

11261
2ej
4

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POST-GRADO

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

I N D I C E :

	HOJA:
INTRODUCCION:	1
MATERIALES Y METODOS:	12
RESULTADOS:	19
DISCUSION:	34
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS:	42
BIBLIOGRAFIA:	44

I N T R O D U C C I O N :

I Los Monitores Fluorescentes:

La utilización de colorantes para medir algunas características de los sistemas biológicos, como la polaridad del medio o el gradiente de potencial eléctrico a los lados de una membrana, muestra ventajas con respecto a otros métodos, útiles en escala macroscópica, y hace posibles medidas en células, organelos y vesículas demasiado pequeños para ser estudiados con microelectrodos. (Rubalcava y cols -- 1969; Waggoner 1976)

Ya desde hacía tiempo, se habían utilizado las moléculas fluorescentes para medir cambios estructurales en proteínas y lipoproteínas (Brocklenhurst 1970; Chen 1967; Chen 1977) aprovechando los cambios en la intensidad de emisión y en su patrón al pasar de un medio dentro de diferente polaridad o al variar la conformación espacial de

las proteínas; de hecho, una de las primeras definiciones de los moni-
tores fluorescentes (Edelman y M^C Clure 1968) es la que los describe
como moléculas pequeñas que sufren cambios en una o más de sus pro-
piedades fluorescentes como resultado de una interacción no covalente
con las proteínas. A partir de los primeros trabajos de Ruvalcaba (19
69) y Gitler (1969) se empezó a aplicar el método a membranas, prime-
ro de eritrocitos, o en micelas de detergente; se observó una depen-
dencia inversa de los cambios de fluorescencia con relación a la pre-
sencia de iones de la misma carga que el monitor, que debían esconder
los sitios de fijación de este a la membrana. Con la dependencia de
la fluorescencia en la carga de la membrana en mente se empezó a u-
sar el método para medir el potencial de diferentes sistemas, como--
Streptococcus faecalis, donde se estimó un potencial de -60 a -70 mV
en ausencia y -130 a -140 mV al poner glucosa en el medio, hiperpola-
rización que se evitaba con dicilohexilcarboxidimida (Laris Fershand
singh 1974). Otro estudio interesante es el que hicieron Salama y Mo-
rad (1976) quienes demostraron cambios en la fluorescencia de corazo-
nes de rana durante el potencial de acción cardíaco y diferentes pa-

trones entre los tejidos ventricular, auricular y del marcapaso, En neuronas también se ha empleado la técnica (Ross y cols 1974) examinando potenciales de acción en axonas gigantes de calamar aislados, usando como monitor un colorante y observando cambios en la absorción.

Para que una molécula de colorante pueda ser considerada como un monitor adecuado debe presentar cambios cuantificables en sus propiedades ópticas al pasar de una condición o medio a otro. Los primeros colorantes usados, como el ANS y el EB han sido relegados, aún sin haber sido estudiados completamente, para dar paso a toda una gama de colorantes que son sintetizados ex profeso, buscando las mejores condiciones de solubilidad en diferentes medios y de modificación de emisión; por ejemplo, Sims y cols. (1974) describieron la síntesis de 29 colorantes catiónicos derivados de la cianina, junto con sus propiedades fluorométricas, para compararlos entre sí y seleccionar los mejores en cuanto a sus propiedades ópticas y a su inguridad para las membranas en estudio.

Una vez aceptado ampliamente el modelo de Singer de una bicapa lipídica altamente ordenada, en forma de cristal líquido para las

membranas biológicas (Singer & Nicolson 1972) se han adaptado diversos métodos espectroscópicos para estudiar los componentes de la bicapa. Uno de los capítulos más interesantes al respecto es el estudio del gradiente de fluidez al ir penetrando en la membrana. Los métodos de Resonancia Magnética Nuclear con Deuterio ó Carbono 13, aplicados a membranas modelo mostraron que efectivamente las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos tenían mayor libertad de movimiento en el centro de la bicapa que en la periferia (Seelig y Seelig 1974)--- pero al parecer no pudo aplicarse el método a membranas naturales por la gran complejidad de los espectros que arrojaba. Mediante la medición de la polarización de la fluorescencia uniendo el monitor covalentemente a un ácido graso de cada vez mayor longitud se obtuvieron resultados similares a los de Seelig (1974). Se midió la libertad rotacional del colorante al ir profundizándolo en la membrana, (Thulborn & Sawyer 1978; Tilley, Thulborn & Sawyer 1979) los resultados se trataron de acuerdo con Hare y Lussan (1977) que habían correlacionado los cambios de la polarización de la fluorescencia con las variaciones de viscosidad de varios aceites alifáticos. El---

potencial del método es muy grande y aún es difícil ver hasta donde pueda llegar su utilidad.

Los colorantes utilizados para monitorizar los potenciales de diferentes membranas se han dividido en dos grandes grupos, dependiendo de la velocidad, magnitud y mecanismo del cambio óptico dependiente del potencial; pueden ser de respuesta rápida o de respuesta lenta (Waggoner 1979). Los últimos, también llamados de incorporación, reaccionan a las variaciones de potencial en el orden de segundos, entrando a la membrana o saliendo del seno de esta hacia el medio externo con variaciones en su fluorescencia hasta de un 80 %. Los colorantes de respuesta rápida, también llamados de orientación, reaccionan en microsegundos; aparentemente las moléculas se encuentran embebidas en la membrana desde un principio y al aplicar el potencial modifican su fluorescencia al reorientarse o girar dentro de la misma membrana, sin necesidad de salir al medio. La variación en la fluorescencia puede ser muy pequeña, 3 a 5 %. De lo anterior se desprende que un colorante, para ser un buen monitor debe ser una molécula anfipática, es decir, tener una porción soluble en medio---

hidrófobo y otra en medio apolar, lo que puede hacer deslocalizando---
su carga eléctrica por resonancia.

Los cambios de fluorescencia observados son el resultado de la
variación de muchos parámetros, como la conductancia específica de la
membrana en estudio, la carga y estructura del colorante, sus variaciones
en emisión, absorción y rendimiento cuántico; la fuerza iónica del medio
puede hacer variar el estado de agregación del colorante, o la proporción
de moléculas unidas a membranas y proteínas. El pH puede ser importante, y
se ha demostrado que el valor interno en los eritrocitos influye en los
patrones de fluorescencia (Hladky y Rink 1976) y de absorbencia de colo-
rantes. La interacción con otras moléculas de colorante puede llevar a un
apagamiento (Peña y cols 1980) o a potenciación por formación de dímeros
excitados o excímeros (Erocklenhurst 1970). También puede haber inter-
acción con otro tipo de moléculas, el dinitrofenol, la veratridina y la
antimicina A, agregados en cantidades adecuadas interfieren con la
fluorescencia del colorante derivado de la cianina "D1S-C3-(5), con
el cual se ha observado que forman complejos no fluorescentes en solución.

Una complicación del uso de colorantes en organelos y células vivas es la influencia que tienen sobre los procesos metabólicos de estos (Waggoner 1979; Peña y cols 1977). Un ejemplo de daño químico ó foto químico que los colorantes producen fue descrito por Miller y Koshland (1978) quienes observaron cambios en el patrón de movimiento de Bacillus subtilis en presencia de $\text{DiS C}_3(5)$. (Yoduro de 3,3'Dipropiltiodicarbocianina)

Por todas las razones enumeradas en el párrafo anterior, la utilización de la fluorescencia a un nivel cuantitativo es extraordinariamente difícil; por ejemplo, en mitocondrias energizadas, hay autores que reportan potenciales de membrana hasta de -180 mV (Laris y cols 1975) mientras otros reportan datos en condiciones similares de no más de -60 mV (Kinnally y cols 1978). Se están haciendo muchos esfuerzos para controlar y eliminar cada factor de variación; esto será un paso decisivo para la utilización de la fluorescencia como un método exacto.

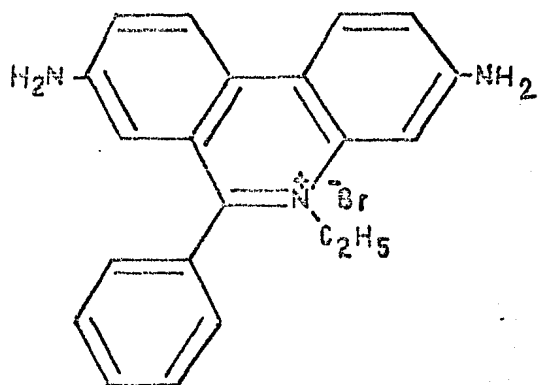
II El Bromuro de Etidio:

El Bromuro de etidio (EB) (2,7, diamino 9 fenil fenantridinio 10 etil Bromuro)(Fig 1) es una molécula de color rojo, con un nitrógeno

FIGURA 1

MOLECULA DE BROMURO DE ETIDIO

La carga le es conferida por sus grupos amino que se protonan a los valores de pH utilizados, y por el Nitrógeno cuaternario, al tiempo que la resonancia de sus anillos deslocaliza esa carga y le da a la molécula cierta solubilidad en medio apolar.



BROMURO DE ETIDIO ◦

cuaternario y dos grupos amínicos que le confieren carga positiva,-- la cual se ve deslocalizada por resonancia de sus anillos aromáticos y ello le da al colorante capacidad para disolverse en medios hidrófobos (Gitler y cols 1969) como el butanol y el octanol; también tiene una elevada afinidad por compuestos con carga eléctrica contraria a la suya. Gitler y cols (1969) encontraron una incorporación en micelas de lauril sulfato hasta llegar a una concentración total de una molécula de E8 por micela. Al variar la polaridad del medio en que se encuentra disuelta la molécula, se observan cambios importantes, tanto en la fluorescencia, que varía mucho (Estrada O., no publicado) como en la absorbancia (Azzi y Santato 1971); además de un ligero aumento en la intensidad de la absorbancia se observa un desplazamiento del espectro hacia longitudes de onda mayores al disminuir la polaridad del medio.

Originalmente usado como tripanocida, el E8 ha mostrado propiedades de mutagenicidad, tanto en bacterias, en las que suprime la resistencia a antibióticos dependiente de plásmidos (Grimwood y Wagner 1976) como en levaduras, donde provoca la mutación a células res

piretario deficientes (petites) por el daño que produce en el DNA mitocondrial. En organismos superiores se le han encontrado efectos -- carcinogénicos. En todos los casos, el mecanismo de la interacción-- ácido nucleico-colorante parece consistir en un intercalamiento que lleva a desenrollamiento de la doble hélice y la separación de las-- cadenas complementarias de DNA; esto provoca errores en la transcrip-- ción y en la duplicación. Se ha observado que en presencia de DNA la fluorescencia del EB aumenta, lo que debe obedecer al secuestro del-- colorante en una región relativamente hidrofóbica del ácido nucleico; si el ácido nucleico usado es el DNA de cadena simple solo se observa un muy ligero aumento en la fluorescencia. Para estudiar a fondo la-- interacción de los ácidos nucleicos con el EB se ha sintetizado un EB modificado mediante la adición de un nitroxilo en uno de los dos gru-- pos amínicos de la molécula (Hong y Fiette 1976) para seguir los cam-- bios de movilidad que experimenta el colorante al dejarlo reaccionar con DNA. La inmovilización que sufre el colorante está de acuerdo con el intercalamiento postulado. En ese mismo trabajo se reportan otras aminas carcinogénicas también marcadas con nitroxilos con las que se

observaron resultados similares.

La bioenergética se ha ocupado del EB utilizándolo como un moni
tor fluorescente del potencial de las membranas. Hay varios estudios
sobre el efecto del colorante en los procesos metabólicos y en la
producción de energía por la mitocondria (Brimwood y Lagner 1976;---
Peña y cols 1977; Mito y Chance 1975) y en general hay acuerdo en se-
ñalar una tendencia a desacoplar a bajas concentraciones la respira-
ción de mitocondrias. Al aumentar la concentración del colorante se
produce una inhibición, primero selectiva para el sitio I y posterior
mente a todos niveles de la cadena respiratoria.

La selectividad que a ciertas concentraciones muestra el EB para
inhibir el sitio I de la cadena respiratoria recuerda que a ese ni-
vel se han descrito con frecuencia efectos de la adición de cationes
monovalentes, tanto orgánicos como inorgánicos; el potasio, en gene-
ral, acelera el consumo de oxígeno y mejora el acoplamiento (Tuena--
y cols, enviado); Los alquilguanidinas tienen el efecto contrario, an
un principio desacoplan y luego inhiben el consumo de oxígeno (Fress
man 1963), con una marcada selectividad para el sitio I. En estas---

además se encuentra que la inhibición aumenta geométricamente con la longitud de la cadena, posiblemente por el aumento de su solubilidad en la membrana mitocondrial.

Este trabajo muestra nuestros esfuerzos por profundizar en el conocimiento de la interacción de la membrana mitocondrial con el EB el tiempo que tratamos de encontrar las razones que hacen del EB un mutágeno selectivo para el DNA mitocondrial, mediante estudios en mitocnondrias de levadura de panadería Saccharomyces cerevisiae y en ocasiones con mitocnondrias de hígado de rata. Los estudios se complementan con los efectuados en la célula íntegra (Peña y cols 1980) por nuestro grupo de trabajo.

MATERIALES Y METODOS:

Materiales:

Se utilizaron mitocondrias de hígado de rata y de levadura; las primeras obtenidas de ratas albinas, hembras, adultas, provenientes de la granja del Centro; las de levadura se obtuvieron de levadura del género Saccharomyces cerevisiae, de la marca comercial "La Azteca" según el método de Peña y cols (1977*).

Los reactivos utilizados fueron obtenidos comercialmente de las casas especializadas, todos de calidad analítica; se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

Medio de cultivo para levadura de De Kloet (De Kloet y cols 1960)

Medio de Preparación de mitocondrias de levadura (Peña y cols 1977*) Manitol 0.6 M, Imidazol 10 mM, Albúmina desgrasada 0.1%, pH 6.8 con HCl.

Otros medios de incubación se describen en los experimentos---
particulares realizados.

Métodos:

Desgrasado de Albúmina: (Chen 1967) Para obtener albúmina des--
grasada al 10% se ponen a agitar 10 gms de albúmina bovina (Sigma)--
con 3.5 gms de Carbón activado, en agua destilada, llevando el pH a--
3.5 con ácido clorhídrico; se agita una hora en baño de hielo y pos-
teriormente se centrifuga a 18000 rpm durante 20 minutos; el sobrena
dante se lleva a pH de 7.0 con hidróxido de Sodio y se afora a 100--
ml. La solución se reparte en tubos de ensayo y se congela hasta su-
utilización en los medios de preparación y reacción de mitocondrias-
de levadura.

Preparación de mitocondrias de levadura: (Peña y cols 1977*) Se
toman 30 gms de levadura y se suspenden en un matraz de Erlenmeyer--
conteniendo un litro de medio de De Kloet estéril, agregándole un---
gatero (3 ml) de líquido antiespumante F6-10 de Corning. Se deja ai-
reando (2 lts por minuto) durante 8 horas, al cabo de las cuales se
centrifuga en dos ocasiones consecutivas a 2500 rpm por 10 minutos,
resuspendiendo en medio para preparar mitocondrias de levadura hasta

unos 60 ml que se recentrifugan, ahora a 5000 rpm por 10 min. Se resuspende de nuevo en el mismo medio hasta un volumen de 100 ml. Este líquido se introduce en la cámara compresora de un fraccionador de células Ribi cuyas piezas han sido enfriadas previamente. Una vez dentro del fraccionador, las células se llevan a una presión de 13500 PSI y se dejan salir lentamente al medio ambiente, de mucho menor presión, a través de una válvula de abertura regulable, para romperlas por descompresión. Durante el proceso enfriamos con una corriente constante de Nitrógeno de unos 15 a 20 lts por minuto. La suspensión, con las células rotas, es recolectada en un matraz inmerso en hielo y de inmediato puesta a reaccionar, a temperatura ambiente, con una ó dos hojuelas de Deoxirribonucleasa (menos de 1 mg) durante 10 min. para romper el DNA liberado y eliminar la viscosidad que este le confiere al líquido. En seguida se somete a centrifugación diferencial, a 4RC para aislar las mitocondrias: A 2500 rpm por 5 min descartando el precipitado con las células no rotas y algunas membranas plasmáticas. El sobrenadante se centrifuga luego a 5500 rpm por 10 min, resuspendiendo el precipitado en el mismo medio, para centrifugarlo otra-

vez a 5500 rpm por 5 min, descartando el precipitado con las últimas contaminaciones. Se centrifuga por último a 12000 rpm por 10 min para resuspender el paquete formado al final en 0.5 ml de medio, dejando las mitocondrias en un tubo de ensayo, en baño de hielo, hasta su utilización.

Preparación de mitocondrias de Hígado de Rata: Se deja al animal en ayuno unas 8 a 10 horas para depletar de sustratos endógenos (Cárbaz, comunicación personal) y se le sacrifica mediante luxación cervical seguida de decapitación, dejando sangrar unos segundos para luego diseccionar y extraer el hígado que se lava en un vaso de precipitados con medio para preparación de mitocondrias de hígado de rata (Sacarosa .25 M, EDTA 1 mM llevado a pH de 7.4 con TEA), en frío y se pasa a otro con medio limpio donde se corta en pedazos pequeños para verterlo en un vaso de homogeneizador con un vástago de teflón movido por un taladro para homogeneizarlo. El líquido resultante se somete a centrifugación diferencial para separar las mitocondrias; primero a 2500 rpm por 10 min, descartando el precipitado, y luego dos veces a 10 000 rpm por 10 min, descartando el sobrenadante y resuspendiendo

el precipitado en sacarosa-EDTA, llevándolo en la segunda ocasión a un volumen aproximado de 2 ml que se dejan en un baño de hielo para su utilización.

Determinación de la concentración de proteína: (Murphy 1960) Se prepara una dilución 1 a 100 de la suspensión original de mitocondrias, en agua. De ahí se toma 0.1 ml y se mezcla con 2.9 de una solución de NaOH 50 mM. Esto se lee en un espectrofotómetro contra una solución- 50 mM de NaOH sin proteína. La diferencia en las lecturas a 215 y 225 nm se multiplica por 432 y esto da la concentración de proteína en miligramos por mililitro en la concentración original.

Oximetría: El consumo de Oxígeno se midió con un electrodo de Clark conectado a un oxímetro y a un graficador de escala ajustable. Los datos se reportan en natg de Oxígeno consumido por miligramo de proteína por minuto ó bien como porcentaje de un control. Se midieron los estados 3, 4, desacoplado y el cociente respiratorio.

Fluorescencia: Se midió en un espectrofluorómetro marca Farrand Mark I acoplado a un amplificador y a un graficador Heath-Schlumberger. Se hicieron espectros de emisión del colorante en diferentes---

condiciones y a longitudes de onda fijas (530 - 610 nm) se observaron los cambios de fluorescencia del colorante a través del tiempo. Se utilizaron cuvetas de cuarzo de 3 ml. Se utilizaron los medios de reacción descritos en los experimentos.

Absorbancia: Se midió en un espectrofotómetro de doble rayo Aminco D42A restando una cuveta blanco de otra con colorante para obtener los espectros de absorbancia entre 350 y 650 nm; la muestra se introdujo en cuvetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz con un volumen total de líquido de 3 ml, excepto en las concentraciones mayores de E6, en que se usaron cuvetas de 0.1 cm de paso de luz, con volúmenes totales de 0.3 ml para aumentar la transmitancia.

Captación de Bromuro de Etidio: Se midió agregando el colorante a una mezcla de incubación con mitocondrias íntegras, en un volumen total de 3 ml de medio de reacción, en matraces de Erlenmeyer en agitación continua y en un baño de temperatura constante; a 25°C para las mitocondrias de levadura y de 30°C para las de hígado de rata. Se dejó incubar durante 2 minutos pasando a tubos de microcentrífuga y centrifugando por dos minutos para desechar el sobrenadante, retirando

do todo el que fuera posible con succión por bomba de vacío. Se re--
suspendieron los paquetes en 0.2 ml de SDS y 1.3 ml de agua destila--
da y se volvió a centrifugar, en una centrifuga clinica durante 10--
minutos para obtener un sobrenadante transparente, luego se midió la
fluorescencia del sobrenadante a 610 nm, excitando a 530 nm. La ne--
cesidad de usar altas concentraciones de proteina para este experi--
mento hizo que para las mitocondrias de levadura se obtuvieran datos
solamente con respecto al estado de mayor actividad y a aquel en que
se encuentran deenergizadas por completo.

RESULTADOS :

I Efectos del EG sobre la Respiración:

A partir de la experiencia que se tiene con mitocondrias de hígado de rata, con las que se observa un desacoplamiento de la fosforilación-oxidativa y posteriormente una inhibición del consumo de oxígeno, más--marcada para las mitocondrias respirando en presencia de sustratos de--primer sitio (Peña y cols 1977), se estudiaron los efectos del colorante sobre la respiración mitocondrial, dependiendo del sitio de entrada a--la cadena respiratoria del colorante utilizado; en la tabla I se puede apreciar que hay concentraciones a las que no se observa efecto del colo--rante y por lo tanto se le puede utilizar en el organelo como un monitor inoco del estado energético mitocondrial.

Cuando se usó succinato, que es un sustrato de segundo sitio, no se observó acción inhibitoria en ninguno de los estados medidos, en las tres concentraciones bajas utilizadas, que fueron 0.5, 5 y 10 μM (Tabla I y fig 2) y sólo a mayores concentraciones (25 μM o más) se observó un abatimiento del estado tres (fig 3) con un cociente respiratorio de 1.0 y ninguna respuesta a la adición de desacoplantes. Utilizando etanol como sustrato, que entrega sus electrones al principio de la cadena respiratoria, se empezaron a observar cambios desde la concentración de 0.5- μM ; hubo un incremento ligero del consumo de Oxígeno en el estado desacoplado que se hizo aún mayor a 5 μM de EB; además, se observó un aumento pequeño del cociente respiratorio (Tabla I y fig 2). A 10 μM disminuyó el consumo de Oxígeno en el estado desacoplado a niveles casi normales y se obtuvo un cociente respiratorio por debajo del control. A 25 μM , lo mismo que con succinato, no hubo cociente respiratorio ni respuesta a los desacoplantes. En la figura 3 se muestra en el trazo inferior la influencia de una concentración de EB de 60 μM , la cual es similar a la que se observa ya a 25 μM .

II. Propiedades espectroscópicas del EB al interactuar con la mito---

TABLE I

EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EB SOBRE EL CONSUMO DE OXIGENO DE MITOCONDRIAS DE LEVADURA.

<u>RESPIRACION EN PRESENCIA DE UN AGENTE DE UN CONTROL EN ED</u>					
<u>SUBSTRATO SUCCINATO</u>					
	<u>CONTROL</u>	<u>BRONCURO DE ETIDIO</u>			
		<u>0.5 uM</u>	<u>5 uM</u>	<u>10 uM</u>	<u>25 uM</u>
EDD. 3	100%	98±3.7	53±1.7	56±6.2	---
EDD. 4	100%	98±2	96±2.3	100±2.8	61±0.0
EDD. DESAC	100%	95±0.7	94±4.5	91±6.4	----
<u>COEFICIENTE RESPIRATORIO EN VALORES ABSOLUTOS</u>					
COE. RESP.	1.39	1.39	1.37	1.35	1.00
<u>SUBSTRATO ETANOL</u>					
EDD. 3	100%	97±4.3	83±5.4	57±0.0	---
EDD. 4	100%	105±6.0	76±5.0	69±1.0	73±0.0
EDD. DESAC	100%	113±3.3	153±20.0	110±4.5	----
COE. RESP.	1.55	1.45	1.74	1.33	1.00

Medio de respiración isotónico, Manitol 0.6 M, Pi TEA 10 mM, Albúmina 0.1%, pH 6.5, EB a la concentración final indicada. Mitochondrias en un promedio de 400 µg de proteína, sustrato etanol 237 mM o Succinato--15 mM. Se agregaron 120 nMoles de ADP en 3 µl y FCCP 6 µM final. El consumo de Oxígeno se refiere en porcentaje de un control para cada estado y el coeficiente respiratorio en valores absolutos.

FIGURA 2

EFFECTO DEL EB SOBRE LA RESPIRACION DE MITOCONDRIAS DE LEVADURA CON= SUCCINATO O CON ETANOL COMO SUBSTRATOS.

Medio de respiración isotónico, Manitol 0.6 M, Fosfato-TEA 10 mM,-- Albúmina 0.1%, pH 6.5. Proteína mitocondrial 405 μ g por trazo. Substratos: Succinato 15 mM o Etanol 257 mM. Volumen final 2 ml. EB 5 μ M donde se in dica, ADP 120 nMoles en 3 μ l, FCCP 6 μ M final. En la figura se anotan los datos de consumo de Oxígeno en natsg por mg de proteína mitocondrial por minuto.

SUCCINATO

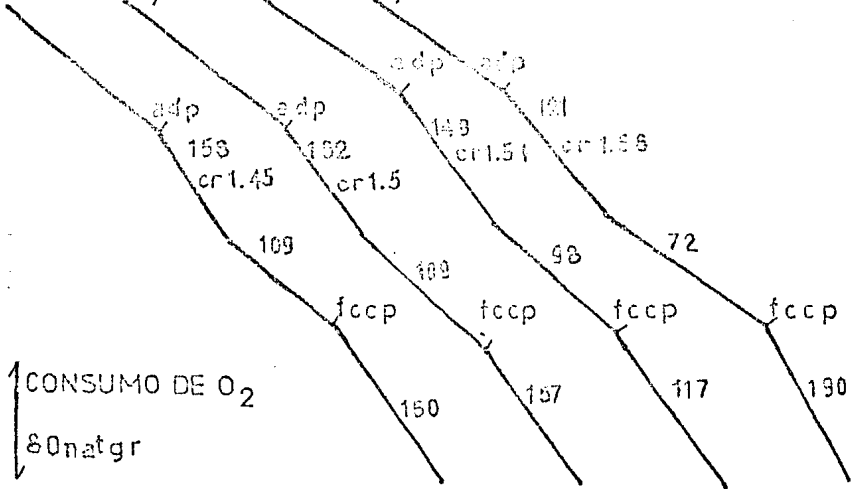
ETANOL

control

eb5µM

control

eb5µM



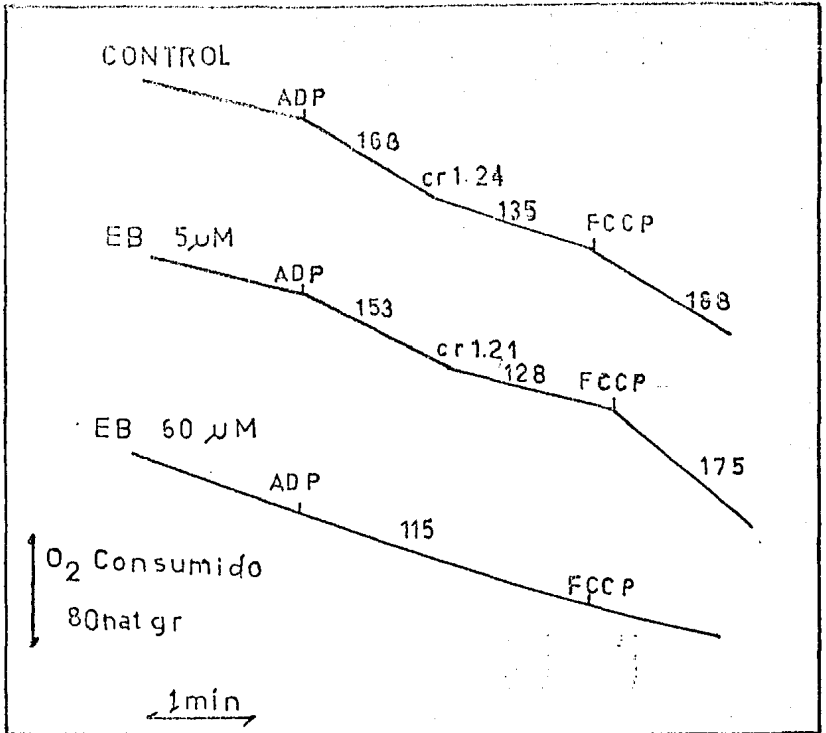
↑ CONSUMO DE O₂
80 natgr

1 min

FIGURA 3

EFFECTO DE ALTAS CONCENTRACIONES DE EB SOBRE EL CONSUMO DE OXIGENO EN MITOCONDRIAS DE LEVADURA.

Condiciones de incubación similares a las de la figura 2, sustrato-succinato, concentraciones de EB indicadas, proteína mitocondrial 0.15 mg por trazo.



condría:

Una vez estudiados los efectos del EB sobre los procesos respiratorios mitocondriales, procedimos a observar cuáles eran sus patrones de fluorescencia y de absorción de luz, en presencia y en ausencia de mitocondrias, tanto en estados energizados como desenergizados. Para ello se utilizaron mitocondrias de hígado de rata (MHR) cuando era necesario experimentar con un organelo sensible a la rotenona como inhibidor de la cadena respiratoria en el primer sitio.

Fluorescencia: 3

Cuando se excita con luz de 530 nm, el EB muestra dos posibles --- máximos de emisión: Si está en medio hidrofílico, el máximo de emisión se halla a 590 nm, y si está en medio hidrofóbico a 610 nm. Estando en medio hidrofílico, si se aumenta la concentración de EB se obtiene, alrededor de 300 μ M un apagamiento, y posteriormente, a 1 mM un desplazamiento del máximo hacia el rojo. A 5 mM, el apagamiento es casi total, con el máximo alrededor de 620 nm (fig 4).

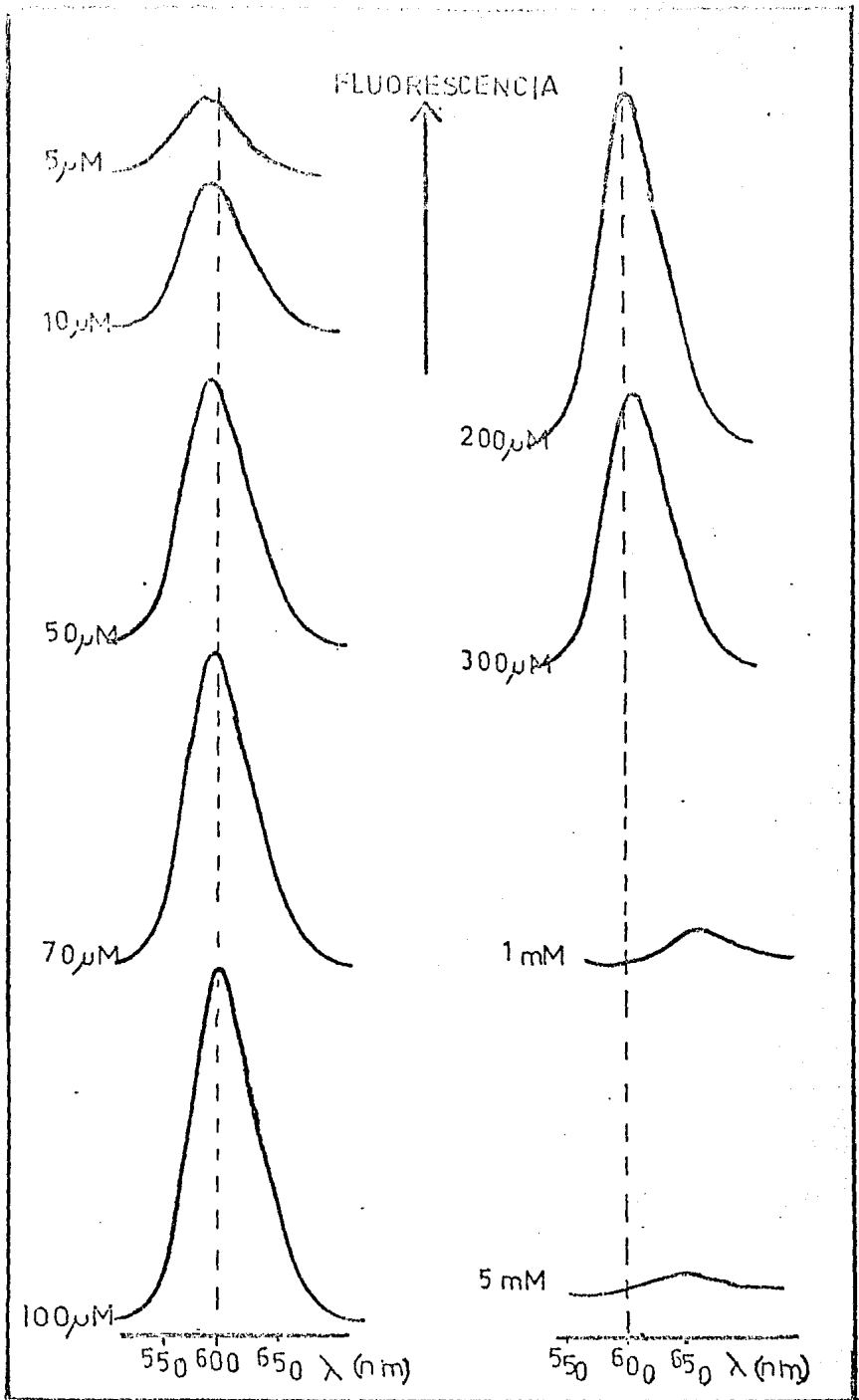
A una longitud de onda fija la curva de emisión contra concentra--- ción del colorante muestra una zona en que el EB fluoresce más si está-

FIGURA 4

ESPECTROS DE FLUORESCENCIA DE EB A DIFERENTES CONCENTRACIONES EN ME

DIO POLAR.

Medio con Manitol 0.6 M, Pi-TEA 10 mM, Albúmina 0.1%, pH 6.5. Las -
concentraciones de EB usadas se anotan a la izquierda de cada espectro.



en medio hidrofóbico que si está en medio polar, aún cuando se presente apagamiento a concentraciones mayores (fig 5).

A las concentraciones bajas de EB, a las que no mostró interferencia con los procesos metabólicos mitocondriales, se observó que el máximo de emisión, en presencia de los organelos permanece a 590 nm, independientemente de que estos estén energizados o no..

El patrón de los cambios de fluorescencia contra tiempo en presencia de mitocondrias energizadas cambia, dependiendo otra vez de la concentración de EB en el medio:

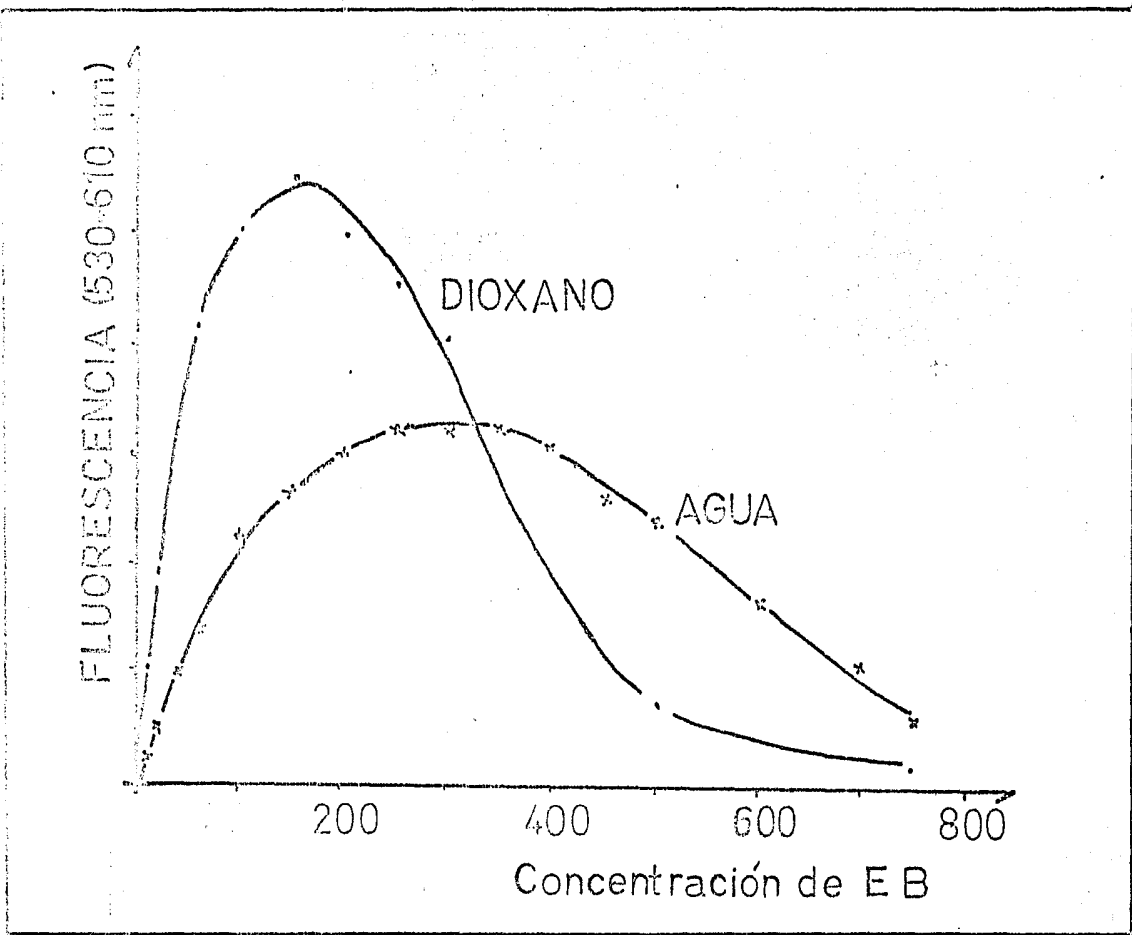
A concentraciones bajas de EB (0.5 a 1 μM para mitocondrias de levadura y hasta 5 μM para mitocondrias de hígado de rata) se observa un rápido aumento de fluorescencia al agregar mitocondrias, el cual pierde velocidad llegando a los dos o tres minutos a un nivel en el que se estabiliza. Si se agrega un desacoplante o un inhibidor de la cadena respiratoria la fluorescencia decae súbitamente para llegar a un nivel similar al que tendría la suma de las fluorescencias del EB y de las mitocondrias medidos por separado en el medio de reacción (fig 6-A).

Al aumentar la concentración de EB, 5 μM para ML y 30 μM para MHR,

FIGURA 5

FLUORESCENCIA DEL EB A DIFERENTES CONCENTRACIONES EN MEDIOS DE DIFERENTE CONSTANTE DIELECTRICA.

La fluorescencia se midió a 610 nm excitando a 530 nm, en fosfato-TEA 10 mM, pH 6.5 en solución acuosa o en Dioxano. El volumen máximo de EB--20 mM agregado fué de 112.5 μ l para un volumen final de 3.0 ml.



se observó que el patrón de fluorescencia contra tiempo se invertía, ya que ahora (Fig 6-C) al agregar mitocondrias energizadas tiene lugar un rápido aumento de fluorescencia, otra vez mayor que la suma obtenida de los espectros de EB y mitocondrias medidos por separado, pero aboradando paso a una rápida disminución que tiende a estabilizarse, llegando a un nivel de fluorescencia a los dos ó tres minutos. La adición de un agente que desenergize la membrana da lugar a un aumento rápido de la fluorescencia, casi tan alto como la espiga inicial que se estabiliza rápidamente.

Hay una concentración, (alrededor de $1.6 \mu\text{M}$ para ML y de $18 \mu\text{M}$ para KHR) en la que se observa un patrón intermedio de fluorescencia (Fig 6-B) y la espiga inicial da lugar casi de inmediato a un nivel estable y la adición de antibióticos no genera cambios en el nivel de fluorescencia.

Si se pone la mitocondria en el medio en presencia de un inhibidor de la cadena respiratoria o de un desacoplante desde el principio, llega la fluorescencia de inmediato al mismo nivel que llega desacoplando la mitocondria energizada con la misma concentración de EB. (Fig 6, trazo-

FIGURA 6

CAMBIO DE FLUORESCENCIA DE EB EN PRESENCIA DE MITOCONDRIAS DE
LEVADURA EN DIFERENTES CONDICIONES.

Medio similar al descrito en la figura 2, concentraciones de EB indi-
cadas para cada trazo. FCCP $3 \mu\text{M}$ final, y antimicina A (AM) $6 \mu\text{g}$ desde su
inicio.

A) ML energizadas (Etanol), EB $0.83 \mu\text{M}$.

B) ML energizadas, (Etanol), EB $1.67 \mu\text{M}$.

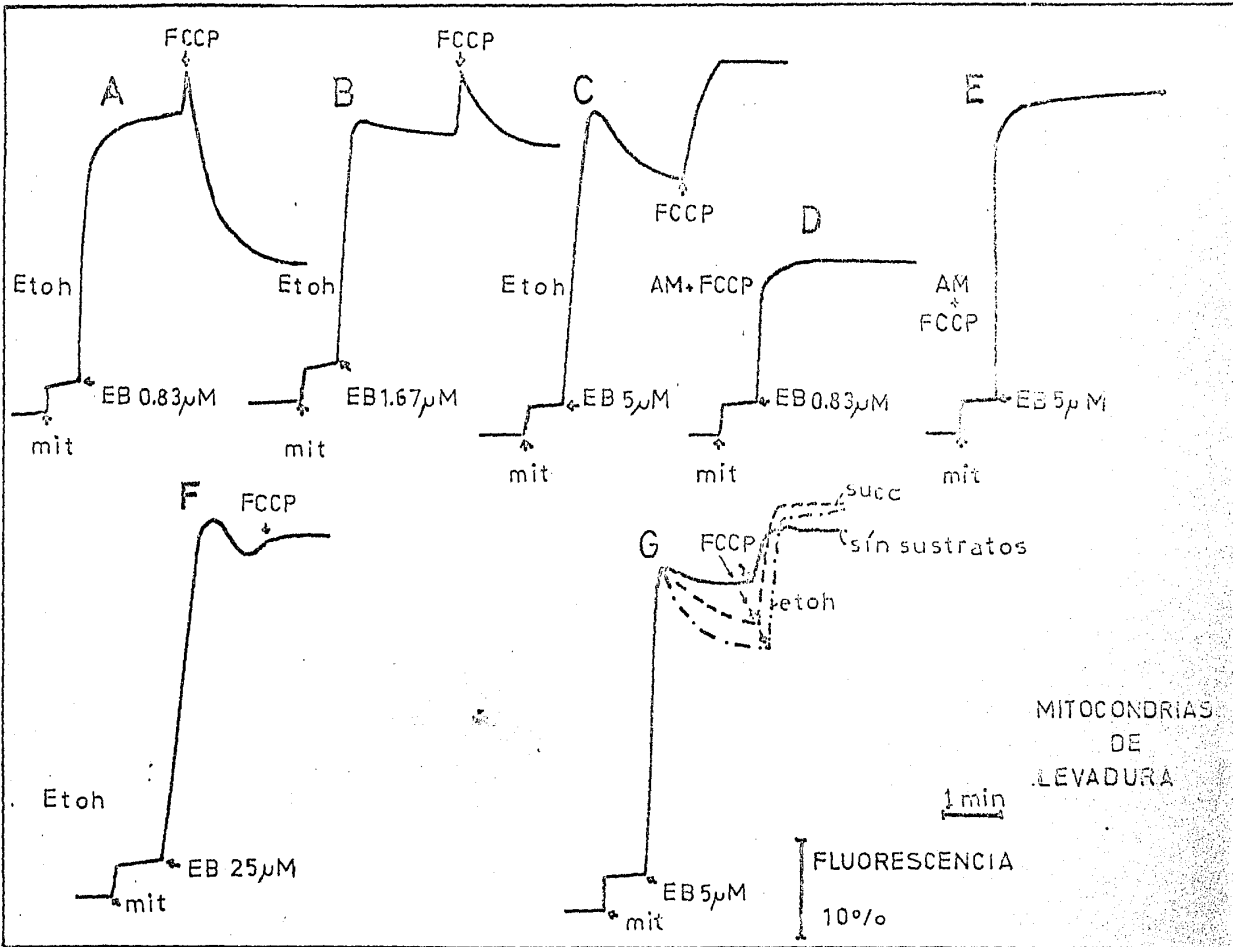
C) ML energizadas (Etanol), EB $5 \mu\text{M}$.

D) ML con antimicina y FCCP desde el principio, EB $0.83 \mu\text{M}$.

E) ML con antimicina y FCCP desde el principio, EB $5 \mu\text{M}$.

F) ML energizadas (Etanol), EB $25 \mu\text{M}$.

G) Tres trazos superpuestos, con EB $5 \mu\text{M}$ en diferentes condiciones de e-
nergización: (—) Sin sustratos; (---) Con succinato; (- - -) con Etan-
ol como sustratos.



D para una concentración baja de EB y traza E para una concentración más elevada; compararlos con A y C respectivamente).

En presencia de concentraciones de EB superiores a las que no producen alteraciones de las funciones de la mitocondria se observa un patrón inicial similar al descrito para la figura 6-B, pero el apagamiento inicial se ve revertido y la fluorescencia llega a un nivel estacionario que ya no es modificado por la acción de agentes deenergizantes (fig 6-F).

Cuando se experimenta con diferentes sustratos, se observa que los niveles de fluorescencia varían al agregar distintos sustratos en presencia de una concentración fija de EB. A 5 μ M de EB con ML se observa que en ausencia de sustrato es menor el apagamiento que en presencia de succinato y esta a su vez tiene menos que la que tiene etanol en el medio. En los tres casos, la adición de FCCP revierte el apagamiento a un nivel similar (Fig 6-C).

Si utilizamos la concentración de EB a la que se observa un patrón intermedio (Fig 6-B) y variamos la concentración de mitocondrias en el medio, obtenemos el patrón que obtendríamos al variar en sentido opuesto

la concentración del colorante (Fig 7) es decir, al aumentar la concentración de proteína obtenemos el mismo efecto sobre el patrón de fluorescencia que obtendríamos al disminuir la de EB y viceversa.

Se llevaron a cabo experimentos de alternamiento de estados, energizado y desenergizado, utilizando KCR (Fig 8), observando cambios de fluorescencia dependientes de estos, opuestos cuando la sustancia agregada era un inhibidor a cuando era un sustrato. La secuencia fue: Glutamato-Malato, Rotenona, ATP, Oligomicina, Succinato y Antimicina A. Es interesante hacer notar, por insuperado, que el ATP agregado después de la Antimicina A (Fig 8, trazo superior) no daba lugar a cambios de fluorescencia.

Absorbencia:

Ante los resultados obtenidos con la fluorescencia, y la aparición al aumentar la concentración de EB, de una inversión en el patrón de fluorescencia, que disminuía al energizar la mitocondria, hubo que diferenciar entre dos razones posibles, o bien la elevada concentración intramitocondrial del colorante estaba llevando a un apogonamiento por interacción de las moléculas del colorante, o la concentración del col

FIGURA 7

CAMBIO DE FLUORESCENCIA DE EB EN PRESENCIA DE DIFERENTES CANTIDADES
DE MITOCONDRIAS DE HIGADO DE RATA.

Medio de reacción: Sacarosa 125 mM, EDTA 0.5 mM, TEA pH 7.4; TEA-HCl
20 mM pH 7.4; Fosfato TEA 10 mM, pH 7.4; Glutamato-malato-TEA 10 mM-1 mM-
pH 7.4. Proteína mitocondrial indicada para cada trazo, EB 20 mM, volumen
final 3 ml, temp 25°C. FCCP 8 μ M final.

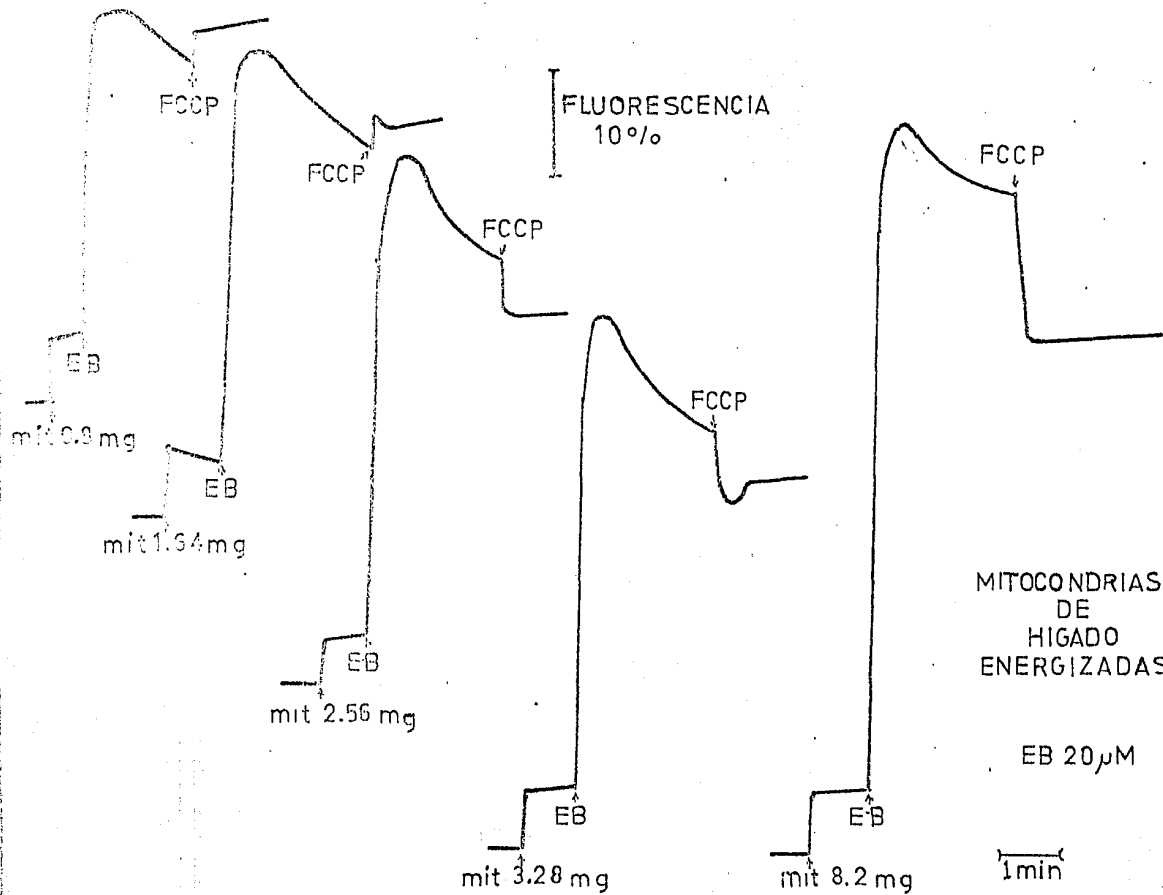
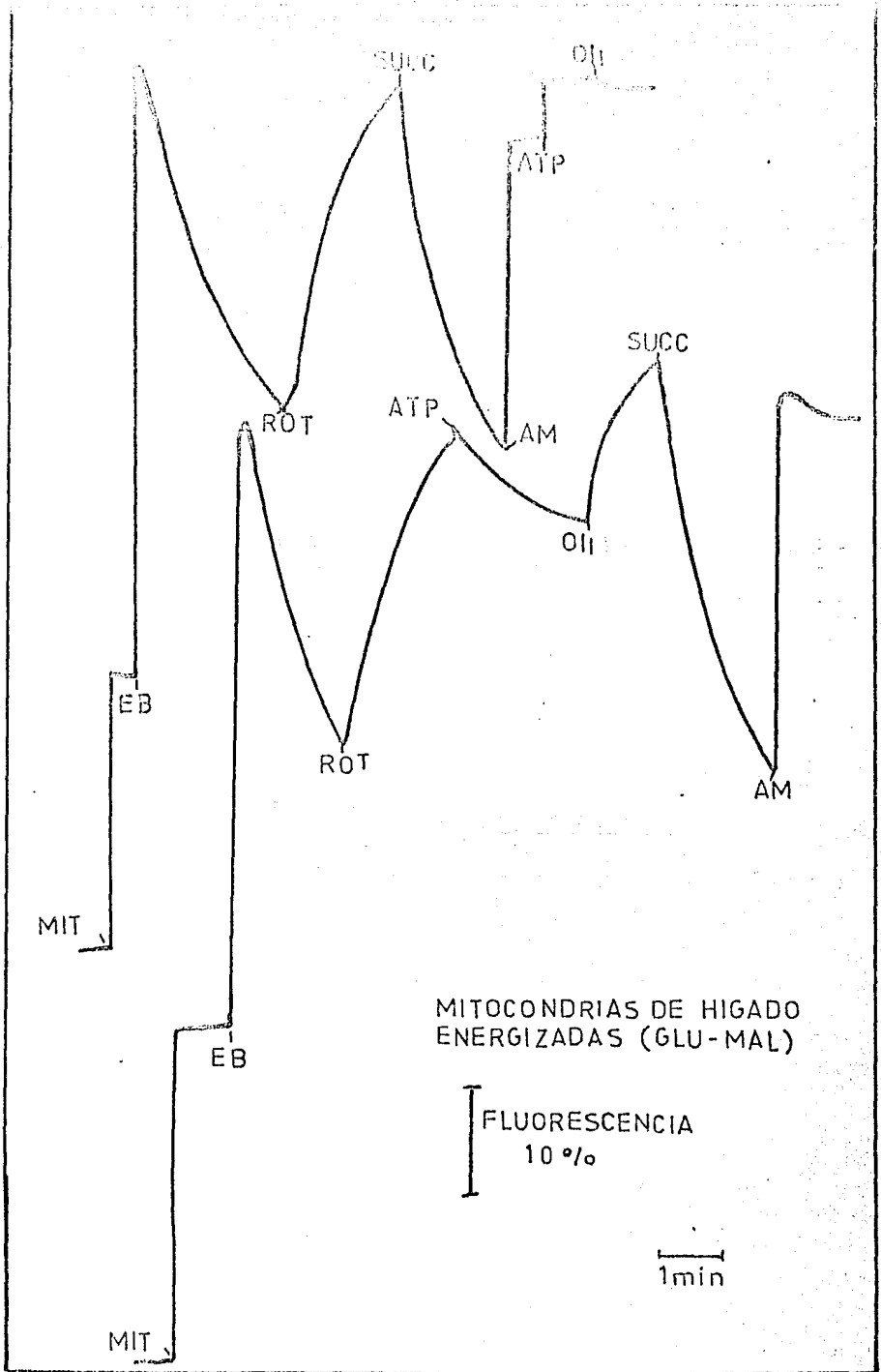


FIGURA 8

EFFECTO DEL ALTERNAMIENTO DE ESTADOS ENERGIZADOS Y DEENERGIZADOS SOBRE LA FLUORESCENCIA DE EB EN RMR.

Medio de reacción similar al de la figura 7, Rotenona (ROT) 5 μg en 5 μl de etanol, Succinato 5 mM, Antimicina A (AM) 6 μg en 3 μl de DMF, -- ATP 8 mM final. Oligomicina (oli) 10 μg en 10 μl de etanol. EB 30 μM , --- proteína mitocondrial 2 mg por trazo.



rente estaba condicionando cambios de captación por una mitocondria afeg-
tada metabólicamente. Para diferenciar entre estas dos posibilidades se
diseñaron experimentos de absorberencia y de captación de colorante por la
mitocondria. El espectro de absorberencia del EB se desplaza de manera im-
portante al variar la constante dieléctrica del medio en que se encuan-
tra. Estos datos fueron verificados corriendo espectros de absorberencia-
de EB hasta concentraciones muchas veces mayores a las usadas en los es-
tudios de fluorescencia.

Cuando se encuentra en un medio polar, el máximo de absorberencia del
EB se halla a 477 nm (Fig 9); en este caso se utilizó MES-TEA pH 6.0 en
agua, se observó a varias concentraciones, desde 16.6 μM hasta 300 μM y
no se observaron corrimientos laterales o pérdida de la linealidad en
el aumento de la intensidad de la absorberencia con respecto a la concen-
tración de EB. Al observar el espectro del colorante en un medio con una
menor constante dieléctrica, vemos un corrimiento del máximo hacia el -
rojo. A 526 nm con dioxano y hasta 532 nm con butanol (Figs 10 y 11).--
Estos máximos se mantienen aún cuando aumentemos varias veces la con-
centración del colorante y la linealidad del aumento de la absorberencia-

FIGURA 9

ESPECTROS DE ABSORBENCIA DEL EG A DIFERENTES CONCENTRACIONES EN

MEDIO POLAR.

Se utilizó un buffer de MES-TEA 20 mM, pH 6.0. Las concentraciones de EG se indican. Espectro total de 350 a 700 nm en dos minutos, velocidad de 2 nm por segundo, sensibilidad de absorbencia de 0.2 para todos los trazos.

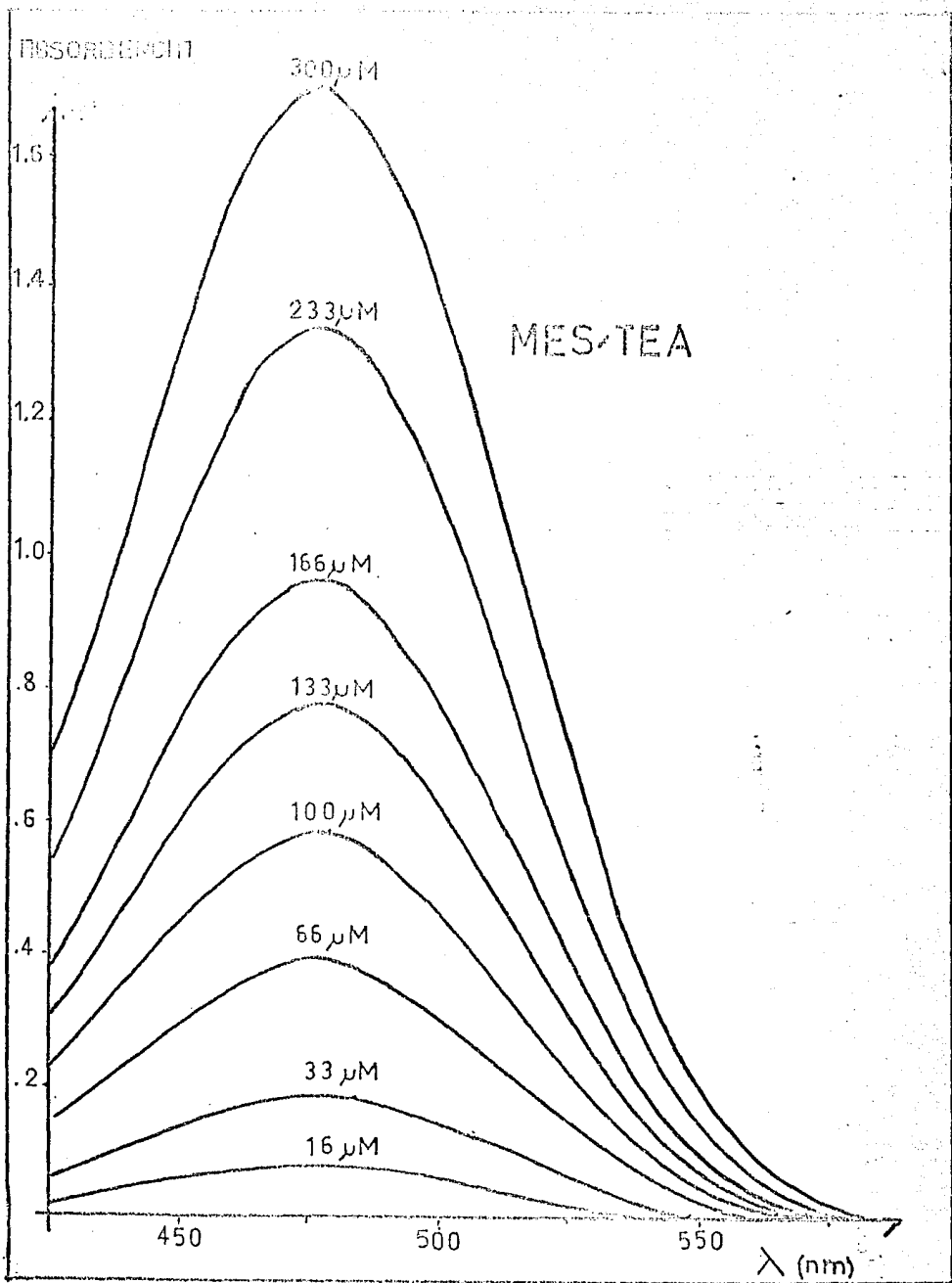


FIGURA 10

ESPECTROS DE ABSORBENCIA DE EB A DIFERENTES CONCENTRACIONES EN MEDIO
APOLAR, DIOXANO.

Condiciones similares a las de la figura 9.

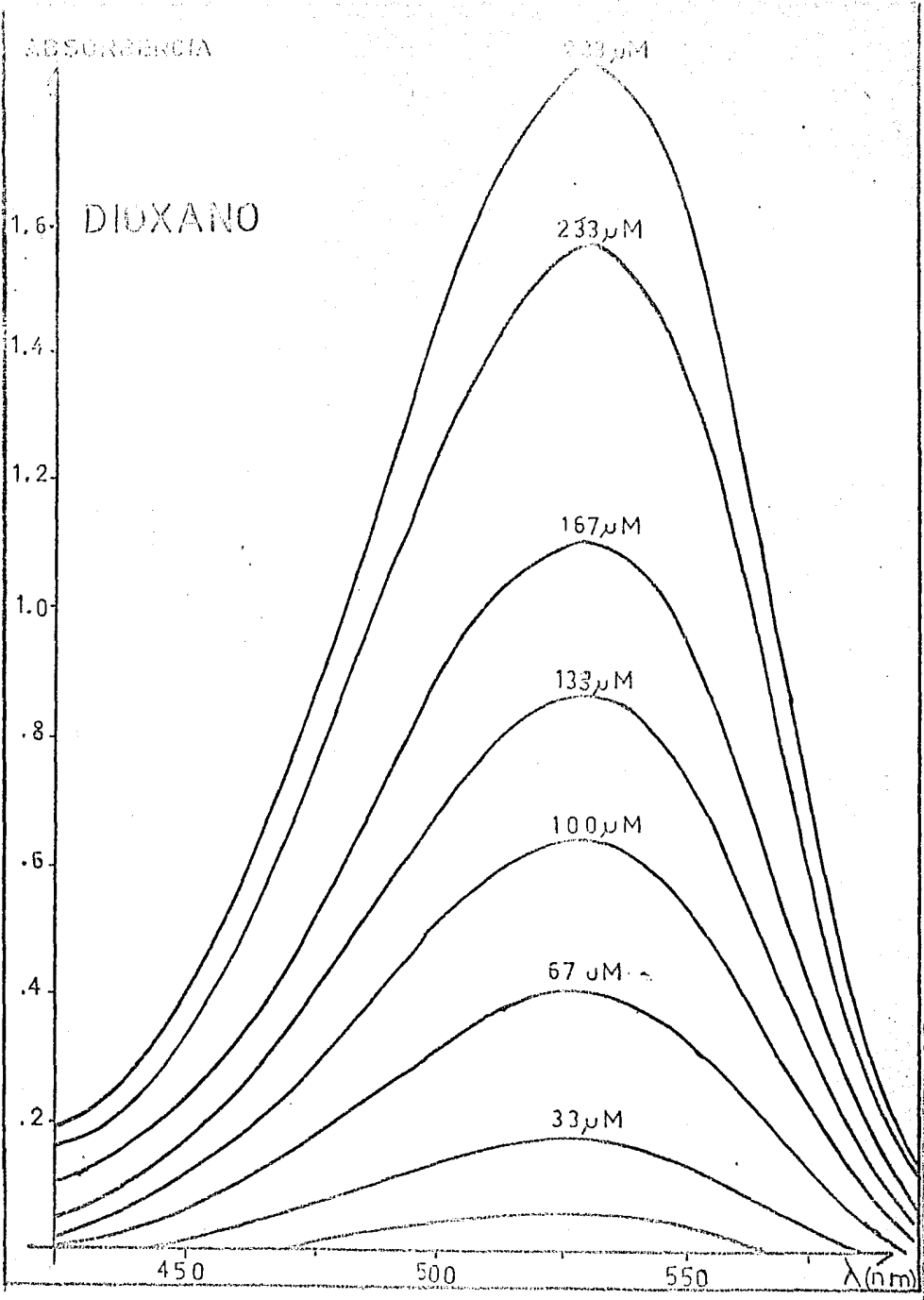


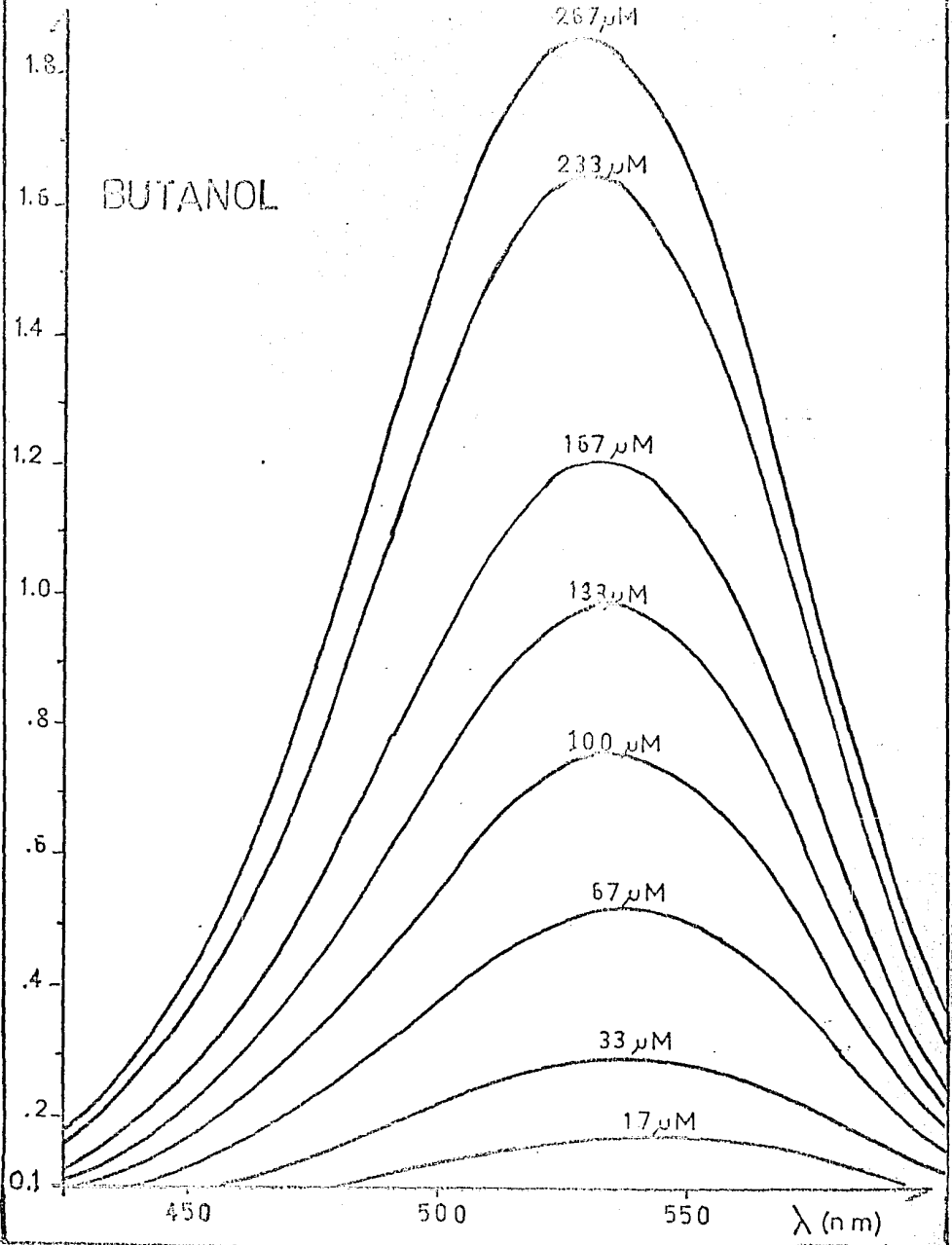
FIGURA 11

ESPECTROS DE ABSORBEANCIA DE EB A DIFERENTES CONCENTRACIONES EN MEDIO
APOLAR, BUTANOL.

Condiciones similares a las de la figura 9.

ABSORPTANCE

BUTANOL



con respecto al aumento de concentración se conserva en todos los parámetros observados.

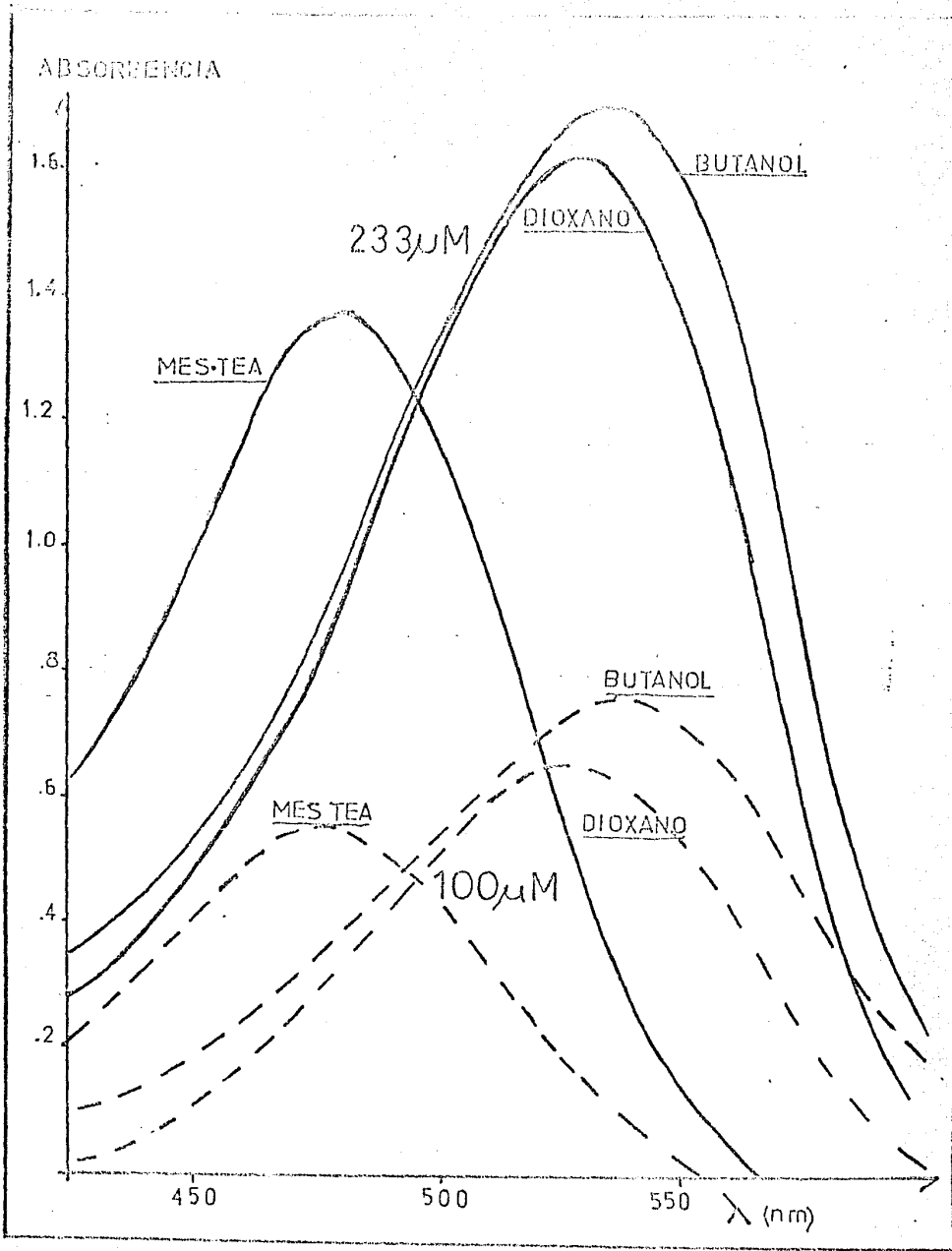
La magnitud de la absorbencia es mayor en el medio hidrófobo con respecto al medio acuoso en todas las concentraciones probadas, por lo que, además del corrimiento del máximo observamos un aumento de la absorbencia en el medio apolar que se presenta en todas las concentraciones. Esto puede verse en la figura 12, en la que se presentan dentro de las mismas escalas de absorbencia y longitud de onda los espectros en medio acuoso (MES-TEA), dioxano y butanol a dos diferentes concentraciones;-- una elevada de $233 \mu\text{M}$ y otra intermedia de $100 \mu\text{M}$ (trazo continuo y discontinuo respectivamente).

Considerando que la presencia de mitocondrias en un medio acuoso-- desplaza al colorante hacia la membrana mitocondrial y por esto el espectro de absorbencia debe desplazarse hacia longitudes de onda mayores, decidimos observar los espectros generados en presencia de los organelos, así como la dependencia de aquellos en la energización y deenergización de la membrana. Decidimos incluir los resultados con MHR debido a la escasez del material biológico obtenido con las levaduras y a que nuestros

FIGURA 12

COMPARACION DE ESPECTROS DE E8 A DIFERENTES CONCENTRACIONES EN MEDIOS DE DIFERENTE CONSTANTE DIELECTRICA.

Medios usados: MES-TEA 20 mM-pH 6.0, Dioxano y Octanol. Los trazos discontinuos muestran los espectros de E8 a una concentración de 100 μ M en los tres medios. Los trazos continuos muestran los espectros de E8 a 233 μ M. Sensibilidad similar para todos los trazos. Condiciones de instrumentación similares a las de la figura 9.



datos de fluorescencia ya describir los resultados obtenidos con éstos.

En presencia de mitocondrias demerilizadas, se trata de mitocondrias de hígado de rata ó de lavadera (Fig 13) se observa que el máximo de absorbancia se encuentra siempre por debajo de los 500 nm; al aumentar por encima de 5 μ M, concentración a la que lo observamos a 490 nm, a 10 μ M este llega a los 477 nm, de donde ya no se desplace aún aumentando varias veces la concentración del colorante (Hasta 170 μ M).

Cuando las mitocondrias se encuentran respirando en presencia de un sustrato, el espectro de absorbancia del EB tiene un máximo en valores superiores a 500 nm, que disminuye al aumentar la concentración del colorante por arriba de los que no mostraron efectos sobre el acoplamiento mitocondrial. Las KNO_3 , respirando en presencia de Glutamato-Maleato (Fig-14), muestran un máximo de absorbancia a 505 nm a las concentraciones de EB de 5, 20 y 30 μ M; este máximo se desplace hasta 501-502 nm con 50 μ M de colorante en el medio y cuando este se aumenta hasta 110 μ M llega a una 495 nm; a 170 μ M de EB el máximo se encuentra a 485 nm. Si se aumenta aún más la concentración de EB aún se desplace el máximo de absorbancia hacia longitudes de onda menores; de cualquier manera, sabemos -

FIGURA 13

ESPECTRO DE ABSORBENCIA DE EB EN PRESENCIA DE MITOCONDRIAS DEENERGI_ZADAS.

Se muestra un experimento con EPR, medio de reacción similar al de la figura 7. Antimicina 12 μ g y FCCP 8 μ M final desde el principio. Con centraciones de EB indicadas para cada trazo. Condiciones del instrumen to similares a las de la figura 9. Dos sensibilidades diferentes en la- figura; 0.1 para los trazos continuos y 0.2 para el discontinuo.

MITOCONDRIAS DEENERGIZADAS

ABSORBENCIA

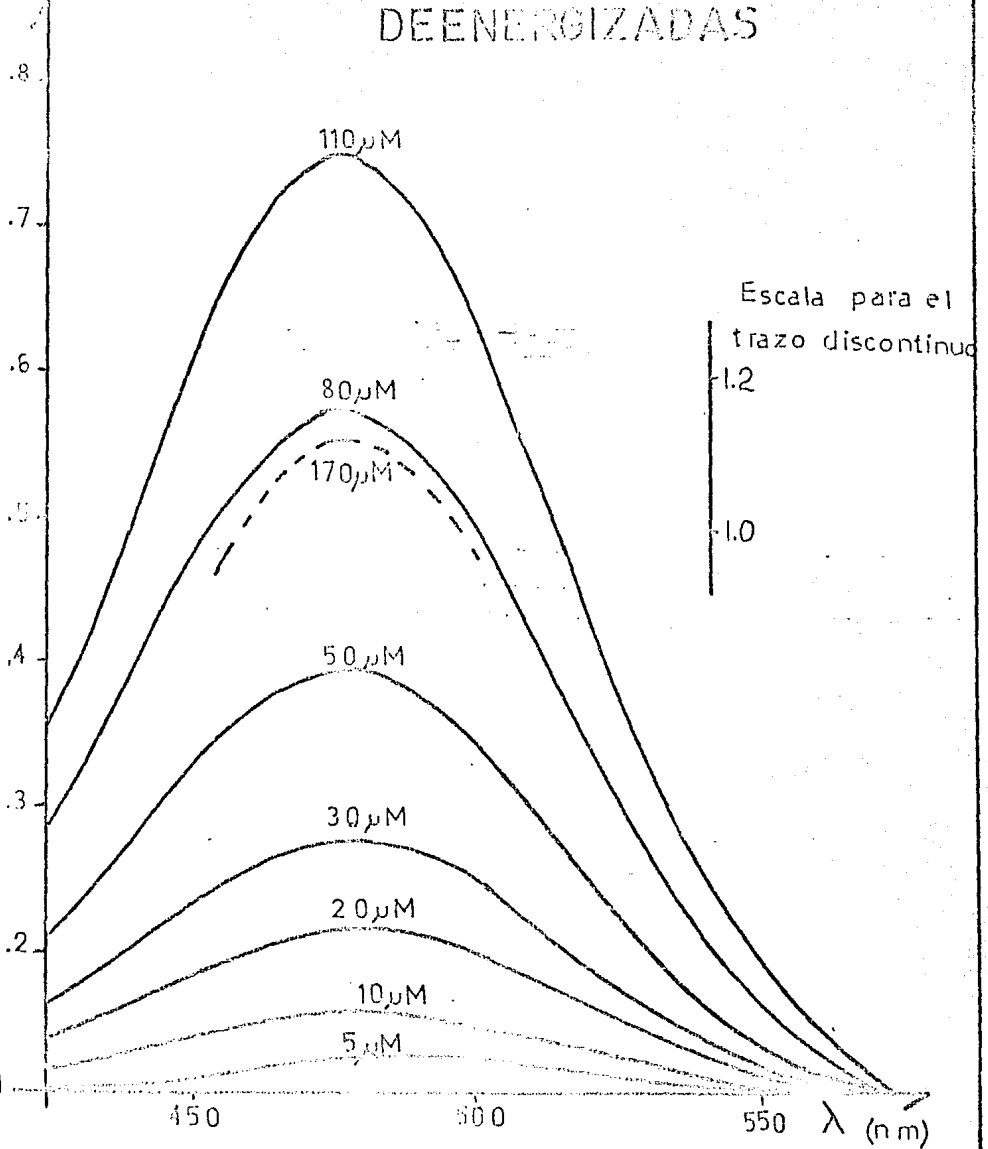


FIGURA 14

15

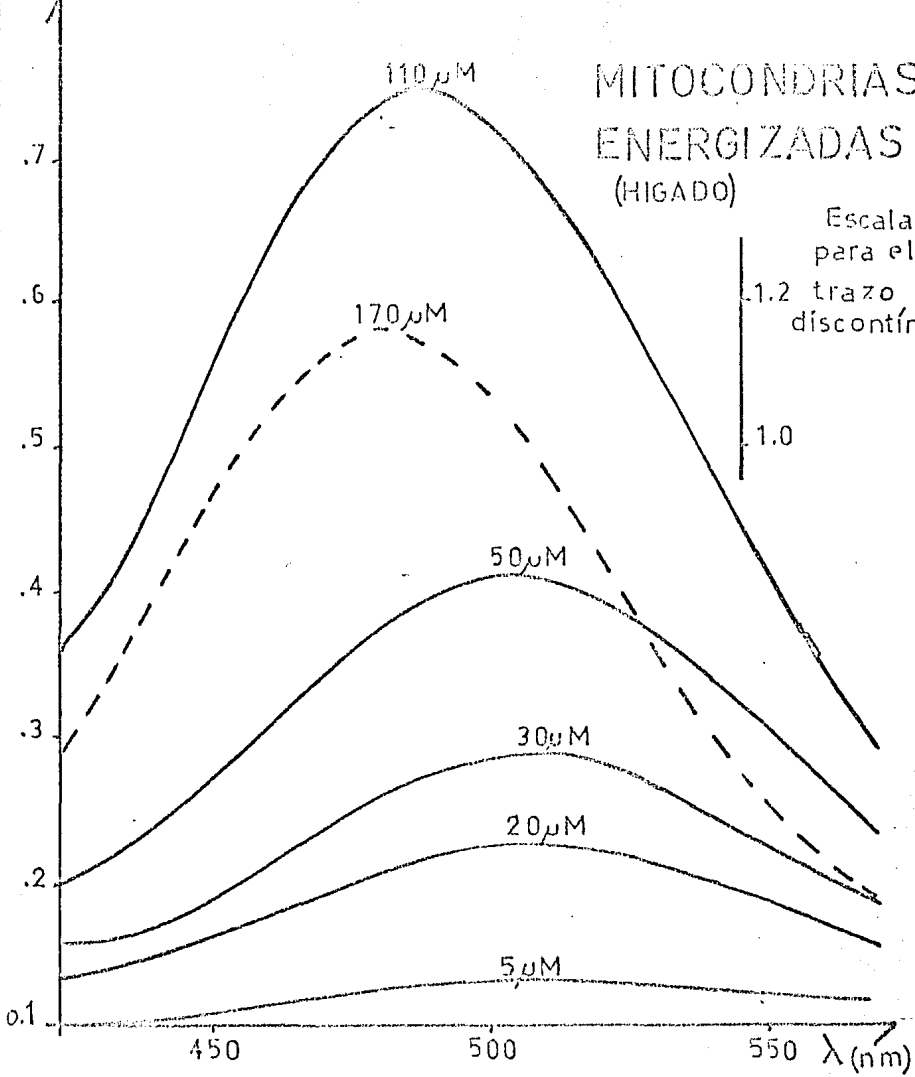
ESPECIES DE RESERVENIA DEL ES EN PRESENCIA DE LAS ESPECIES.

Condiciones de incubación similares a las de la figura 7. Condiciones de instrumentación similares a las de la figura 13, incluyendo la presencia de dos difarctores locales de sensibilidad de los ródops.

ABSORBENCIA

MITOCONDRIAS
ENERGIZADAS
(HIGADO)

Escala
para el
trazo
discontinuo
1.2
1.0



que ya desde $50 \mu\text{M}$ de EB la absorbancia no se encuentra en buenas condiciones de acoplamiento.

Con mitocondrios de levadura se llevaron a cabo experimentos similares (Fig 15) y se observaron los mismos desplazamientos de la absorbancia, aunque ahora a concentraciones menores del colorante; otra vez, por debajo de las concentraciones óptimas para el organelo el máximo de absorbancia del EB se encontraba por arriba de los 500 nm (a $5 \mu\text{M}$ se observa a 510 nm y a $10 \mu\text{M}$ a 506 nm), a concentraciones tóxicas ese máximo descendía aún más, llegando a 494 nm al poner $20 \mu\text{M}$ de EB en el medio y a 490 nm a $50 \mu\text{M}$.

En la figura 15 se muestran los espectros de absorbancia de mitocondrios energizados y desenergizados, se usan dos concentraciones de EB y se reportan a diferentes sensibilidades de absorbancia para hacer más obvia la localización de los máximos del espectro. A una concentración elevada, de $170 \mu\text{M}$, muy superior a la que ya es óptima para la mitocondria, se observa una diferencia entre los máximos de absorbancia de 7 a 8 nm , mientras que a $30 \mu\text{M}$ (líneas discontinuas en la fig 16) cuando los MMR aún se encuentran acoplados la diferencia entre los máximos de absor-

FIGURA 15

ESPECTRO DE ABSORBENCIA DEL EB A DIFERENTES CONCENTRACIONES EN
PRESENCIA DE ML ENERGIZADAS.

Condiciones de incubación similares a las de la figura 2. Condicio
nes de instrumentación similares a las de la figura 13. Una sola escala
de sensibilidad de absorberencia, de 0.1.

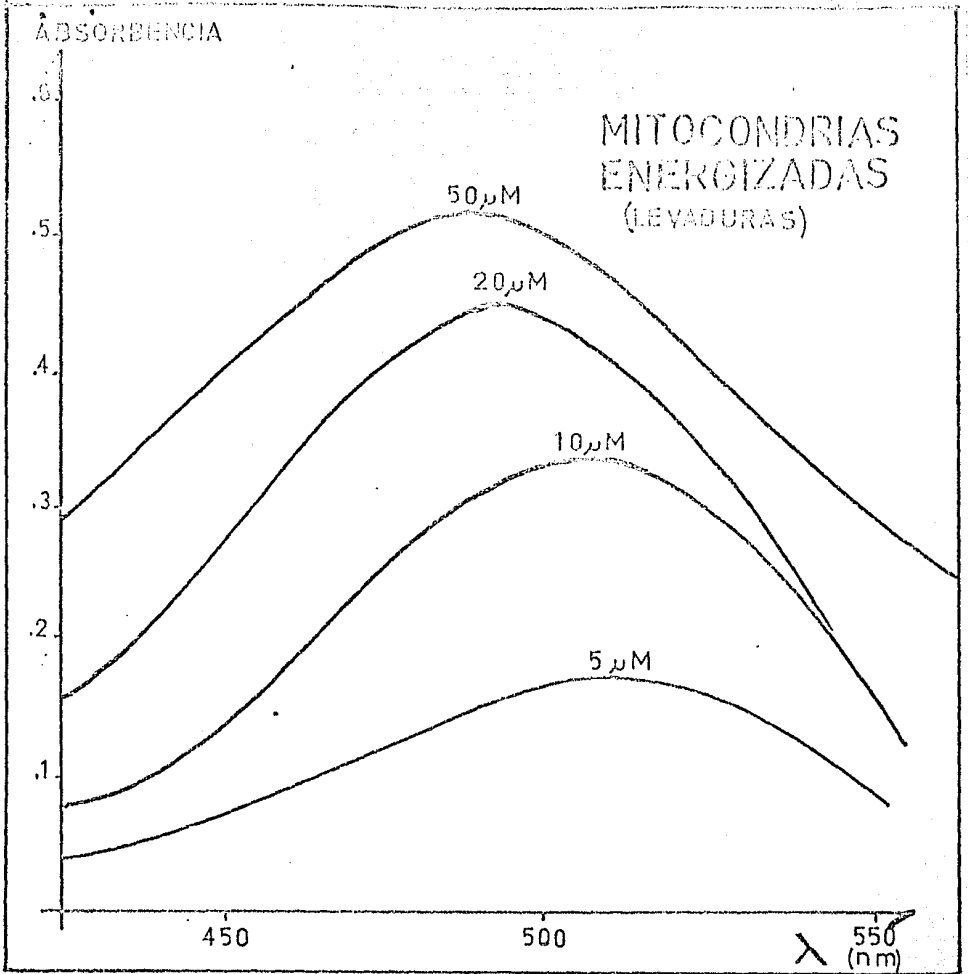


FIGURA 16

COMPARACION DE ESPECTROS DE ABSORBENCIA DE EB A DOS DIFERENTES CONCENTRACIONES, EN PRESENCIA DE NHR ENERGIZADAS O REENERGIZADAS.

Condiciones de incubación similares a las de la figura 7. Antimicina A (12 μg en 6 μl de DMF) y FCCP (8 μM final) en los casos de mitocondrios desenergizados. En 30 μM , (Medido a 0.1 de sensibilidad de absorbancia), y 170 μM (Medido a 0.2 de sensibilidad de absorbancia). Condiciones de instrumentación similares a las de la figura 13.

ABSORBENCIA

(MITOC. D. HIGADO)

1.4

M. ENERGIZADAS

170 μ M

1.2

M.
DEENERGIZADAS

1.0

.8

.6

M. ENERGIZADAS

.4

30 μ M

.2

M. DEENERGIZADAS

.0

450

500

550

λ (nm)

↑

.2

.1

0

lancia es de 25 nm. En esa figura, se debe hacer notar que aún a concen--
traciones tan elevadas como 170 μ M debe haber mayor cantidad de coloran--
te en la mitocondria previamente energizada que en la deenergizada pues
la intensidad de absorción es mayor para las primeras. Esto puede de--
berse a la presencia de un potencial residual, reflejo de la presencia--
de sustrato en el medio.

La energización y deenergización alternada de las MHR produce tam--
bién, a una concentración fija de EB, desplazamiento del máximo de ab--
sorbencia alternadamente a mayores y menores longitudes de onda, esto--
se observó poniendo el EB en un principio en ausencia de mitocondrias--
en el medio de reacción (Tabla II) y se observó un máximo a 488 nm; al
agregar mitocondrias consumiendo exclusivamente sustratos endógenos se
obtuvo un corrimiento hacia longitudes de onda mayores (507 nm) que se
acentuó con la adición de Glutamato-malato como sustrato de primer sitio
llegando a 512 nm; al agregar Rotenona volvió a correrse el máximo de
regreso hasta 496 nm. Agregando ahora succinato como sustrato de segun--
do sitio obtuvimos de nueva cuenta un aumento en la longitud de onda a--
la que encontramos el máximo de absorción, hasta 515 nm; al deenergiz-

T A B L A I I

LOCALIZACIÓN DEL MÁXIMO DE ABSORBENCIA PARA EL O₂ EN MEDIO ACUOSO ANTES Y DESPUÉS DE LA ADICIÓN DE MITOCONDRIAS (MR) Y DE DIFERENTES SUSTRATOS E INHIBIDORES.

<u>ADICIÓN SECUENCIAL:</u>	<u>Longitud de Onda (nm)</u>
MEDIO ACUOSO	488
+ MITOCONDRIAS	507
+ GLUTAMATO MALATO	512
+ ROTENONA	498
+ SUCCINATO	515
+ ANTIMICINA A	484

Medio de incubación similar al de la figura 7, adición secuencial de las sustancias enumeradas con medición, después de cada adición, del espectro de absorbencia. Condiciones del instrumento como en la figura-9, sensibilidad de 0.1.

zar de nueva cuenta, ahora con antimicina A el máximo se situó a 40% m.
Otra vez, como ya reportamos en los estudios de fluorescencia, el ATP a-
gregado después de la antimicina no generó nuevas corrientes (No se--
muestra). La presencia de un desacoplante mimetiza el efecto de los inhi-
bidores de la cadena respiratoria y evita el de cualquier sustrato.

III Captación de EB por la mitocondria:

Los resultados de captación de EB por mitocondrias en diferentes--
estados de energización también debían demostrar diferente captación --
de EB siendo mayor en el estado energizado que en el deenergizado, aún-
cuando en los datos de fluorescencia se observa que a concentraciones--
intermedias de EB la fluorescencia es menor antes que después de dec--
nergizar.

Debido a la poca cantidad de mitocondrias de levadura obtenida y a
la necesidad de utilizarla en concentraciones elevadas para poder apre-
ciar captación del colorante, para EL se utilizó a una concentración de
5 uM para evitar efectos secundarios sobre los organelos y se experimen-
tó exclusivamente en dos estados, el energizado, en presencia de etanol
como sustrato, y el deenergizado, en presencia de Antimicina A y FCCP--

en el medio de reacción, también se tuvo que modificar el método de --- medida de la fluorescencia, pues una vez centrifugadas las mitocondrias casi no se observaban diferencias de concentración de colorante en el sobrenadante (Paña y cols 1977 describen el método original), lo que se hizo fue desecar el sobrenadante y resuspender las mitocondrias, rompiéndolas con detergente, diluyéndolas con agua y leyendo la fluorescencia de esta solución, para después referirla (Tabla III) a concentración total de proteína mitocondrial usada por muestra y reportarla como unidades arbitrarias por mg de proteína usada.

Para las MBR cuya captación de EB ya había sido medida previamente y reportada (Paña y cols 1977) se hicieron experimentos similares con este método y se reportan en la misma tabla III para usarse como referencia.

Apreciamos que la captación de EB en dos minutos, en ambos tipos de mitocondrias (Tabla III) se compara en el estado energizado y el desenergizado. El extracto de M energizadas fluoresce con el doble de intensidad que el de M desenergizadas. La concentración de EB utilizada para estos experimentos, por muestra fue de 5 μ M, todavía inco~~va~~, pero-

T A B L A I I I

CAPTACION DE EB MEDIDA EN UNIDADES ARBITRARIAS DE FLUORESCENCIA
POR MILIGRAMO DE PROTEINA MITOCONDRIAL EN DOS MINUTOS.

<u>MITOCONDRIAS</u>	<u>ENERGIZADAS</u>	<u>DEENERGIZADAS</u>
<u>DE LEVADURA (EB 5 μM)</u>	.0162 \pm .0022	.0089 \pm .0019
<u>DE HIGADO DE RATA (EB 30 μM)</u>	.0105 \pm .0058	.0187 \pm .0080

Condiciones de incubación: radio para FL similar al de la Tabla I, EB 5 μ M. Para ICR radio similar al de la figura 7, EB 30 μ M. Incubación durante dos minutos. Los valores son los promedios de 4 determinaciones.

con presencia de apagamiento en la mitocondria íntegra. Con MHR se obtu-
vieron resultados similares, pues se observa que las mitocondrias energé-
tizadas con Glutamato-sulato como sustrato captaron 6 veces más que las
deenergizadas.

El que los valores de fluorescencia sean más elevados para MHR que
para NL puede deberse a que con las MHR se utilizó una concentración de
30 μ M de EB en el medio, que es la requerida para ver apagamiento de --
fluorescencia en la mitocondria íntegra energizada.

D I S C U S I O N :

Las características del CB lo sitúan como un posible monitor de -- potencial de los llamados de incorporación, o también de respuesta lenta (Waggoner 1978); su coeficiente de partición se desplaza en gran medida del medio externo hacia la membrana, sobre todo cuando la carga del lado opuesto se hace negativa con respecto al medio en que se halla el colorante. Cuando el gradiente de carga se abate, el monitor se desplaza de vuelta hacia el medio externo y muestra importantes cambios en sus propiedades ópticas, que son observables a las concentraciones a las que-- no se observan efectos adversos sobre la fosforilación oxidativa (Tabla I; Peña y cols 1977) y que, una vez caracterizados para el sistema en-- estudio, indican fielmente cual es el estado energético de una membrana. Las concentraciones desde 0.5 hasta 5 μM para ML y desde 5 hasta 30 μM para MR no alteran la fosforilación oxidativa y sí se observan impor--

tales cambios en las propiedades ópticas del colorante al energizar y deenergizar la mitocondria:

Los experimentos de absorbencia muestran que el ER, en presencia de mitocondrias energizadas, entra en una fase apolar con respecto a la -- del medio en ausencia de mitocondrias, lo que genera un corrimiento del máximo de emisión hacia el rojo. Esa fase apolar es saturable, con lo-- que al rebasar cierta concentración, se observa una reversión gradual-- del desplazamiento original, regresando el máximo hacia las longitudes-- de onda, menores, del medio hidrofílico, en proporción con el aumento-- del colorante, que debe estar quedando fuera de la fase apolar una vez-- que se ha saturado. Esta saturación debe verse facilitada de manera im-- portante también por la inhibición que el mismo colorante ejerce sobre-- la respiración mitocondrial.

A las mismas concentraciones, si deenergizamos a la mitocondria con inhibidores de la cadena respiratoria o con desacoplantes, la absorbencia desplaza su máximo hacia la longitud de onda que indica que el colo-- rante se encuentra en un medio polar; una vez hecho esto, si administra-- mos un sustrato cuyos electrones ingresen a la cadena respiratoria abajo del sitio inhibido, el máximo de absorbencia indicará un nuevo ingreso--

apagamiento de las moléculas de EB que, demasiado próximas unas a otras en la fase mitocondrial deben interferir mutuamente su fluorescencia,-- tal como se ha descrito para el caso de la atetrina (Izzi, Fibro y Cantato 1971) y con algunas colorantes derivados de la cianina (Eles y cols 1974). Una vez desenergizada la mitocondria, se establece un nivel de -- fluorescencia, siempre mayor que el que se alcanzaría con la suma de la fluorescencia de ambos medidos por separado en medio acuoso; ese nivel debe corresponder al de la fluorescencia de EB distribuido entre las dos fases, la membranal y la externa, de acuerdo con el coeficiente de partición en ausencia de potencial en la membrana. La adición alternada de-- sustratos con sus inhibidores específicos en la mitocondria provoca cambios de la fluorescencia del EB con direcciones definidas y opuestas entre sí siguiendo la energización y desenergización mitocondrial; esto--- muestra la utilidad del EB como monitor de energización en una membrana.

Entre la concentración de EB que genera apagamiento y la que muestra aumento de la fluorescencia, hay una transición, a una concentración en que se observa que el nivel de fluorescencia casi no varía, ni en el tiempo ni al energizar y desenergizar la mitocondria. Si a esta concentración de colorante se varía la cantidad de mitocondrias en el medio,--

se ve el efecto contrario al resultante de variar el EB en la misma dilución; esto indica una dependencia del patán de Fluorescencia con la relación de las concentraciones EB-mitochondria en el medio y no solamente con la concentración total del colorante.

No debe olvidarse que además, el EB es un catión orgánico monovalente; esto explica que su comportamiento en cuanto a la influencia que tiene sobre la cadena respiratoria al aumentar su concentración sea similar a la descrita para otros cationes orgánicos monovalentes (Rogers y Higgins 1973; Pressman 1963; Gómez Puyou y Tuena de Gómez Puyou 1974). El aumento gradual de la concentración del colorante provoca una inhibición del estado 3 mitochondrial cuando el organelo está utilizando sustratos NAD^+ dependientes; no así cuando se utiliza succinato. La concentración de EB a la que se observa esto es de $12.5 \mu M$ para ML .

Utilizando otros cationes orgánicos, este efecto selectivo de inhibición sobre la parte inicial de la cadena ya ha sido descrito, para NHR con guanidinas y derivados alquilados (Pressman 1963; Gómez Puyou y Tuena de Gómez Puyou 1974) e incluso para el EB (Peña y cols 1977). Esto ha llevado a postular sitios hidrofóbicos, inhibibles por estos compuestos, situados entre la $NADH$ deshidrogenasa y el citocromo b (Yaguzhinsky

1973). Otros interesantes experimentos, aunque ahora en particular mitocondrias han mostrado que la NADH deshidrogenasa es inhibida por el NAD^+ , que además de ser el producto de la reacción catalizada por la enzima, es un cofactor orgánico. La reversión de esa inhibición por ciertas inorgánicas mostrada en el mismo trabajo (Valenz y Wojtowak 1978) puede ser debida a una competencia y rechazo mutuo por la similitud de cargas. En mitocondrias de levadura, hemos encontrado aceleración del consumo de Oxígeno y aumento del cociente respiratorio como efectos de la presencia de Potasio (Tuena y cols En Prensa).

Al continuar aumentando la concentración de ED en el medio, a $25 \mu\text{M}$ para mitocondrias de levadura, encontramos cada vez mayor inhibición que ahora se torna independiente del sustrato utilizado. A concentraciones aún mayores, por ejemplo a $40 \mu\text{M}$, ya casi no hay consumo de Oxígeno y no hay influencia ni de desacoplantes ni de ADP.

Los datos de inhibición obtenidos para mitocondrias de levadura son esencialmente similares a los reportados por Peña y cols (1977) para mitocondrias de hígado de rata, excepto que ellos observan en su sistema un desacoplamiento inicial y que se requieren mayores concentraciones

nas de colorante para observar efectos inhibitorios. Aún cuando la variación de experimento a experimento es grande, la proporción colorante-mitochondria usada tanto para FL como para FHR cae en el mismo orden de magnitud por lo que aún deben hacerse estudios aumentando la concentración de FL buscando una reversión de la inhibición.

El EB tiene una última característica que analizar; se trata de un agente mutágeno mitocondrial importante. Los experimentos de captación demostraron que las mitochondrias energizadas concentran el EB de manera importante. Este colorante debe estar solubilizado en un medio de menor constante dieléctrica o de mayor viscosidad que el medio acuoso externo, puesto que esto lleva a modificaciones importantes de sus propiedades ópticas, afines a su carga pues de otro modo se rechazarían. Esto nos deja con dos posibles sitios de localización del EB, la membrana interna mitocondrial en su parte polar interna (Laüger y Neuncke 1973, citados por Sims 1974) y las moléculas de la matriz mitocondrial, que posean una carga negativa, entre las cuales se encuentra de una manera importante el DNA mitocondrial, el cual además genera cambios en las propiedades ópticas del colorante (Hong y Pietto 1976). Una vez que el EB interactúe en grandes concentraciones con el DNA mitocondrial, las mutaciones que-

lleva a células respiratorias deficientes a las levaduras deben quitarse con relativa facilidad. (De Nobrega y Nigam 1974).

Nuestro grupo ha llevado a cabo algunos estudios sobre la modificación de las propiedades ópticas del EB al interactuar con las células de levadura íntegras, observando un paralelismo de los resultados obtenidos así con los reportados aquí para mitocondrias aisladas, ya que la deenergización de las mitocondrias desde el exterior de la célula íntegra genera cambios de fluorescencia que reflejan el estado mitocondrial observándose disminución de la fluorescencia al energizar y un aumento al deenergizar, en un patrón de cambios bastante similar al observado cuando usando mitocondrias aisladas se mide la fluorescencia de concentraciones elevadas de EB. Algunas de las figuras presentadas en esta tesis fueron tomadas de ese trabajo (Peña y cols 1980).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS :

El EB es un buen monitor fluorescente que a concentraciones inferiores a las que interfieren con los procesos fisiológicos mitocondriales cambia su intensidad de fluorescencia dependiendo de la presencia o ausencia de energización en la mitocondria.

Los dos patrones de fluorescencia observados monitorean adecuadamente la energización mitocondrial.

Aún sin hablar de cifras exactas, podemos afirmar que el cambio de patrones de fluorescencia depende de la proporción colorante-proteína.

Al aumentar la concentración de EB se inhibe el consumo de Oxígeno, primero selectivamente sobre el primer sitio y luego sobre toda la cadena respiratoria, perdiendo su utilidad como monitor.

La elevada concentración intramitocondrial de EB observada en condiciones de funcionalidad debe ser un factor determinante para la mutagenicidad específica del colorante sobre este organelo.

Los cambios de fluorescencia en las mitocondrias aisladas guardan cierto paralelismo con los observados en levaduras íntegras, por lo que in vivo debe concentrarse también el EB en la mitocondria. El EB podría utilizarse como monitor del estado energético mitocondrial en la célula íntegra, in vivo.

Queremos seguir investigando sobre la posibilidad de utilizar el EB como un monitor de energización a nivel cuantitativo, aprovechando sus características, tanto de absorción como de fluorescencia, en especial las primeras que lo hacen comparable a la safranina que ha sido utilizada ya eficientemente como monitor de potencial (Åkerman y Wikström 1976) aprovechando la separación de sus máximos de absorberencia en medios de diferente constante dieléctrica.

B I B L I O G R A F I A :

Akerman K. E. O. y Wikström M. K. F. (1976) FEBS LETTER 68,2; 191-197
Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential.

Azzi A., Febro A., Santato M. y Gherardini P. L. (1971) Eur J Bioch 21;
404-410.

Energy transduction in mitochondrial fragments. Interaction of the
membrane with acridine dyes.

Azzi A. y Santato M. (1971) Bioch Bioph Res Com 44,1; 211-217

Interaction of ethidium with the mitochondrial membrane. Cooperative
binding and energy linked changes.

Crocklenhurst J. R., Freedman R.B., Hancock D.F. y Radda E. K. (1970)
Bioch J. 116; 721-731

Membrane studies with polarity dependent and excimer forming
fluorescent probes.

Chen R. F. (1967) J. Biol. Chem. 242,2; 173-181.

Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment.

Chen R. F. (1977) Arch. Bioch. Bioph. 179; 672-681.

Fluorescence of free and protein bound aureamine U.

De Kloet S. R., Van Wermeskerken R. K. A. y Koningsberger V. V. (1961)

Bioch. Bioph. Acta 47; 138-143.

Studies on protein synthesis by protoplasts of Saccharomyces carlsbergensis.

De Nobrega B. R. y Mahler H. R. (1974) J. Biol. Chem. 249, 20; 6617-6627.

Molecular mechanisms of mitochondrial genetic activity. Effects of ethidium bromide on the deoxyribonucleic acid and energetics of isolated mitochondria.

Edelman G. M. y Mc Clure W. O. (1968) Sect. Chem. Res. 1, 65-68.

Fluorescent probes and the conformation of proteins.

Gitler C., Ruvalcaba B. y Caswell A. (1969) Bioch. Bioph. Acta 103; 479-483

Fluorescence changes of ethidium bromide on binding to erythrocyte and mitochondrial membranes.

Gómez Puyou A. y Tuana de Gómez Puyou M. (1974) en Perspectives in Membrane

Biology, Estrada E. S. y Gitler C. (Eds.) Acad. Press N.Y.; 303-328.

Site and mechanism of action of cations in energy conservation.

Crimwood B. G. y Wagner R. P. (1976) Arch. Bioch. Bioph. 176; 43-52.

Direct action of ethidium bromide upon mitochondrial oxidative phosphorylation and morphology.

Hare F. y Lussan C. (1977) Bioch. Bioph. Acta 167; 262-272.

Variations in microviscosity values induced by different rotational behaviour of fluorescent probes in some aliphatic environments.

Hladky S. B. y Rink T. J. (1976) J. Physiol. 263; 287-319.

Potential difference and the distribution of ions across the human red blood cell membrane: A study of the mechanism by which the fluorescent cation diS-C₃-(5) reports membrane potential.

Hong S. J. y Piette L. H. (1976) Cancer Res. 36; 1159-1171.

Electron spin resonance spin label studies of intercalation of ethidium bromide and aromatic amine carcinogens in DNA.

Kinnally K. W., Tedeschi H. y Maloff B. L. (1978) Biochem. 17, 16; 3419-3427.

Use of dyes to estimate the electrical potential of the mitochondrial membrane.

Laris P. C., Zahr D. P. y Chaffee R. J. (1975) Bioch. Bioph. Acta 376; 415-421.

Membrane potentials in mitochondrial preparations as measured by means of a cyanine dye.

Laris P. C. y Fershadhsingh H. A. (1974) Bioch Bioph Res Com 573; 620-626

Estimations of membrane potentials in Streptococcus faecalis by means

of a fluorescent probe.

Miko M. y Chance B. (1975) FEBS Letters 54; 347-352.

Ethidium bromide as an uncoupler of oxidative phosphorylation.

Miller J. B. y Washland D. E. (1978) Nature 272; 83-84.

Effects of cyanine dye membrane probes on cellular properties.

Murphy J. B. y Kies M. W. (1960) Bioch. Bioph. Acta 45; 382-384.

Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions.

Nalecz M. J. y Wojtczak L. (1978) Bioch. Bioph. Res. Com. 80,4; 681-689.

Effects of monovalent cations on the inhibition by NAD^+ by NADH oxidation in submitochondrial particles.

Peña A., Clemente S. M., Corbolla M., Carrasco N. y Uribe S. (1980)

Arch. Bioch. Bioph. 201, 2; 420-428.

Multiple interactions of ethidium bromide with yeast cells.

Peña A., Chavez E., Cárabez A. y Tuena de G.F. M. (1977) Arch. Bioch.

Bioph. 180; 522-529.

The metabolic effects and uptake of ethidium bromide by rat liver mitochondria.

Peña A., Piña M. Z., Escamilla E. y Piña E. (1977*) FEBS Letters 8,1; 209-213.

A novel method for the rapid preparation of coupled yeast mitochondria.

Fressman E. C. (1963) J. Biol. Chem. 238, 1; 401-409.

The effects of guanidine and alkylguanidines on the energy transfer reactions of mitochondria.

Rogers K. S. y Higgins E. S. (1973) J. Biol. Chem. 248, 20; 7142-7148.

Lipophilic interactions of organic cations with mitochondrial inner membranes during respiratory control.

Ross W. N., Salzberg B. M., Cohen L. E. y Dávila H. V. (1974) Bioph J. 14; 983-986.

A large change in dye absorption during the action potential.

Rubalcava B., Martínez de M. D. y Gitler E. (1969) Biochem. 8,7; 2742-2747.

Interaction of fluorescent probes with membranes. I Effect of ions on erythrocyte membranes.

Salawa G. y Horod M. (1976), Science 191; 485-487.

Merocyanine 540 as an optical probe of transmembrane electrical activity in the heart.

Seelig A. y Seelig J. (1974) Biochem. 13,16; 3315-3330.

Studies on the mechanism by which cyanine dyes measure membrane potential in red blood cells and phosphatidil choline vesicles.

Singer S. J. y Nicolson G. (1972) Science 175; 720-732.

The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.

Thulborn K. R. y Sawyer W. H. (1978) *Bioch. Biophys. Acta* 511; 125-140.

Properties and the locations of a set of fluorescent probes sensitive to the fluidity gradient of the lipid bilayer.

Tilley V., Thulborn K. R. y Sawyer W. H. (1979) *J. Biol. Chem.* 254,6; 2592-2594.

An assessment of the fluidity gradient of the lipid bilayer as determined by a set of n(9 anthroyloxy)fatty acids (n=2, 6, 9, 12, 16).

Tuena de Gómez Fuyou M., Uribe S., Matton G., Gomez Fuyou A. y Peña A. Mandado a prensa.

The action of monovalent cations on oxidative phosphorylation of yeast mitochondria.

Waggoner A. S. (1976) *J. Membr. Biol.* 27; 317-334.

Optical probes of membrane potential.

Waggoner A. S. (1979) en *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 8; 47 a 68.

Dye indicators of membrane potential.

Yagushinsky L. S., Smirnova E. G., Ratnikova L. A., Kolesova G. N. y Krasinskaya I. P. (1973) en *Bioenergetics*, 5; 163-174.

Hydrophobic sites of the mitochondrial electron transfer system.