

11261 2ej
17

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

" TRANSHIDROGENASA MITOCONDRIAL DE TESTICULO DE RATA "

Tesis, que para obtener el grado de Maestro en Ciencias Biomédicas en el área de Bioquímica presenta:
Leticia Haydeé Ramírez Silva
1989.

FALLA DE ORIGEN



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.

V. B.
 Francis O. Schmitt

SUMMARY

The mitochondrial pyridine nucleotide transhydrogenase has been extensively studied in bovine heart but its role in energy transduction is not clear. Thus it was thought that its function could be better understood if its characteristics in tissues with distinct metabolic properties, such as testis, are established. Moreover in testis, there is only one report in which the activity was merely described (32).

Taking this into account, we undertook the study of the properties of the pyridine nucleotides transhydrogenase activity in submitochondrial particles from testis under energized and non-energized conditions. All the experiments were carried out in parallel with submitochondrial particles from bovine heart, in order to establish if there was a difference in the two preparations. We studied the temporal course of the reactions; from the data the equilibrium constants were calculated in the absence and presence of electrochemical proton gradients. The capacity of energy generation by both particle preparations was also determined.

The results show that the energy-dependent testicular transhydrogenase reaction was two-fold slower than that observed in heart submitochondrial particles; in addition it was found that at equilibrium, the energy-dependent reaction was also less favorable in the testis preparation. The velocity of the energy-

independent reaction was the same for both tissues. In the presence of an electrochemical force, the energy dependent reaction was stimulated to the same extent in testis and heart submitochondrial particles. The energy-independent reaction was much more sensitive to the energization process than the heart preparation. These differences observed were only in the initial velocity, but the apparent equilibrium constants, in both preparations were modified in the same ratio and direction. The membrane potentials generated in the same conditions was significantly lower in the testis preparations; we think this is due to a higher H^+ permeability of the preparation. Instead of the uncoupled submitochondrial particles, we decided to continue the study with the testis mitochondrial capacity to build up and maintain membrane potentials and to synthesize ATP, in the same manner as the hepatic mitochondria. So we consider that the testis mitochondrial transhydrogenase study should be done in mitochondria that show greater coupling than the submitochondrial particles.

The results showed in agreement with the groups of Ernster and Skulachev, but in contrast to Van de Stadt that the operation of the reaction from $NADPH + NAD^+$ to $NADH + NADP^+$ via the transhydrogenase reaction did not drive to synthesis of ATP. Accordingly the role of the transhydrogenase reaction has not yet been established.

V. B. O.
García del Real

RESUMEN

La transhidrogenasa mitocondrial de piridin nucleótidos se ha estudiado ampliamente en mitocondrias de corazón de res y no obstante, el papel que juega esta enzima en cuanto a la producción de energía está en controversia. Sin embargo su importancia se podría evaluar mejor si se conocieran sus características en tejidos de distintas propiedades metabólicas, como es el caso del testículo (organo en el que en un único trabajo anterior (32) ha sido medida la actividad de la transhidrogenasa mitocondrial). Con estos antecedentes, en este trabajo nos propusimos caracterizar inicialmente algunas propiedades de la transhidrogenasa en partículas submitocondriales de testículo, tanto en el sentido de la reacción que depende de energía como en el que es independiente de ella. De manera comparativa, todos los experimentos se hicieron paralelamente con partículas submitocondriales de corazón de res. Se estudió el curso temporal de ambos sentidos de la reacción, se calcularon las K_m respectivas y el efecto de un gradiente electroquímico sobre estos parámetros. Asimismo, se evaluó la capacidad para generar energía en ambas preparaciones.

Los resultados muestran que la reacción de transhidrogenasa testicular dependiente de energía fue 2 veces más lenta que la de corazón y que en el equilibrio, también está menos favorecida. Sin embargo, la velocidad de la reacción independiente de energía no fue diferente en ambos tejidos.

Por otro lado, la reacción dependiente de energía en presencia de un gradiente electroquímico se estimuló de igual manera en partículas submitocondriales de testículo y de corazón. No obstante, la reacción independiente de energía en testículo fue mucho más sensible al proceso de energización que en corazón. Estas diferencias solo se manifestaron en la velocidad inicial, ya que las $K_{m,4}$ se modificaron en la misma proporción y en el mismo sentido. Los potenciales de membrana generados en las mismas condiciones por las partículas de los dos tejidos mostraron una marcada diferencia, que pensamos se traduce en una alta permeabilidad a protones de la membrana de las partículas de testículo, por lo que se decidió continuar el estudio sobre la capacidad de generar potenciales y de sintetizar ATP en mitocondrias intactas de testículo. Los resultados indicaron que el estudio de la transhidrogenasa mitocondrial de testículo debe realizarse en mitocondrias, que mostraron mayor grado de acoplamiento que las partículas.

Por último, los resultados mostraron que la transhidrogenasa de testículo, en cuanto a la conservación de energía, no parece ser diferente de la de corazón y que al igual que el grupo de Ernster y de Skulachev, en controversia con el de Van de Stadt, encontramos que la transhidrogenasa independiente de energía no era capaz de sintetizar ATP a partir de ADP y P_i . Por lo tanto la función de la transhidrogenasa como una enzima importante la conservación de energía aún no ha sido demostrada.

INTRODUCCION

El testículo es la gónada masculina. Se le considera una glándula mixta, ya que posee tejido exócrino, lugar donde se producen los espermatozoides, y endócrino, fuente principal de las hormonas masculinas. Está constituido por túbulos seminíferos y por tejido intertubular, recubiertos ambos por la túnica albugínea. En el tejido intertubular se encuentran: las células de Leydig, en las que se realiza la parte más importante de la función endócrina, y el sistema de vasos sanguíneos y linfáticos. Por otra parte, en el interior de los túbulos seminíferos se localizan el epitelio germinal y las células de Sertoli, limitadas ambas por el complejo lamelar basal. Debido a que las células intratubulares carecen de vasos sanguíneos y linfáticos, se encuentran en un ambiente de hipoxia relativa (1-3), que se acentúa conforme las células se alejan de la membrana basal y se acercan a la luz tubular. Este hecho podría estar relacionado con la observación de André (4) de que las mitocondrias de las células germinales, a partir del estadio de paquitenos, se acomodan en la cercanía de la membrana plasmática. En este trabajo, el autor demostró, que paralelamente a la diferenciación de las células germinales, existía una diferenciación morfológica de las mitocondrias. Más tarde, en nuestro laboratorio, se demostró que esta diferenciación morfológica iba acompañada de una diferenciación funcional (5). Algunas características de estas diferencias funcionales se enumeran a continuación:

- 1.- En las mitocondrias del testículo inmaduro la velocidad de consumo de oxígeno durante la síntesis de ATP (estado 3) es el doble del consumo de O_2 de las mitocondrias de testículo adulto, utilizando succinato, malato y piruvato-malato como sustratos oxidables (5,6). En cuanto a los controles respiratorios, son más bajos en las ratas adultas que en las inmaduras (5).
- 2.- Por otro lado, la velocidad de síntesis de ATP no es el doble en las mitocondrias de ratas inmaduras que en las adultas, llegando a ser solamente un 50% mayor en el mejor de los casos. Por lo tanto, si se compara el QO_2 con la velocidad de síntesis de ATP, se concluye que la eficiencia de las mitocondrias de ratas inmaduras es menor a la de las ratas adultas (7).
- 3.- La actividad de ATPasa sensible a oligomicina no presenta una fluctuación tan grande a través de la diferenciación, siendo significativamente mayor al final de la primera meiosis (espermatoцитos secundarios) que en la adulta (7). La ATPasa a través de la diferenciación es insensible a desacoplantes, y en un estudio realizado en mitocondrias de rata adulta, se encontró que está laxamente unida a la membrana, lo que permite un flujo de protones al interior de la mitocondria por canales F_0 abiertos (8).
- 4.- La citocromo oxidasa, cuya actividad constituye uno de los -- puntos de regulación más importantes de la velocidad de flujo de electrones por la cadena respiratoria, tiene una actividad máxima en las ratas prepúberes (11-14 días), desciende bruscamente durante la pubertad, y después disminuye gradualmente hasta llegar al estado adulto (6), alcanzando valores menores que la

del hígado.

5.- La citrato sintetasa de mitocondrias de testículo incrementa notablemente su actividad a partir del estadio de espermatocitos paquitenos (9). Dicha enzima está involucrada en el metabolismo del piruvato y el malato.

6.- En mitocondrias de testículo se ha encontrado actividad de las deshidrogenasas isocitricas dependientes de NADP^+ y de NAD^+ . La relación que mantienen sus actividades ($\text{IDH-NADP}^+/\text{IDH-NAD}^+$) se modifica durante la diferenciación, siendo 4:1 en las ratas inmaduras y 1:1 en las adultas (5). Nicholls y Garland (10) han informado que en mitocondrias de hígado la oxidación del isocitrato puede seguir una vía diferente al ciclo de Krebs, que involucra a la IDH-NADP^+ y a la transhidrogenasa de piridin nucleótidos en dirección de la oxidación del NADPH . El flujo a través de este camino se ve favorecido en condiciones de desacoplamiento de la fosforilación oxidativa.

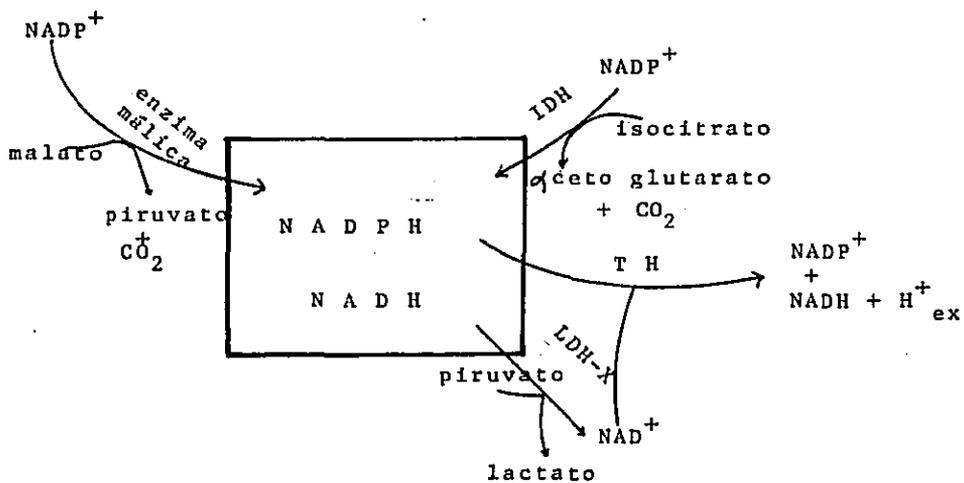
Existen algunas otras características peculiares del testículo que se han informado en la literatura, tales como la presencia de una isoenzima mitocondrial de la lactato deshidrogenasa, denominada LDH-X , que aparece a partir de los 20 días de edad de la rata, correspondiente a la aparición de los paquitenos tardíos (11), y que permanece en los estadios posteriores. En un trabajo realizado en mitocondrias pesadas, se encontró que la LDH-X provenía principalmente de espermatidas y pieza media de espermatozoides (12). El papel fisiológico de esta enzima no ha sido resuelto. Blanco y col., (13) suponen que ya que se trata de la

forma más abundante de lactato deshidrogenasa en células seminales, la LDH-X debe estar integrada en una vía metabólica que provea la energía para la movilidad de los espermatozoides y para su sobrevivencia (13). Con estos antecedentes es posible pensar que la LDH-X podría ser un mecanismo utilizado para reoxidar el NADH acumulado en condiciones de hipoxia o de inhibición de la cadena respiratoria, acoplada a la transhidrogenasa mitocondrial en el sentido en que ésta es capaz de producir energía, en forma de potencial de membrana, como se muestra en el esquema 1.

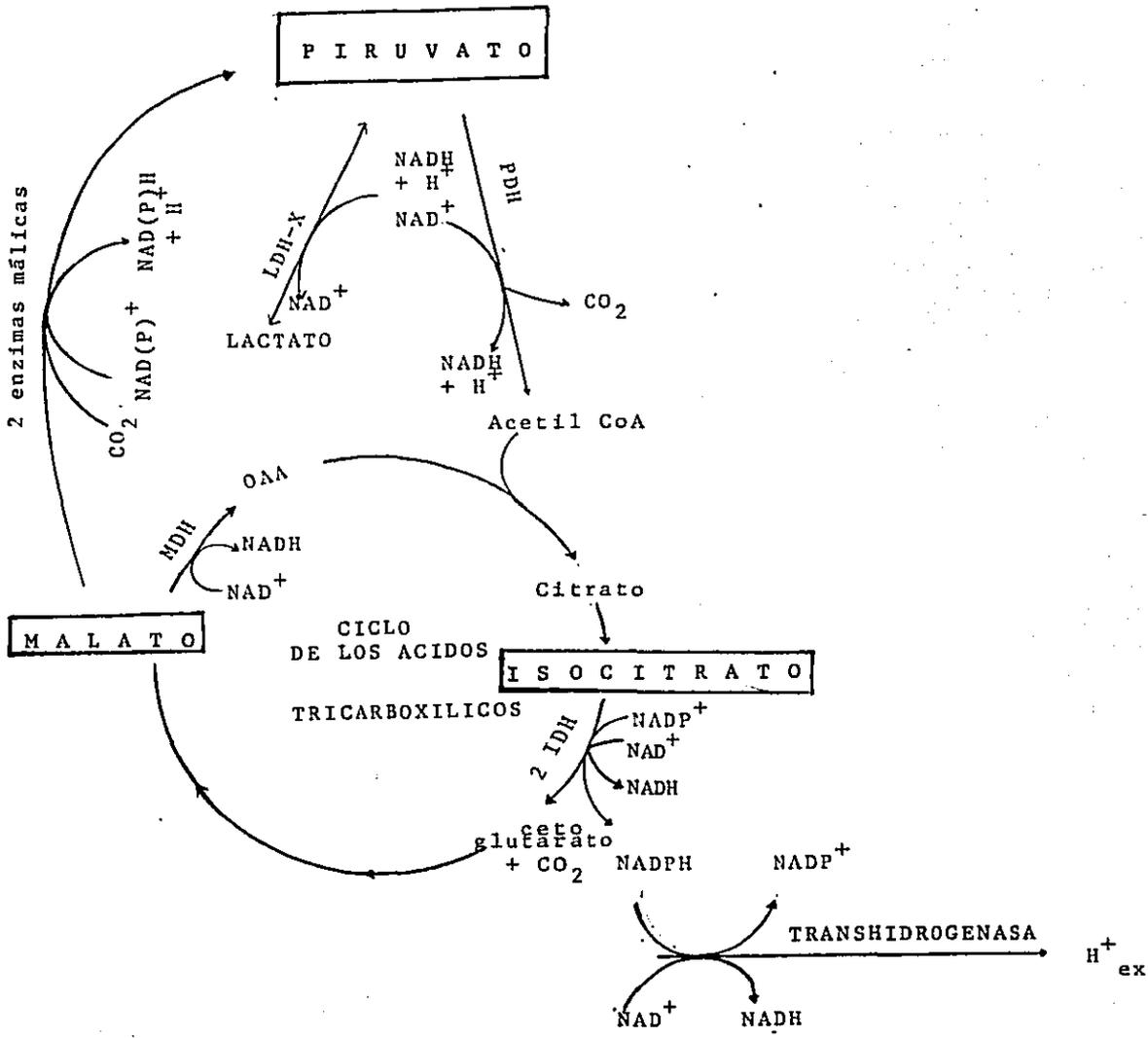
Otra característica que se encuentra en testículo, al igual que en otros tejidos formados por células con una velocidad de recambio muy activa (mucosa, bazo, timo, mucosa del intestino delgado, pulmón y hepatomas de rápido crecimiento), es que posee una actividad elevada de la enzima málica-NAD(F)⁺ con una vía intramitocondrial única para formar piruvato, dependiente de la oxidación del malato (14,15).

Se sabe que el piruvato es un sustrato central en el metabolismo testicular (16-20) y que posee además una enzima málica NAD(F)⁺ muy activa; sin embargo en este tejido la transhidrogenasa, prácticamente no ha sido estudiada, por lo que se considero importante caracterizarla e intentar ubicarla dentro del contexto energético de las mitocondrias de testículo, que suponemos incluye el ciclo del malato-piruvato, según se muestra en el esquema 2.

La transhidrogenasa mitocondrial de piridín nucleótidos (EC 1.6.1.1) es una enzima de la membrana interna que lleva a ca-

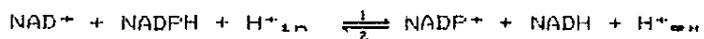


ESQUEMA 1.

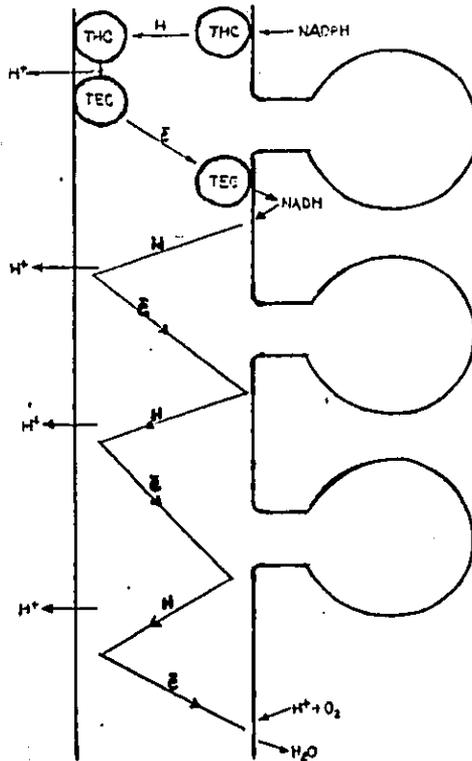


ESQUEMA 2.

bo la siguiente reacción:



La reacción 1 se ha demostrado que es independiente de energía y la 2 dependiente de energía. En la dirección 1 produce energía por bombear H^+ al exterior y crear un gradiente; en la 2 ocurre lo inverso y lo consume. Esta enzima ha sido ampliamente estudiada en corazón de res (21), y no obstante esto, aún se sabe muy poco sobre el papel que juega en la célula. En los trabajos de Ernster y col. (22,23) se encontró que para que la reacción de la transhidrogenasa procediera en la dirección de la reducción de NADP^+ , a partir de NADH (reacción 2), se requería la utilización del potencial de membrana generado por la respiración o por la hidrólisis de ATP. Posteriormente, Mitchell postuló, que en tal caso, la transferencia de H^+ en dirección opuesta debería generar un potencial de membrana (24). Esta posibilidad fue verificada más tarde por Liberman y Tsolina (25), Skulachev (26), Liberman (27), Grinuis y col. (28), Isaev y col. (29) y Skulachev (30). Estos datos significan que la transhidrogenasa produce el potencial de membrana si la reacción tiene el sentido de la reducción de NAD^+ a partir de NADPH (reacción 1), y utiliza el potencial de membrana si la dirección es la reducción de NADP^+ a partir de NADH (reacción 2). De aquí, Mitchell (24) concluyó que además de los 3 sitios de acoplamiento de energía, localizados entre NADH y O_2 , había un sitio más de conservación de energía entre NADPH y NAD^+ al que denominó sitio cero, o cuarto sitio según el esquema 3 (30).



ESQUEMA 3.

Sitio 4 de la Cadena Transportadora de electrones. TEC= acarreador de electrones de la Transhidrogenasa - THC= acarreador de hidrógeno de la transhidrogenasa. Según la ref. (30).

Con base en estos postulados, si la respiración estuviera inhibida por hipoxia, esto podría resultar en la predominancia de la dirección 1 de la reacción de la transhidrogenasa. De esta manera, se convertiría un proceso de utilización de energía en uno de producción de ésta, a través de la generación de un potencial de membrana, utilizable para la síntesis de ATP. Esto fue demostrado por Van de Stadt en $\text{PSM}_{\text{NADP-H}_2\text{O}^{2+}}$ de corazón de res, en las que la reducción de NAD^+ a partir de NADPH pudo producir suficiente energía para fosforilar ADP a ATP en presencia de rotenona y antimicina (31).

En relación con la transhidrogenasa mitocondrial de testículo, existe únicamente un estudio realizado en 1959 (32). En él se informa la actividad de la transhidrogenasa en mitocondrias solubilizadas de diferentes tejidos de mamíferos (32), y se muestra que es máxima en el corazón. La actividad de la reacción independiente de energía y de la reacción dependiente de energía es, respectivamente, 2 y 3.3 veces menor en el testículo que en el corazón.

Considerando todas las características de las mitocondrias de testículo arriba descritas, en este trabajo se trató de dilucidar el papel de la transhidrogenasa de piridín nucleótidos mitocondrial en este sistema, y si constituye un factor importante en la producción de energía en condiciones de bloqueo de la cadena respiratoria, dada la hipoxia fisiológica del tejido testicular.

Para ello nos propusimos:

- 1.- Caracterizar en partículas submitocondriales a la transhidrogenasa mitocondrial de testículo en cuanto a su capacidad generadora de energía de manera comparativa con la del tejido cardíaco.
- 2.- Caracterizar la preparación de PSM testiculares en lo que respecta a su grado de acoplamiento, utilizando como indicador su capacidad de generar un potencial de membrana.
- 3.- Caracterizar al sistema mitocondrial de testículo en condiciones del máximo acoplamiento posible, en cuanto a su $\Delta\psi$ y su capacidad de sintetizar ATP.

MATERIALES Y METODOS

Todos los reactivos utilizados procedieron de SIGMA Chemical Co. (USA), a excepcion del piruvato, malato, EDTA y etanol, que fueron de MERCK (México). La albúmina utilizada en el aislamiento de mitocondrias fue de la fracción V, libre de ácidos grasos. Como patrón de proteína, se utilizó estandar de albúmina humana en solución salina de SIGMA (USA). El NAD⁺, NADH, NADP⁺ y NADPH empleados fueron de alto grado de pureza.

Se utilizaron las siguientes enzimas:

Alcohol deshidrogenasa de levadura de panadería (alcohol:NAD⁺ oxidoreductasa; EC 1.1.1.1): cristalizada y liofilizada, disuelta en un amortiguador que contenía: Tris 40 mM, KH₂PO₄ 40 mM y Na₂F₂O₇ 20 mM, pH 8.1, condiciones de máxima estabilidad para la enzima, de acuerdo con la ref. (33).

Hexocinasa-Glucosa 6-F deshidrogenasa de levadura de panadería: mezcla de enzimas cristalizadas y liofilizadas; disuelta en citrato 0.005 M pH 7.5 para obtener condiciones de máxima estabilidad, siguiendo las especificaciones de SIGMA Chemical Co.

Glutación reductasa (NAD(P)H; glutación oxidado oxidoreductasa de levadura (EC 1.6.4.2): suspensión altamente purificada en (NH₄)₂SO₄ 3.6 M.

Lactato deshidrogenasa de Bacillus stearothermophilus (lactato: NAD⁺ oxidoreductasa EC.1.1.1.28): liofilizada, disuelta en (NH₄)₂SO₄ 2.1 M, siguiendo las especificaciones de SIGMA Chemical Co.

Co.

Se utilizaron ratas machos de la cepa Sprague-Dawley, de aproximadamente 250 g de peso corporal. Los testículos, libres de la túnica albugínea, fueron homogeneizados en el medio de aislamiento, que contenía: sacarosa 0.25 M, TEA 3 mM, EDTA 1 mM a pH 7.2, a una concentración de tejido de un 14 % (P/V).

Con el homogeneizado total se siguieron dos esquemas de centrifugación diferencial: del primero se obtuvo una mezcla de mitocondrias pesadas y ligeras de la que se prepararon PSM_{EDTA}, sacrificando el acoplamiento de la preparación mitocondrial por un considerable incremento en el rendimiento; con el segundo se obtuvo solamente la fracción de mitocondrias pesadas, con el objeto de tener una preparación con mayor grado de acoplamiento. Para el primer esquema, el homogeneizado total se centrifugó a 700 g durante 10 min, obteniéndose la primera pastilla, que fue desechada. El sobrenadante se centrifugó a 12,000 g 10 min para obtener la fracción mitocondrial total; ésta se resuspendió en un pequeño volumen de sacarosa 250 mM, que contenía 1% de albúmina bovina libre de ácidos grasos durante 5 minutos; posteriormente se diluyó hasta el volumen original con el medio sin albúmina, y se volvió a centrifugar a 700 g durante 10 min., esto con el objeto de purificar más la preparación de mitocondrias. El sobrenadante obtenido se centrifugó nuevamente a 12,000 g 10 min y la pastilla mitocondrial se resuspendió en el mínimo volumen posible de sacarosa (25-30 mg de proteína/ml). En el segundo esquema se siguió el procedimiento anterior, excepto que la segunda y cuarta cen-

trifugaciones se hicieron a 3,700 g durante 10 min. y el medio de aislamiento (sacarosa 250 mM, TEA 3 mM y EDTA 1 mM pH 7.2) fue usado durante todo el proceso de obtención de las mitocondrias pesadas. La pastilla obtenida de la cuarta centrifugación, fue resuspendida en el mismo medio en una proporción de 1 ml/g de tejido húmedo original.

El hígado fue obtenido de la cavidad abdominal de la rata y se homogeneizó en el mismo medio de aislamiento. El homogeneizado total se centrifugó a 1000 g 10 min., desechándose la pastilla. El sobrenadante se centrifugó a 10,000 g durante 10 min. para obtener la fracción mitocondrial, que fue resuspendida en el medio de aislamiento e incubada en presencia de albúmina bovina al 1% y vuelta a centrifugar a 8,000 g 10 min., con el objeto de purificar fracción mitocondrial. La pastilla final se resuspendió en el mismo medio en una proporción de 1 ml/7g de tejido húmedo original.

Las mitocondrias de corazón de res utilizadas fueron una donación de los doctores Gómez-Fuyou y se prepararon de acuerdo con Low y Vallin (34).

Las PSM_{dro} se obtuvieron a partir de una suspensión de mitocondrias almacenadas a -70° C por lo menos 3 días; se prepararon en un medio de sacarosa 250 mM y EDTA 2 mM, de acuerdo al método descrito por Lee y col. (35).

La actividad de la piridín nucleótido transhidrogenasa mitocondrial (NADPH:NAD⁺ oxidoreductasa EC.1.6.1.1.) tuvo que ser determinada en PSM, ya que la membrana mitocondrial es impermea-

ble a los sustratos NAD(F)⁺ y NAD(F)H. La actividad se determinó de acuerdo a Lee y col. (36). Para detener la reacción, se utilizó KOH 0.136 M ó HClO₄ 0.5 M (concentración final), en el primer caso para extraer los piridín nucleótidos reducidos, y en el segundo para extraer los oxidados (37).

El NADH y el NADPH se estimaron por medio de sistemas enzimáticos, siguiendo el decremento de la absorbancia a 339 nm en un espectrofotómetro Beckman Modelo 35. El NAD⁺ y el NADP⁺ se midieron también por sistemas enzimáticos, siguiendo el incremento de la absorbancia a la misma longitud de onda.

Los sistemas enzimáticos utilizados para la determinación de los piridín nucleótidos producidos en la reacción de transhidrogenasa fueron:

A. Nucleótidos Reducidos

piruvato + NADH + H⁺ LDH lactato + NAD⁺

GSSG + NADPH + H⁺ glutathion reductasa GSH + NADP⁺

B. Nucleótidos Oxidados

alcohol + NAD⁺ ADH acetaldehido + NADH + H⁺

glucosa 6-F + NADP⁺ 6-F-P DH gluconato 6-F + NADPH + H⁺

El consumo de oxígeno se midió polarográficamente (38) usando un electrodo tipo Clark; en 1.75 ml de un medio que contenía: KCl 120 mM, HEPES 20 mM, KHPD₄ 5 mM, EDTA 2 mM y MgCl₂ 2 mM, éste último, sólo con las mitocondrias de hígado. Las proteínas fueron determinadas usando el método del biuret (39).

Para la determinación del potencial de membrana en mitocondrias, se siguió el cambio espectral de la safranina O, de 497 a

530 nm, de acuerdo con el método descrito por Åkerman (40). El ensayo fue llevado a cabo a 30° C en un volumen de 2.5 ml, conteniendo: sacarosa 250 mM, HEPES 20 mM, EDTA 0.38 mM, a pH 7.2.

El potencial de membrana, en PSM, se determinó midiendo el cambio de la absorbancia del oxonol VI de 611 a 630 nm (41). El ensayo fue llevado a cabo a 30° C en un volumen de 2.5 ml, conteniendo : sacarosa 250 mM y Tris 50 mM, a pH 7.5.

La velocidad de síntesis de ATP en mitocondrias durante la fosforilación oxidativa fue obtenida midiendo el fosfato inorgánico ($^{32}\text{P}_i$) incorporado a $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ en presencia de ADP, un inhibidor de la miocinasa y un sistema de hexocinasa, tal como se describe en la referencia (42). La proteína se determinó por el método de Lowry (43).

RESULTADOS

La transhidrogenasa de piridín nucleótidos de mitocondrias de testículo prácticamente no ha sido estudiada. De hecho, en la literatura sólo existe una referencia que prueba su presencia en un estudio realizado en 1959 en mitocondrias digitonizadas (32) de diversos tejidos. Para caracterizar este sistema enzimático testicular, hicimos un estudio comparativo con preparaciones de PSM de testículo y de corazón de res. Se escogieron estas últimas como control, por ser el tejido donde la enzima presenta mayor actividad y en el que ha sido ampliamente caracterizada.

La Figura (1a) ilustra la similitud en el curso temporal de la reacción 1 independiente de energía ($\text{NAD}^{++} + \text{NADPH} \rightarrow \text{NADP}^{++} + \text{NADH}$) para las dos preparaciones de PSM, y en la figura (1b) se muestra la reacción dependiente de energía ($\text{NADH} + \text{NADP}^{++} \rightarrow \text{NADPH} + \text{NAD}^{++}$). En la figura sólo se presentan las variaciones observadas en los nucleótidos reducidos, ya que en la determinación de los oxidados, se obtuvieron resultados similares. La fig. 2 muestra las velocidades iniciales de las reacciones independiente de energía y dependiente de energía en los dos sistemas, expresadas como actividad específica. Con estos resultados se puede observar que no hubo diferencia significativa entre las dos preparaciones de PSM para la reacción independiente de energía, 64.6 en corazón y 56.8 en testículo. Sin embargo, la actividad específica de la reacción dependiente de energía de las PSM de corazón fue el doble de la de testículo, 33.2 y 15.9 respectivamente.

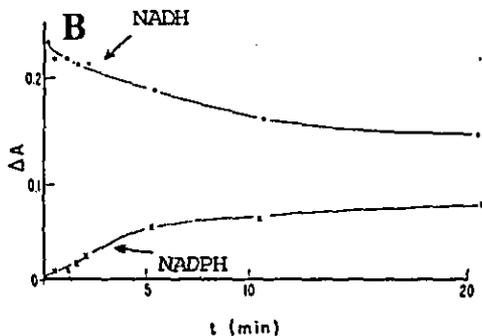
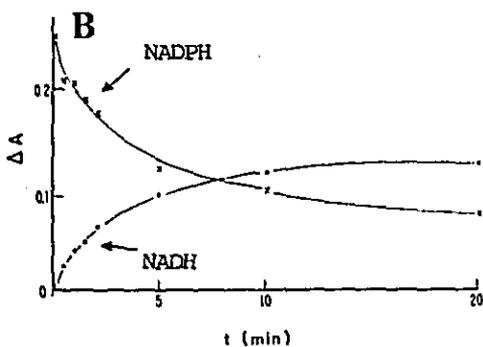
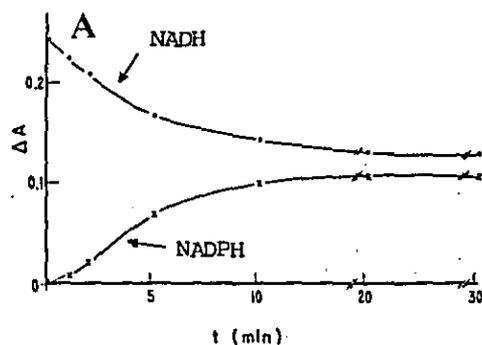
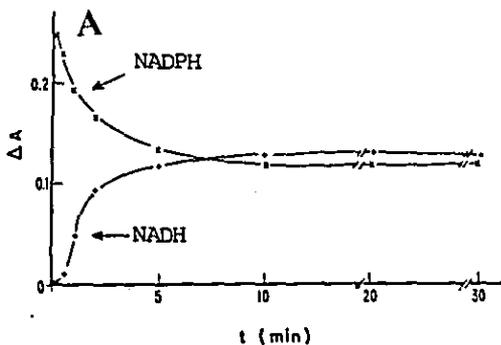


Figura 1(a). Reacción independiente de energía de la transhidrogenasa



Figura 1(b). Reacción dependiente de energía de la transhidrogenasa



A) PSM_{EDTA} de corazón

B) PSM_{EDTA} de testículo

(0.255 mg/ml)

La mezcla de reacción contenía: sacarosa 200 mM, Tris 50 mM (pH 7.5), rotenona 10 μM, KCN 1 mM. En 1(a): NAD⁺ 86 μM y NADPH 88 μM. En 1(b): NADH 88 μM y NADP⁺ 86 μM. El ensayo se llevó a cabo a 30° C. A los tiempos indicados la reacción se detuvo con HClO₄ 0.5 M y KOH 0.136 M para extraer los nucleótidos oxidados y reducidos respectivamente en preparaciones separadas. En la gráfica sólo se ilustran las variaciones en el contenido de los nucleótidos reducidos. El NADH se determinó con piruvato 2mM y LDH (60 uJ/ml) y el NADPH con GSSG 2 mM y glutatión reductasa (1.33 U/ml) siguiendo la absorbancia a 339 nm.

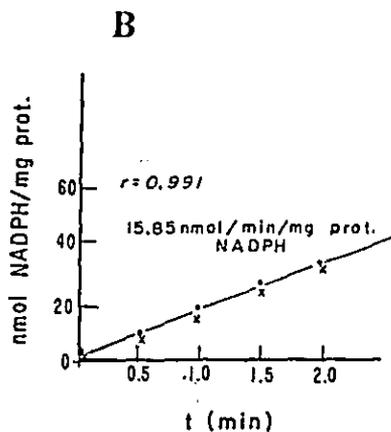
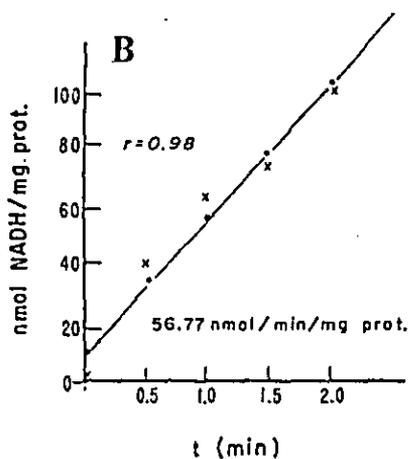
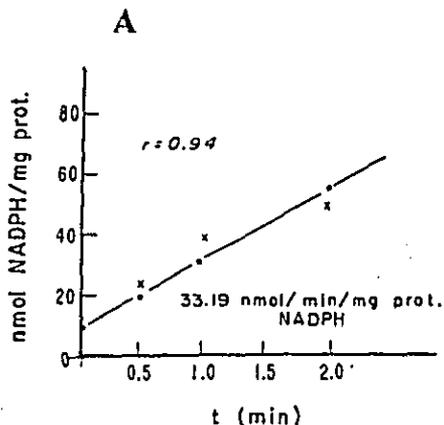
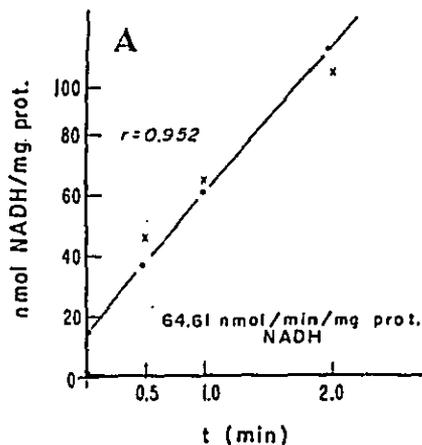


Figura 2(a). Actividad específica de la reacción independiente de energía de la transhidrogenasa $\text{NAD}^+ + \text{NADPH} \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{NADH}$

Figura 2(b). Actividad específica de la reacción dependiente de energía de la transhidrogenasa $\text{NADH} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{NADPH} + \text{NADP}^+$

A) PSM_{EDTA} de corazón

B) PSM_{EDTA} de testículo

(x-x) datos experimentales

(---) regresión lineal

Las condiciones del ensayo fueron iguales a las de las Figuras 1(a) y 1(b)

Como la reacción dependiente de energía de la transhidrogenasa de las PSM de testículo fue dos veces más lenta que en las de corazón, consideramos importante averiguar si esta tendencia se mantenía en el equilibrio, por lo cual calculamos la K_{eq} , de acuerdo con Segel (44), según se detalla en la figura 3. Las K_{eq} fueron 0.6 para las PSM de corazón y 0.2 para las PSM de testículo. Aunque ambos valores son del mismo orden, parecería que la reacción 2, dependiente de energía fue menos favorecida en testículo que en corazón.

Considerando estas diferencias entre ambas preparaciones, nos propusimos averiguar la modulación de la actividad de la transhidrogenasa frente a un gradiente electroquímico. Para esto se consideró de importancia asegurarse de que las PSM fueran capaces de generar dicho gradiente. Con este objetivo, se determinó el potencial de membrana en ambos sistemas de PSM con oxonol VI como indicador. Se siguió el cambio espectral dependiente de NADH y de succinato sucesivamente, ilustrado en la fig.4. Puede observarse que el potencial generado por las PSM de corazón fue casi 3 veces mayor al generado por las partículas de testículo con ATP-Mg²⁺, 6 veces mayor con NADH y 7 veces con succinato. El potencial generado con NADH y succinato fue en presencia de un exceso de oligomicina y cayó en las PSM de corazón a sus valores basales, sin necesidad de agregar rotenona o antimicina.

Una vez definida la magnitud del potencial que eran capaces de generar ambas preparaciones con diferentes sustratos, procedimos a determinar las velocidades iniciales de las reacciones in-

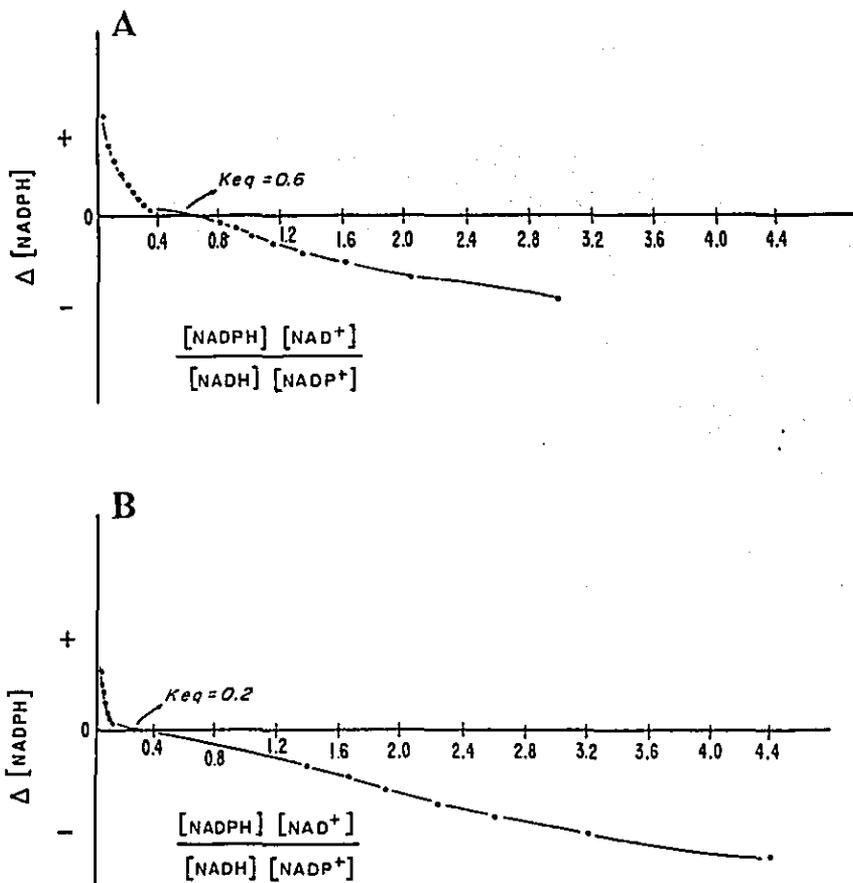


Figura 3. Cálculo de las constantes de equilibrio de la reacción de la transhidrogenasa en partículas submitocondriales de corazón y testículo.

A) PSM_{EDTA} de corazón B) PSM_{EDTA} de testículo (0.255 mg/ml)

Procedimiento para establecer la relación exacta producto/sustrato en el equilibrio de la reacción $NADH + NADP^+ \rightleftharpoons NADPH + NAD^+$. Ver (42). Se establecieron varias relaciones iniciales y se midió el cambio en uno de los piridín nucleótidos. El $\Delta [NADPH]$ se graficó contra la relación $[NADPH][NAD^+] / [NADH][NADP^+]$. Cuando $\Delta [NADPH] = 0$, la relación fue igual a K_{eq} .

La mezcla de reacción contenía: sacarosa 200 mM, Tris 50 mM (pH 7.5), - KCN 1 mM, rotenona $10 \mu M$, NADPH $88 \mu M$, NADH $88 \mu M$, NAD^+ $86 \mu M$ y $NADP^+$ $86 \mu M$. El ensayo se llevó a cabo a $30^\circ C$. Posteriormente los nucleótidos fueron extraídos y el NADH se determinó con piruvato 2mM y LDH 60 mU/ml, el NADPH con GSSG 2 mM y glutatión reductasa 1.33 U/ml, el NAD^+ con etanol 85 mM y ADH 300 U/ml y el $NADP^+$ con G6P-MgSO₄ (5 mM) y G6P-DH - Hexocinasa 56 mU/ml.

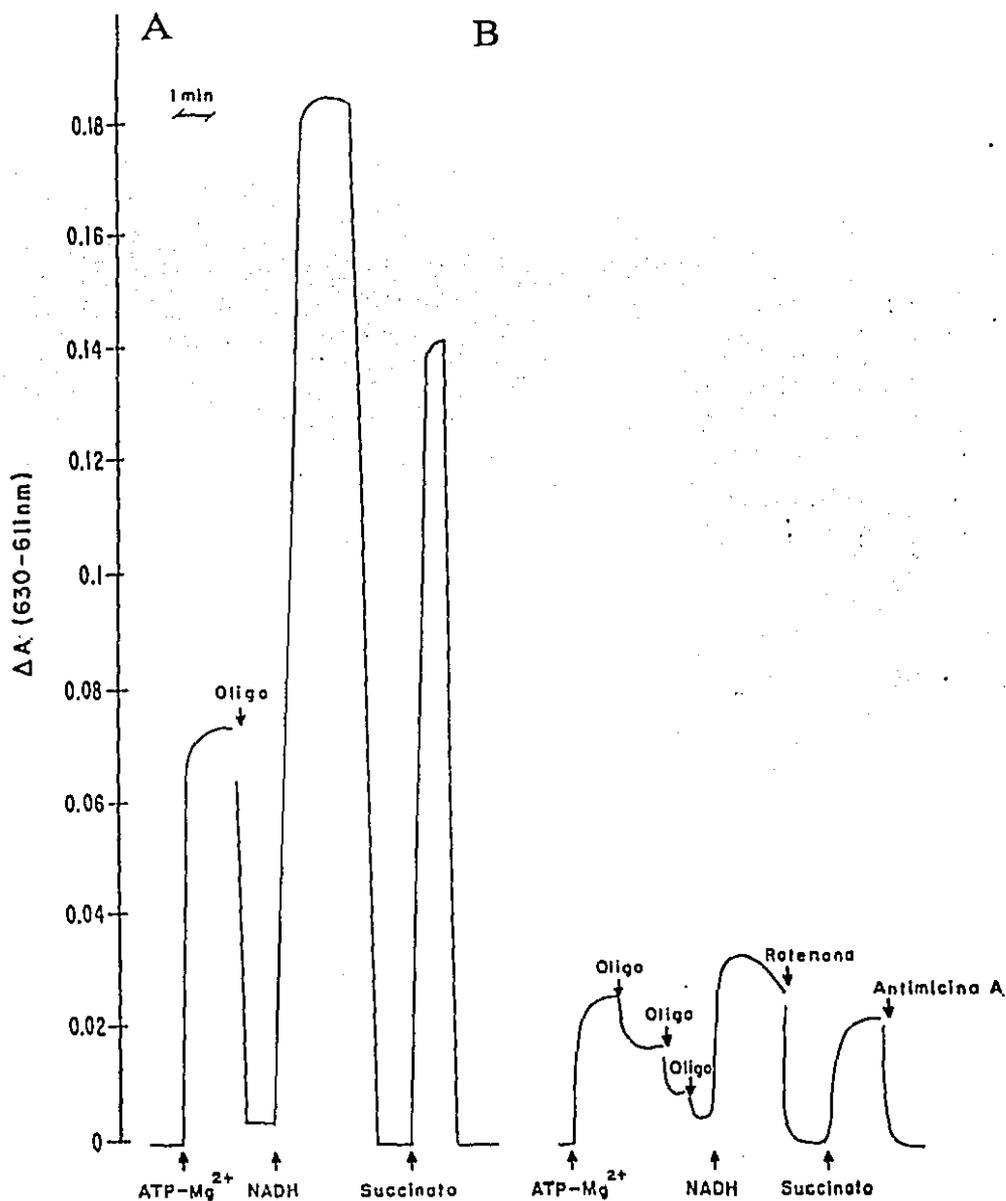


Figura 4. Potencial de membrana en partículas submitocondriales de corazón y testículo.

A) PSM_{EDTA} de corazón

B) PSM_{EDTA} de testículo

El potencial de membrana se midió en un espectrofotómetro de doble-rayo DW-AMINCO de 611 a 630 nm. El ensayo se llevó a cabo en una celda conteniendo en 2.5 ml el medio de incubación (Tris 50 mM, sacarosa 0.2 M pH 7.5), oxonol VI $6\mu\text{M}$, PSM 0.255 mg/ml, a 30°C . El potencial se generó por la adición del sustrato. Las adiciones fueron sucesivas como se muestra en la figura. ATP-MgCl_2 (2 mM), oligomycin $4\mu\text{g}$, NADH 1 mM, rotenona $30\mu\text{M}$, succinato 10 mM y antimicina $10\mu\text{M}$.

dependiente y dependiente de energía en presencia de ATP-Mg^{2+} como generador del gradiente electroquímico para las dos preparaciones de partículas, como se muestra en la fig. (5a) y (5b) respectivamente. Los resultados de la fig. 5a indican que el gradiente electroquímico no modificó la actividad específica de la reacción independiente de energía de las PSM de corazón (64.6 sin el gradiente y 69.1 en presencia de éste); en cambio, la actividad de las partículas testiculares se redujo casi a la mitad de la que se obtuvo sin ATP-Mg^{2+} (56.8 sin el gradiente y 32.7 en presencia de éste (fig. 2a)). En la fig. 5b se observa que el gradiente elevó a más del doble la actividad dependiente de energía en las PSM de corazón, 74.1 en presencia y 32.9 en su ausencia, mientras que en las de testículo, estimuló la actividad sólo un 37 % (15.9 a 21.7).

Con los resultados obtenidos anteriormente se procedió a calcular la constante de equilibrio aparente para la reacción en presencia del gradiente en la misma forma que se hizo sin el ATP-Mg^{2+} (fig. 6). Las nuevas K_{eq} fueron 1.35 para corazón y 0.5 para testículo contra 0.6 y 0.2 respectivamente en ausencia del gradiente. Como era de esperarse, el gradiente electroquímico favoreció la reacción dependiente de energía en ambas preparaciones. Comparando los valores obtenidos en la fig. 6 con los de la fig. 3, se observa que el equilibrio se desplazó en el mismo sentido y en la misma proporción para las dos preparaciones de PSM. Sin embargo, por los resultados anteriores, (ver Fig. 4) observamos que el potencial de membrana generado por ATP-Mg^{2+} en

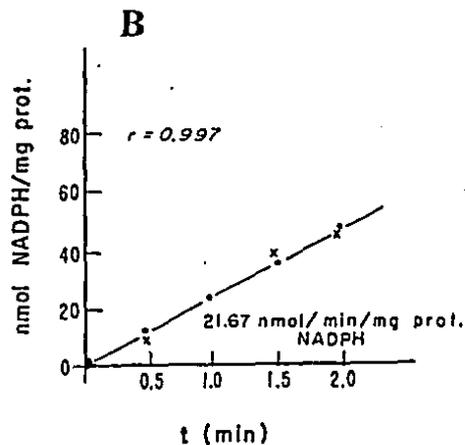
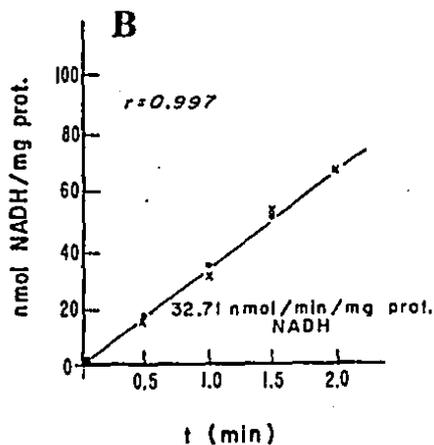
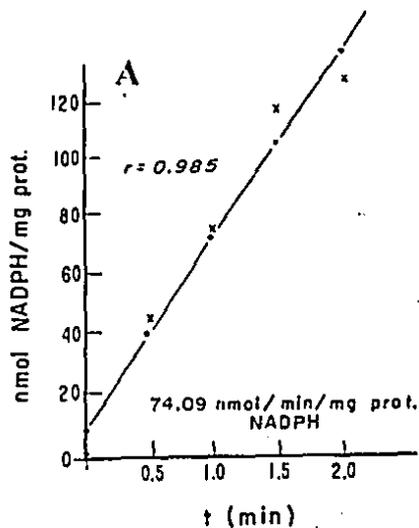
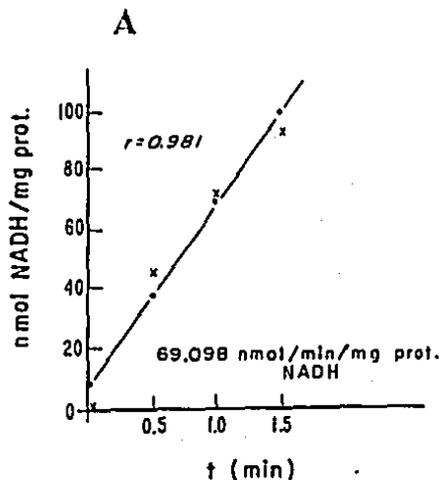


Figura 5(a). Actividad específica de la reacción independiente de energía de la transhidrogenasa en presencia de un gradiente electroquímico generado por ATP-Mg^{2+} .

Figura 5(b). Actividad específica de la reacción dependiente de energía de la transhidrogenasa en presencia de un gradiente electroquímico generado por ATP-Mg^{2+} .

A) PSM_{EDTA} de corazón

B) PSM_{EDTA} de testículo

(x-x) datos experimentales (---) regresión lineal

Las condiciones del ensayo fueron las mismas de la Figura 1(a) y 1(b), excepto que el medio de incubación contenía ATP-MgCl_2 3 mM para generar el gradiente electroquímico.

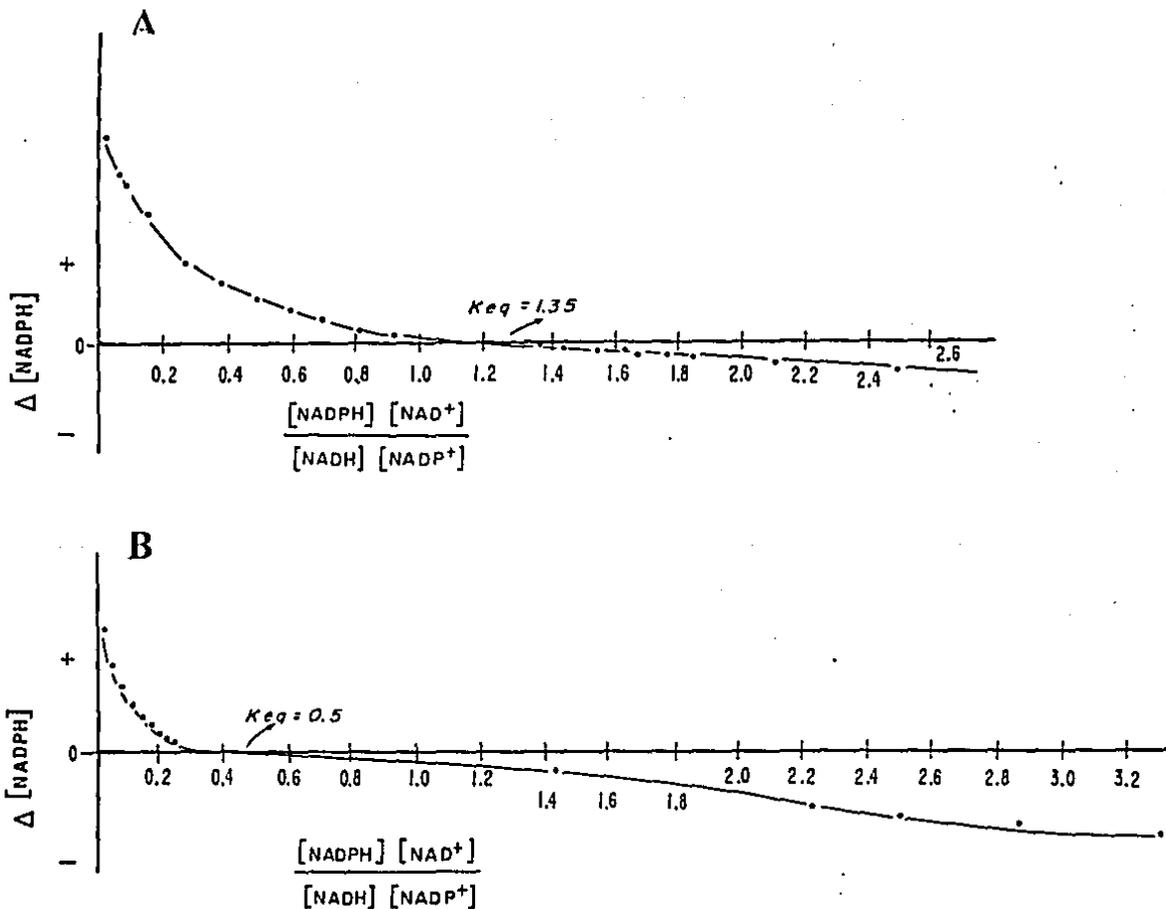


Figura 6. Cálculo de las constantes de equilibrio aparente de la reacción de la transhidrogenasa de partículas submitocondriales de corazón y testículo en presencia de un gradiente electroquímico.

A) PSM_{EDTA} de corazón B) PSM_{EDTA} de testículo

Para calcular las K' se siguió el mismo procedimiento que en la Figura 3. Las condiciones del ensayo fueron las mismas de la Figura 3 sólo que el medio de incubación contenía $ATP-MgCl_2$ 3 mM para generar el gradiente electroquímico.

ambos preparaciones era pobre, lo cual repercutió directamente en los resultados obtenidos para la modulación de la enzima en presencia de un gradiente. Por esta razón consideramos importante asegurarnos, para la continuación de nuestro estudio, de que el sistema que utilizaríamos estuviera bien acoplado, es decir, de que fuera capaz de generar un potencial de membrana por la oxidación de los sustratos de la cadena respiratoria, característicos de un estado 4.

Aún cuando un sistema adecuado para este fin hubiese sido la preparación de las $PSM_{ATP-Mg^{2+}}$, que se sabe tienen mucho mayor grado de acoplamiento que las PSM_{EDTA} (45), no se consideró conveniente utilizarlas, ya que como se muestra en la fig.4, las PSM_{EDTA} de testículo no consiguieron acoplarse aún en presencia de un exceso de oligomicina. Difícilmente se podría esperar obtener $PSM_{ATP-Mg^{2+}}$ de testículo con potenciales de membrana mayores, en vista de que nuestros resultados sugirieron que las partículas testiculares presentan una alta permeabilidad en la membrana; esto se traduce en una marcada diferencia entre las preparaciones de partículas de testículo y de corazón. Por lo tanto, decidimos intentar la preparación de mitocondrias enteras de testículo con el mayor grado posible de acoplamiento. Una vez que consiguiéramos este objetivo, el siguiente sería medir en ellas el potencial de membrana generado por sustratos de la cadena respiratoria y probar, si con ésta inhibida, la transhidrogenasa era capaz de generar un gradiente electroquímico y con éste sintetizar ATP. El papel que la transhidrogenasa desempeña en la

síntesis de ATP en las mitocondrias de corazón de res está en controversia; sin embargo, su importancia podría verse amplificada en tejidos con características diferentes, como es el caso del testículo.

Trabajos previos de nuestro laboratorio habian mostrado que las mitocondrias de testículo adulto, obtenidas por métodos tradicionales, presentaban un desacoplamiento parcial de la fosforilación oxidativa (B). Con el objeto de obtener el valor del potencial de membrana en condiciones de acoplamiento máximo, se requirió en primer término establecer la metodología más adecuada para nuestros propósitos (como se describió en Materiales y Métodos). La Tabla I muestra la velocidad de consumo de oxígeno en los estados 3 y 4, así como los controles respiratorios obtenidos en mitocondrias de testículo y de hígado. Como se puede observar, la máxima velocidad respiratoria se obtuvo con succinato para los dos tejidos, siendo más del doble en hígado que en testículo para el estado 3. El malato también fue oxidado de manera importante por testículo, aunque su velocidad fue menor a la que se obtuvo con succinato. Piruvato fue oxidado de igual forma por los dos tejidos. En el estado 4 no hubo diferencias entre los dos tejidos.

Para determinar el potencial de membrana, se utilizó hígado como control, ya que fue el tejido en el que Åkerman definió las condiciones para determinar el $\Delta\psi$ (40). El potencial de membrana se midió utilizando safranina O como indicador y el cambio espectral se determinó en un espectrofotómetro de doble rayo

TABLA I

Velocidad de consumo de oxígeno y control respiratorio de las mitocondrias de hígado y de testículo de rata.

SUSTRATO mM	H I G A D O			T E S T I C U L O		
	ESTADO 3	ESTADO 4	CONTROL RESPIR.	ESTADO 3	ESTADO 4	CONTROL RESPIR.
SUCCINATO 12	116.74 ± 24.00	22.52 ± 4.17	5.18	47.99 ± 15.31	16.25 ± 8.86	2.96
MALATO 12	N.D.	N.D.	N.D.	37.98 ± 10.5	14.79 ± 3.49	2.57
PIR.-MAL. 12-0.6	27.17 ± 9.8	12.25 ± 5.81	2.22	* 19.85	* 7.8	2.54

El consumo de oxígeno se determinó en un oxígrafo Gilson a 30°C. El ensayo se llevó a cabo en 1.75 ml, que contenían : mitocondrias 1 mg/ml, KCl 120 mM, HEPES 20 mM, EDTA 2 mM y KHPO₄ 5 mM a pH 7.2. El medio para las mitocondrias de hígado incluía MgCl₂ 2 mM.

Se presentan los datos del promedio ± desviación estandar, n = 5 - 11.

* Sólo se hizo una determinación.

N.D. no se determinó.

Los datos están expresados en nmoles/min/mg de proteína.

DW-AMINCO. Tanto en mitocondrias de testiculo como de higado se encontró que las longitudes de onda del punto isobéptico y del máximo de absorbancia para medir los cambios espectrales del indicador correspondieron a 497 y 530 nm respectivamente. Además, se establecieron las concentraciones adecuadas de mitocondrias y de safranina para el ensayo. De este modo, se utilizaron 0.5 mg de proteína y una concentración 6 μ M de safranina O para todos los ensayos. Los sustratos oxidables utilizados fueron: el succinato, por ser ampliamente utilizado en estudios relacionados con la fosforilación oxidativa, el piruvato y el lactato, por ser metabolitos centrales en la producción de energía en testiculo (16-20), y el malato, por ser oxidado de manera importante en testiculo (46). Como se había definido en un trabajo previo (6), los sustratos se usaron a una concentración saturante (12 mM), y el piruvato, en presencia de malato 0.6 mM, como anión permeante (47,48).

En primer término se midió el potencial de membrana en presencia de valinomicina y utilizando concentraciones crecientes de K^+ extramitocondrial. El potencial de membrana se calculó en mV utilizando la ecuación de Nerst y tomando 120 mM de KCl como la concentración intramitocondrial (49), según se muestra en la figura 7. La Tabla II ilustra el valor del potencial de membrana generado por distintos sustratos. En ambas preparaciones mitocondriales el potencial generado fue del mismo orden en presencia de succinato; sin embargo, con piruvato-malato, malato y lactato, el potencial generado por testiculo fue el doble del generado por

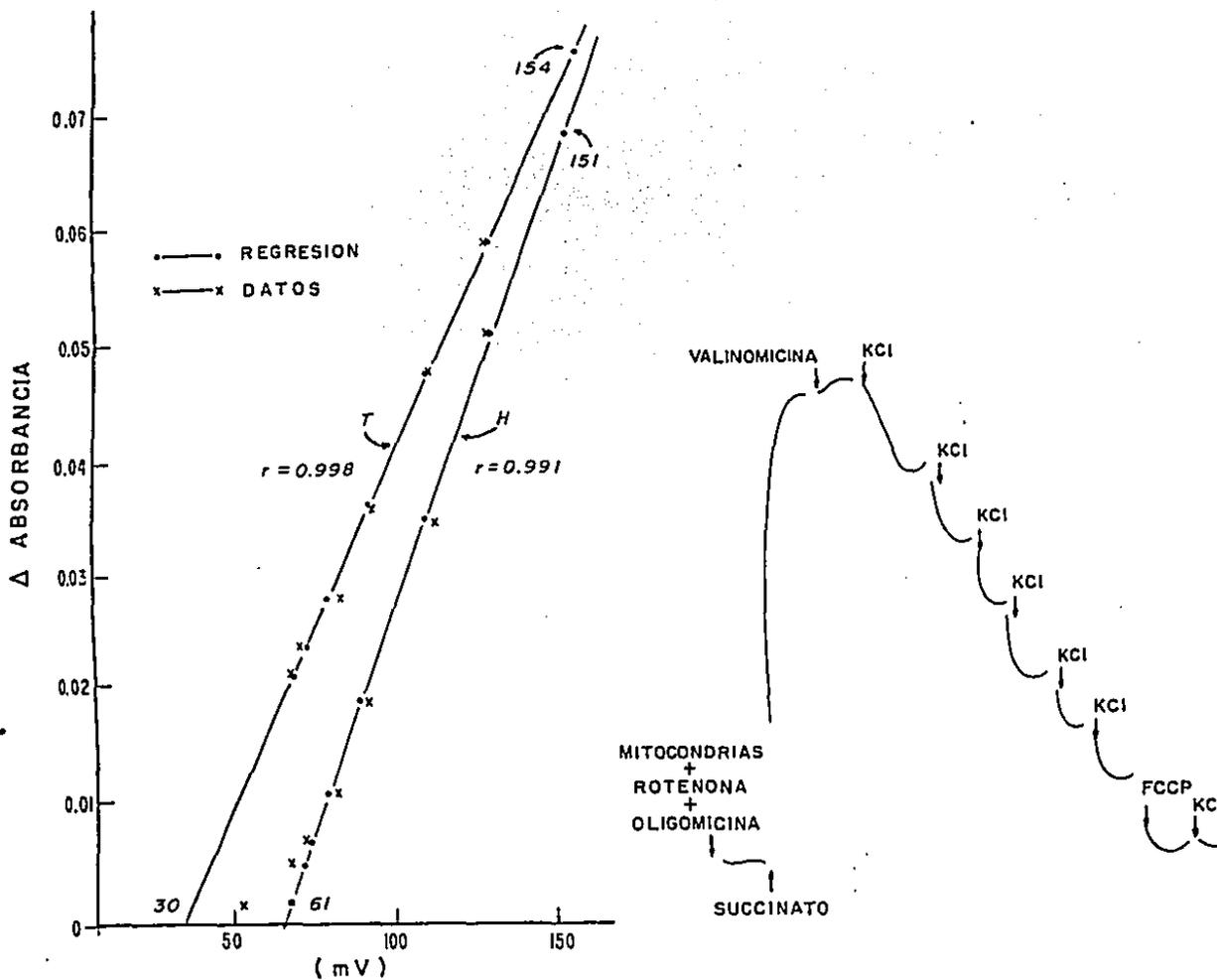


Figura 7. Determinación del potencial de membrana en mitocondrias de hígado y testículo de rata.

El potencial de membrana se determinó en mV, en presencia de valinomicina y concentraciones crecientes de K⁺. Se determinó en un espectrofotómetro de doble rayo DW-AMINCO de 497-530 nm. El ensayo se llevó a cabo en una celda de 3 ml. - conteniendo el medio de incubación (HEPES 20 mM, sacarosa 250 mM y EDTA 0.38 mM, a pH 7.2) y safranina O 6 μM a 30°C. Las adiciones sucesivas fueron hechas como se indica en la figura: mitocondrias 0.5 mg/ml, rotenona 6 μM, oligomicina 3.8 μg/ml, succinato 12 mM, valinomicina 38.5 ng/ml, KCl 0.96 mM cada adición, FCCP 0.48 μM.

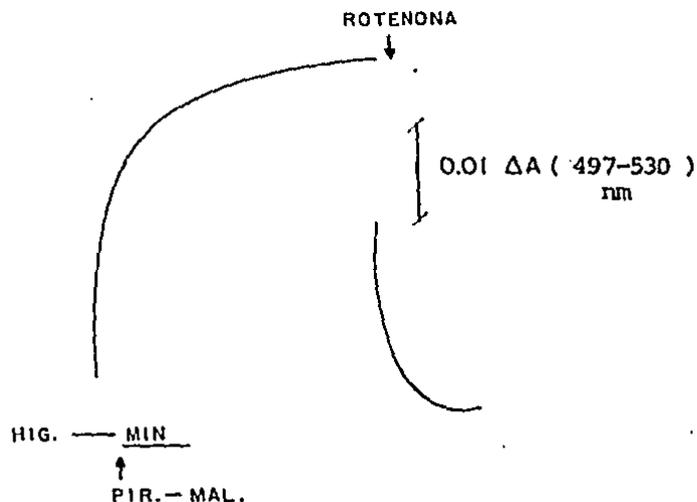
T = testículo

H = hígado

TABLA II

Potencial de membrana de mitocondrias de testículo e hígado
generado por diferentes sustratos.

SUSTRATO (mM)	m VOLTS	
	TESTICULO	HIGADO
SUCCINATO (12)	150.6 ± 9.3	184.5 ± 19.51
PIR. - MAL. (12-0.6)	180.8 ± 18.2	82.5 ± 9.6
MALATO (12)	173.9 ± 15.7	98.8 ± 7.8
* LACTATO (12)	145.5	78.66



Las condiciones del ensayo fueron las mismas de la Figura 7. El potencial se generó por la adición del sustrato, como se muestra en la figura. En la Tabla se muestran las medias - desviación estandar (n = 5). * Sólo se hizo una determinación.

higado.

Una vez definidos los valores del potencial de membrana que ambas preparaciones mitocondriales eran capaces de generar, se intentó averiguar si en las mitocondrias de testículo se podría generar un potencial de membrana en condiciones de inhibición de la cadena respiratoria, es decir, si la transhidrogenasa de piridín nucleótidos mitocondrial en presencia de sustrato del sitio I, piruvato-malato era capaz de funcionar en el sentido del bombeo de H^+ al exterior de la matriz mitocondrial y generar en estas condiciones un potencial de membrana apreciable, en presencia de rotenona $6 \mu M$. Esta concentración de rotenona era suficiente para inhibir el sitio I de la cadena respiratoria en ambas preparaciones mitocondriales, como fue demostrado previamente por medio de una titulación (no se muestra). Utilizando piruvato-malato ($12 mM - 0.6 mM$) como sustrato oxidable, la transhidrogenasa no fue capaz de generar un potencial de membrana detectable utilizando mitocondrias acopladas de higado y testículo de rata.

Dado que la safranina sólo mide el componente eléctrico del potencial electroquímico, y considerando que podría estarse generando un ΔpH sin que el correspondiente $\Delta\psi$ fuese suficientemente alto para ser detectado por el método de la safranina O, se procedió a determinar la capacidad de síntesis de ATP (42) en mitocondrias de testículo en las mismas condiciones, es decir en presencia de rotenona y piruvato-malato. En la Tabla III se observa una incorporación de 100 nmoles de ATP, con una inhibición casi completa en presencia de oligomicina y FCCP, lo que indica-

ría que la incorporación de P^{32} ocurrió en su mayor parte mediante la actividad de la ATP sintetasa y con la utilización de un gradiente electroquímico, generado, en su mayor parte por la cadena transportadora de electrones.

En presencia de rotenona se obtuvo la síntesis de 1.5 nmoles de $[\gamma]$ -ATP 32 /min/mg prot., que por una serie de experimentos hechos posteriormente para esclarecer su procedencia, parecen corresponder a la fosforilación a nivel de sustrato del ciclo de Krebs.

TABLA III

Velocidad de "síntesis de ATP" de mitocondrias de testículo utilizando piruvato - malato como sustrato oxidable.

ADICIONES	$^{32}\text{P}_i$ INCORPORADO (nmol/min/mg prot.)	INHIBICION
NINGUNA	100	—
OLIGOMICINA ($20\mu\text{g}/\text{mg}$ prot.)	3	97
FCCP ($2\mu\text{M}$)	2	98
-PIRUVATO (12 mM)	10	—
ROTENONA ($1\mu\text{M}$)	1.5	98.5

El medio de incubación consistió de: piruvato 12 mM, malato 0.3 mM, ADP 1 mM, $^{32}\text{P}_i$ + fosfato - Tris 4.5 a 5 mM con una actividad específica de 2 000 a 3 000 cpm/nmol de P_i , diadenosina pentafofato $50\mu\text{M}$ (inhibidor de la miocinasa), hexocinasa 10 U, MgCl_2 0.5mM, glucosa 10 mM y de 0.2 a 0.4 mg de proteína en un volumen final de 0.3 ml. El ensayo se llevó a cabo a 30°C y la reacción se detuvo con TCA al 15% a los 3 minutos.

DISCUSION

La transhidrogenasa mitocondrial de piridín nucleótidos ha sido ampliamente estudiada en mitocondrias de corazón de res, tejido en donde su actividad es máxima (32), y no obstante este hecho, el papel que juega esta enzima en cuanto a la producción de energía está en controversia; sin embargo, su importancia podría verse amplificada en tejidos con características metabólicas diferentes, como es el caso del testículo.

Los resultados obtenidos, se discuten a continuación. Se determinó el curso temporal de la actividad de la transhidrogenasa en PSM de corazón y de testículo (fig 1a y 1b). La magnitud de la actividad de la transhidrogenasa que mostraron las PSM_{EDTA} de corazón es muy semejante a la informada anteriormente por el grupo de Ernster en un ensayo realizado en las mismas condiciones (36). A partir de los datos publicados en ese trabajo se pudieron calcular las actividades específicas de la transhidrogenasa durante la fase inicial: 62.81 nmoles de NADH/min/mg prot. producidas en el sentido de reducción de NAD⁺ a partir de NADPH, y 21.32 nmoles de NADPH/min/mg prot. en el sentido de reducción de NADP⁺ a partir de NADH. Los valores obtenidos por nosotros fueron de 64.61 y 33.19 respectivamente, indicando que en las mismas condiciones de ensayo los datos fueron reproducibles. Al compararlos con los obtenidos utilizando PSM de testículo, observamos que la actividad de las partículas de testículo fue dos veces me-

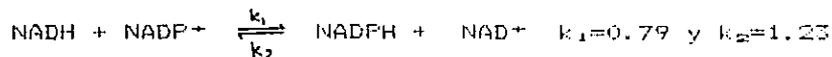
nor a la observada en PSM de corazón en la reacción dependiente de energía, e igual en ambos tejidos en la reacción independiente de ésta. Expresado de otra manera, la relación entre la reacción independiente de energía y la dependiente de energía, fue 3.6 en PSM de testículo y 1.9 en corazón, como resultado de la mayor lentitud en la velocidad inicial de la reacción dependiente de energía de la transhidrogenasa testicular.

En un estudio realizado en mitocondrias digitonizadas, (32) aisladas de diversos tejidos, se informan valores de transhidrogenasa sobreestimados y sin un patrón definido para el mismo tejido; por ejemplo, en corazón informan una actividad específica 11 veces mayor que la encontrada por el grupo de Ernster (36) para la reacción dependiente de energía, y 7.6 veces mayor para la independiente de energía. Por otro lado, en testículo las actividades específicas son 7 y 4 veces mayores a las que nosotros obtuvimos para las reacciones dependiente e independiente de energía respectivamente. Estas diferencias creemos se pueden explicar de la siguiente manera: por un lado Stein y col. estiman la velocidad de reacción por medio de la diferencia espectral de NADPH y el acetyl piridin adenina dinucleótido (análogo del NAD^+) y del NADH y el acetyl piridin adenina dinucleótido fosfato (análogo del $NADP^+$), e informan, que bajo sus condiciones, las velocidades obtenidas son más eficientes con el análogo como aceptor que con $NAD(P)^+$ (32); por otro lado, suponemos que el proceso de solubilización no fue uniforme para las diferentes preparaciones de corazón y de testículo, ya que los valores no están sobrees-

timados de igual manera en los dos tejidos; asimismo no se puede descartar que al solubilizar la enzima con digitonina, ellos hayan obtenido distintos niveles de actividad de la transhidrogenasa por problemas de estabilidad de la misma (50).

Por otro lado, la relación de actividades específicas corazón: testículo en la enzima solubilizada de mitocondrias es de 2.0, para la reacción independiente de energía, y de 3.3, para la dependiente de energía, lo cual difiere de los resultados obtenidos en el presente trabajo, en el que no encontramos diferencia en la reacción independiente de energía entre corazón y testículo, y la relación para la reacción inversa fue de 2.0. Pensamos que estas discrepancias nuevamente se deben a la diferencia del enfoque experimental.

En el trabajo de Ernster y col. (36), la transhidrogenasa de corazón tiene una constante de equilibrio, en ausencia del potencial electroquímico, muy cercana a 1, pero en presencia de éste la constante de equilibrio aparente se eleva aproximadamente a 500, favoreciendo la reacción dependiente de energía. Con el objeto de averiguar si había diferencias en las características cinéticas de la transhidrogenasa en un tejido como el testículo, con sistemas enzimáticos y de regulación propios, decidimos calcular las K_{eq} para los dos tipos de partículas: resultando 0.6 para las PSM de corazón y 0.2 para las PSM de testículo. Ernster y col. (36), informan que en partículas de corazón y ausencia del gradiente electroquímico:



es decir, una $K_{m_1} = 0.64$; que es un valor es muy similar al encontrado en este trabajo.

En testículo, calculamos las constantes de velocidad de la transhidrogenasa a partir de los valores de actividad específica de las figuras 2a y 2b de acuerdo con Rydström y col. (51) y obtuvimos los siguientes valores: $k_1=0.032$ y $k_2=0.206$, y de aquí, $k_1/k_2=0.155$, que fue muy similar al 0.2 que obtuvimos por el método de Segel (44). Así pues, la K_{m_1} de la transhidrogenasa mitocondrial de testículo, a pesar de ser del mismo orden de magnitud que la de corazón, fue 3 veces menor y k_1 un orden de magnitud menor. Podemos concluir que en ausencia de un gradiente electroquímico, la reducción de NADP⁺ por NADH en testículo no sólo fue una reacción 2 veces más lenta que en corazón, sino que en el equilibrio también está menos favorecida.

Para determinar la modulación de la transhidrogenasa en presencia de un proceso de energización, se estudió primero la capacidad de ambas partículas para generar y mantener un potencial de membrana con distintos sustratos oxidables por la cadena transportadora de electrones así como por hidrólisis de ATP-Mg²⁺ (fig. 4). El valor del potencial generado por las PSM de corazón obtenido en este trabajo resultó difícil de comparar con el informado para corazón y otros tejidos utilizando oxonol VI y los mismos sustratos, ya que es bien sabido que el potencial generado depende de la relación proteína-indicador (41). Por lo tanto debemos limitar la comparación del potencial obtenido, en nuestras condiciones, por las PSM de corazón y de testículo.

Aquellas lograron generar potenciales de membrana con un valor 3 veces mayor al de testículo con ATP-Mg²⁺, 6 veces mayor con NADH y 7 veces mayor con succinato. A pesar de que el potencial generado por ATP-Mg²⁺ fue menor en las PSM de testículo, se requirió el triple de oligomicina para abatirlo (6.7 µg de oligomicina/mg de proteína en PSM de corazón y 20 en las de testículo), lo que sugiere una insensibilidad relativa a la oligomicina, congruente con informes previos de nuestro laboratorio (52).

Como era de esperarse (35), en presencia de un exceso de oligomicina, las PSM EDTA o "no fosforilantes" de corazón duplicaron con NADH y succinato el valor del potencial obtenido con ATP-Mg²⁺; al acabarse los sustratos el potencial cayó a los niveles basales. No así, en las partículas de testículo, las cuales fueron incapaces de mejorar los potenciales generados por la cadena respiratoria en presencia de un exceso de oligomicina. Por trabajos previos del laboratorio, en mitocondrias intactas se demostró que cuando éstas eran aisladas en presencia de BSA 1%, se mejoraba considerablemente el grado de acoplamiento (6,8), o bien, que concentraciones bajas de oligomicina (20-40 ng/mg de proteína) mimetizaban este efecto consiguiendo un valor significativamente mayor de síntesis de ATP; lo que sugiere una unión laxa de la F₁ de la ATPasa mitocondrial de testículo con la porción membranal, lo que a su vez permite la existencia de canales F₀ abiertos al flujo de protones. De hecho, la máxima inhibición de la ATPasa por oligomicina que se consigue en mitocondrias es del 50%, aún cuando la concentración del inhibidor sea mayor a

1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína (52). En ese trabajo se discute que este resultado se obtiene debido a que la oligomicina sólo puede inhibir la actividad de la fracción de las F_1 unidas a la porción F_0 membranal, y las F_1 sueltas conservan su actividad. Otra evidencia importante del grupo del laboratorio que cabe considerar, es una micrografía (no publicada) de PSM_{EDTA} de testículo, en la que se observa que la membrana está prácticamente rasurada de F_1 .

Considerando todas estas características de nuestro sistema de estudio, pensamos que los potenciales de membrana generados en estas partículas "no fosforilantes" de la fig. 4 se pueden explicar de la siguiente manera:

1o. Las partículas de testículo no fueron capaces de generar un potencial de membrana mayor por hidrólisis de ATP, similar al de las PSM_{EDTA} de corazón, dado que su membrana carece prácticamente de F_1 .

2o. El potencial de membrana generado por hidrólisis de ATP requirió 3 veces más oligomicina para colapsar el gradiente, dado que suponemos que la oligomicina se unió preferentemente a la porción F_0 de la ATPasa con F_1 no unida, de acuerdo con la referencia (53).

3o. Consideramos que la concentración de oligomicina (20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot.) presente en las partículas de testículo durante la generación del potencial de membrana formado por la oxidación de NADH y succinato era suficiente para tapar todos los canales F_0 abiertos, así como los F_0 unidos a F_1 . Por tanto, el hecho de que en

estas condiciones no se lograra mejorar el grado de acoplamiento de estas particulas, nos sugiere que la membrana de esta preparaci3n de particulas testiculares presenta, adem1s una alta permeabilidad, inespecifica, a protones.

Las figuras 5a y 5b ilustran las velocidades iniciales de las reacciones independiente y dependiente de energia en los dos tipos de particulas, en presencia de un gradiente electroquimico generado por ATP-Mg²⁺. En cuanto a la reducci3n de NAD⁺ a partir de NADPH, las PSM de coraz3n no mostraron diferencia entre las actividades especificas obtenidas en presencia o en ausencia de ATP-Mg²⁺ (64.6 vs. 69.1). En la literatura se ha informado que en las PSM_{membrana} de coraz3n el proceso de energizaci3n inhibe esta reacci3n de manera competitiva con respecto a los sustratos NAD⁺ y NADPH (54), asi como que la constante de velocidad k, de esta reacci3n, es m1s de 3 veces mayor que la velocidad correspondiente en presencia de un exceso de oligomicina y de succinato como sustrato oxidable (51). Esta discrepancia aparente creemos que es debida a que en nuestro caso el proceso de energizaci3n se llev3 a cabo con ATP-Mg²⁺ en vez de succinato.

Por otro lado, las PSM de testiculo, a diferencia de las de coraz3n, mostraron un 58% de inhibici3n en la actividad especifica de la reacci3n independiente de energia en presencia de ATP-Mg²⁺ (56.8 vs. 32.7), no obstante que el potencial de membrana generado por estas particulas fue 3 veces menor al generado en PSM de coraz3n.

Con respecto a la reducci3n de NADP⁺ a partir de NADH en PSM

de corazón, en presencia de un gradiente electroquímico se estimuló en un 123% (33.2 vs. 74.1). Esta observación difiere cuantitativamente de la informada en el trabajo de Lee y Ernster (36), ya que estos autores encontraron una activación del 316%. Esta diferencia se puede explicar si consideramos que en su caso, utilizan succinato como sustrato oxidable para generar el potencial de membrana, y nosotros utilizamos ATP-Mg²⁺, que ya se mostró que solamente generó la mitad del potencial generado por el succinato. Además, según el mismo grupo de Ernster (55) las PSM_{cora} o "no fosforilantes" pueden conducir la reacción dependiente de energía de manera mucho más ineficiente a partir de ATP que a partir de la cadena respiratoria. Esto es consistente con la conclusión de que estas partículas aún poseen la capacidad de generar y mantener el gradiente de protones por la cadena respiratoria acoplada, a pesar de que su capacidad fosforilante, o su habilidad para utilizarlo para convertir ADP y Pi en ATP, es menor o inexistente (35,55).

En cuanto a la velocidad inicial de la reacción dependiente de energía de las PSM de testículo, frente al potencial de membrana que fueron capaces de generar con ATP-Mg²⁺, se observó una estimulación del 37% (15.9 vs. 21.7), que proporcionalmente fue igual al de corazón, si se considera que el potencial de membrana generado por el sistema testicular fue 3 veces menor al de corazón.

Resumiendo los resultados de las figuras 5a y 5b podemos decir que en estas condiciones en que las PSM "no fosforilantes" se

energizaron con ATP-Mg²⁺, es decir en presencia de un gradiente electroquímico muy pobre, sobre todo en testículo, la transhidrogenasa independiente de energía del sistema testicular fue más sensible al proceso de energización que la dependiente de energía. En cambio en corazón ocurrió lo contrario: la reacción dependiente de energía fue más sensible a la energización que la independiente de energía.

A pesar de que nuestros resultados con las partículas de corazón parecen discrepar de lo descrito en la literatura (51,54) y de los resultados con el sistema testicular, se pueden explicar considerando que las condiciones que utilizamos para energizar las partículas difieren de las usadas en la literatura (36,53, 55,56). La diferencia sugiere que el potencial de membrana generado por la hidrólisis de ATP en las partículas de corazón no fue suficiente para inhibir la reacción independiente de energía. Asimismo, resulta evidente que en las partículas de testículo el proceso de energización, aunque más pobre, fue mucho más eficiente para inhibir esta reacción. De hecho, este resultado en testículo coincide con la proposición de Rydström y col. (51) relativa a que la transhidrogenasa está presente en una forma activa (TH*) y una inactiva (TH), la primera promovida por la presencia de NAD⁺ y NADPH ó energía y la segunda por la presencia de NADP⁺ y NADH. La activación de la enzima promovida por energía, estimula la reacción en el sentido de la reducción de NADP⁺ a partir del NADH e inhibe el sentido de la reducción del NAD⁺ a partir del NADPH. Sólo que además cabe agregar que en testículo, la

transferencia de la forma TH* de la enzima promovida por NAD⁺ y NADPH a la forma TH por la presencia de energía, parece funcionar como un sistema de " todo o nada".

La figura 6 muestra los cambios en la constante de equilibrio que resultan por el proceso de energización con ATP-Mg²⁺. Como se muestra en "Resultados", la constante de equilibrio de las partículas de corazón se modificó de 0.6 (fig.3) a 1.35 (fig.6), y en testículo de 0.2 (fig.3) a 0.5 (fig.6). De acuerdo con el grupo de Ernster (36), la constante de equilibrio aparente del sistema cardíaco es aproximadamente 500 y nosotros sólo pudimos obtener una K_{eq} aparente de 1.35. Una vez más podríamos atribuir la discrepancia al diferente generador del potencial de membrana utilizado en ambos estudios, según se discutió anteriormente. Sin embargo, consideramos que nuestra decisión de utilizar ATP-Mg²⁺ para la energización fue la adecuada, en vista de que en FSM de testículo la oligomicina fue incapaz de producir un incremento en el potencial de membrana que sí se indujo con el succinato en FSM de corazón al ser utilizado como agente energizante (fig.4).

Así pues, en estas condiciones pensamos que el efecto del potencial de membrana sobre la constante de equilibrio aparente, no fué distinto para los 2 sistemas de partículas, ya que ambas K_{eq} se desplazaron en la misma proporción y en el mismo sentido.

En la búsqueda de un sistema testicular con mejores condiciones de acoplamiento, decidimos trabajar con mitocondrias enteras y no utilizar las FSM_{ATP-Mg²⁺} o "fosforilantes" por los

resultados de la fig.4, en la que se observa, como antes se mencionó, el efecto nulo de la oligomicina para acoplar las PSM_{EDTA} testiculares. La Tabla I muestra la velocidad respiratoria en los estados 3 y 4, así como los controles respiratorios en mitocondrias de testículo y de hígado en presencia de succinato, piruvato y malato como sustratos oxidables. Los valores encontrados en hígado no fueron diferentes de los informados en la literatura para estos sustratos (57); asimismo, los valores en testículo no difirieron de los observados anteriormente por el grupo del laboratorio (6) o por otros autores (56). Como se puede observar, el máximo consumo de O₂ se obtuvo con succinato para los dos tejidos, aunque en hígado fue más de dos veces mayor que en testículo. Por otro lado, malato fue oxidado por las mitocondrias de testículo de manera importante y aunque no fue determinada la velocidad en las mitocondrias de hígado, ya se había descrito en éstas una muy baja oxidación con un valor de 12 nmoles de O₂/min/mg prot. (6). Piruvato fue oxidado de manera similar en los dos sistemas mitocondriales.

Como ya hemos mencionado que la función de la transhidrogenasa en el proceso de obtención de energía está en controversia, surgió la idea de indagar si la transhidrogenasa independiente de energía en mitocondrias de testículo acopladas pudiera ser capaz de generar un potencial de membrana en condiciones de bloqueo total de la cadena transportadora de electrones. Para esto, primero se determinó la capacidad de las mitocondrias para formar un gradiente, midiendo el $\Delta\psi$ con safranina O como indicador.

En la figura 7 se muestra la curva de calibración del potencial de membrana en mV para las mitocondrias de hígado y de testículo en presencia de succinato y sin Pi. El potencial obtenido fue de 154 mV para testículo y 151 mV para hígado, así como un potencial basal de 30 y 61 mV respectivamente. Åkerman, informa que en mitocondrias de hígado se obtuvo un $\Delta\Psi$ de 165 mV y un potencial basal de 50 mV (40). Estos resultados comparan muy de cerca con las obtenidas en el presente trabajo, y los valores obtenidos para las mitocondrias del testículo no fueron diferentes. La Tabla II muestra los potenciales obtenidos con succinato, piruvato-malato, malato y lactato en las dos preparaciones mitocondriales. En estudios realizados con espermatozoides enteros (17,36,58) y con mitocondrias aisladas de células germinales (20), se ha demostrado una gran capacidad oxidativa asociada con una fosforilación eficiente utilizando estos sustratos, que se ha visto son los metabolitos del ciclo de los ácidos tricarbónicos que más contribuyen a la obtención del ATP en estas células (59).

Una tendencia que resulta evidente con los resultados de la Tabla II es la baja oxidación de piruvato-malato, malato y lactato por las mitocondrias de hígado comparadas con las de testículo. Esta diferencia podría deberse a la actividad de las isoenzimas presentes en el sistema testicular que participan de manera importante en el ciclo malato-piruvato, tales como la enzima-málica NAD(P)⁺ y la LDH-X (14-20) (esquema 2).

Por otro lado, cabe agregar que Åkerman y col. encuentran

un cambio espectral de la safranina que está linealmente relacionado con la generación del potencial de membrana en el rango de 40-170 mV (40). Los valores obtenidos en este trabajo y que se muestran en la Tabla II se encuentran cercanos a estos límites, considerando sus desviaciones estandar.

Alentados por la capacidad de las mitocondrias testiculares para formar y mantener un potencial de membrana, se intentó generar éste en ambas preparaciones mitocondriales con el sitio I de la cadena respiratoria inhibido por rotenona y con piruvato-malato como sustrato oxidable. Como se mencionó en "Resultados", en estas condiciones no logramos observar un cambio medible en el potencial de membrana.

Considerando la posibilidad de que la magnitud del potencial formado estuviera por abajo de la sensibilidad del método, se intentó determinar la velocidad de síntesis de ATP en condiciones similares. Como se muestra en la Tabla III, con las mitocondrias de testículo se obtuvo una velocidad de síntesis de ATP, medida como incorporación de ^{32}P i a ADP, comparable a la descrita anteriormente por nuestro grupo utilizando succinato como sustrato (44). La velocidad de síntesis de ATP^{32}P con mitocondrias de testículo en presencia de piruvato-malato no había sido medida con esta metodología. Otros datos de la literatura se refieren a velocidad de síntesis de ATP por un número de células enteras, sean espermatozoides (16) como espermátidas aisladas (20), por lo que resulta difícil compararlos con los obtenidos por nosotros en mitocondrias aisladas. Los resultados de la síntesis de ATP,

obtenidas en presencia de rotenona muestran, que a pesar de tratarse de una técnica muy sensible, solo se obtuvo la síntesis de 1.5 nmoles de ATP³²P/min/mg de proteína, que además no fueron sensibles ni a la presencia de desacoplantes ni a la de oligomicina (no se muestran los datos), por lo que se concluyó que podría tratarse de una fosforilación a nivel de sustratos y que no era posible atribuirla a una síntesis de ATP mediada por la transhidrogenasa. Por lo demás, la síntesis de ATP³²P de testículo, apoyada por la oxidación de piruvato-malato, exhibió las características "clásicas" de la síntesis mitocondrial de ATP: fue inhibida por oligomicina y agentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa, así como por inhibidores de la cadena respiratoria.

Resumiendo todos los resultados anteriormente expuestos, podemos concluir que la transhidrogenasa dependiente de energía de testículo debe ser estudiada en mitocondrias intactas, ya que éstas mostraron características de un sistema con un buen grado de acoplamiento, es decir, controles respiratorios cercanos a 3, velocidades de consumo de O₂ en el estado 3 medianamente aceptables, valores de potencial de membrana y de síntesis de ATP comparables a los obtenidos en otros tejidos; mientras que la preparación de PSM de este tejido presentó características de desacoplamiento tal que no permitieron la generación de un potencial de membrana propio de esta preparación en otros tejidos, como fue el caso de corazón de res.

Por otro lado, en lo que toca a la participación de la

transhidrogenasa en la conservación de la energía, la enzima de testículo no fue diferente a la de corazón. En este tejido, en 1970 el grupo de Ernster (51) informó que la reacción de la transhidrogenasa en el sentido de la reducción de NAD^+ a partir de NADPH en presencia de ADP y P_i era incapaz de sintetizar ATP, aún en presencia de sistemas eficientes de captura para remover los productos NADH, NADP^+ y cualquier ATP que se pudiera formar. Un año después Van de Stadt (31) aseguró que en el mismo sentido la reacción de la transhidrogenasa era capaz de sintetizar ATP utilizando el potencial de membrana generado por esta reacción. Sin embargo, en 1972, el grupo de Skulachev (60) demostró que el potencial de membrana generado por la transhidrogenasa en esta misma dirección era inferior al mínimo requerido para poder llevar a cabo la síntesis de ATP. Por lo tanto, la función de la transhidrogenasa en la conservación de energía es todavía desconocida.

CONCLUSIONES

- 1) La transhidrogenasa mitocondrial testicular comparada con la de corazón presentó una reacción dependiente de energía dos veces más lenta que la de corazón, y con el equilibrio ligeramente desplazado hacia la reducción de NAD^+ a partir de NADPH . En cambio, la velocidad de la reacción independiente de energía fue igual en los dos tejidos.
- 2) En presencia de un gradiente electroquímico, la reacción dependiente de energía se estimuló en PSM de testículo de igual manera que en corazón; en cambio, la reacción independiente de energía fue mucho más sensible al proceso de energización en testículo que en corazón. Estas diferencias sólo parecen modificar la velocidad inicial, ya que la K_{eq} aparente se modificó en la misma proporción y en el mismo sentido. Por otro lado, no es posible llegar a conclusiones definitivas al comparar el efecto del proceso de energización en los dos tipos de partículas, ya que el gradiente generado en las de corazón fue tres veces mayor al generado en las de testículo.
- 3) La transhidrogenasa dependiente de energía de testículo debe ser estudiada en mitocondrias, ya que la preparación de PSM de este tejido sugiere una membrana con una alta permeabilidad a protones, lo que conlleva a un potencial de

membrana muy pobre.

- 4) De acuerdo a las características que mostró la preparación de mitocondrias intactas en cuanto a su $\Delta \mu H^+$, consideramos que es un sistema con un buen nivel de acoplamiento.
- 5) Por los resultados obtenidos en las mitocondrias de testículo en cuanto a la determinación del potencial de membrana y de síntesis de ATP en presencia de rotenona, la función de la transhidrogenasa mitocondrial en la conservación de la energía es todavía desconocida.

REFERENCIAS

- (1) Setchell, B.P. y Waites, G.M.H. (1964). *J.Physiol.* 171,411.
- (2) Free, M.J. y VanDemark, N.L. (1968). *Am. J. Physiol.* 214,863.
- (3) Free, M.J., Schluntz, G.A. y Jaffe, R.A. (1976). *Biol. Reprod.* 14, 481.
93,1238.
- (4) André, J. (1962). *J. Ultrastruct. Res. Suppl.* 3, 1.
- (5) Izquierdo-Reyes, V., Vázquez-Memije, M.E. y Delhumeau-Ongay, G. (1985). 13° Congreso Internacional de Bioquímica. FR-468,759.
- (6) Izquierdo-Reyes, V. (1988). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química E.N.E.F. - Zaragoza U.N.A.M.
- (7) Delhumeau-Ongay, G., Vázquez-Memije, M.E., Alonso, R., Trejo, R., Hernández-Montes, H. y Izquierdo-Reyes, V. (manuscrito en preparación).
- (8) Vázquez-Memije, M.E., Izquierdo-Reyes, V. y Delhumeau-Ongay, G. (1988). *Arch. Biochem. Biophys.* 260, 67.
- (9) Delhumeau-Ongay, G., Trejo R., Alonso, R. y Hernández-Montes, H. (1982). 12th. International Congress of Biochemistry. Perth, Australia. p. 95.
- (10) Nicholls, D.G., y Garland, P.B. (1969). *Biochem. J.* 114,215.
- (11) Fritz, I.B. (1973). *Current Topics in Cellular Regulation* 7, 129. Eds., Horecker, B.L. y Stadman, E.R., Academic Press, London.
- (12) De Domenech, E.M., Domenech, C.E. y Blanco, A. (1970).

- Arch. Biochem. Biophys. 141, 147.
- (13) Blanco, A., Burgos, C., Gerez de Burgos, N.M. y Montamat, E.E. (1976). Biochem. J. 153, 165.
- (14) Sauer, L.A., Dauchy, R.T., Nagel, W.O. y Morris, H.P. (1980). J. Biol. Chem. 255, 3844.
- (15) Nagel, W.A., Dauchy, R.T., Sauer, L.A. (1980). J. Biol. Chem. 255, 3849.
- (16) Van Dop, C., Hutson, S.M. y Lardy, H.A. (1977). J. Biol. Chem. 252, 1303.
- (17) Hutson, S.M., Van Dop, C. y Lardy, H.A. (1977). J. Biol. Chem. 252, 1309.
- (18) Storey, B.T. y Kayne, F. (1978). Biol. Reprod. 18, 527.
- (19) Aruldas, M.M., Valivullah, M.H. y Govindarajulu, P. (1983). Biochim. Biophys. Acta, 755, 90.
- (20) Grootegoed, J.A., Jansen, R. y VanDer Molen, H.J. (1984). Biochim. Biophys. Acta, 767, 248.
- (21) Rydström, J., Persson, B. y Tang, H.L. (1984). Bioenergetics. Ernster, L. (Ed.). Elsevier Science Publishers B.V. Eur. J. Biochem. 23, 212.
- (22) Danielson, L. y Ernster, L. (1963). Biochem. Biophys. Res. Comm. 10, 91.
- (23) Ernster, L. y Lee, C.P. (1964). Annu. Rev. Biochem. 33, 729.
- (24) Mitchell, P. (1966). en "Chemiosmotic coupling and Energy Transduction". Glynn Res. Ltd., Bodmin, Cornwall, England

- c.f. (30).
- (25) Liberman, E.A. y Tsofina, L.M. (1969). *Biofizika* 14, 1017.
c.f. (30).
- (26) Skulachev, V.P. (1969). 2nd. Biochem. Meet, U.S.S.R., Symp.
Rep., p. 222 c.f. (30)
- (27) Liberman, E.A. (1969). 2nd. Biochem. Meet, U.S.S.R. Symp.
Rep., p. 224. c.f. (30).
- (28) Grinuis, L.L., Jasaitis, A.A., Kadzyauskas, Yu. P.,
Liberman, E.A., Skulachev, V.P., Topali, V.P., Tsofina,
L.M. y Vladimirova, M.A. (1970). *Biochim. Biophys. Acta*
216,1.
- (29) Isaev, P.I., Liberman, E.A., Samuilov, V.D., Skulachev,
V.P., y Tsofina, L.M. (1970). *Biochim. Biophys. Acta* 216,
22.
- (30) Skulachev, V.F. (1971). *Current Topics in Bioenergetics* 4,
127.
- (31) Van de Stadt, R.J., Nieuwenhuis, F.J.R.M. y Van Dam, K.
(1971). *Biochim. Biophys. Acta*, 234, 173.
- (32) Stein, A.M., Kaplan, N.D. y Ciotti, M.M. (1959). *J. Biol.*
Chem. 234, 979.
- (33) Bernofsky, C. y Swam (1973). *Anal. Biochem.* 53, 452.
- (34) Low, H. y Vallin, I. (1963). *Biochim. Biophys. Acta*, 69,
361.
- (35) Lee, C.P., Azzone, G.F. y Ernster, L. (1964). *Nature* 201,
152.
- (36) Lee, C.P., y Ernster, L. (1964). *Biochim. Biophys. Acta*

81,187.

- (37) Bergmeyer, H.U. (1985). en *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. VII, 251. 3a. Edición VCH.
- (38) Estabrook, R.W. (1967) en *Methods in Enzymology*. Vol. 10, 41. Eds. Estabrook, R.W. y Pullman, M.E. Academic Press, New York.
- (39) Gornall, J.A., Bardawill, C.S. y David, M.M. (1949). *J. Biol. Chem.* 177, 751.
- (40) Åkerman, K., y Wikström, M. (1976). *FEBS Letters* 68, 191.
- (41) Bashford, C.L. y Thayer, W.S. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 8459.
- (42) Tuena de Gómez-Puyou, M., Ayala, G., Darazon, A. y Gómez-Puyou, A. (1984). *J. Biol. Chem.* 259, 9472.
- (43) Lowry, D.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.I. (1951). *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- (44) Segel, Irwin, H. en *Enzyme Kinetics. Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and steady-state Enzyme systems*. (1975) p. 864. Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons. New York/ London/ Sydney/ Toronto.
- (45) Beltrán, C., Tuena de Gómez-Puyou, M., Darazon, A. y Gómez-Puyou, A. (1986). *Eur. J. Biochem.* 160, 163.
- (46) Delhumeau-Ongay, G., Vázquez-Memije, M.E., Montalvo, I. y Sotelo, A. (1981). *Rev. Soc. Quim. Mex.* 25, 166.
- (47) Chapell, J.B. (1968). *Brit. Med. Bull.* 24, 150.
- (48) La Noue, K.F. y Tischler, M.E. (1976). *Bioenergetics, biogenesis and membrane structure*, p. 61. Eds. Racker, L.

- y Gómez-Puyou, A. Academic Press, New York.
- (49) Rossi, E. y Azzone, G.F. (1969). Eur. J. Biochem. 7, 418.
- (50) Kaplan, N.D., Colowick, S.P. y Neufeld, E.F. (1953).
J. Biol. Chem. 205, 1.
- (51) Rydström, J., Teixeira da Cruz, A. y Ernster, L. (1970).
Eur. J. Biochem. 17, 56..
- (52) Vázquez-Memije, M.E., Carabez-Trejo, A., Gallardo-
Trillanes, G. y Delhumeau-Ongay, G. (1984). Arch. Biochem.
Biophys. 232, 441.
- (53) Lee, C.P. y Ernster, L. (1966). B. B. A. Library 7, 218.
(Tager, J.M., Papa, S., Quagliariello, E. y Slater, E.C.,
Eds. Elsevier, Amsterdam.
- (54) Rydström, J., Teixeira Da Cruz, A. y Ernster, L. (1971).
Eur. J. Biochem. 23, 212
- (55) Lee, C.P. y Ernster, L. (1967). en Methods in Enzymol. 10,
543.
- (56) Martino, C. De., Floridi, A., Marcante, M.L., Malorni, W.,
Scorza, B.P., Bellocci, M. y Silverstrini, B. (1979).
Cell Tissue Res. 196, 1.
- (57) Nelson, B.D., Kabin, F., Kolarov, J., Luciaková, K.,
Kuzela, S., Latruffe, N., y Linden, M. (1984). Arch.
Biochem. Biophys. 234, 24.
- (58) Peterson, R.N. y Freund, M. (1974). J.Reprod. Fert. 38,
73.
- (59) Mohri, H., Mohri, T. y Ernster, L. (1965). Exp. Cell Res.
38, 217.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

(60) Dontsov, A.E., Grinuis, L.L., Jasaitis, A.A., Severina,
I.I. y Skulachev, V.P. (1972). *Bioenergetics* 3, 277.