

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

CBS



COORDINACION DE SERVICIOS
ACADEMICOS - BIBLIOTECA

POLIETERES CORONA COMO HERRAMIENTA PARA DETECTAR

METALES. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE:

- a) CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL*
- b) CADENA FOTOSINTETICA DE CLOROPLASTO*

POR:

MINA KÖNIGSBERG FAINSTEIN

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

MEXICO, D.F. 1993

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
LIBRARY

A Samy

A mis padres

A Becky

PROVERBIO CHINO
No importa cuantas veces caigas al piso - SUIJOTTA

No importa cuantas veces caigas al piso, siempre y cuando al levantarte hayas recogido algo del suelo.

Proverbio chino.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental para la elaboración de esta tesis, se llevó a cabo en tres instituciones diferentes, durante los tres años que me tomó realizarlo.

Los lugares donde estuve fueron la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, y el Centro de Estudios Avanzados del IPN. El hecho de haber estado en tres centros de investigación del país fue una experiencia sumamente enriquecedora puesto que tuve la oportunidad de conocer de cerca diferentes mentalidades y formas de trabajar, así como la suerte de tratar a gente increíble que se relacionó conmigo y con mi trabajo de distintas maneras y que me ayudó siempre a llevarlo a cabo y a salir adelante.

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Carlos Gómez-Lojero no sólo por haberme enseñado la mayor parte de lo que se en la cuestión académica y experimental, sino también por enseñarme muchísimas cosas más de tan diversa índole que van desde el apreciar la música de Beethoven, hasta algunas recetas de cocina. Esto además de agradecerle los no pocos consejos que me dió en cuestiones personales y cotidianas.

Agradezco también al Dr. Diego Gonzalez-Halphen por el apoyo que siempre me brindó en el desarrollo de esta tesis, especialmente en la parte del aislamiento del complejo I. Al Dr. Sergio Estrada-O por su absoluta fe en mi y en mi trabajo, y al Dr. Antonio Peña por haberme permitido estar en su

laboratorio, usar su material y reactivos, y escucharme en sus seminarios por más de un año.

Durante mi estancia en el CINVESTAV conocí a la Bióloga Bertha Pérez con quien tuve larguísimas pláticas y quien también me enseñó mucho sobre el manejo práctico del laboratorio. Al Sr. Jorge Zarco sin el cual nunca hubiera podido preparar mitocondrias y que hizo que mis relaciones con las ratas fueran más llevaderas. A la Señora Cristina Díaz por su ayuda administrativa y a mis compañeros Rosa María Dominguez y Rogelio Morales quienes con sus visitas me amenizaron la escritura de esta tesis. Muchas gracias.

Del tiempo que estuve en el laboratorio del Dr. Peña, le agradezco a la Q.F.B. Norma Sánchez el haberme ayudado con las técnicas de laboratorio así como por su amistad, misma que también me brindaron la M. en C. Giselle Rosas y la Dra. Martha Calahorra. Gracias también al Q.F.B. Jorge Ramírez por su ayuda con las computadoras. A la Q.F.B. Miriam Vázquez por enseñarme las técnicas y los "trucos" para aislar fracciones mitocondriales y hacer electroforesis, así como a la Bióloga Ema Bertha Gutiérrez que me brindó su ayuda en ese proceso. Doy las gracias a los Dres. Salvador Uribe y Pablo Rangel por sus atinadas sugerencias para mejorar las preparaciones de mitocondrias, al mismo tiempo que por auxiliarme para obtener el hígado de las ratas.

Del laboratorio de la UAM quiero agradecer a mis compañeros

la M. en C. Blanca Rivera y el Dr. Raul Alva por haber sido los primeros en introducirme en este campo. A la M. en C. Mireya Toro que siempre está al pendiente de nosotros. A la Bióloga Experimental Vicky Patiño quien vivió conmigo mis mitocondrias primigéneas. Y a los M. en C. Arturo Preciado y Angeles Aguilar, Jefes del Departamento de Ciencias de la Salud durante el desarrollo de mi maestría, quienes me dieron la oportunidad de salir a otras instituciones para realizar mi trabajo experimental, así como a la Dra. Conchita Gutiérrez, coordinadora de la Maestría en Biología Experimental y a la Señora Mariana Meaney y la Srta. Judith Morales por su ayuda en cuestiones administrativas.

En los trimestres que estudiamos los cursos de la maestría conté con la compañía y la amistad (que perduró más allá de los cuatro trimestres de los cursos), de las M. en C. Alicia Lara, Leticia Rocha y Rebeca López.

Un agradecimiento muy especial a mis papás, a mi hermana, a mi familia, mis amigos no "científicos" y en particular a Samy, quienes no nada más me apoyaron y toleraron mis humores, sino que también han aprendido algo sobre las mitocondrias y cloroplastos de tanto oírme.

"MUCHISIMAS GRACIAS A TODOS"

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN:

1) EL LABORATORIO DE BIOQUIMICA Y BIOFISICA DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA.

2) EL LABORATORIO DEL DR. ANTONIO PEÑA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DEL INSTITUTO DE FISIOLOGIA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

3) EL LABORATORIO DEL DR. CARLOS GOMEZ-LOJERO DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA DEL CENTRO DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL.

BAJO LA DIRECCION DE:

DR. CARLOS GOMEZ-LOJERO,	TUTOR.
DR. DIEGO GONZALEZ-HALPHEN	ASESOR.
DR. SERGIO ESTRADA-ORIHUELA	ASESOR.

LA MAESTRIA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL SE ENCUENTRA REGISTRADA DENTRO DEL PADRON DE EXCELENCIA DE PROGRAMAS DE POSGRADO DEL CONACyT, Y ES FINANCIADA POR ESTE A TRAVES DEL CONVENIO PFPN/66/92.

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCION	
1.1 MEMBRANAS TRANSDUCTORAS DE ENERGIA	1
E HIPOTESIS QUIMIOSMOTICA	
1.2 CADENA RESPIRATORIA	5
1.2.1 COMPLEJO I: NADH:UBIQUINONA OXIDO-REDUCTASA	7
1.2.2 COMPLEJO II: SUCCINATO:UBIQUINONA OXIDO-REDUCTASA	8
1.2.3 COMPLEJO III: UBIQUINOL:CITOCROMO c	
OXIDO-REDUCTASA	8
1.2.4 COMPLEJO IV: CITOCROMO c OXIDASA	9
1.3 FOTOSINTESIS OXIGENICA	9
1.3.1 FOTOSISTEMA II	11
1.3.2 COMPLEJO b ₆ f	13
1.3.3 FOTOSISTEMA I	14
1.4 TRANSPORTE A TRAVES DE MEMBRANAS	15
1.4.1 TIPOS DE TRANSPORTE	16
1.5 POLIETERES CORONA	18
2. OBJETIVO GENERAL	22
2.1 OBJETIVOS PARTICULARES	22
3. HIPOTESIS	22
4. MATERIALES Y METODOS	
4.1 REACTIVOS	24

4.2 CLOROPLASTOS	28
4.2.1 AISLAMIENTO DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA	28
4.2.2 CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA	29
4.2.3 FORMACIÓN DEL COMPLEJO 18C6-PIC-K+	29
4.2.4 FOTORREDUCCIÓN DE NADP ⁺	30
4.2.4 CONSUMO DE OXÍGENO (REACCIÓN DE MEHLER)	31
4.3 MITOCONDRIA	
4.3.1 AISLAMIENTOS	32
4.3.1.1 Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata	32
4.3.1.2 Aislamiento de mitocondrias de corazón de bovino	33
4.3.1.3 Obtención de partículas submitcondriales (PSM) partir de mitocondrias de corazón de bovino	35
4.3.1.4 Aislamiento de fracción RB4 (Complejo I-III) mitocondrial	35
4.3.1.5 Aislamiento de Complejo I mitocondrial (NADH:Ubiquinol Oxido-reductasa) de corazón de bovino	37
4.3.1.6 Extracción de Glutamato Deshidrogenasa de las mitocondrias del hígado de la rata	38
4.3.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA	
4.3.2.1 Método de Biuret	38
4.3.2.2 Método de Lowry	39
4.3.3 CONSUMO DE OXIGENO	
4.3.3.1 En la fracción mitocondrial del hígado de la rata	42

4.3.3.2 En PSM de corazón de bovino	43
4.3.3.3 Estimulación del consumo de oxígeno por valinomicina en la fracción mitocondrial	43
4.3.4 ACTIVIDAD DEL COMPLEJO I	44
4.3.5 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE DSS	45
4.3.6 ACTIVIDAD DE GLUTAMATO DESHIDROGENASA	46
4.3.7 HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL	
4.3.7.1 Hinchamiento mitocondrial no energizado	46
4.3.7.2 Hinchamiento mitocondrial energizado	47

5. RESULTADOS

5.1 CLOROPLASTOS

5.1.1 FOTORREDUCCIÓN DE NADP ⁺	49
5.1.2 REACCIÓN DE MEHLER	52

5.2 MITOCONDRIA

5.2.1 EXPERIMENTOS CON LA FRACCION MITOCONDRIAL	58
5.2.1.1 Estudios en mitocondrias intactas	58
5.2.1.2 Glutamato Deshidrogenasa libre	68
5.2.1.3 Transporte de glutamato	75
5.2.1.3.1 Hinchamiento mitocondrial no energizado	75
5.2.1.3.2 Hinchamiento mitocondrial energizado	82
5.2.2 EXPERIMENTOS CON PARTICULAS SUBMITOCONDRIALES	90
5.2.3 COMPLEJO I: NADH:UBIQUINOL OXIDO-REDUCTASA	92

6. DISCUSION

6.1 CLOROPLASTO

6.1.1 FOTORREDUCCIÓN DE NADP ⁺	100
---	-----

6.1.2 REACCIÓN DE MEHLER	101
6.2 MITOCONDRIA	106
6.2.1 MITOCONDRIAS INTACTAS	107
6.2.2 PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIALES	113
6.2.3 COMPLEJO I: NADH:UBIQUINOL OXIDO-REDUCTASA	118
6.2.4 EXPERIMENTOS CON EL POLIETER 15C5	119
6.2.4.1 Glutamato Deshidrogenasa	121
6.2.4.2 Transporte de glutamato	
6.2.4.2.1 Hinchamiento mitocondrial no energizado	122
6.2.4.2.2 Hinchamiento mitocondrial energizado	125
7. CONCLUSIONES	
7.1 CLOROPLASTO	131
7.2 MITOCONDRIA	131
8. BIBLIOGRAFIA	133

INDICE DE FIGURAS

1. Cadena Respiratoria Mitocondrial	6
2. Cadena de Transporte de electrones Fotosintética	10
3. Poliéteres Corona usados en este trabajo	20
4. Potenciales Redox de los componentes del FSI	50
5. Consumo de oxígeno en cloroplastos incubados con 10^{-4} M de picrato, complejo pic-18C6- K^{+} o poliéter 18C6 respectivamente.	55
6. Efecto del 15C5 sobre el consumo de oxígeno mitocondrial estimulado por FCCP	61
6a. Inverso del efecto del 15C5 sobre el consumo de oxígeno mitocondrial estimulado por FCCP	62
7. Efecto del 1.6mM de 15C5 sobre el consumo de oxígeno mitocondrial	64
8. Efecto de diferentes concentraciones de glutamato sobre la inhibición en el consumo de oxígeno mitocondrial en presencia de 1.6mM de 15C5	67
9. Doble recíproca de la actividad de GDH libre y la concentración de glutamato en presencia y ausencia de 15C5, pH= 7.0	70
10. Doble recíproca de la actividad de GDH libre y la concentración de glutamato en presencia y ausencia de 15C5, pH= 7.6	72
11. Cinética enzimática de la GDH libre en presencia y ausencia de 15C5, pH= 8.0	73
12. Efecto del fosfato sobre el hinchamiento mitocondrial	

no energizado a diferente pH	77
13. Efecto del 15C5 sobre el hinchamiento mitocondrial no energizado, a diferente pH.	79
14. Cinética enzimática a pH 6.8, de la velocidad del hinchamiento mitocondrial no energizado contra la concentración de fosfato, en presencia y ausencia de 15C5	80
15. Doble recíproca del hinchamiento mitocondrial no energizado a pH 6.8 contra la concentración de fosfato, con y sin 15C5	81
16. Hinchamiento mitocondrial no energizado a diferentes concentraciones de fosfato, en ausencia y presencia de 15C5, pH 8.0	82
17. Efecto del 15C5 sobre el hinchamiento mitocondrial inducido por valinomicina con 20mM de glutamato	84
18. Efecto del 15C5 sobre el hinchamiento energizado en presencia de glutamato	83
19. Efecto del 15C5 sobre el consumo de oxígeno mitocondrial inducido por valinomicina, usando glutamato como sustrato	84
20. Efecto del 15C5 sobre el hinchamiento mitocondrial inducido por valinomicina con 20mM de succinato	86
21. Efecto del 15C5 sobre el hinchamiento energizado usando succinato como sustrato	87
22. Efecto del 15C5 sobre el consumo de oxígeno mitocondrial inducido por valinomicina, usando succinato como sustrato	89
23. Trazos de control para los consumos de oxígeno en	

PSM de corazón de bovino.	93
24. EGPA-DSS comparativa del complejo I	95
25. Actividad enzimática del complejo I preincubado con fosfolípidos, a diferentes tiempos de incubación posterior a 37°C	96
26. Dependencia de la actividad enzimática a la concentración de UQ ₁	97
27. Arreglo geométrico de los centros acarreadores de electrones del FSI	100

INDICE DE TABLAS

1. Requerimientos para medir la fotorreducción de NADP+	50
2. Velocidad de fotorreducción de NADP+ en presencia de distintos poliéteres corona.	51
3. Efecto de los poliéteres corona sobre la reacción de Mehler en cloroplastos	53
4. Efecto de los poliéteres corona sobre la reacción de Mehler en cloroplastos.	56
5. Efecto del picrato sobre la reacción de Mehler en cloroplastos	57
6. Efecto de los poliéteres macrocíclicos sobre la respiración mitocondrial	59
7. Efecto de la nueva solución de poliéter 15C5 sobre el consumo de oxígeno mitocondrial	63
8. Porcentaje de inhibición de diferentes concentraciones de poliéter 15C5	65
9. Efecto de 1.6mM de 15C5 sobre el consumo de oxígeno mitocondrial con diferentes sustratos	66
10. Comparación de los valores de Km y Vmax obtenidos de los experimentos mostrados en las figuras 9 y 10; a diferentes pH, con o sin 15C5	74
11. Consumo de oxígeno en PSM de corazón de bovino	90
12. Consumo de oxígeno en PSM de corazón de bovino	91
13. Actividad enzimática de la NADH deshidrogenasa en presencia y ausencia de 10^{-4} M de DB18C6, usando UQ ₁ o DBH como aceptores de electrones.	99

1.INTRODUCCION

1.1 MEMBRANAS TRANSDUCTORAS DE ENERGIA E HIPOTESIS QUIMIOSMOTICA

Una de las características de todos los seres vivos es su habilidad para transformar la energía metabólica requerida para el crecimiento y mantenimiento de múltiples funciones celulares (Erecinska y Wilson, 1982). Algunos organismos son capaces de transformar la energía luminosa y convertirla en energía metabólica, como son los organismos fotosintéticos desde las bacterias hasta las plantas superiores. Sin embargo, una gran parte de los seres vivos no son capaces de aprovechar este tipo de energía, por lo que deben obtenerla del metabolismo de compuestos sintetizados por los organismos fotosintéticos. Lo sorprendente es que además de transformar la energía, los seres vivos son capaces de almacenarla y transportarla para usarla en el momento y en el lugar necesarios. La molécula del ATP tiene enlaces de grupos fosfato de alta energía los cuales, al momento de romperse la transfieren para que se lleven a cabo diversos procesos celulares.

La mayor parte de la transducción de energía y su posterior utilización para sintetizar ATP se realiza en lo que se conoce como membranas transductoras de energía como son la membrana interna mitocondrial en un proceso denominado respiración así como en la membrana tilacoidal de cloroplastos, en algas y bacterias donde es llamado fosforilación fotosintética. Sin embargo, cabe mencionar que existen otros mecanismos para la síntesis de ATP como la

fosforilación a nivel de sustrato.

Para explicar el mecanismo por el cual se sintetiza al ATP, apareció en 1961, la propuesta de Peter Mitchell, la teoría quimiosmótica. Mitchell sugirió que las membranas transductoras de energía que están formadas por complejos proteicos realizan una serie de reacciones de óxido-reducción acopladas de tal manera, que los electrones transferidos desde los sustratos de estas cadenas hasta los aceptores finales de electrones conlleven a una translocación de protones que genera una diferencia de potencial electroquímico de protón, y que ésta a su vez, se utiliza por una bomba de protones, la ATPsintetasa presente en todos los organismos vivos, para generar el ATP.

El término diferencia de potencial o gradiente se utiliza cuando existen dos compartimientos separados por una membrana impermeable y en uno de ellos hay mayor cantidad de soluto que en el otro. El potencial electroquímico tiene un componente eléctrico, que se refiere a la diferencia en cargas que existe en ambos lados de la membrana y uno químico, relacionado con la concentración de la especie química que se esté comparando. En el caso del potencial que genera la translocación de protones en la membrana interna mitocondrial, el potencial eléctrico ($\Delta\psi$) está dado por las cargas positivas del protón; afuera hay más cargas positivas y adentro más negativas. El potencial químico en este caso se refiere únicamente a la especie protón (H^+), i.e. afuera hay más protones, más ácido, y adentro menos protones, más

alcalino, por lo tanto esta diferencia puede expresarse en términos de (ΔpH). Es por ello que a este potencial se le conoce como potencial electroquímico de protón ($\Delta_{\mu\text{H}^+}$), ya que conjunta el efecto de carga ($\Delta\psi$) y de concentración de especie química (ΔpH). La hipótesis que planteó Mitchell se basa en cuatro postulados: (Mitchell, 1977).

1) La ATPsintetasa es una ATPasa de protón reversible, con características quimiosmóticas, y con una estequiometría de $\rightarrow \text{H}^+/\text{P}$.

Este planteamiento fue debido a que la ATPasa es una enzima que se encuentra en la membrana plasmática y de algunos organelos, cuya función es la de meter o sacar iones en contra de un gradiente, obteniendo la energía necesaria de la hidrólisis de ATP. De manera que lo que propone Mitchell en su primer postulado es que la ATPasa de protón funcione en reversa i.e. que en lugar de hidrolizar ATP, lo sintetice, usando para ello la energía de los protones translocados durante el transporte de electrones en la cadena oxidativa.

2) Las cadenas respiratorias y fotorreductoras son sistemas protón-motrices localizados en las membranas con una estequiometría característica de $\rightarrow \text{H}^+/2\text{e}^-$; poseen una polaridad para la translocación de protones a través de la membrana y una actividad reductora.

Este postulado significa que las cadenas transductoras de energía

se encuentran embebidas en la membrana, i.e. acomodadas y orientadas de tal manera que los componentes que pueden transferir electrones y translocar protones estén intercalados con los que únicamente pueden transferir electrones, formando asas, de tal manera que el paso de electrones a lo largo de toda la cadena permita la translocación neta de protones.

3) Existen sistemas transportadores de protones para la estabilización osmótica y el transporte de metabolitos.

Este postulado se refiere a la existencia de acarreadores o transportadores dentro de las membranas transductoras de energía, que también están acoplados a la diferencia de potencial generada por los protones, y la utilizan para translocar aniones (como el fosfato o glutamato) y cationes.

4) Los sistemas anteriores están embebidos en una membrana topológicamente cerrada, llamada membrana de acoplamiento, que funciona como una barrera osmótica no acuosa, que tiene una baja permeabilidad a solutos en general y a protones en particular.

Este último postulado es muy importante debido a que propone por un lado, que los componentes de las cadenas están embebidos en una membrana que sirve de barrera o separación entre dos compartimientos y por otro lado, que dicha membrana es impermeable al paso de protones. La importancia del postulado reside en que si la membrana fuera permeable a protones, estos difundirían del

compartimiento donde la concentración es mayor al compartimiento donde es menor para igualar concentraciones, y no se podría generar una diferencia de potencial.

Es importante recalcar que la energía que se forma por la μH^+ , puede ser utilizada para otros procesos celulares además de la síntesis de ATP como es el caso del transporte de metabolitos o sustratos en contra de gradiente, al interior de los organelos que llevan a cabo la transducción de energía como son las mitocondrias y cloroplastos en eucariotes, o al interior celular en procariotes; y que si se abate alguno de los componentes del $\Delta \mu\text{H}^+$, se interrumpe tanto el transporte de metabolitos como la síntesis de ATP. Esto se tratará con más detalle en el apartado que corresponde a transporte.

1.2 CADENA RESPIRATORIA

La cadena respiratoria (figura 1) consta de cuatro complejos proteicos embebidos en la membrana interna mitocondrial, que se encargan de transferir electrones desde el NADH hasta el oxígeno atómico para formar agua. Para ello cuentan con acarreadores móviles como son la ubiquinona y el citocromo c. La transferencia de electrones está acoplada a la translocación de protones, lo cual genera una diferencia electroquímica de protón aprovechada por la ATPsintetasa para producir ATP a partir de ADP y fósforo inorgánico.

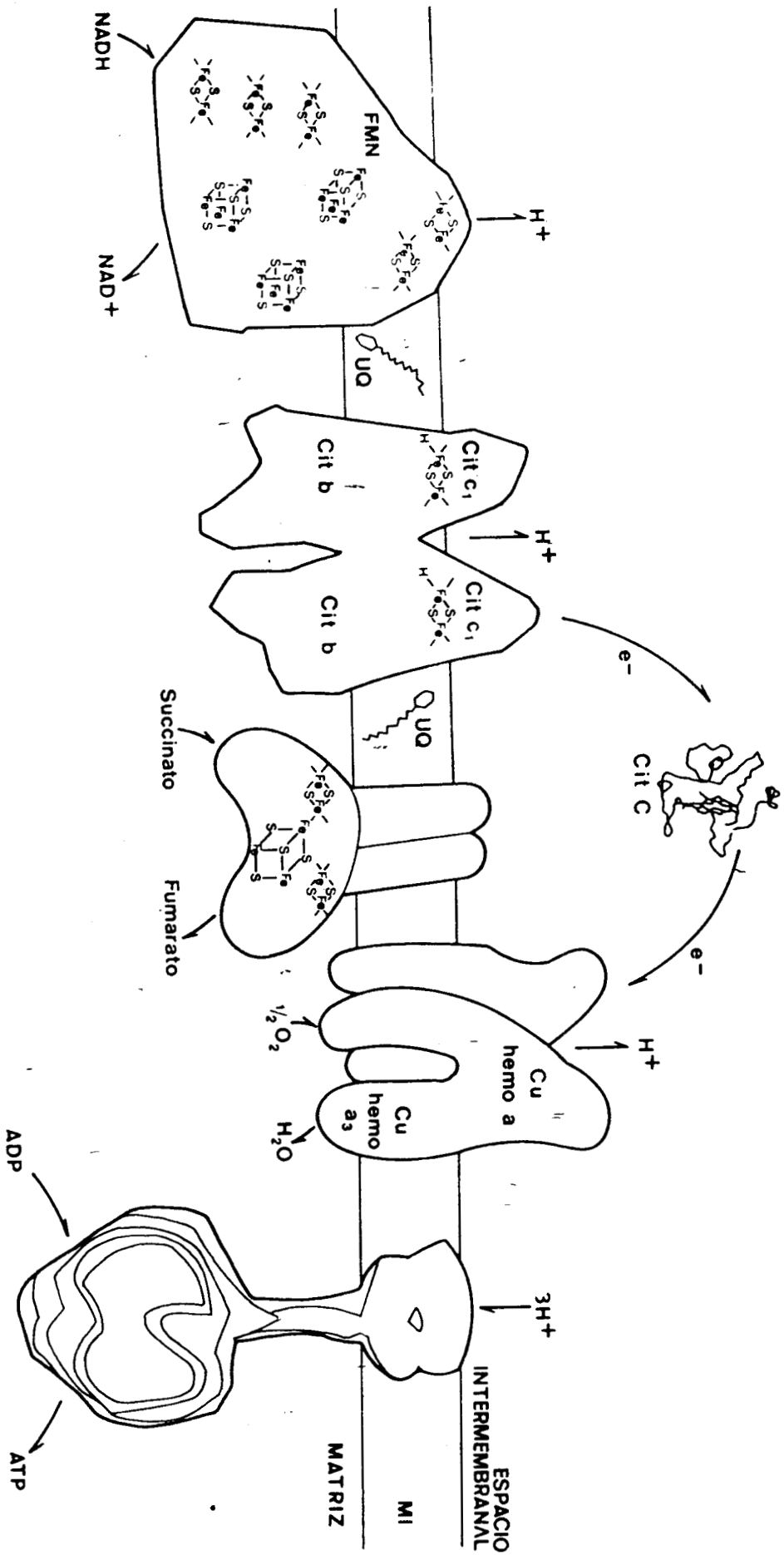


FIGURA 1: Cadena Respiratoria Mitocondrial.

1.2.1 COMPLEJO I: NADH-UBIQUINONA:OXIDO-REDUCTASA

El complejo I cataliza la transferencia de electrones del NADH a la ubiquinona y homólogos artificiales. La reducción de la UQ está acoplada a la translocación de protones, por lo que a este lugar se le conoce como sitio I de acoplamiento.

La NADH deshidrogenasa, como se suele nombrar a la enzima, es el complejo respiratorio que presenta la composición más complicada: Tiene un peso molecular aproximado de 700 kDa y consta de más de 25 polipéptidos diferentes. Todavía no se sabe exactamente como se encuentra conformada la enzima, pero se le ha dividido en tres fracciones con diferentes características: una fracción hidrofóbica, una fracción ferroproteínica y una fracción flavoproteínica (Hatefi, 1985). Que contienen, además de las subunidades peptídicas, a los grupos prostéticos encargados de la oxido-reducción. Estos grupos son un FMN (flavín mono nucleótido) y de seis a ocho centros hierro-azufre. Parece ser que tres de estos centros son tetranucleares [4Fe-4S] y el resto de ellos son binucleares [2Fe-2S] (Ohnishi, et. al. 1985) y se encuentran en una estequiometría de 22-24 átomos de hierro por molécula de FMN (Ingledey y Ohnishi, 1980). Se ha convenido nombrarlos de acuerdo a la nomenclatura de Ohnishi (1985) como N1a, N1b, N2, N3, N4 y N5. Se ha establecido en centro tetranuclear N2, en la fracción hidrofóbica, como el donador directo de electrones a la UQ (Ohnishi, 1985). Esta transferencia es inhibida selectivamente por la rotenona.

1.2.2 COMPLEJO II: SUCCINATO:UBIQUINONA OXIDO-REDUCTASA

Esta enzima está formada por dos subunidades: la succinato deshidrogenasa (SDH) y un citocromo tipo b (Davis y Hatefi, 1971). Como grupos prostéticos tiene a un FAD (Flavin adenin dinucleótido) y tres centros Fe-S denominados S1, S2 y S3 según Onhishi (1985). El complejo II se encarga de transferir electrones del succinato a la ubiquinona, sin translocar protones. De manera que esta enzima no colabora con la formación del potencial electroquímico.

1.2.3 COMPLEJO III: UBIQUINOL:CITOCROMO c OXIDO-REDUCTASA

El también llamado complejo bc_1 es uno de los complejos transductores de energía más ampliamente distribuidos en la naturaleza y se ha podido aislar de una gran cantidad de organismos (Trumpower, 1990; Mukai, et. al. 1989). Incluso se ha encontrado un complejo muy semejante en cloroplastos (Hauska et. al. 1983) cuya similitud esta basada en la presencia de una proteína Fe-S binuclear (proteína Fe-S de Rieske) como grupo prostético. Los otros grupos encargados de llevar a cabo la óxido-reducción son dos citocromos b y un citocromo c_1 (González-Halphen, 1990). Su función es la de catalizar la oxidación del ubiquinol y la reducción del citocromo c. La transferencia de electrones del ubiquinol al citocromo c está acoplada a la translocación de protones a través de la membrana generando un potencial electroquímico de protón, por lo que se le ha denominado sitio II de acoplamiento. El mecanismo por el cual se lleva a cabo este proceso se conoce como ciclo de la

quinona o ciclo Q (Mitchell y Moyle, 1982; Trumpower, 1990).

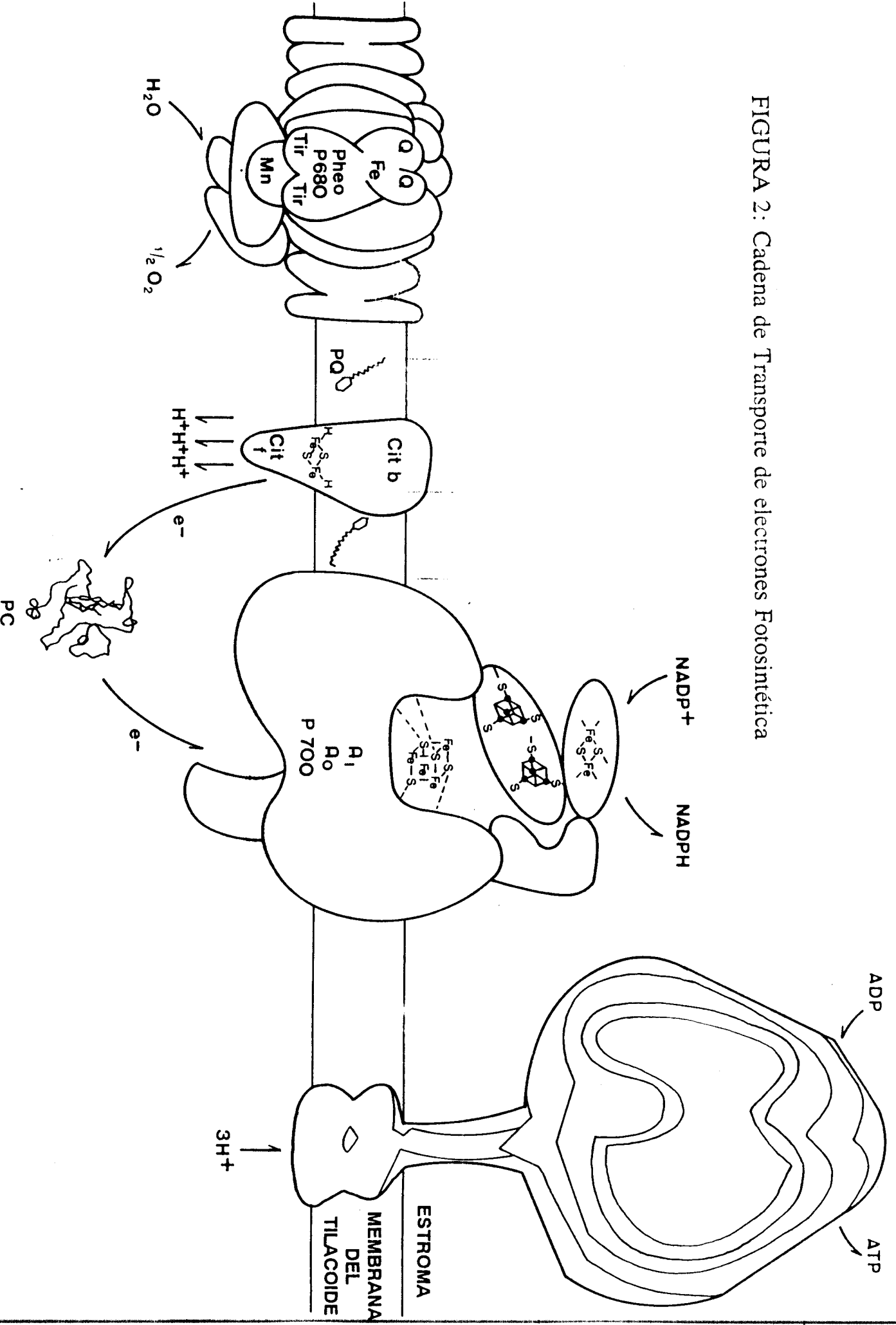
1.2.4 COMPLEJO IV: CITOCROMO c OXIDASA

Esta es la última enzima de la cadena respiratoria y es la que se encarga de transferir los electrones a su aceptor final: un átomo de oxígeno que a su vez toma dos protones del medio y forma agua. Para llevarlo a cabo, la oxidasa cuenta con varios grupos prostéticos como son 2 ó 3 cobres y dos hemos tipo a y a₃, (Capaldi, 1990; Malmström, 1990; Azzi, 1990), todos ellos dentro de una enzima oligomérica de alrededor de 13 subunidades (Kadenbach y Merle, 1981). Además de transferir electrones, esta enzima es capaz de generar gradiente electroquímico translocando protones, por lo que se le considera el sitio III de acoplamiento.

1.3 FOTOSÍNTESIS OXIGENICA

La fotosíntesis en las plantas se lleva a cabo en los cloroplastos, específicamente en la membrana interna del tilacoide (figura 2). El primer paso de la fotosíntesis es la absorción de luz por los pigmentos antena y la transferencia de ella a los centros de reacción donde la energía luminosa es utilizada para separar cargas y después crear un potencial reductor. En las plantas existen dos centros de reacción: el fotosistema I (FSI) que se excita por luz de longitud de onda más corta que 700nm y genera un fuerte poder reductor en forma de NADPH, y el fotosistema II

FIGURA 2: Cadena de Transporte de electrones Fotosintética



(FSII) que absorbe a longitudes de onda más cortas que 680 nm y produce un agente oxidante fuerte que lleva a la formación de oxígeno y al mismo tiempo transfiere electrones del agua a la quinona (Haehnel, 1984). La transferencia de electrones acoplada a la translocación de protones genera un gradiente de potencial electroquímico de protón, que al igual que en el caso de la respiración mitocondrial, se utiliza para formar ATP mediante la ATP sintetasa. El ATP formado, junto con NADPH generado pasan al ciclo de Calvin para finalmente producir hexosas.

Para que se transfieran los electrones desde el agua hasta el NADP^+ se requiere la presencia de tres complejos proteicos, dos de ellos son los centros de reacción del FSI y FSII, y el otro es el complejo b_6f , así como la de acarreadores móviles de electrones como son la plastoquinona que transfiere electrones del FSII al complejo b_6f , y la plastocianina, que va desde este último complejo al FSI. Además de la existencia de la ferredoxina soluble que media la transferencia de electrones del FSI a la ferredoxin- NADP^+ reductasa (Cramer, et. al. 1985).

1.3.1 FOTOSISTEMA II:

Estructuralmente el FSII está formado por aproximadamente 22 polipéptidos que se encuentran asociados formando cuatro secciones funcionalmente distintas (Hansson y Wydrzynsky, 1990):

- 1) El centro de reacción que incluye a los componentes de la producción de oxígeno y reducción de la plastoquinona (PQ), que se

encuentran situados dentro de un dímero de proteína llamado D_1 y D_2 .
2) Una sección regulatoria formada por proteínas hidrofílicas unidas extrínsecamente por la superficie luminal de la membrana
3 y 4) El conjunto de pigmentos antena (light harvesting) del FSII está dividido en dos partes:

- a) Antena proximal: formada por los complejos proteicos de pigmentos CP43 y CP49. Consta de 40-70 clorofilas a y β carotenos.
- b) Antena distal: formada por el característico complejo que absorbe luz para el FSII (light harvesting complex LHCII) cuyo rango de absorción es mayor comparado con el de la antena proximal, y esta formado por alrededor de 200 clorofilas a y b.

Funcionalmente se le han adjudicado dos papeles al FSII, uno reductor y otro oxidante.

Lado Reductor: Al ser excitado por la luz, el donador primario de electrones: P680, que es un dímero de clorofila a, transfiere su electrón al aceptor primario: una molécula de feofitina, que algunos autores han llamado HA y que se encuentra unida a la proteína D_1 por un ácido glutámico. La feofitina se encarga de reducir a la primera quinona: Q_A que se encuentra unida a D_2 , y forma una semiquinona que no se protona sino que transfiere su electrón a la segunda quinona unida: Q_B , que si se protona y forma el plastoquinol: Q_BH_2 , que como tiene una afinidad muy baja se desprende de la proteína siendo desplazada por otra plastoquinona que toma su lugar. Cabe aclarar que entre Q_A y Q_B está localizado un fierro no hemo que interactúa magnéticamente con ellas

(Andersson y Styring, 1991)(Miller y Brudvig, 1991).

Lado oxidante: Para regenerar a P680 se conocía la existencia de un donador de electrones denominado Z. Recientemente se ha descubierto su identidad y se sabe que es una tirosina. De hecho, existen dos tirosinas dentro del centro de reacción del PSII, que por estar unidas a ambientes proteicos distintos, son funcionalmente diferentes. La tirosina que está en la proteína D₁, llamada tirosina 161 (su lugar dentro de la secuencia de aminoácidos), es la que se encarga de la transferencia de electrones (Metz, et. al. 1989; Debus, et. al. 1988), mientras que la que está dentro de D₂ parece estar interactuando con el centro multinuclear de manganesos que mediante una serie de estados de oxidación (desde S₀ hasta S₄) se encarga de liberar al oxígeno del agua y pasar sus electrones a la tirosina Z, para que regenere a P680 (Witt, 1991).

1.3.2 COMPLEJO b₆f:

Este complejo tiene su contraparte en la cadena respiratoria mitocondrial representado por el complejo bc₁, por lo que se la ha considerado como un puente evolutivo entre ambas vías (Hausaka, et. al. 1983)(Scherer, 1990). En ambos sistemas, oxida quinoles y reducen metaloproteínas (en este caso a la plastocianina (PC) o citocromo c₅₅₃ en algunas cianobacterias y algas), mientras generan fuerza protón-motriz. Como grupos prostéticos, además de los citocromos, cuentan con un centro Fe-S llamado proteína de Rieske (Nelson, 1987).

1.3.3 FOTOSISTEMA I:

El centro de reacción del FSI, al igual que el FSII, consta de dos proteínas centrales las cuales poseen a los componentes de las reacciones de óxido-reducción, y otra parte que se encarga de captar la energía luminosa, esta última se conoce como complejo que absorbe luz para el FSI (light harvesting complex LHCI). El FSI también tiene la capacidad de capturar la luz, separar las cargas y estabilizarlas. El donador primario de electrones es un dímero de clorofilas a denominado: P700, que al ser excitado por la luz dona un electrón al aceptor primario que parece ser otra clorofila llamada A_0 (o en algunos casos I) y que a su vez transfiere el electrón al aceptor secundario A_1 , cuya identidad todavía causa controversia, pero que parece ser alguna molécula tipo quinona, posiblemente dos vitaminas K_1 (filoquinona) (Knaff, 1988). El siguiente aceptor de electrones es un centro Fe-S tetranuclear, denominado F_x (Golbeck, et. al. 1988) que continúa transfiriendo el electrón hacia otros dos centros Fe-S tetranucleares: F_A/F_B (Wynn y Malkin, 1988; Mehari et. al. 1991), que finalmente pasan el electrón a la ferredoxina soluble que cuenta con un centro Fe-S binuclear (Smith y Feinberg, 1991).

Por otro lado, la plastocianina reduce al P700 regenerándolo, para que se encuentre de nuevo en condiciones de excitarse por otro fotón (Golbeck y Bryant, 1991).

1.4 TRANSPORTE A TRAVES DE MEMBRANAS

El advenimiento de la hipótesis quimiosmótica produjo un gran cambio en la forma de percibir el proceso de transporte, de ser un fenómeno secundario con movimientos de iones dependientes de energía se volvió un tema central dentro del campo de estudio de la bioenergética (Nicholls, 1982).

Para que un ion o un metabolito se transporten a través de una membrana se requiere una vía y una fuerza motora (Nicholls, 1982).

La fuerza motora o motriz es la fuerza que impulsa a las moléculas a ser transportadas, y se ha dividido básicamente en dos tipos principales:

1) Difusión facilitada: Difusión a través de una membrana a favor de gradiente de concentraciones

2) Transporte activo: Transporte y acumulación de sustratos en contra de un gradiente de concentración (Cramer y Knaff, 1991). Para su estudio se ha separado al transporte activo en dos tipos: primario y secundario (West, 1983; Kotik, 1983).

a) Transporte activo primario: El proceso de transporte está acoplado directamente a una reacción generadora de energía. Puede ser de tres tipos:

► ATPasas, (como la de Na^+ , K^+/Na^+ , Ca^{+2} etc.), que acoplan la hidrólisis de ATP al transporte de metabolitos.

► Reacciones de óxido-reducción dentro de la membrana, como la fotosíntesis o la respiración, donde existe una translocación efectiva de protones.

► Bombas de iones cuya fuerza motriz es la luz, como en las bacterias halófilas (como *Halobacterium halobium*).

Este tipo de transporte incluye sistemas que translocan grupos químicos, de manera que la molécula que entra a la membrana sale modificada químicamente.

b) Transporte activo secundario: llamado también transporte acoplado. En este caso la energía libre no es proporcionada por cambios metabólicos, sino por una energía acumulada por la diferencia en el potencial electroquímico de un catión. En general se acepta que el catión que provee la fuerza motriz en animales es el Na^+ , mientras que para plantas y bacterias es el H^+ .

Actualmente cuando se habla de transporte activo, se está refiriendo al secundario, ya que los fenómenos involucrados en el transporte activo primario se estudian desde otros puntos de vista, v.gr. la respiración y fotosíntesis no se consideran sistemas que transportan protones sino sistemas que generan energía que está acoplada a la síntesis de ATP.

Es por esto que Cramer y Knaff (1991) amplían su definición de transporte activo de la siguiente manera: Transporte y acumulación de sustratos contra un gradiente de concentración sin modificación química del sustrato.

1.4.1 TIPOS DE TRANSPORTE (Nicholls, 1982):

a) Uniporte: Es el transporte de un sólo ion a través de la membrana

b) Simporte o cotransporte: Es un movimiento que involucra el

acoplamiento obligatorio de dos o más iones en paralelo

c) Antiporte o intercambio: Es un proceso donde el transporte de un ion está acoplado al transporte de otro en dirección opuesta.

Estos transportes pueden ser:

a) Electroneutros: cuando no se transfiere carga neta. Ya sea por el uniporte de una especie sin carga, el cotransporte de un anión y un catión o el antiporte de dos iones con igual carga.

b) Electrogénicos: cuando si se transfiere carga neta a través de la membrana.

Lo anterior da una idea de que el potencial electroquímico necesario para que se lleve a cabo el transporte puede verse afectado de distintas maneras. Por ejemplo, para el caso del potencial electroquímico de protón generado por la cadena respiratoria mitocondrial, un ionóforo como la valinomicina que mete potasio en un uniporte electrogénico, abate el potencial eléctrico pero no el químico, mientras que la nigericina, que mete protón y saca potasio en un antiporte electroneutro, abate el potencial químico sin afectar al eléctrico. Por otro lado, una molécula como el FCCP o DNP conocidos como desacoplantes, translocan protones al interior de la mitocondria abatiendo tanto el potencial eléctrico como el químico, con lo que deacoplan a la ATP sintetasa de la cadena respiratoria e impiden la síntesis de ATP (de ahí su nombre).

Para que entren o salgan este tipo de iones se necesita de un sistema de transporte que se encargue de ello. Estos sistemas son

proteínas intrínsecas de membrana que pueden actuar de dos maneras: como canales o como acarreadores móviles.

El aislamiento y caracterización de estos sistemas transportadores a sido un problema difícil que ha llevado a los investigadores a buscar sistemas modelo que semejen lo que sucedería en los sistemas biológicos reales. Estas moléculas pueden ser naturales, aisladas de hongos y bacterias, o sintéticas. Según su mecanismo de acción, estos compuestos se han clasificado en dos grupos: formadores de canales y ionóforos (Gómez-Lojero, 1974; Gómez-Puyou y Gómez-Lojero, 1977; Nicholls, 1982 y Estrada-O, 1983).

Los canales, como la gramicidina y monazomicina, son moléculas que tiene baja selectividad, catalizan el transporte de 10^7 partículas/segundo y no se ven afectados por cambios en la fluidez de la membrana.

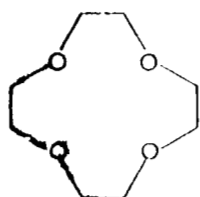
Por su parte, los ionóforos o acarreadores móviles son altamente selectivos pero más lentos, ya que catalizan el transporte de ≈ 1000 iones/segundo, y modifican su funcionamiento por alteraciones en la fluidez membranal o por la temperatura. Ejemplos de ellos son los poliéteres naturales como la valinomicina y bovericina, poliéteres carboxílicos como la nigericina, monencina y dianemicina, y los poliéteres macrocíclicos o corona.

1.5 POLIETERES CORONA

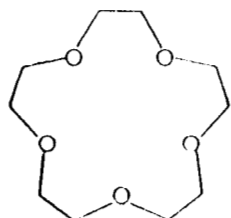
Los poliéteres corona, sintetizados por C.J. Pedersen en 1967, son compuestos denominados macroheterociclos, con enlaces tipo

éter, que se caracterizan por tener una estructura cíclica bidimensional (figura 3). El tamaño de la cavidad del anillo depende del número de unidades: $O-CH_2-CH_2$, presentes. Los átomos de oxígeno (que se pueden sustituir por S, N, P) se encuentran orientados hacia el interior dándole a la cavidad un carácter hidrofílico, lo que hace posible que exista una interacción con cationes metálicos, que depende directamente del tamaño de la cavidad y del radio iónico del catión (Pedersen, 1967, 1968, 1988). La cadena hidrocarbonada del anillo, está dirigida hacia afuera, lo que le confiere una cubierta hidrófoba que aísla al catión acompañado y le permite extraerlo de un medio acuoso o solubilizarlo en solventes orgánicos (Blanco-Gomis, et. al. 1988). Se sabe que pueden clatrar no sólo a cationes mono y divalentes, sino también a metales pesados y de transición (Koshima y Onishi, 1986; Kazem y Shamsipur, 1991); así como solubilizar en solventes no acuosos a polinucleótidos (Odell, 1985) e incluso componentes de la cadena respiratoria como el citocromo c (Odell y Earlam, 1985). Gracias a estas características se les ha utilizado en química orgánica y analítica para la extracción iónica selectiva en solventes orgánicos, separación por métodos cromatográficos, espectroscópicos y de cristalización fraccional, técnicas selectivas de electrodos iónicos, procedimientos electroanalíticos, etc (Weber, 1984). En bioquímica se han usado para el transporte de cationes en membranas mitocondriales (Lardy, 1968) y modelo (Tosteson, 1968; Wong, et. al. 1974), semejando a los sistemas de transporte naturales (Pressman, 1968; Eisenman, 1973). Sin embargo,

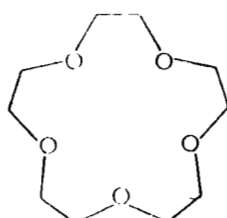
FIGURA 3: Poliéteres corona usados en este trabajo



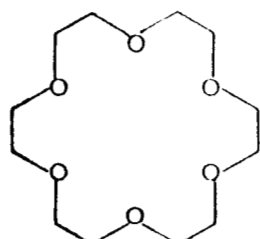
12-CORONA-4
12C4



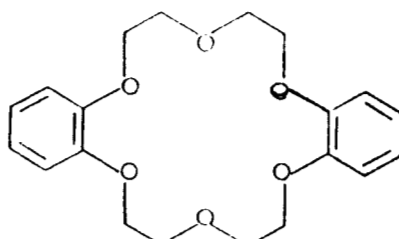
15-CORONA-5
15C5



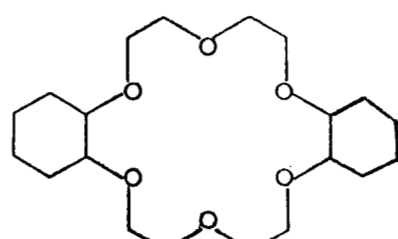
BENZO-15-CORONA-5
B15C5



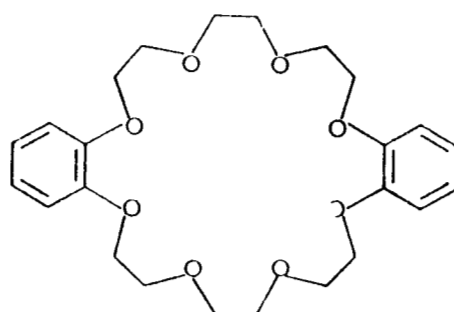
18-CORONA-6
18C6



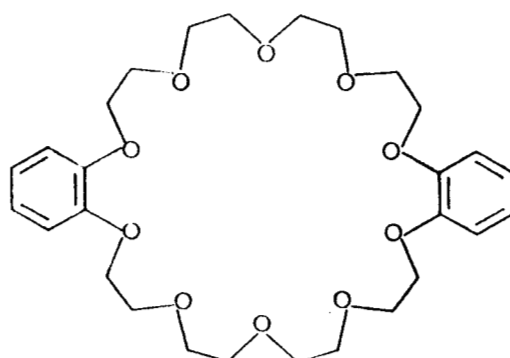
DIBENZO-18-CORONA-6
DB18C6



DICICLOHEXANO-18-CORONA
DC18C6



DIBENZO-24-CORONA-8
DB24C8



DIBENZO-30-CORONA 10

se ha encontrado que el poliéter DB18C6 inhibe específicamente el transporte de electrones en la cadena oxidativa mitocondrial, a nivel del sitio I de acoplamiento (Estrada-O y Cárabez, 1972; Estrada-O y Gómez-Lojero, 1976; Cárabez y Sandoval, 1981).

2. OBJETIVO GENERAL

Detectar la existencia de sitios de transporte de electrones capaces de ser inhibidos por poliéteres macrocíclicos en dos tipos de membranas transductoras de energía: un sistema fotosintético y uno heterótrofo.

2.1 OBJETIVOS PARTICULARES

a) Determinar cuales poliéteres (análogos moleculares del DB18C6) inhiben la cadena oxidativa mitocondrial, y analizar la existencia de una posible relación estructura-actividad.

b) En el caso de los poliéteres que presenten inhibición determinar su sitio de acción.

c) Probar si los poliéteres que inhiben en la cadena respiratoria mitocondrial, inhiben también en la cadena fotosintética de cloroplasto.

d) En el caso de los poliéteres que presenten inhibición determinar su sitio de acción.

3. HIPOTESIS

El DB18C6 es un poliéter macrocíclico que inhibe la cadena de transporte de electrones mitocondrial en el sitio I de acoplamiento. Puesto que las membranas transductoras de energía poseen centros fierro-azufre como grupos prostéticos y se ha encontrado que el DB18C6 es capaz de formar complejos con fierro *in vitro*. Como el

complejo I mitocondrial es un sitio rico en centros fierro-azufre, se ha propuesto que el efecto del poliéter se deba a una interacción con alguno de estos fierros.

Con base en el conocimiento de que todas las membranas transductoras de energía tienen metales como grupos prostéticos, se asume que en otros sistemas transportadores de electrones, distintos al mitocondrial, deben existir sitios metálicos susceptibles de ser inhibidos por poliéteres macrocíclicos.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 REACTIVOS

REACTIVO	FORMULA	PM	MARCA
Acetona	$(\text{CH}_3)_2\text{CO}$	58.08	Baker
Acetato de amonio	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	77.08	Merck
Acido acético glacial	CH_3COOH	60.05	Merck
Acido ascórbico	Vitamina C	198.1	Sigma
Acido cítrico	$\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	210.14	Baker
Acido clorhídrico	HCl	36.5	Baker
Acido desoxicólico		392.6	Sigma
Acido fosfórico	H_3PO_4	98	Baker
Acido L-glutámico		147.13	Sigma
Acido málico		134.1	Sigma
Acido pícrico (2,4,6-trinitrofenol)		229.11	
Acido Succínico	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$	118.1	Merck
Adenosine 5' diphosphate (sal de sodio)		460	Sigma
Albúmina sérica bovina			Sigma
Azida de sodio	NaN_3	65.02	Sigma
Azul de Coomassie B15C5	$\text{C}_{14}\text{O}_5\text{H}_{26}$	180.21	Aldrich
Carbonato de sodio	Na_2CO_3	106.0	Sigma
α -cetogluturato		146.1	

(ácido libre)			
Cianuro de potasio	KCN	49.01	Baker
Cloruro de amonio	NH ₄ Cl	53.49	
Cloruro de calcio	CaCl ₂	110.99	Baker
Cloruro de magnesio hidratado	MgCl ₂ .6H ₂ O	203.3	Merck
Cloruro de manganeso hidratado	MnCl ₂ .4H ₂ O	197.92	Merck
Cloruro de potasio	KCl	74.56	Merck
Cloruro de sodio	NaCl	58.44	Merck
12C4	C ₈ O ₄ H ₁₆	176.21	Aldrich
15C5	C ₁₀ O ₅ H ₂₀	220.27	Aldrich
18C6	C ₁₂ O ₆ H ₂₄	264.32	Aldrich
DB18C6	C ₂₀ O ₆ H ₂₄	360.4	Aldrich
DB24C8	C ₂₄ O ₈ H ₃₂	448.52	Aldrich
DB30C10	C ₂₈ O ₁₀ H ₄₀	536.63	Aldrich
DBH	C ₁₉ H ₃₀ O ₄	332.4	Sigma
(Decilubiquinona)			
DCPIP			British
(Diclorofenolindofenol)			Drug House
DC18C6	C ₂₀ O ₆ H ₄₄	372.5	Aldrich
Dicloroetano	C ₂ H ₅ Cl ₂	100	Baker
Diclorometano	CH ₂ Cl ₂	84.94	Baker
DMFA	HCON(CH ₃) ₂	73.10	Baker
(Dimetilformamida)			
DMSO		78.13	Sigma
(Dimetilsulfóxido)			
DSS		288.33	Bio-Rad
(Dodecil sulfato de sodio)			
Ditionita de sodio	Na ₂ S ₂ O ₄	174.11	Merck

EDTA	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	292.24	Sigma
(Etilendiamino ácido tetraacético)			
EGTA	$C_{14}H_{24}N_2O_{10}$	336.2	Sigma
(Etilenglicol bis(β -aminoetileter) N,N,N',N' -ácido tetraacético)			
Etanol	C_2H_5OH	46.06	Baker
Ferricianuro de potasio		380.4	Téc. Q.
FCCP		254	Dupont
(Carbonilcianida trifluorometoxifenil hidrazona)			
Folín-Ciocalteu	Lote:1111F-5103		Sigma
Fosfatidil colina		732	
Fosfato monobásico de potasio	KH_2PO_4	136.1	Sigma
Fosfato dibásico de potasio	K_2HPO_4	174.2	Sigma
Fosfato monobásico de sodio	NaH_2PO_4	120.0	
			Mallinckrodt
Fosfato dibásico de sodio	Na_2HPO_4	141.96	
			Mallinckrodt
Glicerol	$C_3H_5(OH)_3$	92.10	Baker
β -Hidroxitirato		126.1	
(sal de sodio)			
Hepes		238.3	Sigma
Histidina			
Hidróxido de amonio	NH_4OH	35.04	Baker
Hidróxido de potasio	KOH	56.11	Baker
Hidróxido de sodio	NaOH	40	Baker
Manitol	$C_6H_{14}O_6$	182.17	Merck
Metanol	CH_3OH	32.04	Baker
Metil viológeno		257.2	SERVA
NAD+		663.4	Sigma

NADH		709.4	Sigma
NADP+		765.4	Sigma
(sal de sodio)			
Nigericina		725.0	Sigma
Nitrógeno	N ₂	28	
Persulfato de amonio		228.20	Bio-Rad
Pirofosfato de sodio	Na ₄ P ₂ O ₇ ·10H ₂ O	446.06	
		Mallinckrodt	
Piruvato		110.0	Sigma
(ácido libre)			
Rotenona		394.4	Sigma
Sacarosa		342.3	Merck
Sorbitol		182.2	Sigma
Sulfato de amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	132	Baker
Sulfato cúprico	CuSO ₄ ·5H ₂ O	249.68	Baker
Tartrato de sodio y potasio	C ₄ H ₄ O ₆ KNa·4H ₂ O	282.32	Merck
TEA		149.19	Merck
(Trietanolamina)			
TEMED		116.21	Bio-Rad
(N,N,N'-Tetrametiletilendiamina)			
TRIS	C ₄ H ₁₁ NO ₃	121.1	Merck
(Trizma base)			
Tricina		179.2	Merck
Ubiquinona 1			
Ubiquinona 10			
Valinomicina		1111.4	Sigma

4.2 CLOROPLASTO

4.2.1 AISLAMIENTO DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA TIPO "C" (Membrana externa rota)

(Reeves, S.G. y Hall, D.O. 1980)

AMORTIGUADORES O MEDIOS

Amortiguador I: sorbitol 0.33M, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10mM, MgCl_2 4mM, ácido ascórbico 2mM, pH 6.5 con HCl

Amortiguador II: sorbitol 0.5M, EDTA 2mM, MgCl_2 1mM, MnCl_2 mM, hepes 50mM, pH 7.6 con NaOH

AISLAMIENTO

- 1) Se pesan 60g de hojas de espinaca a las cuales se les quitaron previamente todas la inervaciones
- 2) Se lavan y se cortan en tiras de $\approx 5\text{mm}$
- 3) Se depositan en 300ml de amortiguador I con consistencia de nieve derretida y se homogenizan, en una licuadora, dos o tres veces en pulsos de un segundo
- 4) Se filtra (exprimiendo) a través de dos capas de gasa
- 5) Se vuelve a filtrar a través de 8 capas de gasa
- 6) Se centrifuga a 8,000 rpm en un rotor SS54 o equivalente, por 5 segundos, i.e. cuando la centrifuga alcanza la velocidad deseada, se cuentan 5 seg y se detiene, se deja que se detenga con el freno.
- 7) Se descarta el sobrenadante, y la capa superior de la pastilla, (que parece como un halo) se resuspende muy suavemente con un pincel en 2ml de amortiguador II.

NOTA: TODO EL PROCEDIMIENTO DEBE REALIZARSE LO MAS RAPIDO POSIBLE MANTENIENDO UNA TEMPERATURA DE 4°C

4.2.2 CUANTIFICACION DE CLOROFILA

- 1) Se prepara una solución de 0.075ml de suspensión de cloroplastos en 10ml de acetona al 80%
- 2) La solución anterior se filtra
- 3) En un espectrofotómetro Shimadzu o similar se hace un barrido de 400-700nm; o se lee directamente a una longitud de onda de 665nm
- 4) Se cuantifica la concentración de clorofila usando su coeficiente de extinción molar a 665nm que es de $80,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Arnon, 1949) y un peso molecular de 893.51

4.2.3 FORMACION DEL COMPLEJO 18C6-PIC-K+

(Pedersen, C.J. 1967)

- 1) Se agregan a un tubo de ensaye 10ml de ácido pícrico $1 \times 10^{-4} \text{M}$ disuelto en una solución de KOH a la misma concentración, y 10ml de 18C6 en diclorometano también a $1 \times 10^{-4} \text{M}$, en la parte superior del tubo queda la fase acuosa amarilla del picrato de potasio y en la parte inferior la fase orgánica con el poliéter
- 2) Se agita vigorosamente por algunos minutos
- 3) Se elimina la fase acuosa que ahora es incolora ya que al formarse el complejo poliéter-potasio, el picrato se mantiene unido al potasio como contraión y ambos se solubilizan en el solvente orgánico dándole una coloración amarilla.
- 4) Se obtiene el espectro de absorción en un rango de 200-500nm de la fase orgánica. Esto con el fin de calcular la concentración del complejo, con base en el coeficiente de extinción molar del picrato en agua a 375nm que es de $13,790 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Pedersen, 1968). Ya que el complejo se encuentra en una estequiometría de 1:1:1

5) Se evapora a sequedad con una corriente de nitrógeno

6) Se lleva a la concentración deseada con DMFA

4.2.4 FOTORREDUCCION DE NADP+

(Biggins, J. y Mathis, P. 1988)

1) Se midió espectrofotométricamente a 360nm con un DW AMINCO UV/VIS equipado con fuente de tungsteno-halógeno para iluminación de la muestra. A una velocidad de 2.5cm/100 seg y una escala de D.O. de 0.5

2) Doscientos microgramos de suspensión de cloroplastos se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos sin iluminación directa, en un volumen final de 5ml que contenía Tricina de sodio 50mM pH 7.6, MgCl₂ 10mM, ascorbato de sodio 2mM, sacarosa 100mM, diclorofenolindofenol (DCPIP) 30μM, NADP+ 1mM, 10μg de ferredoxina y NH₄Cl 5mM. A este medio se le agregó una concentración variable desde 10⁻⁶ hasta 10⁻⁴ M de poliéter, complejo poliéter-picrato- K⁺ o picrato solo.

3) Pasado el tiempo de incubación se separó el medio en dos celdas que contenían 2.5ml cada una. (Una celda fue la muestra y otra el blanco)

4) Se iluminó un minuto y se tomó el registro por otro minuto. Esto se repitió unas cinco o seis veces.

5) Para cuantificar la cantidad de NADPH producido se usó el coeficiente de extinción molar del NADPH que es 6mM⁻¹cm⁻¹ (Ellefson y Krogman, 1979) y se reporta como μmolas de NADPH/mg de clorofila/hora

4.2.5 CONSUMO DE OXIGENO (REACCION DE MEHLER)

1) Doscientos microgramos de suspensión de cloroplastos se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos sin iluminación, en un volumen final de 5ml que contenía MgCl₂ 5mM, sacarosa 100mM, Hepes 50mM y KCl 10mM (pH 7.5). Antes de iniciar la incubación se le agregó una concentración variable desde 10⁻⁶ hasta 10⁻⁴ M de poliéter, complejo poliéter-picrato- K⁺ o picrato solo.

2) Se cuantificó el consumo de oxígeno por medio de un electrodo tipo Clark bañado con una solución saturada de KCl y aislado del medio por una membrana YSI tipo estándar. El electrodo se colocó en una cámara con agitación constante, expuesta a la luz de una lámpara de tungsteno.

3) El medio de reacción en el cual se midió el consumo de oxígeno contenía, además de lo anterior, 10mM de azida de sodio, para inhibir a las catalasas presentes en el cloroplasto, y 100μM de metil viológeno como mediador auto-oxidable de electrones.

222878

4.3 MITOCONDRIAS

4.3.1 AISLAMIENTOS:

4.3.1.1 AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS DE HIGADO DE RATA

Método de Johnson, D. y Lardy, H.A. (1967) modificado por Salvador Uribe (comunicación personal).

1) Se utilizan ratas macho cepa Wistar de $\approx 200\text{g}$ de peso, se sacrifican desnucándolas, se extrae el hígado y se deposita en $\approx 30\text{ml}$ de solución de sacarosa 70mM , manitol 220mM , hepes 5mM , EDTA 1mM , pH 7.4 ; se pesa el hígado en el vaso con la solución previamente tarados.

2) Se lava el hígado, con la misma solución anterior, para eliminar los coágulos de sangre y se corta en pedazos finos con tijeras.

3) Se homogeniza con un homogenizador potter embden de 50ml y taladro manual, para destruir conexiones intracelulares y membranas plasmáticas

4) Se centrifuga a $2,500\text{ rpm}$ por 10 minutos en un rotor SS34 (o su equivalente) para separar células enteras, tejido intacto y núcleos. Se desecha la pastilla.

5) El sobrenadante se centrifuga a $7,500\text{ rpm}$ por 10 minutos. A diferencia del método original de Lardy donde se centrifuga dos veces a $12,500\text{ rpm}$, 15 minutos.

6) Se descarta el nuevo sobrenadante que contiene fragmentos de membranas, ribosomas, lisosomas, etc.

7) Las paredes del tubo se limpian con una gasa o papel de baño para quitar la grasa. La pastilla se resuspende utilizando un

tubo de ensaye, el cual se ha llenado previamente de hielo para mantenerlo frío. Esto se hace con mucho cuidado, en un medio de sacarosa 70mM, manitol 220mM, HEPES 5mM, pH 7.4

8) Se vuelve a centrifugar una vez más a 7,500 rpm (rotor SS34) por 10 minutos para lavar, y se descarta el sobrenadante. (Centrifugación no incluida en el método de Lardy).

9) La pastilla se vuelve a resuspender de igual manera en el mismo medio y se centrifuga a 9,500 rpm (rotor SS34) por otros 10 minutos para sedimentar a las mitocondrias (centrifugación no incluida en el método de Lardy). Se descarta el sobrenadante.

10) Finalmente la pastilla se resuspende en un medio de sacarosa 70mM, manitol 220mM, HEPES 5mM, 0.1% de albúmina desgrasada, pH 7.4 ; (0.2ml por gramo de peso de tejido original). La albúmina adsorbe ácidos grasos y previene su efecto desacoplante.

NOTA: TODO EL PROCEDIMIENTO DEBE LLEVARSE A CABO A 4°C, DE MANERA QUE LAS SOLUCIONES DEBEN ESTAR PREVIAMENTE A ESTA TEMPERATURA.

4.3.1.2 AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS DE CORAZON DE BOVINO

(Löw y Valin, 1963))

1) Un día antes se limpian y se cortan todos los ligamentos y grasa de los corazones frescos del día y se separa la carne por peso, máximo 2.5 kg. (Se puede guardar a -70°C por más días)

2) Se muele la carne con un molino de carne.

3) Se pesan paquetes de 400g.

4) Por cada 400g de carne se agregan 1200ml de amortiguador I (sacarosa 250mM, Tris-HCl 5mM, EDTA 2mM, pH 7.5) enfriado a 4°C.

5) Se ajusta a pH 7.5 con Tris saturado a cada vaso con amortiguador y carne. Para medir el pH se utilizan tiras reactivas.

6) Se muele en la licuadora (el contenido de cada vaso por separado), en pulsos de 5 segundos con 5 segundos de descanso hasta completar 6 pulsos.

7) Se vuelve a ajustar a pH 7.5 con Tris saturado

NOTA: TODO LO ANTERIOR SE LLEVA A CABO EN EL CUARTO FRIO (4°C)

8) Se centrifuga a 3,000 rpm por 10 minutos en un rotor GS-3 Sorvall.

9) El precipitado se desecha y el sobrenadante se filtra a través de una doble capa de gasa.

10) Se centrifuga a 10,000 rpm por 10 minutos en un rotor de 250ml GS-A.

11) Se descarta el sobrenadante y se resuspende la pastilla en amortiguador II (sacarosa 250mM, tris-HCl 5mM, pH 7.5)

12) Se homogeniza

13) Se centrifuga por 10 minutos a 3,000 rpm para eliminar la miosina que queda en la pastilla.

14) El sobrenadante se vuelve a centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos en un rotor GS-A.

15) Se desecha el sobrenadante con mucho cuidado y en la pastilla se recuperan las mitocondrias.

16) Se pueden guardar a -70°C.

4.3.1.3 OBTENCION DE PARTICULAS SUBMITOCONDRIALES (PSM) A PARTIR DE MITOCONDRIAS DE CORAZON DE BOVINO

(Loyter, et. al. 1969)

- 1) Se cuantifican la cantidad de proteína de la muestra mitocondrial por la técnica de biuret.
- 2) Se resuspenden las mitocondrias hasta una concentración de 20 mg de proteína/ml con amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7.4.
- 3) Cada 50 ml de suspensión se sonicán 5 pulsos de 45 segundos por 15 segundos de descanso, en un baño de hielo.
- 4) Se centrifuga a 15,000 rpm por 15 minutos en un rotor 60Ti.
- 5) Se descarta la pastilla y el sobrenadante se vuelve a centrifugar a 45,000 rpm por 45 minutos en un rotor 60Ti.
- 6) En el precipitado se encuentran las PSM, se resuspenden en el mismo amortiguador y
- 7) Se pueden guardar a -70°C .

4.3.1.4 AISLAMIENTO DE FRACCION RB4 (COMPLEJO I-III) MITOCONDRIAL (Rieske, 1967)

Partiendo de mitocondrias de corazón de res:

- 1) La suspensión de mitocondrias se diluye con un amortiguador de Tris-sacarosa-histidina (TSH) hasta alcanzar una relación final de 23mg de proteína/ml.
- 2) Se añade desoxicolato de potasio al 10% (pH 9.0), hasta llegar a una nueva relación de 0.3mg/mg de proteína.
- 3) Se añade KCl sólido a una concentración de 74.6 gr/l.
- 4) Se centrifuga en un rotor 60 Ti enfriado a una temperatura de 4°C , por 16 minutos a 45,000 rpm (este procedimiento se conoce como separación roja-verde).

5) El precipitado se resuspende en amortiguador TSH y se congela para una purificación posterior de la citocromo oxidasa.

6) Se mide el volumen del sobrenadante rojo y se le añaden 0.25 volúmenes de agua fría.

7) Se centrifuga en un rotor 60 Ti por 16 minutos a 45,000 rpm a una temperatura de 4°C y se descarta el precipitado.

8) El sobrenadante se dializa contra 8 volúmenes de Tris-HCl 10mM pH 8 durante 3 horas.

9) Se centrifuga en un rotor 60 Ti enfriado a 4°C por 45 minutos a 45,000 rpm.

10) Se resuspende el precipitado en amortiguador TSH. (A esta fracción se le llama precipitado S1).

11) Se cuantifica la concentración de proteína obtenida en la fracción S1 y se diluye a una concentración final de 10 mg/ml

12) Se añade desoxicolato de potasio al 10% hasta llegar a una relación de 0.5mg/mg de proteína.

13) Se añade solución de acetato de amonio al 50% de saturación necesaria para obtener una relación de 16.5 ml por cada 100 ml

14) Se deja reposar por 15 minutos a 0°C.

15) Se centrifuga en un rotor 60 Ti por 16 minutos a 45,000 rpm con una temperatura de 4°C.

16) Se mide el volumen del sobrenadante y se añade solución de acetato de amonio al 50% de saturación, esta vez solamente hasta 6 ml por cada 100 ml.

17) Se deja reposar 15 a 0°C .

18) Se vuelve a centrifugar en un rotor 60Ti frío por 16 minutos a 45,000 rpm.

19) De nuevo se mide el volumen del sobrenadante y se agrega

solución de acetato de amonio al 50% de saturación hasta alcanzar una relación de 3.2 ml por cada 100 ml.

20) Se deja reposar 15 a 0°C y se vuelve a centrifugar igual que en los casos anteriores.

21) El precipitado que se obtiene es la fracción RB4 que se utiliza para aislar el complejo I. Se puede guardar a -70°C.

4.3.1.5 AISLAMIENTO DE COMPLEJO I MITOCONDRIAL (NADH:UBIQUINOL OXIDO-REDUCTASA, E.C. 1.6.5.3.) DE CORAZON DE BOVINO

(Hatefi, Y. y Rieske, 1967)

Partiendo de fracción RB4 (complejo I-III):

1) Se homogeniza y se ajusta a una concentración de proteína de 10 mg/ml en TSH (Tris-sacarosa-histidina), cuantificada previamente por el método de biuret.

2) Se agrega el volumen necesario de una solución 20% p/v de colato de potasio hasta alcanzar una relación final de 0.4 mg de colato/mg de proteína (biuret).

3) Se agrega gota a gota sulfato de amonio saturado frío (neutralizado), hasta alcanzar una concentración de 39% de saturación (0.65 ml/ml de suspensión de proteína). Lo anterior se realiza con agitación con barra magnética y en un baño de hielo.

4) Se deja en hielo durante 15 minutos.

5) Se centrifuga a 45,000 rpm por 15 minutos en un rotor 60Ti

6) Se decanta el sobrenadante (que contiene el complejo III o ubiquinol:citocromo c oxido-reductasa).

7) El residuo se resuspende en amortiguador TSH.

8) Se ajusta a una concentración de proteína de 10 mg/ml en TSH

(biuret).

9) Se agrega gota a gota y con agitación en baño de hielo, sulfato de amonio saturado frío (0.56 ml/ml de solución).

10) Se deja en hielo durante 15 minutos.

11) Se centrifuga por 15 minutos a 45,000 rpm en un rotor 60Ti.

12) Se descarta el sobrenadante.

13) El precipitado, de color verde amarillento, que ya es el complejo I. Se resuspende en TSH.

14) Se cuantifica la proteína ahora por el método de Lowry

15) Se puede guardar a -70°C .

NOTA: TODO EL PROCEDIMIENTO DEBE LLEVARSE A CABO A 4°C .

4.3.1.6 EXTRACCION DE GLUTAMATO DESHIDROGENASA DE LAS MITOCONDRIAS DE HIGADO DE LA RATA

1) Se someten las mitocondrias a un choque hipotónico con agua fría destilada. (La dilución de mitocondrias en agua helada usada fue de 1:30 v/v)

2) Se dejan incubar a 4°C durante una hora.

3) Se centrifugan a 10,000 rpm en un rotor SS34 o su equivalente.

4) Se recupera el sobrenadante con las enzimas solubles de la matriz mitocondrial.

5) Se mide la actividad (ver más adelante).

4.3.2 CUANTIFICACION DE PROTEINA

4.3.2.1 METODO DE BIURET

(Gornall, et. al. 1949)(Jacobs, et. al. 1956)

En condiciones alcalinas el cobre se une al nitrógeno

peptídico de proteínas y péptidos para producir un color púrpura con una absorción máxima a 540-560nm (Shell y Shell, 1967). No se ha encontrado interferencia de aminoácidos libres y hay poca dependencia de la composición de la cadena de aminoácidos ya que el reactivo de cobre reacciona con la cadena peptídica misma y no con los grupos laterales. Su sensibilidad es relativamente baja y se encuentra en un rango de 1-8 mg proteína /ml.

REACTIVOS

1) Desoxicolato de sodio al 5% en NaOH 0.1N

2) Reactivo de biuret:

1.5g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

6g de tartrato de sodio y potasio

300ml de KOH al 10%

Llevado a 1 litro con agua bidestilada previamente deaerada por ebullición y enfriada.

TECNICA

1) A 0.02ml de muestra mitocondrial se le adicionan 0.2ml de la sol. de desoxicolato de sodio, se agita vigorosamente.

2) En seguida se añade 1.5ml de reactivo de niuret y 1.28 ml de agua, se agita vigorosamente y se deja incubar a 37°C durante 15 minutos.

3) Se lee a 540nm.

Los estándares se preparan de la misma manera usando ASB en lugar de la muestra proteica con concentraciones de 1-8 mg/ml y variando el agua según sea el caso.

4.3.2.2 METODO DE LOWRY (Lowry, 1951)

Esta técnica está basada en una primera instancia en la

reacción del cobre en álcali, igual que la de biuret, y además en la reacción de reducción ácida del fosfomolibdico-fosfotugstíco (Folín-Ciocalteau) por medio de la oxidación de los aminoácidos aromáticos catalizada por cobre.

Aunque la reacción alcalina del cobre en esta técnica y la reacción de biuret parecen estar relacionadas, no son estrictamente proporcionales. Con el método de Lowry una pequeña cantidad de cobre es suficiente para dar un máximo de color, mientras que en la técnica de biuret (Mehl, et. al. 1949) un átomo de cobre está unido a 4 residuos aminoácidos. Por ello, la sensibilidad del método de Lowry es bastante mayor que la de biuret y se encuentra en un rango de 0.1 a 1 mg de proteína/ml. Sin embargo, este tipo de reacción sufre una ligera variación en respuesta a la composición proteica y, además, algunas sustancias, que pueden ser tan diversas como derivados de aminoácidos, detergentes, amortiguadores, drogas, lípidos, azúcares y sales entre otros, interfieren con el procedimiento por lo cual, aún y cuando su sensibilidad sea alta, no es la técnica de elección en todos los procedimientos bioquímicos .

REACTIVOS

- 1) Solución de ASB (albúmina sérica de bovino) 1mg/ml
- 2) Solución de DSS (dodecil sulfato de sodio) al 20%
- 3) Solución A: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% en agua

Solución B: tartrato doble de sodio y potasio al 2% en agua

Solución C: Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1N

Solución D: 1 volumen de sol. A + 1 volumen de sol. B, agitar

Solución E: 50 volúmenes de sol. C + 1 volumen de sol. D, agitar y proteger de la luz. Este reactivo debe ser fresco y

dura \approx 24 hrs.

4) Folín diluído 1:1 con H₂O, proteger de la luz.

TECNICA DE CALIBRACION DE PROTEINAS

1) Se agregan alícuotas de 10 μ l de ASB equivalente a una concentración de 10 μ g/ml (en tubos previamente numerados), aumentando el volumen de 10 en 10 hasta llegar a 100 μ l, lo que equivale a 100 μ g/ml. Dejando un tubo sin ASB que servirá como blanco.

2) Se llevan los tubos a un volumen final de 0.5ml con agua, i.e. se agregan 0.5ml al tubo sin ASB, 0.49ml al que tiene 10 μ l de ASB y así progresivamente hasta llegar al tubo con 100 μ l al que se le agregan 0.4ml de agua.

3) Se agregan 1.5ml de DSS a cada tubo, se agita vigorosamente y se deja reposar 10 minutos.

4) Se agregan 5ml de sol. E, se agita vigorosamente y se deja reposar 10 minutos.

5) Se adicionan 0.5ml de reactivo de Folín, se agita vigorosamente y se deja reposar 30 minutos.

6) Se lee a 750nm.

PARA LA MUESTRA

Los tubos problema se preparan al mismo tiempo y de igual manera que los anteriores; únicamente varía en que se ponen 5 ó 10 μ l de la muestra problema en lugar de ASB con 0.495 y 0.49ml de agua respectivamente.

222878

4.3.3 CONSUMO DE OXIGENO

4.3.3.1 EN LA FRACCION MITOCONDRIAL DEL HIGADO DE LA RATA

(Estabrook, 1967)

1) Se cuantificó el consumo de oxígeno en un electrodo tipo Clark (igual que el utilizado en los experimentos de cloroplastos), en un medio que contenía sacarosa 230mM, TEA o HEPES 10mM, fosfatos 5mM, ≈ 1.5 mg/ml (Lowry) de suspensión de mitocondrias en un volumen final de 3ml, todo esto a pH 7.4.

2) Se midió el control respiratorio (CR) y la relación P/O agregando glutamato 5mM como sustrato y $83\mu\text{M}$ de ADP .

$$\text{CR} = \frac{\text{Velocidad de consumo de oxígeno de estado III}}{\text{Velocidad de consumo de oxígeno de estado IV}}$$

$$\text{P/O} = \frac{\text{Moléculas de ADP}}{\text{Atomo gramo de oxígeno}} \quad \text{(Teóricamente se producen 3 ATP por cada átomo de oxígeno que se consume)}$$

El cálculo anterior se hizo para apreciar que tan acopladas se encontraban las mitocondrias.

3) Para los experimentos con los poliéteres se utilizó un segundo control agregando 5mM de glutamato como sustrato y una concentración alta de ADP (1mM), suficiente para que las mitocondrias agotaran todo el oxígeno presente en el medio. (De manera que lo que se observaba en la gráfica era una línea recta, que servía como control si es que llegaba a manifestarse algún cambio de pendiente producido por uno de los poliéteres).

4) Una vez obtenidos los controles previos se procedió a probar el efecto de los ocho poliéteres agregando una concentración de 10^{-4} M del poliéter problema al medio de reacción mencionado en

el inciso 1, al que se le denominó medio sin catión.

5) Cuando se utilizó el medio con potasio y el medio con litio con 5mM de KCl y LiCl respectivamente, se disminuyó la concentración de sacarosa a 220mM para ajustar a la misma osmolaridad.

4.3.3.2 EN PSM DE CORAZON DE BOVINO

1) Se midió el consumo de oxígeno en PSM siguiendo el mismo procedimiento descrito para las mitocondrias intactas, con la excepción de que se omitió el cálculo del control respiratorio.

2) El medio de reacción utilizado fue sacarosa 230mM, TEA 10mM (pH 7.4), suspensión de PSM 1mg/ml y el agua necesaria para llegar a 3ml. Como sustrato se utilizó únicamente NADH 0.5mM

3) Los experimentos se llevaron a cabo en dos condiciones: aa primera fue en ausencia de catión alcalino, y la segunda en presencia de 5mM de KCl

4.3.3.3 ESTIMULACION DEL CONSUMO DE OXIGENO POR VALINOMICINA EN LA FRACCION MITOCONDRIAL

1) El medio de reacción a un pH de 7.4 contenía sacarosa 225mM, HEPES 5mM, fosafatos 5mM, KCl 10mM, glutamato de potasio 20mM, suspensión de mitocondrias \approx 1.5mg/ml en un volúmen final de 3ml. La concentración de KCl y glutamato de potasio se varió y se descontó de la concentración de sacarosa.

2) El consumo de oxígeno empieza cuando se agrega al medio la valinomicina necesaria para obtener una concentración de 1 μ g/ml

3) Estos experimentos se hicieron únicamente con el poliéter 15C5 en una concentración de 1.6mM; el cual se agregó al medio

de reacción.

4.3.4 ACTIVIDAD DEL COMPLEJO I (E.C. 1.6.5.3)

(Hatefi, Y. 1978)

1) Se midió la oxidación de NADH utilizando UQ₁ o DBH como aceptores finales de electrones, en un espectrofotómetro de doble longitud de onda: DW AMINCO UV/VIS, a 340nm con una absorbancia de 0.5 unidades de D.O. y una velocidad de barrido de 1.5 cm/seg

2) El medio de reacción contenía amortiguador de fosfatos 20mM pH 8, azida de sodio 2mM, NADH 150 μ M disuelto en Tris, UQ₁ 11.5 μ M o 1.15 μ M y agua para completar 2ml. Después de incubar un par de minutos hasta alcanzar la temperatura de 38°C se le agregó 0.3mM de fosfatidilcolina en amortiguador de fosfatos (pH 8.0), colato 2% y se dejó equilibrar otros cuantos minutos más. Posteriormente se le agregó la enzima y se midió la oxidación del NADH.

3) La actividad específica se expresó como μ moles de NADH/min/mg de proteína; y se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{Absorbancia a 340nm}}{t} \times \frac{1}{\text{mg enzima}} \times \frac{1}{6.22} \times 2$$

tomando en cuenta que $\epsilon_{\text{NADH}} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Ragan, et. al. 1987) y la celda tenía un volúmen de 2ml.

4) Se incubó a la enzima con la solución 20mM de fosfatidilcolina en colato al 2% por toda la noche \approx 18 hrs, a 4°C, con el fin de activar a la enzima.

5) Se incubaron $8\mu\text{l}$ de enzima con $152\mu\text{l}$ de fosfolípidos, lo que corresponde a una dilución 1:20 en volumen con una relación de concentraciones es de 1:6 mg de proteína/mg de lípidos.

6) Los experimentos con DB18C6 incluyeron 0.1mM de poliéter en el medio de reacción.

4.3.5 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE DSS (Schägger, et. al. 1986)

SOLUCIONES

- 1) Amortiguador para el ánodo (abajo): Tris HCl 0.2M, pH 8.9
- 2) Amortiguador para el cátodo (arriba): Tris 0.1, Tricina 0.1, SDS 0.1%
- 3) Amortiguador electroforético: Tris 3M, HCl 1M, SDS 3%, acrilamida 30%, bis-acrilamida 0.983%
- 4) Gel de separación al 16%: que se prepara agregando 16ml de acrilamida-bis-acrilamida, 10ml de amortiguador electroforético, 4ml de glicerol 79.5% v/v, agitar. Ya que se va a usar se agregan $100\mu\text{l}$ de persulfato y $10\mu\text{l}$ de TEMED, agentes que catalizan la polimerización de la acrilamida
- 5) Gel de condensación de la muestra al 4%: se prepara agregando 1.6ml de la mezcla acrilamida-bis-acrilamida, 3ml de amortiguador electroforético, 7.4ml de agua, y se agita. Ya que se va a usar se agregan $100\mu\text{l}$ de persulfato y $10\mu\text{l}$ de TEMED.
- 6) Solución fijadora: metanol 50%-ácido acético 10%
- 7) Solución teñidora: azul de Coomassie 0.1%-ácido acético 10%
- 8) Solución desteñidora: ácido acético 10%

4.3.6 ACTIVIDAD DE GLUTAMATO DESHIDROGENASA (E.C. 1.4.1.2-4)

(Strecker, H.J. 1955)

1) Se midió la oxidación de glutamato por aumento en la D.O. a 340nm debida a la aparición de NADH, a una velocidad del papel de 2.5cm/50 seg y una sensibilidad de 0.5 unidades de D.O. En un espectrofotómetro DW-AMINCO UV/VIS.

2) El medio de reacción utilizado contenía, en un volumen final de 3ml, 0.1mM de NAD⁺, 2.75ml de suspensión enzimática y 0.05M de amortiguador (fosfatos, pirofosfato o Tris, ya que según el experimento se variaba el pH: 7.6, 8.0 y 7.0)

3) La reacción se iniciaba con la adición de glutamato, variando la concentración de 2 a 30mM.

4) Se utilizaron tres amortiguadores diferentes, para observar la reacción a tres pHs distintos: amortiguador de fosfatos pH 7.6, amortiguador de pirofosfato pH 8.0 y Tris pH 7.0

5) Los experimentos con el poliéter 15C5, contenían 1.6mM de éste en el medio.

6) La actividad enzimática se obtuvo con cálculos basados en el coeficiente de extinción molar del NADH, $\epsilon_{\text{NADH}} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Ragan, et. al. 1987)

4.3.7 HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL

4.3.7.1 HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL NO ENERGIZADO

Estos experimentos se llevaron a cabo en mitocondrias de hígado de rata y se utilizaron para medir indirectamente el transporte de glutamato. Se probaron diferentes pHs y diferentes concentraciones de fosfato

a) HINCHAMIENTO A DIFERENTES pHs:

1) El medio de reacción (volumen final de 3ml) contenía glutamato de amonio 135mM, HEPES 5mM, suspensión de mitocondrias \approx 1.5 mg/ml.

2) El pH se fue variando desde 6.8 hasta 8.0 y se ajustó con HCl y KOH según fuera necesario.

3) La reacción se inició agregando fosfato de amonio 10mM final.

4) El hinchamiento se midió como la disminución en la absorción a 615nm.

b) DIFERENTE CONCENTRACION DE FOSFATO

1) Estos experimentos se realizaron con el mismo medio de reacción anterior. Sin embargo, para mantener la osmolaridad se fue aumentando la concentración de glutamato de amonio en 3 mmolas por cada 2 mmolas que disminuía la de fosfato.

2) El hinchamiento se probó en dos series de experimentos, una a pH ácido de 6.8 y otra a pH alcalino de 8.0

3) La reacción de nuevo se inició agregando fosfato de amonio pero se varió la concentración de 2 a 10mM.

4) Estos experimentos se repitieron con 1.6mM de poliéter que se agregaba previamente al medio de reacción.

5) El hinchamiento se midió como cambio en la absorción a 615nm.

4.3.7.2 HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL ENERGIZADO

a) CON GLUTAMATO COMO SUSTRATO

En este caso se utilizó valinomicina para transportar potasio y glutamato como sustrato para energizar a la mitocondria. El anión permeante también fue glutamato.

1) El medio de reacción contenía en un volumen final de 3ml:

sacarosa 220mM, KCl 10mM, glutamato de potasio 20mM, fosfato de amonio 5mM, HEPES 5mM y suspensión de mitocondrias \approx 1.5 mg/ml.

2) La concentración de glutamato se varió de 2 a 20mM conservando siempre 30mM de potasio en el medio, por lo que la concentración de KCl cambiaba en función de la de glutamato de la siguiente manera: KCl 10mM, K-glut 20mM; KCl 20mM, K-glut 10mM; KCl 25mM, K-glut 5mM; KCl 28mM, K-glut 2mM.

3) El hinchamiento se iniciaba al agregar valinomicina $1\mu\text{g/ml}$

4) En los experimentos con el 15C5, se agregaba 1.6mM de poliéter al medio de reacción junto con los demás reactivos

5) La velocidad del hinchamiento se cuantificaba midiendo la pendiente (D.O./min) a 615nm, que se interpretó como la velocidad de entrada de glutamato.

b) CON SUCCINATO COMO SUSTRATO

Se realizaron los experimentos de igual manera que los mencionados arriba, con la salvedad de que se utilizó succinato en lugar de glutamato de potasio, como sustrato y anión permeante.

5. RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTOS CON CLOROPLASTOS

Para observar el efecto de cada uno de los ocho poliéteres corona sobre la cadena de transporte de electrones fotosintética, se decidió analizar de manera separada algunas de las reacciones parciales que en ella se llevan a cabo.

5.1.2 FOTORREDUCCION DE NADP+

Primero se estudió el efecto sobre el centro de reacción del FSI en el cual se encuentran tres centros Fe-S tetranucleares, (F_x , F_A , F_B), y otro binuclear, en la ferredoxina soluble (Golbeck, J.H. & Bryant, D.A. 1991; Cramer, W.A. 1991). Los

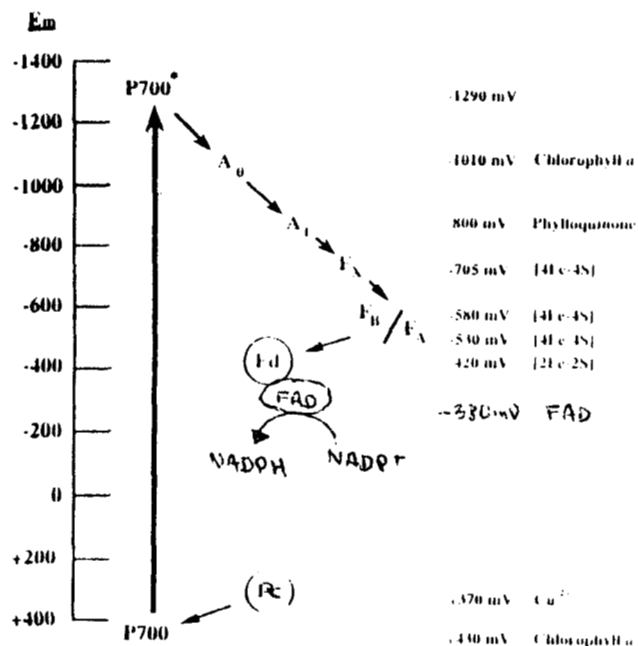


FIGURA 4: Potenciales redox de los componentes del FSI, (Golbeck y Bryant, 1991)

poliéteres podrían interactuar con alguno de estos centros fierro-azufre e inhibir el transporte de electrones a este nivel. Para ello se cuantificó la fotorreducción del NADP⁺ a 360 nm en cloroplastos aislados de espinaca (ver metodología).

Se utilizó al ascorbato como donador de electrones y al DCPIP como mediador de ellos, ya que gracias a su potencial redox menor al de la PC, dona electrones directamente a ésta o al centro de reacción del FSI. Por lo que el efecto que se observó fue únicamente sobre el FSI (figura 4)

Los cloroplastos empleados en nuestros experimentos fueron cloroplastos tipo C (Reev, y Hall, 1980), i.e. cloroplastos cuya membrana externa se encuentra rota, así que se les agregó

SISTEMA	VELOCIDAD DE REDUCCION (umol/mg chl/h)
COMPLETO	9.770
SIN DCPIP	1.248
SIN ASCORBATO	4.368
SIN FERREDOXINA	4.368
SIN CLOROPLASTOS	0.0

TABLA 1: Requerimientos para medir la fotorreducción de NADP⁺: El medio de reacción completo contenía tricina de sodio 50mM pH 7.6, MgCl₂ 10mM, ascorbato de sodio 2mM, DCPIP 30μM, NADP⁺ 1mM, NH₄Cl 5mM, 200μg/ml de clorofila y 10μg/ml de ferredoxina, en un volumen de 5ml, que se dividió en dos celdas idénticas de 2.5ml cada una.

ferredoxina exógena para poder llevar a cabo el ensayo. Además de que se requiere de los reactivos presentes en la tabla 1 para poder cuantificar la fotorreducción de NADP^+ , según el método de Biggins y Mathis (1988). En esta tabla se muestra como disminuye la velocidad de reducción del NADP^+ cuando alguno de ellos se encuentra ausente. La concentración de poliéter utilizada (10^{-4} M), se basó en la concentración óptima utilizada para observar un efecto inhibitorio del DB18C6 sobre la respiración mitocondrial (Estrada-O, S. y Cárabez, A. 1972).

Los resultados de los experimentos con ocho poliéteres se muestran en la tabla 2 donde se presenta la velocidad de

POLIETER (1×10^{-4} M)	VELOCIDAD DE REDUCCION DE NADP^+ umol/mg chl/h	CAMBIO en porciento
—	9.984	0.0
12C4	10.604	-6.2
15C5	9.984	0.0
B15C5	9.984	0.0
18C6	9.048	9.4
DC18C6	9.360	6.2
DB18C6	11.232	-12.5
DB24C8	8.736	12.5
DB30C10	9.948	0.0

222878

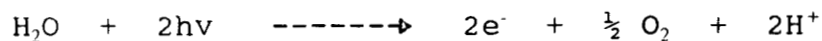
TABLA 2: Velocidad de Fotorreducción de NADP^+ en presencia de distintos poliéteres corona. El medio de reacción está indicado en la tabla 1. La concentración de poliéter empleada fue de 1×10^{-4} M, disuelto en DMFA.

reducción del NADP+ en $\mu\text{moles/mg}$ de clorofila/hora y el porcentaje de cambio. Este parámetro indica la diferencia de la velocidad de fotorreducción en porcentaje con respecto al control. Los valores positivos indican inhibición y los valores negativos estimulación. Como puede verse, en la mayoría de los casos el porcentaje de cambio es nulo, o los valores, tanto positivos como negativos son muy bajos, lo que probablemente se deba sólo a variaciones de un experimento a otro.

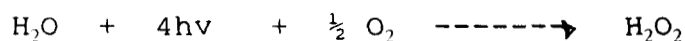
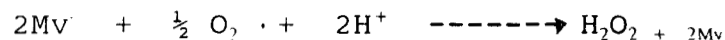
5.1.3 REACCION DE MEHLER

Una vez terminados los experimentos sobre el centro de reacción del FSI, quedaba por estudiar el efecto de los poliéteres sobre el resto de la cadena, específicamente sobre los fierros que se encuentran formando parte del Fe-S de Rieske en el complejo b_6f , y el fierro del centro de reacción del FSII (figura 1). Para lo cual se cuantificó el consumo de oxígeno en la reacción de Mehler usando metil viológeno como mediador auto-oxidable de electrones como se muestra en la siguiente reacción:

FSII

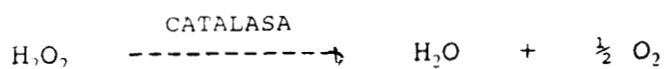


FSI



Es importante agregar azida de sodio a la preparación para

inhibir a la catalasa presente en el cloroplasto, de otra forma no se observaría consumo de O₂:



La tabla 3 presenta los resultados obtenidos con ocho poliéteres a tres concentraciones distintas (de 10⁻⁶ hasta 10⁻⁴M). En ella se observa que no hay ninguna diferencia en las velocidades de los consumos de oxígeno por parte de ningún

VELOCIDAD DE CONSUMO DE O₂
(umol/mg chl/h)

POLIETER	1x10 ⁻⁶ M	1x10 ⁻⁵ M	1x10 ⁻⁴ M
12C4	29.52	31.74	30.35
15C5	26.73	22.97	25.90
18C6	30.91	33.42	31.74
DC18C6	34.53	33.42	33.97
DB18C6	28.12	25.62	26.73
DB30C10	31.19	31.74	32.30
---		29.99	
B15C5	11.91	12.14	12.25
DB24C8	12.92	12.58	13.36
---		12.04	

TABLA 3: Efecto de los poliéteres corona sobre la reacción de Mehler en cloroplastos. El medio de reacción contenía: MgCl₂ 5mM, KCl 10mM, sacarosa 100mM, Hepes pH 7.5 50mM, metil viológeno 100μM, azida de sodio 10mM, 200μg/ml de clorofila, en un volumen de 5ml.

poliéter comparándolos con el control. De hecho, tampoco se encuentran diferencias entre los valores de las tres concentraciones de un mismo poliéter.

Mientras se llevaban a cabo los experimentos anteriores, apareció en la literatura un artículo donde Sabat, S.C. y colaboradores (1991) reportaban el efecto inhibitorio del poliéter 18C6 sobre la actividad transportadora de electrones en membranas tilacoidales de espinaca (beet spinach). Sabat indica en su artículo que la inhibición del poliéter se realiza de manera específica sobre el FSII; sin embargo recalca, que este efecto se manifiesta únicamente cuando el poliéter se encuentra formando complejo con picrato de potasio, en una relación estequiométrica de 1:1:1. Y que dicho efecto no se presenta utilizando poliéter o picrato de manera independiente. Se decidió corroborar los datos reportados por Sabat y colaboradores probando tanto el efecto del complejo, como el del picrato y 18C6 por separado.

Para formar el complejo 18C6-picrato-K⁺ se utilizó la técnica de Pedersen, (1967) (que se describe de manera más amplia en la metodología), utilizándose concentraciones de 10⁻⁴M de cada uno de los componentes.

Los experimentos demostraron una disminución en el consumo de O₂ tanto en los cloroplastos incubados con el complejo como con el picrato solo, no así en el caso de los tratados con el 18C6 en donde el consumo de O₂ se mantuvo como el control (figura 5).

Siguiendo con nuestro diseño experimental, se procedió a probar el efecto de los ocho poliéteres de estudio en presencia

y ausencia de picrato para ver si de esta manera se encontraba algún efecto. Como el tiempo de incubación del complejo o del

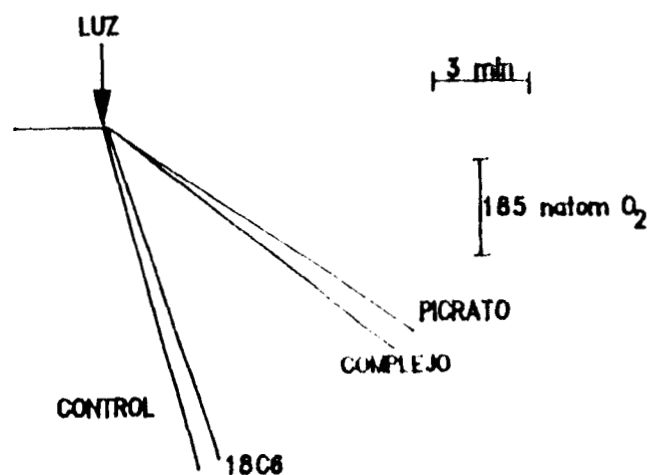


FIGURA 5: Consumo de O₂ en cloroplastos incubados con 10⁻⁴M de picrato, complejo pic-18C6-K⁺, o poliéter 18C6 respectivamente. El medio de reacción contenía: MgCl₂ 5mM, KCl 10mM, sacarosa 100mM, Hepes pH 7.5 50mM, metil viológeno 100μM, Azida de sodio 10mM, 200μg/ml de clorofila, en un volumen de 5ml.

poliéter solo con la suspensión de cloroplastos era bastante prolongado, se pensó que no sería necesario formar previamente el complejo de cada poliéter con picrato y potasio, sino que bastaría con agregar la concentración deseada de poliéter y picrato de potasio al medio de incubación para observar el efecto deseado. Esta suposición fue corroborada experimentalmente, por lo que en lo sucesivo se llevó a cabo de esta manera. En la tabla

4 se presentan los datos obtenidos con los ocho poliéteres a las tres concentraciones ensayadas. La concentración de picrato utilizada en estos experimentos fue de 10^{-6} M. Los resultados

	VELOCIDAD DE	CONSUMO DE O ₂	
		(umol/mg chl/h)	
PICRATO	1×10^{-6} M	1×10^{-6} M	1×10^{-6} M
POLIETER	1×10^{-6} M	1×10^{-5} M	1×10^{-4} M
12C4	30.91	31.19	31.74
15C5	26.73	26.73	24.50
18C6	40.10	41.78	41.78
DC18C6	30.07	30.91	31.74
DB18C6	26.17	26.45	27.57
DB30C10	32.30	32.30	32.02
—		31.20	
B15C5	11.80	12.47	12.03
DB24C8	11.58	11.14	11.36
—		11.42	

TABLA 4: Efecto de los poliéteres corona con picrato sobre la reacción de Mehler en cloroplastos. El medio de reacción es idéntico al reportado para la figura 4. La concentración de poliéter varió desde 10^{-6} hasta 10^{-4} M, mientras que la de picrato fue siempre de 10^{-6} M.

indican que tampoco en este caso se observa inhibición por parte de ningún poliéter, sin embargo, al aumentar la concentración de picrato, en los experimentos control de picrato sólo, se encontró un efecto inhibitorio que aumentaba al incrementar la concentración de mismo hasta alcanzar 80% de inhibición con 10^{-4} M

de picrato, como se muestra en la tabla 5. Este fenómeno se tratará más ampliamente en la discusión.

PICRATO	VELOCIDAD DE CONSUMO DE O ₂ ($\mu\text{mol}/\text{mg chl}/\text{h}$)	INHIBICION en porcentaje
—	41.40	—
$1 \times 10^{-6}\text{M}$	40.10	3.14
$1 \times 10^{-5}\text{M}$	22.56	45.52
$1 \times 10^{-4}\text{M}$	7.52	81.84

TABLA 5: Efecto del picrato sobre la reacción de Mehler en cloroplastos. Las condiciones están dadas para la figura 4. En estos experimentos no se utilizó poliéter en ningún caso; la concentración de picrato varió de 10^{-6}M hasta 10^{-4}M .

5.2 EXPERIMENTOS CON MITOCONDRIAS

5.2.1 EXPERIMENTOS CON LA FRACCION MITOCONDRIAL

Los experimentos con mitocondrias se llevaron a cabo en dos sistemas de estudio:

- 1) Mitocondrias intactas, aisladas de hígado de rata (Johnson, D. y Lardy, H.A. 1967)
- 2) Partículas submitocondriales (PSM), aisladas a partir de mitocondrias de corazón de res (Loyter, 1969)

5.2.1.1 ESTUDIOS EN MITOCONDRIAS INTACTAS

Se probó el efecto de ocho poliéteres macrocíclicos sobre el consumo de oxígeno en mitocondrias energizadas con ADP 1mM y utilizando como sustrato oxidable 5mM de glutamato. Se probaron los poliéteres a una concentración de 10^{-4} M en tres condiciones distintas:

- 1) Sin catión alcalino
- 2) Con 5mM de KCl
- 3) Con 5mM de LiCl

Los motivos por los cuales se realizaron los experimentos es estas condiciones fueron los siguientes:

Cárabez y Sandoval (1981) reportaron que para que se lleve a cabo la inhibición es indispensable la presencia de un catión en el medio, específicamente potasio. También mencionan que al ir aumentando la concentración de potasio, disminuye la inhibición, y que tanto en ausencia de potasio, como en concentraciones superiores a los 75mM, no se observa ningún

efecto inhibitorio. La concentración con la cual reportaron la mayor inhibición fue de 5mM y fue la que se usó en nuestros experimentos.

Se decidió probar también con otro catión monovalente (Li+) para ver si el efecto del poliéter con el K+ era específico de este catión, o se debía a un efecto de fuerza iónica. Se escogió el litio, ya que este catión no forma complejos estables con el poliéter DB18C6 (Pedersen, 1968). Por último, el medio sin catión

% CAMBIO

POLIETER	SIN CATION	LiCl	KCl
12C4	0.00	-6.67	-12.50
15C5	89.50	87.49	82.49
B15C5	1.38	-13.30	-12.50
18C6	7.68	7.13	-9.68
DC18C6	23.89	27.27	-56.31
DB18C6	66.60	57.80	69.40
DB24C8	5.00	3.46	6.99
DB30C10	12.69	14.28	-57.15

TABLA 6: Efecto de los poliéteres macrocíclicos sobre la respiración mitocondrial.

El medio de reacción en el cual se midió el consumo de oxígeno fue de sacarosa 230mM, Hepes 10mM pH 7.4, fosfato 5mM, MgCl₂ 3mM, mitocondrias ≈ 1.5mg de proteína/ml en un volumen final de 3ml. La concentración de poliéter usada fue de 10⁻⁴M; en los experimentos donde se usó catión monovalente la concentración fue de 5mM. El sustrato que se utilizó fue 5mM de glutamato y se estimuló la respiración con 1mM de ADP.

también tiene como finalidad la de esclarecer si para realizar la inhibición se requiere que el poliéter se encuentre formando complejo con algún catión, o bien se encuentre libre en el medio y pueda repartirse a la membrana.

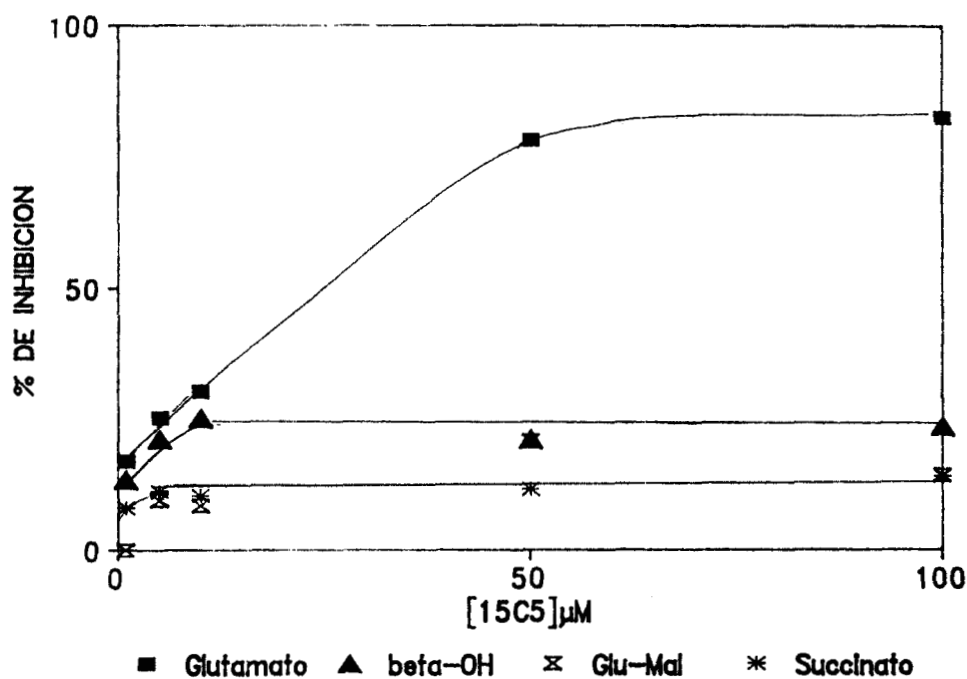
Los resultados (tabla 6) muestran que la inhibición que presenta el poliéter DB18C6 sobre el consumo de oxígeno es independiente de la presencia de catión en el medio, ya sea de litio o de potasio.

También puede observarse en esta tabla que el DC18C6 presenta una inhibición de alrededor del 25% en los experimentos sin catión y con litio, mientras que en presencia de potasio estimula el consumo de oxígeno en más del 50%. De igual manera se observa una estimulación del DB30C10 cuando existe potasio en el medio, sin embargo, los valores de inhibición en los experimentos sin catión o con litio son muy bajos. El resto de los poliéteres, exceptuando al 15C5 que se tratará más adelante, presentan valores bajos o nulos tanto de estimulación como de inhibición. Las diferencias que se observan están dentro de la variación de un experimento a otro, por lo que se concluye que no tienen efecto alguno sobre el consumo de oxígeno mitocondrial en estas condiciones. Es importante notar que ningún poliéter manifiesta efecto estimulador si no se encuentra presente catión en el medio. Todos los poliéteres que estimulan lo hacen en presencia de potasio, y los pequeños además lo hacen en presencia de litio. El hecho de que bajo ciertas condiciones experimentales, algunos poliéteres logren estimular la respiración, indica que la respiración alcanzada con la concentración utilizada de ADP (1mM), no era una respiración

máxima, ya que fue capaz todavía de estimularse.

Con el poliéter 15C5 se obtuvieron los valores más altos de inhibición (más del 80%), por lo que se decidió estudiar su efecto más a fondo. Se realizaron una serie de experimentos empleando diferentes sustratos de sitio I como son:

β -hidroxibutirato y glutamato-malato, así como succinato que es un sustrato de sitio II. Además se decidió estimular la respiración con un desacoplante: FCCP en lugar de con ADP y Pi.



222878

FIGURA 6: Efecto del 15C5 sobre el consumo de oxígeno mitocondrial estimulado por FCCP.

Las condiciones son idénticas a las descritas para la tabla 1, con la salvedad de que en lugar de usar ADP se usó FCCP a una concentración de 200nM, y no se utilizó ningún catión. La concentración de sustrato en todos los casos fue de 5mM.

En estos experimentos no se agregó catión al medio, ya que como se observa en la tabla 6, no se encontró diferencia en presencia o ausencia del mismo. Los resultados aparecen en la figura 6, donde se grafica el efecto inhibitorio (expresado en porcentaje),

contra diferentes concentraciones de poliéter. La inhibición del 15C5 en el consumo de oxígeno estimulado por FCCP se manifiesta de manera contundente sólo cuando se usa glutamato como sustrato. Si se grafican (figura 6a) los inversos del porcentaje de inhibición y de la concentración de poliéter a partir de 5mM, se obtiene una recta con un coeficiente de correlación de 0.96, y una Km en presencia de inhibidor de 13.33 μ M. La inhibición

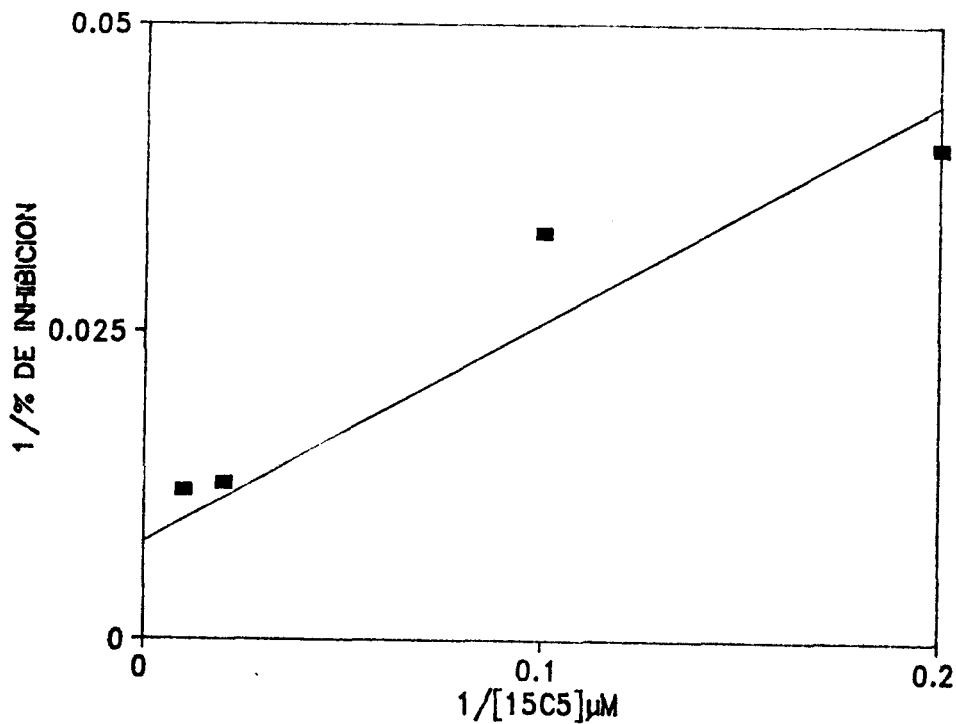


FIGURA 6a: Inverso del efecto del 15C5 sobre el consumo de oxígeno mitocondrial estimulado por FCCP.

Las condiciones experimentales son iguales a las descritas para las figuras anteriores.

máxima extrapolada es de 90.0%. Este efecto inhibitorio contrasta con los datos obtenidos usando los otros sustratos de sitio I y II que manifiesten valores de inhibición muy bajos o casi nulos.

Al preparar nuevas soluciones el efecto inhibitorio

observado sólo fue del 13% y no se logró reproducir la magnitud de los datos con el 15C5 a 10^{-4} M. Los resultados sobre el consumo

% CAMBIO

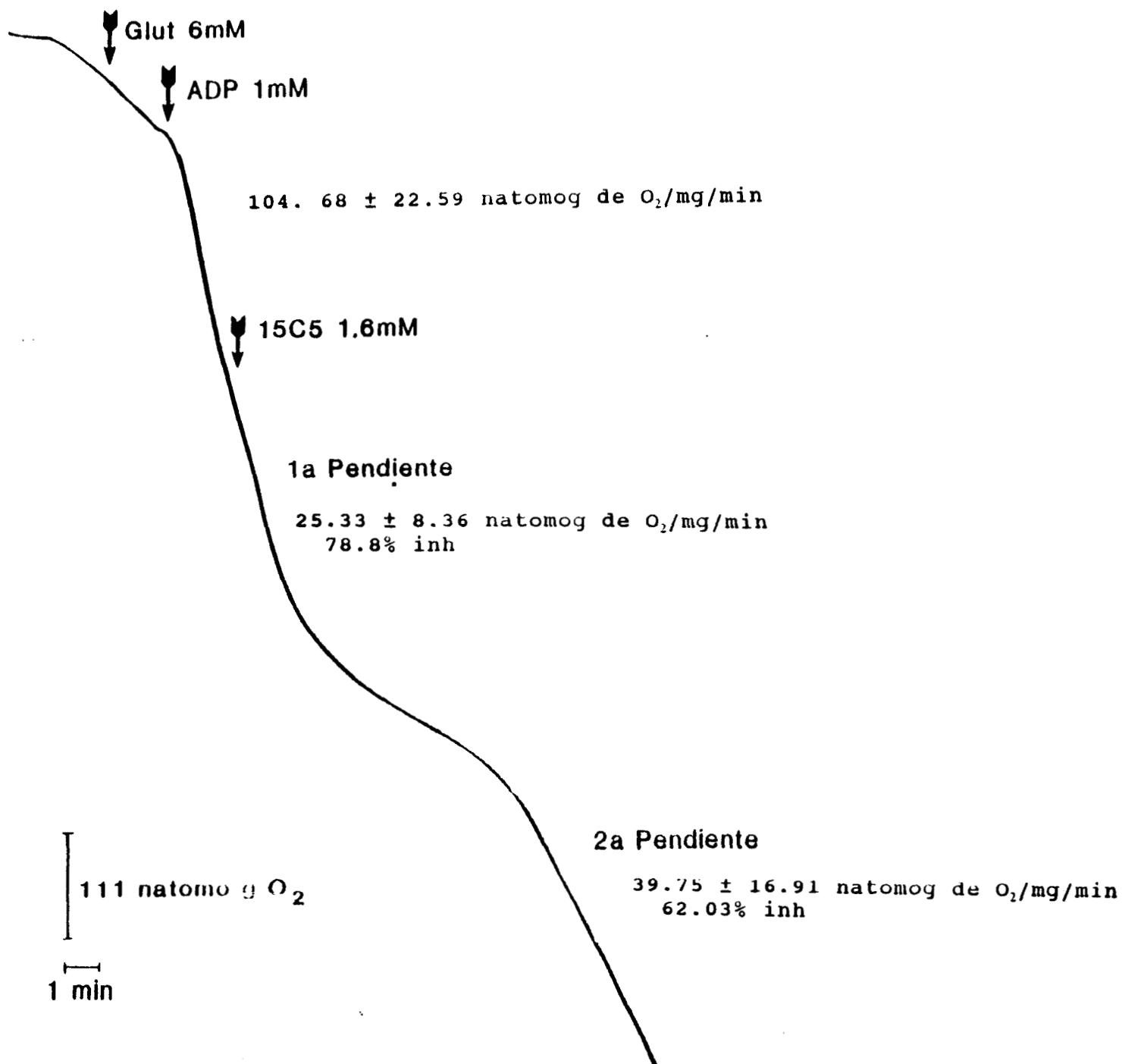
POLIÉTER	SIN CATION	LiCl	KCl
15C5	6.38	0.0	13.3

TABLA 7: Efecto de la nueva solución de poliéter 15C5 sobre el consumo de oxígeno mitocondrial. La concentración usada de 15C5 fue 10^{-4} M. Las condiciones experimentales son iguales a las de la tabla 6. de oxígeno mitocondrial, en las mismas condiciones experimentales de la tabla 6, obtenidos con esta nueva preparación se presentan en la tabla 7.

Pensamos que las inhibiciones que presentaba el poliéter en la solución inicial podían deberse a que la solución fuese una mezcla con algún otro poliéter o a que el solvente se hubiese evaporado y el 15C5 estuviese más concentrado, por lo que se decidió aumentar la concentración en experimentos subsecuentes.

Un trazo típico obtenido usando 1.6mM de la nueva solución de 15C5 se presenta en la figura 7; en ella puede verse una respiración inicial lenta obtenida al agregar el sustrato oxidable, que en esta caso fue glutamato, y que corresponde a lo que se conoce como estado IV. La respiración se acelera al agregar 1mM de ADP, (estado III). Al agregar 1.6 mM de poliéter se inhibe el consumo de oxígeno. La magnitud de la inhibición es transitoria, ya que pasado cierto tiempo se reestablece parcialmente la respiración. A la velocidad de consumo de oxígeno durante la primera fase de inhibición causada por el poliéter se

FIGURA 7: Efecto de 1.6 mM de 15C5 sobre el consumo de O₂ mitocondrial. El medio de reacción usado fue sacarosa 230mM, hepes 10mM pH 7.4, fosfato 5mM, MgCl₂ 3mM, ≈1.5 mg/ml de suspensión de mitocondrias en un volúmen final de 3ml. El sustrato utilizado fue 6mM de glutamato.



le ha denominado primera pendiente, y a la velocidad final de la respiración segunda pendiente. Este trazo es diferente a los obtenidos con la primera solución 15C5 utilizada, debido a que en ellos la inhibición era mucho más rápida y permanente. Aún y cuando se esperó bastante tiempo, nunca se observó un reestablecimiento de la respiración. Esto indica que la diferencia en los datos obtenidos con la primera y la segunda solución de 15C5 posiblemente no se debiera únicamente a un efecto de concentración ocasionado por la evaporación del solvente. Para confirmar lo anterior, se realizaron los experimentos aumentando la concentración desde 0.1mM, (concentración con la que se estudiaron todos los demás poliéteres), hasta 8mM, que fue la máxima concentración probada. En estos experimentos se usó siempre glutamato 5mM como sustrato.

CONCENTRACION DE 15C5	% DE INHIBICION
0.1 mM	6.82
0.5 mM	11.0
1.0 mM	29.16
1.6 mM	67.82
8.0 mM	87.5

Sustrato usado: 5mM de Glutamato

TABLA 8: Por ciento de inhibición de diferentes concentraciones de poliéter 15C5.

El medio de reacción contenía sacarosa 230mM, hepes 10mM, fosfatos 5mM, ≈1.5 mg/ml de suspensión de mitocondrias en un volumen final de 3ml, todo esto a pH 7.4. El sustrato utilizado fue glutamato a una concentración de 5mM, y la respiración se estimuló con ADP.

La tabla 8 presenta los resultados obtenidos encontrándose una inhibición significativa dependiente de la concentración de poliéter usada. Se necesitó llegar a concentraciones ochenta veces más altas que las iniciales para poder observar una inhibición similar a la obtenida con la primera solución. Tomando en cuenta que el poliéter 15C5 es líquido a temperatura ambiente ($\delta = 1.109$, índice de refracción = 1.47035), se da lugar a la siguiente conclusión: el volumen necesario utilizado para obtener una concentración de 8mM, donde se alcanzó una inhibición de más del 80%, fue de $5\mu\text{l}$ tomados directamente del poliéter comprado y $5\mu\text{l}$ es también el volumen que se empleó para obtener la concentración de 0.1mM utilizada en los experimentos de la

	sin 15C5	con 15C5	% de cambio
Glut-Mal	114.82 \pm 6.2	114.82 \pm 6.2	0.0
Succinato	124.55 \pm 3.7	124.55 \pm 3.7	0.0
B-OH	105.69 \pm 3.8	105.69 \pm 3.8	0.0
Glutamato	117.69 \pm 4.5	1) 24.21 \pm 8.4 2) 48.57 \pm 10.22	69 \pm 4.5 38.52 \pm 8.5

nanomolgO₂/mg/min

TABLA 9: Efecto de 1.6mM de 15C5 sobre el consumo de O₂ mitocondrial con diferentes sustratos.

El ensayo se llevó a cabo de igual manera que el que está descrito para los experimentos de la tabla 8. La concentración de cada sustrato utilizada en todos los casos fue de 5mM. Se presentan dos gráficas que corresponden a las dos pendientes observadas en los trazos de consumo de O₂.

tabla 1. De modo que si a lo largo del tiempo (aproximadamente 2 años) el solvente se hubiera evaporado, se habrían estado tomando $5\mu\text{l}$ de poliéter puro en lugar de diluido. Sin embargo esto no explicaría la presencia, en los nuevos experimentos, de 2 pendientes que aparecen de manera muy notoria usando 1.6mM y que se observan mucho menos a 8mM .

Los resultados presentados en la tabla 9 corresponden a los experimentos de consumo de oxígeno en presencia del 15C5, utilizando otros sustratos: de sitio I (glutamato-malato y $\beta\text{-OH}$ butirato) y de sitio II (succinato).

No se encontró efecto inhibitorio con otro sustrato que no fuera glutamato, (los dos valores que se observan para glutamato

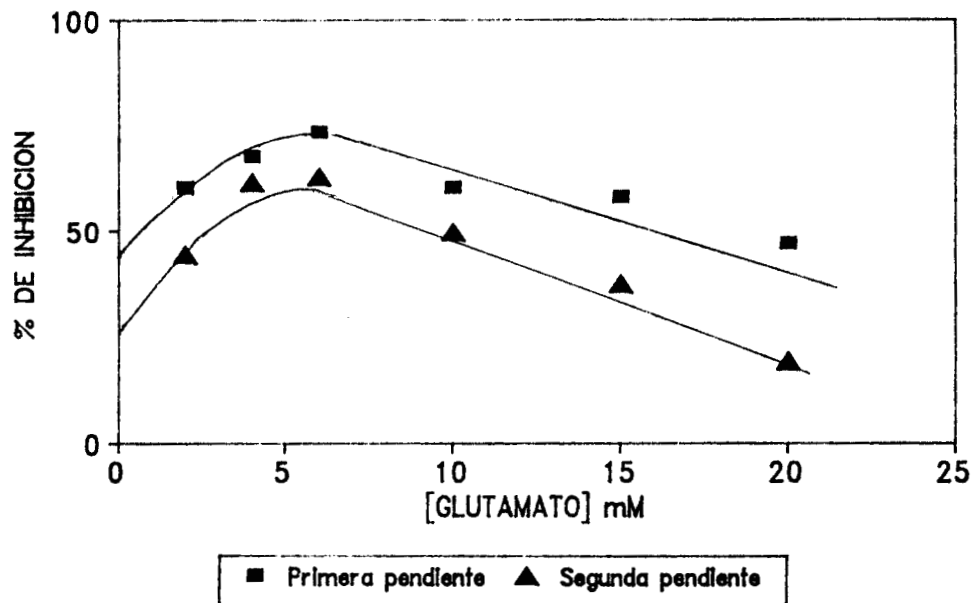


FIGURA 8: Efecto de diferentes concentraciones de glutamato sobre la inhibición en el consumo de O_2 mitocondrial en presencia de 1.6mM de 15C5.

Las condiciones experimentales están dadas en la tabla 8. La primera y segunda pendiente se refieren a la inhibición transitoria que se observa en la figura 7.

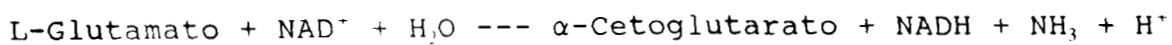
corresponden a las dos pendientes antes mencionadas). Este hecho nos llevó a concluir que el poliéter 15C5 no actúa sobre la cadena de transporte de electrones, como en el caso del DB18C6, sino que de alguna manera está relacionado con el transporte y/u oxidación del glutamato. Por lo tanto, se decidió probar el efecto del poliéter a diferentes concentraciones. En la figura 8 se grafica el porcentaje de inhibición contra la concentración de glutamato desde 2 hasta 20mM, observándose curvas bifásicas, que corresponden a la primera y segunda pendiente de la inhibición que se observa en el trazo del consumo de O₂. La primera parte de las curvas presenta una fase ascendente donde aumenta la inhibición al incrementarse la concentración. Al continuar agregando glutamato, no se observa una inhibición máxima, sino que se ve una fase descendente en la cual se va revirtiendo el efecto inhibitorio, de manera que a partir de alrededor de 6mM, al aumentar la concentración de glutamato disminuye la inhibición del poliéter.

En este punto de la investigación, se pensó que ya que el efecto no era a nivel de la cadena respiratoria, debía ser a nivel de la glutamato deshidrogenasa y/o sobre el transporte de glutamato. Los siguientes experimentos están dedicados a explorar esta interrogante.

5.2.1.2 GLUTAMATO DESHIDROGENASA LIBRE (GDH)

La enzima L-Glutamato Deshidrogenasa (EC 1.4.1.2-4) se encuentra en la matriz mitocondrial y es la responsable de llevar

a cabo la siguiente reacción:



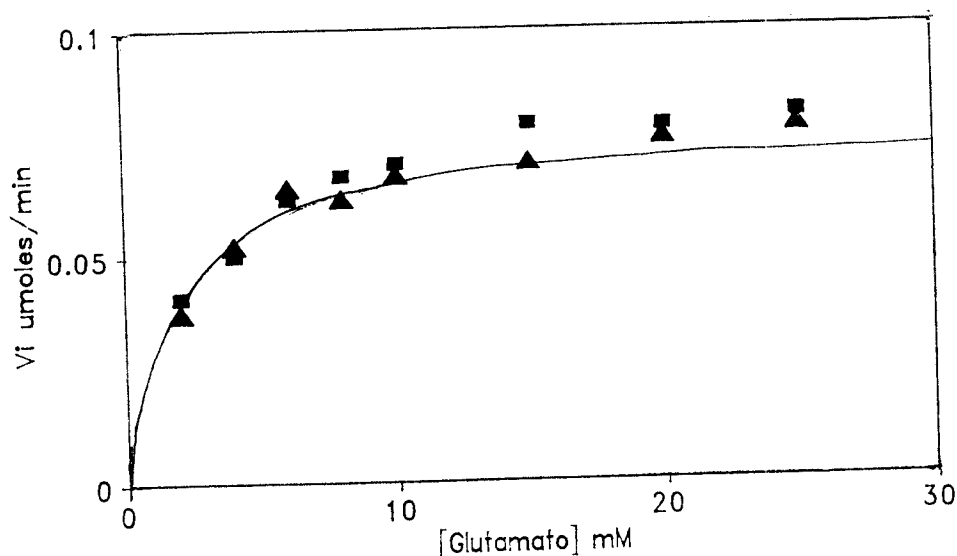
con una $K_{eq} = 1.8 \times 10^{13}$.

Se propuso que el poliéter era capaz de interactuar con el ión amonio que se puede formar en la reacción del amoniaco con un protón. Si la interacción se lleva a cabo mientras el amonio se encuentra dentro del sitio activo de la enzima, el complejo formado (enzima-NH₄⁺-15C5) no tendría capacidad catalítica. Esta consideración se hizo basada en el hecho que el ión amonio tiene un tamaño de radio iónico muy similar al del ión potasio*, con el cual se ha reportado que forma complejos (Gomis-Blanco, 1988). Además, se sabe que la selectividad por K⁺ y NH₄⁺ de varios antibióticos transportadores de cationes es similar (Gómez-Puyou y Gómez-Lojero 1977), aunque puede ser mayor por uno que por otro dependiendo del transportador v.gr. la valinomicina es más selectiva para potasio que para amonio (K⁺ > NH₄⁺) mientras que en los macrotetrálicos, como las actinas, sucede lo contrario (NH₄⁺ > K⁺). Por lo anterior es factible pensar que el poliéter 15C5, que forma complejos con el potasio, sea capaz de formarlos también con el amonio.

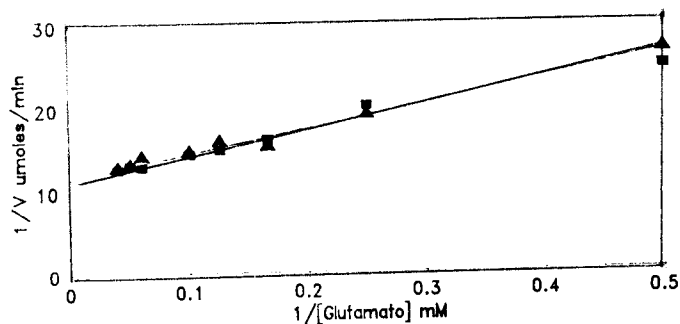
Para llevar a cabo los experimentos que esclarecieran lo anterior, se obtuvo la GDH a partir de mitocondrias de hígado de

* El radio iónico de Pauling para el K⁺ es de 1.33 Å y para el NH₄⁺ de 1.48 Å (Conway, 1981)

** La constante de formación (log K_f) del complejo 15C5-K⁺ en agua a 25°C es de: 0.74, mientras que en metanol es de: 3.34 (Blanco-Gomis, 1988)



■ SIN 15C5 ▲ CON 15C5



■ SIN 15C5 ▲ CON 15C5
 $r = 0.98$ $r = 0.99$
 $K_m = 2.81$ $K_m = 2.44$
 $V_{max} = 0.085$ $V_{max} = 0.084$

FIGURA 9: Cínctica enzimática y doble recíproca de la actividad de GDH libre y la concentración de glutamato en presencia y ausencia de 15C5, pH= 7.0

El medio de reacción utilizado contenía, en un volumen final de 3ml, 0.1mM de NAD⁺, 2.75ml de suspensión enzimática y 0.5M de Tris pH 7.0. La reacción se inició con la adición de glutamato, variando la concentración de 2 a 30mM. Los cuadrados indican los valores obtenidos sin 15C5 y los triángulos con 15C5. La concentración de poliéter fue de 1.6mM.

rata según la metodología antes descrita. La actividad enzimática se cuantificó midiendo la absorción a 340 nm del NADH (Strecker, H.J. 1955). Los experimentos se realizaron a tres pH distintos (dentro del rango de actividad de la enzima) para ver si la

disponibilidad del protón para formar el amonio evidenciaba algún efecto del poliéter. El medio de reacción contenía 50mM de amortiguador que variaba según el pH requerido: Tris (pH 7.0), pirofosfato (pH 8.0) y fosfatos (pH 7.6). En las figs. 9, 10 y 11 se muestran respectivamente los resultados obtenidos en un experimento típico a pH 7.0, pH 7.6 y pH 8.0; en las dos primeras se graficaron las cinéticas y los inversos de la velocidad en $\mu\text{moles}/\text{min}$ contra los inversos de la concentración de sustrato en mM. Los cuadrados indican los valores obtenidos en los experimentos sin poliéter, y los triángulos, los valores al agregar 1.6 mM de 15C5. Como puede verse no hay ninguna diferencia entre los puntos experimentales. Los valores de K_m y V_{max} están expresados en μM y μmoles de NADH/min, respectivamente. La máxima actividad se obtuvo al realizar los experimentos a pH 7.6 en un amortiguador de fosfatos (figura 10). En la figura 9, puede observarse de la gráfica y de los valores de K_m y V_{max} que en estas condiciones la enzima tiene un comportamiento tipo Michaelis-Menten, pero que en ellas no se encuentra ningún efecto por parte del poliéter. En la figura 10 no se observa diferencia entre la enzima tratada y la control. En la figura 11 es preferible observar la gráfica de la velocidad contra la concentración de sustrato, ya que en gráfica de las recíprocas los coeficientes de regresión son muy bajos, debido a que en dichas condiciones la enzima no depende de la concentración de sustrato empleado. Esto significaría que bajo las presentes condiciones la afinidad de la enzima por el glutamato es muy alta, y las concentraciones de glutamato usadas en el experimento (aún y cuando fueron las mismas que en las

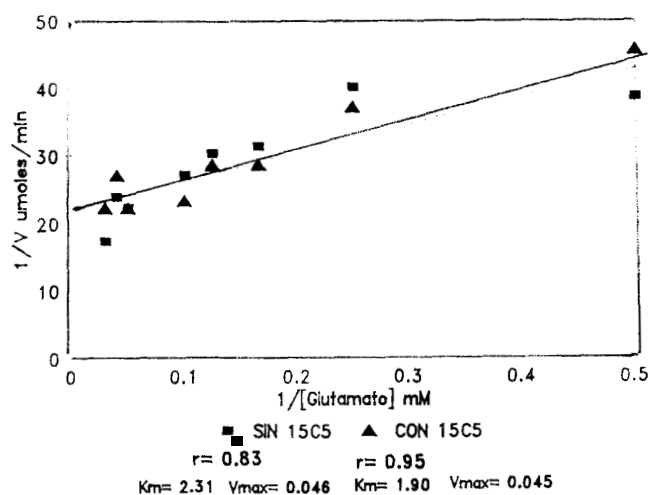
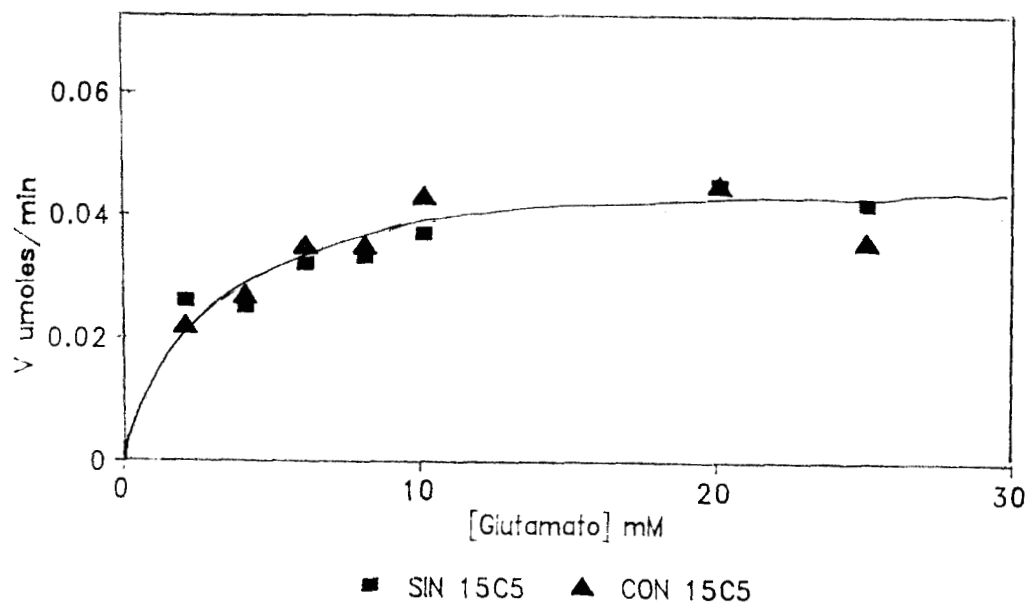


FIGURA 10: Doble recíproca de la actividad de GDH libre y la concentración de glutamato en presencia y ausencia de 15C5, pH = 7.6

El medio de reacción utilizado contenía, en un volumen final de 3ml, 0.1mM de NAD+, 2.75ml de suspensión enzimática y 0.5M de buffer de fosfatos pH 7.6. La reacción se inició con la adición de glutamato, variando la concentración de 2 a 30mM. Los cuadrados indican los valores obtenidos sin 15C5 y los triángulos con 1.6 mM de 15C5.

otras dos condiciones experimentales) están muy cerca del orden cero lo que no permite ver los valores de las velocidad iniciales y no se puede obtener el valor de Km, esto la hace imposible de

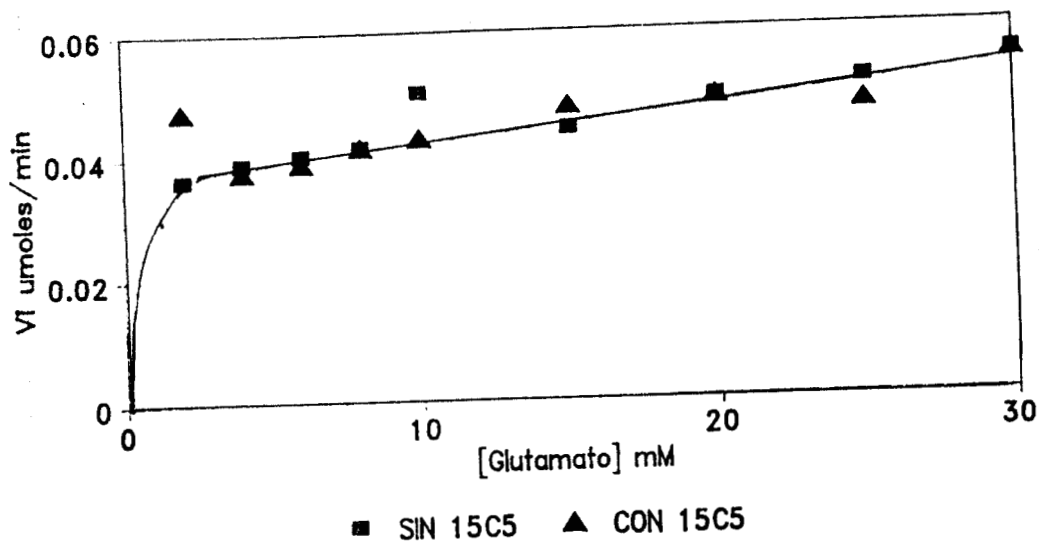


FIGURA 11: Cinética enzimática de la GDH libre en presencia y ausencia de 15C5, pH= 8.0

El medio de reacción y el ensayo se llevaron a cabo igual que los experimentos de las figuras 9 y 10, con la diferencia de que en este caso se usaron 0.5M de buffer de pirofosfato pH 8.0. De nuevo, los cuadrados indican los valores obtenidos sin 15C5 y los triángulos con 1.6mM de 15C5.

comparar con las otras condiciones. Por otra parte, con lo que respecta al poliéter no se observó ningún efecto de ningún tipo bajo estas condiciones.

En general, las actividades obtenidas en las tres condiciones presentan valores muy bajos, esto no es de extrañar si se observa el valor de la constante de equilibrio para la reacción en la cual se forma α -cetoglutarato y NADH a partir de glutamato y NAD⁺, lo cual indica que la reacción no se favorece en este sentido sino en el sentido inverso. Sin embargo, al pH al cual se realizaron los experimentos, la concentración de protones es tan pequeña ($\approx 1 \times 10^{-7}$) que la reacción bien puede desplazarse hacia la formación de α -cetoglutarato por la ley de acción de masas.

Los valores de Km y Vmax promedios de todos los experimentos realizados a pH 7.6 y pH 7.0, aparecen resumidos en la tabla 10. Nótese que es esta tabla, a diferencia de las figuras anteriores, la Km está dada en μ M y la Vmax en nmolas/min.

		SIN 15C5	CON 15C5
Buffer de fosfatos pH=7.6	Km	1.72 \pm 1.2	1.96 \pm 1.1
	Vmax	48.91 \pm 9.0	50.24 \pm 10.56
Tris pH=7.0	Km	2.74 \pm 0.61	2.94 \pm 0.007
	Vmax	91.9 \pm 8.05	86.05 \pm 2.75

Km= μ M

Vmax= nmolas/min

222878

TABLA 10: Comparación de los valores de Km y Vmax obtenidos de los experimentos mostrados en las figuras 9, 10 y 11; a diferentes pH, con o sin 15C5.

Los valores para pH 8.0 no se incluyeron debido a que las

concentraciones de glutamato usadas en esos experimentos fueron demasiado altas como para poder determinar la Km.

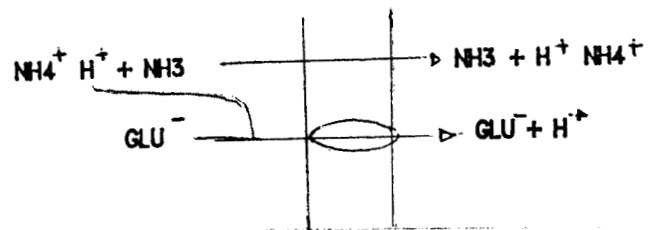
5.2.1.3 TRANSPORTE DE GLUTAMATO

El transporte de glutamato se estudió a través de los cambios de absorción debidos al hinchamiento mitocondrial en un sistema energizado y uno no energizado.

5.2.1.3.1 HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL NO ENERGIZADO

Para que se hinchen las mitocondrias se utilizan sales de amonio, (Chappell, 1968) en este caso el glutamato de amonio. El ión amonio se disocia en protón y amoníaco. El amoníaco difunde libremente a través de la membrana y una vez en el interior toma un protón para regenerar el amonio (esquema 1).

La fuerza impulsora para el transporte de amoníaco al interior de la mitocondria se debe a la diferencia de concentración que en ambos lados de la membrana. Al mismo tiempo, la reacción de NH_3 con protón en el interior, genera un ΔpH que sirve a su vez



Esquema 1: Mecanismo del transporte de glutamato facilitado por amoníaco.

como fuerza motriz para el transporte de glutamato.

El protón generado por la disociación del ion amonio, es utilizado por el acarreador específico de glutamato para transportarlo a través de la membrana, a favor de gradiente, con lo que se incrementa el número de partículas en el interior de

la mitocondria y se produce hinchamiento. Para que este último se manifieste, debe penetrar el par anión-cación.

Es importante aclarar que el medio debe ser totalmente isosmótico para que el hinchamiento que se observa sea debido únicamente al movimiento de las sustancias estudiadas y no por algún efecto de hipotonicidad. En estas condiciones, el hinchamiento mitocondrial pueda ser interpretado como entrada de glutamato.

El hinchamiento se midió por medio del cambio en la absorción a 615nm. Se escogió esta longitud de onda porque ningún componente de la membrana mitocondrial absorbe a esta longitud de onda: las flavinas absorben entre 410 y 420nm con coeficientes de extinción molar muy pequeños, mientras que la banda δ de los citocromos absorbe fuertemente entre 410 y 440nm. Además, los citocromos también absorben de 550 a 610nm en su banda α y de 520-540 en su banda β , (Nicholls, 1982).

Se ha reportado (Chappell, J.B. 1968; Chappell, J.B. y Haarthoff, K.N. 1967) que la presencia de fosfato facilita el transporte de glutamato, así como de otros aniones, por lo que se decidió utilizar fosfato en esta serie de experimentos. Tomando en cuenta estos antecedentes, los puntos en los que hay que poner atención en el momento de realizar los experimentos son los siguientes:

a) El pH, que determina la concentración del amoniaco y la disponibilidad del protón, y

b) La concentración de fosfato, que sea la adecuada para que el hinchamiento que se observe se pueda interpretar como movimiento de glutamato y no como acumulación de

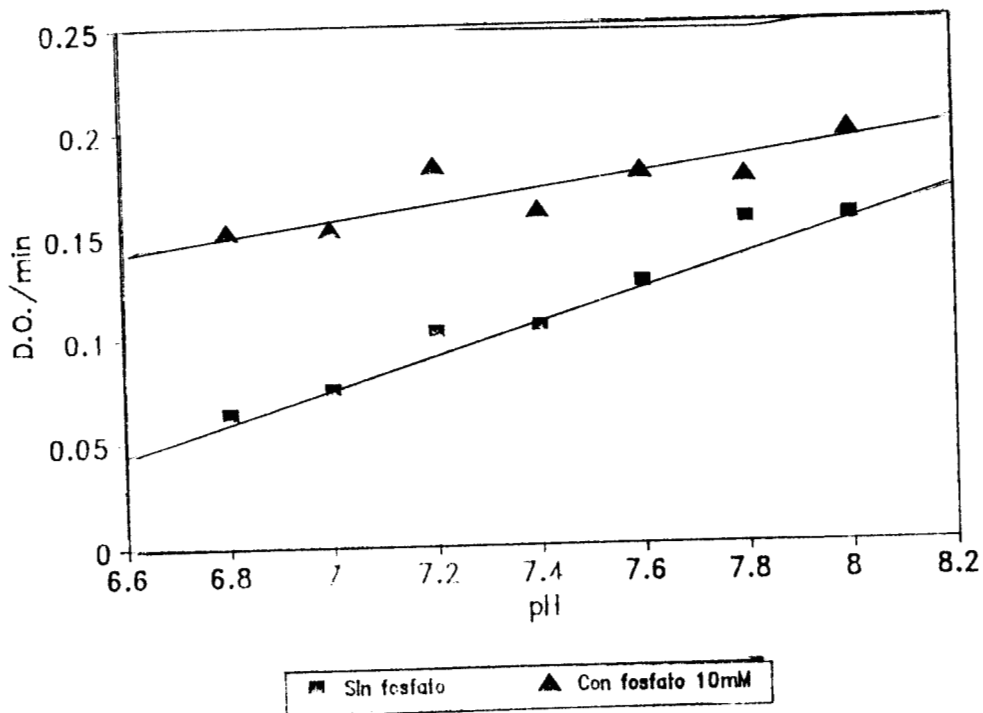


FIGURA 12: Efecto del fosfato sobre el hinchamiento mitocondrial no energizado a diferente pH.

La concentración de fosfato utilizada en estos experimentos fue de 10mM, el medio de reacción contenía glutamato de amonio 135mM, hepes 5mM, suspensión de mitocondrias ≈ 1.5 mg/ml y el agua necesaria para un volumen final de 3ml. El pH se fue variando desde 6.8 hasta 8.0 y se ajustó con HCl y KOH según fuera necesario. El hinchamiento se midió a 615nm.

fosfato.

Los parámetros anteriores son básicos en la interpretación de los resultados, ya que determinan si la fuerza impulsora para el movimiento de glutamato está dada por el componente químico de la fuerza protón motriz, $\Delta p\text{H} = \Delta p[\text{Glu}]$; o bien que el transporte de glutamato dependa en forma directa de las concentraciones de fosfato: $\Delta p[\text{H}_2\text{PO}_4] = \Delta p[\text{Glu}]$

En la fig 12 aparecen los resultados de la dependencia de la velocidad del hinchamiento mitocondrial a variaciones de pH

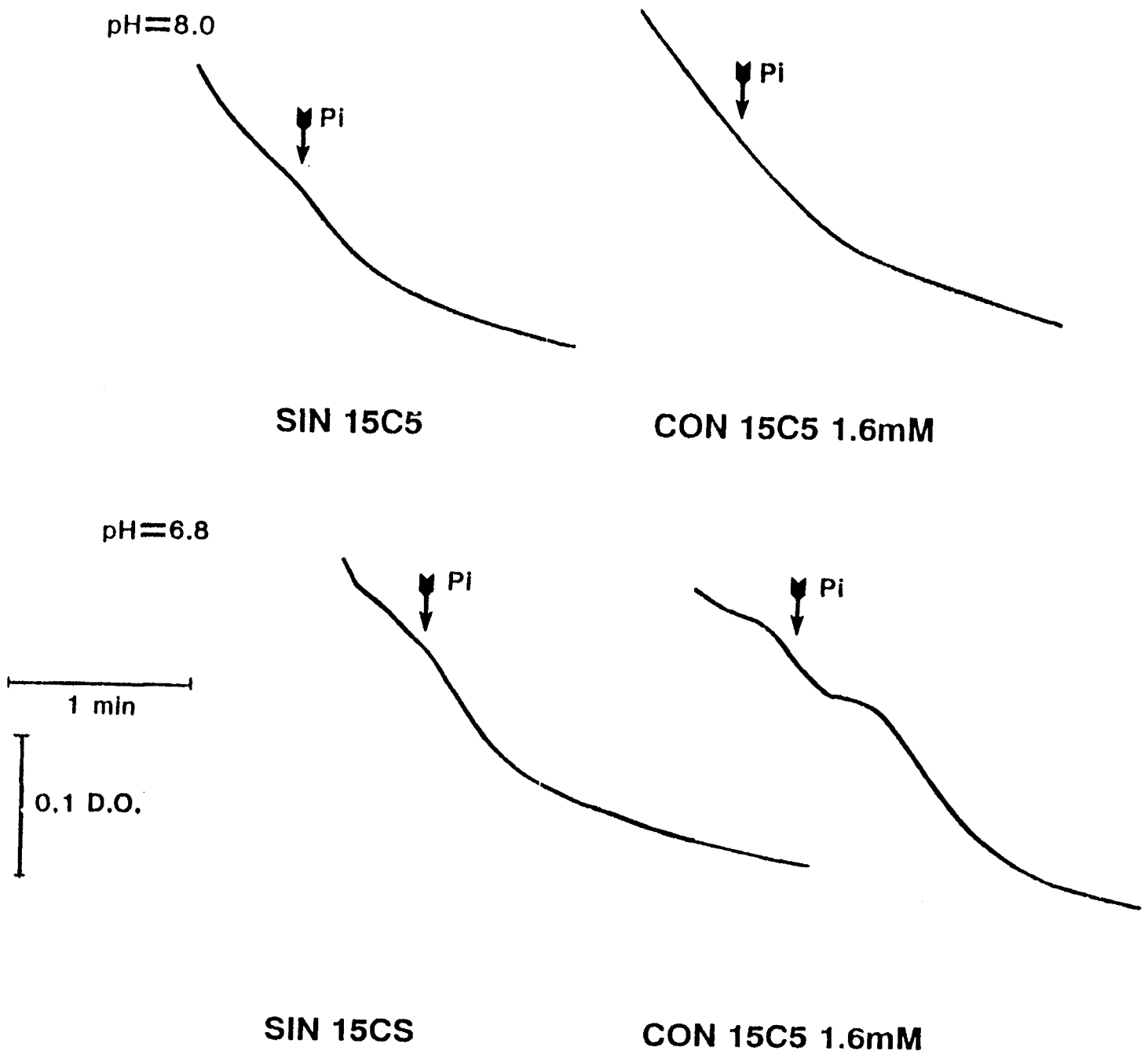
de 6.8 a 8.0, manteniendo constante la concentración de fosfato (10mM). Estos datos muestran una marcada dependencia de la velocidad del hinchamiento al pH en ausencia de fosfato y una dependencia muy pobre en presencia de 10mM de fosfato. Esta dependencia va disminuyendo conforme se alcaliniza el medio, tanto, que a partir de pH 7.8 ya casi no se ve diferencia en el hinchamiento con o sin fosfato. A pH 6.8 puede verse que la velocidad de hinchamiento con fosfato es tres veces mayor que sin fosfato.

Los trazos obtenidos en estos experimentos, para los pH extremos se muestran en la figura 13, en ellos puede verse un hinchamiento inicial lento que a pH 6.8 se acelera al agregar el fosfato, y que casi no cambia a pH 8.0. Además se observa una diferencia transitoria de pendiente en el hinchamiento a pH de 6.8 en presencia de poliéter comparado contra el trazo control. Esta diferencia no se observa a pH de 8.0.

Posteriormente se midió el hinchamiento a diferentes concentraciones de fosfato en un pH de 6.8 y un pH de 8.0. En esta serie de experimentos se decidió bajar lo más posible la concentración de fosfatos, que inicialmente era de 10mM, para ver hasta donde llegaba su influencia sobre el hinchamiento, y al mismo tiempo observar si se evidenciaba algún efecto del 15C5. Se escogieron estos pH porque se observó (figura 12) que a pH 6.8 hay una dependencia al fosfato y un efecto del poliéter y que a pH 8.0 el hinchamiento parece ser independiente de la concentración de fosfato.

En la figura 14 se grafica el cambio en la densidad óptica por minuto contra la concentración de fosfato en mitocondrias

FIGURA 13: Efecto del 15C5 sobre el hinchamiento mitocondrial no energizado, a diferente pH. La concentración de fosfato utilizada en estos experimentos fue de 10mM, el medio de reacción contenía glutamato de amonio 135mM, hepes 5mM, suspensión de mitocondrias \approx 1.5 mg/ml en un volumen final de 3ml. La concentración de 15C5 fue de 1.6mM; y el hinchamiento se midió a 615nm.



control y tratadas con poliéter a pH 6.8. Lo primero que se observa en ella es que al ir aumentando la concentración de

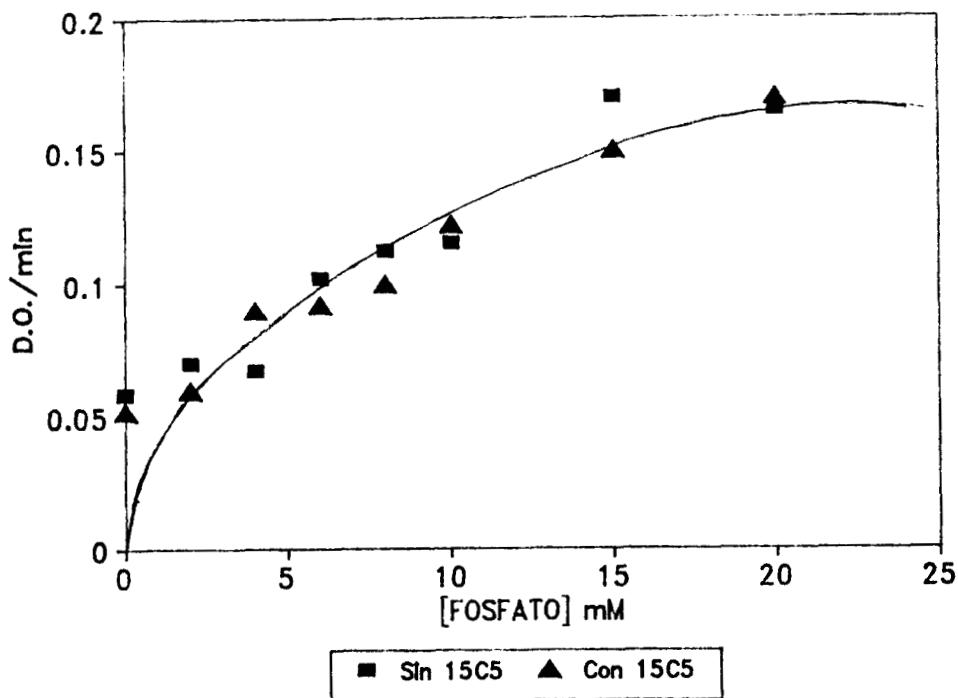


FIGURA 14: Cinética enzimática a pH 6.8, de la velocidad del hinchamiento mitocondrial no energizado contra la concentración de fosfato, en presencia y ausencia de 15C5.

Las condiciones experimentales están dadas en la figura 12. La concentración de 15C5 usada fue de 1.6mM y las concentraciones de fosfato variaban de 0 a 20 mM.

fosfato aumenta la absorción. Se ve un incremento de casi tres veces al agregar 20mM de fosfato comparado con la absorción sin fosfato. Esto indica que existe una dependencia del hinchamiento (interpretada como movimiento de glutamato) de la concentración de fosfato. Se encontró (figura 15) que aún y cuando el hinchamiento si depende de fosfato, no hay ninguna diferencia en K_m y V_{max} al agregar el poliéter 15C5.

Los resultados obtenidos en los experimentos a pH 8.0 se presentan en la figura 16, donde se ve que el hinchamiento a pH un poco más alcalino es independiente de la concentración de fosfato presente en el medio. Como se ve claramente en la figura, no hay diferencia en el hinchamiento en presencia o ausencia del poliéter. En este caso puede confirmarse el razonamiento de la

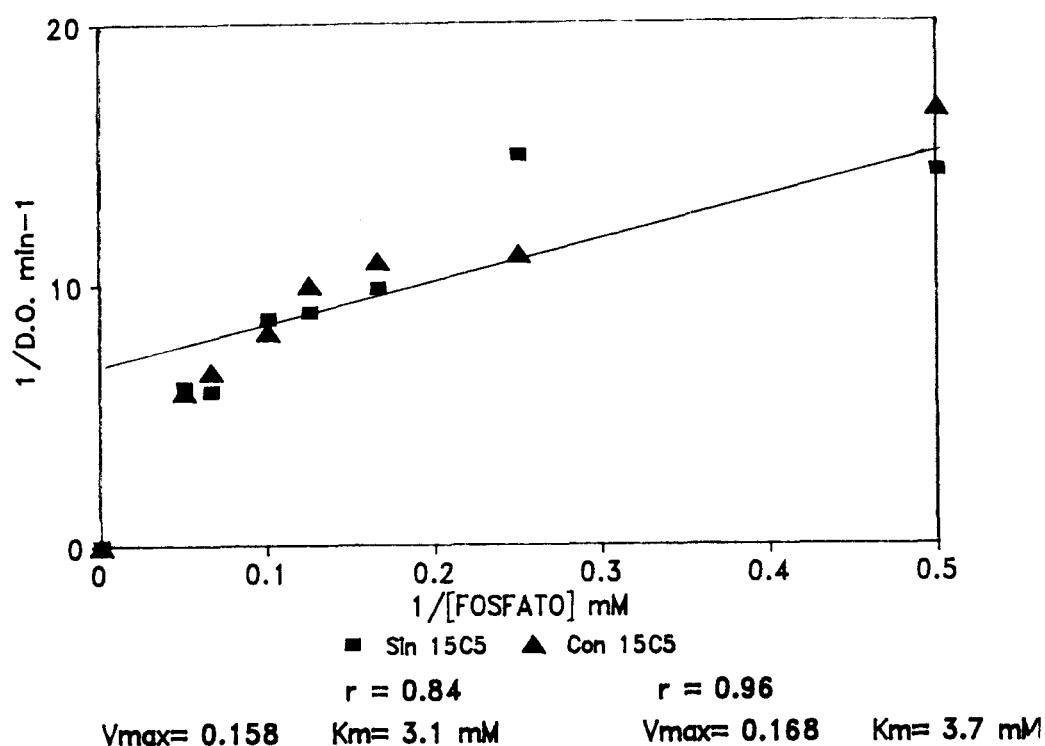


FIGURA 15: Doble recíproca del hinchamiento mitocondrial no energizado a pH 6.8 contra la concentración de fosfato, con y sin 15C5. Las condiciones están dadas para la figura anterior.

figura 12, ya que se observa que a pH alcalino el movimiento de glutamato depende del Δ pH y no del Δ p[H₂PO₄]. Al mismo tiempo, de nuevo se observa que el hinchamiento es mayor a este pH que a pH de 6.8

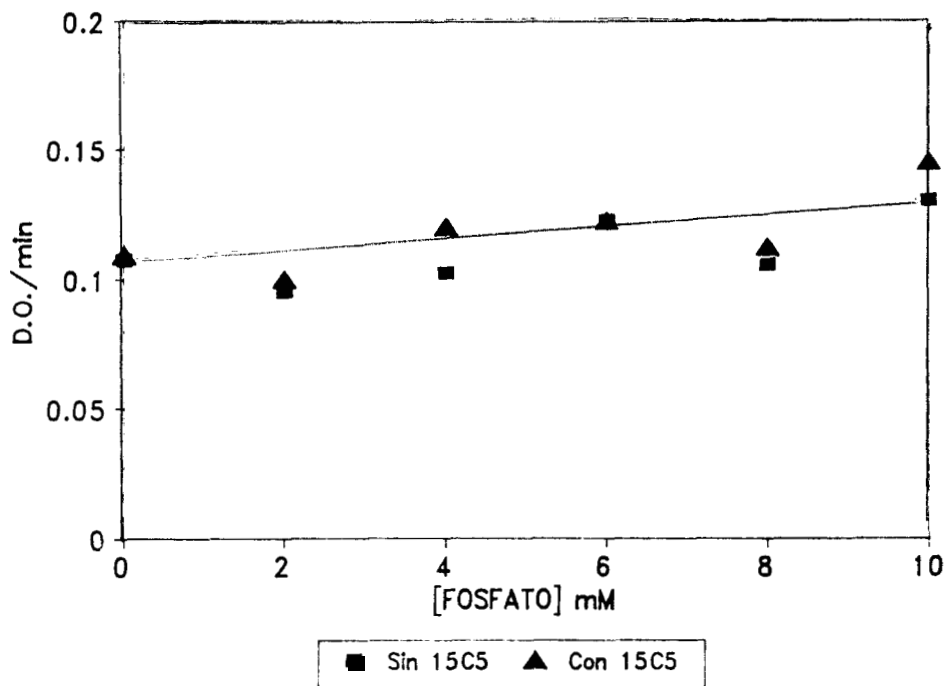


FIGURA 16: Hinchamiento mitocondrial no energizado a diferentes concentraciones de fosfato, en ausencia y presencia de 15C5, pH 8.0. Las condiciones experimentales están dadas en la figura 12 y 13.

5.2.1.3.2 HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL ENERGIZADO

La teoría quimiosmótica (Mitchell, 1961) plantea que el flujo de electrones por la cadena oxidativa mitocondrial está acoplado a la salida de protones y genera una diferencia de potencial electroquímico de protón que puede ser aprovechada ya sea para sintetizar ATP a partir de ADP y fosfato, o para otros procesos que requieran energía, como puede ser el transporte de metabolitos a través de membranas. Para que la cadena oxidativa funcione, se requiere del poder reductor en forma de NADH, que puede obtenerse de sustratos como el glutamato. Como se mencionó antes, para que exista hinchamiento debe penetrar a la mitocondria el par anión-cation, de modo que se utilizó a la

valinomicina para transportar K^+ de un lado a otro de la membrana. De hecho, el hinchamiento mitocondrial es inducido por valinomicina, ya que ella transporta al potasio a favor de su gradiente electroquímico, y una vez que han entrado las cargas positivas, el glutamato es transportado por su acarreador específico. En nuestro ensayo el glutamato se utilizó al mismo tiempo como el sustrato que energiza a la mitocondria y como anión permeante. En estos experimentos se volvió a utilizar fosfato para facilitar el transporte de glutamato.

Un ejemplo de trazo típico del hinchamiento mitocondrial inducido por valinomicina, se presenta en la figura 17, donde se observa una un descenso lineal (el cual se considera como la

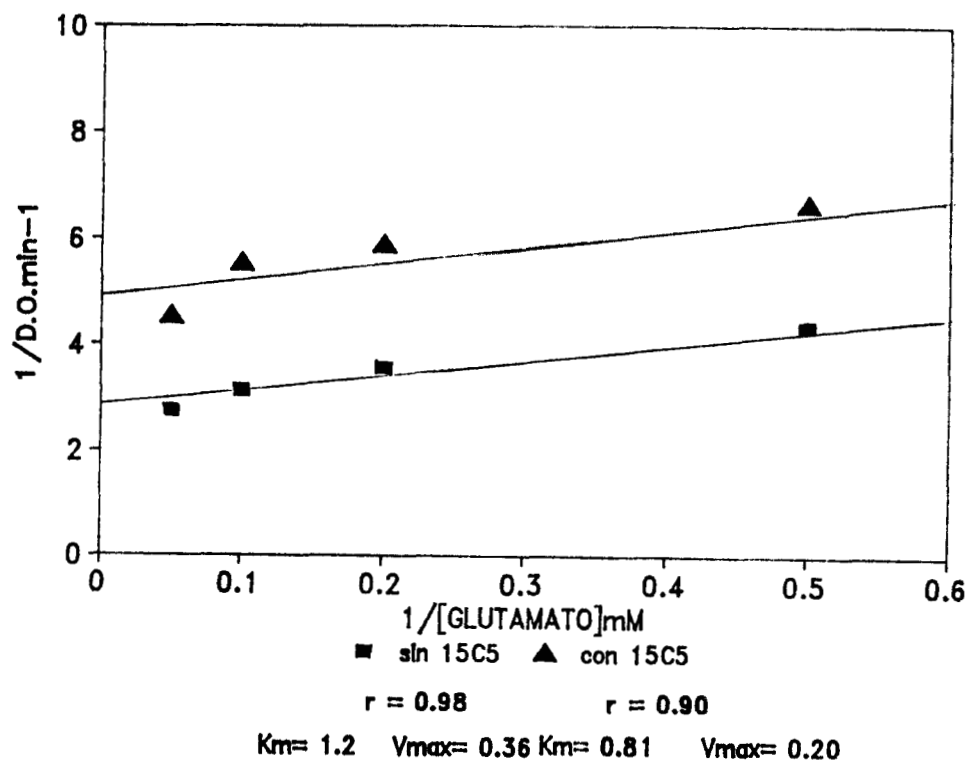


FIGURA 18: Efecto del 15C5 sobre el hinchamiento energizado en presencia de glutamato. Las condiciones experimentales están dadas en la figura 17. Los cuadrados representan los experimentos sin 15C5 y los triángulos son con el poliéter.

FIGURA 17: Efecto del 15C5 sobre el hinchamiento mitocondrial inducido por valinomicina con 20 mM de glutamato. El medio de reacción contenía sacarosa 220mM, KCl 10mM, glutamato de potasio 20mM, fosfato de amonio 5mM, hepes 5mM suspensión de mitocondrias ≈ 1.5 mg/ml en un volúmen final de 3ml. El hinchamiento se midió como cambio en la densidad óptica a 615nm.

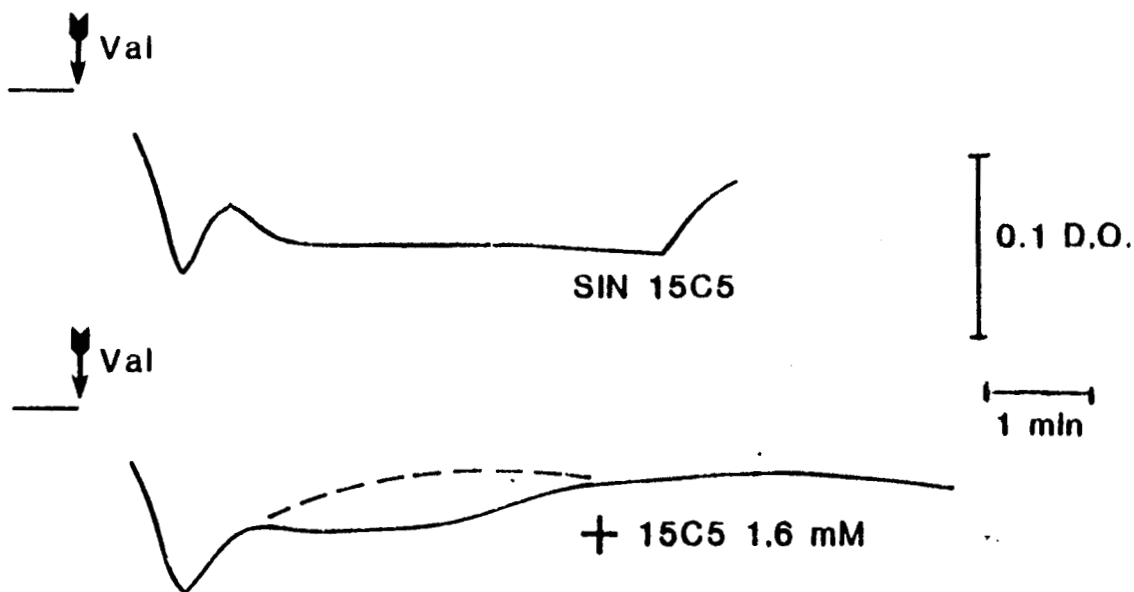
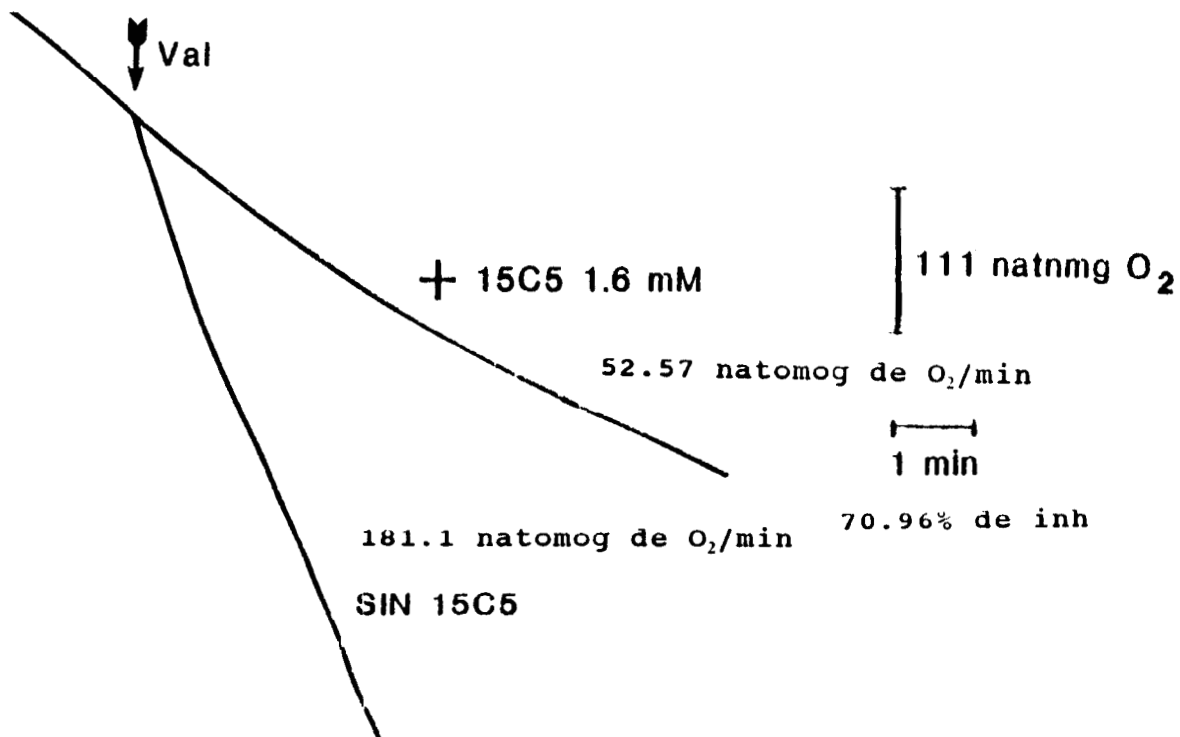


FIGURA 19: Efecto del 15C5 sobre el consumo de oxígeno mitocondrial inducido por valinomicina, usando glutamato como sustrato: El medio de reacción que se encontraba a un pH de 7.4 contenía sacarosa 225mM, hepes 5mM, fosafatos 5mM, KCl 10mM, K-glutamato 20mM, suspensión de mitocondrias ≈ 1.5 mg/ml en un volúmen final de 3ml. El medio de reacción de las mitocondrias tratadas incluía 1.6 mM de 15C5.

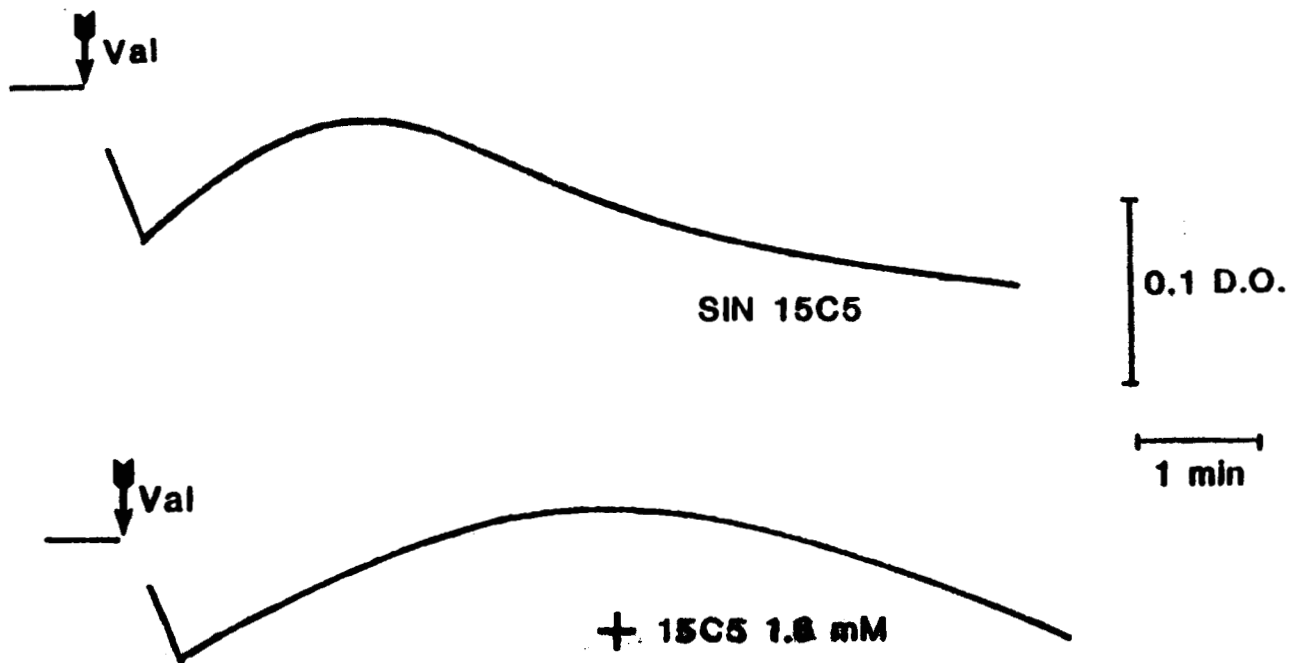


velocidad de entrada de glutamato y potasio) seguida por una "contracción" y nuevamente un relajamiento hasta alcanzar la anaerobiosis y retornar a su absorción original. Puede observarse una diferencia en el trazo control y el que fue tratado con 15C5.

En la gráfica 18 se compara el inverso de las velocidades de hinchamiento obtenidas en experimentos realizados con y sin poliéter con el inverso de distintas concentraciones de glutamato que van desde 2 hasta 20mM. Se observa que en presencia del 15C5 el hinchamiento es menor; esto se confirma cuantitativamente con los datos de K_m y V_{max} anexos a la gráfica. En paralelo se midieron los consumos de oxígeno energizados con valinomicina de mitocondrias control y de mitocondrias con poliéter. Los trazos aparecen en la figura 19, donde se observa en el experimento sin poliéter, un consumo de oxígeno inicial que se acelera al agregar la valinomicina y que no se interrumpe en ningún momento hasta llegar a anaerobiosis. En cambio, en el experimento donde el 15C5 se encontraba presente en el medio de reacción, se aprecia que la respiración no se estimula al agregar valinomicina, i.e. está inhibida un 70% con respecto al control. Estos datos confirman el efecto inhibitorio del poliéter.

Para confirmar los datos anteriores se montaron experimentos iguales pero con succinato en lugar de glutamato. En la figura 20 se observan los trazos control (mitocondrias sin poliéter) y los trazos experimentales (mitocondrias que se encontraban en un medio de reacción que contenía 1.6 mM de 15C5). Los dos trazos son similares, mostrando un descenso lineal por la entrada del par anión-cación que posteriormente se revierte cuando se vuelven a contraer las mitocondrias. Esta contracción no se estabiliza

FIGURA 20: Efecto del 15C5 sobre el hinchamiento mitocondrial inducido por valinomicina con 20mM de succinato: El medio de reacción contenía sacarosa 220mM, KCl 10mM, succinato 20mM, fosfato de amonio 5mM, hepes 5mM, suspensión de mitocondrias \approx 1.5 mg/ml en un volumen final de 3ml, a u pH de 7.4. El hinchamiento se midió como cambio en la densidad óptica a 615nm.



como en el caso de glutamato, ya que se observa un nuevo descenso de la curva que no alcanza a recuperarse y llegar a anaerobiosis. Aunque estos trazos son diferentes a los obtenidos para el hinchamiento con glutamato, no hay que perder de vista que el hinchamiento presentado en esta figura fue energizado con

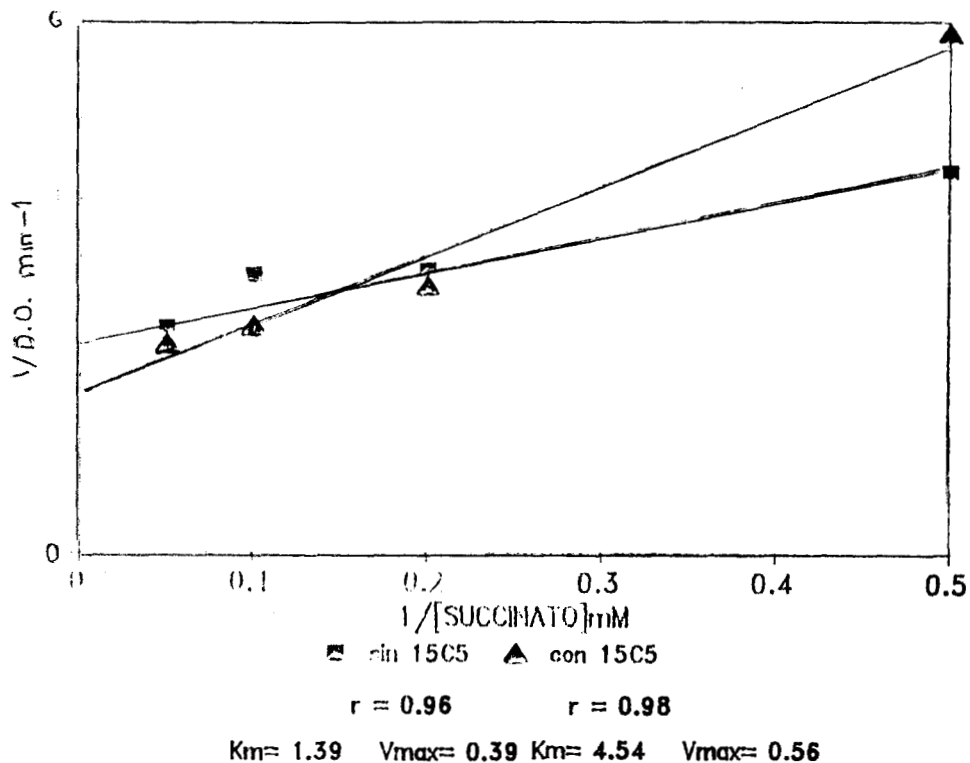


FIGURA 21: Efecto del 15C5 sobre el hinchamiento energizado usando succinato como sustrato.

El medio de reacción que se encontraba a un pH de 7.4 contenía sacarosa 225mM, hepes 5mM, fosafatos 5mM, KCl 10mM, succinato 20mM, suspensión de mitocondrias ≈ 1.5 mg/ml en un volúmen final de 3ml. La concentración de 15C5 usada fue de 1.6mM

succinato y que él mismo fue el anión permeante. El que los trazos con y sin poliéter aparezcan similares puede interpretarse como que el poliéter 15C5 no tiene ningún efecto sobre el transporte de succinato (o por lo menos no un efecto tan claro, sobre el hinchamiento mitocondrial energizado en presencia

de succinato), como lo tiene en presencia de glutamato. Esto se aprecia mejor al graficar (figura 21) los valores del inverso de la velocidad de hinchamiento contra el inverso de la concentración de succinato. En las curvas correspondientes al hinchamiento mitocondrial en presencia y ausencia de 15C5 como en los valores de K_m y V_{max} calculados, se ve que no hay una diferencia apreciable entre el hinchamiento de las mitocondrias tratadas y las control.

Para completar la serie de experimentos con succinato se realizaron los experimentos de consumo de oxígeno estimulado por valinomicina. Los trazos se muestran en la figura 22, donde se observa que el consumo de oxígeno de las mitocondrias con o sin poliéter 15C5 no se interrumpe en ningún momento desde que se agrega la valinomicina. La respiración en ambos casos continúa hasta llegar a anaerobiosis. Lo anterior concuerda con los resultados ya mencionados donde no se veía ningún efecto del poliéter en mitocondrias cuyo sustrato fuera succinato.

CONSUMO DE O₂

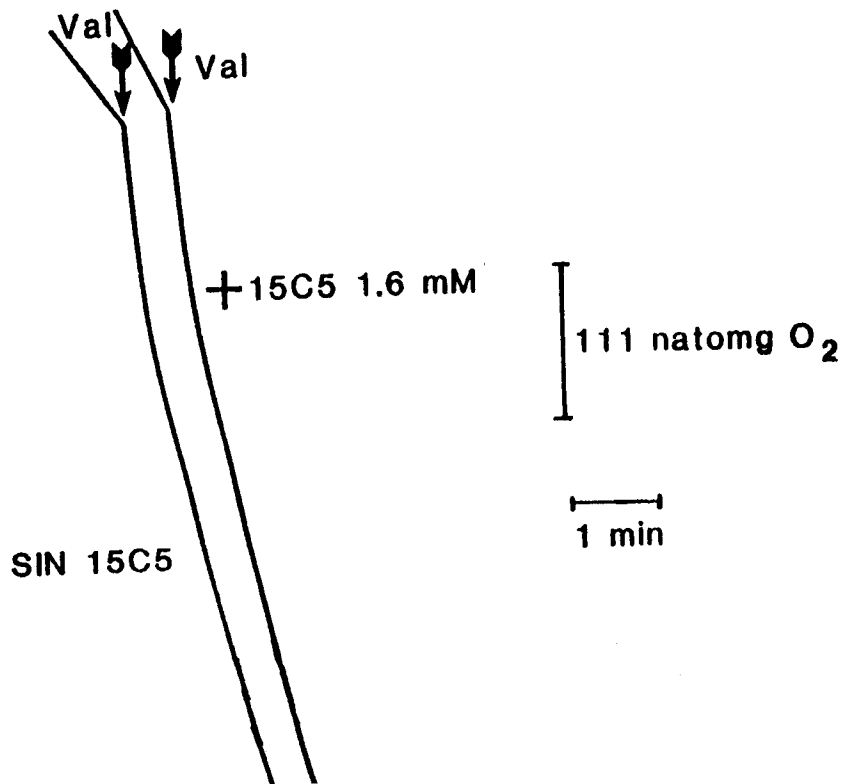


FIGURA 22: Efecto del 15C5 sobre el consumo de oxígeno mitocondrial inducido por valinomicina, usando succinato como sustrato: El medio de reacción que se encontraba a un pH de 7.4 contenía sacarosa 225mM, hepes 5mM, fosafatos 5mM, KCl 10mM, K-glutamato 20mM, suspensión de mitocondrias \approx 1.5mg/ml en un volúmen final de 3ml. El medio de reacción de las mitocondrias tratadas incluía 1.6 mM de 15C5.

5.2.2 EXPERIMENTOS CON PARTICULAS SUBMITOCONDRIALES

(PSM)

Se midió el consumo de O₂ en PSM de corazón de res utilizando NADH 0.5mM como sustrato, en ausencia y presencia de 5mM de KCl.

Hay que hacer hincapié en dos cuestiones al realizar los experimentos con PSM: la primera es con respecto a la homogeneidad en los valores de los consumos de oxígeno. Las PSM

POLIETER	SIN K+			CON K+			↑ estimula ↓ inhibe
	natomogO ₂ /min/mg prot		% Cambio	natomogO ₂ /min/mg prot		% Cambio	
	NADH	Polieter		NADH	Polieter		
—	422.5	422.5	0.0	216.45	216.45	0.0	
12C4	449.55	449.55	0.0	227.50	227.50	0.0	
15C5	406.25	406.25	0.0	216.45	216.45	0.0	
B15C5	423.09	423.09	0.0	250.72	250.72	0.0	
18C6	438.76	438.76	0.0	235.05	235.05	0.0	

TABLA 11: Consumo de O₂ en PSM de corazón de bovino. El medio de reacción utilizado a pH 7.4 fue sacarosa 230mM, TEA 10mM, suspensión de PSM 1mg/ml en un volumen final de 3ml. Como sustrato se utilizó únicamente NADH 0.5mM. Los experimentos presencia de catión alcalino contenían 5mM de KCl. Los valores de los consumos de O₂ están dados en natomog/min/mg de proteína y el cambio en el consumo, con respecto el control, está expresado en porciento; las flechas ↑ indican estimulación y las inhibición.

natomgO₂/min/mg prot

SIN K⁺

CON K⁺

↑ estimula
↓ inhibe

POLIETER	Consumo O ₂		% Cambio	Consumo O ₂		% Cambio
	NADH	Polleter		NADH	Polleter	
—	422.5	422.5	0.0	216.45	216.45	0.0
DC18C6	505.8	303.58	40.0 ↓	185.46	227.61	22.7 ↑
DB18C6	446.6	203.71	54.3 ↓	203.71	133.19	34.6 ↓
DB24C8	475.8	475.8	0.0	203.71	203.71	0.0
DB30C10	470.4	470.4	0.0	219.38	282.06	28.57 ↑

TABLA 12: Consumo de O₂ en PSM de corazón de bovino. El medio de reacción usado es el mismo que el descrito para la tabla 11. El cambio en el consumo, con respecto el control, está expresado en porciento; las flechas ↑ indican estimulación y las ↓ inhibición.

son partículas que se aglutinan y forman grumos, de tal manera que al tomar un volumen de 100 μ l de muestras muy concentradas, no siempre se obtiene una alícuota homogénea, de tal forma que la concentración de 0.5 mg/ml de PSM que se espera no es real para los cálculos, y es por ello que a veces las velocidades que se cuantificaban eran muy altas y en otros casos muy bajas. Para evitar este problema, se diluyen las PSM con el fin que éstas se encuentren distribuidas de manera más homogénea aunque haya que tomar volúmenes mayores.

La segunda cuestión tiene que ver con la aceleración independiente que muestran las PSM en los trazos de consumo de oxígeno, i.e. si se observan los trazos del consumo, se ven dos

velocidades, la primera más lenta y la segunda más rápida. Este cambio de velocidad sucede con o sin poliéter. Sin embargo, al realizar los experimentos, hay que esperar a que se estabilice la respiración para agregar el poliéter, de lo contrario parecerá que el poliéter tiene un efecto estimuladorio.

Una vez aclarado esto, puede pasarse a la figura 23 donde pueden observarse los trazos de los controles para estos experimentos; los trazos punteados se refieren a las velocidades más lentas (pendientes menores) y las líneas continuas marcan las velocidades una vez que se ha estabilizado la respiración. Como se mencionó antes, se observa que éstas son más rápidas (pendientes mayores). En las tablas 11 y 12 se presentan los resultados obtenidos. Los 4 poliéteres más pequeños, que son los que aparecen en la tabla 11, no muestran ningún efecto sobre el consumo de oxígeno.

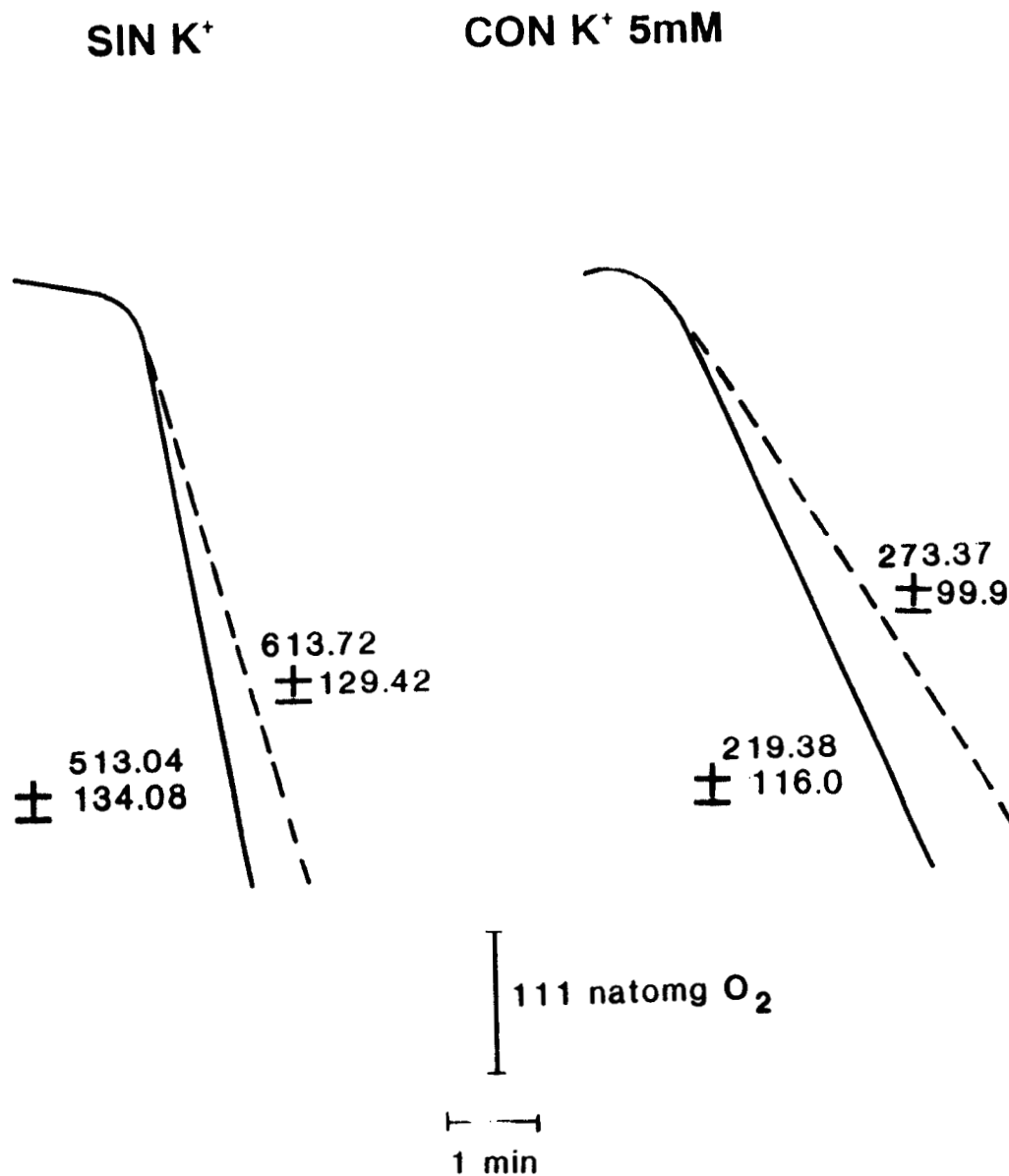
En la tabla 12, donde aparecen los poliéteres mayores, se advierte un efecto inhibitorio del 40% por parte del DC18C6 en ausencia de potasio y un efecto estimulante del 20% en presencia del catión. El poliéter DB18C6 inhibe en ambas condiciones y el DB30C10 sólo estimula cuando hay K⁺ en el medio.

Otro punto importante que hay que analizar en esta tabla, es que los valores de los consumos de oxígeno en presencia de potasio son aparentemente la mitad de los consumos sin potasio.

5.2.3 COMPLEJO I: NADH:UBIQUINOL OXIDO-REDUCTASA

Desde la época de los 70's, cuando se describió el efecto del DB18C6, se encontró que la inhibición era específica sobre el sitio I de la cadena respiratoria mitocondrial (Estrada, S.

FIGURA 23: Trazos control para los consumos de oxígeno en PSM de corazón de bovino. El medio de reacción utilizado a pH 7.4 fue sacarosa 230mM, TEA 10mM, suspensión de PSM 1mg/ml en un volumen final de 3ml. Como sustrato se utilizó únicamente NADH 0.5mM. Los experimentos presencia de catión alcalino contenían 5mM de KCl. Los valores de los consumos de O₂ están dados en natomog/min/mg de proteína.



y Vargas, M.E. 1974). Es por eso que se decidió estudiar el efecto del DB18C6 directamente sobre la enzima. Para esto se aisló a la NADH-deshidrogenasa de mitocondrias de corazón de bovino partiendo de fracción RB4 (Complejo I-III) según el método de Hatefi (1978).

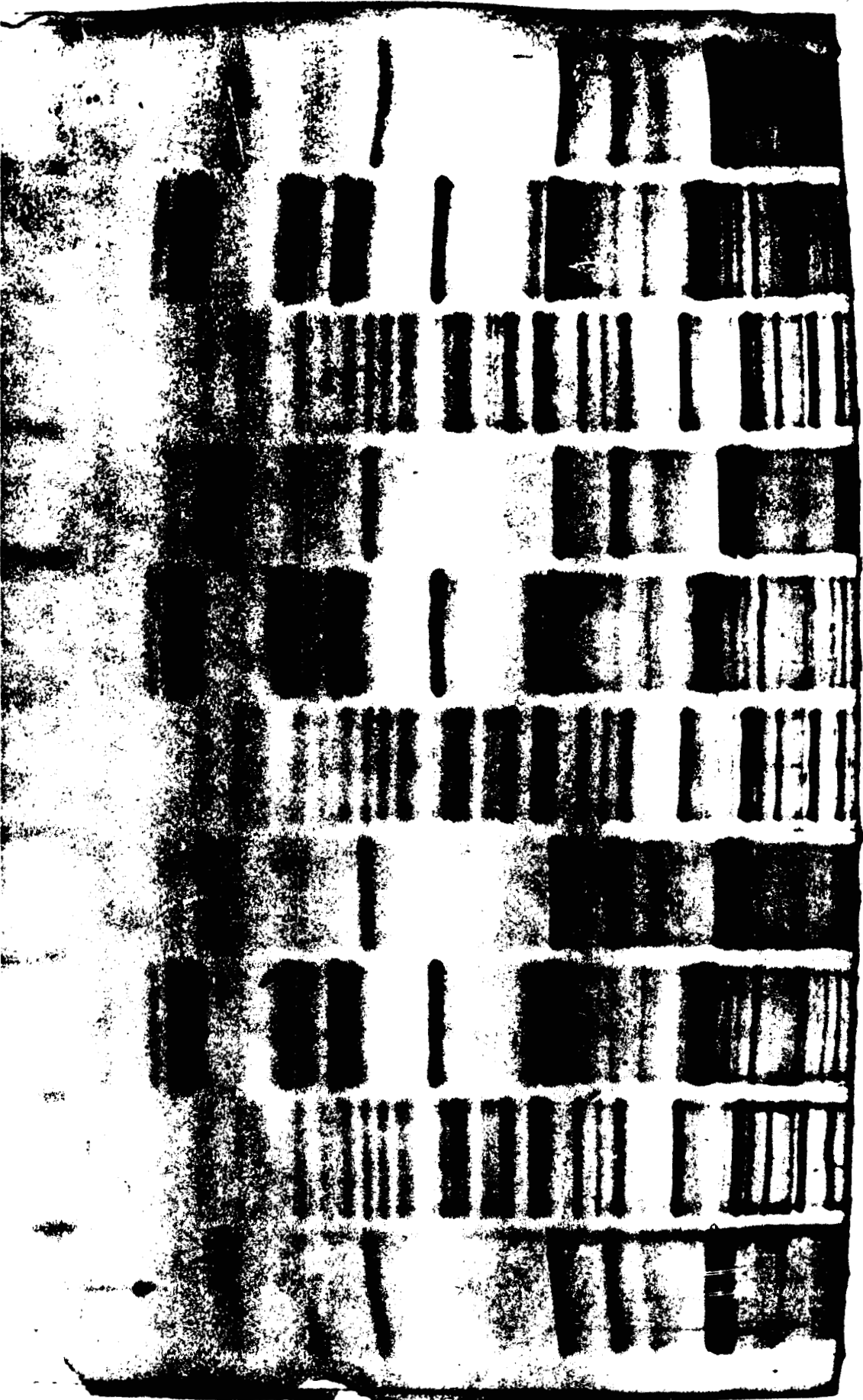
Los criterios que se tomaron en cuenta para juzgar el grado de enriquecimiento de la enzima aislada, fueron los siguientes:
a) EGPA-DSS (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio):

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida de la enzima aislada, alternando en los carriles adyacentes muestras de citocromo c oxidasa (complejo IV) y complejo bc₁ (complejo III). La fotografía del gel puede verse en la figura 24, donde se aprecia que el carril correspondiente al complejo I presenta más de 20 bandas, lo que concuerda con los datos en la literatura que indican que la NADH-deshidrogenasa posee entre 25 y 30 polipéptidos (Hatefi, Y. 1985). Además cabe mencionar, que la enzima aislada no se encuentra contaminada por citocromos b ó c, ya que no presenta ninguna banda en el lugar característico donde se encuentran los citocromos.

b) ACTIVIDAD ENZIMÁTICA:

Se midió la actividad enzimática de la NADH-deshidrogenasa cuantificando la oxidación de NADH por medio de la disminución de la absorbancia a 340 nm usando 11.5 μ M de UQ₁ como aceptor final de electrones. La concentración de enzima utilizada fue de 22.75 μ g de proteína/ml y el medio de reacción contenía, además de amortiguador de fosfatos pH 8.0 y azida de sodio, 300 μ M de fosfatidil colina. Sin embargo, parecía ser que estos

FIGURA 24: EGPA-DSS comparativa del complejo I: En el primer carril se encuentra el complejo bc₁ (complejo III), en el segundo la NADH deshidrogenasa (complejo I), en el tercero la citocromo c oxidasa (complejo IV), y esta secuencia se repite a la largo de todo el gel.



fosfolípidos no eran suficientes para preservar la conformación activa de la enzima, ya que no se obtuvieron resultados positivos en este ensayo. Por lo anterior se decidió incubar a la deshidrogenasa con fosfolípidos para tratar de regenerar la actividad. (La descripción detallada del ensayo está indicada en la parte de metodología).

c) RECONSTITUCION DE LA ACTIVIDAD DE NADH DESHIDROGENASA CON FOSFOLIPIDOS:

Como se mencionó en el inciso anterior, se incubó a la deshidrogenasa con fosfolípidos durante toda la noche (≈ 18 hrs) a 4°C , y posteriormente se midió la actividad preincubando a la

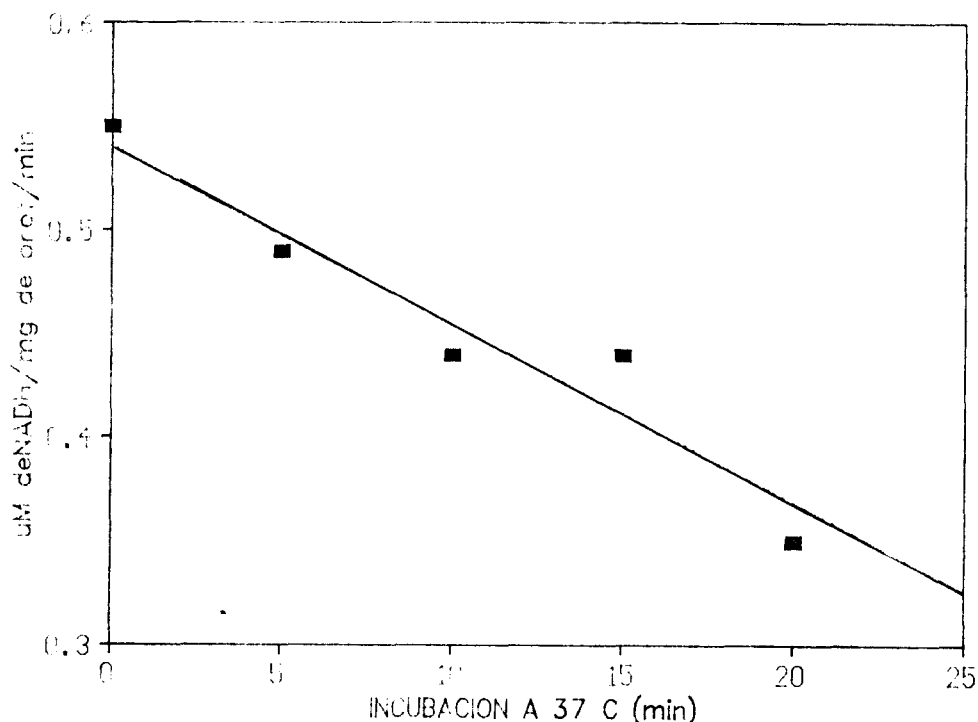


FIGURA 25: Actividad enzimática del complejo I preincubado con fosfolípidos, a diferentes tiempos de incubación posterior a 37°C . El medio de reacción contenía amortiguador de fosfatos 20mM pH 8, azida de sodio 2mM , NADH $150\ \mu\text{M}$ disuelto en Tris, UQ_1 $11.5\ \mu\text{M}$ en un volumen final de 2ml . Después de incubar un par de minutos hasta alcanzar la temperatura de 38°C se le agregó 0.3mM de fosfatidilcolina en amortiguador de fosfatos pH 8.0, colato 2% y se dejó equilibrar unos cuantos minutos más. A este medio es al que se le agregó la enzima para medir la oxidación.

enzima de 0 a 20 minutos a 37°C antes de agregarla al medio de reacción y dejarla alcanzar la temperatura de 38°C. La figura 25, muestra la actividad de la enzima preincubada toda la noche con fosfolípidos y su dependencia para oxidar NADH a diferentes tiempos de incubación posterior a 37°C. La mejor actividad se obtuvo utilizando a la enzima directamente del hielo, sin ninguna incubación a 37°C. Aparentemente, los datos muestran una relación casi lineal entre el aumento del tiempo de incubación a 37 °C y la pérdida de actividad. De aquí en adelante se utilizó la enzima preincubada toda la noche en frío con fosfolípidos, sin volver a incubar a 37°C; únicamente se le dejaba llegar a la temperatura de 38°C antes de comenzar el ensayo.

d) DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD A LA CONCENTRACION DE UBIQUINONA:

La UQ_1 es el aceptor final de electrones, por lo que en la

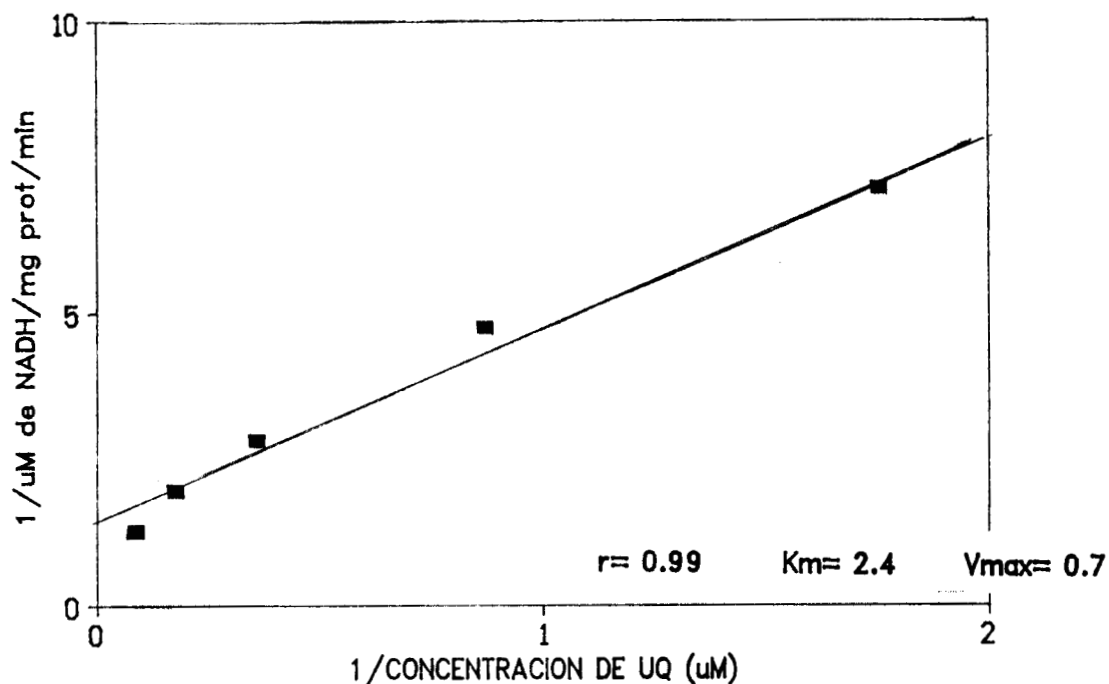


FIGURA 26: Dependencia de la actividad enzimática a la concentración de UQ_1 . El medio de reacción utilizado es igual al descrito para la figura 25. Las concentraciones de UQ_1 iban desde cero hasta $11.5\mu\text{M}$

figura 26, donde se muestran los resultados de los experimentos a diferentes concentraciones de ubiquinona 1, en las condiciones especificadas en el inciso anterior. Al graficar los inversos de la concentración de ubiquinona contra el inverso de la velocidad, se observa una cinética mediada por una enzima, lo cual corrobora que la actividad que se estuvo midiendo corresponde a un mecanismo enzimático específico y no a que el transporte de electrones se diera por una reacción de óxido-reducción inespecífica.

e) VARIACION DE LA CONCENTRACION DE LA ENZIMA:

La utilización de cantidades crecientes de enzima, aunado a un aumento en la actividad, confirma que se está midiendo una actividad catalítica y no a una reacción de óxido-reducción puramente química.

f) INACTIVACION DE LA ENZIMA POR CALENTAMIENTO:

Si se calienta la enzima por 4 minutos a temperatura de ebullición, pierde totalmente su actividad.

g) SENSIBILIDAD A ROTENONA:

La sensibilidad a rotenona es importante para confirmar que la enzima aislada se encuentra íntegra y en una conformación muy parecida a la nativa. Sin embargo, en nuestras manos, la enzima nunca se inhibió en presencia de rotenona. Se probaron otros aceptores finales de electrones para evitar que el aceptor pudiera tomar electrones saltándose el sitio de inhibición de la rotenona. Se usaron UQ₁₀ (ubiquinona con una cadena hidrocarbonada de 50 carbonos, que por ser insoluble se agregó en fosfolípidos con o sin sonicación) y DBH (Decilubiquinona) a la concentración de 15.5 μ M, pero en ningún caso se observó inhibición en presencia

de rotenona.

h) SENSIBILIDAD A DB18C6:

Con la enzima en estas condiciones se probó el efecto del poliéter DB18C6 en el mismo sistema de estudio, obteniéndose los resultados de la tabla 13, en donde puede notarse que en estos experimentos no se encontró ninguna diferencia en la actividad enzimática en presencia o ausencia del DB18C6. La actividad en todos los casos fue muy baja en comparación a las actividades obtenidas para mitocondrias y partículas submitocondriales, ya que en estas últimas se llegaron a obtener actividades de alrededor de 400 natomos de O_2 /min/mg de proteína. (Este hecho se comenta más a fondo en la discusión).

Oxidación de NADH
umoles/mg/mín

	sin DB18C6	con DB18C6
UQ1 11.5 μ M	1.123 \pm 0.02	1.14 \pm 0.02
DBH 15.5 μ M	1.194 \pm 0.005	1.16 \pm 0.0

UQ1 = Ubiquinona 1
DBH = Decilubiquinona

TABLA 13: Actividad enzimática de la NADH deshidrogenasa en presencia y ausencia de 10^{-4} M de DB18C6, usando UQ₁ o DBH como aceptores de electrones. Las condiciones experimentales están dadas en la figura 24.

6. DISCUSION

6.1 CLOROPLASTOS

6.1.1 FOTORREDUCCION DE NADP+

Hay que hacer una distinción entre los diferentes tipos de centros fierro-azufre que forman parte del centro de reacción del FSI, ya que se encuentran en un microambiente fisicoquímico diferente. Los centros Fe-S tetranucleares pertenecientes a lo que se ha llamado F_A/F_B , están muy cerca uno de otro, y no es posible diferenciarlos ya que sus señales de EPR son muy parecidas (Krauss, et al. 1993). La distancia entre $F_A F_B$ es de 12 Å, y se encuentran coordinados a la subunidad C tipo ferredoxina (ferredoxin-like), dentro de un polipéptido

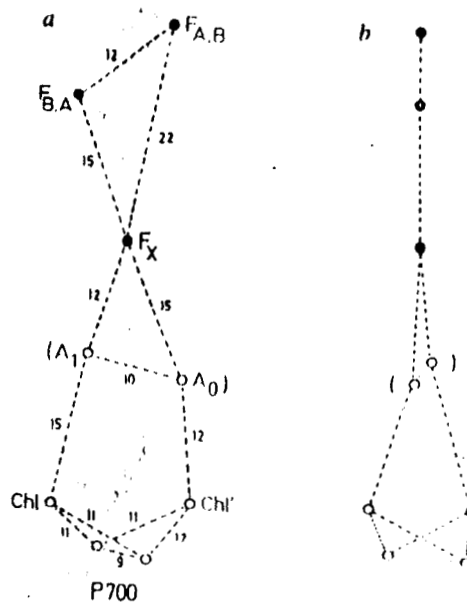


FIGURA 27: Arreglo geométrico de los centros acarreadores de electrones del FSI. a. Vista de frente, b. la misma vista rotada 90°, las distancias están en Å. ((Krauss, et. al. 1993)

periférico que se asoma al estroma y, que se puede remover con agentes caotrópicos, y que incluso se ha reconstituido en cloroplastos de espinaca o de *Synechococcus sp.* (Mehari, et. al. 1991). El otro Fe-S tetranuclear, F_X , se encuentra en el corazón del complejo, a 14 y 21Å de $F_A F_B$, respectivamente, acomodado en la forma de un triángulo irregular, de manera que se encuentra justo en el paso de electrones entre A_0 (clorofila a) y A_1 (vitamina K_1) con los centros 4Fe-4S antes mencionados, (ver figura 27) (Krauss, et al. 1993). Al comparar los valores de los datos obtenidos se encuentra que en la mayoría de los casos el porcentaje de cambio es nulo, o que los valores (tanto positivos como negativos), son muy bajos. Esto se debe sólo a variaciones de un experimento a otro y de ninguna manera al efecto de los poliéteres, ya que entonces se encontraría un efecto más aparente y constante. Podemos concluir que ninguno de los ocho poliéteres corona estudiados, tiene efecto sobre el centro de reacción del FSI en las condiciones exploradas.

Cabe aclarar que los valores obtenidos para la fotorreducción de $NADP^+$ son muy bajos, incluso menores que los de consumo de oxígeno, pero esto se discutirá en conjunto con los datos de los experimentos de la reacción de Mehler, en el siguiente apartado.

6.1.2 REACCION DE MEHLER

La primera parte de los experimentos realizados en este sistema, se hicieron con el fin de observar si alguno de los ocho poliéteres interactuaba con el fierro que se encuentra coordinado

con Q_A y Q_B dentro del lado aceptor del FSII (Andersson y Styring, 1991), o con el centro fierro-azufre Rieske del complejo b_6f (Hauska, et. al. 1983; Gregory, 1989). Antes de realizar los experimentos, ya se presumía difícil una interacción de los poliéteres con el centro Fe-S de Rieske, ya que este centro tiene un homólogo, evolutivamente conservado (Trumpower, 1990; Mukai, et.al. 1989) en la mitocondria, que no es sensible a estos mismos poliéteres. Por lo anterior, se espera que de existir un efecto del poliéter éste fuera con el fierro atómico (no hemo) que se encuentra estabilizando magnéticamente a Q_A y Q_B dentro del FSII (Andersson y Styring, 1991; Miller y Brudvig, 1991). Cabe señalar que existe un reporte de Sabat y colaboradores (1991), donde indican que no existe ningún efecto inhibitorio del poliéter 18C6 cuando se utilizaba solo (i.e. sin haber formado complejo con picrato de potasio). Como ya se indicó, los experimentos iniciales de esta parte de la tesis se hicieron en ausencia de picrato y no se encontró ningún efecto inhibitorio.

También se pensó que podía ser que los poliéteres potenciaron el efecto del picrato, debido a que tienen la capacidad de formar complejo con el picrato y algún catión (en este caso potasio) (Pedersen, 1967) . Si esto sucedía, el poliéter de dicho complejo, que puede solubilizarse en la membrana lipídica, podría acercarse al picrato hacia su sitio de acción, (que en este caso ya no tendría que ser un fierro o algún otro metal), de tal manera que el poliéter serviría de transportador del picrato, facilitándole el acceso. Sin embargo, en nuestros experimentos con los ocho poliéteres en presencia de picrato $10^{-6}M$, no se observó inhibición del consumo de oxígeno en

ninguna de las tres concentraciones de poliéter probadas. Al parecer los datos obtenidos en esta investigación indican que los poliéteres corona, por lo menos los ocho empleados en este trabajo, no poseen efecto alguno sobre la cadena de transporte de electrones fotosintética, ni solos ni en presencia de picrato. Estos resultados, que nos sorprendieron en un inicio, ya que esperábamos observar una inhibición al usar a los poliéteres acomplejados con picrato, se aclararon al encontrar que el picrato por si mismo si presenta una inhibición sobre el consumo de oxígeno alcanzando inhibiciones hasta del 80% (a una concentración de $10^{-4}M$).

Una búsqueda en la literatura mostró que desde 1979 (Maroc y Garnier) trataban al picrato como una agente "ADRY", i.e. un agente acelerador de las reacciones de desactivación del sistema enzimático "Y", divisor del agua en la fotosíntesis (dicho agente aumenta la velocidad de decaimiento de los estados "S", por lo que disminuye el número de precursores en la evolución de oxígeno). Este tipo de compuestos tiene la característica de formar aniones y tener grupos acídicos NH u OH, (el picrato es un trinitrofenol).

Varios estudios hechos con el picrato indican que no actúa como desacoplante en mitocondrias intactas pero si en PSM o células evertidas; que su unión a la membrana del tilacoide no depende del pH y además que su efecto es distinto del de los herbicidas fenólicos y herbicidas del tipo del durión como el DCMU (3-(3',4'-diclorofenil)-1,1-dimetilurea) (Oettmeier y Masson, 1982; Soll y Oettmeier, 1984).

Históricamente, se sugirieron varios mecanismos de acción

para el picrato, pero todos involucran al lado reductor del FSII, específicamente el intermediario Z (Ghanotakis, et. al. 1982), cuya identidad aún permanecía desconocida en ese momento. Después de estos primeros artículos no se publicó nada más al respecto, posiblemente porque el conocimiento de los componentes del FSII todavía no había avanzado lo suficiente.

En la actualidad se ha identificado al intermediario Z como una tirosina, que se encuentra unida a la proteína D₁ (Debus, et. al. 1988; Hoganson y Babcock, 1988; Metz, et. al. 1989), y que es la encargada de transferir los electrones a P680⁺. Un posible mecanismo de acción para el picrato puede estar relacionado con una interacción tipo π entre los electrones del benceno del picrato y de la tirosina. Esta es una hipótesis que habrá que sustentar en datos experimentales de EPR.

Es importante aclarar que los valores obtenidos para el consumo en la reacción de Mehler son bajos (>40 μ molas/mg Chl/hra) comparados con los reportados en la literatura:

MATERIAL BIOLÓGICO	CONSUMO DE O ₂ μ molas/mg Chl/hra	REFERENCIA
Cianobacteria <i>Synechocystis</i> PCC6803	320	Mamedov, et.al. 1993
Cianobacteria <i>Phormidium luridum</i>	59	Dietrich y Thornberg, 1971
Cianobacteria <i>Synechococcus cedrorum</i>	350	Newman y Sherman, 1978
Cianobacteria <i>Spirulina maxima</i>	80	Lerma y Gómez-Lojero, 1980
Cloroplastos de espinaca	3200	Malkin, 1975
Cloroplastos de espinaca	120	Sabat, et.al. 1991

Esto puede deberse a varias cosas:

1) Los cloroplastos preparados para esta tesis se aislaron de espinacas, en su mayor parte durante los meses de septiembre, octubre y noviembre. Con excepción de los cloroplastos de los experimentos preliminares del poliéter 18C6 que se aislaron en junio, y los experimentos de fotorreducción que se realizaron en diciembre. Este hecho puede ser relevante puesto que algunos autores (Jagendorf y Uribe, 1966) aclaran en su artículo que los cloroplastos con los que trabajaron fueron "cloroplastos de verano", lo que nos indica que es muy posible que exista una relación entre el estado de los cloroplastos y la época del año en la que se aíslan.

2) La mayoría de los experimentos que se realizan con partículas fotosintéticas se llevan a cabo con 5-10 μ g/ml de tejido, porque al ir aumentando la cantidad de material biológico, en vez de aumentar el rendimiento, éste disminuye debido a un aumento considerable en la densidad óptica en el ensayo.

Nuestros experimentos se realizaron con 200 μ g/ml en los experimentos de consumo de oxígeno y 100 μ g/ml en los de fotorreducción debido a que tratamos de igualar las condiciones usadas por Sabat y colaboradores, sin embargo sólo logramos obtener la cuarta parte del rendimiento que ellos obtienen. Por otro lado, cabe mencionar que Sabat también tiene un bajo rendimiento en comparación con lo reportado por Malkin (1975), y es posible que también se deba a la gran cantidad de tejido empleada.

De continuarse este proyecto, se sugiere volver a realizar esta serie de experimentos con cloroplastos de temporada de verano, y cuidando los otros detalles antes mencionados.

6.2 EXPERIMENTOS CON MITOCONDRIAS

Los experimentos se llevaron a cabo en dos sistemas de estudio: mitocondrias de hígado de rata y partículas submitocondriales (PSM) de corazón de bovino. Aún y cuando ambos sistemas parten de mitocondrias de mamífero, se han reportado (Capaldi, et. al. 1988) diferencias en las subunidades de los complejos de mitocondria de especies distintas, y diferencias específicas dependientes del tejido del cual formen parte.

Los motivos por los cuales se decidieron usar estos sistemas, a pesar de las variables que pudieran introducir al trabajo fueron los siguientes:

- 1) Para los experimentos de transporte, de consumo de oxígeno en membranas acopladas y los de enzimas solubles de la matriz, es necesario trabajar con mitocondrias enteras, i.e. que posean la membrana externa e interna junto con las enzimas de matriz y espacio intermembranal, esto con el fin de que funcionen normalmente y se logre estudiar lo relacionado con su metabolismo. Para que las mitocondrias estén en un estado óptimo, (esto es: acopladas, íntegras y con las membranas lo menos dañadas posible), no se pueden guardar de un día a otro porque el proceso de congelarlas y descongelarlas daña las membranas de manera irreversible. Para lograr tener mitocondrias en buen estado hay que prepararlas cada día y la manera más fácil y práctica es utilizar un hígado de rata del cual puede obtenerse una cantidad suficiente de mitocondrias frescas para un día de trabajo, sin necesidad de desperdiciar animales o material biológico.

2) Para obtener partículas o fracciones mitocondriales, no importa que las mitocondrias estén desacopladas, ya que de todas maneras se van a fraccionar, puesto que lo que se pretende es estudiar únicamente la cadena respiratoria que se encuentra en la membrana interna, o algún componente de ella. Lo importante en este caso es partir de una gran cantidad de mitocondrias para obtener un rendimiento mayor. Además, las fracciones mitocondriales tiene la característica de poderse guardar a -70°C sin perder sus propiedades. Es por eso que el material biológico de elección para este tipo de partículas son los corazones de bovino, de los cuales se obtiene una gran cantidad de tejido, que sería poco práctico conseguir a partir de hígado de rata.

El trabajar con mitocondrias intactas provee un sistema en el cual se encuentran presentes las membranas y la matriz, mientras que en las partículas submitocondriales sólo se presenta la membrana interna.

6.2.1 EXPERIMENTOS CON MITOCONDRIAS INTACTAS

Los poliéteres que presentaron un efecto sobre el consumo de oxígeno mitocondrial a una concentración de 10^{-4}M , fueron el DB18C6, el DC18C6 y el DB30C10, mientras que el resto de los poliéteres (12C4, 15C5, B15C5, 18C6 y DB24C8), no presentan ningún efecto significativo a estas concentraciones. Los bajos valores de inhibición o estimulación que aparecen en la Tabla 1, como ya se había hecho notar, se consideran como variaciones de un experimento a otro. Sin embargo hay que recalcar que cada vez que se encontró un efecto estimulante, por más pequeño que fuera, siempre se observó en presencia de catión.

Si se comparan los resultados reportados por Estrada y Vargas (1974):

Poliéter	% de Inhibición de Consumo de O ₂ por ADP y Pi en:	
	K ⁺	Li ⁺
DB18C6	85	26
18C6	0	0
DC18C6	67	30
DB24C8	12	0
DB30C10	8	0

con los resultados obtenidos por nosotros:

Poliéter	% de Inhibición de Consumo de O ₂ por ADP y Pi en:	
	K ⁺	Li ⁺
DB18C6	69.4	57.8
18C6	-9.68	7.13
DC18C6	-56.31	27.27
DB24C8	3.46	6.99
DB30C10	-57.15	14.28

se observa que los poléteres 18C6, DB24C8 y DB30C10 presentan una inhibición muy baja o nula sobre el consumo de oxígeno ya sea en presencia de litio o de potasio, lo cual concuerda con nuestros datos. Por otro lado, los poliéteres que dan lugar a una inhibición contundente son el DB18C6 y el DC18C6, que de nuevo corresponden a los datos presentados en este trabajo. Sin embargo, si se hace un análisis más profundo se observan varias diferencias:

1) En los resultados de Estrada y Vargas (1974) ningún poliéter muestra efecto estimulante sin importar cual sea el catión presente en el medio. Por el contrario, los resultados obtenidos en este trabajo revelan un efecto estimulante del poliéter DC18C6 y del DB30C10 en el medio que tiene potasio.

2) Según Estrada y Vargas (1974), los poliéteres que presentan

inhibición, (DB18C6 y DC18C6) lo hacen de manera más evidente cuando hay potasio en el medio que cuando hay litio, a diferencia de nuestros resultados, donde la inhibición del DB18C6 es independiente de la presencia de catión en el medio; en nuestras manos, para poder observar algún efecto inhibitorio del DC18C6, el medio debe encontrarse libre de K^+ , de otra manera lo que se observa es una estimulación.

3) La inhibición obtenida por Estrada y Vargas (1974) con el DC18C6 en litio es muy similar a la inhibición obtenida por nosotros ya sea en presencia de litio o en ausencia de este catión. Por otro lado, en presencia de potasio ellos obtienen una inhibición muy alta y nosotros una estimulación.

La manera como discuten sus resultados Estrada y Vargas (1974) plantea varias alternativas:

a) Que el bloqueo del transporte de electrones esté asociado a la capacidad del DB18C6 para clatrar ya sea un K^+ unido a un acarreador de electrones en la fase lipídica de la membrana, o un metal conductor de electrones en un ambiente hidrófobo de una proteína, como podría ser un fierro de alguna proteína fierro-azufre.

b) Que el DB18C6 en su forma libre se meta dentro de la membrana provocando una interferencia en los componentes redox de la NADH deshidrogenasa.

c) Que la carga neta del complejo poliéter- K^+ sea la responsable de la inhibición del transporte de electrones modificando la carga eléctrica de la superficie de alguna proteína del segmento NADH-Coenzima Q.

d) Un mecanismo mixto donde una molécula de poliéter libre y

otra formando complejo con potasio sean las responsables del efecto observado.

Avances recientes han dado más información para tratar de explicar este fenómeno:

a) No existen potasios formando parte de la cadena oxidativa, los únicos cationes presentes son fierros no hemo formando centros Fe-S (Hatefi, 1985; Jay, 1990).

b) El efecto inhibitorio del DB18C6 sobre la oxidación de NADH en partículas transportadoras de electrones (ETP), es idéntico al obtenido para rotenona (María Eugenia Vargas, tesis de maestría, 1976), con la diferencia de que para lograr el mismo efecto que la rotenona se necesitan concentraciones de poliéter cuatro órdenes de magnitud mayores. (La rotenona actúa sobre el centro Fe-S denominado N2 de la NADH deshidrogenasa).

c) El DC18C6 es un acarreador eficiente de potasio en membranas lipídicas a diferencia del DB18C6, cuya capacidad de transporte es pobre (Pressman, 1968; Tosteston 1968).

d) El DB18C6 forma complejos de coordinación con metales pesados y de transición (Koshima y Ohnishi, 1986; Kamta, et. al. 1988; Blanco-Gomis, et. al. 1988).

e) La capacidad de extracción de cationes por el DB18C6 cambia en función de la hidrofobicidad del solvente. Usando solventes con mayor constante dieléctrica y momento dipolar, como son 1-butanol, acetato de etilo y diclorometano, la selectividad de extracción es: $K^+ > Fe^{+2} > Fe^{+3}$, mientras que en solventes hidrófobos como el cloroformo, la selectividad es: $Fe^{+2} > Fe^{+3} > K^+$ (Erika Piedras, tesis de maestría, 1989). Estos resultados se han interpretado como que el DB18C6 tiene potencialmente la

capacidad para formar complejos con fierro en un medio que podría ser la membrana lipídica.

e) El DB18C6 inhibe el consumo de oxígeno independientemente de la presencia o ausencia de catión en el medio en mitocondrias intactas y en PSM; resultados obtenidos en este trabajo.

Con estos datos parece difícil que el DB18C6 clatre una molécula de K^+ unida a un acarreador dentro de la membrana lipídica, ya que no se ha reportado la presencia de ningún potasio en este segmento de la cadena. Así mismo, el efecto tampoco puede estar relacionado al transporte de potasio, ya que el DC18C6 no es un mejor inhibidor que el DB18C6; además los datos de esta tesis no apoyan el que sea indispensable la formación de un complejo DB18C6- K^+ para que se presente una inhibición. Cabe aclarar en este punto que los experimentos realizados en el presente trabajo, así como en los del artículo de Estrada y Vargas (1974), se hicieron con mitocondrias intactas, i.e. mitocondrias que poseían potasio endógeno. Esto difiere de los experimentos de Cárabez y Sandoval (1981) donde no se encuentra ningún efecto del poliéter en mitocondrias carentes de potasio, por lo que una interacción poliéter- K^+ no se puede descartar totalmente.

Por otra parte, los experimentos de Vargas (1976) y Piedras (1989) sugieren que el DB18C6 interactúa con un centro fierro-azufre (posiblemente el N_2) impidiendo de esta manera que continúe el transporte de electrones. Lo anterior explicaría porque no encontramos una dependencia de la inhibición por el potasio.

Con respecto a la estimulación observada con algunos

poliéteres en presencia de potasio, posiblemente ésta se deba a que el poliéter actúa como acarreador del catión a través de la membrana lipídica y lo transporte al interior de la mitocondria en un movimiento a favor del gradiente, actuando de manera similar a la valinomicina. Lo anterior se sustenta en los estudios realizados con los poliéteres macrocíclicos (Pressman, 1968; Tosteston 1968) en los que se reportó que estos compuestos actuaban como acarreadores móviles de potasio en membranas lipídicas. Por otro lado, se ha reportado (Lardy, 1968), que el DC18C6 actúa como desacoplante cuando se encuentra en presencia de potasio. Este fenómeno se ve apoyado por los resultados de Pressman (1967) y de Gómez-Puyou y colaboradores (1969) que reportan que al meter cationes monovalentes como Na^+ y K^+ a la mitocondria se acelera la respiración debido a que se abate el potencial químico. Esto aclara el porque la estimulación que se observa en nuestros experimentos es únicamente en presencia de K^+ y nunca en ausencia del catión. Además hay que recordar las estimulaciones que presentaron los poliéteres de radio iónico menor (v.gr. 12C4) en presencia de litio. Aunque estas estimulaciones fueron muy pequeñas para tomarse en cuenta, su existencia nos confirma la capacidad que tienen los poliéteres corona para transportar cationes al interior de la mitocondria y estimular la respiración.

Por otro lado, es posible que en ausencia de catión para transportar, el DC18C6 se una o interactúe con el mismo sitio activo que el DB18C6 gracias a su gran parecido estructural (posee dos ciclohexilos como sustituyentes en el lugar de los dos fenilos). Esta interacción se llevaría a cabo con una menor

afinidad, como lo muestran los valores de inhibición más bajos que presenta el DC18C6 comparándolos con los del DB18C6. Sin embargo, el razonamiento anterior no aclara porqué Estrada y Vargas (1974) al usar DC18C6 en un medio con potasio encontraron inhibición, mientras que nosotros encontramos estimulación. Una suposición podría ser el hecho que ellos utilizaron una concentración de $9 \times 10^{-5}M$ de poliéter disuelto en agua, a diferencia de lo que se reporta en esta tesis, donde la concentración usada fue de $1 \times 10^{-4}M$ disuelto en DMFA. Esta explicación no parece ser suficiente para aclarar lo anterior, y aunque no nos deja muy satisfechos, carecemos de más información sobre las condiciones experimentales usadas por dichos investigadores para poder hacer un análisis más detallado.

6.2.2 EXPERIMENTOS CON PARTICULAS SUBMITOCONDRIALES

De los resultados obtenidos al estudiar el consumo de oxígeno en PSM, en presencia de los diferentes poliéteres corona, se pueden analizar varias cosas:

- 1) El consumo de oxígeno obtenido con 5mM de K^+ en el medio de reacción, sin importar el poliéter empleado, es mucho menor (la mitad), que el consumo obtenido sin K^+ . Este fenómeno es un tanto extraño con respecto a lo que se conoce por la literatura, debido a que el potasio es el catión que se encuentra más íntimamente relacionado con la mitocondria en su estado natural. En los estudios de Pressman (1967) donde se buscaron las condiciones óptimas para el acoplamiento mitocondrial, se encontró que el potasio mejora el consumo de oxígeno. Actualmente no se tiene una explicación para este resultado, sin embargo ello no afecta los

datos obtenidos, puesto que cada experimento se realizó con un control interno propio, i.e., para cuantificar si existía un cambio en el consumo de oxígeno debido a un efecto del poliéter probado, se comparó el consumo de oxígeno previo y posterior a la adición del mismo para cada uno de los experimentos y de manera independiente.

2) El DB18C6 inhibe el consumo de oxígeno independientemente de la presencia de potasio en el medio en mitocondrias intactas, mientras que en PSM se observa una menor inhibición cuando hay potasio en el medio que cuando no lo hay:

54.3% en PSM vs 66.6% en mitocondrias sin K^+

34.6% en PSM vs 69.4% en mitocondrias con K^+

El dato anterior va en contra de lo reportado por Cárabez y colaboradores (1981), ya que en sus experimentos con mitocondrias carentes de K^+ , encontraron que en ausencia de potasio no se observa inhibición. Las PSM son un sistema análogo al de dichos investigadores, ya que se encuentra libre de potasio; para tratar de entender esta diferencia hay que mencionar otra observación que se obtiene de los mismos datos, y es que la inhibición obtenida en PSM es menor a la obtenida para mitocondrias intactas, especialmente cuando hay potasio en el medio. Esta disminución se encuentra también reportada en la tesis de maestría de María Eugenia Vargas (1976), donde se estudió el efecto únicamente en presencia de potasio.

Lo que indican todos estos datos es lo siguiente:

a) Por un lado el que se encuentre inhibición del consumo de oxígeno tanto en mitocondrias como en PSM sugiere que el poliéter DB18C6 esté interactuando con algún componente de la cadena

respiratoria de manera que bloquea o interrumpe el transporte de electrones. El dato apoya el planteamiento que se ha venido discutiendo, en el cual el DB18C6 formaría un complejo por enlaces de coordinación con un fierro de los centros Fe-S del complejo I.

b) El hecho de que la inhibición obtenida en PSM sea menor a la obtenida en mitocondrias intactas, indica que tal vez el sitio de acción para el DB18C6 sea más accesible cuando se reparte hacia la membrana interna mitocondrial desde el espacio intermembranal que desde la matriz. Sin embargo, la diferencia en los porcentajes de inhibición sin potasio en mitocondrias y partículas es muy pequeña, y la diferencia mayor se observa sólo cuando hay potasio en el medio. Esto podría estar relacionado con la mencionada accesibilidad del DB18C6 por su sitio activo, ya que si efectivamente se le dificultara llegar a dicho sitio, es posible que algunas moléculas de poliéter formaran complejos con K^+ , en lugar de repartirse a la membrana e interactuar con el fierro, lo cual aclararía la discrepancia encontrada con los experimentos de Cárbaz (1981), ya que en este caso el K^+ actuaría compitiendo con el DB18C6 por su sitio de inhibición.

3) A diferencia de lo obtenido con el DB18C6, la inhibición del consumo de oxígeno sin potasio para el DC18C6 se ve aumentada: 40% en PSM vs 23% en mitocondrias.

Continuando con el razonamiento anterior, pudiera ser que así como al DB18C6 tiene menor accesibilidad al sitio de inhibición cuando se reparte a la membrana en PSM, el DC18C6 tenga una mayor accesibilidad. Esto debido a la diferencia en la estructura química de los dos poliéteres, ya que mientras el

DB18C6 es una molécula plana (con capacidad de formar interacciones tipo π), el DC18C6 presenta conformación de silla. De esta manera, lo que puede ser un impedimento estérico para una puede ser favorable para la otra.

4) Se observa una estimulación del consumo de oxígeno cuando se agregan los poliéteres DC18C6 y DB30C10 en presencia de potasio. Este es un dato sorprendente, debido a que a diferencia de las mitocondrias, donde la entrada de K^+ es suficiente para abatir el potencial eléctrico y acelerar la cadena oxidativa con su respectivo aumento en el consumo de oxígeno (Gómez-Puyou, et. al, 1969); en el caso de las PSM es necesario que salga H^+ y se intercambie K^+ para lograr desacoplarlas (Montal, et. al 1970), i.e. se debe abatir tanto el potencial eléctrico como el químico. Por ejemplo, debe haber valinomicina que saque K^+ por un lado, y nigericina que meta K^+ al mismo tiempo que saca H^+ por el otro. Lo anterior implica que si el DC18C6 actuara de manera idéntica a la valinomicina, como se ha sugerido, y no hubiera algún otro transportador presente, no se observaría una estimulación. Para que el DC18C6 tenga la capacidad de desacoplar por si mismo, debe poder transportar al interior de la mitocondria no sólo al potasio sino también a protones. Esto sería posible si se compara al DC18C6 con la gramicidina que transporta protón en algunos casos, mimetizando el efecto de ácidos débiles desacoplantes (Gómez-Puyou y Gómez-Lojero, 1977). Pudiera ser que algunas moléculas transportaran K^+ , y al bajar la concentración del catión empezaran a transportar H^+ , de esta manera se desacoplarían las partículas y se estimularía el consumo de oxígeno.

Otra explicación sería tomando en cuenta la forma en que se prepararon las PSM. La metodología empleada (Loyter, 1969) incluye la sonicación de las mitocondrias de las que se parte, en un amortiguador de fosfatos 0.1M (pH 7.4). En este caso se utilizó un amortiguador de fosfato de sodio, lo que implica que las partículas contienen por lo menos una concentración de 100mM de Na^+ en su interior. Por otro lado, se ha reportado (Mitchell, 1969) que algunas veces la sonicación hace que se pierda la fracción F_1 de la ATP sintetasa, convirtiéndola a la sección F_0 en un canal de protones. Puede entonces suponerse que las partículas hayan perdido la fracción F_1 y se encuentren expulsando protones al medio. Este fenómeno no sería suficiente para desacoplar a las PSM, puesto que sólo se estaría abatiendo el pH; pero si este movimiento de protones estuviera acompañado de una salida de Na^+ y entrada de H^+ llevada a cabo por el intercambiador mitocondrial Na^+/H^+ , junto con la salida de K^+ mediada por el DC18C6, (que al mismo tiempo estaría quitando el lastre eléctrico para que hubiera una mayor salida de protones), se abatiría tanto el potencial químico como el eléctrico y se terminaría por desacoplar a las partículas. Esto se traduciría finalmente en una estimulación del consumo de oxígeno.

El poliéter DB30C10 (que también manifiesta un efecto estimulante), tiene una cavidad interna mayor que la del DC18C6. Aún así, se ha reportado (Pedersen, 1988; Kazem y Shamsipur, 1990) que forma complejos con K^+ en una relación estequiométrica de 1:1, gracias a su alto grado de flexibilidad. Los complejos que forma el DB30C10 se han llamado "envueltos" (wrapped around) debido a que son complejos tridimensionales en los que todos los

átomos de oxígeno del anillo están coordinados con el catión central, de manera que potencialmente el DB30C10 también tendría la capacidad de transportar al potasio, y actuar de igual manera que el DC18C6 estimulando la respiración.

6.2.3 COMPLEJO I: NADH DESHIDROGENASA

En los experimentos donde se aisló al complejo I mitocondrial, no se encontró ningún efecto por parte del poliéter bajo las condiciones probadas. Esto no quiere decir que en otras condiciones no lo tenga, ya que Estrada y Cárabez (1972) reportan haber aislado un complejo I de *Hatefi* activo, que es sensible a rotenona y que también es inhibido totalmente por el poliéter DB18C6.

Nuestra preparación no tuvo tanta suerte, ya que la enzima aislada no mostró sensibilidad a rotenona, lo que de entrada disminuye la confiabilidad de la misma, ya que la sensibilidad a inhibidores específicos es un parámetro muy importante para asegurar la presencia y actividad de una enzima que se ha aislado. Sin embargo, el hecho de que la deshidrogenasa aislada no fuera sensible a rotenona y tampoco al DB18C6, puede tomarse como una confirmación de que, como se había supuesto por Estrada y Vargas (1974), el sitio de acción del DB18C6 sea el mismo que el de la rotenona, y que se haya perdido o modificado durante el aislamiento.

Además es justo aclarar que la actividad enzimática obtenida, (independientemente de la insensibilidad a rotenona) fue muy pobre comparada a lo reportado por Estrada y Cárabez (350 μ moles de NADH/min/5 mg de nitrógeno) que supera inclusive a la

actividad del mismo Hatefi (1967): 25 μ moles de NADH/min/mg de proteína, y las de Ragan (1987): 7-15 μ moles de NADH/min/mg de proteína.

Sin embargo, parece ser que no somos los únicos en perder la sensibilidad a rotenona al aislar el complejo I: Hatefi (Hatefi y Stigall, 1976; Galante y Hatefi, 1979) y otros autores (Van Dam, 1971; Ragan, 1976; Singer, 1981; Paech, 1982) reportan tres tipos de deshidrogenasa que pueden aislarse de mitocondrias de mamífero:

a) Complejo I: Es una partícula membranal que retiene todas las propiedades enzimáticas y características de EPR, de la enzima en mitocondria intacta.

b) NADH tipo I: Es una deshidrogenasa soluble de alto peso molecular con propiedades similares al complejo I excepto que no es sensible a rotenona.

c) NADH tipo II: Una proteína de peso molecular alrededor de 80 kDa, pero con propiedades enzimáticas alteradas comparada con las anteriores.

De manera que lo más probable es que nuestra deshidrogenasa sea del tipo I o del tipo II, ya que no cumple con todos los requisitos del complejo I de Hatefi. Esto explica porque en una enzima de esta naturaleza no se pudo observar la inhibición del poliéter, así como el sitio preciso donde se lleva a cabo dicha inhibición.

6.2.4 EXPERIMENTOS CON EL POLIÉTER 15C5

La realización de los experimentos con el poliéter 15C5 no forma parte de los objetivos iniciales planteados en esta tesis,

puesto que en las condiciones en las que se probaron todos los poliéteres (a una concentración de $1 \times 10^{-4}M$), el 15C5 no mostró ningún efecto. El factor que nos llevó a interesarnos por el 15C5 se debe a una serendipia, ya que por un posible efecto de evaporación del solvente, pudimos ver que a altas concentraciones el 15C5 se tiene un efecto inhibitorio sobre el consumo de oxígeno mitocondrial. Dicha inhibición es causada por el 15C5 a concentraciones mayores de $1 \times 10^{-3}M$, y es diferente de la inhibición producida por el DB18C6 a concentraciones de $1 \times 10^{-4}M$. En el caso de este último poliéter la inhibición es definitiva, como la de la rotenona, y la respiración no continúa a menos que se agregue un sustrato de sitio II ó III, ya que el DB18C6 actúa directamente sobre el sitio I de acoplamiento (Estrada y Cárabez, 1972). En cambio, la inhibición causada por el 15C5 es transitoria, porque después de cierto tiempo se restablece parcialmente la respiración (figura 7). Por otro lado, el efecto inhibitorio del 15C5 únicamente se presenta cuando se usa como sustrato oxidable al glutamato solo, y no cuando se usa combinado con malato, o empleando otros sustratos de sitio I como el β -hidroxibutirato, o de sitio II como el succinato. Esto indica que el 15C5 no actúa interrumpiendo el transporte de electrones en el sitio I como el DB18C6, sino que tiene otro efecto relacionado directamente con el glutamato.

Además sería difícil tratar de comprometer al 15C5 con la misma hipótesis que se ha planteado para la acción inhibitoria del DB18C6, debido a que se ha reportado su poca capacidad para extraer fierro de diversos solventes, en comparación con el DB18C6 y otros macrociclos de 18 componentes (Koshima y Onishi,

1986).

Una vez descartado el efecto del 15C5 sobre el transporte de electrones de la cadena oxidativa, se procedió a estudiar el efecto del poliéter sobre la deshidrogenasa glutámica donde podría impedir la formación de poder reductor, y el efecto sobre el transporte de glutamato al interior de la mitocondria.

6.2.4.1 EXPERIMENTOS CON LA GLUTAMATO DESHIDROGENASA

Los experimentos que se realizaron para buscar un efecto del 15C5 a nivel de la GDH, estaban encaminados a variar el pH del medio para facilitar la formación de amonio que, por su radio atómico, podría ser un candidato ideal para formar un complejo con el poliéter. Si este complejo se formaba dentro de la enzima impediría su buen funcionamiento, lo cual se traduciría en el efecto inhibitorio observado. Las soluciones amortiguadoras en las que se probaron los poliéteres fueron: Tris, pH 7.0; fosfatos, pH 7.6 y pirofosfato, pH 8.0. En esta última condición no se pudo analizar la cinética debido a que la afinidad por el sustrato era tan grande que todas las velocidades que se encontraron se consideraron máximas. Para tratar de explicar este hecho hay que recordar que la reacción:

$$\text{L-Glutamato} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \alpha\text{-Cetoglutarato} + \text{NADH} + \text{NH}_3 + \text{H}^+$$

(con una $K_{eq} = 1.8 \times 10^{-13}$), está desplazada hacia los productos gracias a que la concentración de protones a pH fisiológico es muy baja. En los experimentos a pH de 8.0, donde hay 1×10^{-8} M de protones, la reacción se verá todavía más favorecida. Por otro lado, se ha reportado (Strecker, 1955) que la glutamato deshidrogenasa es una enzima muy sensible a cambios de pH y de

amortiguador. A pH de 8.0 en un amortiguador de pirofosfato, se logró aumentar la afinidad de la enzima por su sustrato, sin embargo, su capacidad de transformación parece estar disminuida en comparación con las otras condiciones estudiadas donde se obtuvieron valores de V_{max} mayores.

Con respecto a los experimentos a pH 7.0 en Tris y pH 7.6 en fosfatos se encontró una mejor actividad cuando el medio estaba un poco más alcalino (pH 7.6) que cuando estaba neutro (7.0). Sin embargo, los valores de K_m y $V_{máx}$ de los experimentos realizados a estos pH son prácticamente idénticos para los experimentos control y para los tratados con el 15C5, por lo que puede concluirse que no hay efecto del poliéter 15C5 a este nivel en las condiciones experimentales aquí empleadas.

6.2.4.2 TRANSPORTE DE GLUTAMATO

6.2.4.2.1 HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL NO ENERGIZADO

Antes de estudiar el efecto del poliéter se tuvieron que estandarizar las condiciones de pH y concentración de fosfato detalladas en la parte de resultados.

Con respecto a la influencia del pH en el hinchamiento, (en ausencia de fosfato), se encontró que a pH alcalino (8.0) hay un mayor hinchamiento que a pH ácido (6.8). Esto difiere de lo reportado por Williamson y col. (1980) que indican que el hinchamiento y por lo tanto el transporte, disminuyen al aumentar el pH. La diferencia estriba en la fuerza impulsora que se emplea para que se lleve a cabo el hinchamiento, (recordando que para ello deben entrar a la mitocondria el par anión-catión). Williams

y col. (1980) usaron únicamente glutamato y protón para inducir hinchamiento. En sus experimentos a pH ácido, al tiempo cero el pH de la matriz se encontraba más alcalino que el del medio, de manera que la Δ pH era la fuerza impulsora para que penetraran el protón junto con el glutamato produciendo hinchamiento. La entrada de protón a la mitocondria seguida de una acidificación va abatiendo el Δ pH e impide que continúe el influjo. Si al tiempo cero el pH del medio es más alcalino que el de la matriz, no habrá entrada de protón y glutamato, y por lo tanto no habrá hinchamiento.

En los experimentos presentados en este trabajo, el hinchamiento está dado por la disociación del amonio en amoniaco y la difusión de éste último (como un primer evento), seguida por el transporte del protón, (liberado del amonio), y de glutamato por su acarreador específico (como un segundo evento). De este modo, el transporte de glutamato se puede ver afectado por el pH en dos sentidos:

- 1) Un efecto que puede estar relacionado con la carga neta que tenga el acarreador a un pH determinado, v.gr. la protonación de un grupo cuyo pK sea mayor que el pH empleado, y que por tener carga positiva no pueda unir al protón.

- 2) Un efecto que elimine la fuerza impulsora para el transporte de glutamato. A un pH ácido, el pH es mayor con respecto al existente en el interior de la mitocondria, pero la capacidad del amonio para disociarse en protón y amoniaco es menor (el pK del amonio es de 9.2).

Nuestros resultados también indican que cuando hay una concentración constante de fosfato en el medio (10mM), el

hinchamiento es independiente del pH. Se sabe (Chappell y Haarhoff, 1967; Chappel, 1968) que la presencia de fosfato es un requerimiento indispensable para que se lleve a cabo el transporte de varios aniones como son: malato, succinato, oxoglutarato, citrato, y en menor proporción glutamato. El efecto del fosfato sobre el transporte de los aniones se ha interpretado como que el ácido fosfórico es transportado en forma de fosfato monobásico y protón por otro acarreador específico, y posteriormente, el fosfato monobásico se intercambia en un antiport o intercambiador con el anión, facilitando de esta manera su entrada. Sin embargo, no existen reportes en la literatura sobre la existencia de un intercambiador glutamato/fosfato.

Hasta la fecha se han reportado dos transportadores de glutamato: Un acarreador que cotransporta glutamato y protón en un transporte electroneutro (Meijer, et. al. 1972; Meyer y Virgnais, 1973), y un intercambiador electrogénico que mete glutamato más protón y saca aspartato (Williamson, et. al. 1980; Dierks, et. al. 1990; Bisaccia, et. al. 1992). Por lo que el efecto del fosfato sobre el transporte de glutamato podría estar relacionado al pH de la siguiente manera:

A pH ácido podrían existir dentro de la enzima acarreadora, algunos grupos no disociados que conservan aún su protón. Al pH que manejamos, solamente los grupos imidazol de histidinas se encontrarían en dicho estado. Estos grupos podrían interactuar con el fosfato modificando de alguna forma a la enzima, o anulando cargas, de manera que el fosfato estaría jugando un papel de modulador positivo o activador del acarreador. A pH

alcalino, dichos grupos se encontrarían disociados, tal vez activando por este sólo hecho a la enzima y no se requeriría de la presencia del fosfato.

Los experimentos donde se mantuvo fijo el pH y se varió la concentración de fosfato, apoyan la idea anterior, ya que se encontró que a pH 6.8, existe una dependencia del hinchamiento por la concentración de fosfato en el medio, mientras que a pH 8.0 el hinchamiento es independiente del fosfato.

Además, las cinéticas que se observan en las figuras 9 y 10 para el pH 6.8 indican que el transporte de glutamato se lleva a cabo por un acarreador que alcanza velocidades máximas al agregar concentraciones de 20 a 25mM de fosfato al medio, y que después ya no aumenta su velocidad, como si se saturara o alcanzara su máxima capacidad catalítica. Por el contrario, cuando se trabaja a pH 8.0, la enzima es independiente de la concentración de fosfato, y esto se puede interpretar argumentando que los valores obtenidos corresponden a velocidades máximas, en las cuales la enzima tiene su mayor capacidad catalítica.

Con respecto al 15C5, no se observó ningún efecto a pH de 8.0, pero a pH 6.8 se observó una diferencia en el trazo del hinchamiento. Esta diferencia fue la que dió el primer indicio de que el efecto del 15C5 estaría relacionado con el transporte de glutamato, y por eso se llevaron a cabo experimentos adicionales de transporte.

6.2.4.2.2 HINCHAMIENTO ENERGIZADO

Los trazos de hinchamiento energizado usando

valinomicina, potasio y glutamato, (Fig 19) muestran una diferencia entre el experimento que tiene poliéter y el que no lo tiene. Esto se confirma al compararlos con los de consumo de oxígeno estimulados con valinomicina de la figura 20, donde se vuelve a observar una inhibición del 70% en presencia del 15C5 que no se ve en ausencia del mismo. Al mismo tiempo, los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de la tabla 14, así como las gráficas de la figura 18, indican que mientras la K_m se mantiene constante, los valores de $V_{m\acute{a}x}$ disminuyen en presencia del poliéter 15C5 cuando se usa glutamato como sustrato. Todos estos datos apuntan hacia el transporte de glutamato como el sitio de acción del 15C5.

Cuando se utiliza succinato en lugar de glutamato como sustrato oxidable, no se observa una diferencia contundente en los trazos de hinchamiento (figura 22) ni inhibición alguna en el consumo de oxígeno inducido por valinomicina. Los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ (tabla 14), así como la figura 21, indican que no hay una inhibición en presencia de este sustrato, lo que confirma que el efecto observado para el 15C5 sea sobre el transporte de glutamato. Hay que aclarar en este punto, que el hinchamiento que se observa no es debido únicamente a la entrada de glutamato o succinato, sino también (aunque en menor medida) al movimiento de fosfato que se agregó en forma de fosfato de amonio para facilitar la entrada de los otros sustratos. Sin embargo, esto no modifica los datos anteriores, puesto que el fosfato se utilizó de manera idéntica tanto en los experimentos de glutamato o succinato como sustrato, así como en los de con y sin poliéter.

Asumiendo que el efecto del 15C5 sea directamente sobre el sistema de transporte de glutamato, se puede interpretar el

restablecimiento parcial de la respiración como una redistribución del 15C5 entre las membranas y el compartimiento interno. Considerando que el primer sitio donde se incorpora el poliéter, al agregarlo al medio de reacción, es la membrana, una gran cantidad de poliéter estaría al inicio dentro de la membrana interna donde llevaría a cabo su efecto inhibitorio. Con el paso del tiempo, habría un reparto del 15C5 entre la membrana y el compartimiento interno acuoso (matriz), hasta llegar a un equilibrio, de manera que cierta cantidad de poliéter se alejaría del sitio de inhibición, restableciendo parcialmente la respiración.

Por otro lado, con los datos obtenidos en este trabajo, sería difícil tratar de interpretar sobre cual de los transportadores de glutamato actúa el 15C5, si es que lo hace específicamente sobre uno de ellos. Se sabe (Dierks, et. al. 1990; Bisaccia, et. al. 1992) que el mecanismo de transporte mediado por el intercambiador glutamato/aspartato es un mecanismo ordenado, en el cual el acarreador posee un sitio de unión de cada lado de la membrana y deben estar ocupados los dos sitios para formar un complejo transportador competente. Parece ser que existe un sitio de unión a protón diferente de estos dos sitios y que la protonación es un primer evento que aumenta la afinidad del acarreador por glutamato. Este evento es electrogénico y para llevarse a cabo requiere consumir energía para sacar una carga negativa de la matriz. Por la acción de agentes mercuriales, este antiportador puede convertirse en un transportador unidireccional que saca aspartato (Dierks, et. al. 1990), con una especificidad

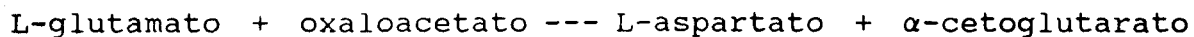
muy baja y que no es saturable. Se cree que en condiciones normales la salida de aspartato representa la dirección fisiológica del acarreador.

Mientras que el acarreador que cotransporta glutamato junto con protón lo hace de manera electroneutra, se asume que el glutamato reacciona como anión, cuando el protón ya se encuentra unido al acarreador, formando un complejo ternario (Williamson, et. al. 1980). El transporte es inhibido por N-etil-maleimidias y bromocresol.

Los resultados presentados en la figura 3, donde se observa inicialmente un aumento de la inhibición al ir incrementando la concentración de glutamato, que después de aproximadamente 8mM empieza a decaer, podrían interpretarse considerando que, a bajas concentraciones de glutamato, se está activando el acarreador de alta afinidad que se inhibe por el 15C5. A altas concentraciones empieza a trabajar el acarreador de baja afinidad, que posiblemente sea menos sensible al poliéter.

Una suposición podría ser la de que, a bajas concentraciones de glutamato, estemos observando el cotransporte de glutamato con protón, ya que en el estado inicial las mitocondrias no tienen aspartato para intercambiar. Al ir aumentando la concentración de glutamato dentro de las mitocondrias, (asumiendo que no todos los acarreadores se encuentran inhibidos por el 15C5), podría aumentar también la concentración de aspartato, esto sería factible si se considera que gracias al metabolismo del glutamato (formación de α -cetoglutarato por acción de la glutamato deshidrogenasa) se estén obteniendo intermediarios del ciclo de Krebs, como el oxaloacetato, que pudiera transaminarse con parte

del glutamato que está entrando para formar aspartato, en una reacción catalizada por la aspartato-aminotransferasa o por la aspartato transaminasa:



Las reacciones catalizadas por las tranaminasas son reversibles y tienen una constante de equilibrio alrededor de 1.0 y las mitocondrias, especialmente las de hígado, tienen una gran capacidad de transaminación. Por lo anterior pudiera ser que a altas concentraciones de glutamato, se manifestara el efecto del intercambiador glutamato/aspartato, sin embargo, faltan experimentos que lo confirmen y que indiquen de manera más exacta donde está actuando el poliéter.

Se pueden diseñar experimentos de transporte usando para esto glutamato radioactivo, además de experimentos de hinchamiento energizado con otro sustrato diferente al glutamato.

Si se confirma la inhibición específica del 15C5 habría que probar sobre cual acarreador se lleva a cabo; para esto se podría aprovechar la cualidad de que el cotransportador glu/H⁺ es electroneutro, mientras que el intercambiador glu/asp⁻ es electrogénico (ya que el glutamato entra junto con protón y el aspartato sale en forma de anión (Dierks, et. al. 1990). Además el intercambiador tiene la capacidad de abatir tanto el potencial químico (mete protones), como el eléctrico (saca cargas negativas) y esto puede usarse como una gran herramienta experimental para diferenciarlos.

La inhibición del transporte de glutamato es de gran interés, ya que no se encuentra reportado actualmente ningún inhibidor específico para dicho transporte. Los inhibidores que

se han reportado son mercuriales como el mersalil y maleimidas alquilantes como las N-etil-maleimidas (Meijer y Van Dam, 1981; Diers, et. al. 1990) los cuales son agentes que reaccionan con los grupos sulfhidrilo, y estos grupos se encuentran presentes en varios acarreadores como los de fosfato, α -cetoglutarato, piruvato, carnitina, etc. El descubrir un inhibidor específico del transporte de glutamato sería una herramienta muy útil en el estudio del transporte mitocondrial.

7. CONCLUSIONES

7.1 EXPERIMENTOS CON CLOROPLASTOS:

El picrato posee un efecto inhibitorio, específicamente sobre el fotosistema II.

Los poliéteres corona no muestran inhibición sobre el transporte de electrones fotosintético y no potencian la inhibición por picrato.

7.2 EXPERIMENTOS EN MITOCONDRIAS:

No obstante que los poliéteres corona que presentan una clara inhibición en mitocondrias intactas y PSM (DB18C6 y DC18C6), muestran una relación estructural, el DC18C6 sólo manifiesta su efecto inhibitorio en ausencia de potasio.

Los poliéteres corona que estimulan la cadena oxidativa (DC18C6 y DB30C10), lo hacen siempre en presencia de potasio, lo que sugiere que están actuando como acarreadores de dicho catión.

Nuestros datos indican que el poliéter 15C5 tiene un efecto inhibitorio sobre el transportador de glutamato mitocondrial .

El transporte de electrones en la respiración presenta ciertos componentes semejantes a los del transporte de electrones fotosintético, sin embargo el blanco de acción de los poliéteres

corona en la mitocondria no tiene contraparte en la cadena de transporte de electrones fotosintética.

8. BIBLIOGRAFIA

- Andersson, B. y String, S. (1991) Photosystem II: Molecular Organization, Function and Acclimatation; *Current topics in Bioenergetics*, 16:1-18
- Azzi, A. y Müller, M. (1990) Cytochrome c Oxidases: Polypeptide Composition, Role of Subunits and Location of Active Metal Centers. *Arch. Biochem. Biophys.* 280(2):242-251.
- Bisaccia, F., De Palma, A. y Palmieri, F. (1992) Identification and Purification of the Aspartate/Glutamate Carrier from Bovine Heart Mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta.* 1106(2):291-296
- Blanco-Gomis, D., Arias-Abrodo, P. y Sanz-Medel, A. (1988) Macrociclos Sintéticos en Química Analítica. I Tipos de Poliéteres y sus Propiedades Complejantes, *Quim. Anal.* 7(3):241-279.
- Capaldi, R.A., González-Halphen, D., Zhang, Y.Z. y Yanamura, W. (1988) Complexity and Tissue specificity of the Mitochondrial Respiratory Chain; *J. Bioenerg. Biomemb.* 20(3):291-311
- Capaldi, R.A. (1988) Mitochondrial Myopathies and Respiratory Chain Proteins. *TIBS*, April:144-148.

- Capaldi, R.A. (1990) Structure and Function of Cytochrome c Oxidase, *Annu. Rev. Biochem.* 59:569-596.
- Cárabez, A. y Sandoval, F. (1981) On the Mechanism of Action of Polyether XXVIII at Site I of Electron Transfer Chain in Rat Liver Mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta.* 638:125-131.
- Chappell, J.B. y Crofts, A.R. (1965) Gramicidin and Ion Transport in Isolated Liver Mitochondria; *Biochem. J.* 95:393-402
- Chappell, J.B. y Haarhoff, K.N. (1967) The Penetration of Mitochondrial Membrane by Anions and Cations; en: *Biochemistry of mitochondria* (edited by Slater, E., Kaniuga, Z. and Wojtczac, L.), Academic Press, London, 75-91
- Chappell, J.B. (1968) Systems Used for the Transport of Substrates into Mitochondria; *Br. Med. Bull.* 24:150-157
- Colman, R.F. (1991) Glutamate Deshydrogenase (Bovine liver), en: *A Study of Enzymes*, Vol. II: Mechanism of Enzyme Action. Ed. Stephen A. Kuby, CRC Press, U.S.A.: 173-192.
- Conway, B.E. (1981) Ionic Hydration in Chemistry and Biophysics, en: *Studies in Physical and Theoretical Chemistry* 12, Elsevier. Sci. Publ. Co. Amsterdam. pág: 65

- Cramer, W.a., Widger, W.R., Herrmann, R.G. y Trebst, A. (1985) Topography and Function of Thylacoid Membrane Proteins, *TIBS*, March 125-129.
- Cramer, W.A. y Knaff, D.B. (1991) Energy Transduction, en: *Biological Membranes*, Springer Study Edition. N.Y. Cáp 9: Active Transport: 406-465.
- Davis, K.A. y Hatefi, Y. (1971) Succinate Dehydrogenas.I. Purification, Molecular Properties, and Substructure, *Biochemistry*. 10(13):2509-2516.
- Debus, J.R., Barry, B.A., Sithole, G.T., Babcock y MacIntosh, L. (1988) Directed Mutagenesis Indicates that the Donor to P⁺₆₈₀ in Photosystem II is Tyrosine-161 of the D1 Polypeptide; *Biochem*, 27 (26): 9071-9074
- Debus, J.R., Barry, B.A., Babcock y MacIntosh, L. (1988) Site-directed Mutagenesis Identifies a Tyrosine Radical Involved in the Photosynthetic Oxygen-evolving System, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85:427-430
- Dierks, T., Salentis, A., Heberger, C. y Krämer, R. (1990) The Mitochondrial Aspartate/Glutamate and ADP/ATP Carrier Switch from Obligate Counter exchange to Unidirectional Transporte after modification by SH-reagents, *Biochem. Biophys. Acta*. 1028:268-280

- Dierks, T., Salentis, A. y Krämer, R. (1990) Pore-like and Carrier-like Properties of the Mitochondrial Aspartate/Glutamate Carrier after Modification by SH-reagents: Evidence for a Preformed Channel as Structural Requirements of Carrier-mediated Transport. *Biochem. Biophys. Acta.* 1028:281-288
- Eastbrook, R.W. (1967) Mitochondrial Respiratory Control and the Polarographic Measurements of ADP:O ratios; *Meth. Enzymol.* Vol X: 41-47
- Estrada-O, S. y Cárabez, A. (1972) Specific Inhibition by Macrocyclic Polyethers of Mitochondrial Electron Transport at Site I, *Bioenerg.* 3:429-443.
- Estrada-O, S. y Gómez-Lojero, C. (1976) Electron Transfer and Energy Coupling at the NADH-Ubiquinone Segment of Mitochondria, en: *Mitochondria: Bioenergetics, Biogenesis and Membrane Structure.* Academic Press Inc. N.Y. pp.167-181.
- Estrada-O, S. y Vargas, M.E. (1974) Los Acarreadores de K⁺ y el Reconocimiento de Sitios Funcionales Comunes en el Transporte de Electrones de Mitocondrias, Cloroplastos y Bacterias Fotosintéticas; en: *Los perfiles de la bioquímica en México,* 397-441
- Estrada-O, S. (1983) El Descubrimiento de los Ionóforos Carboxílicos, *Ciencia.* 34:183-192

- Eisenman, G., Szabo, G., McLaughlin, S.G.A. y Ciani, S.M. (1973)
Molecular Basis for the Action of Macrocyclic Carriers on
Passive Ionic Translocation Across Lipid Bilayers Membranes,
Bioenergetics. 93-148
- Erecinska, M. y Wilson, D.F. (1982) Regulation of Cellular Energy
Metabolism. *J. Membr. Biol.* 70:1-14.
Bioquím. Fac. Medicina,, UNAM. Méx. Vol III:283-277.
- Ghanotakis, D.F., Yereks, Ch.T. y Babcock, G.T. (1982) The Role
of Reagents Accelerating the Deactivation Reactions of
Water-splitting Enzyme System Y (ADRY Reagents) in
Destabilizing High-potential Oxidizing Equivalents Generated
in Chloroplasts PSII. *Biochim. Biophys. Acta.* 682:21-31
- Golbeck, J.H. y Bryant, D.A. (1991) Photosystem I; *Current
topics in Bioenergetics*, 16:83-177
- Golbeck, J.H., Mehari, T., Parret, K. y Ikegami, I. (1988)
Reconstitution of the Photosystem I Complex from the P700
and F_X containing Reaction Center Core Protein and F_A/F_B
Polypeptide. *FEBS LETTERS*. 240 (1-2):9-14
- Golbeck, J.H., Parret, K. Mehari, T., Jones, K.L. y Brand, J.J.
(1988) Isolation of the Intact Photosystem I Reaction Center
Core Containing P700 and Iron-sulfur Center F_X *FEBS LETTERS*.
288 (2):268-272

- Gómez-Puyou, A. y Gómez-Lojero, C. (1977) The use of Ionophores and Channel Formers in the Study of the Function of Biological Membranes, *Current topics in Bioenergetics*, vol. 6:221-257
- Gómez-Lojero, C. (1974) Propiedades de las Antibióticos Ionóforos y Consideraciones Acerca de su Selectividad para Cationes Alcalinos. en: Los Perfiles de la Bioquímica en México. 381-396
- González-Halphen, D. (1990) El Complejo bc₁ de la Cadena Respiratoria Mitocondrial, *Ciencia*. 41:133-152.
- Gornall, A.G., Bardawill, Ch.J., y David, M.M. (1949) Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction; *J. Biol. Chem.* 177:751-766
- Gregory, R.P.F. (1989) *Biochemistry of Photosynthesis*, tercera edición, Wiley-Interscience Publications, Great Britain, 257 pp.
- Haehnel, W. (1984) Photosynthetic Electron Transport in Higher Plants; *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 35:659-693
- Hansson, O. y Wydrzynski, T. (1990) Current Perceptions of Photosystem II; *Photosynt. Res.* 23:131-162

- Hatefi, Y. y Stiggall, D.L. (1976) Metal-Containing Flavoprotein Dehydrogenases, en: *The Enzymes*. Vol XIII, Part C, 3rd Ed.
- Hatefi, Y. y Rieske, J.S. (1967) Preparation and Properties of DPNH- Coenzyme Q reductase (Complex I of the respiratory chain); *Meth. Enzymol.* Vol X:235-239
- Hatefi, Y. (1985) The Mitochondrial Electron Transport and Oxidative Phosphorylation System, *Ann. Rev. Biochem.* 54:1015-1069.
- Hausaka, G., Hurt, E., Gabellini, N. y Lockau, W. (1983) Comparative Aspects of Quinol-cytochrome c/plastocyanin Oxidoreductases, *Biochem. Biophys. Acta.* 726:97-133.
- Ingledeu, W.J. y Ohnish, T. (1980) An Analysis in some Thermodynamic Properties of Iron-Sulphur Centers in Site I of Mitochondria, *Biochem. J.* 186:111-117.
- Izatt, R.M. (1969) Binding of Alkali Metal Ions by Cyclic Polyethers: Significance in Ion Transport Processes. *Science.* 164:443-444
- Jacobs, E.E., Jacobs, M., Sandi, D.R. y Bradley, L.B. (1956) Uncoupling of Oxidative Phosphorylation by Cadmium Ions; *J. Biol. Chem.* 223:147

- Jagendorf, A.T. y Uribe, E. (1966) Photophosphorylation and the Chemi-Osmotic Hypothesis. en: Energy Conversion by the Phoyosynthetic Apparatus. Brookhaven Symposia in Biology. 215-245
- Jay, D., Zamorano, R., Muñoz, E., Gleason, R. y Boldú, J.L. (1990) Centros Fierro-Azufre de la Cadena Respiratoria Mitocondrial. Una Revisión de Resultados de Resonancia Paramagnética Electrónica, *Ciencia*, 41(3):265-276.
- Johnson, D. y Lardy, H.A. (1967) Isolation of Liver and Kidney Mitochondria; *Meth. Enzymol.* Vol X:94
- Kadenbach, B. y Merle, P. (1981) On the Function of Multiple Subunits of Cytochrome c Oxidase from Higher Eukariots. *FEBS*. 135:1-11.
- Kazem, M. y Shamsipur, M. (1991) Complex formation of silver, thallium and alkali cations with dibenzo-30-crown-10 in some non-aqueous solutions, *Inorg. Chim. Acta.* 183:65-69
- Kotyk, A. (1983) Coupling of Secondary Active Transport with μ_{H^+} *J. Bioenerg. Biomemb.* 15 (6):307-319
- Krauss, N., Hinrichs, W., Witt, I., Fromme, P., Pritzkow, W., Dauter, Z., Betzel, Ch., Wilson, K.S., Witt, H.T. y Saenger, W. (1993) Three-dimensional Structure of System I of Photosynthesis at 6 Å Resolution, *Nature*, 361:326-330

- Lardy, H. (1968) Influence of Antibiotics and Cyclic Polyethers on Ion Transport in Mitochondria; *Fed. Proc.* 27 (6):1278-1282
- Löw, H. y Vallin, I. (1963) Succinate-linked Diphosphopyridine Nucleotides Reduction in Submitochondrial Particles; *Biochem. Biophys. Acta.* 69:361-374
- Lowry, O.H., Rostebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) Protein Measurment with the Folin Phenol Reagent; *J. Biol. Chem.* 193:256-275
- Loyter, A., Christiansen, R.O., Stendsland, H., Satltzgaber, J. y Racker, E. (1969) Energy-linked ion Translocation in Submitochondrial Particles; *J. Biol. Chem.* 244:4422-4427
- Malström, B.G. (1990) Cytochrome Oxidase: Some Unsolved Problems and Controversial Issues. *Arch. Biochem Biophys.* 280(2):233-241.
- Mamedov, M., Hayashi, H. y Murata, N. (1993) Effects og Glycinebetaine and unsaturation of Membrane Lipids on Heat Stability of Photosynthetic Electron-transport and Photophosphorylation in *Synechocystis* PCC6803. *Biochi. Biophys. Acta.* 1142:1-5

- Mehari, T., Parrett, K.G., Warren, P.V. y Golbeck, J.H. (1991) Reconstitution of the Iron-sulfur Clusters in the Isolated F_A/F_B Protein: EPR Spectral Characterization of Same-species and Cross-species Photosystem I Complexes, *Biochim. Biophys. Acta.* 1056:139-148.
- Maroc, J. y Garnier, J. (1979) Photooxidation of the Cytochrome b-559 in the Presence of various substituted 2-Anilinothiophenes and of some other compound in *Chlamydomones reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta.* 548:374-385
- Metz, J.G., Nixon, P.J., Rögner, M., Brudwig, G.W. y Diner, B.A. (1989) Directed Alteration of the D1 Polypeptide of Photosystem II: Evidence that Tyrosine-161 is the Redox Component, Z, Connecting the Oxygen-evolving Complex to the Primary Electron Donor P680; *Biochem*, 29 (17):6960-6969
- Meijer, A.J., Brouwer, A. Reijngoud, D.J., Hoek, J.B. y Tager, J.M. (1972) Transport of Glutamate in Rat Liver Mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta.* 283:421-429
- Meyer, J. y Virgnais, P.M. (1973) Kinetic Study of Glutamate Transport in Rat Liver Mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta.* 352;375-384

- Miller, A.F. y Brudvig, G.W. (1991) A Guide to electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy of Photosystem II Membranes, *Biochim. Biophys. Acta.* 1056:1-18
- Mitchell, P. (1961) Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemiosmotic type of Mechanism, *Nature.* 191:144.
- Mitchell, P. y Moyle, J. (1965) Evidence Discriminating between the Chemical and the Chemiosmotic Mechanisms of Electron Transport Phosphorylation. *Nature.* 208: 1205-1206
- Mitchell, P. (1967) Proton-translocation Phosphorylation in Mitochondria, Chloroplasts and Bacteria: Natural Fuel Cells and Solar Cells, *Fed. Proc.* 26(5):1370-1378.
- Mitchell, P. y Moyle, J. (1969) Translocation of some Anions Cations and Acids in Rat Liver Mitochondria. *Eur. J. Bioch.* 9:149-155
- Mitchell, P. (1977) Vectorial Chemiosmotic Processes. *Annu. Rev. Biochem.* 46:996-1005.
- Mitchell, P. y Moyle, J. (1982) Protonmotive Mechanisms of Quinone Function, en: *Function of Quinones in Energy Conserving Systems.* Academic Press, Inc. N.Y. pp.553-575.

- Montal, M. Cance, B. y Lee, C.P. (1970) Iona Transport and Energy Conservation in Submitochondrial Particles, *J. Memb. Biol.* 2:201-234
- Mukai, K., Yoshida, M., Toyosaki, H., Yao, Y., Wakabayashi, S. y Matsubara, H. (1989) An Atypical Heme-binding Structure of Cytochrome c of *Euglena gracilis* Mitochondrial complex III, *Eur. J. Biochem.* 178:649-656
- Nelson, N. (1987) Structure and Function of Protein Complexes in Photosynthetic Membrane; en *Photosynthesis*, J. Amesz (ed). Elsevier Science Publishers B.V. p:213-232
- Nicholls, D.G. (1982) Bioenergetics, Academic Press Inc. N.Y. 191pp.
- Odell, B. (1985) The Dissolution of Polynucleotides in Non-aqueous Solvents using Macrocyclic Polyethers. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 858-859
- Odell, B. y Earlam, G. (1985) Dissolution of Proteins in Organic Solvents using Macrocyclic Polyethers: Association Constants of a Cytochrome c-[1,2-¹⁴C₂]-18-Crown-6 Complex in Methanol. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 359-361
- Oettmeier, W. y Masson, K. (1982) Picrate as an Inhibitor of Photosystem II in Photosynthetic Electron Transport. *Eur. J. Biochem.* 122:136-167

- Ohnishi, T., Ragan, C.J., y Hatefi, Y. (1985) EPR Studies of Iron-sulfur Clusters in Isolated Subunits and Subfractions of NADH-Ubiquinone Oxidoreductase, *J. Biol. Chem.* 260 (5): 2782-2788.
- Ohnishi, T., Ragan, C.I. y Hatefi, Y. (1985) EPR Studies of Iron-Sulfur Clusters in Isolated Subunits and Subfractions of NADH- Ubiquinone Oxidoreductase, *J. Biol. Chem.* 260(5):2782-2788.
- Ohnishi, T., Schagger, H., Meinhardt, S.W., LoBrutto, R., Link, T.A. y Von Jagow, G. (1989) Spatial Organization of the Redox Active Centers in the Bovine Heart Ubiquinol-cytochrome c Oxidoreductase, *J. Biol. Chem.* 264(2):735-744.
- Peach, C. (1982) Improved Assay for NADH Dehydrogenase of the Respiratory Chain, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*
- Piedras, E. (1989) Interacción del Poliéter Macro-cíclico DB18C6 con metales de transición presentes en la Cadena de Transporte de Electrones Mitocondrial, Tesis de Maestría en Biología Experimental. UAM-I, México, D.F.
- Pedersen, C.J. (1967) Cyclic Polyethers and Their Complexes with Metal Salts. *J. Am. Chem. Soc.* 89 (26):7017-7036

- Pedersen, C.J. (1968) Ionic Complexes of Macrocyclic Polyethers;
Fed. Proc. 27 (6):1305-1309
- Pedersen, C.J. (1988) The Discovery of Crown Ethers (Noble
Lecture) *Angew. Chem. Int. Engl.* 27:1021-1027.
- Pressman, B.C. (1968) *Fed. Proc.* 27:1283
- Ragan, C.I., Wilson, M.T. Darley-Usamar, V.M. y Lowne, P.N. (1987)
Sub-fraction of Mitochondria and Isolation of the Proteins
of Oxidative Phosphorylation. en: *Mitochondria: A Practical
Approach.* Darley-Usamar, MV, Rickwood, D y Wilson, MT
Editores. IRL Press, Oxford-Washington.
- Reeves, S.G. y Hall, D.O. (1980) Higher Plant Chloroplasts and
Grana: General Preparative Procedures (Excluding High Carbon
Dioxide Fixation Ability Chloroplasts). *Methods in Enzymol.*
Vol.
- Rieske, J.S. (1967) Preparation and Properties of Reduced
Coenzyme Q-Cytochrome c Reductase (Complex III of the
Respiratory Chain); *Meth. Enzymol.* Vol X:239-245
- Sabat, S.C., Vijayavergeriya, V., Tripathy, B.C. y Mohanty, P.
(1991) Inhibitory Effect of Crown Compound on Photoelectron
Transport Activity of Beet Spinach Thylakoid Membranes. *Z.
Naturforsch.* 46c:87-92

Schägger, H., Kink, Th.A., Engel, W.D. y Von Jagow, G. (1986)
Isolation of the Eleven Protein Subunits of the bc₁ Complex;
Meth. Enzym. 126:224-237.

Scherer, S. (1990) Do Photosynthetic and Respiratory Electron
Transport Chains Share Redox Proteins?, *TIBS*, 15:458-462

Shell, A. y Shell, C. (1967) Colorimetric Methods of Analysis.
Vol IVA; D. Van Nostrand Company, Inc. Princeton, New
Jersey; 307-331

Tosteson, D.C. (1968) Effect of Macrocyclic Compounds on the
Ionic Permeability of Artificial and Natural Membranes. *Fed.*
Proc. 27 (6):1269-1277

Trumpower, B.L. (1990) The Protonmotive Q Cycle. *J. Biol. Chem.*
265(20):11409-11412.

Trumpower, B.L. (1990) Cytochrome bc₁ Complexes of
Microorganisms, *Microbiol. Rev.* 54(2):101-129.

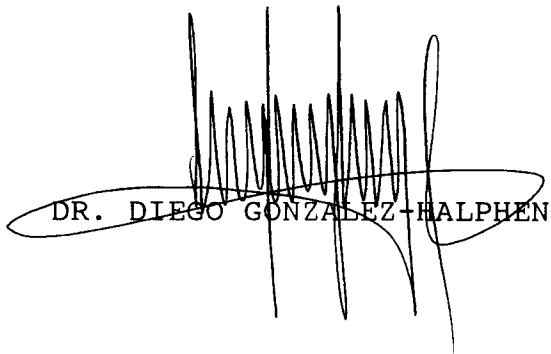
Van Dam, K. y Meyer, A.J. (1971) Oxidation and Energy
Conservation by Mitochondria; *Ann. Rev. Biochem.* 40: 115-160

- Vargas-Linares, M.E. (1976) Los Poliéters Macroclícos como Inhibidores de la Transferencia de Electrones del Segmento NADH-Coenzima Q de la Cadena Oxidativa Mitocondrial; Tesis de Maestría en Ciencias (Bioquímica), CINVESTAV del IPN. México, D.F.
- Wallace, B. Yang, Y. Hong, J. y Lum, D. (1990) Cloning and Secuencing og a Gene Encoding a Glutamate and Aspartate Carrier of *Escherochia coli* K-12, *J. Bacteriol.* 176(6):3214-3220
- Weber, E. (1984) Progres in Crown Ethers. New Applications of Crown Compounds in Chemical Analysis. *Kontakte (Darmstadt)* 1:26-43
- Williamson, J.R., Hoek, J.B., Murpy, E., Coll, K.E. y Njogu, R.M. (1980) Kinetics and Mechanisms of Glutamate Transport Across the Mitochondrial Membrane, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 341:593-608.
- Witt, (1991) Functional Mechanism of Water Splitting Photosynthesis. *Photosynt. Res.* 29:55-77
- Wynn, R.M. y Malkin, R. (1988) Characterization of an Isolated Chloroplast Membrane Fe-S Protein and its Identification as ths Photosystem I Fe-S_A/Fe-S_B binding Protein. *FEBS LETTERS* 229 (29):293-297

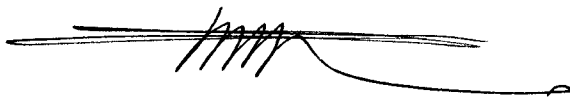
EL JURADO DESIGNADO POR EL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA,
APROBO EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS DE DIA 12 DE JULIO DE 1993.



DR. CARLOS GOMEZ-LOJERO



DR. DIEGO GONZALEZ-RALPHEN



DR. SERGIO ESTRADA-ORIHUELA