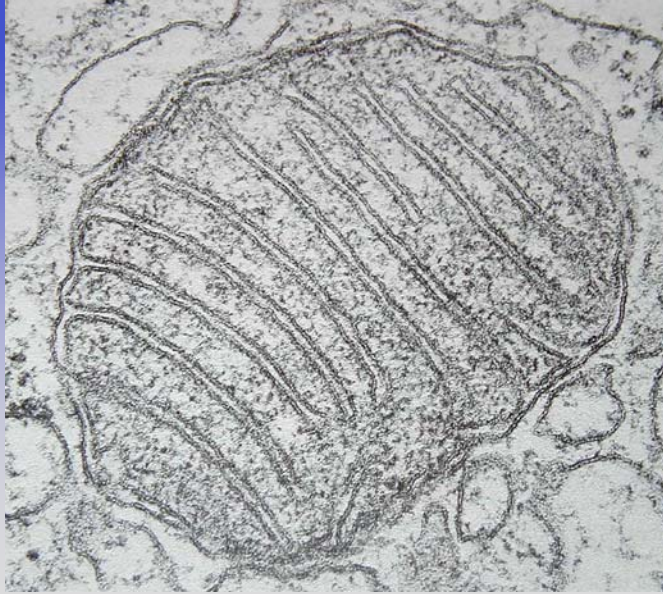


Alteraciones de la función mitocondrial. Importancia del calcio en los mecanismos de toxicidad

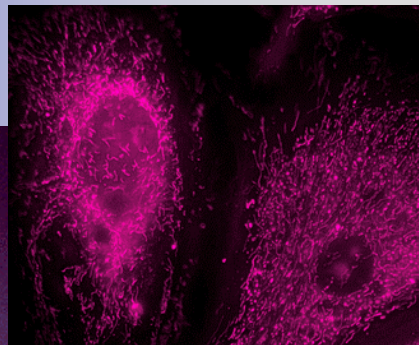
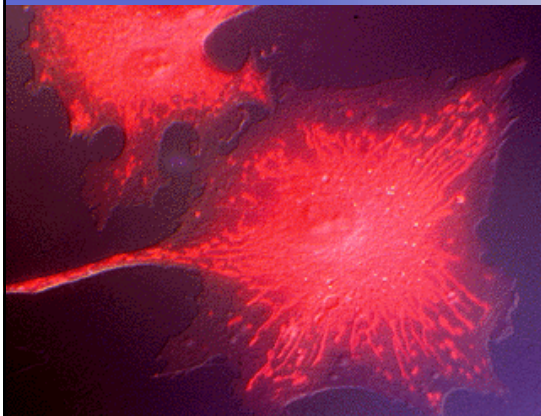
Temas a tratar

- La mitocondria: estructura y función
- El calcio: ubicación y función
- La mitocondria y el calcio
- La mitondria y la muerte celular
- El calcio como desencadenante del efecto tóxico

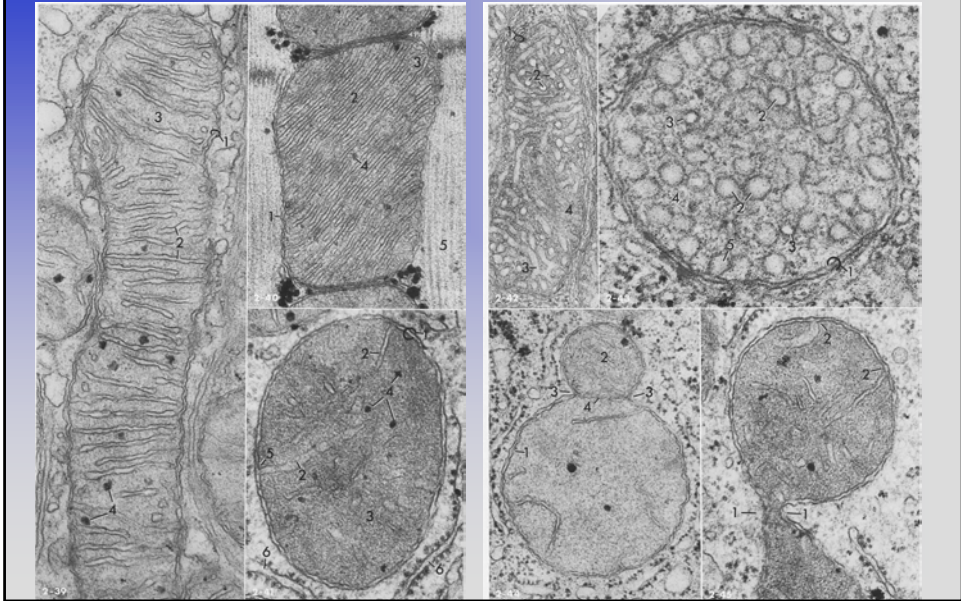
La mitocondria



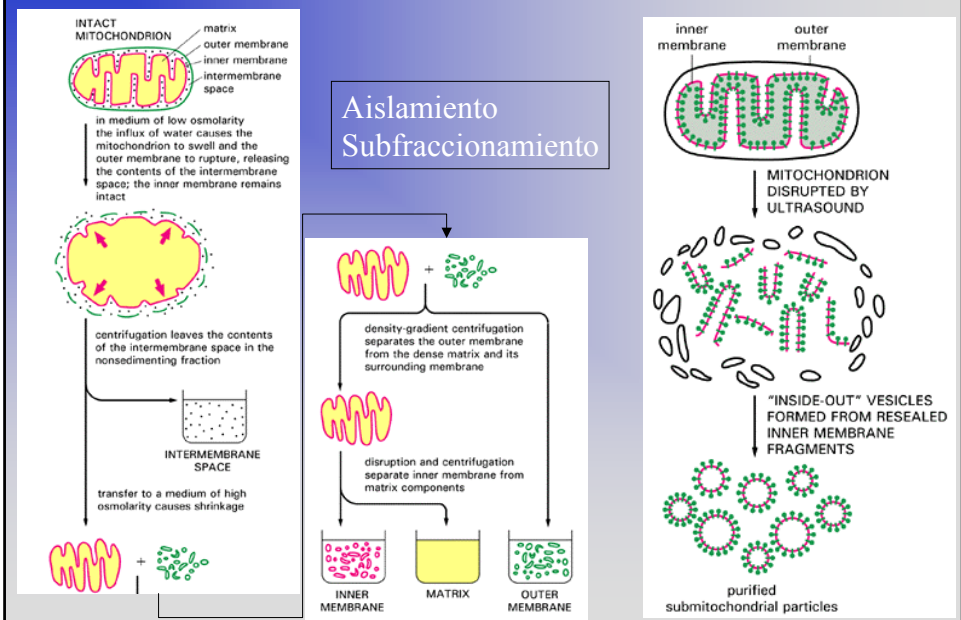
La distribución intracelular de las mitocondrias.



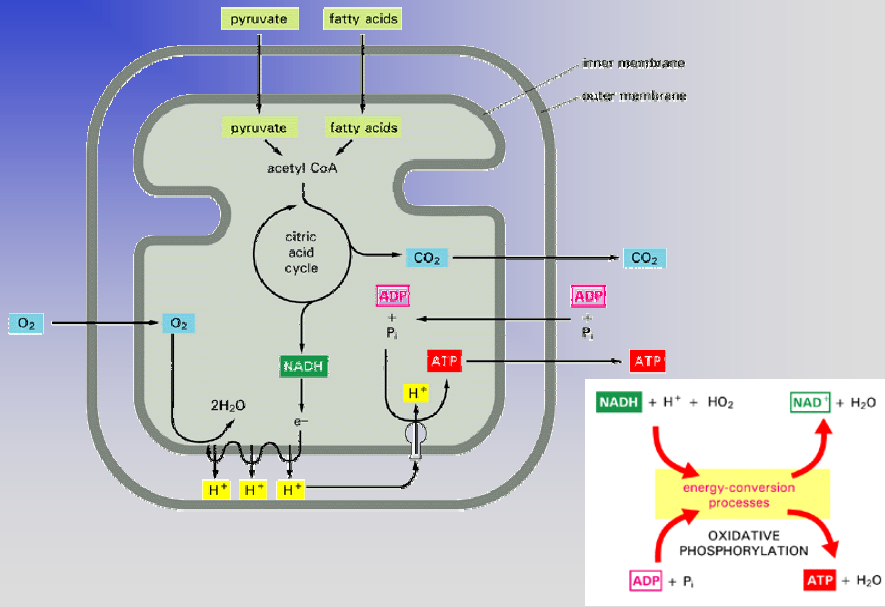
Las mitocondrias tienen morfología heterogénea



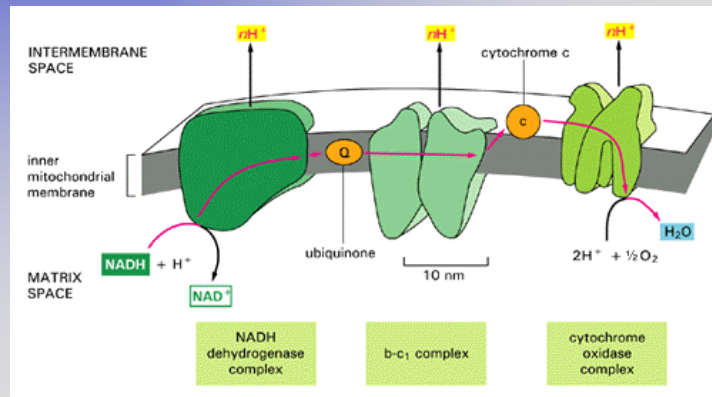
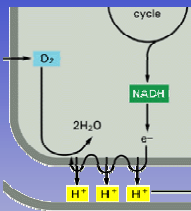
Métodos de estudio de las mitocondrias



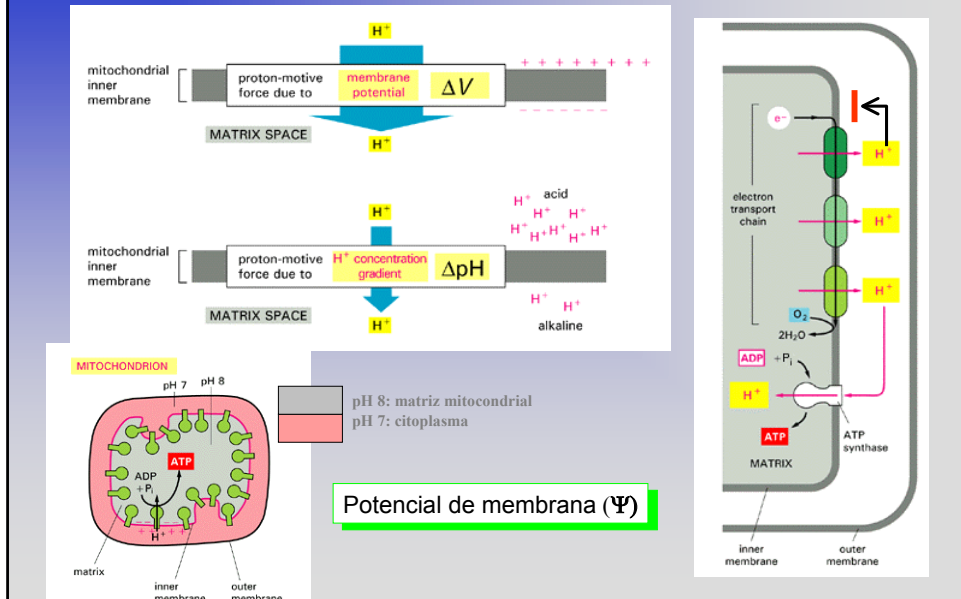
La mitocondria oxida los nutrientes y genera ATP



La cadena de transporte electrónico genera un gradiente de protones



El gradiente electroquímico de protones se utiliza para la síntesis de ATP

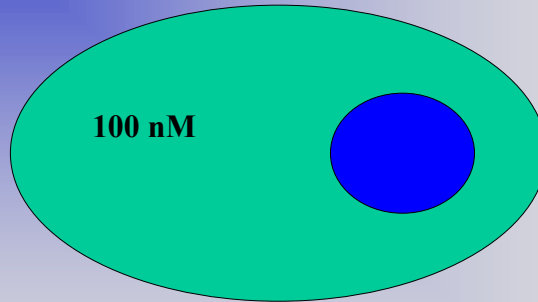


Temas a tratar

- La mitocondria: estructura y función
- El calcio: ubicación y función
- La mitocondria y el calcio
- La mitondria y la muerte celular
- El calcio como desencadenante del efecto tóxico

El calcio intracelular

1-2 mM



100 nM

En condiciones de célula en reposo (“normales”) ...
... las células tienen niveles de Ca^{2+} citosólicos bajos

La célula contiene calcio

Acumulado en orgánulos:

Retículo endoplásmico (calsequestrina)

Mitocondrias

Núcleo

y asociado a proteínas (calmodulina)

Funciones del calcio

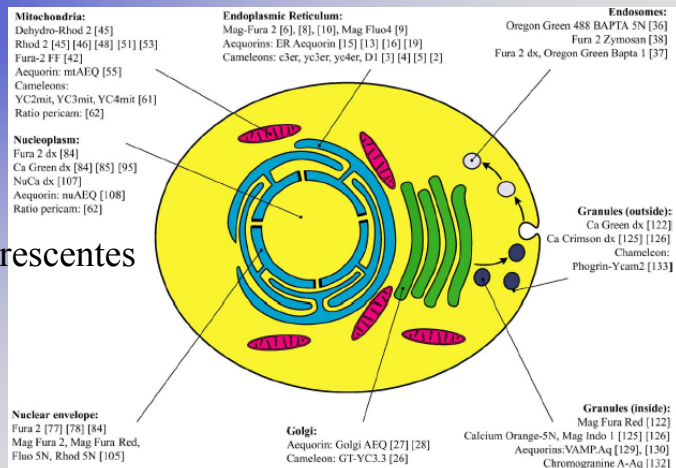
- Contracción muscular
- Reacción cortical tras la fecundación
- Activador de exocitosis (sinapsis, secreción,...)
- Glucogenolisis
- Regulación del citoesqueleto (gelsolina)
- Activador de enzimas catabólicos
- Activador del ciclo de Krebs mitocondrial

Métodos de estudio de los niveles de calcio

Microelectrodos

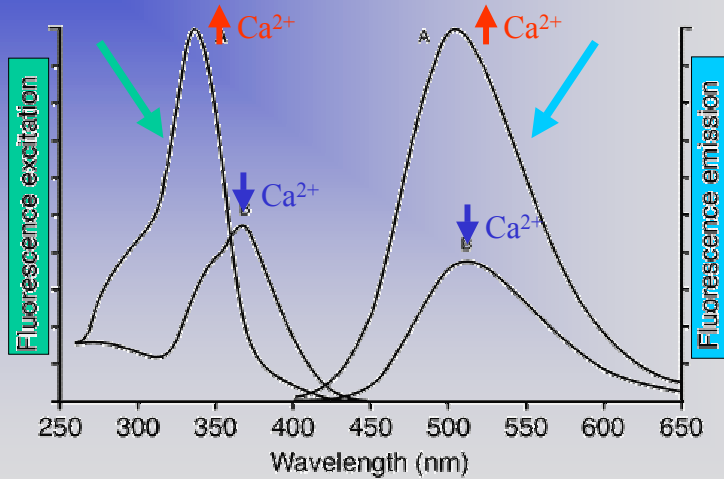
Marcadores fluorescentes

- Aequorin
- Fluo-3
- Fura-2

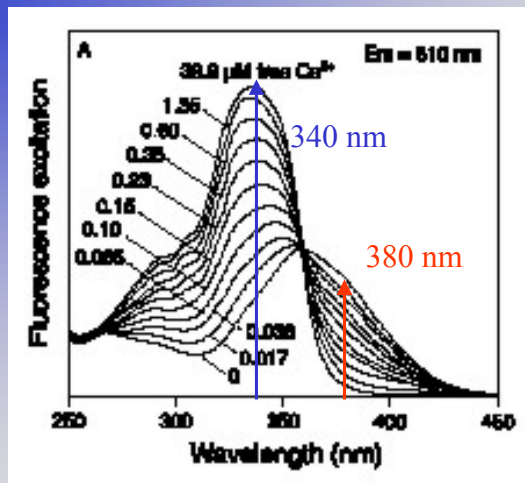


Ejemplo de medición de Ca²⁺: Fura 2

Molécula con espectros distintos: presencia/ausencia de Ca²⁺



Medida de la concentración de Ca²⁺ con ratios

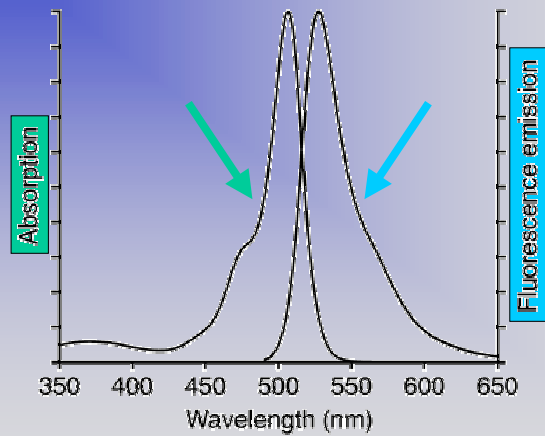


(Menos interferencias, más sofisticado)

$$[Ca^{2+}]_i = Kd Q \frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)}$$

Ejemplo de medición de Ca²⁺: Fluo-3

Molécula con un espectro único: presencia/ausencia de Ca²⁺



Medida del calcio intracelular con Fluo-3

Fluo-3-AM: permeable a membranas, no fluorescente en el citoplasma, las esterasas liberan Fluo-3

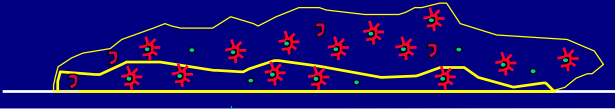
Se incuban las células durante 30 min, a 37°C

Se mide la fluorescencia y se calibra con F_{\max} y F_{\min}

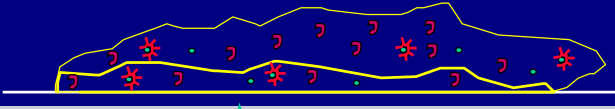
$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \left(\frac{F - F_{\min}}{F_{\max} - F} \right)$$

Medida del calcio intracelular

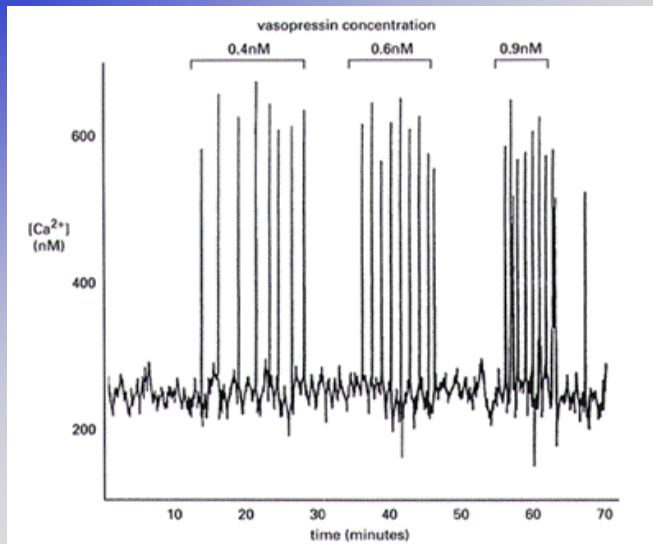
ALTERADA



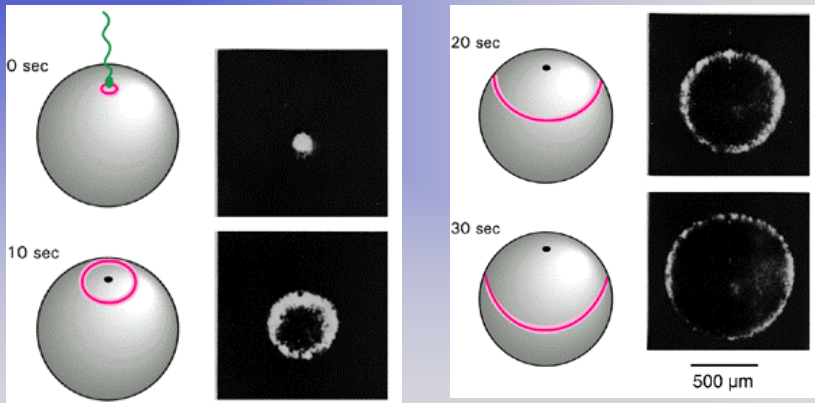
NORMAL



Los cambios de la $[Ca^{2+}]$ son rápidos y transitorios

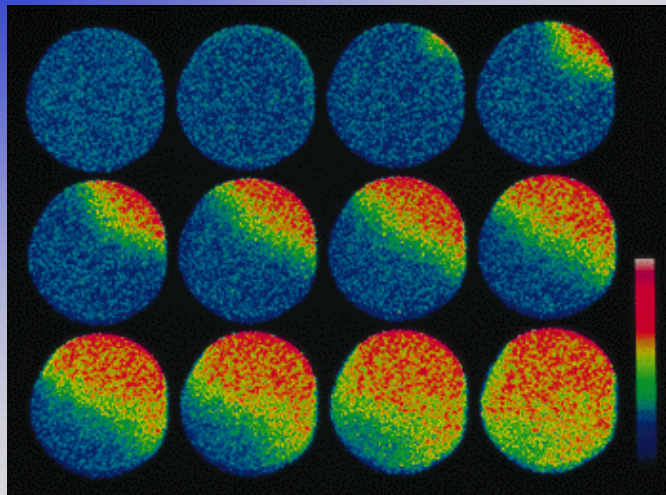


Los cambios de la $[Ca^{2+}]$ son locales



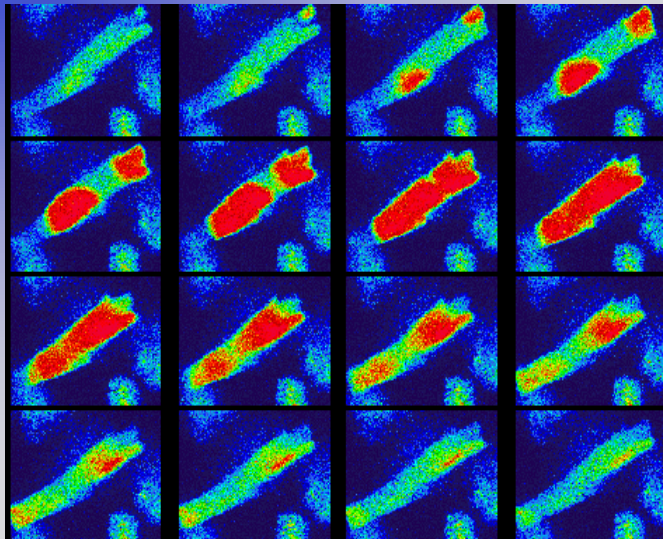
aequorin

Onda de calcio tras la fecundación

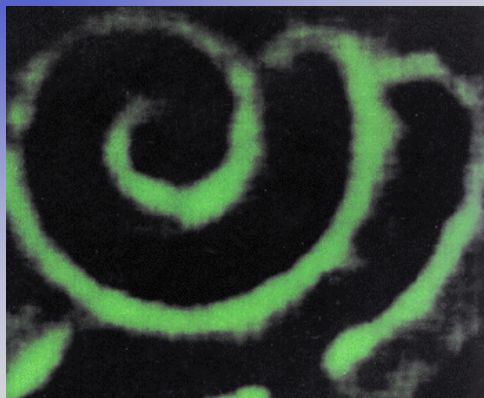


Calcium-green, $t = 5$ seg

Distribución del Ca^{2+} durante la
contracción celular



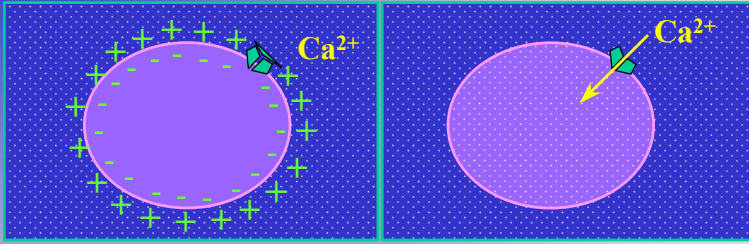
Onda de calcio tras inyección de un
análogo de IP_3



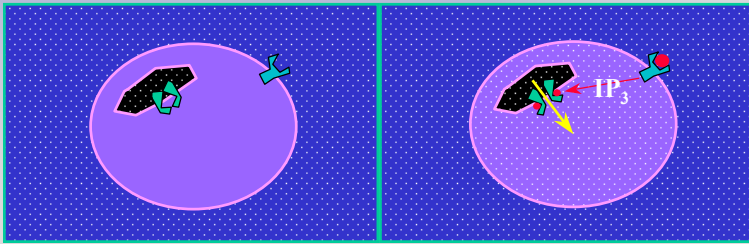
Fluo-3

Entrada de calcio al citosol

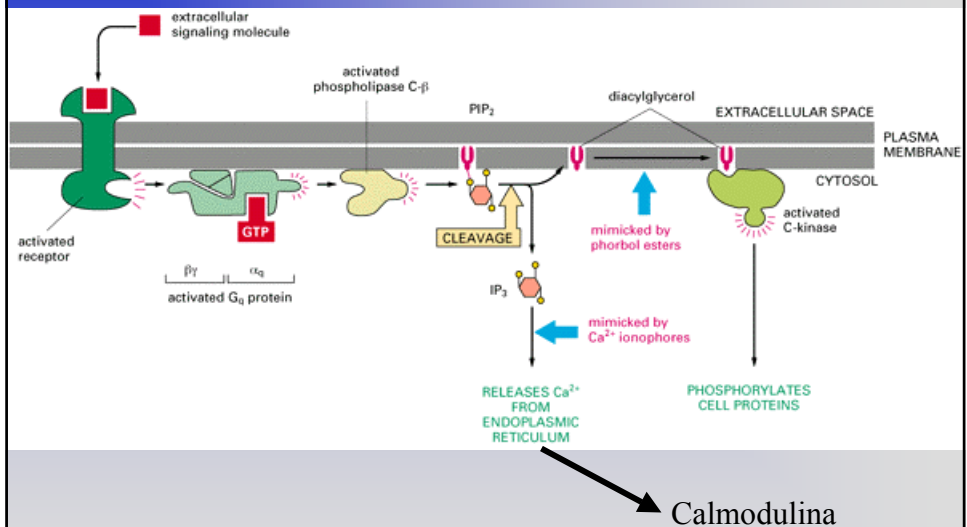
Canales dependientes de voltaje de la membrana plasmática



Canales dependientes de ligando del retículo endoplásmico



El Inositol-tri-fosfato (IP_3)



PIP_2 =fosfatidil inositol bi-fosfato

Temas a tratar

La mitocondria: estructura y función
El calcio: ubicación y función
La mitocondria y el calcio
La mitondria y la muerte celular
El calcio como desencadenante del efecto tóxico

La mitocondria y el calcio

La mitocondria tiene poca afinidad por el calcio

La mitocondria acumula calcio si hay mucha concentración

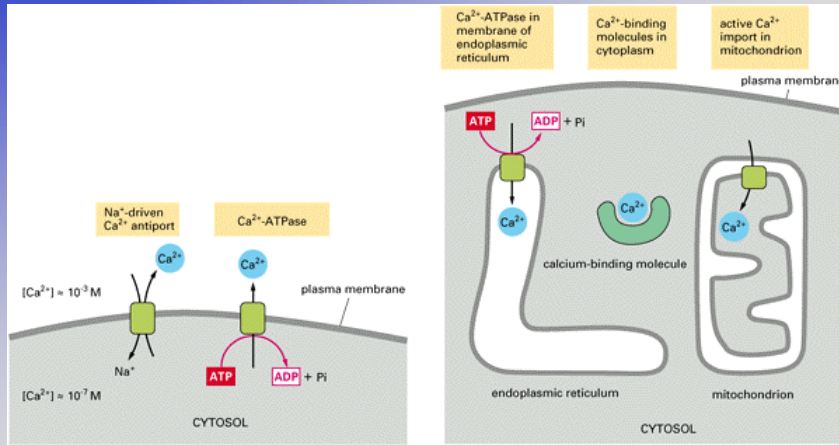
Existe mucha concentración de Ca^{2+} en las proximidades del RE

La entrada de calcio reduce el potencial de membrana (Ψ)

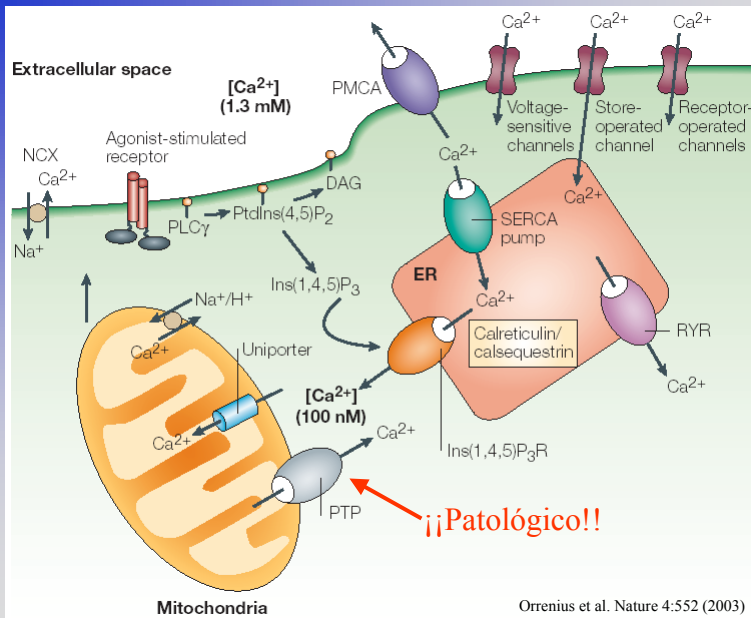
La consecuencia es reducción de la síntesis de ATP

Un aumento sostenido o elevado puede provocar disfunción y apoptosis o necrosis

Aclaramiento del calcio citoplásmico



El calcio del citosol, retículo y mitocondria



Utilización de marcadores de orgánulos

En las mitocondrias, se usan marcadores que dependen de su potencial de membrana (Ψ)

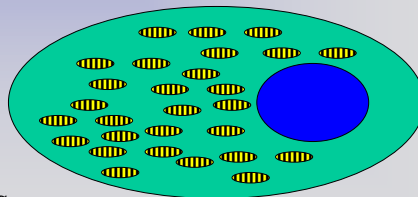
- Fluorocromos que atraviesan o no membranas \rightarrow AM
- se disipan desde las células o se acumulan
- deben llegar a un equilibrio
medio \leftrightarrow citoplasma \leftrightarrow orgánulo
- fotografía (cuantificación) vs dinámica

Medida del potencial de membrana mitocondrial

Rodamina 123: se distribuye según el potencial de membrana

Se incuban 5 min con rodamina 1 μ M

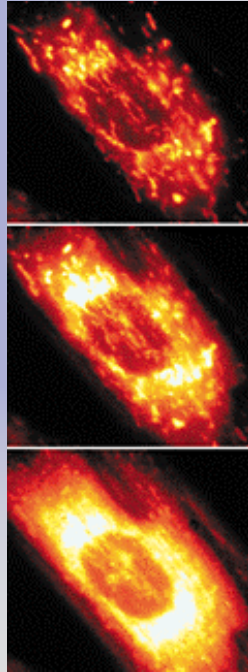
$$\Delta\Psi = 59 \ln \left(\frac{[R123]_{in}}{[R123]_{ex}} \right)$$



En condiciones normales ...

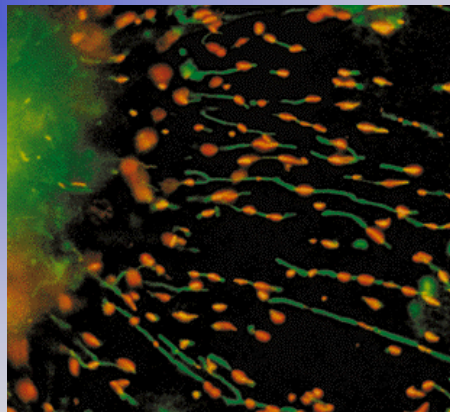
... las células tienen el potencial de membrana mitocondrial elevado

Marcaje de mitocondrias



Rodamina 123

Marcaje de mitocondrias con JC-1



Verde= bajo potencial de membrana mitocondrial, monomérico
Naranja= elevado PMM, agregado

Biochemistry 30, 4480 (1991)

Temas a tratar

La mitocondria: estructura y función

El calcio: ubicación y función

La mitocondria y el calcio

La mitocondria y la muerte celular

El calcio como desencadenante del efecto tóxico

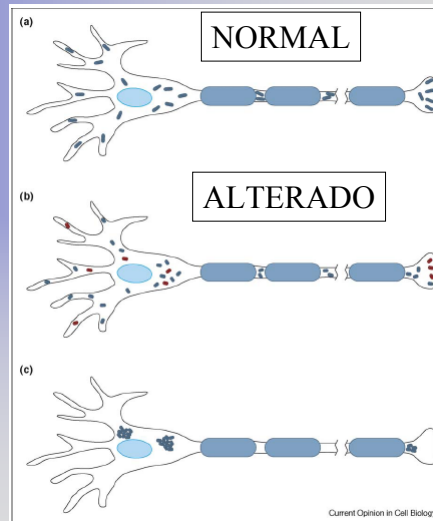
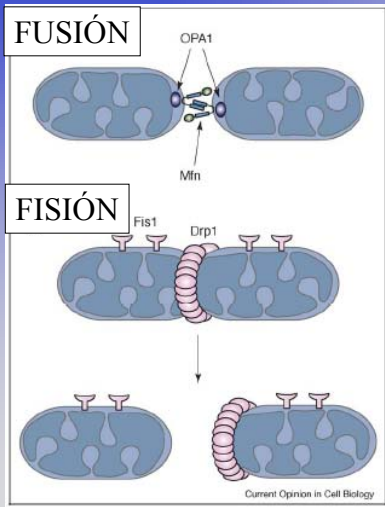
Enfermedades neurodegenerativas relacionadas con alteraciones mitocondriales

Table 1

Mitochondrial proteins mutated in neurodegenerative diseases

Disease	Gene	Function
Charcot-Marie-Tooth type 2A	Mfn2	Mitochondrial fusion
Charcot-Marie-Tooth type 4A	GDAP1	Mitochondrial dynamics/fission?
Dominant optic atrophy	OPA1	Mitochondrial fusion and cristae structure
Recessive optic atrophy	OPA3	Unknown
Lebers' hereditary optic neuropathy	ND genes in mtDNA	Oxidative phosphorylation
Hereditary spastic paraplegia	Paraplegin	Mitochondrial ATPase/protease
Hereditary spastic paraplegia	HSP60	Mitochondrial heat shock protein
Familial amyotrophic lateral sclerosis	SOD1	Superoxide dismutase
Familial Parkinson's	PINK1	Mitochondrial serine/threonine kinase
Friedreich's ataxia	Frxataxin	Formation of iron-sulfur clusters in mitochondria

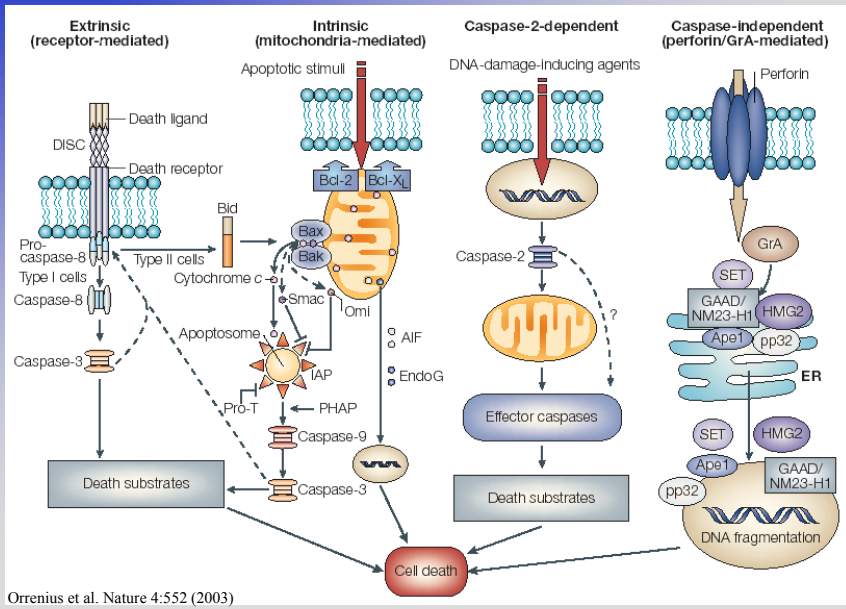
La disfunción celular mitocondrial puede estar relacionada con la dinámica mitocondrial



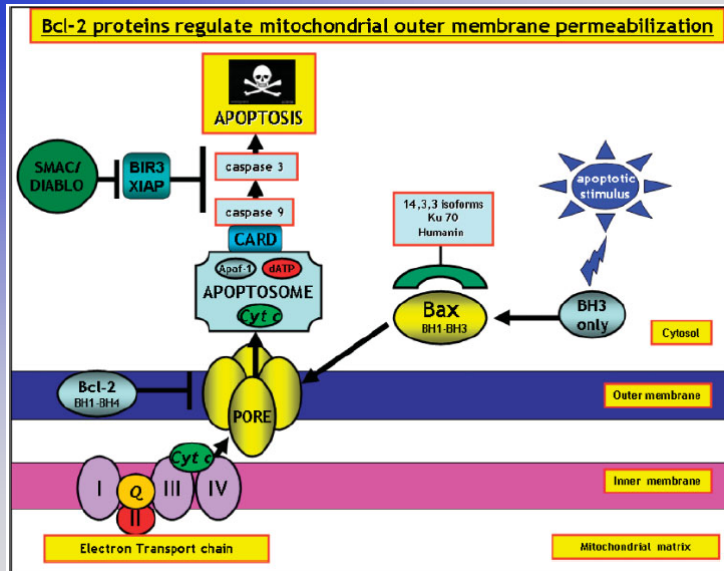
Chen et al. 2006. Curr.Op.Cell.Biol. 18:1-7

La mitocondria puede desencadenar la muerte celular por necrosis o por apoptosis

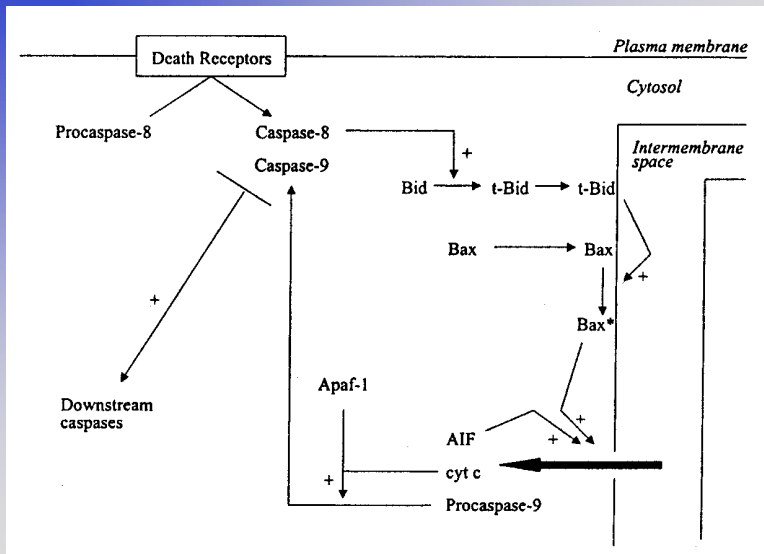
Rutas de señalización de la apoptosis



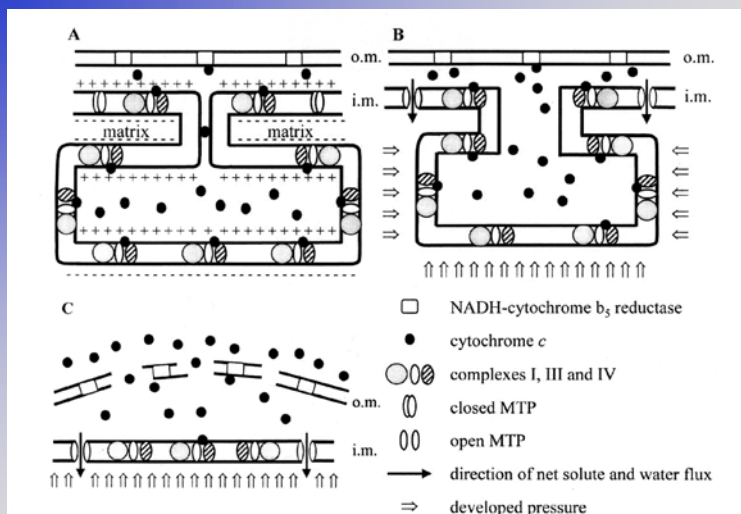
La mitocondria y la apoptosis



La mitocondria activa la apoptosis mediante la liberación de citocromo c



La liberación del citocromo c

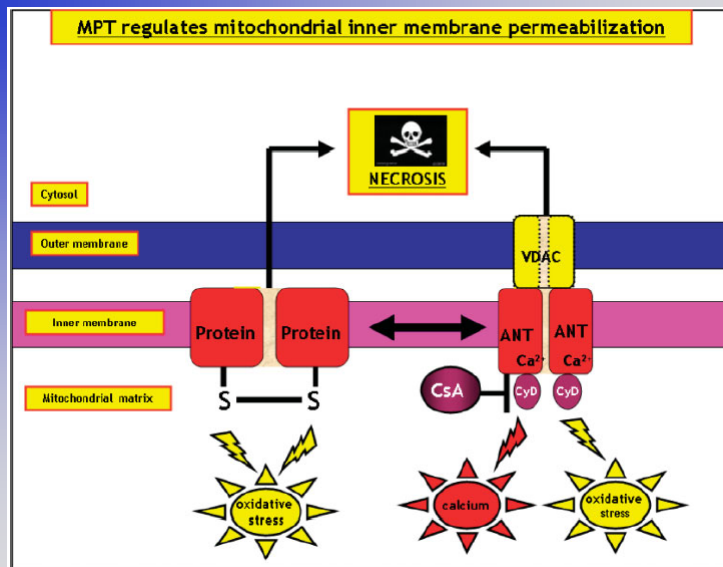


cardiolipina—citocromo c + ROS = cardiolipina + citocromo c

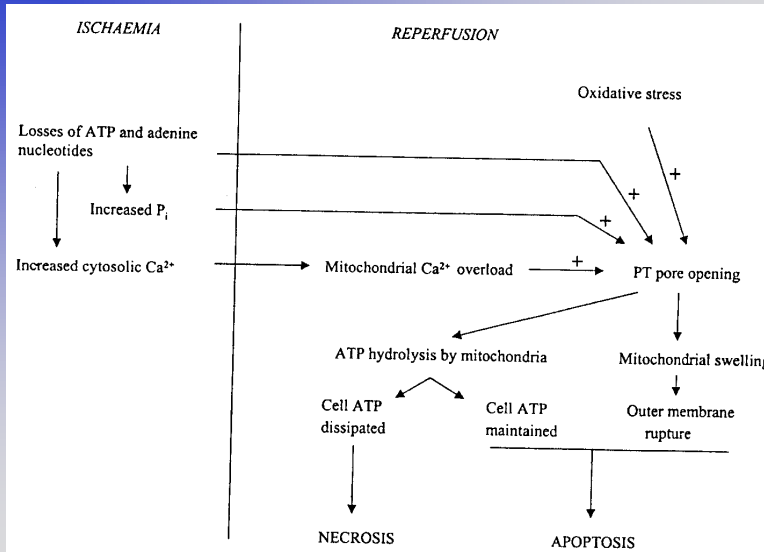
Alteración de la membrana mitocondrial externa

- por unión de proteínas BCL, que al unirse al VDAC generan un poro
 - la mitocondria no pierde su integridad total
 - liberación parcial de citocromo c
 - por hinchamiento de la membrana mitocondrial interna y formación del PTP
 - la mitocondria pierde su integridad
 - liberación total de citocromo c
- no todas las mitocondrias de la célula se afectan de la misma forma (=efecto localizado)

La mitocondria y la necrosis

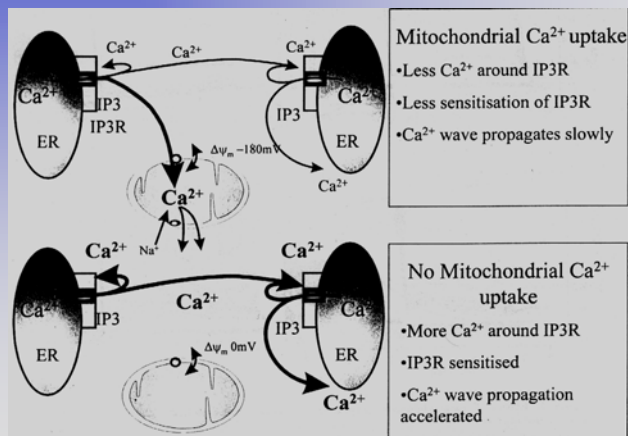


La aparición del Permeability Transition Pore



Paradoja

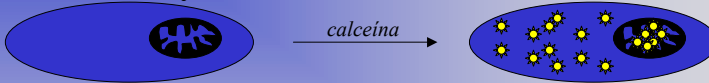
- el exceso de Ca^{2+} citosólico provoca su acumulación en la mitocondria
 - el exceso de Ca^{2+} mitocondrial provoca caída $\Delta\Psi$
 - la caída de $\Delta\Psi$ provoca muerte celular
- si la mitocondria está despolarizada no hay muerte celular



Protocolo para estudiar la formación del PTP con calceína

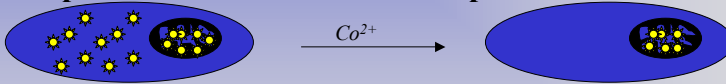
la calceína se distribuye entre citoplasma y mitocondria

- se une a Ca^{2+} y emite fluorescencia



- se incuban las células con Co^{2+}

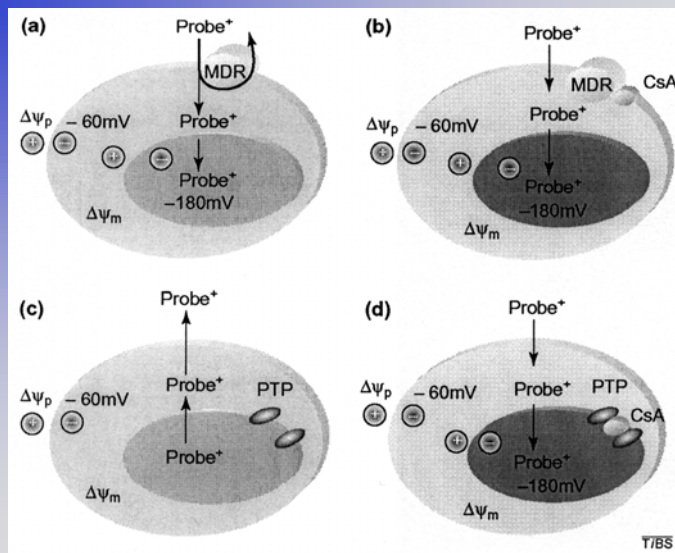
- desaparece fluorescencia en el citoplasma



Si se forma el PTP sale calceína al citoplasma y se mide

Con Ciclosporina-A no se libera calceína

Fuentes de error: Multi Drug Resistance Protein



Temas a tratar

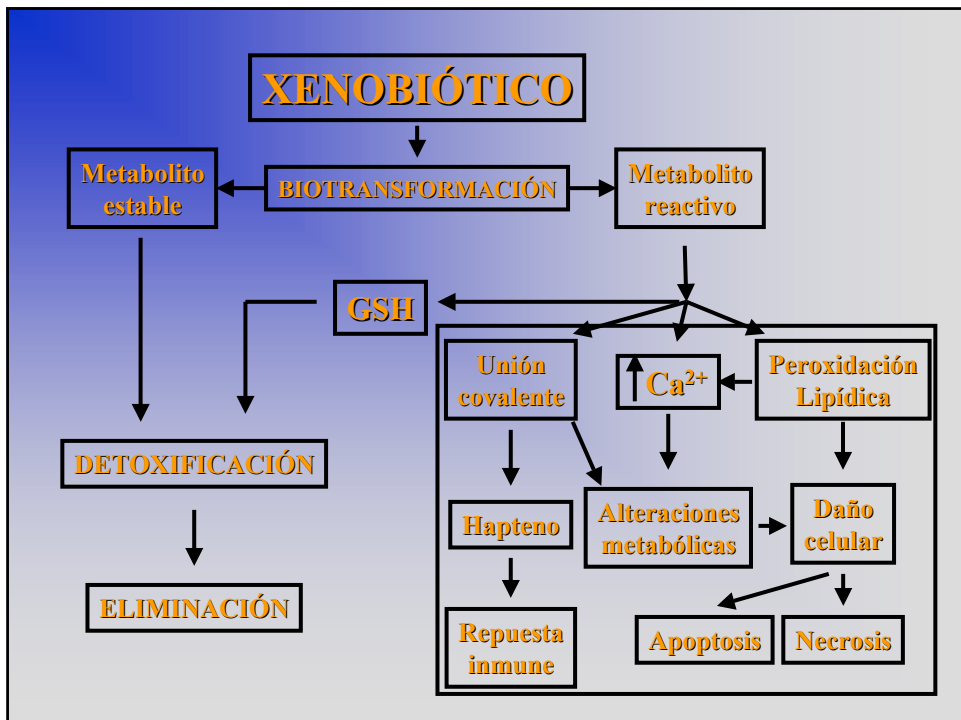
La mitocondria: estructura y función

El calcio: ubicación y función

La mitocondria y el calcio

La mitocondria y la muerte celular

El calcio como desencadenante del efecto tóxico



El verdadero papel del calcio

¿Causa o efecto?

Incubaciones en: ausencia de calcio
 presencia de quelantes (Ca, ..., Mg, Fe)

Aumento de la concentración de calcio:
 efecto primario o tardío
 evitarlo previene la toxicidad

Toxicidad de la cocaína, papel del calcio

La toxicidad de la cocaína depende
de la su metabolización

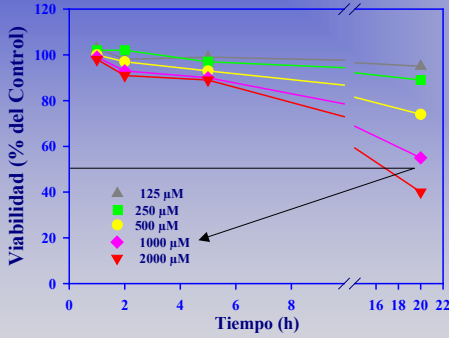
Tratamiento con fenobarbital *in vivo*



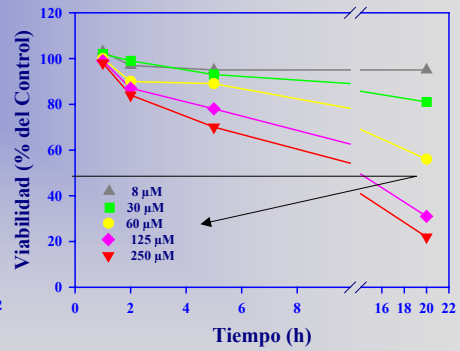
Aumento Retículo Endoplásmico Liso
Aumento metabolización de cocaína

Diferente sensibilidad de los hepatocitos a la cocaína

Rata Control



Rata con Fenobarbital

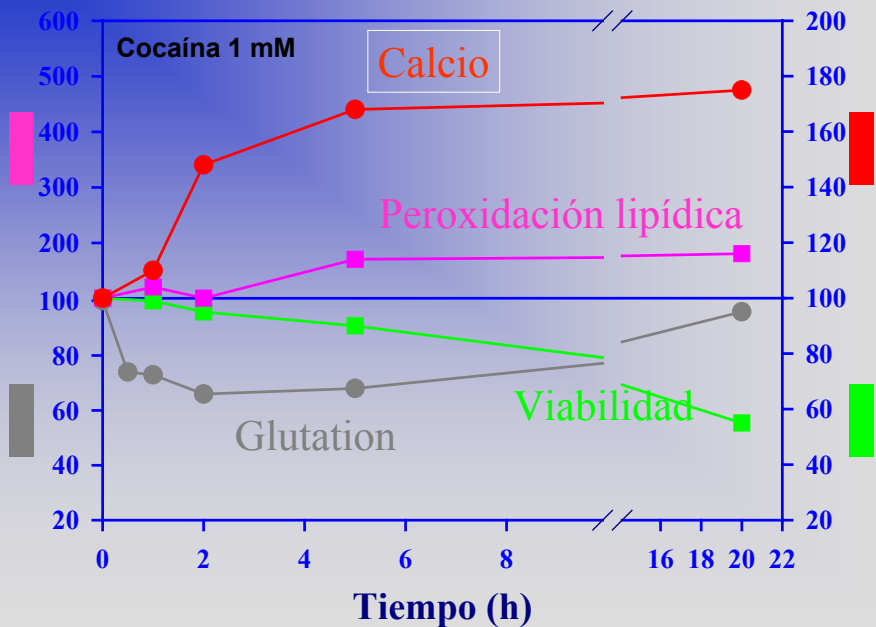


1 mM

vs

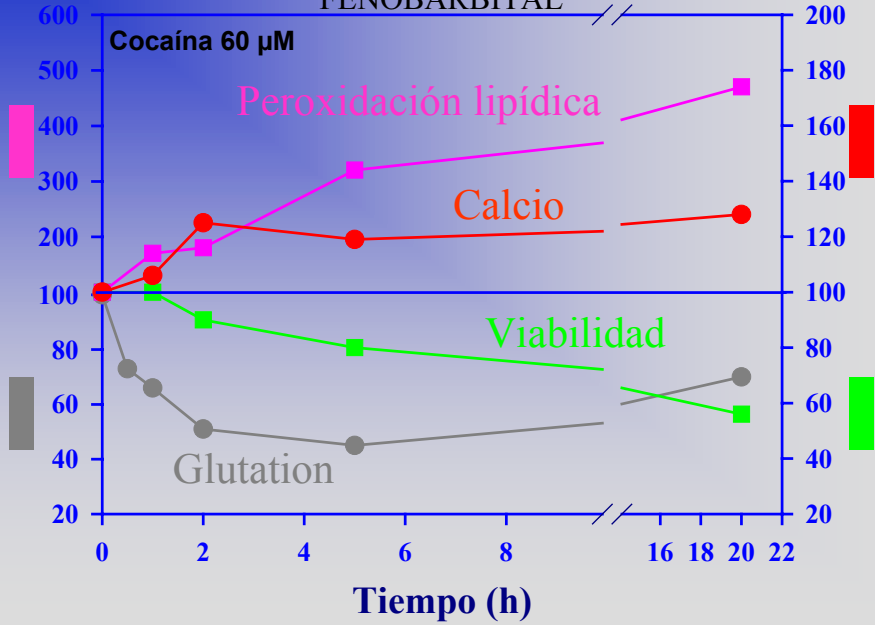
60 μM

Mecanismos de toxicidad en rata control



Mecanismos de toxicidad en rata tratada

FENOBARBITAL



El papel del calcio en la toxicidad

