 minutos, tras los cuales se tomó un alícuota de $0,1 \text{ ml}$ para determinar el contenido en Ca^{2+} intramitocondrial previo a la estimulación del eflujo.

A continuación, se estimuló el intercambiador con $\text{Na}^+ 15 \text{ mM}/\text{EDTA } 0,1 \text{ mM}$ y se tomaron alícuotas de $0,1 \text{ ml}$ a tiempos cortos crecientes, que se filtraron seguidamente mediante vacío a través de filtros de fibra de vidrio Whatmann GF/C y se lavaron 2 veces con 2 ml de tampón de lavado frío, sumergiéndolos seguidamente en 4 ml de líquido de centelleo y midiendo la radioactividad que quedó retenida en los filtros de la misma forma que se ha descrito en el apartado de captación.

En el caso del estudio del eflujo de Ca^{2+} independiente de Na^+ , la salida de Ca^{2+} se estimuló mediante la adición de H^+ al medio de ensayo. Para ello se empleó tampón PIPES 50 mM. Tras los dos minutos de bloqueo del uniportador de Ca^{2+} , se adicionaron alícuotas de ClH 0,1 M, midiendo igualmente el Ca^{2+} intramitocondrial a distintos tiempos.

Los parámetros cinéticos del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, fueron calculados a partir de la representación directa de los datos experimentales analizados según la ecuación transformada de Michaelis-Menten, asumiendo que el intercambiador presenta más de un sitio de unión para el Na^+ :

$$v = (V_{\max} [\text{Na}^+]^n) / ((K_m) + [\text{Na}^+]^n)$$

en la que n representa el valor de la pendiente de la curva.

Los datos experimentales se ajustaron a la ecuación de Hill:

$$\log(v/V_{\max}-v) = \log K_{0,5} + n \log([\text{Na}^+])$$

donde n (la pendiente de la recta) corresponde al coeficiente de Hill y expresa el grado de cooperatividad de la reacción.

Así mismo, los datos experimentales fueron transformados a la representación de Scatchard: .

$$v/ [\text{Na}^+] = (V_{\max}/K_m) - (1/K_m)v$$

Para estudiar el efecto de los diferentes fármacos sobre la salida de Ca^{2+} mitocondrial, se siguió el protocolo descrito en el apartado 4.1, midiendo el Ca^{2+} que permanece acumulado en las mitocondrias tras 10 minutos de estímulo con Na^+ 20 mM/EDTA 0,1 mM. Los resultados obtenidos en cpm fueron ajustados directamente mediante regresión no lineal, a la ecuación clásica de la curva dosis-respuesta, y posteriormente transformados a nmoles de Ca^{2+} /mg de proteína. A partir de la ecuación se obtuvieron los valores de IC_{50} de los fármacos y la inhibición máxima ejercida sobre dicho sistema.



5.- CONSUMO DE OXIGENO.

La actividad respiratoria de las mitocondrias se realizó con un electródo de oxígeno de Clark acoplado a un registrador LKB 2210, ajustado a una velocidad de carta de 10 mm/min.

La respuesta del electrodo de oxígeno se calibró con el tampón de ensayo: manitol 220 mM, sacarosa 70 mM, BSA libre de ácidos grasos 0,5 mg/ml, ClK 30 mM en Tris/ClH 50 mM pH 7,2, suplementado con rotenona 4 μ M, acetato 10 mM y fosfato 0,2 mM. La calibración del electrodo se realizó midiendo el porcentaje de saturación de O₂ en 4 ml de este tampón contenido en una cubeta de vidrio herméticamente cerrada y con agitación suave y constante. La lectura del 0% de oxígeno se obtuvo mediante la adición al medio de ditionito sódico (Na₂S₂O₄).

Tanto la calibración del electrodo de O₂ como el estudio de la respiración mitocondrial se llevó a cabo a 37°C. Las medidas del consumo de oxígeno comenzaron introduciendo el electrodo en la cubeta de vidrio que contenía 4 ml de medio de incubación descrito. Seguidamente, se añadieron las mitocondrias (1mg/ml), manteniéndose siempre en agitación suave y constante.

Tras 2 minutos de incubación, la respiración mitocondrial se inició con la adición al medio de succinato 5 mM, como sustrato de la cadena de transporte electrónico.

Una vez estabilizado el registro, se añadió al medio de incubación ADP/Mg²⁺ 0,4 mM, pasando la el consumo de oxígeno mitocondrial al estado 3 ó estado activo de la respiración. El índice de respiración mitocondrial se obtuvo de la relación de los estados 3 y 4 de la respiración, constituyendo ésta una medida del acoplamiento entre fosforilación oxidativa y respiración mitocondrial.

Para estudiar el efecto del ciclo del Ca²⁺ sobre la respiración mitocondrial, se siguió el mismo protocolo que el descrito para estudiar los movimientos de Ca²⁺. La cadena de transporte electrónico se estimuló con la adición de succinato, añadiendo a continuación Ca²⁺ (50 μ M) rojo rutenio (2 μ M) y Na⁺ 20 mM/EDTA 0,1 mM.

Todos los sustratos se añadieron al medio de ensayo utilizando microjeringas y cada adición se realizó una vez estabilizado el registro.

Para estudiar el efecto de nitrendipina (20 μM) sobre la respiración mitocondrial, las mitocondrias (1mg/ml) se preincubaron con dicho fármaco durante 15 minutos a 37°C antes de introducir el electrodo en la cubeta de vidrio y comenzar la medida del consumo de O_2 .

El contenido de O_2 en el tampón de ensayo, fue calculado siguiendo el método descrito por Estabrook (1967), expresando los resultados en nmoles de O_2 consumidos $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$.

Para comparar las velocidades de consumo de oxígeno obtenidas, tras las diferentes adiciones al medio de ensayo, se determinó si las diferencias observadas entre las pendientes registradas, eran estadísticamente significativas, analizando la relación entre las medias de dos muestras pequeñas mediante el test modificado de la t-student, calculando t :

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{S\sqrt{1/n_1 + 1/n_2}}$$

donde S corresponde a la estimación de la desviación estandar basada en ambas muestras conjuntamente y calculadas mediante:

$$S^2 = \frac{\sum (x - \bar{x}_1)^2 + \sum (x - \bar{x}_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Posteriormente, se comprobó en las tablas de la t de Student, la significación del valor calculado con $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad.



6.- ESTUDIOS DE FIJACION DE [³H]NITRENDIPINA .

En los experimentos de desplazamiento, los distintos fármacos se preincubaron con las mitocondrias (1 mg/1 ml, volúmen final) y [³H]nitrendipina (4 nM), en el tampón de incubación Tris/ClH 50 mM pH 7,2 conteniendo: manitol 220 mM, sacarosa 70 mM, BSA 0,5 mg/ml, ClK 30 mM, succinato 5 mM, rotenona 4 μM, PO₄H₂K 0,2 mM y acetato 10 mM.

Tras una hora de incubación, las muestras se colocaron en un baño de hielo durante 5 minutos. A continuación se diluyeron con 2 ml de tampón de lavado frío (Tris/ClH 50 mM pH 7,2) y se filtraron y lavaron 2 veces con 2,5 ml del mismo tampón frío, aplicando vacío a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C. La cuantificación de la radioactividad retenida se realizó sumergiendo los filtros en 4 ml de líquido de centelleo. Seguidamente se midió en un contador de centelleo líquido Beckman LS 2800 durante 5 minutos, expresándose los resultados en cpm.

La fijación inespecífica se definió en presencia de nitrendipina no marcada 20 μM.

Los parámetros de la unión en equilibrio de [³H]nitrendipina, constante de afinidad (Kd) y densidad de receptores (Bmax), fueron calculados directamente a partir de los experimentos de desplazamiento de la fijación de [³H]nitrendipina por nitrendipina no marcada (DeBlasi y col., 1989), basándose en la ecuación de Cheng y Prussoff y, suponiendo que la afinidad de ambos ligandos, marcado y no marcado es la misma, la Kd se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$Kd = IC_{50} - L$$

siendo L la concentración [³H]nitrendipina. A partir de la ley de acción de masas ($B_{max} = B_0(Kd + L)/L$) y sustituyendo el valor de la Kd, la densidad de sitios de fijación se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:



$$B_{\max} = B_0 I C_{50} / L$$

siendo B_0 , la diferencia entre la fijación máxima y mínima. Este método asume que sólo existe una clase de receptor y que no existe cooperatividad.

Los parámetros que definen el efecto de los fármacos estudiados sobre dicha fijación, fueron calculados mediante regresión no lineal, ajustando los datos experimentales a la ecuación clásica de la curva dosis-respuesta, obteniendo así la constante de inhibición (K_i), el efecto máximo (en %) y la pendiente de las curvas (n).

MATERIALES

[^3H]nitrendipina (actividad específica entre 70 y 87 Ci/mmol) fue suministrada por New England Nuclear.

$^{45}\text{Ca}^{2+}$ (actividad específica 2m Ci/ml) fue suministrada por Amershan.

La nitrendipina, PN 200-110, nimodipina y demás derivados DHP fueron cedidos amablemente por el profesor F.Hoffmeister de la compañía Bayer AG (Wuppertal, Alemania), la amlodipina fue donada por el Central Research de los laboratorios PFIZER (Sandwich, Kent. Reino Unido).

El resto de materiales y reactivos fueron de grado analítico suministrados por Sigma, Merck o Bio-Rad.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

RESULTADOS Y DISCUSION



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



1.- PUESTA A PUNTO DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES.

La caracterización de los sistemas de transporte de Ca^{2+} mitocondriales varía según el tejido de origen, el procedimiento empleado para el aislamiento de las mismas y del medio de captación utilizado.

Con respecto al aislamiento de las mitocondrias procedentes de médula adrenal bovina, se siguió el protocolo de homogenización con polytron, tal y como se describe en la sección de Material y Métodos, ya que previamente se comprobó la imposibilidad de homogenizar dicho tejido mediante el uso de homogenizador de tipo potter teflon-vidrio.

Adicionalmente, la capacidad de captación y retención de Ca^{2+} por parte de las mitocondrias depende a su vez de diversos factores externos, por ello, el primer objetivo a cubrir fue determinar la composición del medio de ensayo para estudiar y caracterizar los sistemas de transporte de Ca^{2+} en mitocondrias de médula adrenal bovina y, en las mismas condiciones, comprobar la integridad funcional de las mismas mediante medidas de consumo de O_2 .

Para ello, se empleó un medio isoosmótico previamente caracterizado por varios autores (Carafoli y col., 1974; Crompton y col., 1978; Hefron y Harris, 1981) constituido por manitol 220 mM, sacarosa 70 mM en tampón Tris/ClH 50 mM pH 7,2, suplementado con BSA libre de ácidos grasos (0,5 mg/ml) y ClK 30 mM, medio que se utilizó para homogenizar y conservar las mitocondrias hasta el momento de su uso.

La adición de BSA libre de ácidos grasos al medio de ensayo, se realiza generalmente con el fin de favorecer su unión a los ácidos grasos y lisofosfolípidos, y prevenir de esta forma, los efectos que éstos producen sobre la permeabilidad de la membrana y sobre el desacoplamiento de la respiración mitocondrial (Moore y col., 1983). Por otro lado, se ha descrito que la capacidad de captura de Ca^{2+} de las mitocondrias aisladas a partir de la homogenización con polytron (método empleado en esta memoria) y el tiempo en el que las mismas pueden estar almacenadas a 4°C sin deteriorarse, se prolonga con la presencia de BSA en el medio (Allshire y



Heffron, 1983). El ClK se utilizó con el fin de favorecer el eflujo Ca^{2+} , ya que actúa como activador alostérico de la salida del mismo estimulada por Na^+ (Rizzuto y col., 1987).

Este medio ha de ser suplementado con sustratos de la cadena de transporte electrónico o con ATP, para estimular experimentalmente la captación de Ca^{2+} en mitocondrias, ya que ésta es inducida alternativamente por la respiración mitocondrial o bien mediante la hidrólisis de ATP (Carafoli, 1982).

Cuando se utiliza succinato, se favorece además la retención posterior de Ca^{2+} , siendo óptima si se combina con rotenona (Lehninger y col., 1978), puesto que de esta forma se evita la reoxidación de sustratos endógenos y se asegura el inicio del transporte electrónico en el momento de la adición de succinato. El intervalo de concentración de succinato óptimo para la captación de Ca^{2+} , fue establecido entre 3 y 6 mM (Harris, 1977), mientras que la concentración adecuada de rotenona está comprendida entre 1 y 4 μM (Rottenberg y Scarpa, 1974; Becker y col., 1980).

El pH del medio de captación también juega un papel importante en los sistemas de transporte en mitocondrias de todos los tejidos estudiados, y se ha descrito que el pH óptimo oscila en el intervalo comprendido entre 7 y 7,4 (Carafoli y col., 1974; Harris, 1977; Crompton y col., 1978). Mediante controles previos, se determinó un pH óptimo de 7,2 para realizar el estudio de los movimientos de Ca^{2+} con mitocondrias adrenales.

Paralelamente se comprobó que las mitocondrias aisladas y almacenadas a 4°C, concentradas en el mínimo volumen posible del medio de ensayo (30-35 mg/ml), se conservaban mejor y respondían a los estímulos utilizados para la captación de Ca^{2+} durante periodos de tiempo mas largos, incluso al día siguiente de haber sido purificadas. Sin embargo, no fueron nunca utilizadas transcurridas 10 h de su aislamiento.

En todos los experimentos control que a continuación se describen, se mantuvieron constantes la temperatura (25°C), el pH (7,2), la concentración de Ca^{2+} (25 μM) y la concentración de proteína (1 mg/ml), siendo el sustrato utilizado para



inducir la captación de Ca^{2+} , succinato 5 mM suplementado con rotenona $4 \mu\text{M}$.

1.1.- FACTORES EXTERNOS QUE INFLUYEN SOBRE EL TRANSPORTE DE Ca^{2+} .

La presencia de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ y/o acetato en el medio de captación es necesaria para aumentar experimentalmente la capacidad de captura de Ca^{2+} por las mitocondrias (Rossi y Lehninger, 1963; Lehninger, 1974). El $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ forma cristales amorfos de hidroxiapatita en la matriz durante períodos de tiempo indefinidos, por lo que aumenta también la capacidad de retención de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial y además, influye sobre la actividad del uniportador de Ca^{2+} aumentando su velocidad de captura del mismo (Crompton y col., 1983). Sin embargo, el acúmulo en exceso de Ca^{2+} puede producir daño irreversible a nivel estructural y funcional de las mitocondrias (Carafoli, 1982).

El anión acetato tiene la capacidad de permear a través de la membrana mitocondrial, reduciendo el pH interno y disminuyendo la unión del Ca^{2+} a sitios internos, formando de este modo complejos solubles con el Ca^{2+} , evitando la precipitación interna (Rottenberg y Scarpa, 1974) y favoreciendo la capacidad de acumular Ca^{2+} .

Por otro lado, los nucleótidos de adenina son acumulados por las mitocondrias junto con el Ca^{2+} y $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, estabilizando los cristales de hidroxiapatita en la matriz mitocondrial. De esta forma contribuyen a aumentar la capacidad de captura y retención del Ca^{2+} en la matriz, siendo el ADP mucho mas efectivo que el ATP y AMP en prolongar el tiempo de retención del Ca^{2+} en el interior mitocondrial (Carafoli y col., 1965).

El estudio de las concentraciones adecuadas de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, acetato y ADP, así como la combinación de todos ellos, constituyó la base para hallar las condiciones idóneas de captación de Ca^{2+} .



En primer lugar se determinó la concentración de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ necesaria para obtener un buen nivel de captación de Ca^{2+} . La concentración máxima de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ utilizada fue 2 mM; no se utilizaron concentraciones superiores debido a que concentraciones próximas a 2 mM pueden favorecer el eflujo del Ca^{2+} acumulado (Carafoli, 1982). Este efecto se ha relacionado con sustratos asociados a NAD para generar la fuerza protomotriz inductora de la captación de Ca^{2+} (Chudapongse, 1976) y, por otro lado, se ha observado que dicho efecto depende del pH, siendo mínimo a valores de pH superiores o igual a 7,2 (Wolkowicz y McMillin-Wood, 1981).

Se midió el contenido en Ca^{2+} intramitocondrial en las condiciones experimentales establecidas anteriormente, utilizando como sustrato generador de la fuerza inductora de la captación de Ca^{2+} al succinato (asociado a FAD) en un medio ajustado a pH 7,2. Los resultados mostraron (figura 2) una clara diferencia entre la captación en ausencia ($5,4 \text{ nmoles de Ca}^{2+} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) y presencia de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ (superior a $38 \text{ nmoles de Ca}^{2+} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), de forma que incluso la menor concentración empleada ($50 \mu\text{M}$) fue suficiente para aumentar 7 veces el nivel de Ca^{2+} acumulado.

La concentración de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ elegida fue de 0,2 mM, ya que por un lado había sido descrito por Crompton y col., (1983) que la adición al medio de captación de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,2 mM, no interfería con la actividad del uniportador, y por otro, se alejaba de las concentraciones de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ descritas (superiores o igual a 2 mM) que interferían sobre la capacidad de retención del Ca^{2+} acumulado y sobre el acúmulo de cargas masivas de Ca^{2+} (superior a $500 \text{ nmoles de Ca}^{2+}/\text{mg}$ de proteína), perjudiciales para la integridad estructural y funcional de las mitocondrias (Vickers y Dowdall, 1976; Nicholls, 1978b).

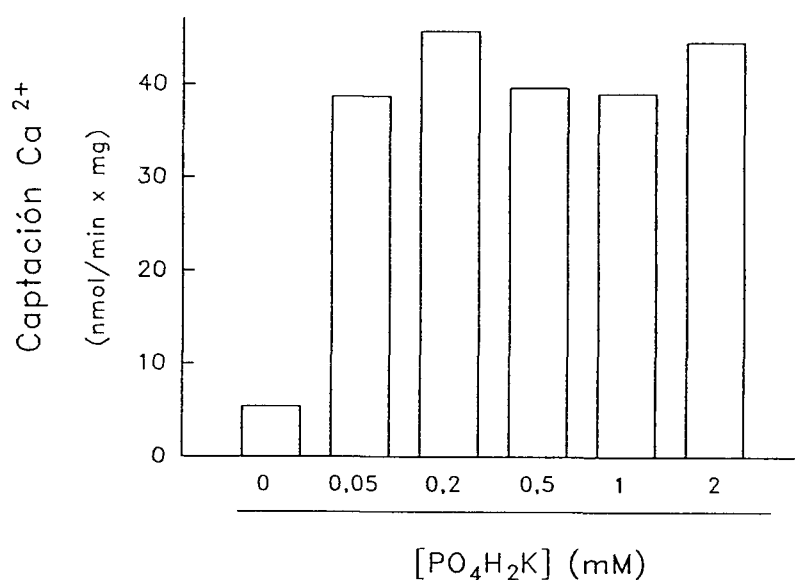


FIGURA.2- EFECTO DE PO₄H₂K SOBRE LA CAPTACION DE Ca²⁺.

Las mitocondrias (1 mg/ml) se incubaron durante 5 minutos a 25°C en 0,5 ml de tampón de homogenización suplementado con succinato 5 mM y rotenona 4 μM, al que se añadió PO₄H₂K (0,05-2 mM). A continuación se añadió Ca²⁺ 25 μM y se midió el contenido en Ca²⁺ intramitocondrial a los 10 segundos, siguiendo el protocolo experimental descrito en la sección de Material y Métodos. La figura representa los datos correspondientes a dos experimentos realizados por duplicado con lotes diferentes de mitocondrias.



Una vez fijada la concentración de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ (0,2 mM), se realizó la captación de Ca^{2+} en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de ADP (10-100 μM) midiendo el contenido intramitocondrial de Ca^{2+} a los 10 segundos de comenzar la captación. En la figura 3 se puede observar que el efecto del ADP sobre la captación de Ca^{2+} fue dependiente de concentración, presentando su efecto máximo, a partir de 50 μM .

Por otro lado, el ADP no sólo aumenta la capacidad de retención del Ca^{2+} en la matriz mitocondrial, sino que también actúa como inhibidor del eflujo de Ca^{2+} en mitocondrias procedentes de tejidos excitables (Vitorica y Satrústegui, 1985). Debido a que el objetivo de la presente memoria fue caracterizar los movimientos de Ca^{2+} mitocondriales, tanto de influjo como de eflujo, se buscaron las condiciones de ensayo en las que, se consiguiera aumentar experimentalmente la capacidad de captura de Ca^{2+} sin interferir sobre el eflujo del mismo. Por lo tanto, la elección de la concentración de ADP se basó también en dicho efecto inhibidor sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, siendo la concentración de ADP elegida (16 μM) muy inferior la concentración de ADP a partir de la cual el ADP ejerce su máximo efecto inhibidor (0,3 mM) (Vitorica y Satrústegui, 1985).

Como se mencionó al principio de este apartado, la presencia de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ y/o acetato favorecía la capacidad de captura Ca^{2+} y retención del mismo en la matriz mitocondrial. Una vez que quedaron establecidas las concentraciones de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ y ADP en el medio de captación, el siguiente paso en este estudio fue la incorporación al medio de ensayo de acetato potásico 10 mM. Se eligió dicha concentración en base a los datos existentes en la bibliografía, en la que las concentraciones de acetato utilizadas oscilaron entre 5 y 10 mM (Nicholls, 1978a; Rizzuto y col., 1987).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

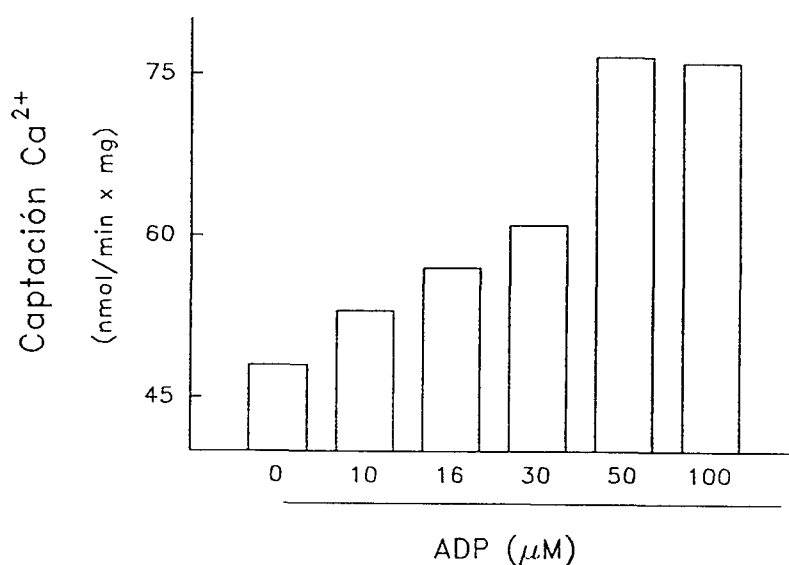


FIGURA 3.- EFECTO DE ADP SOBRE LA CAPTACION DE Ca^{2+} .

Las mitocondrias (1mg/ml) se incubaron durante 5 minutos a 25°C en 0,5 ml de tampón de homogenización suplementado con succinato 5 mM, rotenona 4 μM y $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,2 mM al que se añadió ADP (10-100 μM). Se siguió el mismo protocolo experimental descrito en la figura 2. La figura representa los datos correspondientes a dos experimentos realizados por duplicado con lotes diferentes de mitocondrias.



El siguiente control consistió en la medida del Ca^{2+} intramitocondrial en presencia o ausencia de acetato 10 mM, manteniendo constante la concentración de ADP (16 μM) en el medio de captación. Como se observa en la tabla 5, el acúmulo de Ca^{2+} en presencia de cualquiera de los dos aniones permeantes, no mostró diferencias significativas en cuanto al porcentaje de Ca^{2+} acumulado (74% en presencia de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ y 79% en presencia de acetato), mientras que la combinación de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ y acetato aumentó ligeramente la capacidad de captura de Ca^{2+} , llegando a acumular un 90% del Ca^{2+} añadido.

Sin embargo, se ha descrito que la combinación de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ (1,67 mM) y acetato (20 mM) disminuye el eflujo basal de Ca^{2+} (Wolkowicz y Mc Millin-Wood, 1981) en condiciones experimentales en las cuales se obtenía el mayor eflujo de Ca^{2+} estimulado por $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$,

TABLA 5.- CAPTACION DE Ca^{2+} .

ADICION	Captación de Ca^{2+} (%)
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,2 mM	47
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,2 mM + ADP 16 μM	74
————— + ADP 16 μM + Acetato 10 mM	79
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,2 mM + ADP 16 μM + Acetato 10 mM	90

Las mitocondrias (1mg/1ml, volumen final) se incubaron durante 5 minutos a 25°C en manitol 220 mM, sacarosa 70 mM, ClK 30 mM, BSA libre de ácidos grasos 0,5 mg/ml suplementado con succinato 5 mM y rotenona 4 μM . Se representa el porcentaje de Ca^{2+} acumulado por las mitocondrias tras 1 minuto, con respecto al Ca^{2+} añadido (25 μM). Los resultados son la media de 2 experimentos independientes y realizados por duplicado con diferentes lotes de mitocondrias.



En base a estos resultados, se realizó el estudio sobre la capacidad de retención de Ca^{2+} en función del tiempo, en presencia y ausencia de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,2 mM en un medio de captación suplementado con acetato potásico 10 mM.

Al estudiar el Ca^{2+} que permanecía acumulado a los 5 minutos de bloquear el uniportador (figura 4), se apreció una clara diferencia según estuviese o no presente $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,2 mM. El acetato favorece el transporte de Ca^{2+} hacia el interior mitocondrial, pero por sí solo no presentó la capacidad de mantenerlo retenido en la matriz, de forma que, como se puede apreciar en la figura 4, tras 5 minutos de bloqueo, se perdió un 63% del Ca^{2+} captado, mientras que la combinación de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,2 mM y acetato potásico 10 mM favoreció la retención del 87% del Ca^{2+} acumulado transcurridos 5 minutos de haber bloqueado el uniportador, coincidiendo con los resultados obtenidos previamente por Wolkowicz y McMillin-Wood (1981).

La composición del medio de ensayo para estudiar los movimientos de entrada y salida de Ca^{2+} en mitocondrias procedentes de médula adrenal bovina, quedó finalmente constituido como se refleja en la tabla 6.

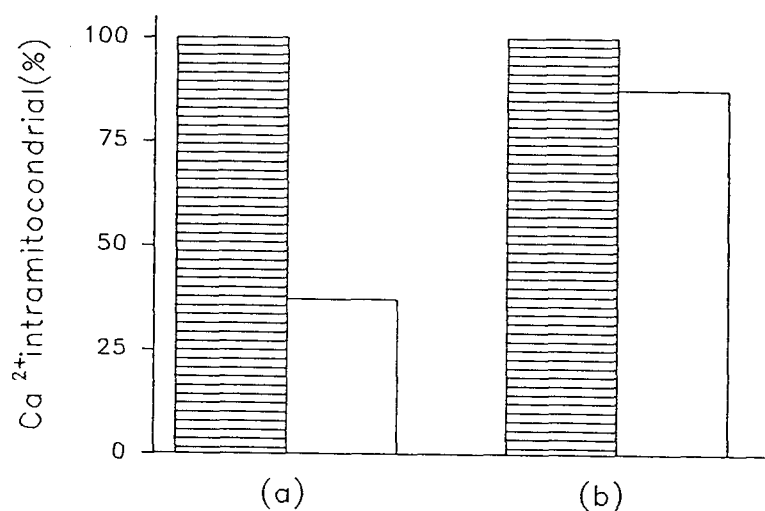


FIGURA 4.- RETENCION DEL Ca²⁺ ACUMULADO.

Se incubaron las mitocondrias (1 mg/ml, volumen final) durante 5 minutos a 25°C en el tampón de homogenización suplementado con succinato 5 mM, rotenona 4 μ M, ADP 16 μ M y acetato 10 mM, en ausencia (a) y presencia (b) de PO₄H₂K 0,2 mM. La concentración de Ca²⁺ utilizada fue 25 μ M.

Tras 2 minutos de captación de Ca²⁺ se bloqueó el uniportador de Ca²⁺ con RR 2 μ M/ADP 16 μ M. Se representa el porcentaje de Ca²⁺ retenido por las mitocondrias transcurridos 5 minutos de bloqueo del uniportador de Ca²⁺ (□) con respecto al acumulado tras 2 minutos de captación (▨), midiendo el contenido de Ca²⁺ intramitocondrial como se describe en Material y Métodos.

Los datos corresponden a un experimento realizado por duplicado.



TABLA 6.- MEDIO OPTIMO DE CAPTACION.

TAMPON DE ENSAYO:

Manitol 220 mM
Sacarosa 70 mM
CIK 30 mM
BSA (libre de ácidos grasos) 0,5 mg/ml
Tris/ClH 50 mM pH 7,2

SUSTRATOS:

Succinato 5 mM
Rotenona 4 μ M
PO₄H₂K 0,2 mM
ADP 16 μ M
Acetato potásico 10 mM



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



2.- CAPTACION DE Ca^{2+} .

La caracterización del uniportador de Ca^{2+} se llevó a cabo en primer lugar, mediante el estudio cinético del proceso de captación de Ca^{2+} en las condiciones previamente establecidas. Para ello, se incubaron las mitocondrias (1mg/ml) a 25°C durante 5 minutos en el medio de ensayo descrito en la tabla 6, añadiendo para comenzar la captación el Ca^{2+} (25 μM) y midiendo el contenido intramitocondrial del mismo a tiempos cortos crecientes.

Como se observa en la figura 5 el proceso alcanzó el equilibrio aproximadamente tras 2 minutos de iniciar la captación. La transformación lineal de los datos experimentales, mostró un comportamiento cinético monoexponencial, siendo lineal ($r^2 > 0.98$) durante los 30 primeros segundos (figura 5 inserto).

Si se compara con el comportamiento cinético de las mitocondrias procedentes de diferentes tejidos, se podría concluir que las mitocondrias de cerebro son las que presentan mayor actividad del uniportador de Ca^{2+} (el proceso de captación alcanza el equilibrio aproximadamente a los 20 segundos) mientras que las mitocondrias adrenales, estarían en concordancia con las procedentes de tejido cardiaco, en las que la captación de Ca^{2+} se equilibra aproximadamente a los 5 minutos de iniciar el proceso (Davidoff, 1974; Nicholls, 1978b).

A continuación se estudió la dependencia de la velocidad de captación del uniportador con la concentración de Ca^{2+} extramitocondrial, midiendo el contenido en Ca^{2+} intramitocondrial en la fase lineal del proceso, a los 5 segundos de iniciar la captación.

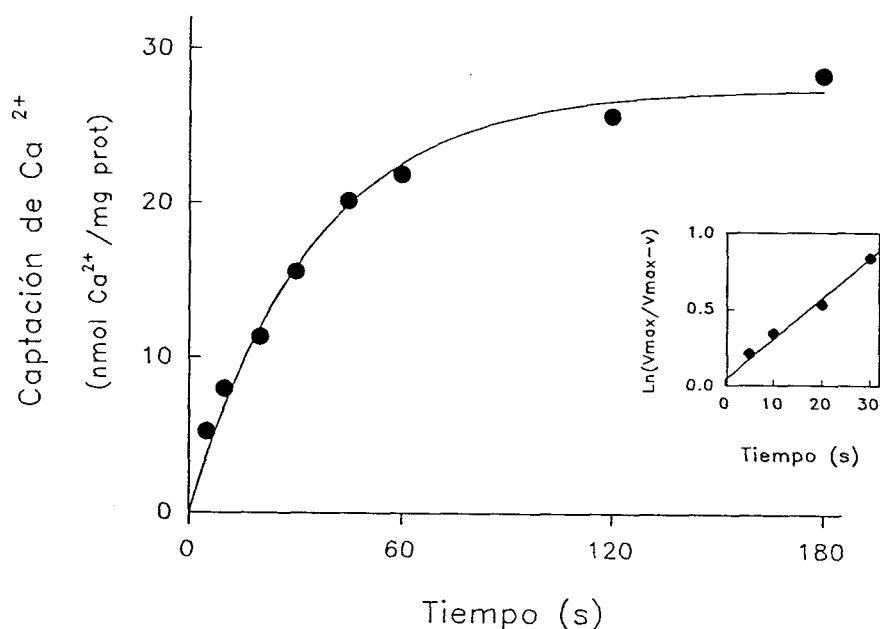


FIGURA 5.- CINETICA DE CAPTACION DE Ca²⁺.

Se incubaron las mitocondrias (1 mg/1 ml, volúmen final) a 25°C durante 5 minutos en el tampón de captación descrito en la tabla 7. Se añadió al medio 25 μ M Ca²⁺ tomando alícuotas de 0,1 ml a tiempos cortos crecientes siguiendo el protocolo experimental descrito en la sección de Material y Métodos.

Inserto: Transformación lineal de los datos ($r^2 > 0,9$) de acuerdo a la ecuación integrada de pseudoprimer orden que se refleja en la sección de Material y Métodos. Los resultados corresponden a la media de dos experimentos realizados por duplicado con diferentes lotes de mitocondrias.



Los datos experimentales se ajustaron mediante la ecuación de Michaelis y Menten (figura 6), y a partir de la representación directa de los mismos se pudo apreciar una relación hiperbólica entre la actividad del uniportador y la concentración extramitocondrial de Ca^{2+} . Mediante la transformación lineal de los datos experimentales a la ecuación de Eadie Hofstee (figura 6 inserto), se obtuvieron los parámetros cinéticos que caracterizan al uniportador de Ca^{2+} , $K_m = 20,9 \pm 3,2 \mu\text{M}$ y $V_{\text{max}} = 148,1 \pm 7,2 \text{ nmoles Ca}^{2+} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

La relación hiperbólica obtenida está en concordancia con los datos existentes en mitocondrias procedentes de tejido cardíaco (Crompton y col., 1976b) y de hígado (Affolter y Carafoli, 1981). Sin embargo, en otros estudios se ha observado una relación sigmoidea (Scarpa y Graziotti, 1973b; Bygrave, 1978). Dicha relación coincidió con la presencia de Mg^{2+} en el medio de captación, y se asoció a una interacción competitiva entre Mg^{2+} y Ca^{2+} por su unión al uniportador (Reed y Bygrave, 1975). También se explicó la relación de sigmoidicidad mediante la descripción de dos sitios de unión para el Ca^{2+} sobre el uniportador (Vinogradov y Scarpa, 1973).

La K_m del uniportador por el Ca^{2+} en mitocondrias procedentes de médula adrenal es ligeramente superior a los valores de K_m descritos previamente en mitocondrias cardíacas (K_m 10-15 μM) (Crompton y col., 1976 b; Nicholls y Crompton 1980); sin embargo, están en concordancia con los datos recientemente publicados en los que se describe un intervalo más amplio de valores de K_m , oscilando entre 5 y 30 μM , dependiendo del tejido del que procedan las mitocondrias y de la composición del medio de captación (Richter y Kass, 1991).

Con respecto a los valores de V_{max} descritos en los diferentes tejidos estudiados, éstos varían según el método empleado en la homogenización del tejido durante el aislamiento de las mitocondrias. Así, en mitocondrias obtenidas mediante disección mecánica del tejido, como por ejemplo utilizando polytron, los valores de V_{max} oscilaron entre 280-600 $\text{nmol Ca}^{2+} \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Crompton y col., 1976b; Vercesi

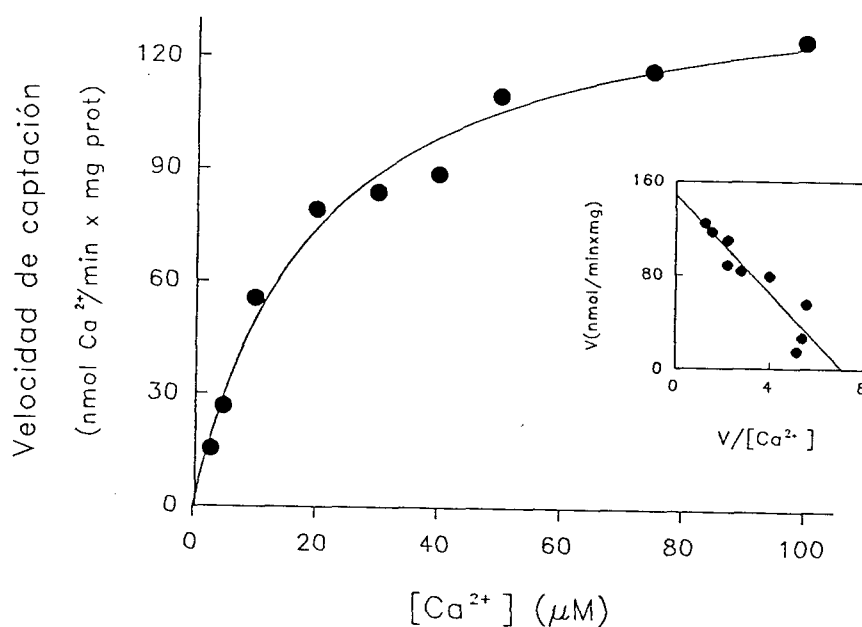


FIGURA 6.- INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE Ca²⁺ EXTERNO SOBRE LA VELOCIDAD DE CAPTACION.

Las mitocondrias (1 mg/ml) se incubaron en 0,5 ml de tampón de captación. Se añadió al medio concentraciones crecientes de Ca²⁺ (3-100 μM). Siguiendo el protocolo experimental descrito en la sección de Material y Métodos, se midió el Ca²⁺ acumulado a los 5 segundos de iniciar la captación. Los datos experimentales se ajustaron mediante la ecuación de Michaelis y Menten.

Inserto: transformación lineal ($r^2 > 0,98$) de los datos mediante la representación de Eadie-Hofstee. Los parámetros se describen en el texto.

Los datos representados corresponden a la media de cuatro experimentos realizados en duplicado con diferentes lotes de mitocondrias.



y col., 1978; McMillin-Wood y col., 1980); mientras que si el método empleado consistía en la digestión enzimática del tejido, las mitocondrias parecen ser más activas, con valores de V_{max} comprendidos entre 400-1770 $\text{nmol Ca}^{2+} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Vercesi y col., 1978; McMillin-Wood y col., 1980).

Así, la V_{max} (148,1 $\text{nmoles Ca}^{2+} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) del uniportador de Ca^{2+} de mitocondrias procedentes de médula adrenal, obtenidas mediante homogenización del tejido con polytron, están en concordancia con los valores de V_{max} obtenidos en mitocondrias aisladas mediante homogenización mecánica del tejido.

2.1.- Captación de Ca^{2+} en gránulos cromafines.

La fracción mitocondrial procedente de médula adrenal no constituye una fracción absolutamente pura debido a la contaminación de gránulos cromafines (Ballesta, 1989). Por lo tanto, se realizaron experimentos de captación en gránulos cromafines purificados con el fin de determinar si existía alguna contribución significativa por parte de ellos sobre los parámetros cinéticos obtenidos.

Las mitocondrias y los gránulos cromafines se separaron mediante un gradiente discontinuo de sacarosa (ver apartado de Material y Métodos). El precipitado resultante de dicho gradiente, se denominó fracción de gránulos ya que en ésta, las vesículas cromafines se purificaron unas 20 veces a partir del sobrenadante de 800xg, mientras que el grado de purificación de las mismas obtenido en la fracción mitocondrial es de aproximadamente 4 veces (Ballesta, 1989).

La fracción de gránulos fue resuspendida en el mismo tampón que las mitocondrias. El protocolo experimental, medio de ensayo y sustratos utilizados para medir el influjo de Ca^{2+} en gránulos cromafines, así como la concentración de proteína y de Ca^{2+} empleadas, fueron idénticas a las empleadas para estudiar el uniportador de Ca^{2+} en mitocondrias.

En las condiciones en las que las mitocondrias presentan una capacidad para acumular entre un 80 y 90% del Ca^{2+} añadido (ver figura 5), la captación de la fracción granular pura (1 mg/ml, volumen final), nunca superó el 4% del Ca^{2+} añadido, incluso transcurridos 10 minutos de captación (figura 7).

Por otro lado, las condiciones experimentales idóneas para la captación de Ca^{2+} en mitocondrias, descritas en el apartado anterior, no coinciden con las condiciones óptimas de captación en gránulos cromafines descritas por varios grupos (Kostron y col., 1977; Phillips, 1981; Niedermaier y col., 1981; Burger y col., 1984; Haigh y Phillips, 1989). Existen diferencias de temperatura óptima, ausencia de ATP, presencia de rotenona y velocidad de captación de Ca^{2+} ; de este modo, se puede descartar una influencia significativa de los gránulos cromafines presentes en los ensayos de captación de Ca^{2+} por mitocondrias adrenales.

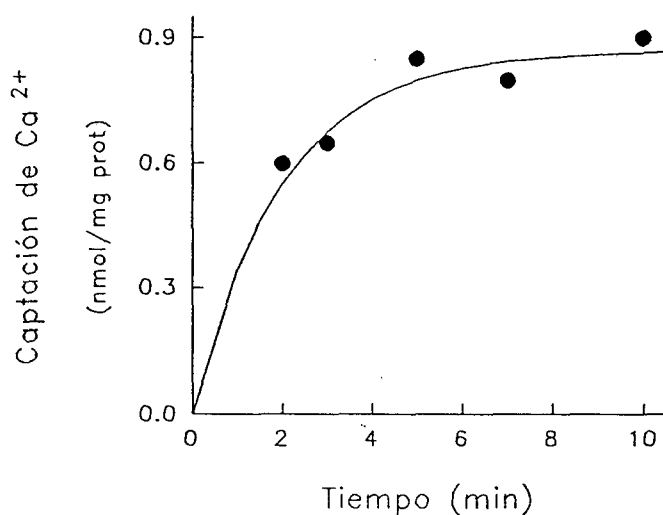


FIGURA 7.- CAPTACION DE Ca^{2+} POR GRANULOS CROMAFINES.

Los granulos cromafines (1mg/ml, volúmen final) se trataron tal y como se describe en la figura 5, midiendo el contenido de Ca^{2+} intravesicular a distintos tiempos de la forma descrita en la sección de Material y Métodos.

Los datos corresponden a la media de dos experimentos realizados por duplicado con diferentes preparaciones de gránulos cromafines.



3.- EFECTO DEL ROJO RUTENIO SOBRE EL UNIPORTADOR DE Ca^{2+} .

El colorante rojo rutenio (RR) actúa específicamente sobre el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial inhibiendo de forma no competitiva la actividad de dicho uniportador (Reed y Bygrave, 1974), sin interferir sobre la fuerza inductora del influjo de Ca^{2+} al interior mitocondrial (Moore, 1971).

La importancia del rojo rutenio radica en que permite establecer la existencia de sistemas de transporte independientes para los movimientos de entrada y salida de Ca^{2+} en mitocondrias, y de este modo, facilita el estudio de ambas rutas por separado (Bygrave, 1978).

Con el fin de estudiar las rutas de salida de Ca^{2+} en mitocondrias adrenales, se caracterizó en primer lugar el efecto inhibitor del RR sobre el uniportador de Ca^{2+} utilizando un intervalo de concentración comprendido entre 0,002 y 20 μM . Para ello, las mitocondrias se incubaron a 25°C durante 5 minutos con rojo rutenio antes de iniciar el proceso de captación.

En la figura 8 se puede apreciar el potente efecto inhibitor del RR, que a la mínima concentración utilizada (0,002 μM), inhibió un 75% la captación de Ca^{2+} con respecto al control realizado en ausencia del mismo. A partir de la concentración 2 μM se alcanzó una inhibición del 92,4% que no varió significativamente con concentraciones superiores, siendo por tanto, la concentración de RR 2 μM la que se utilizó para realizar el bloqueo de la captación de Ca^{2+} en estudios posteriores.

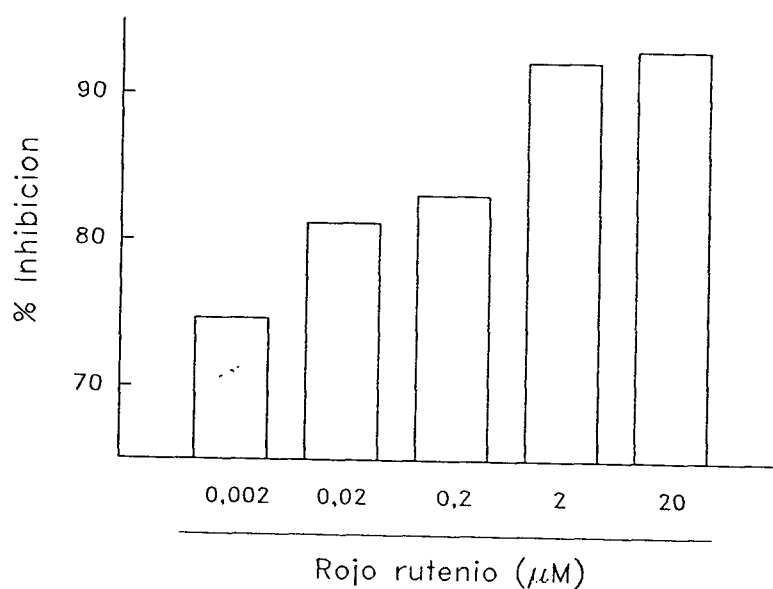


FIGURA 8.- INHIBICION DEL UNIPORTADOR DE Ca^{2+} CON ROJO RUTENIO.

Las mitocondrias (0,7 mg/ml) se incubaron durante 5 minutos a 25°C en 0,5 ml de tampón de captación en ausencia y presencia de distintas concentraciones de rojo rutenio. La concentración de Ca^{2+} utilizada fue $25 \mu\text{M}$, midiendo el contenido de Ca^{2+} mitocondrial tras 10 segundos de captación. La figura representa el porcentaje de inhibición de la captación con respecto al nivel de Ca^{2+} acumulado en ausencia de rojo rutenio.

Los datos corresponden a un experimento realizado por triplicado.



4.- SALIDA DE Ca^{2+} .

Una vez caracterizado el uniportador de Ca^{2+} en mitocondrias adrenales, y elegidas las condiciones óptimas para retener el Ca^{2+} acumulado, se estudiaron los sistemas de eflujo descritos en otros tejidos, el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y el eflujo de Ca^{2+} independiente de Na^+ .

Para realizar este estudio, se eligió un tiempo de captación de 2 minutos, tiempo en el que previamente quedó demostrado que el influjo de Ca^{2+} se encontraba en equilibrio, y se utilizó una concentración de Ca^{2+} elevada ($50 \mu\text{M}$), con el fin de conseguir que las mitocondrias acumulasen suficiente Ca^{2+} y así poder observar una respuesta óptima al estimular su eflujo.

4.1.- EFLUJO BASAL DE Ca^{2+} .

Como ya ha sido descrito, el ADP ejerce un papel modulador regulando la capacidad de acumular y retener Ca^{2+} en la matriz mitocondrial (Carafoli y col., 1965). Utilizando mitocondrias procedentes de hígado, Heffron y Harris (1981) consiguieron disminuir el eflujo basal de Ca^{2+} en presencia de ADP, con lo cual se obtenía una respuesta mayor de las mitocondrias hepáticas ante el estímulo del Na^+ .

Por otro lado, estudios realizados en tejidos excitables, describieron un efecto inhibitor del ADP sobre la salida de Ca^{2+} tanto independiente como dependiente de Na^+ , en función de la capacidad del ADP para estabilizar los cristales de hidroxapatita en la matriz, modificando por lo tanto, el poder intramitocondrial de tamponamiento de Ca^{2+} (Vitorica y Satrústegui, 1985).

A partir de estos datos, se estudió el bloqueo de la captación de Ca^{2+} y la capacidad de retención del mismo, bloqueando el uniportador de Ca^{2+} mediante la adición del colorante RR ($2 \mu\text{M}$) sólo o en combinación con ADP.



Al bloquear el uniportador de Ca^{2+} con RR $2 \mu\text{M}$ suplementado con ADP entre 5 y $30 \mu\text{M}$, se comprobó que el eflujo basal de Ca^{2+} disminuía al aumentar la concentración de ADP en el medio. En concreto, a los 5 minutos de haber bloqueado el uniportador de Ca^{2+} , entre un 89 y 98% del Ca^{2+} captado permanecía acumulado, frente a un 84% retenido en ausencia de ADP (figura 9a).

La elección de la concentración de ADP se basó en los datos existentes sobre el papel inhibitor del mismo sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. La concentración de ADP elegida ($16 \mu\text{M}$) retiene aproximadamente un 95% del Ca^{2+} acumulado y por otro lado, es muy inferior a las concentraciones inhibitorias descritas por otros autores (Vitorica y Satrústegui, 1985).

En la misma figura 9b, se representa un experimento control realizado por duplicado en el que se compara el porcentaje de retención del Ca^{2+} a distintos tiempos, una vez bloqueado el uniportador de Ca^{2+} con RR μM en ausencia y presencia de ADP $16 \mu\text{M}$. Como se puede comprobar, el bloqueo del uniportador de Ca^{2+} con RR $2\mu\text{M}$ fue mas efectivo en presencia de ADP, y la concentración elegida ($16 \mu\text{M}$) fue suficiente para retener prácticamente el 100% del Ca^{2+} acumulado por las mitocondrias, frente a un 85% retenido en su ausencia.

Así pues, mediante el bloqueo previo del uniportador con RR $2 \mu\text{M}/\text{ADP}$ $16 \mu\text{M}$, se caracterizó el eflujo de Ca^{2+} de forma independientemente del proceso de captación del mismo.

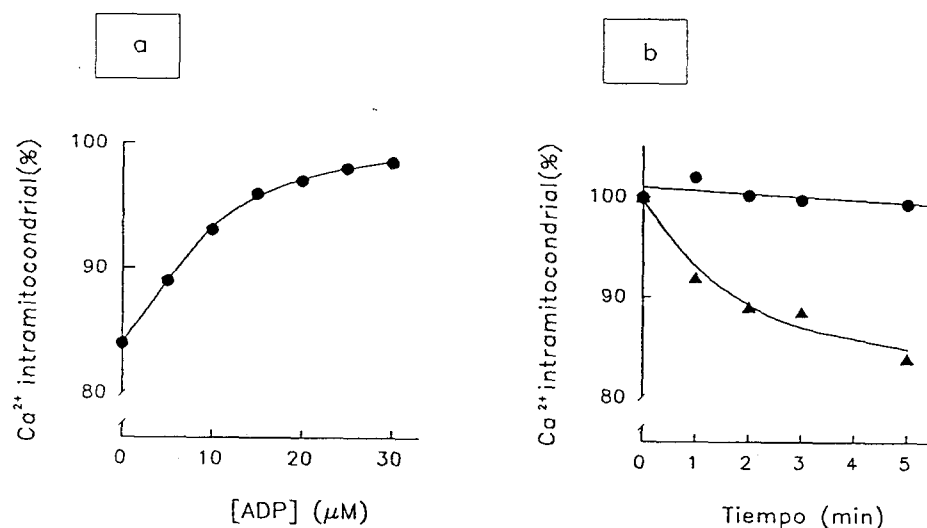


FIGURA 9.- BLOQUEO DEL UNIPORTADOR DE Ca^{2+} .

Las mitocondrias (0,5 mg/0,5 ml, volúmen final) se incubaron en tampón de captación al que se añadió Ca^{2+} 25 μM .

Figura 9a.- Se midió el Ca^{2+} acumulado durante 2 minutos, período tras el cual se bloqueó la captación de Ca^{2+} con RR 2 μM en ausencia y presencia de ADP (5-30 μM). Se midió el Ca^{2+} intramitocondrial a los 5 minutos de efectuar el bloqueo del uniportador de Ca^{2+} . En la figura se representa el porcentaje de Ca^{2+} que permanece en el interior mitocondrial con respecto al Ca^{2+} captado.

Figura 9b.- Curso temporal del bloqueo del uniportador de Ca^{2+} con RR 2 μM en ausencia (▲) y presencia (●) de ADP 16 μM .

Los datos corresponden a dos experimentos independientes realizados por duplicado.



4.2.- INTERCAMBIO $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

El intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es la ruta de salida de Ca^{2+} predominante en tejidos excitables, por lo tanto, en primer lugar se realizó el estudio y caracterización de dicho sistema en mitocondrias de médula adrenal bovina.

El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ presenta sitios reguladores para el Ca^{2+} en la superficie externa de la membrana mitocondrial interna, diferentes de los sitios de unión para el mismo como sustrato de intercambio (Hayat y Crompton, 1982; 1985), de forma que, concentraciones extramitocondriales de Ca^{2+} comprendidas entre 3 y 6 μM , dan lugar a la inhibición máxima del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Hayat y Crompton, 1982). Por lo tanto, debido a la sensibilidad del transportador al Ca^{2+} extramitocondrial el eflujo de Ca^{2+} se estimuló con Na^+ en presencia de EDTA 0,1 mM.

El estudio cinético de dicho sistema se llevó a cabo estimulando con Na^+ 15 mM y midiendo el contenido en Ca^{2+} intramitocondrial a tiempos crecientes a partir de los 10 segundos de haber estimulado el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Los resultados mostraron que dicho proceso alcanzó el equilibrio aproximadamente a los 7 minutos de iniciar el estímulo (figura 10). Al realizar la transformación lineal de los datos experimentales (figura 10 inserto) se observó que la velocidad de salida de Ca^{2+} estimulada por Na^+ , fue lineal ($r^2 = 0,995$) durante los 2 primeros minutos.

Posteriormente se caracterizó el eflujo de Ca^{2+} bajo distintas concentraciones extramitocondriales de Na^+ (3-50 mM), midiendo el Ca^{2+} retenido tras 1 minuto de estímulo. El eflujo de Ca^{2+} se obtuvo mediante la diferencia entre el Ca^{2+} que permanece acumulado en el interior mitocondrial antes y después de estimular el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

La velocidad inicial del eflujo de Ca^{2+} presentó una dependencia sigmoidea con la concentración externa de Na^+ (figura 11a). A partir del análisis de los datos experimentales mediante la ecuación de Hill (figura 11a inserto), se obtuvo un coeficiente de Hill de $1,6 \pm 0,1$, indicando con ello la participación de más de una molécula de Na^+ por cada Ca^{2+} intercambiado en el proceso.

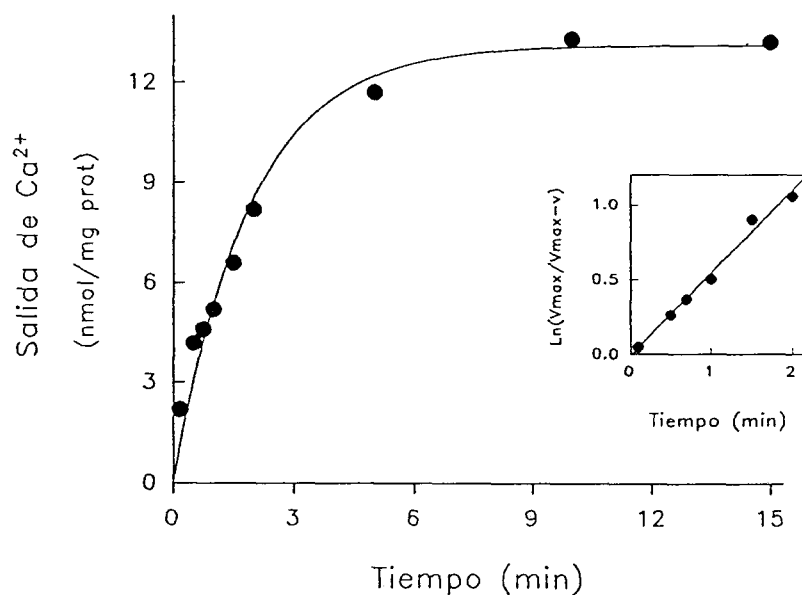


FIGURA 10.- CINETICA DE SALIDA DE Ca^{2+} .

Las mitocondrias (1 mg/ml) se incubaron en 0,6 ml de tampón de captación durante 5 minutos a 25°C , período tras el cual se añadió el Ca^{2+} ($50 \mu\text{M}$). Se siguió el protocolo experimental descrito en la sección de Material y Métodos, midiendo el Ca^{2+} intramitocondrial a diferentes tiempos una vez estimulado el eflujo de Ca^{2+} con Na^{+} 15 mM/EDTA 0,1 mM.

Inserto: linearización de los datos experimentales mediante la ecuación integrada de pseudoprimer orden descrita en la sección de Material y Métodos.

Los datos corresponden a dos experimentos realizados por duplicado con distintos lotes de mitocondrias.

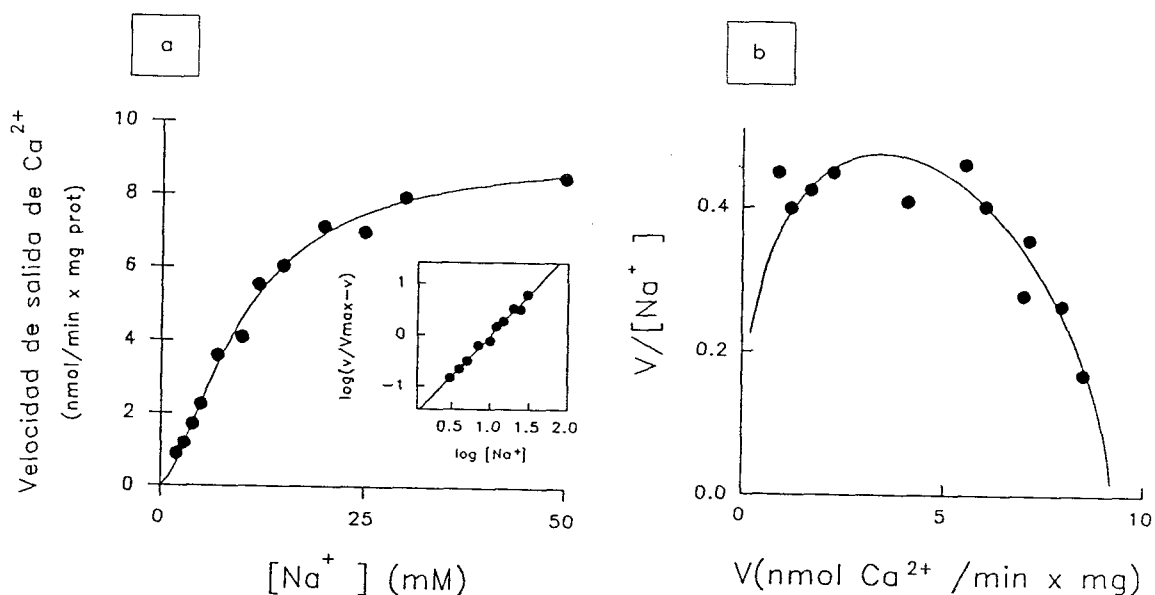


FIGURA 11.- INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE Na^+ EXTERNO SOBRE LA VELOCIDAD DE SALIDA DE Ca^{2+} .

Tras la adición de Ca^{2+} ($50 \mu\text{M}$), las mitocondrias (1 mg/ml , volúmen final) acumularon Ca^{2+} durante 2 minutos, período tras el cual se bloqueó el uniportador de Ca^{2+} con RR $2 \mu\text{M}$ / ADP $16 \mu\text{M}$ siguiendo el protocolo experimental descrito en la sección de Material y Métodos. Se midió el Ca^{2+} intramitocondrial tras 1 minuto de estimular el eflujo con Na^+ ($2\text{-}50 \text{ mM}$)/EDTA $0,1 \text{ mM}$.

Figura 11a.- Representación de los datos experimentales mediante la ecuación transformada de Michaelis y Menten. **Inserto:** Representación lineal de los datos experimentales mediante al ecuación de Hill. Se tomaron los valores comprendidos entre el 10 y 90% de la V_{\max} obtenida en la figura 11a.

Figura 11b.- Representación de Scatchard de los datos experimentales de la figura 11a.

Los parámetros de la figura 11 se describen en el texto. Los datos corresponden a la media de 4 experimentos, realizados por duplicado y con diferentes preparaciones de mitocondrias.



Por otra parte, al no poder medir la concentración de Ca^{2+} libre intramitocondrial, no se puede estudiar la dependencia de la velocidad del proceso con respecto a la misma, por lo que el valor obtenido del coeficiente de Hill no puede utilizarse para diagnosticar la estequiometría del proceso de intercambio.

Mediante el ajuste de los datos experimentales tal y como se describe en la sección de Material y Métodos, se calcularon los parámetros cinéticos del intercambio, obteniendo una afinidad del sistema por el Na^+ extramitocondrial, definida por la K_m , de $10,0 \pm 0,9$ mM y una V_{\max} del eflujo de $9,2 \pm 0,4$ nmol de Ca^{2+} min^{-1} mg^{-1} .

El análisis de Scatchard de los datos experimentales (figura 11b) dió lugar a una representación no lineal con un máximo pronunciado, que reflejó la relación y grado de cooperatividad positiva de la unión del Na^+ sobre la molécula responsable del intercambio.

Los resultados obtenidos, tanto dependencia sigmoidea del sistema sobre la concentración extramitocondrial de Na^+ , como la afinidad del sistema por el Na^+ y la velocidad máxima del eflujo, están en concordancia con los datos descritos en mitocondrias procedentes de tejidos excitables ($K_m = 5-8$ mM y $V_{\max} = 12-27$ nmoles min^{-1} mg^{-1}) (Carafoli, 1987), superando la V_{\max} los valores descritos en tejidos tales como hígado, pulmón o corteza renal ($1,6-2,7$ nmoles min^{-1} mg^{-1}) (Crompton y col., 1978; Haworth y col., 1980; Carafoli, 1987).

4.2.1.- Efecto de los nucleótidos de adenina sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Los nucleótidos de adenina presentan la capacidad de prolongar el tiempo de retención del Ca^{2+} acumulado ($\text{ADP} > \text{ATP}$) (Carafoli y col., 1965; Zoccarato y col., 1981), y por otro lado, en función de esta propiedad, se describió el efecto inhibitorio de ADP sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en mitocondrias de cerebro (Vitorica y Satrústegui, 1985).



La caracterización del uniportador de Ca^{2+} y del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de mitocondrias adrenomedulares, se realizó en presencia de ADP $16 \mu\text{M}$ en el medio de captación, y presente también junto con RR en el bloqueo del influjo de Ca^{2+} , condiciones que mediante controles previos se determinaron idóneas para realizar el estudio de los movimientos de Ca^{2+} .

Recientemente ha sido descrito el efecto inhibitor del ADP sobre la fijación de [^3H]nitrendipina al DHPr mitocondrial (Zernig y col., 1988). Puesto que el siguiente objetivo a cubrir en esta memoria era el estudio de la modulación del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ por derivados DHP, y teniendo en cuenta además el efecto de los nucleótidos de adenina sobre dicho sistema de eflujo, se estudió en primer lugar la posibilidad de excluir el ADP del medio de captación.

Se realizó un experimento control sobre el proceso de captación en ausencia y presencia de ADP $16 \mu\text{M}$ (figura 12). Se observó que en presencia de acetato 10 mM y $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ $0,2 \text{ mM}$ en el medio, y utilizando una concentración de Ca^{2+} de $50 \mu\text{M}$, no existían diferencias significativas entre el nivel de Ca^{2+} acumulado en presencia o ausencia de ADP. Así pues, se determinó descartar la presencia de ADP en el medio de captación.

Contrastando con el estudio de los factores externos que afectan el transporte de Ca^{2+} mitocondrial, se apreció la necesidad de utilizar ADP en un medio suplementado con $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ pero que carecía de acetato utilizando además una concentración de Ca^{2+} de $25 \mu\text{M}$ (figura 3).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

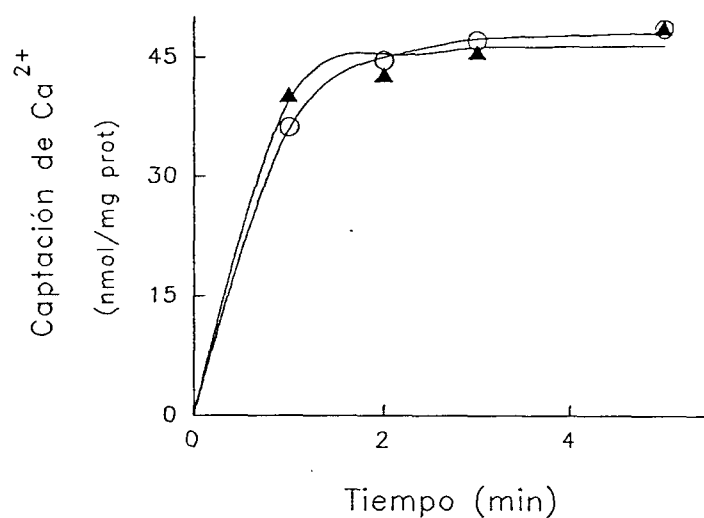


FIGURA 12.- EFECTO DEL ADP SOBRE LA CAPTACION EN UN MEDIO SUPLEMENTADO CON ACETATO.

Las mitocondrias (1mg/ml) se incubaron en 0,7 ml de tampón de ensayo suplementado con succinato 5 mM, rotenona 4 μ M, Pi 0,2 mM y acetato 10 mM, en ausencia (▲) y presencia (○) de ADP 16 μ M en el medio de captación. La concentración de Ca²⁺ utilizada fue 50 μ M.

Los datos corresponden a 2 experimentos realizados por duplicado con diferentes preparaciones de mitocondrias.

El siguiente paso por tanto, fue realizar la caracterización del intercambio Na⁺/Ca²⁺ en ausencia de ADP en el medio de captación, pero debido a la eficacia observada de dicho nucleótido sobre el eflujo basal de Ca²⁺, se mantuvieron las condiciones elegidas para realizar el bloqueo de la captación de Ca²⁺ (RR 2 μ M/ADP 16 μ M).



La representación directa de los resultados obtenidos, mostró una relación hiperbólica del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, con respecto a la concentración externa de Na^+ (figura 13). Al analizar los datos experimentales mediante la ecuación de Hill (figura 13 inserto), el coeficiente de Hill resultante $n_H = 1,4 \pm 0,2$, sugirió la participación de más de 1 Na^+ por cada Ca^{2+} en el proceso de intercambio.

Mediante el ajuste de los datos experimentales, según se describe en Material y Métodos, se obtuvieron los parámetros cinéticos del proceso, $V_{\max} = 8,5 \pm 0,4$ nmoles de $\text{Ca}^{2+} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ y $K_m = 4,2 \pm 0,5$ mM. El análisis de los mismos mediante la representación de Scatchard (figura 13b) dió lugar a una representación concava con un máximo pronunciado, mostrando una relación de cooperatividad positiva por la unión del Na^+ externo.

Al comparar con los resultados obtenidos en presencia de ADP en el medio de captación (apartado anterior), se observó que, tanto la relación sigmoidea con respecto a la concentración externa de Na^+ , como la afinidad del sistema por el Na^+ fueron afectados por el ADP. Al excluir el ADP del medio de captación, se apreció una relación hiperbólica mostrando además, una mayor afinidad del sistema por el Na^+ , disminuyendo la K_m desde 10 mM hasta 4,2 mM.

Sin embargo, la V_{\max} del intercambio, así como la relación de cooperatividad positiva por la unión del Na^+ a la molécula responsable del intercambio, no fueron afectadas por la ausencia de ADP en el medio de captación.

Los resultados obtenidos confirmaron que el efecto del ADP sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ no era ejercido directamente sobre la entidad molecular responsable de dicho intercambio, ya que como anteriormente se demostró en mitocondrias procedentes de hígado o cerebro (Zoccarato y col., 1981; Vitorica y Satrústegui, 1985), el efecto inhibitor del ADP sobre el eflujo de Ca^{2+} era ejercido a través del transportador de nucleótidos mediante la inhibición del eflujo de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ y retención por tanto del Ca^{2+} en la matriz mitocondrial.

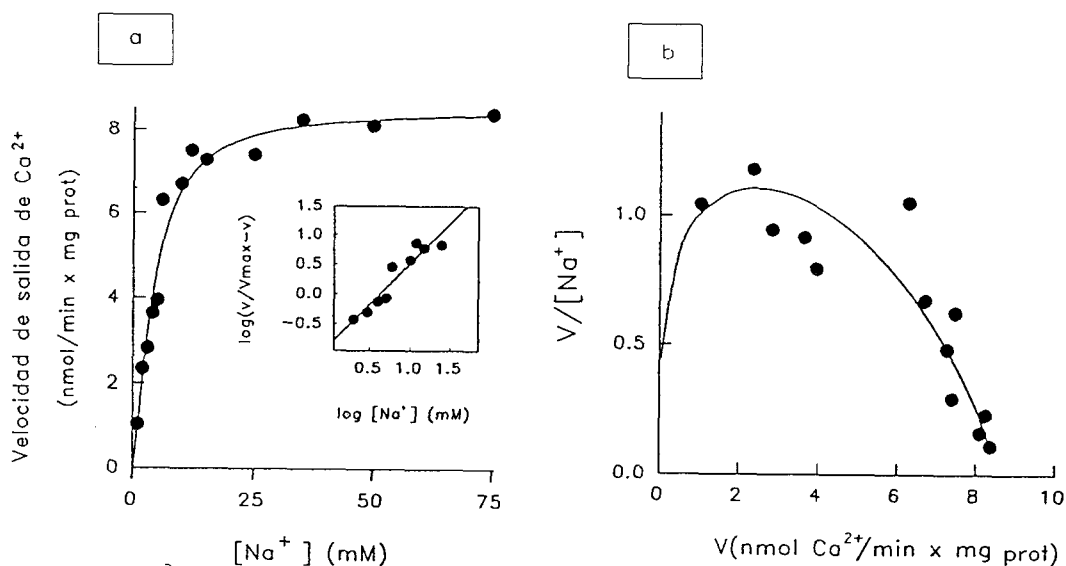


FIGURA 13.- EFECTO DEL ADP SOBRE EL INTERCAMBIO $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Las mitocondrias (1mg/ml, volúmen final) se incubaron siguiendo las mismas condiciones y protocolo experimentales descritos en la figura 11, excepto que en este caso el ADP no estaba presente en el medio de captación.

Figura 13a.- Cinética de salida de Ca^{2+} . El intervalo de concentración de Na^+ utilizado estuvo comprendida entre 3 y 75 mM. Inseto: representación de Hill de los datos experimentales, tomando los valores comprendidos entre el 10 y 90% de la V_{\max} definida a partir de la figura 16a.

Figura 13b.- Análisis de los datos experimentales mediante la representación de Scatchard.

Los parámetros obtenidos se describen en el texto. Los datos corresponden a dos experimentos independientes realizados por duplicado con diferentes preparaciones mitocondriales..



Resultados y discusión

Ante los resultados obtenidos, para estudiar la modulación de este sistema de intercambio, y puesto que la captación de Ca^{2+} en ausencia de ADP no disminuía con respecto a su presencia, el ADP no se incluyó en el medio de captación en experimentos posteriores.

El estudio del efecto del ATP sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, se realizó añadiendo éste una vez que las mitocondrias habían acumulado Ca^{2+} y tras bloquear el uniportador de Ca^{2+} con RR $2 \mu\text{M}/\text{ADP } 16 \mu\text{M}$.

El ATP se adicionó al medio 1 minuto antes de estimular el eflujo de Ca^{2+} con $\text{Na}^+ 20 \text{ mM}/\text{EDTA } 0,1 \text{ mM}$ y se midió el contenido en Ca^{2+} intramitocondrial a los 5 minutos, obteniendo el eflujo neto de Ca^{2+} mediante la diferencia entre el Ca^{2+} que permanece acumulado en el interior mitocondrial en ausencia y presencia de Na^+/EDTA .

Al analizar los resultados (figura 14), se observó un efecto inhibitor dependiente de concentración sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, necesitando concentraciones de ATP superiores a 2 mM para inhibir en un 50% el eflujo de Ca^{2+} .

Entre los datos existentes sobre la acción del ATP sobre los movimientos de Ca^{2+} , se describió la retención del Ca^{2+} acumulado por las mitocondrias en presencia de ATP, disminuyendo por tanto el eflujo de Ca^{2+} (Harris, 1977). Posteriormente se describió el efecto estimulador del ATP sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de forma indirecta, revertiendo el efecto inhibitor del Mg^{2+} sobre dicho sistema (Hayat y Crompton, 1987). Los resultados obtenidos parecen estar relacionados con el papel del ATP en el mantenimiento del Ca^{2+} acumulado pues en las condiciones experimentales utilizadas, no estaban presentes ni Mg^{2+} ni Ca^{2+} extramitocondriales para modular dicho sistema de intercambio.

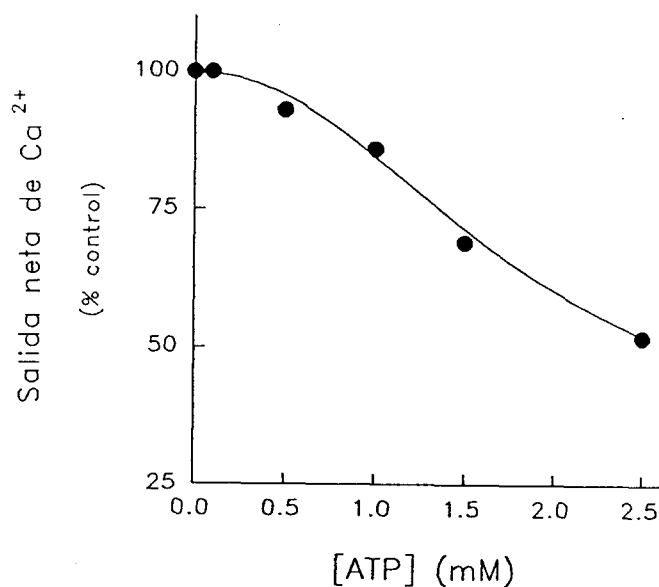


FIGURA 14.- EFECTO DEL ATP SOBRE EL INTERCAMBIO $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Las mitocondrias (1 mg/ml, volúmen final) se incubaron en el tampón de ensayo descrito en la figura 13. Tras la adición del Ca^{2+} (50 μM) y 2 minutos de captación se bloqueó el uniportador con RR 2 μM /ADP 16 μM . Tras 1 minuto de bloqueo, se adicionó ATP (0,1-2 mM) al medio, estimulando 1 minuto después el eflujo con Na^+ 20 mM/EDTA 0,1 mM. Se representa el porcentaje de eflujo de Ca^{2+} con respecto a las condiciones control, tras 5 minutos de estímulo.

Los datos corresponden a dos experimentos realizados por duplicado.



4.3.- SALIDA DE Ca^{2+} INDEPENDIENTE DE Na^+ .

El protocolo experimental que se siguió para realizar este estudio fue el mismo que el descrito al estudiar el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, excepto que el estímulo del eflujo de Ca^{2+} consistió en aumentar la concentración de protones en el medio mediante la adición de CIH 0,1 M, disminuyendo el pH del medio desde 7,2 hasta 6,15, por lo que en este caso se utilizó tampón PIPES 50 mM.

Se midió el Ca^{2+} intramitocondrial transcurridos 2 y 10 minutos de la adición de H^+ . Como se puede observar en la figura 15, la salida de Ca^{2+} independiente de Na^+ fue más acusada conforme se aumentaba la concentración de H^+ en el medio, siendo prácticamente nulo a pH 6,9, aunque a pH 6,6 y 6,9 se produjo una salida de Ca^{2+} de un 30% aproximadamente. Con motivo de comparación, en la misma figura se representan las condiciones control (pH 7,2), en las que el eflujo fue estimulado con Na^+ 20 mM/EDTA 0,1 mM. De los resultados obtenidos, se puede concluir que en nuestras condiciones experimentales el eflujo de Ca^{2+} independiente de Na^+ en mitocondrias adrenomedulares, representa menos de un 10% (a los 10 minutos de ser estimulado por distintas concentraciones de H^+) frente a un 90% del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en las condiciones control. De esta forma, se comprobó que al igual que en los demás tejidos excitables estudiados (Crompton y col., 1978), en mitocondrias de médula adrenal el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ era cuantitativamente más importante, constituyendo la vía principal de salida de Ca^{2+} .

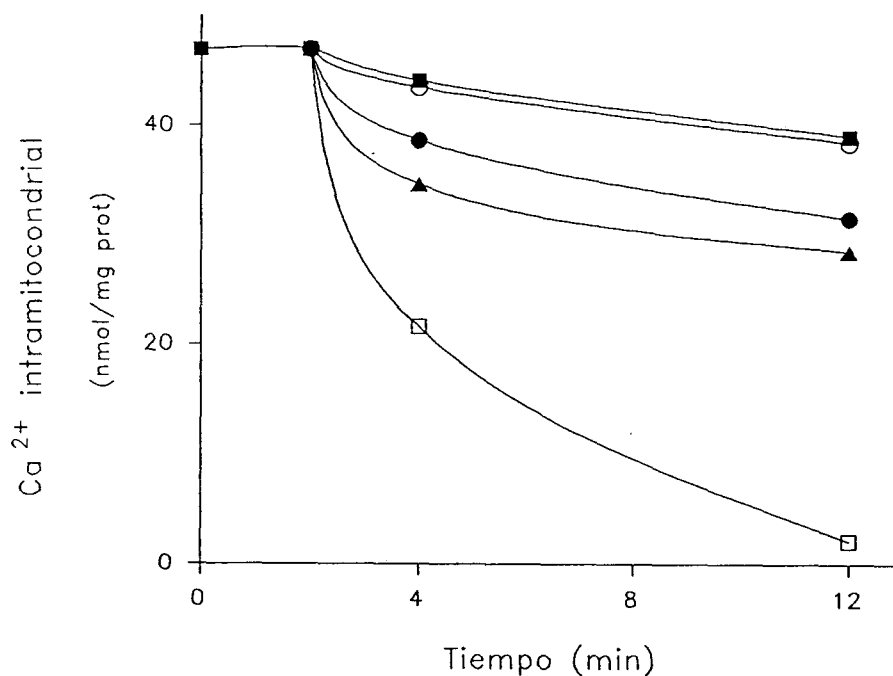


FIGURA 15.- SALIDA DE Ca^{2+} INDEPENDIENTE DE Na^{+} .

Se siguió el protocolo experimental descrito en la sección de Material y Métodos. Las mitocondrias (1,5 mg/1 ml, volúmen final) acumularon Ca^{2+} durante 2 minutos, y tras 2 minutos de bloqueo del uniportador con RR $2\mu\text{M}$ /ADP $16\mu\text{M}$, se estimuló el eflujo de Ca^{2+} mediante la adición de las siguientes concentraciones de H^{+} : $0,063\mu\text{M}$ (■ pH 7,2); $0,126\mu\text{M}$ (○ pH 6,9); $0,25\mu\text{M}$ (● pH 6,6); $0,71\mu\text{M}$ (▲ pH 6,15).

Se midió el Ca^{2+} mitocondrial a los 2, 4 y 12 minutos de bloqueo del uniportador y a los 2 y 10 minutos de estímulo, tratando las muestras como se describe en la sección de Material y Métodos. Con motivo de comparación, se representa la salida de Ca^{2+} estimulada por Na^{+} 20 mM/EDTA 0,1 mM (□ pH 7,2, control).

Los datos corresponden a 2 experimentos realizados por duplicado con diferentes preparaciones de mitocondrias.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

5.- EFECTO DE FARMACOS SOBRE LOS MOVIMIENTOS DE Ca^{2+} .

Para estudiar el efecto de los diferentes fármacos sobre los movimientos de Ca^{2+} , se determinó en primer lugar, el tiempo de incubación necesario para observar su efecto, tanto a nivel del uniportador de Ca^{2+} como sobre la actividad del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Para ello, las mitocondrias se incubaron a 25°C en ausencia y presencia de nitrendipina durante diferentes tiempos antes de la adición de Ca^{2+} $50 \mu\text{M}$.

La concentración de nitrendipina utilizada para llevar a cabo este estudio ($10 \mu\text{M}$) se eligió en función de los datos existentes en la bibliografía sobre el acúmulo intracelular de bloqueantes del Ca^{2+} , y la necesidad de elevadas concentraciones de los mismos para observar su efecto sobre los movimientos de Ca^{2+} en organelas aisladas (Lüllmann y Mohr, 1987; Pang y Sperelakis, 1983).

Con respecto a la actividad del uniportador de Ca^{2+} , los resultados obtenidos quedan reflejados en la figura 16, en la que se observa que el Ca^{2+} acumulado por las mitocondrias en presencia de nitrendipina ($10 \mu\text{M}$), no presentó diferencias significativas con respecto al acúmulo de Ca^{2+} en las condiciones control, independientemente del tiempo de incubación.

Al mismo tiempo se estudió el flujo de Ca^{2+} estimulado por Na^+ , observando que incluso al preincubar las mitocondrias durante 5 minutos con nitrendipina $10 \mu\text{M}$, se apreciaba el efecto inhibitor de la misma sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ transcurridos 10 minutos de estímulo. El tiempo de incubación a partir del cual nitrendipina mostró su efecto máximo sobre el flujo de Ca^{2+} , fue de 15 minutos.

En función de su efecto sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, y con el fin de mantener las mismas condiciones experimentales tanto en los estudios de captación como de salida de Ca^{2+} , se eligió un tiempo de 15 minutos para incubar las mitocondrias con los diferentes fármacos antes de añadir Ca^{2+} .

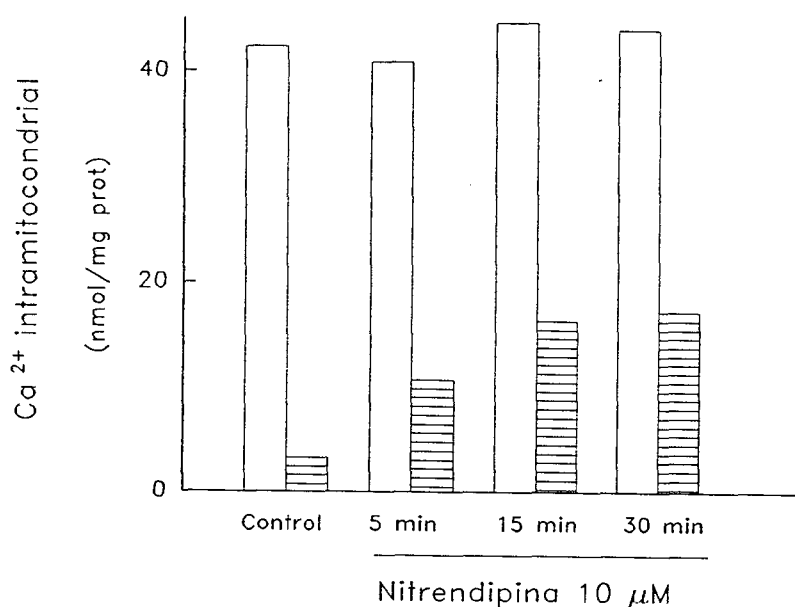


FIGURA 16.- TIEMPO DE INCUBACION DE NITRENDIPINA.

Las mitocondrias (1 mg/ml, volúmen final) se incubaron en presencia de nitrendipina 10 μM , durante 5, 15 y 30 minutos a 25°C. Tras la adición de Ca^{2+} (50 μM) se midió a los 2 minutos, el acúmulo de Ca^{2+} (□). El uniportador de Ca^{2+} se bloqueó con RR/ADP y a continuación de estimuló el eflujo de Ca^{2+} con Na^+ 20 mM/EDTA 0,1 mM, midiendo el Ca^{2+} retenido por las mitocondrias a los 10 minutos de estímulo (▨).

En ausencia de nitrendipina (control), las mitocondrias se preincubaron durante 5 minutos, siguiendo el mismo protocolo experimental descrito.

Los resultados son la media de dos experimentos realizados por duplicado.



Por otro lado, estudios recientes sobre el acúmulo de [^3H]nitrendipina en tejido cardiaco, han demostrado que la acción de nitrendipina sobre la respuesta contráctil es paralelo a un aumento en la concentración intracelular de nitrendipina en un intervalo comprendido entre 1 y 100 μM (Lüllmann y Mohr, 1987).

Teniendo en cuenta además los datos existentes a nivel de fijación de radioligandos sobre el DHPr mitocondrial, el intervalo de concentración de los diferentes fármacos utilizados para estudiar la modulación de éstos sobre el uniportador de Ca^{2+} y el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ estuvo comprendido, en la mayoría de los casos, entre 0,01 y 100 μM .

5.1.- CAPTACION DE Ca^{2+} .

En primer lugar, se estudió el efecto de los diferentes fármacos (0,01-100 μM) sobre el uniportador de Ca^{2+} , para ello, tras preincubar las mitocondrias a 25°C durante 15 minutos, en ausencia (control) y presencia de los distintos fármacos empleados, se midió el Ca^{2+} acumulado por las mitocondrias durante 2 minutos.

A partir de los resultados mostrados en la tabla 7, se observa que ni los fármacos pertenecientes al grupo de las DHP, ni verapamil ni diltiazem, tuvieron efecto sobre la actividad del uniportador de Ca^{2+} , al no apreciarse diferencias significativas entre el nivel de Ca^{2+} acumulado por las mitocondrias en condiciones control, y en presencia de la concentración máxima de fármaco utilizada.

Existen muy pocos datos en la bibliografía en relación a la modulación por los diferentes grupos de bloqueadores del Ca^{2+} sobre el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial. Entre éstos, algunos concuerdan con los resultados obtenidos en esta memoria, ya que reflejan la carencia de efecto de dichos fármacos sobre el influjo de Ca^{2+} en mitocondrias cardíacas (Vaghy y col., 1982; Matlib y col., 1983).

Sin embargo, existen datos contradictorios que describen un efecto inhibitor de dichos fármacos sobre el uniportador de Ca^{2+} en mitocondrias procedentes también de tejido cardiaco (Baydoun y col., 1986; Buss y col., 1988). Entre éstos, algunos



describen valores de IC_{50} superiores a $150 \mu M$ (Buss y col., 1988), concentración que supera el límite de solubilidad observado para la mayoría de las DHP utilizadas.

Aunque las condiciones experimentales utilizadas por los diferentes autores difieren de las empleadas en esta memoria, cabría destacar las diferencias observadas en relación al protocolo de aislamiento y al medio de ensayo utilizado por el grupo de Buss. La homogenización mediante digestión enzimática del tejido, la presencia de ATP y Mg^{2+} en el medio de captación, son condiciones que han sido descritas que interfieren sobre la actividad del uniportador de Ca^{2+} (Harris, 1977; Allshire y Heffron, 1983), y que tal vez podrían explicar las diferencias observadas por el grupo de Buss en relación al efecto inhibitor que ejercen las DHP, verapamil o diltiazem sobre el uniportador de Ca^{2+} de mitocondrias cardiacas (Buss y col., 1988). En este trabajo, la actividad del uniportador en condiciones control, fue muy inferior a la observada por otros autores (Vaghy y col. 1982) y en relación a los resultados descritos en esta memoria.

Por otro lado, se describió que Bay K 8644, estimulaba la captación neta de Ca^{2+} e inhibía la velocidad de captación de Ca^{2+} (Baydoun y col., 1990). Las diferencias observadas en cuanto a la temperatura ($37^{\circ}C$), volumen de ensayo (10 ml) y concentración de proteína (0,25 mg/ml), fueron condiciones experimentales descartadas mediante controles previos para estudiar los movimientos de Ca^{2+} en esta memoria, condiciones que tal vez sean responsables de las diferencias observadas con respecto a los resultados aquí mostrados.



TABLA 7.- EFECTO DE LOS DIFERENTES FARMACOS SOBRE LA CAPTACION DE CALCIO.

FARMACO	nmol Ca ²⁺ /mg prot.	n
Control	42 ± 1	7
nitrendipina	40 ± 3	7
nimodipina	42 ± 3	3
nifedipina	41 ± 3	4
felodipina	48 ± 4	3
PN 200-110	43 ± 2	6
CGP 28392	45 ± 1	4
amlodipina	41 ± 2	3
Bay K 8644	43 ± 1	3
diltiazem	44 ± 3	3
verapamil	44 ± 2	3

Las mitocondrias (1mg/ml, volumen final) se incubaron a 25°C durante 15 minutos con los distintos fármacos. A continuación se adicionó al medio Ca²⁺ (50 μM). Tras 2 minutos de captación se tomaron alícuotas de 0,1 ml que se filtraron y lavaron tal y como se describe en Material y Métodos. En la tabla se representa el Ca²⁺ acumulado por las mitocondrias a una concentración de fármaco de 100 μM, excepto en el caso de verapamil que fue 2mM.

n corresponde al número de experimentos realizados por duplicado, utilizando distintos lotes de mitocondrias.



5.2.- SALIDA DE Ca^{2+} .

De los dos mecanismos implicados en la salida de Ca^{2+} , se estudió en primer lugar el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, dado que cuantitativamente representa el mecanismo más importante en mitocondrias de médula adrenal, tal y como quedó demostrado en el apartado 4.2 de resultados.

El estudio del efecto de los diferentes fármacos sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ se realizó mediante curvas dosis respuesta. Para ello, las mitocondrias se incubaron durante 15 minutos con los diferentes fármacos (0,01-100 μM) antes de iniciar la captación de Ca^{2+} . Las mitocondrias acumularon Ca^{2+} durante 2 minutos, tras los cuales se bloqueó el proceso de captación con RR 2 μM /ADP 16 μM , manteniendo el uniportador de Ca^{2+} bloqueado durante 2 minutos, y estimulando seguidamente el eflujo de Ca^{2+} con Na^+ 20 mM/EDTA 0,1 mM. Con el fin de poder observar diferencias relevantes con respecto a la actividad del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en ausencia y presencia de los fármacos, se midió el contenido en Ca^{2+} intramitocondrial tras 10 minutos de estímulo, tiempo en el que el proceso de eflujo de Ca^{2+} se hallaba en equilibrio, obteniendo el eflujo neto de Ca^{2+} mediante la diferencia entre el contenido en Ca^{2+} intramitocondrial tras 12 minutos de bloqueo y 10 minutos de estímulo.

A) Bloqueantes del calcio no dihidropiridínicos.

Entre los fármacos no DHP utilizados, se estudió el efecto del diltiazem y verapamil sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Al representar los datos experimentales, en porcentaje de eflujo con respecto a las condiciones control (figura 17), se obtuvieron los parámetros que definieron la acción de los mismos sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Como se observa en la figura 17a, el efecto del diltiazem se apreció a concentraciones próximas a 1 μM , y a partir del análisis de los datos experimentales (descrito en la sección de Material y Métodos), se obtuvo un valor de IC_{50} de

$10,9 \pm 1,2 \mu\text{M}$. La potencia de acción de dicho fármaco, fue paralela a la eficacia de acción del mismo, alcanzando niveles de inhibición sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de casi el 90%.

Los resultados obtenidos confirmaron los datos existentes sobre el efecto de dicho fármaco en mitocondrias cardíacas o de cerebro, presentando valores de IC_{50} en el mismo orden, 7 y $10 \mu\text{M}$ respectivamente (Vaghy y col., 1982; Matlib y col., 1983), sin embargo, los resultados obtenidos por el grupo de Buss en mitocondrias procedentes también de tejido cardíaco, mostraron que la concentración de diltiazem necesaria para inhibir un 50% el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ fue casi 3 veces superior ($\text{IC}_{50} = 19 \mu\text{M}$) (Buss y col., 1988).

Con respecto al verapamil, las concentraciones elegidas para estudiar su efecto fueron superiores a las del resto de fármacos empleados, pues a concentraciones inferiores a $100 \mu\text{M}$, no se observó ningún efecto sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Al ampliar el intervalo de concentración hasta $1,5 \text{ mM}$, se observó que la concentración necesaria para inhibir un 50% el eflujo de Ca^{2+} fue de $560 \mu\text{M}$ (figura 17b). Aunque menos potente que el diltiazem, el verapamil fue también un fármaco eficaz inhibiendo dicho sistema, ya que presentó una inhibición máxima de casi un 75%.

Entre los escasos datos existentes en la bibliografía sobre el efecto del verapamil sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, los resultados obtenidos confirman su efecto inhibitorio en mitocondrias cardíacas (IC_{50} de $150 \mu\text{M}$) (Vaghy y col., 1982), mientras que, los resultados descritos por el grupo de Buss fueron al igual que en el caso del diltiazem, contradictorios, ya que utilizando también mitocondrias cardíacas, no se observó efecto del verapamil sobre dicho sistema de eflujo de Ca^{2+} (Buss y col., 1988).

Existen varias diferencias en cuanto al proceso de aislamiento, técnicas experimentales, medio y protocolo de ensayo utilizados por los diferentes autores. Los resultados obtenidos con mitocondrias adrenales (que corresponden a experimentos en los que el nivel de captación de Ca^{2+} fue superior al 70% del Ca^{2+} añadido) están en concordancia con aquellos estudios en los que las mitocondrias acumularon casi todo el Ca^{2+} añadido (Vaghy y col., 1982).



Por lo tanto, los factores que influyen sobre la actividad del uniportador de Ca^{2+} (Harris, 1977; Allshire y Heffron, 1983) podrían ser la causa de las diferencias observadas en relación a la acción de dichos fármacos (Buss y col., 1988) sobre el eflujo del Ca^{2+} acumulado, a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

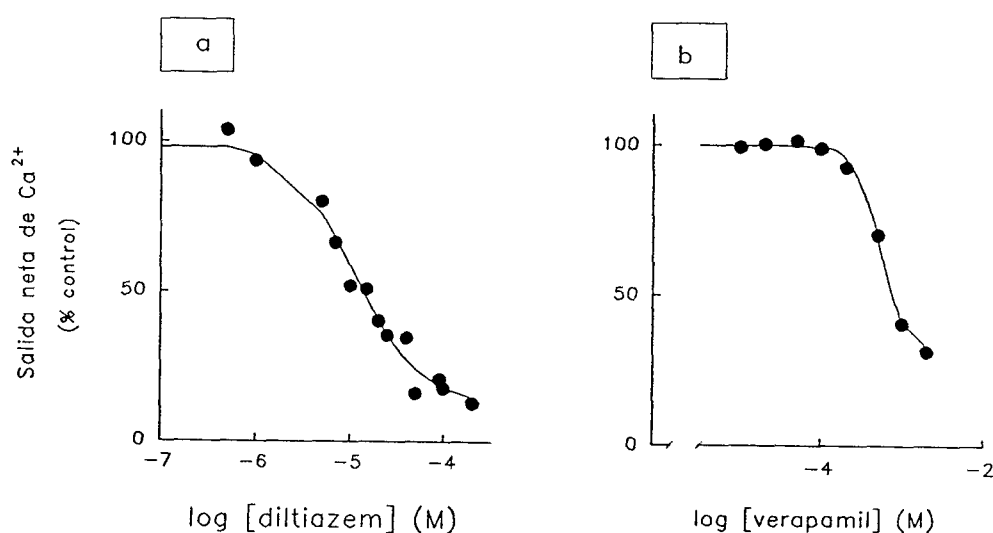


FIGURA 17.- EFECTO DE DILTIAZEM Y VERAPAMIL SOBRE EL INTERCAMBIO $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Figura 17a.- Las mitocondrias (1mg/ml) se incubaron con el diltiazem (0,01-150 μM) a 25°C durante 15 minutos en 0,6 ml de medio de ensayo. Tras la adición de Ca^{2+} (50 μM), las mitocondrias acumularon Ca^{2+} durante 2 minutos y a los 2 minutos de bloqueo con RR 2 μM /ADP 16 μM , se estimuló el eflujo con Na^+ 20 mM/EDTA 0,1 mM, midiendo el contenido en Ca^{2+} a los 10 minutos de estimular el intercambio. Los resultados corresponden a 4 experimentos realizados por duplicado con diferentes lotes de mitocondrias.

Figura 17b .- Las mismas condiciones experimentales pero el fármaco utilizado fue verapamil (0,5-1,5 mM). Los resultados corresponden a la media de 3 experimentos realizados por duplicado utilizando diferentes preparaciones mitocondriales.

Los parámetros obtenidos a partir de las dos curvas se describen en el texto y en la tabla 8.



B) Derivados dihidropiridínicos.

Los resultados obtenidos del estudio del efecto de los bloqueadores del Ca^{2+} pertenecientes al grupo de las DHP y no DHP, sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, quedan reflejados en la tabla 8, en la que se muestran la potencia y eficacia de acción de los mismos, obtenido tras el análisis de los datos experimentales mediante curvas dosis respuesta.

Como puede apreciarse, las concentraciones necesarias para que los bloqueadores del calcio pertenecientes al grupo de las DHP causen efecto sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial, estuvieron comprendidas al igual que en tejido cardíaco, en el orden μM (Vaghy y col., 1982; Matlib y col., 1983; Buss y col., 1988), concentraciones que fueron muy superiores a las necesarias para ejercer su acción a nivel de la membrana plasmática (DePover y col., 1982).

Al representar los datos experimentales (figura 18), en porcentaje de eflujo de Ca^{2+} con respecto a la salida de Ca^{2+} en ausencia de DHP, se observó que todas las DHP en el intervalo de concentración utilizado, inhibieron el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de forma dependiente de concentración, presentando un respuesta sigmoidea con pendientes (h) superiores a la unidad (tabla 8) indicando una relación de cooperatividad positiva entre el fármaco y la actividad del sistema de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Sin embargo, no todos los derivados DHP ejercieron su efecto inhibitor con la misma eficacia.

Como se observa en la figura 18a, entre las DHP estudiadas nitrendipina, felodipina y PN 200-110, fueron prácticamente igual de potentes sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, apreciándose su efecto inhibitor a partir de concentraciones próximas a $1 \mu\text{M}$, con valores de IC_{50} muy próximos entre sí y alrededor de $10 \mu\text{M}$ (tabla 8). A pesar de presentar IC_{50} semejantes (9,5; 11,4 y 11,9 μM para nitrendipina, felodipina y PN 200-110, respectivamente), las tres DHP reflejaron porcentajes máximos de inhibición muy diferentes.

TABLA 8.- EFECTO DE FARMACOS SOBRE INTERCAMBIO $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Fármaco	IC_{50} (μM)	h	% máxima inhibición	n
DHP				
nitrendipina	$9,5 \pm 1,1$	$1,7 \pm 0,3$	44	5
PN 200-110	$11,9 \pm 2,8$	$0,8 \pm 0,3$	37	5
felodipina	$11,4 \pm 2,5$	$1,0 \pm 0,3$	63	3
nifedipina	$49,8 \pm 1,6$	$4,0 \pm 0,4$	52	4
nimodipina	$34,9 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,1$	61	3
CGP 28392	s.e. (75 μM)			
Bay K 8644	s.e. (75 μM)			
amlodipina	s.e. (200 μM)			
BTZ				
diltiazem	$10,9 \pm 1,2$	$1,2 \pm 0,1$	88	4
DPA				
verapamil	560 ± 20	$2,4 \pm 0,2$	73	3

Las mitocondrias (1mg/ml) se incubaron con los diferentes fármacos durante 15 minutos a 25°C, siguiendo el protocolo experimental descrito en la sección de Material y Métodos. Se midió el contenido en Ca^{2+} intramitocondrial tras 10 minutos de estímulo con Na^+ 20 mM/EDTA 0,1 mM. h representa la pendiente de las curvas de las figuras 21 y 22, y n el número de experimentos realizados por duplicado con diferentes preparaciones de mitocondrias. s.e. representa la ausencia de efecto a la concentración indicada entre paréntesis.



Entre las tres DHP mencionadas, felodipina fue la única que presentó potencia y eficacia de acción paralelas, alcanzando una inhibición máxima del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ superior al 60% (tabla 8), mientras que nitrendipina y PN 200-110, no superaron el 50% de inhibición (44% y 37% respectivamente), a pesar de que ambas DHP fueron prácticamente igual de potentes que felodipina inhibiendo el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

En la misma figura 18b se representa el efecto de nimodipina y nifedipina sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Como puede apreciarse, fueron necesarias concentraciones de ambas DHP 10 veces superiores a las de nitrendipina, felodipina o PN 200-110, para ejercer su efecto inhibitor sobre dicho sistema de eflujo de Ca^{2+} .

Aunque nimodipina y nifedipina fueron menos potentes (con valores de IC_{50} de 34,9 y 49,8 μM respectivamente) que las tres DHP anteriores, inhibieron el eflujo de Ca^{2+} hasta un 61% y 52% respectivamente, eficacias que fueron incluso superiores a la ejercida por nitrendipina o PN 200-110.

Entre los bloqueantes del calcio pertenecientes a este grupo, amlodipina no presentó efecto sobre el eflujo de Ca^{2+} en el intervalo de concentración estudiado que por ser dicha DHP soluble en agua, fue ampliado hasta 200 μM . En cuanto a los activadores de canales de calcio, Bay K 8644 y CGP 28392, no afectaron a la actividad del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en un intervalo de concentración comprendido entre 0,1 y 75 μM (tabla 8).

A partir de los resultados obtenidos, representados en la figura 19 y mostrados en la tabla 8, el orden de potencia de acción de los fármacos estudiados queda reflejado de la siguiente manera: nitrendipina = diltiazem = PN 200-110 = felodipina > nimodipina > nifedipina > verapamil, mientras que la relación de los mismos en base a la eficacia de acción sería: diltiazem > verapamil > nimodipina = felodipina > nifedipina > nitrendipina > PN 200-110.

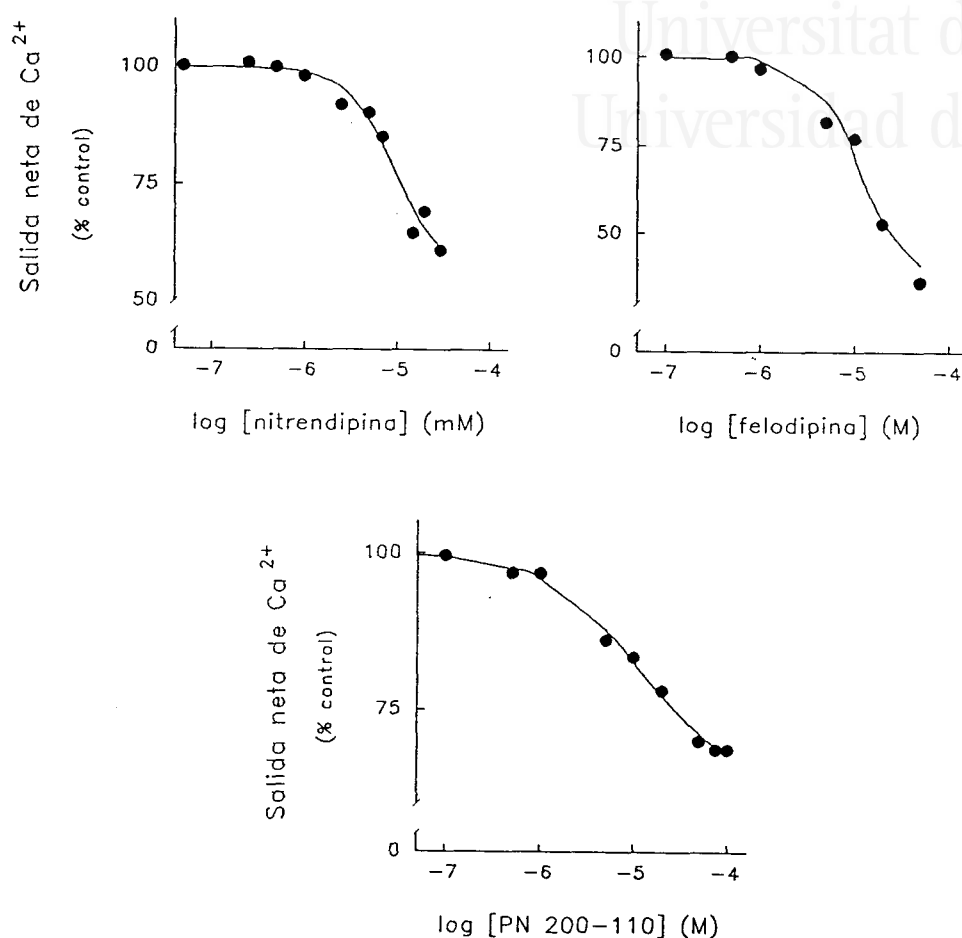


FIGURA 18.- EFECTO DE DERIVADOS DIHIDROPIRIDINICOS SOBRE EL INTERCAMBIO Na⁺/Ca²⁺.

Figura 18a.- Se incubaron las mitocondrias (1 mg/ml, volúmen final) durante 15 minutos con los distintos fármacos representados (0,1-100 μM). Se siguió el mismo protocolo experimental descrito en la figura 17.

Los parámetros obtenidos se muestran en la tabla 8 y se describen en el texto. El número de experimentos realizados para cada DHP se indica en la tabla 8.

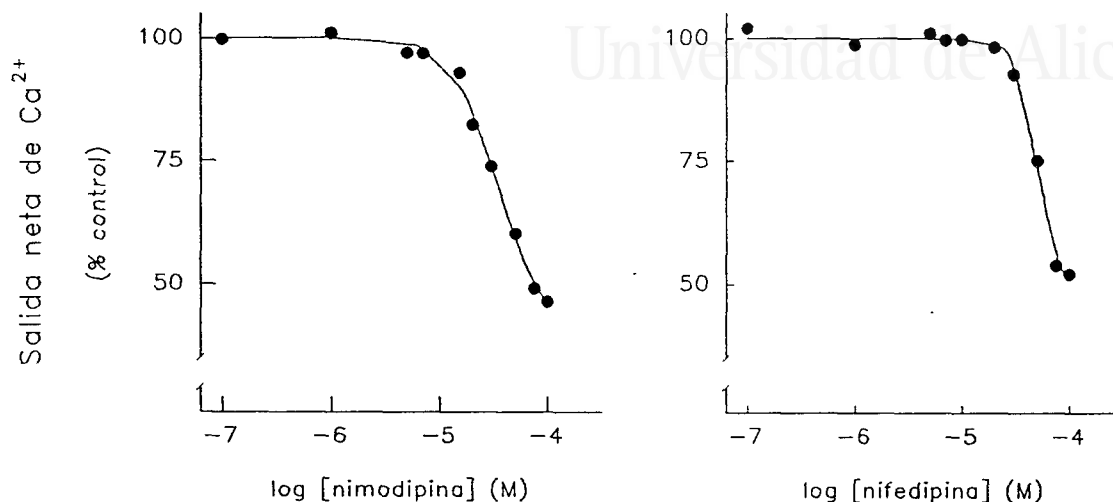


FIGURA 18b.- EFECTO DE NIMODIPINA Y NIFEDIPINA SOBRE EL INTERCAMBIO Na⁺/Ca²⁺.

Las condiciones experimentales son idénticas a las descritas en la figura 18a.

El estudio de la modulación del intercambio Na⁺/Ca²⁺ en mitocondrias adrenomedulares por fármacos bloqueantes del Ca²⁺, confirmaron los datos existentes en la bibliografía sobre la inhibición de dicho intercambio por derivados DHP en mitocondrias cardiacas manteniendo además la relación observada en cuanto a la potencia de acción de los fármacos estudiados (Vaghy y col., 1982; Matlib y col., 1983; Buss y col., 1988). Por el contrario, estudios recientes indicaron un efecto estimulador de nitrendipina e inhibidor de Bay K 8644 sobre el intercambio Na⁺/Ca²⁺ basados en el efecto observado sobre la respiración mitocondrial y salida basal de Ca²⁺ (Baydoun y col., 1990).

Al igual que ocurría con el diltiazem y verapamil, los resultados obtenidos con las distintas DHP utilizadas en este estudio, se aproximaron más a los valores de IC₅₀ obtenidos en aquellos estudios, en los que las mitocondrias presentaron una actividad del uniportador de Ca²⁺ elevada, acumulando casi todo el Ca²⁺ añadido (IC₅₀: 7, 66 y 150 μM para diltiazem, nifedipina y verapamil respectivamente) (Vaghy y col., 1982).



5.2.1.- Efecto de nitrendipina sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Estudios previos describieron un sitio de unión para DHP en mitocondrias procedentes de médula adrenal (Ballesta y col., 1990), por otro lado, al estudiar la modulación del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ por los derivados DHP, nitrendipina fue uno de los derivados DHP más potentes ejerciendo su efecto inhibitor sobre dicho sistema en mitocondrias adrenomedulares. En base a estos datos, se caracterizó el efecto ejercido por nitrendipina sobre la cinética del eflujo de Ca^{2+} .

Para ello, se estudió la actividad del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en presencia de nitrendipina $20 \mu\text{M}$. Tras preincubar las mitocondrias durante 15 minutos a 25°C en presencia de nitrendipina, se adicionó al medio Ca^{2+} $50 \mu\text{M}$. Las mitocondrias captaron Ca^{2+} durante 2 minutos, tras los cuales se bloqueó el uniportador de Ca^{2+} con RR $2 \mu\text{M}/\text{ADP}$ $16 \mu\text{M}$. Se mantuvo bloqueado durante otros 2 minutos periodo tras el cual se estimuló el eflujo de Ca^{2+} . Se midió el Ca^{2+} intramitocondrial a los 5 minutos de estimular su eflujo con Na^+ ($3\text{-}75 \text{ mM}$)/EDTA $0,1 \text{ mM}$, tiempo en el que el eflujo de Ca^{2+} en presencia de nitrendipina $20 \mu\text{M}$ se encontraba en fase lineal (resultados no mostrados).

A partir de la representación directa de los resultados, se obtuvieron los parámetros cinéticos del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, $K_m = 5,7 \pm 0,6 \mu\text{M}$ y $V_{\text{max}} = 2,9 \pm 0,1 \text{ nmoles de Ca}^{2+} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (figura 19a).

Al comparar los valores de K_m de dicho sistema en presencia ($5,7 \text{ mM}$) y ausencia de nitrendipina ($4,2 \text{ mM}$), se pudo comprobar que la presencia de nitrendipina no modificó la afinidad de dicho sistema por Na^+ externo, sin afectar tampoco a la relación hiperbólica con respecto al Na^+ externo. Además las curvas obtenidas en ambas condiciones presentaron pendientes similares en presencia y ausencia de nitrendipina ($n_H = 1,5 \pm 0,2$ y $1,4 \pm 0,2$ respectivamente) (figura 19a).

Sin embargo, la presencia de nitrendipina en el medio si afectó de forma considerable la V_{max} del proceso, disminuyendo la V_{max} a $2,9 \text{ nmoles de Ca}^{2+} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ desde valores próximos a $8 \text{ nmoles de Ca}^{2+} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ en condiciones control.



Por otro lado, el análisis de los datos experimentales mediante la representación de Scatchard, confirmó que la presencia de nitrendipina no afectaba a la relación de cooperatividad positiva del Na^+ como sustrato del intercambiador (figura 19b).

Ante los resultados obtenidos, se puede sugerir que la nitrendipina ejerce un efecto inhibitor de tipo no competitivo sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, afectando tan sólo la V_{max} del intercambio sin modificar la K_m (tabla 9).

Teniendo en cuenta además, la modulación del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ por parte de los derivados DHP, y las diferencias observadas con respecto a la potencia y eficacia de acción de las mismas sobre dicho sistema, tan solo se podría especular sobre la asociación del DHPr con el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, no pudiéndose confirmar si se trata de la misma entidad molecular o de diferentes entidades moleculares y sin precisar en este último caso, si se trata de una asociación directa o indirecta con la proteína transportadora responsable de dicho intercambio presente en la membrana mitocondrial interna.

TABLA 9.- EFECTO DE NITRENDIPINA SOBRE K_m Y V_{max} DEL INTERCAMBIO $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

	K_m (mM)	V_{max} (nmol Ca^{2+} $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)	n_H
Control	4,2	7,8	1,4
Nitrendipina	5,7	2,9	1,5

Se representan los parámetros correspondientes a las figuras 13 y 29 para las condiciones control y en presencia de nitrendipina 20 μM respectivamente.

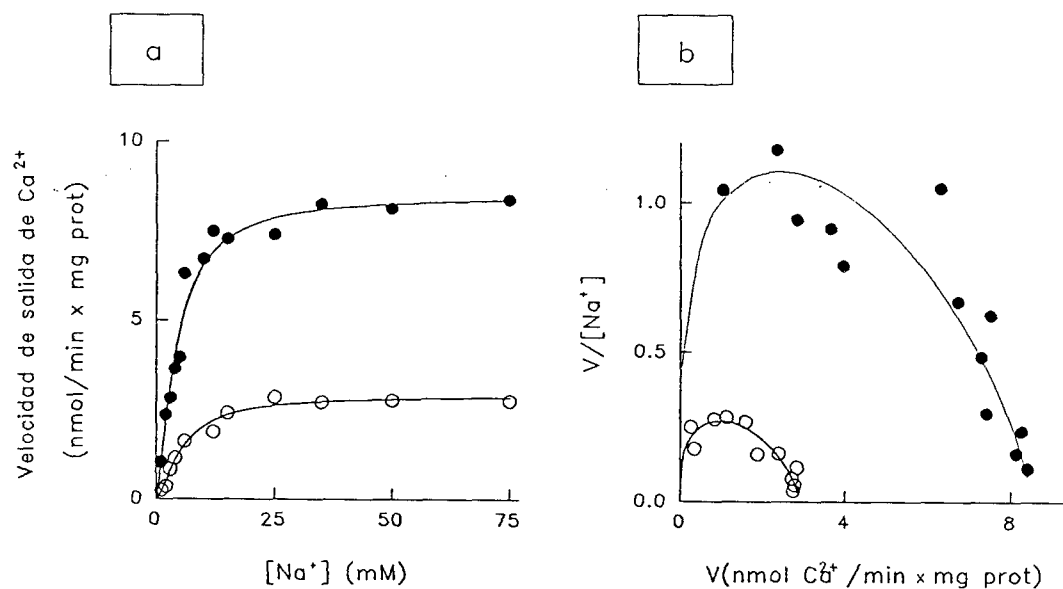


FIGURA 19.- EFECTO DE NITRENDIPINA SOBRE EL INTERCAMBIO $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Se incubaron las mitocondrias (1mg/ml, volúmen final) durante 15 minutos en presencia de nitrendipina $20 \mu\text{M}$. Se siguió el mismo protocolo experimental descrito en la figura 11.

Figura 19a.- Cinética del eflujo de Ca^{2+} estimulado por Na^+ (3-75 mM)/EDTA 0,1 mM en presencia (○) y ausencia de nitrendipina $20 \mu\text{M}$ (●).

Figura 19b.- Representación de Scatchard de los datos experimentales representados en la figura 19a.

Los parámetros obtenidos se describen en el texto. Los datos corresponden a dos experimentos independientes realizados por duplicado con diferentes preparaciones mitocondriales.



5.2.2.- Efecto de nitrendipina sobre el eflujo de Ca^{2+} independiente de Na^+ .

Para realizar este estudio, la nitrendipina (5-30 μM) se adicionó al medio de ensayo seguidamente al bloqueo del uniportador de Ca^{2+} con RR 2 μM /ADP 16 μM . Se estudió el eflujo basal de Ca^{2+} y el estimulado por la adición de H^+ al medio en ausencia (control) y en presencia de nitrendipina. Se observó que tras 10 minutos de bloqueo del uniportador de Ca^{2+} en presencia de nitrendipina 5 μM , permanecía acumulado en la mitocondria aproximadamente un 94% con respecto al control, al igual que con la máxima concentración de nitrendipina utilizada (95,5%).

Por otro lado, la presencia de nitrendipina tampoco alteró el contenido de Ca^{2+} intramitocondrial tras la adición de H^+ al medio. Tanto en presencia de nitrendipina 5 - 30 μM , el nivel de Ca^{2+} retenido fue de un 98% con respecto al Ca^{2+} intramitocondrial en ausencia de nitrendipina (resultados no mostrados).

Por tanto, nitrendipina (5-30 μM) carecía de efecto tanto sobre el eflujo basal de Ca^{2+} (pH 7,2) como sobre el eflujo de Ca^{2+} independiente de Na^+ , estimulado por la adición de ClH 0,1 M al medio de ensayo (pH 6,7), confirmando el efecto específico de los derivados DHP sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



6.- RESPIRACION MITOCONDRIAL.

La integridad funcional de las mitocondrias viene determinada generalmente por el índice de control respiratorio (ICR), estimulando con ADP el paso del estado 4 al estado 3 o activo de la respiración mitocondrial, sin embargo, al igual que ocurre en la caracterización de los movimientos de Ca^{2+} mitocondriales, el medio de ensayo utilizado puede influir sobre los valores de ICR (Harris y Heffron, 1982).

Las condiciones experimentales elegidas para medir el consumo de O_2 fueron las mismas que se utilizaron para realizar el estudio sobre los movimientos de Ca^{2+} mitocondriales, salvo las siguientes excepciones: se excluyó el ADP del medio de ensayo y la temperatura fue de 37°C ya que controles previos demostraron una respuesta mayor que a 25°C (resultados no mostrados).

Como se observa en la figura 20a, el consumo de O_2 comenzó tras la adición del sustrato de la cadena de transporte electrónico, obteniendo una velocidad respiratoria de $15,7 \text{ nmoles de O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, que fue ligeramente incrementada tras la adición de $\text{ADP/Mg}^{2+} 0,4 \text{ mM}$ al medio ($26,3 \text{ nmoles de O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), de forma que el valor de ICR (1,8) calculado a partir de los resultados obtenidos, fue inferior al valor mínimo que define la integridad funcional de las mitocondrias ($3 < \text{ICR} < 15$). Estos resultados contrastaron con los valores de ICR comprendidos en el intervalo 3-15 en mitocondrias de riñón ó hígado (Tager y col., 1983; Hirsch y col., 1988).

En estudios previos, se describió la existencia de competitividad entre el Ca^{2+} y el ADP en estimular la respiración mitocondrial (Bygrave, 1978). Se realizó por tanto, el mismo protocolo experimental pero en presencia de EDTA $0,1 \text{ mM}$ (figura 20b) con el fin de determinar si la presencia de Ca^{2+} en el medio de ensayo fue la causa de los resultados obtenidos.

Se observó una disminución en el consumo de O_2 en el estado 4 ($7-10 \text{ nmoles de O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), sin embargo, la presencia de EDTA no interfirió sobre la velocidad de consumo de O_2 después de la adición de ADP/Mg^{2+} ($24,2 \text{ nmoles de O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), obteniendo un ICR (2,2) prácticamente idéntico al obtenido en ausencia de EDTA.

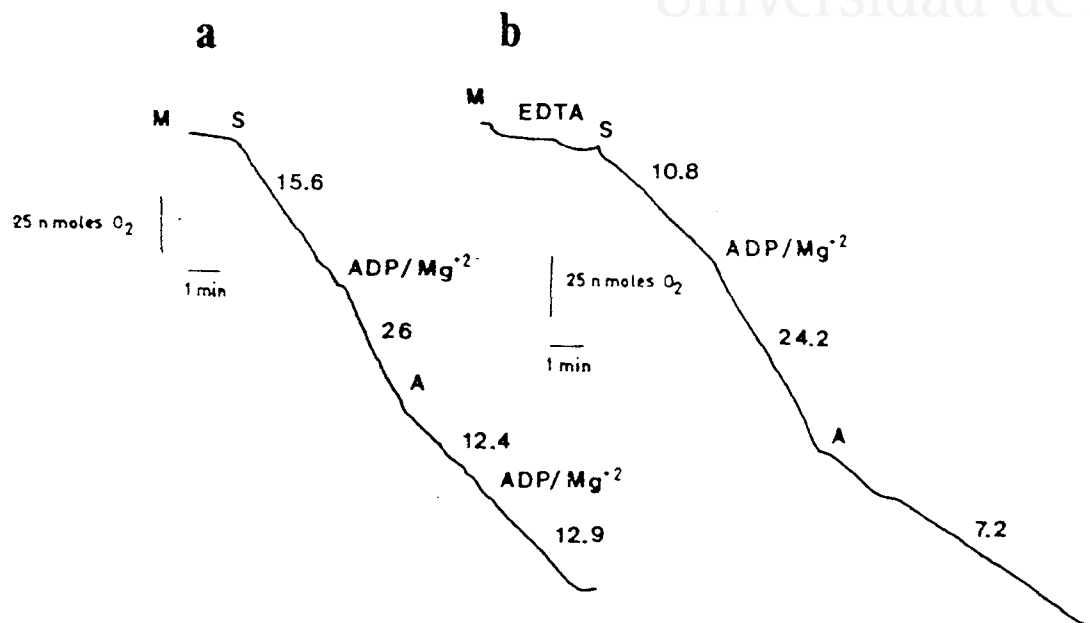


FIGURA 20.- RESPIRACION MITOCONDRIAL.

Las mitocondrias (M) (4 mg) se incubaron a 37°C con 4 ml de medio de ensayo suplementado con rotenona 4 μ M, PO₄H₂K 0,2 mM y acetato 10 mM. El estado 4 de la respiración mitocondrial fue inducido con la adición al medio de succinato (s) 5 mM.

Las adiciones de ADP/Mg²⁺ 0,4 mM y atractilósido (A) 60 μ M, se realizaron conforme se estabilizaba el registro. La adición de EDTA (0,1 mM) se realizó tras la adición de las mitocondrias y antes de comenzar la respiración mitocondrial. Los números representan la velocidad de consumo de O₂ en nmoles min⁻¹ mg⁻¹.



El valor de ICR obtenido parecía estar influido por la velocidad de consumo de O_2 obtenida en el estado 3 de la respiración mitocondrial, por lo que se hipotetizó sobre la alteración de la actividad del transportador de nucleótidos durante el procedimiento de aislamiento o por el medio de ensayo utilizado.

Para ello, una vez estabilizado el registro tras la adición de ADP/Mg^{2+} , se adicionó al medio atractilósido $60 \mu M$, observando una disminución en la velocidad respiratoria tanto en ausencia como en presencia de EDTA. Además, como se puede apreciar en la figura 20a, una adición de ADP posterior a la de atractilósido, no supuso aumento de la velocidad ya que el transportador de nucleótidos había quedado bloqueado, sugiriendo que dicha proteína transportadora no había sido alterada.

Estudios previos demostraron que tanto el el protocolo utilizado para la homogenización del tejido como el medio de ensayo utilizado influían sobre la velocidad respiratoria en el estado 3, obteniendo menor velocidad respiratoria en el estado activo y valores de ICR inferiores a 3 con mitocondrias aisladas a partir de la homogenización del tejido con polytron y utilizando un medio ensayo de sacarosa/EDTA (Harris y Heffron, 1982). El estudio de la respiración mitocondrial permitió comprobar que el método empleado para el aislamiento de las mitocondrias no perjudicó ni la integridad estructural ni funcional de las mitocondrias, manteniendo la viabilidad de las mismas incluso transcurridas 7-10 horas de su aislamiento, hecho que se confirmó con los resultados obtenidos en el estudio de los movimientos de Ca^{2+} .

6.1- EFECTO DE LOS MOVIMIENTOS Ca^{2+} SOBRE LA RESPIRACION MITOCONDRIAL.

La captación de Ca^{2+} y la fosforilación oxidativa son procesos alternativos en la utilización de la energía de respiración, de forma que, en presencia de Ca^{2+} y ADP, el Ca^{2+} estimula con prioridad la respiración mitocondrial, no siendo modulada por ADP, ni éste fosforilado a ATP, hasta que dicho catión no ha sido acumulado (Rossi y Lehninger, 1964).



Por lo tanto, paralelamente al estudio de los movimientos de Ca^{2+} , se realizaron medidas de consumo de O_2 , siguiendo el mismo protocolo experimental que el utilizado para estudiar la captación y eflujo de Ca^{2+} .

Como se observa en la figura 21, utilizando succinato como sustrato oxidable en presencia de rotenona, la adición de Ca^{2+} 50 μM estimuló la velocidad de respiración, dicho estímulo cesó tras el bloqueo del influjo de Ca^{2+} con rojo rutenio, volviendo al nivel del estado 4 de la respiración mitocondrial.

Siguiendo el protocolo experimental de movimientos de Ca^{2+} , se pudo observar que al estimular el eflujo de Ca^{2+} con Na^+ 20 mM/EDTA 0,1 mM, la velocidad de consumo de O_2 se mantenía durante los primeros minutos (9,8 nmoles de O_2 min^{-1} mg^{-1}), aumentando de forma no significativa en la fase final (15 nmoles de O_2 min^{-1} mg^{-1}). Debido a la presencia de rojo rutenio en el medio se evitó la recaptación del Ca^{2+} y estimulación continua de la respiración mitocondrial.

En la tabla 10, se resumen los datos de varios experimentos realizados con diferentes preparaciones mitocondriales. En esta se observan las diferencias de velocidad de consumo de O_2 registradas siguiendo el mismo protocolo experimental utilizado para estudiar los movimientos de Ca^{2+} .

Al igual que ocurría en mitocondrias de hígado (Murphy y col., 1990), la adición de Ca^{2+} estimuló la respiración mitocondrial (desde $12,1 \pm 1,8$ nmoles O_2 min^{-1} mg^{-1} en el estado 4, hasta 21 ± 4 nmoles O_2 min^{-1} mg^{-1}). Una vez bloqueado el uniportador de Ca^{2+} , la respiración mitocondrial volvió al estado 4 (10 ± 2 nmoles O_2 min^{-1} mg^{-1}), manteniéndose tras estimular el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ($12,2 \pm 2,5$ nmoles O_2 min^{-1} mg^{-1}). Estos datos fueron analizados mediante el test modificado de la t de student, observando que la velocidad de consumo de O_2 estimulada por Ca^{2+} , fue significativamente diferente de la velocidad respiratoria en el estado 4 y de la obtenida tras la adición de RR y Na^+/EDTA ($P < 0,01$), demostrando que el ciclo del Ca^{2+} mitocondrial implica un consumo de energía, dando lugar al desacoplamiento entre la cadena de transporte electrónico y la fosforilación oxidativa, como fue establecido anteriormente para mitocondrias cardíacas (Crompton y col., 1976a).

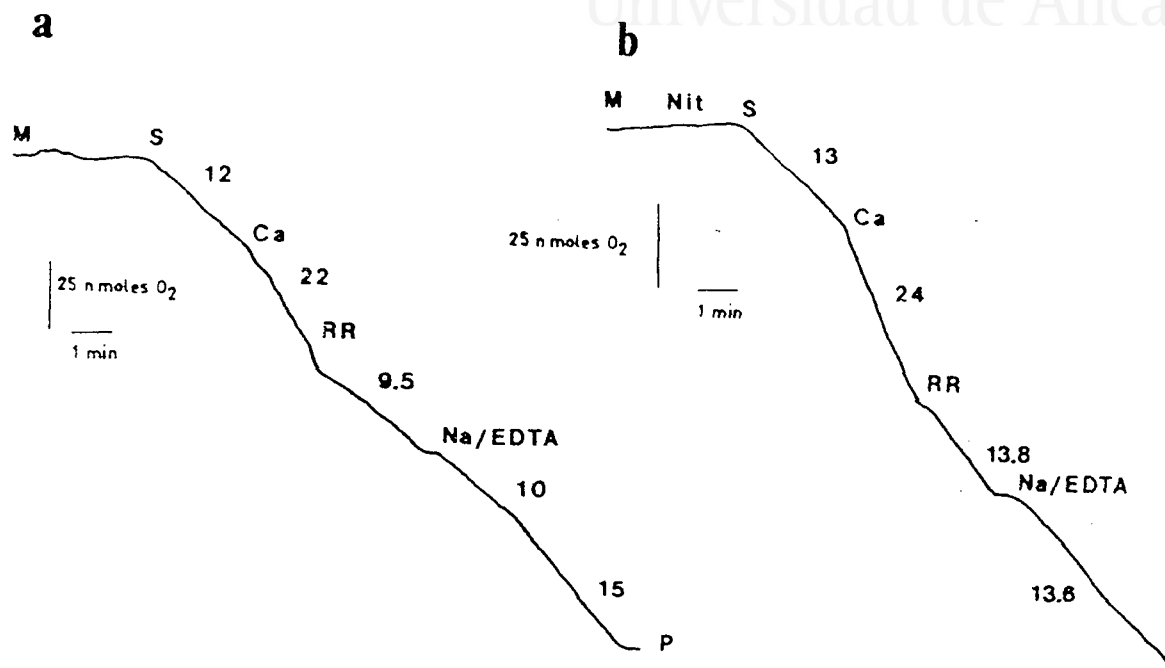


FIGURA 21.- MODULACION DE LA RESPIRACION MITOCONDRIAL.

Figura 21a.- Efecto de los movimientos de Ca^{2+} sobre la respiración mitocondrial.

Se siguió el mismo protocolo que el descrito en la figura 21. Tras comenzar la respiración mitocondrial con la adición de succinato (S) 5 mM, las adiciones siguientes fueron Ca^{2+} 50 μM , rojo rutenio (RR) 2 μM y Na^+ 20 mM/EDTA 0,1 mM.

Figura 21b.- Efecto de nitrendipina sobre la respiración mitocondrial. Las mitocondrias (4mg) se incubaron durante 15 minutos a 37°C con nitrendipina 20 μM (Nit). Seguidamente se estimuló la cadena de transporte electrónico con succinato 5 mM siguiendo el mismo protocolo experimental descrito.

Los números representan la velocidad de consumo de O_2 en $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.


 TABLA 10.- RESUMEN DEL EFECTO DE LOS MOVIMIENTOS Ca^{2+} SOBRE LA RESPIRACION MITOCONDRIAL.

ADICION	Velocidad de consumo de O_2 (nmoles de O_2 min^{-1} mg^{-1})	n
Succinato	$12,1 \pm 1,8$	8 (*)
Ca^{2+}	21 ± 4	7
Rojo rutenio	10 ± 2	6 (*)(**)
Na^+ /EDTA	$12,2 \pm 2,5$	6 (*)(**)

Las mitocondrias (4mg/4 ml, volumen final) se incubaron a 37°C en tampón de ensayo suplementado con rotenona $4 \mu\text{M}$, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ $0,2 \text{ mM}$ y Acetato 10 mM . A continuación se añadió al medio succinato 5 mM . Las adiciones posteriores, descritas en la tabla, se realizaron conforme se estabilizaba el registro de consumo de O_2 , tal y como se describe en la sección de Material y Métodos. El número de experimentos realizados con diferentes preparaciones de mitocondrias se determina como n.

Las pendientes de consumo de oxígeno obtenidas tras la adición de los diferentes sustratos, fueron comparadas mediante el test modificado de la t de student, ((*): $P < 0,01$ estadísticamente diferentes con respecto al consumo de O_2 en presencia de Ca^{2+} ; (**): no son estadísticamente diferentes entre sí).



6.2- EFECTO DE NITRENDIPINA SOBRE LA RESPIRACION MITOCONDRIAL.

Al realizar el mismo protocolo experimental descrito en el apartado 6.1., pero incubando previamente las mitocondrias con nitrendipina 20 μM durante 15 minutos a 37°C, se pudo comprobar que dicha DHP no afectó al estado 4 de la respiración mitocondrial, ni al estímulo de la misma producido por Ca^{2+} (figura 21b).

La falta de efecto de nitrendipina sobre el estado 4 de la respiración mitocondrial contrastó con los estudios realizados con mitocondrias cardiacas, en los que nitrendipina incrementó la velocidad de consumo de O_2 en el estado 4 y la disminuyó ligeramente en el estado 3 (Baydoun y col., 1991). Los resultados de este grupo fueron obtenidos con concentraciones de nitrendipina superiores a 100 μM y utilizando glutamato y malato como sustratos de la cadena de transporte electrónico, mientras que en los estudios realizados con mitocondrias adrenomedulares, dicha concentración no fue superada por problemas de solubilidad de las DHP, y el sustrato de la cadena respiratoria utilizado fue succinato.

A través del papel modulador de nitrendipina sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, se podría sugerir que nitrendipina regula de forma indirecta la respiración mitocondrial, evitando ante una situación de estrés, el reciclaje del Ca^{2+} mitocondrial y de esta forma el estímulo continuo de la cadena de transporte electrónico y desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, que daría lugar a una demanda energética perjudicial para la célula.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



7.- ESTUDIOS DE FIJACION DE [³H]NITRENDIPINA.

Los estudios de fijación de [³H]nitrendipina en membranas mitocondriales procedentes de tejido no neuronal (Brush y col, 1987; Zernig y Glossman, 1988) y de médula adrenal bovina (Ballesta y col., 1990) permitieron la identificación y caracterización de un sitio de unión para nitrendipina en estas organelas. Estos sitios fueron definidos en las condiciones óptimas de fijación, como sitios de unión de baja afinidad y alta capacidad.

Sin embargo, los resultados obtenidos a partir de los estudios funcionales mostraron diferencias significativas entre la concentración que define la potencia de acción de la nitrendipina sobre el intercambio Na⁺/Ca²⁺ mitocondrial (IC₅₀ = 9,2 μM), y la concentración que define la afinidad de la unión de [³H]nitrendipina al DHPr de membrana mitocondrial interna (Kd = 252 nM) (Ballesta y col., 1990), por lo que se planteó el estudio de la fijación de dicho radioligando utilizando mitocondrias intactas y el tampón de captación utilizado para estudiar los movimientos de Ca²⁺.

7.1.- ESTUDIOS EN EL EQUILIBRIO.

Las mitocondrias (0,1 mg/1 ml; volumen final), se incubaron a 25°C junto con [³H]nitrendipina (4nM) en presencia de un amplio intervalo de concentración de nitrendipina no marcada (0,025-100 μM), durante una hora, período en el que previamente se determinó que la unión se encontraba en el equilibrio (resultados no mostrados).

A partir de un experimento control realizado por duplicado se obtuvieron los parámetros de fijación, Kd = 414 nM y la Bmax de 1,9 pmol mg⁻¹ proteína (tabla 11).

Al comparar con los valores descritos en membranas mitocondriales del mismo tejido, se comprobó que en estas condiciones experimentales, la Kd obtenida era del mismo orden (Kd = 252 nM) mientras que la densidad de estos sitios de fijación disminuía considerablemente (Bmax = 169 pmol mg⁻¹ proteína) (Ballesta y col., 1990).

TABLA 11.- PARAMETROS DE FIJACION DE [³H]NITRENDIPINA.

	Kd (nM)	Bmax (pmol/mg prot)
Membrana mitocondrial	254 nM	16
Mitocondria intacta	414 nM	1,9

Tanto membranas mitocondriales como mitocondrias intactas (0,1 mg/ml, volumen final), se incubaron a 25°C durante 1 hora con [³H]nitrendipina (4 nM) y nitrendipina no marcada (25 nM-100µM), siguiendo el protocolo experimental descrito en la sección de Material y Métodos. Los resultados corresponden a 1 experimento realizado por triplicado.

Por motivo de comparación, se realizó el mismo experimento de desplazamiento bajo las mismas condiciones experimentales, pero utilizando membranas mitocondriales. Los resultados (tabla 11) mostraron que el valor de Kd se mantenía (254 nM) mientras que la densidad de sitios de fijación (16 pmol mg⁻¹ proteína) coincidió con la Bmax definida al eliminar el ClNa del medio, tanto en membranas mitocondriales procedentes de médula adrenal bovina (Ballesta y col., 1990) como en mitocondrias cardiacas (Brush y col., 1987).

Ante los datos descritos, la disminución en la densidad de sitios receptores observada en nuestras condiciones experimentales, podría ser debido a la baja fuerza iónica del medio de ensayo utilizado. El ClNa podría influir sobre la accesibilidad del receptor, modificando tal vez directamente la conformación de la entidad molecular responsable de la unión, o quizás por medio de la modificación de proteínas periféricas al sitio receptor de forma que éste quedase más accesible.



7.2.- DESPLAZAMIENTO DE [³H]NITRENDIPINA POR NITRENDIPINA NO MARCADA.

A pesar de que la afinidad de [³H]nitrendipina por su sitio de unión no se modificaba con el medio de ensayo utilizado, se mantenían las diferencias observadas entre la K_d (en el orden nM) y la concentración necesaria para observar su efecto (en el orden μ M) sobre el eflujo de Ca^{2+} estimulado por Na^+ . Teniendo en cuenta la diferencia con respecto a la concentración de proteína utilizada en los experimentos funcionales y de fijación de radioligandos, se realizó el desplazamiento de [³H]nitrendipina (4 nM) por nitrendipina no marcada utilizando un intervalo de proteína comprendido entre 0,1 y 1 mg/ml de volumen final.

Al aumentar la concentración de proteína en el ensayo hasta 1mg/ml, y manteniendo constantes el resto de condiciones experimentales, se observó cómo la K_d aumentaba de forma lineal ($r^2 > 0,96$) al aumentar la concentración de proteína (figura 22), alcanzando valores próximos a 3 μ M.

Así pues, para definir los parámetros de fijación de [³H]nitrendipina en mitocondrias intactas, se mantuvieron todas las condiciones experimentales empleadas en el estudio de los movimientos de Ca^{2+} , incluyendo la concentración de proteína de 1 mg/ml de volumen final, con el fin de no variar ningún factor con respecto a estos estudios.

Los parámetros de unión de nitrendipina a mitocondrias intactas, fueron determinados mediante experimentos de desplazamiento de [³H]nitrendipina (4nM) por el mismo ligando no marcado, utilizando un intervalo de concentración comprendido entre 0,05 y 50 μ M. Como se observa en la figura 23, a partir del ajuste de los datos experimentales mediante curvas dosis respuesta, tomando como fijación inespecífica la obtenida con nitrendipina 50 μ M, se calcularon tanto la densidad de sitios de unión ($B_{max} = 6,02 \pm 0,40$ pmol mg^{-1} proteína) como la afinidad de la unión, con una $K_d = 2,9 \pm 0,2$ μ M. A partir de estos resultados, se observó que en relación a la densidad de sitios de unión, el incremento en la concentración de proteína no aumentó



Resultados y discusión

de forma proporcional el valor de la B_{max} . Ante estos resultados surgió la posibilidad de que tal vez la concentración de proteínas empleada en el ensayo incluyese proteínas constituyentes de la matriz mitocondrial subestimando la concentración real de proteínas de membrana y de esta forma se infravalorase la densidad de receptores localizados en la membrana mitocondrial interna (Zernig y Glossmann, 1988; Ballesta y col., 1990).

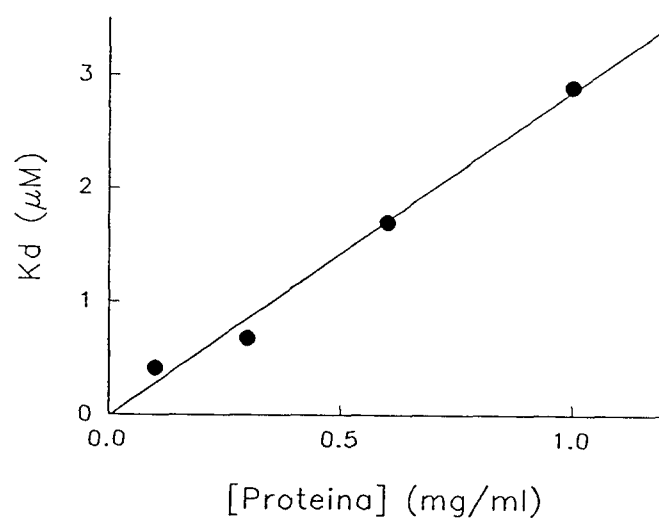


FIGURA 22.- RELACION ENTRE LA K_d Y LA CONCENTRACION DE PROTEINA MITOCONDRIAL.

Las mitocondrias intactas (0,1-1 mg/ml) se incubaron con [3 H]nitrendipina (4 nM) en presencia de nitrendipina no marcada (25 nM-100 µM) durante 1 hora a 25°C en tampón de captación. Se representa la linealidad ($r^2 > 0,96$) de la relación entre la concentración de proteína y la constante de disociación obtenida a diferentes concentraciones de proteína

Los datos son la media de tres experimentos realizados por duplicado con diferentes preparaciones de mitocondrias.

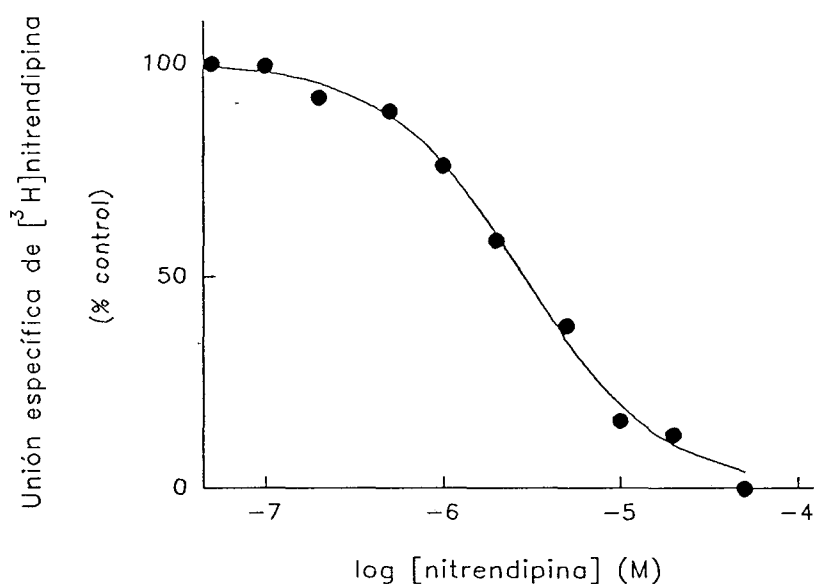


FIGURA 23- DESPLAZAMIENTO DE LA FIJACION DE [³H]NITRENDIPINA POR NITRENDIPINA NO MARCADA.

Se incubaron a 25°C las mitocondrias intactas (1 mg/ml, volúmen final) en presencia de diferentes concentraciones de nitrendipina no marcada (0,5-50 μ M) y [³H]nitrendipina (4 nM) durante 1 hora. Transcurrido el tiempo de incubación, se determinó la fijación específica como se describe en la sección de Material y Métodos. Los parámetros obtenidos, se describen en el texto. La fijación inespecífica se definió en presencia de nitrendipina 50 μ M.

Los datos corresponden a la media de 4 experimentos realizados por duplicado con diferentes preparaciones mitocondriales.



7.3.- MODULACION DE LA FIJACION DE [³H]NITRENDIPINA A MITOCONDRIAS INTACTAS.

El estudio de la modulación de la fijación de [³H]nitrendipina a mitocondrias intactas se realizó en las condiciones descritas anteriormente, mediante experimentos de desplazamiento de la fijación de dicho radioligando por derivados DHP, así como diltiazem, verapamil, N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCCD) y nucleótidos de adenina. Para ello, las mitocondrias (1mg/ml) se incubaron durante 1 hora a 25°C en presencia de [³H]nitrendipina (4 nM) en presencia de los distintos derivados utilizados, que fueron los mismos que se emplearon para estudiar la modulación de los movimientos de Ca²⁺.

7.3.1.- Derivados dihidropiridínicos.

En la figura 24, en la que se representa la fijación específica de [³H]nitrendipina, en porcentaje de fijación específica, frente al logaritmo de la concentración de los fármacos empleados, se observa que las cuatro DHP utilizadas desplazaron la unión de [³H]nitrendipina, siendo PN 200-110 y nimodipina las más potentes con valores de K_i de 14 y 15 μM respectivamente, inhibiendo la fijación de [³H]nitrendipina hasta un 90%.

Al comparar con los datos existentes sobre el efecto inhibitor de PN 200-110 y nimodipina en mitocondrias cardíacas, ambas DHP fueron también las más potentes, aunque los valores de K_i estuvieron comprendidos en el orden nM (entre 300 y 500 nM) (Zernig y Glossmann, 1988), coincidiendo al igual que en el caso de mitocondrias intactas, con el orden de magnitud que define la K_d de nitrendipina.

Con respecto a las otras dos DHP utilizadas, nifedipina y felodipina, fueron prácticamente igual de potentes que nimodipina y PN 200-110, presentando constantes de inhibición (K_i) de 19 y 20 μM respectivamente, siendo nifedipina la menos eficaz inhibiendo la fijación de [³H]nitrendipina (un 66% frente a un 80% de inhibición de felodipina).

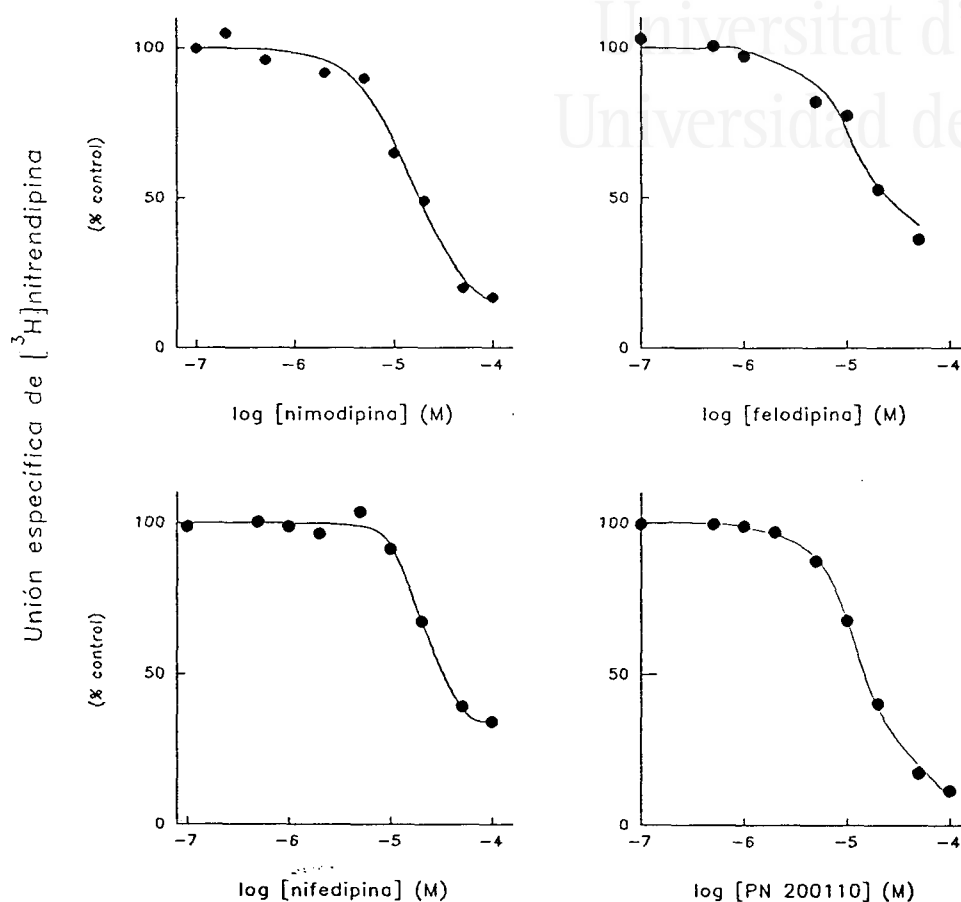


FIGURA 24.- INHIBICION DE LA FIJACION DE $[^3\text{H}]$ NITRENDIPINA A MITOCONDRIAS INTACTAS POR DERIVADOS DIHIDROPIRIDINICOS.

Las mitocondrias (1 mg/ml, volúmen final) se incubaron a 25°C durante 1 hora, en presencia de los diferentes fármacos DHP (0,5-100 μM) y $[^3\text{H}]$ nitrendipina (4 nM). Se definió la fijación inespecífica en presencia de nitrendipina 20 μM .

Las condiciones de ensayo y protocolo experimental se describen en la sección de Material y Métodos. Los parámetros obtenidos se muestran en la tabla 12, así como el número de experimentos realizados.



Resultados y discusión

Como se observa en la figura 24, si se compara con el desplazamiento de [³H]nitrendipina por el mismo ligando no marcado (figura 23) se puede apreciar cómo las cuatro DHP desplazaron la fijación específica de [³H]nitrendipina hacia la derecha, y como se muestra en la tabla 12, las pendientes (h) de las 4 curvas representadas fueron superiores a la unidad, oscilando los valores entre 1,5 y 2,9 reflejando una relación de cooperatividad positiva en la unión del ligando.

Los resultados de estudios previos realizados con membranas mitocondriales cardiacas, demostraron un efecto inhibitor de los derivados DHP sobre la fijación de [³H]nitrendipina al DHP_r mitocondrial, presentando también valores de h superiores a la unidad, excepto para los isómeros de PN 200-110 (Zernig y Glossmann, 1988). En concordancia con los estudios anteriores, los derivados DHP estudiados fueron los únicos que inhibieron la fijación [³H]nitrendipina al DHP_r mitocondrial en mitocondrias intactas, tal y como se aprecia en la tabla 12. Sin embargo, no todos los derivados DHP tuvieron efecto sobre la fijación de [³H]nitrendipina, CGP 28392 y amlodipina fueron los únicos que no desplazaron la unión de [³H]nitrendipina.

Los resultados obtenidos con mitocondrias intactas y los estudios realizados con membranas mitocondriales (Brush y col., 1987; Zernig y Glossmann, 1988; Ballesta y col. 1990) coinciden con respecto al papel modulador de los derivados DHP sobre el desplazamiento de [³H]nitrendipina, aunque los valores de K_i en los dos tipos de preparaciones difieren en 3 órdenes de magnitud.

Sin embargo, recientemente ha sido descrita la inhibición de la fijación de [³H]nitrendipina en mitocondrias intactas procedentes de tejido cardiaco, en condiciones experimentales que favorecen el hinchamiento mitocondrial (Zernig y col., 1990), aproximándose en este caso los valores de K_i (en el orden μM) de las DHP, a los obtenidos en esta memoria. Además, los valores de K_i de las DHP se correlacionaron con los de sus IC₅₀ sobre el canal aniónico de membrana mitocondrial interna (IMAC).

TABLA 12.- INHIBICION DE LA FIJACION DE [³H]NITRENDIPINA

Fármaco	K ₁ (μM)	inhibición máxima (%)	h	n
nitrendipina	2,9 ± 0,2		1,1 ± 06	4
PN 200-110	14,0 ± 0,8	90	1,8 ± 0,2	4
nimodipina	15,4 ± 2,8	90	1,5 ± 0,3	3
felodipina	18,5 ± 1,1	80	1,6 ± 0,1	3
nifedipina	20,2 ± 1,6	66	2,9 ± 0,7	3
CGP 28392	s.e.(100 μM)			
amlodipina	s.e.(200 μM)			
diltiazem	s.e.(100 μM)			
verapamil	s.e.(1,5 mM)			

Las mitocondrias (1mg/ml, volúmen final) se incubaron a 25°C durante 15 minutos en presencia de los fármacos (0,01-100 μM) indicados en la tabla. Se adicionó al medio Ca²⁺ 50 μM. El periodo de captación de Ca²⁺ fue de 2 minutos. Tras 2 minutos de bloqueo del uniportador de Ca²⁺, se estimuló el eflujo con Na⁺ 20 mM/EDTA 0,1 mM. Se midió el Ca²⁺ intramitocondrial a los 10 minutos de estímulo de la forma descrita en Material y Métodos.

h representa las pendientes obtenidas tras realizar el ajuste de los datos experimentales según se describe en la sección de Material y Métodos; n representa el número de experimentos realizados por duplicado con diferentes preparaciones mitocondriales.

s.e. corresponde a la ausencia de efecto del fármaco a la mayor concentración utilizada, indicada entre paréntesis.



7.3.2.- Otros derivados.

Entre los bloqueantes del calcio no DHP, se observó que el verapamil carece de efecto sobre la fijación de [³H]nitrendipina, incluso a concentraciones superiores a 1 mM (tabla 12). El tiempo de incubación utilizado para realizar el desplazamiento de la fijación de [³H]nitrendipina por verapamil en mitocondrias intactas, fue de 1 hora, mientras que en el caso de membranas mitocondriales, fue necesario incubar durante 150 minutos aunque la concentración de verapamil utilizada para observar dicho efecto fue 100 veces inferior (Ballesta y col., 1990).

De todas formas, los datos existentes con respecto al efecto de verapamil sobre la fijación de [³H]nitrendipina a membranas procedentes de tejido cardíaco son contradictorios. Por un lado se sugirió que el verapamil carecía de efecto sobre la fijación (Brush y col., 1987) mientras que por otro lado, mediante experimentos de desplazamiento de la fijación de [³H]nitrendipina, se observó un efecto inhibitor mucho menos potente que los derivados DHP, con valores de IC₅₀ próximos a 100 μM (Zernig y Glossmann, 1988). Con respecto a membranas mitocondriales de médula adrenal bovina, fue demostrado que en las condiciones óptimas para definir los parámetros de fijación de [³H]nitrendipina, el verapamil regulaba de forma alostérica la fijación de [³H]nitrendipina, reduciendo la afinidad de nitrendipina por el DHPr sin afectar la Bmax (Ballesta y col., 1990).

Así pues, parece que el tampón, sustratos empleados, pH y fuerza iónica del medio, influyen sobre la modulación que ejerce el verapamil sobre la fijación de [³H]nitrendipina en mitocondrias intactas. Sin embargo, en cuanto a su efecto funcional sobre los movimientos de Ca²⁺, los resultados obtenidos están en concordancia con los datos existentes, afectando el intercambio Na⁺/Ca²⁺ a concentraciones superiores a 100 μM (Vaghy y col., 1982).

En cuanto a la ausencia de efecto del diltiazem (tabla 12), los resultados obtenidos con mitocondrias intactas coincidieron con los datos existentes sobre el desplazamiento de la fijación de [³H]nitrendipina en membranas mitocondriales (Brush



y col., 1987; Zernig y Glossmann, 1988; Ballesta y col., 1990), en los que se describió la carencia de efecto de diltiazem sobre la fijación de [^3H]nitrendipina al DHPr. Por otro lado, los resultados obtenidos a partir de los estudios funcionales sobre el efecto del diltiazem, éste fue uno de los inhibidores más potentes sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial, no descartándose por tanto, una posible asociación con el DHPr mitocondrial que a su vez, esté asociado con la proteína responsable del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Al realizar los experimentos de desplazamiento de [^3H]nitrendipina en presencia de nucleótidos de adenina, ADP y ATP, ninguno de los dos, en el amplio intervalo de concentración utilizado (0,1 μM -10 mM), desplazó la unión de [^3H]nitrendipina en las condiciones experimentales utilizadas, mientras que en membranas mitocondriales cardiacas fue descrito la modulación alostérica por parte de los nucleótidos de adenina, utilizando en este caso las condiciones óptimas para la fijación de [^3H]nitrendipina (Zernig y col., 1988). Este hecho hizo sospechar en un principio a los autores sobre la asociación de este receptor de baja afinidad con la proteína translocadora de nucleótidos de adenina, siendo rechazada por los mismos autores .

En nuestras condiciones experimentales, los nucleótidos de adenina en el intervalo de concentración estudiado carecen de efecto sobre la fijación de [^3H]nitrendipina a mitocondrias intactas, sin embargo desde el punto de vista funcional sí ejercen un efecto modulador, aunque indirecto, sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Así pues, parece razonable pensar que el DHPr mitocondrial de médula adrenal, al igual que en mitocondrias cardiacas, tampoco esté asociado con la proteína translocadora de nucleótidos.

Posteriormente, se relacionó el DHPr con el canal aniónico de membrana mitocondrial interna (IMAC), al observar que, en condiciones en las que se induce el hinchamiento mitocondrial, éste era inhibido por derivados DHP (Zernig y col., 1990). Al estudiar el efecto de DCCD sobre la fijación de [^3H]nitrendipina en mitocondrias adrenales, se comprobó la ausencia de efecto de DCCD, un inhibidor del IMAC (Beavis y Garlid, 1988), en un amplio intervalo de concentración (5 nM - 100 μM). El efecto



inhibidor de las DHP sobre el hinchamiento mitocondrial, sólo ha sido observado en presencia de aniones permeantes a través del IMAC, pero no cuando utilizaban Pi. En el medio de ensayo utilizado para estudiar, tanto los flujos de Ca^{2+} mitocondriales como los estudios de fijación de radioligandos, estuvo siempre presente Pi 0,2 mM por lo que, posiblemente debido a las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, el DHP no presente asociación con el IMAC.

7.4.- COMPARACION ENTRE LOS ESTUDIOS FUNCIONALES Y DE FIJACION DE ^3H NITRENDIPINA.

No se puede realizar una buena correlación de los resultados obtenidos, tanto funcionales como de fijación de radioligandos, con mitocondrias de médula adrenal bovina, debido a la escasez de fármacos DHP disponibles. Sin embargo sí se podría hacer una correlación aproximada entre los efectos de los derivados DHP a nivel funcional y a nivel de fijación, a partir de los datos mostrados en la tabla 13, en la que se resume el efecto de los fármacos y otros derivados empleados sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y sobre la fijación de ^3H nitrendipina.

Con respecto a los derivados DHP, las DHP que no presentan efecto sobre el eflujo de Ca^{2+} (amlodipina, CGP 28392, Bay K 8644), no inhibieron la fijación de nitrendipina al DHP mitocondrial en el mismo intervalo de concentraciones utilizado para ambos tipos de estudios.

En cuanto a las demás DHP utilizadas, se puede observar que las más potentes inhibiendo el flujo de Ca^{2+} a través del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, fueron también las más potentes en inhibir la fijación de ^3H nitrendipina al receptor DHP mitocondrial, utilizando en ambos tipos de experimentos, las condiciones idóneas para mantener la integridad funcional y estructural de las mitocondrias.



TABLA 13.- RESUMEN DEL EFECTO DE FARMACOS EN ESTUDIOS FUNCIONALES Y DE FIJACION DE RADIOLIGANDOS EN MITOCONDRIAS INTACTAS.

FARMACO	IC ₅₀	K _i
nitrendipina	9,5 ± 1,1	2,9 ± 0,2
PN 200-110	11,9 ± 2,8	14 ± 0,8
nimodipina	34,9 ± 0,2	15,4 ± 2,8
felodipina	11,4 ± 0,2	18,5 ± 1,1
nifedipina	49,8 ± 1,6	20,2 ± 1,6
CGP 28392	s.e. (75μM)	s.e. (100μM)
Bay K 8644	s.e. (75μM)	—————
amlodipina	s.e. (200μM)	s.e. (200μM)
diltiazem	11 ± 1	s.e. (100μM)
verapamil	560 ± 20	s.e. (2mM)
OTROS:		
ATP	2 mM	s.e. (10 mM)
ADP	—————	s.e. (10 mM)
DCCD	—————	s.e. (100μM)

Tanto la potencia de efecto de los fármacos sobre el intercambio Na⁺/Ca²⁺ (IC₅₀), como las constantes de inhibición (K_i) de los mismos sobre la fijación de [³H]nitrendipina están expresadas en μM.

s.e. corresponde a la ausencia de efecto del fármaco a la concentración indicada en el estudio correspondiente.

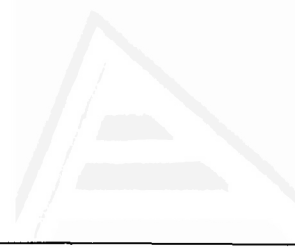


Así pues, dado que de todas las moléculas utilizadas en los estudios de fijación de radioligandos, tan solo los derivados DHP tuvieron efecto sobre la unión de [³H]nitrendipina a su receptor mitocondrial, parece razonable sugerir que la fijación de los mismos está asociado con su efecto sobre el eflujo de Ca²⁺ estimulado por Na⁺.

Adicionalmente, se observó que en ausencia de ClNa no se modificaba la afinidad del DHP, mientras que la B_{max} disminuía, hecho que hizo sugerir que el ClNa ejerciese algún efecto sobre la accesibilidad de las DHP al receptor. Este hecho podría explicar además, la diferencia observada sobre la potencia y eficacia de acción que los derivados DHP mostraron sobre el intercambio Na⁺/Ca²⁺.

Por otro lado, la ausencia de competitividad entre nitrendipina y Na⁺ comprobada tanto en estudios funcionales como de fijación de radioligandos, y el hecho de que la presencia de nitrendipina no modificase la relación de cooperatividad positiva del Na⁺ por su unión al intercambiador Na⁺/Ca²⁺, podrían sugerir que la relación existente entre la unión de DHP al DHP y el intercambiador Na⁺/Ca²⁺, fuese una modulación alostérica del mismo, actuando sobre la misma entidad responsable del intercambio, a través de un sitio diferente al sitio de unión del Na⁺, o bien, sobre alguno de los sistemas de intercambio existentes en la membrana mitocondrial interna que estaría asociado al intercambiador Na⁺/Ca²⁺.

A través del papel modulador de nitrendipina sobre el intercambio Na⁺/Ca²⁺, se podría sugerir un papel de nitrendipina sobre el metabolismo celular, ya que ante un elevado aumento de Ca²⁺ en el citosol, en presencia de nitrendipina se evitaría la estimulación continua de la respiración mitocondrial y consecuentemente, la demanda energética celular.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

CONCLUSIONES



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



1.- Se han caracterizado las condiciones idóneas para el estudio de los movimientos de Ca^{2+} y respiración en mitocondrias procedentes de médula adrenal bovina. Este proceso se ha llevado a cabo utilizando un tampón isoosmótico suplementado con sustratos tales como succinato, rotenona, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, ADP y acetato potásico.

2.- En estas condiciones experimentales se ha caracterizado la actividad del uniportador de Ca^{2+} mitocondrial. Los parámetros cinéticos obtenidos son $K_m = 20,9 \pm 3,2 \mu\text{M}$ y $V_{\text{max}} = 148,1 \pm 7,2 \text{ nmoles de } \text{Ca}^{2+} \text{ mg}^{-1}\text{min}^{-1}$.

3.- El sistema de eflujo predominante en mitocondrias adrenomedulares es el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Los parámetros cinéticos que definen dicho sistema de eflujo de Ca^{2+} son $K_m = 4,2 \pm 0,5 \text{ mM}$ y $V_{\text{max}} = 8,5 \pm 0,4 \text{ nmoles de } \text{Ca}^{2+} \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

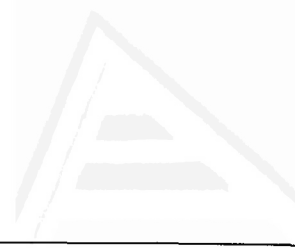
4.- Ninguno de los fármacos utilizados, pertenecientes o no al grupo de las DHP, afectan a la actividad del uniportador de Ca^{2+} mitocondrial.

5.- El diltiazem, verapamil, y la mayoría de los derivados DHP utilizados, ejercen un efecto inhibitor sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial. La nitrendipina, inhibe la actividad del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial de forma no competitiva, afectando tan solo a la V_{max} del intercambio sin modificar la afinidad de dicho sistema por el Na^+ .

6.- Los estudios de fijación de [^3H]nitrendipina en mitocondrias intactas proporcionaron una K_d de $2,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$ y una B_{max} de $6,02 \pm 0,40 \text{ pmol mg}^{-1}$ de proteína. La fijación de [^3H]nitrendipina a mitocondrias intactas, sólo fue afectada por derivados DHP.



7.- Los derivados DHP que ejercen efecto sobre la actividad del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, modulan la fijación de [^3H]nitrendipina. Esta relación sugiere una asociación entre la unión de los derivados DHP al receptor de baja afinidad, con su efecto sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial, sin precisar si dicho sitio de unión se localiza sobre la misma entidad molecular responsable del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ o bien, sobre alguno de los sistemas de transporte existentes en la membrana mitocondrial interna que estuviese asociado al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

BIBLIOGRAFIA



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



- ADVENIER, C.; CERRINA, J.; DUROUX, P.; FLOCH, A. y RENIER, A. (1984). Effects of five different calcium antagonists on guinea-pig isolated trachea. **Br.J.Pharmacol.** 82: 727-733.
- AFFOLTER, H. y CARAFOLI, E. (1981). Hyperbolic kinetics of the electrophoretic carrier of Ca^{2+} uptake in liver mitochondria. **Eur.J.Biochem.** 119: 199-205.
- AKERMAN, K.E.O. (1978a). Changes in membrane potential during calcium ion influx and efflux across the mitochondrial membrane. **Biochim.Biophys.Acta.** 502: 359-366.
- AKERMAN, K.E.O. (1978b). Effect of pH and Ca^{+2} on the retention of Ca^{+2} by rat liver mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.** 189: 256-262.
- AKERMAN, K.E.O. y NICHOLLS, D.G. (1983). Physiological and bioenergetics aspects of mitochondrial calcium transport. **Rev. Physiol.Biochem.Pharmacol.** 95: 149-201.
- AKERMAN, K.E.O.; WIKSTRÖM, M.K.F. y SARIS, N.E. (1977). Effect of inhibitors on the sigmoidicity of the calcium ion transport kinetics in rat liver mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta** 464: 287-294.
- ALLSHIRE, A.P. y HEFFRON, J.J.A. (1983). Uptake, retention, and efflux of Ca^{+2} by mitochondrial preparations from skeletal muscle. **Arch. Biochem. Biophys.** 228: 353-363.
- ARTALEJO, C.R.; DAHMER, M.K.; PERLMAN, R.L. y FOX, A.P. (1991). Two types of Ca^{2+} currents are found in bovine chromaffin cells: facilitation is due to the recruitment of one type. **J.Physiol.** 432: 681-707.



- AW, T. Y.; ANDERSSON, B. S. y JONES, D. P. (1987a). Mitochondrial transmembrane ion distribution during anoxia. **Am.J.Physiol.** 252: C356-C361.
- AW, T. Y.; ANDERSSON, B. S. y JONES, D. P. (1987b). Suppression of mitochondrial respiratory function after short-term anoxia. **Am.J.Physiol.** 252: C362-C368.
- BALLESTA, J. J. (1989). **Tesis Doctoral**: Caracterización de los receptores dihidropiridínicos de la célula cromafin adrenomedular bovina.
- BALLESTA, J. J.; HIDALGO, M. J.; PALMERO, M.; GUTIERREZ, L. M.; REIG, J. A.; GARCIA, A. G. y VINIEGRA, S. (1990). Separate [³H]nitrendipine binding sites in mitochondria and plasma membranes of bovine adrenal medulla. **Br.J.Pharmacol.** 101: 21-26.
- BAYDOUN, A. R.; MARKHAM, R. M.; MORGAN, R. M. y SWEETMAN, A. J. (1986). Nitrendipine inhibits the uptake of calcium into rat heart mitochondria. **British.J.Pharmacol.** 88: 387P.
- BAYDOUN, A. R.; MARKHAM, R. M.; MORGAN, R. M. y SWEETMAN, A. J. (1990). Bay K 8644, modifier of calcium transport and energy metabolism in rat heart mitochondria: a new intracellúlar site of action. **British.J.Pharmacol.** 101: 15-20.
- BAYSAL, K.; BRIERLEY, G. P.; NOVGORODOV, S y JUNG, D. W. (1991). Regulation of the mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ antiport by matrix pH. **Arch.Biochem.Biophys.** 291: 383-389.
- BEATRICE, M. C.; PALMER, J. W. y PFEIFFER, D. R. (1980). The relationship between mitochondrial membrane permeability, membrane potential and retention of Ca²⁺ by mitochondria. **J.Biol.Chem.** 255: 8663-8671.



- BEATRICE, M.C.; STIERS, D.L. y PFEIFFER, D.R. (1982). Increased permeability of mitochondria during Ca^{2+} release induced by t-butylhydroperoxide. **J. Biol. Chem.** 257: 7161-7171.
- BEAVIS, A.D. y GARLID, K.D. (1987). The mitochondrial inner membrane anion channel. Regulation by divalents cations and protons. **J. Biol. Chem.** 262: 15085-15093.
- BEAVIS, A.D. y GARLID, K.D. (1988). Inhibition of the mitochondrial inner membrane anion channel by dicyclohexylcarbodiimide. Evidence for a specific transport pathway. **J. Biol. Chem.** 263: 7574-7580.
- BECKER, G.L.; FISKUM, G. y LEHNINGER, A.L. (1980). Regulation of free Ca^{2+} by liver mitochondria and endoplasmic reticulum. **J. Biol. Chem.** 255: 9009-9012.
- BOLGER, G.T. y SKOLNICK. (1986). Novel interactions of cations with dihydropyridines calcium antagonists binding sites in brain. **Br. J. Pharmacol.** 88: 857-866.
- BOSTROM, S.L.; LJUNG, B.; MARDH, S.; FORSEN, S. y THULINE, E. (1981). Interaction of the antihypertensive drug felodipine with calmodulin. **Nature** 292: 777-778.
- BRAGADIN, M.; POZZAN, T. y AZZONE, G.F. (1979). Kinetics of Ca^{2+} carrier in rat liver mitochondria. **Biochemistry** 18: 5972-5978.
- BRINLEY, F.J., Jr.; TIFFERT, T. y SCARPA, A. (1978). Mitochondria and others calcium buffers of squid axon studied in situ. **J. Gen. Physiol.** 72: 101-127.



- BRUSH, K.L.; PEREZ, M.; HAWKES, M.J.; PRATT, D.R. y HAMILTON, S.L. (1987). Low affinity binding sites for 1,4-dihydropyridines in mitochondria and in guinea pig ventricular membranes. **Biochem.Pharmacol.** 23: 4153-4161.
- BURGER, A.; NIEDERMAIER, W., LANGER, R. y BODE, U. (1984). Further characteristics of the ATP-stimulated uptake of calcium into chromaffin granules. **J.Neurochem.** 43: 806-815.
- BURGOYNE, R.D. (1984). Mechanisms of secretion from adrenal chromaffin cells. **Biochim.Biophys.Acta.** 779: 201-216.
- BUSS, W.C.; SAVAGE, D.D.; STEPANEK, J.; LITTLE, S.A. y MCGUFFEE, L.J. (1988). Effect of calcium channel antagonists on calcium uptake and release by isolated rat cardiac mitochondria. **Eur.J.Pharmacol.** 152: 247-253.
- BYGRAVE, F.L. (1978). Mitochondria and the control of intracellular calcium. **Biol.Rev.** 53: 43-79.
- CANTOR, E.H.; KENESSEY, A.; SEMENUK, G. y SPECTOR, S. (1984). Interaction of calcium channel blockers with non-neuronal benzodiazepine binding sites. **Proc.Natl.Acad.Sci. Usa.** 81: 1549-1552.
- CARAFOLI, E. (1982). The transport of calcium across the inner membrane of mitochondria. En "Membrane transport of calcium". (Ed. E.Carafoli): 109-139. Academic Press, London.
- CARAFOLI, E. (1987). Intracellular calcium homeostasis. **Ann.Rev.Biochem.** 56: 395-433.



- CROMPTON, M.; KESSAR, P. y AL-NASSER, I. (1983). The α -adrenergic mediated activation of de cardiac mitochondrial Ca^{+2} uniporter and its rol in the control of intramito-chondrial Ca^{+2} in vivo. **Biochem.J.** 216: 333-342.
- CROMPTON, M y HEID, I. (1978). The cycling of calcium, sodium, and protons across the inner membrane of cardiac mitochondria. **Eur.J. Biochem.** 91: 599-608.
- CROMPTON, M.; HEID, I.; BASCHERA, C. y CARAFOLI, E. (1979). The resolution of calcium fluxes in heart and liver mitochondria using the lanthanide series. **FEBS.Lett.** 104: 352-354.
- CROMPTON, M.; KÜNZI, M. y CARAFOLI, E. (1977). The calcium induced and sodium induced effluxes from heart mitochondria. Evidence for a sodium-calcium carrier. **Eur.J. Biochem.** 79: 549-558.
- CROMPTON, M. ; MOSER, R.; LÜDI, H. y CARAFOLI, E. (1978). The interrelations between the transport of sodium and calcium in mitochondria of various mammalian tissues. **Eur.J. Biochem.** 82: 25-31.
- CROMPTON, M.; SIGEL, E.; SALZMANN, M. y CARAFOLI, E. (1976b). A kinetic study of the energy-linked influx of Ca^{+2} into heart mitochondria. **Eur.J. Biochem.** 69: 429-436.
- CROSS, R.L. (1981). The mechanism and regulation of ATP synthesis by $\text{F}_1\text{-ATPases}$. **Ann.Rev.Biochem.** 50: 681-714.



- DARLEY-USMAR, V.M.; CAPALDI, R.A.; TAKAMIYA, S.; MILLET, F.; WILSON, M.T.; MALATESTA, F. y SARTI, P. (1987). Reconstitution and molecular analysis of the respiratory chain. En "Mitochondria: a practical approach": 113-152. (V.M.Darley-Usmar; D.Rickwood and M.T.Wilson. Eds.). IRL Press.
- DAVID-DUFILHO, M.; DEVINCK, M.A.; KAZDA, S. y MEYER, P. (1984). Stimulation by nifedipine of calcium transport by cardiac sarcolemmal vesicles from spontaneously hypertensive rats. **Eur.J.Pharmacol.** 97: 121-127.
- DAVIDOFF, F. (1974). Effects of guanidine derivatives on mitochondrial function. Ca^{2+} uptake and release. **J.Biol.Chem.** 249: 6406-6415.
- DE ROBERTIS, E.D.P. y VAZ FERREIRA, A. (1957). Electron microscope study of the secretion of catechol-containing droplets in adrenal medulla. **Exp. Cell Res.** 12: 568-574.
- DeBLASI, A. O'REILLY, K. y MOTULSKY, H.J. (1989). Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor. **Tips.** 10: 227-229.
- DENTON, R.M. y McCORMACK, J.G. (1990). Ca^{2+} as a second messenger within mitochondria of the heart and other tissues. **Ann.Rev.Physiol.** 52: 451-466.
- DePIERRE, J.W. y ERNSTER, L. (1977). Enzyme topology of intracellular membranes. **Ann.Rev.Physiol.** 46: 201-262.



- DePOVER, A.; MATLIB, M. A.; LEE, S. W.; DUBE, G. P.; GRUPP, I. L.; GRUPP, G. y SCHWARTZ, A. (1982). Specific binding of [³H]-nitrendipine to membranes from coronary arteries and heart in relation to pharmacological effects. Paradoxical stimulation by diltiazem. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 108: 110-117.
- DOUGLAS, W. W. y RUBIN, R. P. (1961). The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. **J. Physiol.** 159: 40-57.
- DRANSFIELD, H.; GREEF, K.; SCHORN, A. y TING, B. T. (1969). Calcium uptake in mitochondria and vesicles of heart and skeletal muscle in the presence of potassium, sodium, strophanthin and pentobarbital. **Biochem. Pharmacol.** 18: 1335-1345.
- DUCHEN, M. R. (1992). Ca²⁺-dependent changes in the mitochondrial energetics in single dissociated mouse sensory neurons. **Biochem. J.** 283 : 41-50.
- EHLERT, F. J.; ITOGA, E.; ROESKE, W. R. y YAMAMURA, H. I. (1982). The interaction of [³H]nitrendipine with receptors for calcium antagonists in the cerebral cortex and heart of rats. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 104: 937-943.
- EPSTEIN, M.; FISS, K.; HACHISU, R. y ANDRENYAK, D. M. (1982). Interaction of calcium antagonists with cyclic AMP phosphodiesterases and calmodulin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 105: 1142-1149.
- ERNSTER, L. y SCHATZ, G. (1981). Mitochondria: a historical review. **J. Cell Biol.** 91: 227-255.
- ESTABROOK, R. W. (1967). Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. En "Methods Enzymology." Vol. X: 41-47. (Estabrook, R. W. y Pullman, M. E. eds.). Academic Press, N. Y.



- FABIATO, A. (1985). Stimulated calcium current can both cause calcium binding in and trigger calcium release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. **J.Gen.Physiol.** 85: 291-320.
- FAVARON, M. y BERNARDI, P. (1985). Tissue-specific modulation of the mitochondrial calcium uniporter by magnesium ions. **FEBS.Lett.** 183: 260-264.
- FISKUM, G y LEHNINGER, A.L. (1979). Regulated release of Ca^{2+} from respiring mitochondria by $Ca^{2+}/2H^{+}$ antiport. **J.Biol. Chem.** 254: 6236-6239.
- FISKUM, G. y LEHNINGER, A.L. (1980). The mechanisms and regulation of mitochondrial Ca^{2+} transport. **Fed. Proc.** 39: 2432-2436.
- FLAIM, S.F.; RATZ, P.H.; SWIGART, S.C. y GLEASON, M.M. (1985). Bepridil hydrochloride alters potential dependent and receptor-operated calcium channels in vascular smooth muscle of rabbit aorta. **J.Pharmacol.Exp.Therap.** 234: 63-71.
- FREITAG, H.; NEUPERT, W. y BENZ, R. (1982). Purification and characterization of a pore protein of the intramitochondrial membrane from *Neurospora crassa*. **Eur. J.Biochem.** 123: 629: 636.
- GANDIA, L.; LOPEZ, M.G.; FONTERIZ, R.I.; ARTALEJO, C.R. y GARCIA, A.G. (1987). Relative sensitivities of chromaffin cell calcium channels to organic and inorganic calcium antagonists. **Neurosci.Lett.** 77: 333-338.
- GARCIA, A.G.; SALA, F.; REIG, J.A.; VINIEGRA, S.; FRIAS, J. FONTERIZ, R.I. y GANDIA, L. (1984). Dihydropyridine Bay K 8644 activates chromaffin cell calcium channels. **Nature** 309: 69-71.



- GARLID, K.D. y BEAVIS, A.D. (1986). Evidence for the existence of an inner membrane anion channel in mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta.** 853: 187- 204.
- GLOSSMANN, H.; ZERNIG, G.; GRAZIADEI, I. y MOSHAMMER, T. (1989). Non L-type Ca^{2+} channel linked receptors for 1,4-dihydropyridines and phenylalkylamines. En "Nimodipine and Central Nervous System Function": 51-67. (W.H. Gispen and J. Traber Eds.). Schattauer Verlag, Stuttgart.
- GOLDSTONE, T.P. y CROMPTON, M. (1982). Evidence for β -adrenergic activation of Na^+ dependent efflux of Ca^{2+} from isolated liver mitochondria. **Biochem. J.** 204: 369-371.
- GRESSER, M.J.; MYERS, J.H. y BOYER, P.D. (1982). Catalytic site cooperative of beef-heart mitochondrial F_1 adenosine triphosphatase. Correlations of initial velocity, bound intermediate and oxygen exchange measurements with an alternating three-site model. **J. Biol. Chem.** 257: 12030-12038.
- GUNTER, T.E.; CHACE, J.H.; PUSKIN, J.S. y GUNTER, K.K. (1983) Mechanism of sodium independent Ca efflux from rat liver mitochondria. **Biochemistry** 22: 6341-6351.
- HAIGH, J.R. y PHILLIPS, J.H. (1989). A sodium/proton antiporter in chromaffin-granule membranes. **Biochem. J.** 257: 499-507.
- HALESTRAP, H.P. (1978). Stimulation of pyruvate transport in metabolizing mitochondria through changes in this transmembrane pH gradient induced by glucagon treatment. **Biochem. J.** 172: 389-398.



- HANSFORD, R.G. (1985). Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.** 102: 1-72.
- HANSFORD, R.G. (1991). Dehydrogenase activation by Ca^{2+} in cells and tissues. **J. Bioenerg. Biomembr.** 23: 823-854.
- HARRIS, E.J. (1977). The uptake and release of calcium by rat heart mitochondria. **Biochem. J.** 168: 447-456.
- HARTL, F.U. y NEUPERT, W. (1990). Protein sorting to mitochondria: evolutionary conservation of folding and assembly. **Science** 247: 930-938.
- HATEFI, Y. (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. **Ann. Rev. Biochem.** 54: 1015-1069.
- HAWORTH, R.A.; HUNTER, D.R. y BERKOFF, H.A. (1980). Na^+ releases Ca^{2+} from liver, kidney and lung mitochondria. **FEBS Lett.** 110: 216-218.
- HAYAT, L.H. y CROMPTON, M. (1982). Evidence for the existence of regulatory sites for Ca^{2+} on the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ carrier of cardiac mitochondria. **Biochem. J.** 202: 509-518.
- HAYAT, L.H. y CROMPTON, M. (1985). Ca^{2+} -dependent inhibition by trifluoperazine of the $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ carrier in mitoplast derived from heart mitochondria. **FEBS Lett.** 182: 281-286.
- HAYAT, L.H. y CROMPTON, M. (1987). The effects of Mg^{2+} and adenine nucleotides on the sensitivity of heart mitochondrial $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ carrier to extramitochondrial Ca^{2+} . **Biochem. J.** 244: 533-538.



- HEFRON, J.J.A y HARRIS, E.J. (1981) Stimulation of calcium ion efflux from liver mitochondria by sodium ions and its response to ADP and energystate. **Biochem.J.** 194:925-929.
- HENRY, P.H.; SHUCHLEIB, R.; DAVIS, J.; WEISS, E.S. y SOBEL, B.E. (1977). Myocardial contracture and accumulation of mitochondrial calcium in ischemic rabbit heart. **Am.J.Physiol.** 233: H677-H684.
- HIDALGO, M.J. (1991). **Tesis doctoral**. Purificación y caracterización molecular del receptor dihidropiridínico mitocondrial adrenomedular bovino.
- HUGHES, B.P. y EXTON, J.H. (1983). Effect of micromolar concentrations of magnesium ions on calcium-ion cycling in rat liver mitochondria. **Biochem.J.** 212: 773-782.
- JANIS, R.A.; SARMIENTO, J.G.; MAURER, S.C.; BOLGER, G.T. y TRIGGLE, D.J. (1984). Characteristics of binding of [³H]nitrendipine to rabbit ventricular membranes: modification by other Ca²⁺ channel antagonists and by the Ca²⁺ channel agonist Bay K 8644. **J.Pharmacol.Exp.Therap.** 231: 8-15.
- JENSEN, J.R.; LYNCH, G. y BAUDRY, M. (1989). Allosteric activation of brain mitochondrial Ca²⁺ by spermine and Ca²⁺: developmental changes. **J.Neurochem.** 53: 1182-1187.
- KESSAR, P. y CROMPTON, M. (1981). The α -adrenergic-mediated activation of Ca²⁺ influx into cardiac mitochondria. **Biochem.J.** 200: 379-388.



- KIM, K.T. y WESTHEAD, E.W. (1989). Cellular responses to Ca^{2+} from extracellular and intracellular sources are different as shown by simultaneous measurements of cytosolic Ca^{2+} and secretion from bovine chromaffin cells. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA.** 86: 9881-9885.
- KLONER, R.A. y BRAUNWALD, E. (1987). Effects of calcium antagonists on infarcting myocardium. **Am.J.Cardiol.** 59: 84B-94B.
- KOSTRON, H.; WINKLER, H.; GEISLER, D. y KÖNIG, P. (1977). Uptake of calcium by chromaffin granules in vitro. **J.Neurohem.** 28: 487-493.
- KRÖNER, H. (1990). Activation of calcium uptake in rat liver mitochondria by aminoglucofosidos antibiotics. **Biochem.Pharmacol.** 39: 891-894.
- KUNZE, D.L.; HAMILTON, S.L.; HAWKES, M.J. y BROWN, A.M. (1987). Dihydropiridina binding and calcium channel function in clonal rat adrenal medullary tumor cells. **Mol.Pharmacol.** 31: 401-409.
- LaNOUE, K.F. y SCHOOLWERTH, A.C. (1979). Metabolite transport in mitochondria. **Ann.Rev.Biochem.** 48: 871-922.
- LEHNINGER, A.L. (1974). Role of phosphate and other proton-donating anions in respiration-coupled transport of Ca^{2+} by mitochondria. **Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.** 71: 1520-1524.
- LEHNINGER, A.L.; CARAFOLI, E. y ROSSI, C.S. (1967). Energy linked ion movements in mitochondrial systems. **Adv. Enzymol.** 29: 259-320.



- LEHNINGER, A.L.; VERCESI, I.A. y BABABUNMI, E.A. (1978). Regulation of Ca^{2+} release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 1690-1694.
- LEVITT, M.; SPECTOR, S.; SJOERDSMA, A. y UDENFRIEND, S. (1965). Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart. *J.Pharmacol.Exp.Therap.* 148: 1-8.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. y RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193: 265-275.
- LÜLLMANN, H. y MOHR, K. (1987). High and concentration-proportional accumulation of [^3H]-nitrendipine by intact cardiac tissue. *Br.J.Pharmacol.* 90: 567-573.
- LÜLLMANN, H.; TIMMERMANS, P. y ZIEGLER, A. (1979). Accumulation of drugs by resting or beating cardiac tissue. *Eur.J.Pharmacol.* 60: 277-285.
- MATLIB, M.A. (1985). Action of bepridil, a new calcium channel blocker on oxidative phosphorylation, oligomycin-sensitive adenosine triphosphatase activity, swelling, Ca^{++} uptake and Na^+ -induced Ca^{++} release processes of rabbit heart mitochondria in vitro. *J.Expt.Pharmacol.Ther.* 233: 376-381.
- MATLIB, M.A.; LEE, S.W.; DEPOVER, A. y SCHWARTZ, A. (1983). A specific inhibitory action of certain benzothiazepines and benzodiazepines on the sodium-calcium exchange process of heart and brain mitochondria. *Eur.J.Pharmacol.* 89: 327-328.



- McCORMACK, J.G. (1985). Characterization of the effects of Ca^{2+} on the intramitochondrial Ca^{2+} sensitive enzymes from rat liver and within rat liver mitochondria. **Biochem.J.** 231: 581-595.
- McCORMACK, J.G.; HALESTRAP, A.P. y DENTON, R.M. (1990). Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. **Physiol. Rev.** 70: 391-425.
- McMILLIN-WOOD, J.; WOLKOWICZ, P.E.; CHU, A.; TATE, C.A.; GOLDSTONE, M.A. y ENTMAN, M.L. (1980). Calcium uptake by two preparations of mitochondria from heart. **Biochem. Biophys. Acta.** 591: 251-265.
- MITCHELL, P. (1966). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. **Nature.** 191: 144-148.
- MITCHELL, P. y MOYLE, J. (1967). Respiration-driven proton translocation in rat liver mitochondria. **Biochem.J.** 105: 1147-1162.
- MOORE, C.L. (1971). Specific inhibition of mitochondrial Ca^{2+} transport by ruthenium red. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 42: 298-305.
- MOORE, G.A.; JEWEL, S.A.; BELLOMO, G. y O'RRENIUS, S. (1983). On the relationship between Ca^{2+} efflux and membrane damage during t-butylhydroperoxide metabolism by liver mitochondria. **FEBS Lett.** 153: 289-292.
- NEDERGAAD, J. y CANNON, B. (1980). Effects of monovalent cations on Ca^{2+} transport in mitochondria: a comparison between brown fat and liver mitochondria. **Acta. Chem. Scand. Ser. B.** 34: 149-151.



- NICHOLLS, D. (1981). Some recent advances in mitochondrial calcium transport. **TIBS**. 36-38.
- NICHOLLS, D.G. (1978a). The regulation of extramitochondrial calcium ion concentration by rat liver mitochondria. **Biochem.J.** 176: 463-474.
- NICHOLLS, D.G. (1978b). Calcium transport and proton electrochemical gradient in mitochondria from guinea-pig cerebral cortex and rat heart. **Biochem.J.** 170: 511-522.
- NICHOLLS, D.G. y CROMPTON, M. (1980). Mitochondrial calcium transport. **FEBS Lett.** 111: 261-268.
- NIEDERMAIER, W. y BURGER, A. (1981). Two different ATP-dependent mechanisms for calcium uptake into chromaffin granules and mitochondria. **Arch.Pharmacol.** 316: 69-80.
- NORMAN, J.A.; ANSELL, J. y PHILLIPS, M.A. (1983). Dihydropyridine Ca^{2+} entry blockers selectively inhibit peak I cAMP phosphodiesterase. **Eur.J.Pharmacol.** 93: 107-112.
- NOWICKY, M.C.; FOX, A.P. y TSIEN, R.W. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. **Nature** 316: 440-443.
- PAN, M. y JANIS, R.A. (1984). Stimulation of Na^+ , K^+ -ATPase of isolated smooth muscle cells by Ca^{2+} calcium channel inhibitors, nimodipine and nitrendipine. **Biochem.Pharmacol.** 33: 787-791.



Bibliografía

- PANFILI,E.; CROMPTON,M. y SOTTOCASA,G.L. (1981) Immunochemical evidence of the independence of the $\text{Ca}^{+2}/\text{Na}^{+}$ antiporter and electrophoretic Ca^{+2} uniporter in heart mitochondria. **FEBS Lett.** 123: 30-32.

- PANFILI,E.; SANDRI,G.; SOTTOCASA,G.L.; LUNAZZI,G. y LIUT,G. (1976). Specific inhibition of mitochondrial Ca^{+2} transport by antibodies directed to the Ca^{+2} -binding glycoprotein. **Nature.** 264: 185-186.

- PANG,D.C. y SPERELAKIS,N. (1983). Nifedipine, diltiazem, bepridil and verapamil uptakes into cardiac and smooth muscles. **Eur.J.Pharmacol.** 87:199-207.

- PEDERSEN,P.L. y COTY,W.A (1972). Energy-dependent accumulation of calcium and Phosphate by purified inner membrane vesicles of rat liver mitochondria. **J.Biol.Chem.** 247 (10): 3107-3113.

- PENEFSKY,H.S. (1985). Energy-dependent dissociation of ATP from high-affinity catalytic sites of beef-heart mitochondrial adenosine triphosphatase. **J.Biol.Chem.** 260: 13735-13741.

- PFANER,N. y NEUPERT,W. (1990). The mitochondrial protein import apparatus. **Ann.Rev.Biochem.** 59: 331-353.

- PHILLIPS, J.H. (1981). Transport of Ca^{2+} and Na^{+} across the cromaffin granule membrane. **Biochem.J.** 200: 99-107.

- PITTS,I.R. (1979). Stoichiometry of sodium-calcium exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. **J.Biol.Chem.** 254: 6232-6235.



- PUSKIN, J.S.; GUNTER, T.E.; GUNTER, K.K. y RUSSELL, P.R. (1976). Evidence for more than one Ca^{2+} transport mechanism in mitochondria. **Biochemistry**. 15: 3834-3842.
- RAMPE, D., SU C.M.; YOUSIF, F. y TRIGGLE, D.J. (1985). Calcium channel antagonists: pharmacological considerations. En "Pharmacology of calcium antagonists". 247S-254S.
- RASMUSSEN, H. y WAISMAN, D.M. (1983). Modulation of cell function in the calcium messenger system. **Physiol.Rev.** 95: 111-148.
- REED, K.C. y BYGRAVE, F.L. (1974). Inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and ruthenium red. **Biochem.J.** 140: 143-155.
- REED, K.C. y BYGRAVE, F.L. (1975). A kinetic study of mitochondrial calcium transport. **Eur.J.Biochem.** 55: 497-503.
- REEVES, J.P. y SUTKO, J.L. (1980). Sodium-calcium exchange activity generates a current in cardiac membrane vesicles. **Science** 208: 1461-1463.
- REYNAFARJE, B. y LEHNINGER, A.L. (1977). Electric charge stoichiometry of calcium translocation in mitochondria. **Biochem.Biophys. Res.Comm.** 77: 1273-1279.
- RICHTER, C. y KASS, G.E.N. (1991). Oxidative stress in mitochondria: its relationship to cellular Ca^{2+} homeostasis, cell death, proliferation, and differentiation. **Chem. Biol. Interactions**, 77: 1-23.



- RICKWOOD, D.; WILSON, M.T. y DARLEY-USMAR, V.M. (1987). Isolation and characteristics of intact mitochondria. En "Mitochondria a practical approach": 1-16. (V.M. Darley-Usmar; D. Rickwood y M.T. Wilson Eds). IRL Press.
- RIZZUTO, R.; SIMPSON, A.W.M.; BRINI, M. y POZZAN, T. (1992). Rapid changes of mitochondrial Ca^{2+} revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature*. 358: 325-327.
- RIZZUTO, R.; BERNARDI, P.; FAVARON, M. y AZZONE, G.F. (1987). Pathways for Ca^{2+} efflux in heart and liver mitochondria. *Biochem.J.* 246: 271-277.
- ROSSI, C.S. y LEHNINGER, A.L. (1963). Stoichiometric relationships between accumulation of ions by mitochondria and the energy-coupling sites in the respiratory chain. *Biochem.J.* 338: 698-713.
- ROSSI, C.S. y LEHNINGER, A.L. (1964). Stoichiometry of respiratory stimulation, accumulation of Ca^{2+} and phosphate, and oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *J.Biol.Chem.* 239: 3971-3980.
- ROTTENBERG, H. y SCARPA, A. (1974). Calcium uptake and membrane potential in mitochondria. *Biochemistry* 13: 4811-4817.
- SAFA, A.R.; GLOVER, C.J.; SEWELL, J.L.; MEYERS, M.B.; BIEDLER, J.L. y FELSTED, R.L. (1987). Identification of the multidrug resistance-related membrane glycoprotein as an acceptor for calcium channel blockers. *J.Biol.Chem.* 262: 7884-7888.



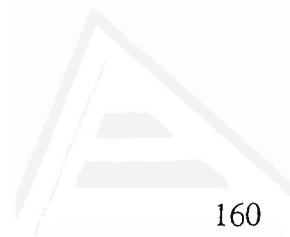
- SARMIENTO, J.G.; SHRIKHANDE, A.V.; JANIS, R.A. y TRIGGLE, D.J. (1987). [³H]Bay K 8644, a 1,4-dihydropyridine Ca²⁺ channel activator: characteristics of binding to high and low affinity sites in cardiac membranes. **J.Pharmacol.Exp.Therap.** 241: 140-146.
- SCARPA, A. (1976). en *Mitochondria: Bioenergetics, Biogenesis and Membrane Structure* (Packer, L. and Gomez-Puyou, A., eds): 31-45, Academic Press. N.Y. USA.
- SCARPA, A. y AZZONE, G.F. (1970). The mechanism of ion translocation in mitochondria. **Eur.J.Biochem.** 12: 328-335.
- SCARPA, A. y GRAZIOTTI, P. (1973a). High and low affinity sites in cardiac membranes. **J.Gen.Physiol.** 72: 101-127.
- SCARPA, A. y GRAZIOTTI, P. (1973b). Mechanisms for intracellular calcium regulation in heart. I. Stopped-flow measurements of Ca²⁺ uptake by cardiac mitochondria. **J.Gen.Physiol.** 62: 756-772.
- SCHACHTELE, C.; WAGNER, B. y MARME, D. (1987). Stereoselective inhibition of calmodulin-dependent cAMP phosphodiesterase from bovine heart by (+)- and (-)-nimodipine. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.** 335: 340-343.
- SCHOOLWERTH, A.C. Y LANOUE, K.F. (1985). Transport of metabolic substrates in renal mitochondria. **Ann.Rev.Physiol.** 47: 143-171.
- SENIOR, A.E. (1988). ATP synthesis by oxidative phosphorylation. **Physiol. Rev.** 68: 177-231.



- SOMLYO,A.P.; BOND,M. y SOMLYO,A.V. (1985). Calcium content of mitochondria and endoplasmatic reticulum in liver frozen rapidly in vivo. **Nature**, 314: 622-625.
- SPEDDING, M. (1985). Competitive interactions between Bay K 8644 and nifedipine in K⁺ depolarized smooth muscle: a passive role of calcium?. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.** 328: 464-466.
- SRERE,P.A. (1980). The infrastructure of the mitochondrial matrix. **Trends Biochem.Sci.** 5: 120-121.
- STRIESSNIG,J.; ZERNIG,G. y GLOSSMANN,H. (1985). Human red-blood-cell Ca²⁺-antagonist binding sites. Evidence for an unusual receptor coupled to the nucleoside transporter. **Eur.J.Biochem.** 150: 67-77.
- TAGER,J.M.; WANDERS,R.J.A.; GROEN,A.K.; KUNZ,W.; BOHNENSACK,R.; KÜSTER,U.; LETKO,G.; BÖME,G.; DUSZYNSKI,J. y WOJTCZAK,L. (1983). Control of mitochondrial respiration. **FEBBS Lett.** 151: 1-9.
- THAYER,S.A. y MILLER,R.J. (1990). Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurones in vitro. **J.Physiol.** 425: 86-115.
- TZAGOLOFF,A. y MYERS, A. (1986). Genetics of mitochondrial biogenesis. **Ann.Rev.Biochem.** 55: 249-285.
- VAGHY,P.L.; JOHNSON,J.D.; MATLIB,M.A.; WANG,T. y SCHWARTZ,A. (1982). Selective inhibition of Na⁺-induced-Ca²⁺ release from heart mitochondria by diltiazem and Ca²⁺ antagonist drugs. **J.Biol.Chem.** 257: 6000-6002.



- VERCESI, A.; REYNAFARJE, B. y LEHNINGER, A.L. (1978). Stoichiometry of H⁺ ejection and Ca²⁺ uptake coupled to electron transfer in rat heart mitochondria. **J.Biol.Chem.** 253: 6379-6385.
- VICKERS, G.R. y DOWDALL, M.J. (1976). Calcium uptake in preterminal synapses: importance of mitochondria. **Exp.Brain Res.** 25: 429-445.
- VINOGRADOV, A. y SCARPA, A. (1973). The initial velocities of calcium uptake by rat liver mitochondria. **J.Biol.Chem.** 248: 5527-5531.
- VITORICA, J. y SATRUSTEGUI, J. (1985). The role of ADP in the modulation of the calcium-efflux pathways in rat brain mitochondria. **Biochem.J.** 225: 41-49.
- WEILAND, G.A. y MOLINOFF, P.B. (1981). Quantitative analysis of drug-receptor interactions: I. Determination of kinetics and equilibrium properties. **Life.Sci.** 29: 313-330.
- WIKSTRÖM, M.; KRAB, K. y SARASTE, M. (1981). Proton-translocating cytochrome complexes. **Ann.Rev.Biochem.** 50: 623-655.
- WOLKOWICZ, P.E. y McMILLIN-WOOD, J. (1981). Glutamate-supported calcium movements in rat liver mitochondria: affects of anions and pH. **Arch.Biochem.Biophys.** 209: 408-422.
- WOLKOWICZ, P.E.; MICHAIL, L.H.; LEWIS, R.M. y McMILLIN-WOOD, J. (1983). Sodium-calcium exchange in dog heart mitochondria: effects of ischaemia and verapamil. **Am.J.Physiol.** 244: H644-H651.



- ZERNIG, G. (1990). Widening potential for calcium antagonists: non-L-type channel interaction. **Tips**. 11: 38-44.
- ZERNIG, G. y GLOSSMANN, H. (1988). A novel 1,4-dihydropyridine-binding site on mitochondrial membranes from guinea-pig heart, liver and kidney. **Biochem.J.** 253: 49-58.
- ZERNIG, G.; GRAZIADEI, I.; MOSHAMMER, T.; ZECH, C.; REIDER, N. y GLOSSMANN, H. (1990). Mitochondrial Ca^{2+} antagonist binding sites are associated with an inner mitochondrial membrane anion channel. **Mol. Pharmacol.** 38: 362-369.
- ZERNIG, G. y MOSHAMMER, T. (1989). Characterization of a phenylalkylamine binding site allosterically coupled to the high-capacity low-affinity 1,4-dihydropyridine-binding site in mitochondria. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.** 339: R45.
- ZERNIG, G.; MOSHAMMER, T.; GRAZIADEI, I. y GLOSSMANN, H. (1988). The mitochondrial high-capacity low-affinity (\pm)-[^3H]nitrendipine binding site is regulated by nucleotides. **Eur.J.Pharmacol.** 157: 67-73.
- ZIMMER, M. y HOFMANN, F. (1987). Differentiation of the drug-binding sites of calmodulin. **Eur.J.Biochem.** 164: 411-420.
- ZOCCARATO, F.; RUGOLO, M.; SILIPRANDI, D. y SILIPRANDI, N. (1981). Correlated effluxes of adenine nucleotides, Mg^{2+} and Ca^{2+} induced in rat-liver mitochondria by external Ca^{2+} and phosphate. **Eur.J.Biochem.** 114: 195-199.