



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

(136)

EFFECTO DE FOSVITINA SOBRE EL FENOMENO DE FUSION DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Tesis Profesional

Que para obtener el título de:

Q U I M I C O

P r e s e n t a :

Erika Sofía Von Raesfeld Ojeda

México, D. F.

1980



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE AL TEMA

PRESIDENTE: DRA. GRACIELA MEZA RUIZ
VOCAL: DR. EDMUNDO CHAVEZ COSSIO
SECRETARIO: DR. ALFONSO CARABEZ TREJO
1er. SUPLENTE: M.C. ROCIO SALCEDA SACANELLES
2o. SUPLENTE: DRA. VICTORIA CHAGOYA DE SANCHEZ

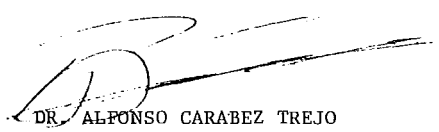
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN FISIOLOGIA CELULAR

UNAM

SUSTENTANTE:


ERIKA SOFIA VON RAESEFELD OJEDA

ASESOR DEL TEMA:


DR. ALFONSO CARABEZ TREJO

A MI MADRE

Con caballos libres cómo el viento,
Permitiste que viajára junto a ellos,
Soltaste de mi rienda y esperaste,
A que yo escogiera la senda que deseaba.

A paso firme galopé por mi camino,
Nó sin antes haberme tropezado,
Más tú siempre estabas a mi lado,
Para quitar las piedras que me herían.

Nó dejaste que mi ímpetu cesara,
Y corrí feliz por la pradera sin descanso,
Aprendí lo que tanto anhelaba,
Y hoy, he llegado al final de ése camino.

GRACIAS MITA.

A PIPO Y ABI

A PALOMA Y NENE

A EDUARDO

Mi agradecimiento al Dr: Alfonso Cárabez Trejo

Gracias al:

Sr: Jorge Sepúlveda Sánchez

Quién procesó las muestras de microscopía electrónica

Centro de Investigaciones en Fisiología Celular

Sítio donde se desarrollo el trabajo.

Gracias a:

Sra: Estela Porter de Fernández.

Ing: Jorge Caraballo C.

Quim: Herbert Scholz Ojeda.

Por su apreciable ayuda y consejos.

INDICE

- 1) INTRODUCCION.
 - I.) FUSION DE MEMBRANAS. IMPORTANCIA.
 - II.) ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA EN RELACION A LA FUSION DE MEMBRANA.
 - III.) LIBERTAD DE MOVIMIENTO DE LAS MACROMOLECULAS DE LAS MEMBRANAS.
 - IV.) CONDICIONES PARA LA FUSION DE MEMBRANA.
 - V.) ESQUEMA DE LA FUSION DE MEMBRANA.
- 2) FOSVITINA.
- 3) MATERIALES Y METODOS.
 - a) AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS DE HIGADO DE RATA.
 - b) DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA.
 - c) DETERMINACION DEL CONTROL RESPIRATORIO DE MITOCONDRIAS AISLADAS.
- 4) MICROSCOPIA ELECTRONICA.
- 5) AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE FOSVITINA.
- 6) METODOS DE AISLAMIENTO.
 - 1) METODO DE F. J. JOUBERT Y W. H. COOK.
 - 2) METODO DE DALE K. MECHAM Y HAROLD S. OLGOTT.
- 7) DIALISIS.
- 8) ELECTROFORESIS DE PROTEINAS.
- 9) ELECTROFORESIS DE FOSVITINA.
- 10) EFECTO DE FOSVITINA SOBRE FUSION DE MEMBRANA.
- 11) RESULTADOS.
- 12) DISCUSION.
- 13) BIBLIOGRAFIA.

INTRODUCCION

I.- FUSION DE MEMBRANAS. IMPORTANCIA.

En las células la fusión de membranas es necesaria para una gran variedad de funciones entre las que podemos señalar entre otras: la incorporación (endocitosis) y subsecuente digestión de material intracelular, así como también el transporte y descarga de material intracelular hacia el espacio intracelular (exocitosis). La formación de vesículas endocitóticas en la superficie de la célula implica la invaginación de un segmento de la membrana plasmática, que se debe fusionar para dar lugar a una vesícula cerrada. Subsecuentemente la digestión del contenido de dichas vesículas involucran una serie de secuencias de fusión de membranas entre estas vesículas y lisosomas así como con vesículas provenientes del aparato de Golgi.

La fusión de membranas también desempeña un importante papel en el proceso inverso: la exocitosis, en la cual la fusión se lleva a cabo en la superficie de la célula, entre la membrana de la vesícula exocitótica y la membrana plasmática. La descarga exocitótica es básica para el proceso de excreción y secreción de la célula; y participa en la liberación de una amplia variedad de enzimas, hormonas y sustancias neurotransmisoras generadas por un amplio tipo de células secretoras especializadas en dichas funciones.

Aunque se han propuesto hipótesis alternativas sobre la liberación de productos de secreción, tales como la transferencia del contenido del gránulo a un depósito en la membrana plasmática, de donde el producto es liberado de la célula como gránulos intactos; existen evidencias experimentales, tanto bioquímicas como ultraestructurales, que apoyan el punto de vista de que dicha liberación ocurre por fusión entre la membrana de los gránulos y la membrana plasmática. La exocitosis ofrece una ventaja adicional sobre otras formas de secreción, en la cual el estímulo para la liberación del producto de secreción puede actuar directamente en la membrana plasmática que además de ser el sitio de fusión, es el sitio de liberación.

Es claro, al observar la Tabla I, que la fusión de membrana desempeña un papel importante en la liberación de los productos celulares de secreción, los cuales son esenciales para la homeostasis.

La fusión de vesículas del aparato de Golgi a ciertas regiones de la membrana plasmática, es un fenómeno común en la mayoría de las células, si no en todas, y puede servir como un posible mecanismo tanto para mantener variaciones cuantitativas y cualitativas en la distribución de material en la membrana celular como para la determinación de la especificidad de componentes en la superficie celular.

Es importante señalar que el fenómeno de fusión no puede ser considerado en forma aislada con respecto a otros aspectos de la actividad membranar. Dicho fenómeno de membrana está también involucrado en el recambio y distribución de membranas y sus componentes dentro de la célula.

Además es claro que la continúa fusión de vesículas endocitóticas con lisosomas, vesículas de Golgi y la membrana plasmática, que ocurre en todas las células, provee un mecanismo para el mantenimiento de cambios de especificidad de los componentes de las diversas membranas intracelulares.

Finalmente, a nivel intracelular, la fusión de membrana es requerida en el ensamble de la cubierta nuclear que sigue a la carioquinéisis; la formación de poros en la membrana nuclear y la formación del septo que permite la separación de las células hijas después de la división celular.

Los eventos que requieren la fusión de membrana son igualmente comunes en las interacciones intercelulares. La zona ocluida observada "in vivo" entre dos membranas de células vecinas, implican fusión parcial de un área limitada de la membrana plasmática de las dos células para formar una estructura membranar pentalamelar.

T A B L A I

FUSION DE MEMBRANA EN SECRECION Y EXOCITOSIS

TEJIDO	DIAMETRO DEL GRANULO SECRETOR (μm)	SUBSTANCIA SECRETADA	DEMOSTRACION DE FUSION POR M.E.
Médula Suprarrenal	0.2	Catecolaminas	+
Neurohipófisis	0.15	Oxitocina	+
	0.15	Vasopresina	+
Adenohipófisis	0.25	Melanotropina	+
	0.1	Hormona tirotrófica	+
	0.25	Hormona luteinizante	+
	0.3	Hormona de crecimiento	+
	0.6	Prolactina	+
	0.2	Adrenocorticotrofina	+
Páncreas	0.3	Insulina	+
Glándula Salival	1.0	Amilasa	+

Las membranas fusionadas que se encuentran en estos sitios pueden funcionar como áreas de interacción célula-célula, para el intercambio de macromoléculas e iones así como de comunicación. Este tipo de fusión puede ser importante para el mantenimiento de la polaridad espacial y orden social dentro de las comunidades celulares que constituyen un tejido (1).

En otras situaciones, la fusión completa de la membrana plasmática de células adyacentes tienen lugar para formar puentes intercelulares, lo cual indudablemente permite una forma más completa de comunicación entre célula y célula, ya que casi todas las macromoléculas y la mayoría de los organelos pueden ser transferidos entre células por medio de estos puentes (2).

El establecimiento de continuidad citoplasmática entre dos o más células por fusión de sus membranas y formación de puentes está considerado como elemento esencial en el desempeño de un papel importante en los mecanismos de sincronización y desarrollo de gametos, tanto masculino como femenino en una amplia variedad de especies animales y vegetales (3).

La fusión completa entre células para formar células multinucleadas (policariocitos) esta también muy bien documentada (4), y mucho del conocimiento que se tiene de la reacción de fusión de membrana, se ha derivado de observaciones realizadas durante el proceso de fusión celular (5). Esta última es también una respuesta importante en situaciones patológicas (6). La fusión de macrófagos libres y retados, es una respuesta celular común en un gran número de condiciones inflamatorias crónicas inducidas por una variedad de agentes químicos, físicos y biológicos (7). Las células multi-

nucleadas se presentan frecuentemente tanto en tumores naturales, como en condiciones experimentales inducidas en el laboratorio (7).

Está claro que la fusión de membrana posee un significado vital en la economía y función de la célula.

La integridad de muchos organelos celulares y ciertos rasgos de la coordinación funcional entre células, está estrechamente asociado a este aspecto del comportamiento de la membrana (8).

Es importante saber que disfunciones patológicas en las varias actividades digestivas tanto de excreción como de secreción de la célula, pueden resultar de la falla o alteración de la reacción de fusión de membrana; y que el valor terapéutico de ciertas drogas en tales condiciones puede afectar su capacidad por alterar la capacidad de fusión de la membrana.

II.- ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA EN RELACION A LA FUSION DE MEMBRANA.

Para dar un significado adecuado al término de la estructura cuando se aplica a membrana, es necesario conocer la organización espacial de sus componentes. También es necesario, para un mejor entendimiento de la reacción de fusión de membranas, el conocimiento de la conformación preferida en la membrana de las macromoléculas y su libertad de movimiento, ya que estos factores determinan el tipo interacción que puede ocurrir entre ellas, en las membranas adyacentes, durante la fusión.

El modelo de mosaico fluido (9) para la estructura de la membrana, ofrece la ventaja de que los componentes de ésta no necesitan existir en una distribución rígida. Este tipo de organización estructural ofrece considerables oportunidades para cambios rápidos en las conformaciones y

en la redistribución de estos elementos membranales en respuesta a alteraciones en el medio ambiente cercano a la membrana.

Esta capacidad para efectuar cambios rápidos en la conformación, que es un buen ejemplo de una situación en la cuál, las macromoléculas de la membrana deben poseer una libertad de movimiento considerable, tanto para facilitar la formación de enlaces entre las macromoléculas de membranas adyacentes así como para permitir una rápida recuperación a su estado nativo inmediatamente después de la fusión.

III.- LIBERTAD DE MOVIMIENTO DE LAS MACROMOLECULAS DE LAS MEMBRANAS.

La fusión entre dos membranas solo puede ocurrir cuando las interacciones moleculares dentro de si mismas, no son más grandes que aquellas a través de la distancia que separa a dichas membranas.

La capacidad de las macromoléculas membranales para moverse y formar enlaces químicos y físicos estables con macromoléculas similares presentes en otra membrana, serán claramente importantes en los eventos primarios de la reacción de fusión.

PAPEL DEL COLESTEROL EN EL MOVIMIENTO DE MOLECULAS DE FOSFOLIPIDOS.

Este compuesto actúa como un factor importante en la determinación de la capacidad de diferentes membranas para la fusión (10). Así la presencia del colesterol se esperaría que promoviera orden y rigidez en las membranas para realizar la fusión y para dar capacidad de respuesta ante una variedad de efectores líticos y celulares.

En diversos estudios realizados anteriormente (10), se encontró que las células con un alto contenido de colesterol en su membrana plasmática, fueron más resistentes al daño producido por choque osmótico, tensiones mecánicas y citólisis inmune, que aquéllas que tienen un contenido menor (11).

No se encontró ninguna correlación entre esta capacidad de resistencia de la membrana plasmática con la producción y composición de fosfolípidos (12, 13). Estos datos ilustran la necesidad de examinar la capacidad de fusión de membranas en un tipo específico de célula, por medio de virus como el SV5, antes de obtener conclusiones, ya que una línea celular que es resistente a la fusión por virus, puede ser altamente susceptible a la fusión por otros agentes debido a un nuevo arreglo membranal como es el que presentan algunas células que ya han sido previamente fusionadas con virus (14, 15).

A partir de los resultados obtenidos en las condiciones experimentales anteriormente mencionadas, es necesario obtener información más amplia sobre la composición lipídica de las membranas en relación a su susceptibilidad para la fusión.

La propiedad de fluidéz (4) de los fosfolípidos en membranas y la capacidad para el movimiento lateral de los lípidos, consecuencia de la fluidéz de éstos, en las membranas biológicas pueden desempeñar un papel importante en la regulación estructural de los componentes de la membrana y podría tener un efecto importante en el establecimiento de enlaces estables entre macromoléculas de membranas adyacentes, durante la reacción de fusión.

Aún así, es importante el reconocer que la fluidez y las oportunidades para difusión lateral de los componentes membranales pueden tener como objeto el limitar áreas de la membrana importantes para dicho evento (16, 17, 18).

IV.- CONDICIONES PARA LA FUSION DE MEMBRANA.

La fusión de membrana requiere de que las membranas deban primero ser colocadas en posiciones opuestas a distancias moleculares (19). El contacto entre membranas (adhesión) es un requisito obvio para una subsecuente fusión (19).

Para poder establecer que dos membranas están fusionadas, en lugar de estar separadas por una pequeñísima hendidura; es necesario usar una serie focal, o bien en microscopía electrónica el movimiento angular para poder examinar cuidadosamente la interfase entre las membranas (20).

En adición a las limitaciones al definir los límites espaciales de membranas en contacto, la fijación de membranas para el microscopio electrónico, puede afectar significativamente su estructura. Cualquier cambio en la fuerza iónica, especies iónicas, temperatura y constantes dieléctricas del medio que las rodea, afectará las fuerzas electrostáticas dentro y entre las membranas, así como de las fuerzas atractivas a través de dichas estructuras.

Por ejemplo, la fijación de multicapas de lecitina con KMNO_4 produce un aumento de cargas de superficie; mientras que la fijación con osmio tiene un efecto opuesto. Donde la fusión de membrana ocurre como un evento muy rápido, la fijación química convencional puede no ser lo suficien-

temente rápida para captar dicho fenómeno. El cálculo de velocidad de penetración del glutaraldehído a las células, dá valores de aproximados 0. 01%; pero la actividad fijadora efectiva puede requerir mayor tiempo y probablemente varíe tanto entre diferentes tipos de fijadores, así como con los diferentes tipos de material celular a fijar.

La teoría desarrollada por Derjaguin y colaboradores, indica que la energía de interacción de membranas, es el resultado del equilibrio entre fuerzas atractivas y repulsivas. En general, las fuerzas electrostáticas tienden a mantener separadas a las membranas mientras que las fuerzas atractivas, tales como las fuerzas London y Van der Waals, tienden a favorecer la interacción y el contacto de la membrana (21).

V.- ESQUEMA DE LA FUSION DE MEMBRANA.

Se considera razonable, después de analizar los datos anteriormente presentados, el dividir la reacción de la fusión de membranas en cuatro períodos o fases:

- 1) Contacto (adhesión); que implica la aproximación de las membranas a fusionar.
- 2) Inducción: El desplazamiento de elementos iónicos como el Ca^{++} de las membranas, así como el movimiento de las partículas intramembranales.
- 3) Fusión: El establecimiento de enlaces intermembranales estables.
- 4) Estabilización: La recuperación de la membrana recientemente fusionada a condiciones normales.

FASE 1.- Contacto de Membranas.- Es un requisito esencial para la fusión el que haya un contacto molecular directo entre las membranas.

El contacto está influenciado directamente por la oposición de las membranas, mediado por las fuerzas ya señaladas anteriormente.

La fusión de membrana es un proceso altamente ordenado que está restringido a situaciones y condiciones específicas. La especificidad de la interacción de contacto entre dos membranas, puede en parte, determinar su capacidad para fusionarse.

FASE 2.- Inducción.- Esta fase es importante por considerar el desplazamiento de Ca^{++} , ATP y Mg^{++} entre otros de las membranas. Dicho desplazamiento es necesario para generar un aumento en la libertad de movimiento y una transformación estructural de los lípidos en la membrana; además aumenta la permeabilidad a cationes por dicha estructura, por otro lado existe una reducción en la resistencia eléctrica de la membrana. Hay evidencias que indican la participación de la ATP asa dependiente de Ca^{++} y Mg^{++} en esta fase, la cual es inhibida por condiciones en que se tiene un aporte continuo de Ca^{++} y/o ATP disponibles, lo que resulta en una estabilización de las membranas. Por otro lado ya que la estructura fundamental de fusión es la bicapa lipídica, ha sido propuesto que las partículas intramembranales presentes en la zona sensibilizada para la fusión, deban desplazarse en sentido lateral para dejar una zona de bicapa libre. Estas evidencias han sido logradas a través de la técnica de criograbado y criofractura (22).

FASE 3.- Fusión.- El proceso de fusión per se, se logra por el establecimiento de enlaces entre las moléculas presentes en las membranas que se van a fusionar. La capacidad para este tipo de interacción molecular podrá manifestarse sólo después de que la fase 2 ha sido realizada. El

desplazamiento de Ca^{++} de las membranas en la segunda fase es necesaria para incrementar la libertad de movimiento de los lípidos de la membrana y posiblemente de las proteínas de membrana, además aumenta el número de sitios de interacción potencial por un aumento en el número de sitios ionofóricos titulables, generando un desorden general de la estructura, perturbación que en un momento dado puede favorecer el enlace y contacto entre los componentes macromoleculares en las dos membranas.

Teóricamente la fluidéz de la membrana contribuye a que el resultado de la reacción de fusión tenga éxito en dos formas:

Primero: que las moléculas en un fluido lipídico tendrían una mayor libertad de movimiento. Esto, junto con el aumento adicional de la libertad de movimiento y el desorden de las moléculas resultantes del desplazamiento del Ca^{++} aumentaría la oportunidad para una interacción exitosa entre las moléculas de las membranas opuestas que se van a fusionar.

Segundo: una estructura de membrana fluida, favorecería la rápida interacción de los componentes en las membranas opuestas lo cual promovería una rápida reconstrucción de esta estructura a su estado original, después de la fusión.

La interacción y posterior fusión de membranas es un ejemplo más de la capacidad de las membranas para actuar como estructuras organizadas capaces de conducir por si mismas cambios estructurales reversibles y de significado funcional en respuesta a la presencia de otras membranas y agentes.

FASE 4.- Estabilización.- Esta fase es esencialmente el proceso reverso de la segunda fase, e implica el reemplazo de Mg^{++} , Ca^{++} y ATP a sus sitios originales en la membrana. Esta recuperación es bloqueada por factores que limitan la disponibilidad del Ca^{++} y ATP y la terminación de esta fase, requiere la introducción de energía al sistema.

El estímulo inicial de la reacción de fusión no ha sido definido, más aún, dado que los agentes que causan la fusión de membrana son muy diferentes, es difícil ver como pueden actuar para inducir una secuencia con eventos comunes en la membrana a lo largo de los pasos descritos anteriormente.

Rubin y colaboradores (23), sugirieron que la formación de lisofosfátidos en las membranas, puede promover la fusión de membranas. Existen evidencias, que apoyan esta proposición en forma experimental, las cuales fueron obtenidas por Lucy y colaboradores (24), al demostrar que la lisolecitina era capaz de fusionar eritrocitos de gallina "in vivo", aunque las células fusionadas eran altamente inestables.

Existen una gran variedad de agentes lipofílicos y lipolíticos que son capaces de inducir la fusión, entre ellos se pueden mencionar el retinol, el ácido oleico, el monooleato de glicerol, el propilén glicol, la sacarosa, D1 sfingosina, el sorbitán monolaureato y la fosfolipasa C. Esta lista sin duda va a ir en aumento con el tiempo, conforme se acumulen evidencias experimentales de fusión de membrana (25, 26) con otros agentes.

Poste y Allison (12, 27, 28), han propuesto que la formación de contactos mínimos primarios entre las membranas plasmáticas opuestas, es suficiente para iniciar la reacción de fusión.

Esta proposición se derivó de observaciones sobre el efecto del potencial eléctrico aplicado a la superficie de la célula y en las propiedades de la membrana plasmática. Dichos autores propusieron que cambios en el potencial de superficie de la célula podrían alterar el potencial electrostático dentro de la membrana lo que genera cambios radicales en las propiedades electrostáticas de las membranas, lo que ha sido deducido por la reorientación de grupos dipolo cargados, observados dentro de la membrana. Esta proposición está apoyada también por observaciones realizadas en sistemas de membranas artificiales, que han demostrado que la permeabilidad iónica es una función del potencial de superficie de la membrana.

La rapidez de la reacción de fusión y el hecho de que está restringida a regiones limitadas de las membranas interactuantes, indican que las investigaciones detalladas tanto con técnicas bioquímicas como biofísicas de los cambios de la membrana durante la fusión, requerirán un sistema experimental en donde un gran número de eventos que se llevan a cabo a diferentes tiempos puedan ser detectados.

FOSVITINA

La presencia de una proteína fosforilada en la yema de huevo de gallina fue descubierta en 1900; sin embargo el primer estudio detallado de la fracción más altamente fosforilada, fue hecho por Mecham y Olcott en 1940 (29), fracción a la que llamaron fosvitina; nombre que describe una proteína con alto contenido en fósforo y que su fuente de obtención es la yema de huevo. Dichos autores aislaron un producto que representa cerca de un 7% de la proteína de la yema y que contenía 10% de fósforo lo que representa cerca del 60% del fósforo de la yema de huevo. Esta proteína, con un peso molecular mínimo de 20,000 daltones, fue reportada como homogénea en la ultracentrífuga; pero heterogéneo bajo ciertas condiciones de cromatografía por electrofóresis.

Resultados obtenidos por estudios posteriores, la mayoría de naturaleza fisicoquímica, apoyaron la sugerencia de que la fosvitina puede ser un complejo formado con otros componentes de la yema de huevo.

Los pesos moleculares de los componentes mayores y menores de la fosvitina, fueron calculados como 40,000 y 36,000 daltones respectivamente. El contenido de fósforo y nitrógeno de esta proteína es cercano al del ácido vitelínico, un derivado de la yema de huevo, siendo la relación molar nitrógeno/fósforo de 2.7.

Las preparaciones purificadas de fosvitina, contienen 6.5% de carbohidratos, que se distribuyen como 6 residuos de hexosa, 5 de glucosamina (considerados como derivados N-acetilo), y 2 de ácido siálico por mola de proteína.

Estudios bioquímicos más recientes han revelado los siguientes puntos sobre la fosvitina.-

a) La fosvitina contiene un número casi igual de residuos serilo y fosforilo.

b) Que por lo menos un residuo de fosfotreonina está presente en la fosvitina.

c) La hidrólisis ácida de la o-fosfoserina ó residuos fosfoserilo de la fosvitina, liberan piruvato y amoníaco como productos principales de descomposición, cuando se adiciona fósforo inorgánico.

En cuanto a la conformación de la cadena polipeptídica de la fosvitina, se sabe que la estructura específica de la misma, depende críticamente de la naturaleza de las cadenas laterales de los aminoácidos que la conforman y que, alteraciones significativas se generan con cambios del pH; así las propiedades conformacionales pueden ser explicadas al considerar a la fosvitina como un polielectrolito macromolecular típico, por lo que se supone que ésta propiedad debe compartir las características de ese tipo de compuestos (5, 6). Esta suposición se basa en los resultados experimentales obtenidos por la medida de la viscosidad; ya que en soluciones acuosas ó en bajas fuerzas iónicas, sus moléculas adquieren una configuración extendida, como resultado de una fuerte repulsión electrostática entre los grupos ácidos cargados negativamente, de las cadenas laterales de los aminoácidos que la componen. Por tanto parece ser que la fosvitina es un anión polivalente a cualquier pH en que se prepara su solución.

MATERIALES

Centrífuga refrigerada. (Lourdes Mod. Betafuge).

Centrífuga Spinco Mod. L5 - 65

Aparato de electroforesis en gel poliacrilamida.

Espectrofotómetro Zeiss Elko III.

Microcentrífuga Beckman Mod. 152.

Microscopio Electrónico Jeol Mod. 100 B.

Monitor de Oxígeno Mod. 55 YSI

Ultramicrotomo Reichert Mod. UmO 3.

MÉTODOS

Obtención de Mitocondrias

a) Método de Aislamiento. Método de Hagihara modificado por Greenawalt y Schaitman (30) en medio "H".

b) Determinación de Proteína. Método de biuret (31).

c) Control de actividad respiratoria.

Método Polarográfico de la actividad respiratoria mitocondrias.

a) AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS DE HIGADO DE RATA.

Para este estudio se emplearon ratas macho de cepa local, de 250 g; en ayuno 16 hrs. con objeto de eliminar, por utilización metabólica, el glucógeno almacenado. El hígado se extrajo después de sacrificar al animal, y se lavó brevemente con agua de la llave para eliminar la sangre residual. Se transfirió a un vaso de precipitados que contenía aproximadamente 25 ml de medio "H" (sacarosa

0.07M, D-Manitol 0.21 M, Hepes 0.05M, BSA 0.5 g/l, pH 7.4 con NaOH), a 4°C. Se cortó en pequeños fragmentos y se lavó dos veces más con un volumen igual de medio "H", con objeto de eliminar sangre y bilis presentes en el tejido.

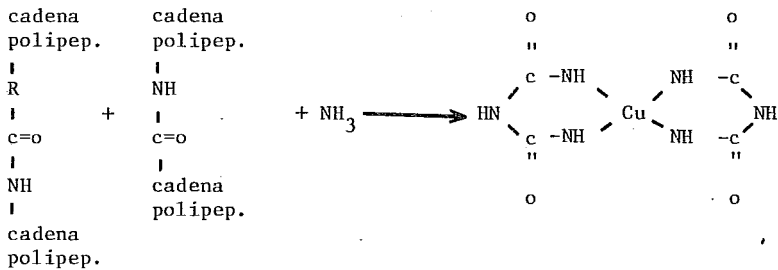
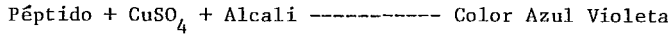
El tejido finamente picado se homogenizó en 40 ml de medio "H" después de lo cual se llevó a un volumen de 150 ml, este homogenizado se filtró en Nytell de 25, 50 y 110 mallas, y se procedió a distribuir el filtrado en cuatro tubos de centrifuga de 40 ml, que se centrifugaron por 10 min. a 600 x g a 4°C. Al término del tiempo el sobrenadante se decantó cuidadosamente, evitando la contaminación del sobrenadante con elementos del paquete formado y se transfirió a otros cuatro tubos, los cuales se centrifugaron a 7000 x g, por 10 min.; con esta centrifugación en el paquete que se forma se obtiene la fracción mitocondrial cruda; el sobrenadante se elimina y dicho paquete mitocondrial se resuspendió en medio "H" con pipeta y se llevaron con el mismo medio hasta aproximadamente 80 ml. Se centrifugó a 9100 x g durante 10 min. El sobrenadante se eliminó y se procedió como en el paso anterior a resuspender el paquete, que se centrifugó nuevamente a 9100 x g por 10 min.

Al final de esta centrifugación se obtuvo la fracción mitocondrial purificada en el paquete formado, el cual se resuspendió en un volumen mínimo de medio "H" (aprox. 1 ml), ya que las mitocondrias a mayor concentración se conservan por más tiempo (fig. 1).

b) DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA

REACCION DE BIURET.

Esta reacción es para enlaces peptídicos, los que en presencia de solución alcalina de cobre producen un color violeta característico de las soluciones de sulfato cúprico diluido. La reacción es:



Método de ensayo:

TUBO	1	2	3	4	5
H ₂ O (ml)	0.5	0.49	0.49	0.49	0.49
Patrón de albúmina (100 mg/ml) ml.	-	1.0	-	-	-
Suspensión de Mito. C. (μl)	-	-	5	10	20
NaOH 10% (ml)	2	2	2	2	2
Colato de Na. (ml).	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
A G I T A R					
CuSO ₄ 1% (ml).	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente para el desarrollo del color.

Leer en un espectrofotómetro a 550 nm. La curva estandar se realizó empleando albúmina de suero de bovino.

c) DETERMINACION DEL CONTROL RESPIRATORIO DE MITOCONDRIAS AISLADAS.

El control respiratorio se determinó por medio de un electrodo sensible al oxígeno, cuya señal se transfiere por medio de un amplificador a un graficador para obtener el registro gráfico. La comparación del medio de respiración fue:

Reactivo	Conc.	Vol.	Conc. Final
Amortiguador de Fosfatos.	0.1 M	0.1 ml	3.3 mM
Cloruro de Potasio.	1.0 M	0.01 ml	0.3 mM
Cloruro de Magnesio.	0.1 M	0.05 ml	2.0 mM
Substrato Oxidable.	0.1 M	0.1 ml	3.3 mM
Medio "H"	-	2.675 ml	-
Mitocondrias	100 mg/ml	<u>0.03 ml</u> 3.0 ml	3.3 mg 1.0 mg

Se deja estabilizar la señal del electrodo y se ajusta el registrador a 100%, conc de O_2 se grafica por un minuto y se añaden las mitocondrias. Para determinar la actividad respiratoria se añade al medio 6mM de ADP. La cantidad de ADP es limitante y por lo tanto se acaba, las mitocondrias regresan al estado basal, Estado IV de respiración que presentaban antes de la adición del ADP, la adición de una nueva alícuota

de ADP repite la estimulación de la respiración (Edo. III), repitiéndose el mismo ciclo ya señalado cuantas veces sea necesario para que se termine el oxígeno disuelto en el medio (aproximadamente cuatro veces).

En la figura a se muestra un registro control de esta actividad mitocondrial, y como se calcula el control respiratorio, cuyo valor nos indica la capacidad funcional de la preparación. Aquellas preparaciones con valores inferiores a cuatro, no se emplean por considerárseles no funcionalmente intactas.

MICROSCOPIA ELECTRONICA

Fijación, Infiltración e Inclusión de Organelos Subcelulares Empleando la Microcentrífuga.

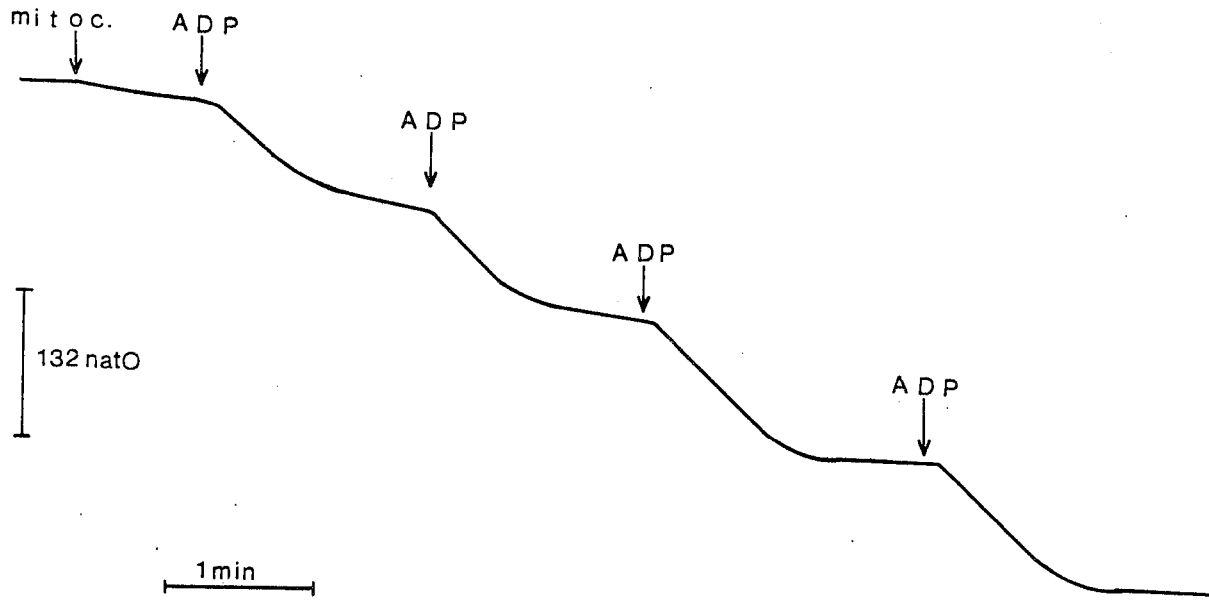
1-) Los tubos de la microcentrífuga (0.4 ml volumen total), se llenan con una solución de glutaraldehido al 3% en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4 y se mantiene a 4°C.

2) Se añade aproximadamente 0.5 mg de proteína (en no más de 10 µl de volumen) y se centrifuga durante 30 segs. ó bien se deja fijar en suspensión por dos horas a 4°C en la solución de glutaraldehido y después de este tiempo se procede a centrifugar.

Al cabo de las dos horas de fijación se retira con pipeta Pasteur el glutaraldehido y se substituye con medio de lavado que contiene.

3) Dejar toda la noche a 4°C.

Si se quiere postfijar inmediatamente con tetróxido de osmio, se hacen cuatro cambios, cada quince min. con medio de lavado a 4°C.



CONTROL RESPIRATORIO DE
MITOCONDRIAS AISLADAS DE HIGADO DE RATA

figura a

Los pasos 4 y 5 se hacen en la campana de extracción ó en un área bien ventilada, pues los vapores de tetróxido de osmio son tóxicos.

4) Extraer el medio de lavado y reemplazar por tetróxido de osmio al 2% en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4 a 4°C por 2 horas máximo. Quitar la solución de osmio.

5) Lavar con acetona al 50% a 4°C, 2 veces, 10 min. cada cambio

6) Lavar con acetona al 60%, 2 veces por 10 min. cada cambio

7) Lavar con acetona al 95%, 2 veces por 10 min. cada cambio

8) Lavar con acetona al 100%, por 30 min. a 4°C. cada cambio

9) Lavar con acetona al 100% por 30 min. a temperatura ambiente.

10) a) Diluir resina completa 1:1 con acetona absoluta.

b) Colocar la resina diluida en viales.

Cortar el fondo de los tubos de la microcentrífuga sin tocar el paquete; desprender por presión el paquete con un objeto romo; cortar el tubo y dejar caer el paquete en la resina diluida, evitando su secado en la interfase.

c) Poner los viales con las muestras en un desecador (sin vacío), que contiene sílica gel con indicador de humedad; infiltrar por 24 a 48 horas.

11) Transferir con palillo las muestras a cápsulas BEEM ó de gelatina (00), que contienen resina sin diluir; esperar que las muestras lleguen al fondo, polimerizar a 60°C por 24 hrs. si la mezcla es de dureza para navaja de vidrio y 36 a 48 horas, si la mezcla es de dureza para navaja de diamante.

AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE FOSVITINA

Se procedió al aislamiento de fosvitina debido a que la fosvitina comercial empleada en los primeros experimentos, dió resultados satisfactorios como inductor de la fusión de membranas, no así un segundo lote comercial.

En base a lo anterior supusimos que la fosvitina posee un componente específico ó contaminante presente en el primer lote (pero no en el segundo), capaz de inducir efectos sobre la respiración mitocondrial así como la fusión de membrana, por lo cual se decidió a aislar y analizar la fosvitina para estudiarla más ampliamente.

METODOS DE AISLAMIENTO

1) Método de F.J. Joubert y W.H. Cook. (32).

Este procedimiento se basó en la observación de Mecham y Olcott de que la fosvitina puede ser precipitada en presencia de una concentración dada de sulfato de magnesio.

Método.- (con ligeras modificaciones al original).

40 grs. de yemas resuspendidas en 120 ml de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0, 4M + 3.94 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Se filtraron y la mezcla se agitó por una hora, evitando la formación de espuma, al cabo de la cuál se centrifugó a 2500 rpm. durante 30 min., el material lipídico que flota, se separó por filtración y decantación.

El filtrado se diluyó lentamente con un volumen igual de agua; y se dejó con agitación durante 2 horas. El precipitado que se forma

(principalmente fosvitina), se separó por centrifugación a 2500 rpm/por 30'. El paquete obtenido, se redisolvió en 80 ml de $MgSO_4$ 0.4 M y se reprecipitó. Este precipitado después de separarlo por centrifugación se disolvió en 10 ml de NaCl al 10% y se centrifugó por 2 horas a 105,000 x g, el líquido subnatante se removió cuidadosamente y se diluyó en 20 ml de NaCl al 10%, el cual se dializó contra varios cambios de amortiguador de acetatos (0.1 M, pH 4.0), con objeto de precipitar la lipovitelina remanente, dicho precipitado se eliminó por centrifugación (1300 x g/10'), la solución sobrenadante se dializó contra amortiguador de acetatos (0.1 M, pH 4.0) toda la noche, los sólidos que se formaron se eliminaron por centrifugación 15 min. a 7000 x g. El dializado se liofilizó.

La fracción de fosvitina así obtenida se mantuvo en congelación.

2) Método de Dale K. Mecham and Harold S. Olcott (29).

Por este método se obtuvo una preparación de fosfoproteína que contenía cuando menos 10% de fósforo, se aisló de la yema de huevo con un rendimiento de suficiente para dar por lo menos el 60% del Fósforo de proteínas totales presentes.

Método.-

A 600 g de yema de huevo de gallina sin la membrana vitelina se les agregó 300 ml de $MgSO_4$ 1.2 M, pH 6.0 (que contienen 120 mg de thimerosal, Lilly). La mezcla se agita vigorosamente por una hora sin que se produzca espuma. A continuación se añaden 3 litros de agua destilada de tal forma que la adición se lleve a cabo en el lapso de una hora; se agita nuevamente por una hora y media más.

Después de 18 horas a temperatura ambiente (la superficie cubierta con tolueno), el precipitado suave y pegajoso que se forma se colectó por centrifugación; descartándose la fracción soluble a pH 5.9.

El precipitado colectado se resuspendió con 400 ml de sulfato de amonio 0.4 M y se agitó por 45 minutos a temperatura ambiente. La dispersión se ajustó a pH 4 por adición de H_2SO_4 6 N.

Después se añadieron 80 ml de amortiguador de acetatos 1M pH 4. La dispersión se agitó vigorosamente con 375 ml de éter etílico y se dejó durante toda la noche a temperatura ambiente para la separación de fases, la capa acuosa opalescente se separó y la mezcla restante se centrifugó para separar la fase acuosa adicional. La fase de éter se descartó.

La extracción del residuo (emulsión gelatinosa), se repitió 3 veces más con sulfato de amonio 0.4 M en amortiguador de acetato 1M a pH 4, en la proporción previamente usada. Los volúmenes empleados en orden sucesivo fueron de 250, 200 y 200 ml; con el primero de estos volúmenes se agregaron 75 ml de éter, y ningún volumen de éter se colectó sino hasta la extracción final de sales. Sólo el último de estos extractos fue separado por centrifugación, los dos primeros se quedaron a temperatura ambiente durante la noche antes de separar la capa acuosa. El residuo gelatinoso insoluble se descartó.

Los extractos obtenidos en el paso anterior de sulfato de amonio fueron lavados con una porción de aproximadamente 200 ml de éter etílico. Después de 30 a 45 min. de reposo, la capa acuosa que se separó durante el lavado se eliminó y se filtraron los extractos a través de papel filtro de poro grueso.

Los filtrados se agitaron nuevamente con 200 ml de éter etílico y las fracciones acuosas se filtraron a través de un vidrio de porosidad media, cubierta con media pulgada de ayuda filtro de alta fluidez.

El filtrado (pH 4.1), que era perfectamente claro y de color ligeramente amarillo, se dializó durante la noche contra 500 ml de sulfato de amonio saturado más sulfato de amonio sólido en exceso (con agitación lenta).

Los sacos de diálisis se transfirieron a dos litros de sulfato de amonio saturado ajustado a pH de 4 con ácido acético glacial en presencia de sulfato de amonio sólido.

Después de la diálisis, se separa un sólido gelatinoso de color blanco, la mayor parte del cuál pudo ser colectado por centrifugación. El resto fue colectado por filtración a través de vidrio poroso.

El precipitado colectado se mezcló con 12.5 ml de NaCl 5M y después se diluyó con agua a un volumen total de 250 ml.

La dispersión viscosa se dializó nuevamente contra varios cambios de NaCl 2 M.

NOTA.- Se observó que en el paso de la precipitación con sulfato de magnesio, una dilución de la concentración a 0.05 M (en lugar de 0.09M), causa la precipitación de productos que no son fosvitina. Mientras que una concentración cercana a 0.03 indujo poca precipitación de fosvitina.

DIALISIS

La diálisis es el proceso mediante el cual sólo las moléculas pequeñas se difunden a través de membranas semipermeables. En el equilibrio la concentración de las moléculas pequeñas es la misma dentro y fuera de la

membrana. Las macromoléculas permanecen en la bolsa.

METODO

Para preparar las membranas se empleó una solución de EDTA 50 μ M, que contiene 0.2 ml/lit. de mercaptoetanol, el tubo de diálisis se hirvió a 90°C por 5 min. y se lavó después con agua destilada unas 5 veces. A estas membranas preparadas se les introdujo la muestra, después de sellar un extremo y se colocó en un recipiente adecuado con el buffer ó solución requerida; en frío y con agitación.

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS

Método de Disco en Amortiguador de Tris.

A) Soluciones.

Solución A.- 83.5 ml de buffer de fosfatos 0.6 M pH 7.3, 30g de acrilamida y 80 g de metilen - bis acrilamida aforándose a 100 ml con agua bidestilada.

Solución B.- 24 ml de 1 N, 18.15 g de tris hidroximetilamino metano y 0.23 ml de TEMED (tetrametilen etilen diamina), agua para un volúmen de 100 ml, ajustándose el pH a 8.9.

Solución C.- 0.14 g de persulfato de amonio en 100 ml de agua.

Solución D.- 5 g de acrilamida, 1.25 g de metilen bis acrilamida y agua hasta 100 ml.

Solución E.- 12.8 ml de H_3PO_4 1 M, 2.85 g de tris y agua para un volúmen final de 100 ml (pH 6.9).

Solución F.- 2 mg de riboflavina en 100 ml de agua. Glicerina en agua 10%.

B) Amortiguador del tanque de Electroforesis.

Solución Stock.-Tris (3.0 g), glicerina (14.4 g) y agua para un volumen final de 500 ml (pH 8.3).

La solución stock se diluyó diez a uno con agua antes de usarla y se empleó como amortiguador en el recipiente superior, se agregó 100 μ l de una solución azul de bromofenol al 0.05% a 500 ml de buffer.

C) Preparación de los Geles.

Se mezclan: 4 ml de solución A, 4 ml de solución B y 8 ml de solución C. Inmediatamente se llenaron 12 tubos de vidrio (9 x 0.7 cm) con alícuotas de 1 ml de la mezcla; cuidadosamente se agregó una capa de agua sobre la solución del gel, para evitar la formación de concavidades por retracción del gel debido a la polimerización. Se requirieron cerca de 30 - 50 min. para la polimerización de la mezcla.

Después de la polimerización del gel, se eliminó el agua, la parte superior del gel se enjuagó con 0.2 ml de la mezcla del gel espaciador. Esta mezcla se obtiene, combinando 4 ml de la solución D, 2 ml de solución E y 2 ml de solución F. Después de enjuagar se llenó cada tubo con 0.15 ml de esta mezcla. Nuevamente se aplicó una capa de agua con el propósito anteriormente mencionado. Se colocaron los tubos con los geles bajo un rayo de luz fluorescente a una distancia de 5 a 10 cm. Se requirieron aproximadamente 30 minutos para la polimerización.

D) Preparación de las Muestras para los Geles.

El buffer de las muestras se preparó, diluyendo 2 ml de solución E y 6 ml de glicerina al 10%.

Para una solución de proteína de 1 mg por ml de concentración, se diluyó una alícuota de 20 μ l a 50 μ l de muestra con 1 ml de la solución buffer, para dar una concentración final de 2 a 5 mg por 100 μ l.

E) Electroforesis

La parte superior del gel se lava con 0.1 ml de la solución amortiguadora empleada para diluir la muestra, después de lo cual se aplicaron 100 - 200 μ l de la muestra, la cuál se coloca con cuidado sobre el gel, para no resuspender el amortiguador del tanque de electroforesis que contiene el colorante trazador. La electroforesis se lleva a cabo a 600 v y cerca de 3 ma por tubo, por el tiempo necesario para que el colorante marcador llegue al frente del tubo.

Como la proteína migra como anión, el ánodo es el compartimento inferior; y el cátodo está en el compartimento superior.

F) Tinción.

Los geles se sacan de los tubos de soporte, y son teñidos con el colorante azul de Coomassie en ácido tricloroacético y ácido sulfosalicílico; cuyas concentraciones y procedimiento se señalan a continuación:

- a) Acido tricloroacético 5% + ácido sulfosalicílico al 5%.
- b) Azul de Coomassie al 1%
- c) Metanol absoluto puro

Procedimiento:

El gel se colocó en un tubo de ensayo que contenía 12 ml del colorante fresco. La mezcla se preparó con 150 ml de solución a, 30 ml de solución c y 3 ml de solución b.

Se agitó periódicamente durante 1 hora y se dejó en reposo durante la noche. La solución colorante se decantó y se añadió 10 ml de solución a, se dejó por varias horas (de preferencia toda la noche), para eliminar el exceso de colorante, después se transfirieron a tubos para almacenar ó para registro fotográfico.

ELECTROFORESIS DE FOSVITINA

Método empleado.

Se corrieron electroforesis en acrilamida para cada lote de fosvitina; tanto lotes comerciales, como lotes obtenidos en el laboratorio de la siguiente forma:

Corrida 1.- Correspondiente a la primera separación de fosvitina en el laboratorio y comparación de ésta con lotes comerciales designados como lote "antiguo" al lote comercial que se utilizó primero y que dió resultados satisfactorios y al segundo lote. (P - 1253; que es lote comercial que no dió el resultado esperado).

Las muestras se corrieron a una concentración de 1 mg/ml.

El tiempo empleado para su corrimiento fue de 2 horas aproximadamente.

Corrida 2.- Comparación entre fosvitina de separaciones hechas en el laboratorio por 2 diferentes métodos y en diferentes medios de diálisis.

EFECTO DE FOSVITINA SOBRE FUSION DE MEMBRANA

Esquema General

A) Fusión de Mitocondrias

Fusión Mitocondrias - Eritrocitos.

Paso 1.- Preparación de mitocondrias y obtención de sangre.

Paso 2.- La sangre se colectó en solución salina fisiológica (0.9%), conteniendo 3 unidades de heparina para evitar la coagulación. Aproximadamente a 2 ml se les añadió 0.2 ml de una dilución 1:3 de la solución de sangre y por medio de una cámara de Neubauer al microscopio óptico se realizó el conteo de eritrocitos; la cuenta globular siempre se ajustó a 67×10^6 - eritrocitos por ml.

Paso 3.- Determinación de proteína en mitocondrias. Control respiratorio de mitocondrias con ADP.

Paso 4.- Se tomaron muestras para microscopía electrónica de:

- a) Mitocondrias control.
- b) Eritrocitos control.

Ambas muestras control son para conocer el estado físico tanto de mitocondrias, como de eritrocitos al momento de efectuar el experimento.

- c) Eritrocitos + mitocondrias.
- d) Mitocondrias 100 mg/ml + fosvitina 10%.
- e) Eritrocitos 100 mg/ml + fosvitina 10%.
- f) Mitocondrias + eritrocitos + fosvitina 10%.

Del inciso c al f, se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 20 minutos, después de los cuales se tomó la muestra.

Serie del inciso f.

PROTOCOLO I										
No. de Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Medio "H" (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mito. 50 $\frac{\text{mg}}{\mu\text{l}}$ ml	20	20	-	20	20	20	20	20	20	20
Eritrocitos 144,000 (μl)	10	-	10	10	10	10	10	10	10	10
Fosvitina 10 mg/ml (μl)	-	100	100	5	10	30	60	75	100	200

PROTOCOLO II

No. de Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Medio "H" (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mito. 50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ (μl)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Eritrocitos 144,000 (μl)	10	-	10	10	-	10	10	10	10	-
Fosvitina 10 mg/ml (μl)	-	100	100	-	100	10	10	100	100	100
CaCl ₂ (ml) 2mM	1	1	1	-	-	1	-	1	-	1
MgCl ₂ (ml) 2mM	-	-	-	1	1	-	1	-	1	1

En primer lugar se variaron las concentraciones de la fosvitina empleada y los lotes de fosvitina que se emplearon; es decir se usaron diferentes lotes comerciales y lotes que se obtuvieron por síntesis en el laboratorio por dos distintos métodos.

Después de agregar la fosvitina, en experimentos posteriores, se incubaron las muestras a temperatura ambiente por espacios de 10 a 30 minutos una serie con agitación ocasional y otra en reposo. Inmediatamente después de la incubación, se agregaron las mitocondrias, y se efectuó otra incubación de 30 minutos. Las muestras se centrifugaron a menos de 100 x g/10', se decantaron y se les añadió a cada una un ml de medio "H". Nuevamente se centrifugaron durante 10', se decantaron y resuspendieron en 0.1

ml de medio "H" y se prosiguió la rutina del esquema general.

(El lavado anterior se hizo con el fin de eliminar el exceso de mitocondrias libres que hay en las muestras).

En algunos experimentos se alteró el orden de adición; es decir se agregaron primero los eritrocitos, después la fosvitina y al último las mitocondrias. Después de la incubación con fosvitina se lavaron los eritrocitos 3 veces más con un ml de medio "H" y se resuspendieron en el mismo medio para agregar las mitocondrias y en algunos casos el Ca^{++} .

Después se incubaron 30 minutos y se lavaron nuevamente con un ml de medio "H" 3 veces y se resuspendieron en 0.1 ml de agua para proseguir con la rutina del experimento.

Los experimentos finales se realizaron empleando únicamente mitocondrias + fosvitina para poder comprobar y confirmar si la fusión se inducía a nivel membranar al contacto con la fosvitina.

RESULTADOS

La incubación de mitocondrias aisladas de hígado de rata con fosvitina a una concentración de 16 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína induce una estimulación de la actividad respiratoria (Fig. 1) que presenta un retardo en la respuesta dependiente de la concentración, retardo que creemos puede deberse a la interacción en función del tiempo entre la proteína y los sitios de fijación en la superficie de la membrana mitocondrial.

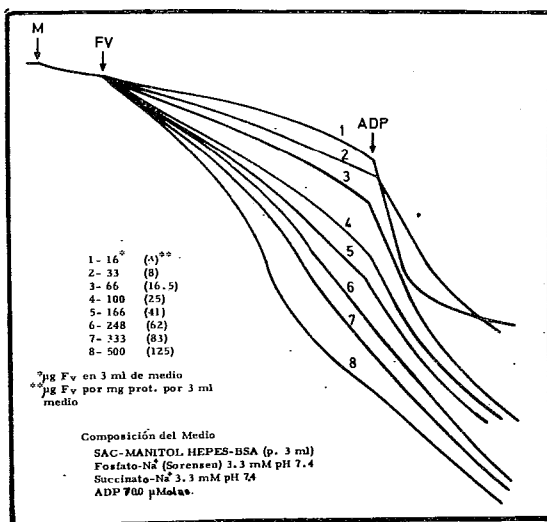


Figura 1

Efecto de diferentes concentraciones de fosvitina sobre la actividad respiratoria basal (Edo IV), de mitocondrias aisladas de hígado de rata. El medio de incubación se señala en la figura, la concentración de proteína mitocondrial fue de 1 mg/ml de medio. El estado activo de la respiración (Edo III), se indujo por la adición de una concentración limitante de ADP.

La adición subsecuente de ADP induce una estimulación de la respiración basal generada por la adición de la fosvitina; estimulación que presenta dos características; la primera es que a bajas concentraciones de fosvitina si se obtiene una respuesta acoplada al ADP, i.e. control respiratorio, dicha respuesta acoplada se va perdiendo hasta que, a una concentración de 16.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteínas, únicamente se observa la fase correspondiente al estado III sin el posterior retorno al estado IV, esta respuesta no se observa cuando la concentración de la fosvitina alcanza una concentración de 62 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína mitocondrial.

A partir de estas observaciones, decidimos analizar si el efecto de la fosvitina era puramente mecánico sobre la membrana mitocondrial, ó si en base a la respuesta obtenida a la adición de ADP, era un proceso dependiente de energía. En la figura 2 se muestra el efecto de la adición de fosvitina a mitocondrias de hígado de rata resuspendidas en un medio isotónico. (medio "H", véase material y métodos). Como se vé, la fosvitina en este caso no indujo a la estimulación de la respiración, ni hinchamiento; por otro lado, cuando el medio se suplementó con un substrato oxidable como el succinato, constantemente se encontró un pequeño cambio en la velocidad de consumo de oxígeno; finalmente en la curva inferior se observa que una respuesta como la descrita en la figura 1, requiere de la presencia de un anión; en este caso el fosfato.

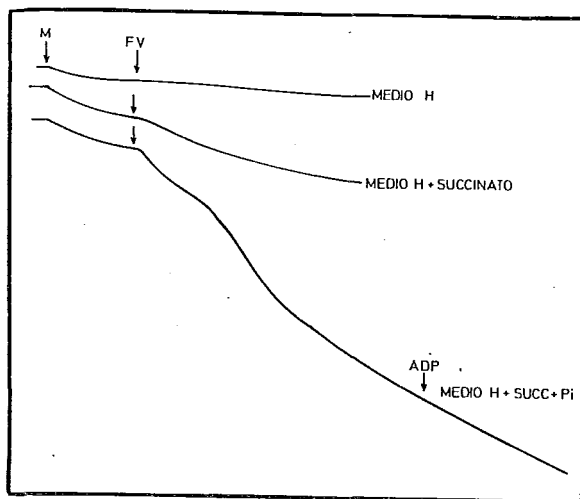


Figura 2

Efecto de las condiciones del medio de incubación sobre la actividad respiratoria mitocondrial inducida por la fosvitina a una concentración de 125 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína mitocondrial.

Para confirmar que el efecto de la fosvitina era un fenómeno dependiente de energía; al medio de incubación, que contenía succinato como substrato oxidable, se le añadió un inhibidor de la oxidación de éste; la antimicina A, la cual efectivamente bloquea la respiración inducida por la fosvitina, (figura 3), esta inhibición fue revertida por la adición de un aceptor artificial de electrones, el TMPD (tetrametilen para - fenilendiamina), lo cual nos indica que no hay un daño irreversible de la función mitocondrial por la presencia de fosvitina en el medio de incubación.

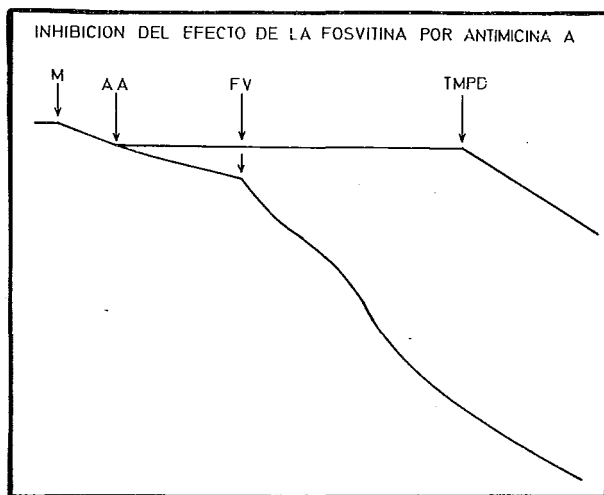


Figura 3 .

Dependencia de energía para la estimulación de la respiración inducida por fosvitina (125 $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot. mitoc.). En presencia de AA, inhibidor del sitio II de la cadena de transporte de electrones, la fosvitina no estimula la respiración y la adición de tetrametilen para fenileno diamina que pasa los electrones a citocromo b y revierte la inhibición por antimicina A.

Dadas las características propias de la fosvitina, es decir la abundancia de cargas negativas debidas a la presencia de fosfoserina y pensando que el efecto de esta molécula además del componente funcional tuviera un componente estructural; decidimos emplear un compuesto que clásicamente se sabe actúa como estabilizador de la estructura de la membrana mitocondrial, dicho compuesto es el catión divalente Mg^{++} . En la figura 4 se observa que el Mg^{++} bloquea el efecto de la fosvitina y que cuando la

concentración del ión alcanza una concentración de 3.3 mM no sólo revierte dicho efecto, sino que se recupera la respuesta al ADP, el cual induce nuevamente control respiratorio (medido como la transición estado III-IV).

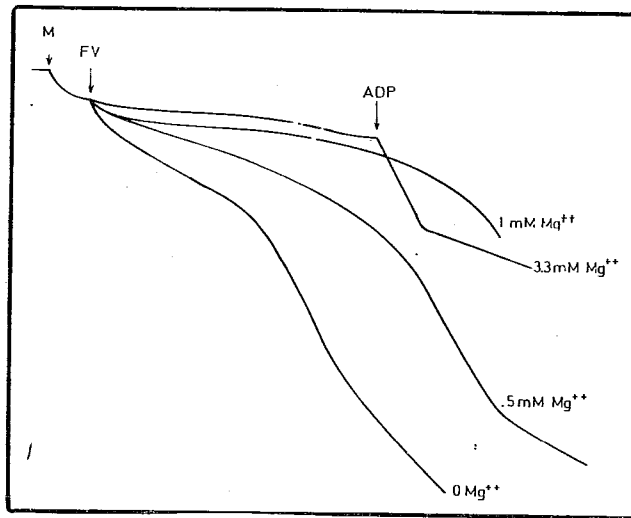


Figura 4

Efecto de iones de magnesio a diferentes concentraciones, sobre la estimulación de la respiración inducida por la fosvitina.

Por el momento no podemos aclarar si el papel del magnesio es bloquear los sitios de fijación de la fosvitina a la membrana mitocondrial o si éste se combina directamente con ella neutralizando sus cargas negativas y de esta manera neutralizando su actividad; o bien, evitando el desplazamiento necesario para el fenómeno de fusión de las partículas intramembranales debido a su capacidad estabilizadora de membranas.

Como se señaló en la figura 2, aparentemente es un requisito para

que la fosvitina actúe, que en el medio se encuentre presente el anión fosfato, por lo cual decidimos estudiar su efecto sobre la actividad respiratoria mitocondrial, cuando se añade la fosvitina.

La figura 5 nos muestra que el requerimiento de este anión es dependiente de la concentración, ya que a 3.3 mM la actividad es máxima, sin embargo en experimentos no mostrados aquí, encontramos que en ausencia del anión, el fenómeno inducido por la fosvitina sí se presenta, pero después de un tiempo de retardo muy largo, lo cual aparentemente nos indica que este anión en alguna forma facilita la interacción de la proteína con su sitio de unión en la membrana, dando como resultado un acortamiento en el tiempo necesario para la implantación de la estimulación, mediado por la fosvitina.

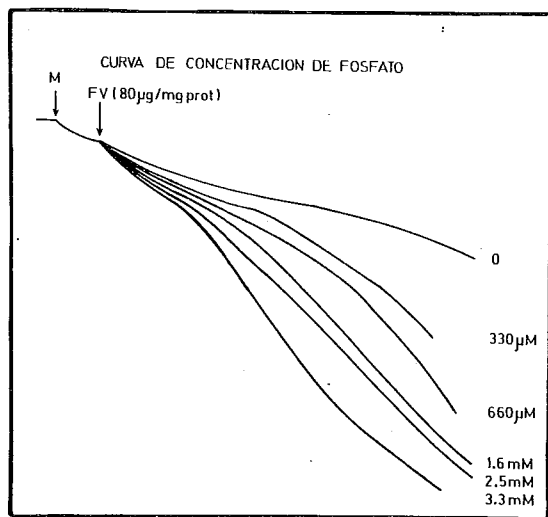


Figura 5

Dependencia de la estimulación de la respiración inducida por fosvitina a 80 µg/mg de proteína, de aniones fosfato. Se muestra el efecto de diferentes concentraciones del anión.

Debido a que los resultados hasta aquí descritos nos indicaban que la fosvitina parecía tener dos efectos; el primero de ellos relacionado con la función mitocondrial y un segundo relacionado con la estructura mitocondrial, decidimos estudiar al microscopio electrónico cuál era el efecto estructural de dicha proteína, sobre las mitocondrias, incubadas en las condiciones descritas para el estudio de esta proteína sobre la actividad respiratoria. A bajas concentraciones de fosvitina (0.5 a 5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína); las mitocondrias no presentan ningún cambio ultraestructural que indique cambios tanto de este tipo como funcionales. Sin embargo cuando la concentración de la fosvitina se aumenta, dependiendo de las condiciones experimentales, encontramos que en primer lugar las mitocondrias no sufrían la transición clásica descrita por Hackenbrock (33), de estado condensado a ortodoxo o viceversa, es decir las mitocondrias sufren aparentemente una congelación de su estructura; por otro lado y tal vez más interesante encontramos que las membranas externas de estos organitos subcelulares se comenzaban a adherir, (figura 6).

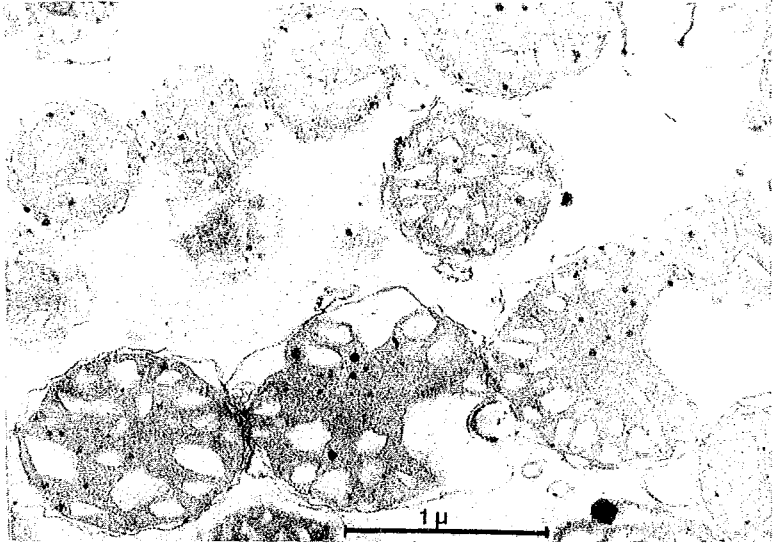


Figura 6

y que conforme la concentración de la proteína o el tiempo de incubación se aumentaba, la adhesión pasaba a ser una franca fusión (figuras 7 y 8).

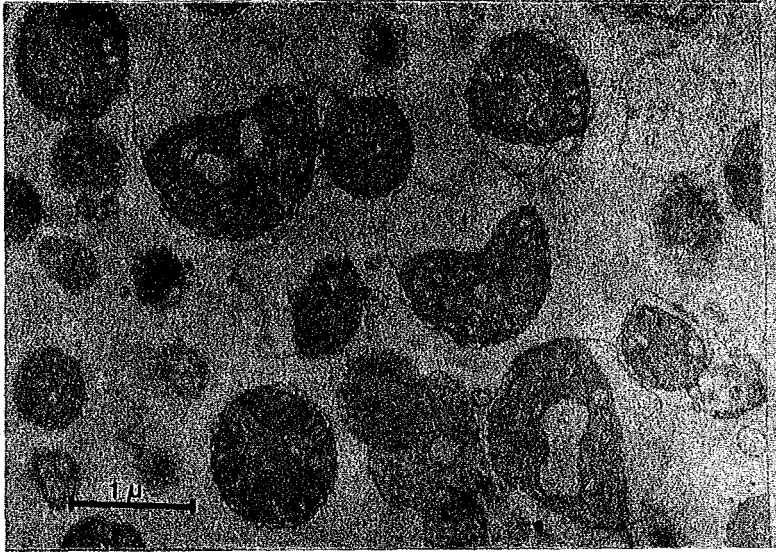


Figura 7

Esta fusión no solamente se realiza entre dos mitocondrias sino que dependiendo también de la concentración, condiciones y tiempo de incubación se obtienen largos agregados de mitocondrias fusionadas (figuras 9 y 10); estos agregados siempre y cuando el tiempo de incubación no sea muy largo, retienen las características de las mitocondrias aisladas, es decir cada uno de los comportamientos descritos para estos organelos son identificables (membrana externa, interna, crestas, etc).



Figura 8

La propiedad de la fosvitina para inducir fusión fue aprovechada en este estudio para determinar si se podía emplear como mediadora para fusionar membranas biológicas de distinta naturaleza y composición; fue así que se incubaron eritrocitos aislados de sangre de rata con suspensiones de mitocondrias aisladas de hígado de rata.

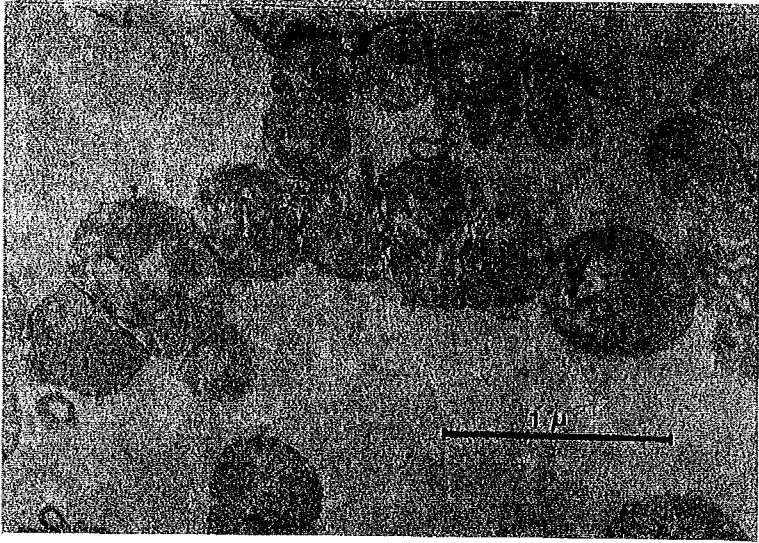


Figura 9

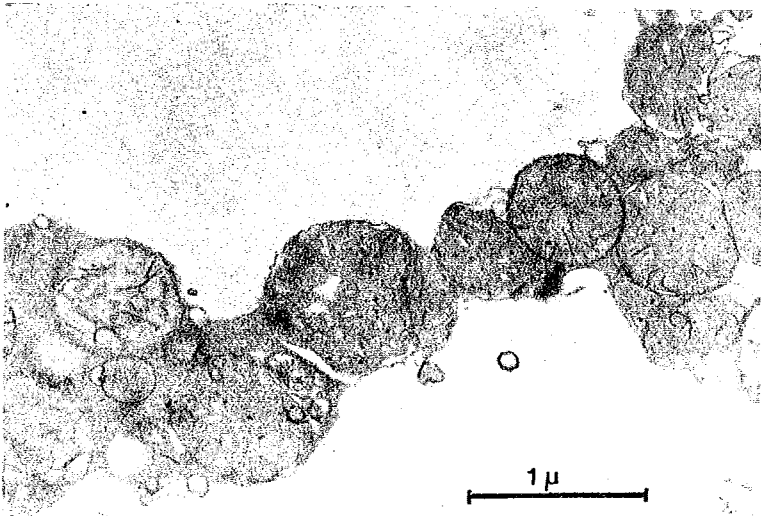


Figura 10

En la figura 11, se pueden observar eritrocitos a los cuáles se les ha introducido, por medio de fusión mediada por fosvitina mitocondrias. Nótese en esta figura la deformación de la membrana del eritrocito debido a la ganancia de membrana por la fusión de la membrana externa de la mitocondria con la membrana plasmática.

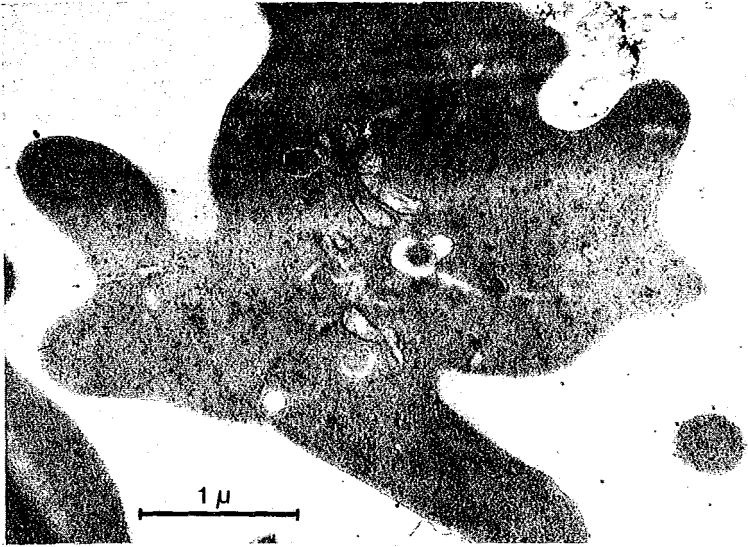


Figura 11

Para asegurar dicha fusión después de lavar cuidadosamente los eritrocitos fusionados tanto de las mitocondrias como de eritrocitos libres, se procedió a determinar la actividad de una enzima presente

exclusivamente en las mitocondrias, dicha enzima fue la citocromo oxidasa cuya actividad pasó de 0 a 1570 unidades de actividad específica, medida por el método polarográfico, en presencia de citocromo c añadido al medio; cuando la fusión se permitía por un periodo de 10 min. a temperatura ambiente y con agitación ocasional. Como la presencia de hemoglobina y otras proteínas presentes en el citoplasma del eritrocito hacían difícil la observación directa, se procedió a obtener preparaciones de eritrocitos libres de dichos elementos. Estas preparaciones llamadas fantasmas se han empleado para repetir los experimentos de fusión ya señaladas obteniéndose los mismos resultados descritos con eritrocitos intactos.

Finalmente queremos reportar otra aplicación que puede tener esta proteína aparte del ya señalado en la fusión. Una de las preguntas fundamentales en el estudio de la fosforilación oxidativa es ¿Cuál es el papel que tiene el Ca^{++} durante la función mitocondrial?, y si es que durante la respiración activa de estos organelos, este catión tiene un papel dinámico o estático; hasta ahora ésta pregunta había sido prácticamente imposible de contestar ya que a pesar de que se tiene marcadores coloridos sensibles a este catión, la sensibilidad de los métodos ha dejado mucho que desear. Algunos ejemplos de estos compuestos son: el rojo de rutenio y el arsenazo III, y compuestos fluorescentes como la aurevertina; sin embargo las sensibilidades de los métodos han dado lugar a interpretaciones difíciles y aún erróneas en cuanto a la temporalidad de los movimientos de Ca^{++} .

Cuando mitocondrias aisladas de hígado de rata se incuban en presencia de fosvitina + Mg^{++} , y se induce la actividad respiratoria con ADP, se produce un movimiento de Ca^{++} , que va de la matriz mitocondrial hacia la fase citoplásmática, este calcio sale de la fase M hacia donde se encuentra

la fosvitina donde se combina con ella, creemos que debido a la alta densidad de cargas negativas que posee, y dá lugar a que por un lado la mitocondria vaya siendo depletada de su contenido de Ca^{++} endógeno, por tanto van perdiendo su capacidad de fosforilar acopladamente; por otro lado el complejo Ca^{++} - fosvitina es fuertemente denso a los electrones lo que permite su visualización por microscopía electrónica de transmisión.

En la figuras 12 a 14, se muestran dichos depósitos, los cuáles se encuentran limitados en su distribución por la membrana externa mitocondrial. Cabe señalar que dichos complejos no difunden a la fase soluble porque el complejo se encuentra fuertemente unido a los sitios de la membrana con los cuales interacciona la fosvitina. Cuando la barrera de difusión, que es la membrana externa, se rompe por las condiciones de incubación o por uso de la preparación mitocondrial conocida como mitoplastos, este complejo denso a los electrones se forma en contacto íntimo con la membrana interna mitocondrial, lo cuál nos indica que los sitios de unión de la fosvitina, es tán presentes tanto en la membrana externa como en la interna.

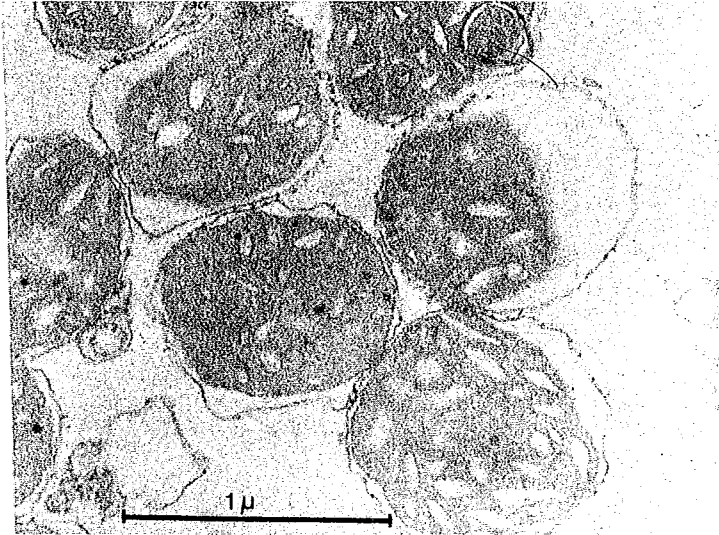


Figura 12

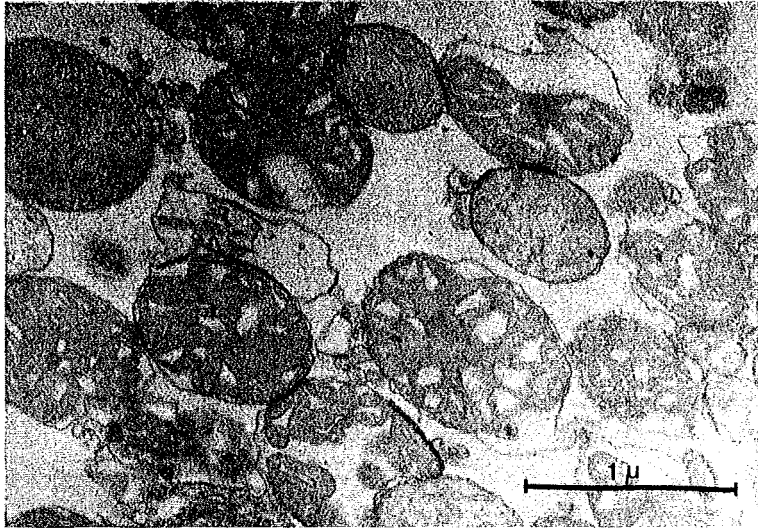


Figura 13

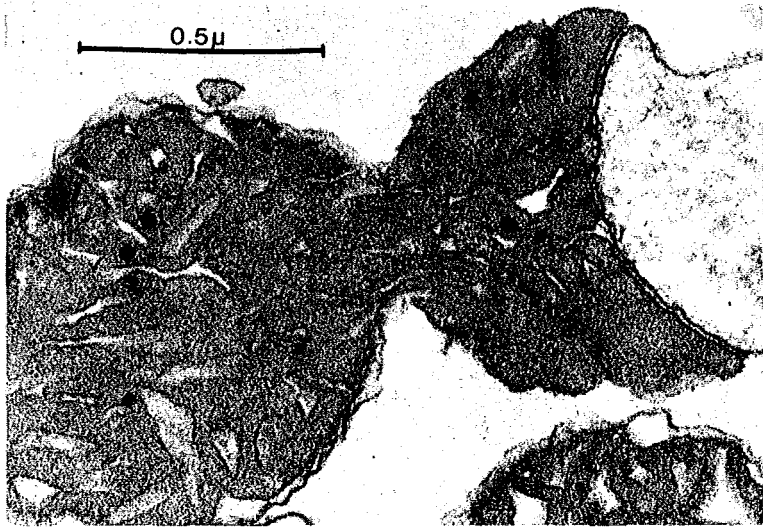


Figura 14

DISCUSION

FUSION DE MEMBRANA

La fusión de membrana para que ocurra requiere que se cumplan 2 eventos cruciales, a) aproximación y contacto y b) inducción de la fusión.

En cuanto a la primera fase de la fusión, debe presentarse un movimiento de partículas intramembranales (22), que dejen una zona libre de ellas formada exclusivamente por la bicapa lipídica, que debe tener continuidad con el resto de la membrana y que debe además mostrar fenómenos consistentes, con la acción de inductores conocidos de la fusión de membrana.

Al presente no se puede dar una hipótesis que explique los mecanismos moleculares responsables de la inducción de la fusión; lo que sí puede decirse es que es un fenómeno con multiplicidad de características fenomenológicas ya que tiene respuesta positiva a un gran número de inductores entre los cuales destacan Ca^{++} , polipéptidos, virus etc.

Es claro que el fenómeno de fusión representa un estado de transición entre dos estados físicos y funcionales que implican una profunda reorganización de los componentes de la membrana y en el sentido señalado por Thom (34), probablemente representa una catástrofe limitada.

La secuencia que proponemos para que los eventos iniciales de fusión se realicen, es que en primer lugar debe haber una continuidad estructural a lo largo de las monocapas de las membranas a fusionar y restringido a la zona de fusión; el segundo paso es que las monocapas opuestas y cercanas entre si se rearreglen por medio de micelización generando que los lípidos de ambas monocapas se mezclen e intercambien, produciendo una nueva bicapa conteniendo lípidos de ambas monocapas. Termodinámicamente esta interacción es

favorecida por la formación de fuerzas de Van der Waals entre las cadenas de lípido de la monocapa lejana.

La ausencia de partículas intramembranales ha sido confirmado en una gran variedad de eventos que llevan a fusión tanto en organismos inferiores, como en tejidos mamíferos, y tejidos embrionarios.

La fusión de membrana parece ser un fenómeno básico que tiene lugar durante el ciclo de vida de muchas células. Muchas funciones celulares y respuestas de éstas a su medio ambiente dependen de la fusión de organelos subcelulares entre si o con la membrana plasmática. La secreción de macromoléculas por glándulas exócrinas y formación de lisosomas secundarios son algunos fenómenos que implican fusión de membranas. Por otro lado la fusión de membranas plasmáticas se ha demostrado que es un proceso necesario para el proceso de fertilización, en la conjugación de protozoarios y la infección celular por virus.

La fusión de membrana también ocurre entre suspensiones de células o cultivos en monocapa (35). La cual puede ser inducida por virus, especialmente aquella del grupo de los paramyxovirus y una gran variedad de agentes químicos (5), fosfolípidos, especialmente lizofosfolípidos (36), etilén glicol (37), y Ca^{++} (38); este último también induce fusión entre vesículas de fosfolípidos con carga negativa en su superficie (39).

La fusión de membranas puede realizarse no solamente entre aquellas del mismo tipo sino también entre membranas de diferente origen o clase. Las características generales para que se realice la fusión son entre otras:

a) Una temperatura mayor a 16°C, metales divalentes (especialmente Ca^{++}) y ATP, los cuales son necesarios para el fenómeno de fusión, pero no para

la inducción de contacto interno entre las membranas.

Varios modelos han sido propuestos para explicar los eventos de fusión (40).

Nuestros datos indican que la fusión de membranas biológicas puede realizarse si en primer lugar se modifica la carga de superficie de las membranas a fusionar, esta modificación favorecería la primera fase descrita en la literatura, que es la de que las membranas deben entrar en contacto físico, lo cual dispara la segunda fase, que sería la de desarreglo de la estructura de la membrana como es el desplazamiento de la zona de fusión de las llamadas partículas intramembranales seguido del desarreglo lamelar de fosfolípidos para finalmente continuar con la fusión propiamente dicha. La culminación de los eventos sería la separación de las membranas participantes originando bicapas que contengan elementos de las dos membranas fusionadas.

La fusión inducida por la fosvitina presenta las características de cualquier inductor descrito; es decir, primero debe interactuar con las membranas que van a fusionarse. La interacción queda demostrada por el efecto profundo que tiene esta proteína sobre la actividad respiratoria de las mitocondrias a las cuales se adiciona. (Véase figura 1), dicho efecto presenta una dependencia tanto de anión como de energía pues en ausencia de cualquiera de las dos o ambas, la fosvitina no tiene efecto; esto podría indicar que la interacción no es al azar pues presenta las características de unión de compuestos que lo hacen específicamente. Esta primera fase de fijación de la fosvitina a la membrana la llevaría a un estado "activado"; es decir listo para la fusión, dicho estado se caracteriza por la gran

adhesividad que muestran las mitocondrias que se incuban por tiempos cortos con fosvitina. El estado de activación genera cambios importantes en la distribución de iones divalentes que se mueven del interior hacia el exterior de la membrana interna mitocondrial, ya que como se señaló en la figura anterior, la fosvitina atrapa iones divalentes probablemente de Ca^{++} , basados en la gran densidad a los electrones. (Véase figura).

El estado de adhesión ilustrado en la figura 6, implica la formación de una estructura pentalamelar; es durante este período que pensamos se lleva a cabo tanto el movimiento de partículas intramembranales, demostrado por la técnica de criofractura como la formación de un estado micelar de transición durante el cual se recambian fosfolípidos de ambas membranas y finalmente se separan quedando nuevamente dos membranas independientes, con estructura de bicapa; como es demostrado por la fusión de mitocondrias a eritrocitos, en donde después de la fusión se detectan estructuras tipo mitoplasto en el interior de esa célula (Figura 11) y lo que trae como consecuencia que se puedan detectar actividades enzimáticas exclusivamente mitocondriales tanto los eritrocitos como en los fantasmas que han sido sometidos a la fusión mediada por la fosvitina.

Estos estudios pensamos enfocarlos para analizar el estado físico de la cadena de transporte de electrones en la membrana interna mitocondrial. Si la cadena se mantiene físicamente como unidad únicamente porque la membrana interna está saturada de unidades de cadena de transporte de electrones, al colocar membrana interna empleando mitoplastos y partículas sub-mitocondriales en una membrana mucho más grande existen 2 posibilidades: la primera que se difundan y disgreguen los componentes, perdiéndose su

actividad de transferencia de electrones pero conservando sus actividades catalíticas de cada componente o bien que siga funcionando como unidad de transporte de electrones, lo cual nos permitiría estudiar cuales son los mecanismos que la mantienen como unidad no solo funcional sino también estructural.

BIBLIOGRAFIA

1. Loewenstein, W.R., (1973), Fed. Proc., 32, 60-64.
2. Fawcett, D.W. (1961). Exp. Cell Res., Suppl. 8. 174-187.
3. Donahen, R.P. (1972). Perspectives in Cytogenesis., (Wright, S.W., Crandall, B.F. and Boyer, L., eds). pp. 5-24.
4. Feinstein, S.M., Fernández S.M. and Sha'afi, R.I., (1975), Biochimica et Biophysica Acta, 413, 354-370. The University of Connecticut (USA).
5. Poste, G., and Allison, A.C., (1973), Biochim. Biophys. Acta, 300: 421-465.
6. Haythorn, S.R., (1972), Arch. Pathol., 7, 651-713.
7. Roizman, B., (1962), Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol., 24, 327-338.
8. Koining, H. (1969) in Lysosomes in Biology and Pathology (Dingle, J.J., and Fell, H.B., eds.), Vol. 2 pp. 111-162, North Holland, Amsterdam.
9. Chapman, D., (1975). University of Sheffield, England. Lipid Dynamic in Cell Membranes. Cell Membranes Biochem., Cell Biology and Pathology. Gerald Wessmann and Robert Clairborne, Editors. P 13-22. April.
10. Klenk, H.D. and Choppin, P. (1969), Virology, 38, 255-268.
11. Fedorko, M.E. and Hirsch, J.G., (1971), Exp. Cell. Res. 64 113-119.
12. Poste, G. (1970), Adr. Virus. Res., 16, 303-356.
13. Poste, G., Reeve, P., Alexander, D.J., and Terry, G. (1972) J. Gen. Virol. 17, 133-136.
14. Klenk, H.D. and Choppin, P. (1969), Virology, 38, 255-268.
15. Klenk and Choppin, 1969, Virology, 37, 155-157.

16. Dervaux, P. and Mc. Connell, H. M. (1972), *J. Am. Chem. Soc.* 94, 4475-4482.
17. Morrison, D.C. and Morovitz, H.J. (1970), *J. Mol. Biol.*, 49 441-455.
18. Oesterbelt, D. and Staichemuir, W.D. (1971), *Nature*, 233, 149-151.
19. Weiss, L., and Harla, J.P., (1972) *Prog. Surf. Sci.* 1, 355-405.
20. Hyde, A., Blondel, B., Matter, A., Cheneral, J.P., Fillous, B. and Gerardier, L. (1969), *Prog. Brain, Res.* 31, 282-311.
21. Weiss, L. and Harlos, J.P., (1972), *Prog. Surf. Sci.* 1, 355-405.
22. Pinto Da Silva, P. and Nogueira, M.L., (1977) *J. Cell Biol.* 73, 161-181.
23. Rubin, H. (1967) in *The Specificity of Cell Surfaces* (Danis, B.D., and Warren, H. eds), pp. 181-194, Prentice Hall, Englewood-Cliffs, N.J. Guttler, F. and Clausen, J. (1969), *Biochem., J.*, 115, 959-968.
24. Lucy, J.A., Akong, Q.F., Cramp. F.C., Fisher, D., and Howell, J.I. (1971), *Biochem. J.*, 124, 46P.
25. Ahkong, Q.F., Cramp. F.C., Fisher D., Howell, J.I., Tampion, W., and Lucy, J.A. (1972) 130, 44P.
26. De Boer, E. and Loyter, A. (1971), *FEBS Lett*, 15, 325-327.
27. Poste, G. (1972) *Int. Rev. Cytol.* 33, 157-252.
28. Poste, G. and Allison A.C. (1971), *J. Theor. Biol.* 32, 165-184.
29. Mecham, R.D. and Olcott, S.H., (1949). Phosvitin, The Principal Phosphoprotein of Egg Yolk. *J. Am. Chem. Soc.* 71, 3670.
30. Schaitman, C. and Greenawalt, J.W. (1968). *J. Cell. Biol.* 38, 158-175.
31. Layne E., (1957) in *Methods in Enzymology*. Colowick, S. P, and Kaplan, N.D. eds. Academic Press, N. York), Vol. 3 pp. 447-454.
32. Joubert, F.J., and Cook, W.H. (1958). *Can. J. Biochem. and Physiol.* 36 (4): 399-408.

33. Hackenbrock, C.R. (1966). *J. Cell. Biol.* 30, 269-297.
34. Thom, R., (1972). *Stabilité Structurale et Morphogénese*. W.A. Benjamin, Inc. Reading, Mass.
35. Okada, Y., (1969), *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 48, 102-128.
36. Croce, C.M., Sawicki, W., Kritchevsky, D. and Koprowski, H. (1971) *Exp. Cell. Res.*, 67, 427-435.
37. Pontecorvo, G. (1975) *Somat. Cell Genet.* 1, 397-400.
38. Toister, Z., and Loyter, A. (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, 241, 719-724.
39. Zakai, N., and Kulka, R.G., and Loyter, A. (1976). *Nature (London)*, 263, 696-699.
40. Lucy, J.A. (1978) in "Membrane Fusion" (G. Poste and G.C. Nicolson, eds. Elsevier/North Holland Biomed. Press Amsterdam pp. 267-304.