

40

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE QUIMICA**

**LOCALIZACION DEL SITIO DE ACCION DE LOS**  
**CATIONES EN LA MEMBRANA MITOCONDRIAL**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**  
**Q U I M I C O**  
**P R E S E N T A**

**MICHEL BEIGEL HALPERN**

**México, D. F.**

**1975**



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).

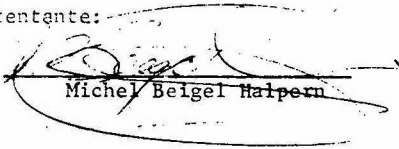
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

PRESIDENTE: ANGELA SOTELO LOPEZ  
VOCAL: FRANCISCO BOLIVAR ZAPATA  
SECRETARIO: MARIETTA TUENA DE GOMEZ-PUYOU  
1<sup>er</sup> SUPLENTE: ERNESTINA BALLESTEROS RUEDA  
2<sup>o</sup> SUPLENTE: SOCORRO CAO ROMERO MARTINEZ

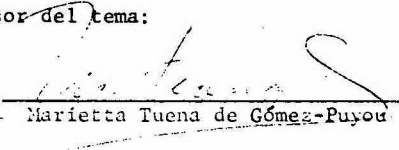
Sitio donde se desarrolló el tema:

Instituto de Biología, Departamento de Biología Experimental

Nombre completo y firma del sustentante:

  
Michel Beigel Halpern

Nombre completo y firma del asesor del tema:

  
Marietta Tuena de Gómez-Puyou

A MI FAMILIA

CON AMOR



EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LOS LABORATORIOS  
DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL DEL INSTITUT  
TO DE BIOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO, BAJO LA DIRECCION DE LA DRA. MARIETTA TUENA  
DE GOMEZ-PUYOU, A QUIEN AGRADEZCO SU AYUDA, TANTO ACADA  
DEMICA COMO HUMANA.

## I N D I C E

	<u>Página</u>
INTRODUCCION . . . . .	1
OBJETIVOS . . . . .	12
MATERIALES Y METODOS . . . . .	15
RESULTADOS Y DISCUSION . . . . .	21
CONGLUSIONES . . . . .	27
BIBLIOGRAFIA . . . . .	30

## A B R E V I A T U R A S

ADP	Adenosin difosfato
ATP	Adenosin trifosfato
ATPasa	ATP sintetasa
CoA	Coenzima A
CoQ	Coenzima Q
(c.p.)	Clostridium perfringens
FAD	Flavina adenina dinucleótido
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
OSCP	Factor que confiere sensibilidad a la oligomicina
Prot.	Proteína
PSM	Partículas submitocondriales
TCA	Acido tricloro acético
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano

"Todo lo que está afuera le dice al individuo  
que no es nada, mientras que todo lo que está  
adentro lo convece de que es todo".

**Budismo Zen.**

## INTRODUCCION

La vida parece haber sido solo un experimento de la naturaleza con peligro de ser extinguida en cualquier momento, hasta que, para preservarla, los protoorganismos desarrollaron una maquinaria segura para poder realizar sus funciones básicas.

Una célula viva es, en sí misma, una organización inestable e improbable, mantiene su maravilloso y específico ordenamiento gracias a la utilización constante de energía. Si cortamos el suministro de energía a una célula, ésta tiende a degradarse hasta un estado de total desorganización. Además del trabajo químico necesario para preservar la integridad de la organización de la célula, ésta necesita energía para llevar a cabo los distintos tipos de trabajos mecánicos, eléctricos, químicos y osmóticos que constituyen los procesos metabólicos de los organismos.

Esta energía necesaria para el funcionamiento celular, y por lo tanto, para la existencia de la vida, la toman las células de la ruptura de los enlaces de los nutrientes que se degradan durante los distintos procesos catabólicos que llevan a cabo. Dicha energía, es almacenada por las células que fabrican los alimentos y que posteriormente sirven como combustible para que se puedan realizar los procesos anabólicos.

Puesto que la célula funciona esencialmente a temperatura constante, no puede utilizar energía calorífica para realizar trabajo; por lo tanto, debe obtener y utilizar la energía a una temperatura constante y baja en un medio acuoso diluido y dentro de estrechos límites de concentración de iones hidrógeno.

Para asegurarse su energía, la célula ha perfeccionado extraordinariamente durante los largos períodos de evolución orgánica, organelos celulares con mecanismos moleculares que trabajan con gran eficiencia en esas condiciones. Estos organelos son: los cloroplastos, que se encuentran en las células de las plantas verdes y llevan a cabo los procesos fotosintéticos, y las mitocondrias, que se encuentran tanto en células animales como en las vegetales y llevan a cabo la fosforilación oxidativa.

La mitocondria es tal vez el organelo celular más estudiado y conocido, es el ejemplo más avanzado que se conoce de relación entre los mecanismos moleculares de reacción y la ultraestructura. Se le denomina con frecuencia la central de energía de la célula, pero es mucho más que eso puesto que realiza otras funciones además de suministrar energía como son, el transporte, la codificación y la síntesis de algunas de sus proteínas. Se encuentra en el citoplasma de todas las células eucariotes aeróbicas, cerca de las estructuras que más requieren de energía como las miofibrillas, los túbulos renales y el axón neuronal.

El Adenosintrifosfato (ATP) es el transportador universal de energía en las células. Esta molécula actúa transfiriendo su fosfato terminal rico en energía a otras moléculas. Durante este proceso, se convierte en Adenosindifosfato (ADP), que nuevamente puede ser transformado en ATP por los sistemas regeneradores de energía de la célula. Esta regeneración del ATP se realiza a través de varias etapas en el proceso de ruptura y oxidación de los alimentos.

El tamaño y forma de la mitocondria varía de un tipo de célula a

otro. Mide aproximadamente de 2 a 5  $\mu$  de longitud y 1  $\mu$  de ancho, y su forma puede ser tanto esférica, como cilíndrica o filiforme. Su número en las diferentes células varía mucho, desde unas cuantas docenas en algunas levaduras hasta 200,000 en las células del huevo de algunos vertebrados.

La mitocondria está constituida por dos membranas continuas y diferentes (Fig. 1), cada una de ellas formando un saco cerrado e independiente que puede representarse como un saco dentro de otro saco.

La membrana externa de 70  $\overset{\circ}{\text{Å}}$  de grueso es lisa y permeable a sacarosa, iones, nucleótidos y todo tipo de pequeñas moléculas, mientras que la interna de 50-55  $\overset{\circ}{\text{Å}}$  de grueso tiene una serie de invaginaciones llamadas "crestas" y su permeabilidad es altamente selectiva ya que solo deja pasar a través de ella algunos metabolitos.

Las dos membranas limitan dos espacios: el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial. Estas dos membranas poseen tres notables propiedades: buena fuerza tensora, estabilidad y flexibilidad.

Cada membrana está compuesta fundamentalmente por dos materiales: proteínas y lípidos. Ambos componentes tienen una función estructural, y las proteínas además, tienen una función enzimática. Los lípidos son aproximadamente el 50% de la masa de la membrana, y de éstos, el 90% son fosfolípidos cuya proporción en las membranas se puede apreciar en la tabla 1.

Dada la importancia de las funciones que residen en las membranas, su estructura y componentes ha tratado de ser visualizada mediante diferentes

Fig. 1

(A) La mitocondria está constituida por dos membranas, cada una de ellas tiene un grosor aproximado de 6 nm.

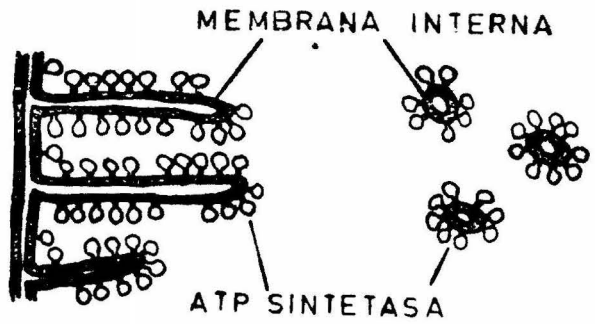
(B) La membrana interna está plegada en "crestas" cubiertas con esferas que corresponden a la ATP sintetasa, cada una de ellas de aproximadamente 8.5 nm. de diámetro. Las mitocondrias expuestas a sonicación dan lugar a pequeñas partículas submitocondriales (C) de polaridad invertida, que son capaces de realizar la fosforilación oxidativa.

(Tomado de 21, 37).





(A)



(B)

(C)

Fig.1

Tabla 1

Composición de Fosfolípidos en la Mitocondria

	Mitocondria	Membrana Interna	Membrana Externa
Cardiolipina	22.5%	21.5%	3.2%
Fosfatidilinositol	7.0	4.2	13.5
Fosfatidilserina	N.D.	N.D.	N.D.
Fosfatidiletanolamina	28.4	27.7	25.3
Fosfatidilcolina	40.0	44.5	55.2
No identificado	2.3	2.2	2.5

% individual de fosfolípidos expresado como % del fósforo total.

Tomado de apuntes del curso de Bioenergética impartido por el Dr. L.

Pedersen en la Universidad de Johns Hopkins en 1974.

N. D. = No determinado

modelos. Se ha postulado recientemente (22) que todas las membranas de los diferentes organelos así como la membrana citoplásmica tienen esencialmente la misma composición: proteínas, lípidos y carbohidratos en menor proporción.

El modelo membranaral mas aceptado en la actualidad es el conocido como "modelo del mosaico fluido" (43) (Fig. 2). En este modelo, los fosfolípidos forman una doble capa discontinua, con sus grupos hidrofóbicos orientados hacia el interior y los hidrofílicos hacia el exterior tal y como fue postulado por Davson y Danielli en 1935 (4) en el que, las proteínas formaban una capa continua adherida a las caras hidrofílicas de la bicapa de lípidos; en cambio en este nuevo modelo de Singer, las proteínas se pueden encontrar tanto en el exterior (como en el modelo de Davson) llamándose periféricas, como parte de ellas sumergidas dentro de la bicapa y parte en el exterior, denominándose integrales. Algunas otras proteínas se encuentran atravesando la membrana y están ancladas a ella por una serie de aminoácidos neutros que se fijan a la parte hidrofóbica de la doble capa conteniendo algunos otros aminoácidos de tipo polar hacia el exterior de ésta.

Todo este mosaico de lípidos y proteínas tiene fluidez, lo que confiere a las proteínas la propiedad de tener movilidad de un lado a otro de la membrana a diferencia del modelo de Davson y Danielli en el que la membrana era una estructura rígida. Estas proteínas parecen ser del tipo globular.

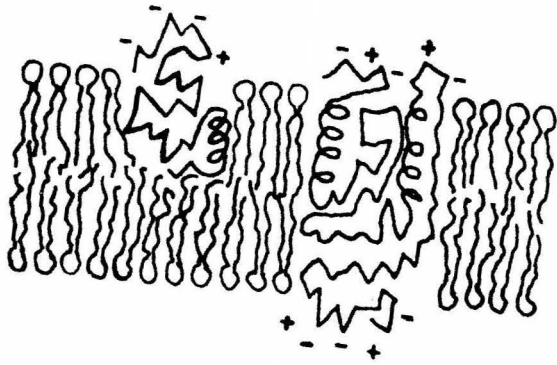
El modelo del "mosaico fluido" es el único modelo membranaral descrito hasta la fecha que es consistente tanto con las propiedades físicas y estructurales de las membranas, como con las restricciones termodinámicas existentes en éstas.

Fig. 2

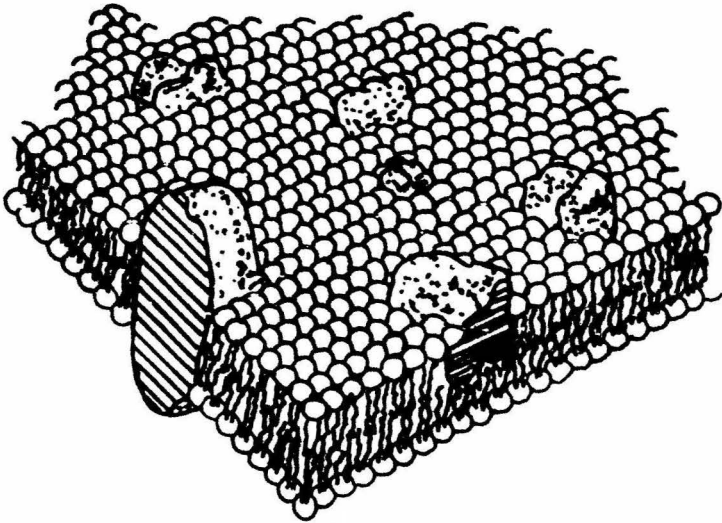
(A) Esquema del modelo membranar del "mosaico fluido". Los fosfolípidos se encuentran acomodados en una bicapa discontinua con sus cabezas polares en contacto con el agua. Las proteínas globulares se pueden encontrar tanto en el exterior de la bicapa (periféricas), como parcial o totalmente en el interior (integrales) las que atraviesan todo el grosor de la bicapa y pueden tener sus partes polares fuera de ésta en contacto con el agua, y sus partes no polares en contacto con la bicapa; estas proteínas son anfipáticas.

(B) Esquema tridimensional del modelo del "mosaico fluido". Los cuerpos sólidos representan a las proteínas globulares integrales que se encuentran distribuidas al azar dentro de la bicapa lipídica.

(Tomado de 43).



(A)



(B)

Fig. 2

Una fracción considerable de las reacciones mitocondriales se lleva a cabo en la membrana interna, siendo las principales, las relacionadas con la degradación oxidativa de los sustratos unida a la transferencia de electrones y a la fosforilación oxidativa.

Las crestas mitocondriales son muy numerosas, aumentando considerablemente la superficie de la membrana interna en comparación con la externa, y están tapizadas por una serie de pequeños gránulos que corresponden al sistema enzimático llamado ATPasa, cuya función es la de catalizar la síntesis o la hidrólisis del ATP.

El espacio cerrado entre las dos membranas es conocido como espacio intermembranal y en él se encuentran un pequeño número de enzimas cuya función no ha quedado hasta el momento muy clara.

El espacio interior delimitado por la membrana interna contiene un gel llamado "matriz mitocondrial", que está constituido aproximadamente por 50% de proteínas. La mayor parte de estas proteínas son enzimas que catalizan el Ciclo de Krebs también llamado Ciclo del Acido Tricarboxílico ó Ciclo del Acido Cítrico. En este ciclo, se oxidan los principales componentes de las células heterotróficas, que son los carbohidratos, los ácidos grasos y las proteínas. Para que esto suceda, cada uno de estos nutrientes tiene que ser preparado por medio de reacciones enzimáticas preliminares para poder ingresar al ciclo. En estas reacciones, los nutrientes se degradan hasta un ceto ácido en forma activada que es la Acetil Coenzima A. Esta molécula actúa como transportador de grupos acetilo en la célula, los cuales son transformados a través de las varias reacciones enzimáticas de

óxido-reducción, dando como resultado la captación de átomos de hidrógeno por las coenzimas de las respectivas deshidrogenasas (como el NAD y el FAD) que en su forma reducida transportan a estos hidrógenos hacia la cadena respiratoria.

La cadena respiratoria o cadena de transporte de electrones es la senda final en la que, todos los hidrógenos o electrones provenientes de los diferentes sustratos oxidables fluyen por diferencia de potencial hacia el oxígeno, que es el oxidante o aceptor final de electrones en las células aeróbicas, formándose  $H_2O$  en el último paso de las oxidaciones celulares. Los electrones que pasan a través de la cadena tienen un contenido relativamente alto de energía y a su paso por los diferentes aceptores liberan mucho de su contenido energético que es recuperado y conservado en la forma de moléculas de ATP.

Los componentes de la cadena respiratoria no han sido purificados totalmente hasta el momento. Según Ohnishi (Fig. 3) (31), está formada por una serie de diferentes deshidrogenasas cuyas coenzimas pueden ser el NAD o el FAD seguidas por un aceptor común de los electrones provenientes del NAD y FAD que es la coenzima Q, una serie de transportadores de electrones formados por distintas ferrosulfoproteínas y varios citocromos que contienen grupos " Heme " constituidos por una molécula de porfirina y Fe. Los electrones son transportados a través de todos estos acarreadores hasta llegar al oxígeno, que es el mas electropositivo de los aceptores y que en el último paso se reduce formando agua.

Este transporte es llevado a cabo cuando un acarreador se oxida

Fig. 3

Componentes de la cadena respiratoria, sitios de acoplamiento de energía y sitios de acción de inhibidores de la respiración, según Ohnishi (31). Las ferrosulfoproteínas (Fe-S) se encuentran numeradas para su identificación.



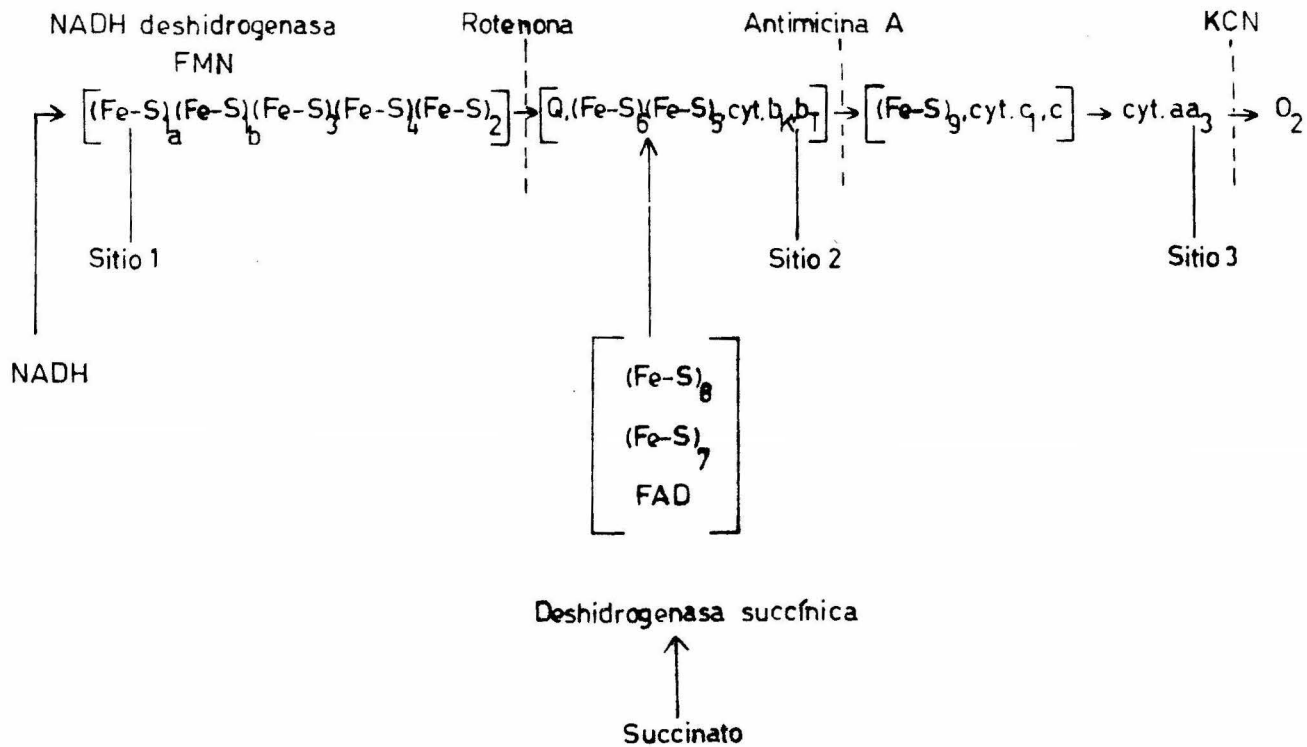


Fig. 3

y dona un electrón al siguiente en la cadena, este al recibirlo se reduce y luego se oxida al donar a su vez el electrón recibido por el primer aca rreador. El proceso se repite a través de todos los acarreadores hasta que, el electrón transportado llega a la molécula de oxígeno.

Los citocromos de la cadena pueden transportar un electrón en cada paso, en cambio las moléculas de NAD, FAD y CoQ pueden transportar dos a la vez, y por esta razón cada citocromo debe reaccionar dos veces por cada vez que reaccionan las moléculas de NAD, FAD y CoQ.

Por cada par de átomos de hidrógeno removidos en cada uno de los cuatro pasos de deshidrogenación del Ciclo de Krebs, un par de electro nes entra a la cadena respiratoria y reduce un átomo de oxígeno para formar agua. Los diferentes transportadores de la cadena están agrupados en unida des llamadas "segmentos respiratorios".

La transferencia de electrones a través de la cadena respiratoria se puede concebir como una serie consecutiva de reacciones enzimáticas conectadas por intermediarios comunes.

Existen evidencias experimentales que apoyan la sugestión de Mitchell (28) en la cual los componentes de la cadena respiratoria se encuentran alternativamente colocados tanto en la cara exterior de la membrana interna como hacia la cara interior de esta membrana.

Los sustratos de la cadena provenientes de las reacciones de óxido-reducción del Ciclo de Krebs y de otras fuentes, pueden verter sus electrones a diferentes niveles en la secuencia de acarreadores de electrones,

así los sustratos del sitio 1 (Fig. 3) son: el piruvato, el malato, el isocitrato, el glutamato y la 3 hidroxiacil CoA, los del sitio 2 son: el succinato, el acil-CoA y el glicerol fosfato, y para el sitio 3 únicamente el ascorbato.

Existen una serie de inhibidores del transporte enzimático de los electrones a través de la cadena: la rotenona, el amital y otros barbitúricos cuyo sitio de acción se encuentra entre el NAD y la CoQ (sitio 1), la antimicina A que inhibe la transferencia de electrones entre el citocromo b y el c (sitio 2), y el cianuro que actúa sobre la citocromo oxidasa (sitio 3) (Fig. 3).

Estudios cualitativos de la cadena respiratoria en mitocondrias, en las que se llevan a cabo las diferentes reacciones del Ciclo de Krebs y el transporte de electrones, han revelado que, tanto las moléculas de fosfato como las de ADP son componentes necesarios para que se lleve a cabo el transporte de los electrones a su máxima velocidad y para que se sintetizen a partir de dichos componentes las moléculas de ATP en el proceso llamado "fosforilación oxidativa".

La fosforilación oxidativa es el mecanismo mas importante en la conservación de la energía producida por la oxidación de los alimentos en los diferentes procesos metabólicos. Por cada molécula de NADH que se oxida en la cadena de transporte de electrones se producen tres moléculas de ATP.

La cadena de transporte de electrones posee tres segmentos específicos en donde existe un decaimiento relativamente alto de energía libre

(Fig. 3): entre el NAD y la CoQ, entre el citocromo b y el c, y entre el citocromo a y la molécula de oxígeno. En estos tres sitios de la cadena es donde se pueden generar durante el transporte de electrones, estados o intermediarios de alta energía que puedan llevar a cabo la síntesis de la molécula de ATP. A estos segmentos de la cadena se les conoce como los sitios 1, 2 y 3 de la fosforilación y es para los cuales se han diseñado los inhibidores del transporte de electrones mencionados anteriormente, como la rotenona para el sitio 1, la antimicina para el sitio 2 y el cianuro para el sitio 3. La cadena respiratoria actúa entonces, como un sistema molecular liberador de energía en forma de pequeños paquetes, tres de los cuales tienen suficiente energía para la síntesis de una molécula de ATP.

Tanto la síntesis de ATP, como su hidrólisis para formar ADP y fosfato inorgánico liberando energía para ser usada en los diferentes trabajos metabólicos, son llevadas a cabo en el complejo de ATPasa.

La ATPasa mitocondrial es posiblemente el sistema enzimático más complejo que conoce el hombre. Este sistema, en su forma intacta, se encuentra ensamblado a la membrana interna de la mitocondria. Está formado por cuatro componentes funcionales (Fig. 4) (42): Una cabeza esférica llamada Factor de acoplamiento, Factor 1 o  $F_1$  que realiza la actividad de la ATPasa, un sector membranal que aparentemente dirige el flujo de protones a la  $F_1$  durante la fosforilación oxidativa, un péptido básico o "tallo" (OSCP) que mantiene unida a la  $F_1$  con el sector membranal y que le confiere sensibilidad a un inhibidor de la actividad de la  $F_1$  llamado oligomicina, y un péptido que inhibe la actividad de la ATPasa durante la fosforilación oxidativa.

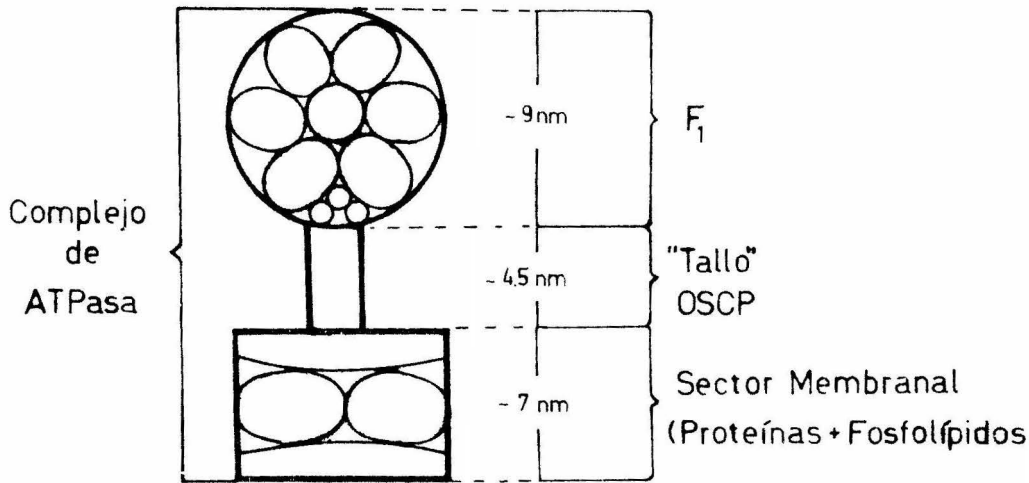
Fig. 4

(A) Morfología del complejo de ATPasa con sus tres componentes funcionales: la  $F_1$  con sus diferentes subunidades protéicas, el "tallo" o OSCP y el "sector membranal" con sus cuatro subunidades protéicas. La proteína inhibitoria de la ATPasa (no representada en la figura) puede ser parte de la  $F_1$  ó según Pedersen (33) una entidad separada.

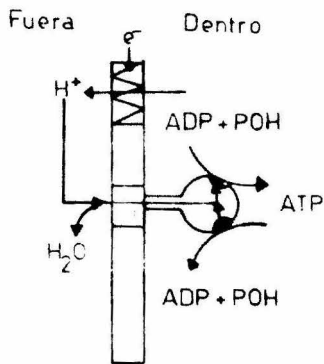
(Tomado de 42).

(B) Esquema que ilustra la forma en que el complejo de ATPasa participa en la síntesis e hidrólisis del ATP. En este esquema se puede apreciar que es posible que exista un sitio para la síntesis del ATP y otro para la hidrólisis, ó diferentes conformaciones del mismo sitio.

(Tomada de 33).



(A)



(B)

Fig 4

La  $F_1$  y el sector membranal pueden ser subdivididos en 5 y 4 polipéptidos diferentes respectivamente. El "tallo" representa el décimo polipéptido y en cuanto a la identidad del inhibidor de la ATPasa aún existe mucha controversia, según Pedersen (33) representa el décimo primer componente.

Existen tres diferentes hipótesis para tratar de explicar la formación de ATP en las mitocondrias: la hipótesis Química, la Químio-osmótica y la Conformacional. La hipótesis Química propuesta por Slater (30) postula la formación de intermediarios de alta energía en pasos previos a la síntesis de ATP durante la fosforilación oxidativa. Supone que cuando un par de electrones pasa de un transportador a otro, se genera un enlace de alta energía que se transmite a un nuevo componente, probablemente una proteína que no es un transportador de electrones. El enlace de alta energía así formado se convierte en el precursor del fosfato de alta energía en el ATP a través de una serie consecutiva de reacciones (Fig. 5A). Hasta la fecha este intermediario de alta energía no ha podido ser aislado.

La hipótesis Químio-osmótica desarrollada por Mitchell (28), propone la formación de moléculas de ATP sin intermediarios de alta energía como en el caso de la hipótesis Química. Sugiere que la membrana mitocondrial, es un elemento esencial en el mecanismo de la fosforilación oxidativa y que siendo anisotrópica e impermeable a los iones  $H^+$ , el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria genera un gradiente de iones  $H^+$  a través de esta membrana. Este gradiente se forma por la extracción de los iones  $H^+$  de la matriz mitocondrial hacia el medio externo (Fig. 5B). La energía libre que decae durante el transporte electrónico se conserva entonces

Fig. 5.

(A) Hipótesis Química del acoplamiento energético en la fosforilación oxidativa. A y B son dos acarreadores de electrones, I es un factor acoplante y E es la enzima que forma al ATP.

Cuando uno de los acarreadores en su estado reducido  $A_{red}$  se encuentra en uno de los sitios de acoplamiento de la cadena, es oxidado por el otro acarreador  $B_{ox}$ , formándose un compuesto de alta energía  $A_{ox} \sim I$ .  $A_{ox}$  es entonces desplazado por la enzima E para formar  $E \sim I$ . En el siguiente paso entra el fosfato inorgánico para formar una fosfoenzima  $P \sim E$ , que es el donador de fosfato al ADP para formar finalmente el ATP.

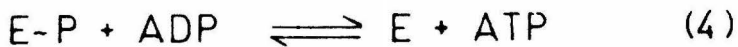
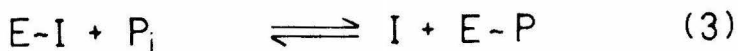
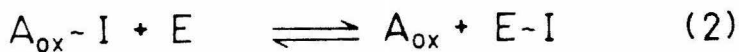
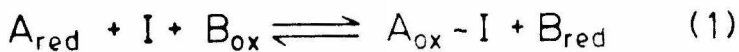
La actividad de ATPasa es la suma de las reacciones 3 y 4. La actividad de recambio  $P^{32}_2$  ATP es la reacción hacia la derecha suma de las 3 y 4. La reacción 4 es el recambio  $ADP \rightleftharpoons ATP$ .

(Tomado de 22).

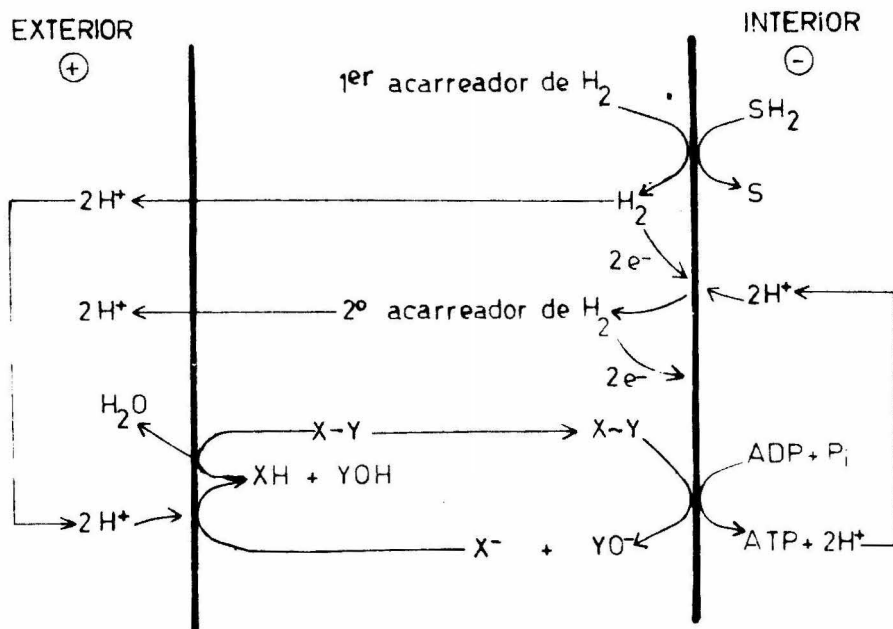
(B) Hipótesis Químio-osmótica del acoplamiento energético en la fosforilación oxidativa.

En el interior de la mitocondria un sustrato ( $SH_2$ ) dona sus hidrógenos al acarreador de  $H_2$  en la primera "asa". Este acarreador de hidrógeno deposita fuera de la membrana dos  $H^+$  y transfiere los electrones a un acarreador de electrones que los regresa al interior de la mitocondria para completar la primera "asa". Los protones que se encuentran en el lado externo de la membrana son tomados por el sistema acoplante (ATPasa reversible) que los incorpora al agua durante la formación de  $X \sim Y$ . Nuevamente se liberan protones en el interior de la mitocondria cuando se forma el ATP a partir de ADP y  $P_i$ . Estos protones junto con los electrones provenientes de la primera "asa" reducen al segundo acarreador de  $H_2$ .





(A)



(B)

Fig. 5

Este proceso cíclico se repite hasta que se hayan translocado seis protones por cada NADH oxidado y se hayan formado tres moléculas de ATP.

Durante la síntesis del ATP se forma X-Y por la deshidratación de  $XH + YOH$ , convirtiéndose en un intermediario de alta energía  $X \sim Y$  que se dirige hacia el interior de la mitocondria cediendo su energía para la síntesis de ATP.

(Tomado de 36).

en el gradiente de pH y potencial eléctrico formado a ambos lados de la membrana. Por cada par de electrones que recorre la cadena desde el NAD hasta el oxígeno, son extraídos de la matriz mitocondrial tres pares de iones  $H^+$ . El gradiente de  $H^+$  rico en energía da lugar a la formación de ATP en el sitio activo de la ATPasa a partir de ADP y fosfato inorgánicos removiendo agua en forma de iones  $H^+$  y  $OH^-$  (Fig. 5B).

Mitchell ha modificado su hipótesis sugiriendo que el gradiente de alta energía no es generado únicamente por los iones  $H^+$  sino que también puede ser producido por otros iones.

Por último, la hipótesis Conformacional sugiere que la energía del transporte de electrones es convertida directamente en un estado conformacional de la membrana interna rico en energía. Esta energía conformacional es la causante de la formación del ATP (1).

La existencia de tres hipótesis que tratan de explicar los mecanismos de conservación de energía durante el transporte de electrones ha creado una gran controversia.

Los mecanismos de la fosforilación oxidativa representan uno de los desafíos teóricos y experimentales más interesantes dentro de la bioquímica moderna.

### OBJETIVOS

La finalidad fundamental de este trabajo y de una serie de trabajos hechos en nuestro laboratorio, es demostrar si existe una interrelación molecular entre el sistema de transferencia de electrones y el sistema fosforilante, como lo propone Slater en la hipótesis Química (30) o si por el contrario, no existe ningún tipo de relación molecular entre los dos sistemas como ha sido propuesto por Mitchell en su hipótesis Quimio-osmótica (28).

Previos a este trabajo, se describieron efectos comunes de dos diferentes cationes, el  $K^+$  y la octilguanidina\* sobre la cadena respiratoria y el sistema de ATPasa. (9-16,24,25,32,34,35,38,45,46). El  $K^+$  activa a la ATPasa y a la respiración con sustratos del sitio 1, y en cambio la octilguanidina inhibe la actividad de ambos sistemas en las mismas condiciones. También se ha descrito la competencia existente entre estos dos cationes (16) siendo esto indicativo de un posible sitio de acción común para ambos.

Con estos antecedentes se planteó el problema de la siguiente manera: existen dos posibilidades para explicar los efectos de los cationes en la cadena respiratoria y la ATPasa, la primera, en la cual el sitio de acción de ambos cationes es único y común para la ATP sintetasa y la cadena respiratoria, inclinándonos esta alternativa hacia la hipótesis Química, y la segunda, en la que existieran dos sitios diferentes de acción para ambos cationes, uno en la cadena respiratoria y el otro en el sistema de ATPasa, impidiéndonos esta posibilidad optar por alguna de las hipótesis de fosforilación antes mencionadas.



\*  $CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-C-NH_2$

El primer paso a resolver era dilucidar en que sitio de la membrana mitocondrial interaccionan los cationes estudiados; para responder a esta pregunta se utilizaron dos tipos de metodologías diferentes: una, en la cual se emplearon mutantes de levadura que carecen de algunos componentes de la membrana y que resultaría en cierta forma en una extracción genética, y la otra, en la que se extrajo alguno de estos componentes por métodos enzimáticos. En ambos casos se estudiaron los efectos del  $K^+$  y la octilguanidina sobre tres diferentes parámetros de las funciones mitocondriales: la respiración, la ATPasa y la fijación de estos cationes a la membrana.

Ya que los componentes principales de la membrana mitocondrial son los fosfolípidos y las proteínas, teniendo ambos cargas negativas con las cuales los cationes podrían interaccionar; los fosfolípidos en los grupos fosfato y las proteínas en los carboxilos, se comenzó a tratar de resolver el problema hidrolizando enzimáticamente los fosfolípidos de la membrana, siendo estos datos los que se describen en el presente trabajo. Se partió de partículas sonicadas de hígado de rata las cuales carecen de enzimas de la matriz mitocondrial y de la membrana externa, y que conservan la integridad de la membrana interna pero con su polaridad invertida (20) teniendo tanto el sistema de transporte de electrones como el de ATPasa íntegros, y los posibles sitios de acción de los cationes accesibles y no modificados. Esta preparación tiene además la ventaja de minimizar los problemas de transporte que se presentan en las mitocondrias enteras. Estas partículas se trataron con fosfolipasa C de Clostridium perfringens que hidroliza preferentemente a la fosforil colina de la fosfatidil colina, dejando anclado a la membrana el diglicérido correspondiente (Fig. 6) (3,27). Después del tratamiento con fosfolipasa

Fig. 6.

La fosfolipasa C (c.p.) tiene la propiedad de hidrolizar a la fosfatidil colina o lecitina, liberando a la fosforil colina y el diglicérido correspondiente.



estas preparaciones se depletaban de aproximadamente un 50% del fósforo total y esto nos permitió estudiar las diferencias existentes entre el efecto de los cationes en el consumo de oxígeno, la ATPasa y la fijación de éstos a la membrana, y los efectos de los mismos cationes en partículas control.

Considerando que la fosfatidil colina o lecitina constituye el 44% de los fosfolípidos de la membrana interna de la mitocondria y que éstos a su vez son el 90% de los lípidos de dicha membrana (8), esperaríamos que al quitar por medio de la fosfolipasa C (c.p.) la fosforil colina que sería uno de los posibles sitios de anclaje de los cationes en los fosfolípidos (39,40) tendríamos una modificación en los efectos de los cationes sobre la respiración, la actividad de la ATPasa y sobre la fijación de éstos en la membrana, si es que realmente esos fosfolípidos fueran el sitio de acción de los cationes empleados, y si, por el contrario el sitio de acción de estos cationes no fueran dichos fosfolípidos, esperaríamos que no hubiera modificación en los parámetros estudiados.

Los resultados de este trabajo nos permiten sugerir que el sitio de acción de los cationes se encuentra localizado en una proteína de la membrana interna de la mitocondria.

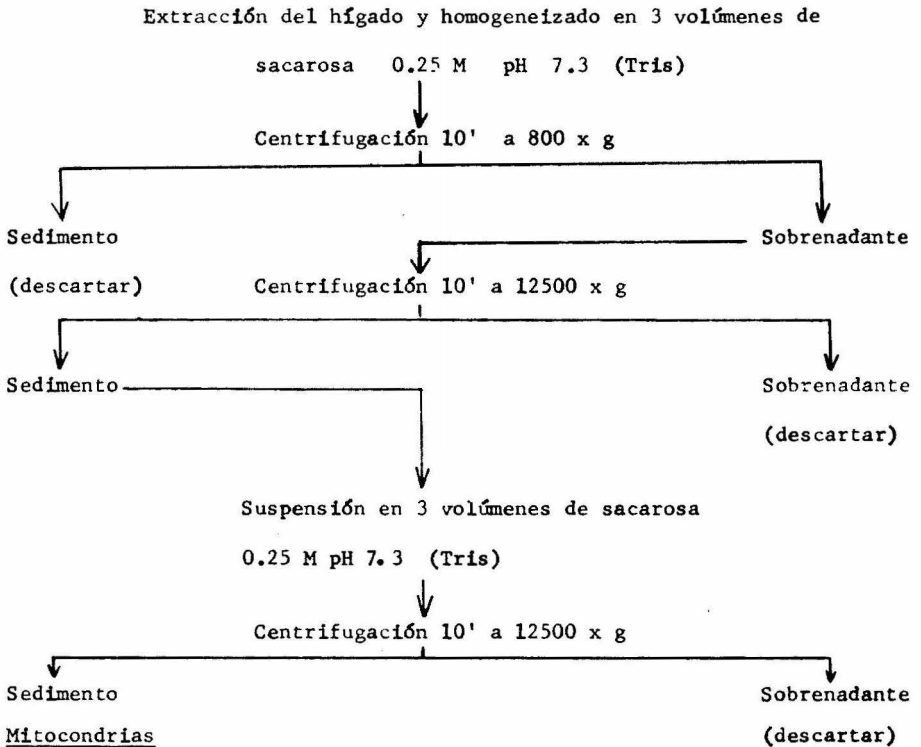


MATERIALES Y METODOS

Obtención de Mitocondrias

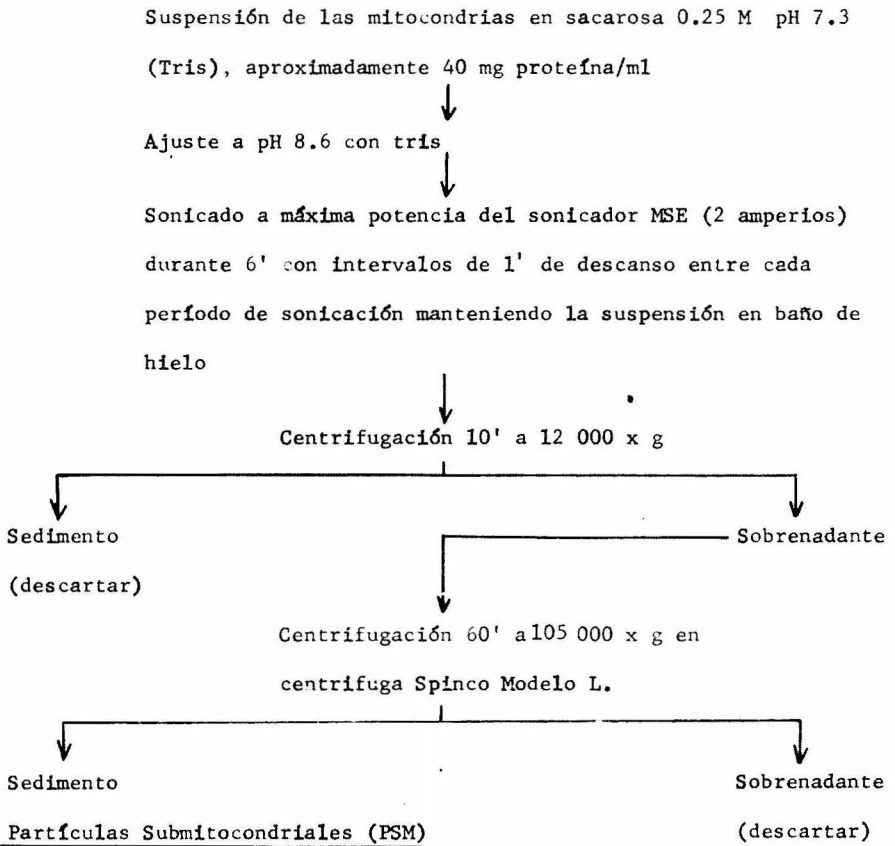
Las mitocondrias se obtuvieron de hígado de rata siguiendo el método descrito por Schneider y Hogeboom (41). Las centrifugaciones se llevaron a cabo en una centrífuga Sorvall modelo RC2-B refrigerada.

La metodología seguida se encuentra resumida en el siguiente cuadro sinóptico.



Preparación de PSM

Las partículas se prepararon a partir de las mitocondrias obtenidas siguiendo el método de Lee y Ernester (20). Esta metodología se describe en el siguiente cuadro:



Las PSM se resuspenden aproximadamente 80 mg prot./ml en sacarosa 0.25 M pH 7.3 (Tris).

### Consumo de oxígeno

Las mediciones del consumo de oxígeno se hicieron utilizando el método polarográfico con un electrodo de oxígeno (Yellow Springs Instrument Co. ), y graficando los cambios en concentración de oxígeno del medio respecto al tiempo en las diferentes condiciones especificadas en las respectivas figuras.

El registro del consumo de oxígeno se inició con la adición de NADH 1 mM para el caso del estudio del sitio 1 y succinato 3.3 mM para el sitio 2.

El KCl se adicionó a una concentración final de 33 mM cuando ya habia sido consumido aproximadamente el 30% del oxígeno del medio. Para evaluar los efectos de la fosfolipasa C en el consumo de oxígeno de los PSM, la enzima se adicionó a la cubeta del oxímetro; las concentraciones de ésta y los tiempos de incubación se encuentran indicados en los respectivos experimentos.

### ATPasa

La actividad de la ATPasa se determinó incubando 1 mg de proteína de PSM 10' a 30°C y con agitación en un aparato de Dubnoff, en las diferentes condiciones especificados en las figuras. La reacción se detuvo con TCA a una concentración final de 6%, y la actividad de la enzima se evaluó midiendo la concentración de fósforo inorgánico liberado del ATP según el método colorimétrico reportado por Sumner (44).

Para el tratamiento de las PSM con fosfolipasa C usadas en la

medición de ATPasa, éstas fueron previamente incubadas 60' a 30°C con y sin fosfolipasa C (c.p.) en un medio que contenía sacarosa 250 mM, tris 5 mM pH 7.3 (HCl) y 0.08 mg de fosfolipasa C por cada mg de proteína, en un volumen final de 1 ml por mg de proteína mitocondrial.

Ambas preparaciones, con y sin fosfolipasa, se recuperaron del medio de incubación centrifugando 60' a 105 000 x g.

#### Fijación de $^{45}\text{Ca}$ .

La fijación del  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  a la membrana de las PSM se llevó a cabo por la técnica de equilibrio de diálisis a través de una membrana de celofán, siguiendo el método descrito por Englund (7). En este método 20  $\mu\text{l}$  de una alícuota de una solución conteniendo las PSM a concentración de 0.5 mg/ml se adicionan a una de las cámaras de diálisis y 20  $\mu\text{l}$  de una solución de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  de concentración y actividad especificada en los experimentos respectivos en la otra cámara.

Después del equilibrio a través de la membrana el cual requiere agitación durante 120' a temperatura ambiente, se mide la distribución de la radioactividad a través de las dos cámaras en un contador de centelleo (Nuclear Chicago), y el cálculo de las nmolas fijadas a la proteína se efectuó haciendo la relación entre cuentas fijadas en la cámara con proteína menos cuentas fijadas en la cámara sin proteína sobre las cuentas totales.

#### Fósforo total

La medición del contenido total de fósforo se efectuó con las partículas tratadas así como con los controles, para determinar la cantidad

de fósforo total existente y comparar el contenido de fósforo en las partículas control con las tratadas con fosfolipasa C, y deducir la cantidad de fósforo liberado con el tratamiento con la fosfolipasa.

Esta medición se llevó a cabo digiriendo a la flama 0.025 ml de PSM con 0.5 ml de  $H_2SO_4$  7.5 N, seguido por la decoloración de la mezcla adicionando unas gotas de  $HNO_3$  2N y calentando en baño de ebullición durante 20'. El fósforo así liberado se determinó por el método de Sumner (44).

#### Extracción de lípidos

La extracción de los lípidos de las PSM se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Fleischer et al ( 8 ). A 1 ml de PSM en una concentración de proteínas de 50 mg/ml en sacarosa 0.25 M pH 7.3 (tris) se le agregan 24 ml de una solución que contiene 2.5 ml de  $H_2O$ , 25 ml de acetona y 3  $\mu$ l de hidróxido de amonio concentrado. Las PSM se recuperan del medio centrifugando a 105 000 x g durante 60' y se lavan con sacarosa 0.25 M pH 7.3 (tris) para volverlas a recuperar con una nueva centrifugación a 105 000 x g durante 60'

#### Estudio de Microscopía Electrónica

El estudio de microscopía electrónica fue efectuado por el Dr. Alfonso Cárabez. Las PSM se fijaron en Glutaraldehído al 3% +  $Ca^{++}$  por 2 horas, fueron postfijadas con tetraóxido de osmio, deshidratadas con acetona (50-100%) e infiltradas e incluidas por el procedimiento de inclusión en EPON\*descrito por Luft (26).

\* Marca Reg.

Las secciones se obtuvieron con navaja de diamante en el ultramicrotomo Reichardt, se tñieron con acetato de uranio y citrato de plomo, y fueron observadas en el microscopio Zeiss EM95 operado a 60 KV.

Las determinaciones de protefna fueron llevadas a cabo colorimétricamente siguiendo el método descrito por Lowry (19). Todos los reactivos utilizados fueron de máxima pureza.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Efecto del $K^+$ sobre el consumo de oxígeno.

Se probó el efecto de 33 mM de KCl sobre el consumo de oxígeno de PSM control y PSM preincubadas 5' con diferentes concentraciones de fosfolipasa especificadas en las figuras. La reacción se inició con la adición de NADH.

En la fig. 7 se observa que el efecto activador del  $K^+$  en la respiración se mantiene a pesar de un tratamiento bastante severo de las partículas con la fosfolipasa. Podemos ver que aún cuando se ha disminuído la capacidad respiratoria de las partículas por las altas concentraciones de la enzima usadas, el  $K^+$  mantiene su capacidad de activar a la respiración. Esto es mas notorio si observamos la fig. 8 en la que está graficando el mismo experimento en % de actividad para el control y para la relación del consumo de oxígeno en presencia de  $K^+$  sobre el control. Vemos que el % de activación por  $K^+$  permanece prácticamente inalterado mientras que el control decrece.

Estos resultados parecen indicar que el sitio sobre el cual el  $K^+$  ejerce su acción no ha sido afectado por nuestro tratamiento.

Es interesante hacer notar que a bajas concentraciones de fosfolipasa (1 $\mu$ g/mg de protefna) existe un ligero efecto activador en el consumo de oxígeno tanto en el control como en presencia del catión. Este efecto puede ser atribuído a una mayor permeabilidad del substrato o del KCl.

Fig. 7.

Efecto de la concentración de fosfolipasa C (c.p.) sobre el consumo de oxígeno en presencia y ausencia de  $K^+$  en PSM, expresado en  $NAO/min/mg$ . Las mediciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente (25 a 27°C) en una mezcla que contenía sacarosa 250 mM, tris 3.3 mM pH 7.3 (HCl), PSM 5 mg. en un volumen final de 3 ml. usando como sustrato NADH 1 mM. El KCl se adicionó a una concentración final de 33 mM cuando ya había sido consumido aproximadamente el 30% del oxígeno del medio.



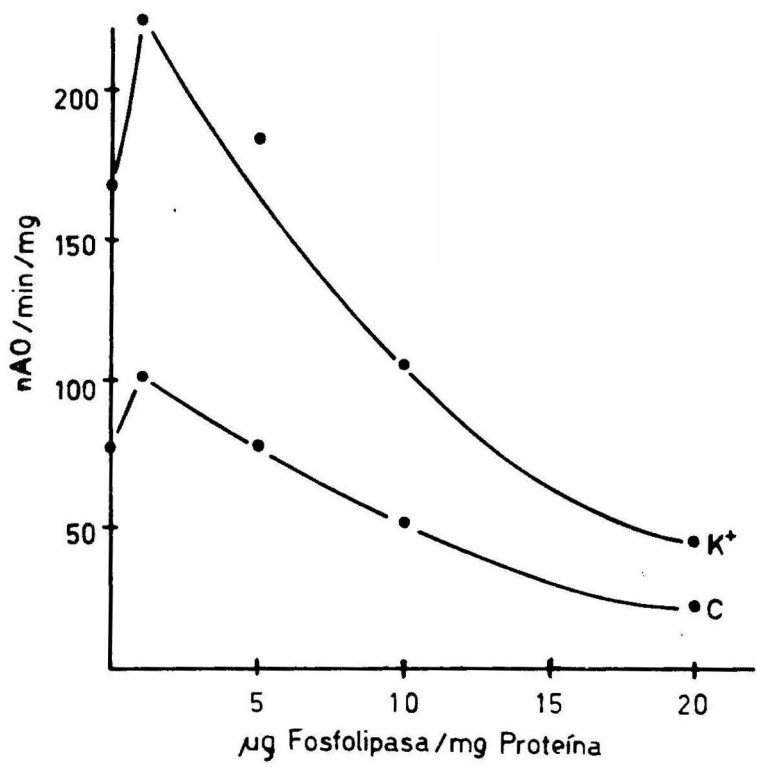


Fig.7

Fig. 8.

Experimento de la fig. 7 expresado en % de actividad del control y de la relación K/C.

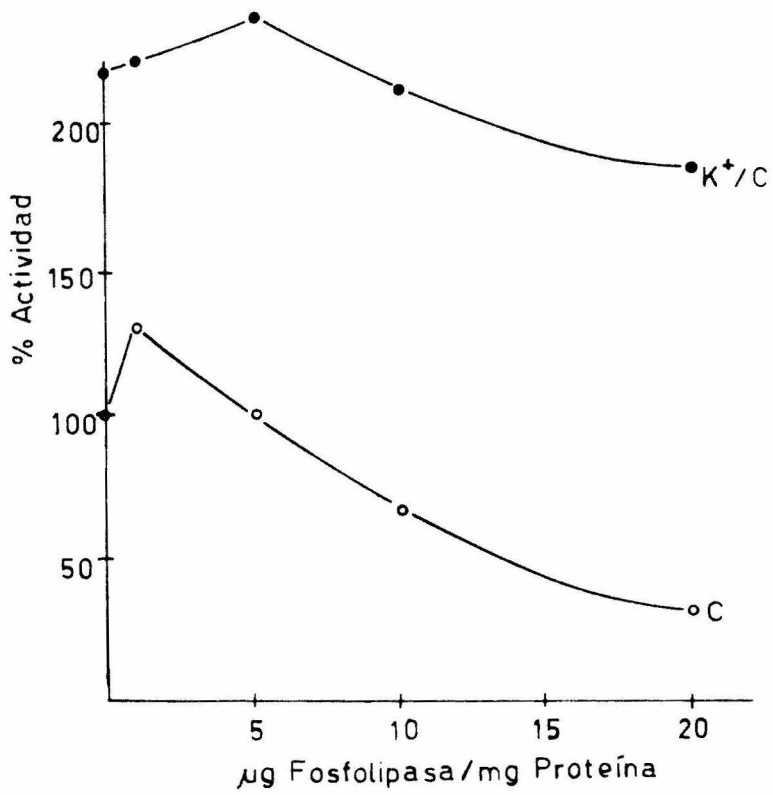


Fig 8

En la fig. 9 se estudió el efecto de diferentes tiempos de preincubación de PSM control y tratadas con 5  $\mu\text{g}$  de fosfolipasa C (c.p) por mg. de proteína. La reacción fué iniciada con la adición de NADH.

Nuevamente podemos observar que aún a preincubaciones tan largas como 60 min. en que el consumo de oxígeno de las partículas se inhibe casi totalmente, el efecto activador del  $\text{K}^+$  persiste. Esto lo podemos ver claramente en la fig. 10 en la que se encuentra graficado el % de activación de los datos de la Fig. 9. En esta figura notamos que no sólo no ha disminuído el efecto activador del  $\text{K}^+$ , sino que éste aumenta considerablemente conforme aumenta el tiempo de preincubación. Esto nos permite deducir que es posible que el tratamiento con la fosfolipasa no sólo no ha afectado los sitios de acción del  $\text{K}^+$  ya existentes, sino que se hace evidentes nuevos sitios de interacción del catión a los cuales puede ser atribuído este aumento.

En trabajos previos a éste, habíamos observado que el efecto de los cationes en la respiración sólo se observaba cuando se consumían substratos del sitio 1 como el NADH, por lo que se postuló que los cationes presentan especificidad de sitio en la cadena. Para constatar si este fenómeno no había variado con las partículas tratadas con fosfolipasa C, realizamos el experimento que se ilustra en la fig 11. En esta figura se muestra el efecto del tiempo de preincubación de las PSM con 10  $\mu\text{g}$  de fosfolipasa C (c.p.) por mg. de proteína sobre el consumo de oxígeno de partículas consumiendo un substrato del sitio 1, el NADH, comparativamente con el consumo de oxígeno de partículas consumiendo un substrato del sitio 2, el succinato; en ambos casos se estudió el efecto de la adición de 33 mM de KCl.

Fig. 9.

Efecto del tiempo de preincubación de las PSM con 5  $\mu$ g. de fosfolipasa C (c.p.) por mg. de proteína en el consumo de oxígeno en presencia y ausencia de 33 mM de KCl. La mezcla de reacción es la misma que la empleada en la Fig. 7.

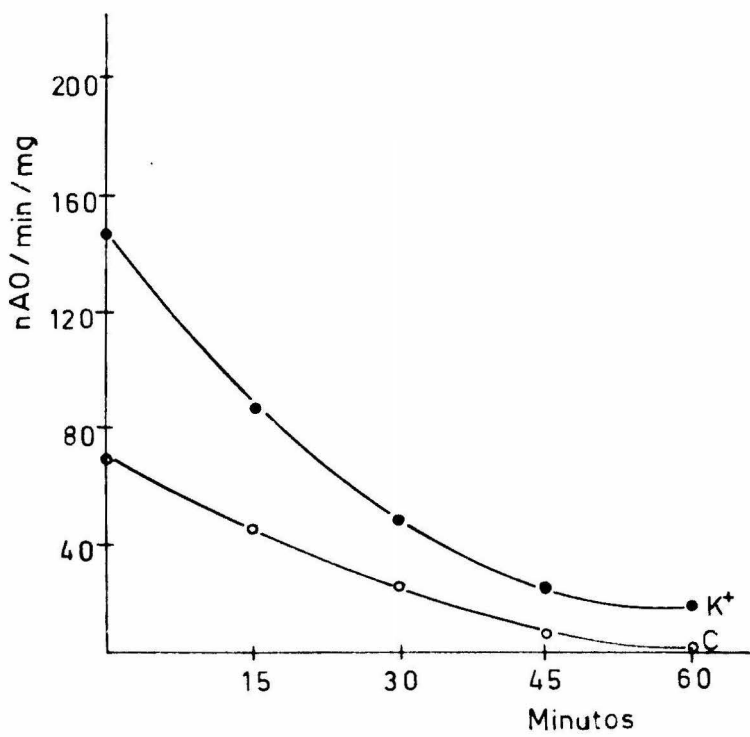


Fig.9

Fig. 10

Experimento de la fig. 9 expresado en % de actividad del control y de la relación K/C.

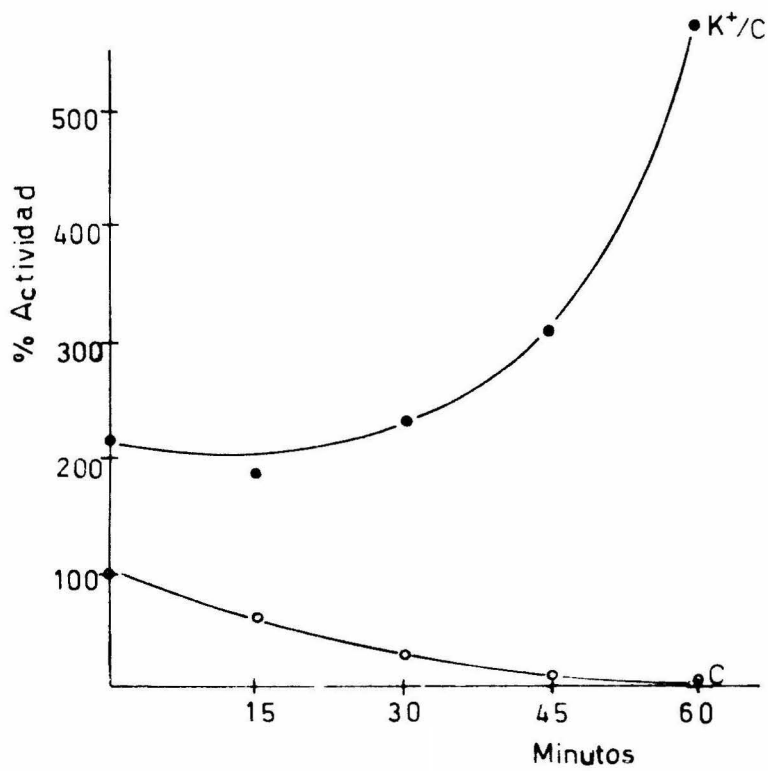


Fig.10



**Fig. 11**

**Efecto del tiempo de preincubación de las PSM con 10  $\mu$ g. de fosfolipasa C (c.p.) por mg. de proteína en el consumo de oxígeno en presencia y ausencia de 33 mM de KCl, con NADH 1 mM y succinato 3.3 mM pH 7.3 (Tris) como sustratos.**

**La mezcla de reacción es la misma que la que se empleó en la fig. 7.**

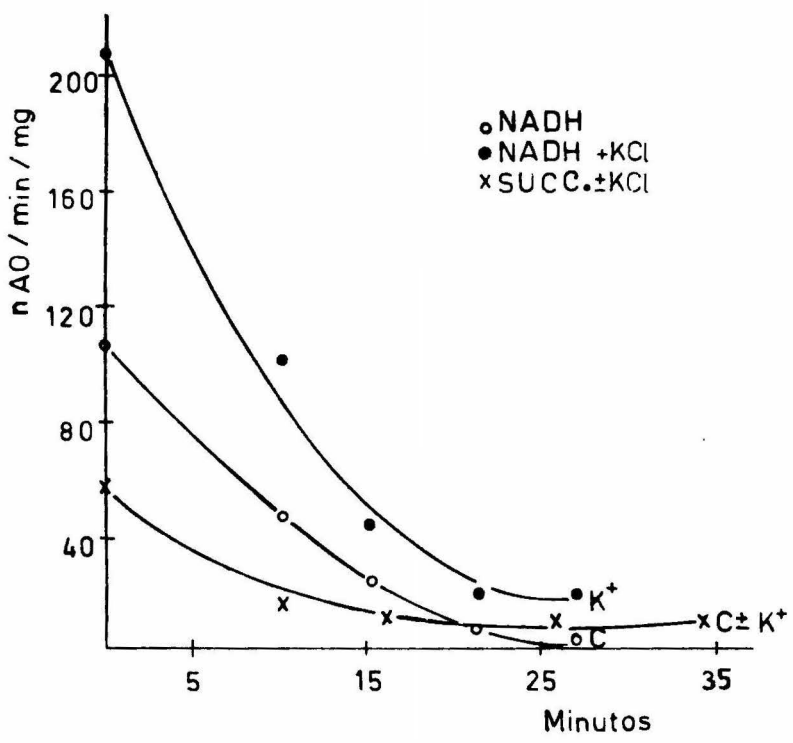


Fig. 11

En la fig. 11 se observa que en las partículas tratadas con fosfolipasa persiste el efecto activador del  $K^+$  con NADH y en cambio no hay efecto en el consumo de oxígeno con succinato. Es decir, el tratamiento con fosfolipasa no alteró la especificidad del catión para los sustratos del sitio 1.

#### Efecto de la octilguanidina sobre la actividad de la ATPasa.

Una de las proteínas más importantes de la membrana interna de la mitocondria es la ATPasa; en trabajos previos (16) se demostró que otro catión la octilguanidina produce un efecto inhibitor en la actividad de esta enzima en PSM.

Con este antecedente, estudiamos el efecto de la octilguanidina en la ATPasa estimulada por  $Mg^{2+}$  de PSM control y tratadas con fosfolipasa C (c.p.). El tratamiento con fosfolipasa se llevó a cabo como se describe en "Materiales y Métodos", y podemos observar en la tabla 2 que este tratamiento libera a las partículas de un 50% del fósforo total de los fosfolípidos de la membrana.

En la fig. 12 observamos el efecto de diferentes concentraciones de octilguanidina sobre la actividad de la ATPasa de PSM control y de PSM tratadas con fosfolipasa. Podemos notar en la figura que el efecto inhibitor de la octilguanidina existe para todas las concentraciones usadas, tanto en las partículas control como en las tratadas con la enzima.

Este resultado confirma las observaciones hechas en el consumo de oxígeno, en las cuales el posible sitio del catión en la membrana no

Tabla 2

Determinación del Fósforo Total en las PSM

	$\mu\text{m Pi total /mg protefna}$	desfosforilación
PSM - Fosfolipasa C (c.p.)	539.63	---
PSM + Fosfolipasa C (c.p.)	250.74	53.53

Las PSM fueron tratadas con el mismo procedimiento que se señala en la fig. 12.

Fig. 12.

Efecto de la concentración de octilguanidina en la actividad de la ATPasa en PSM incubadas con y sin 0.08 mg. de fosfolipasa C (c.p.) por mg. de proteína durante 60' a 30°C. La actividad se determinó en un medio que contenía sacarosa 250 mM, tris 10 mM pH 7.3 (HCl),  $MgCl_2$  4 mM, ATP 0.11 mM pH 7.3 (tris), PSM 1 mg. y las diferentes concentraciones de octilguanidina especificadas en la figura.

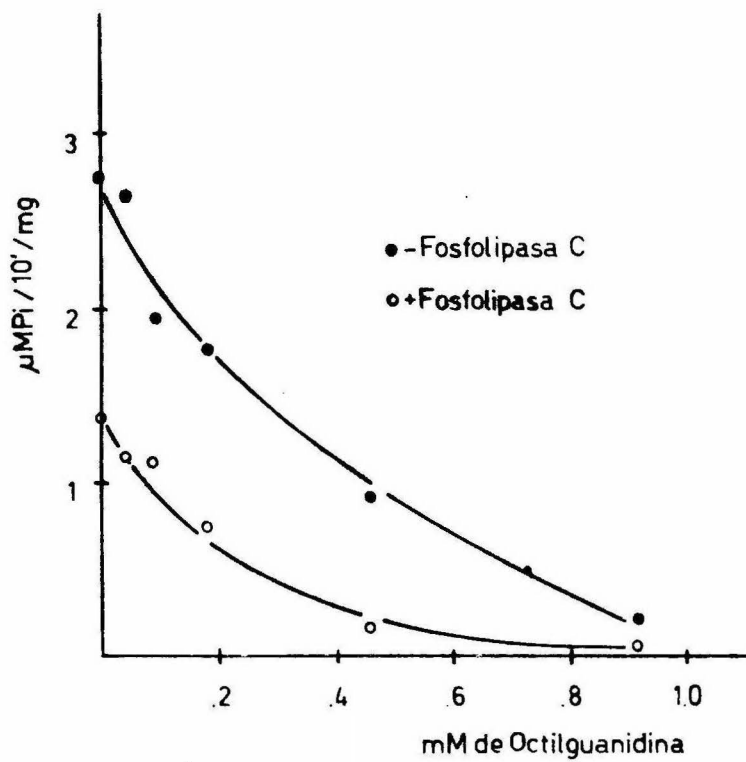


Fig.12

ha sido modificado por el tratamiento con la fosfolipasa . La fig. 13 ilustra el mismo experimento en % de inhibición en el que no se observa modificación en este parámetro para todas las concentraciones de octilguanidina empleadas.

Una característica de la inhibición por octilguanidina es que ésta es mayor a medida que el pH se hace mas alcalino; pensando que el tratamiento con fosfolipasa C (c.p.) pudiera modificar el pH óptimo de inhibición de la octilguanidina, se realizó el experimento de la fig. 14, en la que se midió la actividad de la ATPasa en presencia y ausencia de dos concentraciones octilguanidina 0.37  $\mu\text{M}$  y 0.926  $\mu\text{M}$  en PSM control y tratadas con fosfolipasa como en el experimento de la fig. 12. Los resultados parecen indicar que el patrón de pH de la inhibición por octilguanidina no se modifica con el tratamiento con fosfolipasa. La fig. 15 ilustra mas claramente este hecho expresando en % de inhibición el efecto de las diferentes concentraciones de octilguanidina.

#### Efecto de la fosfolipasa C (c.p.) y la delipidación en la fijación del <sup>45</sup>Ca

Podemos pensar que el efecto de los cationes se ejerce a través de una interacción directa de éstos con algún componente de la membrana, ya que es posible que sitios aniónicos de los lípidos o de las proteínas puedan ser lugares de fijación de los cationes y a través de ese mecanismo ejercer su efecto.

Para explorar esta posibilidad se midió la capacidad de fijación del <sup>45</sup>Ca en PSM control y tratadas con fosfolipasa C (c.p.).

Fig. 13.

Experimento de la fig. 12 expresado en % de inhibición.



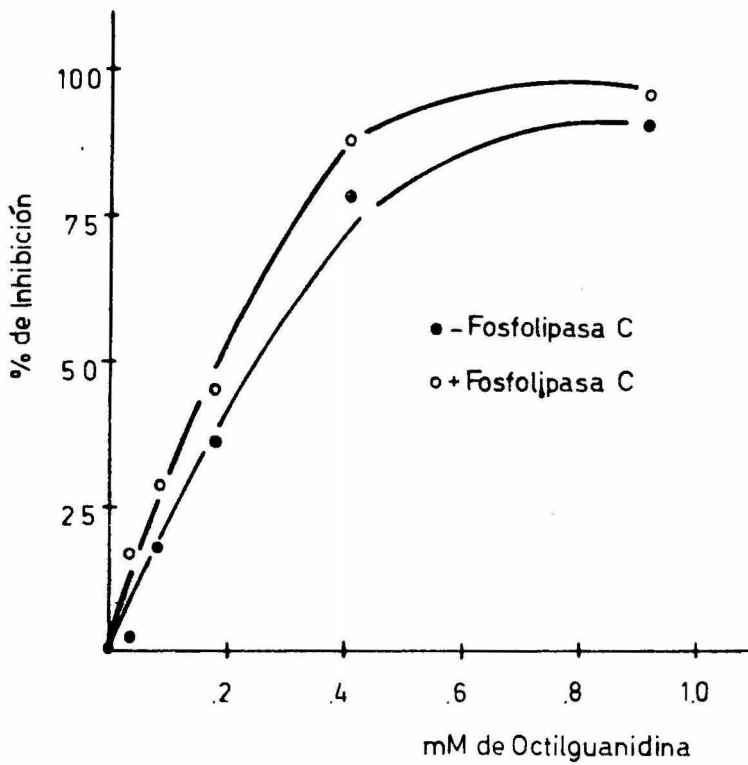


Fig. 13

Fig. 14.

Efecto de diferentes pHs en la actividad de ATPasa de PSM tratadas con y sin fosfolipasa C (c.p.) a dos concentraciones de octilguanidina. El medio de reacción es el mismo que el empleado en la fig. 12.

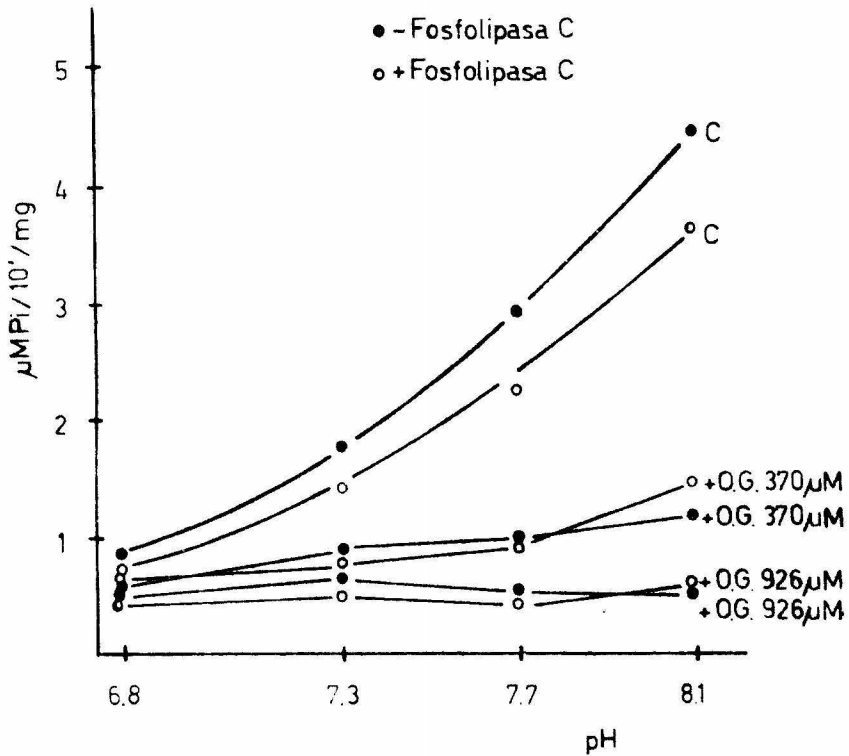


Fig. 14

Fig. 15.

Experimento de la fig. 14 expresado en % de inhibición.

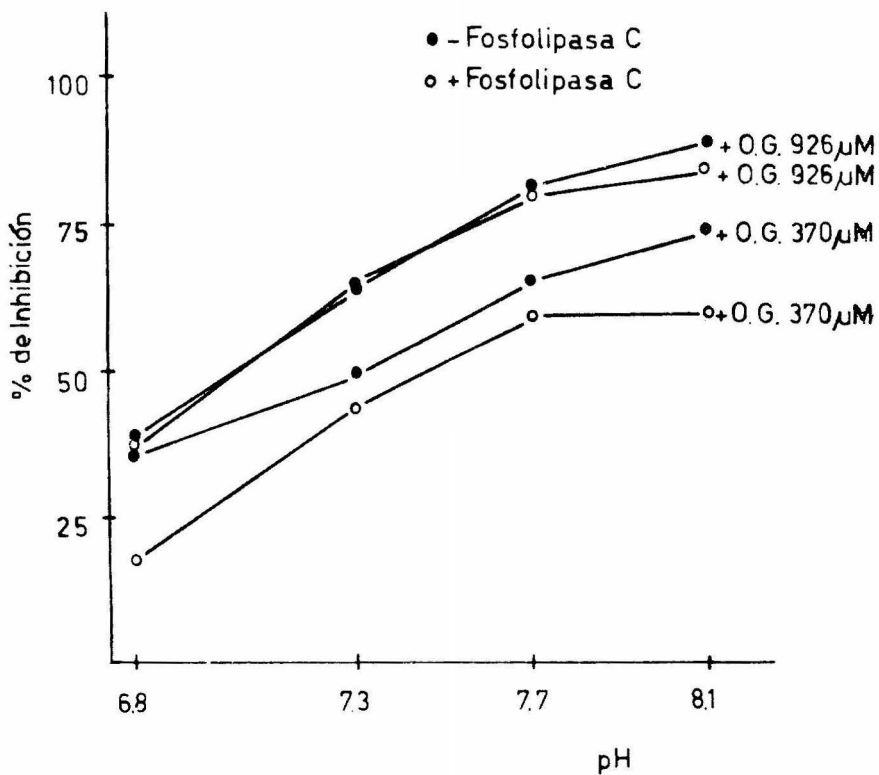


Fig. 15

En trabajos previos a éste observamos que la activación de la respiración con substratos del sitio 1 responde con mayor afinidad al  $K^+$  pero es también activada por otros cationes monovalentes como el  $Na^+$ , el  $Rb^+$  y el  $Cs^+$ , y divalentes como el  $Ca^{2+}$ . Debido a la facilidad de emplear el  $^{45}Ca$ , hicimos el experimento de la fig. 16 en el que se muestra la fijación del  $^{45}Ca$  en PSM normales, tratadas con fosfolipasa C(c.p.) en las mismas condiciones experimentales que las utilizadas para medir la ATPasa y en PSM depletadas de lípidos por extracción con acetona, agua y  $NH_4OH$ .

Como se puede observar, en un gran rango de concentraciones de  $Ca^{2+}$  la fijación de  $^{45}Ca$  en las partículas tratadas con fosfolipasa es considerablemente mayor que en las controles. La extracción drástica de los lípidos hace desaparecer la fijación del  $Ca^{2+}$  casi completamente y este dato es posible explicarlo aduciendo que en un alto porcentaje la fijación de los cationes se realiza en los lípidos, pero que el tratamiento drástico de extracción puede alterar también los sitios de fijación de las proteínas.

La observación de una mayor fijación en las partículas tratadas con fosfolipasa es congruente con los efectos de mayor activación en la respiración por el  $K^+$ . Estos datos nos permiten sugerir que el tratamiento con fosfolipasa abre nuevos sitios a los cationes que en los controles estaban posiblemente ocluidos.

Dado que las observaciones y conclusiones de este trabajo tienen como premisa fundamental la integridad de las estructuras membranales estudiadas, se procedió a observar las PSM control y las tratadas con fosfolipasa al microscopio electrónico. La fig. 17 muestra la morfología de ambas

Fig. 16.

Fijación de diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en PSM incubadas con y sin fosfolipasa C (c.p.) a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 30', así como en PSM delipidadas por el método de Fleischer (8) expresado en nmolas de  $\text{Ca}^{2+}$  fijadas por mg. de proteína. La fijación se llevó a cabo por equilibrio de diálisis como se especificó en "Materiales y Métodos".

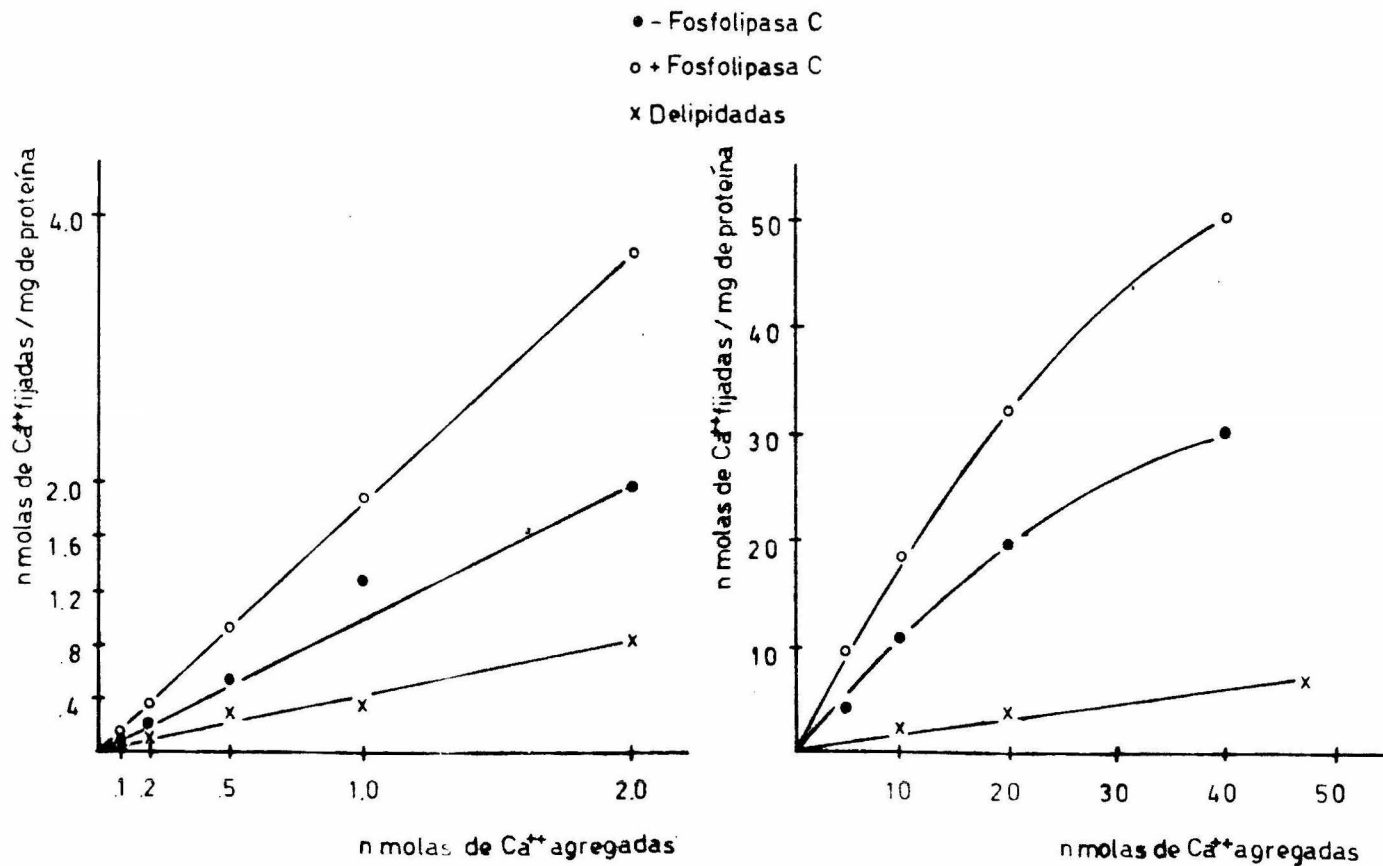


Fig.16



**Fig. 17.**

**Micrograffas electrónicas de: (A) PSM control y (B) PSM tratadas con fosfolipasa C (c.p.). x 112 000.**

preparaciones, observándose que no existe ninguna diferencia morfológica notable, lo cual aumenta el margen de seguridad de los datos observados.

## CONCLUSIONES

Teniendo presente que uno de los principales objetivos de este trabajo era tratar de demostrar en cual de los componentes de la membrana interna de la mitocondria, los fosfolípidos y las protefmas, actúan los cationes, y apoyados en los datos de estimulación de la respiración por  $K^+$  e inhibición de la actividad de la ATPasa por la octilguanidina en partículas tratadas con fosfolipasa C que han perdido un 50% del fósforo total por la hidrólisis de la fosfatidil colina, podemos concluir que el efecto de los cationes estudiados no ejerce su acción a través de interaccionar con los fosfolípidos. La observación de que la hidrólisis drástica de los fosfolípidos no disminuye sensiblemente la respuesta de los cationes; nos permite suponer que estos pueden ejercer su acción interactuando sobre los componentes protéicos de la membrana interna de la mitocondria.

No podemos sin embargo, tomando en cuenta únicamente los resultados descritos en el presente trabajo, descartar la posibilidad de que el sitio de los cationes se pueda encontrar en los fosfolípidos que no han sido hidrolizados con el tratamiento a que han sido sometidas las partículas. Nosotros nos inclinamos a pensar que el sitio no se encuentra en esos fosfolípidos remanentes, ya que si este fuera el caso, al hidrolizar la fosfatidil colina no deberíamos observar ninguna alteración en la respuesta a los cationes, y en cambio observamos un aumento en estos efectos tanto en la respiración como en la fijación de los cationes a la membrana, resultados que parecen indicar que han sido descubiertos sitios de acción para los

cationes que antes del tratamiento estuvieron ocultos por los fosfolípidos y que después de haber hidrolizado éstos en un gran porcentaje, los posibles sitios son ahora accesibles a los cationes. Por lo tanto, creemos que el sitio de acción debe de encontrarse en alguno de los componentes proteícos de la membrana interna.

Experimentos posteriores a este trabajo sobre la misma línea apoyan las conclusiones que mencionamos antes, siendo los mas importantes de éstos la observación de los efectos tanto del  $K^+$  como de la octilguanidina sobre la actividad de la ATPasa aislada y purificada, y la observación de que en PSM tratadas con la enzima proteolítica "Nagarse" que tiene la propiedad de liberar a la ATPasa dejando intacta a la cadena respiratoria, no existe efecto activador del  $K^+$  en el consumo de oxígeno.

Los efectos del  $K^+$  y la octilguanidina sobre la ATPasa aislada nos permiten concluir que existe un sitio para el  $K^+$  y para la octilguanidina en el sistema de ATPasa. Los experimentos con "Nagarse" nos indican que aparentemente no existe sitio de acción del  $K^+$  en la cadena respiratoria ya que habiendo liberado a la ATPasa de las partículas no se encuentra ninguna activación de la respiración por este catión.

Concluyendo, creemos que los datos importantes en nuestra búsqueda del sitio de acción de los cationes son:

1o) En PSM desfosforiladas un 50% sigue existiendo efecto de cationes tanto en la respiración como en la actividad de la ATPasa y éstos se siguen fijando a la membrana encontrándose aumento en la cantidad de cationes que se fijan.

2o) En la ATPasa aislada y purificada se observan los mismos efectos de los cationes que los observados en las partículas normales.

3o) En PSM sin ATPasa no se encuentra actividad del  $K^+$  en la respiración.

Estos datos nos permiten postular que el sitio de acción de los cationes debe de ser una protefina perteneciente al sistema de ATPasa y mas específicamente en la  $F_1$ .

Que el sitio de acción de los cationes se encuentre en el sistema de ATPasa, aunado a la observación de la existencia de efectos de cationes sobre el consumo de oxígeno, nos induce a pensar que pueda existir algún tipo de relación o conexión molecular entre el sistema fosforilante y la cadena respiratoria, puesto que al actuar sobre uno de estos dos sistemas como en el caso de la  $F_1$ , vemos claramente efectos en el consumo de oxígeno. En otras palabras actuando los cationes sobre la  $F_1$  transmiten de alguna forma su efecto a la cadena respiratoria.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Boyer, P. C. en King, T.E., Mason, N. S. & Morrison, M. (Editores), Oxidases and Related Redox Systems, Vol. 2 (1965) pag. 994.
- 2 Bruni, A., Contessa, A. R. & Palatini, P. en Porcellati, G. & di Jeso, F. (Editores), Membrane Bound Enzymes (1971) pag. 195.
- 3 Burstein, C., Kandrach, A. & Racker, E., J. Biol. Chem. 246 (1971) 4083.
- 4 Danielli, J. F. & Davson, A. J., Cell Comp. Physiol. 5 (1935) 495.
- 5 Davidoff Franck, J. Biol. Chem. 246 (1971) 4017.
- 6 Davidoff Franck, J. Biol. Chem. 249 (1974) 6406.
- 7 Englund, P. Huberman, J. A., Jovin, T. M. & Kornberg, A., J. Biol. Chem. 244 (1969) 3038.
- 8 Fleischer, S., Fleischer, B. & Stoeckenius, W. J., J. of Cell Biol. 32 (1967) 193.
- 9 Gómez-Puyou, A., Sandoval, F., Peña, A., Chávez, E. & Tuena, M., J. Biol. Chem. 244 (1969) 5339.
- 10 Gómez-Puyou, A., Sandoval, F., Peña, A., Chávez, E. & Tuena, M., Biochem. Biophys. Res. Commun. 36 (1969) 316.
- 11 Gómez-Puyou, A., Sandoval, F., Chávez, E. & Tuena, M., J. Biol. Chem. 245 (1970) 5239.
- 12 Gómez-Puyou, A., Sandoval, F., Tuena, de Gómez Puyou, M., Peña, A. & Chávez, E., Biochemistry 11 (1972) 97.
- 13 Gómez-Puyou, A., Sandoval, F., Chávez, E., Freitas, D. & Tuena de Gómez Puyou, M., Arch. Biochem. Biophys. 153 (1972) 215.
- 14 Gómez-Puyou, A., Sandoval, F., Tuena de Gómez-Puyou, M. & Pinto, E., Bioenergetics 3 (1972) 221.

15. Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., Becker, G. & Lehninger, L. A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47 (1972) 814.
16. Gómez-Puyou, A., & Tuena de Gómez-Puyou, M., en Estrada, S. O. & Gitler C. (Editores), *Perspectives in Membrane Biology* (1974) pag. 303.
17. Green David, en *Scientific American. La Célula Viva* (1970) pag. 105.
18. Lardy, A. M. & Welner, W., *Arch. Biochem. Biophys.* 162 (1974) 568.
19. Lawry, O. H. Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, A. J., *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265.
20. Lee, C. P., Azzone, G. F. & Ernester, L., *Nature (London)* 201 (1964) 152.
21. Lehninger, A. L., en *Scientific American. La Célula Viva.* (1970) pag. 137.
22. Lehninger, A. L., *Biochemistry*, Worth Publishers, Inc., New York (1970).
23. Lehninger, A. L. *Bioenergetics*. 2<sup>nd</sup> Ed. W. A. Benjamin, Inc., Menlo Park, California (1971).
24. Lotina, B., Gómez-Puyou, A, Tuena de Gómez-Puyou, M. & Chávez, E., *Arch. Biochem. Biophys.* 159 (1973) 517.
25. Lotina, B., Tuena de Gómez-Puyou, M. & Gómez-Puyou A., *Arch. Biochem. Biophys.* 159 (1973) 520.
26. Luft, J. H., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9 (1961) 409.
27. Luzikov, U. N., Kupriyanov, V. V. & Makhils, T. A., *Bioenergetics* 4 (1973) 521.
28. Mitchell Peter, en Tager G. M., Papa, S., Quagliariello, E. & Slater, E. C. (Editores), *Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria* Vol. 7 (1966) pag. 65.

29. Mitchell Peter, FEBS Letters 43 (1974) 189.
30. Myers, D. K. & Slater, E. C., Biochem. J. 67 (1957) 558.
31. Ohnishi Tomoko, Biochem. Biophys. Acta. 301 (1973) 105.
32. Papa, S., Tuena de Gómez-Puyou, M & Gómez-Puyou, A., Eur. J. Biochem.,  
En prensa.
33. Pedersen L. Peter,, J. in Bioenergetics, En prensa.
34. Peña, Díaz A., Campillo-Serrano, C., Tuena M. & Gómez-Puyou, A., Arch.  
Biochem. Biophys. 106 (1964) 461.
35. Pinto, E., Gómez-Puyou, A., Sandoval, F., Chávez, E. & Tuena, M.,  
Biochem. Biophys. Acta. 223 (1970) 436.
36. Racker, E. (Editor), Membranes of Mitochondria and Chloroplasts.  
ACS Monograph 165 (1970) pag. 127.
37. Racker, E., en Scientific American. La Célula Viva. (1970) pag. 150.
38. Sandoval, F., Gómez-Puyou, A., Tuena, M., Chávez, E. & Peña, A.,  
Biochemistry 9 (1970) 684.
39. Schafer Gunter, Eur. J. Biochem. 45 (1974) 57.
40. Schafer,G. & Ekkehard, R., Eur. J. Biochem. 46 (1974) 613.
41. Schneider, W. C. & Hogeboom, G. H. J. Biol. Chem. 183 (1950) 123.
42. Senior, A. E., Biochem. Biophys. Acta 301 (1973) 249.
43. Singer, S. J. & Nicholson, L. G., Science 175 (1972) 722.
44. Sumner, J. B., Science 100 (1944) 43.
45. Tuena de Gómez-Puyou, M., González, S. & Gómez-Puyou, A., Fed. Proc.  
33 (1974) 158.
46. Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. & Beigel, M., Arch. Biochem.  
Biophys. A publicación.
47. William, E. J. & Brierley, P. G., J. Biol. Chem. 244 (1969) 4995.