

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Bioquímica



TESIS DOCTORAL

**Efectos del detergente no iónico tritón x-100 sobre las
membranas mitocondriales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

José Ignacio García-Gurtubay García

Madrid, 2015

TP
1980

030

José Ignacio García-Gurtubay y García



x-53-225324-1

EFFECTOS DEL DETERGENTE NO IONICO TRITON
X-100 SOBRE LAS MEMBRANAS MITOCONDRIALES

Departamento de Bioquímica
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid
1980



BIBLIOTECA

© José I. García-Gurtubay y García
Edita e Imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1980
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-5802-1980

ERRATAS ADVERTIDAS

<u>página</u>	<u>línea</u>	<u>dice</u>	<u>debe decir</u>
243	11	0,1	1

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

Director: Santos Ruiz
Asesor: Santos Ruiz
Asesor: Otero Acallo
Asesor: Santiago Calvo
Asesor: Macasilla Gueles
Asesor: Lopez Pirez

EFFECTOS DEL DETERGENTE NO IONICO
TRITON X-100 SOBRE LAS MEMBRANAS
MITOCONDRIALES

Memoria presentada por el Ldo.
José Ignacio García de Gurtubay
y García para aspirar al grado
de Doctor en Farmacia.

MADRID 1979

DON JOSE MARIA MACARULLA GREOLAS, Catedrático Director del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Bilbao

C E R T I F I C O: Que Don JOSE IGNACIO GARCIA DE GURTUBAY Y GARCIA, Licenciado en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado, bajo mi dirección y la del Profesor Adjunto Numerario de este Departamento Doctor Don Félix María Goñi Urcelay, el trabajo "EFECTOS DEL DETERGENTE NO IONICO TRITON X-100 SOBRE LAS MEMBRANAS MITOCONDRIALES" con el cual aspira a la obtención del grado de Doctor en Farmacia.

Revisado el presente trabajo considero que puede ser presentado al Tribunal que ha de juzgarlo.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expido este certificado en Bilbao a dos de Abril de mil novecientos setenta y nueve.



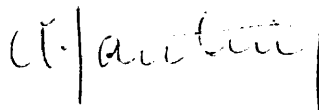
Prof. Dr. J.M. Macarulla

DON ANGEL SANTOS RUIZ, Catedrático Director del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid

C E R T I F I C O como Ponente, que Don JOSE IGNACIO GARCIA DE GURTUBAY Y GARCIA, Licenciado en Farmacia por esta Universidad, ha realizado las investigaciones correspondientes al trabajo "EFECTOS DEL DETERGENTE NO IONICO TRITON X-100 SOBRE LAS MEMBRANAS MITOCONDRIALES", que constituye su Tesis Doctoral, bajo la codirección de los Profesores D. José María Macarulla Greoles y D. Félix María Goñi Urcelay de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Bilbao.

Revisado el trabajo considero que puede ser presentado al Tribunal que lo ha de juzgar.

Y para que conste y a los efectos oportunos extiendo este certificado en Madrid a dieciseis de Abril de mil novecientos setenta y nueve.



Prof. Dr. A. Santos Ruiz

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Bilbao, a cuyo Director, Prof. Dr. D. José María Macarulla Greoles, agradezco su apoyo así como sus útiles comentarios y juicios críticos.

Igualmente deseo hacer constar mi gratitud al Dr. D. Félix María Goñi Urcelay que con su constante orientación, ayuda y estímulo, ha contribuido decisivamente a la realización de este trabajo.

D. José Carlos González Milicua, profesor de este Departamento, ha colaborado en la realización de las técnicas electroforéticas, y D. Juan José de Otamendi, profesor del Departamento de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Bilbao (Prof. Dr. J.M. Rivera), me ha prestado su valiosa ayuda en la realización de los estudios ultraestructurales. A ambos quiero expresar mi agradecimiento, extensivo a mis compañeros del laboratorio que con su amistad y ayuda han contribuido al desarrollo de este trabajo.

A mi mujer

A mis hijos

A mis padres

INDICE

	<u>Página</u>
1. INTRODUCCION	
1.1 Estructura de las membranas biológicas.....	2
1.2 Composición de las biomembranas.....	9
1.2.1 Proteínas de las membranas.....	10
1.2.2 Lípidos de las membranas.....	13
1.3 Membranas mitocondriales.....	17
1.4 Detergentes.....	28
1.4.1 Naturaleza química. Clasificación.....	29
1.4.2 Propiedades físicas de los detergentes en disolución acuosa.....	33
1.4.3 Solubilización de bicapas lipídicas.....	37
1.4.4 Interacciones detergente-proteína.....	40
1.4.4.1 Unión de detergentes a proteínas hidrosolubles.....	40
1.4.4.2 Unión de detergentes a proteínas de membrana.....	43
1.5 Efecto de los detergentes sobre las membranas biológicas.....	45
1.5.1 Efectos del detergente a bajas concentra- ciones.....	46
1.5.2 Solubilización de membranas.....	49
1.5.3 Separación de lípidos y proteínas.....	51

	<u>Página</u>
1.5.4 Efectos sobre las interacciones protef- na-proteína.....	53
1.5.5 Solubilización selectiva de componentes de membrana.....	54
1.6 Triton X-100.....	55
1.7 Objeto del trabajo.....	60
 2. MATERIALES Y METODOS	
2.1 Materiales.....	62
2.2 Aislamiento de mitocondrias.....	63
2.3 Aislamiento y purificación de fracciones submi tocondriales.....	64
2.3.1 Separación de membranas externas e in- ternas.....	64
2.3.2 Purificación de membranas internas.....	66
2.3.3 Purificación de membranas externas.....	67
2.4 Tratamiento de las membranas con diversos agen tes.....	68
2.4.1 Detergente.....	68
2.4.2 Fuerza iónica. Temperatura. EDTA.....	69
2.5 Determinación de proteínas.....	70
2.6 Extracción de lípidos.....	73
2.6.1 Extracción de lípidos de membranas y sedimentos.....	73

	<u>Página</u>
2.6.2 Extracción de lípidos de sobrenadantes.	74
2.7 Determinación de fósforo lipídico.....	75
2.8 Cromatografía en capa fina de fosfolípidos....	77
2.8.1 Determinación cuantitativa de fosfolípi dos.....	78
2.9 Cromatografía gas-líquido de ácidos grasos de fosfolípidos.....	79
2.9.1 Transesterificación de ácidos grasos....	79
2.9.2 Cromatografía gas-líquido de ésteres me tílicos de ácidos grasos.....	79
2.10 Electroforesis de proteínas en gel de poliacri lamida.....	80
2.11 Microscopía electrónica de transmisión.....	83
2.11.1 Fijación.....	83
2.11.2 Deshidratación.....	84
2.11.3 Impregnación.....	85
2.12 Determinación de colesterol.....	85
2.13 Determinación de hierro.....	86
2.14 Determinación de flavinas.....	86
2.15 Determinación de citocromos <u>a</u> , <u>b</u> , <u>c</u> ₁ , <u>c</u>	87
2.16 Extracción y determinación de ubiquinona.....	89
2.17 Determinación de actividades enzimáticas.....	91
2.17.1 Malato deshidrogenasa.....	91
2.17.2 NADH : citocromo <u>c</u> reductasa sensible e insensible a la rotenona.....	92

	<u>Página</u>
2.17.3 Citocromo <u>c</u> oxidasa.....	94
2.17.4 Succinato : Co Q oxidorreductasa.....	95
2.17.5 Succinato : citocromo <u>c</u> reductasa.....	96
2.17.6 Determinación de actividad ATPasa.....	97

3. RESULTADOS

3.1 <u>Solubilización de membrana externa</u>.....	101
3.1.1 Solubilización de proteínas y fósforo lipídico. Influencia de la concentra- ción de detergente y de membranas en suspensión.....	101
3.1.2 Estudios ultraestructurales.....	107
3.1.3 Estudio de los polipéptidos solubiliz- dos.....	117
3.1.4 Estudio de los fosfolípidos solubiliza- dos y de sus ácidos grasos asociados...	120
3.2 <u>Solubilización de membrana interna</u>	
3.2.1 Solubilización de proteínas y fósforo lipídico.....	123
3.2.1.1 Influencia de la concentración de detergente y de membranas en suspensión.....	123
3.2.1.2 Influencia de la temperatura..	128
3.2.1.3 Influencia de la fuerza iónica	133

	<u>Página</u>
3.2.1.4 Estudio comparativo de otros detergentes: dodecilsulfato y desoxicolato sódico.....	139
3.2.2 Estudios ultraestructurales.....	144
3.2.3 Estudio de los polipéptidos solubiliza- dos.....	158
3.2.4 Solubilización de fosfolípidos y de sus ácidos grasos asociados.....	163
3.2.5 Solubilización de colesterol.....	167
3.2.6 Solubilización de flavinas.....	167
3.2.7 Solubilización de cromóforos de citocro- mos.....	171
3.2.7.1 Influencia de la concentración de detergente.....	172
3.2.7.2 Influencia de la fuerza iónica	172
3.2.8 Solubilización de hierro total.....	174
3.2.9 Solubilización de coenzima Q.....	190
3.2.10 Efecto del Triton X-100 sobre la activi- dad específica de diversos enzimas de membrana.....	190
3.2.11 Solubilización de diversas actividades enzimáticas de la membrana interna mito- condrial.....	194

	<u>Página</u>
4. DISCUSION	
4.1 Caracterización del sistema estudiado.....	204
4.2 Mecanismo de acción del Triton X-100.....	207
4.3 Comportamiento de las membranas internas y externas frente al Triton X-100. Selectividad...	218
4.4 Efecto de la temperatura y fuerza iónica.....	227
4.5 Efecto del Triton X-100 sobre algunas actividades enzimáticas de la M.I.M.	232
4.5.1 Solubilización de actividad ATPasa.....	237
4.6 Perspectivas de trabajo.....	240
5. CONCLUSIONES	
5 Conclusiones.....	241
6. BIBLIOGRAFIA	
6 Bibliografía.....	244

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
Aesp	Actividad específica
ANS	1-anilinaftaleno-8-sulfonato
BIS	N,N'-metilendisacrilamida
CMC	Concentración crítica micelar
CoQ	Coenzima Q
DIF	2,6-diclorofenolindofenol
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
ESM	Error estándar medio
Fe(n.h.)	Hierro no hemínico
HLB	Equilibrio hidrófilo-lipófilo
LDH	Lactato deshidrogenasa
MDH	Malato deshidrogenasa
M.I.M.	Membrana interna mitocondrial
PEP	Fosfoenolpiruvato
PK	Piruvato kinasa
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
SF	Semliki Forest (virus)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
TLC	Cromatografía en capa delgada

1. INTRODUCCION

1.1 ESTRUCTURA DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS

El estudio de las membranas biológicas en sus aspectos morfológicos y de multiplicidad funcional, a nivel fisiológico, físico-químico y estructural, ocupa en estos últimos años un área cada vez más amplia dentro del campo de la biología molecular, lo que se refleja en la gran cantidad de artículos y revisiones que sobre estos temas aparece continuamente.

La primera sugerencia sobre la naturaleza lipídica de la membrana plasmática fué establecida por Overton en 1895 (1) al observar que era fácilmente atravesada por sustancias liposolubles, señalando la presencia en ella de colesterol y otros lípidos (2).

Los estudios de Langmuir (3,4) desde 1917 sobre la disposición y orientación de diversas clases de lípidos en medios acuosos, ofrecen los primeros modelos experimentales de películas lipídicas, sirviendo de apoyo a la interpretación de la disposición de los lípidos en las biomembranas.

Gorter y Grendel (5) en 1925 observaron que los lípidos extraídos de eritrocitos de diferentes especies con acetona, extendidos sobre una fase acuosa, ocupaban un área equivalente al doble de la calculada para la superficie de los eritrocitos. Aunque estos experimentos adolecían de errores

técnicos, como se demostró posteriormente (6-8) respecto al cálculo del área del eritrocito y a una completa extracción de lípidos, sirvieron para que fuera aceptada la sugerencia de que la membrana estaba compuesta por una capa bimolecular de lípidos. Por otro lado, estudios simultáneos de la capacitancia de membranas atribuyeron a éstas un espesor de 33 Å (9).

En 1932 Cole (10) consiguió medir la tensión superficial de huevos de erizo de mar hallando un valor de 0,08 dinas/cm, muy inferior al que se esperaba (10-20 dinas/cm) para membranas constituidas por bicapas lipídicas, lo que indujo a pensar en la existencia de capas proteicas cubriendo a los lípidos. Este planteamiento era erróneo ya que se ha comprobado (11) que las membranas reconstituidas con lípidos en ausencia de proteínas tienen normalmente una tensión superficial muy baja, por lo que este hecho no es indicativo de la existencia de cubiertas proteicas. Aquella interpretación errónea sirvió no obstante para reconocer la naturaleza lipoproteica de las membranas biológicas, si bien se prejuzgaba él que las proteínas se disponían en capas cubriendo a la bicapa lipídica. Este pensamiento influyó de manera indudable en la concepción que de la estructura de la membrana hicieron Danielli y Davson, y las modificaciones posteriores a la misma.

La primera hipótesis importante sobre la estructura de las membranas biológicas fué elaborada en 1935 por Danielli y Davson (12), que propusieron su modelo de membrana constituido por una capa bimolecular de lípidos cuyos grupos no polares se dispondrían adyacentes entre sí, mientras que sus grupos polares estarían orientados hacia fuera, y en relación con capas monomoleculares de proteínas. Este modelo fué posteriormente modificado para dar cabida a la existencia de los "poros" en la membrana.

Las primeras imágenes de las membranas que en la década de los 50 proporcionó la microscopía electrónica constituyeron valiosas aportaciones en el estudio de la estructura de las biomembranas. En 1959 Robertson (13), fijando con permanganato potásico, pudo comprobar que las membranas presentaban una "imagen trilaminar" al microscopio electrónico calculándoles un espesor de unos 75 Å. Posteriormente, y con microscopios de mayor resolución, empleando el tetróxido de osmio (OsO_4) como fijador, se confirmó esta imagen trilaminar, especialmente si el material era incluido en "Vestopal", un prepolímero de poliésteres y estireno.

Stoecknius en 1962 (14) utilizó membranas artificiales de fosfolípidos fijadas con OsO_4 y observó una imagen trilaminar, con una lámina clara en el centro y dos ligeramente densas por fuera, lo que indicaba que el fijador se había

unido a los grupos polares. En un segundo experimento, añadió proteína al modelo de bicapa lipídica artificial y, después de tratar con OsO_4 la membrana lipoprotéica así formada, comprobó que en la micrografía electrónica seguía apareciendo la imagen trilaminar pero con las zonas densas mucho más reforzadas. Esto le hizo deducir que el osmio se fijaba a las proteínas y grupos polares de los lípidos y no a los dobles enlaces de los ácidos grasos como se había pensado en un principio. El espesor calculado de 70-75 Å coincidía con el de las dimensiones de las membranas celulares. Estos experimentos vinieron a reforzar la validez del modelo de Danielli y Davson.

Apoyándose en esto Robertson generalizó la estructura trilaminar a todas las membranas biológicas creando su teoría de la "unidad de membrana", la cual suponía una importante implicación fisiológica: la de que tanto la membrana plasmática como las de todos los orgánulos celulares son partes de un sistema continuo de membranas y por tanto son intercambiables.

La teoría de unidad de membrana y el modelo Davson-Danielli-Robertson quedaron desplazados en la década de los 60. Por una parte eran ya conocidas las diferencias de composición entre unas membranas y otras lo que estaba de acuerdo con la distinta función que cada una desempeñaba. Por otra, técnicas bioquímicas y micrografías electrónicas de alta re

solución derrumbaron la teoría de unidad de membrana.

En efecto: ya en 1963 Sjöstrand (15,16), al fijar con permanganato potásico, observó que mientras las membranas plasmáticas mantienen su estructura trilaminar, las membranas de los orgánulos citoplasmáticos (mitocondrias, cloroplastos) presentan un aspecto más bien globular o vesicular con notables variaciones de espesor. El mismo autor comprobó que las membranas son geoméricamente asimétricas, presentando una de las dos láminas mayor grosor y densidad que la otra.

El modelo Danielli-Davson consideraba a las proteínas distendidas en conformación β . La introducción de técnicas ópticas y espectroscópicas refinadas en el estudio de membranas no modificadas, no pudo demostrar este particular (21-23). Los datos que se obtuvieron de estudios con resonancia magnética nuclear, dispersión rotatoria óptica y dicroísmo circular, indicaban la localización de algunas proteínas en medios apolares, lo que puso de manifiesto otro punto débil en la teoría de Danielli y Davson que sólo consideraba las interacciones de proteínas con grupos hidrófilos de fosfolípidos por fuerzas casi exclusivamente polares, e ignoraba las interacciones hidrofóbicas lípido-proteína. Esto está en contradicción con la necesidad de aplicar métodos drásticos para romper la membrana, y con el hecho de que para una total extracción de proteínas de

membrana libres de lípidos deban emplearse procedimientos que debiliten antes las interacciones apolares.

Benson (17) en 1964, sobre los datos obtenidos del estudio de membranas de cloroplastos, postuló la existencia de unidades funcionales complejas de membrana. En este modelo la red protéica ocupa todo el espesor de la membrana disponiendo sus residuos polares hacia la periferia y en relación con los de los lípidos. El centro de la membrana estaría ocupado por los residuos no polares de las proteínas relacionándose con las cadenas alifáticas de los fosfolípidos. Este modelo daba una imagen más dinámica de las membranas y explicaba a la vez las imágenes trilaminares del microscopio electrónico concordantes con los experimentos de Stoeckenius.

Más tarde propondría Robertson (18) su nuevo modelo que coincidía esencialmente con el de Benson.

Benedetti y Emmelot (19) en 1965 describieron también subunidades globulares en las membranas utilizando técnicas de microscopía electrónica de contraste negativo.

Green y Perdue (20) en 1966 apoyaron también estas observaciones; las membranas estarían constituidas por subunidades lipoprotéicas. Las propiedades de las membranas dependerían de la arquitectura y propiedades de estas subunidades consideradas aisladamente.

En 1970 Glaser y col. (24) propusieron un modelo llamado de mosaico según el cual existiría una doble capa lipídica continua en la que algunas proteínas podrían extenderse transversalmente por toda la membrana. Las técnicas de criofractura-réplica de microscopía electrónica avalaron esta teoría.

Vanderkooi y Green (25) en 1971 propusieron un modelo de cristal lipoprotéico bidimensional en el que las membranas serían soluciones bidimensionales de proteínas globulares y lípidos orientados, y en donde algunas proteínas podrían atravesar la bicapa lipídica de parte a parte. Esta teoría se aproxima a la propuesta por Singer (26) en 1971 en la que las proteínas globulares "flotarían" en un "mar" lipídico.

El modelo actual más satisfactorio de membrana es el que en 1972 propusieron Singer y Nicolson (27) que sintetizaron numerosas teorías propuestas con anterioridad en su modelo llamado "mosaico fluido". En este modelo los fosfolípidos de las membranas se hallan ordenados en bicapas formando una matriz fluida de cristales líquidos. Las moléculas lipídicas pueden moverse lateralmente por lo que la bicapa es fluida, flexible, dotada de una resistencia eléctrica particularmente elevada, y de relativa impermeabilidad a las moléculas muy polares.

Las proteínas son globulares, de acuerdo con su alto contenido en hélice α (28-30), y se hallan más o menos "sumergidas" en la bicapa desde cada lado llegando algunas a estar totalmente incluidas y otras a atravesar la fase lipídica de un lado a otro. La extensión en que esto ocurre depende de la secuencia y localización de los restos de aminoácidos no polares en la superficie de la proteína globular. Estas proteínas forman así un "mosaico" sobre la fluida bicapa lipídica. El mosaico no es estático ya que las proteínas pueden difundir lateralmente en dos dimensiones.

Este modelo satisface las propiedades de las membranas biológicas. Explica la variación de espesor y la asimetría en diferentes membranas y es aplicable a membranas con contenidos de proteína muy diferentes por unidad de superficie de membrana. Permite explicar también las propiedades eléctricas y de permeabilidad, así como la rápida movilidad lateral de algunos componentes proteicos en el plano de la membrana.

1.2 COMPOSICION DE LAS BIOMEMBRANAS.

Las biomembranas están compuestas principalmente por lípidos y proteínas cuya relación oscila entre 1:4 a 4:1 (31) según el tipo y la funcionalidad de la membrana. En las membranas más funcionales las proteínas constituyen la

mayor parte en peso (32-34).

1.2.1 Proteínas de las membranas.

Las proteínas llevan a cabo la mayoría de los procesos de las membranas. Según su localización y tipo de unión a la membrana se distinguen dos clases: periféricas o extrínsecas, e integrales o intrínsecas (27,35). Puesto que las periféricas pueden disociarse por soluciones salinas se infiere que están débilmente ligadas a la superficie de la membrana (32). Las integrales por el contrario estarían unidas más fuertemente por interacciones con las cadenas hidrocarrbonadas de los lípidos de la membrana, ya que son solubilizadas por detergentes que compiten con estas interacciones apolares (36).

Un 70-80% de las proteínas de membrana son integrales (37) entre ellas la mayoría de los enzimas asociados a membrana, proteínas antigénicas, proteínas de transporte, receptores de fármacos y hormonas, y receptores de lectinas (38). Ciertos lípidos, a veces específicos, son necesarios generalmente para la función de proteínas integrales con actividades enzimáticas (39,40) o antigénicas como es el caso del factor Rh de la membrana eritrocitaria (41).

Las proteínas intrínsecas o integrales penetran y en algunos casos atraviesan la zona hidrófoba interna de la bicapa lipídica (42,43), debido a la distribución peculiar

de los restos hidrófilos e hidrófobos de sus aminoácidos en la estructura tridimensional de la proteína globular.

Para una proteína extrínseca globular, soluble, los restos no polares quedarían secuestrados hacia el interior de la molécula, presentando hacia el exterior residuos iónicos y altamente polares en contacto con la superficie exterior de la membrana (44). Por el contrario una proteína intrínseca o integral podría disponer sus grupos no polares no sólo hacia el interior de la molécula sino también hacia el exterior de su superficie, en relación con la zona hidrocarbonada hidrófoba interior de la bicapa lipídica, mientras que sus restos polares, ocupando el extremo opuesto, estarían en contacto con la zona hidrófila de la membrana y fase acuosa exterior, por lo que la proteína presentaría un extremo "hundido" en la bicapa lipídica y el otro "emergiendo" de ella (22,45).

El carácter anfipático de estas proteínas ha sido probado mediante la determinación de la secuencia de aminoácidos en proteínas aisladas de membranas de microsomas (46, 47) y de eritrocitos (48), donde se han encontrado fragmentos de polipéptidos lipófilos y lipófilos.

El grado de integración de las proteínas intrínsecas en las membranas estará relacionado con la proporción de aminoácidos polares presentes en ellas (49). La califica-

ción de "polar" o "no polar" para un aminoácido es un tanto arbitraria, por lo que se han desarrollado criterios para la determinación de un "índice de apolaridad" (o hidrofobicidad) para los aminoácidos (49) basados en su solubilidad en disolventes de distinta polaridad y su comportamiento cromatográfico (50), lo que permite calcular la apolaridad o hidrofobicidad media de una proteína a partir de su contenido en aminoácidos.

La disposición de estas proteínas globulares en las membranas se ha confirmado en micrografías electrónicas, con técnicas de criofractura-réplica (51) y marcaje químico (52).

Las proteínas periféricas o extrínsecas son fácilmente desprendidas de la membrana por tratamientos suaves como acción de disoluciones salinas de determinada fuerza iónica o valores extremos de pH. Estas proteínas ejercerían su función unidas fundamentalmente a una proteína integral de membrana; tal sería el caso del citocromo c de la membrana interna mitocondrial, y de otras proteínas periféricas como el complejo llamado espectrina de la membrana eritrocitaria. Todas ellas estarían rodeadas de fase acuosa y unidas a protuberancias de proteínas integrales que sobresalen de la membrana (53).

Mientras en el modelo Davson-Danielli-Robertson se postulaba la asociación de proteínas a la membrana mediante interacciones iónicas entre ellas y las cabezas polares de los lípidos, el mosaico fluido solo admite una pequeña fracción de las proteínas unidas de tal forma. Esto se apoya en que las variaciones de fuerza iónica capaces de disociar los enlaces electrostáticos no provocan una gran separación de proteínas de membrana. Por otra parte, el hecho de que mediante el uso de fosfolipasas específicas puedan eliminarse selectivamente el 60-70% de las cabezas polares de los lípidos sin pérdida de proteína, demuestra que los grupos polares de la bicapa lipídica no tienen gran intervención en la unión de proteínas a la membrana.

1.2.2 Lípidos de las membranas.

La caracterización de los lípidos de las membranas exige su previa extracción y fraccionamiento para lo que se han utilizado disolventes orgánicos no polares como cloroformo, éter benceno, aunque los más efectivos son mezclas cloroformo-metanol (54). Estos tratamientos desnaturalizan las proteínas de membrana que pueden recogerse libres de lípidos. Los métodos cromatográficos (55) de capa fina y columna son los más utilizados para separar diferentes clases de lípidos, combinando distintos sistemas de disolventes con soportes de ácido silícico, óxido de aluminio, ce-

lulosa, etc. (54,56). El método más sensible para una caracterización completa de las especies moleculares de lípidos es la cromatografía gas-líquido que permite identificar los ácidos grasos y azúcares que forman parte de lípidos complejos.

La alteración química de los lípidos es un peligro constante durante la preparación del material para su análisis. La degradación enzimática post-mortem puede evitarse con agentes desnaturalizantes de enzimas o manteniendo el tejido a baja temperatura. Un grave problema es la peroxidación de los ácidos grasos que puede evitarse con el uso de antioxidantes como el BHT (butilhidroxitolueno).

Los lípidos de las membranas poseen carácter anfipático o anfífilo (*). Sus polos hidrófilos tienen distinta afinidad por el agua según su estructura, desde un simple grupo -OH en el colesterol y grupos cargados y "zwitteriones" en fosfoglicéridos, hasta oligosacáridos complejos en esfingoglicolípidos. Este doble carácter hidrófilo-lipófilo común a todos ellos es lo que facilita la mutua interacción y orientación de estos componentes en la membrana.

(*) Siguiendo la sugerencia de Winsor (135), los compuestos que contienen en su molécula porciones hidrófilas y lipófilas reciben frecuentemente el nombre de "anfífilos" o "anfífilicos".

Los lípidos de las membranas de las células eucarióticas pertenecen principalmente a estos cuatro grupos: 1) fosfoglicéridos; 2) esfingofosfolípidos; 3) esfingoglicolípidos; 4) esteroides (57).

Cada tipo de membrana posee un espectro lipídico característico. El colesterol es particularmente abundante en algunas membranas de células eucariotas como la membrana plasmática de los eritrocitos, pero no se encuentra en procariontes. La naturaleza de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos que forman los extremos apolares de fosfoglicéridos y esfingolípidos condicionan algunas propiedades de las membranas. Los ácidos grasos más frecuentes en los lípidos de membrana son los de número par de átomos de carbono (entre C_{12} y C_{24}) siendo los más comunes los C_{16} y C_{18} . Pueden ser saturados o presentar dobles enlaces, en cuyo caso su configuración es casi siempre cis.

El grado de fluidez de las membranas depende de la longitud y grado de insaturación de las cadenas acílicas de sus lípidos. Las saturadas son rectas y al interaccionar entre sí favorecen el estado rígido de la membrana, mientras que un doble enlace cis produce una curvatura en la cadena hidrocarbonada que interfiere el empaquetamiento óptimo de las cadenas de ácidos grasos, además de aumentar la rotación alrededor de los enlaces sencillos C-C por lo

que las cadenas acílicas insaturadas son más flexibles que las saturadas. Este efecto aumenta por la presencia de más de un doble enlace y con la disminución de la longitud de la cadena. Un alto contenido en colesterol favorece por otra parte la rigidez de la membrana (58).

Finalmente, la presencia frecuente en algunas membranas de glúcidos unidos covalentemente a lípidos o a proteínas completa el cuadro complejo de estas estructuras, de cuya fluidez dependen fenómenos tan importantes y variados como el transporte selectivo de metabolitos, los potenciales bioeléctricos, y, en general, el carácter vectorial de muchos procesos bioquímicos.

1.3 MEMBRANAS MITOCONDRIALES

Aproximadamente el 20% del volumen celular del hepatocito de rata está ocupado por las mitocondrias (unas 800 por célula) cuya estructura y aspecto al microscopio electrónico varía según la composición del medio de aislamiento (59). Estos orgánulos poseen un alto grado de organización, con dos membranas concéntricas que delimitan dos compartimentos (60): el más exterior es el espacio intermembranar, entre las membranas interna y externa, y el espacio interior es la matriz mitocondrial limitada por la membrana interna (61,62). La matriz, que contiene un 60% de la proteína mitocondrial (63), presenta una estructura organizada, gelatinosa, reticular, relacionada con la superficie interior de la membrana interna, y experimenta enormes cambios de volumen y organización durante la actividad respiratoria (64,64a,65,66).

En determinadas condiciones de hipotonicidad la membrana externa puede separarse del resto de la estructura mitocondrial; el resultado es una vesícula constituida por membrana interna más matriz que se llama "mitoplasto" (67). En esto se fundan las técnicas de aislamiento de membranas interna y externa que pueden separarse posteriormente por

centrifugación, o en gradiente de sacarosa (67,68,69).

El estudio de ambas membranas revela enormes diferencias de composición, estructurales (70) y funcionales (71).

La membrana externa es lisa, algo elástica, con predominio de lípidos (75%) sobre proteínas (25%), de aspecto más homogéneo, de menor densidad, y con distinta composición enzimática que la membrana interna (72).

La membrana mitocondrial interna (M.I.M.) es más rígida y densa que la externa a causa de su composición (80% de proteínas y 20% de lípidos) presentando pliegues internos o invaginaciones proyectados hacia el interior de la matriz llamados "crestas" por Palade (60) que aumentan considerablemente su superficie respecto a la membrana externa. La magnitud de la superficie de la M.I.M. está relacionada con la intensidad respiratoria (65,66).

Las técnicas de microscopía electrónica con tinción negativa de fragmentos de estas crestas, obtenidos por ruptura osmótica de las mitocondrias, revelan la presencia de pequeñas esferas de 9 nm de diámetro sujetas por un corto vástago a la cara interior de la membrana interna. Estas estructuras descritas por Fernández-Morán (73) como "partí

culas elementales" se han identificado posteriormente con el complejo lipoprotéico llamado ATPasa mitocondrial (74).

La M.I.M. contiene unas 100 proteínas diferentes con actividad biológica, incluidas en un sistema de bicapa fosfolipídica. Entre las proteínas de la M.I.M. aisladas se encuentra la ATPasa (75), citocromoxidasa (76,77), succinato deshidrogenasa (78), el citocromo c (79), el inhibidor de ATPasa (80), el F₁ (80) y la OSCP (*) (81). No obstante, según la técnica empleada en la extracción, se obtienen formas diferentes de un enzima debido a la pérdida de alguna subunidad o a cambios en su conformación, por lo que no hay un criterio uniforme sobre pureza y funcionalidad de estas preparaciones (82).

Los experimentos de reconstitución de la M.I.M. a partir de sus componentes aislados, han aportado una valiosa información sobre la naturaleza y ordenación secuencial de algunos de los componentes complejos implicados en los mecanismos del transporte electrónico y de la fosforilación oxidativa, aunque estamos aún lejos de conocer con detalle

(*) OSCP = Oligomycin-sensitivity-conferring protein. (Proteína que confiere sensibilidad a la oligomicina).

su topografía (83,84).

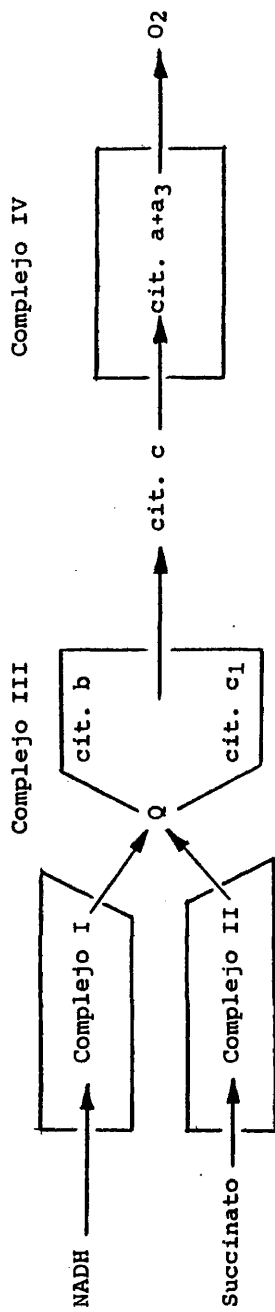
Desde el punto de vista de su funcionalidad las proteínas de la membrana interna pueden dividirse en tres grupos:

- 1.- Sistema de transporte de electrones integrado fundamentalmente por flavoproteínas y citocromos (85).
- 2.- Sistema de transferencia de energía incluidas la ATPasa mitocondrial (86) y proteínas que confieren sensibilidad a la oligomicina (81,87).
- 3.- Otras proteínas tales como transportadores de iones y de nucleótidos.

El sistema de transporte de electrones está compuesto por muchas proteínas con grupos prostéticos como flavinas, hemo, y hierro no hemínico, que con la coenzima Q son oxidados y reducidos en el proceso de transporte electrónico. Esto conlleva cambios específicos en el espectro de absorción de la luz de cada componente, lo que ha facilitado su detección y cuantificación (82).

Hatefi y col. (88), en base a experimentos de recombinación de fragmentos de membrana tras su disociación, propusieron la existencia de cuatro complejos fundamentales en el mecanismo de transporte de electrones en la membrana interna (figura 1).

Figura 1.- Representación esquemática de los cuatro complejos funcionales y su disposición secuencial en la cadena respiratoria (según Hatefi y col.) (82).



Complejo I: NADH : Coenzima Q oxidoreductasa (90)

Complejo II: Succinato : Coenzima Q oxidoreductasa (91)

Complejo III: Coenzima Q : citocromo c oxidoreductasa (92)

Complejo IV: Citocromo c oxidasa (93)

La disposición secuencial de estos complejos en la cadena respiratoria se ha deducido a partir de medidas de los potenciales de oxidoreducción estandar de los diferentes transportadores, así como de experimentos de reconstitución de la cadena a partir de fragmentos recombinados (88), y medidas del espectro diferencial entre las formas oxidadas y reducidas de los transportadores electrónicos en las mitocondrias intactas (89).

El sistema de transferencia de energía está también integrado por muchas proteínas (94). Estas proteínas llamadas factores de acoplamiento ("coupling factors") restauran la fosforilación oxidativa en partículas submitocondriales deficientes (vesículas formadas por fosfolípidos y el sistema de transporte electrónico) acoplando la energía de la corriente de electrones a la fosforilación del ADP (86). Se han descrito varios de estos factores (94,95,96, 97), pero los mejor caracterizados son la ATPasa (86,98) y la OSCP (99).

La llamada ATPasa mitocondrial (100) constituye con toda probabilidad las "partículas elementales" descritas por Fernández-Morán (73,74). Es una proteína con una masa molecular aproximada de 468.000 daltons constituida por tres

partes o sectores:

1) Factor 1 (F₁). - Constituido por una pieza esférica de 9 nm de diámetro con un peso molecular del orden de 360.000 daltons obtenido por técnicas de sedimentación en ultracentrífuga (101,102), e integrado por varias subunidades (81,103). La ATPasa-F₁ liberada de la membrana por ultrasonidos, en presencia de Mg⁺⁺ hidroliza el ATP a ADP y fosfato, reacción que no es inhibida por la oligomicina, y representa la inversión de la función normal de F₁ en las mitocondrias intactas que es la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato. Por ello el factor F₁ debería llamarse con más propiedad ATP sintasa en lugar de ATPasa.

2) OSCP (oligomycin-sensitivity-conferring protein) o F₀. - Es un polipéptido de peso molecular 18.000 (99) que constituye parte del vástago sobre el que se asienta F₁. Este factor hace a F₁ susceptible de ser inhibido por la oligomicina (81), pero para esto necesita también estar unido al proteolípido o pieza basal. OSCP aparece al microscopio electrónico como un cilindro de unos 5 nm de diámetro (99) que a manera de tallo une las esferas F₁ a la pieza basal de la membrana.

3) El proteolípido o pieza basal es esencial para que F_1 presente sensibilidad a la oligomicina, lo que se ha comprobado en experimentos de reconstitución de la actividad ATPasa en membranas mitocondriales desprovistas de F_1 y OSCP (104). Los trabajos de Tzagoloff y col. (105,106, 107) postulan cuatro subunidades para el factor de membrana.

Se ha aislado también una proteína de peso molecular 9.500 que inhibe la actividad ATPasa (80). Recientemente se ha conseguido el aislamiento y caracterización de subunidades inhibitoras de la ATPasa mitocondrial del hepatocito de rata (108). El péptido inhibidor de ATPasa parece formar parte, como subunidad, de F_1 (109).

El papel fundamental de los lípidos en la respiración de tejidos es conocido desde hace 50 años al comprobarse que la adición de fosfolípidos restauraba la actividad respiratoria en tejidos deslipidizados (*) (110,111,112).

La membrana interna mitocondrial se caracteriza por un bajo contenido lipídico (25% en peso), lo que le da una densidad (1,21) mayor que la de la membrana externa (1,12-1,14) (82). El contenido en colesterol es también bajo (menos del 4% de los fosfolípidos), lo que explica su relati-

(*) Véase nota al pie de la página 52.

vamente fácil disociación por las sales biliares. Los fosfolípidos más abundantes son fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina con grupos acilo insaturados en posición C2, lo que les hace muy sensibles a las fosfolipasas y a los agentes líticos que, como el ascorbato, producen la peroxidación de estos ácidos grasos. Destaca el alto contenido en cardiolipina (20% de los fosfolípidos) y fosfatidilinositol (8%), lo que produce una carga negativa neta en la membrana interna.

Los experimentos de reconstitución han demostrado que los fosfolípidos son indispensables en los mecanismos de transporte electrónico (112) y en los de la fosforilación y transporte de H^+ (113), por contribuir al mantenimiento de la conformación original de las proteínas necesaria para su actividad específica (114,115). Por otro lado los lípidos son indispensables en la formación de estructuras vesiculares cerradas, en ausencia de las cuales no se produce la fosforilación (116).

La necesidad de tales vesículas puede comprenderse al considerar la hipótesis del acoplamiento quimiosmótico propuesta por Mitchell (117,118) en la que el transporte de electrones produce un bombeo de iones H^+ a través de la mem

brana mitocondrial interna, lo que origina un gradiente electroquímico que acopla el flujo de energía del transporte electrónico a la formación de ATP a partir de ADP y Pi, mediante una reacción vectorial en la que interviene probablemente el complejo ATPasa F_1-F_0 de la membrana interna.

Esto obliga a considerar una disposición anisotrópica de los componentes de la membrana interna de tal forma que los iones son transportados unidireccionalmente. Esta anisotropía de la membrana interna se ha demostrado por reconstitución de vesículas fosforilantes (100), inactivación inmunológica (119), tinciones específicas con colorantes que no atraviesan la membrana (119), y técnicas de marcaje químico de componentes de la superficie de la membrana (120).

En la mitocondria intacta la NADH-deshidrogenasa y succinato-deshidrogenasa, así como F_1 , se encuentran en la cara interna de la M.I.M., mientras que los citocromos c y c_1 están por la cara externa y los protones son bombeados desde el interior al exterior. Sin embargo las partículas submitocondriales vesiculares obtenidas por sonicación de la M.I.M. están "vueltas del revés" con respecto a la membrana intacta (121). Aquí los citocromos c y c_1 se encuen-

tran hacia el interior de la vesícula, mientras que las NADH y Succinato deshidrogenasas así como F_1 estarán ahora en la cara exterior, por lo que el bombeo de protones será desde el exterior al interior.

La membrana interna mitocondrial es además heterogénea en cuanto a localización de sus componentes. Su desagregación estructural por la acción de agentes líticos como ascorbato y cisteína, o por ultrasonidos, ha sido estudiada desde 1967 por Santiago y colaboradores (122,123,124,125). Las técnicas combinadas de tumefacción, contracción y sonicación han separado partículas submitocondriales que difieren no sólo en cuanto a fosfolípidos, citocromos y actividades enzimáticas (126,127,128,129), sino también en su aspecto al microscopio electrónico. Vázquez y col. (130) han observado la heterogeneidad morfológica de estas membranas.

Un papel importante en la actividad enzimática de ciertas proteínas de la M.I.M. parece que lo desempeñan las asociaciones específicas lípido-proteína, así como el grado de insaturación de los ácidos grasos de los fosfolípidos y su naturaleza. Tal sería el caso de la ATPasa mitocondrial y la cardiolipina según Santiago y col. (131,132).

1.4 DETERGENTES

Los estudios de la estructura y función de las membranas incluyen generalmente experimentos de disociación de los agregados supramoleculares que integran las membranas biológicas.

Los lípidos de membrana se extraen generalmente con disolventes orgánicos. Estos han sido igualmente utilizados para extracción de proteínas, pero con graves inconvenientes ya que provocan a menudo su agregación y desnaturalización.

Para la solubilización parcial y selectiva de proteínas se han utilizado agentes quelantes, modificaciones del pH y la fuerza iónica, urea, guanidina y agentes caotrópicos, así como la digestión enzimática. Sin embargo estos procedimientos generalmente conducen a graves alteraciones y desnaturalización, además de que las proteínas más fuertemente unidas a la matriz lipídica de la membrana no son solubilizadas (133,134).

Los detergentes en general están demostrando ser en este momento los agentes más idóneos para la disociación de membranas con claras ventajas sobre los métodos anterior-

mente citados.

1.4.1 Naturaleza química. Clasificación

Los detergentes constituyen un grupo muy heterogéneo de sustancias cuya característica común es el poseer en su molécula dos zonas, una hidrofílica, y otra lipofílica. Los grupos polares de la zona hidrofílica pueden estar cargados (HPO_4^- , NH_4^+ , SO_4^- , $-\text{COO}^-$) o ser neutros (hidroxilo, carbonilo, éster); estos últimos son menos hidrófilos que los iónicos. La zona apolar, lipofílica, puede contener cadenas alifáticas o anillos aromáticos. Moléculas con esta doble naturaleza hidrófila-lipófila fueron denominadas "an fífilos" por Winsor (135). Las diferencias en el balance relativo entre estas dos zonas se reflejan en su comportamiento en el agua y proporcionan una base para su clasificación (Tabla I) (136).

En efecto: los anfífilos usados en la solubilización de membranas difieren del resto de los lípidos polares en su mayor carácter hidrofílico y por tanto en la mayor solubilidad de su forma monómera en agua. El término "surfac tante" es equivalente al de "anfífilo soluble" (*) mien-

(*) En castellano se conocen como "agentes tensoactivos" a los anfífilos solubles. Por razones prácticas utilizaremos preferentemen te los términos "detergente" y también "surfactante".

TABLA I

PRINCIPALES SURFACTANTES UTILIZADOS EN ESTUDIOS DE BIOMEMBRANAS.

Grupo A. Anfífilos solubles cuya zona hidrofóbica es de naturaleza alifática o arilalifática. Forman micelas por encima de la CMC y cristales líquidos a altas concentraciones.

Detergentes aniónicos

Dodecilsulfato sódico (SDS)

Detergentes catiónicos

Bromuro de cetiltrimetilamonio

Detergentes anfóliticos

Palmitoil-lisolecitina

Detergentes no iónicos

Alkilpolietilenglicoles: "BRIJ", "LUBROL" (Honeywill-Atlas)

Alkilfenilpolietilenglicoles: "TRITON-X", "TRITON N" (Rohm & Haas)

Esteres de ácidos grasos y sorbitano: "Spans" (Honeywill-Atlas)

Esteres de ácidos grasos y derivados polioxietilénicos del sorbitano: "TWENS" (Honeywill-Atlas)

Grupo B. Zona hidrofóbica voluminosa de naturaleza compleja policíclica aromática. Forman micelas por encima de la CMC.

Salas biliares. Colato y desoxicolato sódico.

Saponinas esteroideas. Digitonina.

1
3
9
1

tras que "detergente" debería aplicarse solo a aquellos anfífilos solubles que provocan la solubilización efectiva de los lípidos de la membrana (36).

Los surfactantes en general han encontrado aplicación práctica como humectantes, dispersantes, desfloculantes, emulsificadores, suspensores y solubilizantes (137). Cualquiera de ellos presenta todas estas propiedades en algún grado aunque generalmente predomina una de ellas sobre las demás, lo cual hace que se restrinja el empleo de cada agente a una aplicación determinada. En realidad los dos polos de un surfactante son activos aunque de hecho siempre domina uno de ellos, estableciéndose un equilibrio entre ambas tendencias característico para cada agente tensoactivo.

Griffin (138) ideó una escala arbitraria de valores como medida del balance y "fuerza" relativa entre las dos tendencias, hidrófila y lipófila, de una molécula anfífi-
la: el balance hidrófilo-lipófilo (Hydrophile-Lipophile Balance, HLB) que puede calcularse empíricamente a partir de los índices de saponificación y acidez en el caso de ésteres de ácidos grasos y alcoholes polihidroxilados (137), mientras que para surfactantes cuya porción hidrófila está

formada por grupos oxietilénicos (caso del Triton X-100) el valor $HLB = E/5$, siendo E el % en peso de óxido de etileno en la molécula (139).

En general el valor HLB viene definido por la ecuación:

$$HLB = 0,36 \ln \left(\frac{C_o}{C_w} \right) + 7$$

donde C_o y C_w son respectivamente las concentraciones del surfactante entre la fase oleosa y la fase acuosa de un sistema binario agua/aceite (140). Por encima de $HLB = 10$ y para valores crecientes, la tendencia hidrofílica de la molécula se hace cada vez mayor, mientras que el carácter hidrófobo predomina y se acentúa a medida que el HLB va de creciendo por debajo de 10.

El valor HLB ayuda a predecir la utilidad de un surfactante para un determinado uso condicionando la elección del mismo (141). El poder solubilizante de membranas de un detergente no iónico depende de su valor HLB (142).

Moore y Bell (143) han ideado una clasificación similar del equilibrio hidrófilo-lipófilo asignando a los agentes anfífilos derivados del polioxietileno los llamados in

dices H/L que se calculan por la expresión:

$$H/L = \frac{\text{n}^\circ \text{ de unidades de óxido de etileno}}{\text{n}^\circ \text{ de átomos de carbono de la parte lipófila}} \times 100$$

1.4.2 Propiedades físicas de los detergentes en disolución acuosa

Cuando una sustancia anfifílica se añade al agua, parte de ella se disuelve como monómero y parte forma una monocapa en la interfase aire/agua. Las moléculas de la monocapa están en equilibrio con los monómeros. Cuando la concentración de monómero sobrepasa un valor crítico se forman micelas que son agregados coloidales termodinámicamente estables formados espontáneamente (144). Este valor crítico se conoce como concentración crítica micelar (critical micellar concentration, CMC).

La fuerza que induce a la agregación para formar micelas es hidrofóbica. En el interior de la esfera micelar se encuentran secuestrados los grupos hidrófobos mientras que en la superficie de la micela se encuentran los grupos polares.

La concentración crítica micelar (CMC) depende de la naturaleza del detergente, de la fuerza iónica en el medio y de la temperatura.

La CMC disminuye al aumentar el carácter hidrofóbico del surfactante (145,146) y aumenta con la presencia de dobles enlaces y con la ramificación de las cadenas hidrocarbonadas. Los grupos hidrófilos se oponen a la formación de micelas (145,146,147) por lo que los surfactantes iónicos, a causa de sus grupos hidrófilos cargados, tienen una CMC unas 100 veces mayor que la de los no iónicos.

La formación de micelas se ve favorecida por el contrario al aumentar la fuerza iónica del medio, debido principalmente a la disminución de las repulsiones electrostáticas que impiden la asociación a bajas concentraciones de monómero.

La temperatura influye igualmente sobre la formación de micelas dependiendo de la clase de surfactante: así, temperaturas entre 0° y 37° apenas influyen sobre la CMC de los surfactantes iónicos, mientras que el aumento de temperatura reduce significativamente la CMC en los no iónicos. Las bajas temperaturas pueden formar cristales inso

lubles en los que las zonas hidrófilas e hidrófobas del detergente están ordenadas. La más baja temperatura a la cual se pueden formar micelas se conoce como temperatura crítica micelar (148) y puede determinarse en la práctica por el aclaramiento súbito de una suspensión cristalina turbia de surfactante a concentración crítica micelar cuando se alcanza una temperatura determinada ("punto crítico de Krafft"). Para la mayoría de los anfifilos solubles el punto de Krafft coincide con la temperatura crítica micelar (149). Para los surfactantes no iónicos y las sales biliares la temperatura crítica micelar está por debajo de 0° (149) pero la presencia de impurezas puede producir amplias variaciones como en el caso del dodecilsulfato sódico con oscilaciones desde 10° a 23° (150).

El tamaño y configuración de las micelas depende de la naturaleza del surfactante y de las condiciones del medio. El peso molecular del agregado oscila alrededor de una media (151) por lo que, en la práctica, las micelas de un surfactante pueden considerarse del mismo tamaño. En general los surfactantes no iónicos con bajo valor de CMC forman grandes agregados micelares mientras que los iónicos con altos valores de CMC presentan agregados de bajo peso (152).

Las propiedades físicas de las micelas de los surfactantes del tipo A (tabla I), a bajas concentraciones, así como estudios del volumen y longitud de los grupos hidrófobos y áreas ocupadas por los grupos hidrófilos, indican que la forma de las micelas es de hecho elipsoidal próxima a una esfera (151). Los surfactantes del tipo B (tabla I) difieren en muchos aspectos de los del tipo A; en las sales biliares los grupos polares no se sitúan en un extremo de la molécula como en los surfactantes del tipo A, sino que se distribuyen en diferentes partes de ella. Sin embargo los grupos hidroxilo están todos orientados hacia uno de los lados de la estructura del esqueleto ciclopentano-perhidrofenantrénico, con lo que la molécula presenta una cara polar y otra apolar. En solución acuosa las sales biliares forman pequeños agregados (n° de agregación 8 - 10) interaccionando por sus superficies hidrófobas (149).

El pH apenas afecta a las propiedades micelares de los surfactantes no iónicos o iónicos con grupos ácidos o básicos fuertes. Sin embargo la solubilidad de las sales biliares depende del pH (149) de forma que cuando el pH baja hasta valores próximos al pK_a se forma el ácido que es insoluble en agua.

Estudios recientes parecen demostrar la formación de peróxidos en detergentes no iónicos polioxietilénicos por la acción del aire y la luz. Los productos resultantes pueden interferir con algunas determinaciones analíticas (153).

1.4.3 Solubilización de bicapas lipídicas

Las interacciones entre los detergentes y los lípidos de las membranas han podido estudiarse sobre modelos experimentales de bicapas lipídicas y liposomas (154). Cuando un detergente se añade a una suspensión de liposomas constituidos por fosfolípidos, parte de él interacciona con los lípidos de la bicapa y parte permanece libre en disolución (145,149,151).

Estudios de la permeabilidad de capas lipídicas negras ("black films") en presencia de detergentes (155,156) y de la unión de anfífilos fluorescentes (157) y anestésicos (158) a los liposomas, sugieren que, cuando se añade una pequeña cantidad de detergente a los liposomas, parte de él se incorpora a la estructura de la bicapa sin romperla. Una vez saturada la bicapa, la posterior adición de más detergente provoca la formación de micelas mixtas que esta-

rán saturadas de fosfolípido. Para valores intermedios de la relación detergente/lípido coexisten bicapas saturadas con detergente y micelas saturadas con fosfolípido.

Cuando la cantidad de detergente añadida es suficiente se alcanza el límite de transición de fase y todo el fosfolípido pasará a formar micelas mixtas. Mayores cantidades de detergente elevarán gradualmente el valor de la relación detergente/lípido en las micelas mixtas.

Las micelas mixtas presentan grandes diferencias en tamaño y estructura dependiendo de la sustancia solubilizada, el detergente, y la relación detergente/fosfolípido (159, 160).

Así detergentes no iónicos del tipo A (Tabla I) como el Triton X-100 forman con esfingomiélna micelas mixtas globulares más o menos alargadas según el número de moléculas de detergente y fosfolípido englobadas en la micela (160).

Las sales biliares que son buenos solubilizantes para los fosfolípidos, no son eficaces para el colesterol y moléculas apolares grandes (161). La presencia de fosfolípidos no obstante mejora la solubilización de colesterol por

estos detergentes (161,162) lo que indica una cooperación de la molécula del fosfolípido a la formación de la micela. La estructura molecular del anillo esteroide hace difícil la formación de micelas globulares, por lo que se ha propuesto para las micelas mixtas de sales biliares-lecitinas una estructura cilíndrica formada por una bicapa de lecitina rodeada de las moléculas del detergente biliar (163).

En resumen: cuando se añaden cantidades crecientes de detergente a una suspensión de liposomas preparados con fosfolípidos puros, el proceso de solubilización comprende las siguientes fases:

- 1.- Unión del detergente que se incorpora a la bicapa provocando la alteración de sus propiedades físicas.
- 2.- Transición de fase laminar-micelar cuando la bicapa está saturada de detergente. Se forman micelas mixtas.
- 3.- Después de que la transición de fase se ha completado, la relación detergente/fosfolípido aumenta, y el tamaño de las micelas mixtas disminuye.

Los detergentes del tipo A (Tabla I) harían el efecto

de una "cuña" (164) que presionando sobre la bicapa aumentaría su curvatura induciendo la formación de estructuras globulares mixtas más pequeñas, mientras que los del tipo B actuarían de forma diferente, "cortando" la bicapa en pequeños discos cilíndricos cuya superficie lateral hidrófoba estaría cubierta por las estructuras esteroides de las sales biliares.

La formación y disociación de las micelas es un proceso rápido con una duración inferior a una décima de segundo (165).

1.4.4 Interacciones detergente-proteína

La mayor parte de los estudios sobre interacciones detergente-proteína se han hecho con proteínas hidrosolubles principalmente con seroalbúmina (151).

1.4.4.1 Unión de detergentes a proteínas hidrosolubles

Los detergentes se unen a determinados centros de las proteínas hidrosolubles. La temperatura, el pH, la fuerza iónica y otros factores del medio influyen en esta unión. Las proteínas hidrosolubles ligan a dichos centros con di-

versos grados de afinidad (166,167) las moléculas del detergente en su forma monómera y no en la micelar (168,169) por lo que el número de moléculas de detergente enlazadas a la proteína será mayor por debajo de la CMC. Concentraciones por encima de la CMC no producen aumento apreciable de la cantidad de detergente ligado, lo que significa que la autoagregación de las moléculas de detergente para formar micelas compite con la unión de éste a los centros de unión de la proteína (151,170).

Los estudios de la unión de detergentes con seroalbúmina (168,169,171) demuestran que hay diferentes grados de afinidad en la asociación. Así, moléculas de detergentes aniónicos de cadena larga como el dodecilsulfato sódico (SDS) se unen en mayor número y con mayor afinidad que los detergentes catiónicos, sales biliares o surfactantes no iónicos, lo que es de esperar si se tiene en cuenta que la seroalbúmina funciona como transportador de aniones de ácidos grasos en el sistema circulatorio.

Si la concentración de detergente libre se eleva por encima de la necesaria para saturar los centros de alta afinidad de enlace de la seroalbúmina, se produce la unión del detergente sobre otros centros de la proteína en forma

cooperativa, al mismo tiempo que se producen cambios conformacionales y desnaturalización. La forma de asociación cooperativa del SDS es la misma para toda clase de proteínas, y la cantidad del mismo ligada por gramo de proteína es constante para la mayoría de ellas (172,173). Las proteínas integradas por varias cadenas generalmente se disocian en complejos (174,175) SDS-polipéptido, partículas en forma de varilla cuya longitud es proporcional al peso molecular del polipéptido (176).

Por el contrario, los detergentes no iónicos y las sales biliares han demostrado ser más suaves que los detergentes aniónicos y catiónicos. Tanto el Triton X-100 como el desoxicolato no parecen producir cambios conformacionales ni desnaturalización (168,177,178,179) pero ninguno de los dos son muy efectivos en la disociación de las interacciones proteína-proteína, por lo que muchas proteínas conservan su estructura cuaternaria en presencia de altas concentraciones de estos detergentes (173,179,180,181,182). No obstante algunas proteínas pueden disociarse parcialmente en subunidades.

En general los cambios conformacionales de las proteínas provocados por el enlace de los detergentes a las mis-

mas están condicionados por la longitud y tamaño de la cadena alifática hidrófoba y la carga del grupo hidrófilo de la molécula de surfactante (151,166). En el caso del Triton X-100 o el desoxicolato los grupos apolares son rígidos y voluminosos, lo que dificulta su penetración en las grietas de la superficie de la proteína. Este no sería el caso del SDS que posee una cadena alifática flexible.

1.4.4.2 Unión de detergentes a proteínas de membrana

La interacción de los detergentes con las proteínas de membrana es distinta según el tipo de proteína y su localización en la membrana.

Las proteínas periféricas (27) o extrínsecas están unidas a la membrana por interacciones fundamentalmente polares con proteínas o lípidos de membrana (183), y es de esperar que los detergentes interaccionen con estas proteínas de la misma forma que lo hacen con las proteínas hidrosolubles, aunque no se dispone hasta el momento de mucha información. El citocromo c_1 , que es una proteína periférica, fija el SDS (1,5 g de SDS por g de proteína) con desnaturación (176), mientras que el Triton X-100 no parece que se une al citocromo c (180), y el desoxicolato se une al

citocromo c a razón de 12 moléculas de detergente por cada una de citocromo c (184) probablemente por interacciones e lectrostáticas.

Las proteínas integrales (27) de membrana no son muy hidrosolubles, pero pueden solubilizarse por concentraciones adecuadas de detergente lo que ha proporcionado una ma yor información sobre la unión de detergentes a esta clase de proteínas. La unión del SDS y detergentes catiónicos a proteínas integrales se realiza de forma similar a la de las proteínas hidrosolubles, e igualmente producen desnatu ralización. Por el contrario, detergentes no iónicos derivados del polioxietileno como el Triton X-100 se han utili zado con éxito en la solubilización de proteínas integrales de membrana (134), receptores (38,181,185,186), antígenos de transplante (187,188), glicoproteínas de membranas víricas (182,189) y enzimas ligados a membrana (190,191, 192,193,196) sin pérdida de sus actividades biológicas. Es tos estudios muestran que el Triton X-100 se une en gran cantidad a las proteínas, probablemente a su zona hidrófoba y no a la hidrófila (194).

Los detergentes del tipo B (Tabla I), como las sales bi liares y digitonina, han sido igualmente utilizados en la

solubilización de muchas proteínas de membrana sin pérdida de su actividad biológica (47,133,134,190,195).

1.5 EFFECTO DE LOS DETERGENTES SOBRE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS

En principio cabría suponer que el efecto de los detergentes sobre las biomembranas pudiera ser explicado como una combinación de los datos descritos para los sistemas binarios detergente-lípidos y detergente-proteínas ya estudiados. Sin embargo las membranas biológicas son mezclas extremadamente complejas de lípidos, proteínas, iones, etc., con unas características estructurales muy especiales. Así, los lípidos pueden tener una distribución asimétrica en la bicapa (197) la cual puede presentar regiones en distinto estado físico (cristal líquido, gel, etc.) y con diferente composición lipídica (37). La existencia de cationes divalentes (198) puede alterar sus propiedades. La composición lipídica en las proximidades de las proteínas puede diferir de la del resto de la membrana en tanto que las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas lípido-proteína pueden afectar además al estado de los lípidos (199). Todo esto unido a la presencia en algunas membranas de glúcidos (200),

de proteínas altamente cargadas, de glicoprotéidos (197) o de mallas de proteínas en la superficie de la membrana, afecta la penetración y efectos de los detergentes sobre las membranas (201) y hace su estudio más complejo de lo que cabría esperar para un sistema ternario simple como el formado por detergente-lípido-proteína.

Los efectos de los detergentes sobre las membranas varían según el tipo de surfactante, su concentración, y el valor de la relación detergente/membrana. Pueden producirse desde profundos cambios en las propiedades de las membranas a bajas concentraciones de detergente, hasta efectos drásticos de rotura y desorganización total a altas concentraciones.

1.5.1. Efectos del detergente a bajas concentraciones

Entre otros efectos destacables sobre las propiedades de las membranas sometidas a bajas concentraciones de detergentes se han descrito: desplazamiento o incremento del calcio unido a membrana (158), fluidificación (158) y disminución de la densidad de la membrana (202,203). Las actividades enzimáticas de la membrana pueden igualmente ser modificadas, inhibidas o activadas (83,204) según el deter

gente (205), su concentración, y el tipo de enzima ensayado, aunque es difícil asegurar si los cambios de actividad provienen de la acción directa del surfactante sobre la propia molécula enzimática o de la modificación de las condiciones del entorno que la rodea.

La afinidad de los detergentes por las membranas se ha establecido experimentalmente sobre una gran variedad de concentraciones y en distintos tipos de membranas, como los microsomas de cerebro de rata y las membranas del virus Semliki Forest (SF) (182,202,203). Los centros de alta afinidad para los surfactantes se han puesto de manifiesto utilizando sondas fluorescentes como 1-anilinaftaleno-8-sulfonato (ANS), agentes anestésicos y técnicas de marcaje (157,206).

La alta afinidad de enlace de un detergente a las membranas produce grandes cambios en las propiedades de éstas. Las membranas de eritrocitos experimentan un aumento de su superficie cuando la concentración del surfactante es baja, menor que la CMC. Quizá se deba a este incremento de área el efecto estabilizador de la membrana que producen los surfactantes y ciertos agentes anestésicos a bajas concentraciones contra las lisis osmótica, mecánica y ácida. Así

la clorpromazina (207), el Triton X-100 y el SDS (208) a concentraciones entre $1 \cdot 10^{-5}$ y $6 \cdot 10^{-5}M$ protegen los eritrocitos, pero mayores concentraciones provocan la lisis.

No todos los surfactantes tienen estas propiedades protectoras: así las saponinas, las cuales forman complejos específicos con el colesterol, no estabilizan las membranas de los eritrocitos a ninguna concentración.

Los cambios de la permeabilidad de la membrana a los iones y al agua se producen a concentraciones medias y relativamente altas del surfactante, alrededor de la mitad de la concentración necesaria para la lisis completa. A esta concentración "prelítica" se produce un marcado incremento de la permeabilidad a solutos cargados y neutros pero no a macromoléculas. Cuando las proteínas y otras macromoléculas comienzan a pasar a través de la membrana se produce la lisis.

El mecanismo molecular de la lisis no está del todo aclarado a pesar de las investigaciones al respecto (209, 210). En los eritrocitos, donde el proceso de lisis por surfactantes puede medirse siguiendo la liberación de hemoglobina, se han propuesto cuatro fases (209): (a) adsorción

de monómeros del surfactante, (b) penetración en la membrana donde (c) inducen una alteración en la organización molecular con rotura de la membrana y (d) finalmente la salida de hemoglobina.

1.5.2 Solubilización de membranas

A medida que aumenta la concentración de detergente, una vez sobrepasada la concentración lítica, se produce la unión de cantidades crecientes del mismo a la membrana hasta llegar a una saturación análoga a la producida en bicapas lipídicas, y a partir de ahí comienza la desintegración de la membrana con desaparición de su estructura laminar (155-160) lo que sería equivalente a su "solubilización". Este concepto para membranas es empírico ya que mientras en sistemas lipídicos puros la solubilización se alcanza con la formación de micelas mixtas (159,160), la complejidad del proceso en las membranas obliga a adoptar otros criterios basados en el decrecimiento de la turbidez de una suspensión de membranas, el incremento de material no sedimentable y la desaparición de imágenes laminares continuas en observaciones al microscopio electrónico.

Como en la unión de surfactantes a proteínas, el detergente se une a la membrana en forma de monómero y no como

micela (170,203). La concentración en equilibrio del detergente no unido a membrana se mantiene por debajo de la CMC estando el resto unido a la membrana o a los componentes liberados de la misma (202,203). Es decir que el enlace de monómeros de detergente a las membranas impide la formación de micelas puras del mismo, reduciéndose su concentración por debajo de la CMC en la misma forma que en el caso de bicapas lipídicas y proteínas aisladas (apartados 1.4.3 y 1.4.4).

El grado de solubilización depende de la cantidad de detergente unido o, lo que es equivalente, del valor de la relación detergente enlazado/membrana, que en la práctica se correlaciona con el cociente detergente/membrana, especialmente si la concentración de membrana es relativamente elevada.

El poder solubilizante de un detergente depende de su estructura y propiedades físicas. Los estudios realizados con diversos materiales como mitocondrias (211) microsomas (212) membranas víricas (213) y bacterianas (193) muestran que, en el caso de los detergentes no iónicos, los más efectivos tienen en general un valor HLB comprendido entre 12,5 y 14,5 (para el Triton X-100, HLB = 13,5) aunque la

efectividad de estos surfactantes parece depender además de otros factores como la estructura química de los grupos hidrófobos e hidrófilos (213).

Sobre la estructura de los diversos complejos liberados de las membranas por efecto de los detergentes no se dispone de mucha información, debido a la complejidad de las mezclas solubilizadas y a la carencia de buenos métodos para estudiar los productos intermedios en el proceso de solubilización, especialmente durante la fase de transición. Hay sin embargo pruebas que sugieren que al menos parte de las proteínas de membrana se liberan como complejos detergente-proteína (83,214,215) tras el tratamiento con concentraciones medias de detergentes no iónicos o sales biliares.

1.5.3. Separación de lípidos y proteínas

Cuando la concentración del detergente se eleva por encima de la necesaria para producir la transición de fase se produce la separación de los lípidos y las proteínas. En este momento la concentración de detergente será tal que los lípidos estarán solubilizados en forma de micelas mixtas y las proteínas tendrán saturada su capacidad de

unión con el detergente. La cantidad de detergente necesaria dependerá de su naturaleza y de la composición de la membrana.

La deslipidización (*) puede considerarse como una eliminación progresiva de lípidos de los complejos lipoproteína-detergente formados durante la disgregación de la membrana. Al aumentar la concentración del detergente los lípidos unidos a proteínas son intercambiados por moléculas de detergente (216) y trasladados a micelas mixtas lípido-detergente resultando así la separación de los lípidos y las proteínas.

Los complejos proteína-detergente formados dependen del tipo de surfactante utilizado. Detergentes aniónicos y catiónicos no sólo separan los lípidos de las proteínas sino que inducen cambios conformacionales drásticos. Esto no ocurre generalmente con detergentes no iónicos, como anteriormente se ha dicho (apartado 1.4.4), debido quizá a que en muchos casos el detergente enlazado a la proteína imita al ambiente lipídico que rodea a las proteínas en la membrana, manteniendo su actividad (194,217). No obstante también se han descrito casos de pérdida de actividad biológica

(*) Por analogía con "desproteínización" adoptamos el término "deslipidización" para indicar el proceso de separación o extracción de los lípidos contenidos en una mezcla.

ca en proteínas solubilizadas con detergentes no iónicos (218,219,220).

1.5.4 Efecto sobre las interacciones proteína-proteína

Al igual que las proteínas solubles muchas proteínas de membrana poseen estructura cuaternaria. Las interacciones no covalentes proteína-proteína pueden ser permanentes o reversibles según su función en la membrana.

Entre las proteínas de membrana descritas con estructura oligomérica se pueden citar la ATPasa mitocondrial y la de los cloroplastos (109), los componentes de la cadena de transporte electrónico (221,222), receptores colinérgicos (223,224), la espectrina de las membranas de eritrocitos (37,225) y la colinesterasa (226,227).

Los detergentes suaves son, a menudo, incapaces de romper las interacciones proteína-proteína que presentan ciertos complejos que son solubilizados, deslipidizados y mantenidos en solución como tales, conservando su estructura oligomérica.

Las variaciones de fuerza iónica (134,228), el pH alto (134,193,228), y la presencia de agentes quelantes (229)

en el medio, favorecen en general la eficacia del detergente en la disociación de proteínas, por modificación de las propiedades micelares del surfactante, como la CMC, que disminuye al aumentar la concentración iónica. Por esta razón las sales biliares se emplean frecuentemente en presencia de altas concentraciones de NaCl y KCl (134). En algunos casos se ha observado que la sacarosa aumenta la eficacia de los detergentes no iónicos (230) debido quizá a que la sacarosa liga parte del agua a sus grupos polares con lo que la cantidad real de la misma disponible por el detergente es menor que la teórica y la concentración relativa del surfactante aumenta.

1.5.5 Solubilización selectiva de componentes de membrana

Un fenómeno útil e interesante en el efecto de los detergentes sobre las membranas es la selectividad con que son liberados sus distintos componentes (234-237). La solubilización selectiva es extremadamente valiosa en la purificación de proteínas de membrana y complejos activos de las mismas (83,84,90,93,134,215).

Así han podido separarse los citocromos b, c₁ y c de los a y a₃ en la mitocondria ("Red-Green Separation") (84), los fotosistemas I y II de los cloroplastos (231), la ATPasa dependiente de Na⁺ y K⁺ de los microsomas de médula

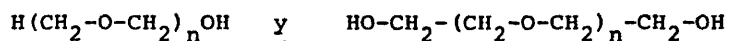
renal de conejo (232), la ATPasa dependiente de Ca^{++} del retículo sarcoplásmico (215) y la citocromoxidasa de la mitocondria (233).

La extracción selectiva de proteínas de membrana se produce por mecanismos complejos y depende de la naturaleza del detergente, de las condiciones del medio, de las manipulaciones previas que hayan sufrido las membranas, etc., por lo que es necesario determinar las condiciones óptimas en orden a la extracción selectiva y purificación de una determinada proteína.

1.6 TRITON X-100

Los surfactantes polioxietilénicos, de amplia aplicación en el campo de la tecnología químico-farmacéutica, se han utilizado igualmente en estudios de disociación y reconstitución de biomembranas (36,84).

Como derivados polietilenglicólicos no se ajustan a una especie química definida. Los polietilenglicoles se forman por polimerización del óxido de etileno o por condensación del glicol, resultando en el proceso productos constituidos por mezclas heterogéneas de distintos grados de polimerización, de fórmula general:



preparados por laboratorios de diversos países bajo nombres patentados. Cada especie comercial está compuesta por mezclas de grado de polimerización muy próximo (238).

Los detergentes patentados con el nombre "TRITON" (Rohm and Haas Company, Independence Mall West, Philadelphia) son derivados *p*-alkilfenílicos de polietilenglicol, distinguiéndose fundamentalmente dos series según el tipo de cadena alquílica unida al anillo aromático: la serie N contiene un radical nonilo no ramificado, mientras que en la serie X es una cadena ramificada simétrica de 1,1,3,3-tetrametilbutilo (*t*-octilo).

Los detergentes de la serie TRITON X son surfactantes no iónicos cuya molécula presenta un polo hidrófobo, el resto *p-t*-octilfenílico, mientras que su porción hidrófila está constituida por un número (*n*) de unidades de oxietileno que oscila entre 1 y 40 según los tipos (Tabla II). Los valores de *n*, HLB, CMC y peso molecular de cada uno deben entenderse como valores medios correspondientes a mezclas de grado de polimerización muy próximo (239,240). El poder solubilizante y los efectos sobre las membranas de estos detergentes dependen entre otros factores de la longitud de la cadena polioxi-etilénica y de los valores HLB y CMC (142, 239).

TABLA II

SURFACTANTES DE LA SERIE TRITON-X (Rohm & Haas)

Surfactantes	n° restos oxietilénicos	valor HLB	Masa molecular media
Triton X-15	1	3,6	250
Triton X-35	3	7,8	338
Triton X-114	7-8	12,4	536
Triton X-100	9-10	13,5	643
Triton X-102	12-13	14,6	756
Triton X-165	16	15,8	910
Triton X-305	30	17,3	1526
Triton X-405	40	17,9	2066

De entre todos ellos el TRITON X-100 es uno de los surfactantes más ampliamente utilizados en los estudios de biomembranas. El grupo *p-t*-octilfenilo constituye su parte apolar, rígida y voluminosa, que interacciona con la zona hidrofóbica de la bicapa lipídica, mientras que la cadena de 9-10 restos polioxietilénicos constituye la zona hidrófila de la molécula (fig. 2).

El Triton X-100 se ha utilizado en la solubilización de membranas de eritrocitos, en la extracción de proteínas integrales, receptores, antígenos, enzimas de membrana, etc. (182,195,197,234-237). Su uso, no obstante, se ha hecho sobre bases empíricas y su mecanismo de acción no está aún aclarado.

Comparado con los detergentes aniónicos y catiónicos el Triton X-100 es un detergente calificado como "suave" por no producir generalmente cambios conformacionales drásticos ni efectos desnaturizantes en las proteínas (168,177-179). La ausencia de carga de su grupo hidrófilo y el volumen y rigidez del grupo hidrófobo dificulta su penetración en las grietas de la superficie de la proteína, por lo que se conserva generalmente la estructura cuaternaria en las proteínas oligoméricas de membrana (178-182), aunque también se han descrito algunos casos de pérdida de actividad (212,218,220) y cambios en su conformación nativa por efecto del detergente (241).

TRITON X-100

4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenoxi-polietilenglicol (n=9-10)

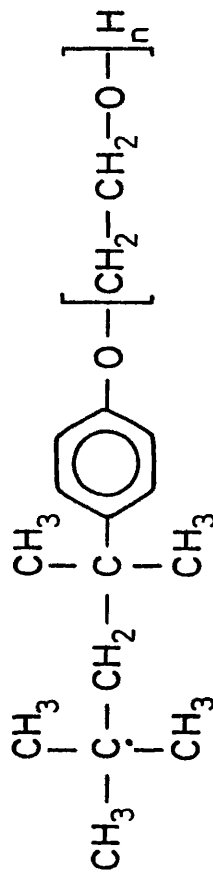


Figura 2

-59-

peso molecular medio	643
peso molecular del agregado micelar	90000
número de agregación	140
concentración crítica micelar (CMC)	0,240 mM
valor HLB (Griffin)	13,5
valor H/L (Moore y Bell)	69,3

1.7 OBJETO DEL TRABAJO

La solubilización de membranas mitocondriales por detergentes no ha sido estudiada sistemáticamente, debido quizá a la complicada arquitectura de las mismas.

El objeto del presente trabajo es estudiar el efecto del Triton X-100 sobre las membranas mitocondriales, con especial atención a la membrana interna, la progresiva alteración de sus estructuras y solubilización selectiva de ciertos componentes en orden a futuros trabajos sobre reconstitución de estas membranas.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 MATERIALES

Animales.- Se utilizan en todos los experimentos ratas

Wistar macho con un peso de unos 200 g, mantenidas en ayunas 15 horas antes de ser sacrificadas a fin de eliminar el glucógeno del hígado.

Reactivos.- Todos los reactivos utilizados son de pureza

analítica. Los disolventes orgánicos, de la firma Merck-Darmstadt. Los reactivos para cromatografía de gases han sido proporcionados por Xpectrix (Barcelona). Los reactivos y sustratos para las determinaciones enzimáticas PEP, PK, LDH son de la firma Boehringer Mannheim; los demás proceden de Sigma (London). Se utiliza agua destilada sobre vidrio y para las técnicas enzimáticas agua bidestilada. El Triton X-100 es de Sigma (London).

Aparatos

Centrífuga SORVALL.

Ultracentrífuga BECKMAN L 3-50.

Fotocolorímetro BAUSCH & LOMB "Spectronic 70".

Espectrofotómetro BECKMAN DBGT de doble haz provisto de expansión de escala y registrador.

Espectrofotómetro UNICAM SP 1800 equipado con accesorio para densitometría.

Espectrofotómetro de absorción atómica ZEISS FMD-4.

Cromatógrafo de gases HEWLETT-PACKARD 5120-A

Microscopio electrónico PHILIPS EM-300.

Ultramicroscopio ULTRATOM III LKB.

2.2 AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS.

Para la obtención de mitocondrias se sigue la técnica de Hogeboom (242,243) ligeramente modificada. Los animales, preparados como se indica en 2.1, se decapitan y desangran. Inmediatamente se extirpa el hígado que se deposita en un vaso de precipitados que contiene sacarosa 0,25M a 4°. En todas las operaciones que siguen se procura mantener en lo posible la temperatura a 4°.

El hígado se exprime entre dos hojas de papel de filtro y se elimina la mayor cantidad posible de tejidos conjuntivo y adiposo. A continuación se parte en pequeños trozos y se transfiere a un homogenizador de vidrio tipo Elvehjem-Potter (244) con pistón de teflón añadiendo un volumen de sacarosa 0,25 M unas ocho veces superior al peso en gramos del hígado. Se procede a su homogenización a 1800 r.p.m.

El homogenado se somete a continuación a centrifugación diferencial. Primeramente a 800xg durante 10 minutos. Se desecha el sedimento, formado por núcleos, hematíes, restos de células, etc.. El sobrenadante decantado se centrifuga dos veces más en las mismas condiciones, eliminando los sedimentos.

El sobrenadante de la tercera centrifugación se somete ahora a una nueva centrifugación, esta vez a 8.500xg durante 10 minutos. Una vez retirado el sobrenadante que contiene la llamada "fracción microsomal", se procede a resuspender el sedimento que contiene las mitocondrias en sacarosa 0,25 M utilizando un volumen mitad del empleado en la homogenización. Se centrifuga de nuevo a 8.500xg durante 10 minutos. El sedimento de esta operación se resuspende y centrifuga de nuevo en las mismas condiciones con lo que finalmente se obtiene un sedimento de mitocondrias "lavadas".

2.3 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE FRACCIONES SUBMITOCONDRIALES

2.3.1. Separación de membranas externas e internas

La separación de membranas mitocondriales se hace siguiendo la técnica de Parsons y col. (67) con algunas modificaciones.

Este método se basa en los cambios de volumen que experimentan las mitocondrias al suspenderlas en un medio de menor osmolaridad. La entrada de agua origina la rotura de la membrana externa, pudiendo separarse de la interna por centrifugación diferencial a causa de su diferente densidad (82), procediendo posteriormente a su respectiva purifica-

ción en gradiente de sacarosa (68).

La técnica de Parsons comprende los siguientes pasos:

a.- Tumefacción de la mitocondria: el sedimento de mitocondrias lavadas, obtenido como se describe en el apartado 2.1, se resuspende en tampón fosfato 0,02 M, pH 7,4, que contiene seroalbúmina bovina al 0,02%. El volumen en mililitros es dos veces el peso del hígado en gramos. Se mantienen así durante 20 minutos a 4°, centrifugando a continuación a 35.000xg durante 20 minutos. En el sobrenadante quedan el espacio intermembrana y parte de la matriz mitocondrial, y en el sedimento las membranas internas y externas.

b.- Centrifugación diferencial: para separar ambas membranas el sedimento se resuspende en un volumen de tampón fosfato 0,02 M, pH 7,4, con seroalbúmina igual al anteriormente empleado, y se centrifuga a 1.900xg durante 15 minutos. En el sobrenadante quedan las membranas externas y en el sedimento las internas.

A continuación y sobre el sedimento de membranas internas se realizan dos lavados. Primer lavado: las membranas se resuspenden en el tampón fosfato antes mencionado y se centrifugan a 1.900xg durante 15 minutos desechando el so-

brenadante. Segundo lavado: el sedimento se resuspende en sacarosa 0,25 M y se centrifuga a 8.500xg durante 10 minutos. El sedimento de esta última operación se somete a continuación a una purificación en gradiente de sacarosa.

2.3.2 Purificación de membranas internas

Las preparaciones de membrana interna obtenida por el método de Parsons (mitoplastos) encierran aún gran parte de la matriz mitocondrial y contienen una ligera contaminación de membrana externa. Esto se prueba mediante la determinación de la actividad de enzimas marcadores como malato deshidrogenasa para la matriz, y NADH: citocromo c reductasa insensible a la rotenona para la membrana externa (69).

Con objeto de eliminar estas contaminaciones el sedimento de mitoplastos (membrana interna más matriz), obtenido como se indica en 2.2.1, se purifica por centrifugación en un gradiente de sacarosa formado por:

- I.- 5 ml sacarosa 1,32 M
- II.- 2,5 ml sacarosa 0,76 M
- III.- Mitoplastos resuspendidos en 4 ml de sacarosa 0,25 M.

Se centrifuga a continuación a 100.000xg durante 60 minutos al cabo de los cuales se obtiene una banda entre I y II constituida por membranas externas y fragmentos de membrana interna, una fracción soluble formada por la matriz

mitocondrial, y un sedimento de membranas internas.

En este sedimento se determinan actividades enzimáticas hallándose las de los enzimas característicos de membrana interna. No se aprecia apenas actividad NADH: citocromo c reductasa insensible a rotenona, y se detecta solamente parte de la actividad malato deshidrogenasa.

A fin de lograr un mayor grado de pureza, el sedimento de membranas internas, procedente de la centrifugación en gradiente, se resuspende en sacarosa 0,25 M tamponada con Tris-HCl 0,02 M a pH 7,4 (tampón Tris-sacarosa) y se somete a una nueva centrifugación a 150.000xg durante 60 minutos.

El sedimento así obtenido constituye la preparación de membrana interna sobre la que se verifican los ensayos.

2.3.3 Purificación de membranas externas

El sobrenadante de la primera centrifugación a 1.900xg, que contiene las membranas externas después de realizada la tumefacción mitocondrial (según se trata en 2.2.1), se centrifuga a 20.000xg durante 20 minutos. El sedimento de membranas externas obtenido se resuspende en tampón fosfato 0,02 M a pH 7,4, y se purifica en gradiente de sacarosa disponiendo cuatro capas en un tubo de centrifuga como sigue:

- I.- 3 ml sacarosa 51,3% (d = 1,192).
- II.- 3 ml sacarosa 37,7% (d = 1,142).
- III.- 3 ml sacarosa 25,2% (d = 1,094).
- IV.- 1 ml suspensión de membranas externas en tampón fosfato.

Se centrifugan los tubos a 100.000xg durante una hora al cabo de la cual se observan un sedimento y tres bandas situadas en las interfases entre las capas. En la interfase entre IV y III están presentes lípidos, proteínas y pequeños fragmentos de membranas externas. Entre III y II se localizan las membranas externas purificadas, mientras que entre II y I se sitúan membranas internas junto con restos de membrana externa. El sedimento está formado por membranas internas.

La fase de membranas externas de todos los tubos se retira con una pipeta Pasteur reuniéndolas y centrifugando a 150.000xg durante 60 minutos. Se obtiene así el sedimento de membrana externa purificada.

2.4 TRATAMIENTO DE LAS MEMBRANAS CON DIVERSOS AGENTES

2.4.1 Detergente

El sedimento de membranas purificadas según las técnicas descritas en el apartado anterior (2.3) se resuspende

en la cantidad apropiada de sacarosa 0,25 M tamponada con Tris-HCl 0,02 M a pH 7,4 (tampón Tris-sacarosa) para obtener una suspensión de concentración protéica conocida. De esta suspensión de membranas se toman alícuotas de 1 ml que se transfieren a tubos a los que se añade la cantidad adecuada de detergente a fin de que las concentraciones finales del mismo en las suspensiones de membranas abarquen un rango entre 0,1% y 2% (p/v).

Después de mezclar se incuban a 20° durante 30 minutos, al cabo de los cuales se centrifugan los tubos a 150.000 x g durante una hora a 4°. En estas condiciones consideramos solubilizada a la fracción de membrana no sedimentada contenida en el sobrenadante después de esta centrifugación.

2.4.2 Fuerza iónica. Temperatura. EDTA.

Para conocer el efecto solubilizante en otras condiciones se someten las suspensiones de membranas a la acción de disoluciones salinas de NaCl y CaCl₂, ambas a concentraciones finales de 50 mM y 100 mM. También se tratan otras alícuotas de la suspensión de membranas con EDTA a concentración final 1 mM. Además se ensaya el efecto de cada uno de los reactivos citados en presencia de Triton X-100 al 0,5% (p/v).

Las suspensiones de membranas así tratadas se incuban a 20° durante 30 minutos.

Ajustando por otra parte la temperatura durante los 30 minutos de incubación, a 4° y 37°, en presencia o ausencia de detergente, se detecta el efecto de esta variable sobre la solubilización de membranas.

En todos los casos, y transcurridos los 30 minutos de incubación en distintas condiciones, la suspensión de membranas se centrifuga durante una hora a 150.000xg, estimando como solubilizada la fracción de membrana no sedimentada contenida en el sobrenadante.

2.5 DETERMINACION DE PROTEINAS

Se ha seguido en esencia el método propuesto por Lowry y col. (245) modificado en orden a evitar las interferencias que se producen en el análisis de muestras que contienen de tergentes no iónicos y catiónicos (246).

El método de Lowry, más sensible que el biuret pues detecta cantidades de proteína del orden de 10 μ g, está basado en la formación de un derivado azul al reaccionar el reactivo de Folin-Ciocalteu (247) con algunos aminoácidos aromáticos.

Se describe primeramente el método que puede utilizarse cuando las muestras no contienen detergente:

Reactivos

- 1.- Solución S: Patrón de seroalbúmina bovina de 100 µg/ml en agua destilada.
- 2.- Reactivo A: Na₂CO₃ al 2% en NaOH 0,1 N.
- 3.- Reactivo B: CuSO₄·5H₂O al 0,5% en tartrato sódico potásico al 1%.
- 4.- Reactivo Folin-Ciocalteu (247) diluido 1:3 con agua destilada.

El procedimiento para la construcción de la curva de calibrado se esquematiza a continuación:

	Patrón				Muestra	
	Blanco	1	2	3	4	suspensión proteínas
Solución S (ml.)	-	0,25	0,50	0,75	1	x ml.
Agua bidestilada a todos los tubos hasta volumen final de 1 ml.						
Reactivo C (ml) mezcla A/B (50:1)	5	5	5	5	5	5
mezclar y esperar 15 minutos						
React. Folin-Ciocalteu.	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Se mezclan bien y se leen a los 40 minutos a una longitud de onda de 750 nm. en un espectrofotómetro Bausch & Lomb "Spectronic - 70".

Modificación del método según Wang y Smith

La técnica de Lowry presenta serias limitaciones si se quieren determinar proteínas en presencia de detergentes no iónicos como es el Triton X-100 el cual forma un precipitado con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

En 1975 Wang y Smith (246) propusieron una modificación en la que se utiliza una disolución de dodecilsulfato sódico (SDS) al 10%. El SDS no afecta la formación de color en el procedimiento de Lowry (246a) e impide la formación del precipitado al interaccionar el Triton X-100 y el reactivo Folin-Ciocalteu. Por su parte el Triton X-100 no desarrolla color hasta concentraciones del 2% (v/v).

Se procede a la construcción de una curva de calibrado con solución patrón (S) de seroalbúmina bovina en presencia de Triton X-100 según el siguiente esquema:

	Patrón				Muestra		
	Blanco	1	2	3	4	suspensión proteínas	
Solución S (ml.)	-	0,25	0,50	0,75	1	x ml.	
Triton X-100 (5%)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	
Agua bidestilada a todos los tubos hasta volumen final de 1,1 ml							
Reactivo C	5	5	5	5	5	5	
		mezclar y esperar 15 minutos					
SDS al 10%	1	1	1	1	1	1	
React. Folin	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	

Se mezclan bien y se leen a los 40 minutos a 750 nm.

2.6 EXTRACCION DE LIPIDOS

Se han seguido dos métodos según se trate de membranas o de sobrenadantes.

2.6.1 Extracción de lípidos de membranas y sedimentos.

Método de Folch (248) modificado por Santiago y col. (249). Las membranas resuspendidas en tampón Tris-sacarosa se tratan con un volumen igual de HClO_4 0,6 N agitando con una varilla y a continuación se centrifugan durante 15 minutos a 4.000 r.p.m. Al sedimento obtenido se agregan 2,5 ml de la mezcla cloroformo-metanol-HCl concentrado 200:100:1, dejándola actuar durante media hora a temperatura ambiente, agitando de vez en cuando con varilla de vidrio. Se añaden 6 ml de HCl 0,1 N y se centrifuga a 4.000 r.p.m. durante 20 minutos al cabo de los cuales se separan 3 fases:

- a.- Fase superior acuosa formada por HCl-metanol-agua y sustancias hidrosolubles.
- b.- Fase intermedia, formando interfase entre la superior y la inferior, conteniendo proteínas precipitadas.
- c.- Fase inferior clorofórmica con los lípidos disueltos.

Se desecha la fase acuosa extrayéndola con una pipeta Pasteur, y se decanta la fase clorofórmica que se conserva

a -20° hasta su utilización. Las proteínas precipitadas se vuelven a extraer del mismo modo para agotar los lípidos y la fase clorofórmica de esta segunda extracción se junta con la primera.

2.6.2 Extracción de lípidos de sobrenadantes.

Para la extracción de lípidos de los sobrenadantes, que contienen la fracción de membranas solubilizada según las condiciones descritas anteriormente en 2.4, utilizamos la técnica de Folch y col. (250).

De los sobrenadantes se toman alícuotas de 0,2 ml y se añaden 3 ml de la mezcla cloroformo-metanol-HCl 0,1 N. (200:100:1) que se deja actuar durante media hora, agitando de vez en cuando, para añadir a continuación 0,4 ml de agua destilada con lo que se consigue la proporción propuesta por Folch. Se agita vigorosamente y se centrifuga a 4.000 r.p.m. durante 15 minutos separándose dos fases en el tubo:

- a.- Fase superior, acuosa, con sustancias hidrosolubles.
- b.- Fase inferior, clorofórmica, con los lípidos disueltos.

Se extrae la fase acuosa con una pipeta Pasteur. Los lípidos quedan en la fase clorofórmica.

2.7 DETERMINACION DE FOSFORO LIPIDICO

Se determina el fósforo lipídico siguiendo la técnica de Bartlett (251) modificada, que se fundamenta en el procedimiento clásico de Fiske y Subbarow (252): el fosfato inorgánico reacciona en medio ácido con el molibdato originando el anión fosfomolibdato, el cual es reducido con 1-amino-2-naftol-4 sulfonato con formación estequiométrica de un complejo coloreado azul.

Para el análisis de fósforo lipídico procedente de la extracción de lípidos de sobrenadantes, de membranas o de sedimentos, se precisa la conversión previa del fósforo orgánico en fosfato inorgánico mediante la digestión de la muestra con HClO_4 a 200° en las condiciones que se señalan más adelante.

Reactivos

- 1.- Solución patrón (P) de ortofosfato disódico equivalente a $10 \mu\text{g}$ de fósforo por mililitro.
- 2.- Molibdato amónico al 5% (p/v).
- 3.- Acido perclórico del 70% (p/v).
- 4.- Reactivo de Fiske. Composición por cada 500 ml: ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico 1,25 g ; sulfito sódico 2,5 g ; bisulfito sódico 75 g ; agua destilada, c.s.p. 500 ml. Añádanse proporciones de la disolu-

ción sulfito/bisulfito sobre el ácido aminonaftolsulfónico en mortero, triturando hasta su completa disolución en el total de 500 ml . Filtrar y dejar 12 horas en nevera; aparece un pequeño depósito de cristales en el fondo de la disolución. Conservar a 4° al abrigo de la luz.

Digestión de la muestra con ácido perclórico al 70%.

El HClO₄ a reflujo oxida los fosfolípidos con desprendimiento cuantitativo de fosfato inorgánico. El extracto lipídico clorofórmico o una parte alícuota del mismo, procedente de la extracción de sobrenadantes, membranas, o de manchas lipídicas de placas cromatográficas, debe evaporarse a sequedad antes de añadir el HClO₄ (!peligro de explosión!).

Para muestras conteniendo 0,5 a 10 µg de fósforo se añaden 1,2 ml de HClO₄ 70% a cada tubo y se mantienen durante una hora a 200° en baño de arena o en estufa en el interior de una vitrina con salida de gases, tomando las debidas precauciones en orden a evitar la explosión. Los tubos se tapan con bolas de vidrio y se introducen en la estufa cuando todavía está fría. Al cabo de una hora de digestión a 200° (no debe sobrepasarse ni disminuirse esta temperatura) se apaga la estufa dejándola enfriar antes de sacar los tubos.

Para la determinación colorimétrica procedemos de acuerdo con el siguiente esquema:

	Patrón					Muestra evaporada
	Blanco	1	2	3	4	
Solución P (ml)	-	0,2	0,4	0,6	0,8	x
Molibdato (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
HClO ₄ , 70% (ml)	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2

Se digiere el contenido de los tubos a 200°, una hora, en la forma indicada anteriormente. Se dejan enfriar, añadiendo seguidamente a cada tubo 0,4 ml de molibdato 5% y otros 0,4 ml del reactivo Fiske. Se añade agua bidestilada hasta completar un volumen final de 10 ml en todos los tubos mezclando bien por inversión. Los tubos, tapados con bolas de vidrio, se calientan en baño maría hirviente 15 minutos durante los que se desarrolla el color. Se dejan enfriar, reponiendo con agua si es preciso el volumen perdido por evaporación y se lee su absorbancia a 830 nm en un espectrofotómetro Bausch & Lomb "Spectronic - 70".

2.8 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE FOSFOLIPIDOS.

Se sigue la técnica de Neskovick y Kostic (253).

Se preparan placas de Silicagel H de 250 micras de espesor que se activan a 130° en estufa durante media hora.

El extracto lipídico clorofórmico se evapora a sequedad y se redisuelve en 0,1 ml de mezcla cloroformo-metanol (2:1) constituyendo ésta la muestra que se aplica sobre la placa en bandas finas de unos 3 cm de longitud, a dos centímetros del borde inferior de la placa. La cantidad depositada debe contener un equivalente de extracto correspondiente a unos 90 μ g de fósforo.

Las placas se someten a dos desarrollos consecutivos en la misma dirección, el primero con cloroformo-metanol-amoníaco 65%-agua (140:50:7:3) y el segundo con cloroformo-metanol-ácido acético-agua (160:20:4:1,5) secando bien la placa entre uno y otro.

Las placas se revelan en cámara saturada de vapores de yodo identificándose las manchas de fosfolípidos por sus Rf y utilizando patrones conocidos.

2.8.1 Determinación cuantitativa de fosfolípidos.

Se recuperan cuantitativamente los fosfolípidos separados en la cromatografía recogiendo el silicagel correspondiente a cada una de las manchas mediante raspado de las placas con una pequeña espátula. Se introduce en tubos de centrifuga de vidrio y se procede a determinar el fósforo total en cada tubo previa digestión con HClO_4 como se ha descrito en 2.7.

2.9 CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO DE ACIDOS GRASOS DE FOSFOLIPIDOS

Se toma una parte alícuota del extracto lipídico obtenido como se ha descrito anteriormente, o bien cada una de las manchas raspadas de la placa cromatográfica.

El extracto se evapora a sequedad. Los fosfolípidos se transesterifican para el análisis de los ácidos grasos de cada componente.

2.9.1 Transesterificación de ácidos grasos.

Las muestras se tratan con 1,5 ml de trifluoruro de boro-metanol al 14% p/v (254) durante dos minutos a 70°. Se añaden después 2 ml de heptano y 1 ml de agua por dos veces consecutivas, extrayendo las fases orgánicas que se deshidratan con Na₂SO₄ anhidro y se evaporan a sequedad, para ser finalmente disueltas en un volumen mínimo de hexano para la cromatografía.

2.9.2 Cromatografía gas-líquido de ésteres metílicos de ácidos grasos.

Se realiza en un cromatógrafo HEWLETT-PACKARD modelo 5120-A, con un sistema dual de columnas de adipato de polietilenglicol al 10% en Chromosorb G (AV), malla 80/100, de una longitud de dos metros y un diámetro de 1/8 de pulgada, en acero inoxidable, y un detector de ionización de llama. Gas portador: nitrógeno; temperatura de la columna: 180°, sin

programación. Las presiones y flujos de los gases se ajustan respectivamente a 6 Kg/cm² y 20 ml/min para el nitrógeno; 1,2 Kg/cm² y 30 ml/min para el hidrógeno, y 2 Kg/cm² y 240 ml/min para el aire.

La identificación se lleva a cabo por comparación con sustancias patrones. La cuantificación se realiza por triangulación de los picos.

2.10 ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

Método de Fairbanks y col. (255) ligeramente modificado. Fórmulas para las soluciones madres, soluciones reguladoras y geles.

A.- Soluciones madres

1.- Con Ac BIS

Acrilamida	40 g
BIS	1,5 g
H ₂ O bidestilada, c.s.p.	100 ml

2.- Solución reguladora 10 x (pH 7,4)

Tris 1,0 M	40 ml
Acetato sódico 2,0 M	10 ml
EDTA 0,2 M	10 ml
Acido acético hasta pH 7,4	
H ₂ O bidestilada, c.s.p.	200 ml

3.- Solución SDS 20% (p/p)

4.- Persulfato amónico 1,5%(p/p)

5.- TEMED 0,5%

B.- Solución reguladora para electroforesis

Solución reguladora 10 x	100 ml
SDS 20%	50 ml
Agua bidestilada	850 ml

C.- Geles (por 10 ml. de solución 5,6% en acrilamida)

Sol. AcBIS	1,4 ml
Solución reguladora 10 x	1,0 ml
SDS 20%	0,5 ml
Agua bidestilada	5,6 ml
Persulfato amónico 1,5%	1,0 ml
TEMED 0,5%	0,5 ml

Abreviaturas: SDS = dodecilsulfato sódico

BIS = N,N'-Metilenbisacrilamida

TEMED = N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina

Para la preparación de los geles se mezclan las soluciones madres concentradas en el orden y proporciones que se indican y se añaden a tubos de vidrio de 9 cm de largo por 0,5 cm de diámetro interno lavados previamente con mezcla crómica. Se rellenan hasta una altura de 8 cm previamente marcada.

A cada columna se añade a continuación, cuidadosamente para que no se mezcle con la solución que ha de gelificar, unas gotas de otra solución al 0,1 % de SDS, 0,15 % en persulfato amónico y 0,05 % en TEMED, para que la superficie del gel quede plana. Después de la gelificación a temperatura ambiente (unos 45 minutos) se quita la solución de recu-

brimiento y se reemplaza por solución reguladora de electroforesis. Se deja así en reposo al menos 12 horas.

Las suspensiones de membranas y los sobrenadantes (2 a 5 mg de proteína por mililitro) se preparan para la electroforesis añadiendo las siguientes sustancias hasta las concentraciones finales indicadas: SDS 1%, Tris-HCl 0,04 M, EDTA 10 mM, 2-mercaptoetanol al 1% y glicerol al 20% (pH 7,4).

Las soluciones ya claras y transparentes se incuban 30 minutos a 40°C para reducir por medio del 2-mercaptoetanol los puentes disulfuro.

Las muestras se depositan sobre los geles, cubiertos con solución reguladora de electroforesis, suavemente. Al estar las proteínas solubilizadas en un medio denso de sacarosa 0,25 M, no se mezclan con la solución reguladora al ser depositadas. Sobre las muestras se añade una traza de azul de bromofenol al 0,01% para seguir la migración del frente.

La electroforesis se lleva a cabo con una corriente de 8 mA/gel y un voltaje de 100 voltios. El tiempo necesario para que el frente electroforético llegue hasta unos 0,5 cm del borde inferior del gel es de 90 minutos.

Los geles se tiñen con azul de Coomassie. Para ello se introducen en tubos agujereados suspendidos en un vaso en

el que se van colocando las soluciones siguientes:

- 1°: isopropanol al 25%; ácido acético 10%; y 0,05% de azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250), durante 12 horas.
- 2°: isopropanol al 10%; ácido acético al 10%; y azul de Coomassie al 0,003% durante 6 a 9 horas.
- 3°: ácido acético al 10% con azul de Coomassie al 0,002% durante 12 horas.
- 4°: ácido acético al 10% durante varias horas hasta que las bandas aparecen nítidas.

La mayoría de las bandas se distinguen ya en la tercera etapa, es decir, unas 24 horas después de la electroforesis.

Los geles se guardan en tubos que contienen ácido acético al 10% y así se fotografían.

Los geles cilíndricos se leen a 550 nm en un espectrofotómetro Unicam SP 1800 equipado con accesorio para densitometría.

2.11 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION

2.11.1 Fijación

El sedimento obtenido después del tratamiento de las suspensiones de membranas con las distintas concentraciones de Triton X-100 y posterior centrifugación según se indica

en 2.4.1, se somete a una fijación en dos etapas:

Primera fijación: Se desecha el sobrenadante y se añade sobre el sedimento en el mismo tubo de centrífuga una solución de glutaraldehído neutro al 2,5% en sacarosa 0,25 M tamponada con Tris-HCl 0,02 M, pH 7,4. Los sedimentos de un espesor no superior a 2 mm se mantienen en esta solución fijadora durante 2 horas al cabo de las cuales se despegan los sedimentos del fondo del tubo, renovando la solución fijadora que se deja actuar durante otras dos horas.

Segunda fijación: Se trocean los sedimentos en fragmentos de aproximadamente 1 mm³ y se lavan durante 24 horas en el tampón Tris-sacarosa. A continuación se sumergen los trozos en una disolución de tetróxido de osmio (OsO₄) al 1% en tampón Tris-sacarosa durante 2 horas.

2.11.2 Deshidratación

Antes de proceder a la inclusión es preciso eliminar el agua lo que se consigue tratando los trozos con soluciones acuosas de acetona en concentraciones crecientes y con los tiempos siguientes:

- 1.- Acetona 30%: 15 minutos
- 2.- Acetona 50%: 30 minutos
- 3.- Acetona 70% + acetato de uranilo 1%: 30 minutos
- 4.- Acetona 90%: 30 minutos
- 5.- Acetona 100%: 30 minutos, con un cambio.

2.11.3 Impregnación

Los trozos se someten a la acción del óxido de propileno durante 30 minutos como paso previo al tratamiento con resinas que se realiza en dos etapas, una de impregnación a temperatura ambiente durante 12 horas y otra de inclusión en la misma mezcla de resina a 60° durante 48 horas.

Composición de la resina.- Los productos, de la serie Durcupan-ACM (Fluka), se mezclan en las siguientes proporciones:

Araldita CY-212.....	10,0 ml
Endurecedor HY-964.....	10,0 ml
Catalizador DY-064.....	0,4 ml
Plastificante (dibutil-ftalato).....	0,4 ml

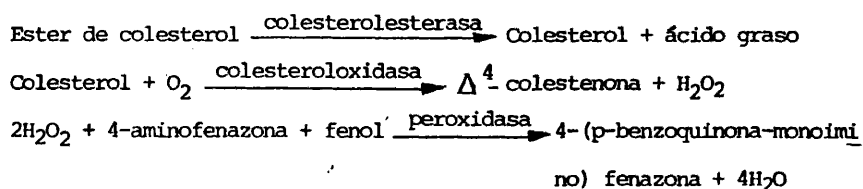
Una vez polimerizada la resina se obtienen secciones mediante un Ultratom III LKB en tonalidades interferenciales de color plata.

Los cortes convenientemente contrastados con citrato de plomo según Reynolds (256) se observan en un Philips EM-300 a 80 kV de aceleración. Las imágenes fotográficas se toman sobre placas "Scientia" (Agfa-Gevaert).

2.12 DETERMINACION DE COLESTEROL

Seguimos un método colorimétrico-enzimático cuyo funda-

mento es el siguiente (257,258):



Se utiliza el equipo de reactivos que para esta técnica ha sido estandarizado por Boehringer Mannheim (Test -Combination. Colesterol. Método "CHOD-PAP", N° 172626).

2.13 DETERMINACION DE HIERRO

El hierro se determina en un espectrómetro de absorción atómica Zeiss modelo FMD-4 equipado con microprocesador, previa calibración del aparato con soluciones estandar de cloruro férrico.

2.14 DETERMINACION DE FLAVINAS

Se determinan flavinas totales siguiendo el método de Chance (259). Se funda en la medida de la diferencia de absorbancias entre su estado oxidado y reducido a 465 y 510 nm. En su forma oxidada las flavinas presentan amplias bandas de absorción con máximos en las proximidades de 370 y 460 nm. Por reducción química o enzimática se decoloran con pérdida de la banda de absorción a 460 nm.

Se colocan 0,5 ml de muestra, conteniendo 4 a 5 mg de proteína por ml, en una cubeta y se añaden 0,4 ml de tampón fosfato 0,1 M pH 7,4, y 0,1 ml de desoxicolato sódico al 10% (p/v). Como agente reductor se utiliza el ditionito sódico, añadiendo una pequeña cantidad en forma sólida a la cubeta.

El coeficiente de extinción de las flavinas es $11 \cdot 10^3 M^{-1} cm^{-1}$ (82).

2.15 DETERMINACION DE CITOCROMOS a, b, c₁, c

Se ha seguido fundamentalmente el método espectrofotométrico propuesto originalmente por Chance en 1952 (260, 261) y modificado posteriormente por Williams (89) que desarrolló un método para la estimación cuantitativa de los cuatro citocromos con ayuda de cuatro ecuaciones simultáneas y cuatro pares de longitudes de onda aplicados al espectro diferencial entre las formas oxidadas y reducidas de los citocromos.

Se utilizan dos cubetas y en cada una de ellas se introducen 0,5 ml de la suspensión o muestra a analizar (con un contenido de 4 a 5 mg de proteína por ml.) 0,2 ml de tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 y 0,2 ml de desoxicolato sódico 10%. A la cubeta A se agregan 0,1 ml de ferricianuro potásico 0,05 M, y a la cubeta B se agregan 0,1 ml de

una disolución acuosa recientemente preparada de ascorbato sódico 0,05 M. Después de agitar por inversión las cubetas, y pasado un minuto, se añade a la cubeta B una pequeña cantidad de ditonito sódico. Se agita de nuevo y se espera dos minutos.

Se registra gráficamente el espectro diferencial de la cubeta B (reducida) frente a la A (oxidada) entre las longitudes de onda 500 a 650 nm. Se utiliza para ello un espectrofotómetro de doble haz provisto de expansión de escala y registrador.

Para calcular las concentraciones de los cuatro citocromos se determinan previamente los siguientes factores:

$$\begin{aligned} a_{15} &= A_{550} - A_{535} \\ a_{25} &= A_{554} - A_{540} \\ a_{35} &= A_{563} - A_{577} \\ a_{45} &= A_{605} - A_{630} \end{aligned} \quad \begin{array}{l} \text{Siendo A los valores de la absor-} \\ \text{bancia a la longitud de onda que} \\ \text{indican sus subíndices.} \end{array}$$

$$b_{15} = a_{15}/21$$

$$c_{25} = (a_{25} - 6,51 b_{15})/15,6$$

$$d_{35} = (a_{35} + 1,16 b_{15} - 1,48 c_{25})/13,8$$

$$e_{45} = (a_{45} + 0,22 b_{15} + 0,482 c_{25} - 0,076 d_{35})/12$$

$$x_4 = c_{45}$$

$$x_3 = d_{35} + 0,0263 x_4$$

$$x_2 = c_{25} - 0,0484 x_4 - 0,225 x_3$$

$$x_1 = b_{15} - 0,03 x_4 + 0,149 x_3 - 0,491 x_2$$

Los valores de X_4 , X_3 , X_2 y X_1 , son las concentraciones de los citocromos a, b, c₁ y c, respectivamente, expresadas en μ moles/ml.

2.16 EXTRACCION Y DETERMINACION DE UBIQUINONA

Se han descrito métodos de aislamiento y purificación de ubiquinonas en gran escala a partir de tejidos y bacterias. El que utilizamos aquí, aplicable a mitocondrias y a preparaciones de membranas es el propuesto por Redfearn (262) basado en el hecho de que la ubiquinona puede ser extraída selectivamente por disolventes orgánicos y detectada por los espectros de absorción característicos de sus formas oxidada y reducida.

Reactivos: Etanol espectroscópicamente puro

Eter de petróleo de bajo punto de ebullición

Metanol

Borohidruro sódico

Una porción de la preparación a ensayar conteniendo 10-20 mg de proteína se coloca en un tubo de vidrio de unos 15 ml con tapón de vidrio. Se añaden rápidamente 4 ml de metanol enfriado previamente a -20° , e inmediatamente después 5 ml de éter de petróleo. Se tapa el tubo con tapón de vidrio (no debe ser de otro material) y agita vigorosamente durante 1 minuto. Se centrifuga a 3.000 r.p.m. 5 minu-

tos para separar las fases.

Se transfiere la fase superior con una pipeta Pasteur a un tubo o matraz acoplable a un rotavapor. El residuo se extrae de nuevo con otros 3 ml de éter de petróleo y se procede del mismo modo a agitar, centrifugar y separar la fase superior, que reunida con la procedente de la primera extracción se evaporan en un rotavapor y el residuo se redissuelve en 3 ml de etanol para espectroscopía.

Se determina a continuación el espectro de absorción de la ubiquinona en solución etanólica entre 230 y 320 nm. La presencia de ubiquinona se detecta por un máximo característico a 275 nm. Se reduce seguidamente la ubiquinona con una pequeña cantidad de borohidruro (0,2 mg aprox.) y se espera 2 minutos para la total reducción y eliminación de burbujas que podrían interferir. Se vuelve a determinar el espectro de la ubiquinona reducida en el mismo rango de λ .

La concentración de ubiquinona se calcula a partir de la diferencia de absorbancias a 275 nm entre las formas oxidada y reducida, mediante la expresión

$$\frac{3 \cdot \Delta A_{275} \cdot 10^3}{12,25 \cdot \text{mg Prot./ml}} = \text{micromoles de Ubiquinona/g protefina}$$

2.17 DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

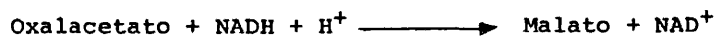
Todos los ensayos de actividades enzimáticas se hacen sobre muestras recientemente obtenidas, o conservadas unas horas a la temperatura del nitrógeno líquido.

Se observan las precauciones relativas a este tipo de determinaciones: reactivos recientemente preparados, o en su caso congelados a -20° , determinación de la actividad de la mezcla de reacción en ausencia de enzima (ensayos en blanco), pH ajustado, y temperatura controlada mediante termostatación en aquellos ensayos que transcurren con variación de absorbancia.

Se utiliza un espectrofotómetro Beckman DBGT de doble haz, con compartimento de cubetas termostaticado y provisto de registrador.

2.17.1 Malato deshidrogenasa

L-Malato : NADH oxidoreductasa (EC 1.1.1.37). Esta técnica, descrita por Ochoa (263) para determinar la actividad malato deshidrogenasa está basada en el descenso de absorbancia producido por la oxidación de una disolución de NADH en presencia del enzima y oxalacetato en exceso según la ecuación:



La mezcla de reacción en la cubeta está formada por:

0,3 ml tampón glicil-glicina 0,25 M pH 7,4

0,1 ml NADH 1,5 mM pH 7,4

0,1 ml oxalacetato 7,6 mM pH 7,4

2,5 ml agua bidestilada.

Se preincuba la mezcla a 35° añadiendo seguidamente a la cubeta una cantidad de enzima equivalente a unos 100 µg de proteína. Se sigue la marcha de la reacción mediante el registro del descenso de absorbancia a 340 nm. El coeficiente de extinción del NADH es $6,22 \cdot 10^6 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (82).

2.17.2 NADH : citocromo c reductasa sensible e insensible a la rotenona

La NADH : citocromo c reductasa insensible a la rotenona está localizada en la membrana externa de la mitocondria, mientras que la sensible se encuentra en la membrana interna.

Para su determinación seguimos la técnica descrita por Hatefi y Rieske (264) en la que la reducción del ferricitocromo c por el NADH se sigue espectrofotométricamente a 550 nm. También puede medirse por registro del descenso de absorbancia a 340 nm producido por la oxidación del NADH por el ferricitocromo c.

La mezcla de reacción contiene:

0,2 ml tampón fosfato 0,1 M pH 7,5

0,02 ml azida sódica 0,1 M

0,01 ml EDTA 0,01 M

0,02 ml NADH 0,01 M

Se completa hasta 0,9 ml con agua bidestilada.

Se incuba a 37° durante dos minutos. La reacción se inicia al añadir a la cubeta 0,1 ml de citocromo c oxidado al 1% (p/v) y 5-10 µl de muestra conteniendo unos 40-60 µg de proteína.

Se registra el aumento de absorbancia a 550 nm. La actividad específica viene dada por la expresión:

$$A_{esp.} = \frac{\Delta A_{550}}{18,5} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Prot.}^{-1}$$

En las condiciones descritas se mide la actividad total tanto del enzima sensible como del insensible a la rotenona.

Para determinar la actividad del enzima sensible a la rotenona se realiza a continuación otro ensayo con una mezcla de reacción igual a la anterior conteniendo rotenona 0,15 mM que anula la actividad del enzima sensible. La aplicación de la ecuación anterior a estas condiciones nos da la actividad específica del enzima insensible a la rotenona.

Por diferencia entre estas dos medidas se calcula la actividad del enzima sensible a la rotenona.

2.17.3 Citocromo c oxidasa

Para la determinación de la actividad citocromo c oxidasa seguimos el método de Sottocasa y col. (265). Se basa en el descenso de absorbancia a 550 nm que experimenta una disolución de citocromo c al pasar del estado reducido al oxidado.

Preparación del citocromo c reducido: se añaden unos pocos cristales de borohidruro sódico a una disolución 3mM de citocromo c batiendo con una varilla o espátula hasta que no haya desprendimiento de burbujas. La disolución resultante es muy alcalina por lo que hay que neutralizarla añadiendo HCl 0,1 N gota a gota hasta pH=7. La concentración de citocromo c se ajusta finalmente a 0,08 mM añadiendo la cantidad adecuada de tampón fosfato 75 mM pH 7,5.

En la cubeta del espectrofotómetro termostatizada a 30° se añaden:

0,2 ml citocromo c reducido 0,08 M

0,7 ml tampón fosfato 75 mM, pH 7,4

0,1 ml de la muestra conteniendo una cantidad de enzima equivalente a 2-5 μ g de proteína.

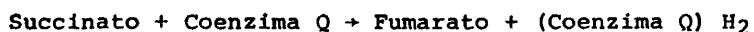
Se registra el descenso lineal de absorbancia durante

los dos primeros minutos. La actividad específica en estas condiciones es:

$$A_{\text{esp.}} = \frac{\Delta A_{550}}{18,5} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Prot.}^{-1}$$

2.17.4 Succinato: coenzima Q oxidoreductasa

Para su determinación utilizamos el método de Ziegler y Rieske (266) basado en la reacción:



donde la tasa de reducción del coenzima Q por el succinato se determina indirectamente siguiendo el cambio de color de un colorante reducible como el 2,6-diclorofenolindofenol (DIF) el cual es reducido rápidamente por el (coenzima Q)H₂. En las condiciones de este ensayo el DIF no se reduce en ausencia de coenzima Q.

Se coloca en la cubeta la siguiente mezcla de reacción:

0,1 ml tampón fosfato potásico 1 M, pH 7.

15 µl DIF al 0,1% en tampón fosfato, pH 7.

20 µl succinato potásico 1 M, pH 7.

10 µl EDTA 1 mM.

10 µl Triton X-100 1%.

20 µl coenzima Q al 0,5 % en etanol.

Agua bidestilada hasta un volumen final de 1 ml.

Se preincuba el contenido de la cubeta a 38° durante 5

minutos al cabo de los cuales se añade una cantidad de enzima equivalente a 15-30 µg de proteína.

Se registra el descenso de absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro termostático a 38° hasta que el 80% del colorante se haya reducido.

La actividad específica del enzima (µmoles de succinato oxidado/minuto/mg proteína) vendrá expresada por la siguiente fórmula:

$$A_{\text{esp.}} = \frac{\Delta A_{600}}{20,5} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Prot}^{-1}$$

2.17.5 Succinato : citocromo c reductasa

Para la determinación de la actividad succinato citocromo c reductasa seguimos el método de Tisdale (267). Se fundamenta en el aumento de absorbancia que presenta el ci tocromo c a 550 nm al reducirse, en presencia de succinato, por la acción de este complejo enzimático. A fin de evitar la reoxidación del citocromo c por la citocromo c oxidasa es necesario bloquear el último paso de la cadena respiratoria con un inhibidor específico como es la azida sódica.

La mezcla de reacción en la cubeta contiene:

0,10 ml tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4

0,01 ml azida sódica 0,1 M

0,02 ml EDTA 0,01 M

0,05 ml albúmina sérica bovina al 10%
0,10 ml succinato potásico 0,1 M, pH 7
Agua bidestilada hasta un volumen de 0,90 ml.

Se agregan 10 μ l de la muestra a medir diluída convenientemente a una concentración de 100-200 μ g de proteína/ml. Se incuba esta mezcla de reacción a 37° durante 2 minutos.

La reacción se inicia al añadir a la cubeta 0,1 ml de citocromo c oxidado al 1% registrando la variación de absorbancia a 550 nm.

El coeficiente de extinción para el citocromo c a 550 nm es $18,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La actividad específica (en $\mu\text{moles de citocromo c reducidos/segundo/mg de proteína}$) se calcula mediante la expresión:

$$\text{Aesp.} = \frac{\Delta A_{550}}{18,5} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Prot}^{-1}$$

2.17.6 Determinación de la actividad ATPasa

Se han descrito varios métodos para la estimación de la actividad ATPasa (ATP fosfohidrolasa); la mayoría de ellos basados en la medida de la cantidad de fosfato inorgánico liberado por el enzima en la hidrólisis del ATP (268, 269). La actividad ATPasa se puede seguir también espectrofotométricamente (86) si se incluyen en el medio de reac-

ción fosfoenolpiruvato, piruvato kinasa, lactato deshidrogenasa, y NADH (270).

Reactivos:

- (1) Tampón: KCl 100 mM, EDTA 6 mM, MgCl₂ 15 mM, trietanolamina · HCl 100 mM, a pH 8.
- (2) Disolución de ATP/Mg⁺⁺: ATP 200 mM, MgCl₂ 200 mM a pH 7.
- (3) Fosfoenolpiruvato (PEP) 100 mM a pH 7.
- (4) NADH 20 mM a pH 7.
- (5) Piruvato kinasa (PK). ATP: piruvato 2-O-fosfotransferasa (EC 2.7.1.40). Suspensión con una actividad de 200 U/mg.
- (6) Lactato deshidrogenasa (LDH). L-lactato:NAD oxidoreductasa (EC 1.1.1.27). Suspensión con una actividad de 300 U/mg.
- (7) Cianuro potásico 2 M.

La mezcla de reacción para cinco ensayos contiene:

- 3,33 ml tampón (1)
 - 0,10 ml ATP/Mg⁺⁺ 200 mM (2)
 - 0,15 ml PEP 100 mM (3)
 - 0,10 ml NADH 20 mM (4)
 - 0,010 ml PK suspensión (5)
 - 0,015 ml LDH suspensión (6)
 - 0,010 ml KCN 2 M (7)
- Agua bidestilada hasta volumen final de 10 ml.

Se colocan en una cubeta 2 ml de esta mezcla y se mantiene a 30° durante 5 minutos al cabo de los cuales se aña de la muestra a ensayar (5-10 μ l de suspensión de membranas o sobrenadante). La oxidación del NADH se sigue espectrofotométricamente a 340 nm midiendo el descenso de absorbancia en función del tiempo en un espectrofotómetro de doble haz provisto de registrador y cubetas termostatzadas a 30°.

Por cada mol de ATP hidrolizado se oxida un mol de NADH. La actividad específica de la ATPasa (μ moles de ATP hidrolizado/min/mg Prot.) vendrá dada por:

$$\text{Aesp.} = \frac{A_{340}}{6,22} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Prot.}^{-1}$$

3. RESULTADOS

3.1 SOLUBILIZACION DE MEMBRANA EXTERNA

Alícuotas de 1 ml de suspensiones de membrana externa de 1 y 5 mg proteína/ml se tratan con cantidades apropiadas de Triton X-100 a fin de obtener concentraciones finales del mismo entre 0,1 y 1 % (p/v). Se incuban en estas condiciones durante 30 minutos, centrifugándolas a continuación 1 hora a 150.000xg, para proceder seguidamente a la determinación de proteínas y fósforo lipídico en los sobrenadantes, con objeto de establecer patrones de solubilización en estas condiciones, comparables con los de la membrana interna.

3.1.1 SOLUBILIZACION DE PROTEINAS Y FOSFORO LIPIDICO. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE DETERGENTE Y DE MEMBRANAS EN SUSPENSION

Los porcentajes de solubilización de proteínas y fósforo lipídico de la membrana externa en función de la concentración de Triton X-100 se muestran en la Tabla III (para una suspensión de membranas de 1 mg proteína/ml) y en la Tabla IV (suspensión de membranas con 5 mg proteína/ml).

La solubilización de proteína depende de la concentración de detergente, y es poco afectada por la concentración de membrana en suspensión, si las concentraciones de Triton X-100 son bajas (menores de 0,1%). Sin embargo con

concentraciones más altas de detergente se observan pequeñas diferencias en las pautas de solubilización proteica que dependen de la concentración de membranas en suspensión. Así con suspensiones de 1 mg proteína/ml se tiende a alcanzar un máximo de proteína liberada (50-60%) ya a partir de 0,25% de Tritón X-100 (figura 3), mientras que la misma concentración de detergente solubiliza una menor proporción de proteína (35-40%), si la concentración de membranas en suspensión es de 5 mg proteína/ml (figura 4).

La solubilización de fósforo lipídico se ve más afectada por la concentración de membranas en suspensión: a 1 mg de proteína/ml (figura 3) la curva de solubilización, parabólica, es similar y paralela a la de proteína, mientras que a 5 mg proteína/ml (figura 4) la liberación de fósforo es casi lineal.

En las dos concentraciones de membrana se observa que las curvas de fósforo solubilizado se mantienen por debajo de las de proteína.

TABLA III

Solubilización de proteínas y fósforo lipídico de la membrana externa mitocondrial en función de la concentración de Triton X-100. (Suspensiones de membranas de 1 mg prot/ml).

Concentración Triton X-100	% Solubilización	
	Proteína	Fósforo lipídico
% (p/v)		
-	8,5 ± 1,50	2,3 ± 1,91
0,10	43,6 ± 4,66	23,6 ± 2,10
0,25	53,8 ± 4,76	37,2 ± 5,53
0,50	51,9 ± 2,31	43,5 ± 6,55
0,75	60,4 ± 4,17	41,9 ± 5,61
1,00	60,5 ± 8,30	44,8 ± 6,12

(Valores $\bar{x} \pm$ ESM correspondientes a 5 experimentos)

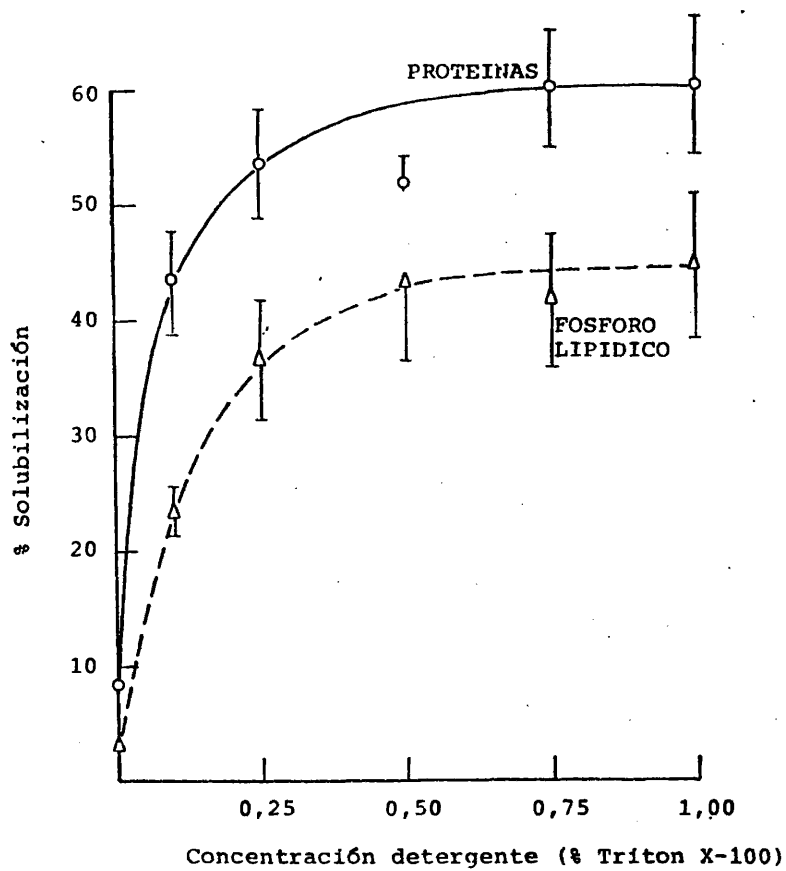


Figura 3 Influencia del Triton X-100 en la solubilización de proteínas y fósforo lipídico de la membrana externa mitocondrial. Suspensiones de membrana de 1 mg proteína/ml.
 (Las líneas verticales corresponden a ± 1 error estándar de la media).

TABLA IV

Solubilización de proteínas y fósforo lipídico de la membrana externa mitocondrial en función de la concentración de Triton X-100. (Suspensiones de membranas de 5 mg prot/ml).

Concentración Triton X-100	% Solubilización	
% (p/v)	Proteína	Fósforo lipídico
-	6,7 ± 0,79	3,2 ± 2,10
0,10	34,1 ± 2,82	7,2 ± 1,01
0,25	36,9 ± 2,01	15,9 ± 1,70
0,50	45,3 ± 0,48	31,2 ± 2,63
0,75	54,6 ± 3,10	37,4 ± 1,87
1,00	57,5 ± 2,01	44,1 ± 2,44

(Valores $\bar{x} \pm$ ESM correspondientes a 5 experimentos)

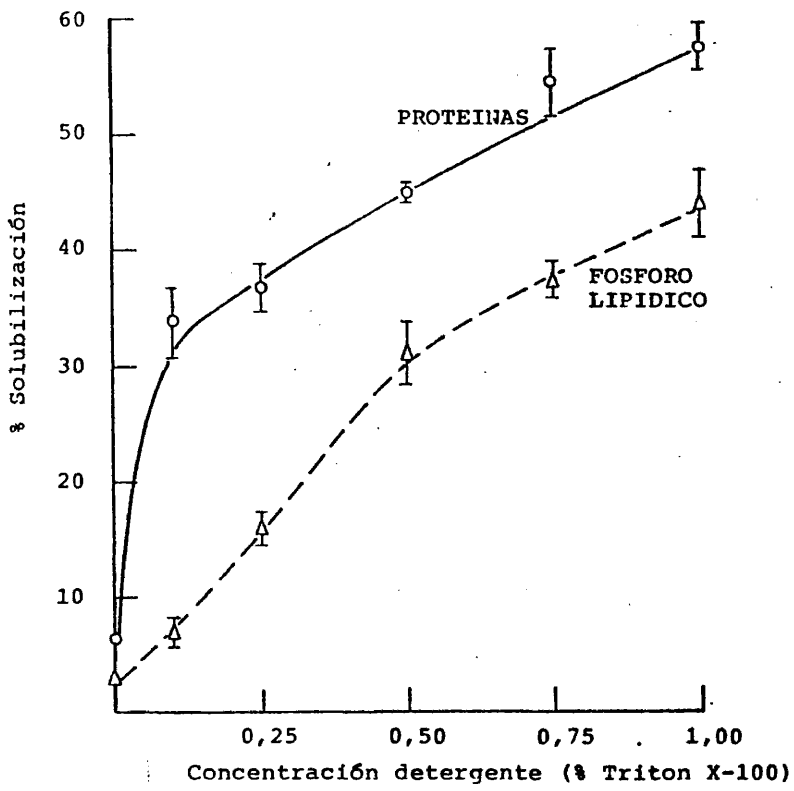


Figura 4 Influencia del Triton X-100 en la solubilización de proteínas y fósforo lipídico de la membrana externa mitocondrial. Suspensiones de membrana de 5 mg proteína/nl.

3.1.2 ESTUDIOS ULTRAESTRUCTURALES

Las secciones de los sedimentos conteniendo el material no solubilizado, procedentes del tratamiento de las membranas externas con Triton X-100 a varias concentraciones, se preparan para su observación al microscopio electrónico según técnicas descritas en 2.11.

Las membranas externas control presentan una apariencia de "fantasmas" (ghosts) (figs. 5,6) que desaparece con el tratamiento por el detergente. Distintas concentraciones de éste producen fundamentalmente imágenes muy similares (figs. 7,8,9). Los sacos membranosos están desintegrados, y aparecen estructuras laminares junto con áreas transparentes a los electrones y granulaciones densas. Estas granulaciones son de dos tipos: unas pequeñas, no muy densas, con cierta tendencia a la agregación, y otras, de alta densidad a los electrones, aisladas y rodeadas de material de baja densidad electrónica.

Estos gránulos, especialmente los más grandes, tienden a disminuir en número a altas concentraciones de detergente.

Figura 5. MEMBRANAS EXTERNAS CONTROL.

El aspecto de "fantasmas" de estos sacos mitocondriales externos es difícil de interpretar ya que se trata de un corte ultrafino. Los sombreados grises y la falta de definición de las membranas no pueden ser totalmente explicados por un efecto de corte oblicuo. Podrían corresponder a un material contaminante de baja densidad y con una cierta afinidad por las membranas. Las estructuras de alta densidad podrían provenir del material contaminante incorporado durante el proceso de preparación de la muestra. Las grandes figuras claras se interpretarían en principio como el resultado de la fusión, completa o no, de varios sacos mitocondriales.

Aumentos placa: 16.000

Aumentos copia: 2,25

Figura 6. DETALLE DE LA ANTERIOR

Aumentos placa: 55.000

Aumentos copia: 2,25



Figura 5

- 110 -



Figura 6

Figura 7. SEDIMENTO DE MEMBRANAS EXTERNAS DESPUES DEL TRATAMIENTO CON TRITON X-100 AL 0,1% (p/v).

Se observa la desintegración de los sacos mitocondriales externos y la aparición de cuerpos laminares y gránulos densos separados por zonas "vacías" correspondientes a un material de muy baja o nula densidad electrónica. Respecto de los gránulos, éstos son de dos tipos: unos más pequeños, de un material de densidad media y con cierta tendencia a la agregación, mientras que los otros, más grandes y rodeados de un material sin densidad electrónica, permanecen aislados.

Aumentos placa: 55.000

Aumentos copia: 2,25



112



Figura 7

Figura 8. SEDIMENTO DE MEMBRANAS EXTERNAS TRAS SU TRATAMIENTO CON TRITON X-100 AL 0,25%.

Presenta en general un aspecto similar al de la figura 7. Se observan no obstante algunas diferencias:

- a.- Estructuras laminares-vesiculares más alargadas.
- b.- Gran incremento en el número de gránulos densos de pequeño tamaño en los que se advierte una tendencia mayor a su disposición en cadenas.
- c.- Aumento en el número y tamaño de los gránulos grandes. Se hace más evidente su posición central en un área de densidad electrónica prácticamente nula.
- d.- Se aprecia la existencia de una cierta afinidad de los gránulos pequeños por las estructuras laminares vesiculosas.

Aumentos placa: 55.000

Aumentos copia: 2,25

111

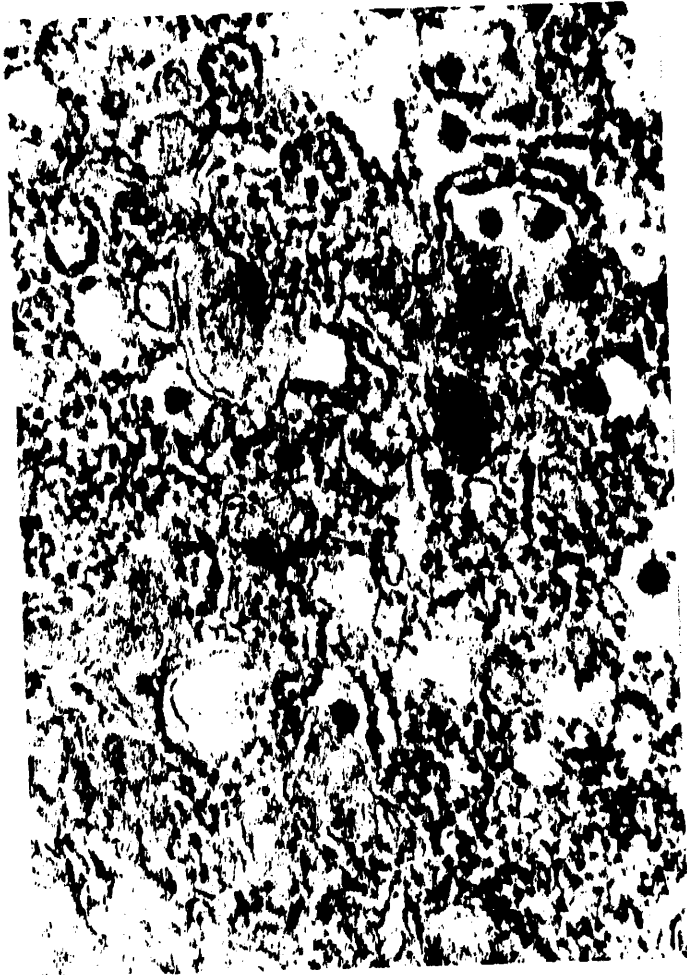


Figura 8

Figura 9. SEDIMENTO DE MEMBRANAS EXTERNAS DESPUES DEL TRATAMIENTO CON TRITON X-100 AL 1%.

Aspecto general similar al de los sedimentos de las figuras 7 y 8. Se observa sin embargo la desaparición de los gránulos grandes rodeados de material sin densidad electrónica y la disminución del número de gránulos pequeños que ya no se disponen en cadenas arrosariadas sino que forman agregados no ordenados. Parece que se pierde la afinidad del material granular por las vesículas o láminas en beneficio de la agregación aparentemente desordenada de estos gránulos.

Aumentos placa: 55.000

Aumentos copia: 2,25



Figura 9

3.1.3 ESTUDIO DE LOS POLIPEPTIDOS SOLUBILIZADOS

Alícuotas de la suspensión de membrana externa y de los sobrenadantes que contienen la fracción de membranas solubilizada por el Triton X-100 se preparan según se indica en 2.10 para electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). Los geles teñidos con azul de Coomassie se muestran en la figura 10.

Del examen de los densitogramas de estos geles (fig.11) se deduce que el Triton X-100 al 0,25% y 1% solubiliza prácticamente los mismos polipéptidos y en las mismas proporciones. La adición de detergente en concentraciones superiores, hasta 2%, no produce modificaciones en los polipéptidos solubilizados de la membrana externa.

El densitograma A, que contiene el espectro polipeptídico de la membrana externa intacta difiere de los otros dos (B, C) principalmente en que estos últimos no contienen la banda X correspondiente a polipéptidos que no han sido solubilizados.

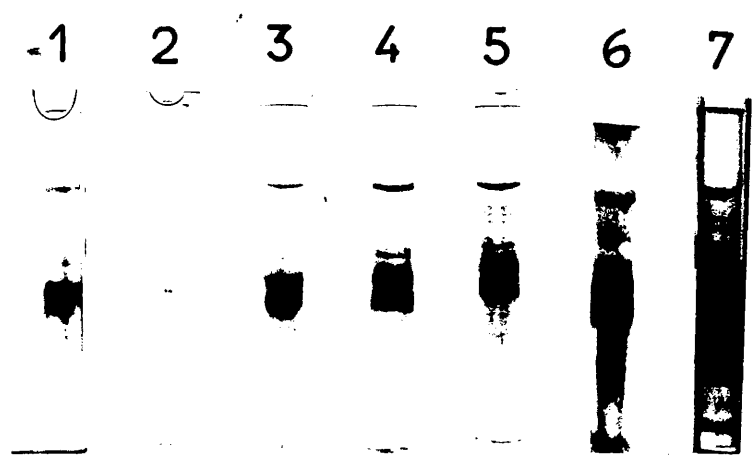


Figura 10 Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de membranas externas y de los sobrenadantes procedentes de su tratamiento con Triton X-100.

- 1.- Control
- 2.- Fracción solubilizada por 0,10% de Triton X-100.
- 3.- " " " 0,25% " " "
- 4.- " " " 0,50% " " "
- 5.- " " " 0,75% " " "
- 6.- " " " 1,00% " " "
- 7.- Membranas externas totales.

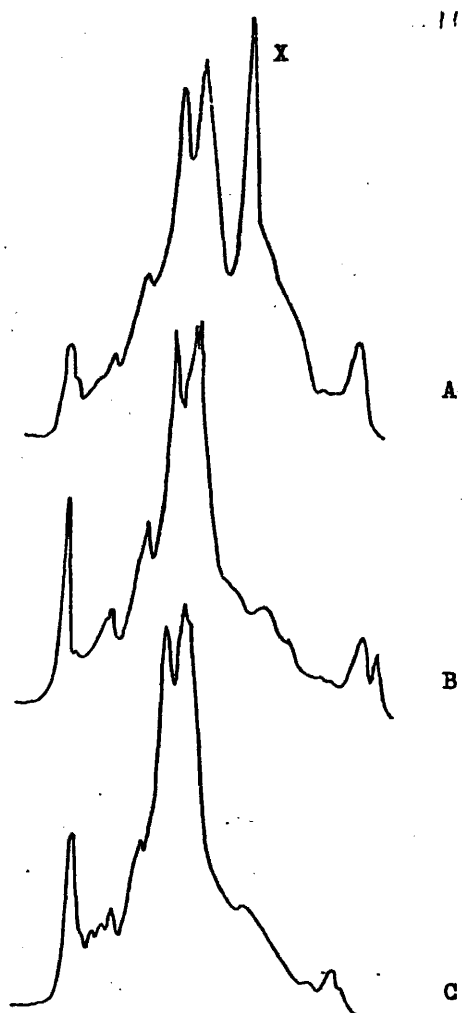


Figura 11 Densitogramas de los patrones electroforéticos obtenidos por SDS-PAGE.

A.- Membranas externas totales.

B.- Fracción solubilizada por 0,25% de Triton X-100.

C.- Fracción solubilizada por 1% de Triton X=100.

3.1.4. ESTUDIO DE LOS FOSFOLIPIDOS SOLUBILIZADOS Y DE SUS
ACIDOS GRASOS ASOCIADOS

Se analizan cuantitativamente las diferentes clases de fosfolípidos en las suspensiones de membrana externa y en los sobrenadantes procedentes del tratamiento de las mismas con Triton X-100, lo que permite hacer una estimación del grado de solubilización de cada fosfolípido. Para ello se extraen los lípidos de los sobrenadantes y las suspensiones de membranas, procediendo luego a su separación cromatográfica y posterior cuantificación según técnicas descritas en 2.6 y 2.8. Los resultados de la Tabla V muestran el porcentaje de solubilización de cada fosfolípido en el sobrenadante referido al contenido del mismo en la membrana externa intacta. Se observa que a la concentración 0,50% de detergente los fosfolípidos del sobrenadante mantienen las mismas proporciones relativas que en la membrana intacta, por lo que no hay solubilización preferente de ninguno de ellos.

Los ácidos grasos asociados a los fosfolípidos se analizan por cromatografía gas-líquido según se describe en 2.9. La Tabla VI muestra que tampoco hay diferencias entre el contenido de ácidos grasos de la suspensión de membranas y el del correspondiente sobrenadante tras el tratamiento con Triton X-100 0,5%.

TABLA V

Solubilización de fosfolípidos de la membrana externa mitocondrial por el Triton X-100.
(Media de 3 experimentos)

	Membrana externa sin tratar		Sobrenadantes Triton X-100 0,50%	
	MgP	Porcentaje relativo	MgP	Porcentaje relativo
Fosfatidilserina + Esfingomielina	32,5	(3,3%)	10,8	(3,2%)
Fosfatidilinositol	35,4	(3,6%)	10,5	(3,2%)
Fosfatidilcolina	554,5	(56,3%)	195,7	(59,1%)
Fosfatidiletanolamina	319,1	(32,4%)	101,8	(30,8%)
Cardiolipina	43,6	(4,4%)	12,0	(3,6%)
				% Solubilizado
				33,2%
				29,8%
				35,3%
				31,9%
				27,7%

TABLA VI

Acidos grasos de los lípidos solubilizados por acción del Triton X-100 0,50% (p/v) sobre la membrana externa mitocondrial.

Acidos grasos	Membranas intactas	Sobrenadantes (Triton 0,5%)
Palmítico (C 16:0)	21,4%	24,1%
Esteárico (C 18:0)	32,5%	29,2%
Oléico (C 18:1)	29,4%	36,5%
Linoléico (C 18:2)	2,5%	2,3%
Linolénico (C 18:3)	14,2%	10,1%

3.2. SOLUBILIZACION DE MEMBRANA INTERNA

Alícuotas de 1 ml de suspensiones de membrana interna de 1 y 5 mg proteína/ml se tratan con cantidades adecuadas de Triton X-100 a fin de obtener concentraciones finales de detergente comprendidas entre 0,1 y 2 % (p/v). Se incuban a 20° durante 30 minutos (salvo cuando se indica lo contrario) centrifugándolas a continuación a 150.000×g durante 1 hora. En el sobrenadante se realizan las determinaciones analíticas oportunas, con objeto de conocer la proporción de los distintos componentes de la membrana interna solubilizados en función de la concentración de detergente, y en otras condiciones, en su caso.

3.2.1 SOLUBILIZACION DE PROTEINAS Y FOSFORO LIPIDICO

3.2.1.1 Influencia de la concentración de detergente y de membranas en suspensión

El porcentaje de solubilización de proteínas y fósforo lipídico de la M.I.M. en función de la concentración de Triton X-100 se muestra en la Tabla VII (para una suspensión de membranas de 1 mg proteína/ml) y en la Tabla VIII (suspensión de membranas de 5 mg proteína/ml).

A bajas concentraciones de detergente (menores de 0,25%) su efecto solubilizante sobre las proteínas de la

- 126 -

TABLA VII

Solubilización de proteínas y fósforo lipídico de la membrana interna mitocondrial en función de la concentración de Triton X-100. (Suspensiones de membranas de 1 mg proteína/ml).

Concentración Triton X-100	% Solubilización	
% (p/v)	Proteína	Fósforo lipídico
-	1,9 ± 0,51	4,1 ± 1,68
0,10	33,7 ± 1,33	77,6 ± 3,51
0,25	41,9 ± 1,79	89,6 ± 2,68
0,50	43,1 ± 1,11	85,2 ± 2,73
1,00	46,5 ± 1,31	88,9 ± 3,41
2,00	46,4 ± 1,10	95,1 ± 5,38

(Valores $\bar{x} \pm$ ESM correspondientes a 6 experimentos)

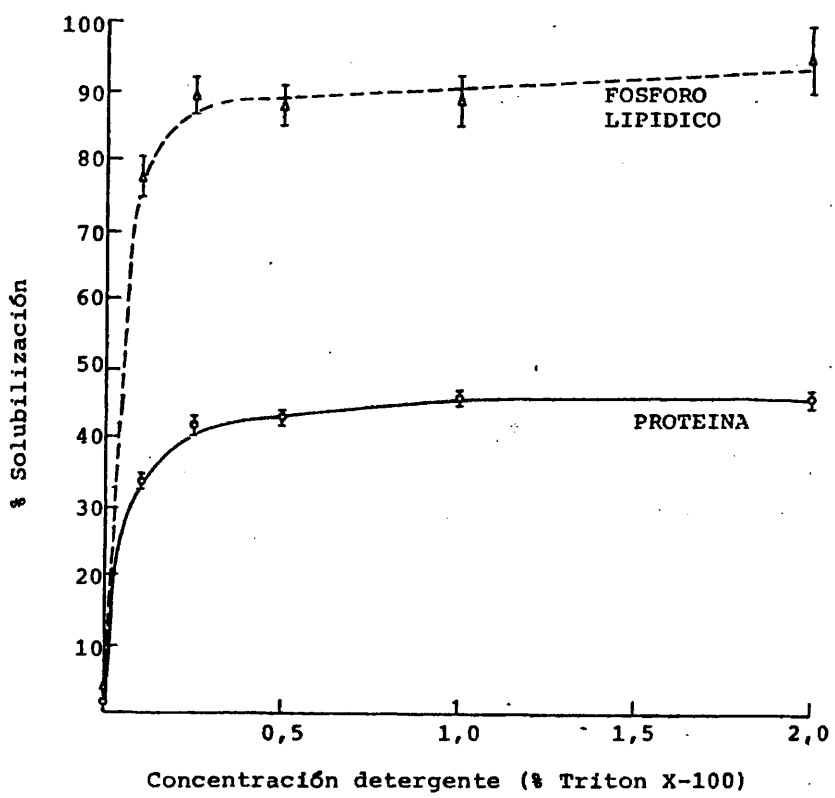


Figura 12 Solubilización de proteínas y fósforo lipídico de la M.I.M. en función de la concentración de Triton X-100. Suspensiones de membranas de 1 mg proteína/ml.

TABLA VIII

Solubilización de proteínas y fósforo lipídico de la membrana interna mitocondrial en función de la concentración de Triton X-100. (Suspensiones de membranas de 5 mg proteína/ml).

Concentración Triton X-100	% Solubilización	
% (p/v)	Proteína	Fósforo lipídico
-	13,1 ± 0,46 (46)	4,4 ± 0,92 (13)
0,10	31,7 ± 0,86 (42)	25,5 ± 5,50 (13)
0,25	37,2 ± 0,95 (45)	49,6 ± 4,61 (10)
0,50	42,6 ± 1,18 (47)	58,7 ± 5,71 (15)
1,00	47,1 ± 1,13 (37)	60,8 ± 3,40 (10)
2,00	48,1 ± 1,37 (38)	66,3 ± 2,69 (10)

Valores $\bar{x} \pm$ ESM correspondiente al número de experimentos señalado entre paréntesis.

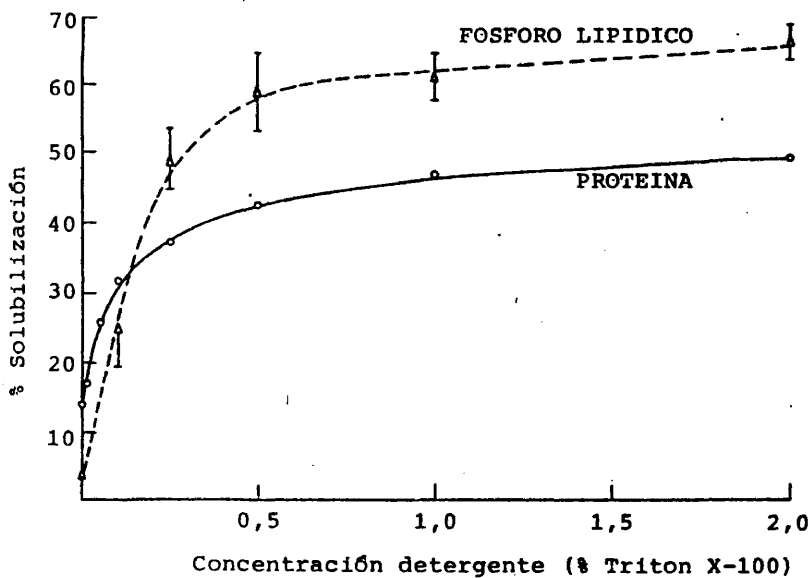


Figura 13 Solubilización de proteínas y fósforo lipídico de la M.I.M. en función de la concentración de Triton X-100. Suspensiones de membranas de 5 mg proteína/ml.

M.I.M. depende de la concentración del mismo obteniéndose curvas de solubilización protéica muy similares para suspensiones de membranas con 1 y 5 mg proteína/ml. Para concentraciones altas de detergente (mayores de 0,5%) se alcanza un punto de máxima solubilización (45-50%) en el que, prácticamente, un aumento en la concentración del surfactante no produce un incremento apreciable del material solubilizado (figs. 12 y 13).

La liberación de fósforo lipídico sigue una pauta similar dependiente de la concentración de Triton X-100 pero se observa una notable diferencia entre las suspensiones de baja concentración de membranas (1 mg proteína/ml) en las que se alcanza un máximo de casi 100% de fósforo solubilizado con 0,25% de Triton X-100, y las membranas a concentración 5 mg proteína/ml en las que un 0,50% del detergente libera un máximo de 60% de fósforo (figs. 12 y 13).

En todo caso las curvas de solubilización de fósforo se mantienen por encima de las de proteínas excepto con membranas de 5 mg proteína/ml y bajas concentraciones de detergente donde se produce un cruce de las curvas de fósforo y proteína (fig. 13).

3.2.1.2 Influencia de la temperatura

Para conocer el efecto solubilizante de la temperatu-

TABLA IX

Influencia de la temperatura en la solubilización de proteínas de la membrana interna mitocondrial.

	% Solubilización		
	4°	20°	37°
Control (H ₂ O)	11,6 ± 0,65 (10)	13,1 ± 0,46 (46)	13,6 ± 0,88 (10)
Triton 0,5%	44,7 ± 3,69 (9)	42,6 ± 1,18 (46)	39,4 ± 4,97 (9)

Valores $\bar{x} \pm$ ESM correspondientes al número de experimentos indicado entre paréntesis.

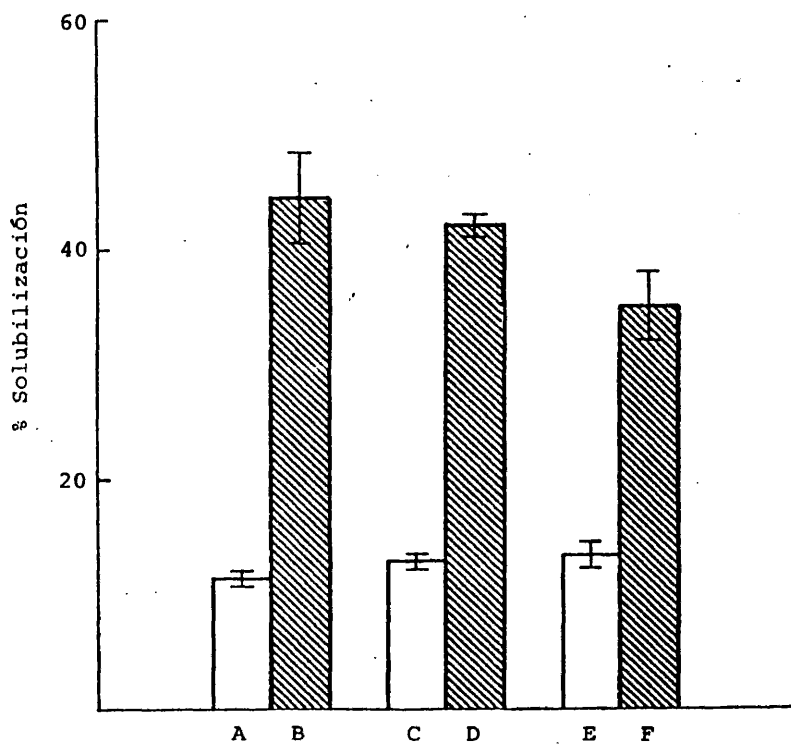


Figura 14 Influencia de la temperatura en la solubilización de proteína de la M.I.M.

- A 4° Control
- B 4° Triton X-100 0,5%
- C 20° Control
- D 20° Triton X-100 0,5%
- E 37° Control
- F 37° Triton X-100 0,5%

TABLA X

Influencia de la temperatura en la solubilización de fósforo lipídico de la membrana interna mitocondrial.

	% Solubilización		
	4°	20°	37°
Control (H ₂ O)	4,4 ± 1,13 (7)	4,4 ± 0,92 (13)	5,2 ± 1,22 (9)
Triton 0,5 %	68,4 ± 5,74 (5)	58,7 ± 5,70 (15)	67,4 ± 2,58 (5)

Valores $\bar{x} \pm$ ESM correspondientes al número de experimentos indicado entre paréntesis.

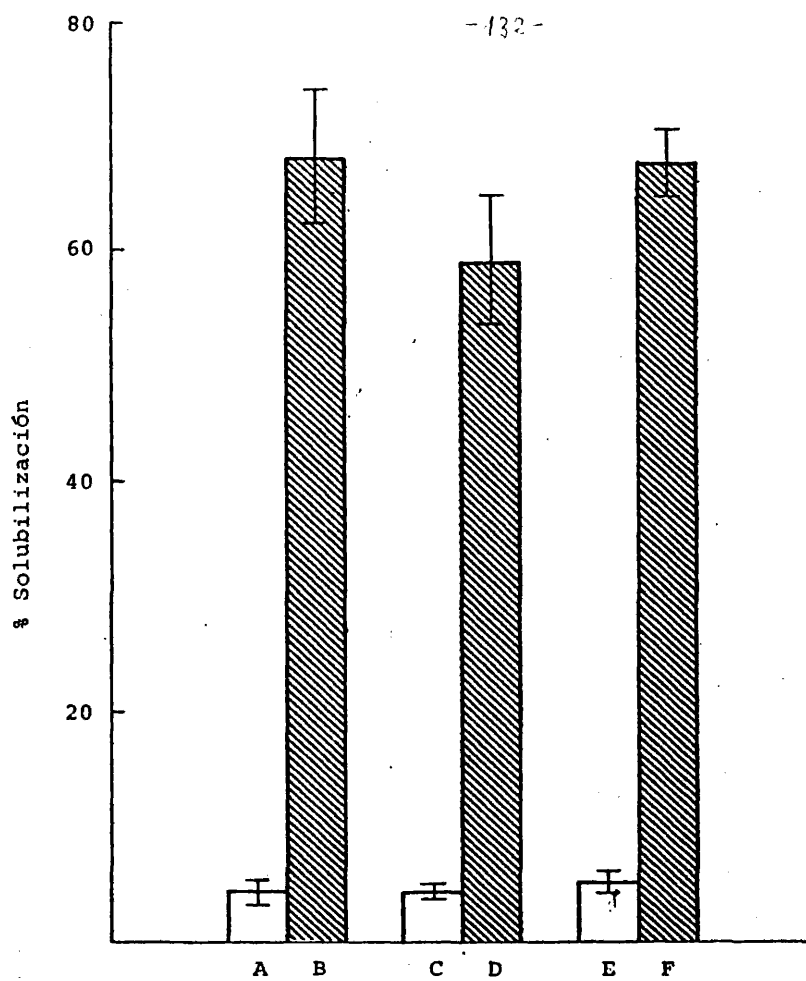


Figura 15 Influencia de la temperatura en la solubilización de fósforo lipídico de la M.I.M.

- A 4° Control
- B 4° Triton X-100 0,5%
- C 20° Control
- D 20° Triton X-100 0,5%
- E 37° Control
- F 37° Triton X-100

ra, suspensiones de membrana interna de una concentración de 5 mg proteína/ml se tratan con detergente a concentración final 0,5% (p/v) durante 30 minutos a 4°, 20° y 37°, procediendo luego del mismo modo indicado en 3.2.

En la Tabla IX se recogen los porcentajes de proteína solubilizada a distintas temperaturas por el Triton X-100 comparados con los controles sin detergente. El agua por sí sola tiene un débil efecto solubilizante. El Triton X-100 a 4° y 20° solubiliza por igual las proteínas de la membrana, sin embargo al aumentar la temperatura a 37° el efecto solubilizante tiende a disminuir ligeramente (fig. 14).

La Tabla X contiene los porcentajes de fósforo lipídico solubilizado por el detergente en función de la temperatura. No aparecen diferencias debidas a esta variable entre los controles. Tampoco el efecto del Triton X-100 parece ser afectado por la temperatura (fig. 15).

3.2.1.3 Influencia de la fuerza iónica

El tratamiento de las suspensiones de membrana interna (de 5 mg proteína/ml) con NaCl y CaCl₂ ambos a concentraciones 50 mM y 100 mM apenas afecta a la solubilización de proteínas y fósforo lipídico ni al efecto del detergente sobre las membranas. No obstante se aprecian pequeñas diferencias, más acusadas en presencia del detergente (Tablas XI y XII).

En ausencia de detergente el aumento de fuerza iónica debido al NaCl no tiene efecto sobre la liberación de proteína mientras que con CaCl₂ se produce un ligero incremento. El EDTA a concentración 1 mM no produce ningún efecto solubilizante.

Algo similar se observa en presencia de 0,5% de Triton X-100 cuyo efecto solubilizante no se modifica por concentraciones salinas de NaCl 50 y 100 mM, aunque se producen pequeños aumentos con CaCl₂. El EDTA sin embargo produce el efecto contrario anulando el incremento de solubilización debido al CaCl₂ (fig. 16).

El aumento de fuerza iónica en el medio, en ausencia de detergente, no modifica la pequeña proporción de fósforo lipídico solubilizado en estas condiciones. Sin embargo en presencia de EDTA 1 mM esta proporción es bastante más alta.

El efecto solubilizante de fósforo por el Triton X-100 al 0,5% se acentúa ligeramente en presencia de NaCl 50 y 100 mM, mientras el CaCl₂ lo afecta en menor medida. El EDTA por el contrario potencia la liberación de fósforo lipídico por el detergente (fig. 17).

TABLA XI

Influencia de la fuerza iónica en la solubilización de proteínas de la membrana interna mitocondrial.

Concentraciones finales en las suspensiones de membranas	% Solubilización	
	Controles	+ 0,5% Triton X-100
-	13,1 ± 0,46 (46)	42,6 ± 1,18 (46)
NaCl 50 mM	13,1 ± 1,14 (11)	42,3 ± 2,88 (8)
NaCl 100 mM	13,9 ± 1,35 (11)	43,8 ± 2,46 (8)
CaCl ₂ 50 mM	14,5 ± 0,98 (10)	50,2 ± 3,44 (7)
CaCl ₂ 100 mM	15,2 ± 0,63 (9) ^b	50,7 ± 4,57 (6) ^c
EDTA 1 mM	12,5 ± 0,56 (11)	46,1 ± 2,66 (10)

Valores $\bar{x} \pm$ ESM correspondientes al número de experimentos señalado entre paréntesis.

Test de Student. b: $P < 0,01$; c: $P < 0,05$.

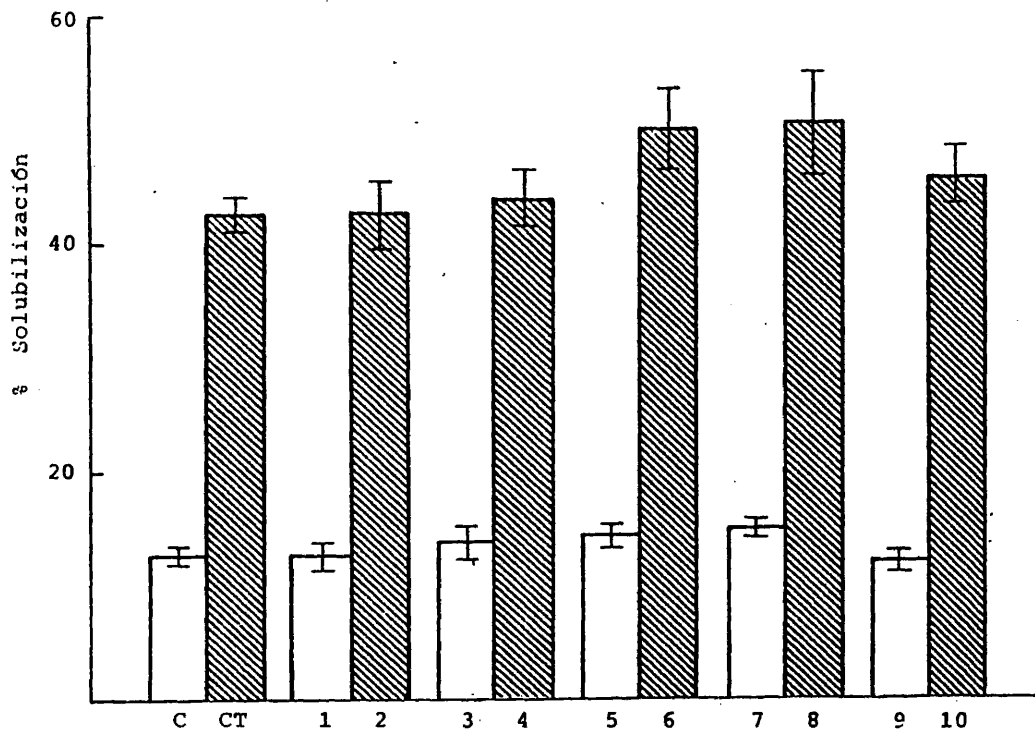


Figura 16 Influencia de la fuerza iónica en la solubilización de proteínas de la M.I.M.

- C Control
- CT Control Triton 0,5%
- 1 NaCl 50 mM
- 2 NaCl 50 mM + Triton 0,5%
- 3 NaCl 100 mM
- 4 NaCl 100 mM + Triton 0,5%
- 5 CaCl₂ 50 mM
- 6 CaCl₂ 50 mM + Triton 0,5%
- 7 CaCl₂ 100 mM
- 8 CaCl₂ 100 mM + Triton 0,5%
- 9 EDTA 1 mM
- 10 EDTA 1 mM + Triton 0,5%

TABLA XII

Influencia de la fuerza iónica en la solubilización de fósforo lipídico de la membrana interna mitocondrial.

Concentraciones finales en las suspensiones de membranas	% Solubilización	
	Controles	+ 0,5% Triton X-100
-	4,4 ± 0,92 (5)	58,7 ± 5,71 (9)
NaCl 50 mM	5,8 ± 1,91 (9)	72,6 ± 5,14 (5)
NaCl 100 mM	5,0 ± 1,20 (8)	68,0 ± 2,51 (4)
CaCl ₂ 50 mM	4,2 ± 0,81 (9)	67,9 ± 3,39 (5)
CaCl ₂ 100 mM	5,3 ± 1,35 (8)	61,7 ± 1,59 (4)
EDTA 1 mM	12,5 ± 1,94 (4) ^b	74,9 ± 5,07 (4)

Valores $\bar{x} \pm$ ESM correspondientes al número de experimentos indicado entre paréntesis.

Test de Student. b: $P \leq 0,05$.

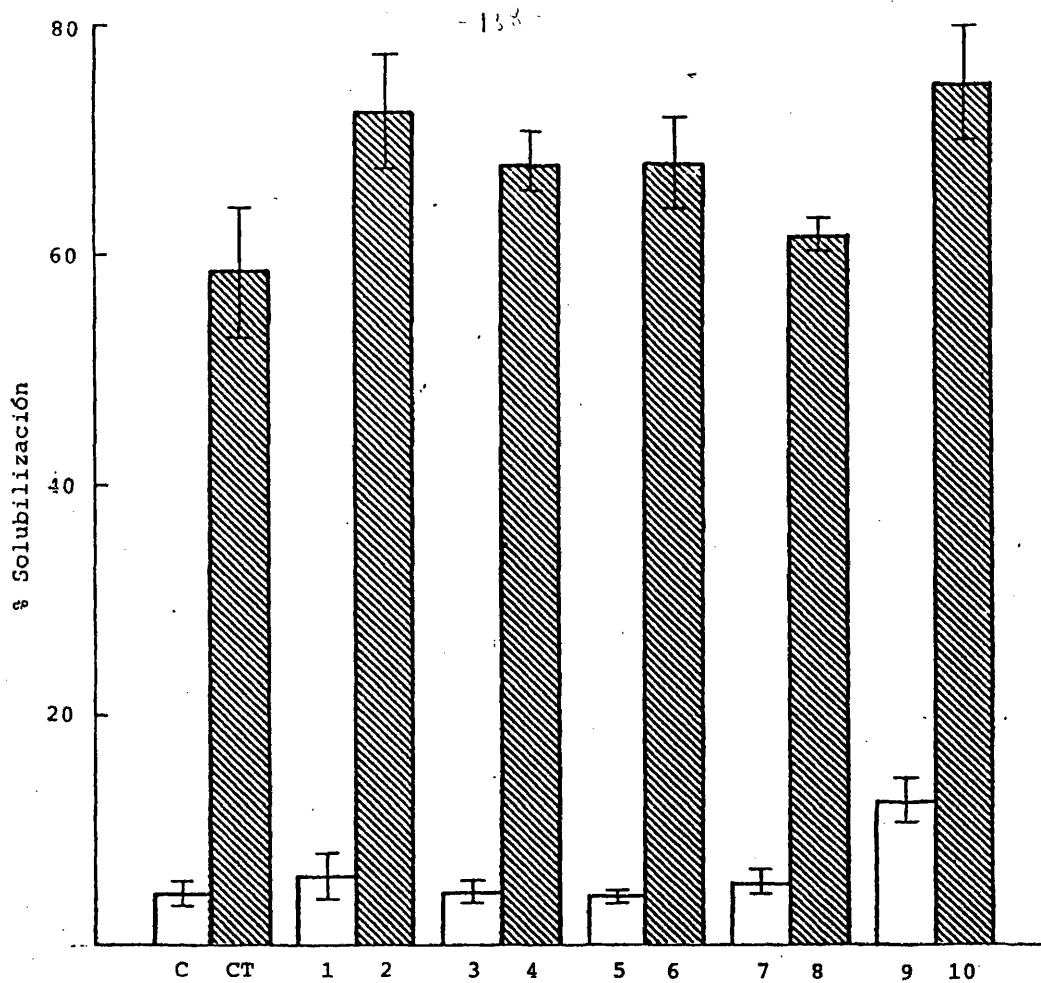


Figura 17 Influencia de la fuerza iónica en la solubilización de fósforo lipídico de la M.I.M.

- C Control
- CT Control Triton 0,5%
- 1 NaCl 50 mM
- 2 NaCl 50 mM + Triton 0,5%
- 3 NaCl 100 mM
- 4 NaCl 100 mM + Triton 0,5%
- 5 CaCl₂ 50 mM
- 6 CaCl₂ 50 mM + Triton 0,5%
- 7 CaCl₂ 100 mM
- 8 CaCl₂ 100 mM + Triton 0,5%
- 9 EDTA 1 mM
- 10 EDTA 1 mM + Triton 0,5%

3.2.1.4 Estudio comparativo de otros detergentes: dodecilsulfato y desoxicolato sódico

Con fines comparativos se ensaya el efecto solubilizante sobre la M.I.M. de un detergente aniónico, el SDS (dodecilsulfato sódico) y el de una sal de ácido biliar, el desoxicolato sódico.

La Tabla XIII contiene los resultados de solubilización de proteína y fósforo lipídico de la M.I.M. por el SDS. A bajas concentraciones del detergente (0,1%) se alcanza ya un máximo de proteínas y fósforo (50%) liberados en proporciones similares por SDS, que se muestra como uno de los detergentes más efectivos en cuanto a solubilización se refiere (fig. 18).

El efecto del desoxicolato a distintas concentraciones sobre la M.I.M. se muestra en la Tabla XIV. Este detergente es menos efectivo que el SDS como se desprende del examen de la figura 19: a concentraciones por debajo de 0,25% se solubiliza más proteína que fósforo, mientras que por encima de 0,25% la solubilización de fósforo es mayor que la de proteína, la cual a esta concentración de detergente alcanza su máxima liberación (30%).

Por su parte para conseguir el máximo en la solubilización de fósforo (50%) se necesitan concentraciones relativamente altas de desoxicolato (entre 0,75 y 1%).

TABLA XIII

Solubilización de proteínas y fósforo lipídico de la membrana interna mitocondrial con dodecilsulfato sódico.

Concentración SDS % (p/v)	% Solubilización	
	Proteína	Fósforo lipídico
-	13,1 \pm 0,46	4,4 \pm 0,92
0,10	50,4 \pm 0,70	45,8 \pm 3,19
0,25	56,7 \pm 0,72	50,5 \pm 2,42
0,50	52,6 \pm 0,31	43,9 \pm 0,90
0,75	54,0 \pm 0,30	45,5 \pm 1,11
1,00	52,6 \pm 0,31	49,3 \pm 3,27

Valores $\bar{x} \pm$ ESM correspondientes a 5 experimentos.

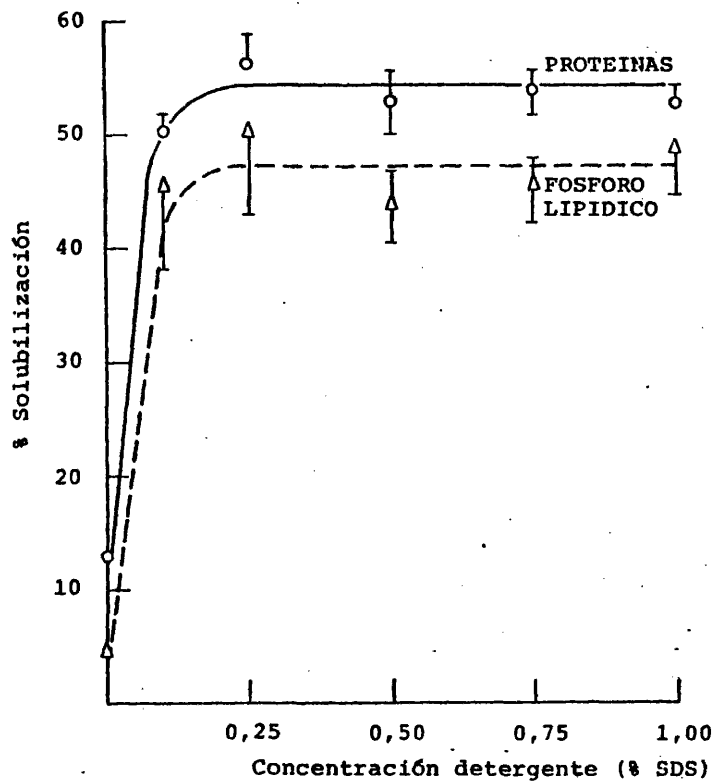


Figura 18 Solubilización de proteínas y fósforo lipídico de la M.I.M. en función de la concentración de dodecilsulfato sódico (SDS).

TABLA XIV

Solubilización de proteínas y fósforo lipídico de la membrana interna mitocondrial con desoxicolato sódico.

Concentración desoxicolato	% Solubilización	
% (p/v)	Proteína	Fósforo lipídico
-	13,1 ± 0,46	4,4 ± 0,42
0,10	21,8 ± 0,52	10,1 ± 1,38
0,25	27,7 ± 0,85	27,8 ± 2,12
0,50	29,8 ± 3,15	38,3 ± 5,27
0,75	29,4 ± 1,37	48,9 ± 0,32
1,00	29,0 ± 1,66	49,7 ± 0,40

Valores $\bar{x} \pm$ ESM correspondientes a 5 experimentos.

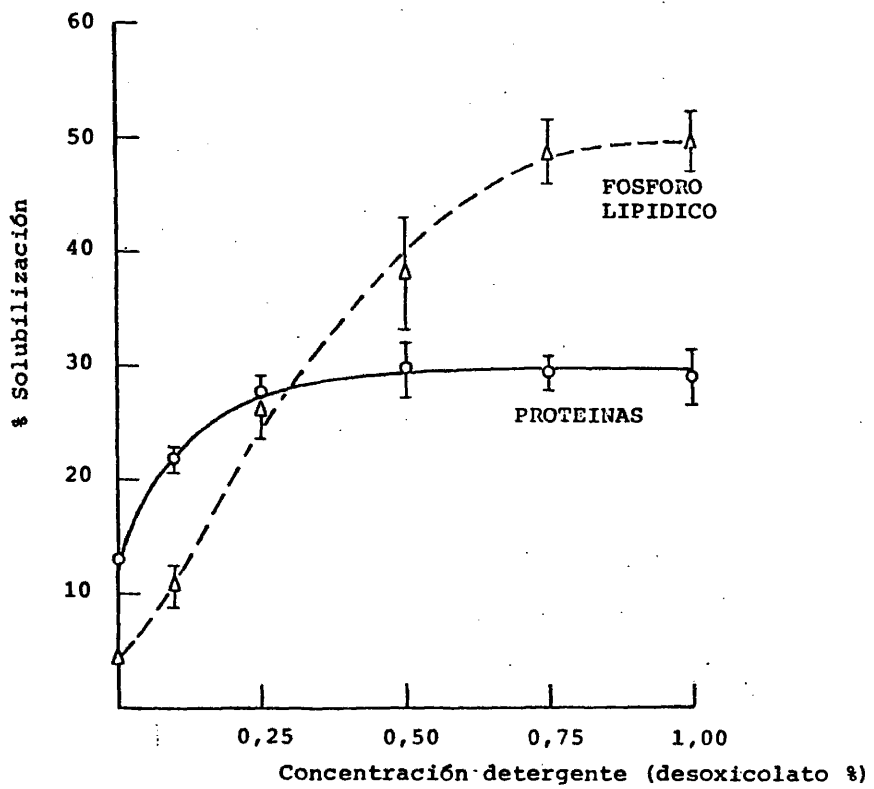


Figura 19 Solubilización de proteínas y fósforo lipídico de la M.I.M. en función de la concentración de desoxicolato sódico.

3.2.2 ESTUDIOS ULTRAESTRUCTURALES

Las secciones de los sedimentos correspondientes al material no solubilizado procedente del tratamiento de la M.I.M. con Triton X-100 se examinan en el microscopio electrónico según se describe en 2.11.

Las membranas internas (fig. 20) ofrecen distintas imágenes según la concentración de detergente que ha actuado sobre ellas. Así, concentraciones de 0,05% (p/v) del detergente que producen una baja solubilización de membrana, originan una considerable desestructuración de la misma (fig. 21). Estos sedimentos no son muy homogéneos respecto a la ubicación de estructuras organizadas, pudiendo observarse figuras mielínicas vesiculares en cortes obtenidos de la zona profunda del sedimento (fig.22).

A 0,25% de Triton X-100 se conservan las figuras mielínicas, pero formando estructuras abiertas con aspecto de membranas trilaminares orientadas perpendicularmente a la dirección del campo gravitatorio, e incluidas en un material amorfo (fig. 23).

La proporción de material granular y amorfo es mayor en los sedimentos procedentes de membranas tratadas con 0,5% de detergente (fig. 24) donde se aprecian cuerpos

esféricos o elipsoidales que contienen un material laminar estructurado con cierta semejanza con los nucleoides de algunos peroxisomas.

Finalmente, la fracción no solubilizada de membranas tratadas con concentraciones mayores de 1% de Triton X-100 (fig. 25) está constituida exclusivamente por un material amorfo y agregados granulares.

-116-

Figura 20. MEMBRANAS INTERNAS CONTROL

La imagen corresponde a una zona del sedimento que contiene sacos internos mitocondriales. La ausencia de membrana externa queda de manifiesto en la singularidad de las líneas envolventes. Se observan las "crestas" en varias orientaciones de corte y algún resto de matriz. Las figuras de contorno evanescente no claramente delineado pueden ser interpretadas como efectos de corte oblicuo sobre sacos aplastados durante la centrifugación.

Aumentos placa: 20.000

Aumentos copia: 2,25

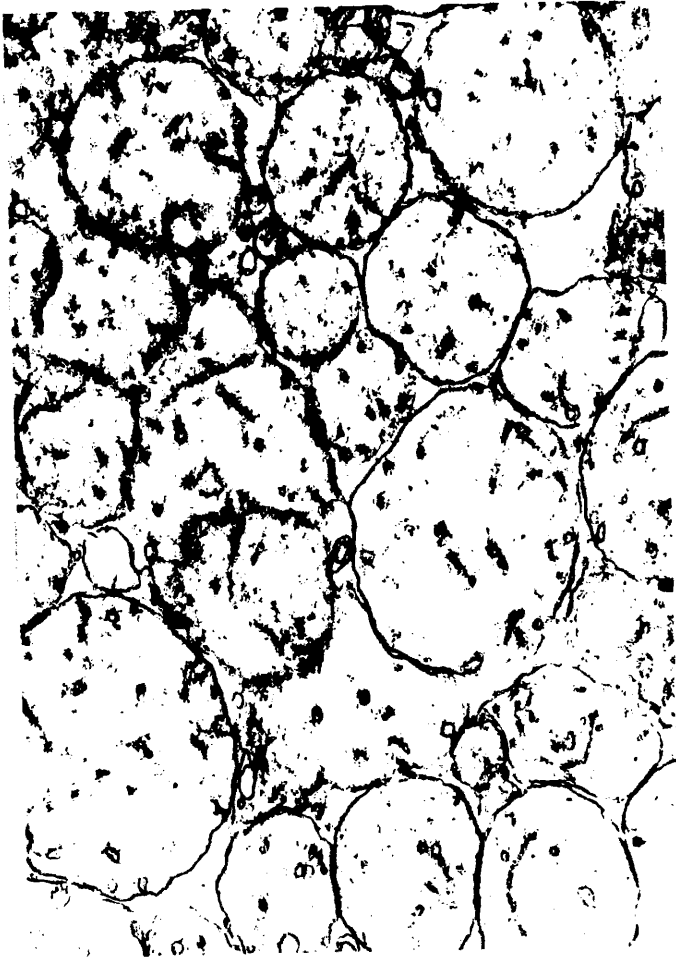


Figura 20

Figura 21. SEDIMENTO DE MEMBRANA INTERNA DESPUES DEL TRATAMIENTO CON TRITON X-100 AL 0,05%.

Sobre un fondo de material desestructurado se observan figuras semejantes a la mielina. Los sedimentos obtenidos con esta concentración de detergente no son homogéneos en cuanto a la distribución de estas figuras, por lo que existen zonas libres de ellas. La imagen corresponde a una zona central del sedimento.

Aumentos placa: 10.000
Aumentos copia: 2,25

- 119 -



Figura 21

Figura 22. SEDIMENTO DE MEMBRANA INTERNA TRAS EL TRATAMIENTO CON TRITON X-100 AL 0,05%.

Detalle de la anterior. Se observan las estructuras de aspecto membranoso con una disposición muy semejante a la mielina y que destacan sobre el fondo desestructurado.

Aumentos placa: 33.000

Aumentos copia: 2,25

-151-



Figura 22

Figura 23. SEDIMENTO DE MEMBRANAS INTERNAS TRATADAS CON TRITON X-100 AL 0,25%.

Se observa una mayor tendencia hacia la aparición de figuras abiertas sobre el fondo desestructurado en el que se aprecia la aparición de un material granuloso. Este efecto se hace más patente en la figura siguiente sin cuya consideración quizá hubiese pasado desapercibido este detalle.

Aumentos placa: 42.000

Aumentos copia: 2,25

-153-

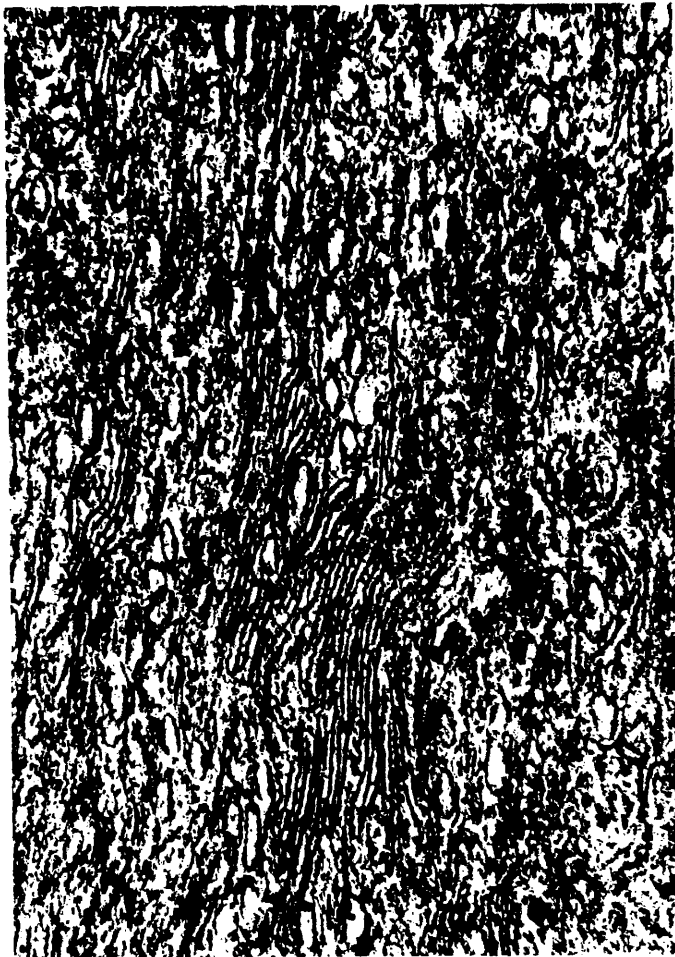


Figura 23

Figura 24. SEDIMENTO DE MEMBRANAS INTERNAS DESPUES DE SU TRATAMIENTO CON TRITON X-100 AL 0,50%.

Es evidente un mayor grado de desestructuración. Persisten las figuras de tipo vesicular, con aspecto muy diferente a las observadas a concentraciones menores de detergente. En la sustancia de fondo se destacan más las estructuras granulosas aludidas en la figura 23. Aparecen además otros cuerpos grandes de forma oval integrados por un material estructurado y de difícil interpretación aunque presentan cierta semejanza con los nucleoides de ciertos tipos de peroxisomas.

Aumentos placa: 33.000

Aumentos copia: 2,25

-155-

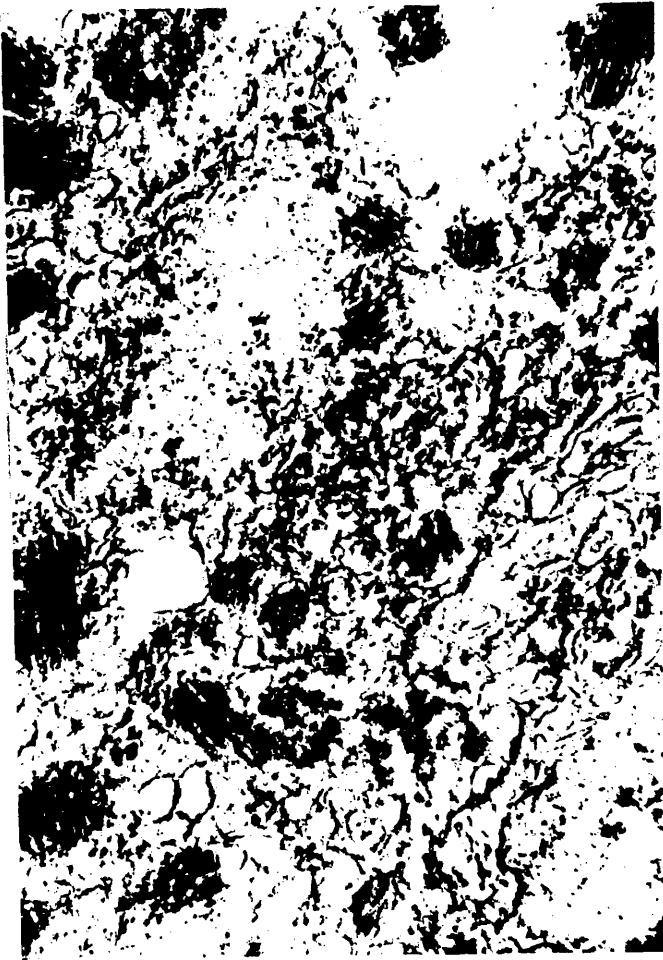


Figura 24

Figura 25. SEDIMENTO DE MEMBRANAS INTERNAS DESPUES DE SU TRATAMIENTO CON TRITON X-100 AL 2%.

Se observa únicamente un material sin estructura aparente aunque con algún grado de agregación. Esta imagen que es representativa de la totalidad del sedimento ya podía observarse en algunas áreas limitadas de los sedimentos tratados con 0,5% de detergente.

Aumentos placa: 114.000

Aumentos copia: 2,25

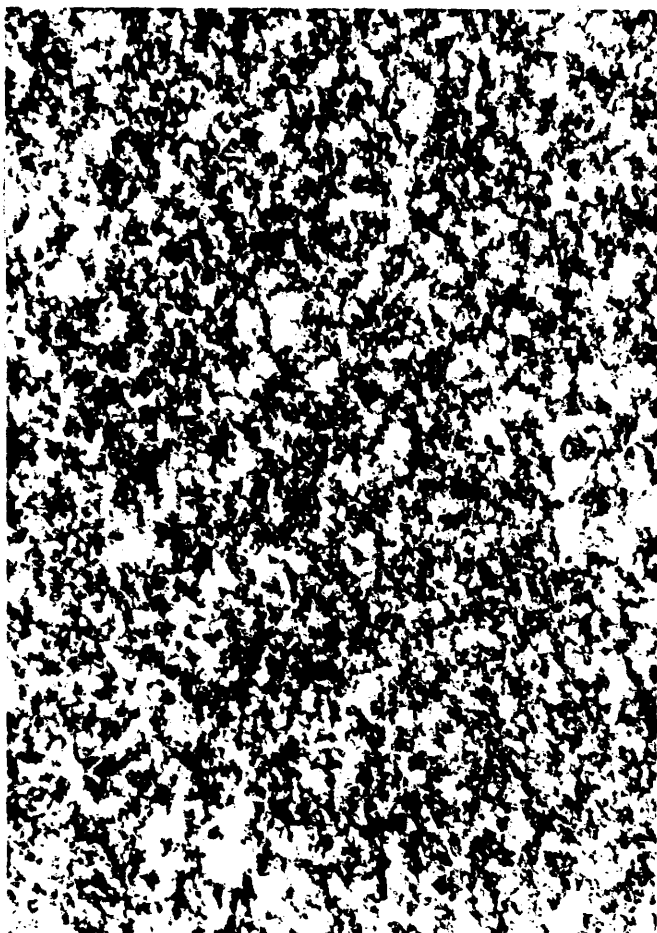


Figura 25

3.2.3 ESTUDIO DE LOS POLIPEPTIDOS SOLUBILIZADOS

Los sobrenadantes que contienen la fracción solubilizada por el detergente, así como suspensiones de membrana interna sin tratar, se preparan según técnica descrita en 2.10 para el estudio de sus polipéptidos por SDS-PAGE.

La figura 26 muestra los geles obtenidos de las distintas fracciones solubilizadas por varias concentraciones de Triton X-100 de cuyos densitogramas (fig. 27) se infiere que un aumento de la concentración del detergente va seguido por la solubilización de nuevos polipéptidos. Así se aprecian diferencias entre los densitogramas correspondientes a la concentración 0,25% (B) y 1% (C) de detergente, y entre éste y el patrón electroforético de las membranas intactas (A).

Se analizan igualmente por SDS-PAGE los sobrenadantes tras el tratamiento de la M.I.M. en diferentes condiciones de temperatura (fig. 28) y fuerza iónica (fig. 29) sin observarse diferencias apreciables en los patrones electroforéticos obtenidos. Esto no significa que no haya una mayor o menor solubilización específica de algunos polipéptidos debida a las variaciones de temperatura o fuerza iónica, pero la composición polipeptídica de la M.I.M., extraordinariamente compleja, sobrepasa la capacidad de resolución de esta técnica.

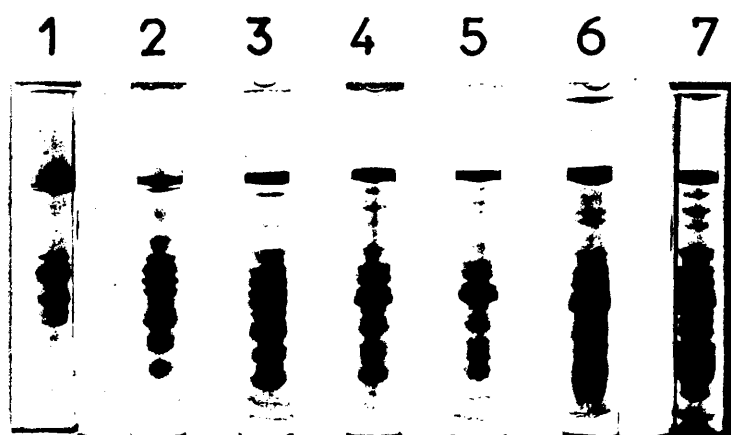


Figura 26 Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de membranas internas y de los sobrenadantes procedentes de su tratamiento con Triton X-100.

- 1.- Control
- 2.- Fracción solubilizada por 0,10 % de Triton X-100
- 3.- " " " 0,25 % " " "
- 4.- " " " 0,50 % " " "
- 5.- " " " 1,00 % " " "
- 6.- " " " 2,00 % " " "
- 7.- Membranas internas totales.

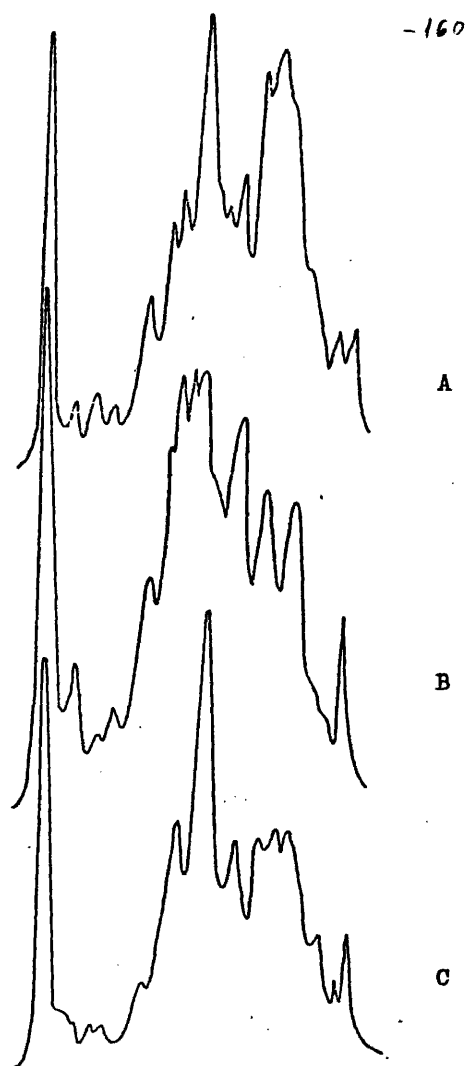


Figura 27 Densitogramas de los patrones electroforéticos obtenidos por SDS-PAGE.

A.- Membranas internas totales

B.- Fracción solubilizada por 0,25% de Triton X-100.

C.- Fracción solubilizada por 1% de Triton X-100.

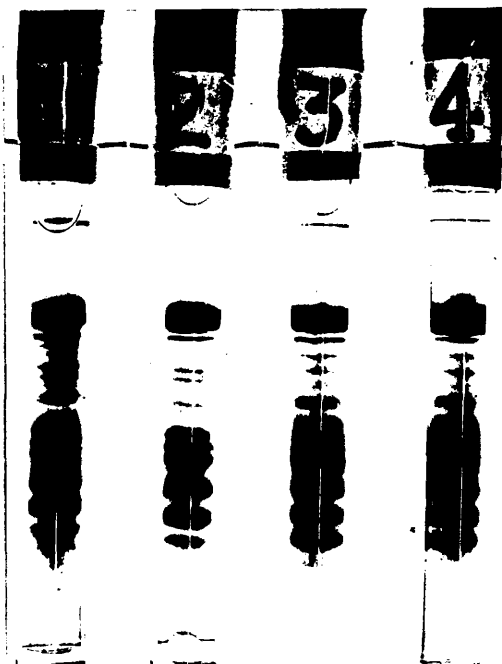


Figura 28 Electroforesis en gel de poliacrilamida de la fracción
protéica solubilizada de la membrana interna por efec-
to de la temperatura.

- 1.- Control a 4°
- 2.- Control a 37°
- 3.- Triton 0,5% a 4°
- 4.- Triton 0,5% a 37°



Figura 29 Electroforesis en gel de poliacrilamida de la fracción
protéica solubilizada de membrana interna por efecto
de la fuerza iónica.

- 1.- NaCl 50 mM
- 2.- NaCl 100 mM
- 3.- NaCl 50 mM + Triton 0,5%
- 4.- NaCl 100 mM + Triton 0,5%
- 5.- EDTA 1 mM
- 6.- EDTA 1 mM + Triton 0,5%

3.2.4 SOLUBILIZACION DE FOSFOLIPIDOS Y DE SUS ACIDOS GRASOS ASOCIADOS

El análisis cuantitativo de las diversas clases de fosfolípidos contenidos en suspensiones de membrana interna intacta y en los sobrenadantes, tras el tratamiento de las mismas con detergente, permite hacer una estimación del grado de solubilización de cada tipo de fosfolípido. Para ello los lípidos contenidos en los sobrenadantes y en suspensiones de membranas, extraídos según se indica en 2.6, se separan por cromatografía y se cuantifican como se describe en 2.8.

La Tabla XV contiene los resultados, expresados en porcentaje de solubilización de cada fosfolípido en el sobrenadante referido al contenido de los mismos en la membrana intacta. Se observa cierto grado de solubilización selectiva más acusada a 0,5% de Triton X-100. A esta concentración, el fósforo total solubilizado es el 55% mientras que la fosfatidiletanolamina lo hace en una cuantía del 31%. En estas mismas condiciones el valor superior al 100% obtenido en los diferentes ensayos para la solubilización de la cardiolipina indica que este fosfolípido se solubiliza completamente a una concentración de 0,5% de detergente, lo que parece indicar que algunas moléculas de cardiolipina estarían en principio "ocultas" o bloqueadas en la matriz lipídica de la membrana intacta y que la acción del detergente faci-

TABLA XV

Solubilización de fosfolípidos de la membrana interna mitocondrial por el Triton X-100. (Media de 3 experimentos).

	S o b r e n a d a n t e s								
	Membrana interna sin tratar		Triton X-100 0,25%		Triton X-100 0,50%				
	µgP	Porcentaje relativo	µgP	Porcentaje relativo	µgP	Porcentaje relativo	µgP	Porcentaje relativo	
Fosfatidilserina + Esfingomielina	61	(5,5%)	18	(4,0%)	23	(4,5%)	23	(4,5%)	37,7
Fosfatidilinositol	48	(4,3%)	20	(4,5%)	27	(5,2%)	27	(5,2%)	56,2
Fosfatidilcolina	434	(39,1%)	195	(43,9%)	183	(35,8%)	183	(35,8%)	42,2
Fosfatidiletanolamina	432	(39,0%)	112	(25,2%)	133	(26,0%)	133	(26,0%)	30,8
Cardiolipina	136	(12,2%)	99	(22,3%)	72,8	(28,3%)	145	(28,3%)	106,6

- 164 -

litaría la accesibilidad a éstas de los disolventes orgánicos utilizados en los procedimientos de extracción.

Los ácidos grasos asociados a los fosfolípidos solubilizados se analizan por cromatografía gas-líquido según técnica descrita en 2.9. Los resultados de la tabla XVI muestran que no hay unas diferencias acusadas entre el contenido de ácidos grasos de las membranas intactas y el del sobrenadante procedente del tratamiento de las mismas con 0,5% de Triton X-100. No obstante sí se observa una cierta diferencia en los ácidos linoléico (C 18:2) y linolénico (C 18:3) cuyo contenido relativo es ligeramente más bajo en el material solubilizado. Lo contrario se observa en el araquidónico (C 20:4).

TABLA XVI

Acidos grasos de los lípidos solubilizados por la acción del Triton X-100 0,50% (p/v) sobre la membrana interna mitocondrial.

Acidos grasos		Membranas intactas	Sobrenadante (Triton 0,5 %)
Palmítico	(C 16:0)	12,0%	10,0%
Estearico	(C 18:0)	21,0%	21,0%
Oléico	(C 18:1)	43,0%	42,0%
Linoléico	(C 18:2)	4,3%	0,70%
Linoléico	(C 18:3)	11,2%	7,50%
Araquidónico	(C 20:4)	8,5%	18,0%

3.2.5 SOLUBILIZACION DE COLESTEROL

El análisis de colesterol en los sobrenadantes procedentes del tratamiento de las membranas internas con el detergente, revela que no se produce solubilización detectable de colesterol, cuyo contenido por otra parte en la membrana interna mitocondrial es muy escaso.

3.2.6 SOLUBILIZACION DE FLAVINAS

La determinación de flavinas totales según el método descrito en 2.14 se lleva a cabo sobre suspensiones de membrana interna con una concentración de 5 mg proteína/ml y en los sobrenadantes procedentes de la centrifugación a $150,000 \times g$ de alícuotas de la suspensión de membranas tratadas con distintas concentraciones del detergente según se describe en 2.4.1. También se hace esta determinación en los sedimentos correspondientes con lo que se obtienen datos complementarios de la fracción de flavinas no solubilizada.

Los resultados expresados en porcentajes de solubilización de flavinas referidos al contenido total en membranas intactas se representan en la Tabla XVII.

La figura 30 muestra una curva de solubilización similar a la de proteínas, que se incluye con fines comparativos.

tivos, observándose que a concentraciones de detergente iguales o superiores al 0,5% (p/v) se alcanza el máximo (25-30%) en la liberación de flavinas. En todo caso el poder solubilizante del Triton X-100 sobre las flavinas es pequeño teniendo en cuenta la relativamente baja proporción de éstas solubilizadas a concentraciones altas (2%) de detergente

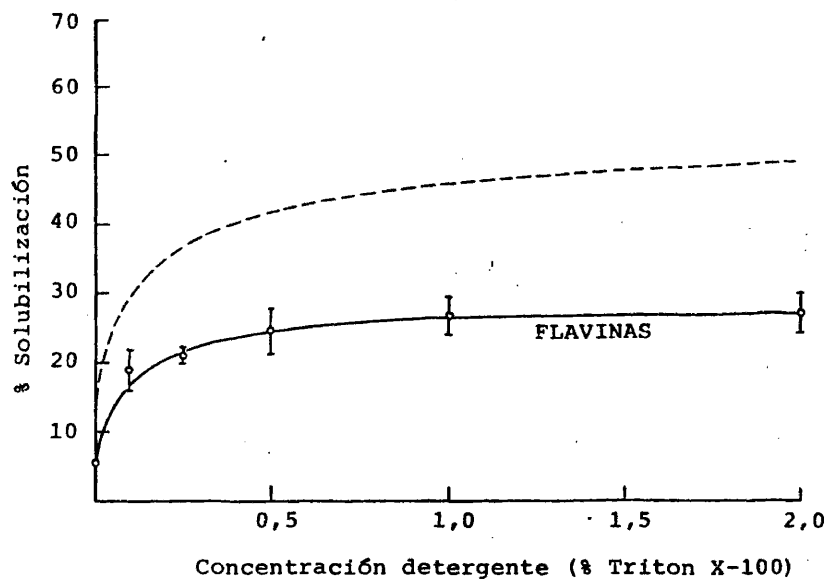


Figura 30 Solubilización de flavinas de la M.I.M. por el Triton X-100. La línea de puntos corresponde a la proteína liberada por el detergente en las mismas condiciones.

3.2.7 SOLUBILIZACION DE CROMOFOROS DE CITOCROMOS

La determinación de citocromos a, b, c₁ y c se hace por espectrofotometría diferencial, como se describe en 2.15, en la fracción de membranas solubilizada por distintas concentraciones de detergente y en su caso por concentraciones de NaCl 50 y 100 mM o EDTA 1 mM en ausencia y en presencia de 0,5% (p/v) de Triton X-100, con lo que se establece la influencia de la fuerza iónica sobre el efecto solubilizante del detergente sobre los citocromos.

La pequeña concentración de citocromos existente en la fracción solubilizada hace precisa la utilización del sistema de expansión de escala del espectrofotómetro y la ampliación de su señal por el registrador lo que introduce en algún caso cierta variabilidad en los resultados. Se realizan también las correspondientes medidas en los sedimentos para conocer el contenido en citocromos de la fracción no solubilizada, cuyo material resuspendido es causa de la alta dispersión de luz en las cubetas, lo que explica la relativa variabilidad observada en los resultados que se expresan en porcentajes de solubilización de cada citocromo referidos a su contenido en la membrana intacta.

3.2.7.1 Influencia de la concentración de detergente

La solubilización de los distintos citocromos en función de la concentración de detergente se muestra en las Tablas XVIII, XIX, XX y XXI.

El citocromo a se solubiliza siguiendo una relación casi lineal respecto a la concentración del surfactante (fig. 31).

La solubilización del citocromo b por el contrario presenta una curva parabólica similar a la de proteína t_o tal alcanzándose el máximo a concentración 1% de Triton X-100 (fig. 32). Algo similar ocurre para el citocromo c₁ (fig.33)

mientras que la curva de solubilización del citocromo c muestra que continúa la liberación de este componente para concentraciones de detergente superiores al 1% y no se alcanza tan claramente un máximo (Fig. 34).

3.2.7.2 Influencia de la fuerza iónica

La liberación de los distintos citocromos de la M.I.M. por concentraciones salinas de NaCl 50 y 100 mM y la acción de esta sal sobre la solubilización de los mismos por el Triton X-100 al 0,5% (p/v) se representa en la Tabla XXII. La solubilización de citocromo a por Triton X-100 al 0,5% (p/v) no es afectada por la concentración salina

de NaCl en ninguna de las condiciones estudiadas. Los correspondientes controles, en ausencia de detergente, tampoco muestran diferencias importantes (fig. 35).

El citocromo b tampoco es afectado por el NaCl a concentración 50 mM, pero esta concentración parece aumentar ligeramente el poder solubilizante del detergente sobre este citocromo. Por el contrario el NaCl 100 mM produce un ligero efecto solubilizante sobre el citocromo b. No ocurre así en presencia del detergente, apreciándose un incremento notable de citocromo solubilizado por el surfactante al actuar en presencia de NaCl 100 mM (fig. 36).

El NaCl 50 y 100 mM tiene su propio efecto solubilizante sobre el citocromo c₁ pero solo la concentración 100 mM influye en el efecto del Triton (fig. 37).

En el caso del citocromo c se destaca claramente el aumento de su solubilización por el NaCl 50 mM que se incrementa notablemente a 100 mM. Por su parte el poder solubilizante del Triton X-100 al 0,5% sobre el citocromo c experimenta un gran aumento con la concentración salina, dobándose con NaCl 50 mM y llegando a triplicarse con NaCl 100 mM. Este incremento se debe solamente a las concentraciones de sal como lo prueban los correspondientes controles (fig. 38). El citocromo c es particularmente sensible a las variaciones de fuerza iónica en el medio de incubación.

El EDTA por sí solo tiene un efecto prácticamente nulo sobre la liberación de citocromos, pero reduce el poder solubilizante del Triton de los mismos. Esto es más evidente en el caso de los citocromos b (fig. 36) y c₁ (fig. 37) lo que puede indicar una intervención del Ca^{++} en el proceso de solubilización de estos citocromos con Triton X-100.

Un estudio directo del efecto del Ca^{++} sobre la solubilización de citocromos no puede llevarse a cabo a causa de la formación de complejos insolubles con los ácidos biliares que se utilizan en las técnicas de determinación de citocromos.

3.2.8 SOLUBILIZACION DE HIERRO TOTAL

El hierro se determina según técnica descrita en 2.13 en las fracciones de membrana interna solubilizadas por distintas concentraciones de detergente. La figura 39 muestra el porcentaje de hierro solubilizado en función de la concentración de Triton X-100. La curva de solubilización, parabólica, muestra que el detergente a concentraciones entre 1 y 2% libera como máximo un 30% del hierro total de la M.I.M. (Tabla XXIII).

TABLA XVIII

Solubilización del citocromo a de la membrana interna
mitocondrial por efecto del Triton X-100.

Concentración

Triton X-100 % Solubilizado % No solubilizado
% (p/v)

-	4,0 ± 2,8	89,0 ± 7,3
0,10	5,2 ± 4,5	86,0 ± 4,7
0,25	13,3 ± 7,5	87,8 ± 6,1
0,50	17,7 ± 4,6	79,8 ± 7,9
1,00	36,0 ± 11,9	74,3 ± 11,1
2,00	60,3 ± 7,7	41,3 ± 6,0

(Valores \bar{x} ± ESM correspondientes a 5 experimentos)

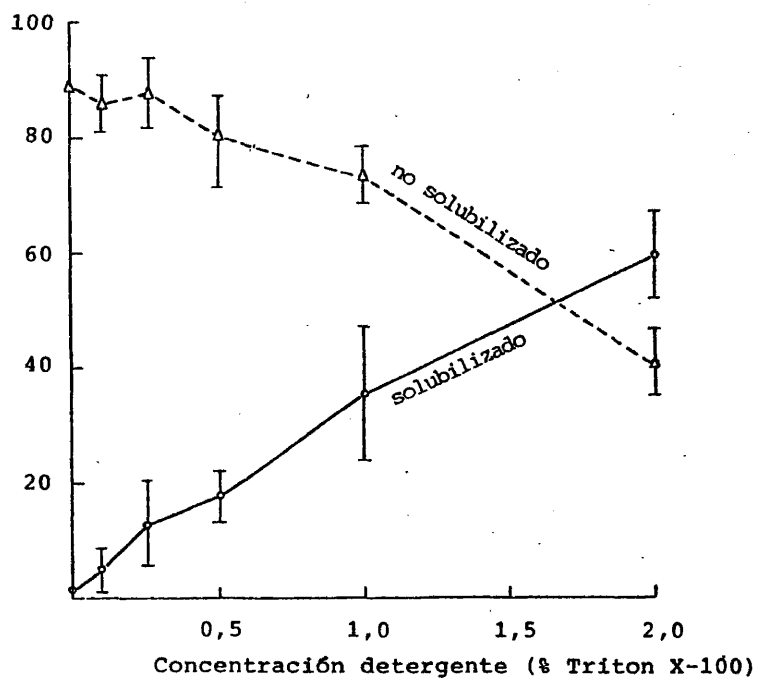


Figura 31 Solubilización de citocromo a de la M.I.M. por Triton X-100.

TABLA XIX

Solubilización del citocromo b de la membrana interna
mitocondrial por efecto del Triton X-100.

Concentración

Triton X-100

% (p/v)	% Solubilizado	% No solubilizado
-	3,9 ± 2,8	85,2 ± 13,0
0,10	8,1 ± 7,0	83,4 ± 6,8
0,25	37,1 ± 12,9	69,3 ± 9,9
0,50	55,2 ± 7,9	62,2 ± 10,3
1,00	62,7 ± 8,6	56,4 ± 11,6
2,00	70,2 ± 4,1	29,2 ± 0,3

(Valores $\bar{x} \pm$ ESM correspondientes a 5 experimentos)

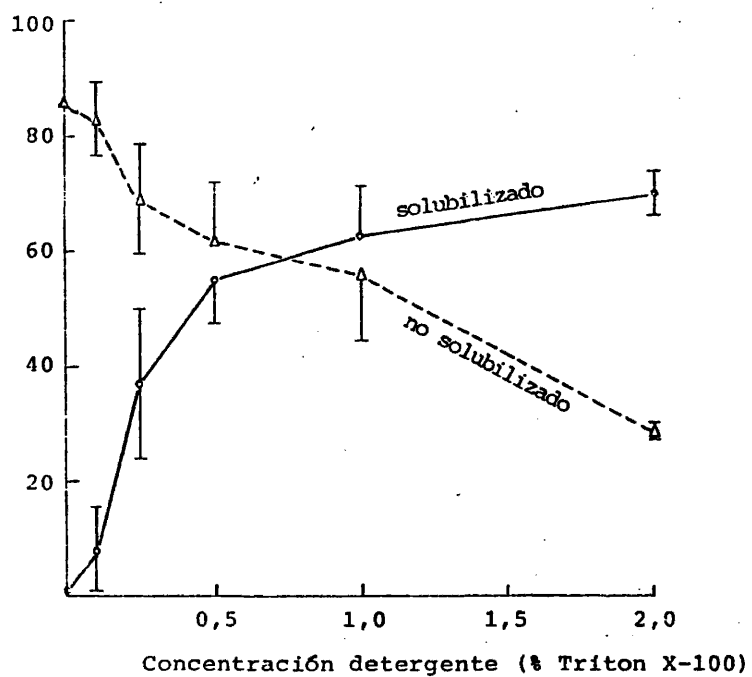


Figura 32 Solubilización de citocromo b de la M.I.M. por Triton X-100.

TABLA XX

Solubilización del citocromo c₁ de la membrana interna mitocondrial por efecto del Triton X-100.

Concentración

Triton X-100

% (p/v)	% Solubilizado	% No solubilizado
-	4,6 ± 3,1	84,2 ± 10,7
0,10	10,1 ± 6,0	61,5 ± 15,3
0,25	19,1 ± 7,4	52,6 ± 10,0
0,50	35,4 ± 10,4	42,6 ± 8,3
1,00	48,5 ± 11,7	20,8 ± 10,4
2,00	73,5 ± 1,4	36,2 ± 10,7

(Valores \bar{x} ± ESM correspondientes a 5 experimentos)

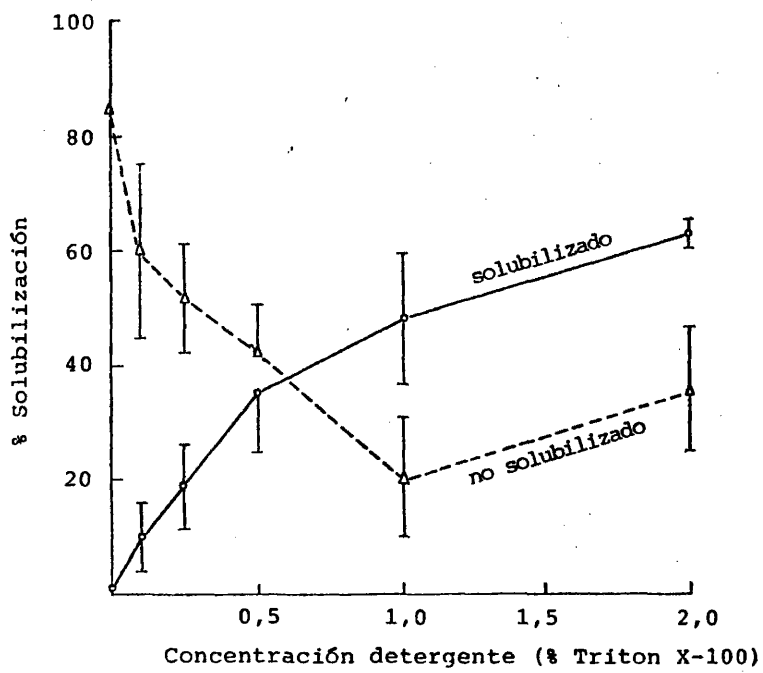


Figura 33 Solubilización de citocromo c_1 de la M.I.M. por Triton X-100.

TABLA XXI

Solubilización del citocromo c de la membrana interna mi
tocondrial por efecto del Triton X-100.

Concentración

Triton X-100

% (p/v)	% Solubilizado	% No solubilizado
-	7,1 ± 4,3	83,2 ± 5,0
0,10	8,3 ± 5,0	81,9 ± 9,0
0,25	9,2 ± 5,4	62,0 ± 12,8
0,50	19,8 ± 4,3	56,5 ± 4,8
1,00	29,0 ± 4,5	48,1 ± 5,3
2,00	51,2 ± 5,5	30,6 ± 4,2

(Valores $\bar{x} \pm$ ESM correspondientes a 5 experimentos)

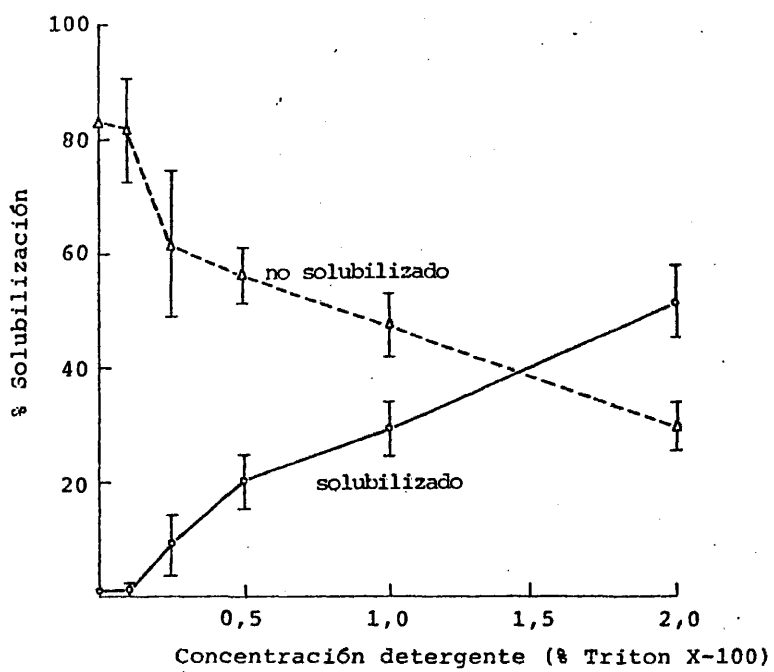


Figura 34 Solubilización de citocromo c de la M.I.M. por Triton X-100.

TABLA XXII

Solubilización de citocromos a, b, c₁ y c de la membrana interna mitocondrial. Influencia de la fuerza iónica.

Concentraciones finales en las suspensiones de membranas	% Solubilización			
	citocromo a	citocromo b	citocromo c ₁	citocromo c
Control (H ₂ O)	4,0 ± 2,8	3,9 ± 2,8	4,6 ± 3,1	8,4 ± 5,0
Control Triton 0,5% (p/v)	18,8 ± 6,2	46,5 ± 9,1	46,4 ± 9,3	31,6 ± 4,5
NaCl 50 mM	4,1 ± 2,9	3,5 ± 1,7	17,6 ± 4,3 ^c	19,7 ± 5,6
NaCl 50 mM + Triton 0,5%	17,0 ± 7,6	55,8 ± 5,6	50,3 ± 12,2	60,0 ± 11,1 ^c
NaCl 100 mM	7,8 ± 6,7	9,0 ± 5,5	30,6 ± 9,7 ^c	45,5 ± 18,2
NaCl 100 mM + Triton 0,5%	18,2 ± 5,5	67,0 ± 11,6	62,9 ± 9,3	89,0 ± 3,1 ^a
EDTA 1 mM	8,7 ± 6,4	13,5 ± 6,7	11,0 ± 9,1	4,9 ± 3,2
EDTA 1 mM + Triton 0,5%	14,8 ± 7,8	22,5 ± 8,2	14,8 ± 8,1 ^c	24,5 ± 14,0

(Valores $\bar{x} \pm$ ESM correspondientes a 5 experimentos)

Test de Student. a: $P < 0,005$; c: $P < 0,01$

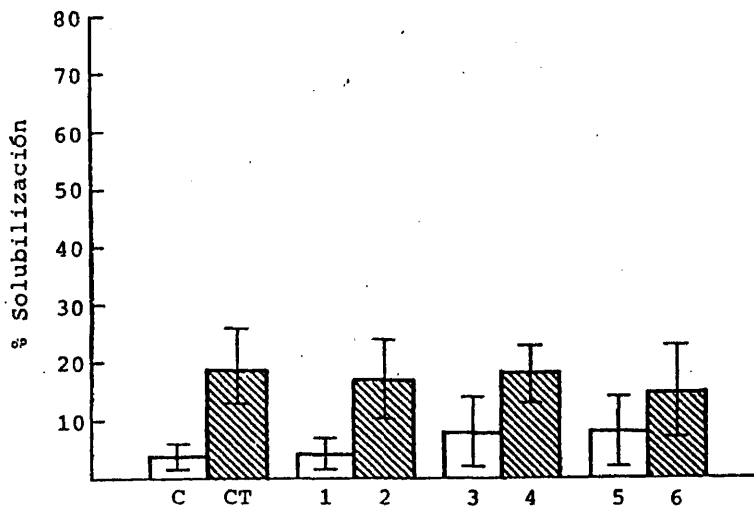


Figura 35 Influencia de la fuerza iónica en la solubilización del citocromo a. de la M.I.M.

- C Control
- CT Control Triton 0,5%
- 1 NaCl 50 mM
- 2 NaCl 50 mM + Triton 0,5%
- 3 NaCl 100 mM
- 4 NaCl 100 mM + Triton 0,5%
- 5 EDTA
- 6 EDTA + Triton 0,5%

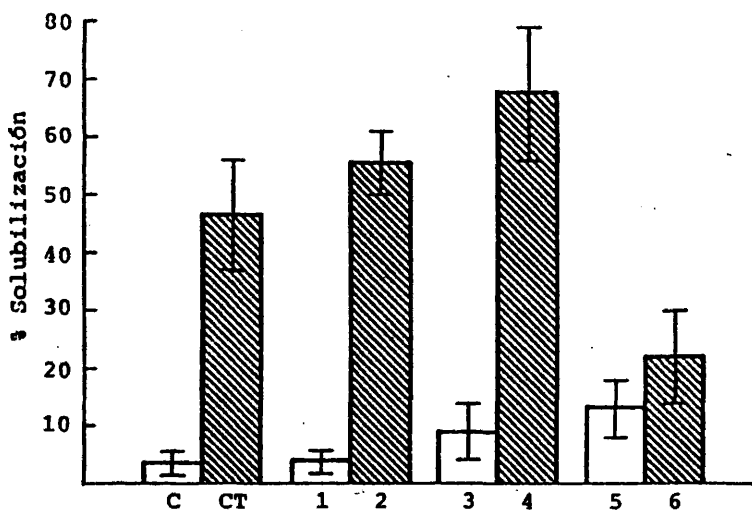


Figura 36 Influencia de la fuerza iónica en la solubilización del citocromo b de la M.I.M.

- C Control
- CT Control Triton 0,5%
- 1 NaCl 50 mM
- 2 NaCl 50 mM + Triton 0,5%
- 3 NaCl 100 mM
- 4 NaCl 100 mM + Triton 0,5%
- 5 EDTA 1 mM
- 6 EDTA 1 mM + Triton 0,5%

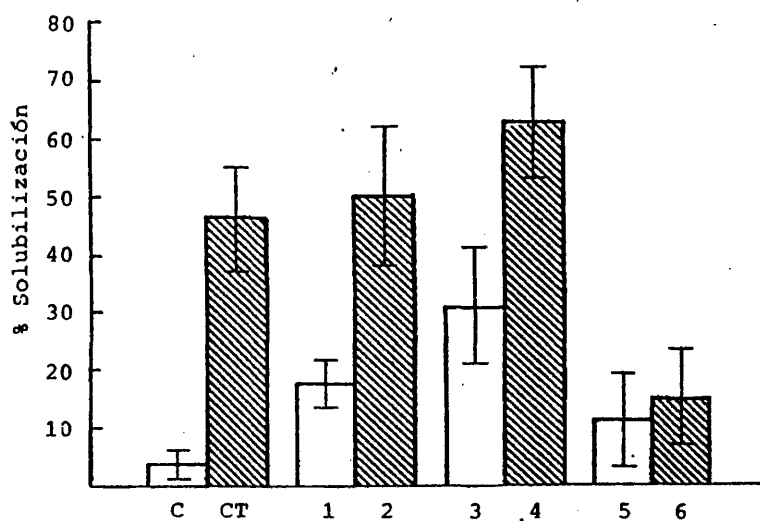


Figura 37 Influencia de la fuerza iónica en la solubilización del citocromo c_1 de la M.I.M.

- C Control
- CT Control Triton 0,5%
- 1 NaCl 50 mM
- 2 NaCl 50 mM + Triton 0,5%
- 3 NaCl 100 mM
- 4 NaCl 100 mM + Triton 0,5%
- 5 EDTA 1 mM
- 6 EDTA 1 mM + Triton 0,5%

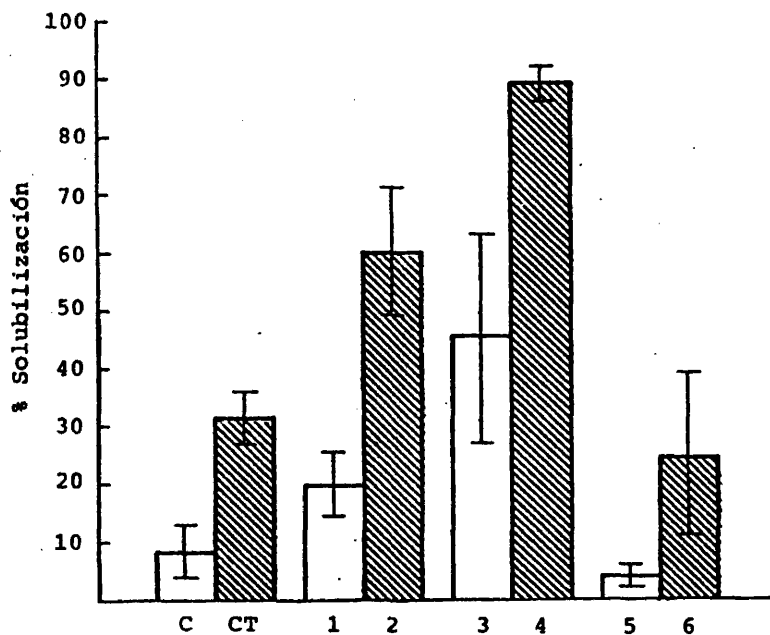


Figura 38 Influencia de la fuerza iónica en la solubilización del citocromo c de la M.I.M.

- C Control
- CT Control Triton 0,5%
- 1 NaCl 50 mM
- 2 NaCl 50 mM + Triton 0,5%
- 3 NaCl 100 mM
- 4 NaCl 100 mM + Triton 0,5%
- 5 EDTA 1 mM
- 6 EDTA 1 mM + Triton 0,5%

TABLA XXIII

Efecto del Triton X-100 sobre la solubilización del hierro de la membrana interna mitocondrial (media de 2 experimentos).

Triton X-100 % (p/v)	% Hierro solubilizado
-	1,8
0,10	11,1
0,25	20,3
0,50	25,9
1,00	29,6

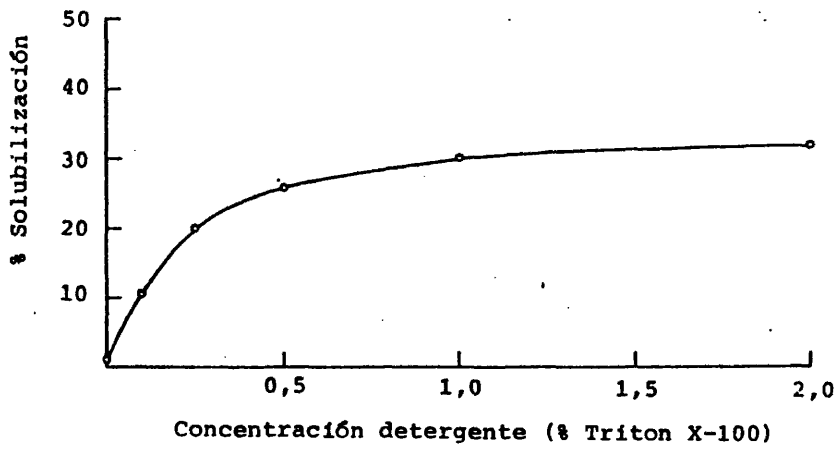


Figura 39 Solubilización de hierro de la M.I.M. en función de la concentración de Triton X-100.

3.2.9 SOLUBILIZACION DE COENZIMA Q

El coenzima Q se extrae de los sobrenadantes procedentes de la centrifugación de suspensiones de membranas tratadas con Triton X-100 a concentraciones finales entre 0,1 y 2% de detergente y se determina espectrofotométricamente según se describe en 2.16 (Tabla XXIV). La figura 40 muestra la pauta de solubilización del coenzima Q que se libera en un 40% a una concentración de 0,1% (p/v) de Triton X-100. Concentraciones de detergente entre 0,50 y 1% solubilizan entre el 80 y 90%, máxima cantidad de coenzima Q capaz de ser extraído de la M.I.M. por TritonX-100 a alta concentración (2%).

3.2.10 EFECTO DEL TRITON X-100 SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE DIVERSOS ENZIMAS DE LA MEMBRANA INTERNA

Se estudia el efecto de varias concentraciones de detergente sobre la actividad de algunos enzimas de membrana interna. Para ello alícuotas de suspensiones de M.I.M. en tampón Tris-sacarosa se tratan con Triton X-100 con objeto de obtener concentraciones finales del detergente entre 0,1 y 2% (p/v), manteniéndolas en estas condiciones a temperatura ambiente durante 30 minutos, al cabo de los cuales se ensayan las distintas actividades según las técnicas descritas en el apartado 2.17 de materiales y métodos. La tabla XXV muestra el efecto del Triton X-100 sobre las actividades enzimáticas investigadas.

TABLA XXIV

Efecto del Triton X-100 sobre la solubilización de coenzima Q de la membrana interna mitocondrial (media de 2 experimentos).

Triton X-100 % (p/v)	Coenzima Q % solubilización
-	7,5
0,10	39,8
0,25	50,2
0,50	81,0
1,00	91,0
2,00	90,5

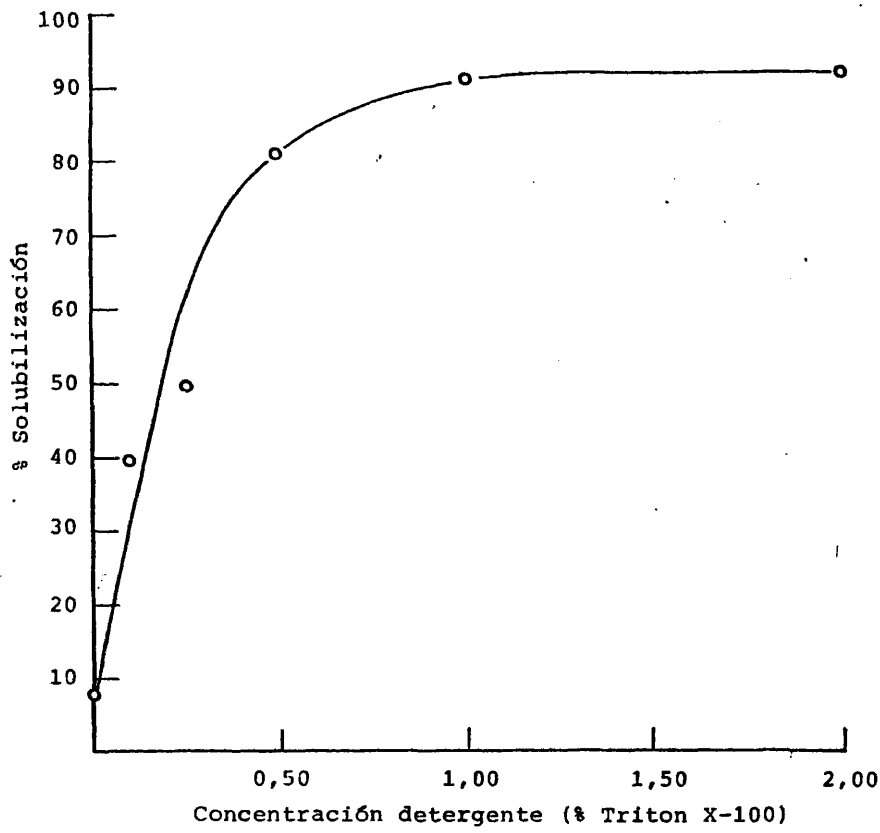


Figura 40 Efecto del Triton X-100 sobre la solubilización de coenzima Q de la M.I.M.

La variación de la actividad específica de la ATPasa de la M.I.M. en función de la concentración de TritonX-100 se muestra en la figura 41: tras un aumento inicial, a bajas concentraciones de detergente menores del 0,1%, se produce un descenso gradual de actividad a medida que aumenta la concentración de detergente hasta 1%. Para concentraciones mayores del surfactante la actividad específica de la ATPasa tiende a restaurarse, llegando a alcan-
zar valores próximos al inicial a una concentración de 2% de Triton.

La citocromo c oxidasa se comporta de forma similar a la ATPasa con concentraciones de detergente menores de 0,25% que incrementan la actividad específica de las membranas, mientras que concentraciones superiores tienden a disminuir este valor o a aumentarlo en función de la cantidad de Triton presente en la suspensión de membranas (fig. 42).

La succinato : coenzima Q oxidorreductasa de la M.I.M. parece ser muy sensible a pequeñas concentraciones de detergente y su actividad específica disminuye un 80% ya con 0,1% de Triton X-100. Sin embargo concentraciones más altas conducen a una restauración de la actividad (fig. 43) que es completa a 2% de detergente como en el caso de la ATPasa.

Se investigan otras dos actividades características de la membrana interna, succinato : citocromo c reductasa (fig. 44) y NADH : citocromo c reductasa sensible a la rotenona (fig. 45). Ambas actividades son rápidamente destruidas por pequeñas cantidades de detergente y nada de ellas se restaura por posterior aumento de la concentración de Triton X-100.

3.2.11 SOLUBILIZACIÓN DE DIVERSAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LA MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL

Todas las actividades enzimáticas ensayadas se deben a proteínas integrales incluidas en la matriz lipídica de la M.I.M.. La posibilidad de que alguna de ellas pueda solubilizarse por acción del detergente se investiga centrifugando a $150.000 \times g$, 1 hora, suspensiones de membranas tratadas con distintas concentraciones de detergente. En los sobrenadantes se ensayan las correspondientes actividades enzimáticas en función de la concentración de detergente (Tabla XXVI).

En el caso de la ATPasa (fig. 41) la actividad enzimática del sobrenadante aumenta casi linealmente con el aumento de concentración de Triton X-100. Los valores son del mismo orden de magnitud que los de la suspensión de membranas.

La citocromo c oxidasa de los sobrenadantes muestra igualmente un incremento lineal de actividad a medida que aumenta la concentración del detergente (fig. 42) pero en este caso las actividades de los sobrenadantes son solo una pequeña fracción de las que muestran las suspensiones de membranas.

La succinato : coenzima Q oxidoreductasa presenta el caso contrario al anterior puesto que las actividades específicas de los sobrenadantes son mucho más altas (más de 14 veces) que las correspondientes suspensiones de membranas tratadas con detergente (fig. 43). La actividad aumenta casi linealmente hasta concentraciones de 0,5% de Triton X-100 para disminuir a medida que aumenta la concentración del detergente.

Finalmente, como podía esperarse por su naturaleza compleja, la succinato : citocromo c reductasa (fig. 44) y la NADH : citocromo c reductasa sensible a la rotenona (fig. 45) apenas exhiben actividad en los sobrenadantes recuperándose en ellos tan solo fracciones despreciables de la actividad inicial.

TABLA XXV

Actividades enzimáticas de la membrana interna mitocondrial en presencia de Triton X-100.

- E 1. ATPasa
- E 2. Citocromo c oxidasa
- E 3. Succinato : coenzima Q oxidoreductasa
- E 4. Succinato : citocromo c reductasa
- E 5. NADH : citocromo c reductasa sensible a la rotenona

Concentración Triton X-100 % (p/v)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (micromoles de sustrato transformado por minuto por miligramo de proteína)				
	E 1	E 2	E 3	E 4	E 5
-	0,187 ± 0,018 (5)	0,352 ± 0,012 (4)	0,018 ± 0,002 (4)	0,437 ± 0,063 (4)	0,267 ± 0,065 (5)
0,10	0,232 ± 0,061 (5)	0,789 ± 0,169 (4)	0,003 ± 0,001 (4)	0,363 ± 0,116 (4)	0,041 ± 0,010 (5)
0,25	0,128 ± 0,030 (5)	0,852 ± 0,084 (4)	0,005 ± 0,001 (4)	0,229 ± 0,081 (4)	0,016 ± 0,008 (5)
0,50	0,075 ± 0,015 (5)	0,494 ± 0,059 (4)	0,007 ± 0,002 (4)	0,061 ± 0,022 (4)	0,005 ± 0,002 (5)
1,00	0,075 ± 0,003 (5)	0,785 ± 0,067 (4)	0,010 ± 0,004 (4)	0,068 ± 0,038 (4)	0,010 ± 0,001 (5)
2,00	0,166 ± 0,034 (5)	0,364 ± 0,059 (4)	0,018 ± 0,003 (4)	0,081 ± 0,032 (4)	0,002 ± 0,001 (5)

Valores \bar{x} ± ESM correspondientes al número de experimentos indicado entre paréntesis.

TABLA XXVI

Actividades enzimáticas en las fracciones de membrana interna mitocondrial solubilizadas por Triton X-100.

- E 1. ATPasa
- E 2. Citocromo c oxidasa
- E 3. Succinato : coenzima Q oxidoreductasa
- E 4. Succinato : citocromo c reductasa
- E 5. NADH : citocromo c reductasa sensible a la rotenona

ACTIVIDAD ESPECIFICA

Concentración	(micromoles de sustrato transformado por minuto por miligramo de proteína)				
% (p/v)	E 1	E 2	E 3	E 4	E 5
-	0,033 ± 0,008 (5)	0,021 ± 0,002 (4)	0,004 ± 0,002 (4)	0,009 ± 0,005 (4)	0,0001 ± 0,0001 (5)
0,10	0,052 ± 0,007 (5)	0,059 ± 0,014 (4)	0,035 ± 0,013 (4)	0,041 ± 0,016 (4)	0,004 ± 0,002 (5)
0,25	0,065 ± 0,007 (5)	0,019 ± 0,001 (4)	0,060 ± 0,019 (4)	0,028 ± 0,008 (4)	0,003 ± 0,002 (5)
0,50	0,097 ± 0,005 (5)	0,052 ± 0,004 (4)	0,095 ± 0,013 (4)	0,067 ± 0,013 (4)	0,015 ± 0,003 (5)
1,00	0,166 ± 0,021 (5)	0,119 ± 0,011 (4)	0,074 ± 0,012 (4)	0,071 ± 0,030 (4)	0,040 ± 0,002 (5)
2,00	0,226 ± 0,025 (5)	0,233 ± 0,002 (4)	0,050 ± 0,004 (4)	0,028 ± 0,012 (4)	0,009 ± 0,005 (5)

Valores $\bar{x} \pm$ ESM correspondientes al número de experimentos indicado entre paréntesis.

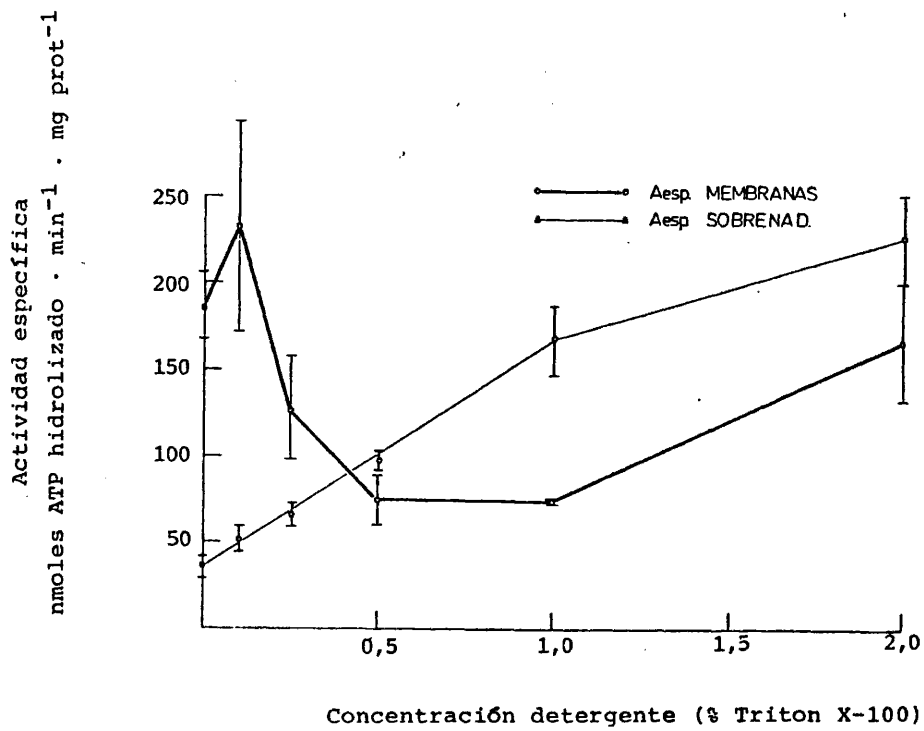


Figura 41. Variación de la actividad específica de la ATPasa en función de la concentración de Triton X-100.

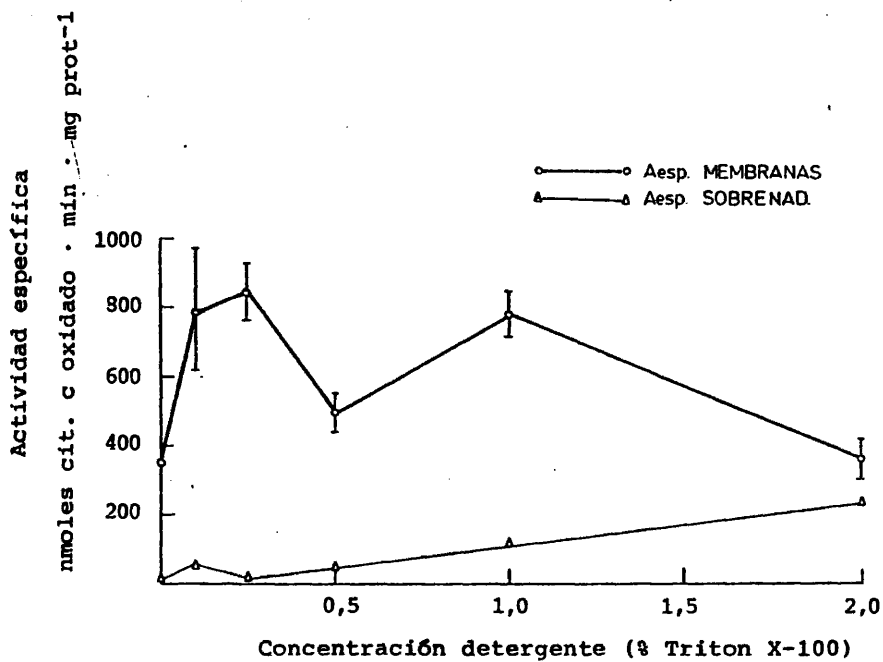


Figura 42 Variación de la actividad específica de la citocromo c oxidasa en función de la concentración de Triton X-100

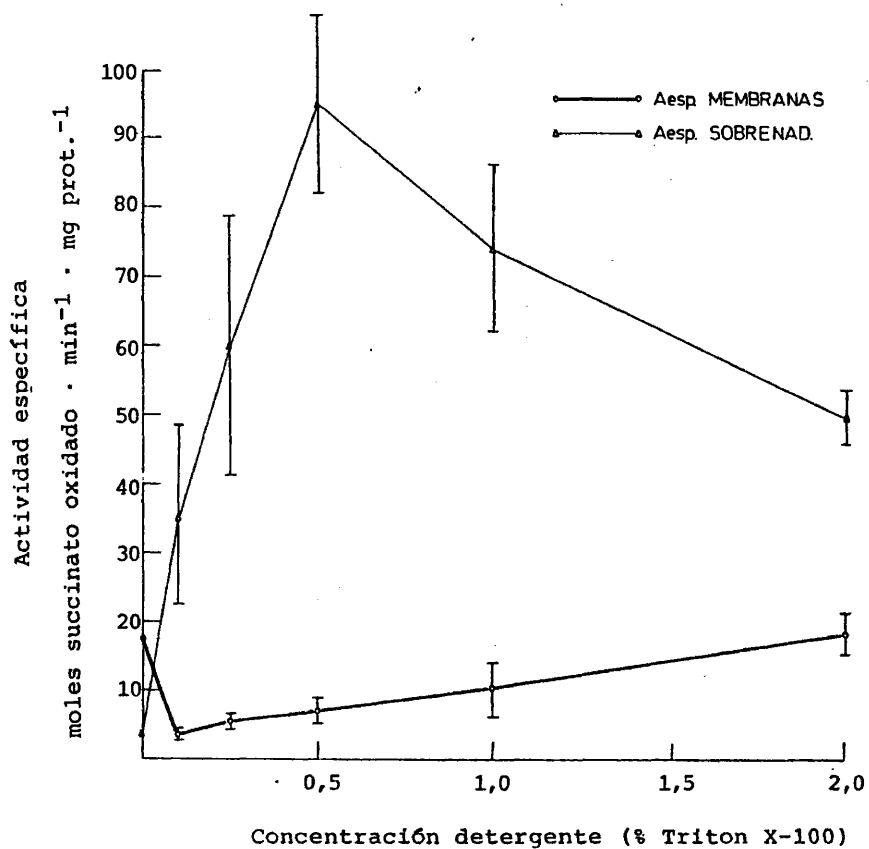


Figura 43 Variación de la actividad específica de la succinato : coenzima Q oxidorreductasa en función de la concentración de Triton X-100.

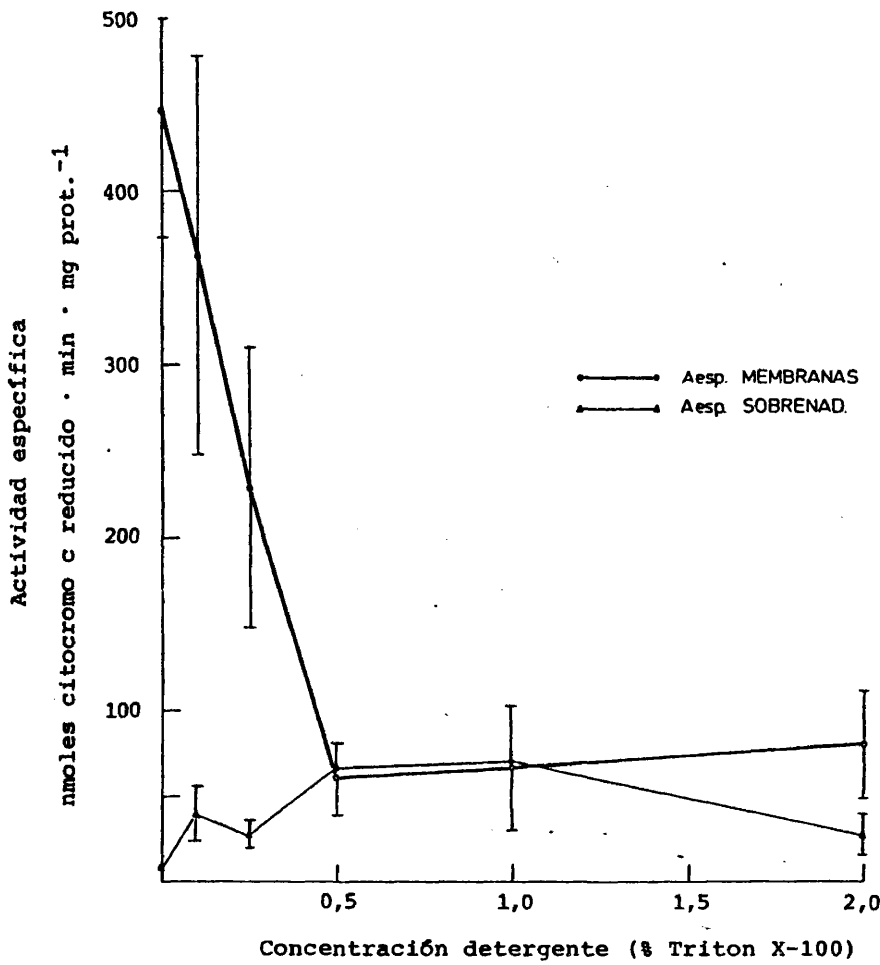


Figura 44 Variación de la actividad específica de la succinato : citocromo c reductasa en función de la concentración de Triton X-100.

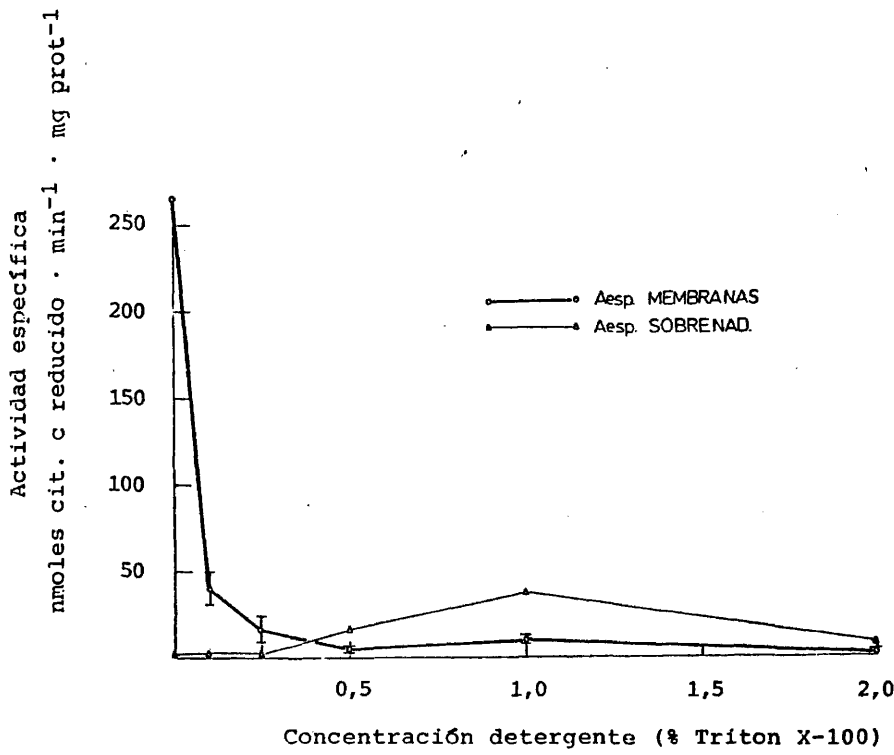


Figura 45 Variación de la actividad específica de la NADH : citocromo c reductasa sensible a la rotenona en función de la concentración de Triton X-100.

4. DISCUSSION

4.1 CARACTERIZACION DEL SISTEMA ESTUDIADO

La pureza de nuestras preparaciones de membrana interna se constata por los ensayos de algunos enzimas marcadores propios de la M.I.M. (ATPasa, citocromoxidasa), y su grado de contaminación por matriz y membrana externa investigando las actividades de la malato deshidrogenasa (MDH) y NADH : citocromo c reductasa insensible a la rotenona, respectivamente. La tabla siguiente muestra los porcentajes de actividad de estos enzimas en los sobrenadantes y sedimentos procedentes de la purificación de los mitoplastos, como se describe en 2.3.2, referidos al total hallado en esta fracción mitocondrial:

Fracción	Proteína	Citocromo oxidasa	ATPasa	MDH
Mitoplastos	100%	100%	100%	100%
Sedimentos	53%	94%	82%	10%
Sobrenadante	47%	6%	18%	90%

La actividad NADH : citocromo c reductasa insensible a la rotenona apenas se aprecia, por lo que la contaminación con membrana externa es prácticamente nula.

Las micrografías electrónicas de las preparaciones de M.I.M. (fig. 20) confirman con su aspecto típico y homogéneo la pureza de las mismas en concordancia con el criterio bioquímico.

La Tabla XXVII contiene algunos parámetros característicos de las preparaciones de membrana interna obtenidas. Se incluyen como comparación algunos valores encontrados en la bibliografía al respecto.

TABLA XXVII

Parámetros característicos de nuestras preparaciones de membrana interna mitocondrial

	Otros valores hallados en la bibliografía (referencias entre paréntesis)
Fósforo lipídico	5 (127), 11 (271)
Cociente proteína/fosfolípido	8 (127), 3,6 (271), 2,7 (84)
<u>Contenido en fosfolípidos</u>	
Fosfatidilserina + Esfingomielina	3,4 (273)
Fosfatidilinositol	5,9 (273)
Fosfatidilcolina	45,4 (273), 41 (84)
Fosfatidiletanolamina	25,3 (273), 33 (84)
Cardiolipina	17,4 (273), 15 (84)
<u>Componentes de la cadena transportadora de electrones</u>	
Flavinas totales	0,720 (272), 3,3 (274)
Ubiquinona	2,100 (272), 4,0 (84), 1,7 (274)
Citocromo a	0,420 (272), 0,300 (127), 0,591 (274)
Citocromo b	0,180 (272), 0,270 (127), 0,500 (274)
Citocromo c1	0,340 (272), 0,275 (127), 0,425 (274)
Citocromo c	0,185 (127), 0,350 (274)
Hierro total	(c + c1)
<u>Actividades enzimáticas (Aesp. en $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1}$)</u>	
ATPasa	0,310 (127)
Citocromo c oxidasa	0,400 (127)
Succinato : citocromo c reductasa	
Succinato : CoQ oxidoreductasa	
NADH : cit. c reductasa sensible a rotenona	

4.2 MECANISMO DE ACCION DEL TRITON X-100

La solubilización de bicapas lipídicas por detergentes (155-165) así como la unión de los mismos a proteínas en sistemas sencillos detergente-proteína-agua (151,166-171) han sido estudiados con detalle y caracterizados desde el punto de vista físico-químico.

Las membranas biológicas y en especial las mitocondriales constituyen mezclas extremadamente complejas si se comparan con los sistemas simples lípido-proteína. No obstante los principios generales de la acción del detergente para los sistemas modelo de membrana pueden ser aplicados a las biomembranas. Becker y col. (203) y Kwant y Seeman (275) han estudiado los efectos de la unión de surfactantes a las mismas.

Es un hecho aceptado que el detergente se une a las membranas ya a muy bajas concentraciones, sin que en principio se produzca lisis ni solubilización de las mismas. En sistemas modelo de bicapas lipídicas y proteínas esta unión produce modificaciones y cambios en las propiedades de las membranas, que implican entre otras fluidificación (158), disminución de la densidad (202,203) y alteraciones de la permeabilidad, así como fusión de membranas (276). La unión de cantidades crecientes de detergente llega a producir la lisis de la membrana cuando se alcanza cierto límite de saturación (208-210), comenzando su desintegración gradual al

aumentar la concentración del surfactante, de modo análogo a como ocurre con bicapas lipídicas puras.

Nuestros datos físico-químicos y ultraestructurales pueden interpretarse en términos de una disociación gradual de las membranas mitocondriales al aumentar la concentración del detergente. Esta generalización se hace fundamentalmente en base a experimentos realizados con suspensiones de membranas de una concentración de 5 mg proteína/ml a la cual el detergente libre en disolución se encuentra prácticamente en su totalidad en forma de monómero (36).

En nuestro caso, a la concentración más baja de detergente utilizada (0,05%) tiene lugar ya la lisis en una considerable proporción (figs. 20-22). Sin embargo "lisis" no significa solubilización simultánea, puesto que a concentraciones bajas de Triton X-100 (0,1%) la proporción de los componentes de membrana solubilizados es relativamente baja (fig. 13). A medida que aumenta la cantidad de detergente añadido, el proceso de lisis continúa junto con solubilización progresiva de distintos componentes de membrana.

La lisis de las membranas internas conlleva importantes modificaciones morfológicas en el aspecto del material de M.I.M. no solubilizado (figs. 20-25), en función de la concentración de detergente. Sin embargo las micrografías electrónicas de los sedimentos correspondientes al tratamiento

de las membranas externas con concentraciones crecientes de Triton X-100 (figs. 7-9) apenas presentan diferencias entre ellas.

De acuerdo con las micrografías electrónicas, la lisis de la membrana interna es completa con concentraciones de Triton X-100 a partir de 0,5% (p/v) mientras que en el caso de la membrana externa se aprecia, tras su tratamiento con 1% del detergente, la persistencia en el sedimento de cierta clase de material estructurado.

Es interesante comparar estas observaciones morfológicas con los datos químicos de solubilización de componentes de membrana. Para la M.I.M. la máxima extensión de la lisis corresponde a la máxima solubilización de proteínas y fósforo lipídico (fig. 13). Por el contrario en la membrana externa no se alcanza una meseta tan clara en la curva de solubilización (fig. 4), y de la observación de las micrografías electrónicas de los sedimentos, correspondientes al tratamiento de las mismas con 1% de Triton X-100, tampoco puede afirmarse rotundamente la completa desestructuración de este material no solubilizado (fig. 9).

Se ha demostrado que el detergente interacciona con la membrana en forma de monómero y no como micela (168-170,203). En presencia de membranas la concentración de equilibrio del Triton X-100 libre permanece por debajo o igual a la CMC

mientras que el resto del detergente se une a las membranas o a componentes liberados de las mismas (202,203). El grado de solubilización depende de la cantidad de detergente unido a la membrana y por tanto se relaciona con el valor del cociente detergente unido/membrana. Esta relación es con frecuencia difícil de determinar, por lo que en la práctica, y cuando el detergente no se encuentra en gran exceso, el grado de solubilización se correlaciona con el cociente detergente total/membrana, especialmente si la concentración de membranas es relativamente alta (superior a 2 mg proteína/ml).

De los patrones de solubilización obtenidos para las membranas externas (figs. 3,4) e internas (figs. 12,13) con Triton X-100, se deduce que para la evaluación y reproducibilidad de los resultados no basta con establecer solamente las concentraciones finales del detergente, sino que además debe precisarse la concentración de membranas en suspensión.

Helenius y Simons (36) han recogido algunos datos de las cantidades de Triton X-100, SDS y desoxicolato (detergentes representativos de cada uno de los principales grupos de anfífilos solubles), que se necesitan para solubilizar varias membranas biológicas y utilizan la relación detergente/lípido (p/p) como parámetro para indicar el grado de máxima solubilización de las membranas. Los efectos solubilizantes de los distintos detergentes sobre las mismas pueden ser así comparados en base a este valor.

Nuestros experimentos de solubilización de la M.I.M. con los tres detergentes citados (figs. 12,13,18,19), e investigaciones preliminares realizadas en nuestro laboratorio (277) sobre el efecto de los mismos en la solubilización de otras membranas (fracción microsomal de hígado de rata y membranas de eritrocitos humanos), nos han llevado a considerar más adecuado y práctico el valor de la relación detergente/proteína como parámetro de referencia en los procesos de solubilización de membranas por detergentes en los que, según nuestros resultados, se obtienen patrones regulares de solubilización protéica.

En todo caso, y para obtener resultados reproducibles, son críticas tanto la concentración del detergente como la de membranas. Esto no ha sido siempre tenido en cuenta en los datos que se encuentran en la literatura al respecto, donde se observa con frecuencia que solamente se cita la concentración final de detergente omitiendo la de membranas, lo que dificulta la comparación de resultados obtenidos por distintos investigadores. La relación detergente/proteína que proponemos podría utilizarse como parámetro para determinar la máxima solubilización de la membrana y su uso sistemático posibilitaría la comparación de los resultados obtenidos por diferentes laboratorios.

La solubilización, o, desde otro punto de vista, la desestructuración de la membrana podría ser interpretada

como una transición de fase laminar→micelar al producirse una saturación de la membrana por el detergente cuando este sobrepasa la concentración lítica. Se forman así micelas mixtas de fosfolípido-detergente-proteína cuya estructura compleja no es bien conocida. Los métodos usuales de análisis y aislamiento de componentes de membrana como cromatografía de filtración por gel, cromatografía de intercambio iónico, centrifugación en gradiente, métodos electroforéticos, isoelectroenfoque, microscopía electrónica, etc., proporcionan una información pobre sobre la composición y estructura de los complejos liberados de la membrana durante la fase de transición y etapas intermedias en el proceso de solubilización. Probablemente esto es debido a las variaciones de la concentración de monómero libre en equilibrio en las mezclas de detergente y membranas durante el procedimiento analítico, lo que ocasiona cambios de composición en los complejos a causa de las variaciones de la cantidad de detergente unido a los componentes de la membrana. Sin embargo existen pruebas de que al menos parte de las proteínas son liberadas como complejos lipoproteína-detergente (202,203) cuya proporción relativa de componentes depende de la cantidad de detergente unido. El cociente proteína solubilizada/lípido solubilizado, dependiente de la concentración de Triton X-100, podría constituir un parámetro que reflejaría la composición del material liberado.

En tanto que la solubilización por detergentes de sistemas modelo formados por bicapas lipídicas puras se alcanza con la formación de micelas mixtas, el proceso, mucho más complejo para las membranas mitocondriales, puede seguirse de algún modo midiendo el aumento de material no sedimentable y la desaparición de imágenes laminares en el microscopio electrónico.

Coleman (237) en experimentos de solubilización de membranas de eritrocitos ha observado que la imagen trilaminar de éstas se conserva en preparaciones con un alto grado de deslipidización. En nuestros experimentos, los estudios de microscopía electrónica en el material no solubilizado de membrana interna muestran que tales imágenes todavía se conservan a la concentración de 0,25% de Triton X-100 (fig. 23) en la que la proporción de fósforo lipídico solubilizado es del 50%. Sin embargo a 0,50% de detergente, cuando se ha solubilizado un 60% de fosfolípido (fig. 13), los sedimentos de membrana interna ya no presentan imágenes trilaminares (fig. 24). En las membranas externas por el contrario, estas figuras persisten en áreas muy reducidas correspondientes a sedimentos muy afectados por el detergente, pero hay que señalar que en este caso sólo se solubiliza un 40% de fosfolípido (figs. 4,7-9).

Cuando la concentración de detergente en la suspensión de membranas es mayor que la requerida para inducir la

transición de fase laminar-micelar, tiene lugar la separación de los lípidos y las proteínas. Con el aumento de concentración de Triton X-100 se llega a un punto en que el detergente está en cantidad suficiente para saturar la capacidad de unión en las proteínas y fosfolípidos por separado, de manera que se originan complejos lípido-detergente y proteína-detergente. Estos últimos suelen ser heterogéneos respecto a su contenido en proteína, detergente y eventualmente fosfolípidos, lo que explica su diferente comportamiento en la centrifugación.

En nuestras preparaciones de membrana interna este fenómeno parece tener lugar a partir de la concentración 0,25 % de Triton X-100, cuando la proporción de fósforo lipídico solubilizado es superior a la de proteína solubilizada. Hay que destacar que por encima de este punto la desorganización de la membrana interna es total (fig. 24), mientras que la misma concentración de detergente conserva cierto tipo de estructuración en el material no solubilizado de membrana externa, según se ha discutido anteriormente (figs. 8,9).

Los patrones de solubilización de fosfolípidos por el Triton X-100, paralelos a los de proteínas (figs. 3,4,12,13) sugieren que al menos una parte de las proteínas solubilizadas de la membrana podrían estar en forma de complejos lípido-proteína (142). La fase de centrifugación a que se some-

ten nuestras suspensiones de membrana tratadas con Triton X-100 a 150.000×g durante 1 hora (rotor Beckman 50 Ti) contribuye a la separación de los agregados complejos ricos en proteína y los complejos lipoprotéicos que por su contenido más bajo en proteína presentan menor densidad y permanecen en el sobrenadante. Proteínas con mayor tendencia a la auto agregación formarían complejos pesados sedimentables en estas condiciones, por lo que el material granular encontrado en los sedimentos de membrana interna con concentraciones de Triton X-100 superiores a 0,5% corresponderían en su mayor parte a complejos enriquecidos en proteína. El aspecto morfológico de estos agregados es similar al de los descritos por Helenius y Söderlund (202) con membranas del virus SF.

No obstante habría que señalar que los criterios de "solubilización", en general, son ciertamente arbitrarios (239), máxime cuando el coeficiente de sedimentación de los complejos (lipo)-proteína-detergente depende, además del tamaño y densidad de los mismos, de las condiciones de centrifugación (densidad y viscosidad del medio, tipo de rotor utilizado, etc.).

El detergente aniónico SDS es mucho más efectivo en la solubilización de la M.I.M. (fig. 18) que el Triton X-100 a causa de la carga del grupo hidrófilo y la longitud y tamaño de su parte apolar constituida por una cadena alquílica

saturada y flexible, pero produce cambios conformacionales drásticos, desnaturalización (172-175) y disociación de las proteínas oligoméricas en complejos SDS-polipéptido cuyo tamaño es proporcional al peso molecular del polipéptido (176).

Por su parte el esqueleto ciclopentanoperhidrofenantrénico que constituye el grupo apolar del desoxicolato es voluminoso y rígido, no puede penetrar en las grietas de la superficie de las proteínas y su poder solubilizante sobre éstas en la M.I.M. (fig. 19) está notablemente reducido respecto al del SDS. Otro tanto parece ocurrir con el Triton X-100 respecto a su parte apolar (el resto *p-t*-octilfenílico) aunque este detergente es más efectivo en la solubilización de proteínas que el desoxicolato.

Los experimentos de solubilización de membranas del virus SF (182,194,202) con Triton X-100 sugieren que este detergente interacciona predominantemente por su grupo *p-t*-octilfenílico con la región apolar hidrofóbica de la membrana. Se produce así la sustitución de moléculas lipídicas de la bicapa, en contacto con las zonas hidrofóbicas de proteínas integrales de membrana, por moléculas de detergente que al interaccionar con la zona hidrofóbica de esas proteínas mantienen su apolaridad y orientación, imitando en muchos casos el entorno lipídico natural que las rodeaba en la membrana, por lo que puede conservarse la actividad biológica en las proteínas solubilizadas por este detergente (217).

A la vista de lo expuesto, el proceso de solubilización de la M.I.M. con Triton X-100 implica fundamentalmente las siguientes etapas:

1. Unión del detergente a la membrana.
2. Lisis de la membrana.
3. Solubilización de la membrana (transición de fase laminar→micelar).
4. Separación (en determinadas condiciones de centrifugación) de micelas enriquecidas en lípido y complejos enriquecidos en proteína.

Tal mecanismo está de acuerdo con el propuesto por Hele^unius y Simons (36) en un esquema general de solubilización de membranas por detergentes. Habría que señalar sin embargo que las diferentes etapas mencionadas no tienen necesariamente que transcurrir cronológicamente, sino que algunas y quizá todas pueden tener lugar simultáneamente. Por ejemplo, es bien conocido que la etapa lítica va acompañada por un gran aumento de la unión de detergente (203,275).

4.3 COMPORTAMIENTO DE LAS MEMBRANAS INTERNAS Y EXTERNAS FRENTE AL TRITON X-100. SELECTIVIDAD.

Las membranas interna y externa de la mitocondria difieren por su biogénesis, ultraestructura, composición química y complejidad funcional. Su comportamiento frente al Triton X-100 es también considerablemente diferente. Algunas de las diferencias observadas pueden interpretarse desde el punto de vista de su diferente composición química, recopilada por Quinn (271).

Así, en las membranas externas se solubiliza una proporción de proteína ligeramente mayor que en las membranas internas, mientras que con el fósforo lipídico ocurre lo contrario. Hay que resaltar que el Triton X-100 en la membrana externa solubiliza una proporción mayor de proteína que de lípido (figs. 3,4) mientras que en la membrana interna el fosfolípido se mantiene por encima de la proteína solubilizada (figs. 12,13), efecto que se observa más claramente para suspensiones de membrana conteniendo 1 mg proteína/ml en donde prácticamente se llega a un 100% de fósforo lipídico solubilizado. Esto puede deberse probablemente al hecho de que la cantidad de fosfolípido es menor en las suspensiones de membrana interna y mayor en las suspensiones de externa a causa del valor más alto de la relación proteína/lípido en las primeras.

Esta mayor proporción de fosfolípido solubilizado de las membranas internas explicaría su completa desestructuración y pérdida de la imagen trilaminar, a concentraciones de Triton X-100 para las cuales en las membranas externas todavía se conserva algún material con cierta estructuración. Otro punto que podría contribuir a explicar este hecho es el diferente contenido en colesterol de ambas membranas mitocondriales y que el Triton X-100 no es eficaz en la solubilización del mismo. Estudios realizados con sistemas modelo (201) y otras membranas (277) muestran que un alto contenido en colesterol confiere a las membranas además de una mayor rigidez (58), una cierta resistencia a su solubilización con Triton X-100. Este sería el caso de la membrana externa, mucho más rica en colesterol que la interna; la primera conserva cierto material con apariencia estructurada a la concentración 1% de Triton X-100 (fig. 9) mientras que en la segunda la desestructuración es total a partir de 0,5% de detergente.

Una diferencia importante entra las membranas externas e internas respecto a su comportamiento frente al Triton X-100 se aprecia en el efecto que sobre cada una de ellas producen las concentraciones crecientes del detergente. A la vista de los patrones electroforéticos, ultraestructurales y químicos obtenidos, se observan pocas diferencias entre las membranas externas tratadas con concentraciones de

Triton X-100 comprendidas entre 0,1 y 1% (p/v). No ocurre así con las membranas internas, en las que las mismas variaciones en la concentración del detergente conducen a considerables cambios en el material solubilizado y no solubilizado.

Estas diferencias pueden ser indirectamente atribuidas a la diferente composición química de ambas membranas, por cuya razón el equilibrio detergente-membranas-agua en cada una es también diferente. No es posible por tanto la comparación directa de las membranas internas y externas tratadas con la misma cantidad de Triton X-100.

La consideración de este diferente comportamiento de las membranas mitocondriales frente al Triton X-100 nos lleva a discutir la solubilización selectiva de algunos componentes de membrana. El concepto "solubilización selectiva" tiene al menos dos significados diferentes: el primero puede referirse a la capacidad o incapacidad del detergente para solubilizar determinados componentes de membrana, mientras que el segundo puede significar la liberación más o menos secuencial de diferentes componentes de la membrana en función de la concentración de detergente. Ambos tipos de selectividad se observan en la solubilización de membranas mitocondriales con Triton X-100.

Un ejemplo de selectividad en su primera acepción es que el Triton X-100 en el rango de concentración utilizado excluye selectivamente de la solubilización una banda prominente de polipéptidos de la membrana externa (fig. 11).

El segundo tipo de selectividad se observa en el caso de la solubilización de la actividad ATPasa (fig. 46) donde una considerable proporción de la actividad de este enzima se solubiliza en un rango de concentración de Triton X-100 comprendido entre 0,5 y 1% al cual no hay prácticamente aumento de proteína solubilizada.

Los lípidos de la membrana pueden ser también extraídos selectivamente con detergentes (234,235). Las causas, complejas, habría que buscarlas en las interacciones específicas entre lípidos y otros componentes de la membrana (proteínas principalmente), y en diferencias de composición química y propiedades físicas, lo que condicionaría la diferente afinidad del detergente por distintas regiones de la membrana. De hecho las dos hojas de la bicapa tienen distinta composición lipídica (197), lo que condiciona la sensibilidad de distintas regiones de la membrana a la acción del detergente (201).

En nuestro caso esta selectividad se ha observado solamente con las membranas internas: así una concentración de 0,5% de Triton X-100 a la cual se libera el máximo (60%) de

fósforo lipídico apenas es capaz de solubilizar la fosfatidiletanolamina que queda en el sedimento en su mayor parte, mientras que la cardiolipina es totalmente solubilizada (100%). Por su parte la esfingomielina tampoco es solubilizada pues aunque este fosfolípido y la fosfatidilserina en la técnica de TLC utilizada por nosotros (253) aparecen generalmente superpuestos, la separación cromatográfica con diferentes sistemas de disolventes (278) de los lípidos del sobrenadante revela que prácticamente nada de esfingomielina se encuentra presente en él. En cuanto a la fosfatidiletanolamina, el Triton X-100 tiene un pequeño efecto solubilizante que ha sido ya observado en experimentos sobre membranas del virus SF (202,203).

Tampoco se detecta ninguna solubilización de las pequeñas cantidades de colesterol presentes en la M.I.M. por efecto del Triton X-100. La incapacidad de este detergente para solubilizar colesterol ha sido observada también en membranas de eritrocitos (235) y de retículo sarcoplásmico (G. Sarzala, comunicación personal) y se explica por la peculiar estructura del anillo ciclopentanoperhidrofenantrénico que hace difícil la formación de micelas mixtas globulares con el Triton X-100. Tampoco las sales biliares solubilizan con eficacia el colesterol (234) aunque se ha observado que la adición de fosfolípidos mejora la solubilización de este componente en membranas ricas en él (161,162).

Por el contrario, y como puede esperarse de la estructura molecular de la ubiquinona (coenzima Q) con su cadena poliisoprenica hidrófoba, la formación de micelas mixtas coenzima Q-Triton X-100 está más favorecida, lo que se traduce en el alto rendimiento de solubilización de este componente lipídico de la cadena de transporte de electrones (fig. 40).

La principal dificultad para interpretar los datos de la solubilización lipídica es conocer cuándo los fenómenos observados son determinados por la membrana más que por el detergente. La naturaleza selectiva de la solubilización revela más que nada la complejidad del proceso.

Helenius y Simons (36) han sugerido algunas hipótesis para explicar los mecanismos complejos de extracción selectiva de componentes de membranas con detergentes, aunque hasta el momento no hay una prueba experimental decisiva en favor de ninguna de ellas.

Con detergentes suaves, como es el caso del Triton X-100, la selectividad puede ser debida a la insolubilización de estructuras continuas grandes estabilizadas por interacciones proteína-proteína como se ha discutido anteriormente, mientras que los componentes susceptibles de solubilización se liberarán más o menos en razón de su solubilidad específica a determinados valores, bajos o intermedios, del co-

ciente detergente/membrana.

La solubilización selectiva de proteínas de la M.I.M. por el Triton X-100 también tiene lugar en el caso de ciertas actividades enzimáticas de la membrana interna y componentes de la cadena de transporte electrónico. Es ya conocido (84) que el tratamiento de la mitocondria con varios detergentes en condiciones apropiadas conduce a la solubilización de los citocromos b, c₁ y c, mientras que los a y a₃ no lo hacen ("Red-Green Separation"). Nuestros datos confirman esta observación y muestran que con un cuidadoso control del cociente detergente/membrana pueden producirse sutiles diferencias en la solubilización de los diferentes citocromos (figs. 31-34) lo que podría aprovecharse con fines preparativos. Con arreglo a esto la selectividad puede ser explicada también en base a las interacciones entre las proteínas y la matriz lipídica de la membrana. Así proteínas integrales que penetran profundamente en la región hidrocarbonada de la bicapa lipídica requieren más altos valores del cociente detergente/membrana que otras proteínas menos firmemente unidas a la matriz lipídica de la membrana.

Así las flavinas, unidas fuertemente a proteínas intrínsecas incluidas en la matriz lipídica, y que probablemente la atraviesan por completo (279), sólo se solubilizan en

una extensión relativamente pequeña (fig. 30). El citocromo a solo es solubilizado en cantidad apreciable a altas concentraciones (2%) de detergente (fig. 31) lo que, de acuerdo con Slinde y col. (239), podría deberse probablemente a una autoasociación de esta proteína integral para formar complejos pesados proteína-detergente que sedimentan al ser sometidos a la centrifugación. Sólo con altas concentraciones (2%) de Triton X-100, parte de estos grandes agregados podrían disociarse en complejos más pequeños y permanecer en el sobrenadante por efecto del detergente en exceso.

Otra proteína integral, el citocromo b, requiere un valor de la relación detergente/membrana más bajo para conseguir su máxima solubilización lo que indicaría un menor grado de unión a la matriz lipídica que el citocromo a.

El Triton X-100 no se une al citocromo c (180). La causa sería la peculiar conformación de esta proteína globular que presenta una superficie formada por restos de aminoácidos hidrófilos, mientras que los restos hidrofóbicos se encuentran estrechamente empaquetados en el interior de la molécula (280) por lo que su interacción con la membrana se hace por la región hidrófila de la misma mediante enlaces electrostáticos y por tanto fácilmente dissociables por tratamiento con soluciones salinas.

El extremo *p-t*-octilfenilico, apolar y voluminoso, del Triton X-100 no puede interaccionar con la superficie hidrófila del citocromo c y la liberación de éste en el sobrenadante se produciría por su gran hidrosolubilidad durante el proceso de desintegración de la membrana.

No obstante, el contenido en proteínas periféricas de nuestras preparaciones de M.I.M. es bajo, lo que se infiere de que el tratamiento de la misma con NaCl o CaCl₂ 100 mM tan solo libera 14-15% de proteínas de la membrana.

La selectividad tal vez refleje propiedades del detergente más que de la membrana. Un problema importante en el uso del Triton X-100 y otros detergentes polioxietilénicos en los estudios de membranas es su heterogeneidad, resultante de la polimeración estadística en el proceso de síntesis del producto (240). La preparación de estos detergentes en forma monodispersa y de gran pureza puede proporcionar un más alto grado de selectividad en la solubilización de membranas y facilitará el estudio de los complejos intermedios originados en el proceso.

4.4 EFEECTO DE LA TEMPERATURA Y FUERZA IONICA

El aumento de fuerza iónica del medio de incubación, tanto en presencia de detergente como en ausencia del mismo no afecta en general la liberación de proteína de la M.I.M. Tan sólo es observable, de acuerdo con los respectivos controles, un ligero aumento en la proteína solubilizada por efecto del CaCl_2 (fig. 16).

Del mismo modo, el aumento de fuerza iónica por sí mismo (en ausencia de Triton X-100) no produce ningún efecto sobre la solubilización de fósforo lipídico. No obstante la proporción de este componente solubilizada por 0,5% de Triton X-100 es ligeramente mayor en presencia de NaCl , mientras que el CaCl_2 no parece influir mucho sobre el efecto solubilizante de fósforo lipídico por el detergente (fig. 17).

El EDTA 1 mM, que no afecta a la liberación de proteínas de la M.I.M. (fig. 16), produce en cambio un aumento en el porcentaje de solubilización de fósforo. Esto ocurre tanto en ausencia como en presencia de Triton X-100 (fig. 17).

El efecto del Ca^{++} podría relacionarse con la segregación lateral de fosfolípidos ácidos inducida en el plano de la bicapa por este catión (281). Tal segregación compensaría el efecto del incremento de fuerza iónica debido al CaCl_2 . El EDTA al impedir esta segregación favorecería el

ataque del detergente sobre toda el área de la membrana aumentando el rendimiento de solubilización de fosfolípidos.

El efecto del NaCl observado en la solubilización de fósforo lipídico podría tener lugar a través de cambios en la disposición de proteínas periféricas de la M.I.M.

Cuando no existe detergente en el medio, las variaciones de temperatura no parecen influir en las proporciones siempre pequeñas de proteínas y fósforo lipídico liberadas de la M.I.M. Por el contrario, en presencia de 0,5% de Triton X-100, se observa que a 37° disminuye la proporción de proteína solubilizada por el detergente respecto a los controles a 4° y 20°. Esto podría atribuirse a un reforzamiento de los enlaces hidrofóbicos sobre los cuales actúa el detergente, efecto que ya ha sido observado por Oakenfull y Farwick (282). La situación es más compleja al estudiar la influencia de la temperatura sobre la solubilización de fósforo lipídico por el Triton X-100 puesto que la proporción solubilizada a 20° es ligeramente menor que a 4° y 37° (figs. 14, 15). En todo caso la significación es exigua.

Los análisis por SDS-PAGE llevados a cabo en las fracciones de M.I.M. solubilizadas por distintas condiciones de temperatura y fuerza iónica, no revelan diferencias en la solubilización de polipéptidos aunque, como ya se ha indicado anteriormente, la composición polipeptídica compleja de la

M.I.M. y la capacidad de resolución de esta técnica de electroforesis hacen difícil determinar en estas condiciones una probable solubilización específica de algunos polipéptidos.

Respecto a la influencia de la fuerza iónica sobre la liberación de componentes citocrómicos de la M.I.M., y a la vista de los resultados obtenidos en presencia y ausencia de Triton X-100, puede afirmarse que el NaCl 50 y 100 mM no afecta a la solubilización del citocromo a (fig. 35) y apenas influye en la del citocromo b (fig. 36) lo que está de acuerdo con el carácter intrínseco de estas proteínas en la M.I.M.

Sin embargo las mismas concentraciones de NaCl producen un marcado aumento en la liberación de citocromos c₁ y c (figs. 37,38) en consonancia con su carácter de proteínas periféricas o extrínsecas. El efecto se acusa también en presencia del detergente cuyo poder solubilizante sobre estos citocromos se refuerza considerablemente, sobre todo en el caso del citocromo c.

El EDTA en ausencia de detergente no tiene prácticamente ningún efecto sobre los citocromos de la M.I.M. pero reduce el poder solubilizante del Triton X-100 sobre los mismos. Este efecto es más acusado en el caso de los citocromos b y c₁ lo que sugiere que la solubilización de estos componentes

de la M.I.M. puede estar relacionada con cambios conformacionales dependientes del Ca^{++} .

La baja eficiencia de algunos surfactantes no iónicos en la solubilización de ciertas membranas podría estar relacionada en algunos casos con el papel que los cationes divalentes pueden jugar en la estabilidad de las mismas (198, 229), mientras que en otros podrían influir la existencia de redes o mallas de proteínas periféricas que, unidas a la membrana por enlaces electrostáticos, pueden recubrir gran parte de la superficie de la bicapa lipídica (283) y con las cuales no puede interaccionar el detergente. La eliminación de cationes divalentes con agentes quelantes, y la rotura de las interacciones electrostáticas que mantienen la unión de las proteínas periféricas a la membrana con el empleo de soluciones de determinada fuerza iónica, facilitaría el acceso y la acción del detergente a zonas de la membrana antes resistentes a la solubilización.

Con arreglo a nuestros resultados podría concluirse que la temperatura y fuerza iónica pueden afectar de distintos modos la solubilización de las membranas por detergentes no iónicos. Esto podría deberse a:

- a.- Perturbación de los enlaces no covalentes que mantienen la unión de los diferentes componentes de la membrana.

- b.- Eliminación de proteínas extrínsecas permitiendo la acción del detergente sobre áreas inicialmente "ocultas" por estas proteínas.
- c.- Cambios conformacionales de las membranas o de sus componentes con modificaciones tales que permitan la accesibilidad del Triton X-100 a regiones antes "cerradas" para el surfactante.

4.5 EFEECTO DEL TRITON X-100 SOBRE ALGUNAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LA M.I.M.

Las actividades enzimáticas estudiadas aquí difieren considerablemente por su complejidad y grado de estructuración en la membrana.

El complejo ATPasa mitocondrial presenta diversas actividades enzimáticas que pueden ser medidas independientemente (98). Una de ellas es la actividad ATP-fosfohidrolasa que exhibe la fracción F_1 de Racker. Este componente del complejo ATPasa puede ser fácilmente separado de la membrana y ensayado en forma soluble libre de lípido (84).

La citocromo c oxidasa por otra parte no puede ser completamente deslipidizada sin pérdida de la actividad enzimática y por tanto no puede ser mantenida en solución a menos que exista detergente presente. Sin embargo esta actividad se reconstituye en vesículas formadas al añadir ciertos lípidos (284).

Las otras tres actividades enzimáticas que han sido estudiadas aquí son más complejas en organización y no han sido reconstituídas hasta ahora. Así la succinato : coenzima Q oxidorreductasa es el Complejo II de Green que contiene succinato deshidrogenasa, coenzima Q y citocromo b. La succinato-deshidrogenasa (285) es una flavoproteína ferro-sulfurada con un peso molecular de alrededor de 100.000, consti

tuida por dos subunidades. La subunidad mayor de la succinato-deshidrogenasa tiene un peso molecular de 70.000 y contiene FAD, cuatro átomos de Fe(n.h.) y cuatro átomos de azufre ácido-lábiles mientras que la subunidad menor, con un peso molecular de 30.000, es una sulfo-ferro-proteína que contiene cuatro átomos de Fe(n.h.) y cuatro átomos de azufre ácido-lábiles.

La succinato : cit. c reductasa requiere para su actividad la acción concertada del Complejo II y el Complejo III. Este último contiene coenzima Q y citocromos b y c₁ (fig.1).

Del mismo modo la NADH : citocromo c reductasa sensible a la rotenona presenta un alto grado de complejidad. Su actividad depende de la coordinación entre los Complejos I y III. El Complejo I contiene NADH-deshidrogenasa que se ha aislado en dos formas diferentes de las que no se conoce mucho sobre su estructura y mecanismo: la forma de peso molecular elevado es un complejo particulado que contiene hasta 18 átomos de Fe(n.h.) y azufre ácido-lábil así como lípidos, y es inhibida por la rotenona y el amital, mientras que la forma de bajo peso molecular (≈ 78.000) contiene solamente cuatro átomos de Fe (n.h.) y de azufre ácido-lábil, es muy sensible a los inhibidores y constituye probablemente una subunidad de la forma nativa, y mayor, del enzima tal como se encuentra en la membrana interna.

El efecto del Triton X-100 sobre estas actividades enzimáticas podría explicarse, al menos parcialmente, en base a sus diferentes complejidades. La actividad ATPasa-F₁ es quizá la menos afectada por el detergente, además de que la actividad enzimática de los sobrenadantes y las suspensiones de membranas son aproximadamente del mismo orden de magnitud (fig. 41).

El Triton X-100 que apenas solubiliza la citocromo c oxidasa no parece afectar mucho la actividad de este enzima en las suspensiones de membrana interna, pero cuando estas son centrifugadas, solamente una pequeña fracción de la actividad inicial permanece en el sobrenadante (fig. 42).

Como es de esperar de su compleja naturaleza, las actividades enzimáticas de la succinato : citocromo c reductasa y NADH : citocromo c reductasa sensible a rotenona en las suspensiones de membranas son destruidas por concentraciones bajas de Triton X-100 y prácticamente no se recupera actividad en los sobrenadantes (figs. 44,45). Esto hecho se debe probablemente a la separación o disociación de uno o varios componentes del complejo por el detergente más que a una inactivación del enzima como se describe más adelante.

Un caso diferente se presenta con el enzima succinato : coenzima Q oxidorreductasa (fig. 43) cuya actividad en las suspensiones de membranas se reduce notablemente por concentraciones bajas de detergente aunque parece res-

taurarse al aumentar la concentración de éste. Sin embargo después de centrifugar las membranas tratadas con Triton X-100 los sobrenadantes muestran una actividad específica de un orden de magnitud superior al de las membranas totales. El considerable aumento de actividad específica en el sobrenadante respecto a la actividad que este enzima presenta en las suspensiones de membranas es difícil de explicar. No obstante hay que tener en cuenta que las propiedades de un enzima unido a la membrana suelen ser diferentes a las del enzima libre solubilizado en lo referente a especificidad por el sustrato, sensibilidad a los inhibidores, pH óptimo, K_m y estabilidad, entre otras. Este fenómeno denominado "alotopía" fué por primera vez observado con la ATPasa de la membrana interna mitocondrial: la ATPasa, cuando está unida a la membrana, es inhibida por la oligomicina y la diciclohexil-carbodiimida (DCCD) mientras que el enzima solubilizado no es afectado. Por otra parte la ATPasa solubilizada es estable a temperatura ambiente pero inestable a 0°C, efecto que no se observa en la forma ligada a membrana. Esto puede explicarse si se considera la enorme diferencia entre el entorno vecinal de un enzima solubilizado y el del mismo unido a la membrana. Así, el enzima solubilizado se encuentra en un medio hidrofílico, polar, de alta constante dieléctrica por lo que los sustratos, iones y metabolitos pueden tener fácil acceso al enzima e interaccionar con grupos en su superficie.

Por el contrario los enzimas unidos a la membrana pueden estar inmersos en la región lipófila de la bicapa lipídica, de baja constante dieléctrica, con pocas oportunidades para interaccionar con moléculas polares. La posible existencia de inhibidores y otros componentes bloqueantes o interferentes de la actividad del enzima en el seno de la membrana viene a acentuar estas diferencias de comportamiento entre las formas soluble y ligada a membrana de un enzima. Así el aumento o disminución de una actividad enzimática en membranas o sobrenadantes puede producirse por la extracción y separación de la membrana de componentes de la misma que bloquean el acceso del sustrato al centro activo del enzima. Esto no puede considerarse como una real "activación" o "inhibición" del enzima.

Es problemático por esto si los cambios de actividad enzimática son causados "a priori" por deterioro durante la extracción o son el resultado del aislamiento de lípidos o proteínas vecinos sobre los cuales podría descansar su propia conformación funcional.

La diferencia de actividades observada entre sobrenadantes y suspensiones de membranas en el caso de la succinato : coenzima Q oxidorreductasa podría entenderse en base a las consideraciones anteriores. Así este complejo enzimático podría contener una subunidad reguladora firmemente unida a la membrana por lo que no se solubilizaría por

la acción del detergente, y si lo haría en cambio la subunidad catalítica. La centrifugación a que son sometidas las suspensiones de membranas tratadas con el detergente sería capaz de romper la unión débil entre las subunidades catalítica y reguladora permaneciendo la primera en forma soluble en el sobrenadante y libre del modulador. Esto implicaría una capacidad del Triton X-100 para solubilizar selectivamente algunos componentes de la M.I.M. como se ha discutido anteriormente.

4.5.1 Solubilización de actividad ATPasa

Cuando una actividad enzimática no es fundamentalmente afectada por el detergente y puede recobrase posteriormente, en los sobrenadantes procedentes de la centrifugación de las suspensiones de membranas tratadas, como es el caso de la ATPasa mitocondrial, puede estudiarse la fracción del enzima solubilizado en función de la concentración de detergente. Esto se muestra en la figura 46 donde se representa el porcentaje de solubilización de la actividad ATPasa en función de la concentración de Triton X-100 junto con la curva de solubilización de proteínas. Es destacable que la máxima liberación del enzima tiene lugar entre 0,5 y 1% de Triton X-100 y es completamente específica, puesto que no es acompañada por solubilización de proteína total.

Es un hecho probado que los fosfolípidos son indispensables para el mantenimiento de la actividad de muchos enzimas ligados a membrana (112-116), y su eliminación por detergentes o su alteración conduce a una pérdida de la actividad enzimática (127). Estos lípidos, en algunos casos, son altamente específicos y desempeñan un importante papel en la actividad de estos enzimas (286).

La actividad ATPasa de diferentes preparaciones submitocondriales puede ser restaurada parcialmente tras su deslipidización añadiendo diferentes fosfolípidos (87). Santiago y col. (131,132) han encontrado una estrecha correlación entre el descenso de la actividad ATPasa mitocondrial y la alteración de la cardiolipina durante la incubación de la M.I.M. en presencia de ascorbato y cisteína. Esta correlación no existe con cualquiera de los otros fosfolípidos presentes en las membranas por lo que proponen la existencia de una asociación específica entre ATPasa mitocondrial y cardiolipina.

Nuestros resultados (fig. 46) muestran que una importante fracción de la actividad ATPasa es solubilizada a concentraciones de Triton X-100 comprendidas entre 0,25% y 0,50%. Por otra parte en este mismo rango de concentración del detergente hemos observado que se produce la solubilización de la mayor parte de la cardiolipina contenida en la M.I.M. (Tabla XV). Esto podría estar relacionado con la

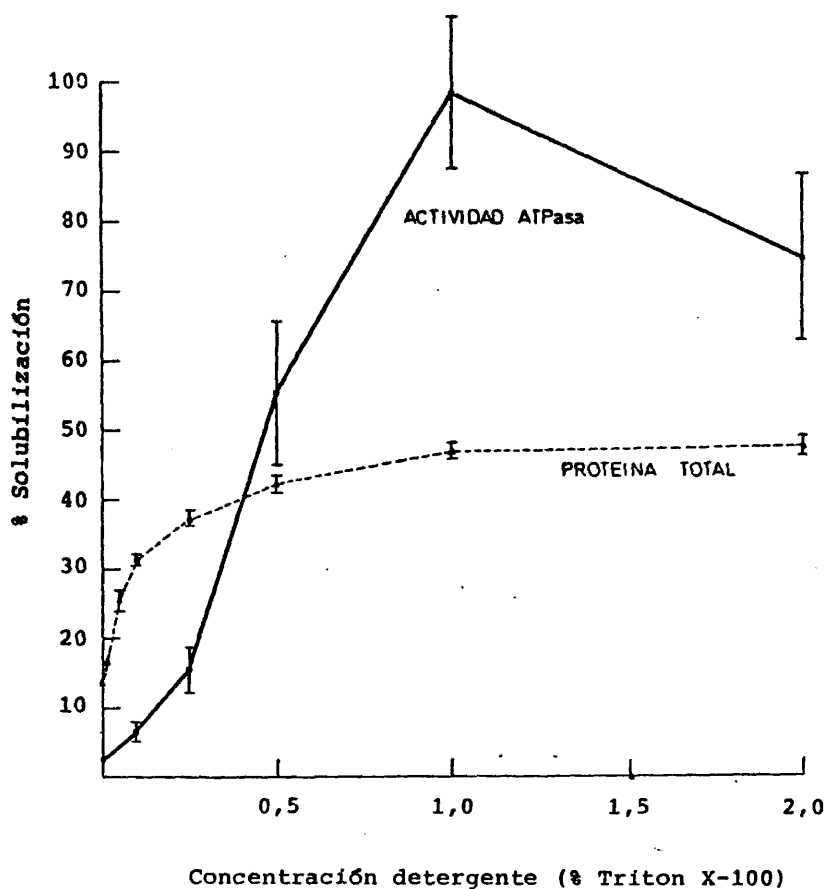


Figura 46 Porcentaje de solubilización de actividad ATPasa en función de la concentración de detergente. Una importante proporción de la actividad de este enzima se solubiliza entre 0,5 y 1% de Triton X-100 en tanto que en este intervalo de concentración no hay prácticamente aumento de proteína solubilizada.

existencia de las mencionadas interacciones específicas entre la cardiolipina y la ATPasa mitocondrial (287) y apoyaría la hipótesis de Santiago y colaboradores.

4.6 PERSPECTIVAS DE TRABAJO

A la vista de los resultados obtenidos en este trabajo se planea para un futuro inmediato su continuación abordando los siguientes aspectos:

- a) Estudio del papel del Ca^{++} y otros iones divalentes en la estructura de las biomembranas.
- b) Estudio detallado de los efectos del detergente sobre la actividad específica de la Succinato : Co Q oxidorreductasa de la M.I.M.
- c) Reconstitución de actividades enzimáticas de la M.I.M. solubilizadas por Triton X-100.
- d) Efecto del detergente sobre nuevas actividades enzimáticas mitocondriales, considerando además las actividades de la fracción no solubilizada y procedimientos de eliminación del detergente.

5. CONCLUSIONES

- 1.- El detergente no iónico Triton X-100 resulta muy eficiente como agente solubilizante de las membranas mitocondriales, con claras ventajas sobre el SDS y el desoxicolato.
- 2.- Se adopta como criterio de solubilización el incremento de material no sedimentable a 150.000 x g durante 1 hora, así como la desaparición de imágenes trilaminares en las micrografías electrónicas de las membranas tratadas con Triton X-100. Las observaciones micrográficas son concordantes con los estudios bioquímicos de solubilización de proteínas y fósforo lipídico.
- 3.- Para obtener resultados reproducibles son críticas tanto la concentración del detergente como la de membranas en suspensión. Se propone el cociente detergente/proteína como parámetro para determinar la máxima solubilización de la membrana.
- 4.- Las membranas internas y externas difieren en su comportamiento frente al Triton X-100, tanto en las alteraciones ultraestructurales producidas como en la proporción y naturaleza de los componentes liberados.
- 5.- Para la membrana interna el grado de alteración ultraestructural es progresivo al aumentar la concentración del detergente. Por el contrario, las distintas concentraciones de Triton X-100 producen el mismo grado de altera-

ción en la membrana externa. Los resultados están de acuerdo con trabajos anteriores que postulan una microheterogeneidad de la membrana interna frente al carácter más homogéneo de la membrana externa.

- 6.- La lisis de la membrana interna se produce ya a baja concentración de detergente (0,05%). La solubilización general de la membrana, sin embargo, es gradual en función de la concentración de Triton X-100. La máxima extensión de la lisis corresponde a la máxima solubilización de proteínas y fósforo lipídico (cuando el parámetro detergente/proteína = 0,1).
- 7.- El Triton X-100 a diferentes concentraciones produce la solubilización selectiva de lípidos y proteínas de la membrana interna mitocondrial, lo que permite su utilización con fines preparativos.
- 8.- Las variaciones de temperatura y fuerza iónica en el medio afectan en general poco al poder solubilizante del detergente. Esto no obsta para que la variación de fuerza iónica no influya claramente en la solubilización de determinados componentes.
- 9.- La naturaleza y ubicación de determinadas proteínas en la membrana interna influye decisivamente en su solubilización. Aproximadamente el 15% de las proteínas totales de nuestra preparación de membrana son proteínas periféricas o extrínsecas.

- 10.- Las actividades enzimáticas de la membrana interna mitocondrial se ven influenciadas en distinto grado por el detergente de manera que, en general, tienden a ser más afectadas las correspondientes a estructuras más complejas.
- 11.- Las actividades enzimáticas ATPasa-F₁ y citocromo c oxidasa de la membrana interna no resultan muy afectadas por las concentraciones utilizadas de Triton X-100. El detergente es capaz de solubilizar la primera, pero no la segunda de estas actividades.
- 12.- Las actividades succinato : citocromo c reductasa y NADH : citocromo c reductasa sensible a la rotenona son rápidamente destruidas por bajas concentraciones de Triton X-100, lo que es explicable en razón de la complejidad de estos componentes de la cadena de transporte electrónico.
- 13.- La succinato : coenzima Q oxidorreductasa es afectada de forma compleja lo que podría implicar la solubilización de alguna(s) de sus subunidades.
- 14.- La solubilización específica de la cardiolipina y de la actividad ATPasa con el Triton X-100 apoyan la existencia de una asociación específica entre la cardiolipina y la ATPasa mitocondrial.

6. BIBLIOGRAFIA

1. OVERTON, E. (1895) *Vischr. Naturf. Ges. Zurich.* 40, 159.
2. OVERTON, E. (1899) *Vischr. Naturf. Ges. Zurich.* 44, 88.
- 3.- LANGMUIR, I. (1917) *J. Am. Chem. Soc.* 37, 1848.
4. LANGMUIR, I. (1942) en "Molecular Films in Chemistry and Biology". Rutgers University Press, New Brunswick. pp. 27-62.
5. GORTER, E., GREDEL, F. (1925) *J. Exp. Med.* 41, 439.
6. BAR, R.S., DEAMER, D.W., CORNWELL, D.G. (1966) *Science* 153, 1010.
7. ENGELMAN, D.M. (1969) *Nature* 223, 1279.
8. LIMBRICK, A.R., KNUTTON, S. (1971) Abs. XI A. Meeting Am. Soc. Cell. Biol., pag. 168.
9. HARVEY, E.N. (1931) *Biol. Bull.* 61, 273.
10. COLE, K.S. (1932) *J. Cell. Com. Physiol.* 1, 1.
11. MALHORTA, S.K., HARREVELD, A. (1967) en "The Biological Basis of the Medicine" (Bittar, E.E., ed.) Vol. I. Academic Press, Nueva York.
12. DANIELLI, J.F., DAVSON, H.A. (1935) *J. Cell. Comp. Physiol.* 5, 495.

13. ROBERTSON, J.D. (1959) Biochem. Soc. Symp. (Cambridge) 16, 3.
14. STOECKENIUS, W. (1962) en "The Interpretation of Structure". (Harris, R.J.C., ed.) Academic Press, Nueva York.
15. SJÖSTRAND, F.S. (1963) J. Ultraestruct. Res. 9, 340.
16. SJÖSTRAND, F.S. (1963) J. Ultraestruct. Res. 9, 561.
17. BENSON, A.A. (1964) Ann. Rev. Plant. Physiol. 16, 1.
18. ROBERTSON, J.D. (1969) en "Handbook of Molecular Cytology" (Lima de Faria, A., ed.) North Holland Publishing Co., Amsterdam.
19. BENEDETTI, E.L., EMMELOT, P.J. (1965) J. Cell. Biol. 26, 229.
20. GREEN, D.E., PERDUE, J.E. (1966) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 55, 1295.
21. LENARD, J., SINGER, S.J. (1966) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 56, 1828.
22. WALLACH, D.F.H., ZAHLER, P.H. (1966) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 56, 1552.
23. LENARD, J., SINGER, S.J. (1968) Science 159, 738.
24. GLASER, M., SIMPKINS, H., SINGER, S.J., SCHEETZ, E.,

- CHAN, I. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 65, 721.
25. VANDERKOOI, G., GREEN, D.E. (1971) Bioscience 21, 409.
26. SINGER, S.J. (1971) en "Membrane Structure and Function" (Rothfield, L.I. ed.) Academic Press, Nueva York.
27. SINGER, S.J., NICOLSON, G.L. (1972) Science 175, 720.
28. URRY, D.W., JI, T.H. (1968) Arch. Biochem. Biophys. 128, 802.
29. GORDON, A.S., WALLACH, D.F.H., STRAUS, J.M. (1969) Biochim. Biophys. Acta 193, 225.
30. MATHEWS, F.S., LEVINE, M., ARGUS, P. (1971) Nature New Biol. 233, 15.
31. STRYER, L. (1975) en "Biochemistry". Freeman and Co. San Francisco, p. 228.
32. GUIDOTTI, G. (1972) Ann. Rev. Biochem. 41, 731.
33. KASHNIG, D.M., KASPER, C.F. (1969) J. Biol. Chem. 244, 3786.
34. KORN, E.D. (1969) Ann. Rev. Biochem. 38, 263.
35. VANDERKOOI, G. (1972) en "Conference on Membrane Structure and its Biological Implications" (Green, D.E., Danielli, J.E. eds.) Ann. N.Y. Acad. Sci.

36. HELENIUS, A., SIMONS, K. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, 415, 29.
37. SINGER, S.J. (1974) *Ann. Rev. Biochem.* 45, 805.
38. CUATRECASAS, P. (1974) *Ann. Rev. Biochem.* 43, 169.
39. COLEMAN, R. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 300, 241.
40. ROTHFIELD, L.I., ROMEO, O. (1971) en "Structure and Function of Biological Membranes" (Rothfield, L.I., ed.) Academic Press. Nueva York.
41. GREEN, F.A. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 5519.
42. EYLAR, E.H., MADOFF, M.A., BRODY, O.V., ONCLEY, J.L. (1962) *J. Biol. Chem.* 237, 1992.
43. NICOLSON, G.L., SINGER, S.J. (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 942.
44. KLOTZ, I.M. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.* 138, 704.
45. LENARD, J., SINGER, S.J. (1966) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 56, 1828.
46. STRITTMATTER, P., ROGERS, M.J., SPATZ, L. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 7188.
47. SPATZ, L., STRITTMATTER, P. (1973) *J. Bio. Chem.* 248, 793.

48. SEGREST, J.P., KAHANE, I., JACKSON, R.L., MARCHESI, V. T. (1973) Arch. Biochem. Biophys. 155, 167.
49. CAPALDI, R., VANDERKOOI, G. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 930.
50. GOMEZ, J.C., GONI, F.M., SANTIAGO, E. (1978) Rev. esp. Fisiol. 34, 67.
51. PINTO DA SILVA, P., BRANTON, D. (1970) J. Cell. Biol. 45, 598.
52. PINTO DA SILVA, P., NICOLSON, G. (1974) Biochim. Biophys. Acta 363, 311.
53. SINGER, S.J. (1975) en "Cell Membranes" (Weissmann, G. ed.) HP Publishing Co., Nueva York, pp. 35-44.
54. KATES, M. (1972) "Techniques of Lipidology" (Work, T.S., Work, E. eds.) North-Holland. Amsterdam.
55. C R C (1972) en "Handbook of Chromatography". Chemical Rubber Co., Cleveland.
56. MARINETTI, G.V. (1967) en "Lipid Chromatographic Analysis". Vol. I. Dekker. Nueva York.
57. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. The Nomenclature of Lipids. Recommendations (1976).
58. DARKE, A., FINER, E.G., FLOOK, A.G., PHILLIPS, M.C.

- (1972) J. Mol. Biol. 63, 265.
59. WITTER, R.F., WATSON, M.L., COTTONE, M.A. (1955) J. Biophys. Biochem. Cytol. 1, 127.
60. PALADE, G.E. (1953) J. Histochem. Cytochem. 1, 188.
61. MUNN, E.A. (1974) en "The Structure of Mitochondria" Academic Press. Londres.
62. LEHNINGER, A.L. (1965) en "The Mitochondrion". (Benjamin, W.A., ed.) Nueva York.
63. SCHNAITMAN, C., GREENAWALT, J.W. (1968) J. Cell. Biol. 38, 158.
64. LEHNINGER, A.L. (1959) J. Biol. Chem. 234, 2187.
- 64a. LEHNINGER, A.L. (1961) en "Biological Structure and Function" (Goodwin, T.W., Lindberg, O., eds.) Vol. II. Academic Press. Nueva York.
65. HACKENBROCK, C.R. (1968) J. Cell. Biol. 30, 269.
66. HACKENBROCK, C.R. (1968) J. Cell. Biol. 37, 345.
67. PARSONS, D.F., WILLIAMS, G.R., CHANCE, B. (1966) Ann. N. Y. Acad. Sci. 137, 643.
68. PARSONS, D.F., WILLIAMS, G.R. (1967) en "Methods in Enzymology". (Colowick, S.P., Kaplan, N.O., eds.), vol. X,

Academic Press, Nueva York. pp. 443-463.

69. SOTTOCASA, G.L., KUYLENSTIERNA, B., ERNSTER, L., BERGSTRAND, A. (1967) en "Methods in Enzymology" (Colowick, S.P., Kaplan, N.O., eds.), Vol. X, Academic Press. Nueva York. pp. 448-463.
70. PARSONS, D.F., YANO, Y. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 135, 362.
71. ASHWELL, M., WORK, T.S. (1970) *Ann. Rev. Biochem.* 39, 251.
72. COMTE, J., MAÏSTERRENA, B., GAUTHERON, D.C. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 419, 271.
73. FERNANDEZ-MORAN, H., ODA, T., BLAIR, P.V., GREEN, D.E. (1964) *J. Cell. Biol.* 22, 63.
74. RACKER, E. (1967) *Fed. Proc.* 26, 1335.
75. PEDERSEN, P.L., ESKA, T., MORRIS, P.M., CATTERALL, W.A. (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 1079.
76. CAPALDI, R.A., HAYASHI, H. (1972) *FEBS Letters* 26, 261.
77. CHUANG, T.F., CRANE, F.L. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 42, 1076.
78. DAVIS, K.A., HATEFI, Y. (1971) *Biochemistry* 10, 2509.

79. DICKERSON, R.E., TAKANO, T., EISENBERG, D., KALLAI, D. B., SAMSON, L., COOPER, A., MARGOLIASH, E. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1511.
80. HORSTMAN, L.L., RACKER, E. (1970) J. Biol. Chem. 245, 1336.
81. MAC LENNAN, D.H., TZAGOLOFF, A. (1968) Biochemistry 7, 1603.
82. WAINIO, W.W. (1970) en "The Mammalian Mitochondrial Respiratory Chain". (Horecker, B., Kaplan, N.O., Marmur, J. Scheraga, H.A., eds.). Academic Press, Nueva York.
83. KAGAWA, Y. (1972) Biochim. Biophys. Acta 265, 297.
84. KAGAWA, Y. (1974) en "Methods in Membrane Biology" (Korn, E.D., ed.) Vol. 1, Plenum Press. Nueva York, Londres. pp. 201-270.
85. HATEFI, Y. (1966) en "Comprehensive Biochemistry" (Florin, M., Stotz, E.H., eds.) Vol. 14. Elsevier, Amsterdam. pp. 199-231.
86. PULLMAN, M.E., PENEFSKY, H.S., DATTA, A., RACKER, E. (1960) J. Biol. Chem. 235, 3322.
87. KAGAWA, Y., RACKER, E. (1966) J. Biol. Chem. 241, 2461.

88. HATEFI, Y., HAAVIK, A.G., FOWLER, L.R., GRIFFITHS, D.E. (1962) J. Biol. Chem. 237, 2661.
89. WILLIAMS, J.N. (1964) Arch. Biochem. Biophys. 107, 537.
90. HATEFI, Y., HAAVIK, A.G., JURTSCHUK, P. (1961) Biochim. Biophys. Acta 52, 106.
91. ZIEGLER, D.M., DOEG, K.A. (1962) Arch. Biochem. Biophys. 97, 41.
92. HATEFI, Y., HAAVIK, A.G., GRIFFITHS, D.E. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1681.
93. FOWLER, L.R., RICHARDSON, S.H., HATEFI, Y. (1962) Biochim. Biophys. Acta 64, 170.
94. RACKER, E. (1970) en "Membrane of Mitochondria and Chloroplasts" (Van Nostrand Reinhold, ed.) Nueva York.
95. FISHER, R.J., CHEN, J.C., SANI, B.P., KAPLAY, S.S., SANADI, D.R. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 2181.
96. RACKER, E., FESSENDEN-RADEN, J.M., KANDRACH, M.A., LAM, K.W., SANADI, D.R. (1970) Biochem. Biophys. Res. Comm. 41, 1474.
97. SENIOR, A.E. (1971) Bioenergetics 2, 141.
98. KOZLOF, I.A., SKULACHEV, V.P. (1977) Biochim. Biophys. Acta, 463, 29.

99. MAC LENNAN, D.H., ASAI, J. (1968) Biochem. Biophys. Res. Comm. 33, 441.
100. RACKER, E. (1970) en "Essays in Biochemistry" (Campbell, P.N., Dickens, F., eds.) Vol. 6 Academic Press. Nueva York.
101. CATERALL, W.A., PEDERSEN, P.L. (1971) J. Biol. Chem. 246, 4987.
102. LAMBETH, D.O., LARDY, A., SENIOR, A.E., BROOKS, J.C. (1971) FEBS Letters 17, 330.
103. CAPALDI, R. (1973) Biochem. Biophys. Res. Comm. 53, 1331.
104. TZAGOLOFF, A. (1970) J. Biol. Chem. 245, 1545.
105. TZAGOLOFF, A., MEAGHER, P. (1972) J. Biol. Chem. 247, 594.
106. TZAGOLOFF, A., AKAI, A., SIERRA, M.F. (1972) J. Biol. Chem. 247, 6511.
107. TZAGOLOFF, A., AKAI, A. (1972) J. Biol. Chem. 247, 6517.
108. CHAN, S.R.P., BARBOUR, R.L. (1976) Biochim. Biophys. Acta 430, 426.
109. KNOWLES, A.F., PENEFSKY, H.S. (1972) J. Biol. Chem. 247, 6624.

110. KAKIUCHI, S. (1927) J. Biochem. 7, 263.
111. TSUNEYOSHI, K. (1927) J. Biochem. 7, 235.
112. FLEISCHER, S., KLOUWEN, H., BRIERLEY, G. (1961) J. Biol. Chem., 236, 2936.
113. KAGAWA, Y., KANDRACH, A., RACKER, E. (1973) J. Biol. Chem. 247, 676.
114. KAGAWA, Y., RACKER, E. (1966) J. Biol. Chem. 241, 2467.
115. FLEISCHER, S., FLEISCHER, B. (1967) en "Methods in Enzymology" (Colowick, S.P., Kaplan, N.O., eds.) Vol. X, Academic Press, Nueva York, pp. 406-433.
116. KAGAWA, Y., RACKER, E. (1971) J. Biol. Chem. 246, 5477.
117. MITCHELL, P. (1966) Biol. Rev. Camb. Phil. Soc. 41, 445.
118. MITCHELL, P. (1967) en "Comprehensive Biochemistry" (Florkin, M., Stotz, E.H., eds.) Vol. 22. Elsevier. Amsterdam. pp. 167-197.
119. VAN DAM, K., MEYER, A.J. (1971) Ann. Rev. Biochem. 40, 115.
120. SCHNEIDER, D.L., KAGAWA, Y., RACKER, E. (1972) J. Biol. Chem. 247, 4074.
121. RACKER, E., BURSTEIN, C., LOYTER, A., CHRISTIANSEN, R.

- O. (1970) en "Electron Transport and Energy Conservation" (Tager, J.M., Papa, S., Quagliariello, E., Slater, E.C., eds.) Adriatica Editrice, Bari. pp. 235-248.
- 1:22. SANTIAGO, E., GUERRA, F., MACARULLA, J.M. (1968) Rev. esp. Fisiol. 24, 25.
- 1:23. SANTIAGO, E., GUERRA, F., EUGUI, J., MACARULLA, J.M. (1968) Rev. esp. Fisiol. 24, 47.
- 1:24. SANTIAGO, E., VAZQUEZ, J.J., GUERRA, F., MACARULLA, J.M. (1968) Rev. esp. Fisiol. 24, 31.
- 1:25. SANTIAGO, E., GANSER, A., MACARULLA, J.M., GUERRA, F. (1968) Rev. esp. Fisiol. 24, 37.
- 1:26. WERNER, S., NEUPERT, W. (1972) Eur. J. Biochem., 25, 379.
- 1:27. LOPEZ-MORATALLA, N., SANTIAGO, E. (1972) Rev. Med. Univ. Navarra 16, 127.
- 1:28. LOPEZ-MORATALLA, N., SANTIAGO, E. (1974) Rev. esp. Fisiol. 30, 191.
- 1:29. SEGOVIA, J.L., LOPEZ-MORATALLA, N., SANTIAGO, E. (1974) Rev. esp. Fisiol. 30, 43.
- 1:30. VAZQUEZ, J.J., SANTIAGO, E., GUERRA, F., MACARULLA, J.M. (1968) Rev. esp. Fisiol. 24, 43.

131. SANTIAGO, E., LOPEZ-MORATALLA, N., SEGOVIA, J.L. (1973)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 53, 439.
132. LOPEZ-MORATALLA, N., SEGOVIA, J.L., SANTIAGO, E. (1973)
Rev. esp. Fisiol. 29, 329.
133. PENEFSKY, H.S., TZAGOLOFF, A. (1971) en "Methods in En-
zymology" (Colowick, S.P., Kaplan, N.O., eds.) Vol. XXII
Academic Press, Nueva York. pp. 204-219.
134. TZAGOLOFF, A., PENEFSKY, H.S. (1971) en "Methods in En-
zymology" (Colowick, S.P., Kaplan, N.O., eds.) Vol. XXII
Academic Press, Nueva York. pp. 219-230.
135. WINSOR, P.A. (1956) Mfg. Chemist. 27, 89.
136. SMALL, D.M. (1970) Fed. Proc. 29, 1320.
137. MARTIN, A.N., (1965) en "Physical Pharmacy" (Lea and
Febdiger ed.) Filadelfia.
138. GRIFFIN, W.C. (1949) J. Soc. Cosmet. Chem. 1, 311.
139. GRIFFIN, W.C. (1954) J. Soc. Cosmet. Chem. 5, 249.
140. DAVIES, J.T. (1957) en "Second International Congress on
Surface Activity", Vol. I. Butterworths, Londres. pp.
426-438.
141. MORRIS, J.A. (1965) Mfg. Chem., 36, 66

142. EGAN, R.W., JONES, M.A., LEHNINGER, A.L. (1976) J. Biol. Chem. 251, 4442.
143. MOORE, C.D., BELL, M. (1956) Soap, Perfumery and Cosmetics 29, 893.
144. MC BAIN, E.L., HUTCHINSON, E. (1955) en "Solubilization and Related Phenomena". Academic Press. Nueva York.
145. SHINODA, K., NAKAGAWA, T., TAMAMUSHI, B., ISEMURA, T. (1963) en "Some Physico-Chemical Properties of Colloidal Surfactants". Academic Press. Nueva York.
146. ELWORTHY, P.H., FLORENCE, A.T., MACFARLANE, C.B. (1968) en "Solubilization by Surface-Active Agents" (Chapman and Hall eds.). Londres.
147. TANFORD, C. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 1811.
148. KRAFFT, F., WINGELow, H. (1895) Ber. Dtsch. Chem. Ges. 28, 2573.
149. CAREY, M.C., SMALL, D.M. (1972) Arch. Int. Med. 130, 506.
150. NAKAYAMA, H., SHINODA, K., HUTCHINSON, E. (1966) J. Phys. Chem. 70, 3502.
151. TANFORD, C. (1973) en "The Hidrophobic Effect" (John Wiley, ed.). Nueva York.

152. HALL, D.G., PETHICA, B.A. (1967) en "Nonionic Surfactants" (Schick, M.J., ed.). Marcel Dekker, Nueva York. pp. 516-557.
153. LEVER, M. (1977) *Analytical Biochem.* 83, 274.
154. BANGHAM, A.D. (1972) *Ann. Rev. Biochem.* 41, 753.
155. VAN ZUTPHEN, H., MEROLA, A.J., BRIERLY, G.P., CORNWELL, D.G. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* 152, 755.
156. SEUFERT, W.D. (1973) *Biophysik* 10, 281.
157. RADDA, G.K., VANDERKOOI, J. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 265, 509.
158. SEEMAN, P. (1972) *Pharmacol. Rev.* 24, 583.
159. SAUNDERS, L. (1957) *J. Pharm. Pharmacol.* 9, 834.
160. YEDGAR, S., BARENHOLZ, Y., COOPER, V.G. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 363, 98.
161. CAREY, M.C., SMALL, D.M. (1970) *Amer. J. Med.* 49, 590.
162. TAMESUE, N., TSUYOSHI, I., KERRISON, J. (1973) *Am. J. Digestive Disease* 18, 670.
163. SMALL, D.M., PENKETT, S.A., CHAPMAN, D. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 179, 178.
164. HAYDON, D.A., TAYLOR, J. (1963) *J. Theoret. Biol.* 4, 281.

165. EKWALL, P., STENIUS, P. (1975) en MTP International Review of Science. Phys. Chem. Ser. 2, vol. 7. Surface Chemistry and Colloids (Kerker, M., ed.) Butterworths. Londres.
166. STEINHARDT, J., REYNOLDS, J.A. (1969) en "Multiple Equilibria in Proteins". Academic Press, Nueva York. pp 10-82.
167. SCATCHARD, G. (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660.
168. MAKINO, S., REYNOLDS, J.A., TANFORD, C. (1973) J. Biol. Chem. 248, 4926.
169. NOZAKI, Y., REYNOLDS, J.A., TANFORD, C. (1974) J. Biol. Chem. 249, 4452.
170. TANFORD, C. (1972) J. Mol. Biol. 69, 59.
171. DOWBEN, R.M., KOEHLER, W.R. (1961) Arch. Biochem. Biophys. 93, 496.
172. PITT-RIVERS, R., IMPLOMPATO, F.S.A. (1968) Biochem. J. 109, 825.
173. REYNOLDS, J.A., TANFORD, C. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 66, 1002.
174. FISH, W.W., REYNOLDS, J.A., TANFORD, C. (1970) J. Biol. Chem. 245, 5166.

175. NELSON, C.A. (1971) J. Biol. Chem. 246, 3895.
176. REYNOLDS, J.A., TANFORD, C. (1970) J. Biol. Chem. 245, 516.
177. BURKHARD, R.K., STOLZENBERG, G.B. (1972) Biochemistry 11, 1672.
178. MEUNIER, J.C., OLSEN, R.W., CHANGEUX, J.P. (1972) FEBS Letters 24, 63.
179. SNARY, D., GOODFELLOW, P., HAYMAN, M.J., BODMER, W.F., CROMPTON, M.J. (1974) Nature 247, 457.
180. HELENIUS, A., SIMONS, K. (1972) J. Biol. Chem. 247, 3656.
181. CUATRECASAS, P. (1972) J. Biol. Chem. 247, 1980.
182. SIMONS, K., HELENIUS, A., GAROFF, H. (1973) J. Mol. Biol. 80, 119.
183. JACOBS, E.E., SANADI, D.R. (1960) J. Biol. Chem. 235, 531.
184. ROWLEY, G.R., WAINIO, W.W. (1958) J. Am. Chem. Soc. 80, 4384.
185. LEVEY, G.S., FLETCHER, M.A., KLEIN, L., RUIZ, E. (1974) J. Biol. Chem. 249, 2665.

186. CHARREAU, E.H., DUFAU, M.L., CATT., K.J. (1974) J. Biol. Chem. 249, 4189.
187. KANDUTSCH, A.A. (1963) Transplantation 1, 201.
188. SCHWARTZ, B.D., NATHENSON, S.G. (1971) J. Immunol. 107, 1363.
189. SETO, J.T., BECHT, H., ROTT, R. (1973) Med. Microbiol. Immunol. 159, 1.
190. ITO, A., SATO, R. (1968) J. Biol. Chem. 243, 4922.
191. SPATZ, L., STRITTMATTER, P. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 1042.
192. SOLTYSIAK, D., KANIUGA, Z. (1970) Eur. J. Biochem. 14, 70.
193. UMBREIT, J.N., STROMINGER, J.L. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 2997.
194. UTERMANN, G., SIMONS, K. (1974) J. Mol. Biol. 85, 569.
195. NELSON, N., RACKER, E. (1972) J. Biol. Chem., 247, 3848.
196. SEGREST, J.P., JACKSON, R.L., MARCHESI, V.T. (1972) Biochem. Biophys. Res. Comm. 49, 964.
197. BRETSCHER, M.S. (1973) Science 181, 622.

198. CHAPMAN, D., URBINA, J., KEOUGH, K.M. (1974) J. Biol. Chem. 249, 2512.
199. GULIK-KRZYWICKI, T. (1975) Biochim. Biophys. Acta 415, 1.
200. RAHMBOURG, A. (1971) Int. Rev. Cytol. 31, 57.
201. INOVE, K., KITAGAWA, T. (1976) Biochim. Biophys. Acta 426, 1.
202. HELENIUS, A., SÖDERLUND, H. (1973) Biochim. Biophys. Acta 307, 287.
203. BECKER, R., HELENIUS, A., SIMONS, K. (1975) Biochemistry 14, 1835.
204. COLEMAN, R. (1973) Biochim. Biophys. Acta 300, 1.
205. NE'EMAN, Z., KAHANE, I., RAZIN, S. (1971) Biochim. Biophys. Acta 249, 169.
206. PAPAHA DJOPOULOS, D. (1972) Biochim. Biophys. Acta 265, 169.
207. KWANT, W.O., VAN STEVENINCK, J. (1968) Biochem. Pharmacol. 17, 2215.
208. SEEMAN, P. (1966) Biochem. Pharmacol. 15, 1767.
209. REMAN, F.C., DEMEL, R.A., DE GIER, J., VAN DEENEN, L.

- L.M., EIBL, H., WHESTPHAL, O. (1969) Chem. Phys. Lipids 3, 221.
210. JAIN, M.K. (1972) en "The Bimolecular Lipid Membrane" (Van Nostrand Reinhold, ed.) Nueva York.
211. ROODYN, D.B. (1962) Biochem. J., 85, 177.
212. SWANSON, P.D., BRADFORD, H.F., MC ILWAIN, H. (1964) Biochem. J. 92, 235.
213. STROMBERG, K. (1971) J. Virol. 9, 684.
214. NELSON, N., NEUMANN, J. (1972) J. Biol. Chem. 247, 1817.
215. MAC LENNAN, D.H. (1970) J. Biol. Chem. 245, 4508.
216. YONETANI, T. (1959) J. Biochem. Tokyo 46, 917.
217. ROBINSON, N.C., NOZAKI, Y., TANFORD, C. (1974) Fed. Proc. 33, 1370.
218. RUBIN, M.S., TZAGOLOFF, A. (1973) J. Biol. Chem. 248, 4269.
219. AWASTHI, Y.C., CHUANG, T.F., KEENAN, T.W., CRANE, F.L. (1971) Biochim. Biophys. Acta 226, 42.
220. GARLAND, R.C., CORI, C.F. (1972) Biochemistry, 11, 4712.

221. TZAGOLOFF, A., RUBIN, M.S., SIERRA, M.F. (1973) Biochim. Biophys. Acta 301, 71.
222. BALTSCHJEFFSKY, H., BALTSCHJEFFSKY, M. (1974) Ann. Rev. Biochem. 43, 871.
223. BIESECKER, G. (1973) Biochemistry 12, 4403.
224. HUCHO, F., CHAGEUX, J.P. (1973) FEBS Letters 38, 11.
225. STECK, T.L. (1974) J. Cell. Biol. 62, 1.
226. DUDAL, Y., HERZBERG, M., SILMAN, L. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2473.
227. POWELL, J.T., BON, S., RIEGER, F., MASSOULIE, J. (1973) Biochim. Biophys. Acta 211. 43.
228. MILLER, D.M. (1970) Biochem. Biophys. Res. Comm. 40, 716.
229. SCHNAITMAN, C. (1971) J. Bacteriol. 108, 553.
230. THOMPSON, M.F., BACHELARD, H.S. (1970) Biochem. J. 118, 25.
231. ANDERSON, J.M., BOARDMAN, N.K. (1966) Biochim. Biophys. Acta 112, 403.
232. JÖRGENSEN, P.L. (1974) Biochim. Biophys. Acta 356, 36.

233. KUBOYAMA, M., YONG, F.K., KING, T.E. (1972) J. Biol. Chem. 247, 6375.
234. KIRKPATRICK, F.H., GORDESKY, S.E., MARINETTI, G.V. (1974) Biochim. Biophys. Acta 345, 154.
235. YU, J., FISCHMAN, D.A., STOCK, T.L. (1973) J. Supramol. Struct. 1, 233.
236. EHRHART, J.C., CHAUVEAU, J. (1975) Biochim. Biophys. Acta 375, 434.
237. COLEMAN, R., HOLDSWORTH, G., FINEAN, J.B. (1976) Biochim. Biophys. Acta 436, 38.
238. MARTINDALE. "THE EXTRA PHARMACOPOEIA" 26a. ed. (Blacow, N.W., ed.) The Pharmaceutical Press. Londres 1972. pp. 385-398.
239. SLINDE, E., FLATMARK, T. (1976) Biochim. Biophys. Acta 455, 796.
240. SHACHAT, N., GREENWALD, H.L. (1967) en "Nonionic Surfactants" (Schick, M.J., ed.) Marcel Dekker. Nueva York. pp 8-43.
241. GIOTTA, G.J. (1976) Biochem. Biophys. Res. Comm. 71, 776.
242. HOGEBOM, G.H., SCHNEIDER, W.C., PALADE, G.E. (1948) J. Biol. Chem. 172, 619.

243. HOGEBOOM, G.H. (1955) en "Methods in Enzymology" (Colowick, S.P., Kaplan, N.O., eds.) vol. I. Academic Press, Nueva York, pp 16-19.
244. POTTER, V.R., ELVEHJEM, C.A. (1936) J. Biol. Chem. 114, 495.
245. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265.
246. WANG, C.S., SMITH, R.L. (1975) Anal. Biochem. 63, 414.
- 246a. LEES, M.B., PAXMAN, S. (1972) Anal. Biochem. 47, 184.
247. FOLIN, O., CIOCALTEU, V. (1927) J. Biol. Chem. 73, 627.
248. FOLCH, J. (1952) en "Phosphorus Metabolism" (Mac Elroy & Glass, eds.) vol. II. Johns Hopkins Press, Baltimore p 197.
249. SANTIAGO, E., MULE, S.J., REDMAN, C.M., HOKIN, M.R., HOKIN, L.E. (1964) Biochim. Biophys. Acta 84, 550.
250. FOLCH, J., LEES, M., SLOANE-STANLEY, G.H. (1957) J. Biol. Chem., 226, 497.
251. BARTLETT, G.R. (1959) J. Biol. Chem., 234, 466.
252. FISKE, G.H., SUBBAROW, Y. (1925) J. Biol. Chem. 66, 375.
253. NESKOVICK, N.M., KOSTIC, D.M. (1968) J. Chromat. 35, 297.

254. MORRISON, W.R., SMITH, L.M. (1964) *J. Lipid. Res.* 5, 600.
255. FAIRBANKS, G., STECK, T.L., WALLACH, D.F.H. (1971) *Biochemistry*, 10, 2606.
256. REYNOLDS, E.S. (1963) *J. Cell. Biol.* 17, 209.
257. RÖSCHLAU, P., BERNT, E., GRUBER, W. (1975) en "9th. Int. Congr. on Clin. Chemistry". Toronto. Abstr. No.1
258. TRINDER, P. (1969) *Ann. Clin. Biochem.* 6, 24.
259. CHANCE, B. (1957) en "Methods in Enzymology" (Colowick, S.P., Kaplan, N.O., eds.) Vol. IV. Academic Press. Nueva York. pp 273-329.
260. CHANCE, B. (1952) *Nature* 169, 215.
261. CHANCE, B. (1954) *Science* 120, 767.
262. REDFEARN, E.R. (1967) en "Methods in Enzymology" (Colowick, S.P., Kaplan, N.O., eds.) vol. X: Academic Press. Nueva York. pp 381-384.
263. OCHOA, S. (1955) en "Methods in Enzymology" (Colowick, S.P., Kaplan, N.O., eds.) vol. I. Academic Press. Nueva York. pp 735
264. HATEFI, Y., RIESKE, J.S. (1967) en "Methods in Enzymology" (Colowick, S.P., Kaplan, N.O., eds.) vol. X.

- Academic Press. Nueva York. pp 235-239.
265. SOTTOCASA, G.L., KUYLENSTIERNA, B., ERNSTER, L.,
BERGSTRAND, A. (1967) *J. Cell. Biol.* 32, 415.
266. ZIEGLER, D., RIESKE, J.S. (1967) en "Methods in Enzy-
mology" (Colowick, S.P., Kaplan, N.O., eds.) vol. X.
Academic Press, Nueva York. pp 231-235.
267. TISDALE, H.D. (1967) en "Methods in Enzymology" (Colo-
wick, S.P., Kaplan, N.O., eds.) vol. X. Academic Press,
Nueva York. pp 213-215.
268. KIELLEY, W. (1955) en "Methods in Enzymology" (Colowick,
S.P., Kaplan, N.O., eds.) vol. II. Academic Press, Nue-
va York. pp 593
269. VAN DE STADT, R.J., KRAAIPOEL, R.J., VAN DAM, K. (1972)
Biochim. Biophys. Acta 267, 25.
270. ROSING, J., HARRIS, D.A., SLATER, E.C., KEMP, A. Jr.
(1975) *Biochim. Biophys. Acta*, 376, 13.
271. QUINN, P.J. (1976) en "The Molecular Biology of Cell
Membranes". The MacMillan Press. Londres.
272. HOCH, F. (1971) en "Energy Transformations in Mammals:
Regulatory Mechanisms". Saunders. Philadelphia.
273. McMURRAY, W.C., MAGEE, W.L. (1972) *Ann. Rev. Biochem.*
41, 129.

274. PEREZ, P., LOPEZ-MORATALLA, N., SANTIAGO, E. (1973) Rev. esp. Fisiol. 29, 239.
275. KWANT, W.O., SEEMAN, P. (1969) Biochim. Biophys. Acta 183, 530.
276. LUCY, J.A. (1973) en "Membrane Mediated Information". (Kent, P.W., ed.) vol. 2, pp 117-128.
277. LOIZAGA, B. (1978) Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad de Bilbao.
278. LEPAGE, M. (1964) J. Lipid. Res. 5, 587.
279. HINKLE, P.C., KIM, J.J., RACKER, E. (1972) J. Biol. Chem. 247, 1332.
280. TAKANO, T., KALLAI, O.B., SWANSON, R., DICKERSON, R.E. (1973) J. Biol. Chem. 248, 5244.
281. GALLA, H-J., SACKMANN, E. (1975) Biochim. Biophys. Acta 401, 509.
282. OAKENFULL, D., FARWICK, D.E. (1977) Aust. J. Chem. 30, 741.
283. FRANKLIN, R.M. (1971) en "Current Topics in Microbiology and Immunology". Springer. Berlin.
284. WIK, S.B., CAPALDI, R.A. (1977) Biochemistry 16, 5755.

285. SINGER, T.P., KEARNEY, E.B., KENNEY, W.C. (1973) en "Advances in Enzymology" (A. Meister, ed.) vol. 37 Interscience. Nueva York, pp 189-272.
286. AITHAL, H.N., JANKI, R.M., GUSHULAK, B.D., TUSTANOFF, E.R. (1976). Arch. Biochem. Biophys. 176, 1.
287. ERNSTER, L., SANDRI, G., HUNDALL, T., CARLSSON, G., NORDENBRAND, K. (1977) en "Structure and Function of Energy Transducing Membranes". (Van Dam, K., Van Gelder, B.F., eds.) Elsevier. Amsterdam, p 209.

