

## Efecto de la cafeína en el transporte de $\text{Ca}^{2+}$ en mitocondrias de hígado

M. J. de la Cruz y J. Tamarit

Departamento de Bioquímica y Fisiología II  
Facultad de Medicina  
Universidad Complutense  
Madrid

(Recibido el 9 de febrero de 1978)

M. J. DE LA CRUZ and J. TAMARIT. *Effect of Caffeine on Calcium Transport in Mitochondria From Rat Liver*. Rev. esp. Fisiol., 34, 351-356. 1978.

The influence of caffeine on the calcium transport through membrane has been studied in recently isolated mitochondria from rat liver. Incubated respiring mitochondria in  $1.5 \times 10^{-4}$  M  $\text{Ca}^{2+}$  solutions, show a 2-3 minutes delay in the beginning of calcium uptake in presence of caffeine, independently of the drug concentration ( $5.1 \times 10^{-5}$  M or  $2.5 \times 10^{-4}$  M). At a higher concentration ( $5.1 \times 10^{-4}$  M)  $\text{Ca}^{2+}$  influx is completely inhibited at least during 5 minutes. Ruthenium red stops the influx reaction acting in the same way as in absence of caffeine. A rapid  $\text{Ca}^{2+}$  efflux induced by caffeine is observed in mitochondria with a high calcium content (60-90 nmole/mg protein) that stops when the initial level is reached (15 nmol/mg protein). An accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$  ions in the intracellular media is to be expected due to the presence of caffeine, as it has an inhibition effect on the calcium uptake mechanism of mitochondria and induces the exit of  $\text{Ca}^{2+}$  ions even in a high external calcium concentration ( $10^{-4}$  M).

Se conoce con bastante certeza que la concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior de las células juega un papel importante en el control de su actividad metabólica (1, 13) e influye en procesos de tanta importancia como la secreción (15) o la contracción y relajación de las fibras musculares (12). Recientemente se ha puesto de manifiesto que la mitocondria puede jugar un importante papel en todos los procesos dependientes de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (10) mediante un mecanismo de acumulación que implica consumo de energía

vinculado a la respiración celular (3, 6) y regulado por la presencia de otros iones en muchos casos (5, 14). Por otro lado, se ha demostrado que, en el hígado intacto, el sistema acumulador de  $\text{Ca}^{2+}$  constituido por las mitocondrias es reversible y puede ser capaz de regular los aspectos del metabolismo dependientes de la concentración de estos iones (19).

En relación con el proceso de contracción muscular se ha observado por varios autores (8, 11, 17) un efecto de la cafeína que se ha explicado principalmente por un

aumento en la concentración de calcio en el medio intracelular inducido por la droga que afectaría principalmente al retículo sarcoplásmico (9, 20). Sin embargo, el papel que pueda desempeñar la mitocondria en este tipo de fenómeno y la perturbación debida a la cafeína no está aclarado.

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de la cafeína en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana mitocondrial, utilizando mitocondrias aisladas de hígado de rata con el fin de obtener información sobre el efecto de la droga tanto en la toma como en la salida de calcio.

### Material y métodos

Se han utilizado mitocondrias de hígado de rata aisladas y purificadas, siguiendo el método de CARVALHO GUERRA con algunas modificaciones (4).

Se han empleado ratas Wistar de ambos sexos alojadas en criaderos en condiciones naturales de iluminación y aire acondicionado. Después de 18-24 horas de permanecer en ayunas el animal se decapitó extrayéndosele el hígado rápidamente, para depositarlo en el medio aislante a  $4^\circ\text{C}$  que contenía: sacarosa 0,33 M, EDTA (sal disódica), 0,025 mM, Tris-ClH 15 mM (pH = 7,4). El tejido cortado en pequeños pedazos se homogeneizó en este medio en un tubo de vidrio de pared gruesa con ayuda de un émbolo de teflón unido a un homogeneizador Omnimixer.

Al material homogeneizado se le añadió alúmina activada ( $\approx 0,5$  g) con el fin de adsorber el material lipídico que pudiera haber en el medio y se centrifugó durante 10 minutos a 800 g.

Después de sedimentadas las mitocondrias se lavaron dos veces en sacarosa 0,33 M y se resuspendieron en el medio de incubación: sacarosa 0,33 M, ClK 0,13 M, Tris-HCl 0,02 M (pH = 7). Todas estas operaciones se llevaron a cabo a  $4^\circ\text{C}$ .

*Determinación de la proteína mitocondrial.* Se determinó en todos los casos por el método modificado de BIURET (1) utilizando disoluciones de seroalbúmina bovina cristalizada purísima (Armour Co.) como estándar.

*Realización de los experimentos.* Parte de la mitocondria obtenida se diluye hasta una concentración final perfectamente medida próxima a 0,5 mg/ml de proteína en el medio de incubación. A la suspensión se le añade succinato potásico (concentración final 0,002 M) y se incuba a  $25^\circ \pm 0,1^\circ\text{C}$  en un termostato en condiciones aeróbicas y con agitación moderada durante 10 minutos. A continuación se añade a la muestra  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  concentrado para que la concentración final sea 150  $\mu\text{M}$  y se comienza a medir el tiempo.

Para los estudios cinéticos se extrajeron alícuotas de 2 ml del medio a tiempos medidos y se filtraron en una jeringuilla desechable a través de filtros Millipore (HAWP 01300) con un diámetro de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ , procediendo en cada caso a un lavado rápido del filtro con dos volúmenes de 2 ml de medio de incubación sin calcio.

La mitocondria retenida en los filtros se trató con 1 ml de ácido perclórico al 6% durante un mínimo de 2 horas y el  $\text{Ca}^{2+}$  extraído se determina por espectrofotometría de absorción atómica (Unicam SP 1900).

En algunos experimentos, al cabo de un tiempo determinado de incubación con  $\text{Ca}^{2+}$  se añadió a la muestra cafeína concentrada para tener una concentración final de  $2,57 \times 10^{-4}$  M. En otros casos, se añadió además rojo de rutenio ( $C_{\text{final}} = 0,12 \mu\text{M}$ ) o solamente este compuesto sin cafeína, procediéndose después a sacar alícuotas a tiempos medidos de la suspensión de mitocondrias, como anteriormente.

*Incubaciones en presencia de cafeína.* Parte de la mitocondria se preincubó como

se ha indicado anteriormente en un medio que contenía succinato potásico y se le añadieron cantidades variables de cafeína (purísima «para análisis», Merck), según los casos, para obtener concentraciones en el medio de  $5,15 \times 10^{-5}$ ,  $2,57 \times 10^{-4}$  y  $5,15 \times 10^{-4}$  M, respectivamente.

Una vez incorporada la cafeína al medio se procedió a añadir como anteriormente los iones  $\text{Ca}^{2+}$  comenzándose a medir el tiempo, y siguiendo la misma técnica descrita. En ocasiones se añadió a los 5 minutos de incubación rojo de ruténio, prosiguiéndose la incubación en estas condiciones.

La centrífuga utilizada ha sido Beckman modelo LS-50, y para la determinación de proteína se empleó un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 124.

### Resultados

*Entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria.* Se ha llevado a cabo una serie de experimentos en ausencia de fósforo inorgánico en los que para una concentración exterior

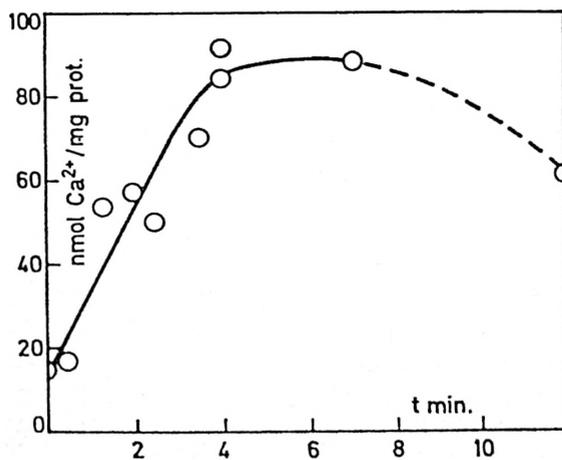


Fig. 1. Variación con el tiempo de incubación del contenido en  $\text{Ca}^{2+}$  de mitocondrias de hepatocitos.

Condiciones iniciales del experimento: 0,5 mg de proteína mitocondrial/ml.  $1,5 \times 10^{-4}$  M  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $2 \times 10^{-2}$  M succinato potásico. Temperatura  $25 \pm 1^\circ \text{C}$ .

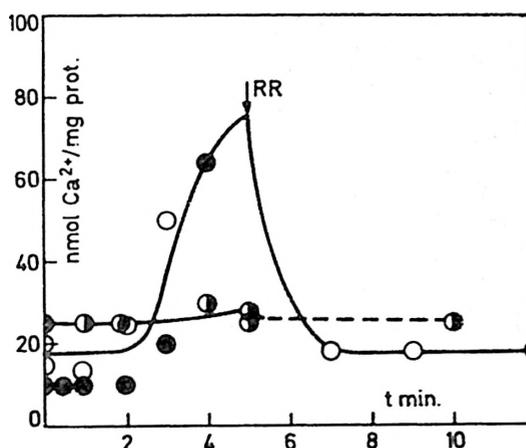


Fig. 2. Variación con el tiempo del contenido en  $\text{Ca}^{2+}$  de mitocondrias de hepatocitos incubadas en presencia de cafeína.

Concentraciones de cafeína: —●—  $5,1 \times 10^{-5}$  M. —○—  $2,5 \times 10^{-4}$  M. —◐—  $5,1 \times 10^{-4}$  M: La flecha indica el momento en que se añadió rojo de ruténio,  $c = 1,2 \times 10^{-7}$  M, en todos los casos. Resto de condiciones como en la figura 1.

inicial  $150 \mu\text{M}$  de ion  $\text{Ca}^{2+}$  se determinó la cantidad de calcio tomado en función del tiempo de incubación, interrumpido por filtración, de una alícuota de mitocondrias que contenía una cantidad medida (0,7-1,2 mg) de proteína.

En todos los casos se determinó el contenido en  $\text{Ca}^{2+}$  de las mitocondrias a tiempo cero, antes de añadir el calcio a la disolución. Los valores obtenidos para nueve determinaciones independientes, dan un promedio de 15 nmoles con una desviación estándar  $\sigma = 6$  nmoles, de  $\text{Ca}^{2+}$  por mg de proteína.

En la figura 1 se observa la variación del contenido en  $\text{Ca}^{2+}$  con el tiempo que alcanza un valor estable máximo de alrededor de 80-100 nmol de  $\text{Ca}^{2+}$  por mg de proteína que se mantiene prácticamente constante entre 4 y 7 minutos obteniéndose valores menores después de los 12 minutos.

En los experimentos realizados en presencia de cafeína se observa un comportamiento cinético distinto. En presencia

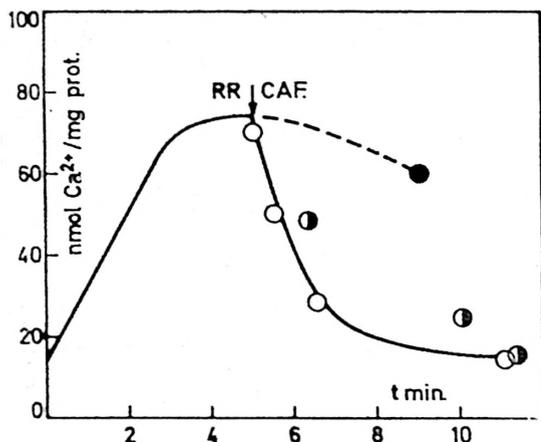


Fig. 3. Variación con el tiempo del contenido en  $\text{Ca}^{2+}$  de mitocondrias de hepatocitos incubadas en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  con adición de distintos compuestos.

—●— rojo de rutenio ( $1,2 \times 10^{-7}$  M), —◐— rojo de rutenio ( $1,2 \times 10^{-7}$  M) y cafeína ( $2,5 \times 10^{-1}$  M), —○— cafeína ( $2,5 \times 10^{-1}$  M). La flecha indica el momento de la adición. Resto de condiciones como en la figura 1.

de concentraciones de cafeína de  $5,15 \times 10^{-5}$  M y  $2,57 \times 10^{-4}$  M existe un cierto tiempo entre 2 y 3 minutos durante el cual la mitocondria no toma cantidades apreciables de iones  $\text{Ca}^{2+}$  observándose a continuación un incremento notable del calcio mitocondrial a los 3-4 minutos de incubación. Si la concentración de cafeína en la disolución de incubación es de  $5,15 \times 10^{-4}$  M no hay entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria incluso después de los 5 minutos (fig. 2).

**Salida del  $\text{Ca}^{2+}$  de la mitocondria.** La figura 3 muestra la pérdida de  $\text{Ca}^{2+}$  experimentada con el tiempo cuando al medio de incubación se añadió cafeína hasta una concentración de  $2,57 \times 10^{-4}$  M o rojo de rutenio ( $c = 0,12 \mu\text{M}$ ) además de la cafeína. Se observa un comportamiento prácticamente igual en los dos casos, con un vaciado del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial que vuelve a los valores iniciales de alrededor de 14 nmoles por mg de proteína en unos 2 minutos, fenómeno que no se observa al añadir solamente el rojo de rutenio que

mantiene durante 4 minutos después de su adición cantidades de 50-60 nmoles de  $\text{Ca}^{2+}$ /mg de proteína.

En los experimentos en los que las mitocondrias se incubaron con cafeína la adición de rojo de rutenio a los 5 minutos produce la salida rápida del  $\text{Ca}^{2+}$  del interior de la mitocondria obteniéndose valores iguales a los medidos antes de iniciar la incubación, a los 2 ó 3 minutos de añadir el rojo de rutenio (fig. 2).

### Discusión

El contenido inicial en  $\text{Ca}^{2+}$  determinado en las mitocondrias aisladas en las condiciones descritas muestra un valor que coincide dentro de los errores experimentales con los obtenidos por otros autores (3). Asimismo, los resultados obtenidos para la toma de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en ausencia de cafeína muestran que las mitocondrias empleadas se encuentran en condiciones de realizar la función acoplada a la respiración de acumular  $\text{Ca}^{2+}$  (3).

Resulta evidente que la presencia de cafeína determina un comportamiento distinto de la mitocondria tanto en la toma como en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio. Sin embargo, existen claras diferencias en el tipo de perturbación introducida en los procesos. En el caso de la toma de  $\text{Ca}^{2+}$  del medio, el proceso de inhibición es dependiente del tiempo y de la concentración, mientras que en la salida se observan resultados comparables a los descritos por CROMPTON *et al.* (5) para la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por iones  $\text{Na}^+$  en mitocondria de corazón.

Este distinto comportamiento confirma la sugerencia de CARAFOLI *et al.* (2) de que el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana mitocondrial interna (7) es un proceso que tiene lugar mediante dos caminos independientes, uno de entrada, inhibido específicamente por bajas concentraciones de  $\text{La}^{3+}$  y rojo de rutenio y otro de salida, que no es afectado por estos inhibidores.

Efectivamente, la presencia de rojo de rutenio no afecta a la salida del  $\text{Ca}^{2+}$ , a menos que exista además cafeína en el medio, aunque está demostrado que detiene o impide la toma en las concentraciones aquí empleadas (8). Hay que señalar que el vaciado del calcio de la mitocondria no es completo y se detiene a niveles muy semejantes en todos los casos a los que tenía inicialmente la mitocondria, lo que indica que este calcio está más fuertemente unido y no participa en los procesos de flujo.

Por otro lado, la presencia de cafeína retrasa el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior durante 2-3 minutos para las concentraciones más pequeñas empleadas; esta inhibición puede ser independiente del tiempo o al menos superior a 5 minutos si la concentración se hace  $5,15 \times 10^{-4}$  M.

Esto sugiere un efecto de la cafeína sobre el sistema molecular receptor-transportador que al menos a las concentraciones más bajas estudiadas no depende aparentemente de la concentración y produce una inhibición dependiente del tiempo, que probablemente se hace total al aumentar la concentración de cafeína. El hecho de que la adición de rojo de rutenio a las mitocondrias ya tratadas con cafeína produzca una detención de la toma de  $\text{Ca}^{2+}$  y permita como consecuencia la liberación de los iones incorporados antes de alcanzarse la saturación de la mitocondria, indica que la acción de la cafeína no es del mismo tipo que la del rojo de rutenio.

Se ha demostrado que el rojo de rutenio se une a una fracción proteica ligada a la membrana (16, 18) que pudiera ser el portador de  $\text{Ca}^{2+}$  o parte del mismo, inhibiendo así la entrada de estos iones (2).

Aunque la comprensión del mecanismo de acción de la cafeína requiere más información experimental, los resultados aquí expuestos demuestran que *in vitro* la presencia de esta droga tiende a aumentar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, incluso a concentraciones del orden de

$1 \times 10^{-4}$  M en  $\text{Ca}^{2+}$ , favoreciendo su paso desde la mitocondria cargada al medio y retrasando o inhibiendo la acumulación por toma del  $\text{Ca}^{2+}$  cuando la concentración de estos iones en el medio sea muy superior a la de reposo en el interior de la célula ( $10^{-8}$ - $10^{-7}$  M) (19).

#### Agradecimientos

Se agradece al alumno interno Manuel García del Valle su valiosa colaboración en la realización de algunos experimentos.

#### Resumen

Se ha estudiado el efecto de la cafeína sobre el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana de mitocondrias aisladas recientemente de hígado de rata. Se observa un retraso de 2 a 3 minutos en la iniciación de la toma de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando la incubación de las mitocondrias en aerobiosis se hace con una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  inicial de  $1,5 \times 10^{-4}$  M y en presencia de cafeína  $5,1 \times 10^{-5}$  ó  $2,5 \times 10^{-4}$  M. A  $5,1 \times 10^{-4}$  M se inhibe totalmente la entrada de calcio, al menos durante 5 minutos. La adición de rojo de rutenio detiene la toma de calcio actuando del mismo modo que en ausencia de cafeína.

La presencia de cafeína en mitocondrias con alto contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  (60-90 nmoles/mg proteína) provoca la liberación del mismo en poco tiempo hasta los niveles iniciales (15 nmoles por mg proteína mitocondrial). En general, el efecto de la cafeína tiende a producir una acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio intracelular, actuando sobre las mitocondrias como inhibidor del mecanismo de toma de  $\text{Ca}^{2+}$  del medio y estimulando el de salida, incluso con concentraciones elevadas de calcio en el medio ( $10^{-4}$  M).

#### Bibliografía

1. BIGRAVE, F. L.: *Nature*, **214**, 667-671, 1967.
2. CARAFOLI, E., GAZZOTTI, P., SCHWEZMANN, K. y NIGLI, V.: En «Calcium Binding Proteins», Academic Press. Nueva York, 1977, págs. 454-468.
3. CARAFOLI, E. y LEHNINGER, A. L.: *Biochem. J.*, **122**, 681-690, 1971.

4. CARVALHO-GUERRA, F.: En «Methods in Enzymology», vol. 31/A. (S. P. Colowick y N. O. Kaplan, eds.). Academic Press, Nueva York, 1974, págs. 299-305.
5. CROMPTON, M., CAPANO, M. y CARAFOLI, E.: *Eur. J. Biochem.*, **69**, 453-462, 1976.
6. CROMPTON, M., SIGEL, E., SALZMANN, M. y CARAFOLI, E.: *Eur. J. Biochem.*, **69**, 429-434, 1976.
7. CHAN, T. L., GREENAWALT, J. W. y PEDERSEN, P. L.: *J. Cell. Biol.*, **45**, 291-305, 1970.
8. ENDO, M.: *Proc. Japan. Acad.*, **51**, 479-484, 1975.
9. HAJDU, S.: *Amer. J. Physiol.*, **218**, 966-972, 1970.
10. JACOBUS, W. E., TIOZZO, R., LUGLI, G., LEHNINGER, A. L. y CARAFOLI, E.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 7863-7870, 1975.
11. MARCO, A. L. y NASTUK, W. L.: *Science*, **161**, 1357-1358, 1968.
12. MARTONOSI, A.: En «Current Topics in Membranes and Transport» (Broner, F. y A. Kleinzeller, eds.). Vol. 3. Academic Press, Londres, 1972, págs. 83-197.
13. RASMUSSEN, H.: *Science*, **170**, 404-412, 1970.
14. REYNAFARGE, B. y LEHNINGER, A. L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 1273-1279, 1977.
15. RUBIN, R. P.: *Pharmac. Rev.*, **22**, 389-428, 1970.
16. SANDRI, G., PANFILI, E. y SOTTOCASA, G. L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**, 1272-1279, 1976.
17. TAYLOR, S. R. y GODT, R. E.: *Symp. Soc. Exper. Biol.*, **30**, 361-380, 1976.
18. UTSUMI, K. y ODA, T.: En «Organization of Energy-Transducing Membranes» (Nakao, K. y L. Packer, eds.). University Park Press, Baltimore, 1974, págs. 265.
19. VAN ROSSUM, G. D. V., SMITH, K. P. y BEETON, P.: *Nature*, Lond., **260**, 335-337, 1976.
20. WEBER, A.: *J. Gen. Physiol.*, **52**, 760-772, 1968.