

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**POSIBLES CAUSAS DE LAS VARIACIONES
DE LA TRANSDUCCIÓN ENERGÉTICA MITOCONDRIAL
DURANTE EL DESARROLLO Y ENVEJECIMIENTO**

Carlos Enrique Torres Mendoza

Directora: Dra. M^a Julia de la Cruz Arriaga



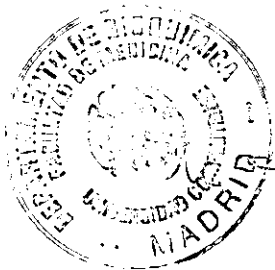
Madrid, 1996

M^a JULIA DE LA CRUZ ARRIAGA, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA:

Que **Carlos Enrique Torres Mendoza**, licenciado en Ciencias Químicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado en este Departamento bajo mi dirección, el trabajo de investigación titulado "**POSIBLES CAUSAS DE LAS VARIACIONES DE LA TRANSDUCCIÓN ENERGÉTICA MITOCONDRIAL DURANTE EL DESARROLLO Y ENVEJECIMIENTO**", que presenta para la obtención del Título de Doctor en Ciencias Químicas.

Madrid, 2 de julio de 1996



Julia de la Cruz

Fdo: M^a Julia de la Cruz Arriaga

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|-----------|
| ÍNDICE | i |
| ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS | ix |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. OBJETIVOS | 13 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 16 |
| IV. RESULTADOS | 42 |
| V. DISCUSIÓN | 76 |
| VI. CONCLUSIONES | 84 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA | 88 |

ÍNDICE DETALLADO

| | |
|--|-----|
| ÍNDICE | i |
| ÍNDICE GENERAL | ii |
| ÍNDICE DETALLADO | vii |
| ÍNDICE DE FIGURAS Y DE TABLAS | xi |
| | |
| ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS | ix |
| | |
| ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS | x |
| | |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| | |
| I.1. ENVEJECIMIENTO | 2 |
| | |
| I.2. COMPLEJO I-III | 6 |
| I.2.1. COMPLEJO I | 7 |
| I.2.1.1. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL | 7 |
| I.2.1.2. ALTERACIONES EN EL COMPLEJO I | 10 |
| I.2.1.2.1. Patologías asociadas al ADN mitocondrial | 10 |
| I.2.1.2.2. Implicaciones del complejo I en el envejecimiento: alteraciones fisiopatológicas | 10 |
| I.2.2. COMPLEJO III | 11 |
| | |
| II. OBJETIVOS | 13 |
| | |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 16 |
| | |
| III.1. MATERIALES | 17 |
| III.1.1. INSTRUMENTACIÓN | 17 |
| III.1.2. REACTIVOS | 18 |
| III.1.3. MATERIAL BIOLÓGICO | 18 |

| | |
|--|-----------|
| III.2. PURIFICACIÓN DE MITOCONDRIAS | 18 |
| III.2.1. AISLAMIENTO DE LAS MITOCONDRIAS | 18 |
| III.2.2. CRITERIOS DE PUREZA | 19 |
| III.2.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FUNCIONAL | 19 |
| III.2.3.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA | 19 |
| III.2.3.2. CONSUMO DE OXÍGENO | 19 |
| III.2.3.3. CINÉTICA DE TRANSPORTE DE CALCIO EN LA MITOCONDRIA | 20 |
| III.2.3.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE ATP EN LA MITOCONDRIA | 20 |
| III.3. PURIFICACIÓN DEL COMPLEJO I-III | 21 |
| III.3.1. OBTENCIÓN DEL COMPLEJO I-III | 21 |
| III.3.2. CRITERIOS DE PUREZA | 24 |
| III.4. ELECTROFORESIS EN GELES DE TRICINA | 24 |
| III.5. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS | 26 |
| III.5.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA ... | 26 |
| III.5.2. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS | 27 |
| III.5.2.1. NADH UBIQUINONA OXIDORREDUCTASA | 27 |
| III.5.2.2. SUCCINATO COENZIMA Q OXIDORREDUCTASA ... | 28 |
| III.5.2.3. UBIQUINOL CITOCROMO <i>c</i> OXIDORREDUCTASA ... | 29 |
| III.5.2.4. SUCCINATO CITOCROMO <i>c</i> OXIDORREDUCTASA ... | 30 |
| III.5.2.5. NADH CITOCROMO <i>c</i> OXIDORREDUCTASA | 30 |
| III.5.2.6. CITOCROMO <i>c</i> OXIDASA | 31 |
| III.5.2.7. MONOAMINO OXIDASA | 32 |
| III.5.2.8. MALATO NADH OXIDORREDUCTASA (MALATO DESHIDROGENASA) | 32 |
| III.5.2.9. GLUCOSA-6 FOSFATASA | 33 |
| III.5.2.10. 5` NUCLEOTIDASA | 34 |
| III.5.3. DETERMINACIÓN DE CITOCROMOS | 34 |
| III.5.4. DETERMINACIÓN DE FMN | 36 |
| III.6. DETERMINACIÓN DE HIERRO NO HEMO | 37 |
| III.7. DETERMINACIÓN DE FÓSFORO | 37 |

| | |
|--|-----------|
| III.8. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS | 38 |
| III.8.1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE AL COMPLEJO I-III .. | 38 |
| III.8.2. TÉCNICAS DE DETECCIÓN INMUNOLÓGICA | 39 |
| III.8.2.1. ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO ELISA | 39 |
| III.8.2.2. <i>DOT BLOT</i> | 39 |
| III.9. ANÁLISIS DE DATOS | 40 |
| III.9.1. DENSITOMETRADO | 40 |
| III.9.2. ANÁLISIS DE BANDAS | 41 |
| III.9.3. ESTADÍSTICA. | 41 |
| IV. RESULTADOS | 42 |
| IV.1. PURIFICACIÓN DE LAS MITOCONDRIAS | 43 |
| IV.2. MORFOLOGÍA Y FUNCIONALIDAD DE LAS MITOCONDRIAS | 44 |
| IV.2.1. MORFOLOGÍA | 44 |
| IV.2.2. ESTUDIOS FUNCIONALES | 46 |
| IV.2.2.1. CONSUMO DE OXÍGENO | 46 |
| IV.2.2.2. VELOCIDAD DE ENTRADA DE CALCIO | 47 |
| IV.2.2.3. NIVELES DE ATP | 48 |
| IV.3. VARIACIONES EN LOS COMPLEJOS DE LA CADENA RESPIRATORIA EN MITOCONDRIA DE HÍGADO DE RATA CON LA EDAD | 49 |
| IV.3.1. VARIACIONES EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA | 49 |
| IV.3.2. VARIACIONES EN LA CANTIDAD DE COMPLEJO | 52 |
| IV.3.3. VARIACIONES EN EL CONTENIDO DE CITOCROMOS | 54 |
| IV.4. PURIFICACIÓN DEL COMPLEJO I-III | 56 |
| IV.5. CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO I-III | 59 |
| IV.5.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA | 59 |
| IV.5.2. DETERMINACIÓN DE CITOCROMOS | 59 |
| IV.5.3. DETERMINACIÓN DE FMN | 61 |
| IV.5.4. DETERMINACIÓN DE HIERRO NO HEMO | 62 |
| IV.5.5. DETERMINACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS | 63 |
| IV.6. ELECTROFORESIS DEL COMPLEJO I-III | 64 |

| | |
|--------------------------------|-----------|
| V. DISCUSIÓN | 76 |
| VI. CONCLUSIONES | 84 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA | 88 |

ÍNDICE DE FIGURAS Y DE TABLAS

• FIGURAS:

| | | | |
|-------|----|--------|----|
| I-1 | 5 | IV-9 | 60 |
| | | IV-10 | 61 |
| III-1 | 23 | IV-11 | 64 |
| | | IV-12A | 67 |
| IV-1 | 45 | IV-12B | 68 |
| IV-2 | 46 | IV-12C | 69 |
| IV-3 | 48 | IV-13 | 70 |
| IV-4 | 51 | IV-14A | 71 |
| IV-5 | 52 | IV-14B | 72 |
| IV-6 | 53 | IV-15A | 73 |
| IV-7 | 54 | IV-15B | 74 |
| IV-8 | 59 | IV-16 | 75 |

• TABLAS:

| | | | |
|-------|----|-------|----|
| I-1 | 2 | IV-4 | 49 |
| I-2 | 9 | IV-5 | 50 |
| I-3 | 11 | IV-6 | 53 |
| | | IV-7 | 55 |
| III-1 | 25 | IV-8 | 57 |
| III-2 | 25 | IV-9 | 60 |
| III-3 | 35 | IV-10 | 62 |
| | | IV-11 | 62 |
| IV-1 | 43 | IV-12 | 63 |
| IV-2 | 47 | IV-13 | 63 |
| IV-3 | 47 | IV-14 | 66 |

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

| | |
|----------------------------------|--|
| ΔA | Incremento de absorbancia |
| Δt | Incremento de tiempo |
| ϵ | Coefficiente de extinción molar de un cromóforo ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) |
| λ | Longitud de onda (nm) |
| A | Actividad enzimática |
| A_c | Área de las crestas mitocondriales |
| A_t | Área total de la mitocondria |
| A.E. | Actividad Específica de una enzima |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADN-n | Ácido desoxirribonucleico nuclear |
| ADN-mt | Ácido desoxirribonucleico mitocondrial |
| ADP | 5'-difosfato de adenosina |
| AMP | 5'-monofosfato de adenosina |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARN-r | Ácido ribonucleico ribosómico |
| ARN-t | Ácido ribonucleico de transferencia |
| ATP | 5'-trifosfato de adenosina |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| c | Concentración de proteína |
| C | % de bisacrilamida/acrilamida total |
| Cit. | Citocromo |
| Co Q ₂ | 2,3-Dimetoxi-5-metil-6 geranilbenzoquinona |
| Co Q ₂ H ₂ | 2,3-Dimetoxi-5-metil-6 geranilbenzoquinol |
| D.O. | Densidad óptica |
| DPIP | Diclorofenol-indofenol |
| DTT | Ditiotreitol |
| EDTA | Ácido etilen-diaminotetraacético |
| ELISA | Inmunoensayo de absorción con acoplamiento enzimático |

| | |
|----------------|--|
| EPR | Resonancia de espín electrónico |
| FAD | Mononucleótido de adenina flavina |
| F _c | Región constante de un anticuerpo |
| Fe-S | Centro ferrosulfuro de una proteína |
| FMN | Mononucleótido de flavina |
| g | aceleración de la gravedad |
| IgG | Inmunoglobulina G |
| kb | Kilobases |
| kDa | Unidad de masa molecular (KiloDalton), equivalente a 1000g/mol |
| l | paso óptico de una cubeta |
| M | Masa molecular |
| NADH | Dinucleótido de adenina α- nicotinamida |
| nm | Nanómetro (1 nm=10 ⁻⁹ metros) |
| OPD | o-fenilendiamina |
| PAGE-SDS | Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil-sulfato sódico |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PBS-T | Tampón fosfato salino con detergente Tween-20 |
| p/v | % peso-volumen |
| PVDF | Difluoruro de polivinilideno |
| Q | Coenzima Q |
| r _m | Radio medio del rotor |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SDS | Dodecil-sulfato sódico |
| SOD | Superóxido dismutasa (enzima) |

| | |
|--------------|---|
| T | % acrilamida total |
| TEMED | N,N,N',N'-tetrametilendiamina |
| THS | Tampón Tris-Sacarosa-Histidina |
| Tris | Tampón (tris[hidroximetil]amino-metano) |
| Triton X-100 | t-Octilfenoxipolietoxietanol |
| Tween-20 | Polioxietilensorbitan monolaurato |
| Ubiquinol | Coenzima Q en la forma reducida |
| Ubiquinona | Coenzima Q en la forma oxidada |
| V_v | Volumen de las crestas mitocondriales |
| v/v | % volumen-volumen |

I. INTRODUCCIÓN

I.1. ENVEJECIMIENTO

Los estudios sobre el envejecimiento presentan muchos problemas que provienen de la dificultad de definir un proceso muy complejo que no se sabe bien, si es un fenómeno normal o patológico. Sin embargo, el envejecimiento es algo que se percibe fácilmente, aunque presente formas muy variables en distintas especies e individuos y que afecta de distinta manera en los sistemas fisiológicos (inmunitario, respiratorio, nervioso, sanguíneo, etc.), que por otra parte, son interdependientes (Dodet, 1994).

Hasta la fecha, se han elaborado muchas teorías para explicar el envejecimiento, lo que refleja la complejidad del mismo. En resumen, las teorías sobre el envejecimiento pueden agruparse en dos grandes grupos (Dice, 1993): las teorías que consideran que el envejecimiento está inscrito en los genes (teorías deterministas), y que son consecuencia de un programa de senescencia incluido en el propio genoma celular (Moment, 1992) y las que consideran que el fenómeno se debe a la acumulación de acontecimientos que ocurren al azar (teorías estocásticas), y que producen alteraciones celulares y moleculares (ADN, ARN, proteínas y lípidos). En realidad, estas propuestas de explicación del envejecimiento no se excluyen mutuamente y de hecho se entrecruzan en muchos de sus aspectos (Tabla I-1).

Tabla I-1. Teorías del envejecimiento celular.

| Teoría | Descripción |
|------------------------------|---|
| Teorías deterministas | |
| Pérdida de ADN repetitivo | Múltiples copias inactivadas o perdidas |
| Acortamientos de telómeros | Alteración de la actividad telomerasa |
| Diferenciación terminal | Factores de crecimiento no expresados o inhibidores del mismo sobreexpresados |
| Teorías estocásticas | |
| Ritmo de vida | Unidades metabólicas fijas |
| Mutaciones somáticas | Mutaciones en los genes |
| Radicales libres | Radicales de oxígeno hiperactivos |
| Acumulación de productos | Transformación en sustancias tóxicas |
| Entrecruzamiento | Enlaces entre macromoléculas |
| Catástrofe de error | Aumento de los errores en la síntesis de proteínas |
| Proteólisis alterada | Disminución del turnover de proteínas |

A) TEORÍAS DETERMINISTAS

De acuerdo con estas teorías, el envejecimiento y la muerte celular (apoptosis) estarían establecidas en el programa genético de las células, de manera que un número restringido de genes presentes a lo largo de la vida celular determinarían su envejecimiento. Estos genes serían responsables de una cascada de expresiones y represiones de genes, que a lo largo de la vida establecen el momento a partir del cual otros genes se activan o se desactivan. Estas teorías se basan no solo en estudios de longevidad, sino también en la observación de enfermedades genéticas, como la progenia de los niños o el síndrome de Werner, vinculadas a la alteración de un gen y que se caracterizan por síndromes de envejecimiento acelerado.

Los trabajos de Hayflick (Hayflick, 1990) demostraron que los fibroblastos humanos cultivados pierden su capacidad de proliferar después de cierto número de divisiones (de 50 a 100), que dependen de la edad del donante. La causa de este reloj interno podría ser la metilación progresiva del ADN repetitivo que acompaña la replicación del ADN y que comporta, después de un cierto número de divisiones, modificaciones de la estructura o de la expresión de los genes. Otra causa podrían ser las modificaciones moleculares que implican la pérdida de secuencias codificantes o no codificantes y que determinarían las distintas etapas del desarrollo o de la madurez (Maciera-Coelho, 1992).

La teoría de acortamiento de telómeros (del griego *telos*, extremo, y *meros*, parte), atribuye el papel de reloj mitótico a los telómeros, estructuras que se distinguen por su carácter conservador a lo largo de la evolución. Consisten en repeticiones en tándem de una secuencia rica en guaninas que se encuentran situadas en los extremos de los cromosomas. La pérdida de estas estructuras terminales produce inestabilidad cromosómica que, con el tiempo, conduce a la muerte celular. Solo en las células espermáticas y en las líneas inmortales, la longitud de estos telómeros permanece constante en cada ciclo de división, gracias a la presencia de la telomerasa, enzima que no se expresa en las otras células (Counter y cols., 1994) o en las células del mismo tipo no cancerosas. Desde el descubrimiento de esta actividad en ciliados, todos los intentos realizados por encontrar esta actividad en células normales humanas ha fracasado. El hecho de que la telomerasa falte en la mayoría de los tejidos adultos da a entender que la longitud de los telómeros de las células somáticas disminuye con la edad, debido a la incapacidad de las ADN polimerasas de replicar completamente los extremos de las moléculas lineales de ADN, que además podría ser un mecanismo de senescencia celular (Harley y cols., 1990, 1992).

El estudio del envejecimiento utilizando como modelo organismos inferiores, pone de manifiesto, al menos en hongos filamentosos, que el envejecimiento está controlado tanto por

genes nucleares como mitocondriales. Existe un intrón particular en el ADN mitocondrial que amplificado produce envejecimiento y que si se elimina en líneas mutantes las hace inmortales. Este elemento genético dirige la síntesis de una transcriptasa inversa mitocondrial. En el caso del nemátodo *C. elegans*, se ha descubierto un gen *Age-1* que está relacionado con la longevidad y que controla una resistencia al H_2O_2 . En general, se tiene cada vez más evidencia de que los genes que determinan la proliferación celular son activos durante el envejecimiento, o que los inductores que son inhibidos pueden causar senescencia.

Por otra parte, los genes implicados en el mantenimiento de la integridad celular, también juegan un papel importante en el envejecimiento y entre ellos están los que se encargan de codificar la SOD que elimina los radicales libres o la helicasa encargada de reparar el ADN (Maciera-Coelho, 1992).

B) TEORÍAS ESTOCÁSTICAS

La mayor parte de las teorías estocásticas, aunque dan un papel determinante al medio, reconocen sin embargo, la implicación de los genes, que se activarían o desactivarían como respuesta a las modificaciones del medio ambiente. Las teorías estocásticas se basan en la acumulación, bien de productos de desecho o de alteraciones sufridas a lo largo del tiempo que pueden afectar al ADN (teorías estocásticas genéticas) o a las proteínas y lípidos de membrana (Tzagaloff, 1982; Rothstein, 1981; Müller-Hocker, 1992), y que conducen a mutaciones somáticas o a la aparición de enlaces de entrecruzamiento entre macromoléculas.

Entre las teorías más aceptadas están las basadas en el papel de las mutaciones del ADN genómico o mitocondrial (Miquel, 1991). Se sabe que la mitocondria, orgánulo responsable de la respiración celular, productor de ATP, contiene ADN propio, distinto del contenido en el núcleo de la célula. Como ha recogido Wallace (Wallace, 1992), el ADN-mt tiene características genéticas únicas:

- a) Proviene de herencia materna, no mendeliana, predominantemente; menos de un 0.1% proviene del espermatozoide.
- b) En células heteroplásmicas, es decir, con mezcla de ADN-mt normal y mutante, el genotipo puede cambiar durante la replicación. De esta forma algunos linajes pueden derivar hacia ADN mutante puro (homoplásmico), otros a tipo salvaje puro y otros permanecer heteroplásmicos, con lo cual el grado de severidad de las alteraciones puede variar de unas células a otras.

c) El fenotipo celular es un reflejo de la proporción de ADN-mt mutante en la célula y del grado de funcionalidad de la mitocondria.

d) El ADN-mt fija mutaciones 16 veces más rápido que los genes nucleares, razón por la cual, la frecuencia de mutaciones en genes del ADN-mt es mucho mayor que la de los genes codificados por el ADN-n.

El ADN mitocondrial está menos protegido que el nuclear y carece de sistemas de reparación, por lo que en principio estará más expuesto al ataque de radicales libres que se generan durante la producción de ATP debido a la presencia de mitocondrias alteradas (Sohal y cols., 1992). Mediante el empleo de diferentes sustratos e inhibidores específicos de la cadena respiratoria, se han identificado en la mitocondria de insectos y mamíferos las regiones generadoras de H_2O_2 y del radical superóxido O_2^- (Sohal y Sohal, 1991); (figura I-1). Especial relevancia presenta la posibilidad de que la eficiencia del proceso de síntesis de ATP pueda estar alterada como consecuencia de la generación local y simultánea de radicales libres. Estas células con un potencial energético disminuído, son especialmente sensibles a situaciones de estrés con lo que perecen más fácilmente (Yen y cols., 1984). Mutaciones mitocondriales que implican la inserción o deleción de bases en el ADN-mt aparecen espontáneamente durante el desarrollo provocando una reducción de la actividad de la cadena respiratoria, fundamentalmente en los complejos I y IV (Cooper y cols., 1992), acompañado de una pérdida progresiva de la capacidad para regenerar la población mitocondrial.

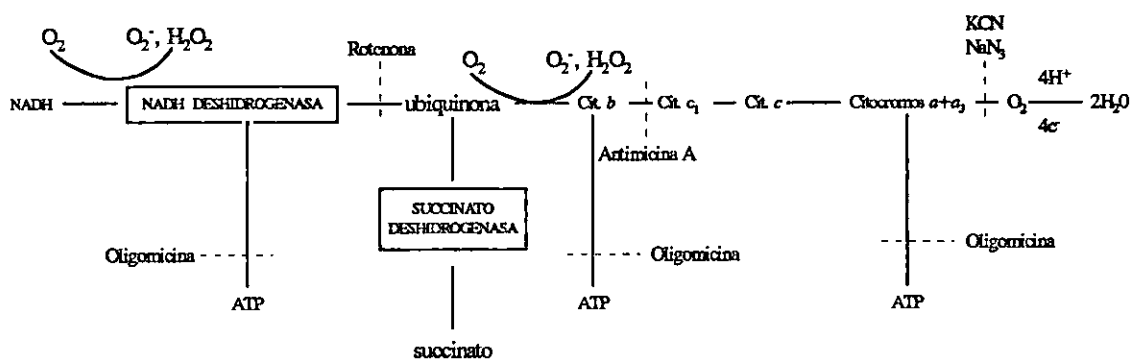


Figura I-1. Representación esquemática de la organización de la cadena respiratoria. Se indican los sitios de generación de radicales libres (O_2^- y H_2O_2) y de acción de los inhibidores respiratorios.

Según los factores responsables de las alteraciones, las teorías más aceptadas son las que consideran, a los radicales libres causantes del deterioro celular y molecular que se produce durante el envejecimiento. Estos se producen durante el metabolismo normal y como

consecuencia de agresiones externas físicas y químicas, y son muy tóxicos para los constituyentes celulares, pudiendo desorganizar las membranas lipídicas, oxidar las proteínas afectando a su funcionalidad o produciendo mutaciones en el ADN (Nohl, 1993; Harman, 1983). Las células viejas no son capaces de resistir estas agresiones de los radicales libres, debido a que los sistemas de protección, antioxidantes (vitaminas C y E, β - caroteno así como enzimas que transforman los radicales libres en moléculas inocuas) y los sistemas de reparación de ADN pueden encontrarse alterados. La importancia de estos agentes nocivos se ha demostrado recientemente (Oor y Sohal, 1994) mediante estudios en *Drosophila melanogaster*, en las que se han introducido genes de la superóxido dismutasa (SOD) y de la catalasa y los animales transgénicos tenían la capacidad de convertir los iones superóxido en H_2O_2 y ésta en H_2O y oxígeno incrementando su vida y sus capacidades físicas un tercio; por otra parte la tasa de oxidación de proteínas era claramente inferior a la de las moscas no tratadas.

Otras teorías (Kirkland, 1992; Zghinicki, 1987) dan mayor importancia a la degradación o cambios en las membranas celulares y mitocondriales por modificaciones estructurales o funcionales de sus componentes, siendo el caso más común el de la peroxidación lipídica.

Es evidente, que los estudios a nivel mitocondrial han permitido avanzar en el conocimiento de aspectos que contribuyen a la comprensión del envejecimiento, puesto que la disminución de la respiración celular (Hansford y cols., 1983; Boffoli y cols., 1994; de la Cruz y cols., 1990), que culmina en la producción de ATP como fuente de energía, es una característica muy importante de lo que constituye el envejecimiento celular. Por tanto, no es de extrañar que gran parte de los estudios sobre el envejecimiento se centren en la mitocondria.

I.2. COMPLEJO I-III

La membrana interna mitocondrial contiene los cinco complejos enzimáticos que actúan sucesivamente en la transferencia de electrones desde los sustratos reducidos al oxígeno, el cual se reduce a agua. Las reacciones redox están acopladas a la síntesis de ATP, constituyendo el proceso conocido como fosforilación oxidativa. El complejo I-III o NADH citocromo c oxidorreductasa (EC 1.6.99.3), transfiere los electrones desde el NADH, a través de la ubiquinona, hasta el citocromo c. Aunque funcionalmente el complejo I-III puede considerarse de manera autónoma, para los estudios estructurales es necesario remitirse a los dos complejos constituyentes; el complejo I (NADH ubiquinona oxidorreductasa) y el complejo III (ubiquinol citocromo c oxidorreductasa).

I.2.1. COMPLEJO I

I.2.1.1. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL

La primera enzima en la cadena respiratoria mitocondrial es la NADH:ubiquinona oxidorreductasa o complejo I (EC 1.6.5.3). Cataliza la transferencia de los dos electrones del NADH a través de diversos centros redox de la enzima (FMN, centros ferrosulfuro), hasta el aceptor natural de electrones; la ubiquinona o coenzima Q_1 , acopló la energía de la reacción redox a la translocación de 3-5 protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana (Brown y Brand, 1988; Weiss y cols., 1991; Walker, 1992) generando un potencial de membrana que posibilita la síntesis de ATP.

Es la enzima respiratoria más compleja, estando presente en todos los organismos. Se ha aislado de *E. Coli* (Hayashi y cols., 1989), *Neurospora crassa* (Azevedo y cols., 1994), *Candida utilis* (Ragan, 1987) y en plantas, de *Solanum tuberosum* (Herz y cols., 1994). En mamíferos se ha aislado de corazón de buey, no existiendo referencias bibliográficas en otros animales superiores. Está constituida por al menos 41 cadenas polipeptídicas (Walker, 1992) con una masa molecular estimada actualmente en 900 kDa (Pilkington y cols., 1993). De ellas, siete son codificadas por el ADN mitocondrial y los respectivos productos polipeptídicos son sintetizados dentro de la mitocondria y al menos 34 subunidades conocidas codificadas por el ADN nuclear, sintetizadas en los ribosomas citoplasmáticos y transportados dentro de la mitocondria y caracterizadas por análisis de secuencia [para revisión ver Walker (1992)].

El origen de la considerable diferencia en la complejidad de este complejo respiratorio, entre los distintos organismos, no está clara así como la función exacta de algunas de las subunidades. Algunas de las proteínas adicionales, pueden conferir otras actividades enzimáticas o ser necesarias para el acoplamiento del complejo. Así, en *N. crassa* (Sackmann y cols., 1991) y en buey (Runswick y cols., 1991), se ha detectado una asociación estrecha entre una actividad transportadora de grupos acilo con el complejo I, lo cual sugiere la existencia de otras, hasta ahora desconocidas funciones bioquímicas en este múltiplo enzimático. La relación entre la actividad acil y la del complejo I permanece desconocida.

La enzima puede ser extraída y purificada de la mitocondria por tratamiento con detergentes de sales biliares, seguido de fraccionamiento con sales de amonio (Hatefi y cols., 1962a, Heron y cols., 1979). La enzima aislada es capaz de catalizar la transferencia de electrones del NADH a un gran número de aceptores artificiales así como a su aceptor natural; la ubiquinona (Ragan, 1976).

Los centros rédox del complejo no se conocen aún en su totalidad; se sabe que contiene FMN, ubiquinona, cuatro centros ferrosulfuro detectables por EPR, denominados N1b, N2, N3 y N4), reducibles por NADH (Ohnishi y cols., 1981, 1985) y posiblemente dos o más centros ferrosulfuro, EPR silentes y no reducibles por NADH (Hatefi, 1985).

Debido a la gran complejidad de la enzima, los diferentes fraccionamientos de la enzima en subcomplejos han facilitado los estudios funcionales, encaminados al conocimiento de la secuencia de los centros rédox y del mecanismo de acción de la enzima, así como los estudios estructurales mediante el empleo de agentes de entrecruzamiento (Yamaguchi y Hatefi, 1993), que han posibilitado una visión topológica sobre la disposición de las subunidades en el complejo. De esta forma, el fraccionamiento del complejo I con perclorato mas sulfato amónico a permitido identificar los elementos funcionales del complejo:

a) Una flavoproteína (FP) con tres subunidades de masas moleculares 51, 24 y 10 kDa. Manifiesta actividad catalítica. Transfiere electrones del NADH al ferricianuro, y posee actividad enzimática con análogos de NAD y varios aceptores artificiales de electrones como 3-acetil piridina, 2,6 dicloroindofenol y menadiona, pero no es capaz de transferir electrones a la ubiquinona y no es sensible a rotenona (Galante Y Hatefi, 1979).

b) Proteína ferrosulfurada (IP) con seis o siete subunidades de masas moleculares de 75, 49, 30, 18, 15, 13 y posiblemente 20 kDa (Ragan, 1987; Masui y cols., 1991) que parece contener algunos de los centro ferrosulfuro.

c) Fracción insoluble (HP) que contiene 15 polipéptidos entre los que se encuentran todas las subunidades codificadas por el ADN-mt. No hay evidencia de que mantenga su integridad estructural durante el proceso de fraccionamiento.

Por otra parte, el uso de detergentes no desnaturalizantes como N,N dimetildodecil N-óxido (LDAO) separa dos subcomplejos I α y I β , los cuales representan los dominios estructurales extrínseco e intrínseco respectivamente (Finel y cols., 1992).

a) El subcomplejo I α , tranfiere electrones desde el NADH al ferricianuro y la ubiquinona-1 y contiene alrededor de 22 subunidades, todos los Fe-S detectados por EPR y los grupos prostéticos presentes en el complejo intacto. Comprende todas las subunidades de los subcomplejos IP y FP.

b) El subcomplejo I β , contiene alrededor de 15 subunidades, marcadamente hidrofóbicas. No contiene ningún Fe-S, y no se le atribuye ninguna función biológica.

Recientes estudios en cristalización del complejo I por análisis de imagen de micrografías de electrones, indican que la enzima es un dímero que parece contener un hoyo central abierto que puede representar el centro activo hendido de la proteína (Van Belzen y cols., 1990; 1992).

Tabla I-2. Composición polipeptídica del complejo I en corazón de buey.

| M (kDa) ^a | NOMENCLATURA ^b | COMENTARIOS ^c |
|----------------------|---------------------------|--------------------------------|
| 75 | 75 kDa (IP) | [4Fe-4S], [2Fe-2S] ? |
| 51 | 51 kDa (FP) | FMN, [4Fe-4S]; NADH |
| 50 | ND5 | |
| 49 | 49 kDa (IP) | |
| 42 | 42 kDa | |
| 39 | 39 kDa, ND4 | |
| 30 | 30 kDa, ND1, ND2 | |
| 24 | 24 kDa (FP) | [2Fe-2S] ? |
| 23 | TYKI | 2 x [4Fe-4S] |
| 22 | B22, PDSW | |
| 20 | PSST | |
| 19 | PGIV | proteína ferrosulfurada ? |
| 19 | ASHI | proteína ferrosulfurada ? |
| 18 | B18, 18 kDa (IP) | |
| 16.5 | B17 | |
| 16 | SGDH | |
| 15 | B15, 13 kDa (IP), ND3 | |
| 14 | B14 | |
| 13 | B13, 13 kDa (IP) | |
| 13 | 15 kDa (IP) | |
| 12 | B12 | |
| 10 | 10 kDa (FP), ND4L | |
| 9 | B9, MLRQ | |
| 8 | SDAP | Transportadora de grupos acilo |
| 8 | B8 | |
| 7.9 | AGGG | |
| 7.5 | MWFE | |
| 7 | MNLL | |
| 6 | KFYI | |
| n.d.* | ND6 | |

^a Determinada por electroforesis empleando el método de Schägger y cols. (1986).

^b Según Walker (1992).

^c Asociación entre elementos funcionales y estructurales con subunidades del complejo (Walker, 1992).

* n.d.: no detectada en gel. La masa molecular determinada por análisis de secuencia es de 19105.6 Da.

I.2.1.2. ALTERACIONES EN EL COMPLEJO I

I.2.1.2.1. Patologías asociadas al ADN mitocondrial

Un gran número de enfermedades humanas han sido asociadas con defectos en el proceso de traslocación de protones en las enzimas de la cadena respiratoria de la mitocondria. Alrededor del 38% del genoma mitocondrial codifica subunidades del complejo I, siendo las alteraciones asociadas a este complejo las más comunes. Las enfermedades afectan predominantemente a órganos con gran demanda de ATP como cerebro y músculo esquelético; a éstos les siguen, por orden decreciente de severidad, el corazón, riñón e hígado. La pérdida de la capacidad respiratoria puede ser compensada en algunos tejidos, mientras que en otros, puede alcanzar niveles que produzcan una alteración irreversible.

Se han descrito numerosas mutaciones puntuales que afectan a cuatro de las siete subunidades mitocondriales del complejo I y que dan lugar a diversas patologías como la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), la epilepsia miocrónica con fibras rojas rasgadas (MERF), la encefalopatía mitocondrial, la acidosis láctica severa (MELAS), la necrosis infantil estriatal bilateral y el síndrome de Kearns-Sayre (Wallace, 1989, 1992). También se ha asociado a la enfermedad de Parkinson (Breakefield, 1992) y al síndrome de Huntington (Parker y cols., 1990).

I.2.1.2.2. Implicaciones del complejo I en el envejecimiento: alteraciones fisiopatológicas

Debido a las peculiares características del ADN mitocondrial, expuestas anteriormente, la acumulación de mutaciones mitocondriales a lo largo de la vida, conduce a la progresiva pérdida de la función respiratoria en las células, contribuyendo a los procesos de envejecimiento y a varias enfermedades degenerativas (Linnane y cols., 1989). Estudios realizados en humanos relacionados con la edad de los individuos, indican una disminución en la actividad de la cadena respiratoria en mitocondria de músculo esquelético (Trounce y cols., 1989) y en corazón (Müller-Hocker, 1989). Por otra parte, se han descrito varias mutaciones que afectan al ADN mitocondrial, relacionadas con la edad. Una de ellas consiste en la delección de 7 kb que comprende cinco subunidades del complejo I en pacientes de 70 años (Sugiyama y cols., 1991; Katayama y cols., 1991). Otra delección de igual magnitud afecta a individuos con enfermedades hepáticas (Yamamoto y cols., 1992). El complejo I también parece implicado en la enfermedad neurodegenerativa de Alzheimer, al encontrarse una mutación puntual en el gen ND2 en cerebros de 10 de 19 víctimas de la enfermedad (Lin y cols., 1991).

I.2.2. COMPLEJO III

El complejo III, ubiquinol citocromo *c* oxidorreductasa (EC 1.10.2.2) de la cadena respiratoria, también conocido como complejo *bc*₁, es un complejo multiproteico integral de la membrana interna mitocondrial que cataliza la transferencia de electrones desde el ubiquinol al citocromo *c* captando dos protones de la matriz, generando un gradiente de protones a través de la membrana interna mitocondrial con un balance total de cuatro protones por cada dos electrones transferidos. (Hinkle y cols., 1991). Esto genera un potencial de membrana suficiente para la síntesis de ATP. Complejos homólogos están implicados en el transporte de electrones fotosintéticos en cloroplastos y algas cianofíceas (Hauska y cols., 1983). Los componentes redox esenciales son dos citocromos *b*, un citocromo *c*, un centro Fe-S y ubiquinona.

La enzima se ha aislado de mitocondria de levadura (Sidhu y cols., 1982), plantas (Berry y cols., 1991), *Neurospora crassa* (Weiss y Juchs, 1978) y bacterias (Hashimoto y cols., 1982). En animales superiores se ha aislado a partir de corazón de buey (Hatefi y cols., 1962b).

Por electroforesis en geles de poliacrilamida se ha resuelto el complejo en 11 subunidades (Schägger y cols., 1986; Usui y cols., 1991), cuyas secuencias de aminoácidos han sido determinadas (Gencic y cols., 1991).

Tabla I-3. Composición polipeptídica del complejo III de corazón de buey.

| M (kDa) ^a | NOMENCLATURA | COMENTARIOS ^b |
|----------------------|--------------|----------------------------|
| 49 | I | Core I |
| 47 | II | Core II |
| 43.7 | III | Unión a citocromo <i>b</i> |
| 27.9 | IV | Unión a citocromo <i>c</i> |
| 25 | V | proteína ferrosulfurada |
| 13.4 | VI | Unión a ubiquinona |
| 9.5 | VII | |
| 9.2 | VIII | <i>Hinge protein</i> |
| 8.0 | IX | Unión a DCCD |
| 7.2 | X | |
| 6.4 | XI | |

^a Masa molecular determinada por electroforesis según el método de Schägger y cols. (1986).

^b Asociación entre elementos funcionales y estructurales con las subunidades del complejo.

La información estructural del complejo es muy limitada. La topología del complejo se ha estudiado a partir de estudios de digestión por proteasas, modificación química, estudios de entrecruzamiento con carbodiimidas y agentes homofuncionales y por microscopía electrónica (González-Halphen y cols., 1988). A partir de estudios sobre cristales bidimensionales (Leonard y cols., 1981), experimentos de velocidad de sedimentación (De Vries, 1985) e inhibidores (Nieboer y Berden, 1992), se ha demostrado que la enzima aislada es un dímero. Hasta hace unos años no ha sido posible la obtención de cristales estables de la enzima (Wen-Hai y cols., 1991), adecuados para la obtención del patrón de difracción de rayos X (Berry y cols., 1991), pero hasta la fecha no se ha ofrecido ningún modelo tridimensional de la enzima.

II. OBJETIVOS

La mayor parte de los estudios sobre envejecimiento se centran en la mitocondria y en las lesiones morfológicas y bioquímicas que se producen en la misma con la edad, como orgánulo responsable de la transducción energética en la célula, y a fin de ayudar a esclarecer un síntoma evidente del envejecimiento; la falta de energía. Estos procesos podrían estar relacionados, con mucha probabilidad, con la presencia en la mitocondria de un ADN propio, muy susceptible al deterioro a lo largo de la vida y que codifica algunas subunidades de los complejos respiratorios.

El propósito del presente trabajo puede resumirse en los siguientes puntos:

- 1.- Estudio de las variaciones morfológicas de la mitocondria con la edad, mediante la determinación por microscopía electrónica de parámetros morfológicos mitocondriales, tales como el área total de la mitocondria y la densidad de volumen de las crestas mitocondriales.
- 2.- Caracterización funcional de la mitocondria durante el envejecimiento, estudiando parámetros funcionales implicados en la homeostasis de la membrana interna mitocondrial como son el consumo de oxígeno y la entrada de calcio, así como los niveles de ATP presentes en la mitocondria.
- 3.- Investigar el comportamiento de la cadena respiratoria durante el desarrollo y el envejecimiento determinando las actividades enzimáticas de los complejos implicados.
- 4.- Interpretar las posibles variaciones observadas en la actividad de los diferentes complejos respiratorios, realizando, en los casos más destacados, dos tipos de estudios:
 - a) Estudios funcionales, mediante la cuantificación de los grupos catalíticos que intervienen en el proceso de transducción energética, tales como grupos prostéticos y centros ferrosulfuro.
 - b) Estudios estructurales a nivel molecular, comparando los patrones electroforéticos de las tres edades consideradas en el estudio, mediante:
 - Implementación de un algoritmo matemático con objeto de obtener un densitograma promedio para cada edad y determinar las variaciones

significativas en el contenido de las diferentes subunidades que componen los complejos respiratorios.

– Utilización del parámetro *Fold* con el fin de establecer la similitud entre los distintos densitogramas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. MATERIALES

III.1.1. INSTRUMENTACIÓN

Agitador de balanceo de SBB® modelo AB-2.
Analizador automático de imágenes IBAS de Kontron.
Aparato de ultrafiltración de agua Millipore® modelo Milli-Q.
Balanzas Precisa 125 A y 300M.
Baño termostatzado Unitronic 320 OR de P. Selecta.
Cámara fría a 4°C.
Cámara oscura para revelado.
Centrífuga de mesa Biofuge B de Heraeus.
Centrífuga Sorwall® RC-5B.
Congeladores de -20°C y de -80°C.
Contador de centelleo líquido Interchnique-3000L.
Cubeta de electroforesis de Hoeffler HSI, modelo SE 600.
Densitómetro láser de Molecular Dynamics equipado con el programa ImageQuant™.
Electrodo de oxígeno Clark (Yellow Spring, EEUU).
Espectrofotómetro Uvicon 940 de Control Instruments.
Espectrofotómetro Spectronic 601 de Milton Roy Company.
Estufa modelo 210 de P. Selecta apta para 200°C.
Fluorómetro SLM Aminco serie 2.
Fuente de alimentación de Pharmacia modelo EPS 500/400.
Homogenizador Omni-Mixer de Sorwall® con émbolo de teflón.
Lector de ELISA SLT de Lab Instruments.
Luminómetro Wallace LK-13 1250.
Microscopio electrónico Jeol 200.
Ordenador DELL Dimension XPS P60 con procesador Pentium™ de intel inside®.
pH-metro PHM 82 de Radiometer Copenhagen con electrodo Crison.
Sonicador Sonifier 450.
Speed Vac concentrador Savant, modelo VP100.
Ultracentrífugas Beckman® modelos L5-50 y XL-90 con rotor SW28.

III.1.2. REACTIVOS

Todos los productos químicos empleados en la realización de la presente Tesis Doctoral han sido de la máxima pureza analítica comercialmente disponible. La procedencia de los reactivos de uso más específico se indicará a medida que aparezcan en el texto.

III.1.3. MATERIAL BIOLÓGICO

Los estudios se han desarrollado con ratas Wistar hembras, sin distinción de sexo en lactantes ya que se trabajó con camadas. Los animales se mantuvieron en jaulas de plástico en habitación a 22°C, con ciclos naturales día-noche, dieta equilibrada y libre acceso al agua.

Se seleccionaron tres grupos de animales: ratas lactantes (15 días), ratas adultas (4–6 meses) y ratas viejas (26–30 meses). Los animales se sacrificaron por decapitación e inmediatamente se procedió a la extracción del hígado y purificación de las mitocondrias.

III.2. PURIFICACIÓN DE MITOCONDRIAS

III.2.1. AISLAMIENTO DE LAS MITOCONDRIAS

Las mitocondrias se aislaron a partir de hígados de ratas de las tres edades seleccionadas, por el método de Gazzoty y cols. (1979). El hígado de la rata recién sacrificada se troceó finamente y se lavó varias veces con tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, conteniendo sacarosa 0.25 M y EDTA 0.5 mM, previamente enfriado a 4°C. Se añadieron 10 ml de tampón por mg de tejido e inmediatamente se transfirió a un homogenizador con émbolo de teflón aumentando progresivamente la velocidad a medida que se introdujo el émbolo hasta el fondo. La operación se repitió dos veces. El homogenizado se filtró en gasa y se centrifugó a 800 g durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó cuidadosamente sobre gasa para eliminar la grasa y se centrifugó a 10000 g durante 8 minutos. El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en un volumen de tampón (igual al anterior pero sin EDTA) 2.5 veces el peso inicial del hígado. La resuspensión se ha de llevar a cabo cuidadosamente con una varilla de vidrio redondeada con objeto de no romper las mitocondrias. La suspensión se volvió a centrifugar a 10000 g durante 8 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en el mismo tampón y se centrifugó como en la etapa anterior, repitiéndose la operación dos veces más. Todo el proceso se lleva a cabo a 4°C y con la mayor rapidez posible con objeto de evitar en lo posible el consumo de sustratos endógenos de las mitocondrias.

III.2.2. CRITERIOS DE PUREZA

Se eligieron los siguientes marcadores enzimáticos para determinar la pureza de las mitocondrias: 5` nucleotidasa (membrana plasmática); glucosa-6 fosfatasa (microsomas), citocromo *c* oxidasa (membrana interna mitocondrial), monoamino oxidasa (membrana externa mitocondrial) y malato-NADH oxidorreductasa (matriz mitocondrial). Las determinaciones enzimáticas se llevaron a cabo tanto en el sobrenadante como en el precipitado de la última centrifugación del proceso de purificación de las mitocondrias. Los ensayos realizados se describen más adelante en el apartado III.5.2.

III.2.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FUNCIONAL

III.2.3.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Los estudios morfológicos se llevaron a cabo en un microscopio electrónico Jeol 200. Las porciones de las fracciones mitocondriales se fijaron por inmersión en tampón cacodilato sódico 0.1 M, pH 7.2, conteniendo 2.5% de glutaraldehído y 4% de sacarosa y postfijadas en tetraóxido de osmio en el mismo tampón toda la noche seguido por deshidratación por medio de alcohol y embebidas en Epon.

Los estudios estereológicos se realizaron determinando los parámetros mitocondriales de densidad de volumen y densidad numérica de las crestas mediante un analizador automático de imágenes IBAS (Kontron, R.F.A.) por el procedimiento de Weibell (1979) para el análisis de áreas.

III.2.3.2. CONSUMO DE OXÍGENO

La velocidad de consumo de oxígeno se determinó utilizando un electrodo de oxígeno tipo Clark (Yellow Spring, EE.UU.) calibrado con ditionito sódico siguiendo el procedimiento de Carafoli y Semenza (1979). Los experimentos se llevaron a cabo en una cubeta termostatizada a $27^{\circ}\text{C} \pm 1$, con agitación moderada constante. La reacción se inició con la adición de 1-2 mg de proteína mitocondrial y succinato potásico hasta una concentración final de 5 mM a un medio que contenía Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, KCl 120 mM, fosfato inorgánico 2 mM y rotenona 12 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína. Transcurrido un minuto se añadió a la suspensión ADP hasta una concentración final de 0.14 mM con objeto de estimular la respiración. El potencial se midió hasta que la mitocondria volvió a su estado de respiración lenta.

III.2.3.3. CINÉTICA DE TRANSPORTE DE CALCIO EN LA MITOCONDRIA

La entrada de calcio en la mitocondria se determinó por el método de Borle (1975). La mitocondria (0.6–0.7 mg de proteína/ml) en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7.4 que contenía sacarosa 125 mM, succinato potásico 10 mM, cloruro magnésico 4 mM, fosfato inorgánico 4 mM, ATP 5 mM, cloruro potásico 33 mM y una concentración final de Ca^{2+} de 5 μM se incubó a 25°C con agitación constante. La reacción se inició por la adición de 2 μCi de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /ml. A diferentes intervalos de tiempo (10, 20, 30, 60 y 90 segundos) se recogió 1 ml de la mezcla de incubación y se separó la mitocondria mediante filtración a través de filtros Millipore de 0.25 μ de poro.

Los filtros se lavaron inmediatamente después con 2 ml de medio frío (4°C) con el fin de parar la reacción y se introdujeron en tubos que contenían 5 ml de líquido de centelleo. La radioactividad se midió en un contador de centelleo líquido Interchnique-3000L. Cada medida se realizó por duplicado.

III.2.3.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE ATP EN LA MITOCONDRIA

El contenido total de ATP se determinó en mitocondrias tanto en el estado 3 (respirantes) como en el estado 4 (de reposo) por el método descrito por Stanley y Williams (1969). Las mitocondrias fueron resuspendidas en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, KCl 120 mM, fosfato inorgánico 2 mM y rotenona 12 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína. Para inducir la respiración se añadieron ADP y succinato potásico hasta concentraciones finales de 1 y 10 mM respectivamente.

Un ml de cada una de las suspensiones mitocondriales (tanto en mitocondrias en el estado de reposo como en las activadas con ADP y succinato potásico), se incubaron a la temperatura de 25°C durante 2 minutos con agitación suave y se añadió 1 ml de ácido perclórico al 8% (v/v). Las suspensiones se sonicaron durante 30 segundos y se centrifugó 12000 g durante 5 minutos. El pH del sobrenadante se ajustó a 7.5. A continuación, se diluyeron 200 μl del sobrenadante hasta 1 ml con Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 que contenía EDTA 2.5 mM y se añadieron 100 μl de luciferasa.

Finalmente, el contenido total de ATP en la mezcla de incubación se determinó utilizando un luminómetro Wallace LK-13 1250.

III.3. PURIFICACIÓN DEL COMPLEJO I-III

Aunque existen varios métodos para la purificación en animales superiores de los complejos I; Hatefi y cols. (1962a), Ragan (1987) y Finel y cols. (1992) y para el complejo III; Hatefi y cols. (1962b), Yu y Yu (1980), Schägger y cols. (1986), sólo se han descrito dos métodos específicos para la purificación del complejo I-III; Hatefi y cols. (1961) y Hatefi y Rieske (1967a), en corazón de buey, basados en la precipitación fraccionada de las proteínas mitocondriales con reactivos caotrópicos, aunque el segundo es en realidad un método mejorado del primero. El complejo I-III obtenido por estos métodos puede fraccionarse en el complejo I (Hatefi y Rieske, 1967b) y en el complejo III (Rieske, 1967). No existen datos bibliográficos para la purificación del complejo I-III ni de ningún otro complejo de la cadena respiratoria mitocondrial en rata.

III.3.1. OBTENCIÓN DEL COMPLEJO I-III

El complejo I-III se purificó por el método de Hatefi y Rieske, (1967a). El método consiste en el fraccionamiento de la membrana mitocondrial interna por tratamiento con deoxicolato potásico y precipitación selectiva de las proteínas mitocondriales mediante el empleo de acetato amónico.

La purificación del complejo se ha efectuado en una ultracentrífuga Beckman XL-90 con un rotor tipo SW28 ($r_m = 16.1$ cm), que no permite alcanzar las 30000 rpm necesarias en las centrifugaciones del proceso de purificación. Por esta razón, ha sido preciso alargar los tiempos de centrifugación en la medida necesaria para obtener una duplicidad en la carrera. Los valores de los tiempos de centrifugación adaptados para 28000 rpm aparecen entre paréntesis junto a las centrifugaciones del método original que se describe a continuación.

A) REACTIVOS

- Sacarosa 0.25 M
- Tampón Tris-Sacarosa-Histidina (TSH), pH 8.0:
 - Sacarosa 0.66 M
 - Tris 50 mM
 - Histidina 1 mM
- Acetato amónico saturado al 50% (740 g/l agua)
- Deoxicolato potásico al 10% (p/v), pH 8.0
- Tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8.0

B) PROCEDIMIENTO

Las mitocondrias aisladas por el procedimiento descrito en el apartado III.2.1., se resuspendieron tras la última centrifugación en sacarosa 0.25 M hasta una concentración entre 50–70 mg/ml, congelándose a -20°C hasta su uso. Las mitocondrias se descongelaron a temperatura ambiente diluyendo con sacarosa 0.25 M hasta 30 mg/ml, homogenizando en un homogenizador de vidrio; posteriormente se centrifugó a 30000 rpm durante 20 minutos (23 minutos). El precipitado se resuspendió en tampón TSH hasta ajustar la concentración de proteína a 23 mg/ml. Si aparece en el fondo del tubo un precipitado marrón más oscuro, éste debe despreciarse, para coger solo la suspensión que esté por encima.

Una vez resuspendido el precipitado, se añadió deoxicolato potásico al 10% (p/v) a una concentración 0.3 mg de deoxicolato/mg de proteína, seguido de KCl a una concentración de 72 g/l (la suma de los volúmenes de la suspensión mitocondrial más el volumen de deoxicolato). Una vez disuelto el KCl se centrifugó a 30000 rpm durante 30 minutos (35 minutos). El precipitado verde contiene el complejo IV de la cadena respiratoria y puede conservarse a -70°C para su posterior purificación. Al sobrenadante rojo claro, que contiene los restantes complejos mitocondriales, se añadieron 0.25 volúmenes de agua destilada fría y se volvió a centrifugar 30 minutos a 30000 rpm (35 minutos). Se descartó el residuo verde oliva y el sobrenadante se colocó en membranas de diálisis de 2–2.5 cm de anchura, dializándose frente a 8–10 volúmenes de tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 durante 3 horas en cámara fría. La mezcla turbia se centrifugó 75–90 minutos a 30000 rpm (86–105 minutos). El sobrenadante amarillo contiene el complejo V y puede almacenarse a -70°C . El precipitado rojo oscuro se resuspendió y homogenizó suavemente en un pequeño volumen de TSH y se almacenó hasta su uso a -20°C .

El precipitado se descongeló a temperatura ambiente homogenizando suavemente para evitar la formación de espuma y se ajustó la concentración con tampón TSH a 10 mg/ml. Se añadió deoxicolato potásico a una concentración de 0.5 mg/mg de proteína seguido de NH_4AC saturado al 50% a una concentración de 16.5 ml/100 ml (volumen total de la suspensión). Se esperó 15 minutos a 0°C y se centrifugó a 30000 rpm 30 minutos (35 minutos). El sobrenadante rojo se trató con 5–6.5 ml de NH_4AC al 50% /100 ml. Tras esperar 15 minutos a 0°C se centrifugó a 30000 rpm 30 minutos (35 minutos). Se desechó el precipitado y se añadió al sobrenadante 3.3 ml de NH_4Ac /100 ml de suspensión. Se esperó 15 minutos a 0°C y se centrifugó a 30000 rpm durante 45 minutos (52 minutos). El sobrenadante rojo contiene el complejo II–III. El sedimento, que consiste en un material denso marrón rojizo que contiene el complejo I–III, se resuspendió con TSH, conservándose a -20°C con pérdida de poca actividad. El proceso se esquematiza en la figura III-1.

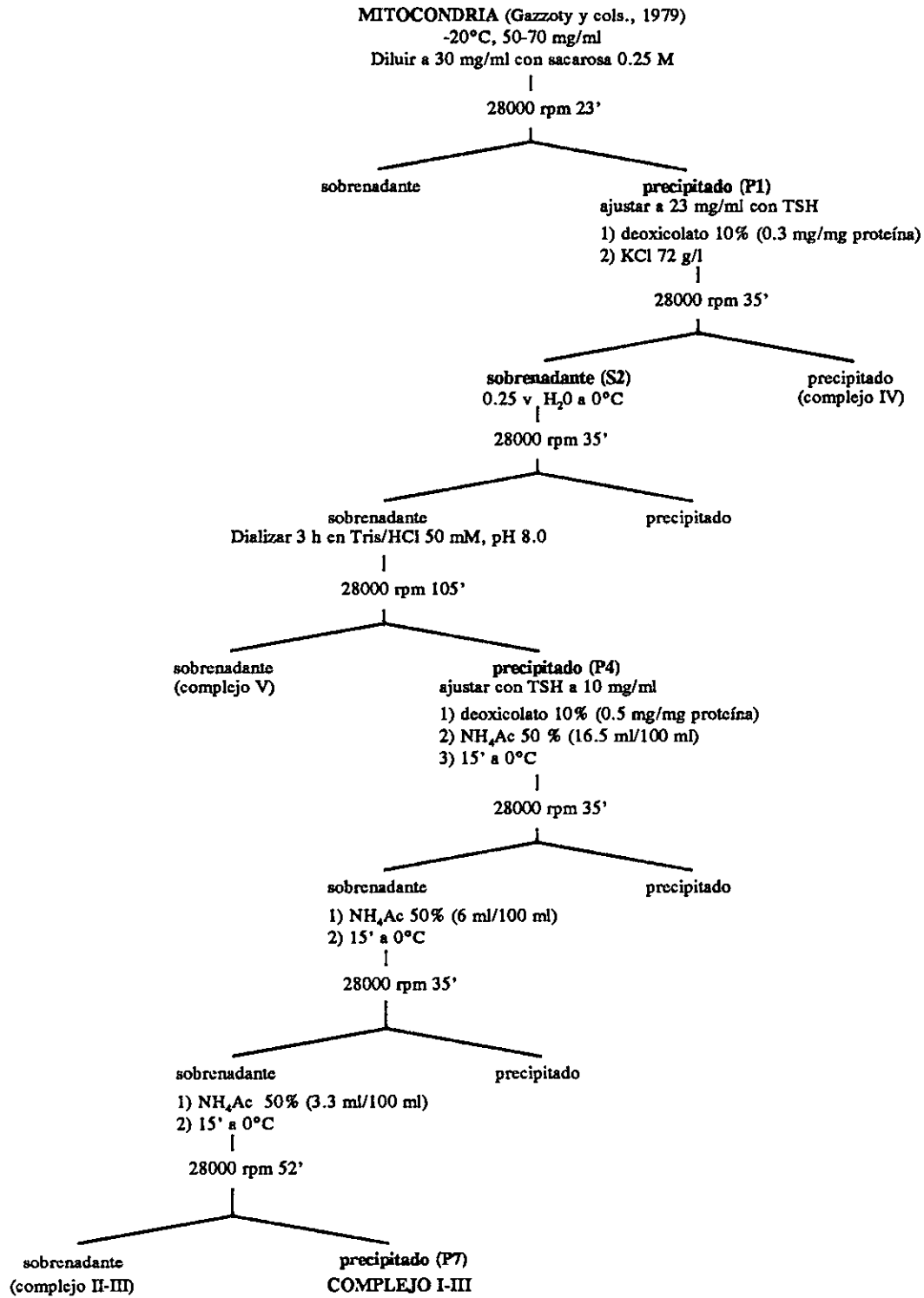


Figura III-1. Purificación del complejo I-III por el método de Hatefi y Rieske (1967a). En negrilla se muestran las etapas seleccionadas para el seguimiento del proceso de purificación.

III.3.2. CRITERIOS DE PUREZA

Para seguir el proceso de fraccionamiento de la mitocondria y purificación del complejo I-III, se seleccionaron diversas etapas del proceso ensayándose las actividades enzimáticas de las siguientes enzimas mitocondriales: malato deshidrogenasa (malato-NADH oxidorreductasa) de la matriz mitocondrial, citocromo *c* oxidasa, succinato-citocromo *c* oxidorreductasa, succinato-coenzima Q oxidorreductasa y NADH-citocromo *c* oxidorreductasa de la membrana interna mitocondrial. Los ensayos efectuados se describen más adelante en el apartado III.5.2.

III.4. ELECTROFORESIS EN GELES DE TRICINA

De todos los sistemas descritos en la bibliografía, tan solo el método de Schägger y cols. (1986) permite la resolución de todas las subunidades del complejo III. El sistema de electroforesis en geles de poliacrilamida de Swank y Munkres (1971) con 12.5% T, 3% C y urea 8 M, requiere mucho tiempo de electroforesis y sin gel de apilamiento, provoca la difusión de las bandas, a la vez que la curva de calibrado no conserva la linealidad en todo el gel, ocurriendo una ruptura entre 10-20 kDa. El sistema de Merle y Kadenbach (1980) con 16.5% T, 3% C con glicerol y/o urea presenta el mismo problema en la linealidad del estándar. Ambos no separan la proteína de 9.175 kDa de la de 9.5 kDa. Por otra parte, es necesario el empleo de un procedimiento de tinción modificado ya que las disoluciones metanólicas no tiñen la subunidad de 8 kDa.

El poder de resolución del método de Schägger y cols., se incrementa al disminuir el masa molecular de las proteínas. El método, descrito originariamente para la resolución del complejo III, presenta una resolución óptima en el rango de separación de 2-100 kDa, intervalo en el que se encuentran todas las subunidades del complejo I-III. Por otra parte, la representación semilogarítmica de la regresión lineal entre las movilidades relativas de las bandas y sus masas moleculares presenta un comportamiento lineal en todo el rango de separación.

El sistema de gel puede también ser usado para separación preparativa de pequeñas proteínas y fragmentos de proteínas para secuenciación de aminoácidos y para la separación de subunidades proteicas unidas covalentemente con inhibidores de transporte de protones y electrones. El uso de la urea puede conducir al bloqueo de los grupos amino y su empleo debe evitarse. La glicina usada en el método clásico de Laemmli (1970) se reemplaza por la tricina. De esta forma se eliminan las dificultades en la preparación de las muestras para secuenciar aminoácidos.

A) PREPARACIÓN DEL GEL

Se utilizaron geles de dimensiones 16x18x0.15 cm. Las disoluciones patrón empleadas en la electroforesis se muestran en la tabla III-1. Todas las disoluciones deben filtrarse y desgasificarse previamente y pueden conservarse a temperatura ambiente excepto la acrilamida/bisacrilamida que debe mantenerse a 4°C.

Tabla III-1. Disoluciones patrón empleadas en la electroforesis en geles de poliacrilamida.

| Disoluciones | Tris (M) | Tricina (M) | HCl (M) | SDS (%) |
|------------------------------|----------|---|---------|---------|
| Tampón ánodo ^a | 0.2 | — | — | — |
| Tampón cátodo | 0.1 | 0.1 | — | 0.1 |
| Tampón gel | 3.0 | — | 1.0 | 0.3 |
| Acrilamida/ bisacrilamida | | 48% Acrilamida (p/v)/ 1.5% bisacrilamida (p/v) | | |

^a Ajustado a pH 8.9 con HCl.

Entre las placas de cristal, limpias y secas, se vació el gel separador (tabla III-2) previamente desgasificado junto a 100 μ l de persulfato amónico al 10% (p/v) fresco y 10 μ l de TEMED, por cada 30 ml de disolución, dejando polimerizar el gel durante 20 minutos. Para asegurar una interfase regular entre el gel separador y el gel concentrador, se cubrió la superficie superior con un pequeño volumen de isobutanol al 10% (v/v). Una vez polimerizado el gel, se decantó y se lavó con abundante agua para eliminar el isobutanol. Posteriormente se añadió el gel concentrador, preparado con las cantidades que se especifican en la tabla III-2 y conteniendo 100 μ l de persulfato amónico al 10% y 10 μ l de TEMED, por cada 12 ml de disolución, dejando polimerizar durante 15 minutos.

Tabla III-2. Composición del gel separador y del gel concentrador.

| Componentes | Gel separador 16% | | |
|------------------------------|-------------------|----------|---------------------|
| | 0.15 cm | 0.075 cm | Gel concentrador 4% |
| Acrilamida/ bisacrilamida | 20 ml | 10 ml | 1 ml |
| Tampón gel | 20 ml | 10 ml | 3 ml |
| Glicerol | 8 g | 4 g | — |
| Agua hasta | 60 ml | 30 ml | 12 ml |

Los geles preparados presentan las siguientes características: gel concentrador, 4% de acrilamida (4.125% T, 3% C); gel separador, 16% de acrilamida (16.5% T, 3% C).

B) PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras fueron incubadas en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, SDS al 5%, glicerol al 15%, β -mercaptoetanol al 2% y azul de bromofenol al 0.003%. Posteriormente fueron sumergidas en agua hirviendo durante 3 minutos para la reducción de las muestras.

C) CONDICIONES DE ELECTROFORESIS

Como marcadores de pesos moleculares se utilizó el estándar Broad (Biorad) y para el seguimiento de la electroforesis se incluyeron en el gel 15 μ l de estandar Broad preteñido proporcionado también por Biorad.

La electroforesis se llevó a cabo en un aparato Hoeffer SE 600 a temperatura ambiente usando una fuente de alimentación Pharmacia EPS 500/400 bajo las siguientes condiciones:

1-2 horas a 30 V (15 mA) hasta que las muestras penetraron totalmente en el gel separador.

15-18 horas a 50 mA constantes (el voltaje se elevó de 80 a 250 V).

D) TINCIÓN DE LOS GELES

Las bandas fueron fijadas previamente en una disolución con metanol al 50% y ácido acético al 10% durante 3 horas. La tinción se llevó a cabo sumergiendo los geles en una disolución de azul de Coomassie R-250 al 0.1% y ácido acético al 10% durante 4 horas. Los geles se destiñeron con una disolución de ácido acético al 10%.

III.5. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

III.5.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

La concentración de proteína en todas las muestras se llevó a cabo por el método colorimétrico de Bradford (1976) basado en la formación de un complejo entre el colorante azul de Coomassie G-250 y aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas. Las medidas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Spectronic 601 a 595 nm usando el reactivo *Protein Assay* de Biorad y albúmina de suero bovino como estándar.

III.5.2. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

Todos los ensayos de actividades enzimáticas se efectuaron *in situ*, a la temperatura adecuada, excepto en algunas determinaciones del complejo I-III que se realizaron con muestras de mitocondria o de complejo congelados a -70°C durante un periodo máximo de 10 días, en el que la enzima conserva íntegra su actividad.

Para las determinaciones en el complejo I-III purificado, y con el fin de reconstituírlo, se añadió previamente a la mezcla de ensayo 1 mg/ml de una suspensión (40 mg/ml) de fosfatidilcolina tipo IV-S de semilla de soja (Sigma) sonicada en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, que contenía EDTA 1 mM y colato al 2% (p/v).

Los reactivos se prepararon el mismo día de los ensayos, o en su caso, mantenidos a -20°C . Las medidas se efectuaron en cubetas desechables de plástico para las determinaciones en el visible y en cubetas de cuarzo para las determinaciones en el ultravioleta, ambas de 1 cm de paso óptico en un espectrofotómetro Uvicon 940 de Kontrol Instruments de doble haz, con compartimento de cubetas termostatzado.

Los valores utilizados en esta Tesis de los coeficientes de extinción molar de los distintos cromóforos han sido: NADH $\epsilon_{340\text{ nm}} = 6.22 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, DPIP $\epsilon_{600\text{ nm}} = 20.5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, citocromo *c* $\epsilon_{550\text{ nm}} = 18.6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, benzaldehído $\epsilon_{250\text{ nm}} = 12080 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

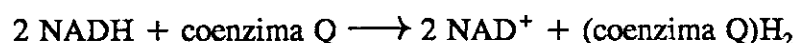
La actividad específica de las enzimas se determinó según la relación:

$$\text{A.E.} = \Delta A / \epsilon \cdot c \cdot l \cdot t$$

siendo ΔA , el incremento de absorbancia; Δt , el intervalo de tiempo considerado; ϵ , el coeficiente de extinción molar del cromóforo; c , la cantidad de proteína y l , el paso óptico de la cubeta.

III.5.2.1. NADH UBIQUINONA OXIDORREDUCTASA

La actividad del complejo I (EC 1.6.5.3) de la cadena respiratoria se determinó por el método de Hatefi (1967b). Debido a la insolubilidad del aceptor natural, la ubiquinona 1, en la mayoría de los estudios sobre actividades enzimáticas se utiliza el análogo decilubiquinona o coenzima Q_2 . La enzima actúa oxidando el NADH y transfiriendo los electrones a la ubiquinona según el siguiente esquema general:



En la cubeta de reacción se añadieron:

0.2 ml de tampón fosfato 0.1 M, pH 8.0

20 μ l de NaN_3 0.1 M neutralizada

100 μ l ubiquinona 2 (Sigma), 1 mM

15 μ l EDTA 1 mM

10 μ l de proteína

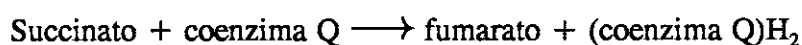
agua bidestilada hasta 0.98 ml

Blanco: 0.98 de la mezcla de reacción + 20 μ l de tampón.

Se incubó la mezcla a 37°C durante 2 minutos, añadiéndose a la cubeta de muestra 20 μ l de NADH (Boehringer Mannheim) 15 mM. Se registró el descenso de absorbancia a 340 nm correspondiente a la oxidación del NADH.

III.5.2.2. SUCCINATO COENZIMA Q OXIDORREDUCTASA

La succinato coenzima Q oxidorreductasa (EC 1.3.99.1) o complejo II de la cadena respiratoria se ensayó por el método de Ziegler y Doeg (1962), basado en la oxidación del succinato según la reacción



La tasa de reducción de la Coenzima Q por el succinato se determinó indirectamente siguiendo el cambio de color de un colorante reducible como el 2,6-diclorofenolindofenol (DPIP), el cual es reducido rápidamente por el ubiquinol o $(\text{Co Q})\text{H}_2$. En las condiciones del ensayo el DPIP no se reduce en ausencia de coenzima Q.

Se colocaron en las cubetas termostatizadas a 38°C los siguientes reactivos:

0.1 ml de tampón fosfato potásico 1 M, pH 7.0

0.1 ml de succinato potásico 0.1 M, pH 7.0

15 μ l DPIP (Sigma) 0.1 % en tampón fosfato, pH 7.0

10 μ l EDTA 1 mM

10 μ l Triton X-100 1%

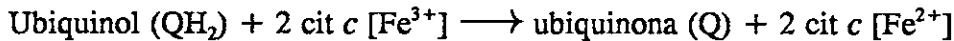
20 μ l coenzima Q al 0.5 % en etanol

Agua destilada hasta 1 ml.

Se añadieron 50–70 μ g de proteína, registrándose el descenso de absorbancia del colorante a 600 nm.

III.5.2.3. UBIQUINOL CITOCROMO *c* OXIDORREDUCTASA

El complejo III de la cadena respiratoria o complejo *bc₁*, (EC 1.10.2.2) cataliza la transferencia de electrones desde el ubiquinol hasta el citocromo *c* de acuerdo al siguiente esquema de reacción:



La coenzima Q reducida (Q₂H₂) o ubiquinol se preparó por el método de Rieske (1967b) del siguiente modo:

Se añadieron 10–50 mg de coenzima Q₂ o decilubiquinona suministrada por Sigma, disueltos en 5 ml de etanol, a 15 ml de una disolución de tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4 que contenía sacarosa 0.25 M. A continuación se añadieron dos ml de ciclohexano y una punta de ditionito para provocar la reducción, agitándose vigorosamente la mezcla en un tubo cerrado y graduado hasta decoloración.

Una vez formada la fase de ciclohexano, se eliminó con una pipeta y se colocó en un tubo cerrado. La fase acuosa se trata con ciclohexano para extraer la mayor cantidad posible de la coenzima. Los extractos de ciclohexano mezclados, se evaporaron a vacío hasta que apareció en el fondo del tubo un residuo amarillo pálido. Este se disolvió en etanol puro hasta una concentración de 10 mg/ml. Para retardar la oxidación de la coenzima Q reducida se acidificó la solución alcohólica con HCl diluido. La coenzima Q₂H₂ se conserva en alícuotas de 200 μl a –20°C durante varios meses.

La actividad enzimática se determinó por el método de Yu y Yu (1980).

La cubeta de ensayo contenía:

0.5 ml de tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4

0.25 ml NaN₃ 0.1 M

0.05 ml BSA al 10% (p/v)

10 μl Q₂H₂ 15 mM

10 μl de proteína

agua hasta 0.9 ml

Blanco: 0.9 ml de la mezcla anterior + 0.1 ml de tampón

Las muestras se incubaron durante dos minutos a 37°C, añadiéndose a continuación 100 μl de citocromo *c* oxidado al 1% (p/v) en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4, registrando el espectro a 550 nm.

III.5.2.4. SUCCINATO CITOCROMO *c* OXIDORREDUCTASA

La actividad del complejo II-III de la cadena respiratoria se determinó por el método de Tisdale (1967). Se fundamenta en el aumento de absorbancia que experimenta el citocromo *c* al reducirse en presencia de succinato, por la acción de la enzima. A fin de evitar la reoxidación del citocromo *c* por la citocromo oxidasa fue necesario bloquear el último paso de la cadena respiratoria con un inhibidor específico como es la azida sódica o el cianuro potásico.



La mezcla de reacción contenía:

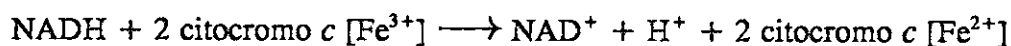
- 0.1 ml de tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4
- 0.1 ml de azida sódica 0.1 M
- 0.1 ml de succinato potásico 0.1 M, pH 7
- 20 μ l de EDTA 1 mM
- 50 μ l de BSA al 10%
- 10 μ l de proteína (1 mg/ml)
- Agua bidestilada hasta 0.9 ml

Blanco: 0.9 ml de la disolución anterior + 0.1 ml de tampón.

Se incubó la mezcla de reacción a 37°C durante 2 minutos. La reacción se inició al añadir a la cubeta 0.1 ml de citocromo *c* oxidado al 1% (p/v) disuelto en el tampón fosfato, siguiéndose la cinética a 550 nm.

III.5.2.5. NADH CITOCROMO *c* OXIDORREDUCTASA

La NADH citocromo *c* oxidorreductasa o complejo I-III de la cadena respiratoria (EC 1.6.99.3), cataliza la oxidación del NADH según la ecuación



La actividad enzimática del complejo se determinó por el método de Rieske (1967) en la que la reducción del ferricitocromo *c* por el NADH se sigue espectrofotométricamente a 550 nm. También puede medirse siguiendo el descenso de absorbancia a 340 nm producido por la oxidación del NADH por el ferricitocromo *c*.

Se añadieron a la cubeta:

0.2 ml de tampón fosfato 0.1 M, pH 8.0

20 μ l de NaN_3 0.1 M neutralizada

20 μ l NADH 15 mM

15 μ l EDTA 1 mM

10 μ l de proteína

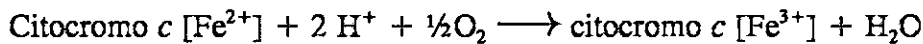
agua bidestilada hasta 0.9 ml

Blanco: 0.9 ml de la mezcla anterior + 0.1 ml de tampón

Se incubó la mezcla a 37°C durante 2 minutos y se añadieron a la cubeta de muestra 100 μ l de ferricitocromo *c* al 1% (p/v), registrando el espectro a 550 nm.

III.5.2.6. CITOCROMO *c* OXIDASA

La enzima citocromo *c* oxidasa o complejo IV de la cadena respiratoria (EC 1.9.3.1) cataliza la oxidación del citocromo *c* según la reacción:



La actividad enzimática se ensayó por el método de Smith (1955), basado en el descenso de absorbancia del citocromo *c* al pasar del estado reducido (ferrocitocromo *c*) al oxidado (ferricitocromo *c*). El citocromo *c* reducido se preparó por el procedimiento de Sottocasa y cols. (1967) añadiendo a una disolución 0.3 mM de citocromo *c* oxidado en tampón fosfato 75 mM, pH 7.5–8 unos granos de ditionito hasta cambio de color. Se agitó y se centrifugó hasta que no se apreciaron burbujas. Se neutralizó con HCl diluido y se ajustó la concentración del citocromo *c* reducido a 0.08 mM con el tampón fosfato. El citocromo *c* reducido se guardó en alícuotas de 1 ml a -20°C.

La muestra de ensayo contenía:

0.8 ml de tampón fosfato 75 mM, pH 7.4

0.1 ml de proteína (0.5 mg/ml)

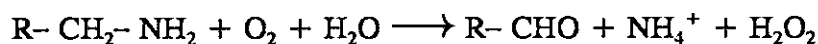
Blanco: 0.9 ml de la mezcla anterior + 0.1 ml de tampón

Se añadió 0.1 ml de citocromo *c* reducido y se registró el descenso lineal a 550 nm.

También puede seguirse la cinética polarográficamente, midiendo el consumo de oxígeno de acuerdo con el método de Sottocasa y cols. (1967).

III.5.2.7. MONOAMINO OXIDASA

La enzima monoamino oxidasa (EC 1.4.3.4) cataliza la oxidación de monoaminas a los correspondientes aldehídos según el siguiente esquema de reacción:



El método seguido para determinar la actividad específica ha sido descrito por Tabor y cols. (1954) y modificado por Salach (1978). Está basado en la diferencia entre los coeficientes de extinción molares de la benzilamina y benzaldehído a 250 nm.

La cubeta de muestra contenía:

1 ml de tampón fosfato 0.2 M, pH 7.2 que contiene Triton X-100 al 0.6% (p/v)

50 μ l de proteína

Agua destilada hasta 1.85 ml.

Blanco: 2.9 ml de la mezcla anterior + 0.1 ml de tampón.

Se incubaron las muestras a 30°C durante 3-5 minutos. La reacción se inició al añadir a la cubeta de muestra 100 μ l de benzilamina 0.1 M, neutralizada a pH 7.0 con HCl. Se siguió la cinética registrando el aumento de absorbancia a 250 nm producido por la oxidación de la benzilamina.

III.5.2.8. MALATO NADH OXIDORREDUCTASA (MALATO DESHIDROGENASA)

La actividad de la enzima malato-NADH oxidorreductasa (EC 1.1.1.37) se ensayó por el procedimiento descrito por Ochoa (1955) basado en el descenso de absorbancia debido a la oxidación del NADH en presencia de la enzima y oxalacetato según la reacción:



La mezcla de reacción en la cubeta contenía:

0.3 ml de tampón glicilglicocola 0.25 M, pH 7.4

0.1 ml de oxalacetato 7.6 mM

0.1 ml de proteína (0.1 mg/ml)

2.4 ml de agua bidestilada

Blanco: 0.9 ml de la mezcla anterior + 0.1 ml de tampón.

Se preincubó a 35°C, añadiendo a la cubeta de muestra 0.1 ml de NADH 15 mM. Se registró el descenso de absorbancia del NADH a 340 nm.

III.5.2.9. GLUCOSA-6 FOSFATASA

Esta enzima (EC 3.1.3.9) cataliza la defosforilación de la glucosa-6-P en los microsomas, con arreglo a la reacción



La actividad enzimática se llevó a cabo por el método de Swanson (1955) estimando el fosfato liberado por la determinación colorimétrica de Fiske y Subbarow (1925).

A) REACTIVOS

– Sustrato

Tris-HCl 55 mM, pH 6.6

Glucosa-6-P 11 mM

β-mercaptoetanol 11 mM

– Reactivo de parada.

TCA 10% (p/v)

– Molibdato amónico/H₂SO₄ al 2.5% (p/v).

– Reductor de Fiske y Subbarow (Sigma).

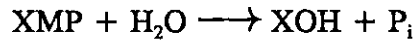
B) PROCEDIMIENTO

Se añadieron 0.9 ml de sustrato y 100 μl de proteína. Se incubó durante 15 minutos para permitir la formación de fosfato, parándose la reacción por la adición de 1 ml de TCA 10%. Se centrifugó para eliminar las proteínas a 3000 rpm durante 10 minutos.

A un ml de sobrenadante claro se añadieron 1.72 ml de agua destilada, 0.2 ml de molibdato amónico y 0.08 ml del reactivo de Fiske y Subbarow. Al mismo tiempo se preparó la recta patrón con distintas concentraciones de fosfato potásico. Se esperaron 20 minutos, procediendo a continuación a la lectura del color a 660 nm.

III.5.2.10. 5' NUCLEOTIDASA

La enzima (EC 3.1.3.5) cataliza la conversión de nucleótidos en sus respectivos nucleósidos en presencia de GMP según la reacción



La actividad enzimática se determinó por el método de Swanson (1955).

A) REACTIVOS

– Sustrato

Tris-HCl 55 mM, pH 8.5

MgCl₂ 55 mM

AMP 11 mM

– El resto de los reactivos como en glucosa-6 fosfatasa.

B) PROCEDIMIENTO

Se procedió de igual forma que para la determinación de la actividad enzimática de la glucosa-6 fosfatasa.

III.5.3. DETERMINACIÓN DE CITOCROMOS

El contenido en citocromos de la mitocondria se determinó registrando el espectro de diferencia entre las formas reducida y oxidada de los citocromos a temperatura ambiente por el método de Bookelman y cols. (1978), en un espectrofotómetro de doble haz Uvicon 940 de Kontrol Instruments. En la cubeta de referencia y en la de muestra (paso óptico de 1 cm) se colocó una suspensión que contenía 0.3–0.6 mg de proteína por ml, 24 mM fosfato potásico, 2 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 60 mM KCl, 7 mM MgCl₂, 90 mM sacarosa, 1.6 mM ADP, pH final de 7.4. Bajo estas condiciones la mitocondria se encuentra en el máximo estado de oxidación. La reducción de los citocromos en la cubeta de muestra se puede llevar a cabo por los siguientes métodos:

a) Se añade succinato 10 mM más KCN 1 mM y se registra el espectro.

b) Se añade succinato 10 mM y 1 μ g de antimicina A a la suspensión mitocondrial y se registra el espectro. A continuación se añaden unos granos de ditionito y se vuelve a registrar el espectro. La antimicina A fue suministrada por Sigma y se preparó disolviendo 5 mg en 1 ml de etanol.

De estas dos alternativas, se ha optado por la primera de ellas en los estudios en mitocondria por dos motivos:

1.- El ditionito aparte de reducir los citocromos de la cadena respiratoria, provoca también la reducción de otros cromóforos que presentan bandas de absorción en las mismas longitudes de onda como hemoglobina y mioglobina (tabla III-3). La presencia de estos dos últimos como contaminantes de las preparaciones mitocondriales está descrita en mitocondria de hígado humano (Ozawa y cols., 1972) y fundamentalmente en las preparaciones de músculo esquelético (Bookelman y cols., 1978), aunque no es posible distinguir la contaminación entre ambas puesto que presentan las mismas características espectroscópicas y por lo tanto el mismo espectro de diferencia. La contaminación afecta fundamentalmente a la bandas α y γ del citocromo *b* al solapar sus bandas de absorción. El empleo de succinato más KCN elimina el problema de la contaminación porque la hemoglobina y mioglobina no se reducen bajo estas condiciones.

Tabla III-3. Características espectroscópicas de los citocromos de la cadena respiratoria y de la oxihemoglobina y oximioglobina.

| | Bandas de absorción (nm) | | |
|----------------------------------|--------------------------|---------|----------|
| | α | β | γ |
| Citocromo $a+a_1$ | 605-630 | - | 445-455 |
| Citocromo <i>b</i> | 562-575 | 526-546 | 431-410 |
| Citocromo $c+c_1$ | 550-540 | 521-527 | 420-430 |
| Oxihemoglobina/ Oximioglobina | 557 | 542 | 415 |

2.- El contenido en citocromos que se obtiene con ditionito es mayor que el obtenido con KCN. Esto puede ser debido a que no todos los citocromos están ligados a la cadena respiratoria como han concluido Sato y Hagihara (1970) en células ascíticas de hepatoma de ratón.

El espectro de diferencia del complejo I-III se registró entre 400 y 650 nm en tampón fosfato 50 mM, pH 7.4 conteniendo colato sódico al 0.5%. La reducción se efectuó con ditionito una vez eliminados los problemas que presenta en la mitocondria.

El contenido en citocromos tanto en mitocondria como en el complejo I-III purificado, se determinó a partir de los siguientes valores bibliográficos de los coeficientes de extinción molar: citocromos $a+a_3$ $\Delta\epsilon_{605-630} = 16.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Yonekati, 1960); citocromo b $\Delta\epsilon_{563-577} = 28.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Berden y Slatter, 1970); citocromos $c+c_1$ $\Delta\epsilon_{553-539} = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Green y cols., 1959).

Para la determinación del citocromo $c+c_1$, debido al solapamiento de las bandas de absorción entre los citocromos b y $c+c_1$, es necesario sustraer 0.11 veces el $\Delta A_{563-577}$ producto de la absorción del citocromo b del $\Delta A_{553-539}$ del citocromo $c+c_1$ (Green y cols., 1959).

III.5.4. DETERMINACIÓN DE FMN

El espectro de emisión de fluorescencia de las flavinas presentes en el complejo I-III se llevó a cabo en un espectrofluorómetro SLM Aminco Serie 2 en microcubetas de cuarzo de 50 μl a temperatura ambiente con rendijas de emisión y excitación de 4 nm. Mientras no se recogían datos, se mantuvo cerrado el paso de la luz para impedir su incidencia directa sobre la muestra con objeto de evitar fotodescomposiciones. El contenido en FMN del complejo I-III se determinó interpolando los valores del máximo de fluorescencia en una recta de calibrado construída a partir de los espectros de emisión de fluorescencia de distintas concentraciones de FMN. En todos los casos el espectro de emisión se midió entre 400-700 nm con una excitación a 445 nm para una emisión máxima a 526 nm. Los espectros corregidos se han obtenido después de restar el espectro del tampón y la banda Raman del agua.

Las concentraciones de FMN de la recta de calibrado se determinaron a partir de los espectros de absorción del FMN (Sigma) registrados a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Uvicon 940 en microcubetas de cuarzo de 50 μl en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 6.1. La concentración se estimó a 445 nm asumiendo un coeficiente de extinción molar para el FMN de $12.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a dicha longitud de onda.

III.6. DETERMINACIÓN DE HIERRO NO HEMO

El contenido en hierro no hemo presente en el complejo purificado se determinó por el método de King (1964). A un volumen entre 0.2–0.4 ml de muestra correspondientes a 4–8 mg de proteína se añadió un volumen igual de HCl 2 N. La muestra se homogenizó y se transfirió a un tubo cerrado calentándose a 100°C durante una hora. Se dejó enfriar centrifugándose seguidamente a 10000 rpm durante 15 minutos. El precipitado constituye la fracción de hierro hemínico, que se descartó y el sobrenadante amarillo (fracción de hierro no hemínico) se recogió cuidadosamente.

Se añadieron a 0.2 ml de sobrenadante 50 μ l de o-fenantrolina al 0.25%, 5 μ l de hidroquinona al 1% fresca y 0.12 ml de citrato sódico al 25%. Se ajustó el pH entre 3.8 y 4.3 y se diluyó a 0.5 ml. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante una hora. Al mismo tiempo se preparó una recta de calibrado entre 0 y 1 μ mol con sulfato ferroso. El contenido en hierro se determinó midiendo la absorción del producto formado a 509 nm.

III.7. DETERMINACIÓN DE FÓSFORO

Está basado en el método de Barlett (1959) que se fundamenta en dos reacciones:

- 1.– Digestión con ácidos fuertes del compuesto orgánico de fósforo y obtención del fósforo inorgánico.
- 2.– Formación de un compuesto coloreado y cálculo de la concentración mediante la lectura de la absorción a una longitud de onda de 830 nm, comparandola con la producida por un patrón de fósforo.

A) DISOLUCIONES

- 1.– Disolución estándar de fósforo. Se prepara a partir de una disolución madre que contiene 1 mg de fósforo por ml. La diluida se obtiene diluyendo la anterior 100 veces. Ambas se suelen conservar a 4°C.
- 2.– Solución de molibdato amónico al 1% y al 5%. La primera disolución sirve de catalizador de la reacción de digestión de fósforo orgánico. La segunda se agrega para formar el compuesto coloreado del ácido fosfomolibdico con el reactivo de Fiske y Subbarow. Se conservan a 4°C aunque no perduran mucho tiempo.

3.- Reactivo de Fiske y Subbarow. Se disuelven 30 g de bisulfito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) y 6 g de sulfito sódico junto a 0.5 g de ácido 1-amino-2-hidroxi-naftalén-4-sulfónico (ANS) de Sigma, en agua destilada hasta llegar a un volumen de 250 ml.

4.- Acido perclórico al 60% (v/v)

B) PROCEDIMIENTO

Las muestras problema se introdujeron en tubos de combustión (matraces Kjeldhal o tubos muy largos). En los tubos de combustión destinados a las muestras patrón, se introdujeron 0.5 ml de la solución estándar diluída de fósforo (equivalentes a 5 μg de fósforo).

A todos los tubos se les añadió unas perlitas de vidrio para favorecer la agitación y 1.2 ml de ácido perclórico al 60% (v/v) que sirve para la digestión de la muestra. Se añadieron a continuación dos o tres gotas de molibdato amónico al 1% (p/v) y se digirió durante 20 minutos a 240°C o durante 30 minutos a 200°C. Se realizó en un baño de silicona preparado para acomodar una serie de matraces Kjeldhal o en una estufa eléctrica. Después de este intervalo se esperó a que se enfriaran los tubos, se añadieron 0.3 ml de ácido perclórico al 60% (v/v) y posteriormente 8.5 ml de agua destilada en los tubos problema y blancos, mientras que en los estándares se añadieron solo 8.0 ml de agua. Se mezcló vigorosamente y se agregaron 0.8 ml de molibdato amónico al 5% (p/v), mezclando de nuevo vigorosamente. Por último, se añadieron 0.2 ml de reactivo de Fiske y Subbarow mezclando bien a continuación. Los tubos se cubrieron con papel de aluminio y se calentaron en un baño de agua hirviendo durante 7 minutos para desarrollar el color. Se enfriaron dejando reposar durante 20 minutos (fijación del color) para medir a 830 nm. Se refiere la concentración de fósforo a concentración del compuesto si se conoce el peso molecular del mismo.

III.8. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

III.8.1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE AL COMPLEJO I-III

El anticuerpo frente al complejo I-III se obtuvo por el método de Heron y cols. (1979) descrito para la obtención de anticuerpos para el complejo I inyectando 5 mg de complejo I-III purificado diluído en 1 ml de agua en el lomo de un conejo. Transcurridas cuatro semanas, se inyectaron intramuscularmente muestras idénticas. A intervalos mensuales, se extrajo sangre del conejo de la vena de la oreja. Tras la coagulación de la sangre a 21°C durante una hora, el suero se clarificó por centrifugación y se guardó en alícuotas de 200 μl a -20°C.

III.8.2. TÉCNICAS DE DETECCIÓN INMUNOLÓGICA

III.8.2.1. ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO ELISA

En esta Memoria se ha utilizado la técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay*) descrita por Engvall (1971) para determinar la especificidad del anticuerpo. La técnica se fundamenta en el reconocimiento de la interacción antígeno-anticuerpo sobre un soporte sólido mediante la utilización de un segundo anticuerpo conjugado específico contra la región constante, F_c del primero. Este segundo anticuerpo porta unido covalentemente una enzima que al añadir el sustrato produce un compuesto coloreado que permite identificar y cuantificar la interacción entre los anticuerpos.

Entre todos los anticuerpos conjugados que pueden disponerse comercialmente, se ha utilizado el sistema peroxidasa conjugada a inmunoglobulina anti-conejo. Como sustrato se empleó OPD. La valoración de la interacción se determinó por colorimetría midiendo la absorbancia del producto formado a 403 nm en un lector de ELISA.

III.8.2.2. DOT BLOT

La técnica se realiza sobre una membrana de material sintético como nitrocelulosa, PVDF o similares. Los estudios se han efectuado con membranas de nitrocelulosa que no requieren tratamiento previo. Si se utiliza otro tipo de membrana, es necesario previamente sumergir las membranas durante 5 minutos en metanol y lavarlas de 5 a 10 minutos en agua destilada Milli-Q.

Las proteínas se depositan directamente sobre la membrana de nitrocelulosa en una sola gota (de 5 a 10 μ l equivalentes a 1-10 μ g de proteína) evitando tocar la membrana con la punta de la pipeta, dejando secar a temperatura ambiente. Durante todo el proceso, la manipulación ha de realizarse con guantes.

El procedimiento seguido para la detección de la interacción ha sido descrito por Towbin y cols. (1979) y Renart y cols. (1979) para la inmunotransferencia, método que combina las técnicas electroforéticas con la especificidad de los anticuerpos.

A) REACTIVOS

- Tampón fosfato salino (PBS) pH 7.5

Hidrógeno fosfato disódico anhidro 80 mM
Dihidrógeno fosfato sódico 20 mM
Cloruro sódico 100 mM

– Tampón PBS–Tween (PBS–T)

Tampón anterior más detergente Tween–20. La cantidad de Tween–20 puede variar en función del tipo de membrana y de la afinidad de los anticuerpos. Una concentración de Tween–20 al 0.1% es adecuada para la mayoría de los estudios.

B) PROCEDIMIENTO

- 1.– La membrana de nitrocelulosa (Hybond–ECL suministradas por Amersham) con la proteína se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas o durante toda la noche a 4 °C con tampón PBS–T que contenía disolución bloqueante al 5%.
- 2.– Se lavó la membrana con PBS–T durante 10 minutos y otras tres veces durante 5 minutos con el mismo tampón en un agitador de balanceo.
- 3.– Se incubó a temperatura ambiente con el primer anticuerpo diluido en tampón PBS–T durante 1 hora con agitación.
- 4.– Se lavó la membrana como en el paso 2.
- 5.– Se incubó a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo (IgG anticonejo conjugado con peroxidasa) diluido con el tampón durante 1 hora en un agitador orbital.
- 6.– Se lavó la membrana seis o siete veces durante 5 minutos cada vez.
- 7.– Detección. Se utilizó el sistema ECL de Amersham con las especificaciones que se adjuntan.
- 8.– Revelado. Se utilizaron líquidos de revelado convencionales. La membrana se expuso a la película (Hiperfilm de Amersham) durante períodos de 10 y 30 segundos y se procedió al revelado.

III.9. ANÁLISIS DE DATOS

III.9.1. DENSITOMETRADO

Los geles de poliacrilamida y las autorradiografías se densitometraron en un densitómetro láser de Molecular Dynamics equipado con el programa *ImageQuant*. En las autorradiografías se integró el volumen de las manchas una vez restado el fondo. Los resultados se expresan como densidad óptica de la mancha entre el área de la misma.

III.9.2. ANÁLISIS DE BANDAS

Los densitometrados de los geles se analizaron implementando un algoritmo matemático en un programa de Fortran 77 calculándose un densitograma promedio para cada grupo de edad, a partir de los cuales se calcularon las diferencias significativas entre los tres grupos de edad considerados.

III.9.3. ESTADÍSTICA.

Los resultados se han expresado como la media de los experimentos efectuados \pm E.E.M. El grado de significación se efectuó por el test de Student.

IV. RESULTADOS

IV.1. PURIFICACIÓN DE LAS MITOCONDRIAS

Como se ha indicado en el apartado III.2.1., las mitocondrias se obtuvieron a partir de hígado de rata por el método de Gazzoty y cols. (1979). Se partió de un hígado de rata adulta o vieja, o de una camada de lactantes, que vienen a corresponder entre 10–16 g de tejido aproximadamente. El rendimiento del proceso se situó sobre los 15 mg de mitocondria/g tejido, comparable con otros métodos de purificación de mitocondrias (Hatefi y cols., 1962; Whilfield y cols., 1981). En animales lactantes y viejos se obtuvieron rendimientos algo inferiores con respecto al grupo de animales adultos (14.0 y 14.5 mg/g tejido en animales lactantes y viejos respectivamente).

La pureza de las mitocondrias se determinó midiendo las actividades específicas de los marcadores enzimáticos seleccionados tanto en el sobrenadante como en el precipitado de la última centrifugación del proceso de purificación, inmediatamente después del aislamiento de las mitocondrias. Los valores de las actividades enzimáticas obtenidos se expresan en la tabla IV-1.

Tabla IV-1. Actividades específicas de los marcadores enzimáticos. Las actividades, determinadas tanto en el sobrenadante (S) como en el precipitado (P) finales en cuatro experimentos diferentes para cada grupo de edad, se expresan en todos los casos en nmoles de sustrato/mg proteína/min. Se efectuaron tres ensayos para cada marcador en cada uno de los experimentos. La actividad de la 5' nucleotidasa no se detectó en ninguna de las fracciones. Los resultados representan la media \pm E.E.M.

| | GLUCOSA-6 FOSFATASA | | MALATO DESHIDROGENASA | | MONOAMINO OXIDASA | | CITOCROMO <i>c</i> OXIDASA | |
|-----------|------------------------|------------------|--------------------------|-------------------|----------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|
| | S | P | S | P | S | P | S | P |
| LACTANTES | 320 ± 21 | 9.8 ± 0.6 | 74.0 ± 11.1 | 2468 ± 148 | 0.7 ± 0.1 | 12.7 ± 0.8 | 143 ± 12 | 1884 ± 139 |
| ADULTAS | 252 ± 18 | 5.3 ± 0.3 | 37.5 ± 5.1 | 2608 ± 161 | 1.1 ± 0.1 | 22.2 ± 1.9 | 108 ± 10 | 1995 ± 149 |
| VIEJAS | 204 ± 19 | 5.1 ± 0.3 | 168.2 ± 9.8 | 2789 ± 199 | 2.7 ± 0.2 | 26.3 ± 1.3 | 170 ± 10 | 1540 ± 143 |

La actividad de la enzima 5' nucleotidasa (membrana plasmática) no se detectó ni en el sobrenadante ni en el precipitado en ninguna de las tres edades. La actividad de la glucosa 6-fosfatasa (microsomos) aparece en la fracción soluble siendo casi inexistente en la fracción mitocondrial de las tres edades consideradas, no representando en ningún caso una contaminación superior al 3%. El resto de los marcadores, ligados a la mitocondria, aparecen en la fracción mitocondrial. En el caso de animales viejos, aparece una actividad residual más elevada de estas enzimas en la fracción soluble (entre un 6-11%) debido probablemente a una mayor fragilidad de las mitocondrias, que podría explicar el menor rendimiento que se obtiene en este grupo de edad.

IV.2. MORFOLOGÍA Y FUNCIONALIDAD DE LAS MITOCONDRIAS

Todas las medidas se han llevado a cabo en muestras de animales adultos (4-6 meses) y viejos (26-30 meses). Asimismo se utilizaron para cada edad tanto mitocondrias en el estado de reposo (estado 4) como mitocondrias respirantes, una vez inducida la respiración con ADP (estado 3 o de respiración acelerada).

IV.2.1. MORFOLOGÍA

Las micrográficas electrónicas (figura IV-1) muestran que las preparaciones mitocondriales contienen un alto grado de pureza a la vez que las mitocondrias mantienen su integridad física. Es apreciable un hinchamiento de las mitocondrias en el grupo de animales viejos. El área total de las mitocondrias y de las crestas mitocondriales se determinaron a partir de las micrográficas electrónicas. Con estos valores se calculó la densidad de volumen mitocondrial ocupado por las crestas, mediante la relación $V_v = A_c/A_t$, donde A_c es el área de las crestas y A_t es el área total de la mitocondria.

En la figura IV-2 aparecen representadas las variaciones de estos parámetros con la edad y según el estado de respiración. El área total de la mitocondria (figura IV-2A) no se ve afectada por el estado de respiración; sin embargo se observa un incremento significativo de la misma en ambos estados en los animales viejos con respecto a los adultos, representando aumentos del 33% en el estado 3 y del 39% en el estado 4, apreciable también en las micrográficas electrónicas. Por otra parte, y en cuanto a la densidad de volumen de las crestas (figura IV-2B) se aprecia una disminución de la misma en las mitocondrias no respirantes (estado 4) de un 55.2% en animales adultos, mientras que en animales envejecidos esta disminución llega a un 70.8%.

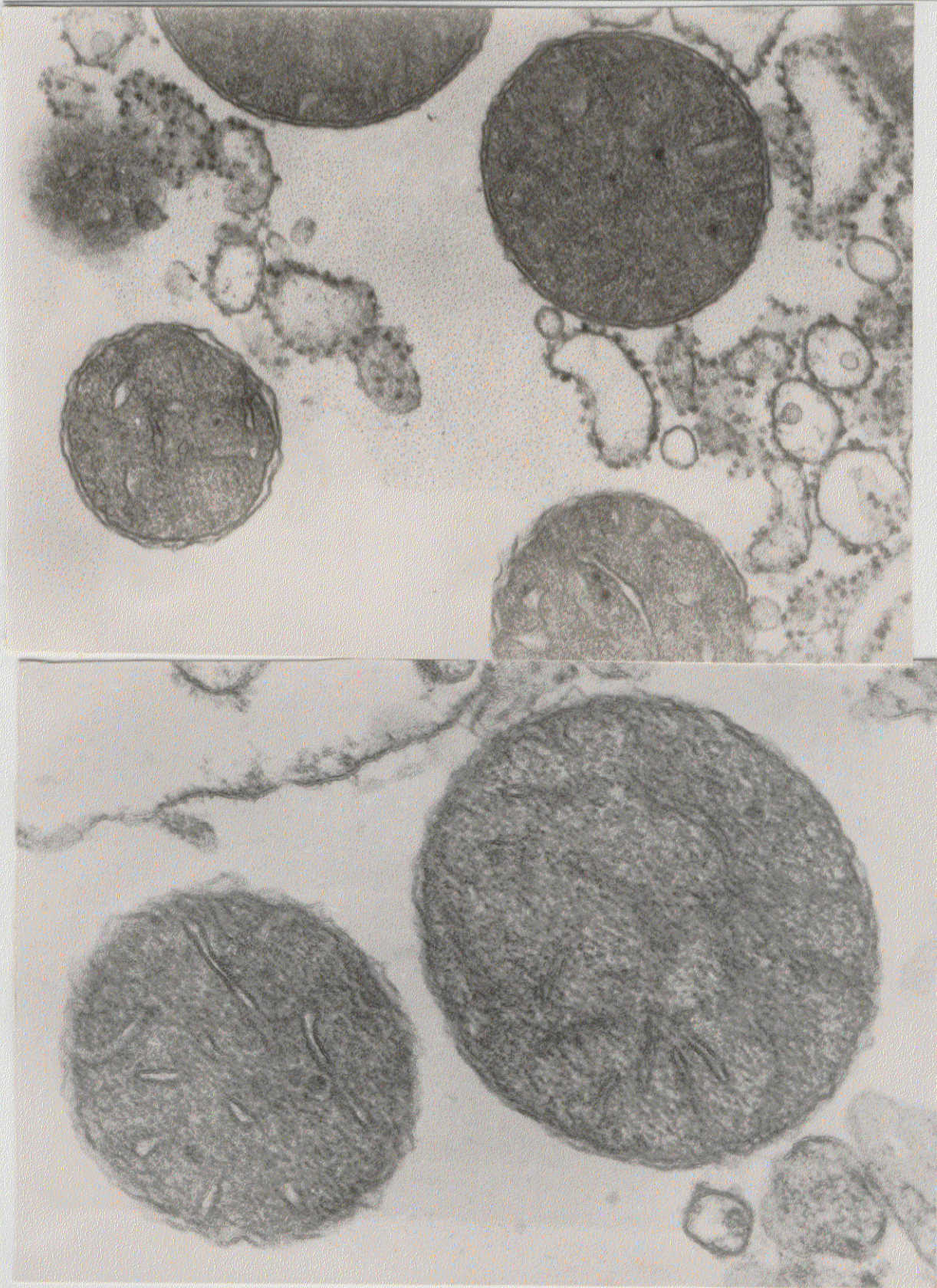


Figura IV-1. Micrografías electrónicas de mitocondria de hígado de rata (x 40000). Animales adultos (fotografía superior) y animales viejos (fotografía inferior), después del estímulo respiratorio.

La edad de los animales por su parte, también afecta al volumen de las crestas mitocondriales, ocasionando una disminución en animales de 26–30 meses con respecto a los animales de 3–6 meses tanto en el estado 3 como en el estado 4. El efecto es más notorio en el estado 4 en el cual el descenso representa un 50%, mientras que en el estado 3 es de sólo un 23%.

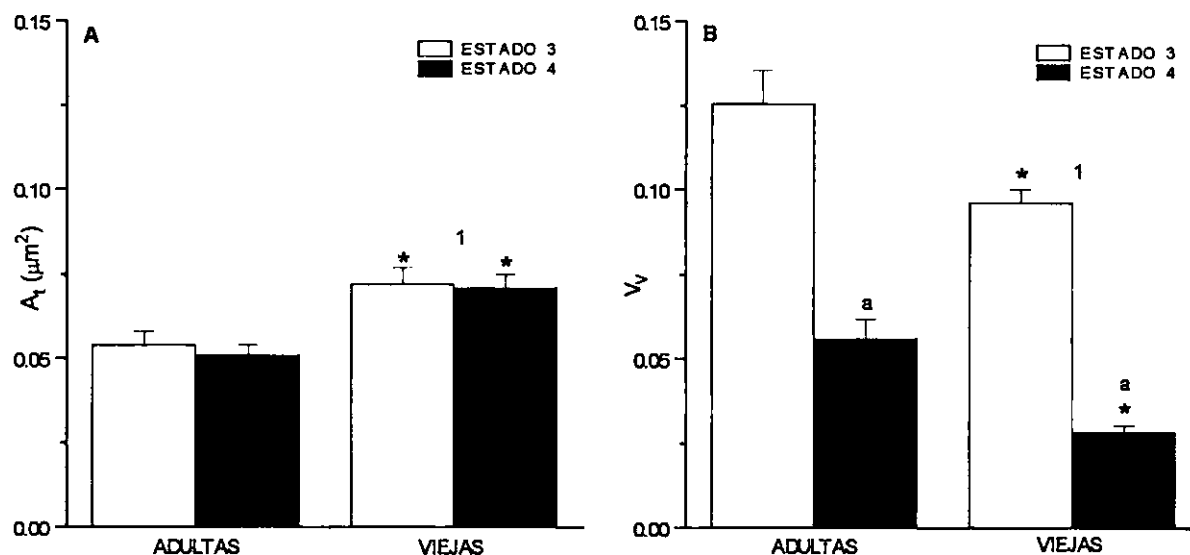


Figura IV-2. Efectos de la edad y del estado de respiración sobre los parámetros mitocondriales. Área total de la mitocondria (A) y densidad de volumen de las crestas mitocondriales (B), en animales adultos de 4–6 meses y animales viejos de 26–30 meses, calculados por microscopía electrónica. Se utilizaron 5 preparaciones distintas para cada edad sumando un total de 50 determinaciones para cada estudio. Los resultados representan la media \pm E.E.M. Significancia estadística: Figura IV-2A, (1) diferencias entre grupos de edad: * $P < 0.001$. Figura IV-2B, (1) diferencias entre grupos de edad: * $P < 0.001$; diferencias entre estados: (a) $P < 0.001$.

IV.2.2. ESTUDIOS FUNCIONALES

IV.2.2.1. CONSUMO DE OXÍGENO

La velocidad de consumo de oxígeno se determinó en los estados 3 y 4 utilizando succinato como sustrato energético tal y como se describe en el Capítulo de Materiales y Métodos (apartado III.2.2.2.). Los resultados obtenidos, resumidos en la tabla IV-2, muestran que la velocidad de consumo de oxígeno disminuye significativamente y de forma notable con la edad en los dos estados, representando esta disminución un 34% aproximadamente en ambos estados. Sin embargo, los coeficientes respiratorios (la relación entre los dos estados) prácticamente no varían, lo cual indica que las muestras procedentes de mitocondrias tanto de animales adultos como viejos estaban intactas y respiraban acopladamente.

Tabla IV-2. Variaciones en la velocidad de consumo de O₂ con la edad y con el estado de respiración. Los resultados representan la media \pm E.E.M. para cuatro experimentos diferentes para cada grupo de edad. El número total de determinaciones aparece junto a cada valor entre paréntesis. Significancia estadística con respecto a adultas: *P<0.001.

| | Consumo de O ₂ (nátomos/mg proteína) | | Coeficiente respiratorio ^a |
|---------|--|------------------|--|
| | Estado 3 | Estado 4 | |
| ADULTAS | 215 \pm 9 (14) | 54 \pm 6 (14) | 4.0 \pm 1 |
| VIEJAS | 142 \pm 6 (11)* | 36 \pm 4 (11)* | 3.9 \pm 1 |

^a Cociente entre las velocidades de consumo de O₂ en los estados 3 y 4.

IV.2.2.2. VELOCIDAD DE ENTRADA DE CALCIO

La cinética de entrada de calcio en la mitocondria a ambas edades presenta un comportamiento saturable típico, en donde la velocidad de entrada de calcio en la mitocondria en el estado 3, en animales envejecidos es menor que en animales adultos (figura IV-3A). Los parámetros cinéticos se determinaron, siguiendo el formulismo de Michaelis-Menten, a partir de la representación de Lineweaver-Burk o de dobles inversas (figura IV-3B). La concentración máxima de calcio acumulada en el interior de la mitocondria en animales adultos, resultó ser significativamente mayor en un 12% a la encontrada en animales viejos. El tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima fue, por el contrario, invariable en las dos edades (tabla IV- 3)

Tabla IV-3. Variación de la velocidad de entrada de calcio en la mitocondria con la edad. Se muestran la concentración máxima de calcio acumulada en la mitocondria y el tiempo necesario para alcanzarla ($t_{1/2}$) para animales adultos y viejos calculados a partir de los valores obtenidos de la representación de dobles inversas de la figura IV-3B. Los resultados representan la media \pm E.E.M. Significancia estadística con respecto a adultas: *P<0.001.

| | [Ca ²⁺] _{max} (pmol/mg proteína) | $t_{1/2}$ (s) |
|---------|---|---------------|
| ADULTAS | 160 \pm 7 | 54 \pm 3 |
| VIEJAS | 136 \pm 5* | 54 \pm 3 |

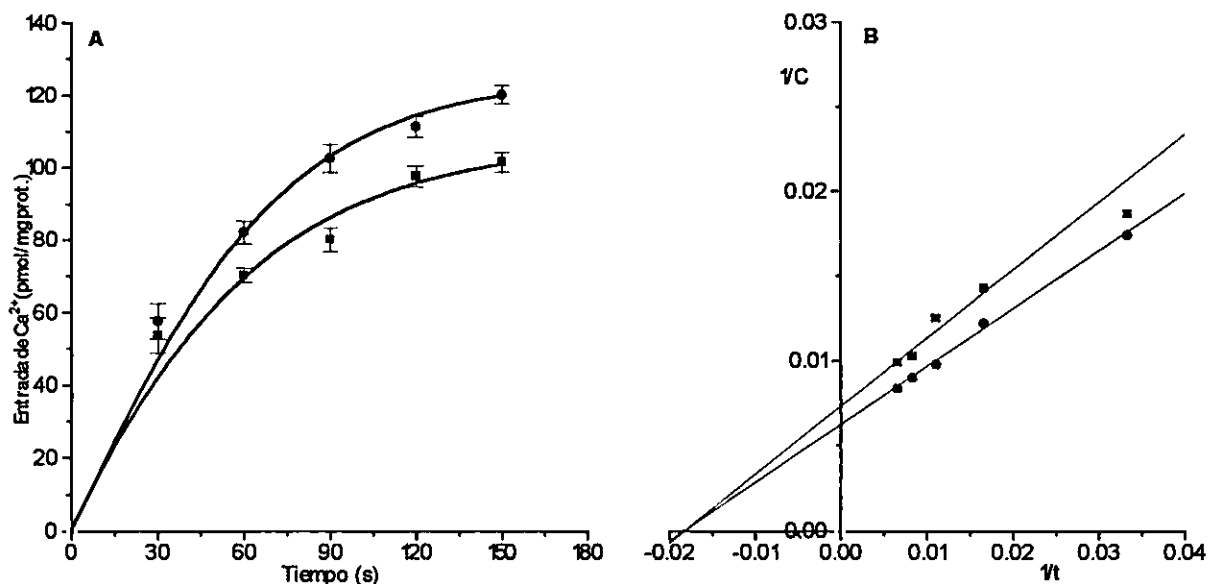


Figura IV-3. Efecto de la edad sobre la entrada de calcio en la mitocondria determinada por métodos de ultrafiltración. A) Cinética de entrada de calcio en la mitocondria en función del tiempo para una concentración final de $\text{Ca}^{2+} = 5 \mu\text{M}$. B) Representación de dobles inversas para la determinación de la concentración máxima de calcio y $t_{1/2}$ en animales adultos (●) y en animales viejos (■). Se efectuaron diez determinaciones para cada punto, representado como la media \pm E.E.M.

IV.2.2.3. NIVELES DE ATP

Otro parámetro que daría cuenta de las posibles lesiones o defectos bioquímicos en la edad y relacionado con la transducción energética en la célula es la medida de producción de ATP. Como se observa en la tabla IV-4, los niveles de ATP en mitocondrias de animales viejos son inferiores en todos los casos a los encontrados en animales adultos. Estas diferencias son mayores en el estado 4 donde el descenso de los niveles de ATP en animales envejecidos representa un 87% con respecto a los adultos, mientras que en el estado 3, el descenso es de un 81%.

Por otra parte, el ATP en ratas adultas desciende durante la respiración acelerada (estado 3) en un 54% con respecto al estado 4, efecto mucho menos notorio en animales envejecidos en donde el descenso representa un 28.6%.

Tabla IV-4. Efectos de la edad y del estado de respiración sobre los niveles de ATP en mitocondria. Se representa la media \pm E.E.M. El número total de determinaciones aparece junto a cada valor entre paréntesis. Significancia estadística con respecto a adultas: * $P < 0.001$

| | Niveles de ATP (nmol/mg proteína) | | |
|---------|--------------------------------------|-----------------------|----------------------|
| | Mitocondria fresca | Estado 3 | Estado 4 |
| ADULTAS | 2.80 \pm 0.10 (12) | 0.53 \pm 0.03 (12) | 1.15 \pm 0.09 (12) |
| VIEJAS | 1.40 \pm 0.04 (12)* | 0.10 \pm 0.02 (12)* | 0.14 \pm 0.03 (12) |

Los resultados obtenidos a estas dos edades apuntan a que con el envejecimiento, hay un deterioro en todos los sistemas responsables del mantenimiento de gradientes energéticos, decidiendo ampliar los estudios a la fase no sólo del envejecimiento sino también a la del desarrollo.

IV.3. VARIACIONES EN LOS COMPLEJOS DE LA CADENA RESPIRATORIA EN MITOCONDRIA DE HÍGADO DE RATA CON LA EDAD

IV.3.1. VARIACIONES EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Una vez comprobada la pureza e integridad física de las mitocondrias y con el fin de esclarecer los resultados expuestos hasta ahora, se procedió a la determinación de las actividades enzimáticas de los complejos respiratorios acoplados I-III (NADH citocromo *c* oxidoreductasa) y II-III (succinato citocromo *c* oxidoreductasa) así como de los complejos I (NADH ubiquinona oxidoreductasa), complejo II (succinato ubiquinona oxidoreductasa), complejo III (ubiquinol citocromo *c* oxidoreductasa) y complejo IV (citocromo *c* oxidasa) por separado en los tres grupos de edad. Los resultados obtenidos, que se reflejan en la tabla IV-5 muestran un comportamiento desigual de los complejos a lo largo de la vida; mientras que para el complejo II y para el complejo II-III no se observaron diferencias significativas en la actividad enzimática ni durante el desarrollo ni durante el envejecimiento, el complejo IV experimenta un acusado descenso en su actividad de un 23% aproximadamente durante el envejecimiento; en cambio no se han encontrado diferencias significativas en su actividad durante el desarrollo.

Tabla IV-5. Actividades enzimáticas de los complejos de la cadena respiratoria en mitocondria de hígado de rata en las tres edades seleccionadas. Las actividades se expresan en todos los casos en nmoles de sustrato/mg proteína/min. Los resultados representan la media \pm E.E.M. El número de determinaciones totales en cada una de ellas aparece entre paréntesis. Significancia estadística con respecto a adultas: *P<0.001; **P<0.01; *** P<0.02; ****p<0.05.

| | LACTANTES | ADULTAS | VIEJAS |
|-----------------|-----------------------|---------------------|-------------------------|
| COMPLEJO I-III | 142 \pm 10 (57)* | 447 \pm 23 (69) | 713 \pm 45 (51)* |
| COMPLEJO II-III | 381 \pm 30 (18) | 392 \pm 39 (23) | 413 \pm 31 (17) |
| COMPLEJO I | 144 \pm 12 (32) | 140 \pm 10 (47) | 95 \pm 10 (29)** |
| COMPLEJO II | 202 \pm 26 (16) | 210 \pm 21 (20) | 201 \pm 18 (15) |
| COMPLEJO III | 130 \pm 14 (27)**** | 170 \pm 11 (42) | 231 \pm 23 (26)*** |
| COMPLEJO IV | 1884 \pm 139 (12) | 1995 \pm 149 (12) | 1540 \pm 143 (12)**** |

El resultado más llamativo es el del complejo I-III, el cual experimenta un incremento de su actividad a lo largo de la vida. El tratamiento estadístico muestra un significativo aumento de su actividad enzimática durante el desarrollo cercano a un 68% y durante el envejecimiento en el cual la variación observada representa un 59.5% aproximadamente. Este aumento de actividad, sin embargo, no se corresponde con el comportamiento observado en los complejos I y III por separado. Así, mientras que a lo largo del desarrollo no se observaron diferencias significativas en la actividad del complejo I, sí se apreció una disminución en su actividad enzimática en el envejecimiento de un 32% aproximadamente. En el complejo III se observó un ligero aumento significativo en torno a un 18% a lo largo del desarrollo y de un 36% en el envejecimiento. Estas variaciones en los complejos son insuficientes para explicar el comportamiento funcional observado del complejo I-III.

En la figura IV-4 se representan las variaciones porcentuales en la actividad enzimática de los complejos respiratorios con respecto al grupo de los animales adultos, que se consideran como cero, a partir de los valores de las actividades enzimáticas que figuran en la tabla IV-5.

Con los resultados expuestos pareció interesante centrar el estudio sobre el complejo I-III, tanto en sus aspectos funcionales como en los estructurales con objeto de aportar datos que ayudaran a comprender el comportamiento observado en el complejo a lo largo de la vida.

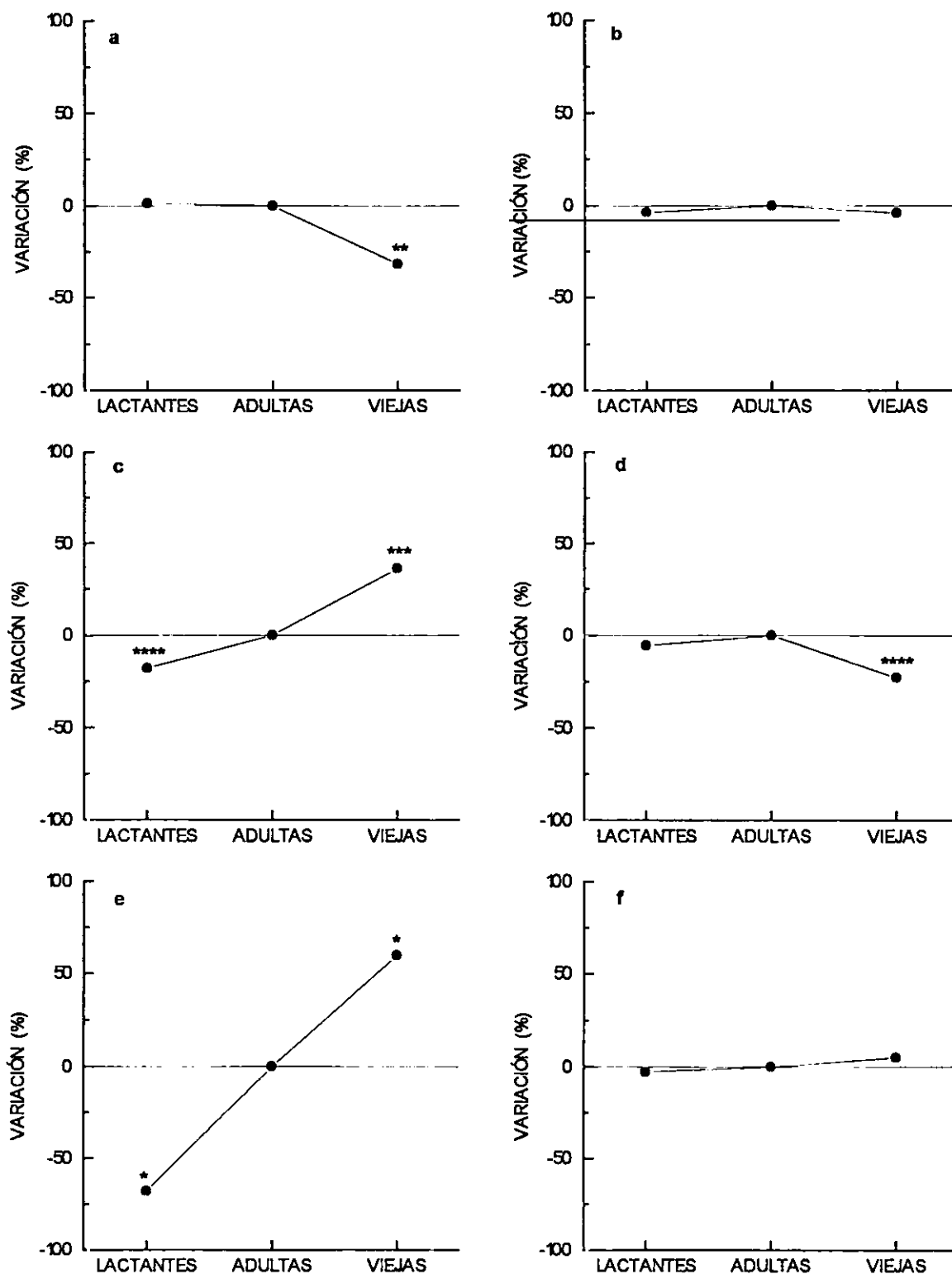


Figura IV-4. Variación de la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria en mitocondria de hígado de rata con la edad. La variación se expresa en porcentaje con respecto al grupo de animales adultos que se toma como cero. a) Complejo I, b) complejo II, c) complejo III, d) complejo IV, e) complejo I-III y f) complejo II-III. Significancia estadística con respecto a adultas: *P<0.001; **P<0.01; ***P<0.02; **** P<0.05.

IV.3.2. VARIACIONES EN LA CANTIDAD DE COMPLEJO

Para determinar si el aumento en la actividad enzimática del complejo I-III observada correspondía a un aumento de la cantidad de complejo I-III en la mitocondria o a un incremento intrínseco de la actividad enzimática del complejo en animales viejos, se efectuaron estudios cuantitativos de la cantidad de complejo presente en mitocondrias por la técnica inmunológica de *dot blot*.

En primer lugar era necesario obtener un anticuerpo frente al complejo I-III. Para ello, se purificó el complejo I-III en animales adultos y tras comprobar su pureza (apartado IV.4.), se inyectó a un conejo del cual se extrajo al cabo de unos meses el suero que contenía el anticuerpo frente al complejo. La especificidad del anticuerpo se valoró por el test de ELISA, empleando como controles negativos BSA y los marcadores de electroforesis de Biorad. Las diluciones óptimas de los anticuerpos resultaron ser [1:10] para el anticuerpo aislado y [1:4000] para el anticuerpo conjugado. Una vez conocidas las diluciones adecuadas de los anticuerpos se aplicaron a membranas de nitrocelulosa 1.5, 2.2 y 3 μg de mitocondria de las tres edades realizándose los *dot blot* tal y como se describe en Materiales y Métodos.

En la figura IV-5 se observa que el anticuerpo se une a la mitocondria mientras que apenas lo hace a los controles negativos elegidos.

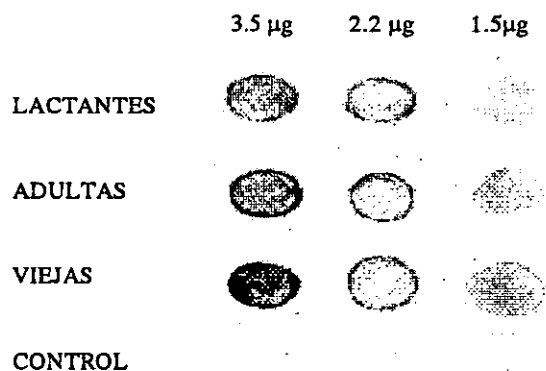


Figura IV-5. *Dot blot*. La fotografía muestra una película representativa de los estudios inmunológicos realizados con mitocondrias de hígado de rata de las tres edades seleccionadas.

Las películas reveladas se densitometraron integrándose el volumen de las manchas referidas al área total de las mismas, una vez descontado el fondo de la película. Se efectuaron seis experimentos sumando un total de 30 determinaciones para cada cantidad de proteína y por grupo de edad. Los resultados aparecen en la figura IV-6 en donde se representa la media de densidad óptica para cada cantidad de mitocondria incubada en los tres grupos de edad.

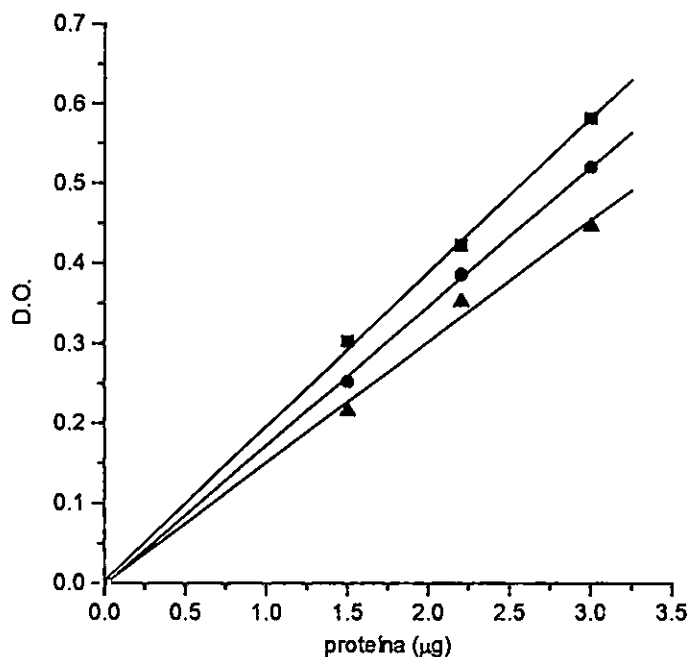


Figura IV-6. Densitometrado de los experimentos de *Dot blot*. Representación de la densidad óptica (en unidades arbitrarias) vs diferentes cantidades de mitocondria para cada edad (símbolos) incubadas con el anticuerpo frente al complejo I-III. Lactantes (▲), adultas (●) y viejas (■).

La pendiente de la recta obtenida para animales viejos es significativamente mayor a la obtenida para animales adultos en un 11.5% y ésta a su vez, es significativamente mayor a la correspondiente a los animales lactantes en un 12.6% (tabla IV-6).

Tabla IV-6. Parámetros de la regresión lineal de los estudios de *dot blot* para una recta $y=a+bx$. Significancia estadística con respecto a adultas: ** $p < 0.02$.

| | a | b | r |
|-----------|---------|------------------------|-------|
| LACTANTES | -0.0043 | $0.152 \pm 0.010^{**}$ | 0.990 |
| ADULTAS | -0.0118 | 0.174 ± 0.006 | 0.999 |
| VIEJAS | 0.0195 | $0.194 \pm 0.008^{**}$ | 0.999 |

Estos resultados son concordantes con los obtenidos para las actividades enzimáticas, aunque el aumento en la cantidad de complejo I-III observado en animales viejos, un 11.5%, no parece suficiente para explicar el aumento en la actividad observado en este grupo de edad, que se sitúa en un 59.5%..

IV.3.3. VARIACIONES EN EL CONTENIDO DE CITOCROMOS

Considerando los resultados obtenidos hasta el momento y de los factores de los cuales pudiera depender, se determinó el contenido en citocromos, dado el papel revelante que desempeñan en la funcionalidad de los complejos. De las dos alternativas descritas en Materiales y Métodos (succinato + KCN o succinato + antimicina A/ ditionito), se optó por la primera por las dos razones comentadas en el apartado III.5.3.:

- 1.- El ditionito aparte de reducir los citocromos de la cadena respiratoria, provoca también la reducción de otros cromóforos que presentan bandas de absorción en las mismas longitudes de onda como hemoglobina y mioglobina, hecho que no hemos apreciado en nuestras preparaciones.
- 2.- El contenido en citocromos que se obtiene con ditionito es mayor que el obtenido con KCN. Esto puede debido a que no todos los citocromos están ligados a la cadena respiratoria.

La figura IV-7 muestra los espectros de diferencia de los citocromos en mitocondria de hígado de rata a las tres edades consideradas en el estudio cuando la reducción se efectúa con succinato + KCN.

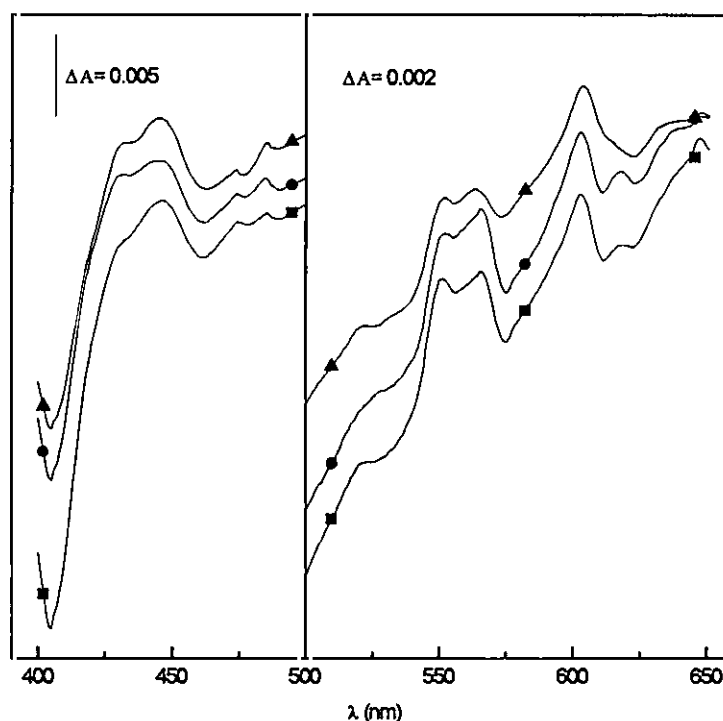


Figura IV-7. Espectros de diferencia de los citocromos en mitocondria de hígado de rata en los tres grupos de edad seleccionados. Animales lactantes (▲), animales adultos (●) y animales viejos (■). La reducción se llevó a cabo con succinato + KCN.

Las bandas α de los citocromos presentan máximos de absorción a 606 nm para el citocromo $a+a_3$, a 565 nm para el citocromo b y a 551 nm para el citocromo $c+c_1$. Las bandas β aparecen en un pico no diferenciado sobre los 625 nm. Las bandas γ o Soret se encuentran a 445 nm y 431 nm para los dos primeros, respectivamente, mientras que la del citocromo $c+c_1$ es apenas distinguible como hombro sobre los 420 nm.

El contenido en citocromos de la mitocondria se refleja en la tabla IV-7. Para el citocromo $a+a_3$ se observa una disminución de un 28% en el envejecimiento, mientras que para el citocromo b se observa una disminución de un 20% en animales lactantes, no encontrando variaciones en el resto.

Tabla IV-7. Determinación de citocromos en mitocondria de hígado de rata a las tres edades consideradas. El contenido en citocromos se representa como la media \pm E.E.M. en nmoles/mg. El número de determinaciones individuales aparece entre paréntesis. Significancia estadística con respecto a adultas: *** $P < 0.02$; **** $P < 0.05$.

| | Citocromo $a+a_3$ | Citocromo b | Citocromo $c+c_1$ |
|-----------|---------------------------|----------------------------|------------------------|
| LACTANTES | 0.128 \pm 0.013 (12) | 0.215 \pm 0.018 (12)**** | 0.169 \pm 0.017 (12) |
| ADULTAS | 0.140 \pm 0.011 (16) | 0.269 \pm 0.019 (16) | 0.183 \pm 0.021 (16) |
| VIEJAS | 0.101 \pm 0.009 (14)*** | 0.283 \pm 0.023 (14) | 0.199 \pm 0.022 (14) |

Los resultados obtenidos en la mitocondria aislada, si bien apuntaban a un tema de estudio interesante (el del complejo I-III), por diversos motivos no fueron del todo esclarecedores. Por una parte, considerando que uno de los objetivos del presente trabajo es apuntar datos sobre la funcionalidad de la membrana interna mitocondrial con la edad, hay que tener en cuenta que la actividad enzimática del complejo I-III determinada en mitocondria corresponde tanto al complejo sensible como al insensible a rotenona, no siendo este último objeto de estudio. Por otra parte, la medida de citocromos en la mitocondria total no es muy sensible considerando la relación entre su concentración y la del conjunto de proteínas mitocondriales que puede inducir fenómenos de dispersión en las medidas espectroscópicas. A esto hay que añadir que la determinación de FMN presente como cofactor en el complejo se ve interferida por la presencia de otras flavinas con análogas características espectroscópicas.

Por estas razones y para obtener datos más exactos se procedió a la purificación del complejo I-III.

IV.4. PURIFICACIÓN DEL COMPLEJO I-III

El complejo I-III fue purificado a partir de mitocondrias aisladas de animales de las tres edades consideradas por el método descrito en el apartado III.3. Un esquema del proceso de purificación aparece en la figura III-1 (página 23), en donde aparecen especificadas las etapas seleccionadas para el seguimiento de la purificación.

El proceso de purificación se valora estimando dos parámetros: el rendimiento y la purificación. El primero representa el porcentaje entre la masa de la proteína después de cada etapa en relación con la masa de una etapa previa de referencia. La masa se valora por la actividad, que es equivalente, y puede determinarse efectuando un ensayo enzimático. El segundo se define como el cociente entre la actividad específica de la enzima en una etapa determinada y la actividad específica de la enzima en la etapa de referencia que generalmente suele ser la primera. En cada etapa del proceso se pierde masa de proteína, bien por la discriminación que efectúa el método, o en su caso porque se desprecian las fracciones extremas que son más contaminantes (cromatografías), lo que conduce a una disminución del rendimiento a lo largo del proceso. La etapa puede provocar también desnaturalización en la enzima (sobre todo las etapas de precipitación), y puesto que el rendimiento se valora por la actividad de la enzima, también puede referirse a él como porcentaje de actividad recuperada. Ya que se elimina fundamentalmente masa de proteína que no proporciona actividad, la masa restante de proteína se va acercando a la masa de la enzima a purificar, por lo que al ser la purificación un cociente entre la actividad total de la enzima y la masa de proteína, la purificación, por el contrario, va aumentando en cada etapa. La cuantificación de este parámetro puede emplearse como método de discriminación de técnicas en los procesos de purificación; aquellas técnicas que conduzcan a una disminución de la purificación deben ser rechazadas.

Sin embargo, la purificación es un término relativo puesto que está referida a una etapa de referencia del proceso. Un alto grado de purificación en la etapa final no siempre indica una homogeneidad de la muestra ni un alto grado de pureza puesto que dependerá de la heterogeneidad de la primera etapa (proteínas presentes y concentración de la proteína a separar en la muestra). Una proteína que se encuentre en pequeña cantidad en la muestra inicial se purificará mucho más que otra que se encuentre en mayor proporción. Por esta razón son necesarios criterios de pureza adicionales. Estos son de carácter cualitativo y son negativos, en el sentido de que nos indican la posible presencia de otras proteínas por lo que sólo se garantiza la homogeneidad efectuando multitud de criterios todos ellos negativos. Entre estos criterios se encuentran las determinaciones de actividades enzimáticas de enzimas presentes en la etapa inicial, relación entre la absorbancia de las proteínas a 280 nm y la actividad específica

en las distintas fracciones y las técnicas electroforéticas en geles de poliacrilamida en todas sus variantes (condiciones desnaturalizantes con SDS, condiciones reductoras con urea, DTT o β -mercaptoetanol, o condiciones no desnaturalizantes) que constituyen el criterio de pureza por excelencia.

Tabla IV-8. Proceso de purificación del complejo I-III de mitocondria de hígado de rata. Las filas de cada fracción corresponden a animales lactantes, adultos y viejos respectivamente.

| Fracción | Proteína total mg | Actividad total $\mu\text{mol cit c/min}$ | Actividad Específica $\mu\text{mol cit c/mg/min}$ | Purificación n° de veces | Rendimiento % |
|---------------------------|----------------------|--|--|-----------------------------|------------------|
| Mitocondria | 1897 | 275.1 | 0.145 | | |
| | 1950 | 877.5 | 0.450 | | |
| | 1840 | 1317.4 | 0.716 | | |
| Mitocondrias rotas (P1) | 1045 | 259.2 | 0.248 | 1.71 | 94 |
| | 1083 | 825.2 | 0.762 | 1.69 | 94 |
| | 960.6 | 1075.9 | 1.120 | 1.56 | 81.6 |
| Sobrenadante KCl (S2) | 100.2 | 203.4 | 2.03 | 14.0 | 74 |
| | 106.4 | 640.6 | 6.02 | 13.4 | 73 |
| | 97.8 | 865.5 | 8.85 | 12.4 | 65.7 |
| Precipitado diálisis (P4) | 27.0 | 176.3 | 6.53 | 45.03 | 64 |
| | 28.7 | 544.0 | 18.95 | 42.11 | 62 |
| | 25.6 | 721.9 | 28.20 | 39.38 | 54.8 |
| Precipitado final (P7) | 6.4 | 101.8 | 15.9 | 109.65 | 37 |
| | 7.7 | 325.1 | 43.7 | 93.82 | 37 |
| | 7.0 | 420.7 | 60.1 | 83.94 | 32.0 |

En la tabla IV-8 se expresan los resultados de un experimento típico en cada grupo de edad. Se partió de 130 g de hígado correspondientes aproximadamente a 13 ratas adultas, 10 ratas viejas y 9 camadas de lactantes (media de 8 animales). Mientras que el rendimiento en mitocondrias en animales adultos se situó sobre los 1950 mg, hay una disminución tanto en animales lactantes como envejecidos. En el primer grupo puede explicarse por una menor cantidad de mitocondrias; en cambio, la disminución en el segundo grupo puede atribuirse, dada la mayor fragilidad de las mitocondrias, a una pérdida de las mismas durante el proceso de purificación como ya se señaló en el apartado sobre la purificación de las mitocondrias. En esta primera etapa se tomaron como valores para el rendimiento y la purificación de 100 y 1

respectivamente y se consideró la etapa de referencia del proceso. La congelación de las mitocondrias a una alta concentración (50–70 mg/ml) y su posterior descongelación y homogeneización conduce a la rotura de las mitocondrias, que tras la centrifugación separa la membrana externa mitocondrial de los mitoplastos (membrana interna mitocondrial más matriz) y constituye la segunda etapa del proceso. Se siguió observando una pérdida de proteínas en animales viejos que se reflejó en el menor rendimiento obtenido, tendencia que prosigue en el resto de las etapas. El que en las otras dos edades se obtuvieran rendimientos parecidos a lo largo del proceso comprobó una vez más las alteraciones ya descritas en animales envejecidos que conducen a una pérdida de proteínas.

El rendimiento final en masa del complejo I–III se situó entre los 7.7 mg en los animales adultos y 6.4 mg en los animales lactantes con rendimientos del 37% para ambos grupos. En animales envejecidos el rendimiento se situó en el 32% correspondientes a 7.0 mg.

Una vez purificado el complejo, se procedió a la determinación de la actividad enzimática de los marcadores seleccionados (malato–NADH oxidorreductasa, succinato–coenzima Q oxidorreductasa, succinato–citocromo *c* oxidorreductasa y citocromo *c* oxidasa), pertenecientes todos a la mitocondria, utilizados como criterios de pureza de las preparaciones. Los resultados obtenidos indican la ausencia de contaminación de los mismos, excepto para el complejo II en el que aparece una actividad residual en todos casos que oscila entre el 3–8% producto probablemente a que la separación del último sobrenadante (que contiene el complejo II–III) del precipitado, poco consistente, (que contiene el complejo I–III) se efectúa por simple decantación.

A continuación se realizaron las siguientes determinaciones en muestras de las tres edades seleccionadas:

- Determinación de la actividad enzimática del complejos I–III con el fin de compararla con la de la mitocondria aislada y tener más datos sobre la pureza de las muestras.
- Determinación del contenido en grupos prostéticos del complejo, tales como FMN y citocromos *b* y *c*+*c*₁.
- Determinación de hierro no hemo para relacionar el dato con una posible variación en la funcionalidad de los centros ferrosulfurados.
- Determinación de fosfolípidos totales.

Además de estas medidas se procedió a un análisis de bandas por electroforesis con el fin de investigar:

- 1) si el patrón es el mismo en las edades.
- 2) En caso de que fuera así, ver si existe variación en la concentración relativa de las bandas.

IV.5. CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO I-III

IV.5.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Los valores obtenidos están reflejados en la figura IV-8 en la cual se aprecia un comportamiento cualitativamente semejante al de la mitocondria, aunque los porcentajes de variación en la actividad entre las tres edades son inferiores a los obtenidos en mitocondria. Estos resultados eran de esperar puesto que el efecto de mayor cantidad de complejo I-III en animales envejecidos, que se manifiesta en los estudios de mitocondria (*dot blot*), desaparece en el complejo purificado.

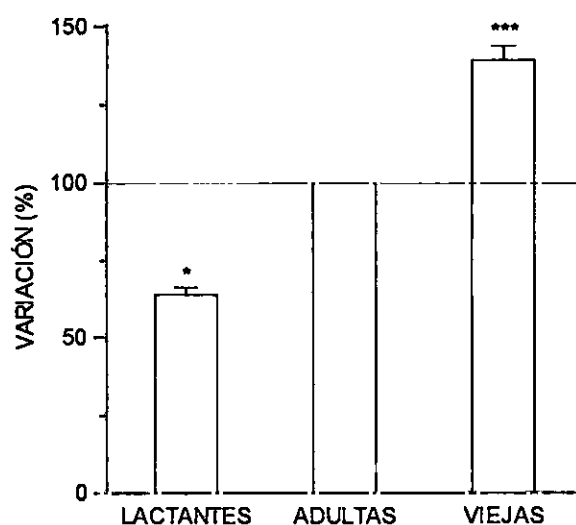


Figura IV-8. Variación de la actividad específica del complejo I-III purificado con la edad. Las actividades se expresan en porcentaje de variación con respecto al grupo de ratas adultas que se considera como 100. Las actividades específicas, expresadas como la media \pm E.E.M., en μ moles de citocromo c/mg/min fueron: lactantes 15.7 ± 1.4 (41); adultas 43.6 ± 3.8 (53); viejas 60.8 ± 6.1 (48). Entre paréntesis figura el número de determinaciones individuales en cada una de ellas. Significancia estadística con respecto a adultas: * $P < 0.001$; *** $P < 0.02$.

IV.5.2. DETERMINACIÓN DE CITOCROMOS

En la figura IV-9 se representan los espectros de absorción del complejo I-III a las tres edades. La línea discontinua representa la forma oxidada del complejo I-III de animales adultos, que se muestra a título comparativo, la cual muestra un pico Soret a 416 nm y una amplia absorción α , poco definida, sobre los 530 nm. Después de la reducción con ditionito como muestran las líneas continuas, las absorciones de las bandas α y Soret para el citocromo *b* se encuentran a 562 nm y 428 nm mientras que las del citocromo *c*+*c*₁ aparecen a 552 nm y 418 nm respectivamente.

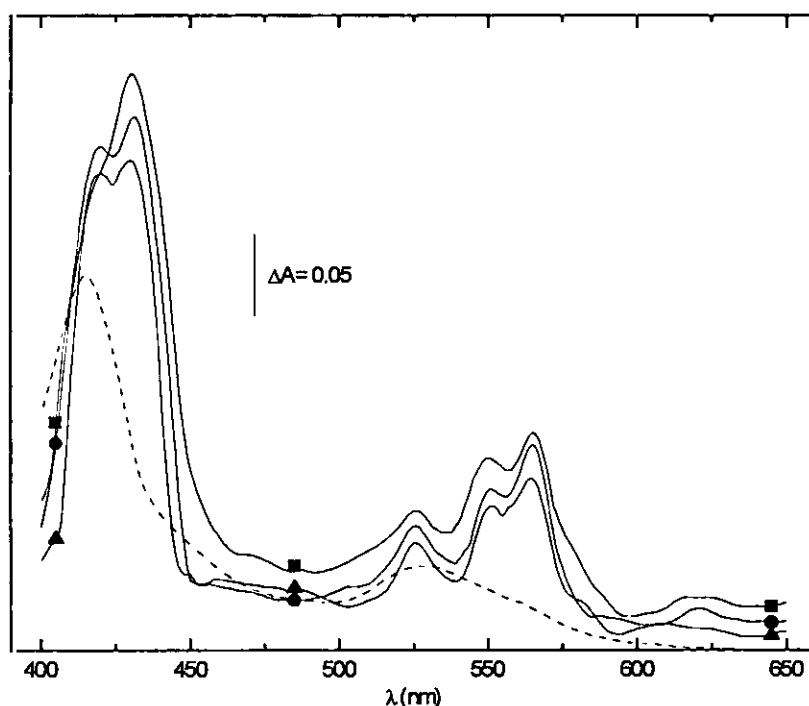


Figura IV-9. Espectros de absorción del complejo I-III purificado de mitocondria de hígado de rata en las tres edades. El complejo I-III purificado se diluyó a 1.7 mg/ml en tampón fosfato 50 mM, pH 7.4 conteniendo 0.5% de colato sódico. La reducción se efectuó con ditionito. Animales lactantes (▲), animales adultos (●) y animales viejos (■). Se muestra a título de ejemplo el espectro del complejo I-III oxidado en animales adultos (- -).

Los resultados obtenidos (tabla IV-9) muestran un incremento significativo del 17% en el contenido de citocromo *b* durante el desarrollo, mientras que no se aprecia diferencia significativa durante el envejecimiento. El citocromo *c*+*c*₁ experimenta un aumento a lo largo de la vida que representa un 21% durante el desarrollo y un 28% durante el envejecimiento.

Tabla IV-9. Variación con la edad en el contenido en citocromos del complejo I-III. Los resultados representan la media ± E.E.M. expresada en nmoles/mg. El número de determinaciones totales en cada una de ellas aparece entre paréntesis. Significancia estadística con respecto a adultas: **P<0.01; ***P<0.02; ****P<0.05.

| | Citocromo <i>b</i> | Citocromo <i>c</i> + <i>c</i> ₁ |
|-----------|---------------------|--|
| LACTANTES | 7.15 ±0.32 (12)**** | 3.91 ±0.28 (12)*** |
| ADULTAS | 8.57 ±0.58 (16) | 4.97 ±0.31 (16) |
| VIEJAS | 9.41 ±0.61 (13) | 6.36 ±0.33 (13)** |

IV.5.3. DETERMINACIÓN DE FMN

El contenido en FMN del complejo se determinó por fluorescencia. En la figura IV-10 se representan las características espectroscópicas del FMN puro junto a los espectros de emisión de fluorescencia del FMN presente en el complejo I-III purificado para una excitación a 445 nm. Para facilitar la comprensión directa de los espectros, éstos se han normalizado.

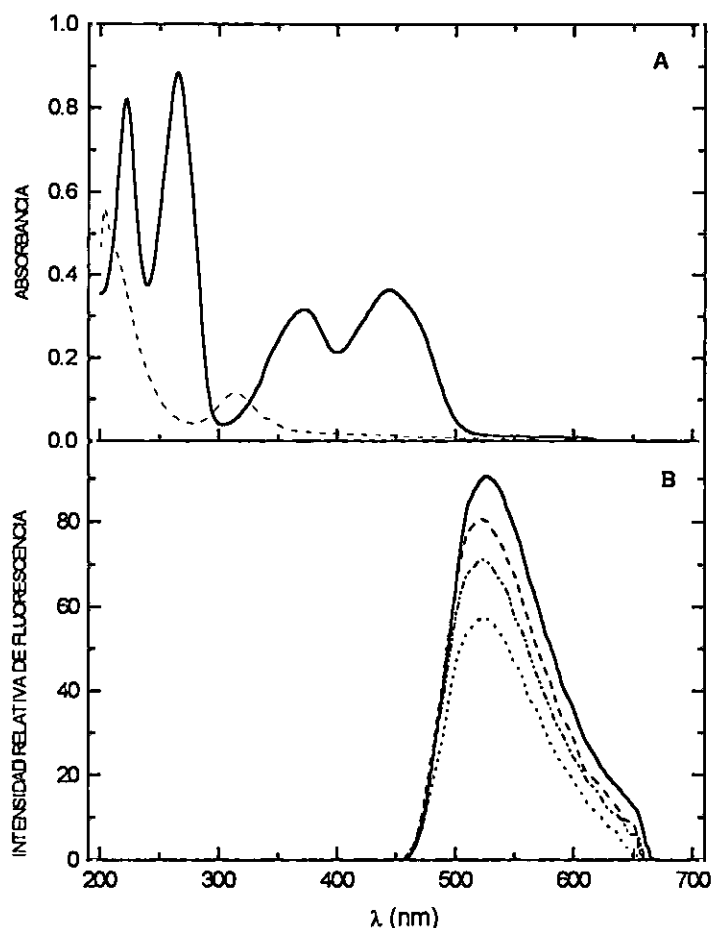


Figura IV-10. Características espectroscópicas del FMN en estado puro y en el complejo I-III purificado. A) Espectros de absorción del FMN puro en su forma reducida (—) y oxidada (- - -). B) Espectros de emisión de fluorescencia del FMN puro (—) y en los complejos I-III de animales lactantes (- - - -), adultos (· · · ·) y viejos (- · - ·).

El FMN, al igual que el resto de flavinas, exhibe picos de absorción a 222, 267, 373 y 445 nm (figura IV-10A, línea continua gruesa). El espectro de emisión de fluorescencia presenta un único pico a 526 nm (figura IV-10B, línea continua gruesa). Aunque existen algunas diferencias entre las flavinas en la intensidad relativa en los picos de absorción del UV, es difícil identificarlas basándose exclusivamente en las características espectroscópicas de absorción electrónica y/o fluorescencia. La presencia en mitocondria de varios tipos de flavinas (FMN, FAD, riboflavina), no todas asociadas como cofactores a los complejos de la cadena respiratoria, hace imposible su cuantificación individual por el método descrito. En cambio,

al estar presente solamente el FMN en el complejo purificado y en ausencia de otros compuestos que presenten similares características fluorescentes, el método se muestra muy sensible para la determinación de FMN. El máximo de emisión del FMN en los complejos aparece a 523 nm, tres nm desplazado hacia el azul, indicando que el FMN se encuentra en un ambiente ligeramente más hidrofóbico que en disolución. Los resultados se sintetizan en la tabla IV-10, en donde no se observa variación significativa en el contenido del nucleótido durante el desarrollo pero sí se aprecia un descenso del 43 % durante el envejecimiento.

Tabla IV-10. Variación con la edad en el contenido de FMN en el complejo purificado. Los resultados representan la media \pm E.E.M. expresada en nmoles/mg. El número de determinaciones totales en cada una de ellas aparece entre paréntesis. Significancia estadística con respecto a adultas: **P < 0.01.

| | FMN |
|-----------|------------------------|
| LACTANTES | 0.27 \pm 0.02 (12) |
| ADULTAS | 0.32 \pm 0.04 (16) |
| VIEJAS | 0.18 \pm 0.02 (13)** |

IV.5.4. DETERMINACIÓN DE HIERRO NO HEMO

Los resultados de las determinaciones figuran en la tabla IV-11, no apreciándose diferencias significativas en el contenido de hierro no hemo en el complejo purificado a lo largo de la vida.

Tabla IV-11. Variación con la edad en el contenido de hierro no hemo en el complejo purificado. Los resultados representan la media \pm E.E.M. expresada en nmoles/mg. El número de determinaciones totales en cada una de ellas aparece entre paréntesis. Significancia estadística con respecto a adultas: No se han encontrado.

| | Hierro no hemo |
|-----------|----------------------|
| LACTANTES | 5.70 \pm 0.61 (12) |
| ADULTAS | 6.23 \pm 0.52 (16) |
| VIEJAS | 5.69 \pm 0.78 (13) |

IV.5.5. DETERMINACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS

Al igual que en las determinaciones de hierro no hemo, no se han encontrado variaciones significativas en el contenido de fosfolípidos en el complejo purificado con la edad. Los resultados se recogen en la tabla IV-12.

Tabla IV-12. Variación con la edad en el contenido de fosfolípidos en el complejo purificado. Los resultados representan la media \pm E.E.M. expresada en nmoles/mg. El número de determinaciones totales en cada una de ellas aparece entre paréntesis. Significancia estadística con respecto a adultas: No se han encontrado.

| | Fosfolípidos |
|-----------|---------------------|
| LACTANTES | 190 \pm 19.7 (12) |
| ADULTAS | 193 \pm 24.6 (16) |
| VIEJAS | 184 \pm 21.3 (13) |

A continuación se suman en la tabla IV-13 los resultados obtenidos en la caracterización del complejo I-III a las tres edades.

Tabla IV-13. Resumen de la caracterización del complejo I-III purificado a las tres edades. Se representa la media \pm E.E.M. Significancia estadística con respecto a adultas: *P < 0.001; **P < 0.01; ***P < 0.02; ****P < 0.05. Para más detalles, ver el apartado IV.5. (página 59) de este Capítulo.

| | LACTANTES | ADULTAS | VIEJAS |
|--|---------------------|-----------------|--------------------|
| Actividad Específica (nmoles cit. c/mg/min.) | 15.9 \pm 1.4* | 43.9 \pm 4.0 | 60.1 \pm 7.2**** |
| Citocromo <i>b</i> (nmoles/mg) | 7.15 \pm 0.32**** | 8.57 \pm 0.58 | 9.41 \pm 0.61 |
| Citocromo <i>c</i> + <i>c</i> ₁ (nmoles/mg) | 3.91 \pm 0.28*** | 4.97 \pm 0.31 | 6.36 \pm 0.33** |
| FMN (nmoles/mg) | 0.27 \pm 0.02 | 0.32 \pm 0.04 | 0.18 \pm 0.02** |
| Hierro no hemo (nmoles/mg) | 5.70 \pm 0.61 | 6.23 \pm 0.52 | 5.69 \pm 0.78 |
| Fosfolípidos (nmoles/mg) | 190 \pm 19.7 | 193 \pm 24.6 | 184 \pm 21.3 |

IV.6. ELECTROFORESIS DEL COMPLEJO I-III

La separación de las subunidades que componen el complejo I-III se llevó a cabo en muestras de las tres edades, por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, en presencia de SDS y β -mercaptoetanol, por el método de Schägger y cols. (1986), descrito en el Capítulo de Materiales y Métodos (apartado III.4.). El estudio se efectuó en cinco grupos de animales de cada edad, sumando 8 ó más experimentos, comprobándose que los patrones eran reproducibles (figura IV-11).

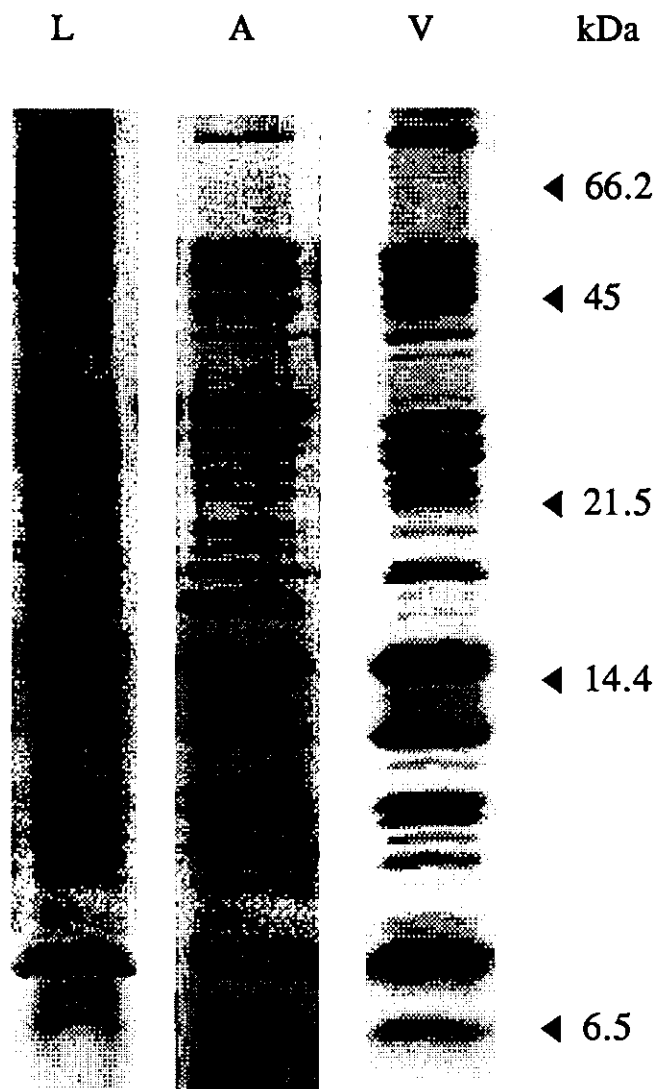


Figura IV-11. Composición polipeptídica del complejo I-III de la cadena respiratoria en mitocondria de hígado de rata en las tres edades seleccionadas. La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 16% con SDS y condiciones reductoras por el método de Schägger y cols. (1986). Animales lactantes (L), animales adultos (A) y animales viejos (V). A la derecha se indican las masas moleculares del estándar.

Las condiciones de electroforesis utilizadas (geles al 16% de acrilamida) permiten la separación de proteínas de masas moleculares comprendidas entre 100–6 kDa aproximadamente, intervalo en el cual se encuentran todas las subunidades que comprende el complejo I–III.

Con el fin de estudiar las variaciones en la composición cualitativa y cuantitativa de las diferentes subunidades, se densitometraron los geles y mediante la implementación de un algoritmo matemático, se obtuvo un densitograma promedio para cada edad (figura IV–12).

De la comparación de los densitogramas se concluye que los tres grupos de edad presentan el mismo patrón, no observando la aparición ni la desaparición de ninguna de las bandas que componen el complejo (figura IV–13). Para facilitar la comparación, se muestran en la figura IV–14 los densitogramas fraccionados en dos partes, correspondientes a masas moleculares entre 75–23 kDa (figura IV–13a) y 22–6 kDa (figura IV–13b).

A partir de los densitogramas promedio para cada edad, se calcularon las diferencias significativas de los grupos de animales lactantes y viejos, con respecto al densitograma promedio de animales adultos que se consideró como cero (figura IV–15, densitogramas individuales y figura IV–16, densitogramas comparados). Tanto en animales lactantes como en animales viejos, en general, hay una disminución global de proteínas, correspondiendo en este segundo grupo a proteínas del complejo I fundamentalmente. En este grupo cabe destacar la disminución de las siguientes subunidades:

- 51 kDa, del complejo I implicada en la unión del NADH y FMN, descenso más acusado en los animales viejos,
- 50 kDa correspondiente a la subunidad ND5 del complejo I codificada por el ADN–mt,
- 30 kDa, que corresponde a tres subunidades del complejo I, dos de las cuales son codificadas por el ADN mitocondrial y
- 23 kDa que presenta sitios de unión para dos centros ferrosulfuro.
- El resto de subunidades no están descritas funcionalmente, aunque alguna de ellas pudiera ser importante en la estructura del complejo.

En total, se han encontrado cinco subunidades que aumentan a lo largo de la vida, cuyas masas moleculares son:

- 75 kDa, correspondiente al complejo I, que contiene dos centros ferrosulfuro; uno tetranuclear 4Fe–4S y otro binuclear 2Fe–2S,
- 43 kDa, implicada en la unión al citocromo b, perteneciente al complejo III,

- 28 kDa, proteína que une el citocromo *c* en el complejo III,
- 13.5 kDa, proteína que interacciona con la ubiquinona, también del complejo III y
- 7.5 kDa, no descrita funcionalmente.

El valor del parámetro Fold, que se emplea para comparar el grado de similitud entre dos densitogramas, indica que una mayor similitud entre los densitogramas de animales lactantes y adultos que cualquiera de ellos con respecto a los animales viejos (tabla IV-14). Mientras que el valor obtenido entre animales lactantes y adultos es de 0.24, entre animales adultos y viejos toma un valor de 0.35, llegando a 0.69 cuando la comparación se realiza entre animales lactantes y viejos.

Tabla IV-14. Parámetro Fold calculado a partir de los densitogramas promedio para cada grupo de edad.

| | V | A | L |
|-----------|------|------|------|
| LACTANTES | 0.69 | 0.24 | 0.00 |
| ADULTAS | 0.35 | 0.00 | |
| VIEJAS | 0.00 | | |

Figura IV-12. Densitogramas promedio del complejo I-III para cada grupo de edad. Animales lactantes (A), (página 67); animales adultos (B), (página 68); animales viejos (C), (página 69). Se indica para cada banda la masa molecular calculada a partir de su movilidad relativa y las masas moleculares del estándar. Los densitogramas promedio corresponden a un total de 10 densitogramas para animales lactantes, 15 densitogramas para animales adultos y 13 densitogramas para animales viejos.

Figura IV-13 (página 70). Comparación de los patrones del complejo I-III en las tres edades. Animales lactantes (- - -), animales adultos (- - -) y animales viejos (—). Para leyenda, ver figura IV-12.

Figura IV-14. Densitogramas promedio. (A) Bandas con masa molecular comprendida entre 75-23 kDa (página 71). (B) Bandas con masa molecular entre 22-6 kDa (página 72).

Figura IV-15. Diferencias significativas en la composición polipeptídica del complejo I-III. Se representan las diferencias significativas entre los grupos de animales lactantes (A), (página 73) y animales viejos (B), (página 74) con respecto al grupo de animales adultos junto a la masa molecular calculada por electroforesis. Las diferencias significativas se han calculado a partir de los densitogramas promedio entre los grupos por la *t* de Student, asignando el valor cero cuando $p > 0.05$.

Figura IV-16 (página 75). Comparación de las diferencias significativas entre animales lactantes y viejos. Animales lactantes (- - -) y animales viejos (—). Para leyenda, ver figura IV-15.

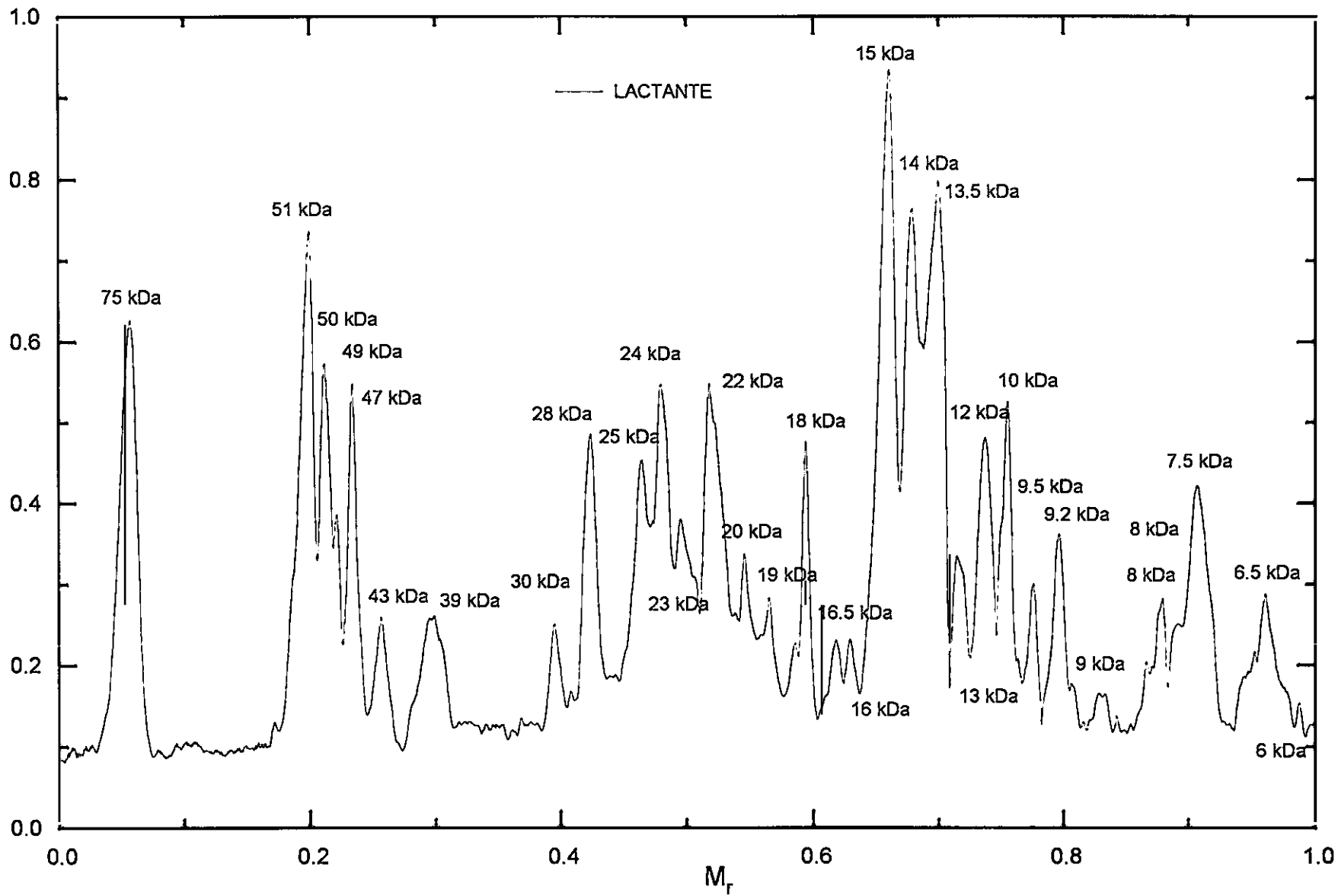


Figura IV-12A

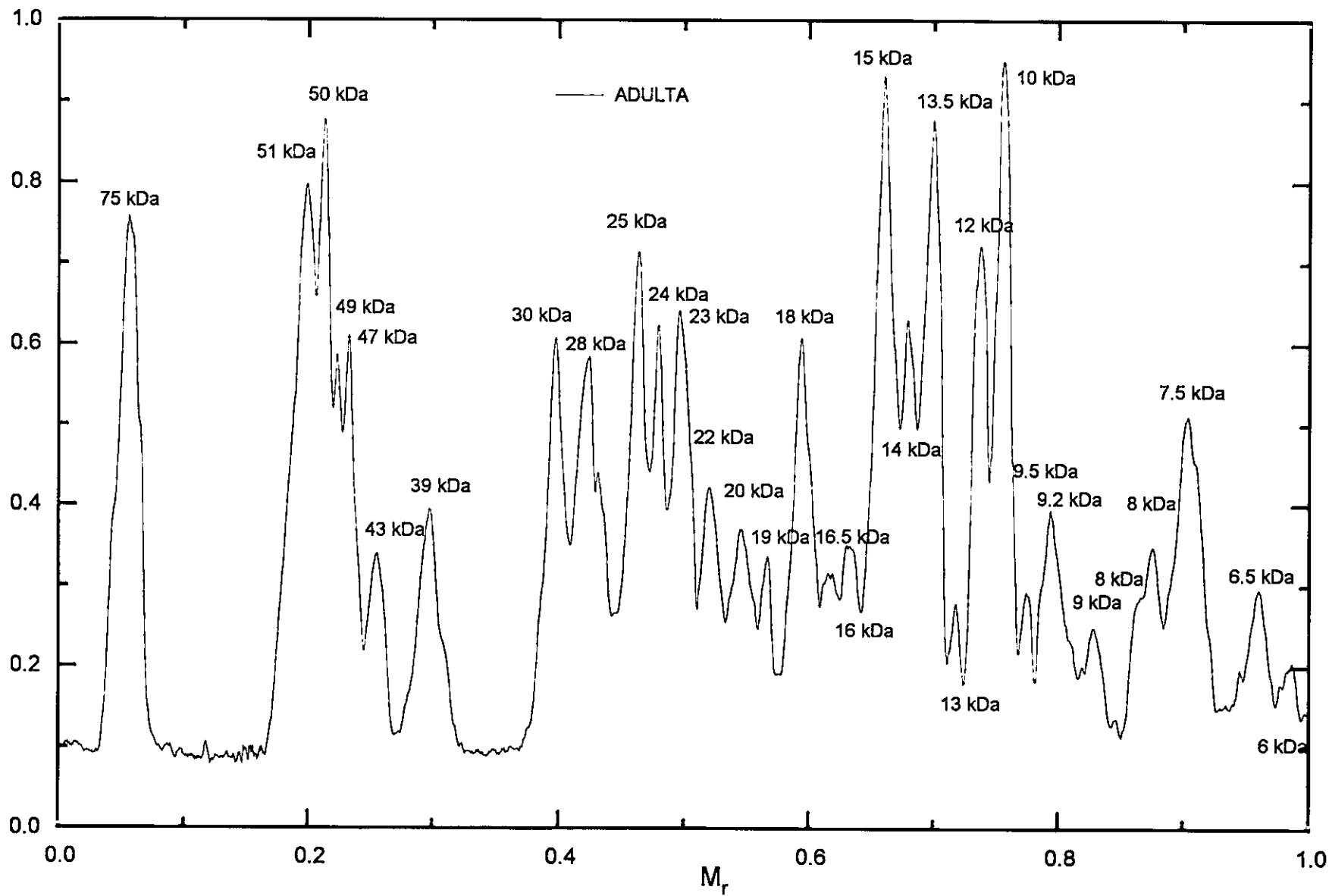


Figura IV-12B

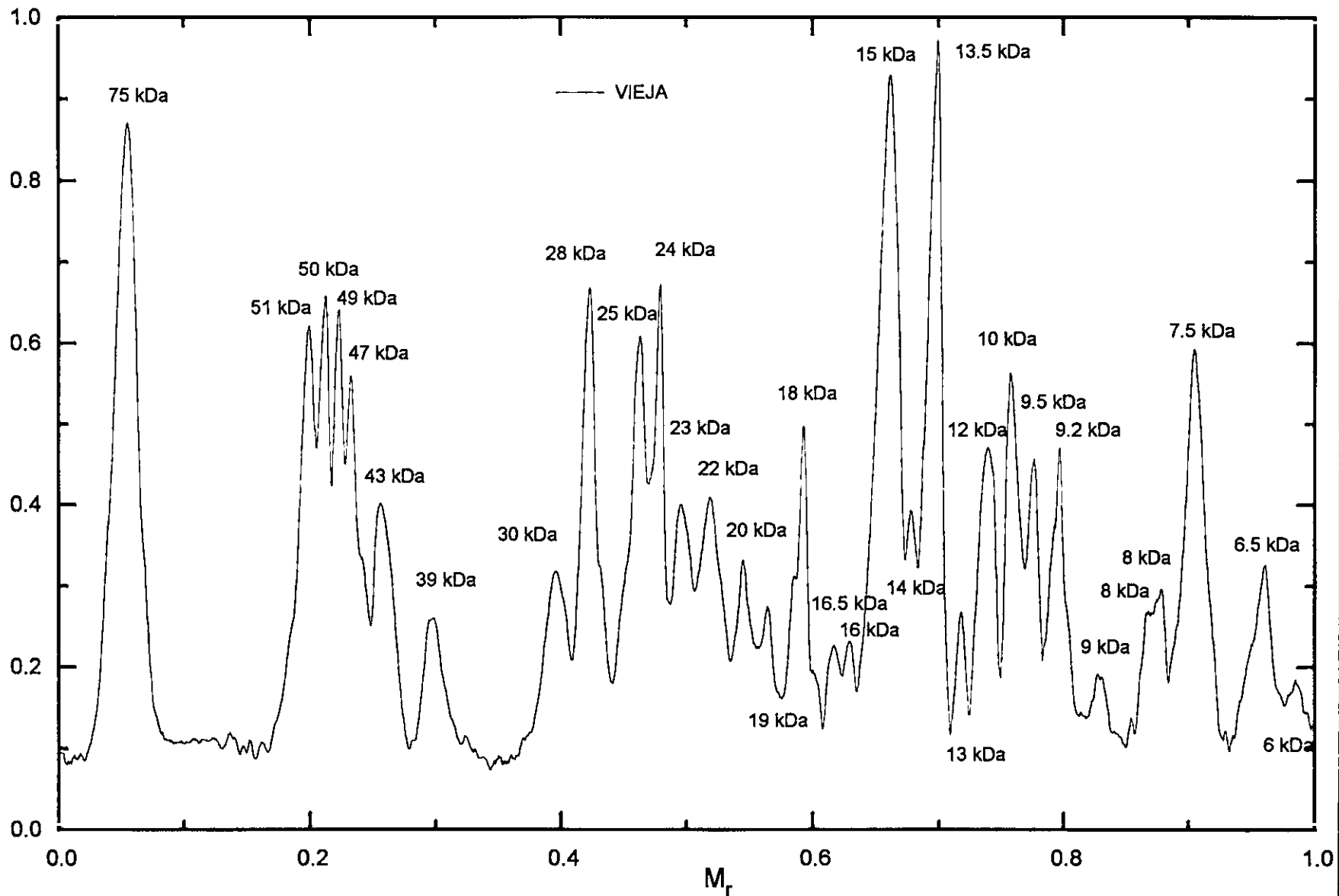


Figura IV-12C

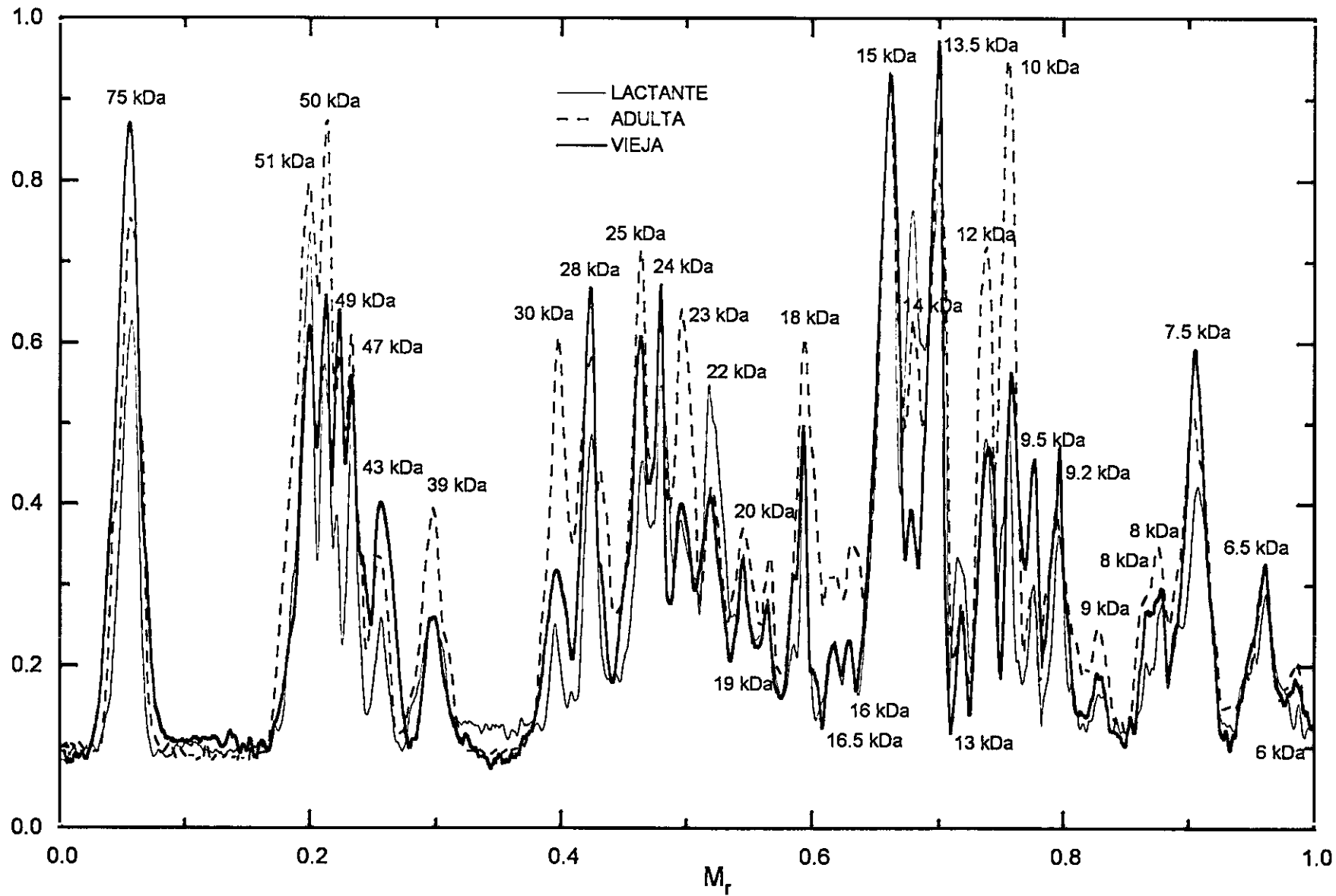


Figura IV-13

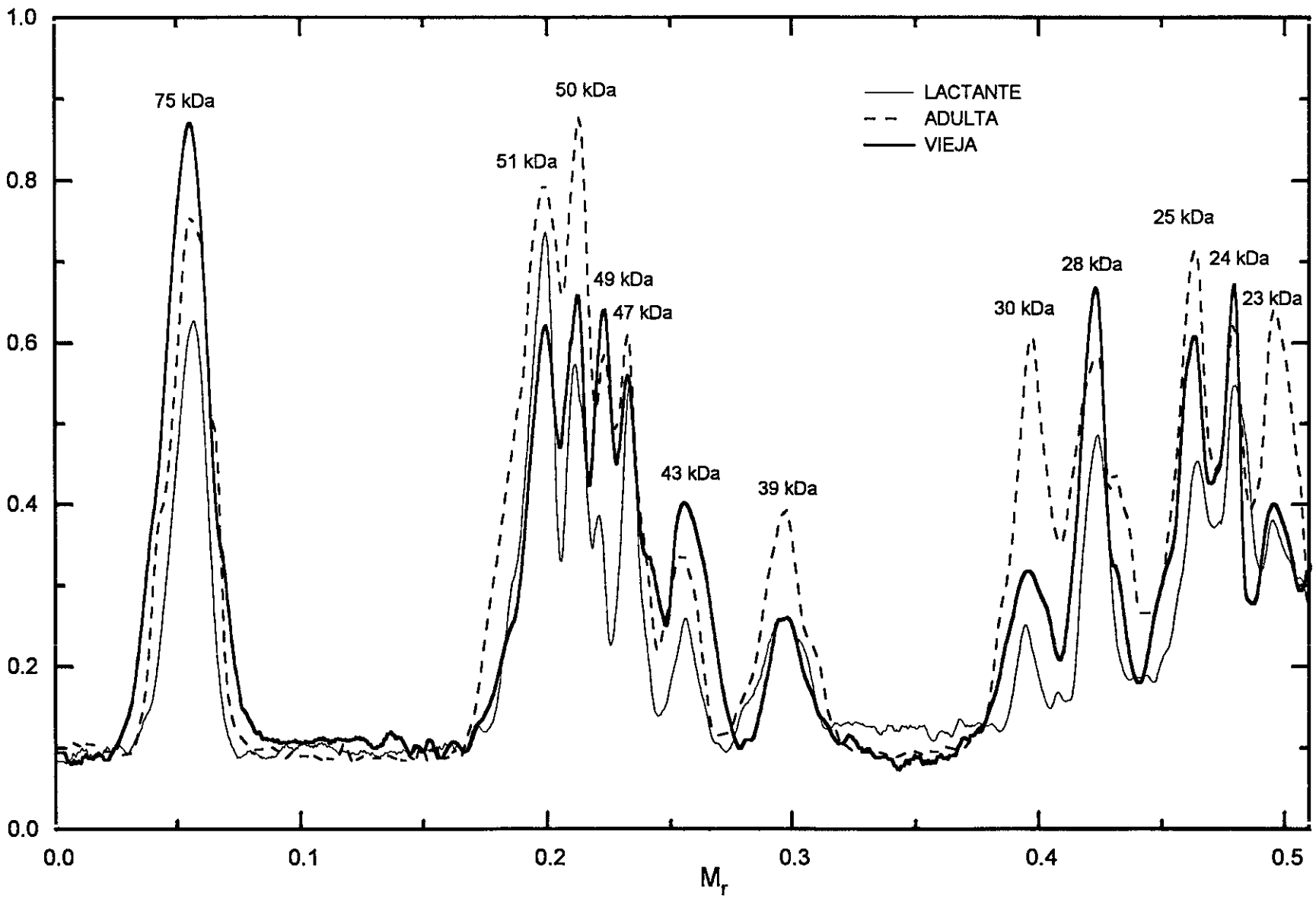


Figura IV-14A

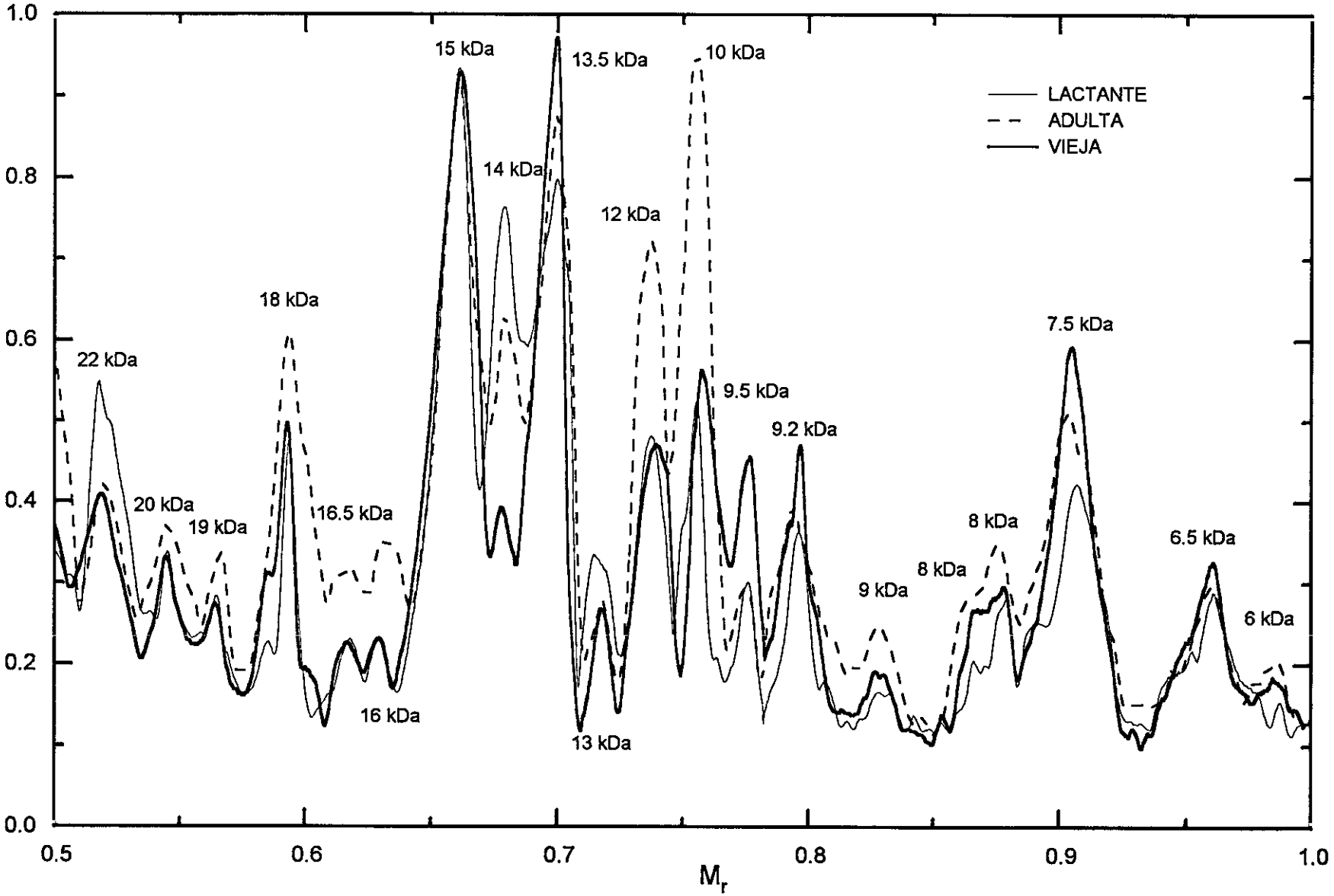


Figura IV-14B

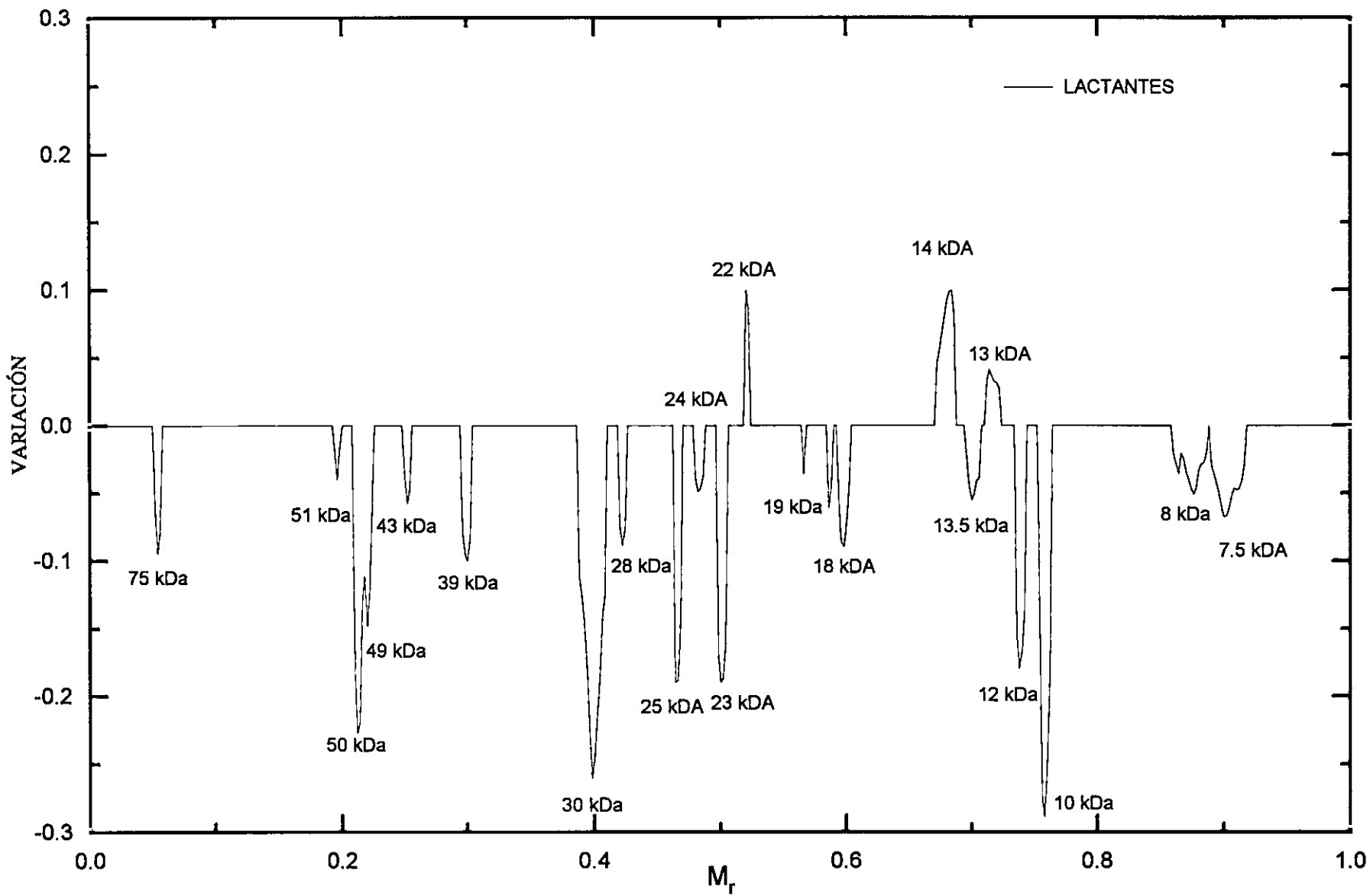


Figura IV-15A

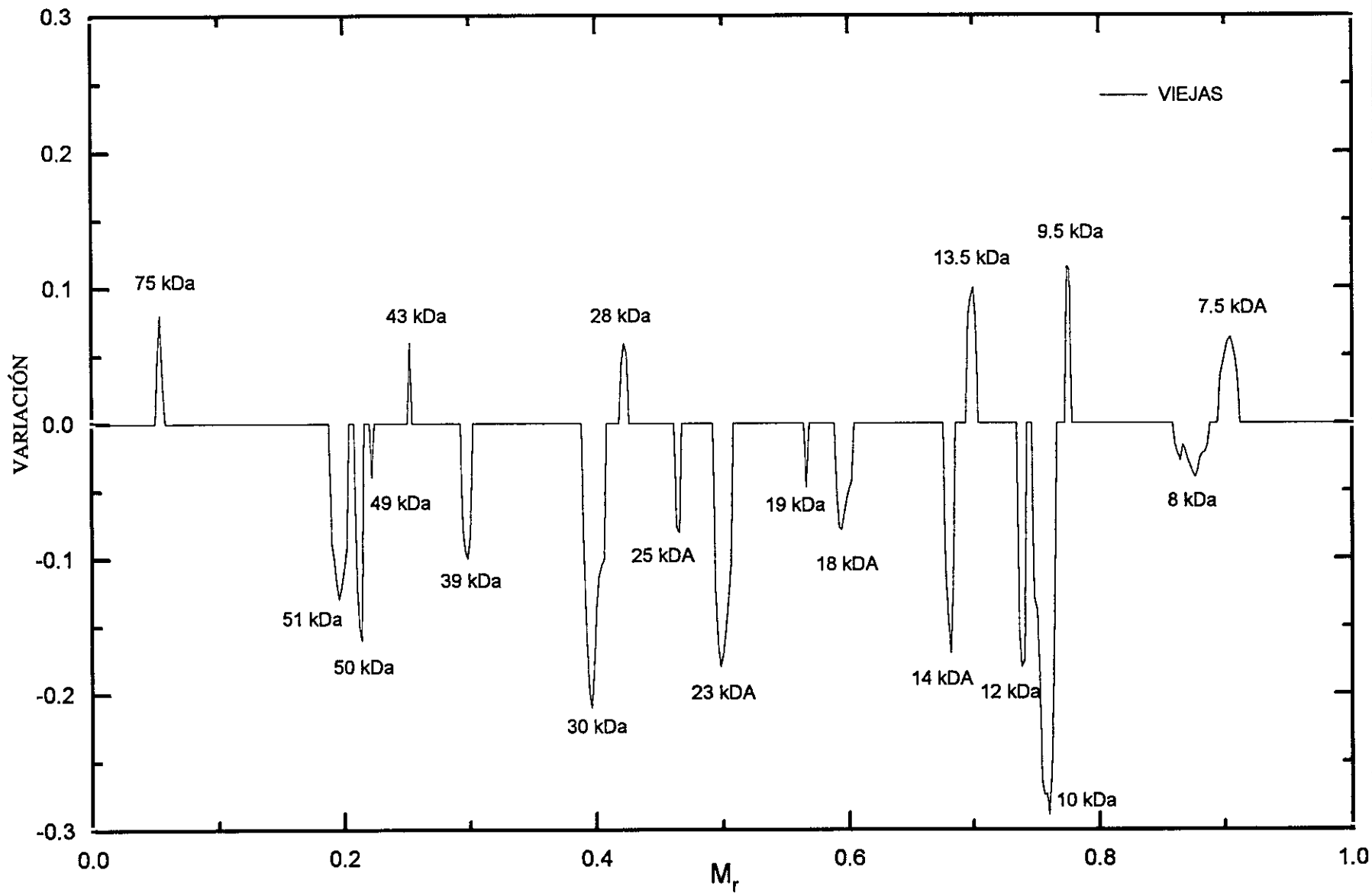


Figura IV-15B

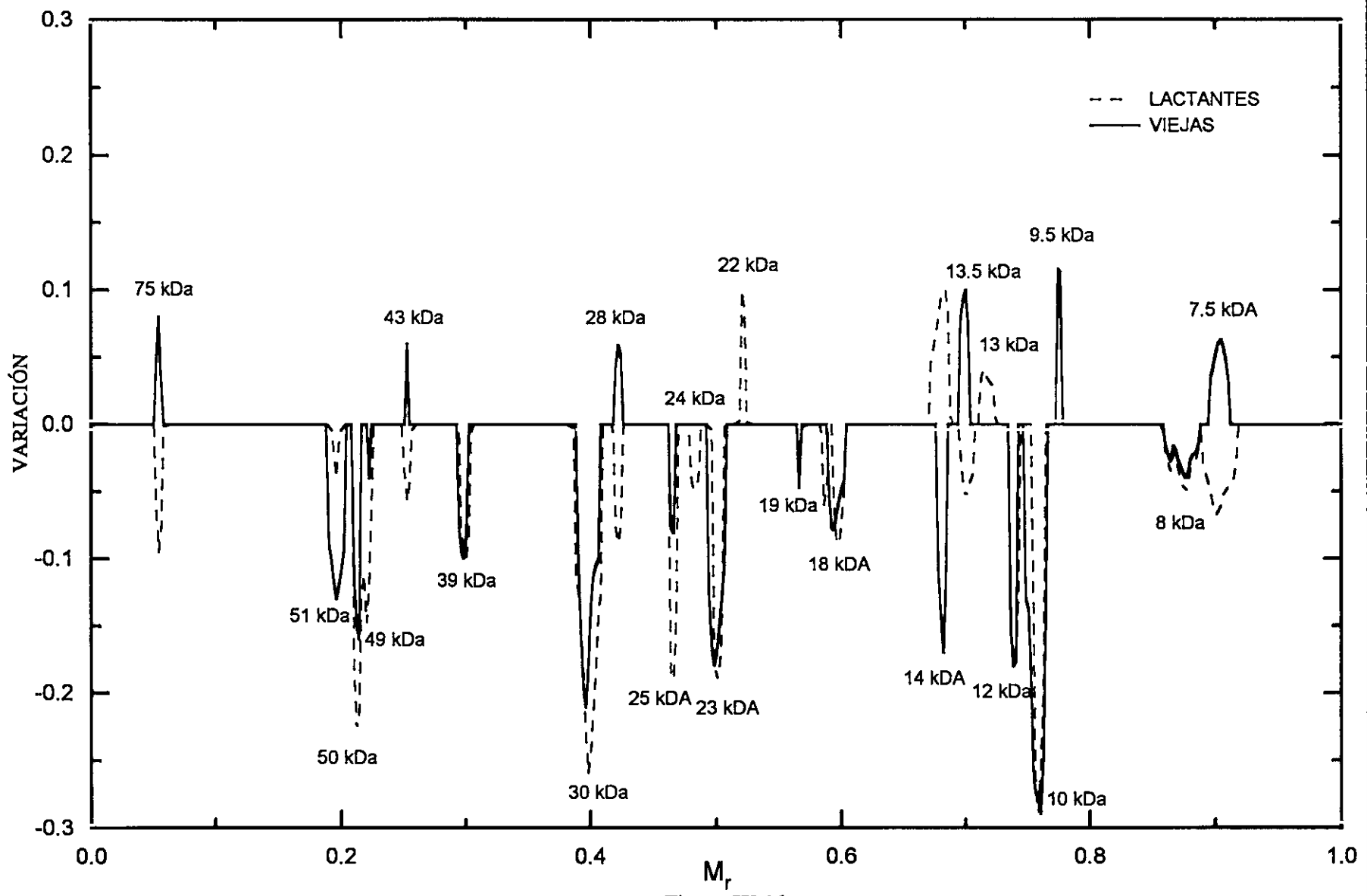


Figura IV-16

V. DISCUSIÓN

Las mitocondrias contienen un sistema genético semi-independiente (que es necesario para la regeneración de estos orgánulos a través de un proceso de división mitocondrial), por lo que el genoma mitocondrial debe jugar un papel importante en el envejecimiento celular (Fleming y cols., 1982).

Según los últimos trabajos, y como se ha expuesto en el Capítulo de Introducción, el propio ADN mitocondrial (ADN-mt) codifica 13 polipéptidos que forman parte de la composición de los complejos respiratorios (Wallace, 1992). Siete de ellos pertenecen al complejo I denominados ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6 (Chomyn y cols., 1985a; 1985b); en el complejo III, la subunidad III (apocitocromo *b*), encargada de la unión del citocromo *b* (Chomyn y cols., 1986), es también codificada por el ADN-mt. Por otra parte, también se asigna al ADN-mt tres subunidades del complejo IV, denominadas COI, COII y COIII (Ching y Attardi, 1982; Mariottini y cols., 1986) y por último dos subunidades de la ATP sintasa; la ATPasa 6 y la ATPasa 8 (Chomyn y cols., 1985a). Aparte de estos polipéptidos, también se encuentran codificados por el ADN-mt los dos ARN-r necesarios y todos los ARN-t requeridos para llevar a cabo la traducción de las proteínas (Lander y Lodish, 1990). La expresión de los genes ADN-mt de la cadena fosforilativa requiere pues, una mitocondria funcional que sea capaz de llevar a cabo la coordinación de los sistemas de transcripción, replicación y traducción cuyos procesos dependen del ADN-n. De esta forma la biogénesis de la fosforilación oxidativa requiere cientos de genes nucleares y mitocondriales (Shoffner y Wallace, 1990; Merriwether y cols., 1991).

Hay que considerar que el ADN-mt es particularmente más susceptible del ataque por radicales libres que el ADN-n, dada su proximidad física a la cadena respiratoria, principal generadora de radicales libres, potencialmente mutagénicos según los estudios de Sohal y Brunk, (1992) y Miquel, (1992). Por otra parte, la ausencia de proteínas histonas y no histonas asociadas al ADN y la alta densidad de información debida a la ausencia de intrones, hace al ADN-mt muy vulnerable al ataque por estos radicales libres. Esto, unido a que la mitocondria carece también de algunos mecanismos de reparación asociados que sí están presentes en el ADN nuclear, hace que el grado de error en la gamma polimerasa sea alto. El ADN-mt, parece pues, ser un objetivo común del daño producido por los radicales libres, acumulando 16 veces más daño oxidativo que el ADN-n, como muestra la diferente cantidad de 8-hidroxiguanina, formada por la reacción de radicales hidroxilo con la guanina en el ADN mitocondrial y nuclear (Richter y cols., 1988).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran, en primer lugar, una disminución de la síntesis de ATP con el envejecimiento del animal que está asociada a cambios morfológicos y funcionales de la mitocondria. Los estudios realizados por microscopía electrónica indican que con la edad, se produce un aumento en el área total de las mitocondrias que va acompañado de una disminución en la densidad de las crestas mitocondriales. Estos estudios están de acuerdo con los obtenidos por otros autores en hígado de rata (Hansford, 1983) y en estructuras sinápticas de cerebelo (Müller-Höcker, 1992).

La estructura de la mitocondria es la manifestación más visible de su funcionalidad. Así, la densidad de volumen de las crestas mitocondriales está relacionada con su capacidad para realizar la fosforilación oxidativa de forma que la morfología y el número de crestas mitocondriales varía de unos tejidos a otros en función de las necesidades energéticas de la célula (Hansford, 1983). En los estudios morfológicos realizados, micrografías electrónicas (figura IV-1) y determinación de parámetros mitocondriales (figura IV-2), se observa que las mitocondrias de animales envejecidos están hinchadas, resultados concordantes con los descritos por Fleming y cols. (1983).

La disminución de consumo de oxígeno observado (tabla IV-2), podría indicar una falta de habilidad por parte de la cadena respiratoria para llevar a cabo la síntesis de ATP, por lo que a primera vista, cabe pensar que la declinación de la fosforilación oxidativa con la edad puede ser producto de la acumulación de daño oxidativo en la mitocondria y en el ADN-mt, que repercutiría en una disfunción en los complejos respiratorios de la cadena transportadora de electrones (Linnane y cols., 1989; Ames, 1989; Pikó y cols., 1988).

Los resultados obtenidos de la medida de actividades enzimáticas de los complejos respiratorios que se han determinado en el presente trabajo, no puede decirse que en su totalidad han sido los que cabría esperar (tabla IV-5 y figura IV-4), de acuerdo a lo anteriormente expuesto. Así la actividad del complejo I (NADH ubiquinona oxidorreductasa) muestra una disminución a lo largo de la vida, resultado concordante con el hecho de que es el complejo respiratorio que posee un mayor número de subunidades codificadas por el ADN-mt, que por las razones expuestas al principio del Capítulo, está más expuesto al ataque de los radicales libres, y por tanto más susceptible al deterioro. Estos resultados también son concordantes con los obtenidos por otros autores en trabajos realizados tanto en músculo esquelético (Trounce y cols., 1989), como en tejido hepático (Yen y cols., 1989; Genova y cols., 1995). Otros autores, por el contrario, no aprecian disminución en la actividad enzimática del complejo I con la edad (Takasawa y cols., 1993; Torii y cols., 1992), si bien hay que tener en cuenta que en estos estudios los animales envejecidos no superan los dos años de vida.

Un razonamiento análogo podría aplicarse al complejo IV (citocromo *c* oxidasa) que según muestran los resultados (tabla IV-5), también experimenta un acusado descenso de su actividad durante el envejecimiento, siendo el segundo complejo con mayor número de subunidades codificadas por el ADN-mt (tres en total). Estos resultados están de acuerdo con trabajos realizados tanto en músculo esquelético (Trounce y cols., 1989), como en tejido hepático (Yen y cols., 1989; Boffoli y cols., 1994). Este último autor realiza en su trabajo estudios de inmunotransferencia de la citocromo *c* oxidasa, con el fin de examinar si el descenso de la actividad catalítica observado en el complejo es debido a una alteración en su composición polipeptídica, llegando a la conclusión de que existe una disminución de algunas de sus subunidades con la edad, entre las que se encuentra la subunidad II que está codificada por el ADN-mt. Por el contrario Vorbeck no encuentra variaciones en la composición polipeptídica por PAGE-SDS (Vorbeck y cols., 1982).

La actividad enzimática del complejo II (succinato ubiquinona oxidorreductasa), según los resultados obtenidos, no varía ni durante el desarrollo ni durante el envejecimiento, resultado de acuerdo con otros autores (Takasawa y cols., 1993; Torii y cols., 1992; Cooper y cols., 1992; Byrne y cols., 1991), resultado que no contradice la teoría del deterioro del genoma mitocondrial con el envejecimiento, puesto que todas sus subunidades están codificadas por el ADN-n que está menos expuesto a los ataques de los radicales libres.

En cuanto a las actividades enzimáticas de los complejos III (ubiquinol citocromo *c* oxidorreductasa) y I-III (NADH citocromo *c* oxidorreductasa) acoplados, la interpretación es más complicada, puesto que el complejo III aumenta moderadamente su actividad durante el envejecimiento y el complejo I-III experimenta un incremento muy significativo de su actividad a lo largo de la vida (figura IV-4).

Con los datos expuestos, es evidente que las variaciones de las actividades resultantes de los complejos I y III no pueden justificar el incremento observado para el complejo I-III acoplado. Cabría pensar que el efecto observado fuese debido, bien a la presencia de una mayor cantidad de complejo en la mitocondria en animales envejecidos, o a algún factor de acoplamiento (aumento de la actividad intrínseca del complejo), o incluso considerar la controvertida hipótesis de Sohal (Sohal y Brunk, 1992), según la cual, existe en la cadena respiratoria una vía no catalizada de formación de radicales libres cuyos procesos de transferencia de electrones contribuyen a sobrevalorar la actividad de los complejos respiratorios.

Para discernir entre estas hipótesis se han efectuado los estudios inmunológicos en mitocondria con el fin de cuantificar la cantidad del complejo I-III presente en los tres grupos

de edad. Los resultados del análisis de la regresión lineal efectuado entre la densidad óptica obtenido vs cantidad de mitocondria incubada con el anticuerpo frente al complejo I-III obtenido (tabla IV-6), muestran que la pendiente de los animales viejos es significativamente mayor que la de animales adultos en un 11.5%, si bien este aumento, aunque significativo, no parece dar cuenta, por completo, del incremento observado en la actividad enzimática. El incremento en la cantidad de enzima presente debería reflejarse en el contenido de los diferentes grupos funcionales que forman parte del complejo. Sin embargo, la medida en mitocondria de estos grupos presenta algunas dificultades, no siendo posible, en algunos casos, su determinación debido a los siguientes motivos:

- 1) Algunos no son componentes específicos del complejo I-III, como los centros ferrosulfuro (centros Fe-S), que se encuentran presentes en todos los complejos que componen la cadena transportadora de electrones, actuando como centros rédox.
- 2) El FMN presenta similares propiedades espectroscópicas que el resto de flavinas, tal como el FAD (De Luca y cols., 1956), que forma parte del complejo II, lo cual invalida cualquier estudio de este tipo.
- 3) La determinación de citocromos parece ser dependiente del método de reducción (Sato y Hagiara, 1970) y de manera muy notable de la posible contaminación de hemoglobina y mioglobina (Bookelman y cols., 1978).

Por estas razones, sólo ha sido posible determinar los niveles de citocromos presentes en mitocondria. Sin embargo, los resultados de estas determinaciones, no han podido esclarecer esta primera posibilidad, puesto que sólo se ha apreciado una disminución en el contenido de citocromo *b* en animales lactantes, no habiendo observado cambios en el contenido en citocromo *c+c₁*. En cambio, sí parece confirmado el descenso en la actividad enzimática del complejo IV, al observarse una disminución significativa en el contenido en citocromo *a+a₃* en animales envejecidos (tabla IV-7). Este descenso en el contenido de citocromo *a+a₃*, también es apreciado por otros autores (Genova y cols., 1995), aunque no observan ningún cambio en los otros dos citocromos. Estos mismos autores señalan que el descenso de la actividad específica de la citocromo *c* oxidasa en mitocondria de hígado de ratas viejas (24 meses) es el resultado del descenso en citocromo *a+a₃*, ya que la actividad del centro catalítico de la enzima permanece invariable.

A la vista de estos resultados, parece evidente que en el incremento en la actividad enzimática del complejo I-III, deben desempeñar un papel importante, los grupos funcionales que intervienen en los distintos procesos de transferencia de electrones que ocurren en la

cadena transportadora de electrones. Se sabe que en esta transferencia de electrones, aparte de los grupos prostéticos tales como flavinas (FMN) y citocromos (*b*, *c*+*c*₁), también participan, como centros rédox, proteínas ferrosulfuradas (Hatefi, 1985), por lo cual cualquier variación en su contenido y/o estructura podría reflejarse en una variación de la actividad enzimática.

Las determinaciones de estos grupos funcionales efectuadas en el complejo I-III purificado parecen confirmar el descenso de actividad del complejo I observado en animales viejos, ya que, aunque no se han encontrado variación en el contenido de hierro no hemo (que da cuenta de los centros ferrosulfuro), a lo largo de la vida, el contenido en FMN experimenta, en animales viejos, una marcada disminución. Este resultado vendría avalado por el hecho de que la concentración relativa de la subunidad de 51 kDa, implicada en la unión a NADH y FMN, disminuye notablemente en animales viejos (figura IV-16).

Aunque no es un objetivo propio de esta Tesis el análisis de la topología del complejo, los estudios de fluorescencia realizados para la determinación de FMN, permiten especular acerca del microentorno en el cual se encuentra el fluoróforo (término empleado en fluorescencia para designar a los compuestos que presentan características fluorescentes, análogo al término de cromóforo empleado en espectrofotometría de absorción). La emisión de fluorescencia de un fluoróforo es muy sensible a los cambios de polaridad que se produzcan en el microentorno de dicho compuesto, de forma que el máximo de emisión de éste, experimenta un desplazamiento con respecto al máximo de emisión que presenta en disolución. Este desplazamiento se produce hacia menores longitudes de onda (corrimiento hacia el azul) si la polaridad del entorno disminuye, como consecuencia de un aumento de la hidrofobicidad, o hacia longitudes de onda mayores (corrimiento hacia el rojo) si la polaridad aumenta. El corrimiento es tanto más acusado, cuanto mayor sea la variación de polaridad. En los estudios realizados, se observa que el máximo de emisión se encuentra, en las tres edades, ligeramente desplazado hacia el azul (figura IV-10), con respecto al que presenta en disolución acuosa (526 nm), lo que indica que el disolvente es bastante accesible al fluoróforo y que éste debe encontrarse en una zona bastante superficial del complejo, lejos de la región hidrofóbica del complejo.

En cuanto al contenido en citocromos (tabla IV-9), que recordemos están asociados al complejo III, la menor actividad enzimática observada en animales lactantes, podría ser producto de la menor cantidad de citocromos encontrada en el complejo purificado, resultado que también queda reflejado en la disminución que experimentan las dos subunidades implicadas en sus respectivas uniones. Los resultados obtenidos en animales viejos para estos grupos funcionales indican, que si bien se observa un incremento en el contenido de citocromo *c*+*c*₁, el contenido de citocromo *b* no varía (figura IV-16). El análisis de bandas, por su parte,

indica que las subunidades del complejo implicadas, aumentan ligeramente en el envejecimiento. Hay que señalar la ausencia de bibliografía en estudios comparativos de este tipo en el complejo purificado, lo que aumenta el grado de incertidumbre a la hora de interpretar los resultados.

Aunque estos estudios no evidencian claramente un efecto de aumento intrínseco de actividad del complejo I-III en animales envejecidos, es posible comprobar su existencia comparando las actividades específicas obtenidas en mitocondria y en complejo purificado.

Si consideramos que las variaciones en la actividad específica del complejo I-III son producto exclusivamente de los niveles de complejo presentes en mitocondria, las actividades específicas en el complejo purificado deberían ser similares en las tres edades, puesto que en este caso, la cantidad de proteína total corresponde prácticamente por completo al complejo I-III, como muestran los estudios de pureza. El hecho de que estas actividades muestren un comportamiento similar al que se observa en mitocondria, es decir, un aumento significativo con la edad, indica que debe de existir otro efecto, distinto al de la cantidad de complejo, que sea responsable de las variaciones observadas.

En mitocondria, las variaciones de las actividades específicas pueden ser reflejo de los niveles presentes de las enzimas y/o de modificaciones de los procesos implicados en su actividad. En cambio, en los complejos purificados la variación de la actividad específica es independiente de la cantidad de complejo, puesto que la proteína presente, como se ha indicado anteriormente, corresponde prácticamente al complejo, manifestándose solamente el efecto de mayor actividad.

Se puede considerar pues, que el incremento total observado en la actividad específica del complejo es la suma del incremento de la actividad específica debida al efecto de mayor actividad intrínseco más el incremento de actividad específica debida al efecto de cantidad presente:

$$\Delta A_t = \Delta A_{ac} + \Delta A_{ca} \quad [1]$$

siendo

ΔA_t , el incremento total en la A.E.,

ΔA_{ac} , el incremento en la A.E. debida al efecto de mayor actividad intrínseco,

ΔA_{ca} , el incremento en la A.E. debido al aumento de los niveles del complejo presentes en mitocondria.

El incremento en porcentaje se obtendrá dividiendo la expresión [1] entre ΔA_t y multiplicando el resultado por cien. Como conocemos el incremento total de actividad (mitocondria) y el incremento por mayor actividad (complejo), podemos estimar el incremento por cantidad. Para el caso entre animales envejecidos (v) y adultos (a), la expresión anterior vendría dada por:

$$[\Delta A]_{mit}^{v,a} = [\Delta A]_{com}^{v,a} + \Delta A_{ca}^{v,a} \quad [2]$$

Sustituyendo en la expresión [2] los respectivos valores para las actividades específicas reflejadas en la tabla IV-5 y figura IV-8, obtenemos un valor para el incremento debido a cantidad de complejo de -13.3% para animales lactantes y de 12.5% para animales viejos en perfecta consonancia con los obtenidos en los estudios inmunológicos, en los cuales las variaciones observadas representan 12.5 y 11.5% respectivamente.

Estos resultados vienen avalados por el hecho de que la mayoría de las subunidades proteicas que aumentan durante el envejecimiento están implicadas directamente en la actividad del complejo I-III (figura IV-16), correspondientes a subunidades de unión de centros ferrosulfuro (75 kDa) del complejo I, citocromos *b* (43 kDa), *c+c₁* (27 kDa) y ubiquinona (13.5 kDa) del complejo III.

VI. CONCLUSIONES

Como consecuencia de la interpretación, discusión y crítica realizadas de los resultados experimentales obtenidos en esta Memoria, se proponen las siguientes CONCLUSIONES:

1.

– Los estudios morfológicos indican que con la edad se produce un hinchamiento de las mitocondrias y una disminución del volumen de las crestas mitocondriales.

2.

– Ciertos parámetros que dan cuenta de la transducción energética en la mitocondria, como son el consumo de oxígeno, el transporte de calcio a través de la membrana interna mitocondrial y los niveles de ATP, disminuyen durante el envejecimiento.

3.

– Esta disminución no se traduce, como cabría esperar, en una disminución generalizada de las actividades enzimáticas de los complejos respiratorios, sino que estos muestran una variación desigual en su comportamiento a lo largo de la vida.

4.

– Dicha variación, en principio, parece estar asociada al número de subunidades, de cada complejo en particular, codificadas por el ADN-mt, de tal forma que el complejo II, codificado íntegramente por el ADN-n no experimenta variación. Por el contrario, los complejos I y IV que son los que contienen un mayor número de subunidades codificadas por el ADN-mt, experimentan una marcada disminución. Sin embargo, este razonamiento no es aplicable al complejo III, cuya actividad aumenta ligera, pero significativamente durante el desarrollo y el envejecimiento.

5.

– La actividad del complejo I-III aumenta muy significativamente a lo largo de la vida. Este aumento, sin embargo, no se corresponde con las variaciones en las actividades enzimáticas de los complejos I y III por separado, ya que como se ha indicado en el apartado anterior, la

actividad del complejo I disminuye en el envejecimiento mientras que la del complejo III aumenta a lo largo de la vida .

6.

– Los resultados de los estudios inmunológicos indican que en la mitocondria de animales viejos, los niveles de complejo I–III aumentan con la edad en un 11% aproximadamente. Este aumento no parece justificar, por sí solo, el marcado incremento observado en la actividad del complejo a lo largo de la vida.

7.

– El hecho de que en el complejo purificado se observe un comportamiento similar de la actividad del complejo I–III al de la mitocondria, indica que deben existir, además de un mayor nivel de enzima en animales envejecidos, otros efectos que incrementen la actividad del complejo, relacionados con el acoplamiento entre los complejos constituyentes.

8.

– Las determinaciones de los grupos catalíticos, así como el análisis de las subunidades que componen el complejo I–III, indican que:

a) Aunque no se han encontrado variaciones en el contenido de hierro no hemo en el complejo, sí existe una disminución de algunas de las subunidades asociadas a la unión de los centros ferrosulfuro.

b) El contenido en FMN, presente en el complejo I, y la subunidad asociada a su unión, disminuyen durante el envejecimiento.

c) El contenido en citocromos aumenta a lo largo de la vida al igual que las subunidades implicadas en su unión.

d) Las subunidades proteicas del complejo que disminuyen durante el envejecimiento pertenecen mayoritariamente al complejo I, algunas de las cuales corresponden a subunidades codificadas por el ADN mitocondrial.

e) Las subunidades que aumentan a lo largo de la vida, excepto una, corresponden a subunidades funcionales del complejo I–III.

f) Existen variaciones en subunidades que si bien, no se les asigna una funcionalidad, podrían desempeñar un papel importante en la estructura del complejo, destacando la disminución en animales lactantes y viejos de las subunidades de 39, 30, 25 y 10 kDa, el aumento en animales viejos de la subunidad de 9.5 kDa y el aumento a lo largo de la vida de la subunidad de 7.5 kDa

9.

– En el envejecimiento se produce un aumento de la actividad del complejo I-III, y aunque las razones del mismo, no se pueden explicar de manera completa, este aumento, desde un punto de vista fisiológico, podría corresponder a un mecanismo compensatorio de la mitocondria para hacer frente a la disminución funcional del complejo I, en animales envejecidos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

A

Ames, B.N. (1989) Endogenous DNA damage as related to cancer and aging. *Mutat. Res.* **214**, 41-46

Azevedo, J.E., Eckerskorn, C. y Werner, S. (1994) In organelo assembly of respiratory-chain complex I. Primary structure of the 14.8 kDa subunit of *Neurospora crassa* complex I. *Biochem. J.* **299**, 297-302.

B

Barlett, G.R. (1959) Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* **234**, 466-468.

Berden, J.A. y Slatter, E.C. (1970) The reaction of antimycin with a cytochrome *b* preparation active in reconstitution of the respiratory chain. *Biochim. Biophys. Acta* **216**, 237-249.

Berry, E.A., Huang, L. y Derose, V.J. (1991) Ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase of higher plants. *J. Biol. Chem.* **286**, 9064-9077.

Berry, E.A., Huang, L., Earnest, T.N. y Jap, B.K. (1992) X-ray diffraction by crystals of beef heart ubiquinol:cytochrome *c* oxidoreductase. *J. Mol. Biol.* **224**, 1161-1166.

Boffoli, D., Scacco, S., Vergari, R., Solarino, G., Santacrose, G. y Papa, S. (1994) Decline with age of the respiratory chain activity in human skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta* **1226**, 73-82.

Bookelman, H., Trijbels, J.M.F., Sengers, R.C.A. y Janssen, A.J.M. (1978) Measurement of cytochromes in human skeletal muscle mitochondria, isolated from fresh and frozen stored muscle specimens. *Biochem. Medecine* **19**, 366-373.

Borle, A.B. (1975) Regulation of celular calcium metabolism and calcium transport by calcitonin. *J. Membrane Biol.* **21**, 125-146.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Breakefield, X.O. (1992) Molecular approaches to disease of nervous system. En *An Introduction to Molecular Neurobiology* (ed. Z.W. Hall), p. 517. Sunderland, Mass., EE.UU.: Sinauer Associates, Inc.

Brown, G.C. y Brand, M.D. (1988) Proton/electron stoichiometry of mitochondrial complex I estimated from the equilibrium thermodynamic force ratio. *Biochem. J.* **252**, 473-479.

Byrne, E., Trounce, I. y Dennett, X. (1991) Mitochondrial theory of senescence: respiratory chain protein studies in human skeletal muscle. *Mechanisms of Ageing and Development* **60**, 295-302.

C

Carafoli, E. y Semenza, G. (1979) Calcium transport in released erythrocytes and the use of calcium sensitive electrode. En *Membrane Biochemistry*. (Carafoli y Semenza eds.), pp 41-50 Springer Verlag, Berlín.

Chance B. y Hagihara B. (1963) En *Proceeding of the international Congress of Biochemistry*, 5º Congreso, Moscú. (C. Slater, Ed.), p. 3. Pergamon Press, Oxford.

Ching, E. y Attardi, G. (1982) High-resolution electrophoretic fractionation and partial characterization of the mitochondrial translation products from HeLa cells. *Biochemistry* **21**, 3188-95.

Chomyn, A. (1985a) En *Achievements and perspectives of mitochondrial research*, vol. 2, Biogenesis, E. Quagliariello, E. C. Slater, F. Palmieri, C. Saccone, A.M. Kroon, Eds. (Elsevier, Amsterdam, 1985), p. 259.

Chomyn, A. Cleeter, M.W.J., Ragan, C.I., Riley, M., Doolittle, R.F. y Attardi, G. (1985b) Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase. *Nature* **314**, 592-597.

Chomyn, A. Cleeter, M.W.J., Ragan, C.I., Riley, M., Doolittle, R.F. y Attardi, G. (1986) URF6, last unidentified reading frame of human mtDNA, codes for an NADH dehydrogenase subunit. *Science* **234**, 614-618.

Cooper, J.M., Mann, V.M., Krige, D. y Schapira, A.H.V. (1992) Human mitochondrial complex I dysfunction. *Biochim. Biophys. Acta.* **1101**, 198-203.

Counter, C.M., Hirte, H.W., Baccetti, S. y Harley, C.B. (1994) Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 2900-2904.

D

de la Cruz, M.J., Burón, I, y Roncero, I. (1990) Morphological and functional studies during aging at mitochondrial level action of drugs. *Int. J. Biochem.* **22**, 729-735.

De Luca, C., Werber, M.M., y Kaplan, N.O. (1956) Assay for flavin adenine dinucleotide. *J. Biol. Chem.* **223**, 559-567.

De Vries, S. (1985) The pathway of electron transfer in the dimeric QH₂:cytochrome *c* oxidorreductase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **18**, 195-224.

Dice, J.F. (1993) Cellular and molecular mechanisms of aging. *Physiological Reviews* **73**(1), 149-159.

Dodet, B. (1994) Vieillissement et longévité, la piste des gènes. *Biofutur*, diciembre, 17-22.

E

Engvall, E. y Perlman, P.J. (1971) Enzime-linked inmunsorbent assay, ELISA. Quantitative assay of inmunnoglobuline G. *Immunochemistry* **8**, 871-879.

F

Finel, M., Skehel, J.M., Albracht, S.P.J., Fearnley, I.M. y Walker, J.E. (1992) Resolution of NADH:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria into two subcomplex, one of which contains the redox center of enzyme. *Biochemistry* **31**, 11425-34.

Fiske, C.H. y Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**(2), 375-400.

Fleming, J.E., Miguel, J., Cottrel, S.F., Yengoyan, L.S. y Economos, A.C. (1982) Is cell aging caused by respiration dependent injury to the mitochondrial genome? *Gerontology* **28**, 44-53.

G

Galante, Y.M. y Hatefi, Y. (1979) Purification and molecular properties of mitochondrial NADH dehydrogenase, *Arch. Biochem. Biophys.* **192**, 559-568.

Gazzoty, P., Malmström, K. y Cromton, M. (1979) Preparation and assay of animal mitochondria and submitochondrial vesicles. En *Membrane Biochemistry* (Carafoli, E., Semenza, G. eds.), pp 62-76 Springer Verlag, Berlín.

Gencic, S., Schägger, H. y von Jagow, G. (1991) Core I protein of bovine ubiquinol - cytochrome-c reductase; an additional member of the mitochondrial-protein-processing family. Cloning of bovine core I and core II cDNAs and primary structure of the proteins. *Eur. J. Biochem.* **199**, 123-131.

Genova, M.L., Castelluccio, C., Fato, R., Castelli, G.P., Merlo Pich, M., Formiggini, G., Bovina, C. Marchetti, M. y Lenaz, G. (1995) Major changes in complex I activity in mitochondria from aged rats may not be detected by direct assay of NADH:coenzyme Q reductase. *Biochem J.* **311**, 105-109.

González-Halphen, D., Lindorfer, M.A. y Capaldi, R.A. (1988) Subunit arrangement in beef heart complex III. *Biochemistry* **27**, 7021-7031.

Green, D.E., Järnefelt, J. y Tisdale, H.D. (1959) Cuantification of cytochromes in complex III. *Biochim. Biophys. Acta* **31**, 34-43.

H

Hansford, R.G. (1983) Bioenergetics in aging. *Biochim. Biophys. Acta.* **726**, 41-80.

Harding, A.E., Holt, I.J., Cooper, J.M., Schapira, A.H.V., Sweeney, M., Clark, J.B. y Morgan-Hughes, J.A. (1990) Mitochondrial myopathies: genetic defects. *Biochem. Soc. Trans.* **18**, 519-523.

Harley. C.B., Futcher, A.B. y Greider, C.W. (1990) Telomers shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-460.

Harley. C.B., Futcher, A.B. y Greider, C.W. (1992) The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp. Gerontol.* **27**, 375-382.

Harman, D.O. (1983) Free radical theory of aging consequences of mitochondria aging. *Age* **6**, 86-94.

Hashimoto, K., Itoh, S., Takamiya, K. y Nishumura, M. (1982) Characterization of electron donation to cytochrome *c*-555 in *Chromatium vinosum* from ferrocyanide, tetramethylphenylenediamine and reduced dimethylquinone. Effects of redox potential, pH and salt concentration. *J. Biochem. (Tokyo)* **91**, 1111-20.

Hatefi, Y., Haavik, A.G. y Griffiths D.E. (1962a) Studies on the electron transfer system. XL. Preparation and properties of mitochondrial DPNH-coenzyme Q reductase. *J. Biol. Chem.* **237**, 1676-1680.

Hatefi, Y., Haavik, A.G. y Griffiths D.E. (1962b) Studies on the electron transfer system. XLI. Reduced coenzyme Q (QH₂)-cytochrome *c* reductase. *J. Biol. Chem.* **237**, 1681-1685.

Hatefi, Y., Haavik, A.G. y Jurtshuk, P. (1961) Isolation of NADH cytochrome *c* reductasa from beef heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **52**, 119-127.

Hatefi, Y. y Rieske, J.S. (1967a) Preparation of submitochondrial particles. DPNH-cytochrome *c* reductase. *Methods Enzymol.* **10**, 225-230.

Hatefi, Y. y Rieske, J.S. (1967b) Preparation of submitochondrial particles. DPNH-coenzyme Q reductase. *Methods Enzymol.* **10**, 235-239.

Hatefi, Y. (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 1015-1069.

Hauska, G., Hurt, E., Gabellini, N. y Lockau, W. (1983) Comparative aspects of quinol-cytochrome *c*/plastocyanin oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta* **726**, 97-133.

Hayashi, M., Miyoshi, T., Takashina, S. y Unemoto, T. (1989) Purification of NADH-ferricyanide dehydrogenase and NADH-quinone reductase from *Escherichia coli* membranes and their roles in the respiratory chain. *Biochim. Biophys. Acta* **977**, 62-69.

Hayflick, L. (1990) Cellular ageing an cell inmortality though memory of cultures cells. *Biofutur* **87**, p. 20.

Heron, C., Smith, S., Ragan, C.I. (1979) An analysis of the polypeptide composition of bovine heart mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase by two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochem J.* **181**, 435-443.

Herz, U., Schröder, W., Liddell, A. Leaver, C.J., Breeicke, A. y Grohmann, L. (1994) Purification of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of the respiratory chain from the inner mitochondrial membrane of *Solanum tuberosum*. *J. Biol. Chem.* **269**, 2263-2269.

Hinkle, P.C., Kumar, M.A., Resetar, A. y Harris, D.L. (1991) Mechanistic stiochiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochemistry* **30**, 3576-3582.

K

King, T.E. (1964) Stoichiometry of labile sulfide, nonheme iron and flavin in reconstitutively active succinate dehydrogenase from heart mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **16**, 511-5.

Kirkland, J. (1992) The biochemistry of mamalian Senescence. *Clin. Biochem.* **25**, 61-75.

L

Laemmli, U.K. (1970) Cleavaje of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lander, E.S. y Lodish, H. (1990) Mitochondrial diseases: gene mapping and gene therapy. *Cell* **61**, 925-926.

Leonard, K., Wingfield, P., Abad, T. y Weiss, H. (1981) Three-dimensional structure of ubiquinol:cytochrome c reductase from *Neurospora* mitochondria determined by electron microscopy of membrane crystals. *J. Mol. Biol.* **149**, 259-274.

Linnane, A.W., Ozawa, T., Markuzi, S. y Tanaka, M. (1989) Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative disease. *Lancet* **i**, 642-645.

M

Maciera-Coelho, A. (1992) Genome reorganization through division implications for aging of mammalian organism. *Exp. Gerontol.* **27**, 369-374.

Mariottini, P., Chomyn, A., Doolittle, R.F. y Attardi, G. (1986) Antibodies against the COOH-terminal undecapeptide of subunit II, but not those against the NH₂-terminal decapeptide, immunoprecipitate the whole human cytochrome c oxidase complex. *J. Biol. Chem.* **261**, 2255-62.

Masui, R., Wakabayashi, S., Matsubara, H. y Hatefi, Y. (1991) The amino acid sequence of two 13 kDa polypeptides and partial amino acid sequence of 30 kDa polypeptide of complex I from bovine heart mitochondria: possible location of iron-sulfur cluster. *J. Biochem.* **109**, 534-543.

Merle, P. y Kadenbach, B. (1980) The subunit composition of mammalian cytochrome c oxidase. *Eur. J. Biochem.* **105**, 449-507.

Merriwether, A., Clark, A.G., Ballinger, S.W., Schurr, T.G., Soodyall, H., Jenkins, T., Sherry, S.T. y Wallace, D.C. (1991) The structure of human mitochondrial DNA variation. *J. Mol. Evol.* **33**, 543-55.

Miquel, J. (1991). An integrated theory of aging as the result of mitochondrial DNA mutation in differentiated cells. *Arch. Gerontol. Geriatric.* **12**, 99-117.

Miquel, J. (1992) An update with mitochondrial-DNA mutation hypothesis of cell aging. *Mutat. Res.* **275**, 249-255.

Moment, G.B. (1992) Theories of aging: an overview. In: testing the theories of aging; editado por R.C. Adelman y G.S. Roth. Boca Raton, FL: CRC, 1982, pp. 1-23.

Müller-Höcker, J. (1992) Mitochondria and ageing. *Brain Pathology* **2**, 149-158.

N

Nieboer, P. y Berden, J.A. (1992) Triple inhibitor titrations support the functionality of the dimeric character of mitochondrial ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase. *Biochim. Biophys. Acta* **1101**, 90-96.

Nohl, H. (1993) Involvement of free radical in ageing: a consequence or cause of senescence. *Br. Med. Bull.* **49** (3), 653-67.

O

Ochoa, S. (1955) Malic dehidrogenase from pig Heart. *Methods Enzimol.* 1[123], 735-739.

Ohnishi, T. (1966) Preparation and some properties of yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 241, 1797-1806.

Ohnishi, T., Blum, H., Galante, Y.M. y Hatefi, Y. (1991) Iron-sulphur cluster studies in NADH-ubiquinone oxidoreductase and soluble NADH dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 256, 9216-9220.

Ohnishi, T., Ragan, C.I. y Hatefi, Y. (1985) EPR studies of iron-sulphur cluster in isolated subunits and subfractions of NADH-ubiquinone oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* 260, 2782-2788.

Orr, W.C. y Sohal, R.S. (1994) Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 263, 1128-1130.

Ozawa, K., Kitamura, O., Mizukami, T., Yamaoka, Y., Kamano, T., Takeda, H., Takasan, H. y Honjo, I. (1972) Human liver mitochondria. *Clin. Chim. Acta* 38, 385-93.

P

Parker, W.D., Boyson, S.J., Luder, A.S. y Parks, J.K. (1990) Evidence for a defect in NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) in Huntington's disease. *Neurology* 40, 1231-1234.

Pikó, L., Hougham, A.J. y Bulpitt, K.J. (1988) Studies of sequence heterogeneity of mitochondrial DNA from rat and mouse tissues: Evidence for an increased frequency of deletions/additions with ageing. *Mech. Ageing Dev.* 43, 279-293.

Pilkington, S.J., Arizmendi, J.M., Fearnley, I.M., Runswick, M.J. Skehel, J.M. y Walker, J.E. (1993) Structural organization of complex I from bovine mitochondria. *Biochem. Soc. Trans.* 21, 26-31.

R

Ragan, C.I. (1976) NADH ubiquinone oxidoreductase. *Biochim. Biophys. Acta* 456, 249-290.

Ragan, C.I. (1987) Structure of NADH-ubiquinone reductase (complex I). *Curr. Top. Bioenerg.* **15**, 1-36.

Renart, J., Reiser, J. y Stark, G.R. (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 3116-3120.

Richter, C. y Frei, B. (1988) Ca^{2+} release from mitochondria induced by prooxidants. *Free Radical Biol. Med.* **4**, 356-374.

Rieske, J.S. (1967) Preparation of submitochondrial particles. Reduced coenzyme Q-cytochrome *c* reductase. *Methods Enzymol.* **10**, 239-245.

Rothstein, M. (1981) Postranslational alteration of proteins, en CRC handbook of biochemistry of aging pp 103-111, J.R. Florini (ed.). CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida

Runswick, M.J., Fearnley, I.M., Skehel, J.M. y Walker, J.E. (1991) Presence of an acyl carrier protein in NADH:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria. *FEBS Lett.* **286**, 121-124.

S

Sackmann, U., Zensen, R., Röhlen, D., Jahnke, U. y Weiss, H. (1991) The acyl carrier protein in *Neurospora crassa* mitochondria is a subunit of NADH:ubiquinone reductase (complex I). *Eur. J. Biochem* **200**, 463-469.

Salach, J.I. (1978) Preparation of monoamine oxidase from beef liver mitochondria. *Methods Enzymol.* vol **53** [49], 495-502.

Sato, N. y Hagihara, B. (1970) Spectrophotometric analyses of cytochromes in ascites hepatomas of rats and mice. *Cancer Res.* **30**, 2061-2068.

Schägger, Th., Link, A. Engel, W.D., y von Jagow, G. (1986) Isolation of the eleven protein subunits of the bc₁ complex from beef heart. *Methods Enzymol.* vol **126** [22], 224-237.

Shoffner, J.M. y Wallace, D.C. (1990) Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell* **61**, 931-7.

Sidhu, A. y Beattie, D.S. (1982) Purification and polypeptide characterization of complex III from yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **257**, 7879-7886.

Smith, L. (1955) Reactions of cytochromes *a* and *a₃*. I. Studies of oxidation and reduction of the pigments in a purified preparation. *J. Biol. Chem.* **215**, 833-846.

Sohal, R.S. y Brunk U.T. (1992) Mitochondrial production of pro-oxidants and cellular senescence. *Mutation Research* **275**, 295-304.

Sohal, R.S. y Sohal, B.H. (1991) Hydrogen peroxide release by mitochondria increases during aging. *Mech. Ageing Dev.* **57**, 187-202.

Sottocasa, G.L., Kuylenstierna, B., Ernster, L. y Bergstrand, A. (1967) An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. A biochemical and morphological study. *J. Cell Biol.* **32**, 415-438.

Stanley, P.E. y Williams, S.G. (1969). Use of a liquid spectrometer for determining adenosine triphosphate by the luciferase enzyme. *Anal. Biochem.* **29**, 381-392.

Swank, R.T., Munkres, K.D. (1971) Subcellular and generic distribution, molecular weights, and proportions of oligopeptides. *Biochemistry* **10**, 3931-9.

Swanson, M.A. (1955) *Methods in Enzymology* **2**, 541-549.

T

Tabor, C.W., Tabor, H. y Rosenthal, S.M. (1954) Purification of amine oxidase from beef plasma. *J. Biol. Chem.* **208**, 645-661.

Takasawa, M., Hayakawa, M., Sugiyama, S., Hattori, K., Ito, T. y Ozawa, T. (1993) Age-associated damage in mitochondrial function in rat hearts. *Exp. Gerontol.* **28**, 269-280.

Tisdale, H.D. (1967) Preparation and properties of succinic-cytochrome *c* reductase (complex II-III). *Methods Enzimol.* vol **10** [39], 213-215.

Torii, K., Sugiyama S., Takagi, K., Satake, T. y Ozawa, T. (1992) Age-related decrease in respiratory muscle mitochondrial function in rats. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **6**, 88-92.

Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.

Trounce, I., Byrne, E. y Markuzi, S. (1989) Mitochondrial respiratory chain function; possible factor in ageing. *Lancet* **1**, 637-639.

Tzagaloff, A. (1982) Mitochondria. pp 244-253 Plenum Press. Nueva York.

U

Usui, S., Yu, L. y Yu, C.A. (1990) The small molecular mass ubiquinone-binding protein (QPc-9.5 kDa) in mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase: isolation, ubiquinone-binding domain, and immunoinhibition. *Biochemistry* **29**, 4618-4626.

V

Van Belzen, R., Van Gaalen, M.C.M., Cuppers, P.A. y Albracht, S.P.J. (1990) New evidence for the dimeric nature of NADH:Q oxidoreductase in bovine heart submitochondrial particles. *Biochim. Biophys. Acta.* **1017**, 152-159.

Van Belzen, De Jong, A.M.P. y Albracht, S.P.J. (1992) On the stoichiometry of the iron-sulphur cluster in mitochondria NADH:Q oxidoreductase. *Eur. J. Biochem.* **209**, 1019-1022.

Vorbeck, M.L., Martin, A.P., Park, J.K.J. y Townsend, J.F. (1982) Aging-related decrease in hepatic cytochrome oxidase of Fischer 344 rat. *Archives Biochemistry and Biophysics* **214**, 67-79.

W

Walker, J.E. (1992) The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Quarterly Reviews of Biophysics* **25**(3), 253-324.

Wallace, D.C. (1989) Mitochondrial DNA mutations and neuromuscular disease. *Trends in Genetics* **5**, 9-13.

Wallace, D.C., (1991) Mitochondrial genes and neuromuscular disease. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* **69**, 101-20.

Wallace, D.C. (1992) Mitochondrial Genetics: A paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* **256**, 628-632.

Weibell, E.L. (1979) Elementary introduction to stereological principles. En *Stereological Methods*, vol. 1 (Weibell, E.L. ed.), pp 9-60. Academic Press, Nueva York.

Wen-Hay, Y., Zou, Y., Yu, L. y Yu, C. (1991) Crystallization of mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase. *Biochemistry* **30**, 2303-2306.

Weiss, H., Friedrich, T. Hofhaus, G. y Preis, D. (1991) The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **197**, 563-576.

Weiss, H. y Juchs, B. (1978) Isolation of a multiprotein complex containing cytochrome b and c_1 from *Neurospora crassa* mitochondria by affinity chromatography on immobilized cytochrome c. Difference in the binding between ferricytochrome c and ferrocycytochrome c to the multiprotein complex. *Eur. J. Biochem.* **88**, 17-28.

Whitfield, C.D., Bostedor, R., Goodrum, D., HaaK, M. y Chu, E.H.Y. (1981) Hamster cell mutants unable to grow on galactose and exhibiting an overlapping complementation pattern are defective in the electron transport chain. *J. Biol. Chem.* **256**, 6651-6656.

Y

Yamaguchi, M. y Hatefi, Y. (1993) Mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I): proximity of the subunits of the flavoprotein and the iron-sulfur protein subcomplexes. *Biochemistry* **32**, 1935-1939.

Yamamoto, H., Tanaka, M., Katayama, M., Obayashi, T., Nimura, Y. y Ozawa, T. (1992) Significant existence of deleted mitochondrial DNA in cirrotic liver surrounding hepatic tumor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**, 913-920.

Yen, T., Chen, Y., King, K., Yeh, S. y Wei, Y. (1989) Liver mitochondrial respiratory functions decline with age. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **165**, 994-1003.

Yonekati, T. (1960) Studies on cytochrome oxidase. I. Absolute and difference absorption spectra. *J. Biol. Chem.* **235**, 845-853.

Yu, C.A., y Yu, L. (1980) Resolution and reconstitution of succinate-cytochrome c reductase. preparations and properties of high purity succinate dehydrogenase and ubiquinol -cytochrome c reductase. *Biochim. Biophys. Acta* **591**, 409-420.

Z

Zglincki, T. (1987) A mitochondrial membrane hypothesis of aging. *J. Theor Biol.* **127**, 127-132.

Ziegel, D.M. y Doeg, K.A. (1962) Properties of succinate:Q reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* **97**, 41-50.