



63
29.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CONTROL DE LA FOSFORILACION OXIDATIVA
EN MITOCONDRIAS DE CEREBRO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
CECILIA GARCIA PEREZ



MEXICO, D. F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La presente tesis se realizó en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" bajo la dirección del Dr. Rafael Moreno Sánchez

Miembros del Jurado

Dr. Edmundo Chávez Cossío
M.en C. Silvia Devars Ramos
Dra. Georgina Garza-Ramos
Dr. Edgardo Escamilla Marván
Dr. Rafael Moreno Sánchez

A mis padres, mis ídolos.

Un agradecimiento al Dr. Edmundo Chávez y el Dr. Rafael Moreno por todo lo que me han enseñado.

CONTROL DE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA EN
MITOCONDRIAS DE CEREBRO

INDICE

INTRODUCCION

Ciclo de los ácidos tricarboxílicos.....	1
Piruvato Deshidrogenasa.....	3
α -cetoglutarato Deshidrogenasa.....	5
Respiración Mitocondrial y Síntesis de ATP.....	7
Teoría del Control Metabólico.....	13
Estado estacionario.....	13
Coeficiente de Control de Flujo.....	16

ANTECEDENTES

Control de la Fosforilación Oxidativa.....	21
El Papel del Calcio en la Fosforilación Oxidativa.....	24
Metabolismo en Cerebro.....	27

OBJETIVOS.....	31
----------------	----

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento de Mitocondrias de cerebro.....	32
Proteína mitocondrial.....	33
Control Respiratorio.....	33
Potencial Transmembranal.....	35
Actividad de la α -cetoglutarato deshidrogenasa.....	38
Síntesis de ATP.....	39
Obtención de C_i por el método lineal.....	40
Obtención de C_o por el método no lineal.....	42

RESULTADOS

Concentración de calcio.....	43
Curvas de Titulación.....	45
Efecto del calcio sobre la deshidrogenasa.....	60
Efecto del calcio, concentración saturante y tipo de sustrato.....	60
Potencial Transmembranal.....	62

Síntesis de ATP.....	66
Parámetros para cada enzima:	
Acarreador ATP/ADP.....	68
Acarreador de fosfatos.....	70
ATP sintetasa.....	70
Sitio 1 de la Cadena Respiratoria.....	73
Sitio 2 de la Cadena Respiratoria.....	73
Concentración de cada enzima.....	76
DISCUSIÓN.....	79
CONCLUSIONES.....	95
PERSPECTIVAS.....	96
BIBLIOGRAFIA.....	97

Los seres vivos necesitan energía para realizar sus funciones. En los heterótrofos, esta energía es obtenida a partir de los alimentos que consumen y que están formados por carbohidratos, lípidos y proteínas. Una vez ingeridas, las macromoléculas son desdobladas a sus unidades constitutivas: glucosa, ácidos grasos y aminoácidos respectivamente. De esta forma, según las necesidades del organismo o tejido, son procesadas.

CICLO DE KREBS

El ciclo de los ácidos tricarbóxicos o ciclo de Krebs (Fig.1) es la vía final común para la oxidación de las moléculas combustibles. La mayoría de los compuestos oxidables entran al ciclo en forma de Acetil-CoA. La descarboxilación oxidativa del piruvato hasta Acetil-CoA está catalizada por el complejo piruvato deshidrogenasa (Fig.2), un conjunto organizado de cinco tipos de enzimas. La reacción neta catalizada por este complejo es $\text{Piruvato} + \text{CoA} + \text{NAD} \rightarrow \text{Acetil-CoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH}$. Las cadenas polipeptídicas constituyentes del complejo se mantienen juntas por fuerzas no covalentes. A pH alcalino, el complejo se disocia en el componente piruvato deshidrogenasa y un subcomplejo de las otras dos enzimas. El ciclo de Krebs también suministra intermediarios para la biosíntesis. En las cuatro óxido-reducciones se transfieren tres pares de electrones al NAD y un

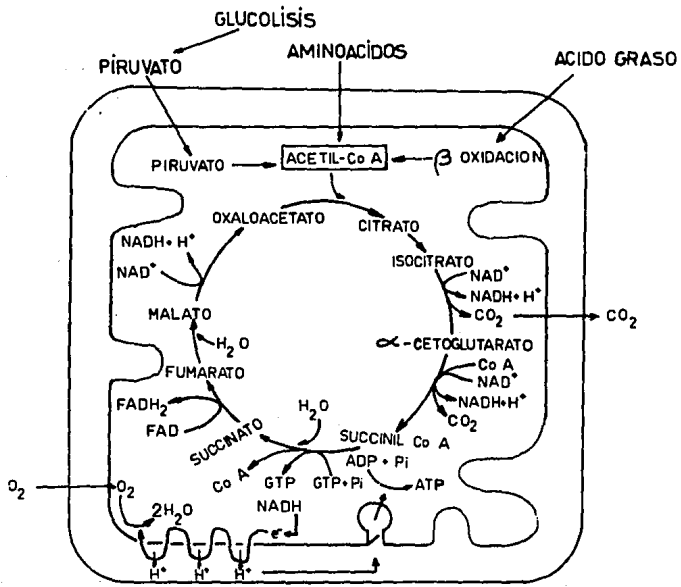


Fig. 1 Ciclo de los ácidos tricarbóxicos o Ciclo de Krebs

par al FAD. Estos transportadores de electrones reducidos se oxidan a continuación por la cadena de transporte de electrones para generar ATP.

PIRUVATO DESHIDROGENASA

La piruvato deshidrogenasa (Fig.2) es un complejo formado por cinco enzimas: componente piruvato deshidrogenasa, E1; dihidriopoil transacetilasa, E2; dihidrolipoil deshidrogenasa, E3, piruvato deshidrogenasa cinasa y piruvato deshidrogenasa fosfatasa. La tiamina pirofosfato (TPP), la lipoamida y el FAD sirven como cofactores catalíticos, además del CoA y el NAD⁺, los cofactores estequiométricos[1].

La principal función reguladora es ejercida por la cinasa, que al catalizar la fosforilación de la piruvato deshidrogenasa por hidrólisis del ATP la convierte en su forma inactiva. La actividad de la cinasa es, a su vez, controlada por iones metálicos, cofactores y metabolitos; de entre ellos cabe destacar el papel estimulador que ejercen el acetil-CoA y el NADH y el papel inhibitor del piruvato y el ADP. La inhibición producida por el ADP es competitiva respecto al ATP. El pirofosfato de tiamina también inhibe a la cinasa. La fosfatasa es inhibida por exceso de NADH y esta inhibición es revertida por el NAD⁺. El Ca²⁺ también estimula a la fosfatasa, convirtiendo a la piruvato deshidrogenasa en su forma activa desfosforilada[2].

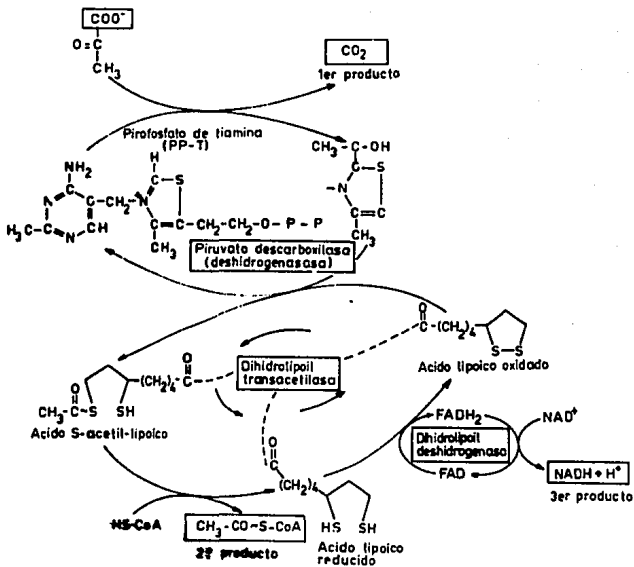


Fig. 2 Piruvato Deshidrogenasa

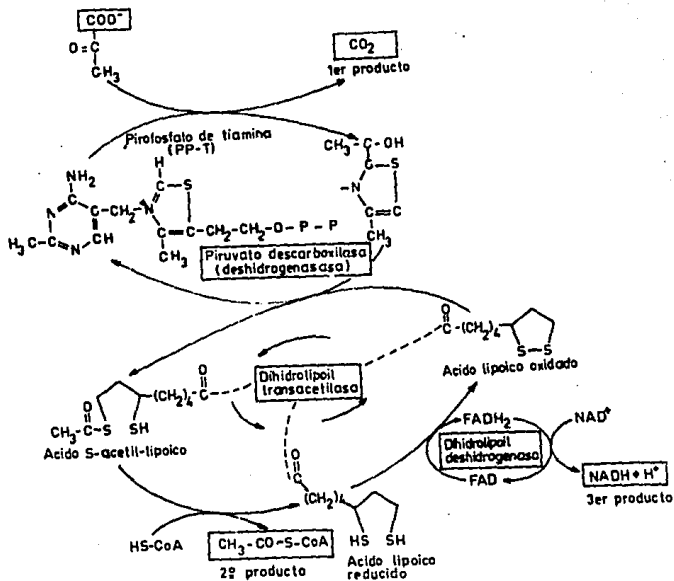


Fig. 2 Potencial Transmembral. Se incubaron las mitocondrias (1mg/ml) en 2.5ml del medio AB con $10\mu\text{M}$ de safranina. A: Malato 2mM + (1)pirúvico 0.5mM , (2) pirúvico 0.5mM + 363nM Ca^{2+} y (3) pirúvico 5mM . B: Malato 5mM + (1)glutámico 1mM , (2) glutámico 1mM + 363nM Ca^{2+} y (3) glutámico 10mM . Se utilizó una concentración de ADP de $640\mu\text{M}$. Las señales fueron calibradas con $2\mu\text{M}$ de CCCP y $1\mu\text{M}$ de rotenona.

α -CETOGLUTARATO DESHIDROGENASA

Otra de las enzimas que intervienen en el ciclo de Krebs es la α -cetoglutarato deshidrogenasa. Esta enzima también es un agregado multienzimático cuya acción es análoga a la piruvato deshidrogenasa, utilizando los mismos cofactores: pirofosfato de tiamina, ácido lipoico, NAD⁺, FAD y Coenzima-A. El incremento en la concentración de Ca²⁺ de la matriz mitocondrial disminuye la Km de esta enzima para el α -cetoglutarato[2,3].

El equilibrio de la reacción que cataliza la α -cetoglutarato deshidrogenasa está desplazado hacia la formación de succinil-CoA. Su sustrato es el α -cetoglutarato, que puede provenir del ácido glutámico: el glutamato, por la razón de su síntesis y por el lugar fundamental que ocupa en la transaminación, desempeña una función central en el metabolismo de los aminoácidos. Es un intermediario importante en el metabolismo cerebral, ya que, a sus funciones como neurotransmisor, se añade su implicación en el llamado Ciclo de GABA. Este aminoácido además participa en una de las lanzaderas más importantes a nivel mitocondrial, como es la lanzadera del malato-aspartato (Fig.3).

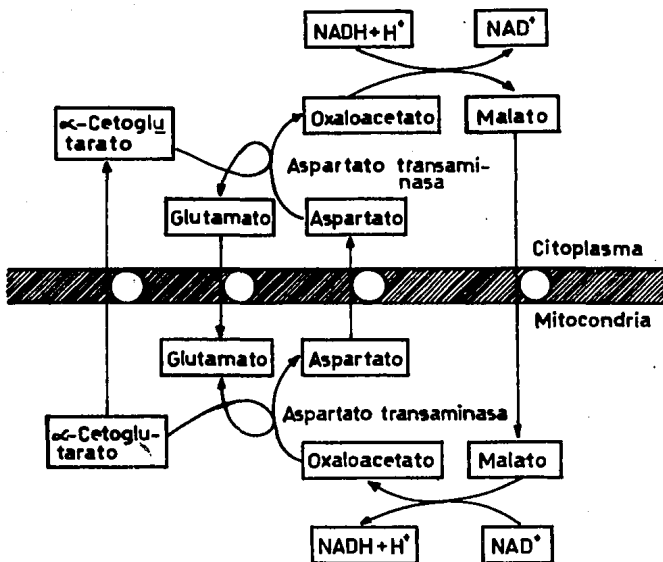


Fig. 3 Lanzadera Malato-Aspartato. Una de las funciones del aspartato es la de servir como precursor para el suministro y transporte de oxaloacetato, en colaboración con el malato, ya que el oxaloacetato es poco estable y las enzimas que lo utilizan activan su rápida desaparición, puesto que está favorecida la formación de malato sobre la de oxaloacetato.

RESPIRACION MITOCONDRIAL Y SINTESIS DE ATP

La respiración consiste en la oxidación del NADH mitocondrial por el oxígeno, acompañada por el bombeo de protones hacia afuera de la membrana interna mitocondrial, generando un gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu_{H^+}$) consistente en un potencial membranal ($\Delta\psi$) y un gradiente de pH (ΔpH); según la teoría de Mitchell [4]: $\Delta\mu_{H^+} = \Delta\psi - 2.3(RT/f)\Delta pH$; donde $\Delta\mu_{H^+}$ es el gradiente electroquímico de protones, f es la constante de Faraday; en el caso de protones a 25°C,

$\ln(C_2/C_1) = 2.3 (\log [H^+]_{ext} - \log [H^+]_{int}) = 2.3 (pH_{int} - pH_{ext}) = 2.3\Delta pH$, y C_2-C_1 es la razón de concentraciones del ion que se traslada.

Estos protones regresan por su gradiente ya sea vía una difusión pasiva a través de la membrana interna mitocondrial, o a través de intercambio con iones mono (Na^+ , K^+) o divalentes (Ca^{2+}) o vía una ATP sintetasa. La ATP sintetasa acopla el gradiente de protones a la síntesis de ATP dentro de la matriz mitocondrial[4]. El fosfato para la fosforilación es transportado hacia la mitocondria a través del acarreador de fosfatos y el ATP es exportado al citosol en intercambio con el ADP por el acarreador de adenín nucleótidos.

El ATP es utilizado por un gran número de enzimas, rutas metabólicas y funciones celulares, como son: la ATPasa de la

actinomioquina, la Na^+/K^+ -ATPasa; biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos; y secreción, fagocitosis y duplicación celular[5]. El metabolismo celular consiste en un gran número de rutas unidas por intermediarios, cuya función principal es la de liberar y distribuir energía.

La fosforilación oxidativa es el proceso acoplado de la respiración mitocondrial con la síntesis de ATP (Fig.4)

Los sistemas que componen a la fosforilación oxidativa son el oxidante y el fosforilante. El sistema oxidante incluye a los transportadores de sustratos, las deshidrogenasas del ciclo de Krebs y a la cadena transportadora de electrones o cadena respiratoria.

TRANSPORTE DE SUBSTRATOS

Existe un acarreador electroforético para el calcio sensible a rojo de rutenio, magnesio y lantánidos [6,7]. Este acarreador es un uniportador. El transportador de piruvato, transporta conjuntamente piruvato y un protón; este transportador es sensible a fenilsuccinato y cianocinnamato. El malato pasa a través de la membrana interna a la matriz vía el sistema de transporte de malato- α -cetoglutarato o en intercambio con fosfato. El acarreador de α -cetoglutarato transporta α -cetoglutarato, malato, malonato, oxaloacetato y succinato; es sensible a phtalonato, fenilsuccinato y butilmalonato[7a]. El glutámico puede transportarse junto con un protón; este

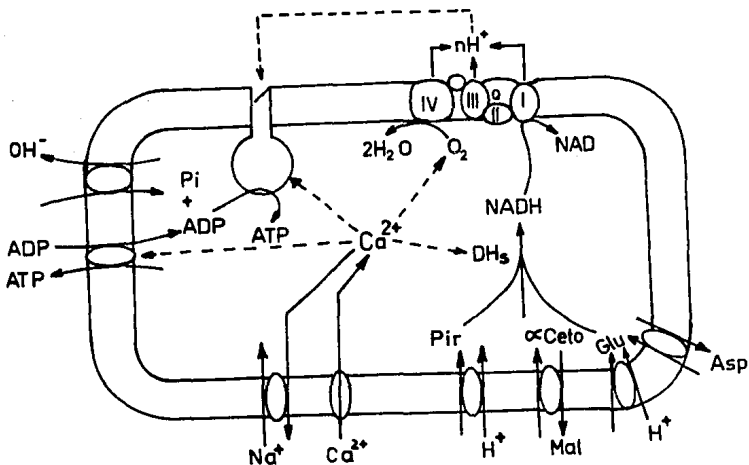


Fig. 4 Fosforilación Oxidativa. Formada por los componentes oxidante y fosforilante, la fosforilación oxidativa acopla el gradiente electroquímico de protones bombeados por la cadena respiratoria con la síntesis de ATP.

transportador glutamato-H⁺ es inhibido por avenaciolida (fungicida). El acarreador de tricarboxilatos puede transportar citrato (+ protón) por malato y puede ser inhibidor por altas concentraciones de mersalil; este acarreador transporta también, isocitrato, *cis*-aconitato y fosfoenolpiruvato[7a]. El acarreador de dicarboxilatos, transporta fosfato, malato, malonato, succinato, sulfato, sulfito, tiosulfato, arsenato y posiblemente oxaloacetato, es inhibido por butilmalonato y fenilsuccinato, entre otros[7a]. El fosfato entra por un intercambio con un OH a través del acarreador de fosfatos, inhibible por mersalil. El calcio puede salir vía intercambio con sodio o por salida independiente de sodio. Particularmente, tanto en cerebro como en corazón, el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ es muy activo [8,9].

CADENA RESPIRATORIA

La cadena transportadora de electrones (fig.5) está constituida por componentes oxidorreductores: grupos hemo(a,b,c1,c), grupos hierro-azufre (FeS), mononucleótidos de flavina (FMN), flavín adenín dinucleótidos (FAD) y átomos de cobre (Cu a, Cu a₃), los cuales se encuentran asociados a proteínas oligoméricas. Estas últimas están formadas por varios polipéptidos y se encuentran parcialmente embebidas en la bicapa lipídica de la membrana mitocondrial interna. Reciben el nombre de complejos I,II,III, y IV, de acuerdo con Hatefi [10]. Por su actividad enzimática, los cuatro complejos se denominan NADH-ubiquinona oxidorreductasa (Complejo I), sensible a rotenona; succinato-ubiquinona oxidorreductasa (Complejo II), ubiquinol-

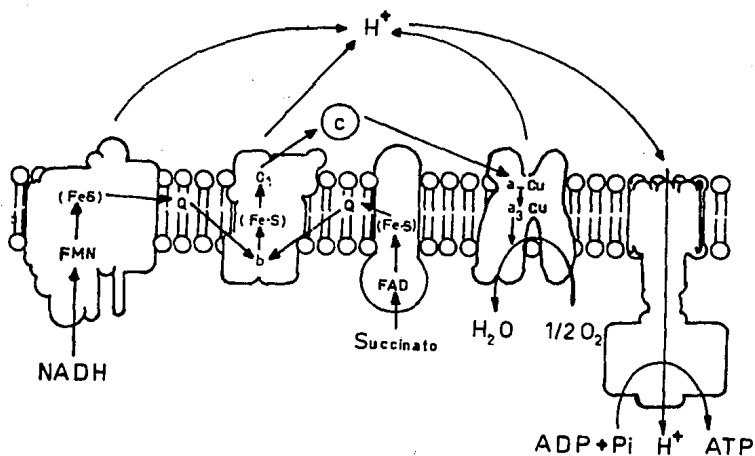


Fig. 5 Cadena Respiratoria. La cadena transportadora de electrones está conformada, según su potencial redox, por cuatro complejos, tres de los cuales bombean protones hacia el exterior de la membrana interna mitocondrial, denominándose Sitio I (Complejo I), Sitio II (Complejo III) y Sitio III (Complejo IV o Citocromo Oxidasa).

citocromo c oxidorreductasa (Complejo III), sensible a antimicina, mixotiazol y HQNO y citocromo c oxidasa (Complejo IV), sensible a cianuro, azida y CO. Siguiendo esta nomenclatura, la ATP sintetasa se denomina Complejo V. La membrana mitocondrial interna se encuentra en estado semifluido debido a su composición lipídica y las proteínas membranales y componentes redox que catalizan el transporte de electrones y la síntesis de ATP difunden independientemente. El transporte de electrones se lleva a cabo, probablemente, por las colisiones múltiples de los componentes redox: los cuatro complejos respiratorios, la ubiquinona y el citocromo c soluble [11].

SISTEMA FOSFORILANTE

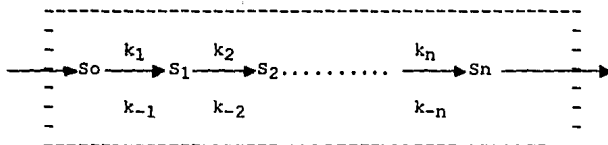
El sistema fosforilante está formado por la ATP sintetasa, sensible a oligomicina; el acarreador de adenín nucleótidos, sensible al atractilósido, carboxiatractilósido y ácido bonkrékico y el acarreador de fosfatos, sensible a mersalil (Fig.4).

TEORIA DEL CONTROL METABOLICO

La adaptación continua de la célula viva a los cambios ambientales es una condición indispensable para su preservación. La necesidad de mantener el medio intracelular constante u homeostasis celular requiere de mecanismos de control metabólico capaces de ajustar el funcionamiento celular a esos cambios externos. Una disminución en la capacidad de control acarrearía el deterioro de las redes metabólicas y podría conducir al envejecimiento de la célula; en ese momento, la célula va de un estado ordenado a otro menos ordenado, aumentando la entropía. El sistema muere cuando termina por equilibrarse con el medio. Por lo tanto, cualquier vía metabólica y de hecho, todo ser vivo, es un sistema abierto que siempre se encuentra alejado del equilibrio termodinámico, lo cual permite un flujo continuo de materia y energía [12].

ESTADO ESTACIONARIO

En una vía metabólica el sustrato inicial (S_0) proveniente del medio ambiente se transforma mediante una serie de reacciones enzimáticas en un producto final (S_n) que regresa al medio:



Cuando la velocidad de entrada del sustrato inicial es igual a la velocidad de formación del producto, la vía se encuentra en el "estado estacionario". En dicho estado, todas las enzimas de la vía trabajan a la misma velocidad y la concentración de todos los intermediarios es constante, aunque no de la misma magnitud.

El control del metabolismo energético se realiza principalmente a nivel de la actividad enzimática. La célula modula la actividad metabólica mediante mecanismos muy finos y efectivos de tal forma que los cambios producidos en una o dos enzimas repercuten en el flujo total de la vía. Este tipo de enzima llamada reguladora se ha definido como aquella capaz de ejercer control significativo sobre la vía [13].

Clasificar a una enzima como reguladora, solo ofrece un término estrictamente cualitativo y no establece cómo las enzimas podrían controlar el flujo metabólico ni tampoco cuantifica la importancia relativa de cada etapa. Implícitamente se supone que al señalar a una enzima como reguladora, ésta controla totalmente el flujo metabólico. En la literatura también se discute en este sentido cuál es el factor determinante en la velocidad de flujo, si la actividad de alguna de las enzimas de la vía o la disponibilidad de sustratos o cofactores, aunque mas bien parecería absurdo sugerir que alguno de estos factores no intervienen e influyen sobre el flujo metabólico [12].

En un intento por responder estas incógnitas y formalizar el análisis de la regulación metabólica, Kacser y Burns en Escocia [14] y Heinrich y Rapoport en Alemania Democrática [15] desarrollaron en forma independiente una teoría cuantitativa de control que sintetiza mucha de la información disponible. El análisis de estos autores propone que las variables de una vía metabólica son los niveles de metabolitos; en el estado estacionario las concentraciones de los intermediarios no varían con el tiempo puesto que cada uno de ellos ha alcanzado un balance de formación y remoción que depende de la actividad de todas las enzimas, por esto, las concentraciones de los intermediarios y los flujos están determinados por los parámetros del sistema.

El flujo es una propiedad sistémica pues la disminución de la actividad de una enzima a cero resulta en la anulación de la vía y las cuestiones acerca de su regulación no pueden ser contestadas estudiando una etapa aislada [12]. Los parámetros del sistema están representados por las constantes enzimáticas como la constante de Michaelis (K_m), la constante catalítica (K_{cat}), las constantes de inhibición (K_i), etc. Existen además restricciones termodinámicas representadas por la constante de equilibrio de una reacción. La cantidad y la calidad de las enzimas y las condiciones del microambiente también son parámetros del sistema, al menos en la mayoría de los experimentos [16].

El parámetro que determina la influencia de un metabolito dado sobre la actividad de una enzima se llama coeficiente de elasticidad y está definido como un cambio relativo en la actividad de la enzima dividido por un cambio mínimo en la concentración de un metabolito.

Una de las formas para describir el grado de control del flujo que ejerce una enzima (o proceso) a través de una ruta metabólica dada es la Teoría del Control Metabólico. De acuerdo con esta teoría, ninguna de las enzimas determina por sí misma el flujo a través de una vía [14,15,17-19].

COEFICIENTE DE CONTROL DE FLUJO

Aunque en el estado estacionario todas las enzimas llegan a tener la misma actividad, el efecto que tendría una variación en sus actividades sobre el flujo metabólico no es necesariamente el mismo. Es posible estimar este efecto induciendo un pequeño cambio en una de las enzimas y expresando esto como un cambio fraccional dE_i/E_i , donde E_i es la actividad de la enzima.

Este cambio en la actividad de la enzima puede deberse a un cambio en la concentración de la enzima, número de recambio u otras constantes cinéticas, es decir, un cambio en la concentración de enzima activa. Debido al cambio inducido, se establecerá un nuevo estado estacionario con un flujo diferente,

el cual se puede expresar como dF/F . La comparación de estas dos medidas, representa cómo el cambio inducido en la enzima afecta al flujo:

$$dF/F = C_i (dE_i/E_i);$$

$$C_i = E_i/F(dF/dE_i)$$

La constante de proporcionalidad (C_i) describe cuantitativamente cuán sensible es el flujo a cambios en una de las enzimas de la vía y fue denominada como coeficiente de sensibilidad por Kacser y Burns, y como fuerza de control por Heinrich y Rapoport. Recientemente estos dos grupos acordaron una nomenclatura unificante y nombraron a C_i como coeficiente de control de flujo.

Desde hace algunos años se ha venido utilizando el método de inhibición específica para modificar las actividades enzimáticas. Originalmente desarrollada por el grupo de Westerhoff y Tager [19], la idea básica es la de titular el flujo metabólico con diferentes inhibidores (al menos uno para cada enzima de la vía) y calcular la pendiente inicial de la curva de inhibición obtenida mediante el análisis de regresión lineal. La determinación del valor de C_i depende entonces del tipo de inhibición, de acuerdo con las siguientes fórmulas:

Inhibición irreversible,

$$C_i = (-I_{\max}/F) (dF/dI); [I] \rightarrow 0$$

Inhibición no competitiva,

$$C_i = (-K_i/F) (dF/dI) ; [I] \rightarrow 0$$

Inhibición competitiva,

$$C_i = (-K_i[1+S/K_m]F) (dF/dI); [I] \rightarrow 0$$

donde F es el flujo total de la vía, I_{\max} es la cantidad mínima de inhibidor necesaria para obtener la máxima disminución del flujo, K_i es la constante de inhibición, S es la concentración de sustrato, K_m es la constante de Michaelis-Menten y dF/dI es la pendiente inicial ($[I]=0$) de la curva de inhibición.

El procedimiento experimental para calcular C_i consiste en determinar la pendiente inicial de la curva de inhibición (dF/dI) y relacionar este valor con la velocidad de flujo no inhibido (F_0) y los correspondientes parámetros cinéticos. Se considera la pendiente inicial porque aquí ocurre una inhibición casi lineal que permite extrapolar al nivel inicial de estado estacionario, que es el estado de interés. La suma de los valores de C_i en una ruta metabólica dada debe ser igual a 1; esto es la propiedad sumatoria [14]. C_i puede valer desde 0 hasta 1; la enzima cuyo C_i fuera 1 estaría controlando todo el flujo por sí misma. Si se supone una vía metabólica lineal, sin entrecruzamientos, la suma de los C_i obtenidos (un C_i para cada enzima) de las enzimas que intervienen en esa vía deberá ser igual a 1.

Los valores de C_i obtenidos mediante este método de regresión lineal dan una idea aproximada de la distribución del control. La mayoría de los inhibidores utilizados para la fosforilación oxidativa, son del tipo "fuertemente unido", comportándose de forma parecida a los inhibidores irreversibles. Es por esto que se utilizó la fórmula para inhibidores irreversibles. Sin embargo, esto trae como consecuencia una sobreestimación de los datos (I_{max} y pendiente inicial). Existe un nuevo método de regresión no lineal [20] en el cual se introduce la curva completa de titulación en una ecuación que utiliza un análisis no lineal obteniéndose un grado mayor de exactitud en cuanto a C_i e I_{max} . Este modelo toma en cuenta la constante de disociación (K_d) que existe entre el inhibidor y sus sitios de unión así como una estimación objetiva de la curva inicial de titulación.

El análisis teórico de este modelo demuestra (Fig.6) que la forma de la curva de inhibición no guarda ningún tipo de relación con el grado de control que una enzima ejerce sobre el flujo metabólico. No existe base teórica para interpretar la fase inicial de una curva sigmoide como el "exceso" de enzima o la aparición de una curva hiperbólica como que la enzima es "limitante" y por tanto $C_i=1$. Aunque la fase inicial de una curva sigmoidal se incrementa al disminuir C_i (lo cual sí estaría asociado al aumento del "exceso" de enzima) (Fig.6c), también ocurre lo mismo al incrementar E_o (Fig.6a) o K_d (Fig.6b).

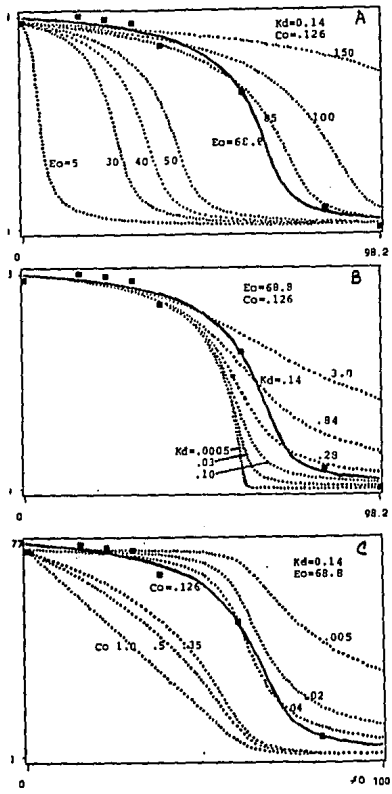


Fig. 6 Gráfica teórica de la variación de A) E_o , manteniendo constantes K_d y C_o ; B) K_d , manteniendo constantes E_o y C_o y C) C_o , manteniendo constantes E_o y K_d . La curva continua es una curva experimental de una titulación hecha con oligomicina y utilizando glutámico 1mM como substrato.

CONTROL DE LA FOSFORILACION OXIDATIVA

Los mecanismos por medio de los cuales se piensa que la respiración y la síntesis de ATP son controlados o regulados, han sido tema de discusión por varios años; se ha visto que los primeros dos sitios de la cadena respiratoria y el translocador ATP/ADP están en equilibrio cercano en varios tipos de mitocondrias y por tanto, la regulación de la fosforilación oxidativa podría ser exclusivamente debida a la reducción irreversible del oxígeno molecular a agua por la citocromo oxidasa [21-23].

Las investigaciones a nivel del acarreador ATP/ADP utilizando carboxiatractilósido (CAT) para su titulación, apoyaron el hecho de que el acarreador es limitante en la velocidad de la fosforilación oxidativa [21,24,25], sin embargo, se ha visto que esto depende de las condiciones utilizadas: dependiendo del estado estacionario y tipo de tejido así como la concentración de ADP, Pi, Ca²⁺, etc.[26]. Que el acarreador sea un paso limitante no quiere decir que sea el único, ya que otras enzimas también pueden estar ejerciendo cierto control.

En estudios realizados en mitocondrias de corazón de perro, hígado y riñón de rata y hepatocitos aislados, se ha observado una dependencia de la respiración sobre las concentraciones de ATP, ADP y Pi extramitocondrial, lo que sugiere que el acarreador ATP/ADP es importante en la regulación del flujo [27,28].

Se ha visto que el grado de control que pueda ejercer el acarreador ATP/ADP no solo depende de la velocidad en el estado estacionario sino que también depende de la forma en la cual el flujo se varía [25,29,30].

Diversos estudios realizados aplicando la teoría de control metabólico muestran que el control de la fosforilación oxidativa en mitocondrias aisladas es multifacético y se ha establecido que el acarreador ATP/ADP, la ATP sintetasa, la citocromo oxidasa, el citocromo bcl y el acarreador de dicarboxilatos son sitios importantes de regulación [22,30-33].

Se ha visto que el acarreador ATP/ADP y la ATP sintetasa están acoplados secuencialmente a través de un intermediario común (la relación intramitocondrial ATP/ADP); en ausencia del acarreador (utilizando para ello, el sistema de arsenilación oxidativa), el control recae sobre la ATP sintetasa, por lo que se sugiere que la actividad de ambas enzimas se regula de manera opuesta [30,33,34].

Estudios realizados por Groen y cols., muestran que el valor de C_i y por lo tanto, el grado de control de la ATP sintetasa y el acarreador ATP/ADP dependen directamente de los cambios en la relación ATP/ADP [35,36].

La aplicación de los métodos y conceptos de la teoría de control metabólico en mitocondrias aisladas por Groen y col.[22] y Tager y col.[19] ha llevado a la idea de que el control sobre la respiración mitocondrial y la síntesis de ATP es compartido por varias enzimas y acarreadores y que la distribución del control cambia bajo distintas condiciones metabólicas.

"TOP-DOWN APPROACH"

Otra forma de obtener C_i aparte de las curvas de titulación con inhibidores, es el "top-down approach" propuesto por Brand, Brown y col [37,38]; estos autores estudiaron principalmente la respiración mitocondrial y la fosforilación oxidativa. Tomando en cuenta los coeficientes de elasticidad y de control, uno puede analizar un sistema dividido a gran escala, en bloques, como sería la respiración, fosforilación y la permeabilidad pasiva de protones. En un intervalo entre estado 4(basal) y estado 3 (activo) de la respiración, estos autores encontraron coeficientes de 0.9-0.0, para la difusión pasiva; 0.0-0.5, para la fosforilación; y 0.1-0.5 para la respiración.

El control de la respiración mitocondrial en hepatocitos en reposo ha sido estudiado bajo este análisis [39], en el cual la pareja NAD/NADH fue tomada como el "metabolito central", dividiendo el sistema en un bloque productor de NADH (glicólisis y ciclo de Krebs) y un bloque consumidor de NADH (cadena respiratoria, síntesis de ATP y consumo de ATP). El bloque productor fue estimado en 0.15-0.30, mientras que el bloque consumidor fue de 0.7-0.87.

EL PAPEL DEL CALCIO EN LA FOSFORILACION OXIDATIVA

En mitocondrias, tanto la fosforilación oxidativa como la entrada de calcio dependen del gradiente electroquímico de protones. Se ha reportado que la fosforilación oxidativa se inhibe en mitocondrias que tienen un alto contenido de calcio endógeno, por ejemplo, músculo liso, corazón, útero y cerebro [40], lo cual sugiere que el nivel de calcio de la matriz mitocondrial puede afectar directamente la actividad de las enzimas intramitocondriales involucradas en la síntesis de ATP. También se ha sugerido que el calcio evita la acción de la proteína inhibidora de la ATPasa [41,42].

En sinaptosomas aislados de cerebro de rata se ha encontrado que la estimulación de la respiración inducida por la despolarización puede ser dependiente de calcio [43]. La interpretación de la dependencia de la respiración por calcio es complicada debido a la posible estimulación de este catión sobre la utilización de ATP [5]. En un trabajo realizado en mitocondrias de corazón de rata [44] se vió que variando la concentración externa de calcio es posible observar distintas velocidades de estado estacionario en la síntesis de ATP. Se encontró que el nivel de calcio externo induce modificaciones importantes sobre toda la cinética de la fosforilación oxidativa.

El calcio intramitocondrial estimula tres deshidrogenasas de la matriz: la piruvato deshidrogenasa, NAD-isocitrato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa [2,3].

El nivel de calcio libre en citoplasma se mantiene en concentraciones fisiológicas gracias a las hormonas movilizantes (y antagonistas) de calcio y por la excitación eléctrica. En algunos tejidos [45] el nivel de calcio citoplásmico regula normalmente el nivel de calcio libre de la matriz mitocondrial vía dos transportadores mitocondriales: un uniportador electroforético para la entrada de calcio y un intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ para la salida.

La concentración de calcio libre en la matriz es del orden $0.1\mu\text{M}$ - $1\mu\text{M}$, cuando la concentración de calcio externo es también de 0.1 a $1\mu\text{M}$ [26,46]. El incremento en esta concentración disminuye la K_m de las NAD-isocitrato y α -cetoglutarato deshidrogenasas para isocitrato y α -cetoglutarato respectivamente y estimula la fosfatasa de la piruvato deshidrogenasa, la cual convierte a esta última en su forma activa desfosforilada. Los estímulos fisiológicos como las hormonas o la excitación eléctrica que elevan la concentración de calcio, activan a la piruvato deshidrogenasa en corazón, músculo, hígado y cerebro junto con las otras dos deshidrogenasas [2,47]. Las hormonas también pueden alterar la cinética de entrada y salida de calcio [48].

En algunas células y bajo ciertas condiciones se ha visto que el suministro de NADH mitocondrial tiene un control significativo pero no alto sobre la respiración [5]. En mitocondrias aisladas de corazón [32] las concentraciones de calcio submicromolar pueden ejercer un aumento significativo del estado 3 de la respiración mitocondrial al estimular el suministro de NADH. Algunas hormonas movilizantes de calcio [39] pueden provocar cambios en la respiración y síntesis de ATP al incrementar el suministro de NADH posiblemente a través de la estimulación de las deshidrogenasas de la matriz.

Se ha visto que existe una relación estrecha entre la actividad de las deshidrogenasas sensibles a Ca^{2+} y el grado de control ejercido por las diferentes enzimas que integran la fosforilación oxidativa, especialmente entre la ATP sintetasa y la translocasa de ATP/ADP [34].

En mitocondrias de corazón el control lo ejercen el acarreador de adenín nucleótidos y el Sitio 1 de la cadena respiratoria mientras que en mitocondrias de riñón, se distribuye entre el acarreador de ATP/ADP y el acarreador de Pi. Cuando se incrementa la actividad de las deshidrogenasas y el flujo con calcio, el control del acarreador y el Sitio 1 disminuye incrementándose a su vez el control de la ATP sintetasa y el acarreador de Pi [34].

El control de la respiración en estado 4 lo ejerce la permeabilidad pasiva a H^+ de la membrana interna mitocondrial, el control que ésta ejerce en el estado 4 es muy elevado y va disminuyendo progresivamente conforme la velocidad de respiración alcanza el estado 3 [34,50,51].

METABOLISMO EN CEREBRO

En términos de metabolismo energético, el cerebro es el principal consumidor de todos los órganos del cuerpo, un hecho reflejado en su gran suministro de sangre y oxígeno. A pesar de que el cerebro humano representa solo el 2% del peso corporal total, su velocidad de consumo de oxígeno representa el 20% del consumo de oxígeno de todo el cuerpo en estado de reposo [52,55]. Mientras que los órganos del cuerpo pueden utilizar una gran variedad de combustibles metabólicos, las células del cerebro solo pueden consumir glucosa sanguínea [53]; mas aún, mientras que, por ejemplo, el músculo puede funcionar por cortos periodos de tiempo en ausencia de oxígeno, el cerebro es completamente dependiente del metabolismo oxidativo.

En los mamíferos, el ATP proveniente de la glicólisis y de la fosforilación oxidativa es la fuente de energía utilizada para realizar las diversas funciones celulares. En particular, las actividades de cerebro y corazón dependen prácticamente en un 100% del ATP suministrado por la mitocondria [54]. Cualquier

déficit en el aporte de oxígeno y glucosa al cerebro podría causar graves alteraciones. Entender cómo se regula la síntesis de ATP en las mitocondrias es uno de los problemas centrales en la bioenergética actual, en particular, el conocimiento del control de la fosforilación oxidativa y el efecto del calcio sobre ésta [12] en un órgano totalmente aeróbico como lo es el cerebro.

El acarreador de adenín nucleótidos es la proteína más abundante de la membrana interna mitocondrial en cerebro. Representa aproximadamente el 10% del contenido total de proteínas de esta membrana [56]. En estas mitocondrias, las poliaminas parecen jugar un papel importante en el transporte de calcio ya que incrementan la habilidad de las mitocondrias para transportar calcio, en particular la espermina, totalmente dependiente en este caso, de la presencia de ADP [57,58]. El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ [8,9] es el sistema más importante para la regulación de la salida de calcio mitocondrial, seguido, en menor escala, por el sistema de salida sensible a ciclosporina A; esta situación es inversa en hígado [8].

Las velocidades de respiración por oxidación de sustratos en mitocondrias de cerebro van, en orden de preferencia, de la siguiente manera: piruvato > succinato > glutamato > citrato, acetilcarnitina, isocitrato, α -cetoglutarato y α -glicerofosfato [60].

En mitocondrias de cerebro, el sustrato que se oxida preferentemente es el piruvato [60]. La piruvato deshidrogenasa es una de las tres enzimas que se ha reportado [2,3] sensible a calcio. Otra de las enzimas sensibles a calcio es la α -cetoglutarato deshidrogenasa. Esta enzima es la más accesible para estudiar, ya que al evaluar su actividad no se involucra a las otras dos enzimas, como sucede con la piruvato deshidrogenasa y la isocitrato deshidrogenasa que presenta además el inconveniente de que su sustrato, el isocitrato, es poco permeable.

En varios de los estudios realizados para conocer el control de la fosforilación oxidativa en diversos tipos de mitocondrias, se utilizaron concentraciones saturantes de sustrato, lo cual impidió observar la posible participación de las deshidrogenasas del ciclo de Krebs [2,3]. Cuando se hicieron estudios con concentraciones fisiológicas de sustrato, se observó que estas enzimas también ejercían control sobre la vía [50].

El control de la fosforilación puede variar dependiendo del estado estacionario; así, al utilizar diferentes concentraciones fisiológicas de sustratos y concentraciones saturantes nos permite observar el efecto de las deshidrogenasas. Esta distribución del control también se ha visto que varía [50] en presencia de calcio.

Esta variación puede deberse a una activación de las deshidrogenasas sensibles a este catión [2] y/o un efecto a diferente nivel de estas enzimas, ya sea translocasa de adenin nucleótidos [47], Complejo III [61,62], ATP sintetasa [63], etc.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el control de la Fosforilación oxidativa en mitocondrias de cerebro.

Objetivos Particulares

Determinar el papel del calcio sobre el control de la fosforilación oxidativa.

Determinar el efecto de la concentración de sustrato sobre el control, es decir, la medición indirecta de la participación de las deshidrogenasas de la matriz mitocondrial.

Comparar el control con dos sustratos: el ácido pirúvico, cuya oxidación involucra a las tres deshidrogenasas dependientes de NAD reportadas sensibles a calcio y el ácido glutámico, cuya oxidación involucra a solo una de estas deshidrogenasas.

Evaluar los dos tipos de análisis para la obtención de C_i , el método cuantitativo propuesto por Westerhoff y Tager (regresión lineal) y el método de Gellerich y col (regresión no lineal).

MATERIAL Y METODOS

MATERIALES Y METODOS**AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS DE CEREBRO**

Se sacrificaron ratas Wistar de cualquier sexo por decapitación y rápidamente se removió el cerebro, que fue colocado a 4°C en un medio que contenía 250mM Sacarosa, 10mM MOPS, 1mM EDTA, 0.5mM EGTA y albúmina al 1%, pH de 7.3. Este medio fue utilizado a lo largo del aislamiento.

La técnica de aislamiento se basa en la propuesta por Lai y Clark [64], con las siguientes modificaciones: Se trituraron con tijeras los cerebros de 5 ratas por experimento y se homogeneizaron con vástago de teflón en 15 ml del medio, a razón de 1/2 cerebro por homogenizador y 10 bajadas del vástago. Una vez homogeneizada la muestra, se llevó a un volumen de 25 ml por tubo para seis tubos y se centrifugó durante 10 minutos a 1000 x g. El sobrenadante obtenido se filtró con gasa y se volvieron a aforar a 25 ml los seis tubos. Se centrifugó por 10 minutos a 7000 x g y el botón obtenido se resuspendió con el medio, se volvieron a aforar los tubos a 25 ml y se dejaron incubando con la albúmina (1%) durante 10 minutos. Por último, se centrifugaron nuevamente a 7000 x g durante 10 minutos y se resuspendió el botón en un volumen mínimo (800µl) con el medio.

MEDICION DE LA PROTEINA MITOCONDRIAL

La determinación de la proteína mitocondrial se hizo por el método de Lowry [65] utilizando albúmina como estándar. El rendimiento fue de 18-22mg de proteína/5 cerebros invariablemente.

MEDICION DEL CONTROL RESPIRATORIO

La medición del control respiratorio se realizó por el método polarográfico utilizando un oxímetro marca YSI, modelo 53, y un electrodo de oxígeno tipo Clark de la misma marca.

Todas las mediciones fueron realizadas a 30°C, preincubando 5 minutos en 1.65ml del medio AB: 120mM KCl, 20mM MOPS, 5mM Pi, 0.5mM EGTA y 0.2mM EDTA, pH 7.2 y los respectivos sustratos utilizados:

Pirúvico	0.5mM	+	Malato	2mM	(± 427nM Ca ²⁺)
Pirúvico	5.0mM	+	Malato	2mM	
Glutámico	1 mM	+	Malato	5mM	(± 427nM Ca ²⁺)
Glutámico	10 mM	+	Malato	5mM	

y con los siguientes inhibidores empleados:

Inhibidor	Sitio de Inhibición	
Carboxiatractilósido	(CAT)	Trans.ATP/ADP
Oligomicina	(Oligo)	ATP sintetasa
Mersalil	(Mers)	Acarreador de Pi
Rotenona	(Rote)	Sitio 1
Antimicina	(Antim)	Complejo III
α -4-OH-cianocinamato	(cinamato)	Acarreador piruvato
cianuro	(KCN)	Citocromo Oxidasa
Azida	(azida)	Citocromo Oxidasa

Todos los inhibidores empleados son del tipo "fuertemente unidos" excepto el KCN y cianocinamato, que son inhibidores no competitivos [66].

El estado 3 de la respiración se obtuvo añadiendo ADP 700 μ M después de 5 minutos de preincubación.

El Ca²⁺ añadido en todos los experimentos fue de un amortiguador o buffer de Ca²⁺/EGTA=0.8 siguiendo las consideraciones indicadas en [67]: 200mM Ca²⁺, 250mM EGTA, 100mM MOPS, pH 7.2. Esta cantidad de Ca/EGTA estabiliza una concentración de Ca²⁺ libre de 427nM.

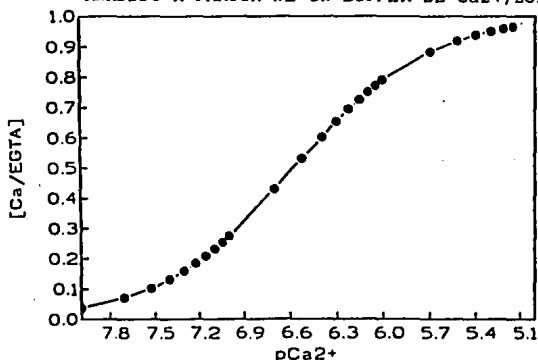
Amortiguador de Ca²⁺/EGTA

La concentración de calcio añadido se controló mediante el empleo de amortiguadores de Ca²⁺/EGTA, realizados de acuerdo a lo propuesto por Moreno-Sánchez y col [67]. El cálculo de la concentración de calcio se realiza mediante programas de computadora, como el "Chelator" [71] que permiten calcular Kas (constante de asociación) relativas a partir de Kas absolutas. Partiendo de las concentraciones libres de ligando y de cationes se pueden calcular las concentraciones totales requeridas de ligandos y cationes para determinados valores de los cationes libres[67]. La gráfica de la página siguiente muestra la curva obtenida por este programa. A partir de las concentraciones de Ca²⁺/EGTA utilizadas se puede conocer el pCa²⁺. Conociendo el pCa²⁺, la concentración de Ca²⁺ libre añadida se obtiene directamente.

MEDICION DEL POTENCIAL TRANSMEMBRANAL ($\Delta\psi$)

Para esta técnica [68] se utilizó safranina 10 μ M como indicador, con el medio AB en un volumen de 2.5ml a 511 y 533 nm, en un espectrofotómetro de doble longitud de onda. Con los sustratos piruvato y glutamato se inició la reacción agregando 1mg/ml de mitocondrias. La señal fué calibrada con CCCP (carbonilcianato-m-clorofenilhidrazona) y rotenona.

GRAFICA PARA CONOCER LA $[Ca^{2+}]$
ANADIDO A PARTIR DE UN BUFFER DE $Ca^{2+}/EGTA$



Gráfica. Se introdujeron puntos teóricos de de concentraciones de calcio total en el programa "Chelator" [80] para obtener las concentraciones de calcio libre. Las condiciones para el programa fueron: fuerza iónica ca 0.129M, pH 7.2, T=30°C v [EGTA]=5nM. En la gráfica aparecen las concentraciones de calcio total dadas ($[Ca/EGTA]$) contra el pCa^{2+} , a partir del cual se obtiene la concentración deseada de calcio libre.

MEDICION DEL $\Delta\psi$ CON TPP⁺

Al medio AB (10ml) se le agregaron 60 μ l de ³H-TPP⁺ (tetrafenilfosfonio) 0.25mM (Actividad especifica = 99,862 cpm/nmol). De esta última mezcla, se añadieron 0.9ml a cada tubo, el cual contenía: malato 2mM, pirúvico 0.5 ó 5mM, con y sin Ca/EGTA, se calibró la reacción utilizando blancos con CCCP y rotenona, a 30°C y en agitación constante. Se inició la reacción añadiendo las mitocondrias (1mg/ml). A los 3 minutos (estado 4) se tomaron 0.5ml de la muestra y se centrifugó durante 1 minuto en una microfuga para después tomar 150 μ l del sobrenadante. El botón fue diluido en 150 μ l de tritón al 2%. Mientras tanto, a los 5 minutos se añadió ADP a concentración saturante para prolongar al máximo el estado 3. A los 6 minutos y medio se tomaron 0.5ml de la muestra con ADP y se le hizo el mismo tratamiento mencionado al sobrenadante y al botón. La radioactividad de las muestras, colocadas en viales, se determinó en un contador de centelleo líquido Beckman LS 7800.

Esta técnica se basa en la distribución de cationes lipofílicos a través de la membrana mitocondrial. De acuerdo con la ecuación de Nernst:

$$\Delta\psi = \frac{-RT \ln \frac{[ext]}{[int]}}{zF}$$

a 30°, RT/zFln=60, entonces:

MEDICION DEL $\Delta\psi$ CON TPP⁺

Al medio AB (10ml) se le agregaron 60 μ l de ³H-TPP⁺ (tetrafenilfosfonio) 0.25mM (Actividad específica = 99,862 cpm/nmol). De esta última mezcla, se añadieron 0.9ml a cada tubo, el cual contenía: malato 2mM, pirúvico 0.5 ó 5mM, con y sin Ca/EGTA, se calibró la reacción utilizando blancos con CCCP y rotenona, a 30°C y en agitación constante. Se inició la reacción añadiendo las mitocondrias (1mg/ml). A los 3 minutos (estado 4) se tomaron 0.5ml de la muestra y se centrifugó durante 1 minuto en una microfuga para después tomar 150 μ l del sobrenadante. El botón fue diluido en 150 μ l de tritón al 2%. Mientras tanto, a los 5 minutos se añadió ADP a concentración saturante para prolongar al máximo el estado 3. A los 6 minutos y medio se tomaron 0.5ml de la muestra con ADP y se le hizo el mismo tratamiento mencionado al sobrenadante y al botón. La radioactividad de las muestras, colocadas en viales, se determinó en un contador de centelleo líquido Beckman LS 7800.

Esta técnica se basa en la distribución de cationes lipofílicos a través de la membrana mitocondrial. De acuerdo con la ecuación de Nernst:

$$\Delta\psi = -\frac{RT}{zF} \ln \frac{[ext]}{[int]}$$

a 30°C, RT/zFln=60, entonces:

$$\Delta\psi = - 60 \log \frac{[ext]}{[int]}$$

[int] ; donde [ext]=cpm del sobrenadante

[int]=cpm del botón

También se obtuvo $\Delta\psi$ utilizando una corrección de la ecuación de Nernst hecha por Rottenberg [69]. Esta ecuación toma en cuenta los coeficientes de partición del TPP⁺ a ambos lados de la membrana interna mitocondrial:

$$\Delta\psi = 60 \log (R V_o - K_o' / V_i + K_i') ; \text{ donde}$$

$$V_o = 150\mu\text{l}$$

$$K_o = 14.3$$

$$V_i = 1.11\text{ml}$$

$$K_i = 9.7$$

$$R = \text{cpm botón/cpm del sobrenadante (cpm=cuentas por minuto)}$$

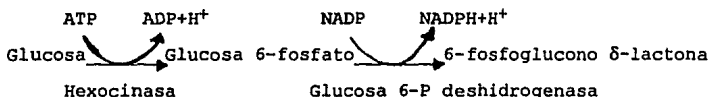
ACTIVIDAD DE LA α -CETOGLUTARATO DESHIDROGENASA

Las mitocondrias de cerebro fueron incubadas en 2.5ml del medio AB en un espectrofluorómetro a 340nm de excitación y 460 nm de emisión a 30°C y 100% O₂. Una vez alcanzado el estado basal de fluorescencia (0%) se agregaron 0.3mM de α -cetoglutaratato como sustrato y distintas concentraciones de calcio. El NADH es un producto de la actividad de esta enzima.

El estado basal de fluorescencia representó la oxidación total del NADH por la cadena respiratoria. Se utilizó rotenona para bloquear la oxidación del NADH por el Sitio 1 de la cadena respiratoria; esto representó el 100% de fluorescencia, es decir el 100% de NADH.

DETERMINACION DE LA SINTESIS DE ATP POR METODO ENZIMATICO

Tomando en cuenta que



De esta reacción se puede observar que por cada ATP consumido se produce un NADPH. Por ello, en esta técnica, la lectura de 1 NADPH fue equivalente a 1 ATP.

Las curvas de síntesis de ATP se obtuvieron tomando una alícuota (1ml) a los 6 minutos y medio de iniciada la reacción de los trazos controles (sin inhibidor) de las curvas de titulación. Esta alícuota fue colocada en 100 μ l de ácido perclórico al 30%, en hielo; después de una agitación severa se centrifugó a 5,000rpm durante 5 minutos. Se tomaron 0.9ml del sobrenadante y se añadieron 0.9ml de una mezcla 1:1 de tri-n-octilamina/1,1,2-triclorotrifluoroetano [70], se agitó

vigorosamente y centrifugó a 5,000rpm durante 5 minutos. De esta centrifugación aparecían tres fases completamente distinguibles entre sí. De la fase acuosa superior se tomaron 650 μ l y se guardaron en congelación a -70°C .

Una vez reunido un suficiente número de muestras, éstas fueron descongeladas y leídas a 340nm [70] en un espectrofotómetro Aminco, de la siguiente manera:

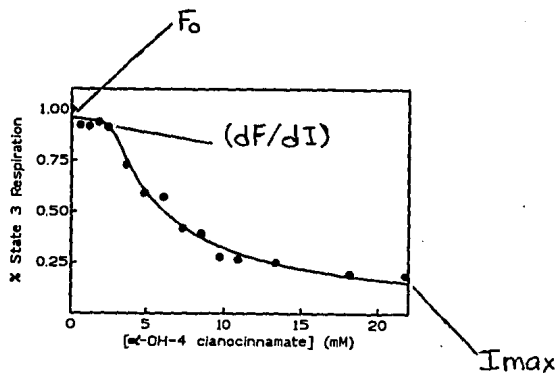
0.5ml de cada muestra se añadieron a un medio que contenía Hepes 0.1M, 20 μ l glucosa 1M, 20 μ l NADP 20mM, 8 μ l Mg 1M y 10 μ l de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de Leuconostoc mesenteroides (2mg/ml) 1:4. La reacción fue iniciada con 20 μ l de hexocinasa (1mg/ml) 1:3.

OBTENCION DE Ci POR EL METODO LINEAL

La obtención de los Ci se realizó mediante el método de inhibición específica propuesto por Westerhoff y Tager [19] en el cual se fue inhibiendo (titulando) a una enzima de la vía con su inhibidor específico de tipo irreversible y registrando los cambios que resultaban en el estado 3 de la respiración mitocondrial, (dF/dI). Se empezó a titular con una concentración aproximada del 10% de la concentración con la que se observaba una inhibición completa del flujo en estado 3. Una vez obtenidas estas curvas, se tomó la pendiente que forman los puntos iniciales. Se extrapóla esta

pendiente, por regresión lineal, al estado estacionario, F_0 (100% respiración) y se tomó el parámetro cinético I_{max} (cantidad de inhibidor mínima con la cual se obtiene la máxima inhibición) de tal forma que:

$$C_i = - \frac{I_{max} (dF/dI)}{F_0}$$



OBTENCION DE C_i POR EL METODO NO LINEAL

Con los datos obtenidos de las curvas de titulación, todos los puntos de cada curva se introdujeron en una ecuación que utiliza una regresión de tipo no lineal y que además aporta la constante de disociación (K_d) y la cantidad de enzima total (E_o); estos parámetros sirvieron para discriminar curvas que no los satisficieran y así obtener C_o más confiables.

Nota: Para diferenciar, C_i será el coeficiente de control de flujo obtenido por regresión lineal; C_o será el mismo coeficiente pero obtenido por regresión no lineal.

Para el caso de inhibidores del tipo "fuertemente unidos" se utilizan las siguientes ecuaciones:

$$J = [n(J_o - J_i)^2 \times E^n / C_o \times J_o \times E_o^n + [(n - C_o) \times J_o - (n \times J_i)] \times E^n] + J_i$$

$$E^2 + (K_d + I - E_o) \times E - K_d \times E_o = 0$$

donde J_o y J_i son las velocidades del flujo en el sistema no inhibido ($E=E_o$) y completamente inhibido ($E=0$), $C_o=C_i$, K_d es la constante de disociación del complejo inhibidor (I)-enzima y n es un exponente empírico que establece la función n de la concentración de sustrato para la reacción catalizada por E (con $n=1$, la reacción es una función lineal de la concentración de sustrato). En este estudio, n fue igual a 1 [20]. Para calcular C_o a partir de estas ecuaciones se requiere de un análisis de tipo no lineal. Esto se pudo hacer mediante un programa de cómputo, Graphpad Inplot4, y contando con la amable colaboración del Dr. Juan Pablo Pardo, de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M.

RESULTADOS

RESULTADOS

Concentración de Calcio

Para conocer la concentración de Ca^{2+} necesaria para una buena estimulación, sin que llegase a haber daño mitocondrial, se hicieron curvas de la concentración de calcio para el estado 3 de la respiración mitocondrial. Se observó que con 427nM de Ca^{2+} (Tabla 1) se obtiene una estimulación mayor al 50%, por lo que todos los experimentos se llevaron a cabo con esta concentración. La ADP/O y el control respiratorio (C.R.) son parámetros que indican la calidad de la preparación. Con 427nM de Ca^{2+} la relación ADP/O bajó de 2.6 (control) a 2.02 mientras que el C.R. bajó de 4.5 a 3.1. Estos números no reflejaron daño mitocondrial: no hubo incremento en la velocidad de respiración para el estado 4 y a esta concentración de calcio se observó una estimulación de la síntesis de ATP (lo cual no se daría en mitocondrias desacopladas).

En un estado estacionario las velocidades de las reacciones involucradas son iguales. Para el caso de la fosforilación oxidativa, la velocidad de consumo de oxígeno es igual a la velocidad de síntesis de ATP. Bajo un acoplamiento total, se producen 3 ATP por cada NADH oxidado, es decir, por cada oxígeno consumido.

TABLA 1

‡ ESTIMULACION POR Ca²⁺ EN EL
ESTADO 3 DE LA RESPIRACION

	VELOCIDAD ABSOLUTA	‡	ADP/O	C.R.	SINTESIS DE ATP (Resp.X ADP/O)
control	53.4		2.60	4.5	139
263nM	80	50	2.34	3.8	187
302nM	90	68.6	2.04	3.3	184
427nM	104	94.6	2.02	3.1	210
467nM	80	49.6	1.84	2.6	147
525nM	75	40	1.75	2.3	131

Tabla 1. Relación ADP/O, control respiratorio y estimulación por calcio. Las mitocondrias fueron incubadas en 1.65ml del medio descrito para la respiración, con pirúvico 0.5mM. A los dos minutos se le agregó la concentración de calcio indicada. Se añadió ADP 700 uM a los cinco minutos para obtener el estado 3 de la respiración. La tabla muestra un experimento representativo de cuatro realizados.

Como experimentalmente este acoplamiento no es completo, se debe medir directamente la relación ADP/O. La velocidad absoluta de respiración por el valor obtenido para la ADP/O indica la síntesis de ATP. Los valores calculados de síntesis de ATP dan una aproximación cercana a los valores obtenidos por medición directa.

Curvas de titulación

Las figuras A a la F ejemplifican las curvas de titulación obtenidas con el programa de regresión no lineal. Las gráficas del lado derecho agrupan al sistema oxidativo. Las gráficas del lado izquierdo agrupan al fosforilante. Cada figura representa:

Fig A. Curvas obtenidas cuando se utilizó pirúvico 0.5mM (+ 2mM de Malato) como sustrato.

Fig B. Pirúvico 0.5mM en presencia de 427nM de Ca^{2+} .

Fig C. Pirúvico 5mM

Fig D. Glutámico 1mM (+ 5mM de Malato)

Fig E. Glutámico 1mM en presencia de 427nM de Ca^{2+}

Fig F. Glutámico 10mM

El eje de las ordenadas corresponde al por ciento de la respiración en estado 3, normalizado para el programa graphpad Kinetics, a $1=100\%$. El eje de las abcisas corresponde a las concentraciones crecientes del inhibidor.

Datos obtenidos de cada curva de titulación

Del análisis de las curvas de titulación, se obtuvieron los parámetros que se indican en las Tablas 2 (regresión no lineal) y 3 (regresión lineal). Las tablas muestran todos los datos crudos obtenidos, incluyendo las curvas que fueron descartadas para el

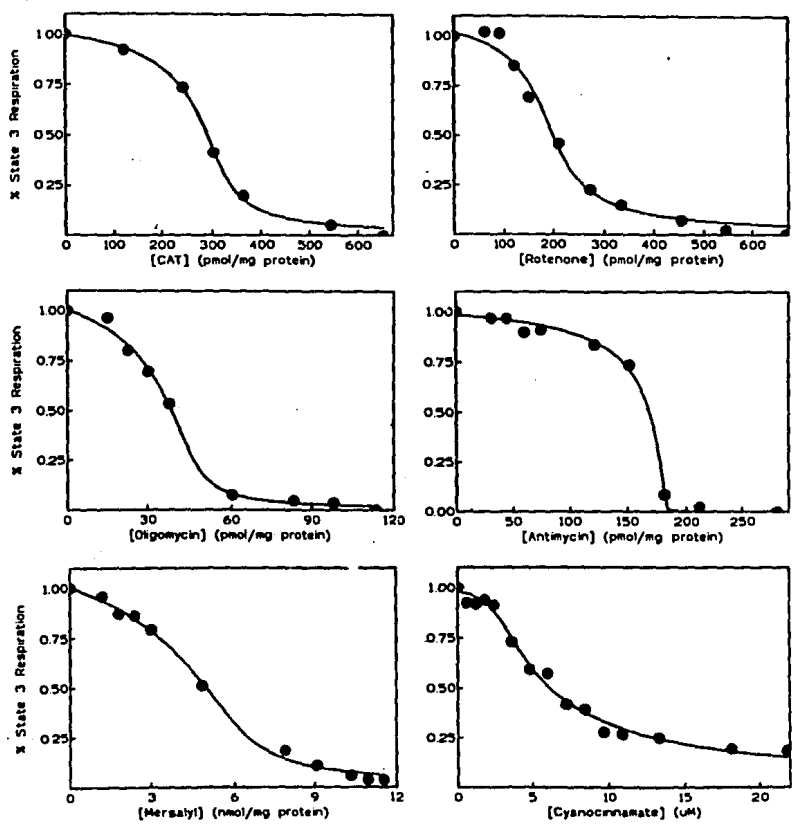


Fig A. Titulación de diferentes etapas que integran la fosforilación oxidativa en mitocondrias de cerebro oxidando pirúvico 0.5mM/malato 2mM. Las mitocondrias fueron incubadas en 1.65ml del medio AB a pH 7.2 y a 30°C durante 5 min y 100% de O₂. La respiración en estado 3 se obtuvo añadiendo 700 μ M de ADP. En las gráficas se muestra el % de estimulación en estado 3 a concentraciones crecientes de los inhibidores indicados.

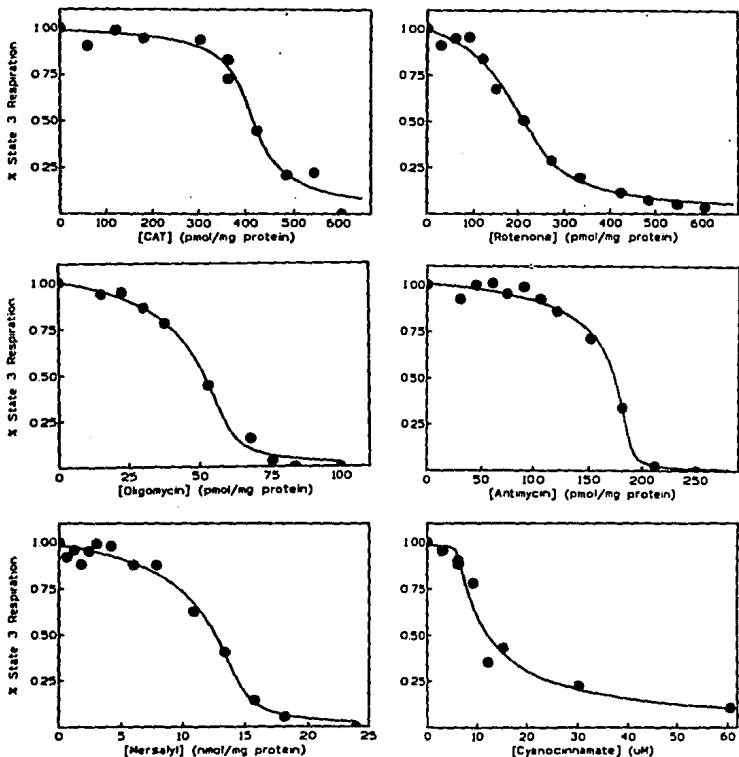


Fig B. Titulación de diferentes etapas que integran la fosforilación oxidativa en mitocondrias de cerebro oxidando pirúvico 0.5mM/malato 2mM en presencia de 427nM de Ca^{2+} (agregado a los 2 min de incubación). Las mitocondrias fueron incubadas en 1.65ml del medio AB a pH 7.2 y a 30°C durante 5 min y 100% de O_2 . La respiración en estado 3 se obtuvo añadiendo 700 μ M de ADP.

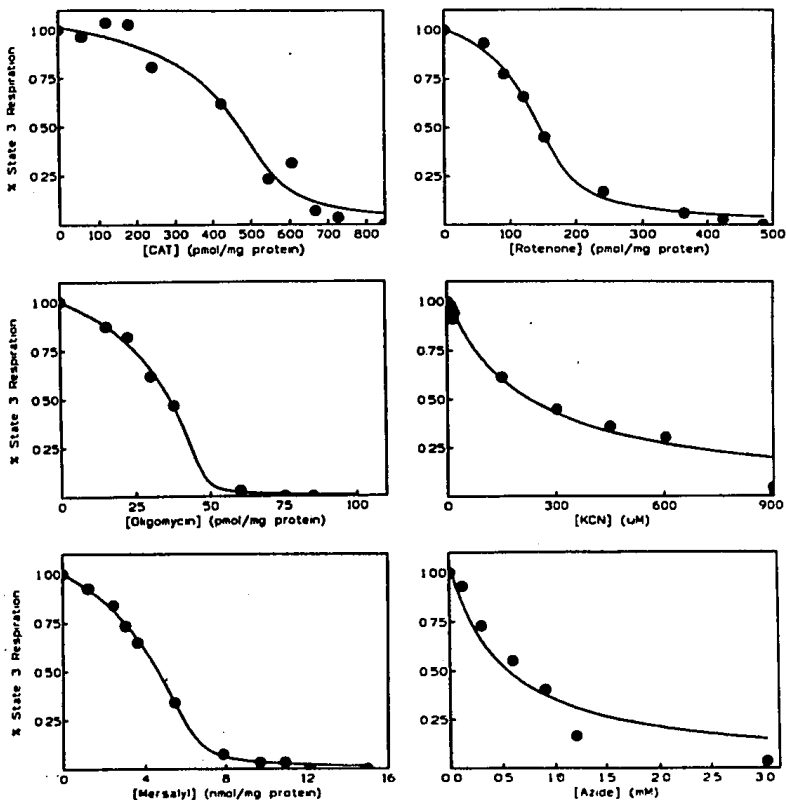


Fig C. Titulación de diferentes etapas que integran la fosforilación oxidativa en mitocondrias de cerebro oxidando pirúvico 5mM/Malato 2mM. Las mitocondrias fueron incubadas en 1.65ml del medio AB a pH 7.2 y a 30°C durante 5 min y 100% de O₂. La respiración en estado 3 se obtuvo añadiendo 700 μ M de ADP.

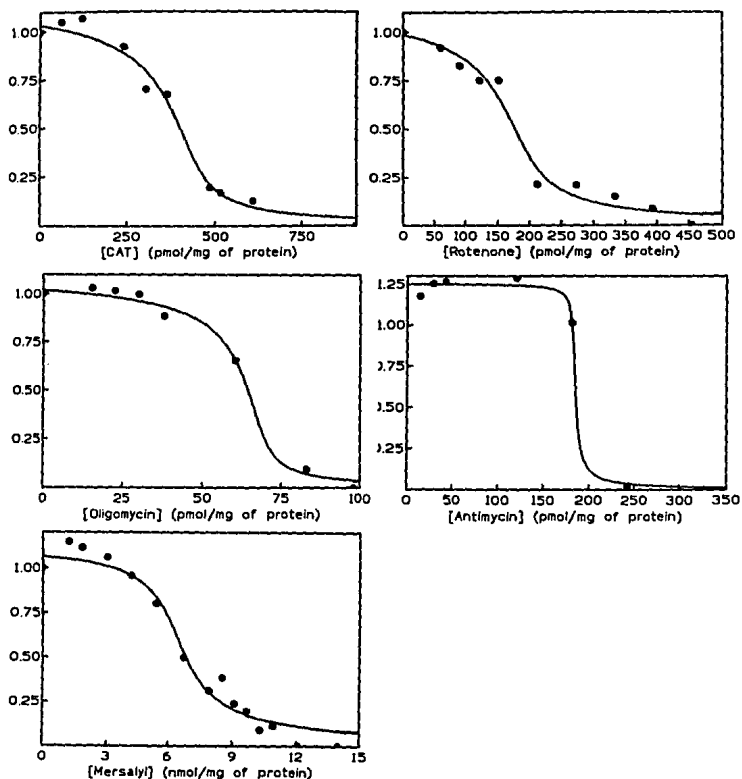


Fig D. Titulación de diferentes etapas que integran la fosforilación oxidativa en mitocondrias de cerebro oxidando glutámico 1mM/malato 5mM. Las mitocondrias fueron incubadas en 1.65ml del medio AB a pH 7.2 y a 30°C durante 5 min y 100% de O₂. La respiración en estado 3 se obtuvo añadiendo 700 μ M de ADP.

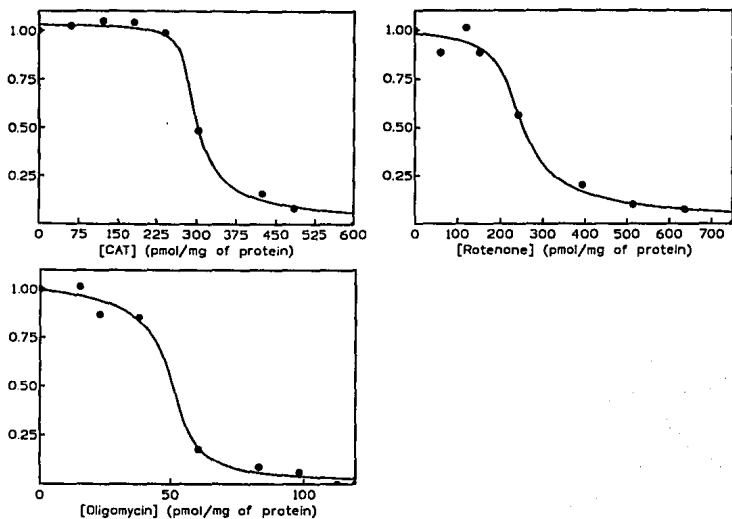


Fig E. Titulación de diferentes etapas que integran la fosforilación oxidativa en mitocondrias de cerebro oxidando glutámico 1mM/malato 5mM en presencia de 427nM de Ca^{2+} (agregado a los 2 min de incubación). Las mitocondrias fueron incubadas en 1.65ml del medio AB a pH 7.2 y 30°C durante 5 min y 100% de O_2 . La respiración en estado 3 se obtuvo añadiendo 700 μ M de ADP.

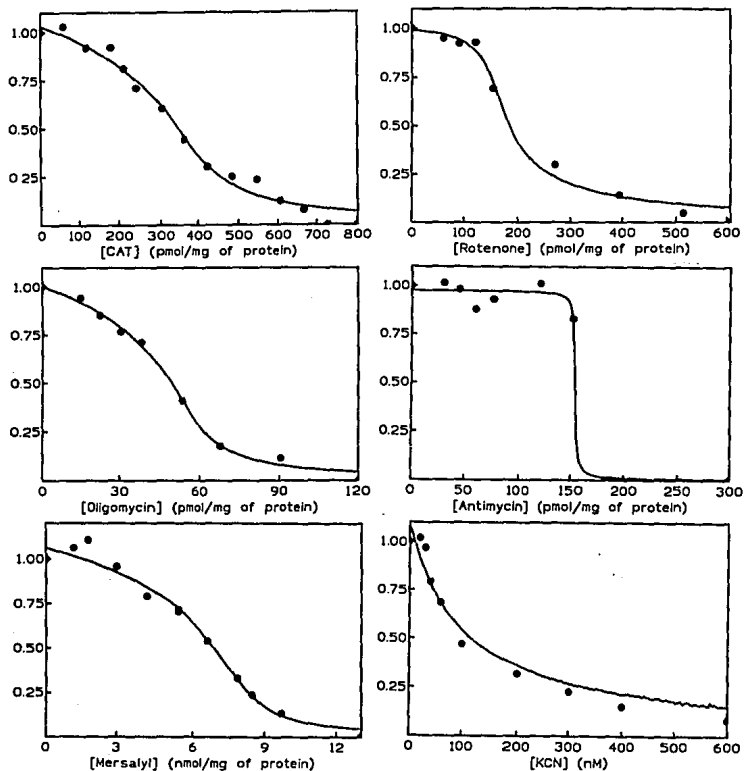


Fig F. Titulación de diferentes etapas que integran la fosforilación oxidativa en mitocondrias de cerebro oxidando glutámico 10mM/malato 5mM. Las mitocondrias fueron incubadas en 1.65ml del medio AB a pH 7.2 y a 30°C durante 5 min y a 100% de O₂. La respiración en estado 3 se obtuvo añadiendo 700 μ M de ADP.

TABLA 2

RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DE LAS CURVAS DE TITULACION Y EL ANALISIS NO LINEAL.

CARBOXIATRACTILOSIDO					ROTENONA.			
	No.	Co.	Kd	Eo	No.	Co	Kd	Eo
Pir	1	.117	3.90	374.1	114	.0006	2.32	188.02
0.5mM	56	.129	0.76	331.8	21*	.1900	4.36	222.20
	58*	.523	2.05	607.0	20	.0380	1.23	141.70
	118	.099	1.49	303.0	19	.0310	0.66	121.80
					18*	.3830	16.6	28.20
					5	.2570	3.2	151.50
					128	.0009	0.66	124.30
					130	.0260	2.73	90.15
Pir	2	.024	0.80	408.8	24	.2080	5.50	215.90
0.5mM	7	.245	3.20	505.0	69	.0180	1.60	238.70
+Ca2+	119	.106	1.50	283.0	115*	1.257	12.0	391.83
427nM					23	.1460	2.70	74.60
					22*	.3510	12.7	12.60
					129	.0530	3.22	148.63
					131	.2750	0.25	312.40
Pir	9	.050	0.68	180.1	26	.1070	1.50	120.00
5mM	57	.000	1.08	173.0	25	.1460	5.30	91.24
	8	.209	2.45	572.0	27	.1930	3.20	145.70
Glut	13	.050	1.60	453.6	31	.0690	4.30	116.80
1mM	12	.283	2.00	517.1	30	.1050	3.03	137.00
	11	.137	2.44	416.8	28	.0100	1.12	160.83
	10	.213	2.21	499.4	29	.0620	6.60	195.00
Glut	15	.034	0.36	281.1	3*	.7760	3.30	231.00
1mM	14	.125	2.28	465.4	33	.2070	6.00	253.40
+Ca2+	68	.026	0.16	278.4	32	.0300	1.60	221.20
427nM								
Glut	17	.270	1.50	511.3	36	.0320	1.60	143.00
10mM	16	.161	8.20	314.0	35*	.4750	9.70	227.15
					34	.1940	8.70	103.10

No = número de experimento

Co = coeficiente de control de flujo (regresión no lineal)

Kd = constante de disociación

Eo = concentración de enzima total

* = curva discriminada

TABLA 2 Continuación

RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DE LAS CURVAS DE TITULACION Y EL ANALISIS NO LINEAL.

	OLIGOMICINA				MERSALIL			
	No.	Co.	Kd	Eo	No.	Co	Kd	Eo
Pir	124	.074	0.18	45.1	61	.275	.055	4.8
0.5mM	40*	.034	0.11	38.7	60	.137	.110	5.6
	39	.300	0.36	40.4	116*	.000	.002	12.0
	38	.462	0.35	45.0	126	.006	.004	9.6
Pir	4	.150	0.20	57.2	104	.117	.041	14.0
0.5mM	41	.271	0.01	71.3	108	.020	.002	13.2
+Ca2+	42	.191	0.40	81.4	117	.092	.027	13.2
427nM	121*	.733	0.03	97.1	127	.265	.001	15.6
	125	.151	0.09	70.9				
Pir	44	.218	0.68	38.8	62	.264	.120	5.02
5mM	6*	.770	0.27	59.0	63	.369	.050	5.97
	43	.300	0.10	46.6				
Glut	49	.126	0.14	68.8	64	.339	.050	9.4
1mM	48*	.504	1.30	81.7	66	.149	.050	5.9
	47	.294	0.01	65.5				
	45	.071	0.32	58.2				
Glut	51	.240	0.86	53.3				
1mM	50	.075	0.16	51.6				
+Ca2+	52	.046	0.16	75.3				
Glut	55	.230	0.93	52.8	67	.226	.080	7.4
10mM	54	.070	0.49	25.1				
	53*	.739	0.00	71.8				

TABLA 2 Continuación
 RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DE LAS CURVAS DE TITULACION Y
 EL ANALISIS NO LINEAL.

ANTIMICINA					CINAMATO			
	No.	Co.	Kd	Eo	No.	Co	Kd	Eo
Pir	122	.087	.024	181.87	132	.0580	0.31	1.13
0.5mM	70	.038	.016	180.60	133	.0205	0.06	2.56
	100	.039	.016	180.70				
	102*	.053	.331	154.80				
	111	.094	.198	166.40				
	112	.163	.010	216.33				
Pir		.123	.108	160.00				
0.5mM	101	.116	.095	162.50				
+Ca2+	105	.103	.048	188.80				
	110*	.041	.393	110.70				
	113	.280	.152	187.50				
	123	.085	.555	144.41				
Pir	109	.159	.001	133.53				
5mM	103	.079	.001	152.80				
	137	.009	.017	149.40				
Glut 1mM	106	.207	.005	183.70				
Glut 10mM	135	.141	.066	230.10				
	138	.021	.001	153.70				

TABLA 3

RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DE LAS CURVAS DE TITULACION Y EL ANALISIS LINEAL.

CARBOXIATRACTILOSIDO				ROTENONA		
	No.	Ci	Imax	No.	Ci	Imax
Pir	58*	.47	606.0	128	0.51	600.00
0.5mM	1	.38	666.7	5	1.92	666.70
	56	.32	424.2	18*	2.21	363.60
	118	.40	650.0	19	0.78	393.90
				20	0.63	666.70
				21*	0.57	666.70
				114	0.65	650.00
				130	0.59	600.00
Pir	2	.16	606.0	22*	1.73	363.60
0.5mM	7	.32	909.0	23	0.30	424.20
+Ca2+	119	.52	650.0	24	0.19	606.00
				69	0.36	575.70
				115*	1.70	650.00
				129	0.64	600.00
				131	0.79	600.00
Pir	8	.16	849.0	25	1.31	606.00
5mM	9	.36	666.7	26	2.76	515.10
	57	.00	484.8	27	0.54	484.80
Glut	10	.40	757.6	28	0.84	606.00
1mM	11	.34	909.1	29	2.52	757.60
	12	.57	787.9	30	0.60	454.50
	13	.21	787.9	31	0.51	545.40
Glut	14	.25	848.5	3*	1.22	363.60
1mM	15	.19	545.4	32	0.55	727.30
+Ca2+	68	.00	484.8	33	0.82	545.50
Glut	16	.42	727.3	34	1.82	697.00
10mM	17	.00	757.6	35*	0.84	484.80
				36	0.51	606.00

No = número de experimento

Ci = coeficiente de control de flujo (regresión lineal)

Imax=cantidad mínima de inhibidor con la que se obtiene la máxima inhibición, asumiendo inhibidores de tipo irreversible, Imax=cantidad de enzima total.

* = curva discriminada

TABLA 3 Continuación

RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DE LAS CURVAS DE TITULACION Y EL ANALISIS LINEAL.

	OLIGOMICINA			MERSALIL		
	No.	Ci	Imax	No.	Ci	Imax
Pir	37	0.26	113.3	60	0.21	9.70
0.5mM	38	0.87	83.1	61	0.38	11.50
	39	0.85	83.1	116*	0.11	18.00
	40*	0.30	83.1	126	0.00	20.00
	120	.114	130.0			
	124	.026	120.0			
Pir	41	0.26	83.1	104	0.18	18.20
0.5mM +Ca ²⁺	4	0.22	83.1	108	0.12	16.96
	42	0.47	113.1	117	0.39	18.00
	121*	0.39	120.0	127	0.26	20.00
	125	0.43	120.0			
Pir	43	0.63	75.5	62	0.41	9.70
5mM	6*	1.03	75.5	63	0.74	12.10
	44	2.66	105.7			
Glut 1mM	45	0.41	128.4	64	0.43	9.70
	47	0.31	83.1	65	0.13	9.70
	48*	0.36	113.3	66	0.74	12.10
	49	0.74	98.2			
Glut 1mM +Ca ²⁺	50	0.55	113.3			
	51	0.29	113.3			
	52	0.01	113.3			
Glut 10mM	53*	0.84	90.6	67	.104	9.70
	54	0.27	83.1			
	55	0.33	90.6			

TABLA 3 Continuación

RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DE LAS CURVAS DE TITULACION Y EL ANALISIS LINEAL.

	ANTIMICINA			CINAMATO		
	No.	Ci	Imax	No.	Ci	Imax
Pir	100	0.280	212.1	132	0.059	30.3
0.5mM	102*	0.110	181.8	133	0.981	42.4
	111	0.296	242.4			
	112	0.528	300.0			
	122	0.063	300.0			
Pir	101	0.002	181.8			
0.5mM	105	0.158	212.1			
	110*	0.019	242.4			
	113	0.030	300.0			
	123	0.050	300.0			
Pir	109	0.008	151.5			
5mM	103	0.050	181.8			
Glut	106	0.000	242.4			
1mM						

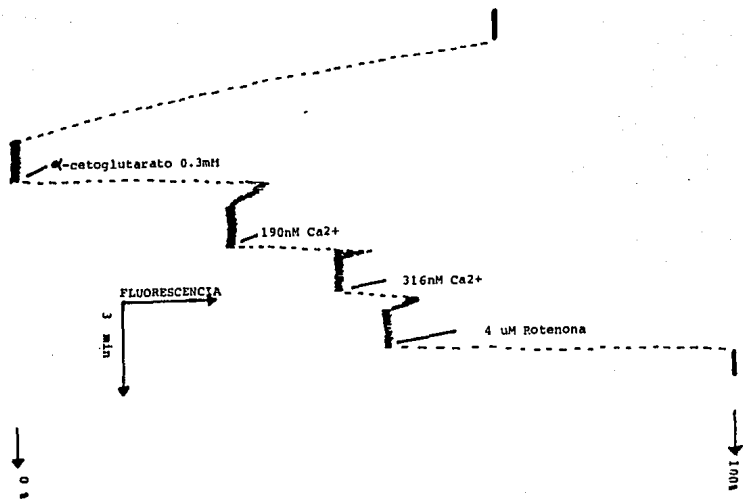


Fig. 1 Efecto del calcio sobre la α -cetoglutarato deshidrogenasa. Las mitocondrias de cerebro fueron incubadas en 2.5ml del medio AB durante varios minutos en un espectrofluorómetro a 340nm de excitación y 460nm de emisión a 30°C y 100% de O₂. Una vez alcanzado el estado basal de fluorescencia (0%), equivalente al consumo total de NADH endógeno, se agregó α -cetoglutarato como sustrato y las concentraciones de calcio indicadas. El 100% de fluorescencia se obtuvo calibrando con rotenona.

TABLA 4

‡ DE LA ACTIVIDAD DE LA α -CETOGLUTARATO
DESHIDROGENASA

CONTROL	190 nM Ca ²⁺	316 nM Ca ²⁺
19.3 \pm 7.5 (3)	34 \pm 10 (3)	44.5 \pm 7 (3)

Tabla 4 . Se midió la actividad de la α -cetoglutarato deshidrogenasa en presencia de calcio como se describe en la metodología. Los valores representan $X \pm E.S.$ (n).

análisis, por no ajustarse, ya sea a la media o a los parámetros evaluados por las regresiones.

Efecto del calcio sobre la α -cetoglutarato deshidrogenasa

Según Hansford [2] y Denton y McCormack [3], una de las tres enzimas reportadas sensibles a calcio es la α -cetoglutarato deshidrogenasa. Se evaluó el efecto del calcio sobre esta enzima, como se describe en la metodología. A concentraciones crecientes de calcio (Fig. 1) se dió un incremento (expresado en por ciento) de la actividad de esta enzima. Este resultado comprobó que existe un efecto directo del calcio sobre al menos una de las tres deshidrogenasas del ciclo de Krebs.

La Tabla 4 muestra el incremento en por ciento de la actividad de la α -cetoglutarato deshidrogenasa cuando se incrementa la concentración de calcio. Utilizando α -cetoglutarato 0.3mM como sustrato, la enzima presentó una actividad del 19%. Esta actividad aumentó hasta un 44% con 316nM de Ca^{2+} .

Efecto del calcio, la concentración saturante y el tipo de sustrato sobre la respiración.

Se utilizó una concentración de calcio en el rango fisiológico (427nM) y dentro del intervalo de concentraciones a las cuales este ion produce estimulación de la respiración de estado 3 [2,3] (Tabla 5). Se evaluó el efecto del calcio así como de sustrato saturante, tanto en el sistema piruvato/malato, como

TABLA 5

VELOCIDADES ABSOLUTAS DE RESPIRACION EN MITOCONDRIAS DE CEREBRO

	PIRUVICO 0.5mM	PIRUVICO 0.5mM+Ca ²⁺	PIRUVICO 5 mM
ESTADO 4	19 ± 6 (20)	21.5 ± 5 (15)	26 ± 8 (15)
ESTADO 3	69 ± 22 (20)	106.4 ± 24 (15)	95 ± 35 (15)
ADP/O	2.16 ± 0.3 (14)	1.97 ± 0.4 (11)	2 ± 0.3 (12)
	GLUTAMICO 1mM	GLUTAMICO 1 mM+Ca ²⁺	GLUTAMICO 10 mM
ESTADO 4	21 ± 6 (19)	23 ± 5 (17)	22 ± 4 (17)
ESTADO 3	63 ± 17 (19)	84 ± 12 (18)	83 ± 14 (18)
ADP/O	1.87 ± 0.3 (19)	1.60 ± 0.2 (9)	1.79 ± 0.3 (15)

Tablas . Se midió la velocidad de la respiración como se describe en la metodología. Los valores representan la media, $\bar{X} \pm$ error estandar (E.S.) (n=número de experimentos)

en el sistema glutamato/malato. El calcio estimuló la respiración en estado 3 con ambos sustratos a concentraciones no saturantes.

Este efecto, aunque en menor escala, también fue observado cuando se utilizaron concentraciones saturantes de sustrato. Tanto el calcio como las concentraciones saturantes no alteraron la respiración en estado 4.

El efecto de la estimulación no fue debido a un desacoplamiento mitocondrial ya que los valores de ADP/O, se mantuvieron mas o menos constantes, indicando una preparación mitocondrial intacta. Estas mediciones fueron hechas en ausencia de Mg^{2+} , ya que se observó que con 1mM de este catión, se daba un incremento en la respiración, debido quizá, a la presencia de ATPasas de Mg^{2+} contaminantes en la preparación.

Potencial Transmembranal

con safranina

Se evaluó el efecto de ambos sustratos (piruvato y glutamato), a concentración fisiológica y saturante y tanto en presencia como en ausencia de calcio sobre el potencial transmembranal. Como se observa en la **figura 2**, el potencial transmembranal no se abate con las concentraciones de ADP ni de Ca^{2+} empleadas. Se utilizó CCCP y rotenona para calibrar la señal (cero de potencial). La diferencia que se observa entre el inicio (M) y la calibración, es debida quizá a la presencia de sustratos endógenos. El efecto del calcio así como de la concentración de sustrato es el mismo para ambos sustratos como se observa tanto en

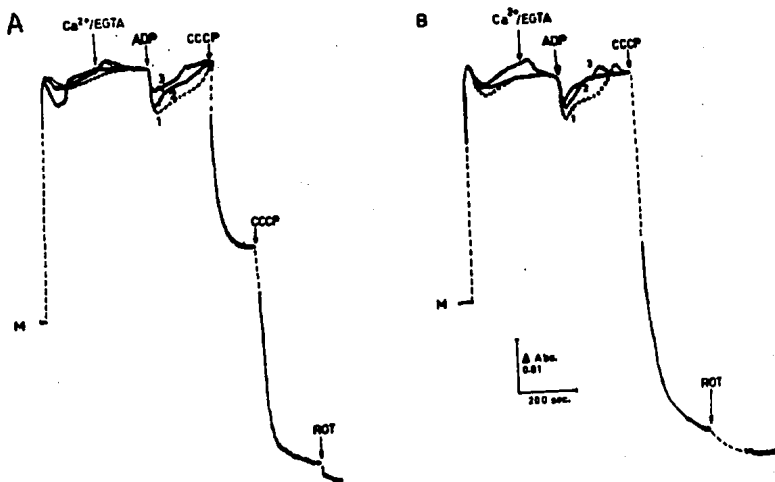


Fig. 2 Potencial Transmembranal. Se incubaron las mitocondrias (1mg/ml) en 2.5ml del medio AB con $10\mu M$ de safranina. A: Malato 2mM + (1)pirúvico 0.5mM, (2) pirúvico 0.5mM + 363nM Ca^{2+} y (3) pirúvico 5mM. B: Malato 5mM + (1)glutámico 1mM, (2) glutámico 1mM + 363nM Ca^{2+} y (3) glutámico 10mM. Se utilizó una concentración de ADP de $640\mu M$. Las señales fueron calibradas con $2\mu M$ de CCCP y $1\mu M$ de rotenona.

A como en B. Los trazos 1. se hicieron en presencia de pirúvico 0.5mM (+ 2mM de Malato) sin calcio y la caída con el ADP es mas pronunciada que en los trazos 2, que son los realizados en presencia de calcio. La caída menor se observa en los trazos 3, para ambos sustratos. Aunque estas diferencias pudieran ser significativas, un análisis mas cuantitativo podría aclararlas. Por esto, se realizaron mediciones del potencial transmembranal con TPP(tetrafenil fosfonio) marcado radiactivamente.

Potencial Transmembranal

con TPP⁺

La tabla 6 muestra los resultados obtenidos por el método radiactivo. Se midieron los potenciales para el estado 4 y el estado 3 de la respiración, utilizando pirúvico como sustrato. Se evaluó el efecto de varias concentraciones de calcio asi como concentración saturante de sustrato (pirúvico 5mM). Las lecturas fueron corregidas con CCCP y rotenona. La evaluación de los datos, por la ecuación de Nernst, fue cotejada con el análisis propuesto por Rottenberg [69] tomando en cuenta los coeficientes de partición para el TPP y suponiendo estos coeficientes (obtenidos para higado) iguales en cerebro. No se encontraron diferencias marcadas tanto en presencia de calcio como con pirúvico 5mM, ni en el estado 4 ni en el estado 3 evaluados. Esto está indicando que no hay cambio en cuanto a $\Delta\psi$ cuando se estimula la fosforilación oxidativa via el calcio o el incremento en la concentración de sustrato para las deshidrogenasas del ciclo de Krebs. Parece ser entonces que, la disminución en el potencial transmembranal que

TABLA 6

MEDICION DEL $\Delta\Psi$ POR TPP⁺

	Ecuacion Nernst		Correccion H.Rottenberg [82]	
	RESPIRACION Estado 4 (mV)	Estado 3 (mV)	RESPIRACION Estado 4 (mV)	Estado 3 (mV)
Piruvico 0.5mM	165±1.0(4)	155±3.0(4)	125±1.8(4)	114±3.0(4)
Piruvico 0.5mM + 363nM Ca2+	159 (2)	166 (2)	121 (2)	122 (2)
Piruvico 0.5mM + 447nM Ca2+	155 (2)	150 (2)	119 (2)	112 (2)
Piruvico 0.5mM + 513 nM Ca2+	159±7.0(4)	152±5.7(4)	121±4.4(4)	113±4.3(4)
Piruvico 5mM	162±8.2(4)	158±7.4(4)	125±4.0(4)	117±7.3(4)
0.5uM CCCP 0.5uM Rotenona			78±3.7(4)	71±3.8(4)

Tabla 6. Potencial transmembranal con TPP⁺. Se midió la distribución del tetrafenilfosfonio (TPP⁺) después de incubar a las mitocondrias con 6 uM [3H]TPP⁺ como se indica en la metodología. Los valores obtenidos con la ecuación de Nernst fueron corregidos con 0.5 uM de CCCP y 0.5 uM de rotenona. Los valores obtenidos a partir de la corrección de H.Rottenberg involucran los coeficientes de partición del TPP a ambos lados de la membrana interna mitocondrial. Los valores representan la X ± D.S. (n).

podiera haber sido inducida por un incremento en el flujo, fue contrarrestada por la activación de las deshidrogenasas ya sea por calcio, o por incremento en su sustrato[50].

Efecto del calcio sobre la Síntesis de ATP

Al estimular a las deshidrogenasas con calcio, se aprecia un incremento en la velocidad de respiración y por tanto, en la fosforilación oxidativa. Para observar una estimulación directa sobre el sistema fosforilante, se midió la síntesis de ATP en presencia y ausencia de calcio (Tabla 7). Utilizando pirúvico 0.5mM como sustrato (+ 2mM de Malato), la síntesis de ATP es de 145.3 nmol/mg/min. En presencia de 427nM de Ca²⁺, esa síntesis llega a 187.2 nmol/mg/min. Se encontró un incremento en la síntesis de ATP por calcio de un 30%.

El valor de ATP obtenido en la Tabla 1, para el control (139nmol ATP/mg/min), fue similar al encontrado experimentalmente (145nmol ATP/mg/min); sin embargo, el valor obtenido con 427nM de Ca²⁺ (210nmolATP/mg/min) fue mayor que el experimental (187nmolATP/mg/min). Esto puede deberse a que en el experimento representativo de la Tabla 1 se dió una estimulación del 95%, mientras que el promedio de los experimentos para la síntesis de ATP fue del 30% de estimulación.

TABLA 7

SINTESIS DE ATP (nmol/mg/min)

Pirúvico 0.5 mM	Pirúvico 0.5 mM + 427 nM Ca ²⁺
145 ±8.5 (20)	187 ±7.4 (20)

Tabla 7 . Se midió la síntesis de ATP como se indica en la metodología. Los valores representan la $X \pm E.S.$ (n).

Parámetros evaluados para cada enzima**Acarreador ATP/ADP**

La **Tabla 8.A** muestra los datos obtenidos para el acarreador de adenin nucleótidos. Con pirúvico 5mM el C_o (coeficiente de control de flujo) bajó de 0.11 a 0.08, es decir, la estimulación por incremento de sustrato de las deshidrogenasas (DHS) provocó que el control de la Translocasa disminuyera. Sin embargo, con calcio no se afectó este coeficiente, lo cual indica que el calcio no afectó directamente al acarreador. Si el calcio estuviera activando sólo a las deshidrogenasas del ciclo de Krebs, cabría esperar que los coeficientes de control obtenidos en presencia de calcio fueran iguales a los obtenidos cuando se incrementa el sustrato, que también activa a estas deshidrogenasas.

Con glutámico 1mM se observó un coeficiente mayor (0.17) que con pirúvico (0.11). Al añadir calcio, este coeficiente disminuyó considerablemente (0.06) lo cual indica un efecto directo del calcio sobre el acarreador, ya que el efecto con glutámico 10mM fué diferente (0.21). Este efecto activador del calcio observado con glutamato, no se observó con pirúvico. Esto puede deberse a las velocidades de respiración en estado 3 con ambos sustratos; es decir, la velocidad alcanzada con pirúvico+Ca²⁺ es mucho mayor (106ngAtO₂/mg/min) que la alcanzada con glutámico+Ca²⁺ (84 ngAtO₂/mg/min). El que la fosforilación oxidativa esté más activada con pirúvico podría estar "encubriendo" el efecto del calcio sobre la translocasa de ATP/ADP. Los C_i (regresión lineal)

TABLA 8

RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DEL ANALISIS DE LA TABLA 6

ACARREADOR ATP/ADP			
	Pyr 0.5mM	Pyr+Ca2+	Pyr 5mM
Regresión no lineal:			
Co	.11±.00(3)	.12±.06(3)	.08±.06(3)
Kd	2.0±.94(3)	1.8±.71(3)	1.4±.53(3)
Eo	336±20.6(3)	400±64.2(3)	308±131.8(3)
Regresión lineal:			
Ci	.36±.02(3)	.33±.10(3)	.17±.10(3)
Imax	580±78.2(3)	722±94.5(3)	667±105.1(3)
Síntesis de ATP:			
Co	.13(1)	.07(1)	
Kd	1.76(1)	0.88(1)	
Eo	299(1)	256(1)	
	Glut 1mM	Glut+Ca2+	Glut 10mM
Regresión no lineal:			
Co	.17±.05(4)	.06±.03(3)	.21(2)
Kd	2.1±.17(4)	0.9±.67(3)	4.8(2)
Eo	472±22.6(4)	342±61.8(3)	413(2)
Regresión lineal:			
Ci	.38±.07(4)	.15±.07(3)	.21(2)
Imax	811±33.6(4)	626±112.5(3)	742(2)

Tabla 8. Los valores presentados son las medias obtenidas a partir de la tabla 6 ± E.S. De las alícuotas tomadas durante las titulaciones para obtener los datos de síntesis de ATP, cada lectura dada, como se describe en la metodología, se normalizó al 100% y se hicieron las curvas cuyo análisis se presenta aquí.

obtenidos mostraron la misma tendencia que los Co (regresión no lineal), aunque los números fueron mayores.

Acarreador de Fosfatos

Existió un aumento en el Co (Tabla 8.B) cuando se incrementó el pirúvico mientras que con calcio no se observó este efecto. El incremento en la actividad de las deshidrogenasas aumentó el control del acarreador de fosfatos; sin embargo, la activación de las deshidrogenasas por el calcio no afectó el control del acarreador. Los Ci estuvieron congruentes con los Co. El Co obtenido por síntesis de ATP (en presencia de calcio) fue similar (0.13) al obtenido por la respiración en estado 3 (0.12).

Cuando se incrementó el glutámico, no se observó un aumento en el Co del acarreador. Los resultados obtenidos con pirúvico fueron diferentes a los obtenidos con glutámico.

ATP sintetasa

Al estimular la fosforilación oxidativa con calcio (Tabla 8.C) el Co de la ATP sintetasa (0.22) disminuyó ligeramente. Cuando se estimularon las deshidrogenasas con pirúvico 5mM, el Co obtenido (0.26) fue mayor, indicando un aumento en el control de esta enzima. Esto fue más evidente con la regresión lineal. Los valores de Co obtenidos con la síntesis de ATP fueron menores que los obtenidos por respiración.

Con glutámico 10mM no se observó el mismo efecto que con pirúvico 5mM, mientras que el calcio disminuyó ligeramente el control de la enzima sobre la vía (0.12). Los Ci obtenidos por

TABLA 8 Continuación

RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DEL ANALISIS DE LA TABLA 6

Acarreador de fosfatos			
	Pirúvico 0.5mM	Pirúvico + Ca2+	Pirúvico 5mM
Regresión no lineal:			
Co	.14±.07(3)	.12±.05 (4)	.32(2)
Kd	.06±.03(3)	.02±.005(4)	.08(2)
Eo	6.7±1.5(3)	14±.57 (4)	5.5(2)
Regresión lineal:			
Ci	.19±.11(3)	.24±.05(4)	.57(2)
Imax	14±3.2(3)	18±.63(4)	11(2)
Síntesis de ATP:			
Co	.02(2)	.13(2)	
Kd	.02(2)	.01(2)	
Eo	12(2)	14(2)	
Glutámico 1mM Glutámico + Ca2+ Glutámico 10mM			
Regresión no lineal:			
Co	.24 (2)		.23(1)
Kd	.05 (2)		.08(1)
Eo	7.6 (2)		7.4(1)
Regresión lineal:			
Ci	.43 (2)		.10(1)
Imax	10 (2)		10(1)

TABLA 8 Continuación

RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DEL ANALISIS DE LA TABLA 6

ATP sintetasa

	Pirúvico 0.5 mM	Pirúvico + Ca ²⁺	Pirúvico 5mM
Regresión no lineal:			
Co	.22±.07(5)	.19±.02(4)	.26(2)
Kd	.31±.03(5)	.17±.08(4)	.39(2)
Eo	45±1.18(5)	70±5.0(4)	43(2)
Regresión lineal:			
Ci	.42±.18(5)	.34±.06(4)	1.6(2)
Imax	106±9.6(5)	100±9.8(4)	90(2)
Síntesis de ATP:			
Co	.14(2)	.14(2)	
Kd	.37(2)	.26(2)	
Eo	69(2)	68(2)	
	Glutámico 1mM	Glutámico + Ca ²⁺	Glutámico 10mM
Regresión no lineal:			
Co	.16±.06(3)	.12±.05(3)	.15(2)
Kd	.16±.08(3)	.39±.23(3)	.71(2)
Eo	64±3.1(3)	60±7.6(3)	39(2)
Regresión lineal:			
Ci	.48±.12(3)	.28±.15(3)	.30(2)
Imax	103±13.3(3)	113±.00(3)	87(2)

regresión lineal mostraron la misma tendencia que los C_o , aunque los número fueron mayores.

Sitio 1 de la cadena respiratoria

Con calcio se observó un incremento en el C_o para esta enzima (Tabla 8.D) de 0.06 a 0.14. Este incremento fue igual que con pirúvico 5mM. Esto sugiere un efecto dado solamente al estimular a las DHs. Los C_i obtenidos fueron grandes, esto era de esperarse ya que muchas de las curvas de titulación con rotenona son hiperbólicas; si se sigue el análisis de los primeros puntos de la curva, la pendiente resultante es muy grande y, por tanto, observando la ecuación por regresión lineal, los C_i obtenidos también lo son. El C_o obtenido por síntesis de ATP con pirúvico 0.5mM + Ca^{2+} apoya al obtenido por respiración.

Con calcio o con sustrato saturante se observó el mismo efecto para glutámico que para pirúvico. Esto fue igual utilizando la regresión lineal.

Sitio 2 de la cadena respiratoria

Al igual que para el Sitio 1, se observó un incremento en los C_o al añadir Ca^{2+} o sustrato a concentración saturante (Tabla 8.E). Esto estuvo apoyado por los datos de síntesis de ATP, aunque en este último, las K_d obtenidas tuvieron un orden de magnitud menor. Los C_i obtenidos por regresión lineal mostraron resultados diferentes. El efecto fue contrario: los C_i disminuyeron en presencia de calcio o con Pirúvico 5mM. Esto mismo

TABLA 8 Continuación

RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DEL ANALISIS DE LA TABLA 6

SITIO 1 DE LA CADENA RESPIRATORIA

	Pirúvico 0.5mM	Pirúvico + Ca ²⁺	Pirúvico 5mM
Regresión no lineal:			
Co	.06±.04(6)	.14±.04(5)	.15±0.02(3)
Kd	1.8±.44(6)	2.6±.87(5)	3.3±1.09(3)
Eo	136±13.4(6)	198±40.4(5)	119±15.7(3)
Regresión lineal:			
Ci	.85±.21(6)	.46±.11(5)	1.5±.64(3)
Imax	596±42.3(6)	561±34.6(5)	535±36.4(3)
Síntesis de ATP:			
Co	.009(2)	.13(2)	
Kd	2.12(2)	1.66(2)	
Eo	152(2)	242(2)	
	Glutámico 1mM	Glutámico + Ca ²⁺	Glutámico 10mM
Regresión no lineal:			
Co	.06±.01(4)	.12(2)	.11(2)
Kd	3.8±1.15(4)	3.8(2)	5.1(2)
Eo	152±16.8(4)	237(2)	123(2)
Regresión lineal:			
Ci	1.1±.47(4)	.68(2)	1.2(2)
Imax	591±63.7(4)	636(2)	651(2)

TABLA 8 Continuación

RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DEL ANALISIS DE LA TABLA 6

Sitio II de la Cadena Respiratoria
Complejo bC1

	Pirúvico 0.5mM	Pirúvico + Ca ²⁺	Pirúvico 5mM
Regresión no lineal:			
Co	.08±.016(5)	.14±.03 (5)	.12(3)
Kd	.10±.05 (5)	.19±.09 (5)	.00(3)
Eo	180±8.45(5)	169±8.54(5)	143(3)
Regresión lineal:			
Ci	.26±.07 (5)	.06±.03 (5)	.03(3)
Imax	247±21.5(5)	248±30.3(5)	167(3)
Síntesis de ATP:			
Co	.05(2)	.11(2)	
Kd	.01(2)	.01(2)	
Eo	218(2)	193(2)	
	Glutámico 1mM	Glutámico + Ca ²⁺	Glutámico 10mM
Regresión no lineal:			
Co	.21(1)		.08(2)
Kd	.00(1)		.033(2)
Eo	184(1)		192(2)
Regresión lineal:			
Ci	.00(1)		.13(2)
Imax	242(1)		242(2)

se observó con glutámico: al estimular con glutámico 10mM, el C_o obtenido bajó, mientras que por regresión lineal se observó un aumento considerable.

Los resultados obtenidos de la Tabla 8, en general, apoyaron la idea de una estimulación por calcio y/o sustrato saturante. Los valores de K_d y E_o sirvieron como parámetros que aportaron mayor confiabilidad a los C_o obtenidos.

Concentración de algunas enzimas de la fosforilación oxidativa en mitocondrias de cerebro

De los datos obtenidos con el programa de regresión no lineal [20] se puede conocer la concentración de enzima total (E_o). La tabla 9 muestra las concentraciones encontradas para mitocondrias de cerebro de las enzimas involucradas en la fosforilación oxidativa, que fueron evaluadas por análisis no lineal.

El acarreador ATP/ADP muestra una concentración de 381 pmol/mg de proteína; en hígado [26] esta concentración varía entre 120 y 300, mientras que para corazón está entre 1360 y 1500 y riñón tiene 613 pmol/mg de proteína.

La ATPsintetasa tuvo una concentración de 56, mientras que en hígado, riñón y corazón es de 283-390, 178 y 216-260, respectivamente [26].

TABLA 9

CONCENTRACIONES DE ALGUNAS ENZIMAS QUE INTEGRAN LA FOSFORILACION OXIDATIVA EN MITOCONDRIAS DE CEREBRO A PARTIR DE LA TITULACION CON LOS INHIBIDORES Y DEL PROGRAMA DE REGRESION NO LINEAL.

ENZIMA	CONCENTRACION (pmol/mg proteína)			
	\bar{X}	\pm	E.S.	(n)
Acarreador ATP/ADP	381.5		28	(18)
ATP sintetasa	55.7		3.6	(17)
Acarreador de Pi	9140		1150	(12)
Sitio I	159		12.7	(22)
Sitio II	172		6.1	(13)
Sitio III	0.236*		0.12	(5)
Acarreador de Piruvato	3.95*		0.9	(3)

* Estas concentraciones están expresadas en μM debido a que los inhibidores utilizados son del tipo no competitivo.

El acarreador de fosfatos tuvo una concentración de 9.14nmol/mg de proteína mientras que para hígado es de 7.8; riñón, 7.1 y corazón, 5.7.

El sitio 1 de la cadena respiratoria presenta una concentración de 159pmol/mg de proteína, parecida a la de hígado que es de 180; la concentración en riñón es de 86, mientras que para corazón se ha encontrado, que varía, entre 80, 172 y 400 [26].

El sitio 2 de la cadena respiratoria, en mitocondrias de cerebro tuvo una concentración de 172 pmol/mg de proteína. Para este sitio, en riñón, la cantidad es de 60 mientras que en corazón va de 127 a 300.

Las concentraciones de enzima encontradas en mitocondrias de cerebro están en concordancia ya sea con las encontradas en hígado, riñón o corazón; sin embargo, la concentración de la ATPsintetasa es mucho menor en este órgano que en los otros. Una posible interpretación de este hecho podría ser que esta enzima es reguladora (debido a los coeficientes de control de flujo encontrados para ella), independiente o dependientemente del número de copias que presenta.

DISCUSSION

DISCUSION

Los estudios cuantitativos en la regulación de la fosforilación en mitocondrias aisladas de mamíferos, [22,31,34,72,73] han demostrado que existen varios pasos o enzimas que son limitantes en la vía, como lo muestran los coeficientes de control de flujo del acarreador de adenín nucleótidos, la ATP sintetasa, la citocromo oxidasa, el complejo bCl y el acarreador de dicarboxílicos; estos coeficientes varían desde 0.1 hasta 0.4. Sin embargo, la mayoría de estos estudios fueron realizados utilizando concentraciones saturantes de sustrato, minimizando la posible participación de las deshidrogenasas dependientes de NAD (DHs).

Deshidrogenasas del Ciclo de Krebs

Se ha propuesto que la actividad de estas deshidrogenasas pudiera controlar la fosforilación oxidativa in vivo; una activación de estas DHs elevaría la relación NADH/NAD maximizando el potencial redox para la síntesis de ATP y el flujo sin disminuir el potencial de fosforilación citosólico y la relación ATP/ADP [32,39,74]. A este respecto, se sabe que las variaciones en la actividad de las DHs son moduladas por los cambios en el calcio libre de la matriz mitocondrial, que resultan de las variaciones del calcio libre extramitocondrial o citosólico [2,3].

Estudios realizados en hígado aislado [74] y mitocondrias de corazón [32] incubadas con bajas concentraciones de α -cetoglutarato y glutamato, mostraron que un incremento en la disponibilidad del calcio resultaba en un incremento en el flujo con un cambio mínimo en el nivel de NADH [32]. Se sugirió entonces que el calcio podía activar ambos sistemas, el fosforilante (acarreador ATP/ADP, acarreador de fosfatos y la ATPsintetasa) y la α -cetoglutarato deshidrogenasa [32]. Como se observa en la **Tabla 5** no se vió estimulación por calcio, ni por el incremento en la concentración de sustratos, sobre el estado 4 de la respiración mitocondrial, tampoco se vió afectado por las titulaciones con los inhibidores.

Para el estado 3 de la respiración en mitocondrias de hepatoma AS-30D [75], el acarreador de adenín nucleótidos ($C_i=0.70$) y la ATP sintetasa ($C_i= 0.19-0.32$) tuvieron un control significativo tanto con glutamato 10mM-Malato 3mM, piruvato 5mM-Malato 3mM como con succinato 10mM-rotenona 2 μ M y a concentraciones fisiológicas de glutámico y pirúvico. El C_i fue obtenido de acuerdo con Groen y cols [22]. Aquí se corroboró que la permeabilidad pasiva a protones de la membrana interna mitocondrial es el paso que ejerce mayor control (0.8) para el estado 4 de la respiración mitocondrial [75].

En mitocondrias de hígado Vignais [73] vió que el control de la fosforilación oxidativa se encuentra distribuido en varios sitios, siendo el acarreador de adenín nucleótidos y el suplemento

de substratos respiratorios los mas importantes para estados activos. Contrario a hígado, en corazón, la ATPsintetasa y las NADH deshidrogenasas ejercen un control significativo mientras que el acarreador de ATP/ADP no tiene control alguno, para el estado 3 (con 10mM de P_i , pirúvico 7mM-Malato 0.7mM); esta diferencia en ambos tejidos podría deberse a la variación del contenido enzimático: en mitocondrias de hígado existen 0.2-0.3 $\mu\text{mol/g}$ de proteína de acarreador mientras que en corazón existen 1.0-1.2 $\mu\text{mol/g}$ de proteína; así, la proporción de acarreador por F1-ATPasa es aproximadamente 2 en hígado y de 4-5 en corazón, explicando tal vez esto, la diferencia en cuanto a la distribución del control en los dos tejidos.

En cuanto a cerebro, existe una proporción de 6.5:1 de acarreador de ATP/ADP por ATPsintetasa (Tabla 9), es decir, una proporción elevada como en corazón. Al igual que en corazón, el control de la fosforilación oxidativa en mitocondrias de cerebro lo ejercen principalmente las DHs del ciclo de Krebs y la ATPsintetasa, mientras que el acarreador de ATP/ADP no tiene un control comparable con estos dos. Esto es en condiciones fisiológicas de sustrato, piruvato 0.5mM.

Ya en otros trabajos [22,34,73] se ha mencionado que el control de la fosforilación oxidativa no necesariamente recae sobre un solo paso o enzima aislada, sino que está distribuido sobre varios sitios, dependiendo, entre otras cosas, del estado estacionario, tipo de mitocondria y los niveles de ADP, P_i o Ca^{2+} [26].

En esta tesis se observó que el control se encuentra distribuido a lo largo de las enzimas que conforman el sistema oxidativo y el fosforilante, predominantemente las deshidrogenasas dependientes de NAD y la ATP sintetasa cuando se utiliza pirúvico como sustrato. El control que ejercen las deshidrogenasas se calculó a partir del teorema de la sumatoria [14] el cual establece que la suma de los coeficientes de control de flujo que integran una vía metabólica debe dar la unidad. Si sumamos los coeficientes obtenidos a partir de la Tabla 8, tenemos que :

Resumen de Datos

COEFICIENTES DE CONTROL DE FLUJO DE LAS ENZIMAS QUE COMPONEN LA FOSFORILACION OXIDATIVA

	SITIO 1	SITIO 2	SITIO 3	TRANSP. Piruv.	TRANS. ATP/ADP	ATP Sint.	TRANSP. Pi	ΣCo	DHs
PIRUVICO									
0.5mM	.06	.05	.10	.04	.11	.22	.10	.68	.32
+ Ca ²⁺	.14	.11	.08	.03	.12	.19	.12	.80	.20
5mM	.15	.08	.11	.04	.09	.26	.32	1.01	.00
GLUTAMICO									
1mM	.06	.21			.17	.16	.24	.84	.16
+Ca ²⁺	.12				.06	.12			
10mM	.11	.08	.10		.21	.15	.23	.88	.12

Como puede observarse, para pirúvico 0.5mM, aplicando el teorema de la sumatoria, el control de las deshidrogenasas es de 0.32 que, junto con la ATPsintetasa(0.22), serían las enzimas que ejercen mayor control bajo estas condiciones.

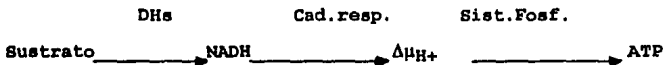
α -cetoglutarato deshidrogenasa

Para poder observar el efecto de cada una de las deshidrogenasas sensibles a calcio sobre el control de la fosforilación oxidativa, se utilizó el glutamato como sustrato. El glutamato entra al ciclo de Krebs a nivel de la α -cetoglutarato deshidrogenasa. La estimulación del calcio sobre esta enzima fue evaluada directamente, obteniéndose resultados positivos (Tabla 4).

La suma de las enzimas evaluadas en presencia de glutámico 1mM fue de 0.84, lo cual indica un control aproximado para esta deshidrogenasa (+ transporte de sustrato) sensible a calcio de 0.16. En presencia de calcio, este control no se cuantificó pero en presencia de glutámico 10mM, se observó un control de las deshidrogenasas de 0.12, es decir, una disminución del control por parte de las enzimas del ciclo de Krebs, cuando se incrementa su velocidad. Esto está en concordancia con los resultados obtenidos para pirúvico, aunque los coeficientes de control no son los mismos, ya que aquí sólo se está evaluando una de las deshidrogenasas sensibles a calcio, por ello, tal vez, su coeficiente de control sea menor en comparación con el obtenido cuando se evalúan las tres enzimas.

A baja concentración de sustrato, la actividad de las deshidrogenasas juega un papel mayor en la limitación del flujo sobre la fosforilación oxidativa. Estos resultados coinciden con otros [32,76,77] en que tanto la relación NADH/NADmit como la

relación ATP/ADP*Pi están involucrados en el control del flujo de la fosforilación oxidativa, ya que estas relaciones son los "intermediarios" dentro de la vía entre las enzimas evaluadas: la actividad de las deshidrogenasas del ciclo de Krebs está ligada con la cadena respiratoria por medio de la concentración de NADH, la cual, a su vez, está regulada por la relación NADH/NAD. La cadena respiratoria o sistema oxidativo está acoplado al sistema fosforilante, mediante el gradiente electroquímico de protones, o $\Delta\mu_{H^+}$. La síntesis de ATP a su vez, está coordinada con la demanda de ATP, mediante la relación ATP/ADP*Pi.



La estimulación de la respiración y niveles de NADH son consistentes con la estimulación por Ca^{2+} de las deshidrogenasas de la matriz [2,3]. Un incremento en el consumo de ATP intracelular, incrementa la respiración en células de hígado [79].

Si el calcio estimula a las deshidrogenasas del ciclo de Krebs, un aumento en su velocidad significaría una disminución en el control que están ejerciendo, ya que al volverse enzimas rápidas, serían menos limitantes; esto fue, efectivamente comprobado cuando evaluamos a las enzimas con pirúvico 0.5mM en

presencia de calcio. En presencia de este catión, el control de las deshidrogenasas bajó de 0.32 a 0.20.

Si el calcio estuviera actuando solo a nivel de las deshidrogenasas, los coeficientes de control observados cuando incrementamos las velocidades de éstas, al aumentar su sustrato disponible, (pirúvico 5mM) deberían ser similares. Los coeficientes de control con pirúvico 5mM, para el sistema fosforilante, fueron mayores que con piruvico 0.5mM pero prácticamente iguales que con piruvato en presencia de calcio; sin embargo, los coeficientes de control para el sistema oxidativo sí muestran ciertas diferencias. Esto nos está indicando que el calcio pudiera estar actuando a un nivel diferente además de las deshidrogenasas.

Existen evidencias al respecto, como la existencia de una proteína, aislada y purificada [63], inhibidora de la ATPsintetasa que es sensible a los niveles de calcio. Se ha observado un incremento en la actividad del citocromo bC1 en presencia de calcio [61,62]. También se ha visto que los coeficientes de control del acarreador ATP/ADP y la ATPsintetasa pueden estar relacionados de manera recíproca y que el cambio en esta reciprocidad está dado por la presencia de calcio [30,33,34].

En condiciones estables, oxidando un sustrato como es el piruvato (0.5mM) la ATPsintetasa presenta un coeficiente de control relativamente alto (0.22) en comparación con las otras enzimas, exceptuando a las deshidrogenasas. Cuando se aumenta la actividad de estas deshidrogenasas al incrementarles su sustrato (pirúvico 5mM), el control que estaban ejerciendo, se distribuye ahora sobre las otras enzimas de la vía, una de ellas, la ATPsintetasa, que se vuelve ahora, mas controladora aún. Sin embargo, cuando se estimulan las deshidrogenasas con calcio, la distribución del control no recae sobre la sintetasa.

Potencial Transmembranal

En esta tesis, no se evaluó ni el papel de la relación NADH/NAD ni el de la relación ATP/ADP*Pi sobre el control de la fosforilación oxidativa, sin embargo, esto queda como una de las perspectivas. Se evaluaron los componentes del gradiente electroquímico de protones, $\Delta\psi$ y $\Delta\mu\text{H}$.

Utilizando pirúvico como sustrato, el mantenimiento de un valor constante del potencial transmembranal cuando se incrementó el flujo, vía calcio o pirúvico 5mM, puede ser explicado en términos de una mayor accesibilidad de NADH para la cadena respiratoria [50] inducida por la activación de las deshidrogenasas, vía calcio o mayor disponibilidad de sustrato. En neuronas aisladas de ratón [80], se vió que los efectos tempranos de una despolarización podrían representar reacciones directas por

un incremento en la entrada de calcio a la matriz mitocondrial. Esto despolarizaría el $\Delta\psi$ directamente y estimularía la respiración.

Efectos similares resultarían de una estimulación de las ATPasas dependientes de calcio después de un incremento en $[Ca^{2+}]_{intra}$ celular, reduciendo entonces la relación $ATP/ADP \cdot Pi$. Esto estimularía el flujo de protones a través de la ATPsintetasa, despolarizando $\Delta\psi$ y estimulando la respiración. La respuesta predominante a un incremento en el calcio intramitocondrial es un incremento en la relación $NADH/NAD$, la cual estimula la actividad de la cadena respiratoria, incrementando entonces, el consumo de oxígeno [2,37].

Tal incremento en el consumo de oxígeno podría esperarse que aumentara (hiperpolarizara) $\Delta\psi$. Debido a la existencia de la proteína inhibidora de la ATPasa [63], el incremento en la concentración citosólica de calcio estimularía a la ATPsintetasa vía el desplazamiento de esta proteína inhibidora. Esto incrementaría el flujo de protones a través del canal F_0 , disminuyendo el $\Delta\psi$, en respuesta a la actividad incrementada de la cadena respiratoria.

Estos incrementos en el calcio citosólico no se ha visto que despolaricen $\Delta\psi$, en otros tipos celulares. Parece posible que esto refleje la alta actividad del uniportador de calcio en el tejido neural [80], comparado con hígado y corazón, por ejemplo [81], provocando entonces mayor entrada de calcio como respuesta a la variación en la $[Ca^{2+}]_{intracelular}$. Los resultados presentados por Duchen, 1992 [80], sugieren que el calcio pudiera actuar como un regulador principal en la fosforilación oxidativa mitocondrial como respuesta al incremento de la actividad neuronal en este tipo de célula.

Síntesis de ATP

Los datos de la **Tabla 7** muestran que un incremento en el flujo de la vía, al estimular a las DHs con calcio, refleja un incremento en la síntesis de ATP. Se ha visto que cuando se aumenta la actividad de las enzimas del ciclo de Krebs, se da un aumento en el NADH; existiendo una mayor disponibilidad de NADH, la cadena respiratoria se estimula; entonces, su bombeo de protones se incrementa y se da un aumento en la fuerza protonmotriz, ya sea en el potencial transmembranal ($\Delta\psi$) o en el ΔpH . Este incremento, trae como consecuencia un aumento en la síntesis de ATP. Sin embargo, la adición de calcio no varió ni el $\Delta\psi$ ni el ΔpH (datos del laboratorio), pero se dió un incremento en la síntesis de ATP.

ATP sintetasa

Esto podría interpretarse como un efecto directo del calcio sobre la ATP sintetasa: al activarse, esta enzima deja de ser lenta (reguladora) y su control sobre la vía baja, lo cual se observa en la **tabla 8**, en la cual el coeficiente de control de flujo de la ATP sintetasa con pirúvico 0.5mM disminuye ligeramente de 0.22 a 0.19.

Translocasa ATP/ADP

Otra enzima que parece afectar directamente el calcio es el acarreador de adenín nucleótidos. Utilizando glutamato como sustrato, se puede observar una clara disminución del control que estaba ejerciendo (.17) cuando se estimuló la vía con calcio (0.06).

Sistemas oxidativo y fosforilante

Esta disminución no se observa si la estimulación proviene del incremento en la concentración de sustrato (glutámico 10mM); lo cual está indicando también, un efecto del calcio diferente a la sola estimulación de las DHs del ciclo de Krebs.

Como se puede observar en la tabla de Coeficientes de Control, la participación de las enzimas del sistema oxidativo en presencia de pirúvico 0.5mM es de 0.22 (sumando sus coeficientes de control), mientras que las enzimas del sistema fosforilante ejercen un control de 0.47, esto es, más del doble de control.

Cuando se reduce la participación de las deshidrogenasas, al añadir calcio, el sistema oxidativo aumenta su control a 0.33 mientras que el fosforilante no varía tanto (0.43). Este resultado sugiere que las reacciones involucradas en la generación de NADH fueron mas estimuladas que las reacciones consumidoras de NADH (cadena respiratoria). Estas consideraciones muestran que existe un cambio en la distribución del control en presencia de calcio sobre los dos sistemas de la fosforilación oxidativa. El cambio en el sistema fosforilante no es tan notorio como el del oxidativo.

Lo que parece indicar, que en condiciones basales, con una concentración fisiológica de sustrato oxidable para cerebro, como sería piruvato 0.5mM, por ejemplo, el control de la fosforilación oxidativa recae principalmente a nivel de la síntesis de ATP, (predominantemente la ATPsintetasa), y con una importante participación de las deshidrogenasas del ciclo de Krebs.

Cuando un estímulo, ya sea eléctrico, químico u hormonal**, causa un incremento en la concentración de calcio citosólico, que a su vez incrementa la concentración de calcio mitocondrial [2,80,82,83] (concentración que, se ha reportado [2,3] está dentro del rango en el cual se estimulan las deshidrogenasas del ciclo de Krebs) se observa una redistribución del control: las deshidrogenasas bajan su participación mientras que las enzimas de

la cadena respiratoria se vuelven mas "controladoras" y el sistema fosforilante sigue siendo un paso importante para la regulación de la fosforilación oxidativa.

**Los estudios en cerebro [84], rebanadas de cerebro [85], sinaptosomas[2,43,45,54] y tanto hepatocitos como cardiomiocitos aislados [2,86] han reportado cambios en la actividad mitocondrial en respuesta a una estimulación fisiológica. Asi mismo, esto fue observado por Duchon, 1992 [80] en neuronas aisladas de ratón.

Regresión lineal y no lineal

El análisis para la obtención de los coeficientes de control de flujo propuesto por Groen y cols [22] (regresión lineal) proporcionó coeficientes de control muy altos para cada caso estudiado y en la sumatoria, ya que ésta rebasaba por mucho, la unidad. Se han reportado [32,50] sumatorias de mas de 1 en otros tejidos, pero esto fue más notorio en cerebro debido quizá a la gran cantidad de lípidos que presentaban las preparaciones.

Estas sobreestimaciones de C_i se deben también, en parte, al tipo de análisis: la obtención de la pendiente inicial muchas veces es subjetiva ya que uno tiene que decidir qué puntos tomar y hasta donde tomarlos. Con un punto de más que se tome, la pendiente puede variar bastante y, por tanto, el C_i obtenido será mayor.

Esto también tiene que ver con el inicio de la curva, para el análisis lineal, los puntos mas importantes de la curva de

titulación son los primeros, sin embargo, uno tiene que decidir con qué concentración empezar a titular; generalmente se toma el 10% de la concentración final con la que se inhibe totalmente el estado 3 de la respiración, por ejemplo, si el acarreador ATP/ADP se inhibe completamente con 630 pmoles, entonces, la curva de titulación se empieza con 60 pmoles y se va inhibiendo al principio de 60 en 60 durante los primeros 4 a 7 puntos.

Así se tendrá un número confiable de puntos iniciales para poder obtener su pendiente. Otro problema que se presenta es la variación de la I_{max} . Este parámetro puede variar de preparación en preparación, por tanto, al hacer la media, la desviación es mucho mayor.

La elección cuidadosa de los puntos iniciales de la curva, el decidir qué puntos entran en la regresión lineal de la pendiente y la obtención de la I_{max} son tres problemas que se pueden evitar con el uso del análisis no lineal.

En primer lugar, debido a que este análisis toma en cuenta todos los puntos de la curva de inhibición, descartando la subjetividad de la elección de la pendiente.

Segundo, con un mínimo de 8 puntos se puede obtener una curva que entre en el programa de cómputo.

Tercero, el valor de I_{max} , la E_0 no está sujeta al supuesto de que existe la misma cantidad de enzima por inhibidor; esto es, la fórmula de regresión no lineal está calculada tomando en cuenta la K_d del inhibidor por su enzima.

Cuarto, los parámetros arrojados por este análisis ($A=K_d-E_0$; $B=K_d \times E_0$; $C=E_0 \times C_0$ y $D=C_0$) pueden meterse a una fórmula cuadrática que al ser resuelta da $X_1=E_0$ y $X_2=K_d$ directamente.

Quinto, una vez teniendo la K_d , E_0 y C_0 , así como el promedio de las C_i , puede uno descartar con máxima confiabilidad las curvas que no satisfagan los promedios generales.

Debido a las necesidades de este tipo de modelos, se deben hacer ciertas suposiciones, como son, por ejemplo, para todos los inhibidores estudiados, suponer un exponente = 1, en la fórmula propuesta por Gellerich y cols [20]; la cantidad de lípidos presentes en la preparación mitocondrial se supuso como error sistemático a lo largo del trabajo y por esto, todos los inhibidores trabajados fueron preincubados durante 5 minutos con las mitocondrias.

En la vía de fosforilación oxidativa no se tomó en cuenta cofactores ni tipo de distribución de los sustratos, etc., se tomó como una ruta lineal integrada por complejos enzimáticos o enzimas solamente.

En una ruta metabólica tan importante como lo es la fosforilación oxidativa para el cerebro, las enzimas reguladoras serían los "detectores" principales si se diera una alteración de la vía. El poder conocer cómo está distribuida esta regulación en esta vía, es el fundamento de esta tesis.

CONCLUSIONES

En mitocondrias de cerebro el control de la Fosforilación oxidativa se distribuyó homogéneamente, con un ligero predominio de las deshidrogenasa dependientes de NAD y la ATPsintetasa.

Esta distribución, aunque diferente, siguió siendo homogénea tanto en presencia como en ausencia de calcio así como con una concentración saturante de sustrato.

El calcio afectó la distribución del control para ambos sustratos, estimulando la fase productora de NADH ya que los coeficientes de control de los complejos de la cadena respiratoria aumentaron.

No se dió un cambio en el ΔpH ni en el $\Delta \psi$ en presencia de calcio ni con concentración saturante de sustrato. Sin embargo, existió un incremento en la síntesis de ATP. La distribución del control en presencia de calcio fue diferente que aumentando el sustrato; esto puede indicar un efecto del calcio sobre otras enzimas de la vía.

Utilizando glutámico 1mM como sustrato, se observó una clara disminución del coeficiente de control del acarreador de ATP/ADP cuando se añadió calcio, lo cual podría estar indicando una activación directa sobre este acarreador.

En presencia de calcio, el coeficiente de control de la ATP sintetasa disminuyó tanto con glutámico como con pirúvico.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de regresión lineal mostraron una clara sobreestimación de los coeficientes de control de flujo y en la mayoría de los casos presentaron sumatorias mayores a la unidad.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de regresión no lineal aportaron coeficientes confiables, cuya sumatoria en ninguno de los casos sobrepasó la unidad.

PERSPECTIVAS

Bajo condiciones de ayuno prolongado, el cerebro ya no dispone de su fuente principal, la glucosa, lo siguiente que utiliza para subsistir son los cuerpos cetónicos[87,88]. La degradación de éstos involucra directamente a la succinato deshidrogenasa [1,89]. Por tanto, sería interesante evaluar el grado de control que tiene esta enzima, ya sea en condiciones normales de aporte de glucosa, como en condiciones de ayuno prolongado.

Obtener la distribución del control en mitocondrias *in situ*, es decir, en sinaptosomas, para lo cual se emplearía la teoría del "Top-down Approach" propuesta por Brand y cols [37,38].

Las enzimas que componen al sistema oxidativo, principalmente los cuatro complejos de la cadena respiratoria, pueden trabajarse aisladamente de los otros complejos, dentro de la mitocondria. Esto se puede realizar por espectrofotometría, registrando la absorbancia como medida de actividad, con inhibidores de los otros complejos y utilizando donadores y aceptores de electrones externos; aunque esto estaría modificando la vía, nos daría otro acercamiento.

Uno de los organelos blanco que se ve directamente afectado en un periodo prolongado de isquemia es la mitocondria[90,91,92]. Durante este período, los niveles de ATP caen abruptamente, debido a la anoxia que se presenta. El 90% del ATP que consume el cerebro proviene de la fosforilación oxidativa. Por tal motivo, sería importante evaluar la distribución del control de la fosforilación oxidativa en este tipo de mitocondrias.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Stryer, L. (1990) Bioquímica. W.H. Freeman and Co. ed. 3a.ed., N.Y.
- [2] Hansford, R. (1985) Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol. 102, 1-72
- [3] Denton, R y McCormack, J. (1980) FEBS Lett. 119, 1-8
- [4] Mitchell, P. (1975) FEBS Lett 56: 1-6.
- [5] Brown, G. (1992) Biochem.J. 284,1-13
- [6] Moore, C.L. (1971) Biochem.Biophys.Res.Commun.42, 298-305
- [7] Carafoli, E. (1976) Mitochondria Bioenergetics Biogenesis and Membrane Structure. Academic.Press.ed. pp.47-60 N.Y.
- [7a] LaNoue, K. y Schoolwerth, A. (1979) Ann.Rev.Biochem. 48: 871-922.
- [8] Crompton, M. Kunz, M y Carafoli, E. (1977) Eur.J.Biochem. 79, 549-558
- [9] Crompton, M. Moser, R. Ludl, H y Carafoli, E. (1978) Eur. J. Biochem. 82, 25-31
- [10] Hatefi, Y. (1985)Annu.Rev.Biochem. 54, 1015-1069
- [11] Gonzalez-Halphen, D. (1990) Ciencia 41, 133-152
- [12] Moreno-Sanchez,R.(1985) Papel del Ca²⁺ en la regulacion de la fosforilacion oxidativa mitocondrial. Tesis Doctorado, UNAM
- [13] Rolleston, F. (1972) . Curr.Top.Cell.Reg. 5, 47-75
- [14] Kacser, H. Y Burns, J.A. (1973) Symp.Soc.Exp.Biol. 27, 65-104
- [15] Heinrich, R. Y Rapoport, T. (1974) Eur.J.Biochem. 42, 89-105
- [16] Moreno-Sanchez, R. (1985) Teoria de Control Metabolico. Mensaje Bioquimico.Vol.VIII. Fac.Medicina, UNAM
- [17] Parteous, W. (1983) TIBS, 8: 200-202
- [18] Crabtree, B. And Newsholme, A. (1987) TIBS, 12: 4-10
- [19] Tager, J y col. (1983) FEBS Lett. 151, 1-9
- [20] Gellerich, F.N. y col.(1991) FEBS Lett. 274, 167-170
- [21] Forman, G. Y Wilson, F. (1983) J.Biol.Chem. 258, 8649-8655

- [22] Groen, A. Wanders, A. Westerhoff, V. Meer, V. And Tager, M. (1982) *J. Biol.Chem.* 257, 2754-2757
- [23] Mazart, J. And col. (1986) *Biochim.Biophys.Acta* 849, 7-15
- [24] Groen, A. (1984) en: *Quantification of Control in Studies on Intermediary Metabolism*, 9-65. Tesis, Amsterdam.
- [25] Gellerich, N. Bohnensack, R. And Kunz, W. (1983) *Biochim.Biophys Acta*, 722, 381-391
- [26] Moreno-Sanchez, R y Torres-Marquez, M.E. (1991) *Int.J.Biochem.* 23, 1163-1174
- [27] Holian, A. Owen, S. Wilson, F. (1977) *Arch.Biochem.Biophys.* 181, 164-171
- [28] Stubbs, M. Vignais, V. Krebs, A. (1978) *Biochem.J.* 172, 333-342
- [29] Duszynski, J. Groen, K. Wanders, A. Vervoorn, C. And Tager, M. (1982) *FEBS Lett.* 146,
- [30] Davis, J. Thienen, D. (1984) *Arch.Biochem.Biophys.* 233, 573-581
- [31] Baggetto, L. Gautheron, C. And Godinot, C. (1984) *Arch.Biochem.Biophys.* 232, 670-678
- [32] Moreno-Sanchez, R. Hogue, A. And Hansford, R. (1990) *Biochem.J.* 268, 421-428
- [33] Moreno-Sanchez, R. Y col. (1988) en *Integration of Mitochondrial Function*. John Lemasters ed. 297-304
- [34] Moreno-Sanchez, R. (1985) *J. Biol.Chem.* 260, 12554-12560
- [35] Westerhoff y col. (1987) *Arch.Biochem.Biophys.* 257, 154-169
- [36] Tager, M y col (1983) *FEBS Lett.* 151, 1-9
- [37] Brown, G y col. (1990) *Eur.J.Biochem.* 188, 321-325
- [38] Hafner, R y col. (1990) *Eur. J. Biochem.* 188, 313-319
- [39] Brown, G y col. (1990) *Eur. J. Biochem.* 192, 355-362
- [40] Roman, I. Clark, A y Swanson, P. (1981) *Membr.Biochem.* 4, 1-9
- [41] Tuena de Gomez-Puyou, M y col. (1980) *Biochim.Biophys.Acta.* 592, 396-405

- [42] Hillered, L y col. (1983) FEBS Lett. 154, 247-250
- [43] Patel, T y col. (1988) Arch.Biochem.Biophys. 264, 368-375
- [44] Robertson, S y col. (1988) J. Biol. Chem. 257, 1743-1748
- [45] Scott, I and Nicholls, D. (1980) Biochem. J. 186, 21-23
- [46] Moreno-Sanchez, R y Hansford, R. (1988b) Am.J.Physiol. 255, H347-H357
- [47] McCormack, J. Halestrap, A y Denton, R. (1990) Physiol.Rev. 70, 391-425.
- [48] Crompton, M. (1985) Curr.Top.Membr.Transp. 25, 231-276
- [50] Moreno-Sanchez, R y col. (1991) Biochimica et Biophysica Acta 1060, 284-292
- [51] Lopez-Gomez, F.J. (1992) Control de la Fosforilacion oxidativa y transporte de Ca^{2+} en mitocondrias de mamifero. Tesis UNAM
- [52] Newsholme, E.A. y Leech, A.R. (1983) Biochemistry for the Medical Sciences. John Wiley and sons, Chichster, Cap.4
- [53] Sokoloff (1977) J. Neurochem. 28, 897-916
- [54] Erecinska, N y Dagan, F. (1990) J. Gen. Physiol. 95, 591-616
- [55] Erecinska, M. Silver, I. (1989) J.Cereb.Blood Flow and Metab. 9, 2-19
- [56] Rottenberg, H. y Marbach (1990) Biochimica et Biophysica Acta, 1016, 87-98
- [57] Rottenberg, H. y Marbach (1990) Biochimica et Biophysica Acta, 1016, 77-86
- [58] Kroner, H. (1988) Arch.Biochem.Biophys. 267, 205-210
- [60] Clark and Nicklas (1970) J. Biol.Chem. 245 No.8, 4724-4731
- [61] Corona de la Peña, N (1992) Efecto del calcio sobre las enzimas de la via de fosforilacion oxidativa en mitocondrias de higado de rata. Tesis UNAM
- [62] Murphy, A. Kelleher, J y Fiskum, G. (1990) J. Biol. Chem. 265(18): 10527-10534
- [63] Yamada, E y Huzel, N. (1988) J. Biol. Chem. 263, 11498-11503

- [64] Lai, J y Clark, J. (1979) *Methods in Enzymology* Vol.LV Ch.6, 51-59
- [65] Lowry, O.H y col.(1951) *J.Biol.Chem.* 193, 265-275
- [66] Moreno-Sanchez, R y col.(1991) *Biochim. Biophys. Acta.* 1060, 284-292
- [67] Moreno-Sanchez, R. Torres-Marquez, M.E. y Lopez-Gomez, F.J. (1993) *Ciencia* 44, 383-396
- [68] Akerman, K y Wikstrom, M. (1976) *FEBS Lett.* 68, 191-197
- [69] Rottenberg, H. (1984) *J. Membrane Biol.* 81, 127-138
- [70] Khyam, J. (1975) *Clin.Chem.* 21, 1245-1252
- [71] Schoenmakers, T.J.M. Visser, G. Flink, A.P.R. Theuvenet. *Biotechniques* (1992) 12, 870-879
- [72] Bohnensack, R. Kuster, U y Letko, G (1982) *Biochim.Biophys.Acta* 680, 271-280
- [73] Doussiere, J. Ligeti, E. Brandalin, G y Vignais, V. (1984) *Biochim.Biophys.Acta.* 766, 492-500
- [74] Korestky, A y Balaban, R (1987) *Biochim.Biophys.Acta* 893, 398-408
- [75] Lopez-Gomez, F.J. y cols. (1993) *Int. J. Biochem.* 25(3): 373-377
- [76] Wilson y col. (1977) *Arch.Biochem.Biophys.* 182, 749-762
- [77] Van der Meer y col. (1978) *Eur.J.Biochem.* 84, 421-428
- [78] Charest, R. Blackmore, P y Exton, J. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 15789-15794
- [79] Nobes, C. Brand, M. (1988) *Biochim.Biophys.Acta* 976, 241-245
- [80] Duchon, M. (1992) *Biochem. J.* 283, 41-50
- [81] Nicholls, D. (1978) *Biochem. J.* 170, 511-522
- [82] Crompton, M. (1990) *Intracellular Calcium Regulation.* Alan R. Liss, N. Y. pp.181-209
- [83] Carafoli, E (1987) *Intracellular Calcium Homeostasis.* *Annu.Rev. Biochem.* 56, 395-435
- [84] Rosenthal, M y Jobsis, F (1971) *J. Neurophysiol.* 34, 750-762

- [85] Segal, M y col. (1980) Brain Res. 202, 387-399
- [86] Balaban, R y Blum, J. (1982) Am. J. Physiol. 242, C172-C177
- [87] Owen, OE; Morgan, AP; Kemp, HG; Sullivan, JM; Herrera, MG; Cahill, GF (1967) J. Clin. Invest. 46: 1589-1595
- [88] Hasselbalch, SG y col. (1994) J.Cereb.Blood.Flow.Metab. 14: 125-131.
- [89] Herrera, E. (1986) Bioquimica. Ed. Interamericana, Madrid, Espana.
- [90] Fiskum G. (1983) Am. J. Emerg. Med. 2: 147-153
- [91] Mela L. (1982) Mitochondrial function in Shock, Ischemia and Hypoxia, in Pathophysiology of Shock, Anoxia and Ischemia (Cowley R.A. and Trump B.F. ,eds.) pp 84-95. Williams and Wilkins, Baltimore.
- [92] Siesjo B.K. (1986) Eur. Neurol. 25 (suppl), 45-56.