

## Acción de la teofilina y de la teobromina sobre la respiración celular y transporte de $\text{Ca}^{2+}$ en mitocondrias aisladas de hígado de rata

M. J. de la Cruz, R. Álvarez-Rementería, J. Alemany y P. Albert

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad Complutense  
Madrid-3

(Recibido el 23 de noviembre de 1983)

M. J. DE LA CRUZ, R. ALVAREZ-REMENTERIA, J. ALEMANY and P. ALBERT. *Effect of Theophylline and Theobromine in Cellular Respiration and  $\text{Ca}^{2+}$  Transport in Isolated Rat Liver Mitochondria*. Rev. esp. Fisiol., 40, 289-296, 1984.

The influence of theophylline and theobromine on cellular respiration and on membrane transport of calcium has been studied in isolated rat liver mitochondria, using oxygen and  $\text{Ca}^{2+}$  selective electrodes.

A linear decrease in respiratory coefficients, in the total amount and rate of «extra» oxygen consumption induced by ADP is observed with drug concentration. Theobromine does not show any appreciable effect on these respiratory parameters, but this result is similar to that observed with theophylline for the same concentration range.

Calcium uptake coupled to respiration is inhibited by both drugs depending on their concentrations. Theobromine is more effective than theophylline. Calcium saturation of the mitochondria takes place in all cases after  $36 \pm 2$  s but only a 20 % of the maximum calcium uptake observed in the absence of the drugs is determined in the presence of 15 mM theophylline or only 1.8 mM theobromine.

Comparative studies show direct correlation between the pharmacological activities as stimulants of caffeine, theophylline and theobromine and their behaviour as inhibitors of calcium uptake coupled to respiration by mitochondria.

**Key words:** Mitochondria, Calcium transport, Liver, Theophylline, Theobromine, Caffeine.

La cafeína, la teofilina y la teobromina son tres derivados metilados de la xantina, que tienen en común varias acciones farmacológicas de interés terapéutico, aunque difieren entre sí marcadamente en la intensidad de las mismas (15).

Los aspectos bioquímicos de las metilxantinas han sido ampliamente estudiados y se han propuesto varios mecanismos de acción encaminados a estudiar sus diversos efectos (10). Entre ellos es de gran interés el que estos compuestos pueden incrementar la con-

centración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en algunos tejidos (13).

Está bien establecido que el  $\text{Ca}^{2+}$  es un regulador clave de numerosos procesos biológicos, contracción muscular (9), acciones hormonales, etc., siendo esto posible gracias al sistema celular por el cual la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol se mantiene baja (14). Inmediatamente después de entrar el  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula es bombeado al exterior o a organelos intracelulares, como el retículo sarcoplásmico y la mitocondria.

En el presente trabajo se ha hecho un estudio comparativo de la acción de la teofilina y teobromina sobre la mitocondria de hígado de rata (RLM), en relación con su posible papel como reguladora del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (6). Se ha prestado atención especial, tanto al transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana mitocondrial, como a los cambios inducidos en el consumo de oxígeno por estos compuestos.

La elección de la teobromina y teofilina se debe a que en los últimos tiempos se han puesto de manifiesto, además de su acción como estimulante, efectos terapéuticos específicos como la relajación del músculo liso, —en el caso de la teofilina—, entre otros (17). Por otra parte, tanto la teofilina como la teobromina son metabolitos activos de la cafeína y se encuentran en numerosas especies estudiadas (3, 18).

Mediante los estudios mencionados se pretende también obtener algún dato adicional sobre la relación entre estructura química y acción farmacológica, hasta ahora desconocida (15).

### Material y métodos

Las mitocondrias de hígado de rata se aislaron y purificaron siguiendo el método de CARVALHO-GUERRA con algunas modificaciones (4). Se utilizaron ratas Wistar, machos y hembras, alojadas

en criaderos en condiciones naturales de iluminación y aire acondicionado, mantenidas en ayunas entre dieciocho y veinticuatro horas antes de ser sacrificadas por decapitación.

*Determinación de proteína mitocondrial.* Con el fin de cuantificar la concentración de mitocondrias en las suspensiones utilizadas, se determinaron proteínas totales mediante el método modificado de BIURET (1), utilizando disoluciones de sero-albúmina cristalizada (Armour) como patrones.

*Experimentos con el electrodo de oxígeno.* El consumo de oxígeno por la mitocondria se midió con un electrodo de oxígeno tipo Clark (Yellow Spring) a  $27 \pm 1^\circ \text{C}$  y con agitación constante. Previamente la respuesta del electrodo fue calibrada utilizando ditionito según el método descrito por CARAFOLI y SEMENZA (2). El medio de reacción contenía KCl 120 mM, Tris-HCl 5 mM, fosfato inorgánico 2 mM y concentraciones variables de teofilina y teobromina. Como sustrato energético se empleó succinato potásico 5 mM, con concentraciones medidas de mitocondria próximas a 2,5 mg/ml.

Una vez iniciada la respiración mitocondrial con succinato, se esperó a obtener un consumo constante de oxígeno (un minuto) y se añadió un pulso de ADP (concentración final 6 mM) para inducir la respiración acelerada. Se registró el potencial hasta que las mitocondrias volvían a la respiración lenta. Antes y después de cada determinación se hicieron experimentos «blancos» (concentración del compuesto igual a cero) para comprobar las características respiratorias de la muestra mitocondrial (6).

*Experimentos con el electrodo de  $\text{Ca}^{2+}$ .* Se empleó un electrodo selectivo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Radiometer F2112 de

$\text{Ca}^{2+}$ ), utilizando como electrodo de referencia uno de calomelano (Radiometer K 401), acoplado a un pHmetro (PHM-61) con salida a un registrador Omniscribe (Houston Instrument). Para el calibrado de los electrodos se utilizó el medio de reacción con mitocondria no respirante y en las mismas condiciones de temperatura ( $27 \pm 1^\circ \text{C}$ ) y agitación de los experimentos. Una vez estabilizado el potencial se añadieron diez pulsos de  $1 \mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M para calcular la equivalencia entre la variación del potencial y la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio (5).

Los experimentos se realizaron con un medio de reacción de KCl 120 mM, Tris-HCl 20 mM y fosfato inorgánico 2 mM al cual se le añadió una cantidad medida de mitocondria para obtener una concentración final aproximada de 1 mg/ml. Una vez estabilizado el potencial se añadió  $\text{CaCl}_2$  hasta una concentración  $100 \times 10^{-6} \text{M}$ , observando un aumento de dicho potencial y a continuación el succinato potásico observándose una disminución en el potencial que corresponde a la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por la mitocondria, volviendo a los valores iniciales al cabo de, aproximadamente, 90 s (experimentos «blancos») (2).

**Estudios estadísticos.** En todos los casos se han realizado más de cuatro determinaciones de las magnitudes correspondientes, calculándose el error estándar de los valores medios. Todas las variaciones lineales se ajustaron a los puntos experimentales por el método de los mínimos cuadrados.

## Resultados

### ESTUDIO CON TEOFILINA

**Características respiratorias de la muestra.** En las mismas condiciones del medio de reacción, sustrato energé-

tico y concentración de ADP se comprobó que la mitocondria mantenía sus características respiratorias en ausencia y en presencia de teofilina en el medio,

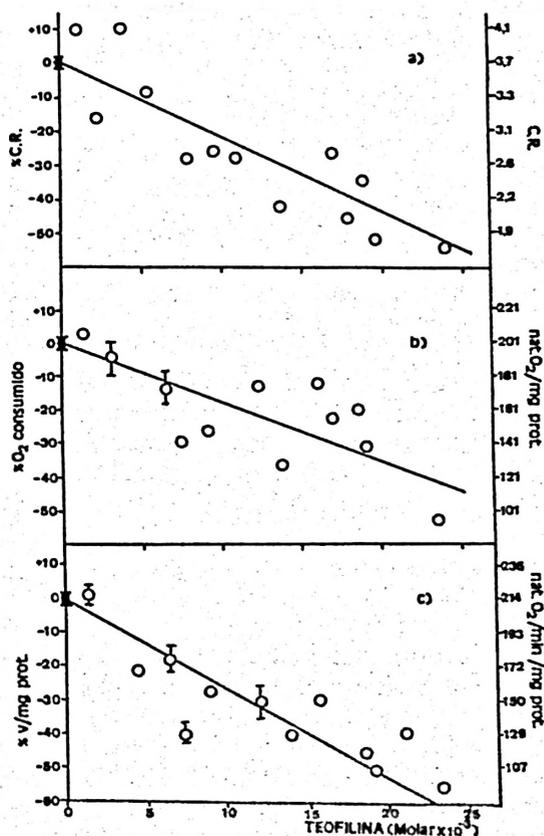


Fig. 1. Experimentos con el electrodo de oxígeno para diferentes concentraciones de teofilina.

a) Variación del coeficiente respiratorio, en incrementos respecto del «blanco» (%) y valores absolutos.  $m = -0,08$ ;  $b = 3,5$ ;  $r = 0,86$ . b) Variación del oxígeno consumido por mg de proteína en incrementos respecto del «blanco» (%) y valores absolutos.  $m = 3,6$  nat  $\text{O}_2/\text{mg prot}$ .  $b = 202$  nat  $\text{O}_2/\text{mg prot}$ .  $r = 0,78$ . c) Variación de la velocidad de consumo de oxígeno, en incrementos respecto del «blanco» y valores absolutos.  $m = 4,9$  nat  $\text{O}_2/\text{min}/\text{mg prot}$ .  $b = 213$  nat  $\text{O}_2/\text{min}/\text{mg prot}$ .  $r = 0,92$ . Experimentos «blancos»:  $n = 51$ . Experimentos con teofilina:  $n \geq 4$ . Cada punto representa el valor medio  $\pm$  E.S. En los experimentos no señalados con trazos, el E. S. entra dentro del diámetro del punto.

hasta unas concentraciones de  $1,5 \times 10^{-3}$  M (C.R. =  $3,7 \pm 0,2$ ). A concentraciones mayores los coeficientes respiratorios (C.R.) disminuyen de un modo significativo, alcanzándose valores que son la mitad de los observados en ausencia de fármaco (fig. 1a).

**Consumo de oxígeno.** El consumo de oxígeno durante el ciclo respiratorio inducido por ADP en función de la concentración de teofilina, se muestra en la figura 1b. Es evidente que existe un efecto del compuesto sobre el consumo total de oxígeno, que disminuye linealmente para las concentraciones estudiadas ( $0-25 \times 10^{-3}$  M).

La velocidad del consumo de oxígeno en función de las concentraciones de teofilina también disminuye de forma lineal, con la concentración del estimulante (fig. 1c).

#### ESTUDIO COMPARATIVO CON TEOBROMINA

Una comparación de cómo se afecta la respiración celular en presencia de teofilina o teobromina se muestra en la figura 2.

Se observa que, tanto los C.R. (figura 2a) como el oxígeno consumido durante el ciclo respiratorio (fig. 2b) y la velocidad de consumo de oxígeno (fig. 2c), tienen un comportamiento análogo en presencia de ambos compuestos, al menos, en el intervalo de concentraciones a las que se ha podido estudiar la teobromina, dada su escasa solubilidad.

Para el oxígeno consumido, los valores obtenidos no muestran diferencias significativas respecto del blanco. Estos resultados no son concluyentes, puesto que en el caso de la teofilina, para la que existe evidencia de una disminución lineal de estas magnitudes al aumentar la concentración, tampoco es observable ningún cambio para las mismas.

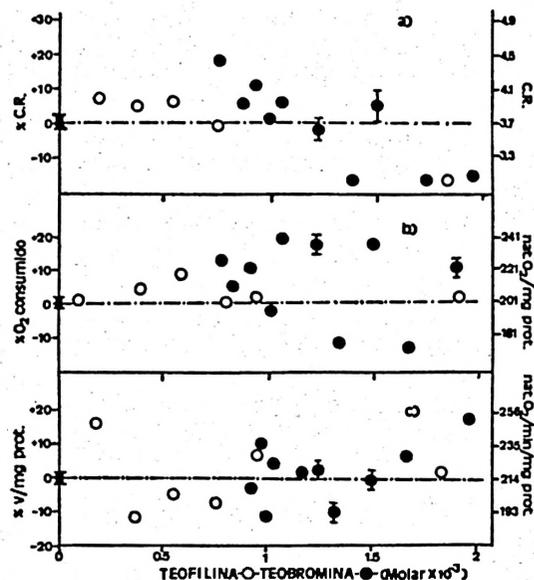


Fig. 2. Experimentos con el electrodo de oxígeno para diferentes concentraciones de teofilina o teobromina.

a) Variación del coeficiente respiratorio en incrementos respecto del «blanco» (%) y valores absolutos. b) Variación de los nanoátomos de oxígeno consumidos por miligramo de proteína en incrementos respecto del «blanco» (%) y valores absolutos. c) Variación de la velocidad de consumo de oxígeno en incrementos respecto del «blanco» (%) y valores absolutos. Experimentos «blanco»:  $n = 26$ . Experimentos con teobromina:  $n \geq 4$ . Cada punto representa el valor medio  $\pm$  E. S.

#### TOMA DE CALCIO POR LA RLM

Paralelamente a los estudios con el electrodo de oxígeno se ha llevado a cabo una serie de experimentos con el electrodo de  $\text{Ca}^{2+}$  para estudiar la influencia de estos compuestos sobre el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana mitocondrial.

**Determinación del valor máximo de calcio tomado por la mitocondria.** La figura 3a muestra la variación de la cantidad máxima de  $\text{Ca}^{2+}$  tomado en

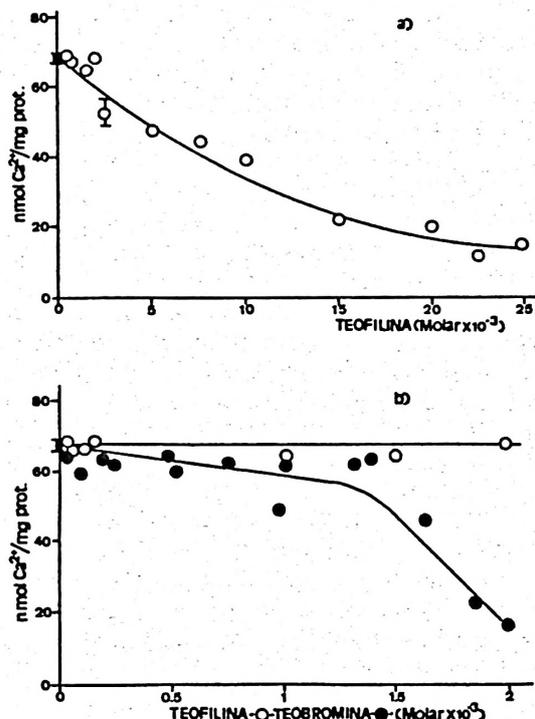


Fig. 3. Experimentos con el electrodo de calcio. a) Variación del Ca<sup>2+</sup> máximo tomado por la mitocondria en función de las diferentes concentraciones de teofilina. Experimentos «blancos»: n = 71. Experimentos con teofilina: n = 5. b) Estudio comparativo de la variación de Ca<sup>2+</sup> máximo tomado por la mitocondria en función de las concentraciones de teofilina o teobromina. Experimentos «blanco»: n = 44. Experimentos con teobromina: n = 5. Cada punto representa el valor medio  $\pm$  E. S.

presencia y ausencia de teofilina. Estos valores disminuyen de forma prácticamente exponencial para alcanzar, cuando se utilizan concentraciones próximas a  $15 \times 10^{-3}$  M, un valor próximo a 10 nmol de Ca<sup>2+</sup>/mg de proteína.

En el caso de la teobromina (fig. 3b), los valores de Ca<sup>2+</sup> máximo tomado por la mitocondria disminuyen lentamente a medida que aumenta la concentración del compuesto en el medio hasta que, a concentraciones entre  $1$  y  $1,5 \times 10^{-3}$  M,

cambia bruscamente de pendiente para llegar, cuando la concentración de teobromina es  $2 \times 10^{-3}$  M, a unos valores que son aproximadamente del 25 % del valor obtenido en los experimentos «blancos» (muy próximo a 15 nmol de Ca<sup>2+</sup>/mg de proteína).

**Estudios cinéticos.** Toma de calcio: se ha observado que, a bajas concentraciones de teofilina (fig. 4a), el tiempo necesario para alcanzar la saturación de calcio por la mitocondria permanece constante y con un valor muy próximo a los 36 s (valor medio de los blancos). Sin embargo, alcanza valores próximos a 60 s cuando las concentraciones del compuesto están cerca de la saturación. Un estudio comparativo con la teobromina (fig. 4b) indica que, para las

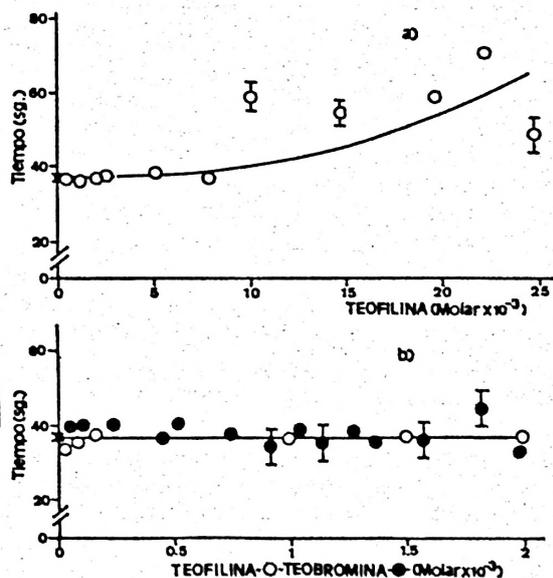


Fig. 4. Experimentos con el electrodo de calcio. a) Variación del tiempo que tarda la mitocondria en saturarse de Ca<sup>2+</sup> en función de las concentraciones de teofilina. b) Estudio comparativo del tiempo que tarda la mitocondria en saturarse de Ca<sup>2+</sup> en función de las concentraciones de teofilina y teobromina. Datos estadísticos como figura 3.

concentraciones en que ésta se ha podido estudiar (entre 0 y 2 mM), no se observan variaciones significativas sobre el tiempo que tarda la mitocondria en saturarse de  $\text{Ca}^{2+}$  por la presencia de ambos fármacos.

**Velocidad de toma de calcio:** Dado el carácter sigmoidal de la variación del  $\text{Ca}^{2+}$  tomado por la mitocondria con el tiempo, se ha tomado como indicador de la cinética global un valor medio de la velocidad, definido por el cociente entre el valor máximo de  $\text{Ca}^{2+}$  (nmoles/mg de proteína mitocondrial) y el tiempo en segundos que se tarda en alcanzar este máximo. La variación de los valores de esta velocidad media, en función de la concentración de teofilina, muestran un comportamiento análogo a los de  $\text{Ca}^{2+}$  máximo tomado por la mitocondria (fig. 3). Un estudio comparativo con la teobromina indica un comportamiento más activo de este compuesto (fig. 3b).

### Discusión

Los estudios del proceso respiratorio mitocondrial descritos demuestran una acción inhibitoria del mismo por la teofilina, que depende de la concentración. Este resultado es semejante al observado con la cafeína (5) y parece indicar una propiedad bastante generalizada de las metilxantinas que, por su baja solubilidad, no ha podido ser demostrada de forma concluyente en el caso de la teobromina.

Se observa una disminución en el consumo de oxígeno prácticamente lineal, con el aumento de concentración de teofilina en el medio, y un comportamiento semejante de la velocidad de consumo de oxígeno por la mitocondria, que llega a hacerse la mitad de la observada en ausencia de teofilina para una concentración de  $20 \times 10^{-3}$  M.

Por lo que respecta al coeficiente res-

piratorio (C.R.) es evidente un notable efecto de la teofilina ya que, a concentraciones de  $10 \times 10^{-3}$  M, los valores de C.R. disminuyen hasta en un 20 % respecto al valor determinado en los experimentos en ausencia del compuesto, efecto no observado en la cafeína que deja casi intacta la capacidad respiratoria de la mitocondria a concentraciones mucho mayores (11).

Los resultados con teobromina no son concluyentes debido a la baja solubilidad de este compuesto en agua, a la temperatura y condiciones experimentales del estudio (11). Sin embargo, el estudio comparativo con teofilina no excluye que el comportamiento pueda ser igual que el de este compuesto, ya que en el rango de concentraciones estudiadas (entre 0 y  $2 \times 10^{-2}$  M), la desviación sobre el resultado observado para los blancos es sólo del 5 %, desviación no significativa como la que se observa con teobromina.

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria, en presencia de succinato, se ve afectada notablemente por las dimetilxantinas estudiadas, de forma semejante a la observada en la cafeína (7). En el caso de la teobromina, la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  máxima disminuye más de tres veces, para concentraciones de  $2 \times 10^{-3}$  M respecto al tomado en su ausencia. Un efecto semejante ha sido observado con la teofilina, si bien para concentraciones superiores a  $15 \times 10^{-3}$  M.

No existe una explicación concluyente de la correlación entre la naturaleza química de las metilxantinas y su acción inhibitoria de la toma de  $\text{Ca}^{2+}$  (8), que es mayor para la teobromina que para la teofilina y ésta es mayor que para la cafeína.

Los estudios cinéticos realizados indican que, a pesar de las grandes diferencias observadas en el valor del  $\text{Ca}^{2+}$  máximo captado por la mitocondria en presencia de teofilina y teobromina, el tiempo necesario para alcanzar este va-

lor no varía ni con la concentración ni con la naturaleza del compuesto empleado, permaneciendo muy próximo al valor obtenido en los experimentos blanco (36 s). Solamente hay que exceptuar los resultados obtenidos a concentraciones de teofilina superiores a  $10 \times 10^{-3}$  en las que parece que hay un desplazamiento de este tiempo a valores próximos a 60 s y que puede estar relacionado con la pérdida de capacidad respiratoria (C.R. más bajos).

Las velocidades de toma de  $\text{Ca}^{2+}$  siguen, como cabría esperar dada la constancia del tiempo en alcanzar el valor máximo, un comportamiento paralelo al de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$ . La teobromina enlentece el proceso más que la teofilina y la intensidad del efecto varía con la concentración. Esta inhibición de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por la mitocondria debida a la presencia de derivados metilados de xantina (12) parece estar relacionada con el proceso respiratorio (5). Por otro lado, no parece que estos compuestos puedan tener un efecto quelante respecto al  $\text{Ca}^{2+}$  ni tampoco un efecto ionóforo que perturbe el proceso (16).

De acuerdo con esto, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extramitocondrial, equivalente al citoplasmático en las células intactas, tenderá a ser mayor en presencia de las mismas cantidades de teobromina y teofilina (por este orden) que en su ausencia, fundamentalmente porque la toma de  $\text{Ca}^{2+}$  por las mitocondrias regida por el proceso respiratorio, está inhibida. Sin embargo, las notables diferencias encontradas en las cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  máximo tomado por las mitocondrias, en presencia de los compuestos estudiados, no se corresponden unívocamente con el consumo de oxígeno, puesto que no se ha observado un efecto significativamente distinto sobre la respiración mitocondrial de la teofilina y teobromina. Esto indica una acción inhibitoria más eficaz sobre el sistema portador de calcio al interior de la

mitocondria en el caso de la 3,7-dimetilxantina (teobromina) que en el de su isómero de posición 1,3-dimetilxantina (teofilina) y ésta, a su vez, es más activa que la 1,3,7-trimetilxantina (cafeína) (8).

Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que las acciones farmacológicas estimulantes son más intensas en la teofilina que en la cafeína (8) y, aunque la presencia de teobromina, dada su poca solubilidad, no puede sobrepasar cierto nivel de concentración, cabe esperar, de acuerdo con los resultados encontrados, efectos aún más notables.

### Resumen

Se estudia la influencia de la teofilina y de la teobromina sobre la respiración celular y el transporte de calcio a través de la membrana de mitocondria aislada de hígado de rata, utilizando electrodos selectivos de oxígeno y  $\text{Ca}^{2+}$ .

Los coeficientes respiratorios, el consumo de oxígeno «extra» inducido por ADP y la velocidad de dicho consumo descienden linealmente a medida que aumenta la concentración del compuesto. La teobromina, a las concentraciones estudiadas, no tiene un efecto apreciable sobre estos parámetros de la respiración, siendo los resultados semejantes a los de teofilina en el mismo rango de concentraciones.

La captación de calcio acoplada a la respiración celular es inhibida por ambos compuestos dependiendo de su concentración. La teobromina es más efectiva que la teofilina. La saturación de calcio por la mitocondria tiene lugar en todos los casos a los  $36 \pm 2$  s, pero en presencia de teofilina 15 mM y teobromina 1,8 mM el calcio máximo captado sólo es el 20 % del observado en ausencia de dichos compuestos.

Los estudios comparativos de cafeína, teofilina y teobromina muestran una correlación directa entre su actividad farmacológica y su comportamiento como inhibidores de la toma de calcio acoplada a la respiración mitocondrial.

### Bibliografía

1. BYGRAVE, F. L.: *Nature*, 214, 667-671, 1967.
2. CARAFOLI, E. y SEMENZA, J.: *Erythrocytes and the Use of Calcium Sensitive Electrode*

- in Membrane Biochemistry. Springer Verlag, Berlín, 1979.
3. CARNEY, J. M.: *Br. J. Pharmac.*, **75**, 451-454, 1982.
  4. CARVALHO-GUERRA, F.: *Methods in enzymology*, **32**, 299-305, 1074.
  5. DE LA CRUZ, M. J., ALEMANY, J., ALBERT, P. y ÁLVAREZ-REMENTERÍA, R.: *N. Arch. Fac. Med.*, **41**, 575-579, 1983.
  6. DE LA CRUZ, M. J., IZAGUIRRE, J. y TAMARIT, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **36**, 127-132, 1980.
  7. DE LA CRUZ, M. J. y TAMARIT, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **34**, 351-356, 1978.
  8. GOODSSELL, E. y STEIN, H.: *J. Med. Chem.*, **14**, 1202-1205, 1971.
  9. HAJDU, S.: *Amer. J. Physiol.*, **218**, 966-972, 1970.
  10. KALSNER, S.: *Br. J. Ph. Br. Pharmacol.*, **43**, 379-388, 1971.
  11. LISTER, J. M.: «The chemistry of heterocyclic compounds». Part. II Purines. (A. Weissberg y E. C. Taylor, eds.). Wiley Interscience, Nueva York, 1971, pp. 256-257.
  12. MARCO, A. L. y NASTUK, W. L.: *Science*, **161**, 1357-1358, 1968.
  13. MARTONOSI, A.: En «Current Topics in Membrane and Transport» (Brones, F. y Kleinzeller, A., eds.). Academic Press, Londres, 1972, Vol. 3, pp. 83-1976.
  14. RACKER, E.: *Fed. Proc.*, **39**, 2422-2426, 1980.
  15. RALL, T. W.: En «Bases farmacológicas de la terapéutica» (Goodman, L. y Gilman, A., eds.). Panamericana, Méjico, 1981, pp. 587-601.
  16. REPKE, D. I., KATZ, A. M. y HASSELBACH, W.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 1938-1949, 1977.
  17. TAYLOR, S. R. y GOOD, R. E.: En «Calcium in Biological System». Symp. Soc. Experimental Biol. 39, Cambridge University Press, Cambridge, 1976, pp. 361-380.
  18. VINEGAR: *Proc. Exp. Biol. Med.*, **151**, 556-560, 1976.