

## Efecto de la calcitonina en el transporte de calcio en mitocondria aislada de rata

M. J. de la Cruz, J. Izaguirre y J. Tamarit

Departamento de Fisiología II y Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad Complutense  
Madrid-3 (Spain)

(Recibido el 15 de mayo de 1979)

M. J. DE LA CRUZ, J. IZAGUIRRE and J. TAMARIT. *Effect of Calcitonin in Calcium Transport in Isolated Rat Mitochondria*. Rev. esp. Fisiol., 36, 127-132. 1980.

The effect of synthetic salmon calcitonin (SCT) on  $Ca^{2+}$  transport by isolated liver mitochondria has been studied. In the presence of inorganic phosphate SCT accelerates the calcium induced oxygen rate consumption, shortens the stimulated respiration time and diminishes the amounts of  $O_2$  consumed. Determination of the  $Ca^{2+}$  accumulated during respiration shows that the uptake rate of  $Ca^{2+}$  increases rapidly with SCT concentration reaching a steady value. There are no appreciable changes on the rate of  $H^+$  ejection due to calcitonin with mitochondria incubated with NEM. However pulses of SCT on previously polarized mitochondria produce instantaneous acceleration on  $H^+$  ejection. These results agree with a possible participation of mitochondria on the hypocalcemia induced by calcitonin.

La acción hipocalcemiante de la calcitonina se ha explicado en parte por una inhibición de la reabsorción ósea (10, 11) y por una mayor acumulación de calcio a nivel celular. Los resultados obtenidos con células aisladas (1, 8) sugieren que la calcitonina o inhibe el mecanismo de transporte activo de salida de calcio de la célula o disminuye la concentración de calcio intracelular disponible.

BORLE (2) ha demostrado que en células aisladas de riñón, la calcitonina produce un aumento en la toma de calcio por las células y que este proceso está íntimamente relacionado con el control de transporte de  $Ca^{2+}$  en la mitocondria, la

cual sería en parte la responsable de la disminución de transporte de calcio y de la hipocalcemia observada en animales. Si bien el paso de la calcitonina al interior de la célula no está demostrado, es muy posible que esta hormona actúe directamente sobre las mitocondrias, ya que se han encontrado en el citoplasma hormonas polipeptídicas de las mismas características de la calcitonina (12).

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de la calcitonina sobre el transporte de  $Ca^{2+}$  en mitocondrias aisladas en presencia y ausencia de fosfatos, con el fin de estudiar el posible papel de la mitocondria como elemento regulador de la

actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel celular y apuntar nuevos datos sobre la acción de la hormona.

### Material y métodos

*Aislamiento de mitocondrias.* Se utilizaron ratas macho Wistar sacrificadas por decapitación después de 24 horas de ayuno. Las mitocondrias de hígado se aislaron y purificaron siguiendo el método de SCHNEIDER (15) con algunas modificaciones. El medio de aislamiento contenía: sacarosa 75 mM, manitol 225 mM, EDTA 0.1 mM (pH 7,2). El medio de lavado no contenía EDTA.

Las mitocondrias, aisladas y lavadas dos veces, se resuspendieron en el medio de incubación adecuado.

Las proteínas mitocondriales se determinaron en todos los casos por el método modificado de BIURET (6) utilizando disoluciones de seroalbúmina bovina (SAB) cristalizada purísima (Armour Co.) como estándar. En los experimentos de control se utilizaron disoluciones de esta misma proteína a igual concentración en peso y disolvente que la calcitonina.

La calcitonina empleada (SCT) fue de salmón, sintetizada por Sandoz (Basilea). La disolución contenía 20  $\mu\text{g/ml}$  de la forma poliacetato polihidrato de la hormona en un medio tamponado con acético-acetato sódico 50 mM.

*Consumo de oxígeno inducido por la adición de  $\text{Ca}^{2+}$ .* El consumo de oxígeno se midió con un electrodo selectivo de oxígeno tipo Clark en una cámara de 2,5 ml a 22° C, con agitación constante. El medio para los estudios de respiración mitocondrial fue: sacarosa 250 mM,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  7 mM, ClK 40 mM, Tris-ClH 20 mM (pH 7,2),  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  5 mM. Una vez estabilizada la temperatura se añadió una cantidad medida de mitocondria (2 mg proteína) y, seguidamente, 10  $\mu\text{l}$  de glutamato potásico 1M y 10  $\mu\text{l}$  de malato potásico 1M como sustrato energético. A continuación se añadieron las cantidades de calcitonina

necesarias y finalmente un pulso de 5  $\mu\text{l}$  de cloruro cálcico 0,1M, registrándose durante todo el tiempo el consumo de oxígeno hasta que las mitocondrias volvían de nuevo al consumo lento de oxígeno.

Se realizaron experimentos al comienzo y final de la serie con ADP en vez de  $\text{Ca}^{2+}$  para comprobar que se mantenían las características respiratorias de la muestra mitocondrial. Asimismo se llevaron a cabo experimentos control con SAB en vez de SCT.

*Determinación por filtración de la toma de  $\text{Ca}^{2+}$  por la mitocondria.* Los experimentos se realizaron en el mismo medio utilizado en los experimentos de respiración, según el método de filtración descrito anteriormente (5) utilizando filtros Millipore (HAWP 01300) y un instrumento Unicamp SP 1900 Atomic Absorption Spectrophotometer para la determinación del  $\text{Ca}^{2+}$ .

*Experimentos de salida de  $\text{H}^+$ .* La mitocondria (8,8 mg de proteína) se suspendió en 4 ml de medio que contenía: sacarosa, 250 mM; ClK, 130 mM; Hepes, 3 mM; rotenona, 2  $\mu\text{M}$ , con el fin de bloquear la oxidación de sustratos endógenos, y NEM (n-etilmaleimida), 40 nmoles por mg de proteína, para impedir los movimientos de iones fosfato (13). Todos los reactivos se llevaron a pH = 7,2, incluida la disolución de SCT, con lo que se destruyó la acción amortiguadora del medio. Después de 3 minutos de incubación aerobia a 22° C se añadieron 200 n.iones-g de  $\text{Ca}^{2+}$ . Inmediatamente se añadió succinato potásico (1 mM) con objeto de iniciar el flujo de protones.

En los experimentos en los que se utilizó calcitonina, ésta se añadió al medio inmediatamente después del NEM y en concentraciones crecientes entre 0,05 y 1  $\mu\text{g/mg}$  de proteína mitocondrial. La eyección de  $\text{H}^+$  se registró en un pHmetro Radiometer PHM 64 (escala de 1500 mV) y un registro X-Y, con base de tiempo, Sefram TGM 164.

Todos los reactivos empleados eran de la máxima pureza.

### Resultados

Se estudió el efecto de la calcitonina en la respiración inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ , utilizando 5 concentraciones de la hormona en el intervalo entre 0,25 y 1,5  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína. En todos los casos se observó que la adición de 500 n.at-g de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio de incubación estimulaba el consumo de oxígeno durante un cierto tiempo, volviéndose al consumo inicial de respiración lenta. En ausencia de calcitonina la duración del ciclo de respiración inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  era de 216 s, y el consumo de  $\text{O}_2$  por adición de ADP en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  daba un coeficiente respiratorio superior a 2,5. La adición de SAB (1,5  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína) en lugar de calcitonina no produjo ningún efecto observable.

En la figura 1 se resumen los resultados obtenidos para las distintas concentraciones de hormona en el medio. La velocidad media de consumo de oxígeno se hace mayor en presencia de calcitonina, aumentando alrededor de un 50 %, aunque no se ve claramente un efecto de la concen-

tración, ya que para las concentraciones más elevadas de hormona, en que parece disminuir, el error experimental es mayor. Por otro lado, la duración del ciclo disminuye exponencialmente a valores que tienden asintóticamente a 50 s para concentraciones elevadas de hormona. Finalmente, se observa un aumento lineal del cociente n.at-g  $\text{Ca}^{2+}$  añadido/n.at-g  $\text{O}_2$  consumido, en función de la cantidad de hormona en el medio.

Paralelamente se han realizado determinaciones de la toma de  $\text{Ca}^{2+}$  por las mitocondrias en función del tiempo de incubación para distintas concentraciones de hormonas. Los resultados indican que, en todos los casos estudiados, en presencia o ausencia de SCT, las cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  acumuladas en la mitocondria, a tiempos que corresponden prácticamente a la terminación del ciclo de consumo acelerado de  $\text{O}_2$ , son independientes de la concentración de hormona y oscilan alrededor de 40 n.at-g/mg de proteína. Sin embargo, los valores más elevados de toma de  $\text{Ca}^{2+}$  (52-50 n.at-g/mg de prot.) por la mitocondria aparecen a tiempos de incubación más cortos en presencia de calcitonina.

El estudio cinético de la salida de protones de la mitocondria en ausencia de fosfato añadido y en condiciones en las que se ha inhibido el transporte de estos aniones y la oxidación de sustratos endógenos (13), muestra en ausencia de calcitonina un comportamiento muy semejante al descrito por otros autores (14). La adición de  $\text{Ca}^{2+}$  no parece tener un efecto importante en la aparición de protones en el medio en ausencia de sustrato energético (fig. 2). La adición de succinato, después de incubar 30 s aproximadamente, inicia inmediatamente el proceso respiratorio acelerado, hasta que se alcanza una variación casi constante del potencial medido con el tiempo (curva A 1). En el caso de que haya una proporción elevada de calcitonina, el potencial medido a tiem-

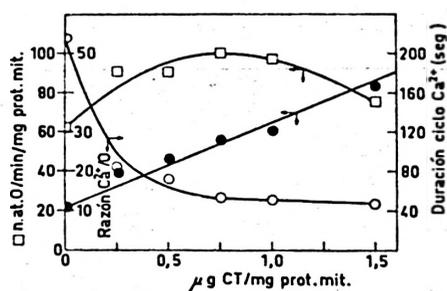


Fig. 1. Variaciones del consumo de  $\text{O}_2$  en mitocondria por la calcitonina.

a) ( $\square$ ) velocidad media de consumo de oxígeno inducido por  $\text{Ca}^{2+}$ , b) ( $\bullet$ ) razón n.at-g de  $\text{Ca}^{2+}$  añadido/n.at-g  $\text{O}_2$  consumido durante el ciclo y c) ( $\circ$ ) tiempo de duración del ciclo (segundos). En presencia de fosfatos inorgánicos, 2 mg de proteína mitocondrial a 22° C.

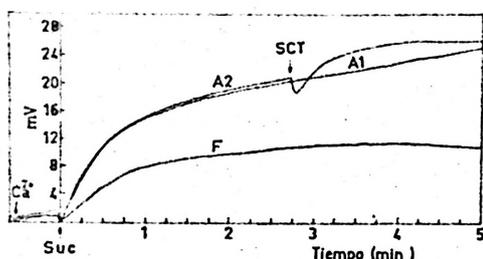


Fig. 2. Variación del potencial en mV registrado con electrodo de vidrio en función del tiempo.

La mitocondria (8,5 mg/4 ml de medio) tratada con rotenona y NEM en ausencia de fosfatos. Las flechas indican la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  (200 nmoles), de succinato potásico y de calcitonina (SCT). La curva A1 se obtuvo con mitocondrias sin SCT. La A2 en las mismas condiciones añadiéndose un pulso de SCT (2,8  $\mu\text{g}$ ) en el tiempo indicado. En la curva F la calcitonina (1,1  $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína) se incubó previamente (15-20 seg) a la adición de  $\text{Ca}^{2+}$ . El pH de todos los reactivos es 7,2.

pos mayores de 5 min tiende a disminuir (curva F).

Es interesante resaltar que la adición de un pulso de calcitonina (curva A 2) a mi-

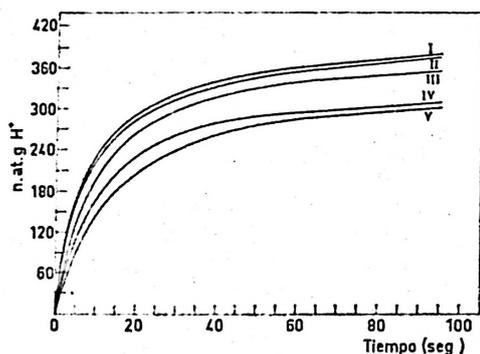


Fig. 3. Variación del incremento de protones en el medio con el tiempo al añadir succinato potásico a muestras que contienen calcio (200 nmoles) y cantidades variables de calcitonina (SCT).

Curvas I (sin SCT); II, 0,11; III, 0,22; IV, 0,54 y V. 1,1  $\mu\text{g}$  de SCT/mg de proteína.

tocondrias incubadas en ausencia de hormona, en fase avanzada del ciclo respiratorio, produce una aceleración del proceso.

En la figura 3 se muestra la variación linealizada de la concentración de protones en el medio en función del tiempo a distintas concentraciones de SCT. Se observan cambios respecto a las curvas en ausencia de hormona, para concentraciones iguales o superiores a 2  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína. Para valores inferiores no hay variaciones significativas ni en el valor de la pendiente inicial (270-275 n.at-g  $\text{H}^+$ /mg de proteína) ni en el valor absoluto de protones en el medio que a 225 s es de 407-400 n.at-g  $\text{H}^+$ . Admitiendo que todo el calcio entra en la mitocondria, estos valores suponen una transferencia de carga neta de  $2\text{H}^+$  por ion  $\text{Ca}^{2+}$  en ausencia de calcitonina. Para adiciones mayores de la disolución de hormona los valores de la pendiente disminuye y la cantidad de protones total medida también, alcanzándose valores de 325 n.at-g  $\text{H}^+$  que tienden a disminuir para tiempos mayores a 250-300 s.

Experimentos control en los que en vez

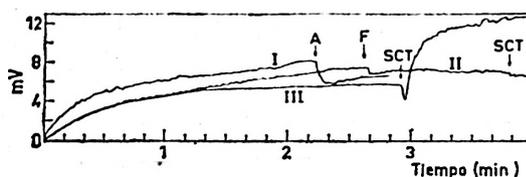


Fig. 4. Efecto de la calcitonina y de iones acetato en la eyección de  $\text{H}^+$ .

Registro de la variación de potencial (mV) con el tiempo, desde la adición de succinato, en muestras de citocondrias (3,2 mg en 4 ml de medio) tratadas con rotenona y NEM. El pH de todos los reactivos es 7,2. Línea I, 15 segundos antes se añadieron 200 nmoles de  $\text{Ca}^{2+}$ . A, momento de la adición de un pulso de acetato sódico (12  $\mu\text{moles}$ ). Línea II, junto con el succinato se añadió SCT (6  $\mu\text{g}$ ). F, adición de fosfato (20  $\mu\text{moles}$ ). Línea III, muestra que contiene la misma cantidad de acetato que la disolución de SCT (12  $\mu\text{moles}$ ). SCT, pulso de calcitonina (1,2  $\mu\text{g}$ ).

de la disolución de hormona se añaden iones acetato en cantidades equivalentes muestran, para concentraciones de 1-4 mM, un comportamiento semejante al observado con concentraciones elevadas de calcitonina (0,2-1  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína) (fig. 4). Esto demuestra que la desaceleración en la salida de protones no se debe a la presencia de hormona sino a la del ion acetato, de acuerdo con lo observado por LEHNINGER y otros autores (3, 9). Sin embargo, hay que señalar que la adición de un pulso de iones acetato a mitocondrias con la membrana polarizada no produce un efecto positivo en la eyección de protones. Por el contrario, un pulso de calcitonina en estas condiciones, aún en presencia de acetato (fig. 4, III), produce una aceleración muy significativa en la salida de protones al medio.

### Discusión

Los cambios introducidos en el consumo de  $\text{O}_2$  inducido por  $\text{Ca}^{2+}$ , por la presencia de calcitonina en el medio indican una acción aceleradora del transporte de calcio al interior de la mitocondria debido a la hormona.

Puesto que no se observan apenas variaciones en la toma de  $\text{Ca}^{2+}$  por la mitocondria en presencia de SCT, es lógico suponer que la velocidad media de la entrada de estos iones sea proporcional al inverso de los tiempos de duración del ciclo respiratorio (fig. 1). Esto significa que el aumento de velocidad debido a la calcitonina será muy importante a bajas concentraciones, creciendo exponencialmente hasta alcanzar un valor casi constante para concentraciones superiores a 0,5  $\mu\text{g}$  de SCT/mg de proteína. Estas observaciones están de acuerdo con los resultados obtenidos por BORLE (2), quien ha observado un incremento rápido en la velocidad de toma de  $\text{Ca}^{2+}$  por mitocondria de hígado en presencia de fosfato, por adición de SCT a una concentración de 0,02  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína.

En condiciones de inhibición de transporte de fosfatos (13) y en ausencia de respiración, antes de añadir succinato, la calcitonina no parece tener ninguna acción como transportador de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , al menos con intercambio de cargas (4). En estas condiciones, la calcitonina añadida antes de que se inicie la respiración no introduce cambios importantes en la velocidad de salida de protones de la mitocondria. Sin embargo, si existe una fuerte polarización previa de la membrana, la acción de la calcitonina como acelerador del transporte de calcio es evidente, observándose un aumento en la velocidad de salida de  $\text{H}^+$  al medio incluso en presencia de iones acetato que tienden a contrarrestar el aumento de concentración de protones en el medio (7).

Todos estos resultados están de acuerdo con una posible participación de la mitocondria en la acción hipocalcemiante de la calcitonina a nivel celular (2, 8), pero es difícil la interpretación del mecanismo de acción a nivel molecular.

Sin embargo, todo indica una posible acción ionófora de la hormona, que explicaría no sólo el aumento de velocidad en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de fosfatos sino la disminución en el consumo de  $\text{O}_2$  implicado al aumentar la concentración de hormona. En ausencia de transporte de fosfatos es evidente la necesidad de una energización previa de la membrana.

### Agradecimiento

Se agradece al Dr. M. Gozávez, Departamento de Bioquímica Experimental de la Clínica Puerta de Hierro, su colaboración en la realización de los experimentos con electrodo de oxígeno y sus valiosas sugerencias.

### Resumen

Se estudia el efecto de la calcitonina sintética de salmón (SCT) en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  por mitocondria aislada de hígado de rata. En presencia de fosfatos se observa una acelera-

ción en el consumo de  $O_2$  inducido por  $Ca^{2+}$ , un acortamiento de los ciclos y una disminución del consumo de  $O_2$  en función de la concentración de calcitonina en el medio. La medida del  $Ca^{2+}$  acumulado durante la respiración demuestra que la velocidad de toma de  $Ca^{2+}$  aumenta rápidamente con la concentración de SCT hasta alcanzar un valor estacionario. En condiciones en las que se ha bloqueado con NEM el movimiento de fosfatos, no se observan cambios en la velocidad de salida de protones del medio al incubar la mitocondria con calcitonina. Sin embargo, un pulso de hormona añadido a mitocondrias ya polarizadas produce una aceleración instantánea en la salida de protones al medio. Estos resultados están de acuerdo con una posible participación de la mitocondria en la acción hipocalcémica de la calcitonina.

#### Bibliografía

1. BORLE, A. B.: *Endocrinology*, **85**, 194-199, 1969.
2. BORLE, A. B.: *J. Membr. Biol.*, **21**, 125-146, 1975.
3. BRAND, M. D., CHEN, C. H. y LEHNINGER, A. L.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 968-974, 1976.
4. CROMTON, M. y HEID, I.: *Eur. J. Biochem.*, **91**, 599-608, 1978.
5. DE LA CRUZ, M. J. y TAMARIT, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **34**, 351-356, 1978.
6. GORNALL, A. G., BARDAWILL, C. J. y DAVID, M. N.: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766, 1949.
7. GOSH, A. K. y CHANCE, B. C.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **138**, 483-492, 1970.
8. HARRELL, A., BINDERMAN, I. y RODAN, G. A.: *Endocrinology*, **92**, 550-555, 1973.
9. LEHNINGER, A. L.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 1520-1524, 1974.
10. MILHAUD, G. y MOUKHTAR, M. S.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **123**, 207-209, 1966.
11. MILHAUD, G., MOUKHTAR, M. S., CHERIAN, G. y PERAULT, A. M.: *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris*, **262**, 511-518, 1966.
12. NORDQUIST, R. E. y PALMIERI, G. M. A.: *Endocrinology*, **95**, 229-237, 1974.
13. REYNAFARJE, B., BRAND, M. D. y LEHNINGER, A. L.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 7442-7451, 1976.
14. REYNAFARJE, B. y LEHNINGER, A. L.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **77**, 1273-1279, 1977.
15. SCHNEIDER, W. C.: *J. Biol. Chem.*, **176**, 259-266, 1948.