

UCH-FC
DDC-Q
F 383

EFFECTOS NUTRICIONALES SOBRE LA BIOENERGETICA MITOCONDRIAL.
Alteraciones sobre los Procesos de Fosforilación Oxidativa
e Incorporación de Ca^{+2} en Mitocondrias de Hígado de Rata.

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Bioquímica

Facultad de Ciencias

Básicas y Farmacéuticas

por

Jorge Federico Ferreira Parker

Octubre, 1984

01-020 1772

Profesor patrocinante: Dr. Lionel Gil H.





Esta tesis fue realizada en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, División de Ciencias Médicas Norte, de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Lionel Gil H. Contó con el patrocinio de este Departamento, que dirige el Dr. Lionel Gil, del cual el autor de esta tesis es miembro académico.

FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS Y FARMACEUTICAS

UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

Jorge Federico Ferreira Parker

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el grado de Doctor en Bioquímica, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 31 de Agosto de 1984.

Patrocinante de Tesis
Dr. Lionel Gil H.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Lionel Gil H.", written over a horizontal line.

Comisión Informante de Tesis

Dr. Osvaldo Cori M. (Presidente)

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Osvaldo Cori M.", written over a horizontal line.

Dr. Miguel Bronfman A.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Miguel Bronfman A.", written over a horizontal line.

Dr. Octavio Monasterio O.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Octavio Monasterio O.", written over a horizontal line.



A aquellos que con su
cariño y comprensión dan
un sentido a mi vida:

Tammy,

Jorge Ignacio

y mis padres



Cuando miramos retrospectivamente, la evolución de las ideas y del conocimiento, al igual que la evolución orgánica, tiende a dirigirse a una lógica falsa y de apariencia inevitable. Pero, como sucede realmente, la búsqueda de la verdad por medio del análisis de conceptos imaginarios en contraste con la realidad está sujeto a ser una aventura incierta y arriesgada ocasionando desengaños así como también sorpresas agradables.

K.P. Popper

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este trabajo, quiero expresar mis agradecimientos a las personas que de una u otra forma hicieron posible que esta Tesis fuera una realidad. En forma muy especial deseo destacar a:

Dr. Lionel Gil, por las facilidades de toda clase otorgadas, su crítica honesta y acertada, ayuda en la revisión de los escritos y estímulo.

Dr. Antonio Morello y a sus colaboradores: Yoly, Jorge y María Eugenia por el generoso y constante estímulo, facilidades y confianza que me brindaron durante todo el desarrollo de este trabajo.

Sra. Inés Salazar M.S. por su valiosa e inagotable ayuda en la redacción de los escritos.

Dra. Catherine Connelly por su ayuda en la revisión de los escritos.

Srta. Patricia Donoso por su generosa y gran paciencia durante la transcripción mecanográfica de este trabajo.

Sr. José Mondaca por su dedicación en la confección de las figuras y esquemas.

A mis padres Manuel y Gabriela, que con su cariño, comprensión y paciencia me ayudaron a superar momentos difíciles.

INDICE DE MATERIAS

	Pág.
LISTA DE TABLAS.....	V
LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT.....	XIV
INTRODUCCION	1
A. BREVE HISTORIA DE LA BIOQUIMICA DE LAS MITOCONDRIAS.....	2
a) <i>Los Comienzos: Primeras Observaciones Citológicas de las Mitocondrias en la Célula</i>	2
b) <i>Identificación de las Mitocondrias como Sitio de la Respiración Intracelular</i>	4
c) <i>Reconocimiento de las Mitocondrias como un Sistema Osmótico</i>	6
d) <i>El descubrimiento de los Componentes de la Cadena Respiratoria</i>	8
e) <i>La Naturaleza de la Conservación de la Energía</i>	12
B. CONSTITUCION DE LA CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES.....	25
C. EL TRANSPORTE DE EQUIVALENTES REDUCTORES A TRAVES DE LA CADENA RESPIRATORIA.....	28
D. LA FOSFORILACION DEL ADP.....	33
E. TRANSPORTE DE Ca^{+2} EN MITOCONDRIAS	37
F. EFECTOS NUTRICIONALES SOBRE LAS FUNCIONES DE LAS MITOCONDRIAS	40
G. PROPOSITOS DE ESTE ESTUDIO.....	44
H. PRINCIPALES RESULTADOS.....	46
MATERIALES Y METODOS	47
I. MATERIALES	47
A. MATERIAL BIOLÓGICO	47
B. REACTIVOS	47

II. METODOS.....	49
A. TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES Y DIETAS.....	49
a) <i>Grupo con Desnutrición Energética-Proteica Drástica (DEPD)</i>	50
b) <i>Grupo Normal</i>	50
B. PREPARACION DE MITOCONDRIAS.....	50
C. PREPARACION DE PARTICULAS SUBMITOCONDRIALES	52
D. DETERMINACION DE: CONSUMO DE OXIGENO, MOVIMIENTO DE PROTONES E INCORPORACION DE ION Ca^{+2} EN MITOCONDRIAS INTACTAS.....	55
a) <i>Consumo de Oxígeno</i>	55
b) <i>Movimiento de H^+</i>	55
c) <i>Incorporación de Ión Ca^{+2}</i>	56
E. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD NADH OXIDASA.....	56
F. ACTIVIDAD ADENOSINA TRIFOSFATASICA	57
G. VELOCIDAD DE HINCHAMIENTO DE LAS MITOCONDRIAS.....	59
H. DETERMINACION DEL CONTENIDO DE CITOCROMOS.....	59
I. INCORPORACION DE ^{14}C -ADP A MITOCONDRIAS.....	60
J. DETERMINACION DEL CONTENIDO DE PROTEINAS.....	62
K. ANALISIS ESTADISTICO	62
III. RESULTADOS.....	64
A. PESO CORPORAL, PESO HUMEDO DEL HIGADO, INGESTA DE ALIMENTO Y CONTENIDO DE PROTEINA MITOCONDRIAL DEL HIGADO.....	64
B. ALTERACIONES EN LA FOSFORILACION OXIDATIVA.....	65
a) <i>Actividades Oxidativas</i>	65
1. Efecto de Rotenona y Antimicina A sobre las Velocidades de Oxidación de Diferentes Sustratos en Mitocondrias Desacopladas con CCCP.....	65
2. Estimulación de la Velocidad de Oxidación de Succinato por ADP.....	72
3. Estimulación de la Velocidad de Oxidación de Diferentes Sustratos por ADP.....	74
4. Actividad NADH Oxidasa.....	77
b) <i>Determinación del Contenido de Citocromos</i>	77
c) <i>Sistema de Transporte de ADP-ATP</i>	81

d) Actividad Adenosina Trifosfatásica por el Complejo F_0F_1 -ATPasa en Mitocondrias Intactas.....	81
1. Efecto de la DEPD en la Actividad Adenosina Trifosfatásica.....	81
2. Estudios de las Condiciones Optimas de Activación del Complejo F_0F_1 -ATPasa	88
2.1. Efecto de succinato y KCl sobre la Actividad Adenosina Trifosfatásica activada por CCCP.....	88
2.2. Efecto de las Concentraciones de Diferentes Iones Monovalentes sobre la Actividad Adenosina Trifosfatásica activada por CCCP.....	91
2.3. Efecto de la Concentración de KCl sobre la Velocidad de Hinchamiento de las Mitocondrias Intactas.....	91
2.4. Estudio de Algunos Factores que Alteran la Actividad ATPasa de Mitocondrias Intactas activada por CCCP.....	94
2.5. Efecto de la Concentración de KCl y NaCl sobre la Actividad Adenosina Trifosfatásica Estimulada por CCCP en Mitocondrias Intactas Suspendidas en LiCl.....	99
2.6. Efecto de las Concentraciones de CCCP y FCCCP sobre la Actividad Adenosina Trifosfatásica Estimulada por KCl.....	101
C. ALTERACIONES EN EL PROCESO DE INCORPORACION DE Ca^{+2}	104
a) Estimulación de la Oxidación de Succinato por Ca^{+2} en Mitocondrias de Hígado de Ratas Normales y con DEPD.....	104
b) Estimulación de las Velocidades de Oxidación de Glutamato, Succinato y Ascorbato + TMPD por Ca^{+2}	106
c) Razón de Control Respiratorio de Ca^{+2} , y Razones: $Ca^{+2}/sitio$ y $H^+/sitio$	106
d) Efecto de la Concentración de Ca^{+2} sobre su Velocidad de Incorporación y su Estequiometría Durante las Oxidaciones de Glutamato y Succinato.....	109
e) Capacidad de las Mitocondrias de Hígado de Rata para Acumular Ca^{+2}	117
f) Preferencia de la Incorporación de Ca^{+2} sobre la Fosforilación Oxidativa en la Utilización de Energía que Proviene de la Oxidación de Sustratos.....	120
g) Determinación de las Razones $Ca^{+2}/sitio$, $H^+/sitio$ y H^+/Ca^{+2} en Mitocondrias de Hígado en Presencia de NEM y en Ausencia de Fosfato.....	124

DISCUSION.....	129
A. Fosforilación Oxidativa.....	130
a) Actividades Oxidativas.....	130
b) Etapa Limitante de la Fosforilación Oxidativa.....	132
c) Incremento de la Actividad Adenosina Trifosfatásica.... por Cationes Metálicos Monovalentes.....	138
B. Alteraciones en la Incorporación de Ca ⁺² en..... Mitocondrias por DEPD.....	144
BIBLIOGRAFIA.....	148

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla I.	Composición porcentual de los ingredientes de la dieta sin proteínas..... 51
Tabla II.	Cambios de los coeficientes de extinción mM de los espectros diferenciales (reducido contra oxidado) de los citocromos de la cadena respiratoria..... 61
Tabla III.	Efectos de la Desnutrición Drástica sobre el Peso Corporal, Peso Húmedo del Hígado, Ingesta de Alimentos y el Contenido de Proteínas Mitocondrial..... 66
Tabla IV.	Velocidades de Oxidación de Glutamato, Succinato y Ascorbato + TMPD por Mitocondrias de Hígado de Ratas..... 75
Tabla V.	Indices de Control Respiratorio, Razones ADP/O y Velocidad de Síntesis de ATP..... 76
Tabla VI.	Contenido de Citocromos de Mitocondrias de Hígado de Ratas..... 80
Tabla VII.	Efecto de CCCP y ATP en la velocidad de hinchamiento de mitocondrias..... 96
Tabla VIII.	Efecto de KCl, succinato, Mg^{+2} , Ca^{+2} , y de inhibidores de: la respiración, el transporte de nucleótidos y la actividad de hidrólisis de ATP sobre la actividad F_1 -ATPasa de mitocondrias de hígado de ratas..... 97
Tabla IX.	Estimulación de la Oxidación de Diferentes Sustratos en los Tres Sitios de Acoplamiento por Ca^{+2} 107
Tabla X.	Razones de Control de Ca^{+2} , Ca^{+2} /sitio y H^+ /sitio..... 108
Tabla XI.	Razones H^+ /sitio, Ca^{+2} /sitio y H^+ / Ca^{+2} 127

LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS

		Pág.
Esquema I.	Constitución de la Cadena Transportadora de Electrones de Mitocondrias.....	26
Esquema II.	La Membrana Interna del Mitocondrión.....	31
Esquema III.	Modelo que Representa la Dependencia de la Actividad del Complejo F_0F_1 -ATPasa con el Estado Energizado y con Cationes Metálicos Monovalentes.....	142
Figura 1.	Estructura Química de Algunos compuestos Usados	48
Figura 2.	Efecto del Tiempo de Sonicación de Mitocondrias Normales y con DEPD sobre la Actividad NADH Oxidasa.....	53
Figura 3.	Curva de Calibración para la Determinación de la Cantidad de Pi.....	58
Figura 4.	Curva de Calibración para la Determinación de la Cantidad de Proteína.....	63
Figura 5.	Efecto de la Concentración de Rotenona sobre las Velocidades de Oxidación de Glutamato y Succinato en Mitocondrias de Hígado de Ratas Normales y con DEPD Desacopladas con CCCP.....	67
Figura 6.	Efecto de la Concentración de Antimicina A sobre las Velocidades de Oxidación de Succinato y Ascorbato + TMPD en Mitocondrias de Hígado de Ratas Normales y con DEPD Desacopladas con CCCP.....	70
Figura 7.	Efecto de la DEPD sobre la Estimulación de la Velocidad de Oxidación de Succinato por ADP en Mitocondrias de Hígado de Ratas.....	73
Figura 8.	Efecto de la Variación de la Cocentración de NADH sobre la Velocidad NADH-Oxidasa en Partículas Submitocondriales de Hígado de Ratas Normales y con DEPD.....	78
Figura 9.	Determinación Simultánea del Contenido de los Diferentes Citocromos de Mitocondrias de Hígado de Ratas Normales y con DEPD.....	79

Figura 10.	Cinética de la Incorporación de ^{14}C -ADP a Mitocondrias de Hígado de Ratas Normales y con DEPD.....	82
Figura 11.	Efecto de la DEPD sobre la Cinética de la Actividad Adenosina Trifosfatásica en Mitocondrias Desacopladas con CCCP.....	84
Figura 12.	Efecto de la Variación de la Concentración de CCCP sobre la Actividad Adenosina Trifosfatásica en Mitocondrias de Hígado de Ratas Normales y con DEPD.....	86
Figura 13.	Efecto de KCl y del Estado Energizado sobre la Actividad Adenosina Trifosfatásica en Mitocondrias Desacopladas con CCCP.....	89
Figura 14.	Efecto de la Concentración de Cationes Metálicos Monovalentes sobre la Actividad Adenosina Trifosfatásica en Mitocondrias Desacopladas con CCCP.....	92
Figura 15.	Efecto de la Concentración de KCl sobre la Velocidad de Hinchamiento de las Mitocondrias Desacopladas con CCCP.....	95
Figura 16.	Efecto de las Concentraciones de KCl y NaCl sobre la Velocidad Adenosina Trifosfatasa en Mitocondrias Suspendidas en LiCl desacopladas con CCCP.....	100
Figura 17.	Efecto de las Concentraciones de CCCP y FCCP sobre la Adenosina Trifosfatasa en Mitocondrias de Hígado de Ratas.....	102
Figura 18.	Efecto de la DEPD sobre la Estimulación de la Oxidación de Succinato por Ca^{+2} en Mitocondrias de Hígado de Ratas.....	105
Figura 19.	Efecto de la DEPD sobre la Velocidad de Incorporación de Ca^{+2} y su Estequiometría Durante la Activación de la Oxidación de Glutamato por Diferentes Concentraciones de Ca^{+2} Agregadas en Mitocondrias de Hígado	110
Figura 20.	Efecto de la DEPD sobre la Velocidad de Incorporación de Ca^{+2} y su Estequiometría Durante la Activación de la Oxidación de Succinato por Diferentes Concentraciones	

Figura 20.	de Ca^{+2} Agregadas en Mitocondrias de Hígado	114
Figura 21.	Efecto de la DEPD sobre la Capacidad de las Mitocondrias de Hígado de Ratas para Acumular Ca^{+2}	118
Figura 22.	Efecto de la DEPD sobre la Preferencia de la Incorporación de Ca^{+2} sobre la Fosforilación Oxidativa en Mitocondrias de Hígado de Ratas.....	121
Figura 23.	Determinación de las Razones Ca^{+2} /sitio, H^{+} /sitio y $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ en Mitocondrias de Hígado de Ratas con DEPD.....	125

ABREVIATURAS

EGTA	:	ácido etilenglicol-bis-(β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético
Hepes	:	ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazina-etanosulfónico
ATC	:	ácido tricloroacético
ADP	:	adenosina-5'-difosfato
^{14}C -ADP	:	^{14}C -adenosina-5'-difosfato
ATP	:	adenosina-5'-trifosfato
ASB	:	albúmina de suero de bovino cristalizada y liofilizada
AA	:	antimicina A
ATR	:	atractilosido
POPOP	:	1,4-bis-[2-(5-feniloxazolil)] benceno
CCCP	:	carbonil cianuro-m-clorofenilhidrazona
FCCP	:	carbonil cianuro-p-trifluormetoxifenilhidrazona
DEPD	:	desnutrición energética-proteica drástica
PPO	:	2,5-difeniloxazol
FMNH_2	:	flavín mononucleótido forma reducida
NEM	:	N-etilmaleimida
NADH	:	β -nicotinamida adenina dinucleótido forma reducida
TMPD	:	N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina

RESUMEN

Esta Tesis es un estudio del efecto del estado nutricional sobre los procesos de fosforilación oxidativa e incorporación de Ca^{+2} en mitocondrias de hígado de ratas. Los experimentos fueron realizados en dos grupos de ratas de 35 días de edad. Grupos con desnutrición energética-proteica drástica (DEPD) fueron provocados de la siguiente forma: 16 crías de la misma camada fueron alimentadas por una nodriza desde el nacimiento hasta 21 días de edad. Se destetaron y por un período de 14 días fueron alimentadas con una dieta sin proteínas y agua "ad libitum". Grupos normales: al momento de nacer, 8 crías de la misma camada fueron alimentadas por una nodriza durante 21 días. Se destetaron y durante 14 días fueron alimentadas con una dieta balanceada comercial y agua "ad libitum".

Proceso de fosforilación oxidativa: las mitocondrias de hígado de rata sometidas a DEPD no presentan alteraciones en las actividades oxidativas durante la lactancia, pero dichas actividades están significativamente disminuidas en mitocondrias de ratas con DEPD de 35 días de edad. Las velocidades de oxidación de glutamato, succinato y ascorbato + TMPD en presencia de ADP son siempre menores en mitocondrias de rata con DEPD (23-27%). Las velocidades de incorporación de H^+ son también menores bajo las mismas condiciones de ensayo (30-38%). La disminución del índice de control aceptor observado en mitocondrias de rata con DEPD en los tres sitios de acoplamiento es el resultado de una menor velocidad de oxidación en el estado 3 y no se observa pérdida en la

eficiencia de la conversión de ADP en ATP, ya que los valores de la razón ADP/O son similares en mitocondrias de ambos grupos de ratas.

La actividad máxima de oxidación de NADH medida en partículas submitocondriales está disminuída en un 40% en mitocondrias de rata sometidas a DEPD. El contenido de citocromo c en ratas con DEPD está aumentado en un 26%, mientras que la cantidad de los citocromos a + a₃ está significativamente disminuída en un 22% con respecto a los valores observados en mitocondrias de rata normal. Este menor contenido de los citocromos a + a₃ podría ser la explicación principal para la disminución de velocidad de las actividades oxidativas en los tres sitios de acoplamiento durante el proceso de fosforilación del ADP, concordando con la "hipótesis cercana al equilibrio". La velocidad de transporte de ADP por el transportador ADP-ATP es similar en mitocondrias de hígado de ambos grupos de rata, lo cual descartaría la hipótesis del "transportador ADP-ATP" como etapa limitante de la fosforilación oxidativa.

Actividad del complejo F₀F₁-ATPasa: la actividad del complejo F₀F₁-ATPasa también está afectada por DEPD. La actividad adenosina trifosfásica de mitocondrias de ambos grupos es activada por carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona (CCCP). K_a es 42% menor en mitocondrias de ratas con DEPD, lo cual indicaría una mejor unión del desacoplante. Además la V_{máx} es 23% menor en mitocondrias de ratas con DEPD, sugiriendo que la cantidad de complejo F₀F₁-ATPasa funcional es menor en mitocondrias de rata con DEPD, si bien no sería la etapa limitante de la velocidad de fosforilación de ADP.

El aumento de la actividad adenosina trifosfatásica depende sólo de la concentración intramitocondrial del catión metálico monovalente.

Succinato inhibe parcialmente la actividad adenosina trifosfatásica activada por K^+ y esta inhibición puede ser revertida por antimicina A, lo cual sugiere que puede existir más de un estado activo del complejo F_0F_1 -ATPasa. Los iones metálicos monovalentes se unirían al complejo en la forma de estado inactivo, lo que permitiría la liberación del péptido inhibidor descrito por Pullman y Monroy y el cambio de la enzima a un estado activo IV o estado en el cual el metal estaría unido al complejo sin el inhibidor.

Proceso de incorporación de Ca^{+2} : la velocidad de incorporación de Ca^{+2} en mitocondrias de hígado de ratas con DEPD es significativamente menor que en mitocondrias de ratas normales, puesto que las velocidades de consumo de oxígeno y de liberación de H^+ están disminuídas en alrededor de 20 y 30% respectivamente. De manera similar la velocidad máxima de incorporación de Ca^{+2} es alrededor de 34% menor debido a una disminución de la velocidad de transporte de electrones en la cadena respiratoria. Estos resultados son similares a los valores encontrados para la disminución de la velocidad de fosforilación de ADP. La capacidad de incorporar Ca^{+2} es 25% menor en mitocondrias de rata con DEPD. Se podría esperar que muchos otros procesos que dependen tanto de la concentración de Ca^{+2} libre intracelular como de energía, sea en la mitocondria como en la célula en general pudieran estar afectados durante la desnutrición.

Los valores de las relaciones estequiométricas de H^+ /sitio y Ca^{+2} /sitio no muestran diferencias con los valores observados en mitocondrias de rata con alimentación normal. El valor promedio de la razón H^+ /sitio determinado para el segundo más el tercer sitio de

acoplamiento de la cadena respiratoria de mitocondrias de hígado de rata con DEPD es muy cercano a 4,0, idéntico al valor promedio de la razón H^+ /sitio observado por otros investigadores en mitocondrias de hígado y de corazón de ratas con alimentación normal y en mitocondrias de tumor ascítico de Ehrlich, extendiendo la escasa información disponible con respecto a este parámetro estequiométrico fundamental.

ABSTRACT

This thesis is a study of the effect of nutritional status on oxidative phosphorylation and Ca^{+2} uptake by rat liver mitochondria. Experiments were carried out with two groups of 35-day-old male rats. Severe protein-energy malnutrition (SPEM group) was provoked as follows: after birth, 16 offspring from the same litter were nursed by one mother for 21 days, then fed for 14 days "*ad libitum*" with water and a protein free diet. Control groups were as follows: after parturition, 8 offspring from the same litter were nursed by one mother for 21 days, then fed for 14 days "*ad libitum*" with water and a balanced commercial pellet diet.

Oxidative phosphorylation process: oxidative activity of liver mitochondria from the SPEM group are not affected during lactation, but oxidative activity is significantly diminished in mitochondria from 35-day-old-male SPEM group. The rates of oxidation of glutamate, succinate and ascorbate + TMPD substrates in the presence of ADP are always lower in mitochondria from SPEM rat group (range 23-27%). The rates of H^+ uptake are also lower under the same assay conditions (range 30-38%). The decrease in the respiratory control index observed in mitochondria from SPEM rat group at the three coupling sites may be the result of the lower rates of oxidation measured in state 3, and there is no loss in the efficiency of conversion of ADP into ATP, since the values of ADP/O ratio are similar in mitochondria from both rat groups.

The V_{max} for NADH oxidation measured in electron transport particles shows a 40% decline in mitochondria from SPEM rat group. Cytochrome c content in mitochondria from SPEM rat group appears to be increased by up to 26%, whereas cytochromes a + a_3 contents are significantly diminished by up to 22%, with respect to the values observed in mitochondria from normal fed rats. The lower contents of cytochromes a + a_3 could account for most of the decreased rates of oxidative activities at the three coupling sites during the ADP phosphorylation process, according to the "near equilibrium hypothesis". The rate of ADP translocation by the ADP-ATP translocase is similar in liver mitochondria from both rat groups, discarding in some way the "ADP-ATP translocase hypothesis" as the rate-controlling step of oxidative phosphorylation.

F₀F₁-ATPase complex activity: the activity of the F_0F_1 -ATPase complex is also affected by SPEM. The adenosine triphosphatase activity by mitochondria from both rat groups is activated by carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP). K_a is 42% lower in mitochondria from SPEM rat group, suggesting a better binding of the uncoupler. Furthermore, the V_{max} is 23% lower in mitochondria from SPEM rat group. This complex activity could be not the rate-limiting step of the ADP phosphorylation.

The increase of the adenosine triphosphatase activity only depends upon the intramitochondrial monovalent metallic cation concentration. The activation of the uncoupler stimulated adenosine triphosphatase activity by K^+ ion is partially inhibited by succinate and this inhibition can be reverted by antimycin A, suggesting that the

F_0F_1 -ATPase complex can exhibit two active states. The monovalent metallic cations would be bound to the state I form of the complex (inactive state) and the inhibitor peptide described by Pullman and Monroy would be released, resulting in a swift and high activation of adenosine triphosphatase activity, consistent with an active state IV or inhibitor-free form of the metal-enzyme complex.

Ca²⁺ uptake process: the rate of Ca^{2+} uptake is significantly lower in mitochondria from SPEM rat group, since the rates of oxygen consumption and H^+ ejection are decreased by 20-30% respectively. Similarly, the maximal rate of Ca^{2+} uptake is 34% lower and the capacity of Ca^{2+} load is 25% lower in mitochondria from SPEM rat group. It is expected that many other intracellular Ca^{2+} concentration-and energy dependent-processes, either in the mitochondria or in the cell, might be affected during malnutrition.

The stoichiometric relationships of $H^+/2e^-$ and $Ca^{2+}/2e^-$ show no differences with those observed in mitochondria from normal fed rats. SPEM rat group liver mitochondria show a H^+ /site ratio close to 4.0 at coupling site II plus site III. These stoichiometric data observed in liver mitochondria from SPEM rat group are in complete agreement with similar data obtained by other investigators on normal rat liver, rat heart, and Ehrlich ascites tumor mitochondria and suggest that the H^+ /site ratio of mitochondrial electron transport may be around 4.

INTRODUCCION

El organismo es un sistema termodinámicamente abierto que intercambia materia y energía con su entorno, permaneciendo en un estado de régimen estacionario sin alcanzar el equilibrio termodinámico mientras viva. De esta manera extrae energía libre del entorno y entrega entropía al medio a velocidad controlada, ya que posee mecanismos de regulación que le permite funcionar con gran eficiencia. En el organismo ocurren procesos que liberan energía útil (exergónicos) y otros que, para realizarse aprovechan esta energía (endergónicos).

En último término, la energía para la vida proviene de la radiación solar. La mayoría de las plantas y algunas bacterias (organismos autótrofos) utilizan la energía de esta radiación para impulsar la fotosíntesis de compuestos orgánicos. Las plantas, las bacterias y todos los animales (organismos heterótrofos), utilizan los compuestos orgánicos originados en la fotosíntesis para satisfacer sus necesidades de energía mediante reacciones oxidativas.

Las mitocondrias, organelos celulares, son las plantas generadoras fundamentales de energía en todas las células de eucariontes. En células no fotosintéticas las mitocondrias son las únicas plantas de energía. En cambio, las células fotosintéticas poseen cloroplastos y mitocondrias, en tal caso estas últimas funcionan en la obscuridad para oxidar los nutrientes orgánicos generados en los períodos de luz.

Conocidas desde más de un siglo, las mitocondrias se han constituido en un importante tópico de la investigación dentro de las diferentes

disciplinas de la biología experimental. Para el citólogo, ellas representan los sujetos de experimentación para la exploración de la ultraestructura celular y para la elaboración de técnicas de fraccionamiento de tejidos con el propósito de aislar organelos citoplasmáticos. Para el bioquímico, la identificación de las mitocondrias como sitio de la respiración celular y de la fosforilación unida a la respiración, implica una etapa decisiva en la resolución y reconstitución de estos procesos a nivel molecular y la explicación de su relación con membranas celulares. Al fisiólogo, las mitocondrias le permiten un acceso experimental a las relaciones estructura-función, en particular el transporte activo, el metabolismo vectorial y los mecanismos de control metabólico a nivel molecular. El descubrimiento del ADN, la síntesis de proteína y la biogénesis mitocondrial abren un nuevo capítulo de la expresión génica en eucariontes y nuevas perspectivas para el Biólogo Molecular.

A. BREVE HISTORIA DE LA BIOQUIMICA DE LAS MITOCONDRIAS.

El propósito de esta revisión es relatar brevemente la evolución de la investigación en mitocondrias y recordar algunos de los trabajos más sobresalientes en la historia de esta investigación, que es ya bastante larga y plena de acontecimientos importantes. Relatos históricos en detalle cubren varios libros (1-3) y artículos de revisión (4-6) que abordan diversos aspectos de este campo.

a) Los Comienzos: Primeras Observaciones Citológicas de las Mitocondrias en la Célula.

Los primeros antecedentes sobre las estructuras celulares que probablemente representaban a las mitocondrias datan de los años 40 del siglo pasado, pocos años después del descubrimiento del núcleo celular. Altmann

en 1890, fue el primero en reconocer la existencia de estas estructuras que llamó "bioblastos" pensando que eran "organismos elementales" que vivían dentro de la célula para realizar funciones vitales. Altmann estaría muy satisfecho al saber que su idea del origen simbiótico de las mitocondrias, sería revivida varias décadas después, basada en las similitudes entre las mitocondrias y las bacterias (7). El nombre mitocondrión derivado del Griego "mitos"=hebra y "chondros"=gránulo, que se refiere a la apariencia de estas estructuras durante la espermatogénesis, fue introducido en 1898 por Benda (8).

En 1900, Michaelis encontró que el colorante de óxido-reducción Verde B de Janus servía para teñir de manera específica a las mitocondrias, constituyéndose según Palade (9), en el "retrato oficial" del organelo hasta 1952 año en que se publicó la primera microfotografía de las mitocondrias obtenida por microscopía electrónica de alta resolución (10). Es notable que a pesar del interés de Michaelis en los procesos biológicos de óxido-reducción, no relacionó su descubrimiento con un posible rol de las mitocondrias en las oxidaciones celulares. De hecho, transcurrieron 50 años hasta que Lazarow y Cooperstein (11) demostraran que la tinción específica de las mitocondrias por el Verde B de Janus se debe a la capacidad de estos organelos para reoxidar al colorante reducido mediante la acción de la citocromo oxidasa.

Las mitocondrias de vegetales fueron descritas por primera vez en 1904 por Meves (12). Cuatro años más tarde Regaud (13) concluyó que las mitocondrias contienen proteínas y lípidos. Tanto Meves (12) como Regaud (14) sugirieron que el papel de las mitocondrias era el de "portadores de genes". En 1912, Kingsbury (15) llegó a la conclusión que las mitocondrias

funcionan como "una expresión estructural de las sustancias reductoras que están relacionadas con la respiración celular". Sin embargo estas proposiciones, como muchas otras que surgieron durante los siguientes 20 años (16), se basaban casi exclusivamente en observaciones morfológicas sin evidencias bioquímicas directas.

El primer paso hacia este objetivo fue dado en 1934, cuando Bensley y Hoerr (17) trabajando con un homogeneizado de hígado de cuy, en solución salina fisiológica, describieron en el sobrenadante de 2000 rpm una fracción que contenía estructuras de forma globular o de varilla. Aunque estos gránulos no se teñían con Verde B de Janus, probablemente consistían, al menos en parte, de mitocondrias. Este método de fraccionamiento dio la primera oportunidad para el análisis bioquímico de una fracción citoplasmática aislada y abrió la ruta para la identificación de las mitocondrias como sitio de la respiración celular.

b) Identificación de las Mitocondrias como Sitio de la Respiración Intracelular.

Battelli y Stern en 1912, encontraron en una suspensión de pequeñas partículas provenientes de la resuspensión de un precipitado obtenido al tratar un triturado de músculo de corazón con ácido, las actividades succinato oxidasa e indofenol oxidasa, y propusieron que la respiración de la célula ocurría, en esas partículas. Una preparación similar de músculo fue usada por Keilin y sus colaboradores alrededor de 1925 para el estudio del sistema de citocromos (18). Aún cuando Keilin y Hartree (19) comprendieron que esas partículas contenían un sistema complejo de enzimas organizadas en forma muy delicada, las cuales debían ser derivadas de alguna estructura pre-existente en músculo intacto, no intentaron determinar su origen celular.

Era mucho más fácil separar gránulos respiratorios de músculo triturado que de otros tejidos, ya que la gran masa de fibras en las cuales están encajados los núcleos sedimenta en reposo, quedando suspendidas en el sobrenadante lo que hoy conocemos como "partículas submitocondriales". Se necesitaba de la centrifugación diferencial para separar los componentes del citoplasma de las diferentes células, pero las centrífugas adecuadas estuvieron disponibles sólo a partir de los años 40. No obstante, ya en 1913 Warburg (20) tuvo éxito en concentrar gránulos grandes por centrifugación y demostró que la mayor parte de la respiración de la célula se realizaba en la fracción que contenía esos gránulos.

Las mitocondrias aisladas empezaron a usarse ampliamente en bioquímica a partir de 1946 gracias a los trabajos de Claude (21). Hogeboom, Claude y Hotchkiss (22) demostraron que las mitocondrias aisladas contienen en forma exclusiva las actividades citocromo oxidasa y succinato oxidasa. Poco tiempo después, Lehninger y Kennedy demostraron que todas las reacciones involucradas en la fosforilación oxidativa, en la oxidación de piruvato y de ácidos grasos se realizaban en mitocondrias aisladas de hígado (23,24).

Slater (25) siguiendo un procedimiento de preparación basado en aquel descrito por Claude (21), demostró en 1950 que en gránulos aislados de músculo de corazón se producía la oxidación de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos acompañada de una actividad de fosforilación. Estos gránulos fueron identificados como sarcosomas en 1953 (26). En esa misma época Harman y Feigelson (27) demostraron que gránulos similares obtenidos de corazón y llamados "preparaciones de cicloforasa" tenían actividad respiratoria. Otros investigadores como Watanabe y Williams (28) utilizando músculo torácico de moscarda y Chapell y Perry (29) y Harman y

Osborne (30) con músculo del tórax de paloma obtuvieron resultados similares. Así, en el año 1953 se estableció, sobre una base de criterios bioquímicos, que los sarcosomas cumplían en músculo la función de las mitocondrias.

Más o menos al mismo tiempo Palade (10) y Sjöstrand (31) informaron que las subestructuras de las mitocondrias de hígado y de músculo son muy similares al microscopio electrónico y que la mayor actividad respiratoria de las mitocondrias de músculo estaría correlacionada con una mayor cantidad de membrana interna (10).

Cleland y Slater (25,26) lograron relacionar sus observaciones con los primeros trabajos de Battelli y Stern y con los de la escuela de Keilin (32), al demostrar que las partículas de músculo de corazón de Keilin y Hartree se formaban por desintegración de las membranas de las mitocondrias hinchadas. La cadena respiratoria estaba presente en esas membranas, mientras que muchas deshidrogenasas requeridas para el funcionamiento del ciclo de los ácidos tricarbóxicos estaban disueltas y permanecían en el sobrenadante después de sedimentar aquellas membranas.

c) *Reconocimiento de las Mitocondrias como un Sistema Osmótico.*

El fenómeno de hinchamiento de mitocondrias aisladas de hígado (33) o "*in situ*" (34) indicaba la presencia de una barrera osmótica, pero la membrana limítrofe no fue claramente detectada en esas mitocondrias y en 1950 Harman (35) negó la existencia de tal membrana. Entre 1952-53 sin embargo, la divergencia fue totalmente aclarada. Por microscopía electrónica se demostró la existencia de dos sistemas de membranas: una membrana externa y un sistema de membrana interna altamente plegada (10,31).

En 1952 Cleland (36) y Raaflaub (37) introdujeron la técnica de dispersión de la luz para medir el hinchamiento de las mitocondrias y la

permeabilidad de las membranas a diferentes solutos. A comienzos de la década del 50 varios laboratorios interesados en estudiar este sistema y su relación con otras funciones de las mitocondrias establecieron que una membrana tiene permeabilidad selectiva a ciertos aniones y cationes. Así, encontraron que el hinchamiento puede ocurrir también en un medio isotónico y puede ser promovido por Ca^{+2} (37,38), fosfato inorgánico (39), ácidos grasos de cadena corta (40), bilirrubina (41) y otros agentes (42). Algunas veces el hinchamiento depende de energía, en la forma de un sustrato oxidable y en esta situación puede ser inhibido por inhibidores de la respiración, por anaerobiosis o por desacopladores (4). Durante el proceso de hinchamiento, las mitocondrias pierden gradualmente su habilidad para concentrar iones (43) y nucleótidos (44) y para realizar la fosforilación oxidativa (44, 45), y simultáneamente adquieren ciertas actividades hidrolíticas (39). En la mayoría de los casos, el hinchamiento es impedido por Mg^{+2} , Mn^{+2} y ATP (45). Se puede también invertir el proceso de hinchamiento restaurándose la fosforilación oxidativa y las funciones que dependen de la estructura de las mitocondrias por la adición de ATP en presencia de Mg^{+2} o Mn^{+2} (45). Se ha establecido que en el fenómeno de hinchamiento de las mitocondrias, así como también en la contracción, participa la membrana interna. Estos procesos están, al menos parcialmente, relacionados con los movimientos de agua a través de la membrana, que acompañan la incorporación y la liberación de iones por vía de transportadores específicos (46,47).

En 1961, Mitchell sugirió que la función de esta barrera era principalmente separar los protones, los cuales son liberados hacia un lado de la membrana (cuando opera la cadena respiratoria) para ser utilizados al otro lado. En 1964, Chapell (46), usando el método de dispersión de la luz para

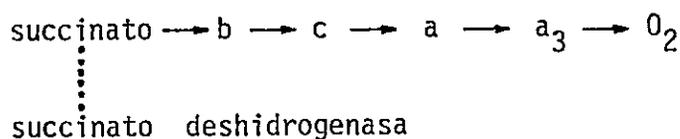
medir el hinchamiento de las mitocondrias, descubrió algunos transportadores específicos para sustratos aniónicos que se intercambian a través de la membrana con OH^- o con otros sustratos aniónicos. Otro tipo de transportador es el transportador de ATP-ADP descubierto por Klingenberg en 1965 (48).

d) El Descubrimiento de los Componentes de la Cadena Respiratoria.

Como ya se mencionó, en sus primeros estudios Battelli, Stern y Keilin (18,19) usaron preparaciones de enzimas derivadas de fragmentos de membranas de mitocondrias de corazón aunque en ese tiempo ellos no pudieron establecer el origen de las partículas de esas preparaciones. Una interesante controversia surgió en esos años: Wieland y Thunberg creían que las oxidaciones biológicas ocurrían en virtud de la activación de átomos de hidrógeno de sustratos oxidables por acción de deshidrogenasas específicas, en cambio Warburg, reconocía solamente el papel de una enzima que activaba al oxígeno denominada "fermento respiratorio". Esta fue resuelta en 1925 por Keilin (18), quién demostró que la respiración celular requería tanto de las deshidrogenasas como de una enzima que redujese al oxígeno. Las primeras para reducir al sistema de citocromos y la última para oxidarlos. En ese preciso momento nació el concepto de cadena respiratoria, aunque el término no fue usado entonces.

El descubrimiento de Keilin resolvió la controversia entre Wieland y Warburg, pero abrió una nueva, ahora entre Keilin y Warburg, con respecto a la naturaleza y nomenclatura de la enzima que reducía al oxígeno. En 1925 Keilin (18) demostró la existencia de tres citocromos: b, c y un tercer citocromo sensible a cianuro, pero no relacionó este último con el "fermento respiratorio sensible a cianuro" de Warburg. En 1926 Warburg (49) demostró que la respiración celular era inhibida por monóxido de carbono. Por su

parte Keilin (50) en 1927 observó que la actividad indofenol oxidasa era también inhibida por monóxido de carbono y concluyó que el "fermento respiratorio" de Warburg era la indofenol oxidasa. En 1930 Keilin (51) demostró que la oxidación de citocromo c aislado, catalizada por preparaciones de músculo de corazón era sensible a monóxido de carbono y a cianuro. Cuando en 1938 Keilin y Hartree (52) encontraron que el citocromo c estaba también involucrado en la reacción de la indofenol oxidasa, cambiaron el nombre a la enzima que reducía al oxígeno y era inhibida por monóxido de carbono y cianuro, por el de citocromo oxidasa. Finalmente en 1939 Keilin y Hartree (53) informaron que, quién había sido considerado hasta entonces como un solo citocromo consistía de dos componentes: citocromo a y citocromo a_3 , y que el citocromo a_3 poseía las propiedades esperadas de la citocromo oxidasa o "fermento respiratorio". Mientras tanto Ball (54) estableció al medir los potenciales de óxido-reducción, que los tres citocromos de Keilin (18) reaccionaban en el siguiente orden: $b \rightarrow c \rightarrow a$; así fue posible describir la cadena respiratoria para la oxidación de succinato mediante el esquema:



También se demostró, principalmente por los trabajos de Warburg (55,56), que la oxidación de muchos sustratos por ejemplo malato, requiere de la participación adicional de dinucleótidos de adenina-nicotinamida (NAD^+ o $NADP^+$) y flavoproteínas.

Desde 1939, muchos componentes han sido identificados en la cadena respiratoria. En orden cronológico:

- 1940: Yakushiji y Okumuki describen un nuevo citocromo del tipo c que ellos denominaron c_1 y cuya ubicación en la cadena respiratoria sería

previa a la del hasta entonces conocido citocromo c.

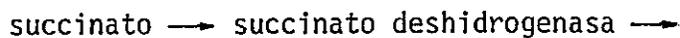


Este trabajo no es bien aceptado hasta que Keilin y Hartree lo confirmaran en 1955 (57).

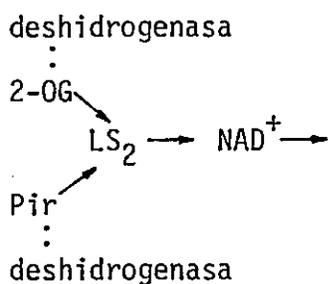
- 1948: Slater (58) encuentra que al tratar las partículas de músculo de corazón con BAL (2,3-dimercaptopropanol) en presencia de oxígeno se destruye en forma irreversible un factor que sería necesario para la transferencia de los electrones entre el citocromo b y c.



- 1951: Tsou (59) establece que la succinato deshidrogenasa funciona como un transportador de electrones.

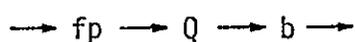


- 1951: Gunsalus (60) descubre que sustratos de potencial bajo, como piruvato y 2-oxoglutarato, requieren de ácido lipoico para reducir al NAD^+

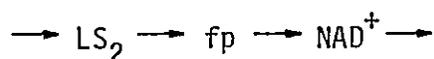


- 1956: Wang y Tsou (61) y Singer (62) establecen que la enzima succinato deshidrogenasa es una flavoproteína.

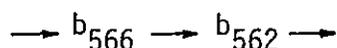
- 1957: Crane y colaboradores (63) descubren que una quinona (ubiquinona) participa en el transporte de electrones y proponen que estaría ubicada entre la flavoproteína y el citocromo b.



- 1958: Massey (64) descubre que aquella que había sido propuesta como la enzima responsable de la oxidación del NADH en la cadena respiratoria (65) tiene la función de transferir los electrones del ácido lipoico reducido al NAD^+ .



- 1958: Chance (66) publica las primeras observaciones sobre el efecto de la antimicina A en el citocromo b, del cual, después de varios años de confusiones y controversias (67), finalmente se acepta que existen al menos dos especies que se ubicarían en el orden:



- 1960-62: Takemori (68) y Beinert (69) confirman finalmente las sugerencias previas, en particular la de Waino (70), que la citocromo oxidasa contiene cobre como un componente integral.

- 1960: Beinert (71) descubre una nueva clase de componentes de la cadena respiratoria que contienen fierro, la mayoría de los cuales están asociados con flavoproteínas. La estructura química de los centros activos de estas proteínas, ahora llamadas proteínas fierro-azufre (Fe-S), es establecida antes del final de la década.

- 1964: Rieske (72) descubre una proteína Fe-S que difiere de otras presentes en la cadena respiratoria, en que no está asociada con alguna flavoproteína, sino con la transferencia de electrones en la región bc_1 .

La integración de todo este conocimiento dentro de un modelo aceptable de la cadena respiratoria pertenece más bien al presente y al futuro que al pasado. La cadena respiratoria es compleja, contiene por lo menos 16 centros de óxido-reducción la mitad de los cuales son centros Fe-S y aún se descubren centros de óxido-reducción nuevos. Se puede mencionar que

el factor destruido por BAL, informado en 1948 (58), ha sido identificado sólo en 1980 como la proteína Fe-S de Rieske (73).

La secuencia funcional de estos centros de óxido-reducción ha sido analizada por medio del uso de: sustratos oxidables, aceptores artificiales de electrones de potenciales de óxido-reducción conocidos, inhibidores específicos y técnicas espectroscópicas especializadas. Algunos componentes han sido purificados, pero a menudo con propiedades modificadas, otros han sido detectados sólo en membranas funcionales. La secuencia precisa y la función de cada una de las proteínas Fe-S es aún desconocida. La membrana mitocondrial interna contiene al menos 5.000 copias de las proteínas que transfieren electrones, así como también varios sistemas de transporte a través de la membrana (74).

e) La Naturaleza de la Conservación de la Energía.

La primera demostración de la síntesis de ATP acoplada a la respiración fue hecha en 1930 por Engelhardt (75) en eritrocitos de paloma en los cuales se formaba rápidamente fosfato inorgánico cuando se agregaba algún inhibidor de la respiración (cianuro, uretano o monóxido de carbono). La cantidad de fosfato formado estaba estrechamente relacionada con la cantidad de ATP que desaparecía. Si se extraía el cianuro mediante lavado, se producía una resíntesis del éster de fosfato sensible a ácido. En cambio en los eritrocitos de conejo, que no respiran, se formaba fosfato inorgánico cuando se inhibía la glicolisis con fluoruro, mientras que el cianuro no tenía efecto. Engelhardt concluyó que la ruptura de ATP se producía tanto en ausencia como en presencia de inhibidores respiratorios, pero que en ausencia de ellos la ruptura se compensaba con la resíntesis de ATP.



El trabajo de Engelhardt tuvo poco impacto cuando fue publicado.

El interés en la fosforilación oxidativa, como se llamó más tarde al proceso, empezó con el trabajo de Kalckar en 1937 (76), quién demostró que la fosforilación de glucosa, glicerol o AMP se realizaba cuando homogenizados de riñón y de otros tejidos catalizaban la oxidación de citrato, glutamato, fumarato o malato. Puesto que las reacciones no ocurrían en condiciones anaeróbicas y no se formaba fosfoglicerato, concluyó que la glicolisis no era responsable de la fosforilación. En 1939, Lipmann (77) demostró que la oxidación de piruvato está acoplada con la fosforilación en bacterias.

En 1939-40, dos grupos: Belitzer y Tsibakowa (78) y Ochoa (79) hicieron la importante observación que más de un átomo de Pi es esterificado por cada átomo de oxígeno consumido en preparaciones que están respirando bajo condiciones en que no hay glicolisis. Ambos grupos llegaron a la conclusión que la fosforilación debe ocurrir durante el paso de hidrógeno (o de electrones) a través de la cadena respiratoria hasta el oxígeno. Así estos investigadores fueron los primeros en postular lo que llegó a conocerse como la fosforilación unida a la respiración. Este postulado fue confirmado directamente cerca de 10 años más tarde por Lehninger y Friedkin, al usar NADH como sustrato para una fracción particulada de hígado de rata (80).

Mediante el uso de mitocondrias aisladas, Lehninger (81,82) amplió sus resultados anteriores obtenidos junto a Friedkin (80), referentes a que la respiración estaba acompañada con la fosforilación del ADP y que el valor de la razón P/O era aproximadamente 3, confirmando la existencia de tres sitios de fosforilación en la cadena respiratoria. Esto concordaba con la proposición hecha ya en 1943 por Ochoa (83), quién estudió en una fracción particulada el proceso de fosforilación oxidando en forma aeróbica piruvato.

Los experimentos realizados por Lehninger indicaban además que las mitocondrias eran impermeables al NADH agregado y que poseían una vía "externa" de oxidación del NADH, que no fosforila y que puede ser demostrada en presencia de citocromo c exógeno. Se demostró más tarde que esta vía difiere de aquella encargada de la oxidación del NADH intramitocondrial, ya que es insensible a antimicina (82), amital (84) y rotenona (85) y está asociada con la membrana mitocondrial externa (86).

Mediante el aislamiento de mitocondrias estructuralmente bien preservadas fue posible el descubrimiento del alto grado de organización de los sistemas enzimáticos de las mitocondrias, lo cual no fue observado en trabajos anteriores que utilizaban fracciones particuladas. Entre 1951-52 varios laboratorios (87,88) demostraron con mitocondrias aisladas el "control respiratorio", que consiste en el control de la velocidad de la respiración por la disponibilidad de fosfato inorgánico y del aceptor de fosfato, ADP. Se propuso que este fenómeno que requiere de un cierto grado de integridad estructural, era un reflejo de la capacidad del organismo como un todo para ajustar su respiración a la necesidad real de energía. El control respiratorio pasó a ser un parámetro importante en el estudio de la transformación de la energía en mitocondrias a niveles bioquímicos, fisiológicos y patológicos (89). Otra característica de la alta organización de las mitocondrias intactas, descubierta por Kielley y Kielley (90), es la actividad ATPasa "latente" estimulada por agentes que dañan la estructura de las mitocondrias. Cuando se agregaba 2,4-dinitrofenol, desacoplante de la fosforilación oxidativa, se observaba un aumento de la actividad ATPasa y la supresión del control respiratorio (88,91). Estas observaciones indicaban que el acoplamiento de la respiración a la fosforilación requería una integridad estructural

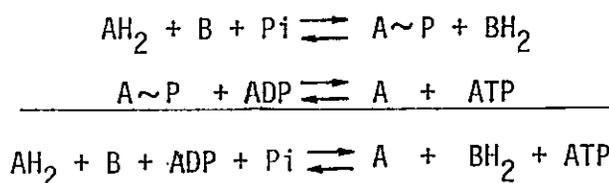
de las mitocondrias además de un conjunto de enzimas funcionales. Estos descubrimientos estimularon el interés en determinar la relación estequiométrica de la formación de ATP y la localización del proceso de fosforilación en la cadena respiratoria. Una de las estrategias usadas se basó en determinar la razón P/O (o P/2e-) en diferentes sitios de la cadena respiratoria. Para este tipo de estudios se usaron diferentes sustratos naturales, o dadores artificiales de electrones como ascorbato + citocromo c (92) o TMPD (93) o menadiol (94). También se recurrió a aceptores artificiales de electrones por ejemplo ferricianuro (95), coenzima Q₁ (96), combinados con inhibidores del transporte de electrones tales como cianuro para la citocromo oxidasa (18), antimicina A para el segmento citocromo b-c (66,82,97), amital (84) o rotenona (85) para el flujo de electrones entre NADH y coenzima Q para delimitar los sitios en estudio.

Chance y Williams a mediados de la década de 1950 (98) introdujeron un gran avance técnico para el estudio de la fosforilación oxidativa. Ellos desarrollaron un espectrofotómetro de doble longitud de onda con la suficiente energía para el uso de suspensiones concentradas de mitocondrias y combinado con un electrodo de oxígeno. Por este procedimiento pudieron determinar en forma simultánea el estado de óxido-reducción de varios componentes de la cadena respiratoria espectrofotométricamente, y el consumo de oxígeno por medición polarográfica. Estas determinaciones se realizaron para diferentes estados metabólicos de las mitocondrias, por ejemplo: durante la respiración en presencia de un sustrato y fosfato, con y sin ADP (estado 3 y estado 4). La transición entre los dos estados estaba acompañada por los cambios en el estado de óxido-reducción, característicos de ciertos transportadores de electrones, algunos estaban más reducidos, otros más oxidados.

Los sitios de fosforilación en la cadena respiratoria se determinaron al localizar esos puntos de entrecruzamiento. Al mismo tiempo se calculó la razón ADP/O o P/O según el aumento del consumo de oxígeno producido por la adición de una cantidad determinada de ADP.

Con esta metodología se determinaron los tres sitios de fosforilación presentes en la cadena respiratoria y localizados entre: NADH y citocromo b; citocromo b y citocromo c, y citocromo c y oxígeno. En cada sitio se sintetiza una molécula de ATP a partir de ADP y de fosfato inorgánico cuando pasan dos electrones. El mecanismo real de estas fosforilaciones permanecía no obstante, incierto.

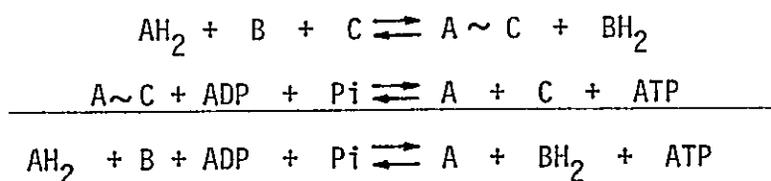
En 1946, Lipmann (99) sugirió que las fosforilaciones en la cadena respiratoria tenían un mecanismo similar al de la fosforilación en la glicolisis, donde el dador de electrones forma un derivado fosforilado al oxidarse:



Siendo A y B transportadores de óxido-reducción.

En los primeros años de la década de 1950, Racker (100) estudiando la oxidación de gliceraldehído-3-fosfato, y Lynen y Reichert (101) utilizando piruvato, describieron el papel de los ésteres de tiol como intermediarios de alta energía, esto facilitó el camino para dilucidar el mecanismo de la etapa de fosforilación unida a la oxidación de 2-oxoglutarato en mitocondrias (102). También fue la primera demostración que la energía de las reacciones de oxidación puede ser conservada sin la formación de compuestos fosforilados de "alta energía".

Entusiasmado por estos resultados, Slater en 1953 (103) consideró la posibilidad que fosforilaciones unidas a las reacciones de óxido-reducción de la cadena respiratoria podrían también seguir el camino de los intermediarios de alta energía no fosforilados, la idea de Slater es hoy conocida como hipótesis química de la fosforilación oxidativa. Esta hipótesis propone dos postulados: a) la energía se conserva antes de la intervención del fosfato inorgánico; b) la energía se conserva en un compuesto de "alta energía" que se formaría por la unión del producto oxidado de la reacción con un ligando hipotético C. El intermediario de "alta energía" reaccionaría entonces con fosfato y ADP:



El mecanismo propuesto por Slater estaba apoyado por varios descubrimientos relacionados con la fosforilación unida a la cadena respiratoria, por ejemplo, el fenómeno del control respiratorio podría ser explicado al suponer que en ausencia de Pi y/o ADP, se acumularía A~C y esto produciría una inhibición del transporte de electrones. Este mecanismo también explicaría el efecto de los desacopladores que suprimen el control respiratorio y la fosforilación oxidativa y estimulan la actividad ATPasa, al sugerir que los desacopladores provocan la ruptura del compuesto A~C en A y C. De manera similar, el daño estructural podría inducir una ruptura de A~C, esto explicaría por qué fragmentos de la membrana mitocondrial, tales como aquellos de la preparación de Keilin y Hartree, pueden respirar en ausencia de Pi (103).

Chance y William (98) postularon una extensión de la teoría química proponiendo la participación de dos tipos de intermediarios de alta energía no fosforilados, uno de los cuales contendría un transportador de óxido-reducción y sería individual para cada sitio de acoplamiento de la cadena respiratoria, y un segundo que no contendría transportadores de óxido-reducción y sería común para los tres sitios de acoplamiento. En este postulado se reemplazó "C" por "I" para indicar que este ligando inhibiría la respiración al unirse a un transportador de electrones. El ligando I se uniría de preferencia al transportador en estado reducido.

Uno de los postulados más importantes de la hipótesis de Slater y sus posteriores ampliaciones, fue que la energía liberada durante el transporte de electrones en la cadena respiratoria podría ser conservada sin la participación del sistema de fosforilación. Pruebas experimentales para este concepto fueron obtenidas a fines de la década de 1950 y principios de la década de 1960 por una serie de descubrimientos, principalmente: la inversión de la reacción de fosforilación unida a la cadena respiratoria (104, 105). Posteriormente se llegó al concepto general de que el transporte de electrones a través de los dos primeros sitios de acoplamiento de la cadena respiratoria es reversible y que depende: del equilibrio dinámico entre los sistemas respiratorio y de fosforilación (106).

La inhibición de la fosforilación oxidativa por oligomicina (107), permitió demostrar la transferencia de energía en forma directa desde los sitios de acoplamiento de la cadena respiratoria hacia otras funciones que realizan las mitocondrias, como por ejemplo, la reacción de transhidrogenación de nicotinamidas descubierta por Danielson y Ernster (108), la termogénesis (109) y los transportadores de iones entre los cuales es relevante

la incorporación de Ca^{+2} dependiente de energía (110), que permitió abrir un importante capítulo de la investigación en mitocondrias desde entonces hasta nuestros días.

A pesar de la gran cantidad de información que se acumuló durante los años de la década de 1950 y la primera mitad de la década de 1960 en relación a las vías y a los componentes que participan en la transformación de la energía en mitocondrias, la aclaración del mecanismo de fosforilación unido al transporte de electrones progresó muy poco. Si bien la mayoría de los resultados experimentales concordaba con las predicciones de un mecanismo químico como el formulado por Slater (103) y ampliado posteriormente por Chance y Williams (98), que involucraba un "intermediario de alta energía" como transformador de energía entre el transporte de electrones y la síntesis de ATP, no hubo éxito en el aislamiento o identificación de dicho intermediario pese a los esfuerzos de muchos laboratorios. La mayoría de los componentes de la cadena respiratoria fue propuesto en algún momento, al menos como parte de ese intermediario. Se consideró también alguna participación de Ca^{+2} (111) y de K^+ + valinomicina (112) en la formación de ese intermediario de alta energía debido a la incorporación activa de esos cationes en mitocondrias que respiran, pero con ninguno de los intermediarios propuestos se logró comprobar experimentalmente el mecanismo químico.

En 1965 Boyer (113) propuso que las etapas de óxido-reducción productoras de energía en la cadena respiratoria podrían llevar a estados conformacionales "energizados" del catalizador que participa en esa reacción. Estos estados conformacionales de los catalizadores de óxido-reducción inducirían la formación de un enlace covalente de alta energía en una molécula adyacente a la ATPasa, con el resultado de que se podría ahora sintetizar

ATP a partir de ADP y Pi. Este mecanismo dio una explicación alternativa de cómo se conservaría la energía en los catalizadores del transporte de electrones o en la enzima que sintetiza ATP, pero no dio una respuesta útil para el mecanismo por el cual la energía puede ser traspasada "entre" aquellas enzimas. A mediados de la década de 1960 había evidencias de que la energía de las mitocondrias podía ser traspasada a un número relativamente grande de entidades que transforman energía y que incluye los tres sitios de acoplamiento de la cadena respiratoria, el sistema de síntesis de ATP, la transhidrogenasa de nucleótidos de nicotinamida y los transportadores de iones entre otros. Pero parecía poco probable que todas estas enzimas y transportadores transfirieran energía mediante una colisión directa de moléculas dentro de la membrana.

Una solución a este problema se abrió en 1961 cuando Mitchell (114) dio a conocer su hipótesis quimiosmótica, que posteriormente amplió para proponer un mecanismo general sobre el acoplamiento de la energía en la respiración y en la fosforilación fotosintética (115). De acuerdo a esta hipótesis, la conservación de la energía en los centros de óxido-reducción de la cadena respiratoria se produciría mediante la generación de un gradiente de protones a través de la membrana de acoplamiento. El gradiente se generaría por la acción de transportadores de iones de hidrógeno y de electrones alternativos los cuales formarían ondas que irían desde un lado al otro de la membrana, de manera tal, que los iones de hidrógeno serían incorporados en un lado de la membrana y liberados en el otro lado. Propuso también que la membrana misma tiene una ATPasa reversible que transportaría protones y utilizaría esta gradiente de protones generada por los centros de óxido-reducción de la cadena, para la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi. Ese mismo año

Williams (116) propuso un mecanismo en el cual el paso de electrones por la cadena respiratoria generaría un flujo de protones que sería la fuerza que conduce a la síntesis de ATP, sin embargo, en lugar de establecer un gradiente a través de la membrana como en el caso de la hipótesis quimiosmótica, supuso que este flujo de protones ocasionaría un aumento localizado de la actividad de los protones en la fase de lípidos dentro de la membrana provocando una deshidratación del sitio activo de la ATPasa y de esa manera promovería la condensación del ADP y Pi para formar ATP (117). El mecanismo propuesto en la hipótesis quimiosmótica despertó especial interés, ya que dio una explicación racional del papel de la membrana en las fosforilaciones oxidativa y fotosintética, y constituyó un punto de unión entre estos procesos y el transporte activo.

Históricamente el concepto de transporte vectorial de protones se originó de la idea de Lundegård en 1945 (118), quién sugirió que si los centros de óxido-reducción del sistema de citocromos estaban organizados en forma anisotrópica a través de la membrana, los protones serían producidos en un lado y consumidos en el otro. En sus estudios de la secreción de ácido clorhídrico por la mucosa gástrica, Davies y Ogston (119) concluyeron en 1950 que en la secreción de protones estarían participando dos mecanismos en forma paralela: a) una bomba de protones unida a reacciones de óxido-reducción y b) una bomba de protones conducida por la hidrólisis de compuestos lábiles de fosfato, por ejemplo fosfato de creatina.

La hipótesis quimiosmótica se basa en cuatro postulados (115):

a) una ATPasa que transporta protones; b) una cadena con centros de óxido-reducción que transporta protones; c) un sistema de intercambio por difusión que acopla el transporte de protones a la de aniones y cationes y que

permite la entrada y salida de metabolitos esenciales; y d) una membrana impermeable a iones, en la cual se basan los sistemas de los puntos a), b) y c).

La fuerza del movimiento de protones, $\Delta\rho$ o $\Delta\mu_{H^+}$, como la designan muchos investigadores, se definió (115, 120) como la suma del potencial eléctrico ($\Delta\Psi$) y la diferencia de pH (ΔpH) que existe entre ambos lados de la membrana de acuerdo a la ecuación:

$$\Delta\rho \text{ (o } \Delta\mu_{H^+}) = \Delta\Psi - Z\Delta pH$$

donde $Z = -2,303RT/F$ y tiene el valor de -59 mV cuando $\Delta\rho$ (o $\Delta\mu_{H^+}$) y $\Delta\Psi$ están expresados en mV y ΔpH en unidades de pH.

El estreno oficial de la hipótesis quimiosmótica fue en 1961 (114). Una de las razones que se dieron para proponer esta hipótesis fue la de "reconocer el carácter esquivo de los intermediarios C o I, al admitir que ellos pueden no existir". Poco tiempo después Mitchell (121) demostró que los desacopladores de la fosforilación oxidativa actúan como conductores de protones a través de las membranas de mitocondrias y de bacterias.

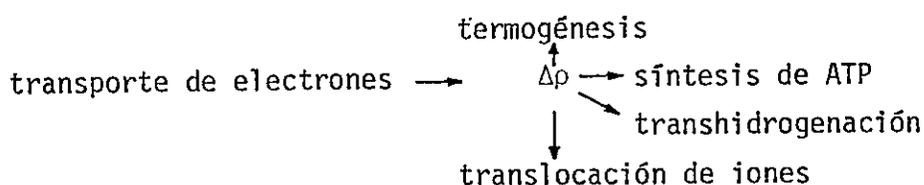
Mitchell y Moyle (122, 123) demostraron que la adición de oxígeno a mitocondrias sometidas a un estado anaeróbico en presencia de un sustrato unido a NAD^+ producía una liberación de protones con una estequiometría de $6H^+/O$, y que la proporción de los componentes eléctrico y químico de la fuerza del movimiento de protones variaba con las condiciones experimentales. Esto concordaba completamente con las predicciones de la hipótesis quimiosmótica. La primera evidencia independiente que llamó mucho la atención fue el experimento del "baño ácido" de Jagendorf y Uribe (124), con el cual demostraron que una gradiente de protones impuesta a través de la membrana tilacoide de cloroplasto conduce a la síntesis de ATP.

Los progresos posteriores en esta área eran totalmente dependientes de un desarrollo tecnológico que hiciera posible la demostración y la cuantificación de la fuerza del movimiento de protones y de sus componentes eléctrico y químico (125,126). La disponibilidad de electrodos suficientemente sensibles, combinados con ionóforos adecuados y específicos para iones y para protones y de varias pruebas ópticas, fueron de gran importancia además de la introducción por Skulachev, Liberman y sus colaboradores (127), de una serie de aniones y cationes orgánicos sintéticos, entre ellos varios compuestos con boro muy útiles para la determinación de $\Delta\rho$. Varias técnicas físico-químicas elegantes, que facilitaron la medición de las fases transitorias de eventos electroquímicos, especialmente de aquellos que acompañan la fosforilación y el transporte de electrones inducidos por la luz, fueron desarrollados en el laboratorio de Witt (128). Otro evento crucial iniciado en el laboratorio de Racker (129,130) y perfeccionado por el grupo de Skulachev (131,132), fue la elaboración de métodos para incorporar transportadores de iones, ATPasas y catalizadores del transporte de electrones con sistemas transformadores de energía, en vesículas artificiales de fosfolípidos.

Gracias a estas técnicas y a la gran cantidad de datos experimentales recogidos en muchos laboratorios, los cuatro postulados básicos de la hipótesis quimiosmótica de Mitchell fueron comprobados a mediados de la década de 1970. Se estableció que en mitocondrias y en partículas sub-mitocondriales se produce una gradiente de protones entre ambos lados de la membrana concomitante con el transporte de electrones o la hidrólisis de ATP, y que la generación de una gradiente de protones por el transporte de electrones puede ser utilizada para la síntesis de ATP. Se demostró también que la membrana interna de las mitocondrias contiene un sistema de transportadores

de iones, específico para cada sustrato y que la membrana misma tiene una baja permeabilidad a los protones y a otros iones. Resultados similares se obtuvieron para cloroplastos y bacterias. La incorporación en liposomas de complejos aislados de la cadena respiratoria que representan a los tres sitios de acoplamiento de la cadena (133,134), de la ATPasa (135) y de la transhidrogenasa (136), dio como resultado la generación de un gradiente de protones a través de la membrana. Además cuando fueron incorporados en un mismo liposoma uno de los tres complejos y la ATPasa, el complejo fue capaz de realizar la fosforilación oxidativa (137,138).

La hipótesis quimiosmótica ha sido tema de mucho debate. Algunas críticas (139,140) dirigidas a los principios básicos de la hipótesis, han sido rechazados (141), otras críticas referente a detalles del mecanismo de Mitchell han conducido a modificaciones menores de la hipótesis (142). Este debate aún continúa. Una revisión sobre este campo (143) muestra sin embargo, que la idea básica de esta hipótesis:



ha sido aceptada ampliamente desde mediados de la década de 1970 como "dogma central" de la bioenergética de membranas.

En los últimos años la investigación de la transformación de energía en las mitocondrias se ha centrado principalmente en tres enfoques (143): a) el mecanismo del transporte de protones por varias unidades que transforman energía; b) el posible papel de los cambios conformacionales de proteínas como primer acontecimiento en la transformación de energía; y

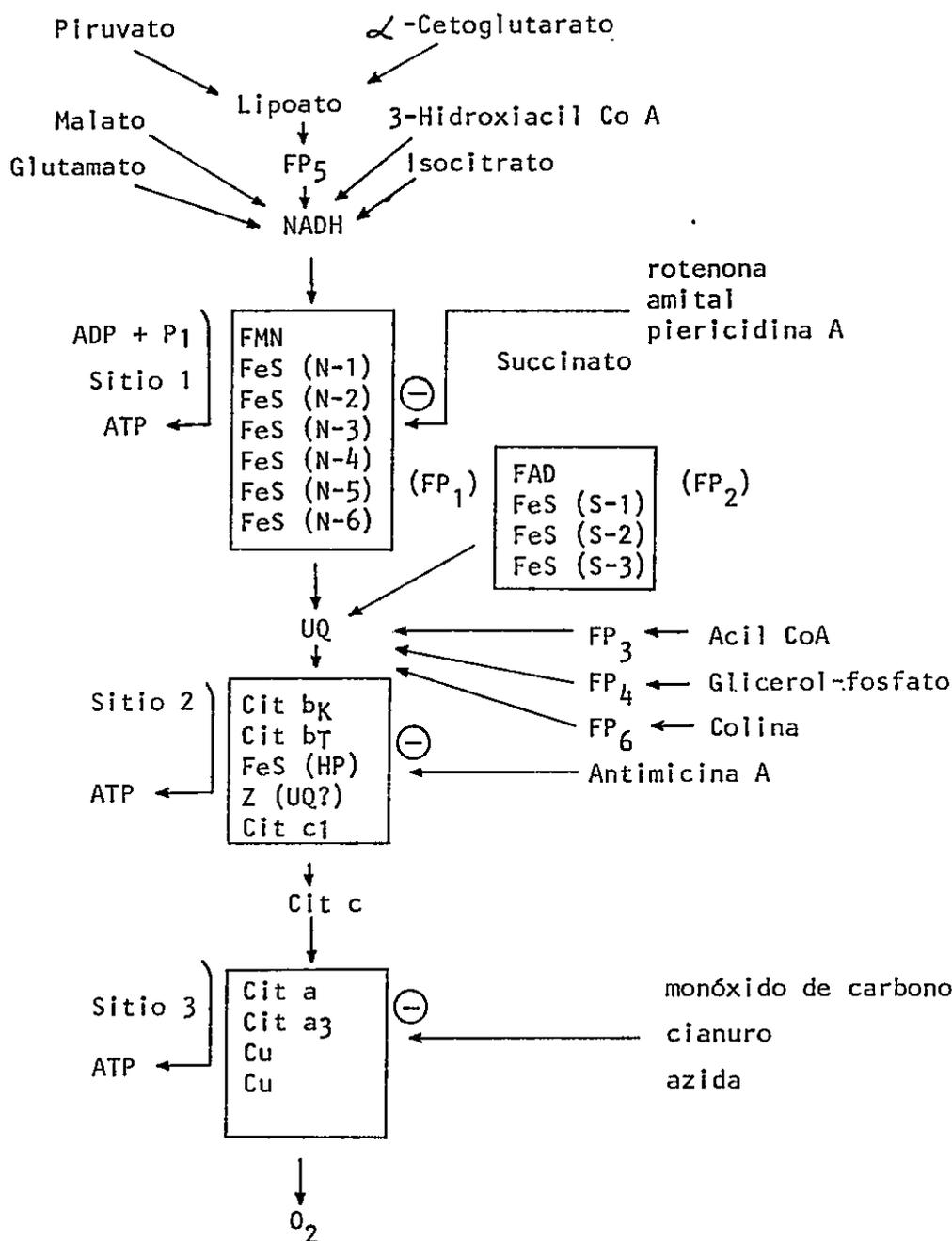
c) la posible implicancia de los mecanismos electroquímicos localizados (intramembrana), en la transferencia de energía entre unidades que transforman energía.

Un tema polémico y muy activamente discutido es el relacionado con el mecanismo del transporte de protones. De acuerdo a Mitchell (115), el número de protones transportados a través de la membrana interna de las mitocondrias por cada par de electrones transferidos en cada sitio de acoplamiento de la cadena respiratoria es 2, lo que concuerda con el concepto de las ondas de óxido-reducción. Estimaciones de otros laboratorios (144,145) indican valores más altos, probablemente 3 o 4, lo cual sugiere la existencia de bombas de protones (146) puestas en duda por Mitchell (147). Una parte de esta Tesis, el estudio de la estequiometría del transporte de protones, se relaciona con dicha polémica.

B. CONSTITUCION DE LA CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES.

Las enzimas de óxido-reducción que participan en el transporte de electrones son complejas tanto en su estructura como en su mecanismo de acción. Se encuentran incrustadas en la membrana interna de las mitocondrias y resulta muy difícil su extracción en forma soluble, así como su purificación.

La cadena está formada por una serie de transportadores de electrones capaces de experimentar cambios reversibles en sus estados de óxido-reducción. El Esquema 1 muestra el ordenamiento de los transportadores de electrones de la cadena, además de los sitios de acción de algunos inhibidores característicos y la localización de los sitios de conservación de energía. Los transportadores de electrones pueden ser moléculas orgánicas relativamente simples como la ubiquinona o coenzima Q, o nucleótidos como el



Esquema I. Constitución de la Cadena Transportadora de Electrones de Mitochondrias.

Las abreviaturas son FMN, proteína con flavín mononucleótido de la FP₁; FeS, centros de óxido-reducción hierro-azufre; FAD, proteína con flavín adenina dinucleótido de la FP₂; cit b, c, etc., citocromos; UQ, ubiquinona; FP₁, NADH-deshidrogenasa; FP₂, succinato-deshidrogenasa; FP₃, FTE-deshidrogenasa; FP₄, glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa; FP₅, dihidrolipoil-deshidrogenasa, y FP₆, colina-deshidrogenasa. No todos los centros FeS están localizados en proteínas individuales. Reproducido de Lehninger, A.L. (74).

NADH; o estructuras proteicas como las flavoproteínas, las proteínas hierro-azufre y los citocromos. La estructura en membrana permite fijar firmemente los componentes de la cadena respiratoria en un ordenamiento secuencial que facilita la transferencia de electrones entre ellos, lo cual determina una alta eficiencia del sistema. Cada componente está situado respecto de sus vecinos de manera tal que el transporte de electrones se realiza con la mayor especificidad evitándose reacciones laterales. En el Esquema 1 se indica además, los puntos de entrada de los electrones provenientes de las distintas deshidrogenasas. La coenzima Q recibe la gran mayoría de los electrones que provienen de los procesos oxidativos celulares. Los electrones son transferidos a la coenzima Q por las siguientes enzimas: a) NADH-deshidrogenasa; b) succinato-deshidrogenasa; c) glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa; d) FTE (flavoproteína de transferencia de electrones)-deshidrogenasa y e) colina-deshidrogenasa. Todas ellas son flavoproteínas (148, 149). En cambio hay un sólo dador de electrones al oxígeno: el citocromo aa_3 o citocromo oxidasa. Entre la coenzima Q y el citocromo aa_3 se encuentran varios transportadores intermedios: los citocromos b, c_1 y c, y algunas proteínas hierro-azufre.

Por fraccionamiento salino de la membrana interna de mitocondrias, en presencia de sales biliares, es posible aislar complejos constituidos por varias proteínas que reflejan el ordenamiento de los constituyentes de la cadena respiratoria. Estos complejos son: el complejo I (NADH-coenzima Q-reductasa), el complejo II (succinato-coenzima Q-reductasa), el complejo III (coenzima Q-citocromo c-reductasa) y el complejo IV (citocromo oxidasa) (150,151).

C. EL TRANSPORTE DE EQUIVALENTES REDUCTORES A TRAVÉS DE LA CADENA RESPIRATORIA.

En las mitocondrias, el hidrógeno es extraído de las reacciones de óxido-reducción que se realizan en el ciclo de los ácidos tricarbónicos por la molécula de nicotinamida-adenín-dinucleotido, o NAD^+ . Cada molécula de NAD^+ acepta dos electrones y un protón. El protón y uno de los electrones se unen a un átomo de carbono de la molécula de NAD^+ y el otro electrón neutraliza la carga positiva, obteniéndose la forma reducida NADH . El NADH cede sus dos electrones y un protón al FMN de la NADH -deshidrogenasa. En este proceso el NADH es oxidado y el FMN habiendo aceptado dos electrones y un protón, capta un protón adicional del medio interno delimitado por la membrana con lo cual es reducido a FMNH_2 .

Mediante un mecanismo todavía desconocido, el FMNH_2 transfiere los dos átomos de hidrógeno desde la superficie interna de la membrana hasta la superficie externa donde los átomos son ionizados y los protones liberados al medio extramitocondrial. De esta manera los dos primeros protones han sido transportados a través de la membrana, de acuerdo a la teoría quimiosmótica (152). Los dos electrones son transferidos a proteínas fierro-azufre. Al ceder los dos protones y los dos electrones el FMNH_2 retorna a su estado oxidado para ser nuevamente reducido por el NADH . Algunos investigadores han postulado que los protones serían liberados por el FMNH_2 en el interior de la membrana y que llegarían al medio externo a través de otro transportador (153).

Las proteínas fierro-azufre transfieren únicamente electrones, no átomos completos de hidrógeno, cada proteína fierro-azufre transporta un electrón. Existen diversos tipos de proteína fierro-azufre en este tramo

de la cadena respiratoria. Se ha propuesto la existencia de al menos seis o siete centros fierro-azufre, dos o tres binucleares y cuatro tetranucleares. La razón entre fierro y flavina podría ser de 22 a 1 (153). Las proteínas fierro-azufre deben estar ordenadas en la membrana de forma tal que puedan transferir los electrones nuevamente hacia el interior de la mitocondria.

Las proteínas fierro-azufre transfieren un total de dos electrones a la ubiquinona o coenzima Q. La coenzima Q en el estado de oxidación máxima (forma quinona) contiene dos átomos de oxígeno unidos al anillo por dobles enlaces. Al unir un átomo de hidrógeno a uno de los oxígenos se crea la forma semiquinona o QH^* , en la forma más reducida llamada hidroquinona o QH_2 , los dos oxígenos tienen unidos átomos de hidrógeno.

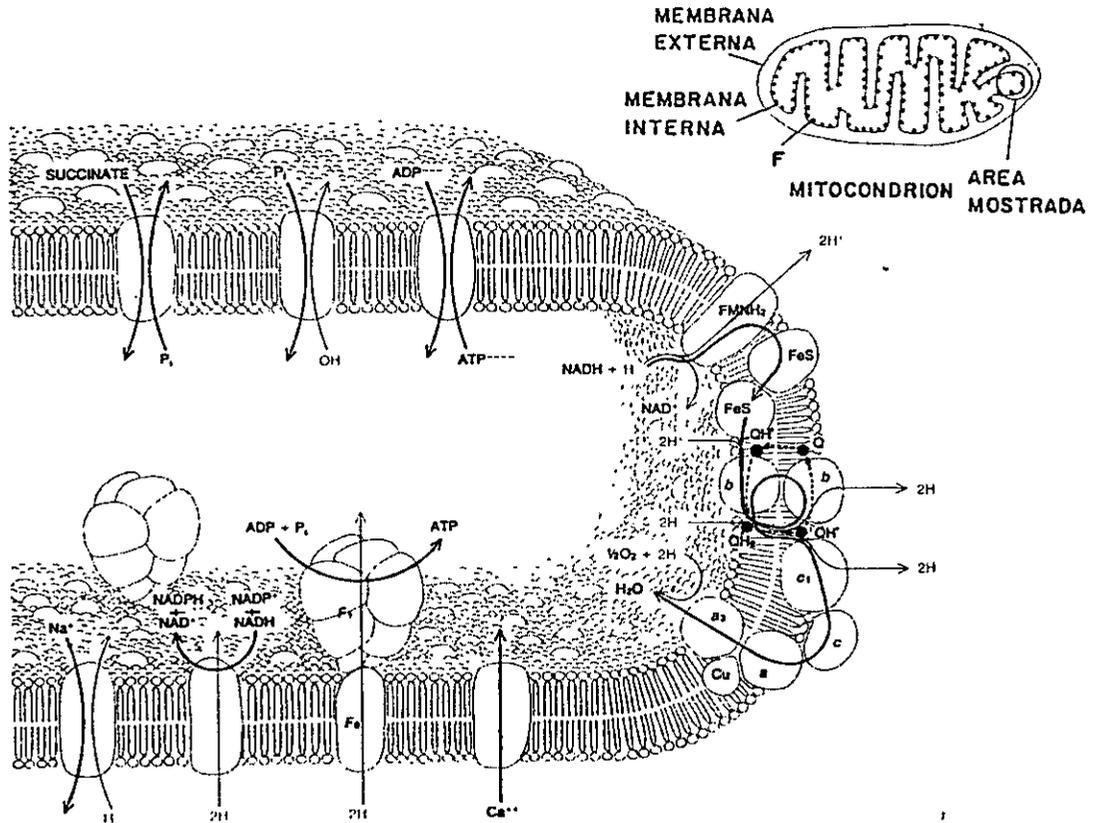
Dos moléculas de coenzima Q captan respectivamente un electrón que procede de las proteínas fierro-azufre y un protón del medio interno para formar dos moléculas de semiquinona (QH^*). Dos electrones más son suministrados entonces por otra proteína de la cadena respiratoria, el citocromo b, y al captar dos protones más del medio intramitocondrial se forman dos moléculas de QH_2 . La coenzima Q es soluble en la matriz lipídica de la membrana, lo cual le permite migrar como molécula de una a otra parte de la membrana (152). Las dos moléculas de hidroquinona atraviesan la membrana desde la superficie interna, donde toman un total de cuatro átomos de hidrógeno, hasta la externa donde cada molécula de QH_2 cede un electrón al citocromo c_1 y libera un protón hacia el exterior de la mitocondria. En consecuencia, el número de protones transportados hasta el momento es de cuatro. Las moléculas de coenzima Q en el estado de semiquinona ceden cada una su protón restante al medio externo (liberando los últimos dos del total de seis protones)

y transfieren el electrón que llevan asociado al citocromo b. Los electrones son devueltos a la coenzima Q, atravesando la membrana para formar nuevamente dos moléculas más de hidroquinona a partir de dos moléculas de semiquinona, constituyéndose lo que se conoce como el ciclo de la coenzima Q (154, 155).

Los citocromos c_1 , incluidos en la superficie exterior de la membrana, transfieren los dos electrones al citocromo c que está situado sobre la superficie exterior. A continuación, los dos electrones pasan al citocromo a, y atravesando la membrana por última vez llegan hasta el citocromo a_3 . Finalmente, el citocromo a_3 es oxidado por el oxígeno molecular. Los dos electrones son cedidos a un átomo de oxígeno y dos protones son captados desde el medio interno de las mitocondrias, formándose una molécula de agua (156).

Se ha propuesto en los últimos años que la citocromo oxidasa genera también la fuerza de movimiento de protones por el transporte de protones unida a reacciones de óxido-reducción, pero por un mecanismo diferente, mediante una bomba de protones unida a reacciones de óxido-reducción (157).

Durante esta serie de reacciones de óxido-reducción, un par de electrones atraviesa tres veces la membrana en ambos sentidos y extrae cada vez dos protones. El primer paso por medio de la FMNH₂, ingreso a través de las proteínas hierro-azufre, y nueva salida por la hidroquinona. El segundo ingreso se efectúa por medio del citocromo b, los electrones reducen otro par de moléculas de coenzima Q y migran por tercera y última vez a la superficie exterior de la membrana. Posteriormente vuelven al interior de la mitocondria a través del sistema de citocromos para reducir al oxígeno (Esquema 2). Este flujo de electrones genera una corriente eléctrica. La diferencia de



Esquema II. La Membrana Interna del Mitocondrión.

Esquema II. *La Membrana Interna del Mitocondrion.* En la membrana interna de las mitocondrias se encuentran incluidas las enzimas y otros componentes de la cadena respiratoria. La disposición de las moléculas no se conoce todavía con seguridad; este modelo es, en cierto modo, hipotético. La respiración comienza en el NADH, el cual cede dos electrones y un protón al flavín-mononucleótido (FMN); otro protón es captado del medio interno, de manera que la forma reducida de la molécula (FMNH₂) tiene dos átomos de hidrógeno completos. Los protones son expulsados y los electrones retornan a la superficie interna de la membrana a través de las proteínas fierro-azufre. Una vez allí, los dos electrones son cedidos a dos moléculas de ubiquinona (Q), cada una de las cuales adquiere un protón y da lugar a la forma semiquinona (QH*). A diferencia de los otros componentes de la cadena respiratoria, las quinonas migran probablemente como moléculas completas a través de la membrana (líneas de trazos). Cada semiquinona capta un electrón más del citocromo b, y con un protón procedente del interior de la mitocondria da a lugar a la forma hidroquinona (QH₂), que es el estado más reducido. Cada hidroquinona cede un electrón al citocromo c₁, y se libera al exterior el protón correspondiente. Los dos electrones restantes son devueltos al ciclo por medio del citocromo b, y se liberan los dos protones que faltaban para completar el número de seis. Por último, los dos electrones cedidos al citocromo c, atraviesan la membrana al pasar por los citocromos c, a y a₃ hasta llegar al oxígeno, que de esta forma es reducido a agua. El complejo F₀F₁-ATPasa completa el circuito de protones. En él, por cada dos protones introducidos se sintetiza una molécula de ATP. La energía generada por la gradiente de protones puede ser utilizada para otros procesos, como por ejemplo la reducción de NADP⁺ por NADH, el transporte de iones Ca⁺² y Na⁺, el intercambio de ADP por ATP, entre otros. Reproducido de Hinkle, P.C. y McCarty, R.E. (158).

potencial entre el NADH y el oxígeno es de alrededor de 1,2 voltios, y la intensidad total de las mitocondrias de un adulto en reposo es de aproximadamente 100 amperios, generándose 120 Watt de potencia (158).

La energía se almacena en la gradiente de protones en dos formas, es decir, la gradiente tiene dos componentes. Un componente es la diferencia de concentración o actividad química de los protones a ambos lados de la membrana. Los protones tienden a difundir desde una región con alta concentración hasta otra región con baja concentración cuando se establece una vía entre la membrana. La energía de la gradiente de concentración se determina por la diferencia de pH a través de la membrana. La carga eléctrica transportada por los protones da a lugar al segundo componente de la energía de la gradiente. El movimiento neto de cargas a través de la membrana crea una diferencia de potencial eléctrico y todas las partículas cargadas son afectadas por el campo electrostático resultante. La energía total de la gradiente de protones es la suma del componente químico o de concentración y del componente eléctrico (115).

Debido a la diferencia de concentración y de potencial eléctrico, un protón expulsado de una mitocondria experimenta una fuerza que tiende a introducirlo de nuevo. La entrada del protón en respuesta a esta fuerza puede utilizarse para efectuar un trabajo, como por ejemplo, el de la fosforilación del ADP, o la transhidrogenación, etc. También esta diferencia de potencial electroquímico puede utilizarse para la entrada de algún ión, como Ca^{+2} .

D. LA FOSFORILACION DEL ADP.

La enzima que cataliza la reacción de fosforilación del ADP o síntesis de ATP es el complejo ATP sintetasa o $\text{F}_0\text{F}_1\text{ATPasa}$ o $\text{H}^+\text{-ATPasa}$, que tiene

dos componentes principales llamados F_0 y F_1 . El componente F_1 tiene la forma de una esfera que sobresale de la membrana interna hacia la matriz y está unido a F_0 por un tallo. F_0 está incrustado en la membrana interna y se extiende a través de ella (Esquema 2). El sufijo de F_0 , la letra o, indica que es la porción de la ATP sintetasa que une al antibiótico tóxico oligomicina, potente inhibidor de esta enzima y por tanto de la fosforilación oxidativa.

F_1 aislado es incapaz de sintetizar ATP, solamente la hidroliza, razón por la cual se le conoce con el nombre de F_1 ATPasa.

F_1 se ha obtenido en forma de cristal (159). Tiene un peso molecular de alrededor de 380.000 daltons, contiene nueve subunidades de cadenas polipeptídicas de cinco diferentes tipos ordenadas dentro de un racimo, con varios sitios de unión para ATP y ADP. Estos cinco tipos de subunidades han recibido diferentes nombres, pero la terminología más comúnmente empleada se refiere a ellas como subunidades α , β , γ , δ , y ξ de acuerdo a sus pesos moleculares en orden decreciente.

Los H^+ son transportados a través de la bicapa de la membrana interna por el componente F_0 de la enzima, que es el canal de H^+ . La subunidad δ (y probablemente también la subunidad ξ) de F_1 está en contacto directo con el canal H^+ y actúa como un "tapón" del sistema F_0 de transporte de H^+ . La subunidad γ sufre cambios conformacionales que inducen la abertura o cierre del canal de H^+ por la subunidad δ (y la subunidad ξ). El "sensor" que determina los cambios conformacionales de la subunidad γ sería la subunidad β , la cual posee el sitio catalítico para la síntesis de ATP. La subunidad α parecería ser un regulador de la actividad de la enzima (160).

Las subunidades PCSO (proteína que confiere sensibilidad a

oligomicina) y F_6 son los factores de unión entre el componente F_1 y el componente F_0 , conforman el tallo de la enzima y no están relacionadas con la catálisis (160).

Existe también una proteína de bajo peso molecular llamada proteína inhibidora de la ATP sintetasa, que se une a la subunidad β para inhibir la actividad catalítica. El mecanismo involucrado en la liberación de esta proteína inhibidora para que se exprese la actividad, estaría gatillado por el potencial electroquímico (160).

El mecanismo por el cual la enzima cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP, fosfato inorgánico y energía electroquímica no ha sido completamente establecido. Una de las causas que ha dificultado la resolución del mecanismo, es el hecho que el sitio catalítico se encuentra en la subunidad β de la cual existen dos a tres especies dependientes unas de otras, por lo cual se requiere la integridad funcional de uno de los sitios para que funcionen los otros. Así, la ATP sintetasa posee dos a tres sitios catalíticos que funcionan en forma concertada.

Se han propuesto varias hipótesis para explicar cómo la enzima cataliza la síntesis de ATP. La diferencia principal de los tres mecanismos propuestos radica en la naturaleza de la fuerza que conduce a la síntesis de ATP.

En una de las hipótesis (A), los H^+ se utilizarían directamente en el sitio catalítico e inducirían la síntesis de ATP (161). Una vez formado el ATP ocurriría un cambio conformacional en F_1 que resultaría en su liberación. Inmediatamente se unirían nuevas moléculas de ADP y fosfato inorgánico en ese sitio y los H^+ conducirían la síntesis de una segunda molécula de ATP. No existen evidencias directas que apoyen este mecanismo, pero aún

esta proposición es válida.

En la hipótesis B, los protones fluirían a través del componente de la membrana para inducir un cambio conformacional en F_1 , el cual conduciría a la liberación de ATP ya existente en la enzima, simultáneamente se uniría ADP y fosfato inorgánico a un segundo sitio. Si la enzima tuviese tres subunidades β , se podría acomodar fácilmente un tercer sitio en este modelo (162). El hecho que la unión de inhibidores a una subunidad β suprime las propiedades catalíticas de la ATP sintetasa, sugiere que este mecanismo podría ser esencialmente correcto, sin embargo, la evidencia es indirecta pues la acción de inhibidores podría ser explicada por el mecanismo anteriormente enunciado o por el mecanismo siguiente.

En la hipótesis C, el flujo de H^+ induciría por medio de un reordenamiento de la estructura cuaternaria de F_1 , un cambio en la posición del sitio catalítico hacia un ambiente de menor constante dieléctrica. La síntesis de ATP se produciría cuando ADP y fosfato inorgánico, presentes en el sitio catalítico con ambiente de alta constante dieléctrica pasaran a un ambiente de menor constante dieléctrica (163). No existen evidencias directas que apoyen esta teoría.

La información disponible no favorece ninguna hipótesis en particular. Es posible que ninguna de ellas sea la correcta.

Para que la fosforilación oxidativa tenga lugar se requiere los sustratos ADP y fosfato inorgánico que son producidos principalmente en el medio extramitocondrial. El ATP sintetizado en las mitocondrias debe salir al citosol donde aportará la energía necesaria para que se realicen los procesos endergónicos. El paso de este compuesto a través de la membrana mitocondrial interna ocurre mediante un transportador específico. El

transportador de nucleótidos de adenina transporta específicamente una molécula de ADP hacia el interior de la mitocondria con una molécula de ATP que sale al citosol. El transportador consiste de una proteína ubicada a través de la membrana interna que es capaz de unir ADP en su sitio específico de la cara citosólica. El intercambio ADP/ATP es mediado por un cambio conformacional de esta proteína. Este transportador es inhibido específicamente por el glucósido atractilosido (Esquema 2) (47,164).

El fosfato inorgánico ingresa a la matriz mitocondrial en intercambio con iones OH^- a través de otro transportador (158). Este transportador específico para fosfato es inhibido por agentes que bloquean grupos $-\text{SH}$ como la N-etil maleimida (Esquema 2) (47). Evidencias recientes indican que fosfato entraría junto con H^+ hacia la matriz mitocondrial (74).

E. TRANSPORTE DE Ca^{+2} EN MITOCONDRIAS.

La membrana mitocondrial interna posee sistemas de transporte que promueven el movimiento de algunos metabolitos y de iones inorgánicos entre la matriz mitocondrial y el citosol circundante. Estos sistemas de transporte son elementos constituyentes de la compartimentalización y regulación de la energía del metabolismo y participan además en otras actividades metabólicas importantes (47).

Las mitocondrias de los tejidos animales pueden acumular también algunos cationes como Mn^{+2} , Fe^{+2} , Sr^{+2} y muy particularmente Ca^{+2} , en contra de altas gradientes (165).

Mitocondrias aisladas de hígado de ratas pueden acumular con alta afinidad Ca^{+2} desde el medio de suspensión hacia la matriz mitocondrial en un proceso energéticamente acoplado al transporte de electrones de la cadena respiratoria (166). La incorporación de Ca^{+2} en las mitocondrias es

impulsada principalmente por el potencial eléctrico negativo del lado interno de la membrana interna (alrededor de 180 mV) generado por el paso de electrones equivalentes a través de la cadena respiratoria, ya que en presencia de inhibidores de la cadena transportadora de electrones, la liberación de K^+ endógeno al usar valinomicina como ionóforo induce la incorporación de Ca^{+2} debido a que se ha generado un potencial de membrana (Esquema 2) (166).

Se ha observado durante la entrada de Ca^{+2} una estimulación en la respiración (167), cambios en los estados de óxido-reducción de algunos componentes de la cadena respiratoria (168) y liberación de protones (144,169). La energía requerida para la incorporación de Ca^{+2} puede ser obtenida no sólo de la oxidación de sustratos en la cadena respiratoria sino también de la hidrólisis de ATP. Esta incorporación tiene lugar a través de un transportador específico, presenta una cinética de saturación, es inhibida directamente por rojo de rutenio, La^{+3} y Mg^{+2} e indirectamente por N-etilmaleimida y otros reactivos que se unen a grupos sulfidrilos (170). El proceso es además estimulado por fosfato y otros aniones que transportan H^+ , tales como acetato, propionato, butirato y β -hidroxibutirato (171).

Por cada par de electrones transportado desde el NADH hasta el oxígeno se acumulan 6 iones Ca^{+2} procedentes del citosol y se postula que se liberan 6 (158) o 12 (170) iones H^+ . Por lo tanto, se acumularían 2 iones Ca^{+2} y se liberarían 2 a 4 iones H^+ por cada centro de conservación de energía, de tal manera que 2 iones Ca^{+2} producirían la misma cantidad de consumo extra de oxígeno que 1 molécula de ADP, en mitocondrias de mamíferos (165).

La energía liberada por el transporte de electrones puede emplearse tanto para llevar a cabo la acumulación de Ca^{+2} como para la síntesis de ATP, pero la acumulación de Ca^{+2} es predominante sobre la fosforilación de ADP (172).

Las mitocondrias pueden también liberar Ca^{+2} desde la matriz, proceso que se realiza a través de otro transportador, el cual es inhibido específicamente por el anestésico local nupercaina. En consecuencia existen por lo menos dos sistemas de transporte de Ca^{+2} , uno que opera principalmente como mecanismo de incorporación y otro como mecanismo de liberación de Ca^{+2} . La capacidad de las mitocondrias para incorporar y liberar Ca^{+2} permite que se origine un flujo de Ca^{+2} lento, continuo y cíclico a través de la membrana interna. Se ha sugerido que este ciclo de Ca^{+2} puede participar al menos en parte, en la regulación de la concentración de Ca^{+2} libre del citosol, que normalmente es muy baja, (aproximadamente 0,1 a 1 μM) en comparación con la que existe en el líquido extracelular, por lo menos 10^3 veces mayor (165,170,173,174).

Cualquier cambio en la velocidad de entrada o de salida de Ca^{+2} alteraría la distribución de Ca^{+2} entre el citosol y la matriz de las mitocondrias. Por otra parte se ha postulado también, que la función más importante del transporte de Ca^{+2} mitocondrial sería regular la concentración de Ca^{+2} intramitocondrial (173,174).

Los cambios de concentración de Ca^{+2} entre citosol y matriz mitocondrial, desencadenados por estímulos hormonales, eléctricos u otros, podrían modular procesos celulares tales como metabolismo, motilidad, excitosis, transporte a través de membrana, transmisión del impulso nervioso y división celular, ya que regularían las actividades de algunas enzimas como lipasas, fosfolipasas, proteínas quinasas, fosfodiesterasas y enzimas de la matriz mitocondrial que proporcionan equivalentes reductores a la cadena respiratoria (174).

En general las propiedades del proceso de incorporación de Ca^{+2}

descrito anteriormente, han sido observadas en mitocondrias de todos los tejidos de rata y en mitocondrias de varios tejidos de otros mamíferos, anfibios, reptiles, aves y peces, sin embargo no se ha observado el transporte de Ca^{+2} de alta afinidad en mitocondrias de alrededor de 15 diferentes plantas superiores, levaduras y hongos superiores (165).

F. EFECTOS NUTRICIONALES SOBRE LAS FUNCIONES DE LAS MITOCONDRIAS.

El metabolismo energético depende del estado nutricional en que se encuentra un ser viviente.

Los estudios de alteraciones en las actividades de las mitocondrias por diferentes estados nutricionales han sido principalmente orientados a los efectos que produce el ayuno por períodos no superiores a 7 días o a deficiencias en nutrientes específicos, pero muy poco se sabe sobre los efectos que produce una desnutrición drástica prolongada.

La respiración corporal total está disminuída en ratas ayunadas seis días. El ayuno produce además pérdida de peso corporal, pérdida de peso y disminución del contenido de proteínas de los diferentes órganos siendo en hígado > riñón > corazón. Estos cambios están acompañados por una mayor reducción de la actividad deshidrogenasa succínica en: hígado y riñón, pero en corazón no hay cambio significativo de esta actividad. El análisis de algunas actividades enzimáticas marcadoras para mitocondria (citocromo oxidasa), lisosoma (fosfatasa ácida), retículo endoplásmico (glucosa-6-fosfatasa) y membrana plasmática (5'-nucleotidasa) de hígado de rata, muestra que también están disminuídas (175). Además la cantidad de proteína, DNA y RNA mitocondrial es menor (176).

Se ha demostrado en corazón de ratas sometidas a ayuno durante siete días que los niveles de glucosa, fructosa-1,6-difosfato, lactato, alanina,

glutamato y ADP están disminuídos; los niveles de fructosa-6-fosfato, β -hidroxibutirato, acetoacetato y ATP están aumentados (177). Además los niveles de metabolitos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos: citrato, isocitrato, α -cetoglutarato, malato y oxalacetato están levemente aumentados. Se ha observado también, una marcada hipoglicemia, hipercetonemia e hipocitricemia. El flujo de metabolitos a través de la vía glicolítica está disminuído por inhibición de la fosfofructoquinasa (177, 178) y hay un aumento de la utilización de aminoácidos y una disminución de los lípidos como fuente energética, a pesar del alto nivel de cuerpos cetónicos circulantes. Por otra parte las actividades específicas de las enzimas mitocondriales isocitrato deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa y citocromo c oxidasa disminuyen en un 11 a un 23% (177).

En mitocondrias de hígado de ratas que han sido sometidas a ayuno durante una semana, las velocidades de oxidación de diferentes sustratos en los distintos segmentos de la cadena respiratoria están drásticamente disminuídas (179), pero no se observan cambios en la capacidad para oxidar lípidos, la velocidad de utilización de palmitoilcarnitina, la actividad específica de la carnitina palmitoiltransferasa y la producción de cuerpos cetónicos (180).

La composición de la dieta juega un papel importante en el metabolismo energético. Cuando se alimenta a ratas hembras durante la gestación, lactancia y después del destete con dieta de bajo contenido proteico (8%), se observa que el peso corporal y el peso húmedo del hígado son menores (181) y el potencial de crecimiento queda permanente deteriorado, aún cuando la rehabilitación nutricional se inicie al momento del destete (182). El consumo de oxígeno de las mitocondrias de hígado de estas ratas cuando los

sustratos son piruvato + malato es similar al de ratas controles durante la lactancia y destete. Cuando el sustrato es succinato el consumo de oxígeno del grupo alimentado con baja cantidad de proteínas es menor en el estado 3 y en el estado 4 en el período post-destete (181). Ratas alimentadas con dieta de "cafetería" con bajo contenido de proteínas (7%) depositan más grasa en sus tejidos que ratas controles, pero tienen menor crecimiento y menor eficiencia energética. La actividad de lanzadera de α -glicerofosfato es dos veces mayor en las mitocondrias de hígado de ratas sometidas a una dieta baja en proteínas que en organelos control (183).

Cambios en la cantidad o tipo de carbohidratos en la dieta materna afectan funciones de las mitocondrias de la progenie. Las velocidades de consumo de oxígeno y de síntesis de ATP en mitocondrias de hígado son menores en ratas alimentadas con sacarosa, ya sea en la lactancia a través de la madre o en la dieta después del destete, cuando se compara con ratas controles alimentadas con dietas que contienen almidón como fuente de carbohidratos (184).

La cantidad y composición de lípidos de la dieta es importante en la actividad de las mitocondrias. Al usar aceite de maravilla como fuente de lípidos se observa un aumento de la velocidad de consumo de oxígeno asociada con un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (185). La alimentación prolongada de ratas con lípidos de cadena larga como el ácido erúcido, altera la eficiencia del metabolismo oxidativo de una variedad de sustratos mitocondriales que son oxidados a nivel del sitio I o del sitio II de fosforilación (186,187), ya que la composición de los ácidos grasos ingeridos afecta la composición de los ácidos grasos del fosfatidilglicerol mitocondrial (188).

Deficiencias en vitamina E conducen a disminuir la respiración en mitocondrias de hígado de rata (189). Las mitocondrias se hinchan más rápidamente tanto en forma espontánea como en presencia de glutatión ya que la vitamina E estaría involucrada especialmente en la permeabilidad de la membrana (190). El efecto de deficiencia de vitamina E en la dieta puede ser contrarrestado con una dieta adecuada de vitamina C, la cual disminuye la susceptibilidad de peroxidación en el hígado y restituye la respiración y la velocidad de hinchamiento de mitocondrias a niveles normales (191).

Estudios realizados en músculo esquelético de ratas muestran que la carencia de fierro en la dieta produce disminuciones en las actividades oxidativas de las mitocondrias sin afectar la eficiencia de la respiración (192). Sin embargo, el contenido de las proteínas Fe-S y las actividades de las deshidrogenasas están disminuídas (193).

Por otra parte, hay una estrecha relación entre el nivel de lípidos en un tejido determinado y la cantidad de Ca^{+2} ingerido. Los niveles de colesterol, esfingomielinea y fosfatidiletanolamina son elevados en el hígado, en cambio, los fosfolípidos están disminuídos en el músculo esquelético y pulmón en animales deficientes en Ca^{+2} . Los niveles de triglicéridos en riñón, hígado, cerebro y tejido adiposo están aumentados en ratas alimentadas con una dieta rica en Ca^{+2} (194).

Los niveles de Ca^{+2} en cerebro y en tejido adiposo son más altos en ratas deficientes en Ca^{+2} (194). La naturaleza de los lípidos de la dieta puede afectar la composición de los ácidos grasos y fosfolípidos de la membrana mitocondrial y la formación de membranas que tengan estructura y configuración correctas parece ser esencial para una mayor capacidad oxidativa.

Dietas ricas en proteínas producen hipercalciuria (195), por

reducción de la reabsorción renal de Ca^{+2} (196), y aumento del Ca^{+2} fecal (197), aún cuando la actividad de las proteínas intestinales que unen Ca^{+2} no esté aumentada (198).

La desnutrición energética-proteica altera el contenido de DNA, RNA, colágeno y Ca^{+2} en mandíbula y en huesos largos de ratas en período de lactancia (199), además la actividad fosfatasa alcalina que está relacionada con la formación de la matriz ósea (200) y con el crecimiento y desarrollo del esqueleto (201), y la actividad fosfatasa ácida, relacionada con la reabsorción de los tejidos duros (202) se encuentran disminuídas principalmente en los huesos largos, ya que sus crecimientos críticos ocurren en el período post-natal. También el nivel sanguíneo de calcitonina, hormona capaz de regular la actividad de la fosfatasa alcalina, está disminuído (203).

G. PROPOSITOS DE ESTE ESTUDIO.

Es conocido el papel que juegan las mitocondrias en la transformación de la energía, en la regulación de los niveles de Ca^{+2} citoplasmático y la función que tiene Ca^{+2} de regular una serie de actividades celulares, pero muy poco se sabe sobre la influencia del estado nutricional en la actividad de la cadena respiratoria, transporte de Ca^{+2} y su estequiometría en mitocondrias intactas.

Como se ha señalado anteriormente, existen numerosos estudios del efecto de ayuno por períodos cortos de tiempo (no más de una semana), o de la cantidad de proteínas, o efecto de variaciones en la cantidad y la calidad de carbohidratos y lípidos de la dieta sobre la actividad oxidativa mitocondrial y en algunos casos sobre la absorción y excreción de Ca^{+2} , sin embargo, no existe información sobre el efecto de una desnutrición proteica

drástica en la fosforilación oxidativa y en la incorporación de Ca^{+2} por mitocondrias.

Actualmente, más de la mitad de la población mundial padece en alguna medida de problemas nutricionales (204,205) que provocan importantes alteraciones en el sistema oxidativo mitocondrial, entre otros. Estudios de este tipo son de gran importancia en países en vías de desarrollo como el nuestro, cuya población, en proporción importante sufre de problemas nutricionales.

Los estudios realizados para esta Tesis se enfocaron hacia los efectos de una desnutrición energética-proteica prolongada sobre la fosforilación oxidativa y la incorporación de Ca^{+2} acoplada al transporte de electrones en mitocondrias aisladas de hígado de ratas, y sobre las relaciones estequiométricas de las razones $\text{Ca}^{+2}/\text{sitio}$ y H^+/sitio .

La relación estequiométrica entre los protones liberados y el transporte de electrones es un tema de mucho interés, por la fundamental importancia que tiene el cociente H^+/sitio (número de protones liberados por par de electrones que pasan a través de un sitio conservador de energía) en el análisis del mecanismo de acoplamiento de la energía respiratoria.

La mayoría de los datos disponibles al respecto ha sido obtenida de mitocondrias de hígado de ratas normalmente alimentadas. Es necesario por lo tanto disponer de datos estequiométricos sobre mitocondrias de distinta procedencia, para comprobar la generalidad de las conclusiones obtenidas hasta ahora. Las mitocondrias aisladas de animales con desnutrición drástica constituyen un interesante sistema para estudiar estos parámetros.

H. PRINCIPALES RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en esta Tesis muestran que las velocidades de oxidación de sustratos estimuladas por la fosforilación de ADP o por la incorporación de Ca^{+2} y los índices de control respiratorio están significativamente disminuídos en los tres sitios de acoplamiento en mitocondrias que provienen de ratas desnutridas, pero la velocidad de incorporación de ADP, las razones ADP/O cuando se sintetiza ATP, y las razones Ca^{+2} /sitio y H^+ /sitio cuando se incorpora Ca^{+2} , no están afectadas. Además la actividad ATPasa es menor en organelos de animales desnutridos. Estos resultados sugieren que la desnutrición drástica originada por una dieta carente de proteínas afecta la fosforilación oxidativa y la incorporación de Ca^{+2} , probablemente por la disminución del contenido de los citocromos $a+a_3$, sin embargo las relaciones estequiométricas de ambos procesos no presentan alteraciones.

MATERIALES Y METODOS

I. MATERIALES.

A. MATERIAL BIOLÓGICO.

Los hígados se obtienen de ratas machos de 35 días de edad de la cepa Wistar, proporcionadas por el vivero del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, División Ciencias Médicas Norte, Universidad de Chile.

B. REACTIVOS.

Acido ascórbico, ácido p-amino benzoico, ácido etilenglicol-bis (β -aminoetil éter), N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), ácido fólico, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico (Hepes), ácido nicotínico, adenosina-5'-difosfato (ADP), adenosina-5'-trifosfato (ATP), albúmina de suero de bovino cristalizada y liofilizada (ASB), antimicina A, arsenito de sodio, atracilosido (ATR), 1,4-bis-[2-(5-feniloxazolil)] benceno (POPOP), carbonato de sodio, carbonil cianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP), α -celulosa, citocromo c, clorhidrato de tiamina, cloruro de colina, desoxicolato de sodio, 2,5-difeniloxazol (PPO), N-etilmaleimida (NEM), α -D(+)-glucosa, myo-inositol, β -nicotinamida adenina dinucleotido forma reducida (NADH), oligomicina, pantotenato de calcio, piridoxina, retinol, riboflavina, rotenona, sacarosa, sulfato de magnesio, N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD), α -focofe-rol, vitamina B₁₂, vitamina D₂ y vitamina K, son productos de Sigma Chemical Co., St. Louis., U.S.A.; ácido acético, ácido clorhídrico 0,1 N patrón, ácido succínico, ácido tricloroacético (ATC), citrato de sodio, cloruro de calcio, cloruro de cobalto, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, cloruro de zinc, ditionito de sodio, ferricianuro de potasio, fósforo de potasio

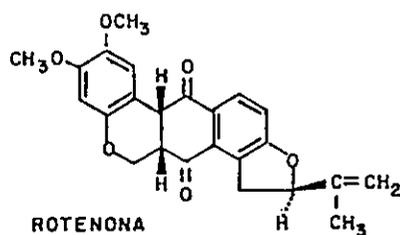
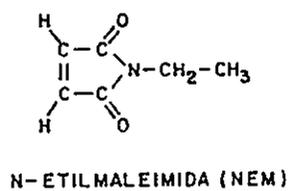
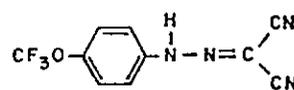
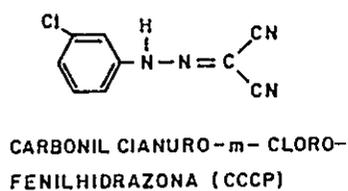
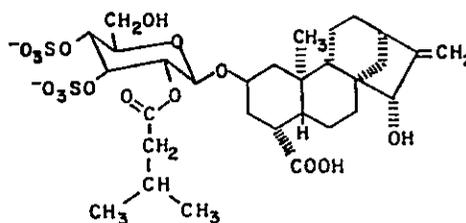
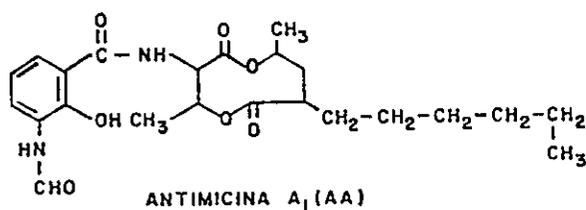


Figura 1. Estructura Química de Algunos Compuestos Usados.

monobásico, fosfato monocálcico dihidratado, fluoruro de sodio, selenito de sodio, sulfato de cobre, sulfito de sodio y yoduro de potasio son productos de E. Merk AG-Darmstat, West Germany; citrato ferroso y sulfato de manganeso son productos de J.T. Baker Chemicals Co., Phillipsburg, N.J., U.S.A.; cloruro de sodio y molibdato de amonio tetrahidratado son productos de May y Baker Ltd., Dagenham, England; hidróxido de potasio es un producto de Analar BDH Chemical Ltd., Poole, England; cloruro de litio es un producto de Fisher Scientific Co., Fair Lawn, N.J., U.S.A.; ácido L-glutámico es un producto de General Biochemicals, Chagrin Falls, Ohio, U.S.A.; cloruro de calcio 0,1 N patrón es proporcionado por Radiometer, Copenhagen, Denmark; ^{14}C -adenosina-5'-difosfato (^{14}C -ADP), sal trisódica, 50.0 mCi/mmol es un producto de New England Nuclear, Boston, U.S.A.; tolueno es un producto proporcionado por Shell Chile S.A., Viña del Mar, Chile; aceite de maíz Topacio^(R) es un producto de Industria Nacional de Alimentos Ltda., Santiago, Chile; almidón de papa (chuño) es un producto de N. Daetz Cía. Ltda., Llanquihue, Chile; almidón de maíz Maicena^(R) es un producto de Industrias de Maíz y Alimentos S.A., Llay-Llay, Chile; azúcar flor Florencia^(R) es un producto de Comercial Florencia Ltda., Santiago, Chile; crema de leche Pac^(R) es un producto de Pac-Yeli Productos Lácteos Ltda., Santiago, Chile, y manteca hidrogenada vegetal es un producto de COPRONA S.A., Santiago, Chile.

II. METODOS.

A. TRATAMIENTOS DE LOS ANIMALES Y DIETAS.

Se usaron los siguientes grupos de animales:

a) *Grupo con Desnutrición Energética-Proteica Drástica (DEPD).*

La desnutrición energética-proteica drástica (DEPD) se provoca con el siguiente modelo experimental: al momento de nacer, 16 crías de la misma camada son alimentadas por una nodriza durante 21 días. Se destetan y por un período de 14 días se les ofrece agua y una dieta sin proteínas ad libitum, cuya composición se muestra en la Tabla I (206).

b) *Grupo Normal.*

Al momento de nacer, 8 crías de la misma camada son alimentadas por una nodriza durante 21 días. Se destetan y durante 14 días se les proporciona agua y una dieta balanceada cuya cantidad de proteínas es no menor de 22,5% ad libitum, adquirida en FABALIM, Chile.

B. PREPARACION DE MITOCONDRIAS.

Las mitocondrias de hígado de ratas machos de 35 días de edad de ambos grupos son aisladas por el procedimiento usual de nuestro laboratorio descrito por Gil y col., (207). Los animales son sacrificados por decapitación. Los hígados son extraídos y depositados en un vaso de precipitado que contiene alrededor de 20 ml de sacarosa 0,25 M ajustada a pH 7,2. Una vez determinado el peso, los hígados se trozan y se lavan varias veces con sacarosa 0,25 M (pH 7,2), se suspenden en nueve volúmenes de medio de homogenización (sacarosa 0,25 M, EGTA 0,5 mM y ASB al 1% p/v, pH 7,2) y se homogenizan suavemente con tres pasos a 50 rpm en un homogenizador de vidrio con bástago de teflón.

El homogeneizado se centrifuga a 600 x g durante 10 min para descartar los núcleos y las células que no se han roto. La fracción sobrenadante se centrifuga a 10.000 x g durante 10 min.

TABLA I

Composición porcentual de los ingredientes de la dieta sin proteínas.

Ingredientes	%
Almidón de Maíz	31,30
Crema de leche	31,30
Glucosa	7,82
Grasa vegetal	6,26
Aceite de maíz	6,26
Almidón de papa	4,69
Mezcla de minerales ^a	3,13
α -celulosa	3,13
Mezcla de vitaminas hidrosolubles ^b	1,88
Mezcla de vitaminas liposolubles ^c	1,25

a) La mezcla de minerales contiene (en porcentaje): K_2HPO_4 32,77; $CaCO_3$ 30,48; NaCl 17,02, $MgSO_4$ 10,36; $CaHPO_4 \times 2H_2O$ 7,62; citrato de hierro 1,02; $MnSO_4$ 0,51; $ZnCl_2$ 0,08; $CuSO_4$ 0,051; KI 0,010; NaF 0,010; $CoCl_2$ 0,003, y Na_2SeO_3 0,0005.

b) La mezcla de vitaminas hidrosolubles contiene(en g/Kg de mezcla de vitaminas): cloruro de colina 31,50; ácido p-aminobenzoico 15,80; pantotenato de calcio 7,89; riboflavina 7,89; clorhidrato de tiamina 6,31; inositol 3,20; ácido nicotínico 1,58; clorhidrato de piridoxina 0,16; ácido fólico 0,16; biotina 0,03 y vitamina B_{12} 0,0016, y almidón de maíz 946,40.

c) La mezcla de vitaminas liposolubles contiene(en g/kg de mezcla de vitaminas): α -tocoferol 50,0; retinol 0,45; vitamina K 0,05, y vitamina D_2 0,0075, y almidón de maíz 950,0.

El sedimento obtenido se suspende suavemente en 1/3 del volumen original con sacarosa 0,25 M, pH 7,2 y se centrifuga a 10.000 x g durante 10 min. El sedimento obtenido se suspende suavemente en la mitad del último volumen con sacarosa 0,25 M, pH 7,2. El sedimento final se suspende suavemente en sacarosa 0,25 M, pH 7,2 y se ajusta a una concentración de proteína de 50 mg/ml.

Todos los pasos se realizan entre 0-4°C, se utiliza una centrífuga Sorvall modelo RC-2B con un rotor SS-34.

C. PREPARACION DE PARTICULAS SUBMITOCONDRIALES.

Las partículas submitocondriales se obtienen mediante ruptura por ultrasonido de las mitocondrias de hígado de ratas normales y desnutridas según una modificación del método de Ruzicka y Crane (208). Las mitocondrias se suspenden en sacarosa 0,25 M (pH 7,2) a una concentración de proteína de 30 mg/ml. La sonicación se realiza en un sonicador Braun-Sonic 1510 con un bástago de titanio de tamaño intermedio (127 mm de longitud y 9,5 mm de diámetro) a una potencia de 200 Watt. Para establecer las mejores condiciones de sonicación, se midió la actividad NADH oxidasa en función del tiempo de sonicación para ambos tipos de partículas submitocondriales. La Figura 1 muestra que las más altas actividades NADH oxidasa se obtienen al sonicar 7 veces durante 1 min, con intervalos de 3 min, para mitocondrias de ratas normales y 5 sonicaciones de 1 min con iguales intervalos para mitocondrias de ratas desnutridas. Todas las sonicaciones se realizan en un vaso de precipitado de 30 ml enfriado por una solución de NaCl en hielo. El sobrenadante que se obtiene al centrifugar a 26.000 x g durante 15 min en una centrífuga Sorvall con un rotor SS-34, se centrifuga a 105.000 x durante 45 min en una centrífuga Beckman L2-65B con un rotor tipo 40. El sedimento

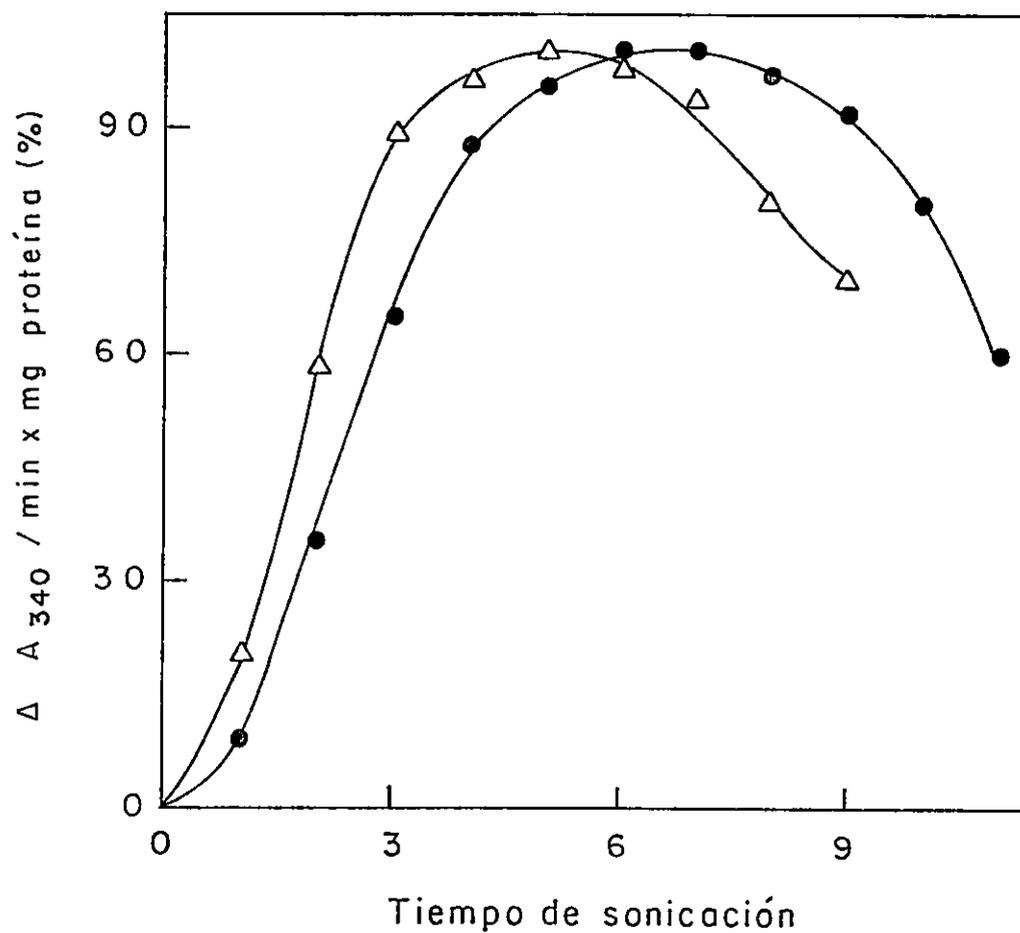


Figura 2. Efecto del Tiempo de Sonicación de Mitochondrias Normales y con DEP sobre la Actividad NADH-Oxidasa.

Figura 2. Efecto del Tiempo de Sonicación de Mitocondrias Normales y con DEPD sobre la actividad NADH-Oxidasa. Las velocidades de oxidación de NADH por mitocondrias de hígado de ratas normales (●) y con DEPD (Δ) se miden como se describe en la sección de Materiales y Métodos a los tiempos de sonicación indicados. El sistema de ensayo en un volumen de 3,0 ml contiene: fosfato de potasio 100 mM (pH 7,4), citocromo c 0,032 mM, NADH 0,075 mM y 1 mg de proteína mitocondrial. Los resultados se expresan como porcentaje de la actividad mayor que se alcanza a un tiempo de sonicación. La velocidad de oxidación de NADH correspondiente a 100% de actividad es $0,050 \pm 0,004 \Delta A_{340}/\text{min}$ por mg de proteína de mitocondrias de hígado de ratas normales y $0,035 \pm 0,004 \Delta A_{340}/\text{min}$ por mg de proteína de mitocondrias de hígado de ratas con DEPD. Los valores son los promedios \pm D.S. para cinco (normal) y seis (con DEPD) determinaciones independientes de grupos de ratas. Significancia (normal contra desnutridas) $P < 0,025$.

de 105.000 g que contiene las partículas submitocondriales se lava 2 veces con sacarosa 0,25 M (pH 7,2), centrifugando a 105.000 x g durante 45 min cada vez. Las partículas submitocondriales se resuspenden en sacarosa 0,25 M, pH 7,2 a una concentración de proteína entre 15-20 mg/ml y se guardan a -20°C.

D. DETERMINACION DE: CONSUMO DE OXIGENO, MOVIMIENTO DE PROTONES E INCORPORACION DE ION Ca^{+2} EN MITOCONDRIAS INTACTAS.

a) Consumo de Oxígeno.

Se mide polarográficamente con un electrodo de tipo Clark N°5331 (Yellow Springs Instrument Co.). La señal es amplificada por un monitor de oxígeno YSI modelo 53 y registrada en un inscriptor de 1 canal Goerz RE 511, cuya diferencia de potencial de entrada es 100 mV. La solubilidad del oxígeno del aire en agua a 25°C y 760 mm de Hg de presión atmosférica es 516 nanoátomo-gramos/ml. Se usa esta solución como patrón para calibrar el electrodo de oxígeno 100% de saturación, previa corrección de la presión atmosférica, y el 0% de saturación se calibra al agregar cristales de ditionito de sodio o una solución neutra o débilmente básica de sulfito de sodio 0,02 M burbujeada previamente con nitrógeno (209).

b) Movimiento de H^+ .

Se mide con un electrodo combinado de vidrio (Thomas 4094 L25) de respuesta rápida y de alta sensibilidad. La señal de electrodo es amplificada por un medidor de pH digital Orion modelo 801 y registrada en un segundo inscriptor de 1 canal Goerz modelo RE 511, cuya diferencia de potencial de entrada es 10 mV. Las cantidades absolutas del movimiento de H^+ se determinan por titulación con patrón HCl 0,1 N.

c) *Incorporación de ión Ca^{+2} .*

Se mide con un electrodo selectivo para ión Ca^{+2} (Radiometer, F 2112 Calcium Selectrode). La señal de electrodo es amplificada por un medidor de pH Radiometer modelo PHM 84 Research y registrada en un inscriptor de 1 canal Goerz modelo RE 511, cuya diferencia de potencial de entrada es 1 V. Las cantidades absolutas de Ca^{+2} incorporado se determinan utilizando una solución patrón de CaCl_2 0,1 N.

Los medios de reacción para determinar consumo de oxígeno, movimiento de H^+ e incorporación de Ca^{+2} en un volumen de 2,0 o 5,0 ml contenían LiCl 117 mM, KCl 13 mM, Hepes 3 mM (pH 7,2), fosfato de potasio 0-2 mM (pH 7,2) y 1,25-2,50 mg de proteína mitocondrial/ml (210). La concentración de los diferentes sustratos fue: glutamato 2,0 mM, o succinato 2,5 mM, o ascorbato 5,0 mM + TMPD 0,5 mM. Otras adiciones fueron las siguientes: ADP entre 0,1-0,2 mM, ión Ca^{+2} (CaCl_2) entre 0,0-0,2 mM, rotenona entre 0-6 μM antimicina A entre 0,0-0,6 μM y CCCP 0,1 μM ; según se indica en las Tablas y Figuras. Los sistemas de incubación fueron equilibrados con mitocondrias durante 2 min a 25°C antes de la determinación de las velocidades de consumo de oxígeno, movimiento de H^+ e incorporación de Ca^{+2} . Los valores representan el promedio de experimentos independientes como se indica en las correspondientes Tablas y Figuras. Todas las determinaciones se realizaron inmediatamente de obtenidas las mitocondrias.

E. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD NADH OXIDASA.

Esta actividad se midió utilizando una modificación del método descrito por Singer (211). El sistema de ensayo en un volumen de 3 ml contenía: fosfato de potasio 100 mM (pH 7,4), citocromo c 0,032 mM, NADH entre 0,0075-0,075 mM y 0,12 mg de partículas submitocondriales. La disminución

de la absorbancia a 340 nm (A_{340}) se midió en un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu modelo UV-210 A.

F. ACTIVIDAD ADENOSINA TRIFOSFATASICA

La hidrólisis del ATP por el complejo H^+ -ATPasa (EC 3.6.1.3) se determinó en mitocondrias intactas de hígado de ratas normales y desnutridas. El medio de reacción en un volumen de 2,0 o 5,0 ml contenía diferentes combinaciones, según se indica en las respectivas Tablas y Figuras, de los reactivos: sacarosa 0-250 mM, LiCl 0-117 mM, NaCl 0-50 mM, KCl 0-50 mM, manteniendo la osmolaridad entre 0,25-0,26 osM; Hepes 10 mM (pH 7,4) y 2-5 mg de proteína mitocondrial. Los sistemas se preincubaron durante 3 min a 25°C; y se agregó simultáneamente ATP 3 mM y CCCP 0-1 μ M, según se indica en las respectivas Tablas y Figuras, para iniciar la reacción. Otras adiciones fueron: succinato 5 mM, rotenona 1,6 μ M, antimicina A 0,16 μ M, oligomicina 1 μ g/mg de proteína, atractilosido 0,01 mM, ión Mg^{+2} ($MgCl_2$) 150 μ M e ión Ca^{+2} ($CaCl_2$) 0,2 mM.

A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 0,2 ml las que se transfirieron a tubos Eppendorf de 1,5 ml de capacidad que contenían 0,2 ml de ATC 20% p/v (concentración final 10%). Después de ser centrifugados a 12.000 x g durante 15 seg, se determinó el fosfato inorgánico (Pi) en el sobrenadante según el método descrito por Baginski y col., (212) que consiste en: a 0,2 ml de sobrenadante se agrega 1,0 ml de reactivo A-ATC (ATC 10% p/v y ácido ascórbico 2% p/v), 0,5 ml de molibdato de amonio tetrahidratado 1% p/v, 1 ml de reactivo A-C (ácido acético 2% p/v, citrato de sodio 2% p/v y arsenito de sodio anhidro 2% p/v) y 0,3 ml de agua. Después de 15 min, se mide la absorbancia a 700 nm en un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu modelo UV-210 A, usando como referencia 37,5 nmoles de fosfato de

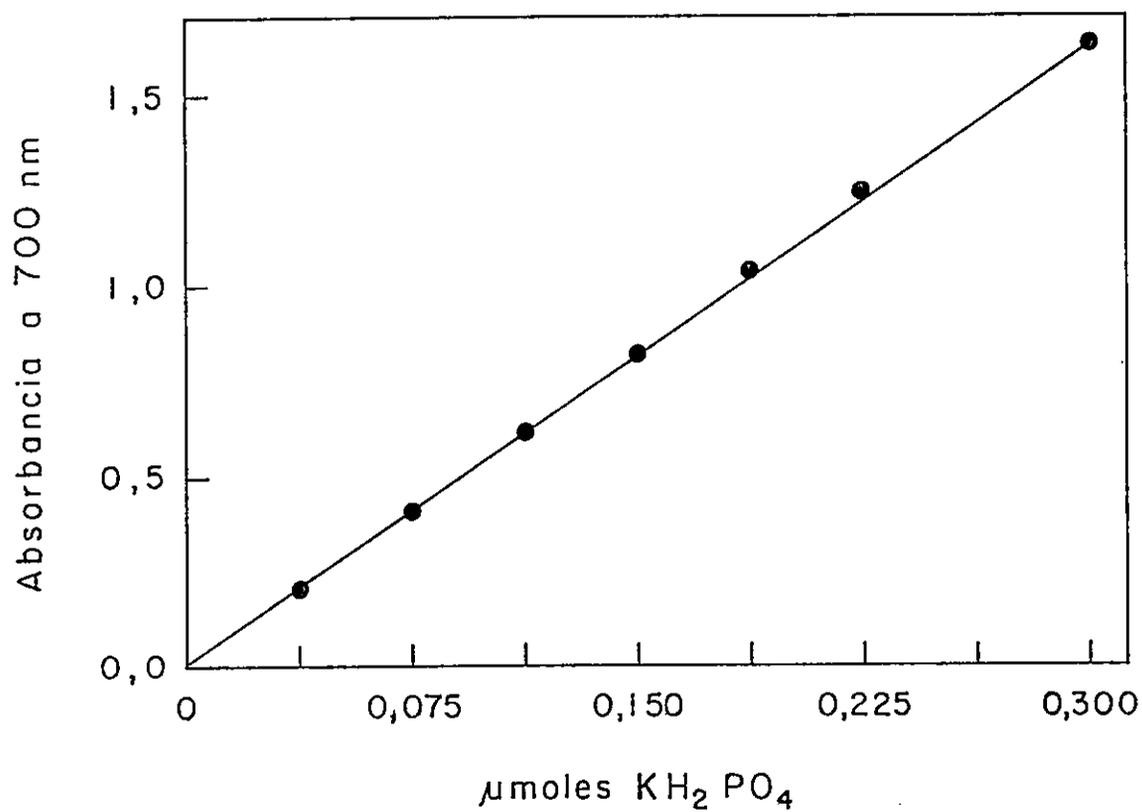


Figura 3. Curva de Calibración para la Determinación de la Cantidad de P_i . Se utiliza como patrón una solución de KH_2PO_4 1,5 mM. Las determinaciones se realizan como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

potasio monobásico. La Figura 2 muestra una curva de calibración con fosfato de potasio.

G. VELOCIDAD DE HINCHAMIENTO DE LAS MITOCONDRIAS.

La velocidad de hinchamiento de las mitocondrias de hígado de ratas normales se midió mediante una modificación del método descrito por Brierley y col., (213). El método se basa en la disminución de la absorbancia de una suspensión mitocondrial producida por la entrada de un compuesto capaz de arrastrar agua. El medio de suspensión de 1,0 ml contiene: sacarosa 0,15-0,25 M, KCl 0-50 mM, Hepes 10 mM (pH 7,4) y 1 mg de proteína mitocondrial. El sistema se preincubó durante 3 min a 25°C, y se agregó simultáneamente ATP 3 mM y CCCP 1 μ M en presencia o ausencia de ATR 0,01 mM, según se indica en la Tabla o la Figura respectiva. La disminución de la absorbancia a 540 nm (ΔA_{540}) se midió en un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu modelo UV-210 A.

H. DETERMINACION DEL CONTENIDO DE CITOCROMOS.

La determinación cuantitativa de los 4 citocromos: $a+a_3$, b, c_1 y c se efectuó simultáneamente en una alícuota de la suspensión de mitocondrias de ratas desnutridas y normales, de acuerdo al método de Williams (214). El espectro diferencial entre 650 nm y 500 nm se determinó a 25°C en un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu modelo UV-210 A. La muestra reducida con cristales de ditionito de sodio contenía en 1 ml: 5 mg de proteína mitocondrial, fosfato de potasio 20 mM (pH 7,4), desoxicolato de sodio 2% p/v y ascorbato de sodio 5 mM, y la referencia oxidada contenía en 1 ml: 5 mg de proteína mitocondrial, fosfato de potasio 20 mM (pH 7,4), desoxicolato de sodio 2% p/v y ferricianuro de potasio 5 mM. Las concentraciones

de los citocromos se calcularon según el método de Williams (214). Las contribuciones de los citocromos a la máxima y mínima absorbancia de cada citocromo en particular son conocidas, (Tabla II) de manera que se pueden formular simultáneamente 4 ecuaciones con 4 incógnitas:

$$21,0 X_1 + 10,3 X_2 - 3,12 X_3 + 0,63 X_4 = a_{15} = \Delta A_{550-535}$$

$$6,51 X_1 + 18,8 X_2 + 2,55 X_3 + 0,95 X_4 = a_{25} = \Delta A_{554-540}$$

$$-1,16 X_1 + 0,91 X_2 + 14,3 X_3 - 0,326 X_4 = a_{35} = \Delta A_{563-577}$$

$$-0,22 X_1 - 0,59 X_2 + 0,0 X_3 + 12,0 X_4 = a_{45} = \Delta A_{605-630}$$

donde:

$$X_1 = (\text{citocromo c}) \mu\text{moles/ml}$$

$$X_2 = (\text{citocromo } c_1) \mu\text{moles/ml}$$

$$X_3 = (\text{citocromo b}) \mu\text{moles/ml}$$

$$X_4 = (\text{citocromos } a+a_3) \mu\text{moles/ml}$$

I. INCORPORACION DE ^{14}C -ADP A MITOCONDRIAS.

La incorporación de ADP a mitocondrias de hígado de ratas normales y desnutridas se midió según el método descrito por Winhler y col., (215), con algunas modificaciones. Las mitocondrias de hígado de ambos tipos de ratas (0,6 mg de proteína) se incubaron a 5°C con agitación constante en un volumen de 0,2 ml de medio que contenía: LiCl 117 mM, KCl 13 mM, Hepes 10 mM (pH 7,4). Para iniciar la incorporación se agregó ^{14}C -ADP 0,25 mM (0,1 $\mu\text{C/ml}$). La incorporación se detuvo con 0,02 ml de ATR 0,01 mM a los tiempos que se indican. Alícuotas de 100 μl (0,3 mg de proteína) se colocaron en filtros de nitrocelulosa (Schleicher y Schuell, grado BA 85, tamaño del poro 0,45 μ), previamente enfriados por paso 5 ml de medio de incubación entre 0-4°C, bajo vacío parcial. El medio de suspensión fue arrastrado inmediatamente a través del filtro por medio de vacío para separarlo de las

TABLA II

Cambios de los coeficientes de extinción mM de los espectros diferenciales (reducido contra oxidado) de los citocromos de la cadena respiratoria.

Citocromos	pares de longitudes de onda			
	605 - 630	563 - 577	554 - 540	550 - 535
	Δ absorbanza mmoles ⁻¹ cm ⁻¹			
a + a ₃	12,0	-0,326	0,95	0,63
b	0	14,3	2,55	-3,12
c ₁	-0,59	0,91	18,8	10,3
c	-0,22	-1,16	6,51	21,0

Valores obtenidos de Williams, J.N.Jr. (214)

mitocondrias. Las mitocondrias adheridas al filtro se lavaron rápidamente con una solución de sacarosa 0,25 M fría entre 0-4°C para remover el medio adherido y el nucleótido unido inespecíficamente. Los filtros se secaron y se colocaron en tubos de centelleo (POP 0,4% p/v, POPOP 0,2% p/v disueltos en tolueno). La incorporación de nucleótido a las mitocondrias se determinó en un contador de centelleo para muestras líquidas Tracor Analytical Delta 300.

J. DETERMINACION DEL CONTENIDO DE PROTEINAS.

El contenido de proteínas se determinó en 3 ml de suspensiones de mitocondrias diluidas 500-1000 veces y en 3 ml de suspensiones de partículas submitocondriales diluidas 200-500 veces en agua. La diferencia de absorbancia entre 215 y 225 nm ($\Delta A_{215-225}$) se midió en un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV-210 A. Los valores obtenidos en cada oportunidad, se compararon con los valores que corresponden a 50 y 100 μ g de ASB, de acuerdo al método de Murphy y Kies (216). La Figura 3 muestra una curva de calibración con ASB.

K. ANALISIS ESTADISTICO.

Los datos experimentales se analizaron por el test t de Student. El número de observaciones separadas y las desviaciones estándares de las medias se indican en las diferentes Tablas. Los valores de las Figuras se analizaron por el método de regresión lineal (217).

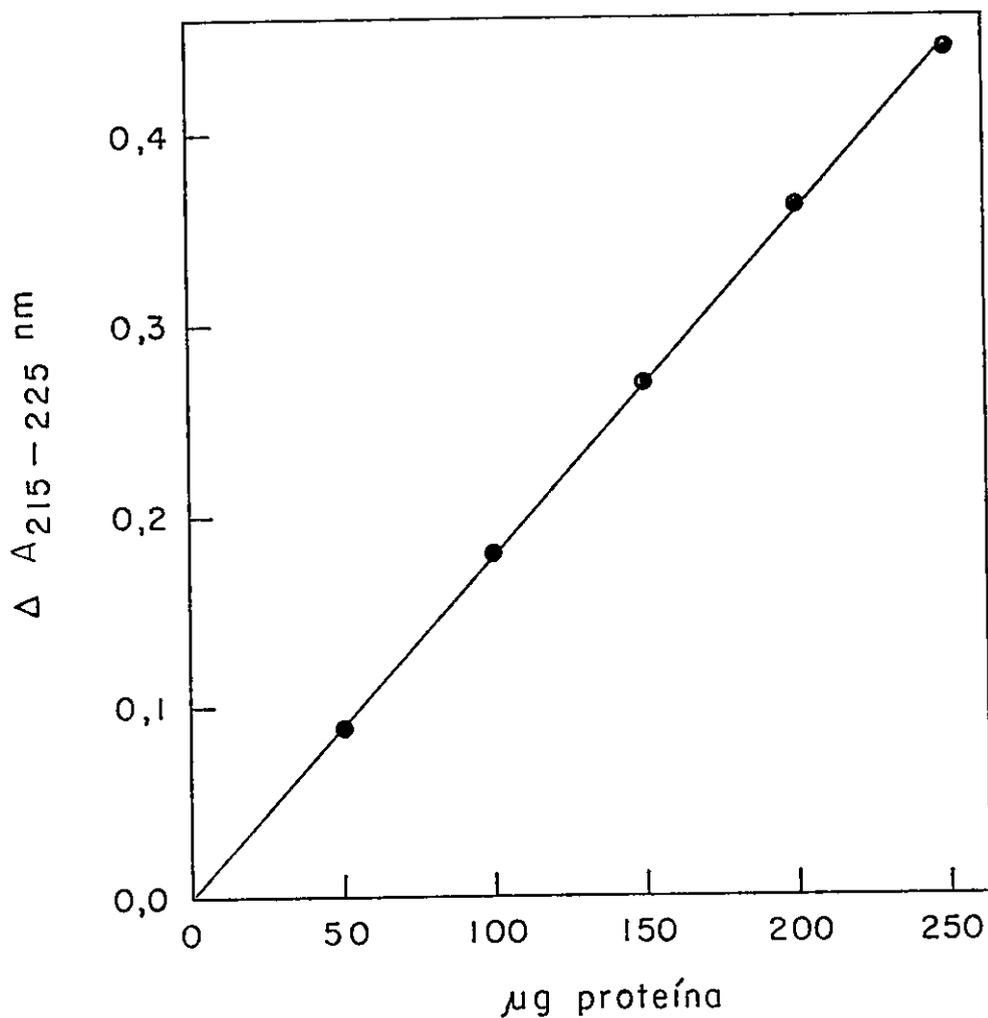


Figura 4. Curva de Calibración para la Determinación de la Cantidad de Proteínas. Se utiliza como patrón una solución de albúmina de suero de bovino (ASB) 500 $\mu\text{g/ml}$. Las determinaciones se realizan como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

RESULTADOS

A. PESO CORPORAL, PESO HUMEDO DEL HIGADO , INGESTA DE ALIMENTO Y CONTENIDO DE PROTEINA MITOCONDRIAL DEL HIGADO.

El modelo de desnutrición usado en este estudio provoca cambios drásticos en el peso corporal, peso del hígado y en el contenido de proteína mitocondrial de ratas macho de 35 días de edad. Al momento de nacer, las crías de ambos sexos presentan un peso corporal promedio de $6,2 \pm 0,5$ g y un peso húmedo promedio del hígado de $0,25 \pm 0,04$ g. Cuando se colocan 16 crías por nodriza la disponibilidad de alimento es menor que para el grupo normal que consiste en sólo 8 crías por nodriza. Al destete el peso corporal promedio del grupo de ratas macho con DEPD es menor que el que presenta el grupo de ratas normales: $35,5 \pm 2,2$ g (normal) y $25,0 \pm 2,2$ g (DEPD). El peso húmedo promedio de los hígados también es menor en el grupo de ratas con DEPD, los valores son $1,50 \pm 0,12$ g y $0,82 \pm 0,07$ g para ratas normales y con DEPD respectivamente.

Las crías se separan por sexo cuando se destetan. El grupo con DEPD es alimentado durante 14 días con una dieta sin proteínas y el grupo normal con una dieta balanceada comercial cuyo contenido de proteínas es no menor de 22,5% p/p, extracto etéreo no menor de 6,0% p/p y de fibra cruda no mayor de 5,0% p/p.

El contenido en calorías de la dieta sin proteínas es alto (5,81 Kcal/g), pero la ingesta es baja. Las ratas con DEPD de 35 días de edad ingieren en promedio sólo 1,57 g/rata por día, lo cual equivale a 9,1 Kcal/rata por día. Las ratas alimentadas con la dieta normal ingieren

6,3 g/rata por día, equivalente a 21,48 Kcal/rata por día (Tabla III).

La Tabla III muestra además que en el grupo de ratas con DEPD el peso corporal promedio está disminuido 5 veces y el peso húmedo promedio de los hígados 6,4 veces con respecto al grupo normal. Además, la cantidad de proteína mitocondrial promedio de los hígados es 27% menor en el grupo con DEPD.

Esta menor cantidad de proteína mitocondrial se debería a una disminución neta del número de mitocondrias, ya que el número de mitocondrias/mg de proteína mitocondrial permanece inalterado ($1,03 \times 10^8 \pm 2,00 \times 10^5$ y $0,98 \times 10^8 \pm 1,5 \times 10^5$ mitocondrias/mg de proteína mitocondrial de hígados de ratas normales y con DEPD respectivamente).

B. ALTERACIONES EN LA FOSFORILACION OXIDATIVA.

a) *Actividades Oxidativas.*

1. Efecto de Rotenona y Antimicina A sobre las Velocidades de Oxidación de Diferentes Sustratos en Mitocondrias Desacopladas con CCCP.

Glutamato, succinato y ascorbato + TMPD son algunos de los sustratos que se oxidan respectivamente a nivel de los sitios I, II y III de fosforilación.

Cuando se desea determinar la velocidad de oxidación de succinato, se utiliza rotenona para inhibir la oxidación de sustratos endógenos que se oxidan a nivel del sitio I (216).

La Figura 5 muestra el efecto de diferentes concentraciones de rotenona sobre las velocidades de consumo de oxígeno durante la oxidación de glutamato o succinato por mitocondrias de hígado de ratas normales y con DEPD desacopladas con CCCP. Se puede apreciar que a concentraciones

TABLA III
 Efectos de la Desnutrición Drástica sobre el Peso Corporal, Peso Húmedo del Hígado, Ingesta de Alimentos y el Contenido de Proteínas Mitocondrial.

	<u>NORMALES</u>	<u>DESNUTRIDAS</u>
Peso Corporal (g)	101,9 ± 8,6	20,0 ± 1,9 **
Peso Húmedo del Hígado (g)	4,96 ± 0,82	0,77 ± 0,09 **
Ingesta de Alimento (Kcal/día)	21,48 ± 2,20	9,10 ± 0,58 **
Proteína Mitocondrial (mg/g de hígado)	30,5 ± 7,2	22,3 ± 4,9 *

Todas las determinaciones fueron realizadas en ratas de 35 días de edad. Las mitocondrias de los hígados de ratas normales y desnutridas se aíslan según el método descrito en la sección de Materiales y Métodos. El contenido de proteínas mitocondrial se determina por el método de Murphy y Kies (221). Los valores son las medias ± S.D. para veinte y nueve (normales) y diecinueve (desnutridas) determinaciones independientes de grupos de ratas (grupo normal = 2-3 ratas, grupo desnutrido = 4-9 ratas). Sig nificación (normales contra desnutridas): *p 0.01: **p 0.001.

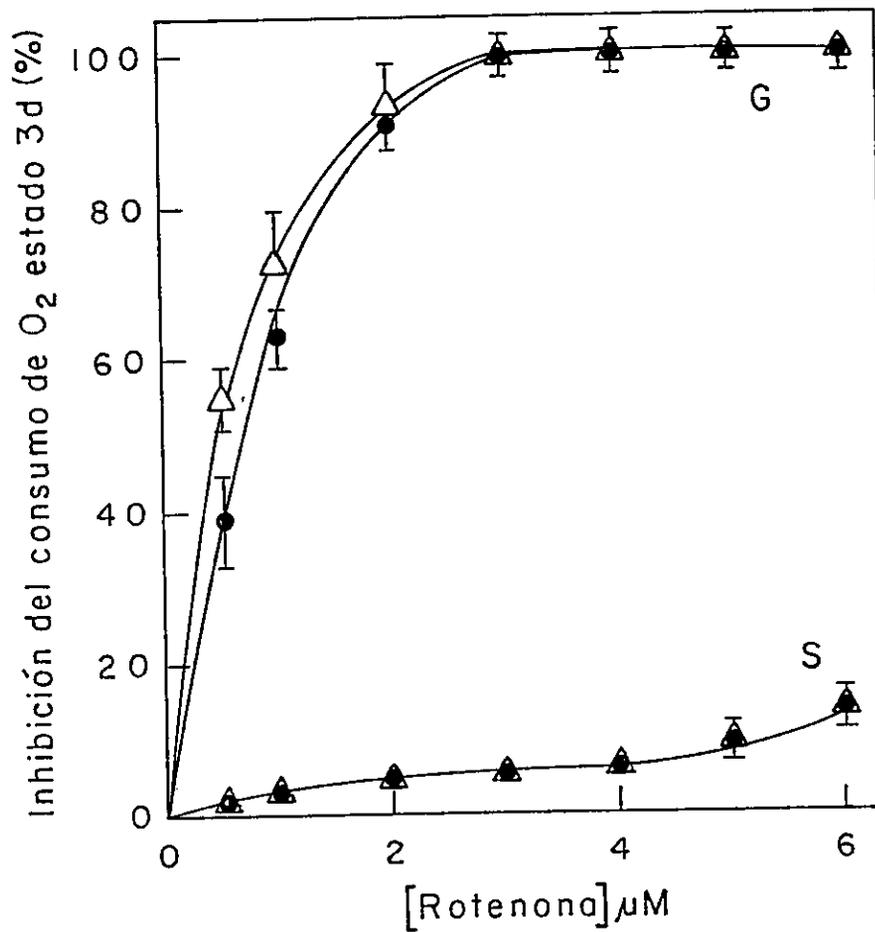


Figura 5. Efecto de la Concentración de Rotenona sobre las Velocidades de Oxidación de Glutamato y Succinato en Mitochondrias de Hígado de Ratas Normales y con DEPD Desacopladas con CCCP.

Figura 5. Efecto de la Concentración de Rotenona sobre las Velocidades de Oxidación de Glutamato y Succinato en Mitocondrias de Hígado de Ratas Normales y con DEPD Desacopladas con CCCP. Las velocidades de oxidación de glutamato y succinato se determinan midiendo las respectivas velocidades de consumo de oxígeno por mitocondrias de hígado de ratas normales (●) y con DEPD (Δ) como se describe en la sección de Materiales y Métodos, en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de rotenona indicadas en la figura. El sistema de ensayo en un volumen de 2,0 ml contiene: LiCl 117 mM, KCl 13 mM, Hepes 3 mM, fosfato de potasio 2 mM a pH 7,2, 2,5 mg de proteína mitocondrial/ml de ambos grupos de ratas y CCCP 0,1 μM. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la velocidad de consumo de oxígeno en ausencia de rotenona. Las velocidades de consumo de oxígeno en ausencia de rotenona son respectivamente: 85 ± 10 y 68 ± 7 n-átomos-gO₂/min por mg de proteína de mitocondrias de hígado de ratas normales y con DEPD cuando el sustrato es glutamato 2,0 mM (G); 182±18 y 142±17 n-átomos-g O₂/min por mg de proteínas de mitocondrias de hígado de ratas normales y con DEPD cuando el sustrato es succinato 2,5 mM (S). Los valores son los promedios ± D.S. para tres determinaciones independientes de ambos grupos de ratas.

2,5-3,0 μM de rotenona el consumo de oxígeno es inhibido alrededor de un 100% cuando el sustrato oxidativo es glutamato. En cambio, para la oxidación de succinato se observa sólo un 5% de inhibición a concentraciones menores de 4 μM rotenona. Este menor efecto de rotenona sobre el consumo de oxígeno en la oxidación de succinato podría deberse a la presencia de sustratos endógenos a nivel del sitio I. El efecto de la rotenona fue similar para mitocondrias provenientes de ratas normales o con DEPD, por lo tanto los estudios de oxidación de succinato se realizaron en presencia de 4 μM rotenona para ambos tipos de mitocondrias.

Cuando se midió la velocidad de oxidación de ascorbato + TMPD, se agregó antimicina A para inhibir la oxidación de sustratos endógenos que se oxidan a nivel de los sitios I y II. La Figura 6 muestra el efecto de la concentración de antimicina A sobre la inhibición del consumo de oxígeno durante la oxidación de succinato o ascorbato + TMPD. Se observa en ambos tipos de mitocondrias que a concentraciones entre 0,25 y 0,30 μM de antimicina A el consumo de oxígeno fue inhibido en un 90% en presencia de succinato. Por otra parte, cuando se utilizó como sustrato oxidable ascorbato + TMPD prácticamente no se observó inhibición a concentraciones menores de 0,4 μM de antimicina A. Este bajo efecto inhibitorio del antibiótico se debería a inhibición de la oxidación de sustratos endógenos en los sitios I y/o II de fosforilación.

Antimicina A no inhibe el consumo de oxígeno en un 100% en presencia de sustratos que se oxidan a nivel del sitio I y sitio II (218); por lo tanto, la oxidación de ascorbato + TMPD se realizó en presencia de rotenona 4 μM y antimicina A 0,4 μM en ambos tipos de mitocondrias.

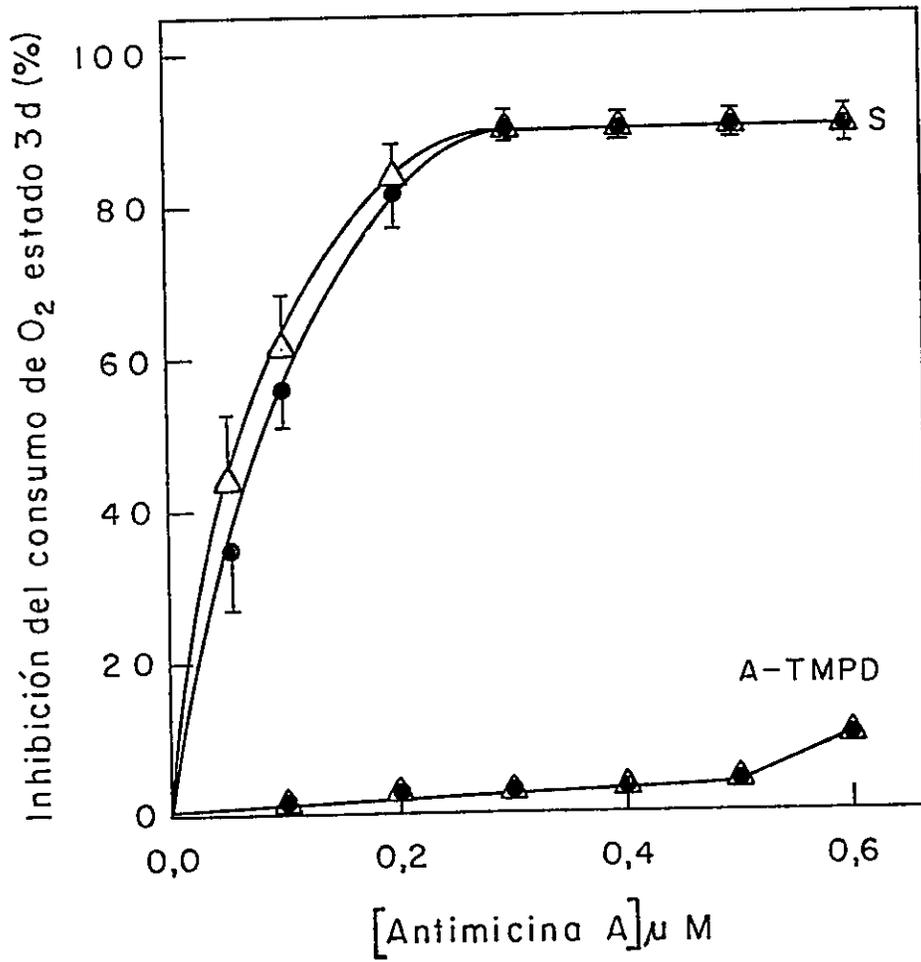


Figura 6. Efecto de la Concentración de Antimicina A sobre las Velocidades de Oxidación de Succinato y Ascorbato + TMPD en Mitochondrias de Hígado de Ratas Normales y con DEPD Desacopladas con CCCP.

Figura 6. Efecto de la Concentración de Antimicina A sobre las Velocidades de Oxidación de Succinato y Ascorbato + TMPD en Mitocondrias de Hígado de Ratas Normales y con DEPD Desacopladas con CCCP. Las velocidades de oxidación de succinato y de ascorbato + TMPD se determinan midiendo las respectivas velocidades de consumo de oxígeno por mitocondrias de hígado de ratas normales (●) y con DEPD (Δ) como se describe en la sección de Materiales y Métodos, en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de antimicina A que están indicadas en la figura. El sistema de ensayo es el mismo de la Figura 5, excepto que la concentración de proteína mitocondrial es 1,25 mg/ml proveniente de ambos grupos de ratas. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la velocidad de consumo de oxígeno en ausencia de antimicina A. Las velocidades de consumo de oxígeno en ausencia de antimicina A son respectivamente: 178 ± 20 y 139 ± 15 n-átomos-g O₂/min por mg de proteína de mitocondrias de hígado de ratas normales y con DEPD cuando el sustrato es succinato 2,5 mM (S); 470 ± 32 y 380 ± 35 n-átomos-g O₂/min por mg de proteína de mitocondrias de hígado de ratas normales y con DEPD cuando el sustrato es ascorbato 5,0 mM 5,0 mM + TMPD 0,5 mM (A-TMPD). Los valores son los promedios \pm D.S. para tres determinaciones independientes de ambos grupos de ratas.

2. Estimulación de la Velocidad de Oxidación de Succinato por ADP.

La Figura 7 muestra los resultados de un experimento típico de medición simultánea de las velocidades de consumo de oxígeno y de incorporación de H^+ en mitocondrias aisladas de hígado de ratas normales y con DEPD. La adición de ADP induce un aumento de aproximadamente 4,7 veces en la velocidad de consumo de oxígeno lo que equivale a 144,8 nanoátomos-g O/min por mg de proteína en mitocondrias de ratas normales, en cambio, en mitocondrias de hígado de ratas con DEPD la inducción por ADP de la velocidad de consumo de oxígeno fue menor, sólo 3,8 veces equivalente a 90,8 nanoátomos-g O/min por mg de proteína. La estimulación por ADP de la velocidad de respiración está acompañada de un aumento de la velocidad de incorporación de H^+ , dicho aumento es también menor en mitocondrias de hígado de ratas con DEPD, 210,0 (normal) y 119,8 (DEPD) nanoiones-g H^+ /min por mg de proteína. Cuando todo el ADP agregado es fosforilado, las velocidades de consumo de oxígeno e incorporación de H^+ recuperan sus valores originales de estado 4 de respiración. Los valores de la razón ADP/O (nanomoles de ADP agregados/nanoátomos-g de oxígeno consumidos) en estas preparaciones típicas, no presentan variaciones significativas y son respectivamente: 1,59 y 1,76 para mitocondrias de hígado de ratas normales y con DEPD.

Este experimento sugiere que las mitocondrias de hígado de ratas con DEPD responden de igual manera que las mitocondrias provenientes de ratas normales en presencia de ADP, sin embargo, las velocidades de consumo de oxígeno e incorporación de protones están significativamente disminuidas en mitocondrias de ratas con DEPD durante la fosforilación de ADP.

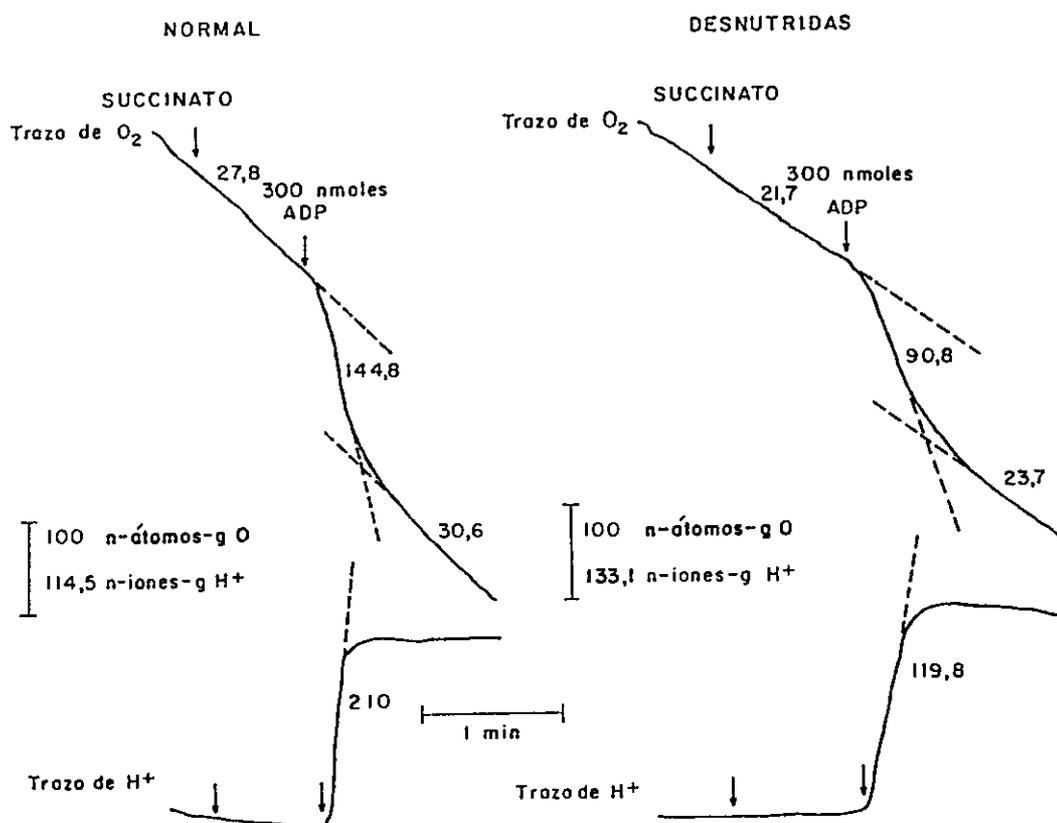


Figura 7. Efecto de la DEPD sobre la Estimulación de la Velocidad de Oxidación de Succinato por ADP en Mitocondrias de Hígado de Ratas. Las velocidades de consumo de oxígeno y de incorporación de H^+ por mitocondrias de hígado de ratas normales (lado izquierdo) y con DEPD (lado derecho) se miden como se describe en la sección de Materiales y Métodos. El sistema de ensayo en un volumen de 2,0 ml contiene: LiCl 117 mM, KCl 13 mM, Hepes 3 mM, fosfato de potasio 2 mM, 2,5 mg de proteína mitocondrial/ml de ambos grupos de ratas y rotenona 4 μ M a pH. 7,2. En los puntos indicados por las flechas se agrega succinato 2,5 mM y ADP 0,15 mM. Los números sobre los trazos indican las velocidades en n-átomos-g O_2 o n-iones-g H^+ /min por mg de proteína.

3. Estimulación de la Velocidad de Oxidación de Diferentes Sustratos por ADP.

Los valores promedios obtenidos de varios experimentos para las velocidades de consumo de oxígeno e incorporación de H^+ durante las oxidaciones de glutamato, succinato y ascorbato + TMPD en ausencia y presencia de ADP se muestran en la Tabla IV. Las velocidades de consumo de oxígeno de mitocondrias de ratas con DEPD en estado 3 están disminuidas en un 23% cuando el sustrato oxidado es glutamato, 27% con succinato y 26% con ascorbato + TMPD. De manera similar las velocidades de incorporación de H^+ son también menores en mitocondrias de ratas con DEPD cuando se oxidan los tres sustratos independientemente. Las disminuciones son respectivamente: 31%, 38% y 30% para la oxidación de glutamato, succinato y ascorbato + TMPD. El consumo de oxígeno en presencia de ADP ya fosforilado (estado 4) está disminuido aproximadamente en 18% durante la oxidación de succinato y ascorbato + TMPD, pero la velocidad de consumo de oxígeno durante la oxidación de glutamato permanece inalterada.

La Tabla V muestra los índices de control respiratorio o control aceptor, las razones ADP/O y las velocidades de síntesis de ATP para la oxidación de glutamato, succinato y ascorbato + TMPD por mitocondrias de hígado de ratas normales y con DEPD. Se puede observar que la velocidad de síntesis de ATP es 25% menor en mitocondrias de ratas con DEPD para los tres sitios de acoplamiento. Los índices de control aceptor son también menores en mitocondrias de ratas desnutridas, pero el grado de disminución depende del nivel del sitio de acoplamiento donde se oxida el sustrato, así cuando se oxida glutamato el índice de control aceptor está disminuido en un 29%, con succinato un 16% y con ascorbato + TMPD un 7%, sin embargo este último

TABLA IV

Velocidades de Oxidación de Glutamato, Succinato y Ascorbato + TMPD por Mitocondrias de Hígado de Ratas.

Sustratos	ESTADO 3		ESTADO 3		ESTADO 4	
	Consumo de Oxígeno Normales	Desnutridas	Incorporación de Protones Normales	Desnutridas	Consumo de Oxígeno Normales	Desnutridas
Glutamato	59,7 ± 6,8	46,1 ± 3,7**	119,8 ± 23,6	83,0 ± 14,6*	9,8 ± 0,6	10,8 ± 1,4
Succinato	134,2 ± 13,5	98,1 ± 10,7*	184,8 ± 26,3	115,3 ± 21,6*	31,0 ± 5,4	24,8 ± 1,3*
Ascorbato + TMPD	167,2 ± 29,6	124,8 ± 6,0*	321,6 ± 69,6	226,5 ± 26,0*	109,2 ± 17,3	88,8 ± 4,7*

Las velocidades de consumo de oxígeno e incorporación de protones se miden como se describen en la sección de Materiales y Métodos. Los valores para consumo de oxígeno se expresan en n-átomos-g de O/min por mg de proteína y para la incorporación de protones en n-iones de H⁺/min por mg de proteína. Las determinaciones de las velocidades de oxidación en Estado 3 se miden después de la adición de 400 nmoles de ADP para las oxidaciones de glutamato y succinato y de 200 nmoles de ADP para la oxidación de ascorbato + TMPD. Las concentraciones de proteína mitocondrial son 2,5 mg/ml para las oxidaciones de glutamato y succinato y 1,25 mg/ml para la oxidación de ascorbato + TMPD. Se usan los siguientes inhibidores: rotenona 4 μM para la oxidación de succinato, rotenona 4 μM y antimicina A 0,4 μM para la oxidación de ascorbato + TMPD. Las velocidades de oxidación en estado 4 se determinan después que todo el ADP se ha fosforilado. Los valores son las medias ± D.S. para seis (normales) y siete (desnutridas) determinaciones independientes de grupos de ratas. Significación (normales contra desnutridas): *P<0,025; **P<0,001.

TABLA V

Indices de Control Respiratorio, Razones ADP/O y Velocidad de Síntesis de ATP.

	INDICE DE CONTROL RESPIRATORIO		RAZON ADP/O		VELOCIDAD DE SINTESIS DE ATP	
	Normales	Desnutridas	Normales	Desnutridas	Normales	Desnutridas
Glutamato	6,11 ± 0,41	4,33 ± 0,74**	2,75 ± 0,13	2,69 ± 0,23	165,0 ± 26,5	125,0 ± 20,5**
Succinato	4,70 ± 0,25	3,97 ± 0,57**	1,66 ± 0,09	1,68 ± 0,14	224,0 ± 34,5	166,3 ± 31,6**
Ascorbato+TMPD	1,52 ± 0,10	1,41 ± 0,12	0,98 ± 0,11	0,98 ± 0,10	167,1 ± 47,4	122,9 ± 18,3*

Los índices de control respiratorio y las razones ADP/O se determinaron según el método descrito por Chance y Williams (98). Las velocidades de síntesis de ATP se expresan en nmoles de ATP/min por mg de proteína mitocondrial y se calculan suponiendo una conversión total de ADP en ATP a las razones ADP/O experimentales correspondientes. Los valores son las medias ± D.S. para seis (normales) y siete (desnutridas) determinaciones independientes de grupos de ratas. Significación (normales contra desnutridas): *p<0.05; **p<0.025.

valor no es significativamente diferente del obtenido con las mitocondrias de ratas normales. Los valores de las razones ADP/O en los tres sitios de acoplamiento no son alterados por la DEPD.

4. Actividad NADH Oxidasa.

Las actividades oxidativas de la cadena respiratoria desde el NADH hasta el oxígeno se determinaron en partículas submitocondriales obtenidas al romper por ultrasonido las mitocondrias provenientes de hígado de ratas normales y con DEPD. La Figura 8 muestra las actividades NADH oxidasa en un gráfico de dobles recíprocas. Los valores de Km aparente para la oxidación de NADH son iguales ($15 \mu\text{M}$) en ambos tipos de partículas submitocondriales, pero los valores de Vmax son significativamente diferentes (40% menor); $1,29 \Delta A_{340}/\text{min}$ por mg de proteína (normal) y $0,78 \Delta A_{340}/\text{min}$ por mg de proteína de partículas submitocondriales provenientes de hígado de ratas con DEPD.

b) Determinación del Contenido de Citocromos.

El contenido de citocromos de las cadenas respiratorias de mitocondrias de hígado de ratas normales y con DEPD se determinó simultáneamente desde los respectivos espectros diferenciales de absorción (reducidos contra oxidados) entre 650 y 500 nm como se muestra en la Figura 9. En Tabla VI se expresa la cantidad de los diferentes citocromos presentes en mitocondrias de hígado de ratas normales y con DEPD. Se observa que el contenido de los citocromos b, c_1 y c es mayor en un 12%, 20% y 26% respectivamente en las mitocondrias de ratas con DEPD, aunque la diferencia para los valores de los citocromos b y c_1 no es significativa ($P < 0,5$). La cantidad de citocromos a + a_3 está disminuída en un 22% en mitocondrias de ratas con DEPD ($P < 0,025$) con respecto a normales.

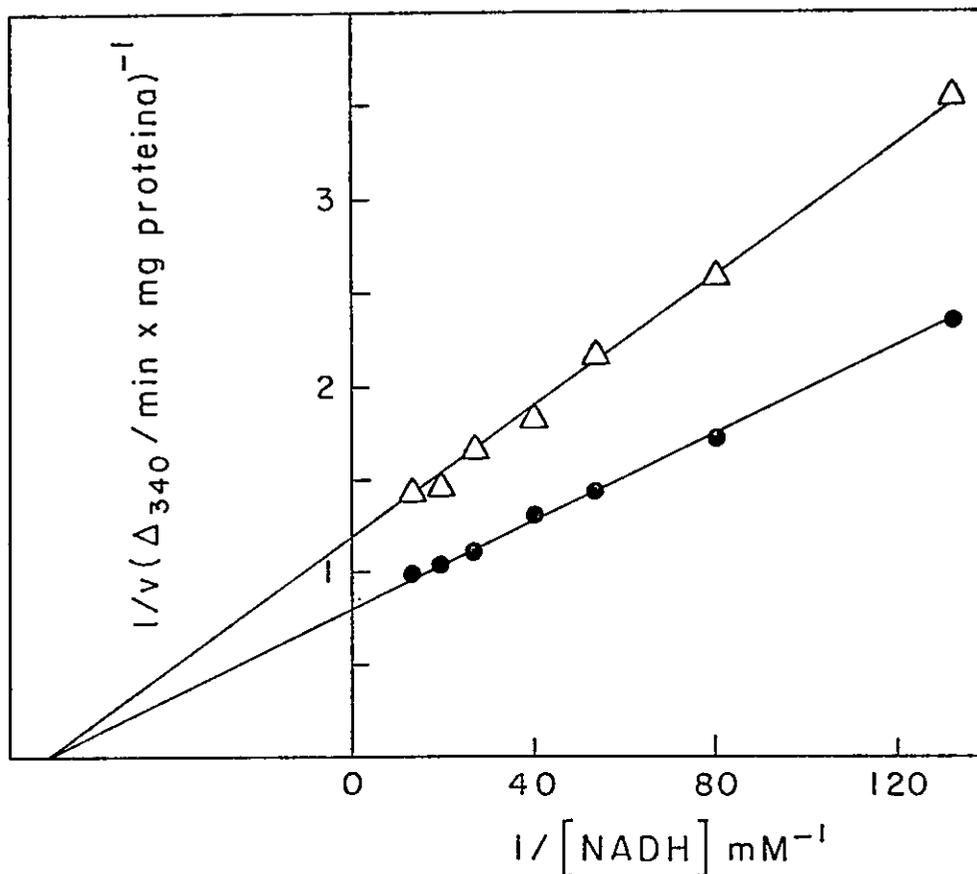


Figura 8. Efecto de la Variación de la Concentración de NADH sobre la Velocidad NADH-Oxidasa en Partículas Submitocondriales de Hígado de Ratas Normales y con DEPD. Las partículas submitocondriales obtenidas de mitocondrias de hígado de ratas normales (●) y con DEPD (Δ) se incuban como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los valores son los promedios \pm D.S. para cinco (normal) y seis (con DEPD) determinaciones independientes. Regresión lineal: $r = 0,9992$ (normal); $r = 0,9987$ (desnutridas). V_{\max} : $1,29 \pm 0,07$ (normal); $0,78 \pm 0,04$ (con DEPD) $\Delta A_{340}/\text{min}$ por mg de proteína ; K_m aparente $15 \mu\text{M}$ en ambos grupos.

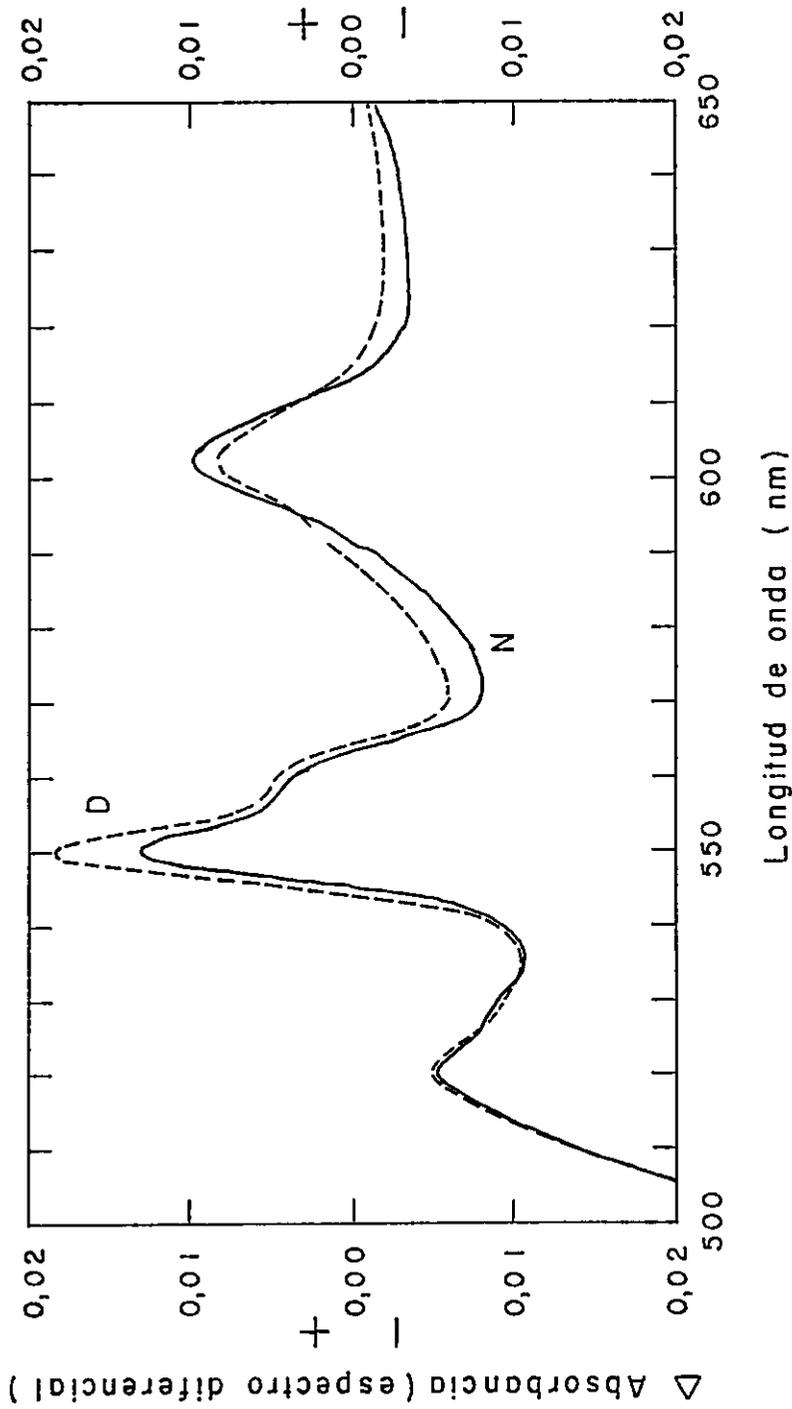


Figura 9. Determinación Simultánea del Contenido de Los Diferentes Citocromos de Mitochondrias de Hígado de Ratas Normales y con DEPD. El contenido de los citocromos de mitochondrias de hígado de ratas normales (—, N) y con DEPD (---, D) se determina como se describe en la sección de Materiales y Métodos. La figura presenta una superposición de los espectros de absorción de los citocromos de mitochondrias de ratas normales y con DEPD.

TABLA VI

Contenido de Citocromos de Mitocondrias de Hígado de Ratas.

	nmoles de citocromo/mg de proteína		% de Cambio
	Normales	Desnutridas	
Citocromos a + a ₃	0,224 ± 0,024	0,176 ± 0,015 *	- 21,6
Citocromo b	0,144 ± 0,026	0,164 ± 0,024	+ 12,2
Citocromo c ₁	0,088 ± 0,009	0,110 ± 0,033	+ 20,0
Citocromo c	0,173 ± 0,016	0,235 ± 0,035 **	+ 26,4

El contenido de citocromos de mitocondrias de hígado se determina según el método descrito por Williams (212). Otros detalles están en la sección de Materiales y Métodos. Los valores son las medias ± D.S. para cinco (normales) y cinco (desnutridas) determinaciones independientes de grupos de ratas. La significación (normales contra desnutridos): *P<0,025; **P<0,01; P<0,5.

c) *Sistema de Transporte de ADP-ATP.*

La Figura 10 muestra la incorporación de [^{14}C]-ADP en mitocondrias de hígado de ratas normales y con DEPD en función del tiempo de incubación a 5°C. Se puede apreciar que la incorporación de ADP permanece inalterada por la DEPD. Se observa una fase rápida que está esencialmente completa a los 30 seg, seguida de una fase muy lenta que dura alrededor de 10 min. Más del 70% del ADP se incorpora en los primeros 30 segundos en ambos tipos de mitocondrias. Incubaciones a mayor tiempo dan valores superiores con un valor límite de alrededor de 8 nanomoles de ADP/mg de proteína mitocondrial, valor que sería aproximadamente igual al contenido total de nucleótidos de adenina de estas preparaciones mitocondriales ya que la incorporación de [^{14}C]-ADP estaría acompañada por la descarga de una cantidad equivalente de nucleótidos de adenina endógena no marcada (215).

d) *Actividad Adenosina Trifosfatásica por el Complejo F_0F_1 -ATPasa de Mitocondrias Intactas.*

1. Efecto de la DEPD en la Actividad de Adenosina Trifosfatasa.

La reacción catalizada por el complejo F_0F_1 -ATPasa en mitocondrias intactas se mide de preferencia en el sentido de la hidrólisis del ATP (reacción exergónica). La velocidad de la reacción depende entre otros factores, de la cantidad y del estado en que se encuentre el complejo. Este complejo existe en los estados activo e inactivo (160-219). Para comparar las actividades ATPásicas de mitocondrias intactas de hígado de ambos grupos de ratas, es necesario seleccionar las condiciones experimentales óptimas para la medición de dichas actividades de manera que todo el complejo se encuentre en estado activo. Estas condiciones se pueden obtener a concentraciones saturantes de

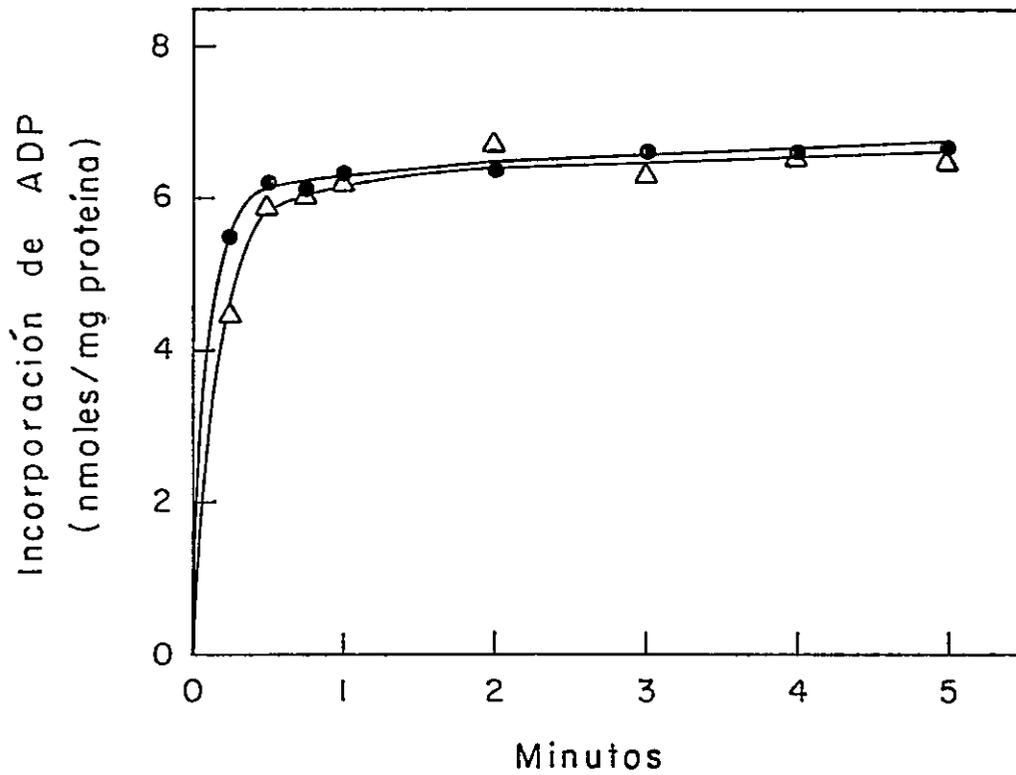


Figura 10. Cinética de la Incorporación de ^{14}C -ADP a Mitocondrias de Hígado de Ratas Normales y con DEP. Las mitocondrias obtenidas de hígado de ratas normales (●) y con DEP (Δ) se incuban como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los valores son los promedios de tres determinaciones independientes de grupos de ratas.

ATP (3 mM), alta fuerza iónica proporcionada por ejemplo por LiCl 117 mM y KCl 13 mM y en presencia de un desacoplante. En estas condiciones, se determina el Pi por la hidrólisis de ATP en función del tiempo en mitocondrias intactas de hígado de ratas normales y con DEPD. La Figura 11 muestra que en ausencia de un desacoplante no se produce Pi durante los 15 min en los que la reacción transcurre usando mitocondrias de ambos tipos de grupos de ratas, debido a que la enzima estaría en el estado inactivo. La cantidad de Pi formado es aumentada varias veces al adicionar el desacoplante CCCP en el medio de reacción, ya que la enzima proveniente de mitocondrias de ambos grupos de ratas pasa a un estado activo. La cantidad de Pi proveniente de la hidrólisis de ATP estimulada por el desacoplante es menor en mitocondrias de ratas con DEPD. Esto podría deberse a que las mitocondrias de ratas con DEPD tuviesen una menor cantidad de enzima, o una enzima menos eficiente, o a un menor grado de activación. La cantidad de Pi formado a partir de la hidrólisis de ATP aumenta en forma proporcional al tiempo en los primeros 5 minutos de reacción. Además, se observa que en el estado activo, la enzima puede ser evaluada por ensayos de la actividad de hidrólisis activada por desacoplantes en tiempos de incubación relativamente cortos.

Los valores de la velocidad de hidrólisis de ATP dependen de la concentración del desacoplante. La Figura 12 muestra los valores de V_{max} y K_a (la concentración del desacoplante que se requiere para obtener la mitad de la actividad máxima) para la actividad de hidrólisis de ATP. Estos valores se calcularon de los gráficos de dobles recíprocos respectivos obtenidos de mitocondrias intactas de hígado de ratas normales y con DEPD. La V_{max} es 23% menor con mitocondrias de ratas con DEPD y los valores de K_a para CCCP son muy cercanos: 0,285 μM con mitocondrias de ratas normales y 0,164 μM

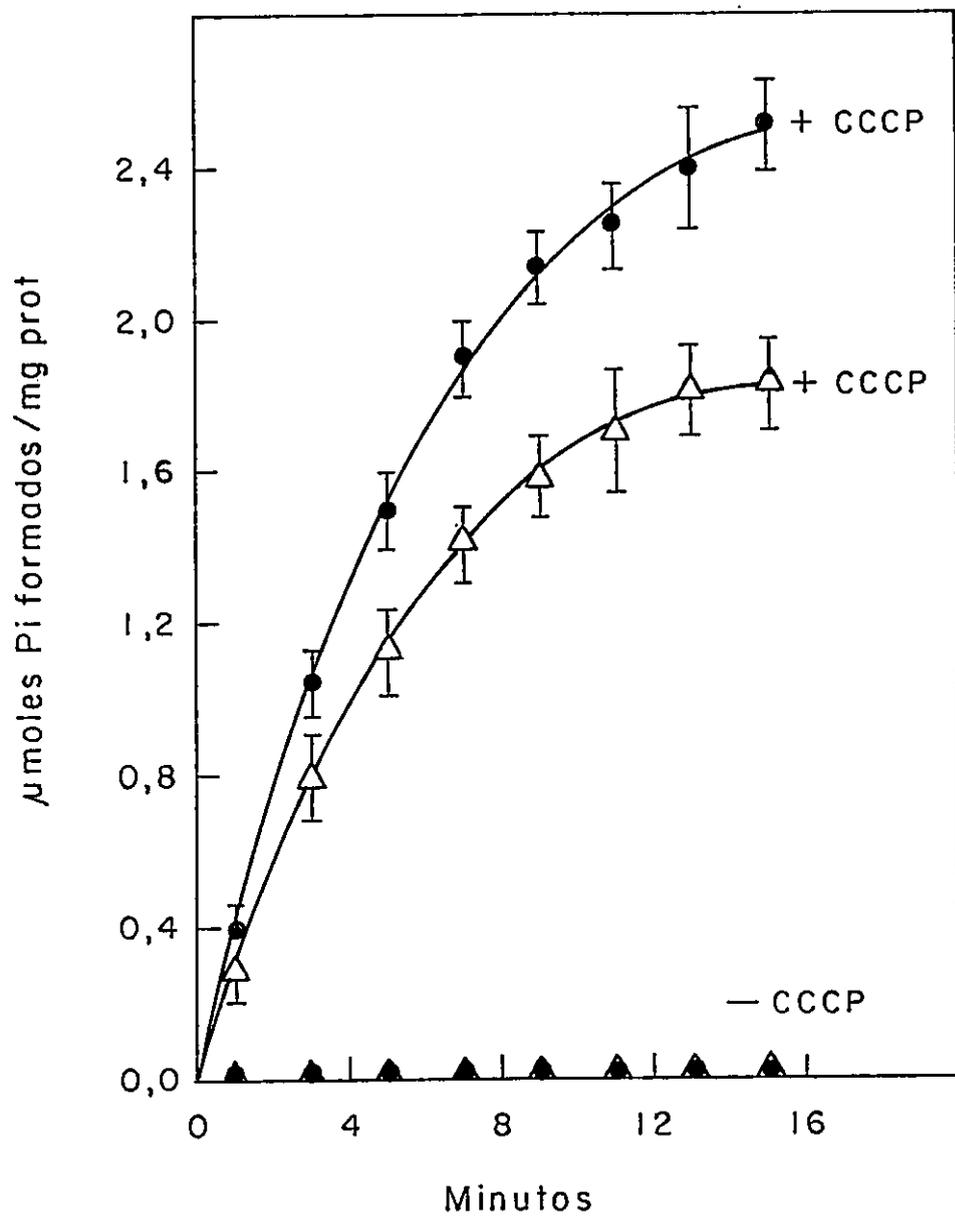


Figura 11. Efecto de la DEPD sobre la Cinética de la Actividad Adenosina Trifosfatásica en Mitocondrias Desacopladas con CCCP.

Figura 11. Efecto de la DEPD sobre la Cinética de la Actividad Adenosina Trifosfatásica en Mitocondrias Desacopladas con CCP. La hidrólisis de ATP por mitocondrias de hígado de ratas normales (●) y con DEPD (Δ) se miden como se describe en la sección de Materiales y Métodos. El sistema de ensayo en un volumen de 5,0 ml contiene: LiCl 117 mM, KCl 13 mM, Hepes 10 mM (pH 7,4) y 5 mg de proteína mitocondrial proveniente de hígados de ambos grupos de ratas. Los sistemas se preincubaban durante 3 min a 25°C. Se agrega simultáneamente ATP 3 mM y CCCP 1 μM (concentraciones finales); a los tiempos indicados se toman alícuotas de 0,2 ml. La reacción se detiene con ATC. La determinación de Pi en el sobrenadante se realiza según está descrito en la sección de Materiales y Métodos. Los valores son los promedios ± D.S. para cinco determinaciones independientes de ambos grupos de ratas.

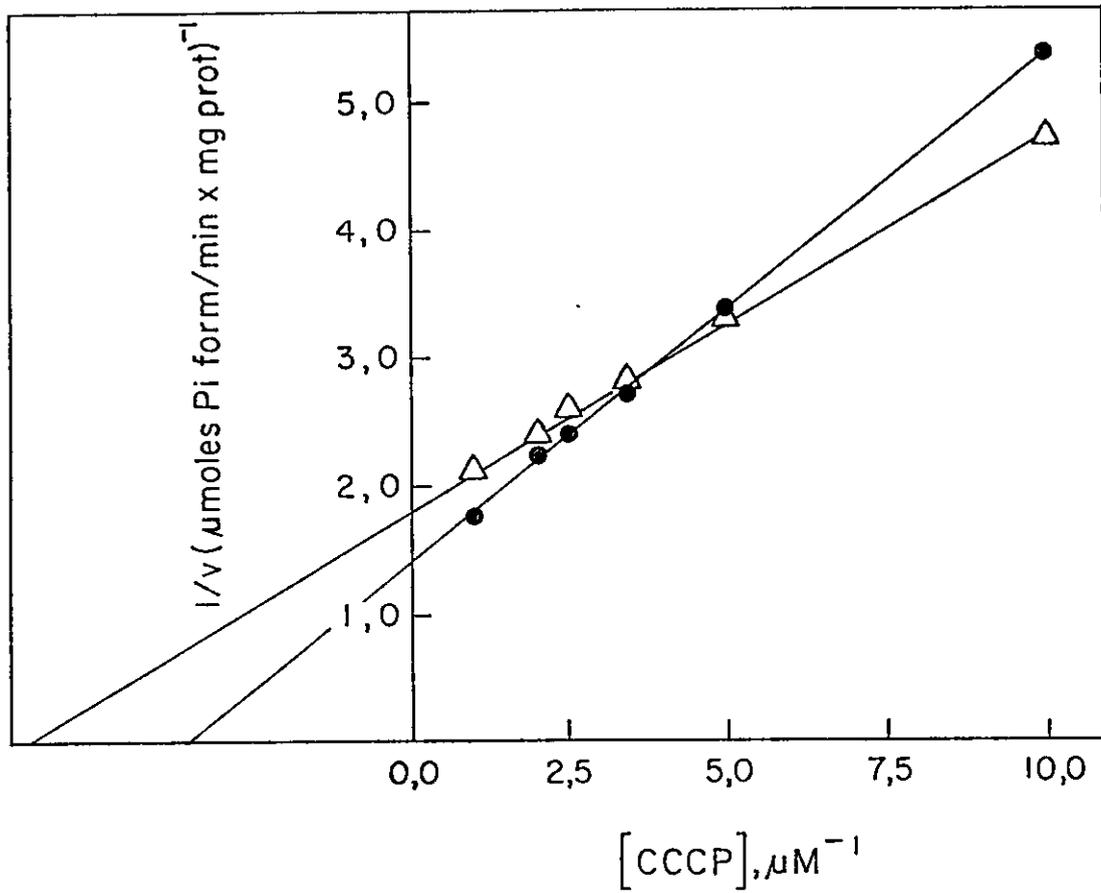


Figura 12. Efecto de la Variación de la Concentración de CCCP sobre la Actividad Adenosina Trifosfatásica en Mitochondrias de Hígado de Ratas Normales y con DEPD.

Figura 12. Efecto de la Variación de la Concentración de CCCP sobre la Actividad Adenosina Trifosfatásica en Mitocondrias de Hígado de Ratas Normales y con DEPD. Las mitocondrias de hígado de ratas normales (o) y con DEPD (Δ) se incuban como se describe en la sección de Materiales y Métodos. El sistema de ensayo en un volumen de 2,0 ml contiene: LiCl 117 mM, KCl 13 mM, Hepes 10 mM (pH 7,4) y 2 mg de proteína mitocondrial proveniente de hígado de ambos grupos de ratas. Los sistemas se preincuban durante 3 min a 25°C. Se agrega simultáneamente ATP 3 mM y CCCP entre 0,1-0,8 μ M (concentraciones finales); a los 3 min se toman alícuotas de 0,2 ml. La reacción se detiene con ATC. La determinación de Pi en el sobrenadante se realiza según está descrito en la sección de Materiales y Métodos. Los valores son los promedios \pm D.S. para ocho (normal) y nueve (con DEPD) determinaciones independientes. La regresión lineal: $r=0,9997$ (normal); $r=0,9985$ (con DEPD). $V_{\text{máx}}$: $0,725 \pm 0,02$ (normal); $0,561 \pm 0,062$ (con DEPD). K_a : $0,285 \pm 0,019 \mu\text{M}$ (normal); $0,164 \pm 0,059 \mu\text{M}$ (con DEPD).

La ecuación de la línea recta es:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_a}{V_{\text{máx}}} \cdot \frac{1}{[\text{CCCP}]} + \frac{1}{V_{\text{máx}}}$$

con mitocondrias de ratas con DEPD, lo cual sugiere que podría existir una menor cantidad de la enzima o una enzima menos activa en mitocondrias de ratas desnutridas.

2. Estudio de las Condiciones Optimas de Activación del Complejo F_0F_1 -ATPasa.

Como se ha mencionado, para comparar las actividades ATPásicas de mitocondrias intactas de hígado de ambos grupos de ratas, es necesario seleccionar las condiciones experimentales óptimas para la medición de dichas actividades de manera que todo el complejo se encuentre en estado activo.

2.1. Efecto de succinato y KCl sobre la Actividad Adenosina Trifosfatásica Activada por CCCP.

La Figura 13 muestra el efecto de succinato y de KCl sobre la hidrólisis de ATP por mitocondrias intactas activadas por CCCP en función del tiempo de reacción. Se observa que la hidrólisis de ATP activada por CCCP depende de los componentes del medio de incubación. La cantidad de Pi proveniente de la hidrólisis de ATP por mitocondrias activadas por CCCP suspendidas en sacarosa 0,25 M aumenta en forma proporcional con el tiempo de reacción dentro de los 15 min que dura la determinación, pero cuando se incubaba previamente durante 6 min con succinato, la cantidad de Pi formado aumenta proporcionalmente durante los primeros 7 min de reacción y es alrededor de 10 veces mayor que en ausencia de succinato. Al reemplazar una cantidad de sacarosa por 50 mM KCl manteniendo la osmolaridad constante, la cantidad de Pi formado es alrededor de 17 veces mayor si se compara con la cantidad obtenida cuando el medio contiene sólo sacarosa y 2 veces mayor que cuando el medio sacarosa es preincubado con succinato. En condiciones de KCl 50 mM, la cantidad de Pi formado aumenta en forma proporcional al tiempo de reacción durante los primeros 5 min lo cual permite realizar determinaciones en tiempos más cortos.

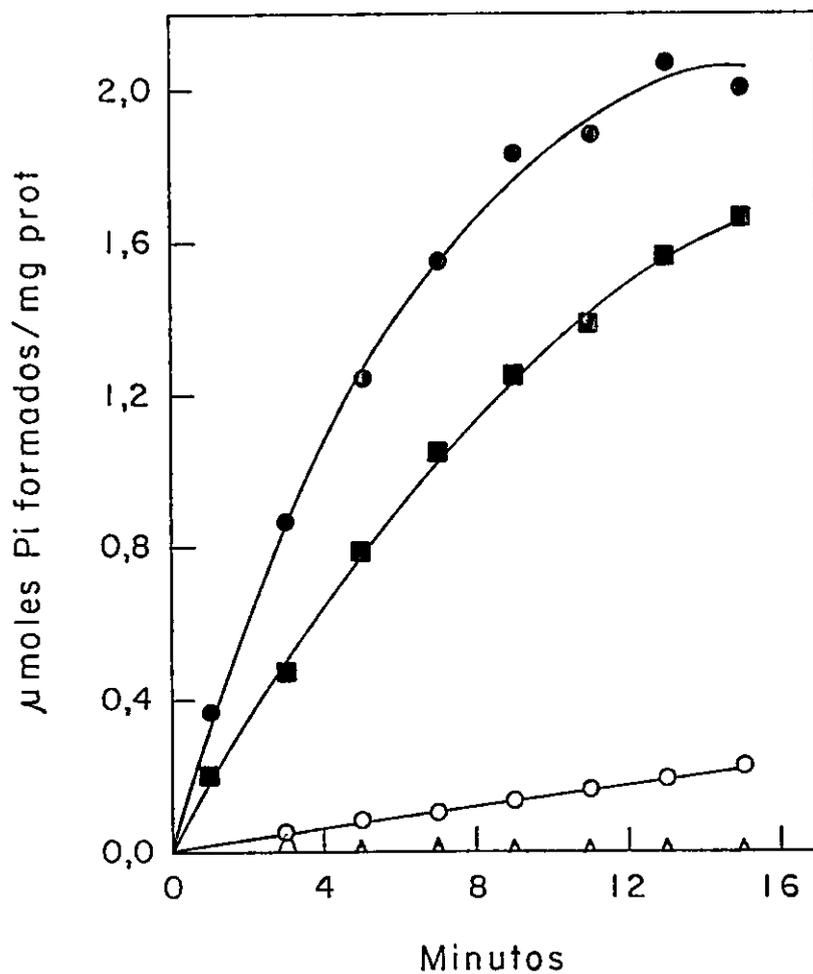


Figura 13. Efecto de KCl y del Estado Energizado sobre la Actividad Adenosina Trifosfatásica en Mitocondrias Desacopladas con CCP.

Figura 13. Efecto de KCl y del Estado Energizado sobre la Actividad Adenosina Trifosfatásica en Mitocondrias Desacopladas con CCCP. El Pi proveniente de la hidrólisis de ATP se determina como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los sistemas de ensayo en un volumen de 5,0 ml contienen: (o) sacarosa 250 mM y Hepes 10 mM (pH 7,4); (●) sacarosa 150 mM, KCl 50 mM y Hepes 10 mM (pH 7,4); (■) sacarosa 250 mM, succinato 5 mM y Hepes 10 mM (pH 7,4). A cada uno de los diferentes medios se agrega 5,0 mg de proteína de mitocondrias de hígado de ratas normales. Los sistemas se preincuban durante 3 min a 25°C; excepto el sistema que contiene succinato, el cual se preincuba 6 min. La reacción de hidrólisis de ATP se inicia al agregar simultáneamente ATP 3 mM y CCCP 1 μ M (concentraciones finales) o en ausencia de CCCP (Δ) para los diferentes sistemas. A los tiempos indicados se toman alícuotas de 0,2 ml. La reacción se detiene con ATC y se determina el Pi en el sobrenadante según está descrito en la sección de Materiales y Métodos. Los valores son los promedios de tres determinaciones independientes de los diferentes sistemas de ensayo usados.

2.2. Efecto de las Concentraciones de Diferentes Iones Monovalentes sobre la Actividad Adenosina Trifosfatásica Activada por CCCP.

Para estudiar si la activación de la hidrólisis de ATP es dependiente de un catión monovalente específico, un anión específico, o simplemente de la fuerza iónica total del medio externo o interno, se probaron diferentes sales de cloruro de cationes metálicos.

La Figura 14 muestra que la velocidad de hidrólisis de ATP activada por CCCP es dependiente de concentraciones de LiCl, NaCl y KCl en mitocondrias intactas. Se aprecia que a medida que se reemplaza la sacarosa del medio de incubación por cantidades crecientes de las diferentes sales de cloruros de cationes monovalentes y manteniendo la osmolaridad constante, la actividad de hidrólisis de ATP aumenta dramáticamente. Este efecto activador se mantiene hasta que la concentración de las distintas sales es alrededor de 50 mM. El aumento de actividad obtenido es de 13 a 16 veces dependiendo del catión de la sal de cloruro: $\text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{K}^+$. Además en esta Figura se observa que la activación no es dependiente de la concentración del anión ni de la fuerza iónica total del medio externo puesto que si así fuera, las curvas de activación serían exactamente superponibles. Los datos de la Figura 14 sugieren que la activación dependiente de catión monovalente no es específica.

2.3. Efecto de la Concentración de KCl sobre la Velocidad de Hinchamiento de las Mitocondrias Intactas.

Si el efecto activador de los cationes monovalentes en la velocidad de hidrólisis de ATP activada por CCCP se debe a un aumento de la fuerza iónica total del medio interno, se estudia la posibilidad de que KCl entre a la mitocondria. Cuando entra gran cantidad de un ión a la matriz a través de un

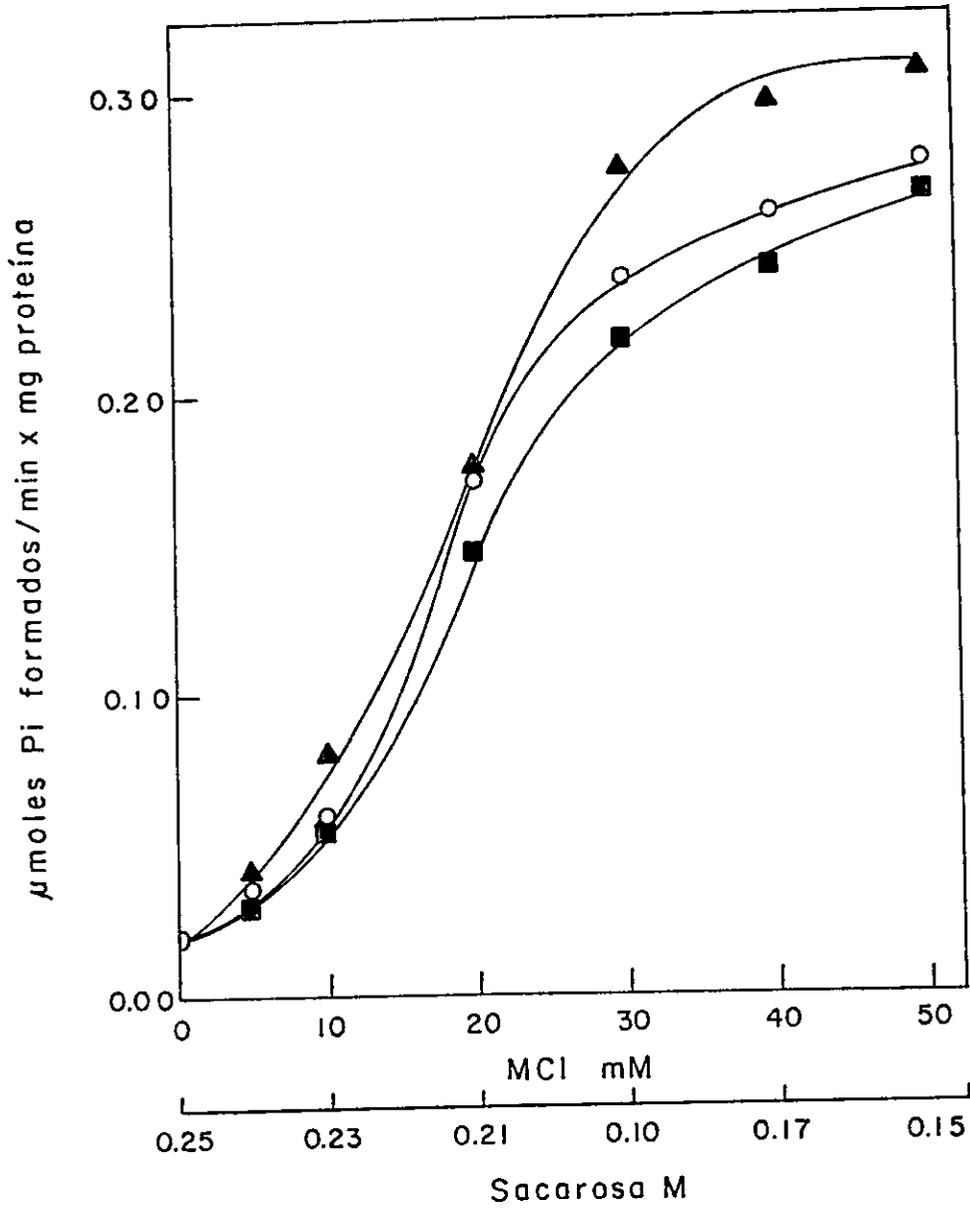


Figura 14. Efecto de la Concentración de Cationes Metálicos Monovalentes sobre la Actividad Adenosina Trifosfatásica en Mitochondrias Desacopladas con CCCP.

Figura 14. Efecto de la Concentración de Cationes Metálicos Monovalentes sobre la Actividad Adenosina Trifosfatásica en Mitocondrias Desacopladas con CCCP. La actividad de hidrólisis de ATP por mitocondrias de hígado de ratas normales se determina como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los sistemas de ensayo en un volumen de 2,0 ml contienen: 2 mg de proteína mitocondrial, Hepes 10 mM (pH 7,4), sacarosa entre 250-150 mM y cationes monovalentes: NaCl 0-50 mM (\blacktriangle), o LiCl 0-50 mM (O), o KCl 0-50 mM (\blacksquare). Los sistemas se preincubaban durante 3 min a 25°C. La reacción se inicia al agregar simultáneamente ATP 3 mM y CCCP 1 μ M (concentraciones finales) para los diferentes medios de ensayo. A los 3 min se toman alícuotas de 0,2 ml. La reacción se detiene con ATC. La determinación de Pi en el sobrenadante se realiza como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los valores son los promedios para cuatro determinaciones independientes de los diferentes sistemas de ensayo usados.

transportador se producen un aumento de la concentración intramitocondrial y se observa que las mitocondrias se hinchan por la entrada de agua que disminuye este aumento de concentración ocasionado por el ión. El grado de hinchamiento de las mitocondrias se puede medir determinando la disminución de la absorción de la luz, lo que resulta de la disminución de la densidad de la mitocondria. La Figura 15 muestra la velocidad de hinchamiento de las mitocondrias en función de la concentración de KCl en el medio de incubación. Se observa que a medida que la concentración de KCl aumenta (manteniendo la osmolaridad constante) la velocidad de hinchamiento de las mitocondrias aumenta rápidamente hasta una concentración de KCl 30 mM y a concentraciones superiores de KCl el aumento de la velocidad de hinchamiento es menor, lo que sugiere que KCl entraría a las mitocondrias. Se observa una perfecta correlación entre la mayor concentración de KCl intramitocondrial (mayor fuerza iónica total intramitocondrial) y el aumento de la velocidad de hidrólisis de ATP (Figura 14). La entrada de KCl se produce sólo en presencia de CCCP y ATP (Tabla VII)

2.4. Estudio de Algunos Factores que Alteran la Actividad ATPasa de Mitocondrias Intactas Activada por CCCP.

La Tabla VIII muestra el efecto de KCl, succinato, Mg^{+2} , Ca^{+2} e inhibidores de: a) el transporte de electrones de la cadena respiratoria (rotenona, antimicina A), b) el transporte de nucleótidos de adenina (atractilosido) y c) la actividad de hidrólisis de ATP (oligomicina) sobre la actividad de F_0F_1 -ATPasa activada por CCCP en mitocondrias intactas. Se observa que la actividad ATPasa en presencia de CCCP es aumentada alrededor de 7 veces, cuando las mitocondrias suspendidas en sacarosa se preincuban durante 6 min con succinato. Esta activación es inhibida a casi a la mitad cuando se mide

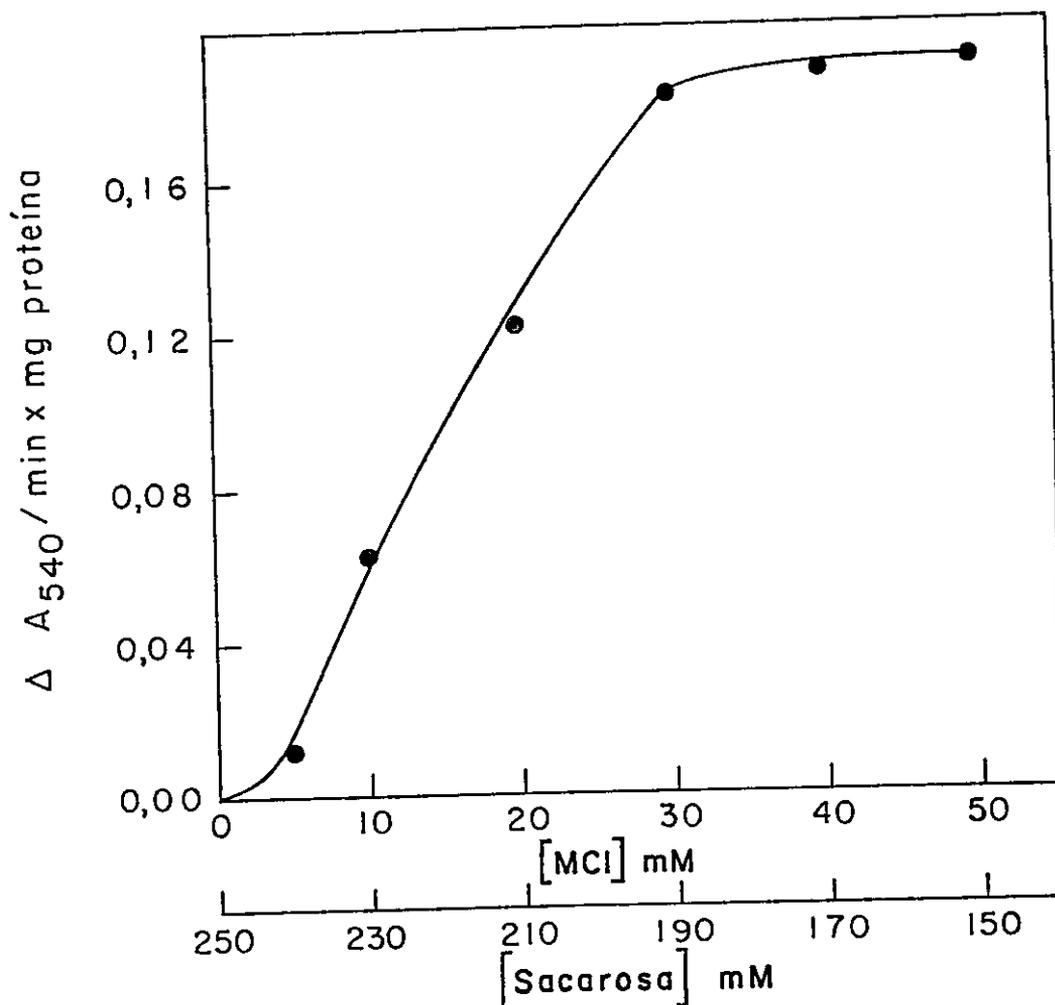


Figura 15. Efecto de la Concentración de KCl sobre la Velocidad de Hinchamiento de las Mitocondrias Desacopladas con CCCP. La velocidad de hinchamiento de las mitocondrias de hígado de ratas normales se determina como se describe en la sección de Materiales y Métodos. El sistema de ensayo en un volumen de 1,0 ml contiene: sacarosa 250-150 mM, KCl 0-50 mM, Hapes 10 mM (pH 7,4) y 1 mg de proteína mitocondrial. El sistema se preincuba durante 3 min a 25°C, y se agrega simultáneamente ATP 3 mM y CCCP 1 μM (concentraciones finales) para iniciar el proceso de hinchamiento. Los valores son los promedios de tres determinaciones independientes.

TABLA VII

Efecto de CCCP y ATP en la velocidad de hinchamiento de mitocondrias.

Medio de incubación	Adiciones	Velocidad de hinchamiento ΔA_{540} /min por mg proteína
Sacarosa 0.25 M	ATP/CCCP	0,000
Sacarosa 0.15 M KCl 50 mM		0,001
Sacarosa 0,15 M KCl 50 mM	ATP	0,048
Sacarosa 0,15 M KCl 50 mM	CCCP	0,022
Sacarosa 0,15 M KCl 50 mM	ATP/CCCP	0,190
Sacarosa 0,15 M KCl 50 mM	ATR/ATP/CCCP	0,014

La velocidad de hinchamiento se mide como se describe en la sección de Materiales y Métodos. La concentración de proteína mitocondrial es 1 mg/ml. Las concentraciones de las adiciones finales son: 3 mM ADP, 1 μ M CCCP y 10 μ M ATR. Los valores se expresan como disminución de absorbancia a 540 nm por min por mg de proteína mitocondrial y son los promedios de tres determinaciones independientes.

TABLA VIII

Efecto de KCl, succinato, Mg^{+2} , Ca^{+2} y de inhibidores de: la respiración, el transporte de nucleótidos y la actividad de hidrólisis de ATP sobre la actividad F_0F_1 -ATPasa de mitocondrias de hígado de ratas.

Medio de incubación	Adiciones	ATPasa $\frac{\mu\text{moles Pi formado}}{\text{min} \cdot \text{mg prot.}}$	
		-CCC P	+CCC P
Sacarosa 0.25 M		0,000	0,300
Sacarosa 0.25 M	ATP	0,000	0,021
Sacarosa 0.25 M	Succinato/Rotenona/ATP	0,000	0,140
Sacarosa 0.25 M	Succinato/Rotenona/AA/ATP	0,000	0,068
Sacarosa 0.15 M			
KCl 50 mM		0,000	0,000
Sacarosa 0.15 M			
KCl 50 mM	ATP	0,000	0,286
Sacarosa 0.15 M			
KCl 50 mM	ATP/Oligomicina	0,000	0,012
Sacarosa 0.25 M			
KCl 50 mM	ATP/ATR	0,000	0,008
Sacarosa 0.15 M			
KCl 50 mM	ATP/ Mg^{++}	0,000	0,077
Sacarosa 0.15 M			
KCl 50 mM	ATP/ Ca^{++}	0,000	0,163
Sacarosa 0.15 M			
KCl 50 mM	Succinato/Rotenona/ATP	0,000	0,152
Sacarosa 0.15 M			
KCl 50 mM	Succinato/Rotenona/AA/ATP	0,000	0,290

Tabla VIII. Efecto de KCl, succinato, Mg^{+2} , Ca^{+2} y de inhibidores de: la respiración, el transporte de nucleótidos y la actividad de hidrólisis de ATP sobre la actividad F_0F_1 -ATPasa de mitocondrias de hígado de ratas.

El Pi proveniente de la hidrólisis de ATP se determina como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los sistemas de ensayo son los mismos de la Figura 13. Otras adiciones a los diferentes medios de incubación son: rotenona 1,6 μM , antimicina A (AA) 0,16 μM , oligomicina 1 μg /mg de proteína, atractilosido (ATR) 0,01 mM, ión Mg^{+2} ($MgCl_2$) 150 μM e ión Ca^{+2} ($CaCl_2$) 0,2 mM (concentraciones finales). Los sistemas se preincuban durante 3 min a 25°C; excepto el sistema con sacarosa 250 mM y succinato 5 mM, el cual se preincuba durante 6 min. La reacción se inicia al agregar simultáneamente ATP 3 mM y CCCP 1 μM (concentraciones finales) o en ausencia de CCCP para los diferentes sistemas. A los 3 min se toman alícuotas de 0,2 ml. La reacción se detiene con ATC y se determina Pi en el sobrenadante según se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los valores son los promedios de tres determinaciones independientes de cada uno de los diferentes sistemas de ensayo usados.

en presencia de Antimicina A, inhibidor del sitio II de acoplamiento. Si sustituye cierta cantidad de sacarosa por KCl (osmolaridad constante) en el medio de incubación en ausencia de ATP agregado, se observa una actividad ATPasa remanente que podría corresponder a la hidrólisis de ATP endógeno. Al agregar ATP la actividad aumenta alrededor de 14 veces si se compara con la actividad determinada en ausencia de KCl. Esta actividad ATPasa es inhibida por oligomicina y atractilosido lo cual sugiere que la hidrólisis de ATP medida corresponde sólo a la reacción catalizada por el complejo F_0F_1 -ATPasa en mitocondrias intactas. Además esta actividad estimulada por K^+ es inhibida por Mg^{+2} y Ca^{+2} , resultados que concuerdan con aquellos encontrados por Cintrón y Pedersen (220) en vesículas de membrana interna invertida de mitocondrias, y por Gómez-Puyou y col., (219) en mitocondrias de corazón de rata. Con KCl en el medio de incubación, succinato actúa como inhibidor de la actividad hidrolítica estimulada por K^+ , en estas condiciones se obtienen valores similares a los medios sin KCl, pero la actividad es independiente del tiempo de preincubación con succinato. La inhibición por succinato puede ser revertida, en presencia de antimicina A. Estos resultados sugieren que existe más de un estado activo del complejo F_0F_1 -ATPasa.

2.5. Efecto de la Concentración de KCl y NaCl en la Actividad Adenosina Trifosfatásica Estimulada por CCCP en Mitocondrias Intactas Suspendingas en LiCl.

Para comparar las actividades de hidrólisis de ATP en mitocondrias de hígado de ratas alimentadas con una dieta normal y en ratas alimentadas con una dieta sin proteínas, se midió la actividad ATPasa usando un medio lo más semejante posible (Figuras 11 y 12) al utilizado para medir el proceso.

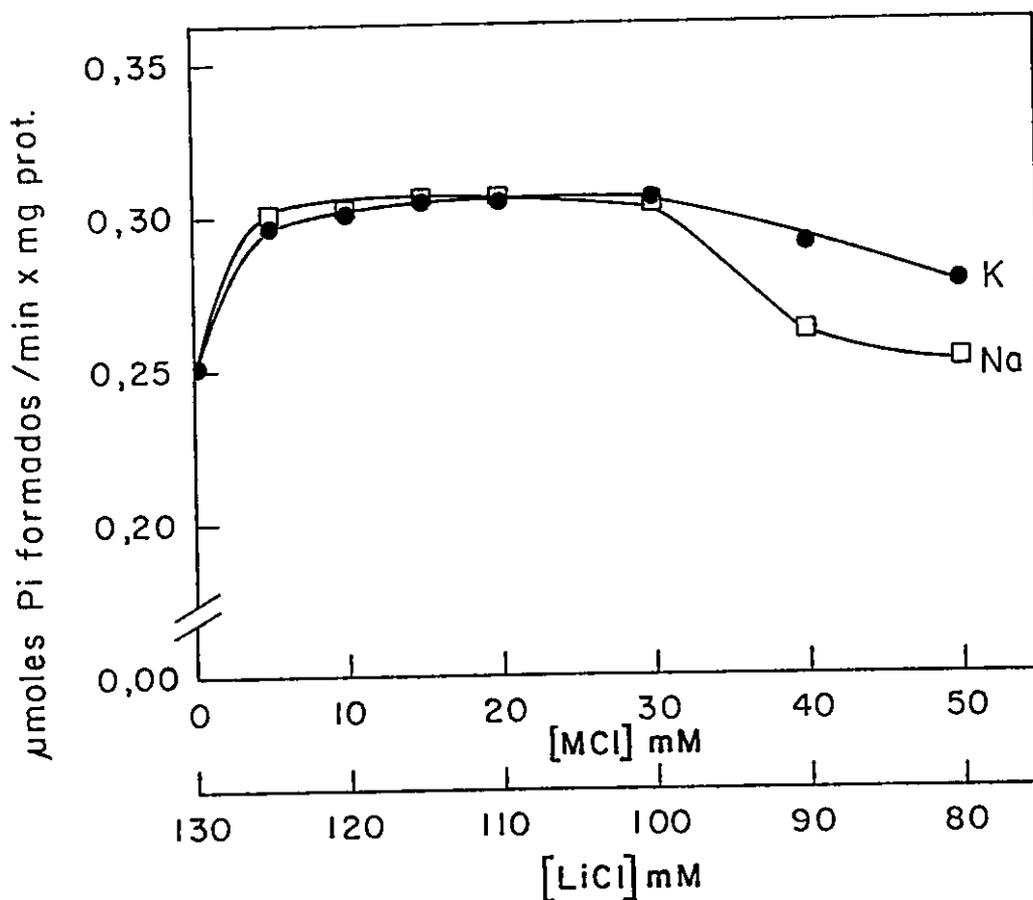


Figura 16. Efecto de las Concentraciones de KCl y NaCl sobre la Velocidad Adenosina Trifosfatasa en Mitocondrias Suspendidas en LiCl desacopladas con CCCP. La actividad de hidrólisis de ATP por mitocondrias de hígado de ratas normales se determina como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los sistemas de ensayo en un volumen de 2,0 ml contienen: 2 mg de proteína mitocondrial, Hepes 10 mM (pH 7,4), LiCl entre 130-80 mM, NaCl entre 0-50 mM (\square , Na), o KCl entre 0-50 mM (\bullet , K). Los sistemas se preincubaban durante 3 min a 25°C. La reacción se inicia al agregar simultáneamente ATP 3 mM y CCCP 1 μ M (concentraciones finales) para los diferentes medios de ensayo. A los 3 min se toman alícuotas de 0,2 ml. La reacción se detiene con ATC. La determinación de Pi en el sobrenadante se realiza como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los valores son los promedios para cuatro determinaciones independientes de los distintos sistemas de ensayo usados.

de fosforilación oxidativa, para lo cual se estudió el efecto de la concentración de KCl y NaCl sobre la velocidad de hidrólisis de ATP en mitocondrias suspendidas en LiCl, como se muestra en la Figura 16. Se puede observar que cuando LiCl es reemplazado por KCl o NaCl para alcanzar una concentración de 5 mM (manteniendo la misma osmolaridad) la actividad ATPasa estimulada por CCCP aumenta en un 16% aproximadamente, y a medida que mayor cantidad de LiCl es reemplazada por KCl o NaCl la actividad de esta enzima se mantiene constante hasta una concentración de 30 mM para cada una de las sales. Los valores de actividad ATPasa son muy semejantes a los obtenidos con sacarosa y una concentración 50 mM de los distintos cationes monovalentes (Figura 14). Concentraciones mayores de NaCl o KCl inhiben la actividad ATPasa.

2.6. Efecto de las Concentraciones de CCCP y FCCP sobre la Actividad Adenosina Trifosfatásica Estimulada por KCl.

La Figura 17 muestra el efecto de la concentración de los desacoplantes CCCP y FCCP sobre la actividad de hidrólisis de ATP en mitocondrias intactas en un medio de suspensión compuesto por sacarosa 0,15 M y KCl 50 mM. Se puede observar en la Figura 17A que los valores de actividad máxima y de K_a para CCCP son similares a los obtenidos con el medio de suspensión compuesto de KCl 13 mM y LiCl 117 mM (Figura 12). Si el desacoplante utilizado es FCCP (Figura 17B), el valor de la actividad máxima es similar al obtenido con CCCP, pero el valor de K_a es característico para FCCP. Lo cual sugiere que ambos medios de suspensión son equivalentes y el aumento de la actividad de hidrólisis de ATP es independiente de la naturaleza de estos dos desacoplantes.

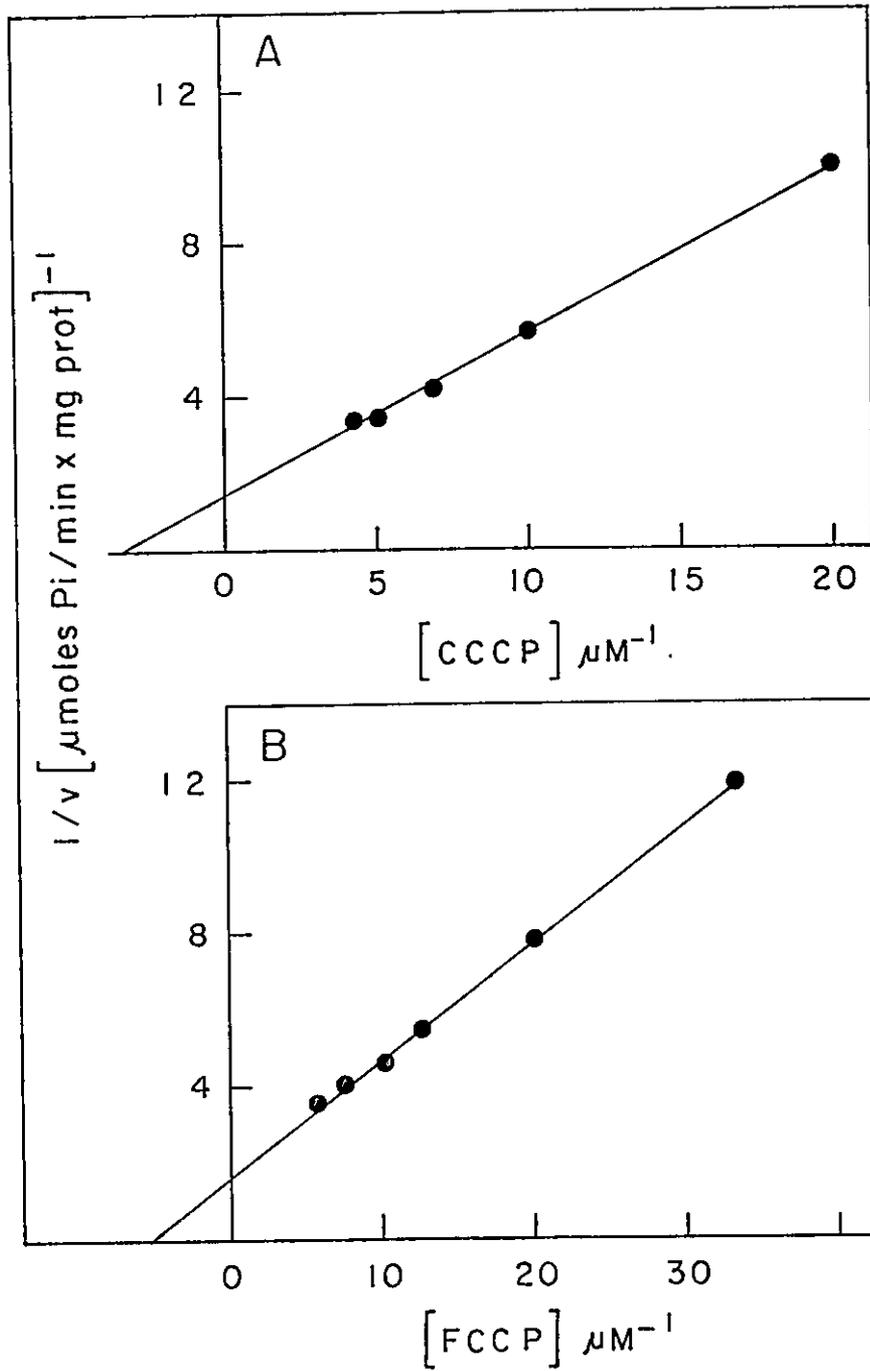


Figura 17. Efecto de las Concentraciones de CCCP y FCCP sobre la Adenosina Trifosfatasa en Mitochondrias Suspensas en LiCl Desacopladas con CCCP.

Figura 17. Efecto de las Concentraciones de CCCP y FCCP sobre la Adenosina Tri-fosfatasa en Mitocondrias Suspendidas en LiCl Desacopladas con CCCP. La Velocidad de hidrólisis de ATP por mitocondrias de hígado de ratas normales se mide como se describe en la sección de Materiales y Métodos. El sistema de ensayo en un volumen de 2,0 ml contiene: sacarosa 150 mM, KCl 50 mM, Hepes 10 mM (pH 7,4) y 2 mg de proteína mitocondrial. El sistema se pre-incuba durante 3 min a 25°C. Se agrega simultaneamente ATP 3 mM y CCCP entre 0,05-0,25 μ M o FCCP entre 0,03-0,20 μ M (concentraciones finales). A los 3 min se toman alícuotas de 0,2 ml. La reacción se detiene con ATC. La determinación de Pi en el sobrenadante se realiza según está descrito en la sección de Materiales y Métodos. Los valores son los promedios para cuatro determinaciones independientes para cada uno de los des_acoplantes. CCCP: $r=0,9994$, $V_{max}: 0,714 \pm 0,016$ y $K_a: 0,303 \pm 0,020 \mu$ M. FCCP: $r = 0,9994$, $V_{m\acute{a}x}: 0,697 \pm 0,012$ y $\bar{K}_a: 0,210 \pm 0,010 \mu$ M.

C. ALTERACIONES EN EL PROCESO DE INCORPORACION DE Ca^{+2} .

a) Estimulación de la Oxidación de Succinato por Ca^{+2} en Mitocondrias de Hígado de Ratas Normales y con DEPD.

La Figura 18 muestra los resultados de un experimento típico donde se miden simultáneamente las velocidades de consumo de oxígeno y de liberación de H^+ en mitocondrias de hígado de ratas normales y con DEPD en presencia de fosfato. La adición de Ca^{+2} induce un aumento de la velocidad de consumo de oxígeno de 4,6 veces en mitocondrias de ratas normales y de 3,7 veces en mitocondrias de ratas desnutridas, lo que equivale respectivamente a 111 (normal) y 86 (DEPD) nanoátomos-g O/min por mg de proteína. Cuando todo el Ca^{+2} ha sido incorporado las velocidades de consumo de oxígeno vuelven a las velocidades de estado 4 de Ca^{+2} (la velocidad de consumo de oxígeno que prevalece después de la activación de la respiración inducida por Ca^{+2}). Los valores de la razón Ca^{+2}/O son 3,7 (normal) y 3,65 (DEPD), equivalente a los valores de la razón $\text{Ca}^{+2}/\text{sitio}$ respectivos de 1,85 y 1,83. La estimulación de la respiración por Ca^{+2} está acompañada por la liberación de H^+ . Los valores de la velocidad de liberación de H^+ son 468 (normal) y 337 (DEPD) nanoiones-g H^+ /min por mg de proteína y aquellos de la razón H^+/O (velocidad de liberación de H^+ /velocidad de consumo de O) son 4,22 (normal) y 3,92 (DEPD), lo que equivale a los valores de la razón H^+/sitio respectivos de 2,11 y 1,96.

De estos experimentos podemos concluir que las mitocondrias de ratas con DEPD muestran las mismas respuestas características con respecto a las relaciones estequiométricas entre la entrada de Ca^{+2} y la liberación de H^+ con el transporte de electrones, observadas en mitocondrias de ratas normales. Sin embargo, las velocidades de transporte de electrones y de liberación de

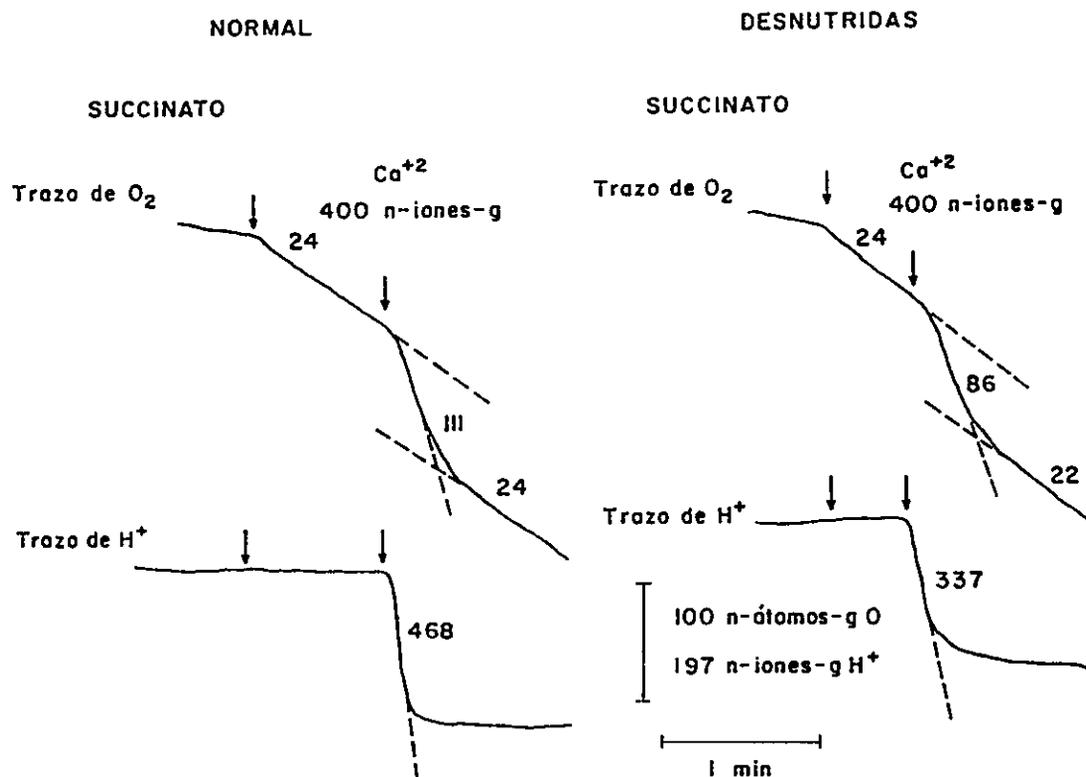


Figura 18. Efecto de la DEPD sobre la Estimulación de la Oxidación de Succinato por Ca^{+2} en Mitocondrias de Hígado de Ratas. Las velocidades de consumo de oxígeno y de liberación de H^+ por mitocondrias de hígado de ratas normales (lado izquierdo) y con DEPD (lado derecho) se miden como se describe en la sección de Materiales y Métodos. El sistema de ensayo en un volumen de 2,0 ml contiene: LiCl 117 mM, KCl 13 mM, Hepes 3 mM, fosfato de potasio 2 mM, 2,5 mg de proteína mitocondrial/ml de ambos grupos de ratas y rotenona 4 μM a pH 7,2. En los puntos indicados por las flechas se agrega succinato 2,5 mM y Ca^{+2} (CaCl_2) 0.2 mM. Los números sobre los trazos indican las velocidades en n-átomos-g O_2 o n-iones-g H^+ /min por mg de proteína.

H^+ cuando se incorpora Ca^{+2} están disminuídas en mitocondrias de ratas con DEPD.

b) *Estimulación de las Velocidades de Oxidación de Glutamato, Succinato y Ascorbato + TMPD por Ca^{+2} .*

En la Tabla IX se muestra una comparación entre las velocidades de consumo de oxígeno y de liberación de H^+ estimuladas por Ca^{+2} en presencia de fosfato cuando son oxidados glutamato, succinato y ascorbato + TMPD en mitocondrias de hígado de ratas normales y con DEPD. Se puede observar que en mitocondrias de ratas desnutridas las velocidades de consumo de oxígeno estimuladas por Ca^{+2} están disminuídas 21% cuando el sustrato oxidado es glutamato, 22% para succinato y 19% para ascorbato + TMPD. Las velocidades de liberación de H^+ fueron también menores durante la oxidación de los tres sustratos con disminuciones de 29%, 26% y 30% para glutamato, succinato y ascorbato + TMPD respectivamente. Los porcentajes de disminución son muy semejantes a los obtenidos en el proceso de fosforilación de ADP.

c) *Razón de Control Respiratorio de Ca^{+2} , y Razones: Ca^{+2} /sitio y H^+ /sitio.*

La Tabla X muestra las razones para el control de Ca^{+2} (velocidad de consumo de oxígeno cuando se incorpora Ca^{+2} /velocidad de consumo de oxígeno después de todo el Ca^{+2} ha sido incorporado), Ca^{+2} /sitio (nanoiones-g de Ca^{+2} incorporados/nanoátomos-g de O consumidos por sitio de acoplamiento) y H^+ /sitio (velocidad de liberación de H^+ /velocidad de consumo de O por sitio conservador de energía) durante la oxidación de diferentes sustratos en mitocondrias de hígado de ratas normales y con DEPD. Se observa que en mitocondrias de hígado de ratas desnutridas las razones de control de Ca^{+2} están disminuídas 20% y 18% cuando son oxidados glutamato y succinato respectivamente, pero no se observa diferencias con los organelos normales cuando se

TABLA IX
 Estimulación de la Oxidación de Diferentes Sustratos en los Tres Sitios de Acoplamiento por Ca^{+2} .

Sustrato	Incorporación de Oxígeno		Liberación de Protones	
	Normal	Desnutridas	Normal	Desnutridas
Glutamato	48,6 ± 3,2	38,5 ± 3,5*	360,8 ± 34,4	257,6 ± 20,1***
Succinato	117,8 ± 10,3	92,0 ± 9,8****	442,0 ± 26,2	328,5 ± 89,0****
Ascorbato + TMPD	177,0 ± 10,1	142,9 ± 9,5****	338,6 ± 17,9	237,2 ± 19,6**

El consumo de oxígeno y la liberación de protones se midieron como está descrito en la sección de Materiales y Métodos. El sistema de ensayo de 2,0 ml a 25°C y pH 7,2 contenía LiCl 117 mM, KCl 13 mM, tampón Hepes 3,0 mM y fosfato (K) 2,0 mM. La estimulación de la oxidación de diferentes sustratos se midieron después de la adición de 400 n-iones-g de Ca^{+2} para la oxidación de glutamato y succinato y de 200 n-iones-g de Ca^{+2} para la oxidación de ascorbato + TMPD. La concentración de proteína mitocondrial era 2,5 mg/ml para las oxidaciones de glutamato y succinato y 1,25 mg/ml para la oxidación de ascorbato + TMPD. Los siguientes inhibidores fueron usados: rotenona 4 μM para la oxidación de succinato, rotenona 4 μM y antimicina A 0,4 μM para la oxidación de ascorbato + TMPD. Las velocidades de las oxidaciones de estado 4 de Ca^{+2} fueron determinadas después que todo el Ca^{+2} ha sido incorporado. Los valores indican las velocidades en nano-átomos-g de oxígeno o nanoiones-g de H^{+} por min^{-1} por mg^{-1} de proteína. Los valores son los promedios ± D.S. para siete (normal) y ocho (desnutrida) determinaciones independientes de grupos de ratas. La significación (normal contra desnutrida): * $P < 0,0005$; ** $P < 0,0025$; *** $P < 0,025$; **** $P < 0,05$.

TABLA X
 Razones de Control Ca^{+2} , Ca^{+2} /sitio y H^{+} /sitio

Sustrato	Razón de Control de Ca^{+2}		Razón Ca^{+2} /sitio		Razón H^{+} /sitio	
	Normal	Desnutrida	Normal	Desnutrida	Normal	Desnutrida
Glutamato	$4,81 \pm 0,67$	$3,78 \pm 0,90^*$	$1,80 \pm 0,14$	$1,76 \pm 0,18$	$2,43 \pm 0,37$	$2,23 \pm 0,21$
Succinato	$4,41 \pm 0,19$	$3,62 \pm 0,30^{**}$	$1,85 \pm 0,15$	$1,87 \pm 0,18$	$1,88 \pm 0,06$	$1,78 \pm 0,27$
Ascorbato + TMPD	$1,78 \pm 0,29$	$1,70 \pm 0,18$	$1,81 \pm 0,08$	$1,86 \pm 0,18$	$1,91 \pm 0,08$	$1,66 \pm 0,13$

Las razones de control de Ca^{+2} , Ca^{+2} /sitio y H^{+} /sitio se calculan de los valores de la Tabla IX como está descrito en el texto. Significancia (normal contra desnutrida): * $p < 0,01$; ** $p < 0,025$.

oxida ascorbato + TMPD.

Las razones $\text{Ca}^{+2}/\text{sitio}$ se calcularon suponiendo que todo el oxígeno ha sido consumido durante la incorporación de Ca^{+2} . Los valores de las razones $\text{Ca}^{+2}/\text{sitio}$ fueron cercanos a 2,0 tanto en mitocondrias de ratas normales como desnutridas cuando los sustratos oxidados fueron glutamato, succinato y ascorbato + TMPD. Además la Tabla X muestra la determinación cuantitativa de las razones H^+/sitio para la liberación de H^+ por la incorporación de Ca^{+2} acoplada al transporte de electrones durante la oxidación de diferentes sustratos. En mitocondrias de ambos grupos de ratas el valor obtenido para las razones H^+/sitio fue alrededor de 2,0 para la oxidación de los diferentes sustratos.

d) Efecto de la Concentración de Ca^{+2} sobre su Velocidad de Incorporación y su Estequiometría Durante las Oxidaciones de Glutamato y Succinato.

En la Figura 19 se observa el efecto de diferentes concentraciones de Ca^{+2} en el medio de suspensión sobre las velocidades iniciales de consumo de oxígeno y de liberación de H^+ durante la oxidación de glutamato en presencia de fosfato en mitocondrias de hígado de ratas normales y con DEPD. La misma Figura muestra el efecto de la concentración de Ca^{+2} sobre la razón de control de Ca^{+2} y las razones $\text{Ca}^{+2}/\text{sitio}$ y H^+/sitio bajo las mismas condiciones en mitocondrias de ambos grupos de rata.

La Figura 19 A muestra el efecto de la concentración de Ca^{+2} sobre la razón de control respiratorio de Ca^{+2} . Las velocidades en estado 4 usadas en los cálculos de las razones de control de Ca^{+2} son las que prevalecen una vez terminada la activación de la respiración inducida por las

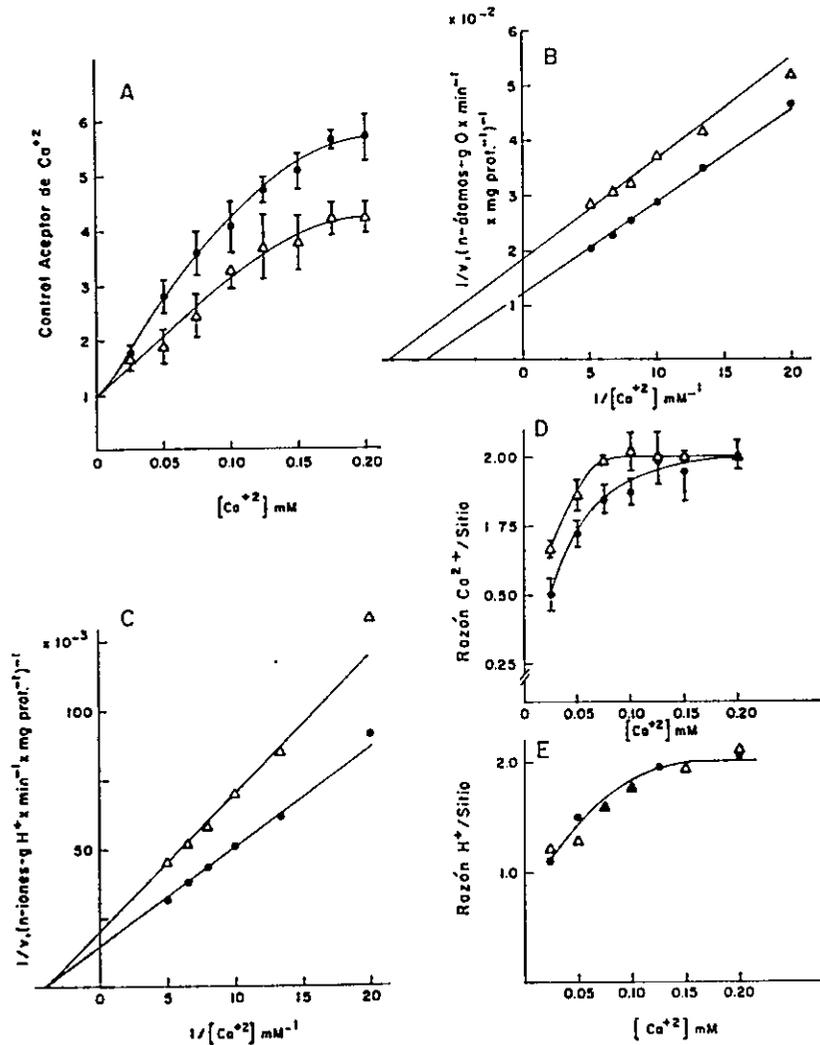


Figura 19. Efecto de la DEP sobre la Velocidad de Incorporación de Ca^{2+} y su Estequiometría Durante la Activación de la Oxidación de Glutamato por Diferentes Concentraciones de Ca^{2+} Agregadas en Mitocondrias de Hígado.

Figura 19. Efecto de la DEPD sobre la Velocidad de Incorporación de Ca^{+2} y su Estequiometría Durante la Activación de la Oxidación de Glutamato por Diferentes Concentraciones de Ca^{+2} Agregadas en Mitocondrias de Hígado. Las velocidades de consumo de oxígeno y de liberación de H^+ por mitocondrias de hígado de ratas normales (\bullet) y con DEPD (Δ) se miden como se describe en la sección de Materiales y Métodos. El sistema de ensayo en un volumen de 2,0 ml contiene: LiCl 117 mM, KCl 13 mM, Hepes 3 mM, fosfato de potasio 0,5 mM, 2,5 mg de proteína mitocondrial/ml de ambos grupos de ratas, glutamato 2,0 mM y Ca^{+2} (CaCl_2) entre 0,02 - 0,20 mM a pH 7,2. Los valores son los promedios de cinco (normal) y seis (con DEPD) determinaciones independientes de grupos de ratas. Normal : $V_{\text{máx}} = 83,3$ n-átomos-g O_2/min por mg proteína y 714 n-iones-g H^+/min por mg proteína, K_m ap = 138 μM y 250 μM Ca^{+2} respectivamente; con DEPD: $V_{\text{máx}}$: 54 n-átomos-g O_2/min por mg proteína y 488 n-iones-g H^+/min por mg proteína, K_m ap = 101 μM y 250 μM Ca^{+2} respectivamente. Las razones de control de Ca^{+2} , $\text{Ca}^{+2}/\text{sitio}$ y H^+/sitio , y la velocidad de incorporación de Ca^{+2} se calculan como se describe en el texto.

diferentes cantidades de Ca^{+2} . Cuando la concentración de Ca^{+2} aumenta la velocidad de consumo de oxígeno también aumenta en mitocondrias de ambos grupos de rata, pero esta estimulación de la respiración por Ca^{+2} es menor en mitocondrias de hígado de ratas con DEPD; en consecuencia las razones de control de Ca^{+2} aumentan, pero el aumento es siempre menor en mitocondrias de ratas con DEPD. La razón de control de Ca^{+2} en mitocondrias de hígado de ratas normales aumenta cuando la concentración de Ca^{+2} aumenta alcanzando un valor de 5,7 a una concentración de Ca^{+2} de 0,2 mM; en cambio en mitocondrias de ratas con DEPD la razón de control de Ca^{+2} es 4,2 (26% menor) a la misma concentración del catión.

Si se acumulan 2 iones Ca^{+2} por cada par de electrones transportados por sitio conservador de energía las mitocondrias de hígado de ratas con DEPD muestran una velocidad máxima de incorporación de Ca^{+2} significativamente menor (35% menor) que aquella que proviene de ratas alimentadas con dieta normal (Figura 19 B). Mitocondrias de hígado de ratas con DEPD incorporaron 324 nanoiones-g de Ca^{+2} por min por mg de proteína, comparado con 500 nanoiones-g de Ca^{+2} por min por mg de proteína en mitocondrias de ratas normales. Además las mitocondrias de ambos grupos de animales presentaron una afinidad similar por Ca^{+2} . En presencia de fosfato 0,5 mM y concentración de glutamato no limitante, las concentraciones de Ca^{+2} necesarias para obtener la mitad de la actividad máxima de consumo de oxígeno fueron semejantes 101 μM Ca^{+2} (DEPD) y 138 μM Ca^{+2} (normal).

El efecto de la desnutrición sobre la velocidad de liberación de H^{+} a diferentes concentraciones de Ca^{+2} fue similar a la estimulación del consumo de oxígeno. La velocidad máxima de liberación de H^{+} (Figura 19 C) fue significativamente menor en mitocondrias de ratas con DEPD (32%). Así,

la velocidad correspondiente en mitocondrias de ratas normales fue de 714 nanoiones-g de H^+ por min por mg de proteína y en mitocondrias de ratas con DEPD de 488 nanoiones-g de H^+ por min por mg de proteína. La concentración de Ca^{+2} necesaria para obtener la mitad de la velocidad máxima de liberación de H^+ es la misma para mitocondrias de hígado de ambos grupos de rata (250 μM). Este valor no es significativamente diferente de los obtenidos en las mediciones de consumo de oxígeno. Los valores de la razón H^+/Ca^{+2} calculados de las velocidades máximas de liberación de H^+ y de incorporación de Ca^{+2} son 1,5 (DEPD) y 1,4 (normales).

La Figura 19 D muestra las razones de Ca^{+2} /sitio obtenidas de mitocondrias de ratas normales y con DEPD en función de la concentración de Ca^{+2} presente en el medio de incubación. Los valores de la razón Ca^{+2} /sitio son muy cercanos a 2,0 y se mantienen casi constantes en el rango de 75 a 200 $\mu M Ca^{+2}$ en mitocondrias de ambos grupos de rata.

La Figura 19 E muestra las razones H^+ /sitio obtenidas de mitocondrias de hígado de ratas normales y desnutridas en función de la concentración de Ca^{+2} . Los valores de la razón H^+ /sitio son también constantes entre 1,8 a 2,0 en el rango de 100 a 200 $\mu M Ca^{+2}$ en mitocondrias de ambos grupos de rata.

La Figura 20 muestra el efecto de la concentración de Ca^{+2} en las velocidades de consumo de oxígeno y liberación de H^+ cuando se incorpora Ca^{+2} durante la oxidación de succinato en mitocondrias de hígado de ratas normales y con DEPD. La misma Figura muestra también el efecto de la concentración de Ca^{+2} sobre las razones de control de Ca^{+2} , Ca^{+2} /sitio y H^+ /sitio en mitocondrias de ambos grupos de rata.

La Figura 20 A muestra el efecto de la concentración de Ca^{+2} sobre la razón de control de Ca^{+2} durante la oxidación de succinato, determinado

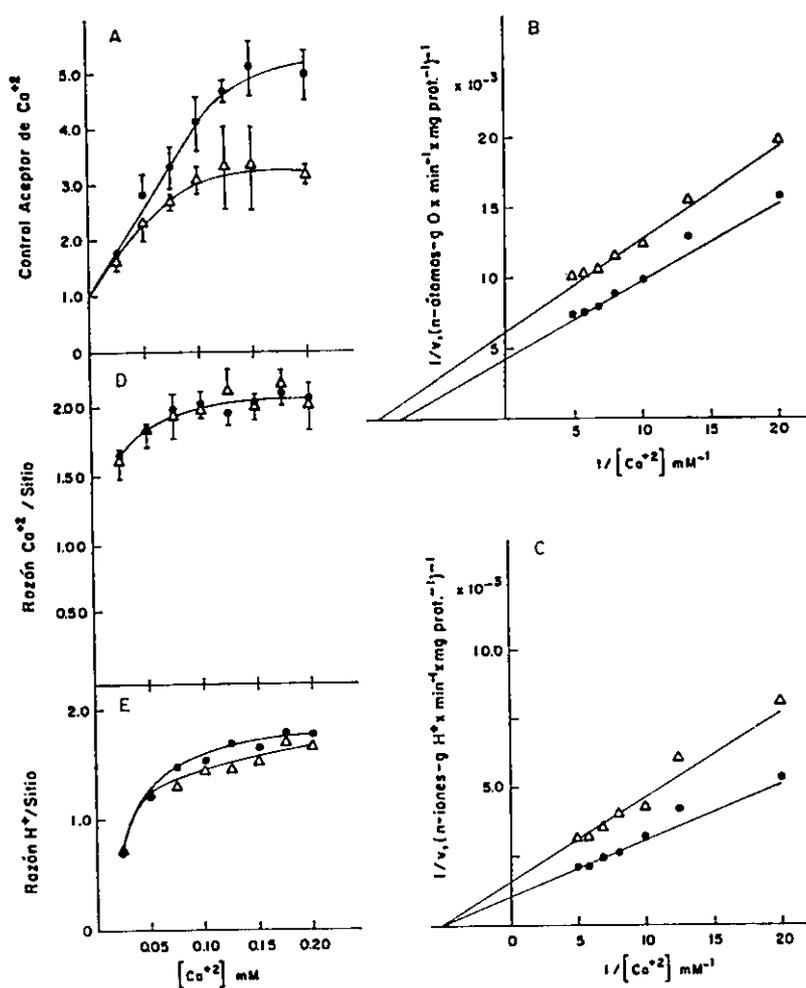


Figura 20. Efecto de la DEPD sobre la Velocidad de Incorporación de Ca^{2+} y su Estequiometría Durante la Activación de la Oxidación de Succinato por Diferentes Concentraciones de Ca^{2+} Agregadas en Mitocondrias de Hígado.

Figura 20. Efecto de la DEPD sobre la Velocidad de Incorporación de Ca^{+2} y su Estequiometría Durante la Activación de la Oxidación de Succinato por Diferentes Concentraciones de Ca^{+2} Agregadas en Mitocondrias de Hígado. Las velocidades de consumo de oxígeno y de liberación de H^+ por mitocondrias de hígado de ratas normales (\bullet) y con DEPD (Δ) se miden como se describe en la sección de Materiales y Métodos. El sistema de ensayo es igual al de la Figura 19 con excepción de glutamato que es reemplazado por succinato 2,5 mM y rotenona 4 μM . Los valores son los promedios de cinco (normal) y seis (con DEPD) determinaciones independientes de grupos de ratas. Normal: $V_{\text{max}} = 227$ n-átomos-g O_2/min por mg de proteína y 952 n-iones-g H^+/min por mg de proteína, $K_m \text{ ap} = 125 \mu\text{M}$ y $190 \mu\text{M}$ Ca^{+2} respectivamente; con DEPD: $V_{\text{max}} = 154$ n-átomos-g O_2/min por mg proteína y 625 n-iones-g H^+/min por mg proteína, $K_m \text{ ap} = 103 \mu\text{M}$ y $190 \mu\text{M}$ Ca^{+2} respectivamente. Las razones de control de Ca^{+2} , $\text{Ca}^{+2}/\text{sito}$ y H^+/sito , y la velocidad de incorporación de Ca^{+2} se calculan como se describe en el texto.

por el mismo procedimiento utilizado para la Figura 19 A. La razón de control de Ca^{+2} aumenta cuando la concentración de Ca^{+2} aumenta. En mitocondrias de hígado de ratas normales se alcanza un valor de alrededor de 5,2 cuando la concentración de Ca^{+2} es 0,2 mM, en cambio en mitocondrias de hígado de ratas con DEPD, el valor es 36% menor (3,3), y se mantiene casi constante en un rango de concentración de Ca^{+2} que varía desde 0,1 mM hasta 0,2 mM.

Si se incorporan 2 Ca^{+2} por cada par de electrones transferidos por sitio conservador de energía las mitocondrias de hígado de ratas con DEPD presentan un valor de incorporación máxima de Ca^{+2} significativamente menor (32% menor) que el observado en mitocondrias de hígado de ratas normales (Figura 20 B). Las mitocondrias del grupo sometido a una dieta sin proteínas transportan 615 nanoiones-g de Ca^{+2} por min por mg de proteína comparado con 909 nanoiones-g de Ca^{+2} por min por mg de proteína de mitocondrias de hígado de ratas normales. Las mitocondrias de hígado de ambos grupos de animales presentan una afinidad similar por Ca^{+2} . Las concentraciones de Ca^{+2} para estimular a la mitad de la velocidad máxima el consumo de oxígeno son 103 μM (DEPD) y 125 μM (normales).

La Figura 20 C muestra los valores de la velocidad máxima de liberación de H^+ calculados de un gráfico de dobles recíprocas. Se observa que el valor de velocidad máxima de liberación de H^+ es significativamente menor (34% menor) para mitocondrias de hígado de ratas con DEPD. Mitocondrias de ratas con DEPD liberan 625 nanoiones-g de H^+ por min por mg de proteína y las normales 952 nanoiones-g de H^+ por min por mg de proteína. Los valores de la concentración de Ca^{+2} necesaria para obtener la mitad de la velocidad máxima de

liberación de H^+ son iguales ($190 \mu M$ de Ca^{+2}) para mitocondrias de ambos grupos de rata. Los valores de la razón H^+/Ca^{+2} calculados de los valores de las velocidades máximas de liberación de H^+ y de incorporación de Ca^{+2} son 1,01 (desnutridas) y 1,04 (normales).

La Figura 20 D muestra los valores de la razón $Ca^{+2}/sitio$ obtenidos de mitocondrias de hígado de ratas normales y desnutridas en función de la concentración de Ca^{+2} . El valor de la razón $Ca^{+2}/sitio$ en cada caso es 2,0 y se mantiene casi constante en el rango de concentración de Ca^{+2} de 75 a 200 μM para ambos grupos de mitocondrias.

La Figura 20 E muestra los valores de la razón de $H^+/sitio$ obtenidos de mitocondrias de ambos grupos de rata en función de la concentración de Ca^{+2} . Los valores de la razón $H^+/sitio$ se mantiene también casi constantes entre 1,5 y 1,8 en el rango de concentración de Ca^{+2} de 100 a 200 μM en mitocondrias de ambos grupos.

e) *Capacidad de las Mitocondrias de Hígado de Rata para Acumular Ca^{+2} .*

La Figura 21 muestra que las mitocondrias de hígado de rata con DEPD tienen menor capacidad para acumular Ca^{+2} que los organelos de ratas normales sin presentar daño en sus estructuras y reteniendo completamente el control respiratorio de Ca^{+2} . Cuando se agregaron pulsos sucesivos de 40 u 80 nanoiones-g de Ca^{+2}/mg de proteína por períodos de varios minutos (Figuras 21 A y 21 B), se acumuló un total de alrededor de 120 (DEPD) y 160 (normales) nanoiones-g de Ca^{+2} por mg de proteína mitocondrial sin que se aprecien disminuciones significativas de las respectivas razones de control de Ca^{+2} y $Ca^{+2}/sitio$. Los valores de la razón $Ca^{+2}/sitio$ en estos experimentos de acumulación de Ca^{+2} fueron cercanos a 2,0 en mitocondrias de ambos

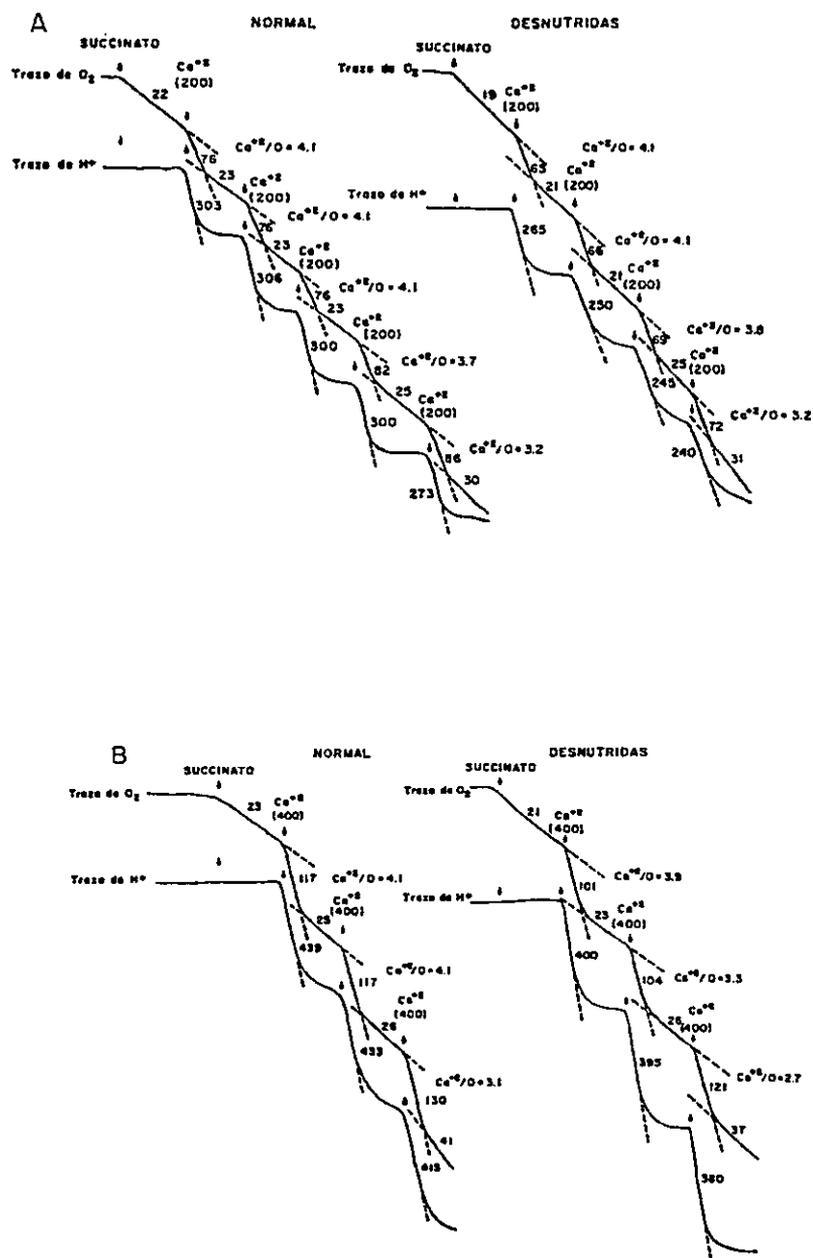


Figura 21. Efecto de la DEP sobre la Capacidad de las Mitochondrias de Hígado de Ratas para Acumular Ca⁺².

Figura 21. Efecto de la DEPD sobre la Capacidad de las Mitocondrias de Hígado de Ratas para Acumular Ca^{+2} . Las velocidades de consumo de oxígeno y de liberación de H^+ por mitocondrias de hígado de ratas normales (lado izquierdo) y con DEPD (lado derecho) se miden como se describe en la sección de Materiales y Métodos. El sistema de ensayo es el mismo al utilizado en la Figura 18. Las adiciones de Ca^{+2} en n-iones-g se realizan en los puntos indicados por las flechas. Los números sobre los trazos indican las velocidades en n-átomos-g O_2 o n-iones-g H^+ /min por mg de proteína. La razón Ca^{+2}/O se calcula como se describe en el texto. Los trazos son representativos de resultados obtenidos de tres determinaciones independientes de cada grupo de ratas.

grupos de rata.

Los valores de las razones control de Ca^{+2} , $\text{Ca}^{+2}/\text{sitio}$ y las velocidades de liberación de H^+ disminuyeron progresivamente y las velocidades de consumo de oxígeno en estado 4 de Ca^{+2} aumentaron progresivamente cuando se agregó más pulsos de Ca^{+2} , produciendo un efecto desacoplante.

f) *Preferencia de la Incorporación de Ca^{+2} sobre la Fosforilación Oxidativa en la Utilización de Energía que Proviene de la Oxidación de Sustratos.*

Mitocondrias de hígado de ratas normales y con DEPD muestran que la incorporación de Ca^{+2} precede a la fosforilación oxidativa cuando ambos procesos compiten por la energía liberada durante la respiración (Figura 22). Las mitocondrias se preincubaron en ausencia de sustratos respiratorios para agotar todo el ATP endógeno (221). Se agregó entonces succinato y aproximadamente 2 min más tarde se adicionaron juntos Ca^{+2} y ADP para iniciar el flujo de electrones. Se produjo una rápida liberación de H^+ y una estimulación en la respiración en mitocondrias de ambos grupos de rata, que corresponde casi precisamente a la incorporación de Ca^{+2} según se observa en la Figura 18 y en la Tabla IX. La liberación de H^+ cesa al término del primer período de estimulación respiratoria marcado por un punto de inflexión hacia una velocidad de consumo de oxígeno menor. En este punto se inicia la incorporación de H^+ que acompaña a esta velocidad menor de consumo de oxígeno y correspondería al período de fosforilación oxidativa, respuesta semejante a la mostrada en la Figura 7. Los valores similares de velocidad de consumo de oxígeno y de liberación de H^+ inducidos por Ca^{+2} y obtenidos en ausencia de ADP (Figura 18 y Tabla IX .) demuestran que la incorporación de Ca^{+2} ocurre en mitocondrias de ambos grupos de rata con muy poca competencia de la fosforilación del ADP en las condiciones de ensayo utilizadas.

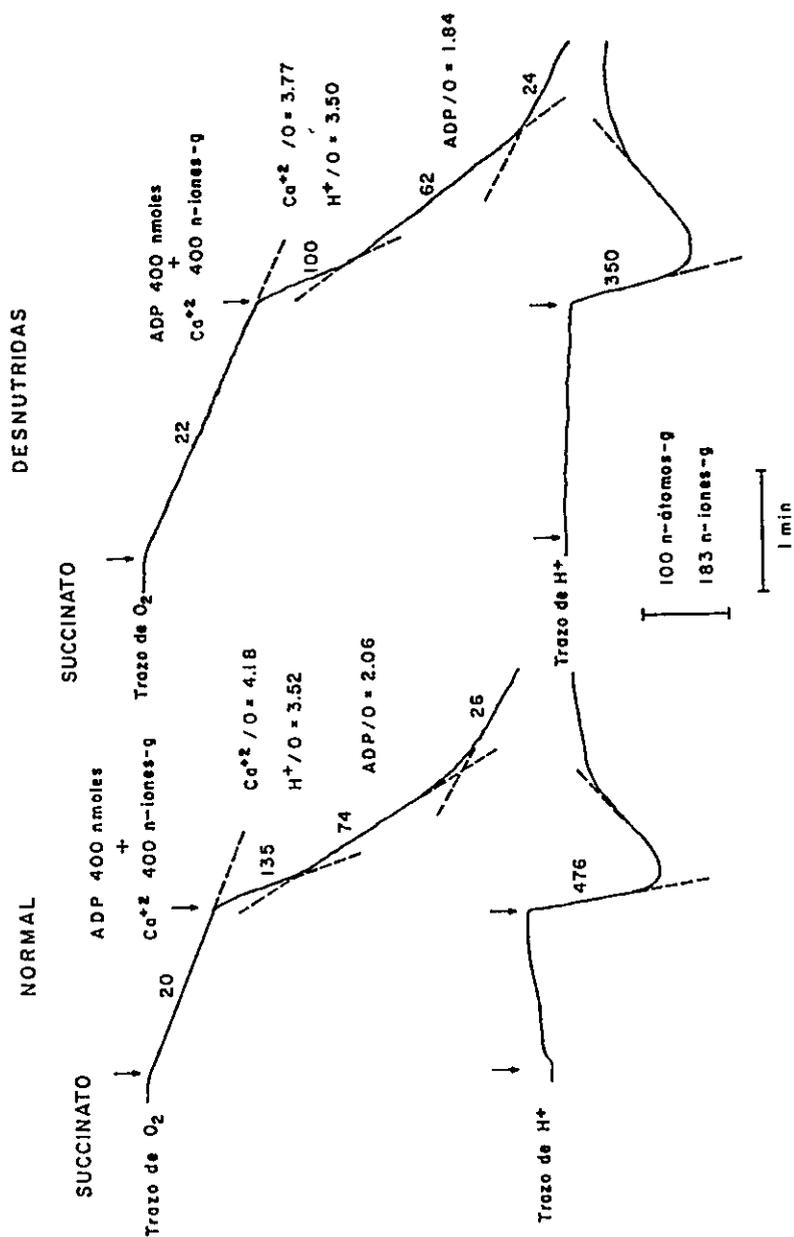


Figura 22. Efecto de la DEPD sobre la Preferencia de la Incorporación de Ca²⁺ sobre la Fosforilación Oxidativa en Mitocondrias de Hígado de Ratas.

Figura 22. Efecto de la DEPD sobre la Preferencia de la Incorporación de Ca^{+2} sobre la Fosforilación Oxidativa en Mitocondrias de Hígado de Ratas. Las velocidades de consumo de oxígeno y de liberación de H^+ por mitocondrias de hígado de ratas normales (lado izquierdo) y con DEPD (lado derecho) se miden como se describe en la sección de Materiales y Métodos. El sistema de ensayo es el mismo utilizado en la Figura 18. En los puntos indicados por las flechas, se agregan simultáneamente 400 n-iones-moles de ADP. Los números sobre los trazos indican las velocidades en n-átomos-g O_2 o n-iones-g H^+ /min por mg de proteína. Los trazos son representativos de resultados obtenidos de tres determinaciones independientes de cada grupo de rata.

Los valores de la razón Ca^{+2}/O fueron de 4,18 (normales) y 3,77 (DEPD) equivalentes a los valores de la razón $\text{Ca}^{+2}/\text{sitio}$ de 2,09 (normales) y 1,89 (DEPD). Los valores de la razón H^{+}/O fueron 3,52 (normales) y 3,50 (DEPD) lo cual equivale a los valores de la razón $\text{H}^{+}/\text{sitio}$ de 1,76 (normales) y 1,75 (DEPD). Los valores de la razón ADP/O fueron de 2,06 (normales) y 1,84 (DEPD).

Además, la Figura 22 muestra que la fosforilación oxidativa es inhibida en cierta forma por el Ca^{+2} acumulado previamente en mitocondrias de ambos grupos de rata (si se compara con los valores de la Figura 7 y Tabla IV). Observaciones similares han sido obtenidas tanto en mitocondrias de corazón (222), como de hígado (172) de rata y de tumor ascítico de Ehrlich y AS30-D (223). La preferencia de la incorporación de Ca^{+2} sobre la fosforilación oxidativa y el efecto inhibitorio de Ca^{+2} sobre el proceso de fosforilación del ADP se debería a un colapso transitorio del potencial de membrana además de un efecto favorable de Ca^{+2} -ATP en la asociación del péptido inhibitorio de la ATPasa al complejo F_0F_1 -ATPasa (219).

De estos resultados se puede concluir que la incorporación de Ca^{+2} es el primer proceso que utiliza la energía generada por el transporte de electrones cuando se agrega Ca^{+2} y ADP simultáneamente. Así las mitocondrias de hígado de ratas normales y con DEPD se comportan de manera similar a este respecto, excepto que las velocidades de consumo de oxígeno y de movimiento de H^{+} son menores en mitocondrias de ratas desnutridas.

g) *Determinación de las Razones $\text{Ca}^{+2}/\text{sitio}$, H^+/sitio y $\text{H}^+/\text{Ca}^{+2}$ en Mitocondrias de Hígado en Presencia de NEM y en Ausencia de Fosfato.*

El sistema experimental para las determinaciones casi simultaneas de las razones $\text{Ca}^{+2}/\text{sitio}$, H^+/sitio y $\text{H}^+/\text{Ca}^{+2}$ consiste en utilizar Ca^{+2} como catión móvil y NEM para inhibir cualquier posible movimiento de H^+ acoplado al transporte de fosfato, el cual interfiere la determinación. Las velocidades de consumo de oxígeno y de liberación de H^+ fueron medidas simultáneamente en un sistema de ensayo de 2,0 ml. Las velocidades de liberación de H^+ y de incorporación de Ca^{+2} se determinaron también en forma simultánea en otro sistema de ensayo bajo las mismas condiciones experimentales, excepto que el volumen final fue de 5,0 ml. Se utilizó las velocidades de liberación de H^+ para comparar ambos sistemas.

La Figura 23 muestra las velocidades de consumo de oxígeno, incorporación de Ca^{+2} y liberación de H^+ en un experimento típico en mitocondrias de hígado de ratas con DEPD en presencia de succinato y rotenona. De los valores de velocidad inicial de los tres parámetros medidos se calcularon los valores de las diferentes razones obteniéndose: razón $\text{H}^+/\text{sitio} = 4,03$, razón $\text{Ca}^{+2}/\text{sitio} = 2,03$ y razón $\text{H}^+/\text{Ca}^{+2} = 1,98$.

La Tabla XI muestra los resultados promedios obtenidos de diferentes preparaciones de mitocondrias de hígado de ratas normales y con DEPD. En estas condiciones experimentales las velocidades de consumo de oxígeno, incorporación de Ca^{+2} y liberación de H^+ son muy similares en mitocondrias de ambos grupos de rata, probablemente debido a que la cadena transportadora de electrones no es la etapa limitante en la incorporación de Ca^{+2} en estas condiciones (170). En consecuencia, los valores promedios calculados fueron para la razón $\text{Ca}^{+2}/\text{sitio} 2,08$, para la razón $\text{H}^+/\text{sitio} 3,98$ y para la razón

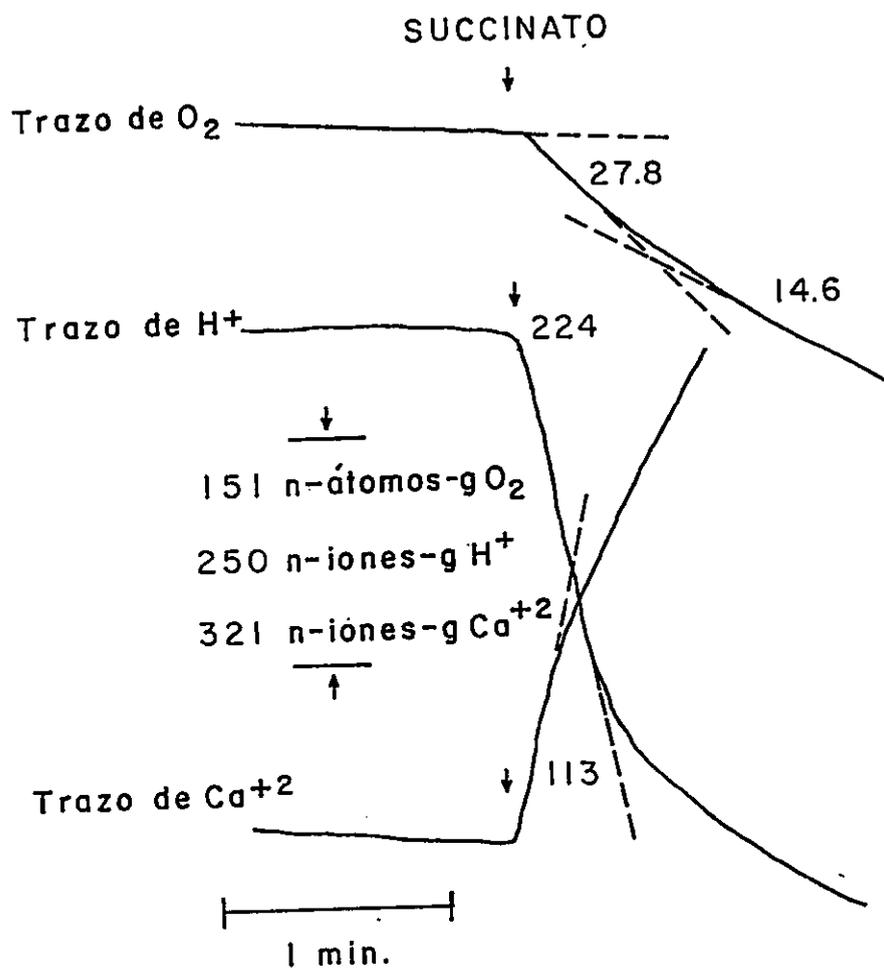


Figura 23. Determinación de las razones $Ca^{+2}/sitio$, $H^+/sitio$ y H^+/Ca^{+2} en Mitocondrias de Hígado de Ratas con DEPD.

Figura 23. *Determinación de las razones $\text{Ca}^{+2}/\text{sitio}$, $\text{H}^{+}/\text{sitio}$, y $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ en Mitocondrias de Hígado de Ratas con DEPD.* Las velocidades de consumo de oxígeno, de liberación de H^{+} y de incorporación de Ca^{+2} por mitocondrias de hígado de ratas con DEPD se miden como se describe en la sección de Materiales y Métodos. El sistema de ensayo en un volumen de 2,0 o 5,0 ml contiene: LiCl 117 mM, KCl 13 mM, Hepes 3,0 mM (pH 7,2), rotenona 4 μM , CaCl_2 80 nmoles/mg de proteína, NEM 40 nmoles/mg de proteína y 2,5 mg/ml de proteína mitocondrial. Después de la estabilización de los trazos (2,0 min a 25°C), se agrega succinato 1,0 mM (concentración final) para iniciar el flujo de electrones hasta el oxígeno. A partir de las velocidades de consumo de O_2 , liberación de H^{+} e incorporación de Ca^{+2} , indicados sobre los trazos como n-átomos-g (n-iones-g)/min por mg de proteína, se calculan las razones $\text{H}^{+}/\text{sitio}$, $\text{Ca}^{+2}/\text{sitio}$ y $\text{H}^{+}/\text{sitio}$ como se describe en el texto.

TABLA XI

Razones H^+ /sitio, Ca^{+2} /sitio and H^+/Ca^{+2} .

	NORMAL	DESNUTRIDA
Velocidades de consumo de oxígeno (n-átomos-g O por min^{-1} por mg^{-1})	29,1 \pm 1,8	26,5 \pm 2,0
Velocidades de liberación de protones (n-iones-g de H^+ por min^{-1} por mg^{-1})	239,8 \pm 18,8	211,0 \pm 19,1
Velocidades de incorporación de Ca^{+2} (n-iones-g Ca^{+2} por min^{-1} por mg^{-1})	120,0 \pm 4,1	110,5 \pm 2,5
Razones H^+ /sitio	4,12 \pm 0,07	3,98 \pm 0,06
Razones Ca^{2+} /sitio	2,06 \pm 0,06	2,08 \pm 0,11
Razones H^+/Ca^{+2}	2,00 \pm 0,09	1,9 \pm 0,13

El sistema de ensayo es el mismo de la Figura 23. Los valores son los promedios \pm D.S. de cuatro determinaciones independientes de cada grupo de rata.

H^+/Ca^{+2} 1,91 en mitocondrias de ratas con DEPD, valores muy similares a los promedios calculados para mitocondrias de hígado de ratas normales. Estas observaciones sugieren que las mitocondrias de ratas desnutridas incorporan Ca^{+2} con una estequiometría muy similar a la de mitocondrias de hígado de ratas normales.

DISCUSION

El modelo experimental de desnutrición energética-proteica drástica (DEPD) utilizado en esta Tesis, provocó también alteraciones en el sistema oxidativo microsomal hepático (206). La actividad hidroxilasa de hidrocarburos arílicos (benzo(a)pireno) fue casi insignificante en ratas con DEPD, en contraste con los altos valores observados en microsomas de ratas alimentadas con dieta normal. Sin embargo, ratas con DEPD realimentadas con una dieta con proteínas aumentaron la actividad hidroxilasa a valores aún más altos que los observados en los animales normales. Estos cambios en las actividades oxidativas de microsomas se correlacionaron con las alteraciones provocadas por el estado nutricional sobre las especies de citocromos P-450 involucradas en la oxidación de benzo(a)pireno (206).

En esta Tesis se informa que una deficiencia energética-proteica está asociada con alteraciones de las funciones bioenergéticas de mitocondrias de hígado de ratas tales como: el proceso de fosforilación oxidativa y el de incorporación de Ca^{+2} .

La disminución drástica del peso corporal y del hígado observados en ratas con DEPD estuvo acompañada con una disminución significativa del contenido de proteína mitocondrial (Tabla III). Este menor contenido de proteína mitocondrial hepático se debería a una disminución neta de la cantidad de mitocondrias, ya que el número de mitocondrias/mg de proteína permanece inalterado por la condición nutricional.

A. Fosforilación Oxidativa.

a) *Actividades Oxidativas.*

Las mitocondrias de hígado de ratas recién nacidas presentan menor velocidad de síntesis de ATP acoplada a la oxidación de sustratos (224, 225), es decir una menor eficiencia en la fosforilación oxidativa. Esta eficiencia mejora rápidamente durante las primeras horas después del nacimiento (226). Aún no se entiende completamente el mecanismo de maduración de las mitocondrias. Es conocido el hecho que el contenido total de nucleótidos de adenina mitocondrial aumenta conjuntamente con la actividad respiratoria al momento de nacer. Un aumento de la velocidad de síntesis de ATP a través de la maquinaria de fosforilación oxidativa es uno de los primeros acontecimientos que ocurren en mitocondrias de ratas recién nacidas. Durante la maduración desde el nacimiento a la etapa adulta se produce una proliferación activa de nuevas mitocondrias debido al aumento de la masa del hígado. La actividad específica de varias enzimas mitocondriales continua aumentando durante las primeras semanas de vida, y un control aceptor similar al de mitocondrias adultas se alcanza dentro de las primeras horas después del nacimiento. La composición de fosfolípidos de mitocondrias de hígado de ratas de 90 min de edad es similar a la de mitocondrias de ratas adultas (227).

Las mitocondrias de hígado de ratas del grupo DEPD no presentan alteraciones en las actividades oxidativas durante la lactancia, pero dichas actividades oxidativas están significativamente disminuidas en mitocondrias de ratas con DEPD de 35 días de edad. La velocidad de oxidación de sustratos en los tres sitios de acoplamiento en presencia de ADP es siempre menor en mitocondrias de ratas con DEPD. El porcentaje de disminución de esta

actividad es similar para los tres sustratos ensayados (23-27%) y la velocidad de incorporación de H^+ es también menor bajo las mismas condiciones de ensayo (30-38%) (Tabla IV). La velocidad de incorporación de H^+ es la resultante entre la velocidad de liberación de H^+ a través de la cadena respiratoria y la velocidad de incorporación de H^+ a través del complejo F_0F_1 -ATPasa cuando se fosforila ADP.

La actividad máxima de oxidación de NADH medida en partículas submitocondriales está disminuída en un 40% en mitocondrias sometidas a DEPD. Estos datos junto a la disminución de la velocidad oxidativa de sustratos en ausencia de ADP (estado 4) en mitocondrias de ratas con DEPD sugieren que existirían alteraciones en la cadena respiratoria (Tabla IV y Fig.8).

El índice de control respiratorio o de control aceptor medido en mitocondrias de ratas con DEPD y en ratas normales indica que esta disminución de la velocidad de síntesis de ATP no se debería a un desacoplamiento en las mitocondrias de ratas con DEPD (Tabla V). Sin embargo, la disminución del índice de control aceptor observado en mitocondrias de ratas con DEPD en los tres sitios de acoplamiento podría ser el resultado de una velocidad de oxidación menor en el estado 3 (Tabla IV).

Es notable el hecho que, aún cuando la velocidad de oxidación de los sustratos está disminuída entre 23-27% en los tres sitios de acoplamiento de mitocondrias con DEPD, no se observó pérdida en la eficiencia de la conversión de ADP en ATP ya que los valores de la razón ADP/O son similares en mitocondrias de ambos grupos y el valor de la razón $P/2e^-$ es cercano al valor ampliamente aceptado de 1,0 para cada uno de los sitios (Tabla V), lo cual sugiere que la generación de la fuerza de movimiento de H^+ ($\Delta\rho$) permanece inalterada. La velocidad de síntesis de ATP es dependiente de la

velocidad de oxidación de los sustratos, pero la magnitud de la fuerza de movimiento de H^+ es independiente de la velocidad de oxidación de los sustratos (228).

b) *Etapa Limitante de la Fosforilación Oxidativa.*

La cadena respiratoria mitocondrial transporta electrones en una serie de reacciones durante las cuales equivalentes reductores de los sustratos oxidables son en último término utilizados para reducir el oxígeno molecular a agua. El gran cambio de energía libre negativo que acompaña las reacciones de oxidación-reducción, es conservado en la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi. La regulación de la fosforilación oxidativa es una determinante importante de los procesos metabólicos y fisiológicos que ocurren en células y tejidos, dada la importancia del ATP en todos los aspectos de la función celular (229).

En estudios sistemáticos sobre el control de la respiración en mitocondrias aisladas realizadas por Lardy y Willman (230) y Chance y Williams (98) se observó una relación entre la velocidad de la respiración y la concentración de ADP extramitocondrial. Ambos grupos concluyeron que la concentración extramitocondrial de ADP es el factor principal que controla la velocidad de la fosforilación oxidativa en mitocondrias.

En una serie de estudios en los cuales Klingenberg y col. (231) variaron la concentración de ADP, ATP y Pi, concluyeron que la respiración es función del potencial de fosfato extramitocondrial, definido como $[ATP]/[ADP][Pi]$. Wilson y col. también llegaron a la misma conclusión (232). Se han desarrollado varios sistemas (233) en los cuales la respiración en mitocondrias aisladas está equilibrada entre el estado 4 y el estado 3, sin

embargo, los resultados obtenidos no han permitido deducir una interpretación inequívoca. Por ejemplo las opiniones difieren con respecto a la interrogante si la respiración está controlada por la razón ATP/ADP extramitocondrial (234) o por el potencial de fosfato extramitocondrial (235). Se ha supuesto, en forma implícita, que una etapa en particular del proceso sea la etapa limitante de la respiración, por ejemplo el transporte de nucleótidos de adenina (236) o la reacción catalizada por la citocromo oxidasa (237).

Actualmente existen dos hipótesis que tratan de explicar la regulación de la fosforilación oxidativa. La primera desarrollada por Wilson (238) llamada "hipótesis cercana al equilibrio", postula que los primeros dos sitios de fosforilación oxidativa mitocondrial están cerca del equilibrio, es decir, la cantidad de energía generada durante la transferencia de dos equivalentes reductores desde el NADH intramitocondrial al citocromo c es igual a la requerida para la síntesis de 2 moles de ATP. Este postulado ya ha sido demostrado (229). La regulación total del sistema es ejercida en la reacción esencialmente irreversible entre el citocromo c reducido y el oxígeno molecular catalizada por la enzima citocromo oxidasa cuya K_m para oxígeno variaría dependiendo de la razón $[ATP]/[ADP] [P_i]$ intramitocondrial (239). Sin embargo puesto que ATP es sintetizado dentro de la matriz mitocondrial, el transporte de nucleótidos de adenina a través de la membrana interna es, según este concepto, una etapa intermedia obligatoria en la secuencia de reacciones y como tal debe estar cerca del equilibrio. Esto significa que si el transporte de ATP, ADP y P_i está acoplado a iones y/o a gradientes eléctricos a través de la membrana, estos deberían ocurrir sin pérdida de energía libre ($\Delta G \rightarrow 0$). Este postulado tiene evidencias

experimentales a favor (240).

La segunda hipótesis llamada "hipótesis del transportador de ATP-ADP", postula que el transporte de nucleótidos de adenina que intercambia ATP^{-4} por ADP^{-3} a través de la membrana mitocondrial, regula la velocidad total de la fosforilación oxidativa (241). De acuerdo con este postulado el transporte de nucleótidos de adenina estaría desplazado del equilibrio con un valor de ΔG_T de $-8,7$ KJ/mol cuando la velocidad de respiración es 40% de la velocidad máxima (242), actuando como detector por medio del cual la mitocondria percibe los cambios de la razón $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$. Postula entonces, que la respiración acoplada a la síntesis de ATP está controlada por la razón $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ y no por la razón $[\text{ATP}]/[\text{ADP}] [\text{Pi}]$ (233, 243). Las razones de $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ medidas en la matriz y en el espacio extramitocondrial no son la misma (244), existe desacuerdo entre los proponentes de esta hipótesis con respecto a cuál de las dos razones es el parámetro regulatorio. Originalmente se propuso que la respiración responde exclusivamente a cambios en el valor de la razón $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ extramitocondrial (234), pero otros investigadores han sugerido que la actividad respiratoria está relacionada con la razón $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ intramitocondrial (243), si bien mantener la razón $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ extramitocondrial mayor que $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ intramitocondrial requiere de energía (244). La fuente de energía necesaria debe ser por lo tanto, el potencial de membrana generado por la cadena respiratoria mitocondrial acoplada a un intercambio de ATP^{-4} por ADP^{-3} . Tal mecanismo implica que el transporte de nucleótidos de adenina requiera de energía, el transporte de ADP hacia adentro y de ATP hacia afuera debe ser dirigido por la energía proporcionada por la respiración y en consecuencia la energía generada por la cadena respiratoria sería utilizada parcialmente para

la síntesis de ATP y el transporte de ADP y ATP (244).

El transporte ATP-ADP no sería la única etapa que limita la fosforilación oxidativa (245). Otras etapas, incluyendo la reacción catalizada por la citocromo oxidasa (247), pueden contribuir en forma significativa al control de la respiración. Además el hecho que el transporte de nucleótidos no sea la única etapa que controle la velocidad de respiración implica que la razón ATP/ADP no sea el único parámetro que controle la respiración. Así la concentración de P_i extramitocondrial y el suministro de equivalentes reductores que proporcionan los sustratos para la fosforilación oxidativa jugarían un papel significativo en el control de la respiración (245).

En esta Tesis no se ha medido todos los componentes de la cadena respiratoria, pero se han encontrado cambios en el contenido de algunos citocromos. El contenido de citocromo c en ratas con DEPD está aumentado en un 26%, mientras que la cantidad de los citocromos $a + a_3$ está significativamente disminuida (22%) con respecto a los valores observados en mitocondrias de hígado de ratas alimentadas con dieta normal (Tabla VI). Este menor contenido de los citocromos $a + a_3$ podría ser la explicación principal de la disminución de la velocidad de las actividades oxidativas en los tres sitios de acoplamiento durante el proceso de la fosforilación del ADP, estos datos experimentales por lo tanto concordarían con la hipótesis cercana al equilibrio de Wilson (238), ya que por otro lado, la velocidad de transporte de ADP por el sistema de transporte ADP-ATP es similar en mitocondrias de hígado de ambos grupos de ratas (Fig. 10), lo cual descarta en alguna medida la hipótesis del transportador ADP-ATP (241) como etapa limitante de la fosforilación oxidativa.

Parece razonable que en un estado drástico de desnutrición el

organismo proceda afectando la etapa que limita la velocidad de la fosforilación oxidativa, es decir la citocromo oxidasa. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad que ocurran cambios en el contenido de otros componentes de la cadena respiratoria tales como flavoproteínas y fosfolípidos, los cuales podrían también afectar las actividades oxidativas de las mitocondrias.

En esta Tesis no se presentan bases experimentales para explicar la disminución del contenido de los citocromos $a + a_3$ en mitocondrias con DEPD, pero una posible explicación podría ser que la carencia de proteínas en la dieta por un período prolongado de tiempo, pudiera afectar la velocidad de síntesis de estos citocromos, o su ensamblaje en la membrana interna o podría aumentar la velocidad de degradación de los citocromos $a + a_3$ previamente ensamblados.

Está claro que las mitocondrias de hígado de ratas con DEPD poseen la capacidad para sintetizar ATP aunque a una velocidad menor que las mitocondrias de ratas alimentadas con dieta normal. Esto indica que el transporte mitocondrial de electrones funciona normalmente. Se observa que la secuencia del flujo de electrones para acoplar energía no ha sido alterada, lo cual presumiblemente disminuiría la eficiencia de la síntesis de ATP, pero en lugar de eso hubo disminución en los componentes funcionales que transportan electrones en la etapa control de la velocidad de fosforilación oxidativa, ya que la velocidad de consumo de oxígeno expresada por contenido de citocromo oxidasa permanece inalterada por la condición nutricional, cuando la energía proviene de sustratos que se oxidan en los tres sitios de acoplamiento durante el proceso de fosforilación de ADP. Los componentes funcionales remanentes son capaces de mantener un gradiente eléctrico y

de protones adecuada para que se realice la síntesis de ATP a pesar de la pobre condición nutricional.

Si bien, la desnutrición energética-proteica drástica afecta la velocidad de fosforilación de ADP debido a que la velocidad del flujo de electrones a través de la cadena es menor, otro componente del proceso de fosforilación oxidativa podría también estar afectado; la actividad del complejo F_0F_1 -ATPasa. Para verificar esta suposición, la actividad de hidrólisis de ATP (reacción exergónica) se ensayó en condiciones tales que todo el complejo se encuentre en estado activo, para comparar así esta actividad en mitocondrias de ambos grupos de rata. Los resultados muestran que la actividad adenosina trifosfatásica de mitocondrias de ambos grupos es activada por CCCP. La concentración del desacoplante requerida para obtener la mitad de la velocidad máxima es 42% menor en mitocondrias de ratas con DEPD. lo cual sugiere una mejor unión del desacoplante. Además, la V_{max} es 23% menor en mitocondrias de ratas con DEPD (Fig. 12). Si se supone que la actividad medida es la máxima actividad de esta enzima, se puede concluir que la cantidad del complejo F_0F_1 -ATPasa funcional es menor en mitocondrias de rata con DEPD, lo cual podría deberse a que la velocidad de síntesis o su ensamblaje en la membrana interna, pudiesen estar afectadas, o bien pudiese estar aumentada la velocidad de degradación de los componentes del complejo previamente ensamblados. Por otra parte, esta actividad podría no ser la etapa limitante de la velocidad de fosforilación de ADP, porque la actividad de esta enzima es mucho mayor que la velocidad de flujo de electrones a través de la cadena (Figuras 5 y 6).

En conclusión, las mitocondrias de ratas con DEPD muestran alteraciones en la cadena de transporte de electrones, así como también en la

actividad del complejo F_0F_1 -ATPasa. Sin embargo el sistema de transporte de electrones y la fuerza de movimiento de protones no están afectados.

Además del proceso de síntesis de ATP, también está disminuída la hidrólisis de ATP por este modelo de desnutrición y se podría esperar que muchos otros procesos que dependen de energía tanto en la mitocondria como en la célula en general pudieren estar disminuídos durante la desnutrición. Estos efectos sobre la bioenergética mitocondrial tendría importantes consecuencias fisiológicas.

c) *Incremento de la Actividad Adenosina Trifosfatásica por Cationes Metálicos Monovalentes.*

Se ha establecido que el complejo F_0F_1 -ATPasa de mitocondrias de corazón de rata puede existir al menos en dos estados: un estado "*activo*" en el cual la enzima presenta las actividades totales de hidrólisis y de síntesis de ATP, y un estado "*inactivo*" en el cual estas dos actividades están totalmente deprimidas (160). La transición de la enzima de una forma a la otra está controlada por el péptido inhibidor de la F_0F_1 -ATPasa aislado originalmente por Pullman y Monroy (246). Cuando el péptido inhibidor está asociado a la ATPasa las actividades enzimáticas del complejo están completamente abolidas. La disociación del inhibidor y la enzima es inducida por la gradiente electroquímica y se obtiene la restauración completa de las actividades catalíticas de la enzima (247). En mitocondrias intactas de hígado de ratas la restauración de la actividad de hidrólisis de ATP por la gradiente electroquímica es muy lenta (248). El suministro de energía a la membrana interna de mitocondrias de hígado de ratas por la oxidación de sustratos en la cadena respiratoria revierte en un corto período de tiempo, del orden de segundos, la inhibición de la síntesis de ATP causada por el

inhibidor. Durante este período la capacidad de hidrólisis de ATP permanece totalmente reprimida debido a que el péptido inhibidor de la ATPasa se encuentra unido a la enzima. Por lo tanto la activación de la síntesis de ATP no está acompañada de la liberación del péptido inhibidor. Si el suministro de energía a la membrana interna continúa por varios minutos la actividad de síntesis de ATP no aumenta. Sin embargo, la actividad de hidrólisis de ATP sí aumenta. Conjuntamente con este aumento de la actividad de hidrólisis el péptido inhibidor es liberado al medio quedando la enzima sin inhibidor (249).

En mitocondrias de hígado de rata la actividad de hidrólisis de ATP activada por 2,4-dinitrofenol es estrictamente dependiente de la concentración de K^+ en presencia de valinomicina, el cual aumenta la permeabilidad de la membrana interna a K^+ (250). También esta actividad en mitocondrias de tumores humanos es estimulada por K^+ en presencia de valinomicina (251). La velocidad de hidrólisis de ATP catalizada por el factor de acoplamiento 13S de "Alcaligenes faecalis" purificado o catalizada por F_1 purificado de mitocondrias de corazón de bovino son activadas por cationes metálicos monovalentes Li^+ , Na^+ y K^+ (252). Por estas razones en esta Tesis se estudió el efecto activador de diferentes cationes metálicos monovalentes sobre la enzima F_0F_1 -ATPasa, midiendo la actividad de hidrólisis de ATP en mitocondrias intactas, para determinar las condiciones en que el complejo esté totalmente en estado activo y en estas condiciones comparar esta actividad en mitocondrias de ambos grupos de ratas.

Los resultados de esta Tesis muestran que el aumento de actividad de hidrólisis de ATP depende de manera no específica de la concentración del catión monovalente y no de la concentración del anión ni de la fuerza

iónica total del medio externo (Fig. 14), pero si depende de la fuerza iónica total del medio interno, puesto que la activación de la enzima se produce cuando el catión entra al espacio de la matriz mitocondrial (Fig. 15 y Tabla VII).

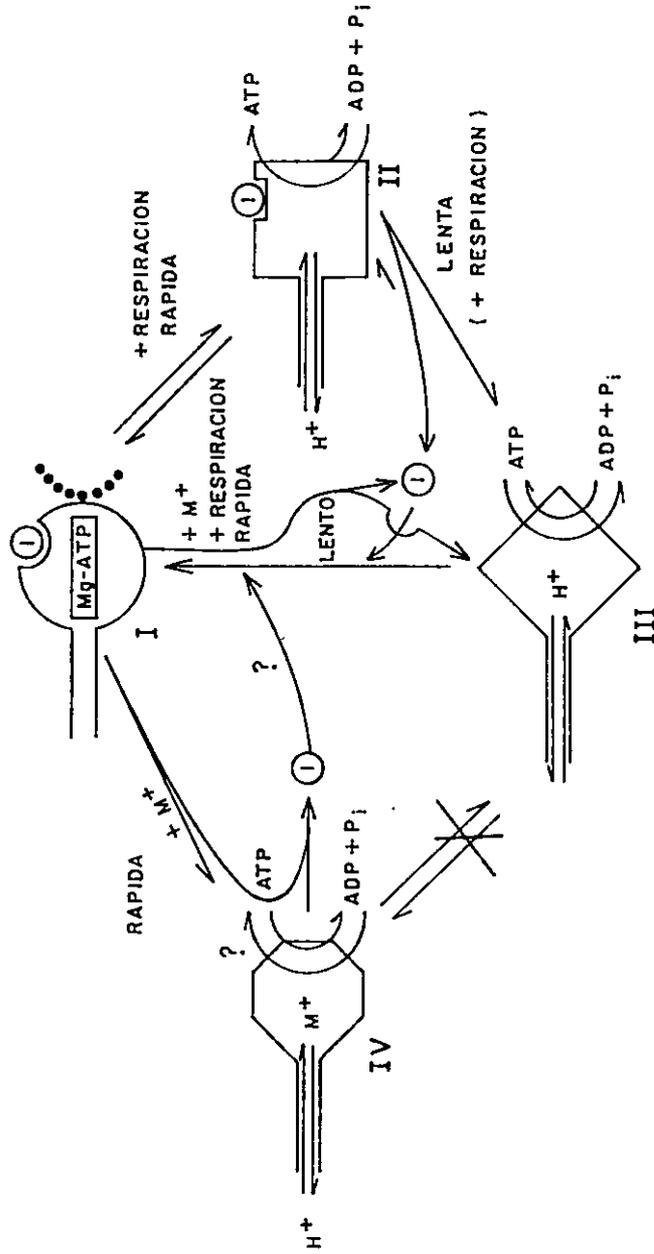
El efecto activador de los cationes metálicos monovalentes sobre la actividad de hidrólisis de ATP es mayor que el observado cuando se suministra energía mediante sustratos que se oxidan en la cadena respiratoria en las condiciones de ensayo estudiadas (Fig. 13). Si el tiempo de suministro de energía fuese mayor probablemente la activación no sería equivalente a la acción de los cationes ya que succinato inhibe parcialmente la actividad de hidrólisis de ATP activada por K^+ y esta inhibición puede ser revertida por antimicina A, lo cual indica que puede existir más de un estado activo del complejo F_0F_1 -ATPasa (Tabla VIII).

El medio de suspensión que contiene LiCl 117 mM y KCl 13 mM es equivalente al medio de suspensión compuesto de sacarosa 150 mM y KCl 50 mM, pues en ambos medios los valores de la hidrólisis de ATP son similares (Fig. 12 y Fig. 17A). La activación de la hidrólisis de ATP es independiente del tiempo de pre-incubación (Tabla VIII) e independiente de la naturaleza de los dos desacoplantes usados (Fig. 17), en estas condiciones el complejo F_0F_1 -ATPasa se encontraría totalmente en su estado activo.

La activación por cationes metálicos monovalentes ha sido observada en varias enzimas diferentes (253). Quizás la idea más aceptada para explicar esta acción es que los cationes monovalentes se unen a la enzima y esto induce algún cambio en la enzima, quizás conformacional, lo cual resulta en un aumento en la actividad catalítica. Este mecanismo fue propuesto para explicar la activación de la enzima piruvato kinasa por K^+ (254). Otro

posible mecanismo de acción de K^+ en la piruvato kinasa es la unión de un K^+ al sitio activo muy cerca de donde está unido un Mn^{+2} (255) y actuaría coordinando al grupo carboxílico del fosfoenolpiruvato en el sitio activo (256). Con respecto al posible papel del K^+ en las ATPasas, se ha demostrado que K^+ puede formar un complejo ternario con Mn-ATP, y que facilita la velocidad de hidrólisis de ATP en un sistema modelo (257). La activación del complejo F_0F_1 -ATPasa de mitocondrias de hígado de rata, por la unión de K^+ , Na^+ o Li^+ en el sitio activo o en alguna otra parte de la enzima, no puede explicarse por los resultados obtenidos, pues se utilizaron mitocondrias intactas. La baja especificidad con respecto al catión metálico monovalente parece explicar su acción más bien a través de un efecto inespecífico, el cual podría ser que un aumento de la fuerza iónica intramitocondrial disminuya la afinidad del péptido inhibidor por la F_0F_1 -ATPasa o produzca un cambio conformacional del complejo al unirse cationes monovalentes, este cambio conformacional sería distinto al provocado por el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria, y en esa forma disminuiría la afinidad del péptido inhibidor por la F_0F_1 -ATPasa.

Los resultados de esta Tesis podrían modificar el modelo de Schwerzman y Pedersen (249), sugiriendo un modelo de cuatro estados para el complejo F_0F_1 -ATPasa. Basados en los resultados experimentales obtenidos en mitocondrias intactas de hígado de rata en esta Tesis y aquellos presentados por Schwerzman y Pedersen en vesículas invertidas de membrana interna de mitocondrias de hígado de ratas (249), se puede postular el modelo siguiente: cuando el complejo F_0F_1 -ATPasa tiene unido el péptido inhibidor en presencia de Mg-ATP se encuentra en un estado inhibido (estado I o estado inactivo). El suministro de energía por sustratos que se oxidan en



Esquema III. Modelo que Representa la Dependencia de la Actividad del Complejo F₀F₁-ATPasa con el Estado Energizado y con Cationes Metálicos Monovalentes.

Esquema III. Modelo que Representa la Dependencia de la Actividad del Complejo F_0F_1 -ATPasa con el Estado Energizado y con Cationes Metálicos Monovalentes. Estado I: en presencia de Mg-ATP y en ausencia de un potencial de membrana, el péptido inhibidor se encuentra unido al complejo F_0F_1 -ATPasa, inhibiendo tanto la síntesis como la hidrólisis de ATP. Estado II: el complejo F_0F_1 -ATPasa sufre un cambio de estado cuando se genera un potencial de membrana, reduciendo la afinidad del péptido inhibidor por su sitio de unión. El complejo F_0F_1 -ATPasa es ahora catalíticamente activo para la síntesis de ATP. Se puede considerar que es catalíticamente activo para la reacción de hidrólisis de ATP, pero a una velocidad menor. Estado III: la disminución de la afinidad del péptido inhibidor por su sitio de unión en el estado II trae como consecuencia una liberación lenta del péptido inhibidor. La liberación del inhibidor está acompañada por un cambio de estado lento. El complejo F_0F_1 -ATPasa se considera ahora totalmente activo para catalizar, tanto la síntesis como la hidrólisis de ATP. Además de la acción del potencial de membrana, el aumento de la fuerza iónica por cationes metálicos monovalentes produciría una liberación rápida del péptido inhibidor debido a una disminución drástica de la afinidad del péptido inhibidor por su sitio de unión en el estado I y el complejo F_0F_1 -ATPasa sufriría un rápido cambio de estado desde el estado I al estado III directamente ya que no es necesario un tiempo de preincubación para que actúe el potencial de membrana. Estado IV: el complejo F_0F_1 -ATPasa sufriría un cambio de estado cuando se aumenta la fuerza iónica por cationes metálicos monovalentes, se reduciría la afinidad del péptido inhibidor por su sitio de unión dramáticamente. Cationes metálicos se unirían a la enzima, ya que ella presenta mayor actividad catalítica para la reacción de hidrólisis de ATP que si estuviera en estado III. Si se colapsa el potencial de membrana, o si se disminuye la fuerza iónica proporcionada por los cationes monovalentes, el complejo F_0F_1 -ATPasa se recombina con el péptido inhibidor en presencia de Mg-ATP y se forma nuevamente el complejo F_0F_1 -ATPasa del estado I. Ampliación del modelo de Schwerzman y Pedersen (249) por la acción de los cationes metálicos monovalentes.

La cadena respiratoria produce una activación de la síntesis de ATP, la cual consiste en que la enzima se encuentra en un estado II y aún contiene el péptido inhibidor. Una vez alcanzado el estado II, el transporte de electrones por la cadena no produce efecto en la actividad de síntesis, pero el péptido inhibidor se libera y la capacidad de la enzima para catalizar la actividad de hidrólisis de ATP aumenta. La enzima se encuentra ahora en un estado III o forma del complejo sin inhibidor. Los iones monovalentes metálicos se unirían al complejo en la forma del estado I y como resultado se obtiene una rápida y mayor activación de la hidrólisis de ATP, que consistiría en la liberación del péptido inhibidor y la enzima se encontraría en un estado activo IV. Al parecer no habría interconversión entre las formas de estado activo III y estado activo IV.

B. ALTERACIONES EN LA INCORPORACION DE Ca^{+2} EN MITOCONDRIAS POR DEPD.

Es conocido el hecho que el proceso de incorporación de Ca^{+2} estimulado por la respiración en mitocondrias está principalmente limitado por la velocidad de respiración y no por el transportador de Ca^{+2} mismo, en condiciones que la concentración de Ca^{+2} es alrededor de 0,2 mM (166, 258, 259, 260, 261). Estas condiciones han sido empleados para la mayoría de los estudios del mecanismo y la interacción del transporte de Ca^{+2} con el circuito quimiosmótico de H^+ (262). El estudio del efecto de la DEPD sobre el sistema de incorporación de Ca^{+2} permite correlacionarlo con la alteración del sistema de fosforilación oxidativa por DEPD en lo que respecta a la etapa que limitaría la velocidad en uno u otro proceso.

Esta investigación exploratoria de la incorporación de Ca^{+2} que depende de la velocidad del transporte de electrones por la cadena

respiratoria de mitocondrias de hígado aisladas de ratas normales y con DEPD ha conducido a por lo menos dos hallazgos que las diferencian en este proceso. Primero, las mitocondrias de hígado de ratas con DEPD incorporan Ca^{+2} a menor velocidad que las ratas normales (20-22% menores) (Tabla IX), cuando la energía proviene de la oxidación de sustratos que reaccionan en diferentes sitios de la cadena respiratoria, lo cual se debe a una disminución de la velocidad de transporte de electrones en la cadena respiratoria (Fig. 8), pues el contenido de la citocromo oxidasa de ratas con DEPD está disminuído en un 22% (Tabla VI). La velocidad máxima de incorporación de Ca^{+2} es 34% menor en mitocondrias de ratas con DEPD (Fig. 20). Estos resultados son sorprendentemente similares a los valores encontrados para la disminución de la velocidad de fosforilación de ADP, lo cual permite corroborar lo anteriormente sugerido, que la etapa limitante principal de la fosforilación oxidativa sería la citocromo oxidasa. Segundo, las mitocondrias de hígado de ratas con DEPD tienen menor capacidad para incorporar Ca^{+2} dentro de la matriz mitocondrial, en presencia de fosfato, que las obtenidas de ratas normales (Fig. 21). Estos dos hallazgos pueden sugerir que el papel de mantener y de regular la concentración de Ca^{+2} en el citoplasma de aquellos hígados de ratas con DEPD puede estar perturbado, y en consecuencia muchos procesos celulares, incluyendo metabolismo, movilidad, exocitosis, transporte a través de membrana y división celular (174, 263), que son regulados por la concentración de Ca^{+2} libre citosólico, pudieran estar alterados. Además las bombas de Ca^{+2} de la membrana plasmática que expulsan Ca^{+2} son importantes en la regulación de la concentración de Ca^{+2} en el citoplasma (264). La homeostasis celular puede estar perturbada ya sea en el flujo neto a través de la membrana

plasmática, o en alteraciones en la velocidad de transporte de Ca^{+2} mitocondrial o en ambos (174). La interrogante que surge es, si en estas células de hígado de ratas con DEPD las bombas de Ca^{+2} de la membrana plasmática que expulsan Ca^{+2} tienen la actividad alterada. Para responder a esta interrogante debiera realizarse un examen detallado del balance entre el transporte de Ca^{+2} por la membrana plasmática y por la mitocondria en células hepáticas intactas de ratas con DEPD, por medio de mediciones apropiadas de entrada y salida de Ca^{+2} .

Por otro lado, se ha propuesto otro papel para el proceso de incorporación de Ca^{+2} mitocondrial, el cual sería regular la concentración de Ca^{+2} libre de la matriz mitocondrial, que controlaría la actividad de ciertas deshidrogenasas de la matriz dependiente de la concentración de Ca^{+2} (174). La DEPD podría afectar la actividad de las deshidrogenasas de mitocondria lo que tendría consecuencias fisiológicas importantes.

En casi todos los otros aspectos, las propiedades y el comportamiento de las mitocondrias de hígado de ratas con DEPD son muy similares a las mitocondrias de ratas normales: la liberación de H^+ totales acopladas a la respiración y a la incorporación de Ca^{+2} es idéntica en mitocondrias de ambos grupos de ratas (Tabla X, Figuras 19 y 20), la adición de Ca^{+2} provoca un aumento de la velocidad de oxidación de sustratos que reaccionan en diferentes regiones de la cadena acompañado por la incorporación de Ca^{+2} , el valor de la razón Ca^{+2} /sitio es alrededor de 2,0 y el valor de la razón H^+ /sitio es muy cercano a 2,0 en presencia de fosfato, cuando todo el Ca^{+2} ha sido incorporado las mitocondrias regresan al estado metabólico 4 (Figura 18) y en estas preparaciones la incorporación de Ca^{+2} precede a la fosforilación de ADP en la demanda de energía liberada por la respiración

cuando Ca^{+2} y ADP son agregados juntos (Figura 22).

Los experimentos realizados en esta Tesis en ausencia de fosfato y en presencia de NEM demuestran claramente que, el valor promedio de la razón H^+ /sitio para el segundo más el tercer sitio conservador de energía de la cadena respiratoria de mitocondrias de hígado de ratas con DEPD es muy cercano a 4,0, idéntico al valor promedio de la razón H^+ /sitio observado en mitocondrias de ratas alimentadas con dieta normal (Figura 23 y Tabla XI). Resultados similares se han obtenido en mitocondrias de hígado (172, 265), mitocondrias de corazón de ratas (222) y en mitocondrias de tumor ascítico de Ehrlich (223). Los resultados informados en esta Tesis extienden la hasta hoy escasa información disponible con respecto a este parámetro estequiométrico fundamental, en la transformación de energía en mitocondrias, sugiriendo fuertemente que el valor de la razón H^+ /sitio sería universalmente de 4,0.

BIBLIOGRAFIA

1. Lindberg, O. y Ernster, L. (1954). "The Chemistry and Physiology of Mitochondria and Microsomes". Springer-Verlag, Viena, 136 pág.
2. Lehninger, A.L. (1965). "The Mitochondrion" W.A. Benjamin, Inc. Second printing, New York 263 pág.
3. Mun, E.A. (1974). "The Structure of Mitochondria". Academic Press, Inc., London 465 pág.
4. Ernster, L. y Lindberg, O. (1958). "Animal Mitochondria" Annu. Rev. Physiol. 20, 13-42.
5. Nicholls, P. (1963). "Cytochromes. A Survey". In The Enzymes. Boyer, P.D., Lardy, H. y Myrbäck, K. editors. Second Edition Academic Press, Inc. New York 8, 3-40.
6. Ernster, L. y Schatz, G. (1981). "Mitochondria: A Historical Review". J. Cell Biol. 91, 227_S- 255_S.
7. Margulis, L. (1970). "Origin of Eukaryotic Cells". Yale University Press. New Haven 325 pág.
8. Benda, C. (1899). "Weitere mittheilungen über die mitochondria". Verhandl. Physiol. Ges., Arch. Anat. Physiol. 376-383.
9. Palade, G.E. (1964). "The organization of living matter". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 52, 613-634.
10. Palade, G.E. (1952). "The fine structure of Mitochondria". Anat. Rec. 114, 427-451.
11. Lazarow, A. y Cooperstein, S.J. (1953). "Studies on the enzymatic basis for the Janus Green B staining reaction". J. Histochem. Cytochem 1, 234-241.
12. Meves, F. (1908). "Die Chondriosomen als Träger erblicher Anlagen". Arch. Mikrosk. Anat. 72, 816-867.
13. Regaud, C. (1908). "Sur les formations mitochondriales des diverses espèces cellulaires". C.R. Soc. Biol. 65, 718-720.
14. Regaud, C. (1909). "Sur la structure du protoplasma dans les cellules". C.R. Soc. Biol. 66, 1034-1036.
15. Kingsbury, B.F. (1912). "Cytoplasmic fixation". Anat. Rec. 6, 39-52.
16. Kater, J.M. y Smith, P.M. (1932). "Formation of fat in hepatic cell". Anat. Rec. 52, 55-68.

17. Bensley, R.R. y Hoerr, N. (1934). "Studies on cell structure by the freezing-drying method VI. The preparation and properties of mitochondria". *Anat. Rec.* 60, 449-455.
18. Keilin, D. (1925). "On cytochrome, a respiratory pigment". *Proc. R. Soc. B. Biol. Sci.* 98, 312-339.
19. Keilin, D. y Hartree, E.F. (1940). "Succinic dehydrogenase-cytochrome system of cells. Intracellular respiratory system catalyzing aerobic oxidation of succinic acid". *Proc. R. Soc. London B. Biol. Sci.* 129, 277-306.
20. Warburg, O. (1913). "Über sauerstoffatmende Körnchen aus Leberzellen und über sauerstoffatmung in Berkfeld-Filtraten wässriger Leber-extrakte". *Arch. Gesamte. Physiol.* 154, 599-617.
21. Claude, A. (1946). "Fractionation of mammalian liver cell by differential centrifugation. II. Experimental procedures and results". *J. Exp. Med.* 84, 51-89.
22. Hogeboom, G.H. Claude, A. y Hotchkiss, R.D. (1946). "The distribution of cytochrome oxidase and succinoxidase in the cytoplasm of the mammalian liver cell". *J. Biol. Chem.* 165, 615-629.
23. Kennedy, E.P. y Lehninger, A.L. (1948). "Intracellular structures and the fatty acid oxidase system of rat liver". *J. Biol. Chem.* 172, 847-848.
24. Lehninger, A.L. y Kennedy, E.P. (1948). "The requirements of the fatty acid oxidase complex of rat liver". *J. Biol. Chem.* 173, 753-771.
25. Slater, E.C. (1950). "Phosphorylation coupled with the reduction of cytochrome c by α -ketoglutarate in heart muscle granules". *Nature* 166, 982-983.
26. Cleland, K.W. y Slater, E.C. (1953). "Respiratory granules of heart muscle". *Biochem. J.* 53, 547-556.
27. Harman, J.W. y Feigelson, M. (1952). "Studies on mitochondria". *Exp. Cell. Res.* 3, 47-58.
28. Watanabe, M.I. y Williams, C.M. (1953). "Mitochondria in the flight muscle of insects II. Effects of the medium on the size, form, and organization of isolated sarcosomes". *J. Gen. Physiol.* 37, 71-89.
29. Chappell, J.B. y Perry, S.V. (1953). "Respiratory and adenosinetriphosphatase activities of skeletal-muscle mitochondria". *Biochem. J.* 55, 586-595.

30. Harman, J.W. y Osborne, J.H. (1953). "The relationship between mitochondria and myofibrils in pigeon skeletal muscle". *J. Exp. Med.* 98, 81-98.
31. Sjöstrand, F.S. (1953). "Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes: *Nature*, London 171, 30-32.
32. Keilin, D. y Hartree, E.F. (1949). "Activity of the succinic dehydrogenase-cytochrome system in different tissue preparations". *Biochem. J.* 44, 205-218.
33. Claude, A. (1944). "Constitution of mitochondria and microsomes and distribution of nucleic acid in cytoplasm of leukemic cell". *J. Exp. Med.* 80, 19-29.
34. Zöllinger, H.U. (1948). "Cytologic studies with phase microscope; mitochondria and other cytoplasmic constituents under various experimental conditions". *Amer. J. Path.* 24, 569-589.
35. Harman, J.W. (1950). "Studies on mitochondria. II. The structure of mitochondria in relation to enzymatic activity". *Exp. Cell Res.* 1, 394-402.
36. Cleland, K.W. (1952). "Permeability of isolated rat heart sarcosomes". *Nature*, London. 170, 497-499.
37. Raaflaub, J. (1953). "Die Schwellung isolierter Leberzell Mitochondrien und ihre physikalisch-chemische Beeinflussbarkeit; über den Wirkungsmechanismus von Adenosin triphosphat als Cofaktor isolierter Mitochondrien". *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta* 11, 142-165.
38. Slater, E.C. y Cleland, K.W. (1953). "The effect of tonicity of the medium on the respiratory and phosphorylative activity of heart-muscle sarcosomes". *Biochem. J.* 53, 557-567.
39. Hunter, F.E. y Ford, L. (1955). "Inactivation of oxidative and phosphorylative system in mitochondria by preincubation with phosphate and other ions". *J. Biol. Chem.* 216, 357-369.
40. Pressman, B. y Lardy, H.A. (1956). "Effect of surface active agents on the latent ATPase of mitochondria". *Biochim. Biophys. Acta* 21, 458-466.
41. Zelterström, R. y Ernster, L. (1956). "Bilirubin, and uncoupler of oxidative phosphorylation in isolated mitochondria". *Nature (Lond.)* 178, 1335-1337.
42. Tapley, D.F. (1956). "The effect of thyroxine and other substances on the swelling of isolated rat liver mitochondria". *J. Biol. Chem.* 222, 325-339.

43. Price, C.A., Fonnesu, A. y Davies, R.E. (1956). "Movements of water and ions in mitochondria". *Biochem. J.* 64, 754-768.
44. Siekevitz, P. y Potter, V.R. (1955). "Biochemical structure of mitochondria I. Intramitochondrial components and oxidative phosphorylation". *J. Biol. Chem.* 215, 221-235.
45. Hunter, F.E., Davis, J. y Carlat, L. (1956). "The stability of oxidative and phosphorylative system in mitochondria under anaerobic conditions". *Biochim. Biophys. Acta* 20, 237-242.
46. Chappell, J.B. (1964). "The oxidation of citrate, isocitrate and cis-aconitate by isolated mitochondria". *Biochem. J.* 90, 225-237.
47. LaNoue, K.F. y Schoolwerth, A.C. (1979). "Metabolite transport in mitochondria". *Ann. Rev. Biochem.* 48, 871-922.
48. Pfaff, E., Klingerberg, M. y Heldt, H. W. (1965). "Unspecific permeation and specific exchange of adenine nucleotides in liver mitochondria". *Biochem. Biophys. Acta* 104, 312-315.
49. Warburg, O. (1926). "Wirkung des CO auf den Stoffwechsel der Hefe". *Biochem. Z.* 177, 471-486.
50. Keilin, D. (1927). "Influence of CO and light on indophenol oxidase of yeast cells". *Nature, London* 119, 670-671.
51. Keilin, D. (1930). "Cytochrome and intracellular oxidase". *Proc. R. Soc. Biol. Sci.* 106, 418-444.
52. Keilin, D. y Hartree, E.F. (1938). "Cytochrome Oxidase". *Proc. R. Soc. B. Biol. Sci.* 125, 171-186.
53. Keilin, D. y Hartree, E.F. (1939). "Cytochrome and cytochrome oxidase". *Proc. R. Soc. London B. Biol. Sci.* 127, 167-191.
54. Ball, E. G. (1938). "Über die Oxydation und Reduktion der drei CytochromKomponenten". *Biochem. Z.* 295, 262-264.
55. Warburg, O. y Christian, W. (1936). "Pyridin als Wirkungs-Gruppe dehydrierender Fermente". *Biochem. Z.* 286, 142-154.
56. Warburg, O. Christian, W. (1938). "Bemerkung über gelbe Fermente". *Biochem. Z.* 298, 368-384.
57. Keilin, D. y Hartree, E.F. (1955). "Relationship between certain components of the cytochrome system". *Nature, London*, 176, 200-206.
58. Slater, E.C. (1948). "A factor in heart muscle required for the reduction of cytochrome c by cytochrome b". *Nature*, 161, 405-406.

59. Tsou, C.L. (1951). "On the cyanide inactivation of succinic dehydrogenase and the relation of succinic dehydrogenase to cytochrome b". *Biochem. J.* 49, 512-520.
60. Dolin, M. I. y Gunsalus, I.C. (1951). "Pyruvic acid metabolism; acetoin-forming enzyme system in *Streptococcus faecales*". *J. Bacteriol.* 62, 199-214.
61. Wang, T. Y., Tsou, C.L. y Wang, Y. L. (1956). "Succinic dihydrogenase. I. Isolation, purification and properties". *Scientia Sinica* 5, 73-90.
62. Singer, T.P., Kearney, E. B. y Bernath, P. (1956). "Studies on succinic dehydrogenase. II. Isolation and properties of the dehydrogenase from beef heart". *J. Biol. Chem.* 223, 599-613.
63. Crane, F.L., Hatefi, Y., Lester, R.L. y Widmer, C. (1957). "Isolation of a quinone from beef heart mitochondria". *Biochem. Biophys. Acta* 25, 220-221.
64. Massey, V. (1958). "The identity of diaphorase and lipoic dehydrogenase". *Biochim. Biophys. Acta* 30, 205-206.
65. Straub, F.B. (1939). "XCIX Isolation and properties of a flavoprotein from heart muscle tissue". *Biochem. J.* 33, 787-792.
66. Chance, B. (1958). "The kinetics and inhibition of cytochrome components of the succinic oxidase system III. Cytochrome b". *J. Biol. Chem.* 233, 1223-1229.
67. Wikström, M.K.F. (1973). "The different cytochrome b components in the respiratory chain of animal mitochondria and their role in electron transport and energy conservation". *Biochim. Biophys. Acta* 301, 155-193.
68. Takemori, S., Sekuzi, I. y Okunuki, K. (1960). "Properties of copper in purified cytochrome a". *Biochim. Biophys. Acta* 38, 158-160.
69. Beinert, H., Griffiths, D.E., Wharton, D.C. y Sands, R.H. (1962). "Properties of the copper associated with cytochrome oxidase as studied by paramagnetic resonance spectroscopy". *J. Biol. Chem.* 237, 2337-2346.
70. Eichel, B., Waino, W.W., Person, P. y Cooperstein, S.J. (1970). "A partial separation and characterization of cytochrome oxidase and cytochrome b". *J. Biol. Chem.* 245, 89-103.
71. Beinert, H. y Sands, R.H. (1960). "Studies on succinic and DPNH dehydrogenase preparation by paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3, 41-46.

72. Rieske, J.S., Hansen, R.E. y Zaugg, W.S. (1964). "Studies on the electron transfer system. LVIII. Properties of a new oxidation-reduction component of the respiratory chain as studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy". *J. Biol. Chem.* 239, 3017-3022.
73. Slater, E.C. y de Vries, S. (1980). "Identification of the BAL-labile factor". *Nature* 288, 717-718.
74. Lehninger, A.L. (1980). "The Primary Energy-Transformations in Biological Systems". *Ber. Bursenges. Phys. Chem.* 84: 943-951.
75. Engelhardt, W.A. (1930). "Ortho-und Pyrophosphat im aeroben und anaeroben Stoffwechsel der Blutzellen". *Biochem. Z.* 227, 16-38.
76. Kalckar, H. (1937). "Phosphorylation in kidney tissue". *Enzymologia* 2, 47-52.
77. Lipmann, F. (1939). "Coupling between pyruvic acid dehydrogenation and adenylic acid phosphorylation". *Nature, London* 143, 281.
78. Belitzer, V.A. y Tsibakowa, E.T. (1939). "The mechanism of phosphorylation as related to respiration". *Biokhimiya* 4, 516-535.
79. Ochoa, S. (1940). "Nature of oxidative phosphorylation in brain tissue". *Nature, London*, 146, 267.
80. Friedkin, M. y Lehninger, A.L. (1948). "Phosphorylation coupled to electron transport between dihydrodiphosphopyridine nucleotide and oxygen". *J. Biol. Chem.* 174, 757-758.
81. Lehninger, A.L. (1949). "Esterification of inorganic phosphate coupled to electron transport between dihydrodiphosphopyridine nucleotide and oxygen II. *J. Biol. Chem.* 178, 625-644.
82. Lehninger, A.L. (1955). "Oxidative Phosphorylation". *Harvey Lect.* 49, 176-215.
83. Ochoa, S. (1943). "Efficiency of aerobic phosphorylation in cell-free heart extracts". *J. Biol. Chem.* 151, 493-505.
84. Ernster, L., Jalling, O., Löw, H. y Lindberg, O. (1955). "Alternative pathways of mitochondrial DPNH oxidation, studied with amytal". *Exp. Cell. Res.* 3 (Suppl.), 124-132.
85. Ernster, L., Dallner, G. y Azzone, G.F. (1963). "Differential effects of rotenone and amytal on mitochondrial electron and energy transfer". *J. Biol. Chem.* 238, 1124-1131.
86. Sottocasa, G.L., Kuylenstierna, B., Ernster, L. y Bergstrand, A. (1967). "An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. A biochemical and morphological study. *J. Cell Biol.* 32, 415-428.

87. Niemeier, H., Crane, R.K., Kennedy, E.P. y Lipmann, F. (1951). "Observations on respiration and phosphorylation with liver mitochondria of normal, hypo-, and hyperthyroid rats". Fed. Proc. 10, 229.
88. Lardy, H.A. y Wellman, H. (1952). "Oxidative phosphorylation: Rôle of inorganic phosphate and acceptor systems in control of metabolic rates". J. Biol. Chem. 195, 215-224.
89. Ernster, L. y Luft, R. (1964). "Mitochondrial respiratory control: biochemical, physiological and pathological aspects". Adv. Metab. Disord. 1, 95-123.
90. Kielley, W.W. y Kielley, R.K. (1951). "Myokinase and adenosinetriphosphatase in oxidative phosphorylation". J. Biol. Chem. 191, 485-500.
91. Loomis, W.F. y Lipmann, F. (1948). "Reversible inhibition of the coupling between phosphorylation and oxidation". J. Biol. Chem. 173, 807-808.
92. Friedkin, M. y Lehninger, A.L. (1949). "Esterification of inorganic phosphate coupled to electron transport between dihydrodiphosphopyridin nucleotide and oxygen I. J. Biol. Chem. 178, 611-623.
93. Jacobs, E.E. (1960). "Phosphorylation coupled to electron transport initiated by substituted phenylenediamines". Biochem. Biophys. Res. Commun. 3, 536-539.
94. Colpa-Boonstra, J. y Slater, E.C. (1957). "The enzymatic oxidation of reduced vitamin K₃ (menadione)". Biochim. Biophys. Acta 23, 222-224.
95. Copenhaver, J.H. y Lardy, H.A. (1952). "Oxidative phosphorylation: pathways and yield in mitochondrial preparations". J. Biol. Chem. 195, 225-238.
96. Schatz, G. y Racker, E. (1966). "Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. VII. Oxidative phosphorylation in the diphosphopyridine nucleotide-cytochrome b segment of the respiratory chain: assay and properties in submitochondrial particles". J. Biol. Chem. 241, 1429-1438.
97. Potter, V.R. y Reif, A.E. (1952). "Inhibition of an electron transport component by antimycin A". J. Biol. Chem. 194, 287-297.
98. Chance, B. y Williams, G.R. (1956). "The respiratory chain and oxidative phosphorylation". Adv. Enzymol. 17, 65-134.



99. Lipmann, F. (1946). "Metabolic Process Patterns". In: Currents in Biochemical Research. Green, D.E. editor Wiley-Interscience, New York, 137-148.
100. Racker, E.F. (1951). "The mechanism of action of glyoxalase". J. Biol. Chem. 190, 685-696.
101. Lynen, F. y Reichert, E. (1951). "Zur chemischen Struktur der" aktivierten Essigsäure". Angew. Chem. 63, 47-48.
102. Sanadi, D. R. y Littlefield, J.W. (1951). "Studies on α -ketoglutaric oxidase I. Formation of "active" succinate". J. Biol. Chem. 193, 683-689.
103. Slater, E.C. (1953). "Mechanism of phosphorylation in respiratory chain". Nature, London 172, 975-978.
104. Chance, B. y Hollunger, G. (1957). "Succinate-linked pyridine nucleotide reduction in mitochondria". Fed. Proc. 16, 163.
105. Chance, B. y Hollunger, G. (1961). "The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria VI. The efficiency of the reaction". J. Biol. Chem. 236, 1577-1584.
106. Klingenberg, M. y v. Häfen, H. (1963). "Hydrogen pathway in mitochondria. I. Hydrogen transfer from succinate to acetoacetate". Biochem. Z. 337, 120-145.
107. Lardy, H.A., Johnson, A.D. y McMurray, W.C. (1958). "Antibiotics as tools for metabolic Studies I. A survey of toxic antibiotics in respiratory, phosphorylative glycolitic system". Arch. Biochem. Biophys. 78, 587-597.
108. Danielson, L. y Ernster, L. (1963). "Energy-dependent reduction of triphosphopyridine nucleotide by reduced diphosphopyridine nucleotide, coupled to the energy-transfer system of the respiratory chain". Biochem. Z. 338, 188-205.
109. Smith, R.E. y Hock, R.J. (1963). "Brown fat: Thermogenic effector of arousal in hibernators". Science 140, 199-200.
110. Vasington, F.O. y Murphy, J.V. (1962). " Ca^{++} uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation". J. Biol. Chem. 237, 2670-2677.
111. Chance, B. (1965). "The energy-linked reaction of calcium with mitochondria". J. Biol. Chem. 240, 2729-2748.
112. Moore, C. y Pressman, B.C. (1964). "Mechanism of action of valinomycin on mitochondria". Biochem. Biophys. Res. Commun. 15, 562-567.

113. Boyer, P.D. (1965). "Conformational coupling in oxidative phosphorylation" in *Oxidases and Related Redox System* (King, T.E., Masson, H.S. y Morrison, M. editores : John Wiley and Sons New York 994-1008.
114. Mitchell, P. (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen system by a chemiosmotic type mechanism. *Nature (Lond.)* 191, 144-148.
115. Mitchell, P. (1966). "Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation". Glynn Research. Glynn Research Ltd., Bodmin 192 pág.
116. Williams, R.J.P. (1961). "Possible functions of chains of catalyts. *J. Theor. Biol.* 1, 1-17.
117. Williams, R.J.P. (1977). "Fundamental features of proton-coupled transport". *Biochem. Soc. Trans.* 5, 29-32.
118. Lundegård, H. (1937). "Untersuchungen über die Anionenatmung". *Biochem. Z.* 290, 104-124.
119. Davies, R.E. y Ogston, A.G. (1950). "On the mechanism of secretion of ions by gastric mucosa and by other tissues". *Biochem. J.* 46, 324-333.
120. Mitchell, P. (1968). "Chemiosmotic Coupling and Energy Transduction. Glynn Research Ltd., Bodmin. 111 pág.
121. Mitchell, P. (1961). "Conduction of protons through the membranes of mitochondria and bacteria by uncouplers of oxidative phosphorylation". *Biochem. J.* 81, 24P.
122. Mitchell, P. y Moyle, J. (1967). "Proton-transport phosphorylation. Some experimental tests". In *Biochemistry of Mitochondria*. Slater, E.C., editors: Academic Press and Polish Scientific Publishers, London and Warsaw, 53-74.
123. Mitchell, P. y Moyle, J. (1969). "Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 7, 471-484.
124. Jagendorf, A.T. y Uribe, E. (1966). "ATP formation caused by acid-base transition of spinach chloroplast". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 55, 170-177.
125. Rottenberg, H. (1979). "The Measurement of Membrane Potential and Δ pH in Cells, Organelles and Vesicles". En *Methods in Enzymology*, Fleisher, S. y Packer, L. Editores: Academic Press N.Y. LV, (F) 547-569.

126. Bashford, C.L. y Smith, J.C. (1979). "The use of Optical Probes to Monitor Membrane Potential". En *Methods in Enzymology*, Fleisher, S. y Packer, L. Editores Academic Press N.Y. LV, (F).569-586.
127. Jasaitis, A.A., Kuliene, V.V. y Skulachev, V.P. (1971). "Anilinonaphthalenesulfonate fluorescence changes induced by non-enzimatic generation of membrane potential in mitochondria and submitochondrial particles". *Biochim. Biophys. Acta* 234, 177-181.
128. Witt, H.T. (1979). "Energy conversion in the functional membrane of photosynthesis. Analysis by light pulse and electric pulse methods. The central role of the electric field". *Biochim. Biophys. Acta* 505, 355-427.
129. Kagawa, Y. (1972). "Reconstitution of oxidative phosphorylation". *Biochim. Biophys. Acta* 265, 297-338.
130. Racker, E. (1979). "Reconstitution of membrane processes". En *Methods in Enzymology*, Fleisher, S. y Packer, L. Editores:Academic Press, N.Y., LV, (F). 699-711.
131. Skulachev, V.P. (1979). "Membrane potential and reconstitution". En *Methods in Enzymology*, Fleisher, S. y Packer, L. Editores: Academic Press, N.Y. LV, (F) 586-603.
132. Skulachev, V.P. (1979). "Methods for reconstitution of the electrogenic function of membrane proteins". En *Methods in Enzymology*, Fleisher, S. y Packer, L. Editores Academic Press N.Y. LV, (F) 751-776.
133. Hinkle, P.C., Kim, J.J. y Racker, E. (1972). "Ion transport and respiratory control in vesicles formed from cytochrome oxidase and phospholipids". *J. Biol. Chem.* 247, 1338-1342.
134. Ragan, C.I. e Hinkle, P.C. (1975). "Ion transport and respiratory control in vesicles formed from reduced nicotinamide adenine dinucleotide coenzyme Q reductase and phospholipids". *J. Biol. Chem.* 250, 8472-8476.
135. Kagawa, Y. y Racker, E. (1971). "Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation". XXV. Reconstitution of vesicles catalyzing ^{32}P -adenosine triphosphate exchange". *J. Biol. Chem.* 246, 5477-5487.
136. Rydström, J., Kanner, N. y Racker, E. (1975). "Resolution and reconstitution of mitochondrial nicotinamide nucleotide tranhydrogenase". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 831-839.
137. Ragan, C.I. y Racker, E. (1973). "Partial resolution of enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. XXVIII. The reconstitution of the first site of energy conservation". *J. Biol. Chem.* 248, 2563-2569.

138. Racker, E. y Kandrach, A. (1971). "Reconstitution of the third site of oxidative phosphorylation". *J. Biol. Chem.* 246, 7069-7071.
139. Wang, J.H. (1970). "Oxidative and photosynthetic Phosphorylation mechanisms. The chemistry reflects a possible evolutionary pattern for the driving force of life". *Science (Wash. D.C.)* 167, 25-30.
140. Weber, G. (1975). "Energetics of ligand binding to proteins". *Adv. Protein Chem.* 29, 1-83.
141. Mitchell, P. (1977). "A commentary on alternative hypotheses of protonic coupling in the membrane systems catalysing oxidative and photosynthetic phosphorylation". *FEBS Lett.* 78, 1-20.
142. Slater, E.C. (1971). "The coupling between energy-yielding and energy-utilizing reactions in mitochondria". *Q. Rev. Biophys.* 4, 35-71.
143. Boyer, P.D., Chance, B. Ernster, L., Mitchell, P., Racker, E. y Slater, E.C. (1977). "Oxidative phosphorylation and photophosphorylation". *Ann. Rev. Biochem.* 46, 955-1026.
144. Brand, M.D., Reynafarje, B. y Lehninger, A.L. (1976). "Stoichiometric relationship between energy-dependent proton ejection and electron transport in mitochondria". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 437-441.
145. Brand, M.D., Harper, W.G., Nicholls, D.G. e Ingledew, W.J. (1978). "Unequal charge separation by different coupling spans of the mitochondrial electron transport chain". *FEBS Lett.* 95, 125-129.
146. Wikström, M. y Krab, K. (1979). "Proton-pumping cytochrome c oxidase". *Biochim. Biophys Acta* 549, 177-222.
147. Mitchell, D. (1979). "Compartmentation and communication in living system. Ligand conduction: a general catalytic principle in chemical, osmotic and chemiosmotic reaction system". *Eur. J. Biochem.* 95, 1-29.
148. Singer, T.P. y Edmondson, D.E. (1978). "Flavoproteins (Overview)". *En Methods en Enzymology* Fleisher, S. y Packer, L. Editores Academic Press N.Y. LIII, (D) 397-418.
149. Singer, T.P., Ramsay, R.R. y Peach, C. (1981). "Flavoproteins of the respiratory chain" en "Mitochondria and Microsomes". in honor of Lars Ernster, Lee, C.P., Schatz, G. y Dallner, G. editores Addison-Wesley Publishing Company Inc. Massachusetts 155-190.

150. Hatefi, Y. (1978). "Introduction-preparation and properties of the enzymes and enzymes complexes of the mitochondrial oxidative phosphorylation system". En *Methods in Enzymology*, Fleisher, S. y Packer, L. Editores Academic Press, N.Y. LIII, (D) 3-5.
151. Hatefi, Y., Galante, Y.M., Stigall, O.N. y Ragan, C.I. (1979). "Proteins, polypeptides, prosthetic groups, and enzymic properties of complexes I, II, III, IV y V of the mitochondrial oxidative phosphorylation system". En *Methods in Enzymology*, Fleisher, S. y Packer, L. Editores Academic Press N.Y. LVI, (G) 577-602.
152. Mitchell, P. (1979). "David Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences". *Science* 206, 1148-1159.
153. Ragan, C.I., Smith, S., Early, G.P. y Poore, V.M. (1981). "NADH Dehydrogenase" en "Chemiosmotic Proton Circuits in Biological Membranes" in honor of Peter Mitchell. Skulachev, V.P., Hinkle, P.C. editores Addison-Wesley Publishing Company Inc. Massachusetts 161-169.
154. Konstantinov, A., Kung, W.S. y Kamensky, Y.A. (1981). "The Q cycle in the mitochondrial respiratory chain", en "Chemiosmotic Proton Circuits in Biological Membranes" in honor of Peter Mitchell". Skulachev, V. P. y Hinkle, P.C. editors. Addison-Wesley Publishing Company, Inc. Massachusetts 123-146.
155. Slater, E.C. (1983). "The Q cycle, an ubiquitous mechanism of electron transfer" *Trends Biochem. Sci.* 8, 239-242.
156. Chance, B. (1981). "Structural and kinetic approach to electron transfer oxygen reaction and energy conservation in cytochrome oxidase" en "Chemiosmotic Proton Circuits in Biological Membranes in honor of Peter Mitchell" Skulachev, V.P. y Hinkle, P.C. editores Addison-Wesley Publishing Company, Inc. Massachusetts 161-169.
157. Wikström, M. (1981). "The protonmotive function of cytochrome oxidase" en "Chemiosmotic Proton Circuits in Biological Membranes" in honor of Peter Mitchell. Skulachev, V.P. y Hinkle, P.C., editores. Addison-Wesley Publishing Company, Inc. Massachusetts 171-180.
158. Hinkle, P.C. y McCarty, R.E. (1978). "How Cells makes ATP" *Sci. Am.* 238, 104-123.
159. Amzel, L.M. y Pedersen, P.L. (1978). "Adenosine triphosphatase from rat liver mitochondria. Crystallization and X-ray diffraction studies of the F₁-component of the enzyme". *J. Biol. Chem.* 253, 2067-2069.
160. Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (1981). "On the structure, function and regulation of proton ATPases. *Arq. Biol. Tecnol.* 24, 207-221.

161. Mitchell, P. (1973). "Hypothesis: cation-translocating adenosine triphosphatase models: how direct is the participation of adenosine triphosphate and its hydrolysis products in cation translocation". *FEBS Lett.* 33, 267-274.
162. Kayalar, C., Rosing, J. y Boyer, P.D. (1977). "An alternating site sequence of oxidative phosphorylation suggested by measurement of substrate binding patterns and exchange reaction inhibitions". *J. Biol. Chem.* 252, 2486-2491.
163. Kozlov, I.A. y Skulachev, V.P. (1977). " H^+ -Adenosine triphosphatase and membrane energy coupling". *Biochim. Biophys. Acta* 463, 29-89.
164. Klingenberg, M. (1981). "The ADP, ATP, translocation system of mitochondria" in *Mitochondria and Microsomes in honor of Lars Ernster*; Lee, C.P., Schatz, G. y Dallner, G. editores. Addison-Wesley Publishing Company, Inc. Massachusetts 293-316.
165. Lehninger, A.L., Fiskum, G., Vercesi, A. y Tew, W. (1981). " Ca^{+2} transport by mitochondria: A Survey" in *Calcium and Phosphate Transport across Biomembranes* Bronner, F. y Peterlik, M., editores New York, Academic Press. 73-78.
166. Scarpa, A. y Azzone, G.F. (1970). "The mechanism of ion translocation in mitochondria 4. Coupling of K^+ efflux with Ca^{+2} uptake". *Eur. J. Biochem.* 12, 328-335.
167. Lehninger, A.L. (1970). "Mitochondrial and calcium ion transport. The fifth jubilee lecture". *Biochem. J.* 119, 120-138.
168. Chance, B. y Schoener (1966). "High and low energy states of cytochromes. III. In reactions with cations". *J. Biol. Chem.* 241, 4577-4587.
169. Reynafarje, B., Lehninger, A.L. (1973). " Ca^{+2} transport by mitochondria from L1210 mouse ascites tumor cells". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 1744-1748.
170. Fiskum, G. y Lehninger, A.L. (1980). "The mechanism and regulation of mitochondrial Ca^{+2} transport". *Federation Proc.* 39, 2432-2436.
171. Lehninger, A.L. Reynafarje, B., Vercesi, A. y Tew, W. P. (1978). "Transport and accumulation of calcium in mitochondria". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 307, 160-176.
172. Brand, M.D., Chung-Ho Chen y Lehninger, A.L. (1976). "Stoichiometry of H^+ ejection during respiration-dependent accumulation of Ca^{+2} by rat liver mitochondria". *J. Biol. Chem.* 251, 968-974.

173. Carafoli, E. (1981). "The Calcium transport in Mitochondria". in "Mitochondria and Microsomes in honor of Lars Ernster," Lee, C.P. Schatz, G. y Dallner, G. editores Addison-Wesley Publishing Company Inc. Massachusetts 357-374.
174. Nicholls, D. y Akerman, K. (1982). "Mitochondrial Calcium Transport". *Biochim. Biophys. Acta* 683, 57-88.
175. Cascarano, J., Migler, R.A. y Wilson, M.A. (1978). "Starvation and refeeding in rats: effect on organismic respiration, cytoplasmic constituents of liver and succinic dehydrogenase activity in liver, kidney and heart". *J. Nutr.* 108, 1606-1615.
176. Stocco, D.M., Cascarano, J. y Wilson, M.A. (1977). "Quantitation of mitochondrial DNA, RNA and protein in starved and starved-refed rat liver". *J. Cell Physiol.* 90, 295-306.
177. Gold, A.J. y Yaffe, S.R. (1978). "Effects of prolonged starvation on cardiac energy metabolism in the rat". *J. Nutr.* 108, 410-416.
178. Rasheed, B.K.A., Chhabra, S. y Kurup, C.K. (1980). "Influence of starvation and clofibrate administration on oxidative phosphorylation by rat liver mitochondria". *Biochem. J.* 190, 191-198.
179. Yaffe, S.R. y Gold, A.J. (1979). "Effect of prolonged starvation on substrate uptake in the isolated perfused rat heart". *J. Nutr.* 109, 2140-2145.
180. Brady, L.J. y Hoppel, Ch.L. (1983). "Effect of diet and starvation on hepatic mitochondrial function in the rat". *J. Nutr.* 113, 2129-2137.
181. Tyzbir, R.S., Hewett, D.E., Swan, Ch. A. y Carew, L.B. (1982). "The effects of pre-and postweaning dietary protein levels on mitochondrial metabolism in developing liver and interscapular brown adipose tissue in rats". *J. Nutr.* 112, 1536-1545.
182. Coupain, J.G., Tyzbir, R.S. y Beech, G.R. (1977). "Influence of altering protein levels during early development of the rat on the activity of several brain enzymes". *J. Nutr.* 107, 1102-1113.
183. Rothwell, N.J., Stock, M.J. y Tyzbir, R.S. (1982). "Energy balance and mitochondrial function in liver and brown fat of rats fed "Cafeteria" diets of varying protein content". *J. Nutr.* 113, 1663-1672.
184. Bouillon, D.J. y Berdanier, C.D. (1983). "Effect of maternal carbohydrate intake on mitochondrial activity and on lipogenesis by the young and mature progeny". *J. Nutr.* 113, 2205-2216.
185. Hornstra, G. (1972). "Digestibility, efficiency and other metabolic effects of dietary rapeseed oil in rats". *Nutr. Metab.* 14, 282-297.

186. Hsu, Chi MingLee y Kummerow, F.A. (1977). "Influence of elaidato and erucate on heart mitochondria". *Lipids* 12, 486-494.
187. Clandinin, M.T. (1978). "The role of dietary long chain fatty acids in mitochondrial structure and function on rat cardiac mitochondrial respiration". *J. Nutr.* 108, 273-281.
188. Renner, R., Innis, Sch. M. y Clandinin, M.T. (1979). "Effects of high and low erucic acid rapassed oils on energy metabolism and mitochondrial function of the chick. *J. Nutr.* 109, 378-387.
189. Schwarz, K. (1972). "The cellular mechanism of vitamin E action: Direct and indirect effects of α -tocopherol on mitochondrial respiration". *Annals. N.Y. Acad. Sci.* 203, 45-52.
190. Alozie, S.O., Elles, L.C., Johnson, R.M. y Street, J.C. (1975). "Effects of vitamin E deficiency on GSH-induced swelling of rat liver mitochondria". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148, 929-932.
191. Chen, L.H. y Chang, M.L. (1978). "Effect of dietary vitamin E and vitamin C on respiration and swelling of guinea pig liver mitochondria". *J. Nutr.* 108, 1616-1620.
192. Finch, C.A., Miller, L.R., Inamdar, A.R., Person, R., Seiler, K. y Makler, B. (1976). "Iron deficiency in the rat. Physiological and biochemical studies of muscle dysfunction". *J. Clin. Inv.* 58, 447-453.
193. Maguire, J.J., Davies, K.J.A., Dallman, P.R. y Packer, L. (1982). "Effects of dietary iron deficiency on iron-sulfur proteins and bioenergetics function of skeletal muscle mitochondria". *Biochim. Biophys. Acta*, 679, 210-220.
194. Dougherty, R.M. y Iacomo, J.M. (1979). "Effects of dietary calcium on blood and tissue lipids, tissue phospholipids, calcium and magnesium levels in rabbits fed diets containing buf tallow". *J. Nutr.* 109, 1934-1945.
195. Allen, L.H., Oddoye, E.A. y Margen, S. (1979). "Protein-induced hypercalciuria: a longer term study". *Am. J. Clin. Nutr.* 32, 741-749.
196. Allen, L.H. y Hall, T.E. (1978). "Calcium metabolism, intestinal calcium-binding protein and bone growth of rats fed high protein diets". *J. Nutr.* 108, 967-972.
197. Allen, L.H., Bartlett, S.R. y Block, G.O. (1979). "Reduction of renal calcium reabsorption in man by consumption of dietary protein". *J. Nutr.* 109, 1345-1350.

198. Johnson, N.E., Alcántara, E.N. y Linkswiler, H. (1970). "Effect of level of protein intake on urinary and fecal calcium and calcium retention of young adult males". *J. Nutr.* 100, 1425-1430.
199. Nakamoto, T. y Miller, S.A. (1979). "The effect of protein-energy malnutrition on the development of bones in new-born rats". *J. Nutr.* 109, 1469-1476.
200. Siffert, R.S. (1951). "The role of alkaline phosphatase in osteogenesis". *J. Exp. Med.* 93, 415-426.
201. Jaffe, N.R. (1976). "Alkaline phosphatase activity characterization and subcellular distribution during initial skeletogenesis in the prenatal rat liver *Calcif. Tissue Res.* 21, 153-162.
202. Hammarstrom, L.E. y Hasselgrem, G. (1974). "Acid phosphatase in developing teeth and bone of man and macaque monkey". *Scand. J. Dent. Res.* 82, 381-395.
203. Nakamoto, T. y Miller, S.A. (1979). "Physical and biochemical changes of the mandible and long bone in protein-energy malnourished born rats". *J. Nutr.* 109, 1477-1482.
204. Waterlow, J.C. (1979). "Childhood malnutrition-the global problem". *Proc. Nutr. Soc.* 38, 1-9.
205. Miller, D.S. (1979). "Prevalence of nutritional problems in the world". *Proc. Nutr. Soc.* 38, 197-205.
206. Salazar, I., Litvak, S. y Gil, L. (1983). "Modulation of rat liver aryl hydrocarbon(Benzo-(A)pyrene) hydroxylase activity by nutritional effects". *J. Toxicol. Environ. Health* 11, 519-533.
207. Gil, D.L., Ferreira, J. y Reynafarge, B. (1980). "The 1,2,3,-benzothiadiazole. A new type of compound acting on coupling site I in rat liver mitochondria". *Xenobiotica* 10, 7-15.
208. Ruzicka, F.J. y Crane, F.L. (1970). "Quinone interaction with the respiratory chain-linked NADH dehydrogenase of beef heart mitochondria I. Juglone reductase activity. *Biochim. Biophys. Acta* 223, 71-85.
209. Reynafarge, B., Brand, M.D. y Lehninger, A.L. (1976). "Evaluation of the H⁺/site ratio of mitochondrial electron transport from rate measurements". *J. Biol. Chem.* 251, 7442-7451.
210. Mitchell, P., Moyle, J. y Mitchell, R. (1979). "Measurement of $\rightarrow H^+/O$ in mitochondrial and submitochondrial Vesicles. *En Methods in Enzymology*, Fleisher, S. y Packer, L. Editores Academic Press LV, (F) 627-640.

211. Singer, P.T. (1974). "Determination of the activity of succinate, NADH, Choline, and glycerophosphate dehydrogenases". *Methods Biochem. Anal.* 22, 123-175.
212. Baginski, E.S., Poa, P.P. y Zak, B. (1967). "Determination of phosphate: Study of labile organic phosphate interference". *Clin. Chim. Acta* 15, 155-158.
213. Brierley, G.P., Jurkowitz, M., Chávez, E. y Jung, D.W. (1977). "Energy-dependent contraction of swollen heart mitochondria". *J. Biol. Chem.* 252, 7932-7939.
214. Williams, J.N., Jr. (1964). "A method for the simultaneous quantitative estimation of cytochrome a, b, c₁, and c in mitochondria". *Arch. Biochem. Biophys* 107, 537-543.
215. Winhler, H.H., Bygrave, F.L. y Lehninger, A.L. (1968). "Characterization of the atractyloside-sensitive adenine nucleotide transport system in rat liver mitochondria". *J. Biol. Chem.* 243, 20-28.
216. Murphy, J.B. y Kies, M.W. (1960). "Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions". *Biochim. Biophys. Acta* 45, 382-384.
217. Steel, R.G. y Torrie, H.J. (1960). "Principles and Procedures of Statistics". New York, McGraw Hill 67-87.
218. Singer, T.P. (1979). "Mitochondrial Electron-Transport Inhibitors" en *Methods in Enzymology* Fleisher, S. y Packer, L. Editores Academic Press N.Y. LV, (F) 454-462.
219. Tuena de Gómez-Poyou, M., Gavilanes, M., Gómez-Poyou, A. y Ernster, L. (1980). "Control of activity of heart mitochondrial ATPase role of the proton-motive force and Ca²⁺". *Biochim. Biophys. Acta* 592, 396-405.
220. Cintrón, N.M., y Pedersen, P.L. (1979). "A protein inhibitor of the mitochondrial adenosine triphosphatase complex of rat liver. Purification and characterization". *J. Biol. Chem.* 254, 3439-3443.
221. Brand, M.D. y Lehninger, A.L. (1975). "Superstoichiometric Ca²⁺ uptake supported by hydrolysis of endogenous ATP in rat liver mitochondria". *J. Biol. Chem.* 250, 7958-7960.
222. Vercesi, A., Reynafarje, B. y Lehninger, A.L. (1978). "Stoichiometry of H⁺ ejection and Ca²⁺ uptake coupled to electron transport in rat heart mitochondria". *J. Biol. Chem.* 253, 6379-6385.
223. Villalobo, A. y Lehninger, A.L. (1980). "Stoichiometry of H⁺ ejection coupled to electron transport through site 2 in ascites tumor mitochondria". *Arch. Biochem. Biophys.* 205, 210-216.

224. Nakazawa, T., Osami, K., Suzuki, H. y Yakawa, O. (1973). "Appearance of energy conservation system in rat liver mitochondria during development. The role of adenine nucleotide translocation". *J. Biochem. (Tokyo)* 73, 397-406.
225. Hallman, M. (1971). "Changes in mitochondrial respiratory chain proteins during perinatal development. Evidence of the importance of environmental oxygen tension". *Biochem. Biophys. Acta* 253, 360-372.
226. Pollak, J.K. (1975). "The maturation of the inner membrane of foetal rat liver mitochondria". *Biochem. J.* 150, 477-488.
227. Meister, R., Comte, J., Baggetto, L., Godinot, C. y Gautheron, C.D. (1983). "Inhibitory effect of glucose on the maturation of rat liver mitochondria at birth. Phospholipid and oxidative metabolism". *Biochim. Biophys. Acta* 722, 36-42.
228. Sorgato, M.C., Branca, D. y Ferguson, S.J. (1980). "The rate of ATP synthesis by submitochondrial particles can be independent of the magnitude of the protonmotive force". *Biochem. J.* 188, 945-948.
229. Forman, N.G. y Wilson, D.F. (1982). "Energetics and stoichiometry of oxidative phosphorylation from NADH to cytochrome c in isolated rat liver mitochondria". *J. Biol. Chem.* 257, 12908-12915.
230. Lardy, H.A. y Wellman, H. (1952). "Oxidative phosphorylation: Role of inorganic phosphate and acceptor systems in control of metabolic rates". *J. Biol. Chem.* 195, 215-224.
231. Klingenberg, M., y Schollmeyer, P. (1960). "On the reversibility of oxidative phosphorylation. Adenosine triphosphate-dependent respiratory control and reduction of diphosphopyridine nucleotide in mitochondria". *Biochem. Z.* 333, 335-350.
232. Holian, A., Owen, C.S. y Wilson, D.F. (1977). "Control of respiration in isolated mitochondria: quantitative evaluation of the dependence of respiratory rates on [ATP], [ADP] and [Pi]". *Arch. Biochem. Biophys.* 181, 167-171.
233. Brawand, F., Folly, G. y Walter, P. (1980). "Relation between extra- and intramitochondrial ATP/ADP ratios in rat liver mitochondria". *Biochim. Biophys. Acta* 590, 285-289.
234. Davis, E.J. y Lumeng, L. (1975). "Relationships between the phosphorylation potentials generated by liver mitochondria and respiratory state under conditions of adenosine diphosphate control". *J. Biol. Chem.* 250, 2275-2282.
235. Stucki, J.W. (1980). "The optimal efficiency and the economic degrees of coupling of oxidative phosphorylation". *Eur. J. Biochem.* 109, 269-283.

236. Küster, U., Bohnensack, R. y Kunz, W. (1976). "Control of oxidative phosphorylation by the extramitochondrial ATP/ADP ratio". *Biochim. Biophys. Acta* 440, 391-402.
237. Erecińska, M. y Wilson, D.F. (1978). "Homeostatic regulation of cellular energy metabolism". *Trends Biochem. Sci.* 3, 219-223.
238. Wilson, D.F., Stubbs, M., Veech, R.L., Erecińska, M. y Krebs, H.A. (1974). "Equilibrium relations between the oxidation-reduction reactions and the adenosine triphosphate synthesis in suspensions of isolated liver cells. *Biochem. J.* 140, 57-64.
239. Lehninger, A.L. (1984). Comunicación personal.
240. Wilson, D.F., Erecińska, M. y Schram, V.L. (1983). "Evaluation of the relationship between the intra-and extramitochondrial [ATP]/[ADP] ratios using phosphoenolpyruvate carboxikinase". *J. Biol. Chem.* 258, 10464-10473.
241. Klingenberg, M. (1980). "The ADP-ATP translocation in mitochondria, a membrane potential controlled transport". *J. Membrane Biol.* 56, 97-105.
242. Wanders, R.J.A., Groen, A.K., Meijer, A.J. y Tager, J.M. (1981). "Determination of the free-energy difference of the adenine nucleotide translocator reaction in rat-liver mitochondria using intra-and extramitochondrial ATP-utilizing reactions". *FEBS. Lett.* 132, 201-206.
243. Kung, W., Bohnensack, R., Böhme, G., Küster, U., Letko, G. y Schönfeld, P. (1981). "Relations between extramitochondrial and intramitochondrial adenine nucleotide systems". *Arch. Biochem. Biophys.* 209, 219-229.
244. Erecińska, M. y Wilson, D.F. (1982). "Regulation of Cellular Energy Metabolism". *J. Membrane Biol.* 70, 1-14.
245. Tager, J.M., Wanders, R.J.A., Groen, A.K., Kunz, W., Bohnensack, R., Küster, U., Letko, G., Böhme, G., Duszynski, J. y Wojtezak, L. (1983). "Control of mitochondrial respiration". *FEBS. Lett.* 151, 1-9.
246. Pullman, M.E. y Monroy, G.C. (1963). "A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase". *J. Biol. Chem.* 238, 3762-3769.
247. Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Ernster, L. (1979). "Inactive transitions of the mitochondrial ATPase complex as controlled by the ATPase inhibitor". *Biochim. Biophys. Acta* 547, 252-257.

248. Carafoli, E., Gavilanes, M., Affolter, H., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (1980). "Regulation of the ATP-supported Ca^{+2} uptake by heart and liver mitochondria". *Cell Calcium* 1, 255-265.
249. Schwerzmann, K. y Pedersen, P.L. (1981). "Proton-adenosinetriphosphatase complex of rat liver mitochondria: Effect of energy state on its interaction with the adenosinetriphosphatase inhibitory peptide". *Biochemistry* 20, 6305-6311.
250. Gómez-Puyou, A., Sandoval, F., Tuena de Gómez-Puyou, M., Peña, A. y Chávez, E. (1971). "Dependency of the 2,4-dinitrophenol stimulated ATPase activity on K^+ and respiration". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 45, 104-111.
251. Knowles, A. (1982). "Differential effects of 2,4-dinitrophenol and valinomycin ($+\text{K}^+$) on uncoupler-stimulated ATPase of human tumor mitochondria". *Biochim. Biophys. Acta* 681, 62-71.
252. Adolfsen, R. y Moudrianakis, E.N. (1973). "Roles of metals ions in the hydrolisis of adenosine triphosphate by the 13S coupling factor of bacterial and mitochondrial oxidative phosphorylation". *Biochemistry* 12, 2926-2933.
253. Suelter, C.H. (1970). "Enzymes activated by monovalent cations. Patterns and predictions for these enzymes-catalized reactions are explored". *Science* 168, 789.
254. Kachmar, J.F. y Boyer, P.D. (1953). "Kinetics analysis of enzyme reactions II. The potassium activation and calcium inhibition of pyruvic phosphoferase. *J. Biol. Chem.* 200, 669.
255. Kayne, F. y Reuben, J. (1970). "Thallium-205 nuclear magnetic resonance as a probe for studying metal ion binding to biological macromolecules. Estimate of the distance between the monovalent and divalent activator of pyruvate kinase". *J. Amer. Chem. Soc.* 92, 220-222.
256. Nowak, T. y Mildvan, A.S. (1972). "Nuclear magnetic resonance studies of the function of potassium in the mechanism of pyruvate kinase". *Biochemistry* 11, 2819-2828.
257. Lowenstein, J.M. (1960). "The stimulation of transphosphorylation by alkali-metal ions". *Biochem. J.* 75, 269-274.
258. Heaton, G.M. y Nicholls, D.G. (1976). "The calcium conductance of the inner membrane of rat liver mitochondria and the determination of the calcium electrochemical gradient". *Biochem. J.* 156, 635-646.

259. Hutson, S.M., Pfeiffer, D.R. y Lardy, H.A. (1976). "Effect of cations and anions of the steady state kinetics of energy-dependent Ca^{+2} transport in rat liver mitochondria". J. Biol. Chem. 251, 5251-5258.
260. Bragadin, M., Pozzan, T. y Azzone, G.F. (1979). "Kinetics of Ca^{+2} carrier in rat liver mitochondria". Biochemistry 18, 5972-5978.
261. Affolter, H. y Carafoli, E. (1981). "Hyperbolic kinetics of the electrophoretic carrier of Ca^{+2} uptake in liver mitochondria". Eur. J. Biochem. 119, 199-201.
262. Nicholls, D.G. y Crompton, M. (1980). "Mitochondrial Calcium transport". FEBS Lett. 111, 261-268.
263. 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.
264. Barrit, J.G. (1981). "Calcium transport across cell membranes: progress toward molecular mechanism". Trends Biochem. Sci. 6, 322-325.
265. Costa, L. E., Reynafarje, B. y Lehninger, A.L. (1984). "Stoichiometry of mitochondrial H^{+} translocation coupled to succinate oxidation at level flow". J. Biol. Chem. 259, 4802-4811.