

Tesis de Posgrado

Diabetes y funciones mitocondriales en miocardio de rata

Grinblat, Lea

1980

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Grinblat, Lea. (1980). Diabetes y funciones mitocondriales en miocardio de rata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1694_Grinblat.pdf

Cita tipo Chicago:

Grinblat, Lea. "Diabetes y funciones mitocondriales en miocardio de rata". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1980.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1694_Grinblat.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DIABETES Y FUNCIONES MITOCONDRIALES EN MIOCARDIO DE RATA

Tesis presentada por: LEA GRINBLAT
para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas

Director de Tesis: Dr. Andrés O.M. Stoppani
Consejero de Estudios: Dr. Israel D. Algranati
Trabajo realizado en el Instituto de Química Biológica,
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

1980

1694
EJ-2

A mi madre.

A Bernardo, Alejandra y Roberto.

Agradezco al Dr. Andrés O.M. Stoppani su comprensión, la certeza de sus apreciaciones y su guía durante la realización de estos estudios; al Dr. I.D. Algranati, quien contribuyó a mi ubicación en el Instituto de Química Biológica, por su paciente interés en mis cursos del Doctorado y por sus consejos.

Expreso mi reconocimiento a los integrantes del Instituto, profesionales y personal técnico, por la colaboración y apoyo a mi tarea.

ABREVIATURAS

- NAD y NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido en estados oxidado y reducido.
- ATP: Adenosina trifosfato.
- ADP: Adenosina difosfato.
- AMP: Adenosina monofosfato.
- EDTA: Etilendiamino-tetracetato disódico.
- ECTA: Etilenglicol, bis(aminoetileter-N N' tetracético)
- Tris: Tri(hidroximetil)aminometano.
- DNP: 2-4-dinitrofenol.
- FCCP: Trifluorometoxicarbonilcianuro, fenilhidrazona.
- DCF1: 2-6-diclorofenolindofenol.
- MSF: Metosulfato de fenazina.
- TCA: Acido tricloroacético.
- OA: Oxalacetato.
- 3-HB: 3-hidroxi butirato de sodio.
- HSD: 3-D (-) hidroxibutirato deshidrogenasa.
- nAO: nanoátomos de oxígeno.
- FMNH: Flavina mononucleótido, estado reducido.
- FAD: Flavina adenina dinucleótido.
- PPO: 2,5-difeniloxazol.
- POPOP: 1,4 bis-2-(5-feniloxazolil)benceno.

I N D I C E

CAPITULO I . INTRODUCCION	1
CAPITULO II	
a) Alteraciones metabólicas en la diabetes	2
b) Alteraciones mitocondriales	
1) Ultraestructura	5
2) Composición	5
3) Función respiratoria	6
4) Actividades enzimáticas	8
5) Biosíntesis de proteínas mitocondriales	9
c) Músculo cardíaco y diabetes	10
CAPITULO III . OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO	13
CAPITULO IV . MATERIALES Y METODOS	
Animales de experimentación	14
Métodos analíticos	14
1) Determinación de la glucemia	14
2) Determinación de proteínas	14
3) Determinación de actividades enzimáticas	
Medida de la actividad respiratoria mitocondrial ..	15
Medida de la actividad 3-D (-)HCO	16
Medida de la actividad citocromo oxidasa	16
Medida de la actividad succinato deshidrogenasa ..	18
Medida de la actividad NADH deshidrogenasa	18
4) Determinación cuantitativa de citocromos mitocon - driales	19
Preparaciones enzimáticas	
1) Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata ...	20
2) Aislamiento de mitocondrias de corazón de rata	21
3) Preparación de partículas submitocondriales de co - razón de rata	21
4) Preparación de mitocondrias fragmentadas por hipo - tonicidad	22

Determinación de la incorporación "in vitro" de leucina- ¹⁴ C a proteínas mitocondriales.	
1) Incubación de mitocondrias enteras con leucina- ¹⁴ C.	22
2) Precipitación de las proteínas marcadas	23
3) Detección de radiactividad en proteínas mitocondriales	23
Expresión de los resultados	24
Reactivos	24
CAPITULO V . RESULTADOS .	
a) Preparación de los animales. Tratamiento con estreptozotocina e insulina	25
Acción diabética de la estreptozotocina	25
Variación del peso corporal y del corazón de rata .	27
b) Capacidad respiratoria de las mitocondrias de corazón de ratas diabéticas. Control respiratorio ...	28
Estados metabólicos de la mitocondria	28
Relación P:O	29
Análisis de la dependencia de la capacidad respiratoria con el método de aislamiento de las mitocondrias intactas	31
Sustratos para la generación de los equivalentes reductores	35
Efecto de la insulina sobre la función respiratoria	36
Efecto de estreptozotocina sobre la función respiratoria	36
c) Actividad enzimática de la 3-D(-)HBD cardíaca	39
Efecto de diabetes sobre la velocidad de reacción..	41
Respuesta a la insulina "in vivo"	42
Liberación de la actividad en membrana y estabilidad de la preparación	43
Efecto de cisteína sobre la actividad enzimática ..	46
Efecto del pH sobre la velocidad de reacción	47
Efecto de la temperatura sobre la actividad	48

Propiedades cinéticas de la enzima de rata diabética	49
d) Actividades enzimáticas en membrana interna.	
Actividad citocromo oxidasa en mitocondria cardíaca.	
Determinación de velocidad inicial de reacción catalizada por mitocondrias fragmentadas	54
Cinética de la reacción. Cálculo de la constante k.	56
Actividad citocromo <u>c</u> oxidasa cardíaca de ratas diabéticas por estreptozotocina	61
Actividad enzimática NADH deshidrogenasa cardíaca de ratas diabéticas por estreptozotocina	62
Actividad succinato deshidrogenasa cardíaca de ratas diabéticas por estreptozotocina	63
e) Incorporación de aminoácidos "in vitro" a proteínas mitocondriales de corazón de rata diabética	65
Elección de las condiciones óptimas	66
Selección del sistema generador de energía	68
Inhibidores de la síntesis proteica mitocondrial..	70
Elección del sustrato respiratorio	71
Concentraciones óptimas de Mg^{++} y fosfatos	71
Elección de la solución amortiguadora	73
Dependencia del método de fraccionamiento celular.	74
Cinética de la incorporación	75
Incorporación de aminoácidos a mitocondrias cardíacas de ratas con estreptozotocina	77
Tratamiento reconstitutivo con insulina	78
Incorporación de aminoácidos a mitocondrias de ratas con hipofisectomía	79
f) Niveles de citocromos en mitocondrias de corazón de ratas diabéticas.	
Propiedades espectrales de los citocromos mitocondriales	80
Determinación cuantitativa de citocromos en la membrana mitocondrial	81

Niveles de citocromos en mitocondrias cardíacas de ratas diabéticas	82
CAPITULO VI . DISCUSION	85
Actividad respiratoria de las mitocondrias cardíacas ...	86
Respiración y fosforilación de las mitocondrias de ratas diabéticas y tratadas con insulina	89
Actividades enzimáticas en la mitocondria cardíaca de ratas tratadas con estreptozotocina	92
Actividad IIBD, relación temporal	93
Actividad IIBD, efecto de insulina	94
Detección de la actividad IIBD	95
Diferencias de la IIBD cardíaca en ratas diabéticas	96
Parámetros cinéticos de la IIBD cardíaca de ratas diabéticas	103
Incorporación de aminoácidos a mitocondrias de ratas diabéticas	106
CAPITULO VII . CONCLUSIONES	114
CAPITULO VIII . BIBLIOGRAFIA	117
RESUMEN	123

CAPITULO I

I N T R O D U C C I O N

Las mitocondrias, organoides presentes en todos los organismos aerobios, tienen un papel crítico para el aprovechamiento de la energía en las reacciones de óxido-reducción.

En una situación patológica como la diabetes se producen cambios en múltiples aspectos del metabolismo celular y algunos de estos cambios involucran a las actividades mitocondriales.

Se mencionarán a continuación los conocimientos disponibles que describen las consecuencias de la hiper o hipoinsulinemia sobre la estructura y el metabolismo mitocondrial en diversos tejidos, principalmente sobre aquellos temas que serán objeto del presente estudio.

CAPITULO II

a) Alteraciones metabólicas en la diabetes

La diabetes mellitus se caracteriza, de acuerdo con la interpretación clásica, por la alteración del metabolismo de los hidratos de carbono, que determina el síntoma primario de la hiperglucemia. Con el aporte de innumerables investigaciones centradas en el tema, se revelaron modificaciones del metabolismo lipídico y proteico (Krahl, 1974). Estos disturbios fueron atribuidos primeramente a la insuficiencia de insulina frente a los requerimientos del organismo, pero más adelante se hizo evidente que no es la única hormona responsable de la enfermedad. Glucagon, somatotrofina, glucocorticoides y con efectos más leves la hormona tiroidea inducen el estado diabético en el hombre y en ciertos animales; la somatostatina hipotalámica, factor inhibidor de la liberación de hormona de crecimiento y tirotofina, por otra parte, deprime la liberación pancreática simultáneamente de insulina y glucagon, constituyendo un elemento interesante para la terapia de la diabetes del adulto (Maugh, 1975).

Se supone que los efectos de la insulina no requieren la presencia intracelular de ésta, como es el caso de las hormonas esteroideas, sino que actúa sobre receptores de membrana con cierto grado de especificidad y afinidad, que inician las interacciones biológicas. El mecanismo molecular de la acción insulínica no está suficientemente aclarado, se acepta que la hormona actúa sobre la membrana plasmática e incrementa la entrada de glucosa, ciertos aminoácidos y iones, y contribuye a su conocido efecto anabólico.

Esta primera acción sobre el transporte no involucra cambios en la función enzimática. En un segundo paso la

hormona estimula la actividad de enzimas ligadas a la membrana para la liberación de un segundo mensajero y éste transmite la señal que influye en otros procesos enzimáticos. Se ha señalado al GMP cíclico o el ion K^+ como posibles mensajeros intracelulares (Hers, 1976).

Podemos enumerar algunos de los más importantes cambios que ocurren en la diabetes mellitus sobre el metabolismo de:

1) Glúcidos: La elevación de la glucemia se presenta en la diabetes como consecuencia de un doble mecanismo: a) disminución de la entrada de glucosa a los tejidos insulino-dependientes, principalmente los tejidos adiposo y muscular. Esta disminución implica menor utilización celular de la glucosa en las vías oxidativas, y disminución de la síntesis de glucógeno; b) mayor liberación hepática de glucosa a la circulación por inducción hormonal de la enzima glucosa-6-fosfatasa. El hígado acelera la glucógenolisis y estimula la gluconeogénesis utilizando la cadena carbonada de los aminoácidos liberados por proteólisis.

2) Lípidos: El nivel de los ácidos grasos circulantes en el plasma del diabético supera al de individuos normales, y este hecho se asocia a la disminución de la actividad antilipolítica de la insulina. La liberación de ácidos grasos por el tejido adiposo depende del balance entre las vías antagónicas de lipólisis y reesterificación. En la movilización de los triglicéridos interviene la enzima lipasa adipolítica sensible a la acción de numerosas hormonas que la activan, como glucagon y glucocorticoides que suelen encontrarse anormalmente elevados en la diabetes. La reesterificación de los ácidos grasos del adipocito, dependiente del metabolismo de la glucosa, está restringida en un organismo con déficit de insulina. En el hígado, los ácidos grasos de cadena larga tienen un papel especial en la regulación de su propia síntesis: cuando su concentración se eleva se inhibe la síntesis.

sis y simultáneamente se estimula la vía oxidativa que lleva a la formación de cantidades importantes de acetil-CoA.

3) Cuerpos cetónicos: En circunstancias normales, el acetil-CoA tiene varios caminos alternativos, de acuerdo al estado energético de la célula: cuando éste es bajo tiende a oxidarse en el ciclo del ácido cítrico, y en el caso opuesto, a la formación de ácidos grasos para su reservorio como triglicéridos; en una proporción menor constituye el sustrato para la síntesis de colesterol y cuerpos cetónicos. En el organismo diabético disminuye el acceso de acetil-CoA al ciclo del ácido cítrico, baja la actividad de la citrato sintasa debido al alto tenor de ácidos grasos y en consecuencia se exalta la síntesis de acetoacetato y betahidroxibutirato, que sobrepasan la capacidad de los tejidos extrahepáticos para catabolizarlos.

4) Proteínas: Hay un característico balance nitrogenado negativo en el diabético, como consecuencia de la disminución de la síntesis proteica y un elevado catabolismo. Debe destacarse la ausencia o disminución de ciertas enzimas "claves" que involucra la modulación genética que ejerce la insulina. La estimulación de la síntesis proteica por insulina se produce independientemente de su efecto sobre la captación celular de aminoácidos, y controla pasos de la activación de los aminoácidos, la traducción y transcripción del material nuclear.

Parte de los desórdenes enunciados se localizan dentro de las mitocondrias, donde convergen las vías del catabolismo final y el inicio de vías anabólicas que utilizan la energía liberada por las anteriores.

b) Alteraciones mitocondriales

1) Ultraestructura: Por medio de la microscopía electrónica se evidenciaron alteraciones morfológicas y de ultraestructura asociados a cambios funcionales que se producen en las mitocondrias diabéticas. Ibarano y col. (1969) y Ibarano y col. (1972) observaron que en el tejido hepático de ratas diabéticas aumentó el número y tamaño de sus mitocondrias. La ultramicroscopía de las mitocondrias aisladas reveló formas alargadas que se caracterizan por tener mayor fragilidad (ver también Hall y col., 1960; Matsubara y Tochino, 1969); estas modificaciones fueron revertidas por el tratamiento insulínico de los animales.

2) Composición: Las membranas mitocondriales están formadas por bicapas lipídicas compuestas principalmente por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y cardiolipina con proteínas activas en íntima asociación con los lípidos como requisito para su estado funcional. Las membranas interna y externa difieren químicamente tanto en sus proteínas como lípidos, y ambos componentes están sujetos a la regulación hormonal.

Todas las alteraciones en la mitocondria de animales diabéticos están estrechamente relacionados con la variación estructural de la membrana. Boveris y col. (1969) asociaron la depresión en la velocidad respiratoria de mitocondrias de ratas pancreatectomizadas con un aumento de la ubiquinona, en tanto el contenido del citocromo c no se modificó. Lerner y col. (1972) determinaron el contenido de los pigmentos respiratorios: el espectro diferencial de las mitocondrias de hígado de ratas con tratamiento aloxánico mostraba el pico de 605 nm correspondiente a los citocromo a y a₃ más deprimido que el de los animales testigos; esta

disminución era más pronunciada en ratas con cetosis pero susceptible de corrección con tratamiento insulínico; en las mitocondrias cardíacas eran idénticos los espectros de diabéticos y normales. Ellos suponen que estas alteraciones reflejan cambios estructurales de la membrana, producto del metabolismo anormal de sus componentes fosfolipídicos, en particular los ácidos grasos; en las ratas diabéticas encontraron disminuido el porcentaje de ácido araquidónico y ácidos poliinsaturados totales mientras aumenta el de ácido palmítico. Estudios similares de Vidal y col. (1977a) verificaron el déficit de ácido araquidónico en la mitocondria hepática de ratas inyectadas con estreptozotocina acompañado en este caso del aumento de ácido linoleico.

3) Función respiratoria: Muchos investigadores atribuyeron a la insulina alguna acción sobre la generación de uniones fosfato de alta energía. Comenzaron estudiando el recambio de fosfato inorgánico marcado o de reacciones dependientes de ATP en distintos tejidos de animales diabéticos para pasar luego a sistemas más simples, por ejemplo mitocondrias aisladas, para anular las interacciones con otras reacciones celulares que consumen ATP. Para señalar las particularidades del efecto de la diabetes en distintos tejidos se detallan separadamente los estudios referidos a las mitocondrias hepáticas y de músculo.

El hígado es el tejido más afectado dado su papel en la regulación del metabolismo, y se encontraron deficiencias en el consumo de oxígeno y en la actividad fosforilante medida como relación ADP/O en las mitocondrias de gatos pancreatectomizados (Hall y col., 1960; Vester y Stadie, 1957) y de ratas tratadas con aloxano (Harano y col. 1969; Harano y col. 1972; Hall y col. 1960; Matsubara y Tochino 1969; Lerner y col. 1972); la respiración mitocondrial se encontraba en estos casos desacoplada de la fosforilación

oxidativa. La insulina restableció los valores normales, tanto en experiencias "in vivo" (Hall y col. 1960; Matsubara y Tochino 1969; Lerner y col. 1972; Vester y Stadie 1957) o "in vitro" (Hall y col. 1960)

Schäfer y Nägel (1968) inyectaron insulina a animales no diabéticos, en cuyo caso comprobaron el efecto contrario al estado diabético, con incremento del consumo de oxígeno y control respiratorio, sin que se hubiera alterado la relación ADP/O.

El incremento del nivel de ácidos grasos de cadena larga en el plasma e hígado de rata diabética induce la aceleración de la respiración de las mitocondrias hepáticas; Harano y col. (1969 y 1972) indicaron que fué de 90% el aumento del consumo de oxígeno cuando las mitocondrias se incubaron con palmitato, como resultado de la acción desacoplante de los ácidos grasos (Matsubara y Tochino, 1969; Lerner y col. 1972); el efecto es revertido por la presencia de albúmina en las incubaciones.

Resultados opuestos a los que se acaban de describir fueron publicados por Parks y col. (1955), en experiencias con ratas que se sacrificaron después de un mes de inyectar aloxano, indicaron que las mitocondrias hepáticas tenían consumos de oxígeno y relación ADP/O normales durante la oxidación de una serie de sustratos. Tomando en consideración estos últimos datos se planteaba la duda si el estado de los animales y los efectos secundarios a la inducción de la diabetes da lugar a las deficiencias respiratorias detectadas en algunos laboratorios. Boveris y col. (1969) utilizaron ratas pancreatectomizadas para evitar los efectos colaterales de los diabetógenos y comprobaron que las mitocondrias hepáticas consumían oxígeno a velocidad 25% menor que los controles durante la oxidación de diversos sustratos, y el déficit respiratorio era más notable

con 3-hidroxi-butirato, llegando al 50%; la amplitud del efecto observado era paralelo al desarrollo de la diabetes.

En las mitocondrias de músculo esquelético incubadas con varios metabolitos del ciclo del ácido cítrico no se llegó a detectar variación significativa del consumo de oxígeno, control respiratorio e Índice P:O entre ratas diabéticas y testigos (Dow, 1967; Favelukes y col. 1973). La actividad ATPásica de esas mitocondrias tampoco parece afectada.

Los ensayos con homogenatos de tejido cardíaco demostraron que preparaciones obtenidas de ratas inyectadas con aloxano tenían menor velocidad fosforilante que sus correspondientes testigos (Haugaard y Haugaard, 1964).

4) Actividades enzimáticas: Dentro de la descripción global de modificaciones del metabolismo en el diabético, se mencionaron algunas producidas por defectos de enzimas de localización mitocondrial, y a continuación se analizarán aquellas alteraciones relacionadas con la velocidad del ciclo del ácido cítrico, respiración y fosforilación mitocondrial y síntesis de cuerpos cetónicos.

Schäfer y Nägel (1968) midieron la actividad de enzimas hepáticas de ratas inyectadas con insulina, notando el aumento de actividad alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, HBD, succinato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, glutamato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa (dependiente de NAD y de NADP) y aspartato transaminasa paralelamente con el aumento de la capacidad respiratoria de las mitocondrias intactas que ya hablamos descripto.

En ratas con diabetes experimental se observó el efecto inverso: enzimas que participan del ciclo tricarboxílico como malato deshidrogenasa (Armstrong y Januzzo, 1976) y succinato deshidrogenasa (Karl y col., 1976) disminuyen su capacidad catalítica. Sin embargo Harano y col. (1972) no

detectaron diferencia en la velocidad de las reacciones catalizadas por citrato sintasa, aconitasa, isocitrato deshidrogenasa (dependiente de NAD y NADP), alfacetoglutarato deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, fumarasa y malato deshidrogenasa, entre ratas con aloxano y sus testigos.

La disminución de la actividad citocromo oxidasa fué comprobada por Lerner y col. (1972) en la fracción mitocondrial de hígado de ratas con aloxano, a 3 y 5 días de la dosis diabética. La actividad HBD hepática fué determinada en perros pancreatectomizados por Roldan y col. (1971), como continuación de sus propias observaciones de la depresión de la respiración mitocondrial con ese sustrato, y comprobaron que la actividad enzimática bajó a la mitad de su valor normal al mismo tiempo que el nivel plasmático de cuerpos cetónicos se triplicaba; la insulina "in vivo" tuvo efecto reparador tanto sobre la actividad de la deshidrogenasa como sobre la cetosis. Vidal y col. (1977a) midieron la actividad de la misma enzima con vesículas submitocondriales de hígado de ratas inyectadas con estreptozotocina, en las que encontraron una importante disminución. La apoenzima extraída de mitocondrias diabéticas y unida a una mezcla de fosfolípidos de mitocondrias normales tenía una actividad enzimática comparable a los normales (Vidal y col. 1977 b; 1978a).

5) Biosíntesis de proteínas mitocondriales: Existe un mecanismo de control para la síntesis coordinada de polipéptidos en mitocondrias y citoplasma, a través de proteínas de codificación nuclear y síntesis en microsomas, con las cuales se ensamblan los péptidos de la síntesis mitocondrial.

Es ampliamente conocido que la síntesis de proteínas en ribosomas citoplasmáticos de tejido hepático (Pilkis y Korner, 1971) y muscular (Wool y col., 1968; Manchester y Young, 1960; Pain, 1973; Chain y Sender, 1973) de animales

diabéticos se desarrolla con menor velocidad que la normal. El músculo cardíaco tiene diferente respuesta que el esquelético, no varía la velocidad de incorporación de fenilalanina- ^{14}C en experiencias con corazones perfundidos de ratas aloxánicas (Rannels y col., 1970) o con estreptozotocina (Rannels y col, 1970; Chain y Sender, 1973). La incorporación "in vitro" del aminoácido radiactivo a polirribosomas de músculo cardíaco de ratas con estreptozotocina también es comparable a la de ratas normales (Chain y Sender, 1973).

La adición de insulina al medio de perfusión estimuló la incorporación de aminoácidos a proteínas de corazones no diabéticos (Wool y Manchester, 1962; Chain y Sender, 1973) o diabéticos por estreptozotocina, y el efecto es similar en el sistema de músculo esquelético (Manchester y Young, 1958; Wool y Krahl, 1959).

En estudios similares del sistema mitocondrial, Favell y col. en 1973, y Möckel y Beattie en 1975, encontraron deprimida la incorporación de aminoácidos marcados a las mitocondrias intactas de ratas diabéticas por aloxano o estreptozotocina, en tanto los ensayos con mitocondrias hepáticas no lograron detectar cambios significativos.

c) Músculo cardíaco y diabetes

La diversidad de las alteraciones que se presentan en los distintos tejidos de animales diabéticos indican una capacidad particular de cada órgano para adaptar su metabolismo a ese estado.

El metabolismo del miocardio está orientado al cumplimiento de la función de contracción muscular rítmica, y el papel de las mitocondrias como productores de las uniones de alta energía por la fosforilación oxidativa es crítico para este tejido que trabaja en condiciones esencialmente

aerobias. La célula cardíaca cuenta para satisfacer su demanda energética con numerosas mitocondrias que ocupan hasta el 40% de su citoplasma, surcadas por un importante número de crestas que le permiten responder instantáneamente a una sobrecarga con la producción de ATP, pudiendo elevar la velocidad de consumo de oxígeno a 5 veces su nivel basal.

El músculo cardíaco contiene pequeña cantidad de glucógeno en calidad de reserva y sólo para situaciones de emergencia. En el individuo en reposo la glucosa representa alrededor del 20% del aporte de energía; en caso de isquemia su oxidación no se completa y produce lactato y piruvato. Trabajando a ritmo forzado por ejercicio intenso o en ayuno prolongado puede utilizar una proporción considerable de sus propios triglicéridos, para lo cual cuenta con actividad de lipoproteínlipasa. En condiciones post-prandiales el cociente respiratorio es 0,74 y se calcula que contribuyen hasta 28% la glucosa, 1% piruvato, 11% lactato, 7% cuerpos cetónicos y 60% de ácidos grasos (ver revisión de Campbell y Hales, 1976).

El recambio proteico es mucho más activo que el de músculo esquelético, siendo capaz de sintetizar nuevo tejido contráctil frente a un esfuerzo sostenido o un infarto. La captación de glucosa en el corazón perfundido de rata está inhibido por concentraciones fisiológicas de ácidos grasos libres. En animales diabéticos, cuando la captación de glucosa es deficiente, el corazón puede derivar más del 95% de su energía de los ácidos grasos libres y cuerpos cetónicos. Los ácidos grasos son utilizados en proporción a su concentración plasmática ya que no hay impedimentos para la entrada a la célula y la regulación de su metabolismo está dada primordialmente por la velocidad de oxidación del acetil-CoA y del ciclo del ácido cítrico.

El cociente respiratorio del corazón diabético es inferior al normal, y varía entre 0,54 y 0,73, valores que definen a los lípidos como combustibles principales.

Con la administración simultánea de glucosa e insulina a diabéticos en ayunas aumenta la captación de glucosa y en consecuencia el cociente respiratorio se eleva a 1,17 .

CAPITULO III

OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo del presente trabajo es verificar la influencia de la diabetes experimental sobre las mitocondrias de corazón de rata, y la corrección de las modificaciones que se observen mediante la administración de insulina.

Se estudiarán las siguientes funciones características mitocondriales:

1) Actividad respiratoria con diferentes sustratos, y acoplamiento de la fosforilación oxidativa, medida por el consumo de oxígeno, el control de la respiración y la relación ADP:O .

2) Actividades enzimáticas de la membrana interna.

3) Niveles de los transportadores de electrones mitocondriales, medidos cuantitativamente por sus componentes espectrales.

4) Actividad de la síntesis proteica medida por la velocidad de incorporación "in vitro" de leucina radiactiva a mitocondrias enteras.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y METODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se utilizaron ratas macho, cepa Williams del Instituto de Quimica Biológica, cuyo peso inicial oscilaba entre 180 y 220 g. Los animales tenían libre acceso a agua y alimento comercial Forramex o Purina.

Para la inducción de diabetes se inyectó por vía endovenosa una única dosis de estreptozotocina de 65 mg/kg de peso, en solución de citrato 0,1 M (pH 4,5), preparada en el momento y utilizada dentro de los 3 a 5 minutos. Se consideraron aptos para los ensayos aquellos animales cuya glucemia superaba los 300 mg%. Las ratas testigo fueron inyectadas simultáneamente con la solución de citrato.

El tratamiento insulínico de animales diabéticos o testigos consistió en dosis de 8 a 10 U por día de Insulina NPH Lilly de liberación lenta, por vía intraperitoneal.

METODOS ANALITICOS

1 - Determinación de la glucemia: Se efectuó por el método de Nikkilä y Hyvärinen (1962) en muestras de sangre extraídas de la cola con el agregado de cristales de FNa como anticoagulante. Se leyó la absorbancia a 625 nm contra un testigo de glucosa de 100 mg%.

2 - Determinación de proteínas: Se aplicó el procedimiento rápido de Jacobs y col. (1956) agregando desoxicolato de sodio a la suspensión de proteínas de la fracción mitocondrial en concentración final del 0,2%. Se leyó la absorbancia a 540 nm contra testigos de albúmina.

3 - Determinación de actividades enzimáticas

Medida de la actividad respiratoria mitocondrial: Se efectuó por el método polarográfico siguiendo la velocidad de consumo del oxígeno en una suspensión de mitocondrias enteras, durante la oxidación de un sustrato que se indica oportunamente, mediante el uso de un polarógrafo Gilson Medical Electronic Oxigraph model K con electrodo de oxígeno Clark dotado de movimiento vibratorio para acelerar el equilibrio del oxígeno con el electrodo. Se llenó la celda polarográfica con 1,9 ml de una solución apropiada a la muestra de mitocondrias a ensayar, saturada con aire y a temperatura constante de 30 °C. Se estimó el contenido inicial de oxígeno disuelto a esa temperatura en 234 μ moles/l según el Handbook of Chemistry and Physics (1956). El consumo de oxígeno se registró a partir de la adición de 0,1 ml de fracción mitocondrial conteniendo 2 a 3 mg de proteína más un sustrato oxidable. Al cabo de 2 o 3 minutos se agregó solución de ADP a pH 7,4 y se siguió la lectura hasta que el contenido de la celda se tornara anaeróbico por consumo total del oxígeno.

Solución amortiguadora para las medidas de respiración mitocondrial: Para mitocondrias hepáticas se utilizó un medio que contenía sacarosa 240 mM, ClK 34 mM, Cl_2Mg 5 mM, EDTA 0,9 mM, Tris-ClH 9 mM a pH 7,4 a 30 °C y solución de fosfatos 6 mM a pH 7,4 ; y para mitocondrias cardíacas contenía manitol 250 mM, ClK 10 mM, EDTA 2 mM, Tris-ClH 10 mM de pH 7,4 y fosfatos 5 mM e igual pH.

Cálculo de la concentración de ADP: Se midió espectrofotométricamente la absorbancia de la solución de ADP en las medidas respiratorias, diluida en ClH 0,01 N utilizando el coeficiente milimolar de extinción a pH 2 de $14,9 \text{ cm}^{-1}$.

Medida de la actividad 3 D (-) Hidroxibutirato deshidrogenasa E C (1.1.1.30): Se basa en el método de Williamson y col. (1962) de medición del NADH formado en la reacción catalizada por la enzima unida a membrana mitocondrial, con las modificaciones que se mencionarán oportunamente.

Se incubaron las fracciones mitocondriales o partículas submitocondriales con solución de Tris-ClH 50 mM a pH 8 durante 10 minutos con concentraciones variables de NAD entre 0,1 y 2,0 mM a la temperatura de 30 °C; 0,3 µg de rotenona en solución alcohólica reemplazan a 0,01 mg de antimicina A del método original. La velocidad de reducción del NAD se evidenció al agregar la mezcla racémica de betahidroxibutirato por el aumento de absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Beckman DB-G con registrador. Para medir la actividad enzimática en función de la temperatura se usó un monocromador Beckman DU acoplado a un Gilford Model 2000 Absorbance Recorder, termostatzado y provisto de resistencia de platino en la base de las cubetas para seguir la temperatura de la celda durante la reacción.

La actividad específica se expresó como velocidad de reducción en µmoles del NAD por mg de proteína mitocondrial y por minuto, aplicando para el cálculo el coeficiente de extinción del NADH = $6,22 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (Horecker y Kornberg, 1948).

Medida de la actividad citocromo oxidasa E C (1.9.3.1):

Se determinó por el método espectrofotométrico de Smith (1954) basado en la medida de la velocidad de oxidación aeróbica del citocromo c soluble catalizada por una suspensión de mitocondrias fragmentadas.

Se utilizó un espectrofotómetro Beckman DB-G provisto de registrador de velocidad variable y la reacción se llevó a cabo en cubetas de 3 ml termostatzadas a 25 °C. La mezcla de reacción consistía en una solución 15 µM del citocromo c disuelto en fosfato 0,1 M y cantidades de proteína mitocon-

drial entre 2 y 45 $\mu\text{g/ml}$ que se agregaron rápidamente a las cubetas para medir la velocidad de reacción en los primeros minutos.

Para el cálculo de la actividad específica se utilizó el coeficiente de extinción $20,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ que corresponde a la diferencia entre los coeficientes del citocromo c reducido menos el oxidado: 29,5 menos 9,0 respectivamente, (Margoliash y Walasek, 1967).

Determinación de la concentración total de citocromo c

El citocromo c en cada incubación, presente en forma reducida + oxidada, se determinó reduciéndolo cuantitativamente con ditionito de sodio y midiendo la absorbancia a 550 nm utilizando el coeficiente milimolar $20,5 \text{ cm}^{-1}$ antes mencionado.

Reducción del citocromo c: Por adición de ascorbato de sodio, se evidencia en pocos minutos a través del cambio de color de la solución de citocromo disuelto en fosfato de potasio 0,01 M a pH 7,0 que pasa de pardo a salmón. El exceso de ascorbato se eliminó por diálisis durante 24 horas con cambios de la solución de fosfatos de la misma concentración y pH, hasta ausencia de viraje del colorante 2-6 diclorofenolindofenol. La solución de citocromo se mantiene en estado reducido durante varias semanas, tomando la precaución de guardarlo congelado en frasco con tapa esmerilada y sin que quede cámara de aire sobre el nivel del líquido. El grado de reducción que se logra por este método sobrepasó el 70%; por debajo de este porcentaje el citocromo c oxidado inhibe la reacción enzimática. Esta proporción corresponde a una relación de absorción a 550 nm/565 nm superior a 6 (Paul, 1947)

Medida de la actividad succinato deshidrogenasa: Se utilizó el método de Arrigoni y Singer (1962) para la medida de succinato-metoesulfato de fenazina (MSF) reductasa en muestras de mitocondrias con membranas fragmentadas. El leucoderivado de MSF es reoxidado por 2,6 -diclorofenolindofenol, cuyo cambio de absorbancia en función del tiempo a 800 nm se registró en el espectrofotómetro Beckman DB-G.

Las incubaciones contenían solución de fosfato 50 mM a pH 7,4, succinato 20 mM, cianuro 1 mM, y aproximadamente 0,1 a 0,2 mg de la preparación enzimática consistente en mitocondrias de corazón de rata sometidas a tratamiento hipotónico según método de Parsons y Williams (1967). Después de 15 minutos a 30 °C se adicionó solución recientemente preparada de 2,6-diclorofenolindofenol hasta una concentración final de 0,06 mM y se determinó la línea de base de la reacción espontánea que se restó de la variación de absorbancia del MSF. La actividad enzimática se registró al adicionar este último compuesto, hasta la reducción total del 2,6-diclorofenolindofenol, que requiere 2 a 3 minutos.

Expresión de los resultados: La actividad específica se calculó utilizando el coeficiente de absorción mM del 2,6-diclorofenolindofenol a 600 nm:19,1 (Minakami y col., 1962) y en base a la relación mol a mol entre el succinato y el colorante reducidos; el resultado se expresó como actividad específica de la reacción en micromoles de succinato oxidados por minuto y por miligramo de proteína mitocondrial.

Medida de la actividad NADH deshidrogenasa: La actividad de esta enzima ligada a la cadena respiratoria se midió como NADH-ferricianuro óxido reductasa, según técnica de Minakami y col. (1962) siguiendo espectrofotométricamente la deshidrogenación de NADH acoplado a la reducción de ferricianuro de potasio por la FMNH, grupo prostético de la enzima.

El medio de reacción contenía: fosfato 40 mM a pH 7,4, 25 μ l del sustrato: NADH 15 mM y concentraciones crecientes de ferricianuro de 0,5 a 1,5 mM para determinar la velocidad máxima de reacción. El volumen total de 3 ml se incubó a 30 °C y durante 30 segundos; se registró un cambio de absorban- cia apreciable que se restó de la velocidad de la reacción enzimática. Esta comenzó con el agregado rápido de la mues- tra de mitocondrias en un volumen suficientemente pequeño para que la dilución sea despreciable.

Para el cálculo de la actividad específica se utilizó el coeficiente de extinción del ferricianuro de potasio a la longitud de onda registrada, 420 nm, de $1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. El resultado se expresa como actividad máxima respecto al fe- rricianuro en μ moles NADH/min/mg proteína considerando que 1 mol de NADH se oxida por cada 2 moles de ferricianuro que se reducen.

De los gráficos de Lineweaver-Burk se calcularon las $V_{\text{Máx}}$ de la reacción respecto al oxidante, ferricianuro, utilizando el método de cuadrados mínimos para la compensación de errores.

4 - Determinación cuantitativa de citocromos mitocondriales

La determinación simultánea de los niveles de citocro- mos por los espectros diferenciales de absorción de sus gru- po prostéticos se basó en el método desarrollado por Chance y Williams (1955) utilizando el espectrofotómetro diferencial B. Chance de haz dividido construido en la Johnson Foundation Un. of Pennsylvania, Philadelphia, Pa. El aparato provee la medida simultánea de los citocromos en estado reducido y oxi- dado de dos diluciones idénticas de mitocondrias que difie- ren en su tratamiento químico.

En ambas cubetas de 3 ml se colocan entre 3 y 4 mg de proteína mitocondrial suspendida en sacarosa 0,25 M con so-

lución de fosfatos a pH 7,4. Para llevar los citocromos al estado totalmente oxidados se agregaron 15 μ moles de ferricianuro a una, y para reducirlos se disuelven unos cristales de ditionito de sodio en la otra cubeta, agitando unos minutos. El trazado del registrador grafica directamente la diferencia de densidad óptica entre ambas cubetas para cada longitud de onda entre 500 y 630 nm.

Cálculo de los contenidos de citocromos mitocondriales ;

La estimación de la concentración de cada uno de los citocromos en presencia de los demás se basó en el método de J.N. Williams (1964). Se midió la diferencia de absorbancia entre los máximos y mínimos correspondientes a cada citocromo, que se presentan en los siguientes pares de longitudes de onda, y cuyos coeficientes se detallan a continuación:

citocromo <u>c</u>	550-535 nm	A= 21,0 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$
" <u>c₁</u>	554-540 "	A= 18,8 " "
" <u>b</u>	563-577 "	A= 14,3 " "
" <u>a-a₃</u>	605-630 "	A= 12,0 " "

Los datos se aplicaron a un sistema de ecuaciones cuya resolución fué provista por el trabajo citado, del cual se extraen las concentraciones buscadas.

PREPARACIONES ENZIMATICAS

1 - Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata: Se basó en el método de fraccionamiento de Hogeboom (1955) modificado por Myers y Slater (1957). Se homogeneizó el tejido hepático en 9 volúmenes de solución de sacarosa 0,25 M, con Tris-ClH 5 mM a pH 7,5 y EDTA 1mM (medio STE) en un Potter-Elvehjem con pistilo de teflón. Una centrifugación a 750xg durante 10 minutos decantó el material nuclear, células y membranas, y del sobrenadante se sedimentó la fracción mitocondrial a 7000 xg durante 10 minutos, la cual se lavó 2 ve-

ces y resuspendió en la misma solución de homogeneización en un volumen tal que la concentración de proteínas fuera aproximadamente 15 mg/ml.

2 - Aislamiento de mitocondrias de corazón de rata: Se utilizó el método de Favelukes y col. (1971) desarrollado para músculo esquelético, con ligeras modificaciones. Se extrajo el corazón del animal recién decapitado descartando el tejido auricular; el resto se cortó con tijeras y lavó en solución CLK 0,15 M hasta que los líquidos de lavado resultaron libres de sangre. Se incubó 10 minutos a 0°C en 12 volúmenes del medio de homogeneización de Chappell y Perry (1954) adicionado con 2 mg. de proteinasa nagarse por cada gramo de tejido, y luego se diluyó hasta 25 volúmenes para cortar la incubación homogeneizando en un Pooter-Elvehjem y centrifugando 5 minutos a 500 xg para descartar el sedimento con fibras musculares, restos celulares, eritrocitos, membranas y material nuclear. Del sobrenadante se separó la fracción mitocondrial por centrifugación a 7700 xg durante 10 minutos. El precipitado se resuspendió para los lavados en el mismo medio al que se agregó albúmina 1 mg/ml. Las mitocondrias se suspendieron finalmente en sacarosa 0,25 M. El rendimiento obtenido fué de 10 a 15 mg. de proteína mitocondrial por cada gramo de tejido cardíaco.

3 - Preparación de partículas submitocondriales de corazón de rata: Se utilizó la técnica de Linnane y Ziegler descrita por Beyer (1967). Partiendo de una preparación mitocondrial cuya concentración de proteínas no era inferior a 20 mg/ml. Se sometió la suspensión a desintegración sónica durante 60 segundos, en períodos de 10 para evitar que aumente la temperatura. Se utilizó un Desintegrador Ultrasónico MSE (Measuring & Scientific Equip. Ltd. London) de 500 watt, la frecuencia era de 20 Kc/segundo, intensidad 0,4 a 0,5 mA, y la temperatura se mantuvo colocando el recipiente en baño

de hielo. Se centrifugó la preparación durante 10 minutos a $7700 \times g$ y 4°C para descartar las mitocondrias sin romper y fragmentos de gran tamaño, y el sobrenadante se centrifugó a $105000 \times g$ durante 40 minutos en centrifuga Spinco L con rotor tipo 40. Las partículas de membranas se suspendieron en 2 ml del medio de homogeneización y se conservaron congeladas a -15°C .

4 - Preparación de mitocondrias fragmentadas por hipotonicidad: Se siguió la técnica de Parsons y Williams (1967). Las fracciones mitocondriales aisladas por el método habitual se lavaron y suspendieron en solución de fosfatos 20 mM a pH 7,5 con 0,02 % de albúmina de suero bovino. Después de incubar 20 minutos a 4°C se centrifugó para separar la solución hipotónica a $35000 \times g$ durante 20 minutos, el sedimento consistió en partículas de membrana interna juntamente con fragmentos de membrana externa. Se resuspendió en solución 0,1 M de fosfatos a pH 7,5 para ser utilizado en las incubaciones como preparación enzimática de membrana interna.

DETERMINACION DE LA INCORPORACION "IN VITRO" DE LEUCINA- ^{14}C A PROTEINAS MITOCONDRIALES

1 - Incubación de mitocondrias enteras con leucina- ^{14}C : Se incubaron entre 1 y 2 mg de proteínas de mitocondrias frescas, de respiración activa y acoplada a la fosforilación de ADP, junto a $0,25 \mu\text{Ci}$ de leucina- ^{14}C de radiactividad específica $6,5 \mu\text{Ci/mol}$. El sistema para la incorporación de aminoácidos a las proteínas mitocondriales contenía una mezcla previamente esterilizada por filtración a través de discos Millipore de poro 0.22μ , compuesta por una mezcla equimolecular de aminoácidos excepto leucina, sacarosa 100 mM, ClK 40 mM, EDTA 1,3 mM, Bicine 10 mM (pH 7,4), solución de

fosfatos 8 mM de pH 7,4, SO_4Mg 12 mM, malato 10 mM, glutamato 10 mM, malonato 5 mM, ADP 2 mM.

La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 1 ml, en frascos Erlenmeyer esterilizados y con tapón de algodón, a temperatura constante de 30 °C y con agitación durante 60 minutos. Al cabo de ese tiempo se cortó la reacción enfriando los frascos a 0 °C sobre hielo y por dilución con solución de leucina no radiactiva.

Todo el material de vidrio para el experimento fué esterilizado previamente en autoclave, y las alícuotas se prepararon bajo luz UV.

2 - Precipitación de las proteínas marcadas: Se agregó 2 ml de solución de albúmina de 50 mg% en ClK 0,15 M a cada incubado conteniendo 2 ml de la solución descrita anteriormente para aumentar el volumen del precipitado. Las proteínas se precipitaron con ácido TCA de concentración final 5%, se centrifugaron y se lavaron con TCA al 5%.

La suspensión de las proteínas insolubles en TCA al 5% se llevó a 85 °C durante 15 minutos para eliminar el aminoacil-t RNA que no formó uniones peptídicas. Se volvieron a lavar en TCA en frío y finalmente en alcohol:éter 3:1. Se resuspendió el precipitado en TCA al 5% y se filtró por discos Millipore de 0,45 μ para retener las proteínas radiactivas.

3 - Detección de radiactividad en las proteínas mitocondriales : Los filtros Millipore conteniendo las proteínas fueron colocados en viales de vidrio para secar bajo lámpara IR. Se agregó en cada vial 5 ml de líquido centelleador de la siguiente composición: 4 g de PPO y 100 mg POPOP en 1 litro de tolueno. En todas las determinaciones se utilizó la misma cantidad de proteínas mitocondriales para formar una capa de espesor uniforme sobre los filtros. Las muestras se leyeron en un Nuclear Chicago Liquid Scintillation Coun-

ter con sustracción automática del background. La calibración de la eficiencia del espectrómetro de centelleo líquido para ^{14}C se realizó por el método de la relación de canales, utilizando muestras patrón con distintos grados de apagamiento. El canal 1 operó con 9% de ganancia y ventana 90-1000, y el canal 2 con igual ganancia y ventana 50-1000.

EXPRESION DE LOS RESULTADOS

El análisis estadístico de series de experimentos repetidos se hizo en base al cálculo de la media aritmética de los valores acompañándola del error standard. Para probar la significancia de las diferencias de datos pertenecientes a poblaciones de animales que recibieron distintos tratamientos se sometió a la prueba de t (Bancroft, 1971).

En los gráficos de Lineweaver-Burk se utilizó el método de los cuadrados mínimos para la compensación de errores en el cálculo de constantes cinéticas.

REACTIVOS

Nagarse (BPN') 150×10^4 P.U.N./g de Nagarse & Co.Ltd., Osaka, Japon.

Estreptozotocina, Upjohn International Inc., Kalamazoo, Mich.

Insulina NPH, Elli Lilly & Co.

L-leucina- ^{14}C , Radiochemical Center, Amersham, England.

PPO Amersham, Searle.

POPOP, Nuclear, Chicago.

DL-3-hidroxitirato, citocromo c (type IV) de corazón de caballo, NAD, NADH, AMP, ADP, ATP, Trisma Base, albúmina de suero bovino, y otros, de Sigma Chemical Co. St.Louis, Mo.

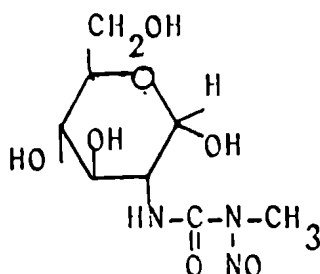
Sacarosa, manitol, y otros reactivos que no se detallan, eran drogas de pureza analítica y de laboratorios acreditados.

CAPITULO V

R E S U L T A D O S

a) PREPARACION DE LOS ANIMALES - TRATAMIENTO CON ESTREPTOZOTOCINA E INSULINA

Acción diabética de la estreptozotocina: La 2 deoxi-2-(3 metil, 3 nitrosoureido)D glucopiranososa:



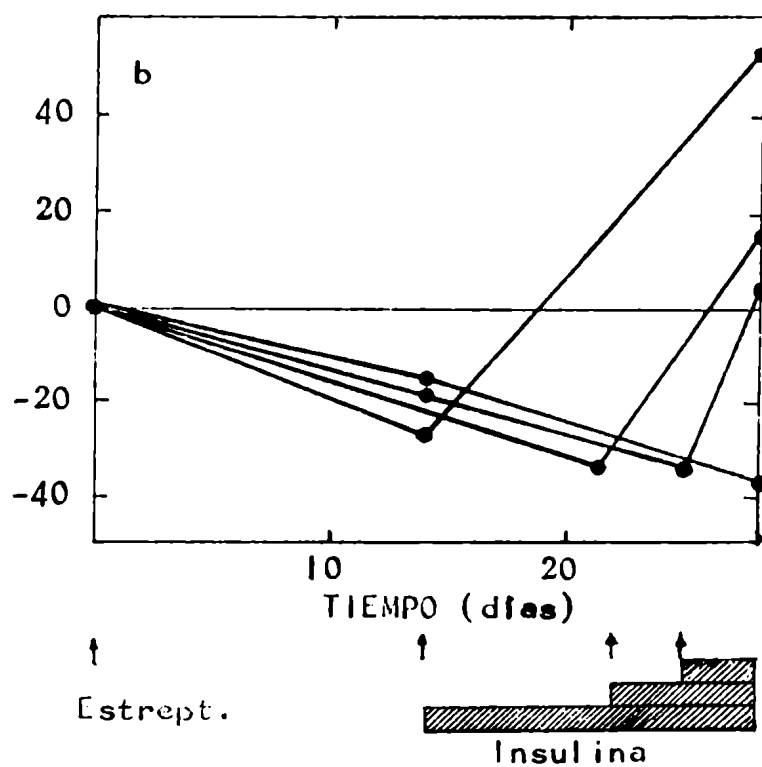
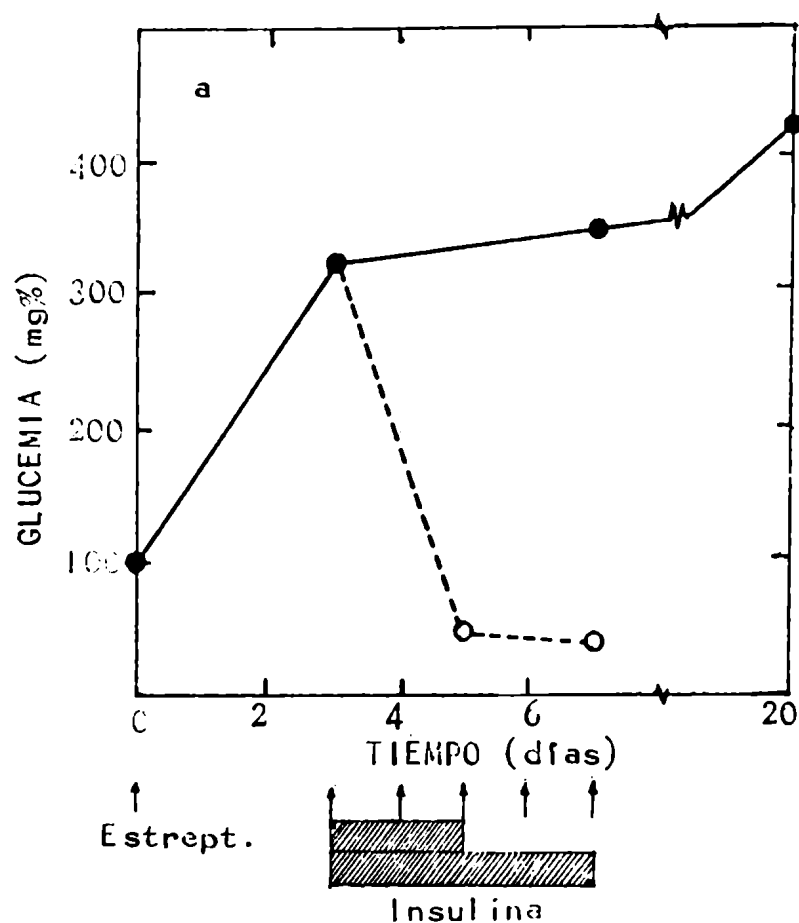
es un antibiótico derivado del Streptomyces achromogenes que aventaja al aloxano para la inducción de diabetes experimental porque combina su acción rápida con la

especificidad betacitotóxica que no produce daños en otros tejidos, salvo los secundarios a la hiperglucemia e hiperlipemia. (Junod y col., 1967).

La cadena lateral del ureido sustituido parece ser la porción de la molécula responsable del daño tisular, que se produce rápida y específicamente sobre las células beta debido a la unión de los receptores celulares a la porción glucosídica de la molécula (Karunanayake y col. 1976).

A pocas horas de administrar una única dosis endovenosa las células necrotizadas liberan insulina y se inicia un período de hipoglucemia responsable de la mortandad de los animales. La tasa de mortandad en nuestras ratas fué de 10 a 20%, y sólo en unos pocos lotes llegó a 50% por causas que no pudieron explicarse. Superado el período crítico de 24 a 48 horas no se presentaron más muertes y el estado diabético se mantuvo con sobrieda de varios meses. Rakieten y col. (1976) detectaron reversión después de 10 meses por regeneración de los islotes. Las ratas diabéticas para

Figura 1 - EFFECTO DE ESTREPTOZOTOCINA E INSULINA EN RATAS
 Ratas macho de 200 g. Dosis de 13 mg de estreptozotocina.
 Dosis de insulina NPH 10 U/dfa. a) Nivel de glucosa sangui-
 nea: ● ratas diabéticas; ○ ratas diabéticas + 2 y 5 dosis de
 insulina. b) Peso corporal de ratas, diabéticas y con 0,3,7
 y 14 dosis de insulina.



nuestros experimentos no llegaron a períodos tan prolongados por cuanto se utilizaron entre los 2 y 40 días posteriores a la aplicación de estreptozotocina. Las ratas mostraban los síntomas típicos de poliuria, polidipsia, pérdida de peso y desaparición de tejido adiposo. El ensayo con la tirilla Ketodiastix Ames dió resultados positivos de cuerpos cetónicos urinarios en algunos animales, pero negativo en todos aquellos casos con más de 10 días de diabetes.

La glucemia en ayunas ascendió desde su valor normal promedio de 100 mg% a 328 mg% en la primer semana, con un rango de dispersión entre 200 y 460 mg%, y a 425 mg% en la diabetes crónica de 3 y 4 semanas, con rango de dispersión entre 360 y 550 mg%, (Figura 1 a).

La administración de 10 U de insulina diaria llevó la glucemia a niveles inferiores a los normales: menor que 50 mg%, similares a los que presentaron ratas no diabéticas que se inyectaron igualmente con insulina.

Variación del peso corporal y del corazón de la rata

Las ratas cuyo peso promedio inicial era 200 g perdieron de 15 a 30 g en las 2 semanas que siguieron a la inducción de la diabetes, y hasta 37 g en 3 semanas. Las dosis de insulina produjeron una rápida recuperación de peso, más acentuada en aquellos animales que habían soportado tiempos prolongados de hipoinsulinemia (figura 1 b). Los testigos no diabéticos también aceleraron el crecimiento con las primeras dosis y siguieron su evolución normal.

Se pudo apreciar el menor tamaño y peso del corazón en las ratas con 7 días de diabetes, y recuperación parcial en las de 30 días, según datos de la Tabla 1.

Tabla 1 - VARIACION DE PESO DEL CORAZON DE RATA DIABETICA
 Ratas de peso 180 - 220 g se inyectaron con una dosis endovenosa de estreptozotocina de 65 mg/kg de peso. Se extrajeron los corazones de ratas recién decapitadas, que se lavaron en ClK 0,15 M,

Animales	Nº de casos	Peso promedio (gramos)	Límites de variación (gramos)
Control	25	0,60	0,50 - 0,75
Diabéticos			
7 días	24	0,47	0,40 - 0,55
30 días	15	0,53	0,44 - 0,66

b) CAPACIDAD RESPIRATORIA DE LAS MITOCONDRIAS DE CORAZON DE RATAS DIABETICAS

Se midieron los siguientes parámetros útiles para estudiar la capacidad respiratoria de mitocondrias de corazón de rata, y de sus variaciones por modificación del equilibrio endócrino, producido por la estreptozotocina:

Consumo de oxígeno en los estados 3 y 4 de respiración.

Control respiratorio.

Relación P:O entre el ADP adicionado y el oxígeno consumido durante su fosforilación.

Control respiratorio: El fenómeno de control respiratorio de una mitocondria está asociado al acoplamiento entre el transporte de electrones por la cadena y la síntesis de ATP. En la mitocondria intacta este índice alcanza valores altos, y más aún en la célula intacta. Pueden considerarse aceptablemente acopladas para los estudios de respiración "in vitro" aquellas mitocondrias que aceleran de 4 a 10 veces la velocidad de las oxidaciones por el agregado de ADP a la mezcla de reacción. Si la mitocondria está envejecida, o cuando por las condiciones del aislamiento se altera la permeabilidad de las membranas su índice de control respiratorio baja a 1 y consume oxígeno a gran velocidad, inde-

pendientemente de la concentración del aceptor de fosfato. Este índice puede tomarse entonces como una medida útil de la integridad funcional de las mitocondrias aisladas por fraccionamiento subcelular.

Estados metabólicos de la mitocondria: El estado de respiración 3 de Chance (ver Chance y Williams, 1955 a; Chance y Hollunger, 1963) se define para mitocondrias acopladas como un estado de fosforilación activa, con alta concentración de fosfatos, aceptor y del sustrato para la oxidación; en estas condiciones el factor limitante de la velocidad es la cadena de transporte de electrones.

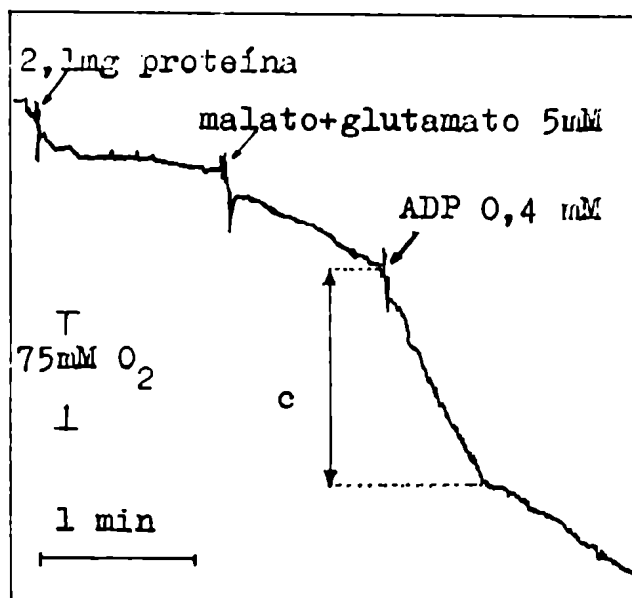
Al agotarse el ADP agregado y manteniéndose alta la concentración del sustrato, la mitocondria retorna al estado respiratorio 4 y el componente que limita la velocidad es el ADP. Esa respiración controlada se mantiene hasta el agotamiento del oxígeno en la suspensión mitocondrial (condición de anaerobiosis).

Relación P:O: La duración del incremento producido en la velocidad de la cadena por agregado de ADP, o sea el estado 3, depende de la concentración de éste, y el oxígeno utilizado es proporcional a la cantidad de ADP que se fosforila. El factor de proporcionalidad o cociente P:O se aplica entonces como medida de la eficiencia de la fosforilación.

Un experimento representativo de las medidas polarográficas de velocidad de utilización del oxígeno por las mitocondrias cardíacas de rata se presenta en la figura 11. Al adicionar la suspensión mitocondrial, anaerobia, se observa un descenso del trazado al cual contribuyen varios efectos: dilución del oxígeno presente en la solución amortiguadora, oxidación brusca de los sustratos endógenos, y descenso de la sensibilidad del electrodo causado por la sacarosa y la proteína mitocondrial. La respiración lenta en esta etapa es a expensas de la oxidación de los sustra-

tos endógenos y al agregar un exceso del sustrato que interesa ensayar (en este caso fué malato y glutamato) se produce la transición del estado I al 4a. El agregado siguiente de ADP estimuló la actividad respiratoria mitocondrial en el estado 3, período de fosforilación acoplada que se mantiene hasta agotar el ADP. En aquellos casos en que por prevalecer la actividad ATPasa del tejido muscular no se produjo el retorno del estado 3 al 4b con velocidad igual al 4a se tomó como dato para determinar el control respiratorio la relación entre los estados 4a y 3.

Figura 11 - DETERMINACION DE LA VELOCIDAD RESPIRATORIA DE MITOCONDRIAS DE CORAZON DE RATA. Medida polarográfica del consumo de oxígeno de una preparación fresca de mitocondrias enteras aislada según la técnica de Favelukes y col. (1971). Detalles del experimento en el capítulo de métodos.



Los cálculos se efectuaron en base a los datos tomados del gráfico de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$\text{Consumo de oxígeno} = \frac{936 (nAO) \quad b \text{ (cm)}}{P \text{ (mg)} \quad a \text{ (cm)}}$$

Control respiratorio:

$$CR = \frac{\text{Pendiente en el estado 3}}{\text{Pendiente en el estado 4b}}$$

Relación ADP:O

$$P:O = \frac{\text{nmoles ADP}}{936 \text{ nAO} \frac{c}{a}}$$

siendo, a= altura correspondiente al contenido total de O_2

b= altura del oxígeno consumido en un minuto.

c= altura del oxígeno consumido en el estado 3.

P= proteína mitocondrial en cada experimento.

El contenido inicial de oxígeno en la celda polarográfica de 2 ml resulta de multiplicar:

$$234 \text{ nmol/ml} \times 2 \text{ ml} \times 2 \text{ átomos/mol} = 936 \text{ nAO}$$

Para la determinación de estos índices era deseable contar con organoides frescos y con la máxima integridad de sus membranas para tratar de reproducir las respuestas características del funcionamiento "in vivo" de esas mitocondrias. Como primera aproximación se ensayaron métodos de aislamiento de las fracciones subcelulares, seleccionando medios de homogeneización del tejido cardíaco y esquemas de centrifugación y lavado más apropiados a este tejido.

Análisis de la dependencia de la capacidad respiratoria con el método de aislamiento de mitocondrias intactas:

Aplicando diversas técnicas para la separación de fracciones mitocondriales de músculo se obtuvieron los siguientes resultados:

a) El método para aislar mitocondrias de músculo esquelético, de Favelukes y col. (1971), descrito en el capítulo correspondiente a métodos permitió aislar preparaciones con

elevado rendimiento, eficiencia de la respiración y fosforilación y alto índice de control respiratorio, tal como se observa en la tabla II.

Tabla II - CAPACIDAD RESPIRATORIA DE MITOCONDRIAS DE CORAZÓN DE RATA AISLADAS POR VARIOS METODOS DE FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR. Determinación por polarografía según está descrito en el texto. 1,2 mg de proteína mitocondrial en cada experimento se incubó con el medio de respiración para músculo. El consumo de oxígeno se refiere al estado 3, por adición de 5 μ l de ADP 68 mM. Resultados: promedio del número de experimentos que figura entre paréntesis, acompañado del error standard.

Método de aislamiento mitocondrial	Consumo de oxígeno (nAO/min/mg)	Control Respiratorio	P:0
Chance y Hagihara (1963) (5)	202 \pm 5	3,34 \pm 0,14	2,8 \pm 0,04
Tyler y Gonze (1967) (3)	164 \pm 11	2,97 \pm 0,11	2,3 \pm 0,30
Favelukes y col. (1971) (7)	200 \pm 12	6,42 \pm 0,23	2,9 \pm 0,10

b) El método de Chance y Hagihara (1963), desarrollado para músculo de pectoral de paloma, difiere del anterior en el medio de homogeneización del tejido que contiene sacarosa 0,25 M, EDTA 1 mM, Tris-ClH 5 mM a pH 7,4, y también en el tiempo de incubación con la proteasa que se prolonga 20 minutos. Las mitocondrias así aisladas de tejido cardíaco consumían oxígeno durante el estado 3 a velocidad comparable a las del método a) pero su control respiratorio no llegó al valor de 4 que tomábamos como mínimo aceptable para mitocondrias acopladas.

c) El método de Tyler y Gonze (1967), para corazón de rata, utiliza el medio de homogeneización MSE: manitol 225 mM, sacarosa 75 mM y EDTA 50 mM, incubada con una solución de nagarse en proporción 2,5 veces mayor que por los otros procedimientos y el esquema de centrifugación tiene la particu-

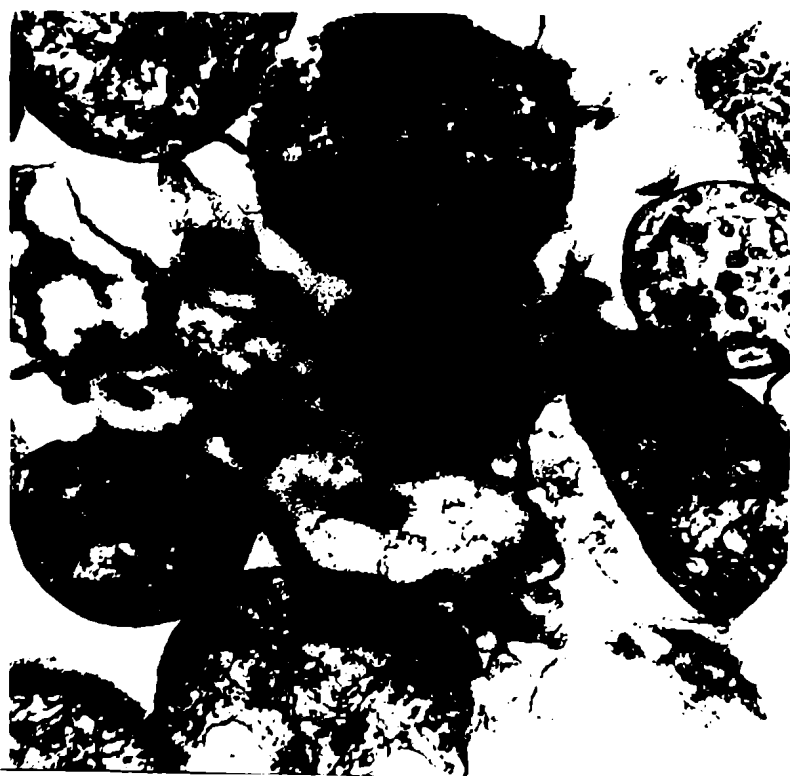
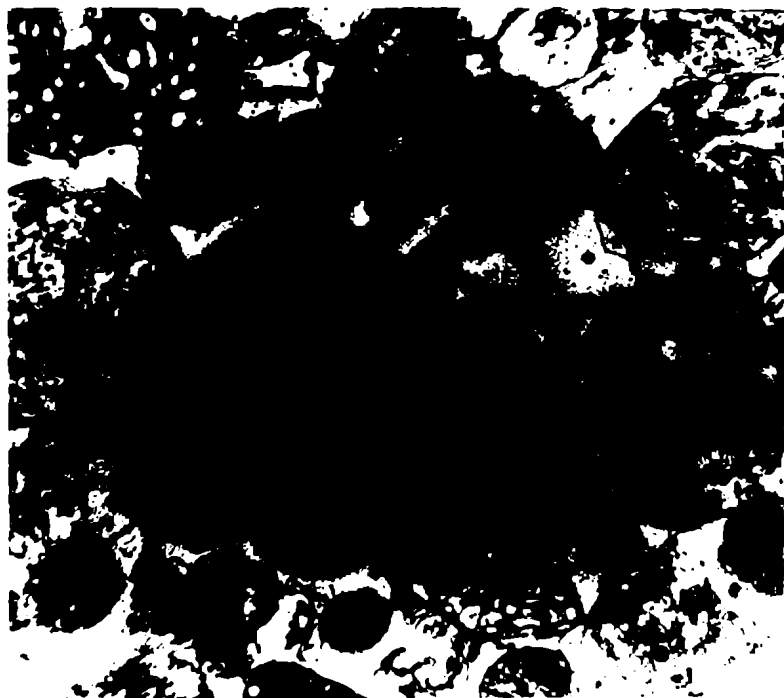
laridad de separar a 8000 xg una fracción impura de mitocondrias juntamente con la fracción nuclear y todos los contaminantes descartando la proteasa del sobrenadante con el objeto de cortar la incubación. Se resuspendió el sedimento y separó una fracción descartable de 700 xg y una fracción mitocondrial de 8000 xg.

En la literatura se presentan técnicas preparativas en las cuales las incubaciones con nagarse son muy prolongadas; por ejemplo Bullock y col. (1970), quienes incluso prescinden de la homogeneización del tejido y liberan las mitocondrias sólo por incubación de los cortes de tejido con enzimas proteolíticas: nagarse, tripsina, o Pronase B, durante 30 minutos. El nagarse, que tiene una vida media a pH neutro 30 veces más larga que la tripsina (Hagihara, 1960), se incluye habitualmente en la metodología porque aumenta la posibilidad de aislar mitocondrias más representativas del tejido "in vivo", se obtienen organoides de diversos tamaños y formas, se evita la ruptura de las más grandes y en consecuencia es mayor el rendimiento.

La velocidad de consumo de oxígeno durante el estado respiratorio 4 en la oxidación de malato + glutamato, de mitocondrias aisladas por los 3 métodos que se detallaron fué: a) 31, b) 61 y c) 55 nAO/min/mg. La respiración más lenta en la muestra fraccionada por la técnica de Favelukes y col. (1971) es un índice de menor disipación de la energía del proceso oxidativo; la acumulación de ATP y otros compuestos energizados es inhibitoria, y la velocidad respiratoria se incrementa al agregar ADP exógeno, (estado 3).

La microscopía electrónica de un sedimento de 7700 xg de la figura III b) muestra una preparación que contiene predominantemente mitocondrias con membranas bien constituidas, con abundancia de crestas, y en la figura III a) las muestras correspondientes de mitocondrias de ratas

FIGURA III - MITOCONDRIAS CARDIACAS DE RATA. Microscopía electrónica de un sedimento de la centrifugación de homogenato de corazón de rata a 7700 xg de acuerdo al método de fraccionamiento de Favelukes y col.(1971). a) Ratas inyectadas con estreptozotocina (x10000). b) Ratas control (x19000)



diabéticas tienen aspecto y tamaño regular, no presentan ramificaciones, deformaciones o menor densidad que las normales, como fué descrito por Harano y col.(1969) en tejido hepático o en mitocondrias aisladas del mismo, de ratas diabéticas.

Sustratos para la generación de los equivalentes reductores: Los procesos más importantes para la economía celular tienen lugar en la mitocondria, donde los nutrientes se oxidan liberando CO_2 . Las coenzimas se reducen para luego dar lugar a su oxidación exergónica en la cadena de transporte de electrones en un proceso acoplado a la conservación de considerable cantidad de energía utilizable en la síntesis de ATP. El camino clave para esa degradación es el ciclo del ácido cítrico totalmente localizado en mitocondrias; la velocidad del ciclo en el miocardio es proporcional al consumo de oxígeno. (Williamson, 1979).

En una serie de experimentos con mitocondrias de corazón de rata se incubaron diversos sustratos para determinar la velocidad que cada uno de ellos imprime a la cadena respiratoria. Los resultados de la tabla III, con mitocondrias de ratas normales, y los de la tabla VI con mitocondrias de ratas inyectadas con estreptozotocina y sus controles, demuestran que el flujo máximo de electrones acoplado medido como consumo del oxígeno en el estado 3, se originó con los metabolitos del ciclo tricarboxílico: malato, alfa-cetoglutarato y succinato, en reacciones en que intervienen las 2 coenzimas NAD y FAD. A menor velocidad se oxidaron 3-hidroxibutirato y piruvato.

El consumo de oxígeno en el estado 4 con todos los sustratos que se enumeran en la tabla II variaba entre 29 y 33 nAO/min/mg, pero el estímulo de la velocidad respiratoria por adición de ADP dependió del sustrato oxidable: entre 5 y 6 veces con malato + glutamato o α -cetoglutarato, y cer-

Tabla III - VELOCIDAD DE UTILIZACION DEL OXIGENO CON DISTINTOS SUSTRATOS. Fracción mitocondrial de corazón de rata lavada 2 veces con albúmina 1 mg/ml. Medio de reacción y condiciones como en tabla II. 1,4 mg de proteína en cada ensayo. El consumo de oxígeno se expresa en nAO/min/mg con su error standard. Entre paréntesis el número de experimentos.

Sustrato oxidable	Consumo de oxígeno		C/R
	Estado 4	Estado 3	
malato 5mM; glutamato 5 mM (14)	32,8 ± 2,9	197 ± 11	6,0 ± 0,5
alfacetoglutarato 5 mM (7)	31,9 ± 5,0	166 ± 19	5,2 ± 0,7
3-hidroxi butirato 5 mM (5)	28,8 ± 4,1	95 ± 11	3,3 ± 0,5
piruvato 10mM (2)	29,2 ± 3,6	87,5 ± 8,5	3,0 ± 0,1

cano a 3 con 3-hidroxi butirato o piruvato. Los desacoplantes dinitrofenol y FCCP no aceleraron la respiración del estado 3 por encima del incremento que produce el ADP.

Efecto de insulina sobre la función respiratoria: Se inyectaron 2 lotes de ratas con dosis de 8 ó 10 U/día de insulina NPH de liberación lenta, uno de ellos recibió 2 dosis y el otro 4 dosis. Al cabo del tratamiento se sacrificaron juntamente con animales testigos no inyectados y se aislaron las mitocondrias de corazón.

Los resultados de un experimento tipo, entre varios coincidentes, muestran en la tabla IV que la insulina "in vivo" estimuló la respiración del estado 3 con el par de sustratos malato-glutamato, aumentó el control respiratorio pero no tuvo efectos sobre la relación ADP/O.

Efecto de estreptozotocina sobre la función respiratoria: Para cubrir los efectos a corto y largo plazo sobre la respiración de mitocondrias cardíacas, se controlaron polarográficamente los consumos de oxígeno durante el curso de la diabetes experimental, hasta un mes.

Tabla IV - EFFECTO DE INSULINA SOBRE LA ACTIVIDAD RESPIRATORIA DE MITOCONDRIAS CARDIACAS DE RATA Datos de una experiencia en que se midió la respiración en el medio y las condiciones descritas para la tabla II. Sustrato: malato-glutamato en presencia de malonato. Dosis de insulina: 10 U/día.

Nº	Dosis	Consumo oxígeno (est. 3) (nAO/min/mg)	C/R	P:O
-		195	4,6	2,7
2		286	4,9	2,5
4		281	6,3	2,6

Las medidas respiratorias con malato y glutamato muestran una disminución aparente de la velocidad en el estado 3 al 2º día de la inyección del diabetógeno, tal como observaron Harano y col. (1972) en mitocondrias hepáticas de ratas aloxánicas en estado de cetosis. En nuestro caso, el control respiratorio y el índice P:O muestran una variación paralela a la del consumo de oxígeno, con recuperación de los niveles normales al 4º día de diabetes (tabla V).

Tabla V - CAPACIDAD RESPIRATORIA DE MITOCONDRIAS DE CORAZON DE RATA DURANTE LA EVOLUCION DE LA DIABETES. Ratas inyectadas con estreptozotocina solubilizada en solución de citrato a pH 4,5. Se midió el consumo de oxígeno del estado 3. Sustratos: malato - glutamato. Tiempo: es el transcurrido desde la dosis. La rata de tiempo 0 es un testigo inyectado con citrato. Resultados con el error standard. a) $p > 0,05$

Tiempo (días)	Nº de Exp.	Cons.O ₂ (nAO/min/mg)	C.R.	P:O
0	18	157 ± 13	4,23 ± 0,21	2,60 ± 0,07
2	4	133 ± 5 (a)	3,03 ± 0,22	2,47 ± 0,19
4	5	153 ± 9	4,10 ± 0,53	2,62 ± 0,18
7	14	149 ± 8	4,37 ± 0,12	2,72 ± 0,08

Ensayos con éstos y otros sustratos: 3-hidroxi-butirato, succinato-glutamato, confirmaron la estabilidad de la

función respiratoria del miocardio en diabetes de un mes. Un cambio estadísticamente significativo apareció en el estado respiratorio 4 durante la oxidación del malato y glutamato ($p < 0,01$), que en las mitocondrias diabéticas era 25% más lento que en los testigos (tabla VI); sin embargo, podría interpretarse que antes que disminución de la velocidad del estado 4, es demasiado alto el dato de las mitocondrias testigos (43 nAO/min/mg) en esta serie de experimentos, en relación a los valores habituales en mitocondrias normales, que se presentaron en las tablas III y IV cuyos promedios 33 y 37 nAO/min/mg semejan precisamente al valor de las preparaciones diabéticas.

Tabla VI - ACTIVIDAD RESPIRATORIA DE MITOCONDRIAS DE CORAZON
EFFECTO DE ESTREPTOZOTOCINA A 30 DIAS DE LA DOSIS: se midió la velocidad de oxidación de sustratos exógenos por el consumo de oxígeno, con 1,8 mg de proteínas, El consumo de oxígeno en nAO/min/mg con la desviación standard de la media. (a) $p < 0,01$ (b) $p < 0,1$. Condiciones como en tablas anteriores.

Sustrato	Consumo de oxígeno		Control resp.
	Estado 4	Estado 3	
<u>Malato-glutamato</u>			
Testigos (6)	43,1 \pm 2,1	107,1 \pm 25,7	4,0
Diabéticos (7)	31,9 \pm 2,6(a)	142,9 \pm 19,1	4,5
<u>3-hidroxi butirato</u>			
Testigos (11)	22,6 \pm 2,2	39,1 \pm 3,3	1,7
Diabéticos (8)	25,5 \pm 1,4	39,5 \pm 3,4	1,5
<u>Succinato-glutamato</u>			
Testigos (4)	105,5 \pm 12,5	253,8 \pm 29,8	2,4
Diabéticos (6)	118,4 \pm 9,3	320,1 \pm 16,8(b)	2,7

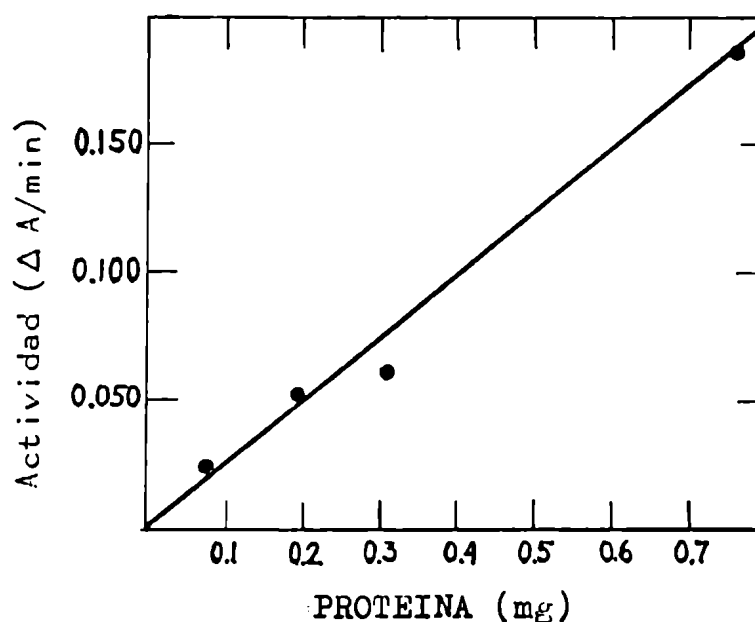
c) ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA 3 D (-) HIDROXIBUTIRATO DES-HIDROGENASA CARDIACA

La enzima 3 D (-)hidroxibutirato:NAD oxidoreductasa cataliza la reacción reversible



La actividad enzimática fué medida en el sentido de la oxidación del hidroxibutirato con cantidades crecientes de una fracción de mitocondrias fragmentadas para romper la barrera de permeabilidad de la membrana al NAD y NADH. Se verificó que la velocidad de reacción es proporcional a la proteína mitocondrial presente en las incubaciones en el rango de 0,08 a 0,8 mg, (figura IV).

Figura IV - ACTIVIDAD HBD EN MITOCONDRIAS CARDIACAS DE RATAS. Medida de la reducción de NAD 1 ml con 10 μ moles de DL-3-hidroxibutirato. La preparación de "enzima HBD" es el sedimento de 7700 xg congelado y descongelado sucesivamente 3 veces. Detalles de la reacción se describen en el capítulo de materiales y métodos.

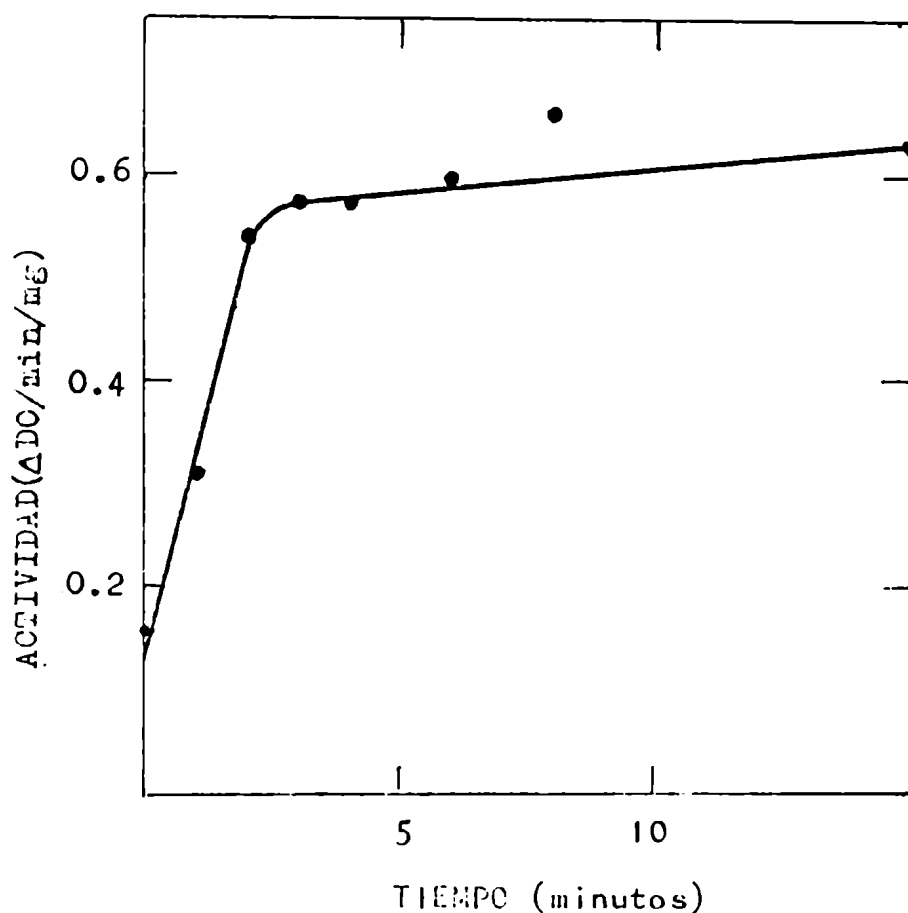


La proteína activa que se utilizó en todos los experimentos que se describirán en adelante fué de 0,15 a

0,35 mg en incubaciones de 1 ml, y los resultados se expresaron en términos de actividad específica por mg de proteína mitocondrial.

En trabajos publicados por distintos laboratorios se menciona la importancia de la preincubación de la enzima en presencia de reactivos de tior y NAD^+ durante 7 a 10 minutos, como requisito para reconstituir el complejo lipoproteico y unirlo a la coenzima, en caso de purificación de IIBD de corazón de bovino (Jurtshuk y col., 1963; Nielsen y Fleischer, 1973) o de hígado de rata (Gotterer, 1967).

Figura V - EFECTO DE LA INCUBACION CON NAD^+ SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA IIBD EN MITOCONDRIAS CARDIACAS. En este experimento se incubaron a 30 °C 0,2 mg de proteína mitocondrial con NAD 2mM durante el tiempo indicado y en las condiciones detalladas en Métodos. A partir del agregado de 50 μl de 3-IIB 0,2 M se registró la velocidad inicial de reacción.



Con nuestra preparación de enzima asociada a la membrana mitocondrial, 3 minutos de incubación con el NAD^+ fueron suficientes para permitir su difusión y alcanzar la máxima velocidad de reacción. La escasa actividad a tiempo cero que se advierte en la figura V puede considerarse originada por la existencia del complejo endógeno (enz-NAD).

Efecto de la diabetes sobre la velocidad de reacción

a) Tejido cardíaco: El efecto producido sobre la actividad de la enzima cardíaca, a 30 días de inyectar estreptozotocina, es una disminución del 50% con relación a los testigos no inyectados. (Tabla VII)

Tabla VII - ACTIVIDAD HBD EN CORAZON DE RATAS DIABETICAS

Animales sacrificados 30 días después de una dosis de estreptozotocina. Entre paréntesis el número de experimentos, cada uno de ellos con una preparación aislada de 3 corazones. Sustrato: DL-3-HB 20 mM que representa una concentración 10 mM del isómero D. La actividad enzimática se registró por aparición de NADH a 340 nm en incubaciones de 0,38 mg de proteínas, NAD 1mM, 0,3 μg de rotenona 0,4 mg albúmina, en solución Tris-ClH 50 mM a pH 8. Diferencia estadística altamente significativa: $p < 0,001$

Muestras	Actividad específica nmoles NADH/min/mg
Testigos (11)	50,5 \pm 2,7
Diabéticas (12)	24,9 \pm 2,0

El tiempo que transcurrió desde la destrucción de las células beta del páncreas hasta evidenciar el déficit de la HBD cardíaca varía de un animal a otro; a los 7 días de ser inyectadas, en muy pocas ratas se detectó aumento y en otras una leve disminución de la actividad deshidrogenasa. A los 14 días, en algunas ratas aún no hubo cambios de la actividad; a los 30 días, como se vió en la tabla VII, la diferencia fué amplia en todos los casos medidos y con al-

ta significancia estadística por el test de t.

b) Tejido hepático: Se hicieron unos experimentos adicionales con mitocondrias hepáticas para relacionarlos con los resultados en el corazón de los mismos animales, confirmando los datos previos de Roldan y col. (1971) sobre disminución de actividad enzimática en las mitocondrias de perros pancreatectomizados, y los de Vidal y col. (1977) en las mitocondrias sonicadas de ratas con tratamiento de estreptozotocina.

La diferencia en la velocidad de reacción de la enzima diabética es más acentuada en mitocondria hepática que en cardíaca; en un experimento típico la actividad fué de 36,5 nmoles/min/mg en muestras diabéticas y 179 en los controles.

Respuesta a la insulina "in vivo": El tratamiento con insulina de ratas con 30 días de diabetes para la restitución de la actividad de HBD cardíaca dió resultados parcialmente positivos.

Tabla VIII - EFFECTO DE INSULINA "IN VIVO" SOBRE HBD DE MITOCONDRIAS DE CORAZON DE RATA DIABETICA Actividad deshidrogenasa en nmoles de NADH/min/mg de proteína con el error standard, promedio de 3 experimentos. Cada experimento es un promedio de 2-3 corazones procesados simultáneamente. Dosis insulina NPH 8 U/día, que se administraron 3, 7 y 15 días antes del experimento. Condiciones del ensayo enzimático similares a las de la tabla VII.

Nº dosis	Actividad enzimática		% de T
	Testigos	Diabéticos	
-	39,2 ± 0,7	21,4 ± 3,5	54
3	38,6 ± 4,2	26,7 ± 2,9	69
7	37,3 ± 2,9	25,0 ± 0,5	67
15	35,5 ± 4,1	27,9 ± 3,1	79

Se inyectó a cada rata una dosis diaria de insulina de 8 U, que se comenzó escalonadamente 3, 7 y 15 días antes de la experiencia para sacrificar los animales y simultáneamente los testigos no diabéticos inyectados de la misma forma.

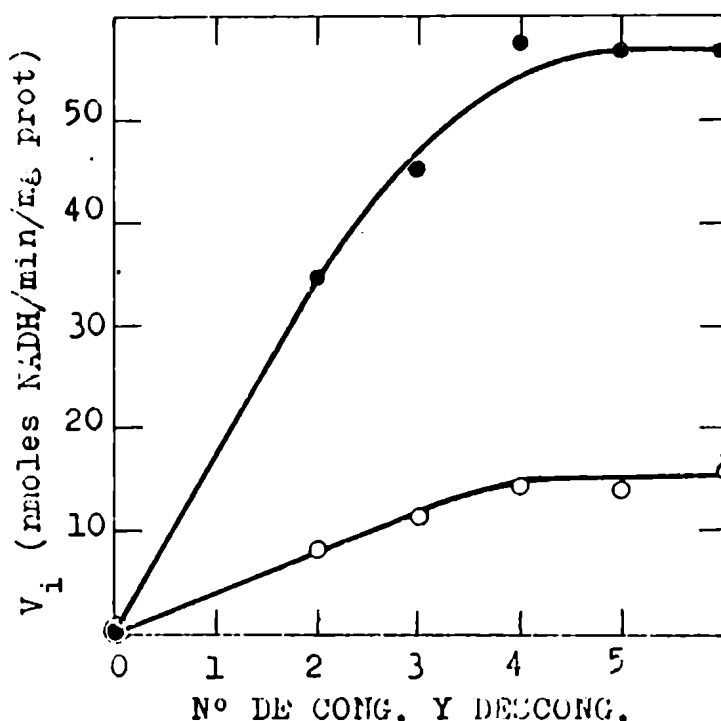
El grado de la respuesta se relaciona con la cantidad de dosis recibidas, ratas diabéticas con 15 dosis de insulina pasaron del 54% al 79% de la actividad de no diabéticas también con 15 días de tratamiento. En las ratas no diabéticas, puede observarse en la tabla VIII que la actividad deshidrogenasa no fué estimulada y éste es un resultado totalmente opuesto a los de Schäfer y Nägel (1968) en mitocondria hepática, quienes después de 4 días de tratamiento insulínico vieron aumentada 10 veces la actividad HSD junto con la de otras actividades mitocondriales.

Liberación de la actividad en la membrana y estabilidad de la preparación: La enzima se encuentra en las crestas mitocondriales orientada hacia la cara interna y no es accesible al NAD externo (McIntyre y col., 1978). Se ensayaron diferentes métodos de permeabilización de las mitocondrias normales y diabéticas:

1) Congelamientos y descongelamientos sucesivos de la suspensión mitocondrial, ya descrito en el capítulo de Métodos. A partir del 4º ciclo de congelamiento se alcanzó la velocidad máxima con valores reproducibles y el aumento fué paralelo en fracciones aisladas de ratas con diabetes por estreptozotocina y ratas control, a medida que aumentaba la desorganización de las membranas mitocondriales. (figura VI). La forma unida a membrana es muy estable y la actividad pudo medirse hasta 4 ó 5 semanas después de su preparación, manteniéndola congelada a -15°C . Este método brinda las ventajas de su rápido pro-

cedimiento, estabilidad y reproducibilidad de las medidas enzimáticas. Permite ensayar el comportamiento de la enzima sin separarla del contenido intramitocondrial con el que interactúa en la mitocondria intacta o en la célula, muy importante por la unión con el NAD^+ .

Figura VI - LIBERACION DE LA ACTIVIDAD IIBD CARDIACA EN MITOCONDRIAS ENTERAS. ○ Ratas diabéticas. ● Ratas testigos. Los resultados son el promedio de 2 experiencias coincidentes que se desarrollaron en las condiciones de la tabla VII.



2) Choque osmótico: cuando las mitocondrias fueron expuestas a hipotonicidad en fosfatos 20ml para la explosión de las membranas la actividad resultante fué muy baja, y en muestras diabéticas, 40% menor que en testigos.

Por expansión de las mitocondrias se rompe la membrana externa y se separa parcialmente; la membrana interna queda formando "fantasmas" y una pequeña proporción de ruptura es la responsable de la actividad medida (tabla IX).

3) Vibración sónica: cuando se someten mitocondrias intac-

Tabla IX - EFEECTO DE ESTREPTOZOTOCINA SOBRE LA ACTIVIDAD HBD EN MITOCONDRIAS CARDIACAS DE RATA. Resultados a 30 días de diabetes. Mitocondrias aisladas y sometidas a diversos procedimientos de permeabilización según se detalla en el texto. Ensayo enzimático en iguales condiciones que en tabla VII.

Tratamiento de la fracción mitocondrial	Actividad específica (nmoles NADH/min/mg)	
	Normales	Diabéticas
Hipotonicidad	17,5	6,7
Vibración sónica	65,2	32,0
Cong. y descong.	56,4	15,5

tas a tratamiento ultrasónico, la desintegración de sus membranas produce partículas submitocondriales en las cuales los fragmentos de membrana interna se sellan en sus extremos. Los cambios de presión producidos por el pasaje de sonido a través de la suspensión de mitocondrias forma cavidades (fenómeno de cavitación) del orden de 10 μ de diámetro que aumentan de tamaño y finalmente se colapsan produciendo velocidades y presiones muy elevadas que dan origen a la ruptura. La lateralidad de la membrana queda invertida y la cara interna expuesta al medio de reacción. Por este procedimiento los sitios activos de la enzima se hacen perfectamente accesibles y se supone que queda evidenciada toda la actividad latente de HBD y como se ve en la tabla IX la enzima diabética mantiene el 50% de diferencia con la actividad normal.

La actividad específica se refiere en este caso a mg de partícula submitocondrial, que está enriquecida en un 20% de material membranoso respecto a la mitocondria entera por pérdida de componentes solubles de la matriz y fragmentos de membrana externa, durante la inversión de la membrana.

Efecto de cisteína sobre la actividad enzimática: Menzel y Hammes (1973) determinaron por análisis de la apoproteína extraída de mitocondrias de corazón de bovino, 6,2 residuos de cisteína por cadena polipeptídica, y Wise y Lehninger (1962) demostraron que hay grupos cisteicos que en alguna medida intervienen en la unión de la enzima con el NAD e incluso presentan evidencias de un grupo ditiol activo (ver también Sekuzu y col. 1963).

En los métodos de purificación desarrollados por distintos laboratorios la enzima se solubiliza y precipita con sulfato de amonio en presencia de colato (Sekuzu y col. 1961) o a pH elevado (Gotterer, 1967) y deben incorporarse durante el fraccionamiento reactivos protectores de tiol, que también son requerimiento absoluto e inespecífico para la estabilidad y actividad de la enzima reconstituida.

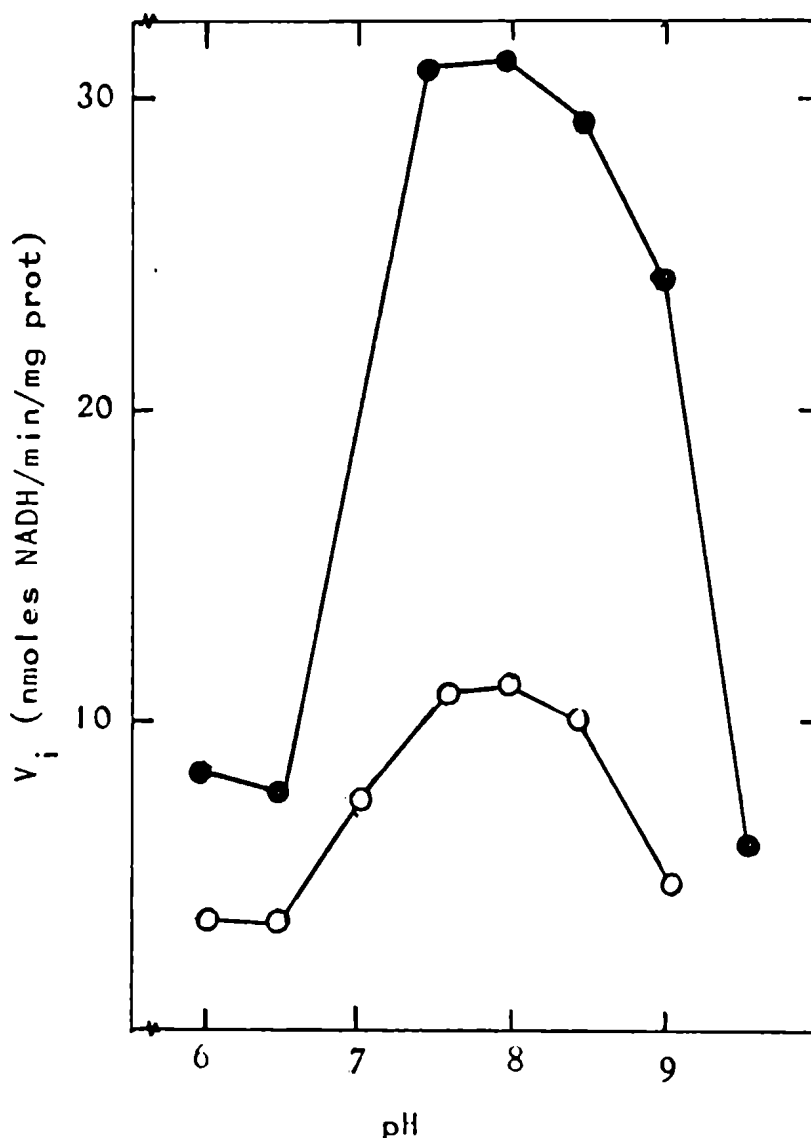
Se intentó una prueba de reversión del defecto de la HBD cardíaca de rata diabética con cisteína, en el supuesto caso de variación de la reactividad de los grupos sulfhidrilos libres en el centro activo. En nuestra preparación cruda, con actividad ligada a la membrana, no se observó el efecto protector de la cisteína; tanto en las mitocondrias diabéticas como testigos, la velocidad de reacción no fué estimulable por cisteína 50 mM.

Tabla X - EFFECTO DE CISTEINA SOBRE HBD EN MITOCONDRIAS CARDIACAS. Actividad específica, promedio de 8 datos \pm error standard. 3-HB 10 mM, NAD 2 mM. Cisteína en solución Tris-ClH a pH 8,0. Ratas con 30 días de diabetes.

Medio standard	Velocidad enzimática (nmoles NADH/min/mg)	
	Testigos	Diabéticos
con cisteína 50 mM	50,1 \pm 3,3	25,9 \pm 1,9
sin cisteína	48,7 \pm 5,1	24,2 \pm 1,7

Efecto del pH sobre la velocidad de reacción: Se midieron las actividades enzimáticas en mitocondrias de ratas diabéticas y testigos variando el pH de la mezcla de reacción de 6.0 a 9,5, con la enzima saturada.

Figura VII - EFFECTO DEL pH SOBRE LA REACCION CATALIZADA POR IIBD CARDIACA EN MEMBRANAS MITOCONDRIALES. Preparación enzimática de mitocondrias rotas por 3 ciclos de congelamientos. 0,39 mg de proteína, NAD 2 mM, 3-HB 10 mM, por tubo. Otros componentes como en la figura V. ● Testigos. ○ Diabéticos de 30 d.



La figura VII da el resultado de 2 curvas con meseta de actividad máxima a pH 7,5-8,0. Se destaca una zona paralela en el perfil de ambas curvas con una diferencia constante de 20 nmoles/min/mg en la zona de pH 7,5 a 8,5.

Los primeros estudios de la enzima en mitocondrias de

corazón de cerdo en 1937 por Green, Dewan y Leloir determinaron el pH óptimo 7,3. Otros investigadores lo situaron a pH más alcalino; Gotterer (1967) entre 7,5 y 8,5 y Lehnin-ger y col. (1960) entre 8,0 y 8,5; y para el sentido inver-
so de la reacción a pH 7,0 .

Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

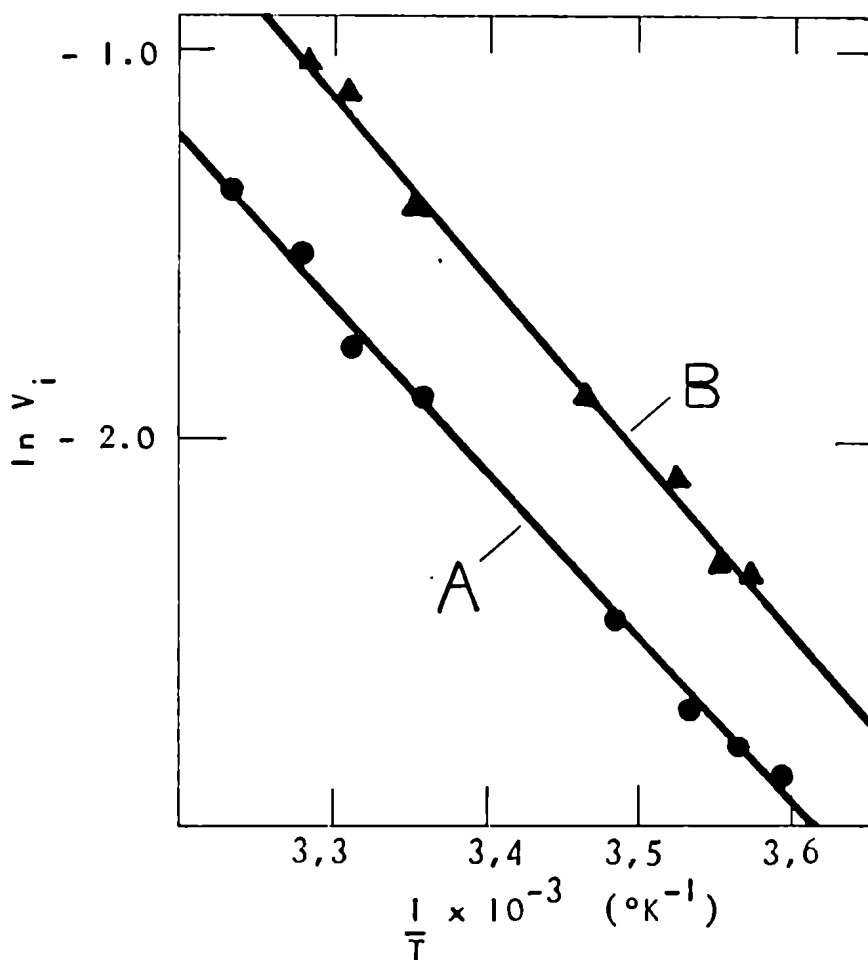
La dependencia de la velocidad de reacción con la tempera-
tura responde a la ecuación empírica de Arrhenius:

$$d \frac{\ln k}{dT} = \frac{E}{RT^2}$$

y a partir de su resolución

$$\ln k = \frac{E}{R} \frac{1}{T}$$

Figura VIII - EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD HBD CARDIACA DE RATA DIABETICA Gráfico del logaritmo natu-
ral de la velocidad inicial expresada como variación de
absorbancia a 340 nm por mg de proteína mitocondrial. Las
preparaciones enzimáticas se incubaron con la coenzima y
demás componentes del medio de reacción, tal como se des-
cribió en el texto. A: diabéticas. B: testigos.



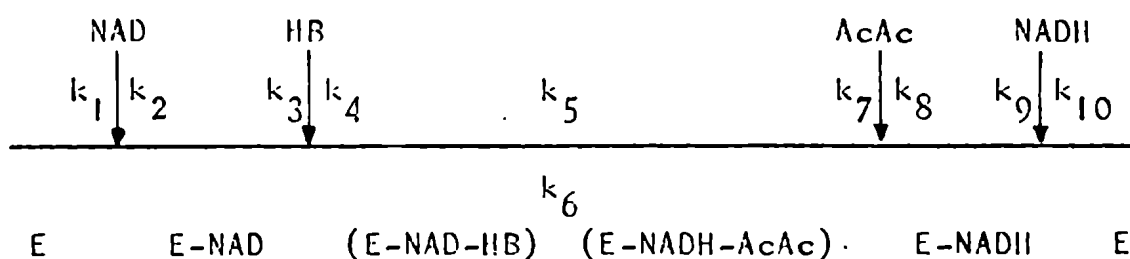
pudo calcularse la energía de activación aparente de la enzima de miocardio de rata.

Se midió la velocidad inicial de reacción catalizada por mitocondrias de ratas diabéticas y no diabéticas a distintas temperaturas de incubación entre 6 y 36 °C. La representación del logaritmo de esa velocidad en función de la inversa de la temperatura absoluta dió un par de rectas prácticamente paralelas, como se observa en la figura VIII. El valor de la energía de activación de cada muestra enzimática se calculó a partir de la pendiente, que dividida por 0,219 queda expresada en calorías por mol.

La energía de activación de la betahidroxibutirato-deshidrogenasa en mitocondrias diabéticas de corazón es de 8700 cal/mol y 9260 cal/mol la de los testigos. Ambos valores son cercanos a los que se conocen de esta enzima, que fué medida por Lenaz y col. (1972) en mitocondrias de corazón de bovino: 10900 cal/mol, y en partículas submitocondriales de hígado de rata por Latruffe y Gaudemer (1974) y por Vidal y col. (1978 a) con los siguientes resultados: 10000 y 11200 cal/mol, respectivamente.

Propiedades cinéticas de la enzima de rata diabética:

La betahidroxibutirato deshidrogenasa, como la mayoría de las deshidrogenasas dependientes del NAD, responde a un mecanismo BiBi ordenado con el NAD como primer sustrato que se une a la enzima y NADH el último producto liberado. Se puede representar en forma gráfica según la notación de Cleland (1963):



De acuerdo al desarrollo de la cinética de reacciones enzimáticas de Cleland, cuatro parámetros son necesarios y suficientes para describir la cinética de esta reacción con dos sustratos: $V_{Máx}$, K_M^{NAD} , K_M^{HB} y K_S^{NAD} (constante de disociación del complejo).

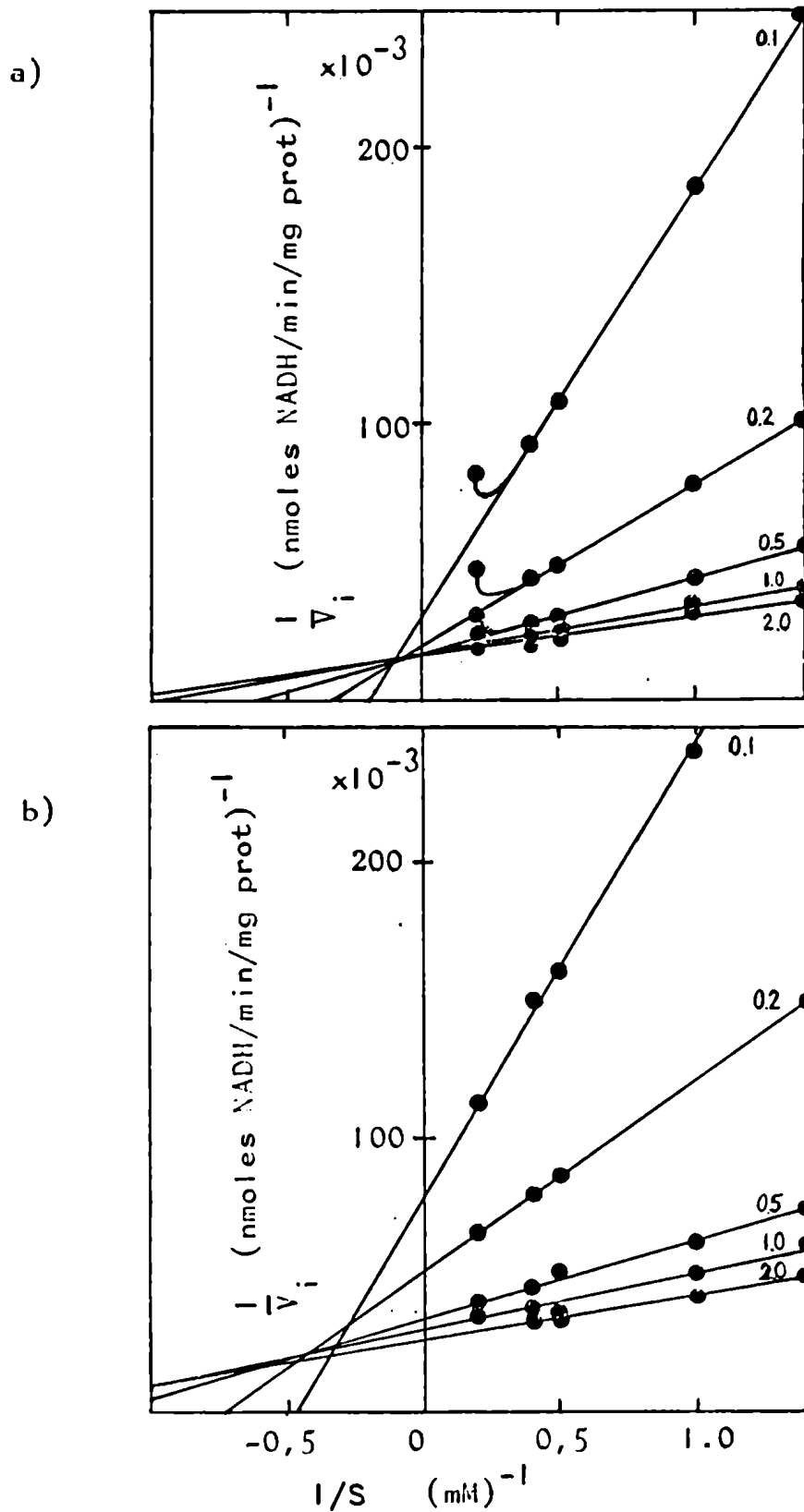
En el caso de las reacciones ordenadas, están relacionadas por la siguiente ecuación de velocidad para condiciones de velocidad inicial:

$$v_i = \frac{V_{Máx} (NAD) (HB)}{K_S^{NAD} K_M^{HB} + K_M^{HB} (NAD) + K_M^{NAD} (HB) + (NAD)(HB)}$$

En la representación de Lineweaver-Burk de las figuras IX a y b, se observa la familia de curvas obtenidas de las medidas de actividad enzimática en muestras testigos y diabéticas con mitocondrias congeladas y descongeladas sucesivamente 5 veces, en el gráfico de doble recíproca. La concentración del sustrato 3-hidroxibutirato varió entre 0,7 y 5 mM en cada recta, y la concentración del NAD quedó fija en cada recta y tomó valores de 0,1 a 2.0 mM.

En los puntos correspondientes a concentraciones altas de 3-HB pudo detectarse un efecto inhibitorio en la actividad de la enzima computable a las sales presentes en el medio, dado que el sustrato como sal sódica aumenta su concentración. En esos casos las intersecciones se estimaron extrapolando la línea dibujada para los puntos de baja concentración. Con aplicación del método de los cuadrados mínimos para la compensación de los errores se determinaron las intersecciones y pendientes de las rectas en las figuras IX a y b, que responden a las siguientes ecuaciones:

Figura IX - ACTIVIDAD HBD CARDIACA DE RATAS DIABETICAS EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO. Gráfico de doble recíproca de la velocidad inicial de reacción en función de la concentración del D-3-hidroxi butirato. La concentración mM de NAD, sustrato fijo, figura al extremo de cada recta. Condiciones experimentales; ver el capítulo de Métodos. a) Ratas control. b) Ratas con 30 días de diabetes.



$$\text{Pendiente} = \frac{K_M^{\text{HB}}}{V_{\text{Máx}}} + \frac{K_S^{\text{NAD}} K_M^{\text{HB}}}{V_{\text{Máx}}} \cdot \frac{1}{(\text{NAD})}$$

$$\text{Intersección} = \frac{1}{V_{\text{Máx}}} + \frac{K_M^{\text{NAD}}}{V_{\text{Máx}}} \cdot \frac{1}{(\text{NAD})}$$

Trasladando los resultados de intersecciones y pendientes del gráfico IX a una nueva representación en función de la inversa de la concentración de la coenzima, se obtienen las rectas secundarias que aparecen en la figura X a y b, de cuyas pendientes e intersecciones se calcularon los parámetros cinéticos buscados que figuran en la tabla XI.

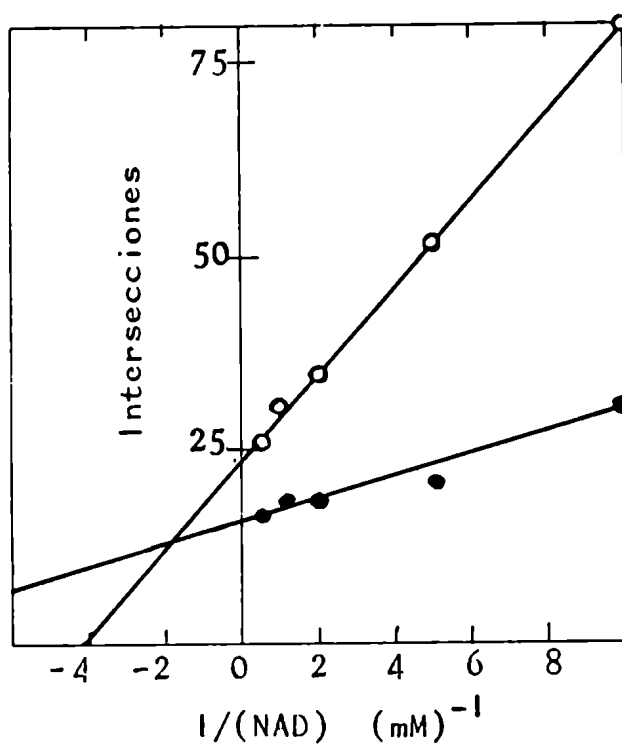
Tabla XI - CONSTANTES CINÉTICAS DE LA ENZIMA 3-HIDROXIBUTIRATO DESHIDROGENASA EN MITOCONDRIAS DE CORAZÓN DE RATA
Mitocondrias rotas por 5 ciclos de congelamientos. La preparación diabética; a partir de 12 corazones de ratas con diabetes de 30 días por dosis de estreptozotocina de 65 mg/kg de peso, y la preparación testigo; a partir de 8 corazones de ratas control inyectadas con citrato pH 4,5. Otras condiciones de la medida se detallan en Métodos.

	TESTIGOS	DIABÉTICAS	% de T
$V_{\text{Máx}}$ (nmoles/min/mg)	64,5	42,3	65
K_M^{NAD} (mM)	0,093	0,240	258
K_M^{HB} (mM)	0,548	0,360	65
K_S^{NAD} (mM)	1,19	1,41	118

Se destaca una diferencia importante en la constante de Michaelis para el NAD, que es en las muestras diabéticas 2,6 veces más alta que en los controles, reproduciendo el

Figura X - ACTIVIDAD HBD CARDIACA DE RATAS DIABETICAS EN FUNCION DEL SUSTRATO. Curvas secundarias de pendientes e intersecciones de las rectas de las figuras IX a) y b), en función de la concentración del sustrato fijo NAD.

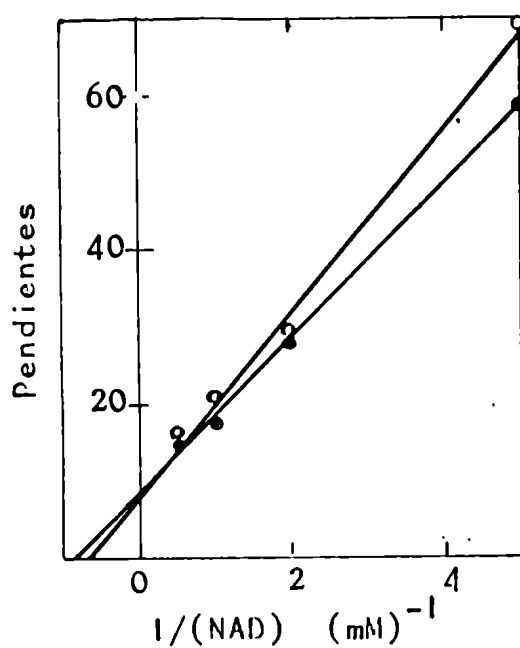
● Ratas control. ○ Ratas diabéticas (30 días)



a)

$$\text{Pendiente} = \frac{K_M^{\text{NAD}}}{V_{\text{Máx}}}$$

$$\text{Inters.} = \frac{I}{V_{\text{Máx}}}$$



b)

$$\text{Pendiente} = \frac{K_S^{\text{NAD}} \cdot K_M^{\text{HB}}}{V_{\text{Máx}}}$$

$$\text{Inters.} = \frac{K_M^{\text{HB}}}{V_{\text{Máx}}}$$

mismo efecto que detectaron Vidal y col. (1977 a) en la enzima de hígado de ratas tratadas con estreptozotocina.

La velocidad máxima de la reacción en el sentido de la oxidación del 3-hidroxi butirato es 35% más lenta en ratas diabéticas que en normales, y la constante de Michaelis para este sustrato es también 35% menor. La constante de disociación del complejo (E-NAD) es bastante próxima en las 2 muestras: 18% mayor en ratas diabéticas.

d) ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN MEMBRANA INTERNA

Partiendo de las diferencias detectadas en la actividad catalítica de la betahidroxi butirato deshidrogenasa cardíaca de ratas diabéticas, se determinaron las velocidades de reacción de enzimas características de la membrana interna: citocromo c oxidasa, succinato deshidrogenasa y NADH deshidrogenasa.

Actividad citocromo oxidasa en mitocondrias cardíacas - Determinación de la velocidad inicial de reacción catalizada por mitocondrias fragmentadas: Esta enzima, al igual que otras ubicadas en la membrana interna mitocondrial, no reacciona con el sustrato cuando la mitocondria está entera. Si se someten las fracciones mitocondriales frescas a ruptura de sus membranas se libera la actividad "latente" con pérdida del material de intermembrana y matriz. Parte del citocromo c, que es el componente más lábil de la cadena de transporte de electrones, puede separarse o alterar su unión con el sistema de citocromos (Barrett y col. 1976); para el ensayo espectrofotométrico de actividad enzimática se adicionó citocromo c externo.

Una manera sencilla de liberar la actividad y que proveyó muestras adecuadas para las medidas de la HBD cardíaca consistió en congelar y descongelar repetidas ve-

ces la suspensión mitocondrial. Se determinó la actividad citocromo oxidasa en fracciones mitocondriales con este tratamiento y el de choque osmótico (Parsons y Williams, 1967) en iguales condiciones de ensayo enzimático; los resultados en la tabla XII demuestran la efectividad de este último procedimiento con una velocidad de reacción que duplica a la de la muestra congelada 3 ó 4 veces. Se explica que el complejo de la citocromo oxidasa, de importante tamaño y que atraviesa de una a otra cara la membrana interna, resulte susceptible a los daños propios del material biológico sometido a congelamiento. Con la expansión hipotónica de la mitocondria el citocromo c exógeno accede a su sitio en el lado c de la membrana interna que queda expuesta después de la ruptura de la membrana exterior. Como la integridad de la membrana prácticamente no se altera por este método está favorecida la actividad de citocromo oxidasa en membrana interna.

Tabla XII - ACTIVIDAD CITOCROMO C OXIDASA EN MEMBRANAS MITOCONDRIALES DE CORAZON DE RATA. Dos tubos con el sedimento de 7700 xg, fracción de mitocondrias enteras, se suspendieron: uno en sacarosa 0,25 M para someterlo a congelamiento y descongelamiento, y otro en fosfatos 0,02 M durante 20 minutos. Se midió la velocidad de oxidación de ferrocitocromo c 14 μ M por el método de Smith (1954).

Tratamiento de la enzima	Activ. específica (μ moles cit/min/mg)
<u>Hipotonicidad</u>	0,91
" + 1 congelamiento	0,50
" + 2 "	0,47
" + 3 "	0,22
<u>Congelamientos:</u> 3	0,43
4	0,49
5	0,20
6	0,24

La cantidad de proteína mitocondrial en cada ensayo: 3 a 15 $\mu\text{g/ml}$, es apropiada para obtener una respuesta lineal del cambio de absorbancia con el tiempo en los primeros minutos, y que la reacción se complete en aproximadamente 10 minutos.

La preparación enzimática de mitocondrias expandidas es relativamente estable a 0-4 °C, la actividad persiste durante una semana, pero se inhibe si se la lleva a -15 °C hasta niveles equivalentes al tratamiento directo de congelamiento y descongelamiento, (tabla XIII).

Tabla XIII - ESTABILIDAD DE LA ENZIMA CITOCROMO OXIDASA EN MEMBRANA MITOCONDRIAL DE CORAZON DE RATA. Medida de la oxidación aerobia de ferrocitocromo c 14 μM a 550 nm, catalizada por mitocondrias con tratamiento hipotónico según se describió en el texto de la tabla XII, en idénticas condiciones. El tiempo corresponde a los días corridos desde el momento de preparación de la proteína activa.

Tiempo (días)	Activ. específica ($\mu\text{moles cit/min/mg}$)
2	1,16
3	1,23
7	1,11
15	0,33

La actividad después de 2 semanas, como se observa en la tabla XIII, es sumamente escasa.

Cinética de la reacción - Cálculo de la constante k:

La velocidad instantánea de una reacción enzimática puede expresarse como función proporcional a la concentración del sustrato que determina la cinética

$$- \frac{dC}{dt} = k C^n$$

siendo:

C= sustrato involucrado

k constante cinética de la reacción

n= orden de la reacción

La ecuación anterior en su forma logarítmica

$$\log \left[- \frac{dC}{dt} \right] = \log k + n \log C \quad (1)$$

representa la ecuación de una recta cuya pendiente da el orden n de la reacción y la ordenada al origen permite calcular la constante cinética k .

La experiencia desarrollada para la determinación de las correspondientes constantes del complejo enzimático de la citocromo oxidasa en las membranas de mitocondrias cardíacas de rata consistió en la incubación de una solución $33 \mu\text{M}$ de ferrocitocromo c con $27 \mu\text{g}$ de una suspensión de mitocondrias con buena actividad catalítica y se registró la velocidad de oxidación del sustrato en presencia de oxígeno. El trazado espectrofotométrico de la figura XI muestra que con esa concentración inicial de sustrato la disminución de absorbancia a 550 nm es rápida y se puede apreciar por el agregado de ferricianuro un salto mínimo de extinción para completar la oxidación del sustrato. El gráfico inserto en la figura XI es la rectificación de esa curva por su representación en escala semilog, que confirma una cinética de primer orden para esta reacción.

Graficando la velocidad instantánea de oxidación del sustrato en función de su concentración instantánea en escala logarítmica se obtuvo la recta de la figura XII, de acuerdo a la ecuación (1). La pendiente = $0,94$ corresponde a un orden de reacción aproximadamente 1.

Para deducir el valor de la constante k se extrapoló hasta una concentración de citocromo = 1 o sea $\log = 0$ cuando según la ecuación (1) $\frac{\Delta C}{\Delta t} = k$. La ordenada en este punto resultó $3,4$ si la unidad de tiempo de la velocidad

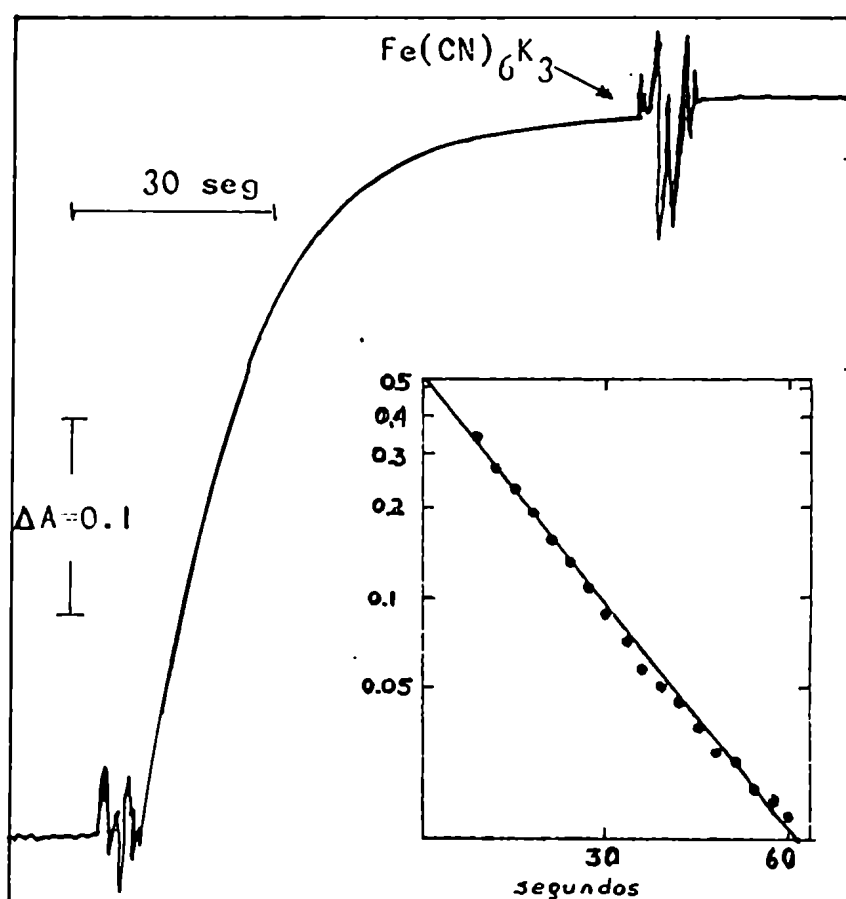
de reacción era el minuto, y pasándolo a segundos

$$k = 0,057 \text{ seg}^{-1}$$

La constante k también puede calcularse utilizando la forma integrada de la ecuación diferencial que mencionáramos al principio:

$$-\int \frac{dC}{C} = k \int dt$$

Figura XI - OXIDACION DE FERROCITOCROMO C CATALIZADA POR MITOCONDRIAS CARDIACAS DE RATA. Registro espectrofotométrico a 550 nm de la oxidación de citocromo c reducido $33 \mu\text{M}$, con $27 \mu\text{g/ml}$ de proteína mitocondrial, en las condiciones detalladas en el capítulo de métodos. El gráfico inserto muestra el decrecimiento logarítmico de la concentración instantánea de sustrato en función del tiempo. La concentración de sustrato se expresa como diferencia de absorbancia A en un tiempo dado y la absorbancia del citocromo totalmente oxidado A cuando se agrega ferricianuro de potasio al medio de reacción.

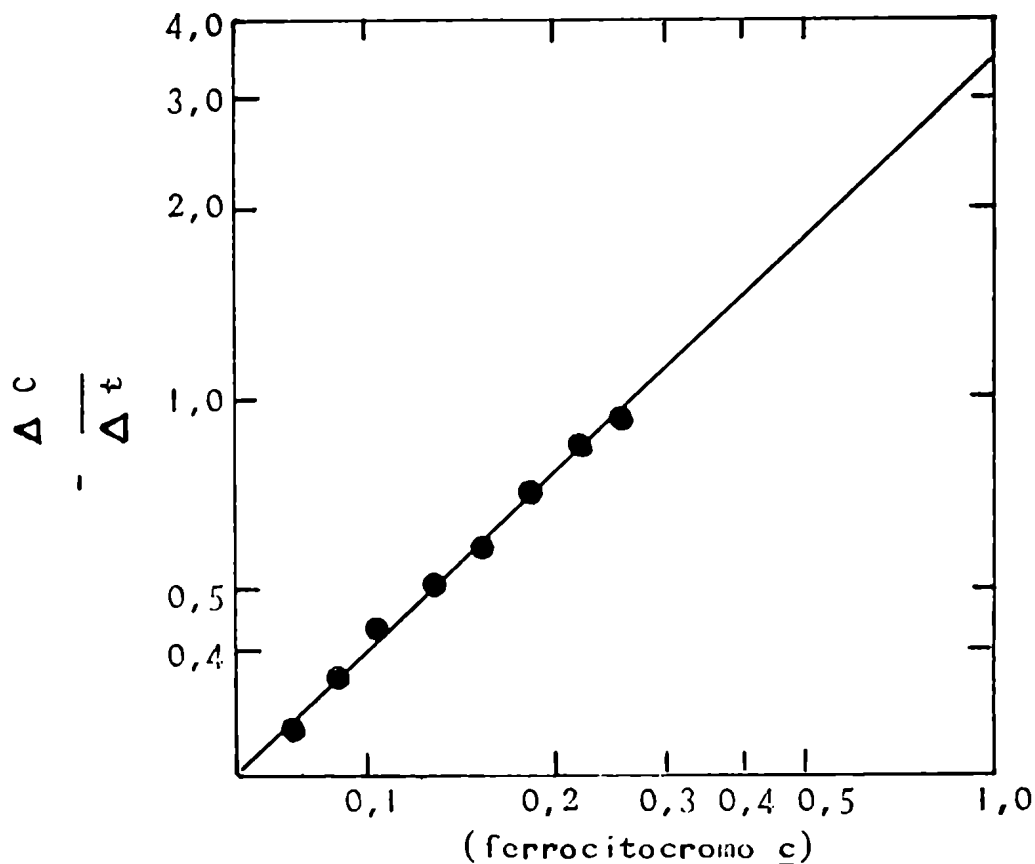


que se resuelve entre los límites t_2 y t_1

$$k = \frac{2,3 (\log C_1 - \log C_2)}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

De acuerdo a la ecuación (2) la pendiente de la recta de la figura inserta en la XI multiplicada por 2,3 da el valor de $k = 0,057 \text{ seg}^{-1}$ que coincide con el calculado por el método gráfico de la figura XII

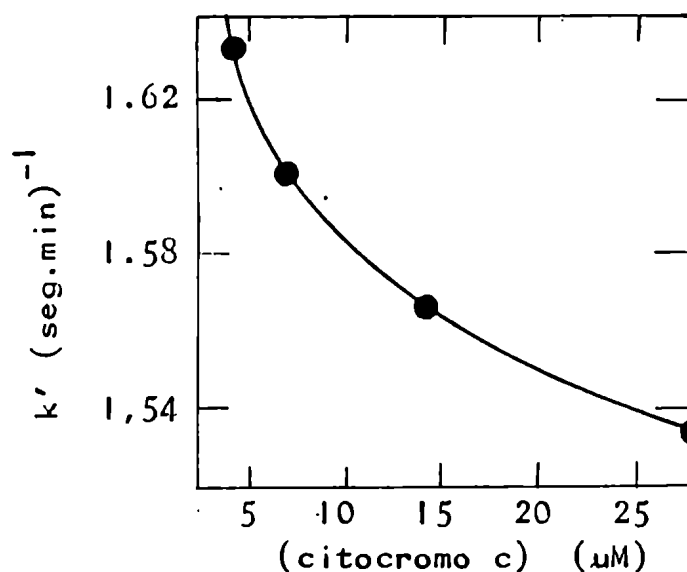
Figura XII - RELACION ENTRE VELOCIDAD DE REACCION INSTANTANEA Y CONCENTRACION DE SUSTRATO. Reacción catalizada por citocromo c oxidasa en mitocondrias de corazón de rata a pH 7,0 y en las condiciones de la figura XI. Método gráfico para determinar orden y constante de reacción según la ecuación (1) en el texto.



Smith y Conrad (1956) advirtieron que la reacción catalizada por esta enzima en membranas mitocondriales de corazón o por la enzima purificada es de primer orden respecto al sustrato y que el valor de la constante de velocidad disminuye al elevarse la concentración total de citocromo c (oxidado + reducido) al iniciarse la reacción. Verificamos lo expuesto por estos autores con nuestra preparación de enzima, midiendo el valor de k con concentraciones iniciales de citocromo c reducido en cada ensayo entre 4 y 28 μM , y los resultados se muestran en la figura XIII.

Figura XIII - EFECTO DE LA CONCENTRACION INICIAL DE SUSTRATO SOBRE LA CONSTANTE CINETICA DE CITOCROMO C OXIDASA

Se midió la actividad de la enzima unida a las crestas de mitocondrias de corazón de rata en las mismas condiciones que se detallaron en el capítulo de métodos, variando la concentración de ferrocitocromo c inicial. En cada experiencia se utilizó 0,009 mg de proteína activa, y se calculó la constante específica k' por el método de la figura XI, expresandola por segundo y por mg de proteína mitocondrial.



La enzima unida a mitocondrias fragmentadas de corazón de rata cuyas características cinéticas fijamos precedentemente fué utilizada para el estudio comparativo de la etapa final del flujo de electrones en animales con defi-

ciencia insulínica.

Actividad citocromo c oxidasa cardíaca de ratas diabéticas por estreptozotocina: Se midió la velocidad inicial de reacción en mitocondrias de ratas inyectadas con la dosis usual de diabetógeno entre una semana y un mes antes de la experiencia; la concentración inicial del sustrato en el estado reducido se fijó estrictamente entre 15 y 17 μM . Los resultados demuestran, como lo evidencia la tabla XIV, que la actividad funcional del citocromo a-a₃ no está sujeta a control hormonal por insulina.

Tabla XIV - EFECTO DE ESTREPTOZOTOCINA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CITOCROMO OXIDASA DE MITOCONDRIAS CARDIACAS

Los resultados son promedio del número de experimentos entre paréntesis con el error medio cuadrático. Las ratas presentaban síntomas de diabetes con tiempos de evolución de 8 y 30 días. Mitocondrias aisladas por la técnica de Favelukes y col. (1971) y fragmentadas según método de Parsons y Williams (1967). Ferrocitocromo c 15 a 17 μM y 2 a 6 μg de proteína mitocondrial en cada ensayo.

	Activ. específica ($\mu\text{moles cit. c/min/mg}$)
Testigos (4)	1,85 \pm 0,19
Diabéticas (5)	1,81 \pm 0,18

Actividad enzimática NADH deshidrogenasa cardíaca de ratas diabéticas por estreptozotocina: La NADH deshidrogenasa es una flavoproteína inserta en las crestas cuya función es transferir electrones del NADH intramitocondrial, producto de las reacciones oxidativas intracelulares, y encauzarlos en la cadena respiratoria.

La metodología para su determinación en preparaciones particuladas, por el método de Minakami y col. (1962), utiliza $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$ como aceptor de electrones en la secuencia: NADH ----► flavoproteína ----► ferricianuro

Este aceptor externo reacciona rápidamente y con eficiencia cuando la concentración del sustrato se mantiene cerca de $1 \text{ ó } 1,5 \times 10^{-4} \text{ M}$; si la concentración de NADH supera ese valor, aumenta progresivamente la fracción de equivalentes reductores que escapan a la cadena respiratoria. En las condiciones en que se desarrollaron los experimentos comparativos de mitocondrias de ratas diabéticas y testigos, de concentración inicial de NADH $0,15 \mu\text{M}$, el ferricianuro de potasio actúa a nivel de la NADH deshidrogenasa involucrando al hierro no hemínico. En el caso de concentraciones de NADH del orden de $0,6 \text{ mM}$, el ferricianuro actúa en un segundo sitio, probablemente a nivel del citocromo $c \text{ ó } c_1$.

Aún en estas condiciones, la velocidad de reducción del ferricianuro por una preparación de mitocondrias permeabilizadas no expresa sólo la actividad de la NADH oxidasa sino que contribuyen otros sistemas presentes en la mitocondria capaces también de reducir ferricianuro.

En la tabla XV se consignan los resultados de velocidad máxima respecto a ferricianuro de potasio a 30 °C , de muestras mitocondriales de ratas con 7 y 30 días de diabetes, que no difiere significativamente de los controles, Las constantes de Michaelis aparentes respecto al ferri-

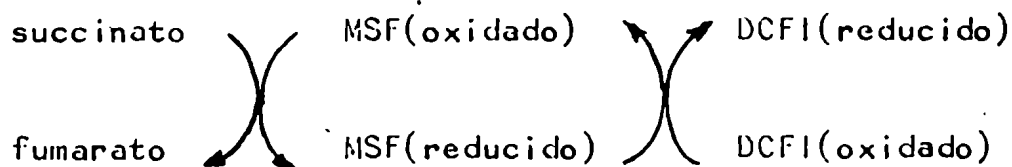
cianuro de las mitocondrias diabéticas son indistinguibles de los testigos.

Tabla XV - EFECTO DE ESTREPTOZOTOCINA SOBRE LA ACTIVIDAD CATALITICA NADH DESHIDROGENASA EN MITOCONDRIAS CARDIACAS

Medida de la velocidad de reacción NADH-ferricianuro óxido reductasa según método de Minakami y col.(1962). Resultados de 4 experimentos; en cada uno se incubó 0,10 a 0,34 mg de proteína mitocondrial con trietanolamina 0,04 M y solución de fosfatos 40mM a pH 7,4. Velocidad máxima y K_M es el resultado de la aplicación del método de cuadrados mínimos a los gráficos de doble recíproca de $1/v$; en función de $1/(S)$ cuando S variaba de 0,4 a 2,0 mM. Ratas con 30 días de diabetes; mitocondrias aisladas y fragmentadas según método de Parsons y Williams (1967).

	Activ.específica (μ moles NADH/min/mg)	K_M aparente mM $Fe(CN)_6^{3-}$
Testigos	$1,36 \pm 0,17$	$0,48 \pm 0,035$
Diabéticos	$1,80 \pm 0,38$	$0,43 \pm 0,069$

Actividad succinato deshidrogenasa cardíaca de ratas diabéticas por estreptozotocina: La actividad de esta enzima fué medida en las membranas mitocondriales utilizando un transportador de electrones artificial y bloqueando el pasaje de los electrones a través de la cadena respiratoria con cianuro. El esquema de reacciones es:



Se determinó espectrofotométricamente la desaparición del colorante DCF1 a 600 nm catalizada por muestras preparadas a partir de ratas con diabetes.

Como el succinato reacciona con la cadena respiratoria sólo por la cara de la membrana interna expuesta a la matriz (Harris y col. 1967), todos los componentes de la reacción deben ser forzados al compartimiento interno mi-

tocondrial y a tal fin se utilizó la misma preparación de mitocondrias que para ensayos de NADH deshidrogenasa y citocromo oxidasa.

Giuditta y Singer (1959) seleccionaron el MSF entre una serie de diferentes aceptores, cada uno de los cuales mide una fracción de la actividad total de la enzima, que fué ensayada por estos autores en preparaciones particuladas o enzima solubilizada de corazón de bovino. La velocidad de oxidación de succinato con MSF se realiza a velocidad comparable a la ligada a cadena respiratoria completa en las preparaciones frescas de Keilin-Hartreey en base a estos datos consideran que la velocidad succinato-MSF reductasa refleja la velocidad de la succinato oxidasa en corazón de mamíferos.

La velocidad de reacción de nuestras preparaciones mitocondriales de rata fué medida en las condiciones ya descritas y con concentraciones de MSF variables entre 0,125 y 1,0 mg; en cada experimento individual no era detectable diferencia entre diabéticos y testigos, tanto en ratas a 7 ó 30 días del tratamiento de estreptozotocina. Los datos en la tabla XVI son el promedio estadístico de medidas con 0,165 mg del aceptor de electrones.

Tabla XVI - EFECTO DE ESTREPTOZOTOCINA SOBRE LA VELOCIDAD DE REACCION SUCCINATO- MSF REDUCTASA EN CORAZON DE RATAS

Promedio de 7 experimentos con el error standard. Medida de desaparición a 600 nm del DCFI; 0,05 a 0,2 mg de protelina y 0,033 ml MSF 5mg/ml en cada ensayo.

	Activ.específica (μ moles succinato/min/mg)
Testigos	0,137 \pm 0,012
Diabéticos	0,149 \pm 0,014

e) INCORPORACION DE AMINOACIDOS "IN VITRO" A PROTEINAS MITOCONDRIALES DE CORAZON DE RATA DIABETICA

Se presentarán resultados que demuestran la sensibilidad del sistema biosintético de proteínas mitocondriales a las variaciones endócrinas de la rata, midiendo la velocidad de incorporación de leucina marcada en presencia de la mezcla de los demás aminoácidos no radiactivos en mitocondrias aisladas de corazones de ratas tratadas con estreptozotocina y/o insulina.

El primer paso en este estudio consistió en desarrollar un sistema reproducible y probar las condiciones óptimas para intentar en un segundo paso los ensayos con mitocondrias diabéticas; al respecto se aplicó y adaptó la metodología en uso en este laboratorio para la marcación isotópica "in vitro" de las mitocondrias de tejido hepático y de músculo esquelético a las mitocondrias de corazón.

Para evitar resultados con una base de error y la superposición con otros sistemas de síntesis proteica, sea citoplasmático o bacteriano, se deben cumplir ciertos requisitos en los experimentos de incorporación:

- 1) La fracción mitocondrial usada para estos estudios debe estar libre de otras estructuras subcelulares, en especial ribosomas y polisomas.
- 2) La proteína marcada debe ser perfectamente separable del aminoácido radiactivo no incorporado a las proteínas.
- 3) La contaminación bacteriana debe ser estrictamente evitada.

La primera condición se cumplió al separar las fracciones subcelulares por ultracentrifugación diferencial y lavando repetidas veces las mitocondrias sedimentadas para eliminar la fracción microsomal del sobrenadante de 7700 xg. El sistema de incorporación de aminoácidos a mitocon-

drias intactas exhibe propiedades particulares que la diferencian del sistema citoplasmático: a) las mitocondrias aisladas no requieren la adición del soluble o fracción sobrenadante de 105000 xg, complemento de enzimas y cofactores que ya están contenidos en el organoide; b) no se inhiben con ARNasa; c) su cinética de incorporación es lineal durante un tiempo más prolongado, como se demuestra en la figura XVII; d) es sensible a inhibición por cloranfenicol tal como lo es el sistema de síntesis proteica bacteriano, e insensible a cicloheximida (Wheeldon y Lehninger, 1966; Beattie y col., 1967).

La segunda condición se cumplió filtrando el producto de la reacción a través de discos Millipore de poro fino que retiene las proteínas insolubles en ácido tricloroacético al 5% en caliente y deja pasar la leucina libre o unida a ARN-t, aunque parte de la marcación se pierde como péptidos solubles en ácido disminuyendo la eficiencia de la detección.

La tercera condición se cumplió llevando a cabo los ensayos de marcación en condiciones estériles para eliminar las bacterias cuyo desarrollo durante las incubaciones distorsiona los resultados. Las condiciones de trabajo se controlaron cuidadosamente desde el sacrificio de la rata que se lavó previamente con alcohol, utilizando material de vidrio y de cirugía esterilizado, trabajando bajo campana estéril con lámpara UV y con las soluciones que componen el medio de homogeneización y de incubación de las mitocondrias aisladas filtradas a través de discos Millipore para retener bacterias.

Elección de las condiciones óptimas para las medidas:

El aminoácido radiactivo se incubó con las mitocondrias recién aisladas suspendidas en solución isotónica de sacarosa en presencia de la solución amortiguadora a pH 7,4, io-

nes Mg^{++} y fosfato, y EDTA. La tabla XVII muestra algunas características de los ensayos de incorporación en mitocondrias, su dependencia del Mg^{++} , aminoácidos y fuente de energía.

Tabla XVII - INCORPORACION DE LEUCINA- ^{14}C A MITOCONDRIAS DE CORAZON DE RATA. 1,3 mg de proteína de una suspensión de mitocondrias de respiración acoplada a la fosforilación oxidativa, controlado polarográficamente según se describió en el capítulo de métodos, se incubó con una mezcla de reacción compuesta de ClK 40 mM, EDTA 1,3 mM, Tris-ClH 20 mM, SO_4^{2-} 8 mM, 50 μ g de mezcla equimolecular de aminoácidos, sistema generador de ATP: ADP 1 mM, malato+glutamato 10 mM y fosfatos 16 mM, a pH 7,4, en sacarosa 100 mM; volumen total de 1 ml. El aminoácido marcador: 0,25 μ Ci de leucina - ^{14}C . Cicloheximida: 30 μ g/incubación; cloranfenicol: 50 μ g/incubación. Se midió radiactividad en las proteínas precipitadas en TCA 5% según se detalló en el texto.

Condiciones del ensayo	Activ. específica	
	(cpm/mg)	%
medio completo	45	100
- Mg	4	9
- mezcla aminoácidos	25	56
- malato-glutamato	19	42
- ADP y sustrato oxidable	13	29
+ cicloheximida	43	96
+ cloranfenicol	6	13

El ion Mg^{++} es requerimiento absoluto para la reacción; la adición de una mezcla equimolecular de aminoácidos menos leucina, que es el marcador isotópico adicionado separadamente, incrementó un 80% el resultado en relación a la utilización del contenido endógeno de aminoácidos.

La reacción se frenó un 87% por la presencia del cloranfenicol, antibiótico que selectivamente inhibe el sistema mitocondrial de síntesis de proteínas sin afectar el citoplasmático, y por otro lado fué resistente a cicloheximida, que es el inhibidor de la peptidil transferasa citoplasmática.

Selección del sistema generador de energía: Dentro de la complejidad del proceso de síntesis de un polipéptido, comenzando por el transporte de aminoácidos a través de la membrana, hay varios pasos endergónicos involucrados, sin que pueda precisarse si el requerimiento es por ATP o por algún intermediario energizado de la mitocondria.

Diversos investigadores que estudiaron la dependencia de la síntesis proteica mitocondrial con el mecanismo productor de energía observaron su estímulo al incluir sustratos respiratorios mitocondriales (Roodyn, 1961; Kroon, 1964) o su depresión por desacoplantes de la fosforilación oxidativa o inhibidores del flujo de electrones (Wheeldon y Lehninger, 1966).

Ya se evidenció por los resultados de la tabla XVII que la omisión de esos sustratos o de ADP en las incubaciones de fracción mitocondrial de corazón de rata baja el rendimiento de la incorporación de leucina-¹⁴C. A partir de ese dato se probaron distintos nucleótidos de adenina y sus concentraciones más apropiadas para elevar la eficiencia de la incorporación. Una alícuota de esas fracciones se utilizó para las medidas polarográficas que paralelamente verificaron la integridad y eficiencia respiratoria de esas preparaciones.

Las mitocondrias respirantes poseen en sus membranas un sistema transportador específico que facilita el pasaje de ADP y ATP, la translocasa sensible a atractilósido. Cuando se adicionaron los nucleótidos a las incubaciones se observó que tanto AMP como ADP y ATP aumentan el rendimiento de la marcación (tabla XVIII). Resulta difícil de explicar la respuesta al AMP por cuanto la membrana interna es impermeable a éste; la translocasa de adenin nucleótidos no se une a AMP, tal lo demostrado por Klingenberg y col. (1975) y además actúa preferentemente en el sentido de la

extrusión de ATP y entrada de ADP.

Tabla XVIII - DEPENDENCIA DE ENERGIA PARA LA MARCACION "IN VITRO" DE PROTEINAS MITOCONDRIALES. Componentes del medio de incubación como en tabla XVII excepto ADP y malato-glutamato (M-G). CrP: creatina fosfato 5 mM; CrK: fosfocreatina quinasa 0,1 mg/incubación.

Medio completo +				Activ. especif. (cpm/mg)
M-G	10 mM			17
AMP	2 mM	+	M-G 5 mM	63
AMP	4 mM	+	" " "	53
ADP	1 mM	+	M-G 5 mM	51
"	" "	+	M-G 10 mM	62
ADP	2 mM	+	M-G 5 mM	87
"	" "	+	M-G 10 mM	106
ATP	1 mM			58
ATP	2 mM			78
ATP	1 mM	+	CrP + CrK	42
ATP	2 mM	+	" + "	52

Wheeldon y Lehninger, (1966), y contrariamente a nuestros resultados, demostraron que AMP inhibe la síntesis en tanto una fuente exógena de ATP con sistema regenerador es más eficiente que la utilización de la cadena respiratoria acoplada, a pesar de que en ese esquema experimental la translocasa no estaría funcionando en su sentido más favorable. Nuestros experimentos con ATP y fosfocreatina quinasa dan un rendimiento 50 % menor que con ADP y malato-glutamato coincidiendo con Kroon (1963), quien propone la posibilidad del aprovechamiento de la energía de la oxidación de un sustrato sin sintetizar ATP como paso previo.

La incorporación de leucina a nuestras preparaciones mitocondriales de corazón se aceleró cuando la concentración de ADP se llevó a 2 mM y la del sustrato a 10 mM. (tabla XVIII).

Inhibidores de la síntesis proteica mitocondrial: En un experimento que puede aclarar la presencia de residuos de citoribosomas en el sedimento de 7700 xg que diera origen a una marcación extra, las fracciones mitocondriales con un número creciente de lavados en el medio de homogeneización de Chappell y Perry (1954) con albúmina 1mg/ml, se incubaron en presencia de cicloheximida o cloranfenicol, inhibidores específicos citoplasmático y mitocondrial, respectivamente.

Tabla XIX - EFEECTO DE INHIBIDORES SOBRE LA SINTESIS PROTEICA MITOCONDRIAL. El procedimiento para estos ensayos ya se describió para la tabla XVII. ADP 1 mM, M-G 10 mli de cada uno. Cicloheximida 50 μ g/incubación. Cloranfenicol: 30 μ g/incubación.

Medio completo +	Actividad específica (cpm/mg)	
	Mitocondrias con 3 lavados	4 lavados
-----	71	65
cicloheximida	72	65
cloranfenicol	33	12

En la tabla XIX se observa que la presencia de cicloheximida no modifica la incorporación mitocondrial, pero 30 μ g de cloranfenicol en las incubaciones con mitocondrias con 4 lavados produce un 82 % de inhibición. La homogeneización reiterada de la fracción mitocondrial disminuye en cierta medida el rendimiento, pero asegura la pureza de la preparación. En la muestra con 3 lavados, la diferencia de la velocidad de incorporación producida por el cloranfenicol es del 54%, que está por debajo de los índices de inhibición habituales en la literatura. Para deslindar los efectos atribuibles a la diabetes sobre el sis-

tema de síntesis proteica mitocondrial y citoplasmático debemos considerar insuficiente 3 lavados para los experimentos comparativos entre mitocondrias de ratas diabéticas y normales.

Elección del sustrato respiratorio: El rendimiento de la síntesis proteica sin sistema externo de energía depende de aquellos metabolitos que se catabolizan en las mitocondrias y alimentan la cadena de transporte de electrones. Ensayando con succinato, malato, piruvato, glutamato y alfacetoglutarato, resultó más efectiva la mezcla de malato-glutamato 10 mM de cada uno, que igualmente se había evidenciado como óptimo sustrato en las medidas de velocidad respiratoria y fosforilación del ADP (tablas XVII y XX, ver también tablas III y VI).

Tabla XX - EFFECTO DEL SUSTRATO OXIDABLE MITOCONDRIAL SOBRE LA INCORPORACION DE LEUCINA RADIATIVA. Condiciones similares al ensayo de la tabla XVII con ADP 2 mM. Leucina presente en cada incubación: 0,25 μ Ci. El sustrato malato + glutamato contenía malonato con el 50% de la concentración de aquellos.

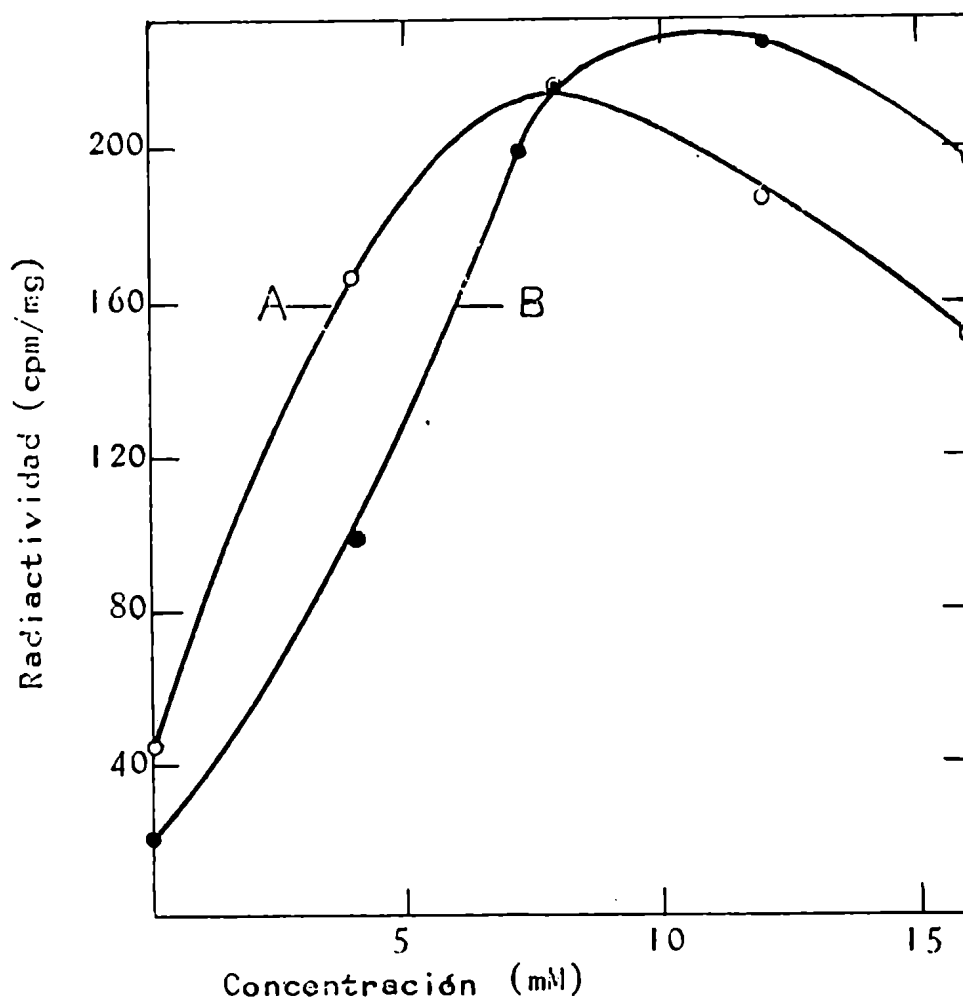
Sustrato	Activ. especif. (cpm/mg)		
	5 mM	10 mM	20 mM
succinato		88	86
malato-glutamato	88	102	87
piruvato		85	85
piruvato-malato		87	86
alfacetoglutarato	39	38	

El resultado de estos experimentos confirma el acoplamiento del proceso endergónico de formación de uniones peptídicas con la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa mitocondrial.

Concentraciones óptimas de Mg^{++} y fosfatos: Hemos visto en la tabla XVII la dependencia de la reacción con el Mg^{++} ; al aumentar a 12 mM su concentración mejora la

velocidad de la síntesis. La concentración de fosfato fué también motivo de ajuste, según vemos en la figura XIV la concentración 8 mM es óptima e incrementa el 40% el resultado respecto a la concentración del método original. El fosfato cumple aquí el papel simultáneo de regulador del pH y sustrato de la ATP sintetasa.

Figura XIV - EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE IONES Mg^{++} Y FOSFATO SOBRE LA INCORPORACION DE LEUCINA A MITOCONDRIAS CARDIACAS DE RATA. 1 mg de proteína mitocondrial incubado con ClK 40mM, EDTA 1,3 mM, Tris-ClH 10mM, ADP 2mM, malato-glutamato 10mM, 50 μ g mezcla equimolecular de aminoácidos excepto leucina que como marcador isotópico se agregó independientemente 0,25 μ Ci de leucina- ^{14}C , en sacarosa 100mM. Curva A: variación de fosfatos entre 0 y 16mM con Mg^{++} fijo en 8mM. Curva B, varía Mg^{++} y fosfatos fijo en 16 mM.

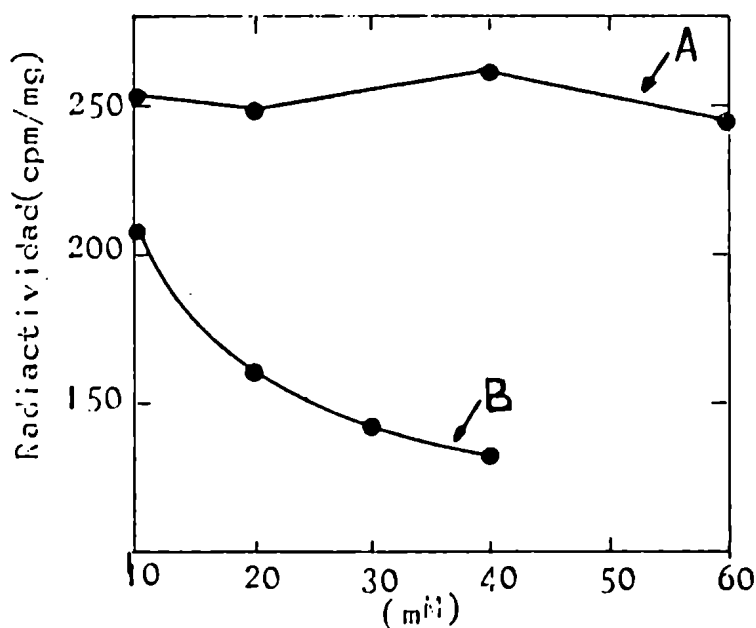


Elección de la solución amortiguadora: Good y col.

(1966) publicaron un trabajo que demuestra las ventajas de una serie de amortiguadores con estructura de aminoácidos N-sustituídos para obtener preparaciones mitocondriales más estables, mejorar la actividad respiratoria y aumentar el rendimiento de la síntesis proteica. La inclusión de bicine (N,N,Bis(2-hidroxietyl)glicina) $(\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_2\text{-N}^+\text{-CH}_2\text{COO}^-$ en el medio de homogeneización del tejido cardíaco durante el aislamiento de nuestras muestras mitocondriales o durante las medidas de velocidad respiratoria no mejoraron el rendimiento mitocondrial o el consumo de oxígeno al utilizar Tris-ClH, pero su presencia en las incubaciones con aminoácidos favorece la captación de radiactividad en las proteínas precipitadas en TCA 5%.

Al elevar la concentración de Tris-ClH se detectó inhibición (ver figura XV), mientras que bicine aumenta el rendimiento a todas las concentraciones ensayadas.

Figura XV - EFECTO DE TRIS-ClH Y BICINE EN LA SÍNTESIS PROTEICA DE MITOCONDRIAS CARDIACAS. Incubación de 1,6 mg de proteína mitocondrial con una mezcla de reacción que contenía SO_4 Mg 8ml, fosfatos 8 ml, ADP 2 ml y otros componentes que se describieron para la tabla XVII. Curva A: bicine a pH 7,4 entre 10 y 60 mM. Curva B: Tris-ClH a pH 7,4 a 30°C entre 10 y 40 mM.



Dependencia del método de fraccionamiento subcelular:

Un aislamiento de fracción mitocondrial se realizó por centrifugación del homogenato preparado según el método de Chappell y Perry (1954) desarrollado para músculo esquelético y se comparó con otra preparación que homogeneizaba el tejido cardíaco en sacarosa-EDTA-Tris-ClH, medio de uso frecuente en los aislamientos de mitocondrias cardíacas.

Las medidas polarográficas y las incubaciones con aminoácidos se hicieron paralelamente con las muestras frescas, con los resultados que vemos en la tabla XXI.

Tabla XXI - EFECTO DEL METODO DE AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS CARDIACAS SOBRE EL SISTEMA DE SINTESIS PROTEICA.

El consumo de oxígeno se midió en un oxígrafo a la temperatura de 30 °C. El sustrato en todos los ensayos era malato+glutamato 10 ml con malonato 5ml. SET: sacarosa 0,25 ml, EDTA 1 ml y Tris-ClH (pH 7,4 a 0°C) 5ml.

(a) Chappell y Perry (1954).

Medio de homogeneización del tejido	C.R.	Cons.O ₂ Estado 3 (nAO/min/mg)	Activ.específ. (cpm/mg)
<u>SET</u>			
Experimento 1	3,4	189	174
" 2	3,8	204	183
<u>Chappell-Perry(a)</u>			
Experimento 1	5,6	190	222
" 2	6,8	198	240
" 3	5,8	177	226

La velocidad respiratoria y el P:O no difieren en las diferentes preparaciones mitocondriales, pero el mayor control respiratorio de las mitocondrias aisladas por el método de Chappell y Perry es un indicativo de mitocondrias con menor daño estructural y mayor acoplamiento del mecanismo conservador de energía aprovechada en la formación de unión peptídica.

Como resultado de las aproximaciones descritas y con el ajuste de las concentraciones de cada componente mencionados hasta aquí, la incorporación de leucina- ^{14}C se cuadruplicó en relación a los primeros ensayos que presentamos en la tabla XVII, para llegar a las condiciones de reacción utilizada en los experimentos con animales diabéticos. El lavado del sedimento de 7700 xg con solución de albúmina 1 mg/ml favorece la eliminación de ácidos grasos libres de acción desacoplante e inhibitoria de la cadena respiratoria a bajas y altas concentraciones, respectivamente. Pande y Blanchaer (1971) sugieren la inhibición reversible de la respiración acoplada de las mitocondrias de corazón de rata a nivel de la translocasa de adeninucleótidos por acil-CoA de cadena larga. Las mitocondrias tratadas con albúmina en el fraccionamiento no requieren albúmina durante la incubación con aminoácidos para mejorar la velocidad de incorporación de leucina- ^{14}C .

Cinética de incorporación: La curva que muestra la figura XVI es característica del sistema intramitocondrial de síntesis proteica, como nueva evidencia de la ausencia de contaminante bacteriano o microsomal.

Se observó un salto brusco de radiactividad en los primeros 10 minutos, cuyo origen puede atribuirse a la leucina que se incorpora al sistema ya funcionando con la mezcla endógena de aminoácidos, enzimas, factores, y en el que probablemente se encuentran receptores disponibles y rápidamente utilizados. Continúa un gráfico de primer orden respecto al tiempo y pasadas 2 horas de incubación decae tal vez por agotamiento de las proteínas precursoras de origen citoplasmático o por el envejecimiento mitocondrial y disminución de la velocidad de fosforilación.

Figura XVI - CINETICA DE INCORPORACION "IN VITRO" DE LEUCINA- ^{14}C A MITOCONDRIAS DE CORAZON DE RATA. Incubación de 1,4 mg de proteínas mitocondriales en el medio y las condiciones descritas en la tabla XVII

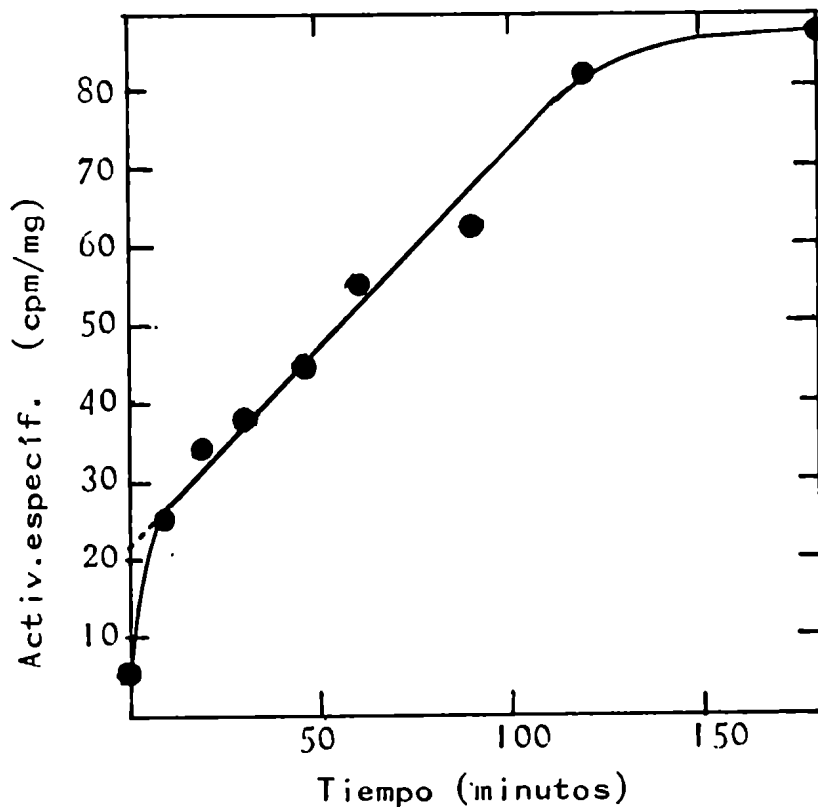
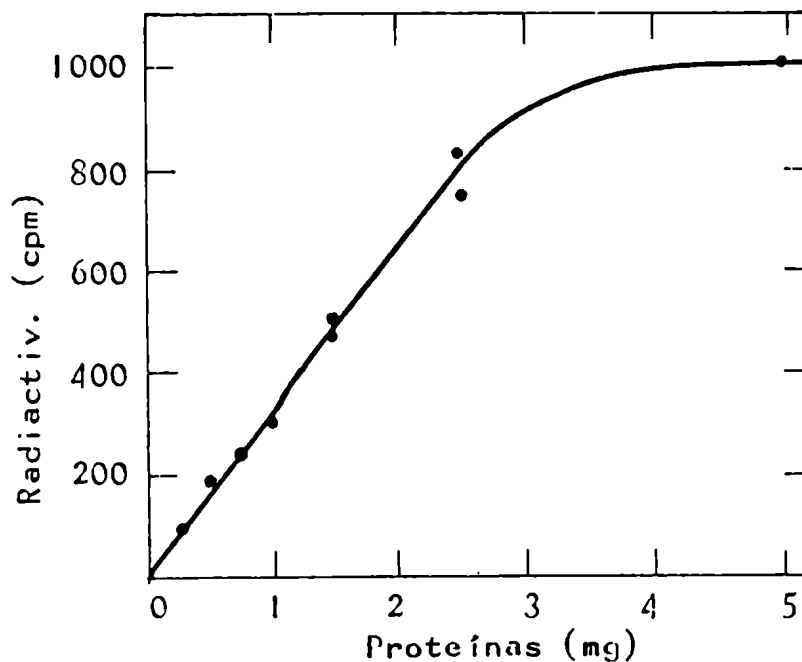


Figura XVII - INCUBACION DE LEUCINA- ^{14}C Y MEZCLA DE AMINOACIDOS CON MITOCONDRIAS INTACTAS DE CORAZON DE RATA. Resultados de 2 ensayos en iguales condiciones. La cantidad de proteína en cada incubación con leucina 37 mM y el medio completo de reacción como se detalló en métodos. Se determinó radiactividad en proteínas precipitadas en TCA 5%.



Expresión de los resultados: La incorporación del elemento isotópico a las proteínas mitocondriales se expresa como actividad específica de la leucina radiactiva presente en cuentas por minuto por mg de proteína de fracción mitocondrial que se incubó, lo que es válido en el rango de 0 a 2,5 mg de proteínas en el cual la relación es lineal como se aprecia en la figura XVII.

Incorporación de aminoácidos a mitocondrias cardíacas de ratas con estreptozotocina: Para estos experimentos se inyectaron lotes de ratas con una dosis de estreptozotocina y se sacrificaron a los 7 y 30 días para el aislamiento de la fracción mitocondrial. Los datos de la tabla XXII demuestran que a los 7 días hay un descenso significativo del 41% ($p < 0,01$) en la velocidad de incorporación respecto a testigos. En ratas con 30 días de diabetes el descenso es del 15% y por la dispersión de los resultados no supone significancia estadística.

Tabla XXII - EFFECTO DE ESTREPTOZOTOCINA SOBRE LA MARCACION DE PROTEINAS DE MITOCONDRIAS CARDIACAS CON LEUCINA- ^{14}C .

Ratas inyectadas con 13 mg de estreptozotocina por vía endovenosa. Peso promedio de los corazones según datos extraídos de Tabla I. (a) resultados promedio de 6 ensayos, en cada uno se agruparon 2 corazones, $p < 0,01$. (b) promedio de 7 ensayos, igualmente los testigos, $p < 0,4$.

Ratas	Peso del corazón (g)	Activ. específ. (cpm/mg)
Testigos	0,60	190 ± 13
Diabetes (D ₇)	0,47	113 ± 5 (a)
Diabetes (D ₃₀)	0,53	164 ± 25 (b)

El peso del corazón sufrió un descenso del 22% en la primer semana de diabetes ya mencionado en la tabla I, con aumento relativo en las siguientes semanas; los animales con 30 días de diabetes evidenciaban una importante

disminución del peso total corporal (ver figura 11) y del peso del corazón, 12% menor que el de ratas control. Podemos destacar que la velocidad de síntesis proteica intramitocondrial en corazón acompaña las fluctuaciones observadas en el peso del órgano.

Tratamiento reconstitutivo con insulina: Las ratas con diabetes de 7 días se inyectaron diariamente con 10 U de insulina Lilly NPH. La tabla XXIII muestra varios experimentos de este tipo en que a pesar de diferente respuesta de un animal a otro coinciden en el aumento de velocidad de incorporación de leucina - ^{14}C proporcional al tiempo de tratamiento insulínico; con 4 dosis se alcanzó o sobrepasó los valores de testigos no diabéticos. Las ratas testigos a su vez incrementaron la velocidad de síntesis al ser inyectadas con dosis equivalentes de hormona.

Tabla XXIII - RESPUESTA A INSULINA "IN VIVO" DE LA INCORPORACION DE AMINOACIDOS A MITOCONDRIAS CARDIACAS DE RATA.

Animales diabéticos inyectados con estreptozotocina 7 días antes del experimento. La hormona se administró en dosis de 8 U/día insulina Lilly NPH durante el tiempo indicado. Preparación de las mitocondrias, ensayo con leucina- ^{14}C , y medida de la marcación según detalles en métodos.

Exp.	Incorporación de leucina- ^{14}C (cpm/mg)					
	Testigos	Diabéticos + insulina				
		0 dosis	2 dosis % de T		4 dosis % de T	
1	154	93	122	79	167	108
2	198	145	168	85	187	94
3	197	153	208	105	238	120
			Testigos + insulina			
			2 dosis % de T		4 dosis % de T	
4	204		259	127	278	136
5	220		321	146	332	151

Incorporación de aminoácidos a mitocondrias de ratas con hipofisectomía: Se contaba con un lote de 9 ratas operadas por el Dr.C.D.Bedetti para los estudios simultáneos de la síntesis proteica mitocondrial en tejido hepático y de músculo esquelético (Favelukes y col.,1975). Estas ratas, de alrededor de 100 g al ser operadas, no incrementaron su peso en los 30 días que le siguieron, momento en que fueron sacrificadas para estos ensayos. Los corazones pesaban 0,4 g aproximadamente y fué necesario agrupar 3 corazones para aislar la fracción de mitocondrias.

La cantidad de datos disponibles no permite una estadística de los resultados, pero se mencionan por su correlación con los de otros tejidos, y con datos propios en animales diabéticos (tablas XXII y XXIII).

Tabla XXIV - EFFECTO DE HIPOFISECTOMIA DE LA RATA SOBRE LA SINTESIS PROTEICA EN MITOCONDRIA CARDIACA. Ratas macho de 100 g de peso, operadas por extracción de la glándula hipófisis por succión con bamba de vacío por aproximación parafaríngea. No aumentó el peso corporal en el mes transcurrido hasta el experimento. Peso del corazón: promedio testigos 0,52 g, hipofisoprivos 0,4 g. Datos promedio de duplicados de cada experimento con 3 corazones simultáneamente. Detalles de la experiencia en métodos.

Exp.Nº	Incorporación leucina- ¹⁴ C (cpm/mg)		
	Testigos	Hipofisoprivos	% de T
1	182	144	79
2	151	134	89
3	174	145	83

Simultáneamente se midió la actividad respiratoria en alícuotas de estas fracciones mitocondriales en las que se detectó déficit del consumo de oxígeno, que pasó de 164 a 126 nAO/min/mg por efecto de la hipofisectomía, (el control respiratorio bajó de 4,9 a 3,3); comparando con los resultados de la tabla XXIV, el decrecimiento es proporcional.

f) NIVELES DE CITOCROMOS EN MITOCONDRIAS DE CORAZON DE RATAS DIABETICAS

Propiedades espectrales de los citocromos mitocondriales: Como las suspensiones mitocondriales son turbias y absorben y dispersan la luz, los espectros de absorción en la mitocondria entera no pueden medirse directamente por espectrofotometría. En los espectrofotómetros convencionales el detector se encuentra a cierta distancia de las celdas y una parte importante de la luz transmitida es dispersada y no alcanza el detector, con lo que resulta un espectro poco definido, con absorbancias distorsionadas.

El uso del espectrofotómetro de haz dividido es ventajoso para estas muestras en razón de la ubicación del fotomultiplicador, a menos de un cm de las celdas, y por poseer además un área fotosensible mayor.

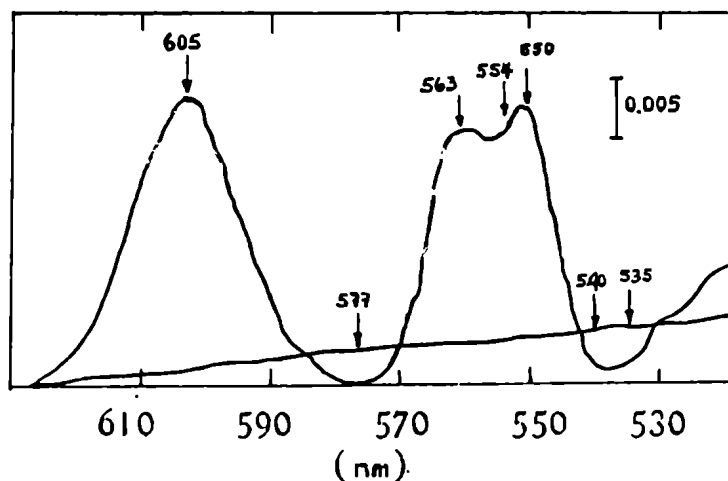
El grado de dispersión producido por las muestras turbias depende del tamaño de partículas y su concentración. En nuestras mediciones no se presentaron diferencias en los niveles espectrales de los citocromos por el hecho de utilizar mitocondrias frescas enteras, o congeladas, cuidando que en todos los ensayos la proteína presente en las cubetas fuera constante.

El espectro diferencial, reducido menos oxidado, se debe al efecto de la reacción con ditionito y ferricianuro respectivamente en cada cubeta mientras que el debido al espectro diferencial propio de la suspensión mitocondrial se anula.

Las medidas de absorbancia leídas entre 500 y 630 nm detectaron las bandas α de los citocromos con máximos en 605, 563, 550 y 554 nm correspondientes a citocromos \underline{aa}_3 , \underline{b} , \underline{c} y un codo de citocromo \underline{c}_1 , respectivamente. Un trazado típico de los espectros diferenciales en la fracción mitocondrial

de corazón de rata aparece en la figura XVIII.

Figura XVIII - ESPECTROS DIFERENCIALES DE LA FRACCION MITOCONDRIAL DE CORAZON DE RATA. 3,8 mg de proteínas en medio de fosfatos a pH 7,4 en cada cubeta, a una se adicionó ferricianuro y a la otra ditionito. Se registró la diferencia de absorbancia entre los citocromo oxidados y reducidos con un espectrofotómetro de haz dividido. Detalles en el texto.



Determinación cuantitativa de citocromos en la membrana

mitocondrial: El método de Williams (1964) permite la estimación simultánea de los citocromos mitocondriales con el planteo de un sistema de ecuaciones con 4 incógnitas cuya resolución da la concentración de cada citocromo en micro-moles por mililitro de solución presente en la celda del espectrofotómetro. Estas son:

$$21,0 X_1 + 10,3 X_2 - 3,12 X_3 + 0,63 X_4 = a_{15}$$

$$6,51 X_1 + 18,8 X_2 + 2,55 X_3 + 0,95 X_4 = a_{25}$$

$$- 1,16 X_1 + 0,91 X_2 + 14,3 X_3 - 0,326 X_4 = a_{35}$$

$$- 0,22 X_1 - 0,59 X_2 + 0 X_3 + 12,0 X_4 = a_{45}$$

a_{15} , a_{25} , a_{35} y a_{45} se calculan por diferencia entre las lecturas de los picos de longitud de onda de máximos y mínimos de los citocromos \underline{c} , \underline{c}_1 , \underline{b} y \underline{aa}_3 respectivamente.

A esas absorbancias contribuyen en parte cada uno de los citocromos en una proporción dada por su concentración

y su coeficiente de extinción a la longitud de onda correspondiente. X_1 , X_2 , X_3 y X_4 son las concentraciones buscadas de los citocromos \underline{c} , \underline{c}_1 , \underline{b} y \underline{aa}_3 y las cifras que los acompañan en cada ecuación los coeficientes de extinción milimolar en el par de longitudes de onda leído.

Williams presenta la resolución del sistema de ecuaciones por sustitución aplicando las fórmulas siguientes:

$$b_{15} = \frac{a_{15}}{21,0}$$

$$c_{25} = \frac{a_{25} - 6,51 b_{15}}{15,6}$$

$$d_{35} = \frac{a_{35} + 1,16 b_{15} - 1,48 c_{25}}{13,8}$$

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

y de ellas se deducen las correspondientes concentraciones:

$$\text{cit } \underline{aa}_3: \quad X_4 = a_{45}$$

$$\text{cit } \underline{b}: \quad X_3 = d_{35} + 0,0263 X_4$$

$$\text{cit } \underline{c}_1: \quad X_2 = c_{25} - 0,0484 X_4 - 0,225$$

$$\text{cit } \underline{c}: \quad X_1 = b_{15} - 0,03 X_4 + 0,149 X_3 - 0,491 X_2$$

Niveles de citocromos en mitocondrias cardiacas de rata diabética: La tabla XXV resume las medidas efectuadas con muestras de ratas inyectadas con estreptozotocina y ratas control. Como las diabéticas tienen corazones de menor tamaño y peso, se hizo necesario agrupar 3 corazones para que la cantidad de proteína mitocondrial en las dos cubetas diera los picos espectrales bien definidos. Los registros de mitocondrias diabéticas y testigos siguen curvas idénticas y los resultados de la tabla indican que hay leve disminución de los niveles: 12% el citocromo \underline{c} , 9% el \underline{aa}_3 , 8% el \underline{b} ,

y 3% el \underline{c}_1 , sin significancia estadística.

Tabla XXV - CITOCROMOS MITOCONDRIALES EN CORAZON DE RATAS TRATADAS CON ESTREPTOZOTOCINA: Los espectros entre 500 y 630 nm fueron medidos en un espectrofotómetro diferencial de haz dividido. En cada cubeta, 3 a 4 mg de proteína mitocondrial. Los resultados se calcularon aplicando las ecuaciones propuestas por Williams (1964) y se expresan como nmoles/mg proteína con el error standard. El número de experimentos figura entre paréntesis y cada uno es un promedio de 3 corazones. Las pruebas de significancia dan para diabéticos $p > 0,1$ (no significativo).

	Testigos (8)	Diabéticos (5)
citocromo \underline{aa}_3	1,201 \pm 0,050	1,097 \pm 0,140
" \underline{b}	0,877 \pm 0,047	0,807 \pm 0,061
" \underline{c}_1	0,264 \pm 0,005	0,256 \pm 0,016
" \underline{c}	0,685 \pm 0,038	0,604 \pm 0,039

Los trabajos de Williams fueron revisados por Vanneste en 1966, quien corrigió algunos coeficientes de absorción. Aplicamos esos valores para nuevos cálculos, en los que la relación de cada citocromo en diabéticos y testigos por supuesto se mantiene, y el contenido de citocromos es el que vemos en la tabla XXVI.

Tabla XXVI - CITOCROMOS MITOCONDRIALES EN CORAZON DE RATAS TRATADAS CON ESTREPTOZOTOCINA. Cálculos de los mismos experimentos de la tabla XXV con los coeficientes de absorción según Vanneste (1966), como se explica en el texto.

	Concentración (nmoles/mg)	
	Testigos	Diabéticos
citocromo \underline{aa}_3	1,097 \pm 0,039	1,003 \pm 0,128
" \underline{b}	0,439 \pm 0,024	0,405 \pm 0,030
" \underline{c}_1	0,265 \pm 0,007	0,256 \pm 0,016
" \underline{c}	0,574 \pm 0,032	0,505 \pm 0,022

Los coeficientes de extinción a que hace referencia la tabla XXVI son: citocromo \underline{aa}_3 12,0 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Van Gelder y Slater, 1963), citocromo \underline{c} 21,1 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Van Gelder y Slater

1962) y citocromo b $28,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Zaugg y Rieske, 1962). De los resultados expuestos vemos que expresando los radios molares de cada uno respecto al citocromo aa₃, al que le asignamos el valor de 4, podemos aproximar a números enteros: (aa₃:b:c₁:c)=(4;3;1;2) en base a la tabla XXV, y (aa₃:b:c₁:c) = (4;2;1;2) si tomamos valores de la tabla XXVI que da menor relación del citocromo b.

Los datos de Vanneste fueron medidos en mitocondria de corazón de bovino y son cercanos a los que obtuvimos en ratas. Es mayor la proporción c:aa₃ de nuestra preparación y puede tomarse como indicativo de mitocondrias íntegras porque el citocromo c puede perderse durante el fraccionamiento.

CAPITULO VI

D I S C U S I O N

El efecto de la diabetes e insulina sobre las funciones mitocondriales es un tema frecuentemente estudiado en el tejido hepático en relación con su papel regulador del metabolismo de glúcidos y lípidos, pero es escasa la información que describe actividades enzimáticas y respiratorias del miocardio, que generalmente fueron medidas como complemento de aquellas investigaciones referidas al hígado.

El metabolismo del miocardio exhibe algunas características que le son propias y otras en común con el tejido de musculo esquelético adaptadas a la función de contracción rítmica. La evidencia morfológica de abundantes crestas en relación al volumen mitocondrial es típico de aquellos tejidos con importante demanda de ATP en los que prevalecen los mecanismos aerobios para la conservación de la energía.

Los principales nutrientes metabolizados en el tejido cardíaco; ácidos grasos, cuerpos cetónicos y glucosa, completan su degradación compartimentada en las mitocondrias donde se logra la transferencia controlada de los electrones desde esos electrones a las coenzimas. Estos procesos implican un ciclo de los ácidos tricarbóxicos muy activo y coordinado con la reoxidación de las coenzimas en la cadena respiratoria.

Debido a la íntima conexión entre los procesos metabólicos mitocondriales y su ultraestructura, el estudio de un estado fisiológico o patológico particular debe estar encadrado integralmente en esos dos aspectos. Tomando como ejemplo las levaduras en las que, citando a Packer y col. (1973) "el fenómeno de deficiencias respiratorias ocasionado por

la pérdida o alteración del ADN mitocondrial se traduce en membranas funcionalmente deficientes con decrecimiento de la actividad ATPasa y de actividades enzimáticas, respiratorias y componentes del citocromo aa_3 , b y c_1 "; en base a este modelo experimental de las levaduras en crecimiento anaeróbico y con el conocimiento de que existen deficiencias respiratorias, enzimáticas y de la biosíntesis proteica en mitocondrias de mamíferos en estado diabético que ya se comentaron en el capítulo II b), se diseñaron los experimentos para el estudio de las correspondientes funciones de las mitocondrias cardíacas de rata diabética, que se proyectaron en las siguientes direcciones: a) actividad respiratoria, b) actividades enzimáticas localizadas en el compartimiento interno mitocondrial y c) velocidad de la síntesis proteica, asociada con la marcación de péptidos de la membrana interna.

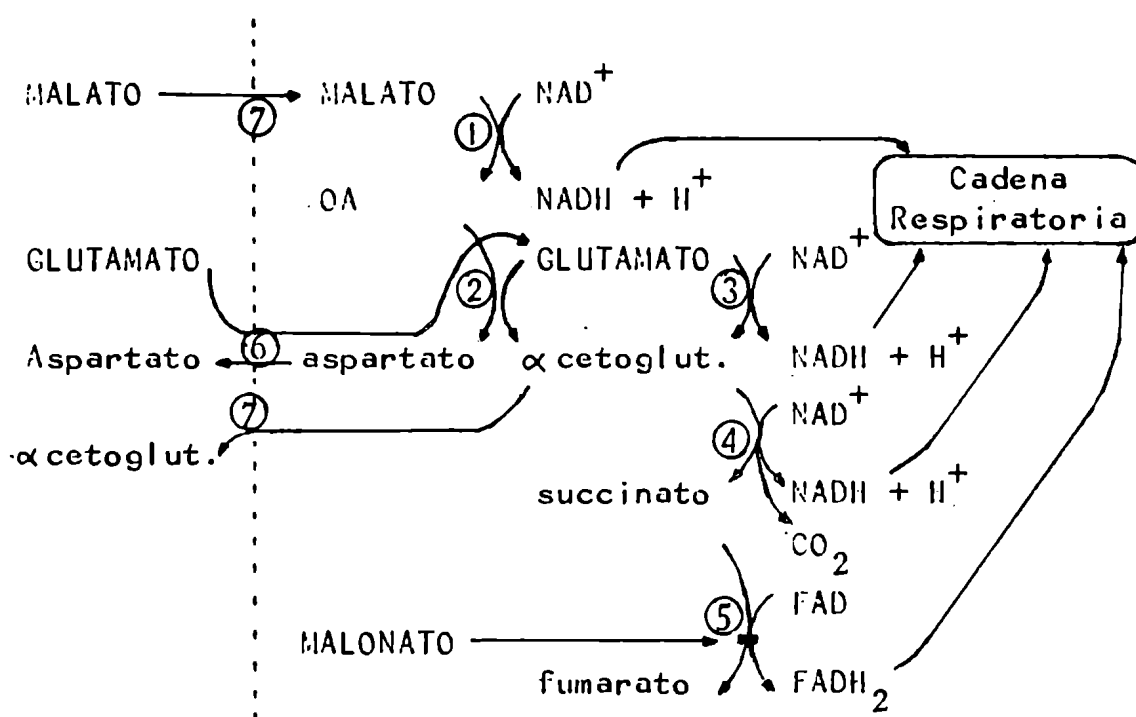
Como resultado de esos estudios se detectaron algunos efectos transitorios en respuesta a la diabetes experimental de la rata sobre la velocidad del transporte de electrones por la cadena, sobre la incorporación de aminoácidos a polipéptidos en mitocondrias enteras, y un efecto que persiste en la diabetes crónica sobre la actividad de la enzima betahidroxibutirato deshidrogenasa.

Actividad respiratoria de las mitocondrias cardíacas:

En la primera etapa de este estudio se caracterizó el funcionamiento de la cadena respiratoria, la velocidad de las oxidaciones de distintos sustratos y el acceso de los equivalentes de reducción como nucleótidos de adenina o flavina.

Aquellos metabolitos que imprimen mayor velocidad al flujo de electrones en mitocondrias cardíacas son malato y glutamato aportados simultáneamente. La enzima malato deshidrogenasa es inhibida por su producto pero el agregado de glutamato deriva el oxalacetato formado hacia su transa-

minación catalizada por aspartato-glutamato aminotransferasa mitocondrial, protegiendo a la enzima de su inactivación y acelerando la entrada del NADH a la cadena respiratoria. La reacción de transaminación parece más probable en el músculo cardíaco que la vía de la glutamato deshidrogenasa, por ser esta enzima menos activa en corazón que la transaminasa (Davis, 1968). El esquema de reacciones es el que sigue:



- 1 - NAD malato deshidrogenasa
- 2 - glutamato-oxalacetato transaminasa
- 3 - glutamato deshidrogenasa
- 4 - α cetoglutatarato deshidrogenasa
- 5 - succinato deshidrogenasa
- 6 - transportador glutamato-aspartato
- 7 - transportador malato- α cetoglutatarato

El movimiento desde y hacia las mitocondrias está favorecido por los transportadores de membrana que intercambian malato con α cetoglutatarato, y glutamato con aspartato. El α cetoglutatarato tiene dos caminos alternativos, su oxi-

dación en el ciclo del ácido cítrico, o la salida de la mitocondria. Este último paso está estimulado por las concentraciones relativas de α cetoglutarato y malato a ambos lados de la membrana (Williamson, 1979). En el esquema anterior pueden señalarse las reacciones 1 y 2 relativamente más activas que 3 y 4 (LaNoue y col., 1973), la reacción 5 bloqueada y las 6 y 7 intercambiando los metabolitos entre las mitocondrias respirantes y el medio de reacción en las que se suspendieron.

Este conjunto de reacciones, que constituye el sistema de lanzadera del malato-aspartato para introducir los equivalentes de reducción citoplasmáticos originados en la glucólisis, es más activa que la lanzadera del glicerofosfato en el músculo cardíaco de acuerdo a los resultados de la tabla III, tal como fuera demostrado en el músculo esquelético (Bookelman y col., 1979; LaNoue y col., 1973).

Algunos investigadores sostienen que la enzima IIBD cumple también en papel fisiológico de lanzadera intracelular con el 3-hidroxibutirato actuando de transportador de equivalentes reductores, también de un tejido a otro (Devlin y Bedell, 1960; Krebs, 1961; Klingenberg y Häfen, 1963) pero nuestros resultados demuestran que su participación en el miocardio es escasa y menos eficaz que el sistema del malato, que produce una velocidad de consumo de oxígeno que duplica la generada por el betahidroxibutirato.

Las medidas de utilización del oxígeno en el estado 4 son del mismo orden para aquellos sustratos ligados al NAD: malato, 3-IIB, α cetoglutarato o piruvato, pero el índice de control respiratorio llamativamente bajo en el caso del 3-IIB parece indicar una restricción del flujo total de electrones que no permite traspasar ciertos niveles, aún activado por ADP o desacoplantes. Datos publicados por Pande y Blanchaer, (1971) son razonablemente cercanos a los de nuestras expe-

riencias, sus mitocondrias de corazón de rata tienen una velocidad de consumo de oxígeno con 3-HB 50% más lenta que con malato y glutamato y un control respiratorio 3,3 similar al de la tabla III.

Respiración y fosforilación de las mitocondrias de ratas diabéticas y tratadas con insulina. Las observaciones en ratas tratadas con estreptozotocina indican que la velocidad de las oxidaciones y eficiencia fosforilante mitocondrial están protegidas en corazón, comportamiento similar al del músculo esquelético según lo demostraron Favelukes y col. (1973) y Dow (1967). Por otra parte, la literatura ofrece numerosos ejemplos de deficiencias respiratorias en la mitocondria hepática de ratas y otros mamíferos diabéticos (Harano y col., 1972; Hall y col., 1960; Matsubara y Tochino, 1969; Lerner y col., 1972; Vester y Stadie, 1957; Boveris y col., 1969).

La disminución aparente del control respiratorio estimulado por ADP a los 2 días de inyectar estreptozotocina, que aparece en la tabla V, es el resultado de la simultánea disminución de la velocidad en el estado 3 y el aumento de la velocidad en el estado 4. La aceleración de la respiración controlada, estado 4, de las mitocondrias diabéticas en relación con sus testigos es un índice de: a) mayor desacople entre el mecanismo conservador de la energía y la cadena respiratoria, o b) disipación de la energía por estimulación de la actividad ATPasa o por reacciones endergónicas mitocondriales. Si tomamos la respiración del estado 3 como indicación de la velocidad de formación de ATP, entonces puede interpretarse como un defecto o inhibición temporal de la ATP sintetasa o de la disponibilidad de ADP y Pi dependiente en este último caso de permeasas.

Se han presentado evidencias de la inhibición de la adenina nucleótido translocasa por acción de los ácidos

grasos libres o esterificados con coenzima A en las mitocondrias de ratas diabéticas (Lerner y col. 1972; Shug y col. 1971; Shertzer y Racker, 1976; Chua y Shrago, 1977). Los ácidos grasos se acumulan en el hígado en períodos de degradación excesiva de triglicéridos, por ejemplo cuando se induce el estado diabético, y pasan a la circulación aumentando la concentración intracelular en otros tejidos. En tejido cardíaco, y más evidente aún en el hepático, el decaimiento de la respiración en el estado 3 es dependiente de la concentración de palmitoil-CoA (McMillin Wood y col. 1977). La primera indicación en la literatura sobre defectos de la actividad fosforilante mitocondrial del corazón por efecto de la diabetes, que publicaron Haugaard y Haugaard en 1964, fué medida en un homogenato de tejido que naturalmente debía contener una elevada concentración de acil-CoA y hace pensar que este metabolito sea en parte responsable del efecto observado.

Para nuestras medidas con mitocondrias aisladas tratamos de eliminar ese factor a través de repetidos lavados de la fracción mitocondrial y mediante la adición de albúmina a esa solución, pero la acción inhibitoria sobre la translocasa podría manifestarse aún con concentraciones de ácidos grasos inferiores a las necesarias para desacoplar la cadena respiratoria y no puede descartarse como responsable de la depresión del consumo de oxígeno en el estado 3, que se presentó a los 2 días del tratamiento con estreptozotocina. Por otra parte, los resultados de la respiración "in vitro" no necesariamente reflejan el comportamiento "in vivo" de las mitocondrias diabéticas desde el momento en que fueron suspendidas en un medio artificial seleccionado para lograr la mayor velocidad respiratoria pero alejado de la composición del compartimiento externo mitocondrial y sometidas a tratamientos mecánicos agresivos en las

etapas del aislamiento que pueden ocasionar daños más o menos evidentes según la fragilidad de las membranas.

La situación inversa de elevado índice de control respiratorio es una evidencia de la estabilidad de la preparación y una medida de la conservación de los compuestos energizados dentro del compartimiento mitocondrial cuya acumulación tiende a inhibir la velocidad respiratoria.

A través de los trabajos ya mencionados de Lerner y col. (1972), Ilarano y col. (1972) o Matsubara y Tochino (1969) parece aclararse que un factor decisivo para que se puedan detectar deficiencias respiratoria es la severidad de la diabetes por aloxano o por pancreatectomía (Roldan y col., 1971), cuando se eleva la concentración de ácidos grasos y cuerpos cetónicos circulantes. En cuanto se restablecen los niveles normales por la acción de insulina "in vivo" recuperan las deficiencias respiratorias.

La aceleración de la respiración y fosforilación por efecto de la administración de insulina a ratas no diabéticas había sido comprobada por Schäfer y Nägel en 1968 en las mitocondrias hepáticas y se confirmó en las de miocardio con los experimentos de la tabla IV, con la salvedad del índice $P:O'$ que no se alteró en miocardio.

Lo más significativo que podemos deducir de nuestros datos experimentales y de la bibliografía citada es la diferente respuesta a la diabetes entre la respiración mitocondrial de fracciones aisladas de tejido hepático y muscular. Fisiológicamente la estabilidad de estas funciones mitocondriales es crítica y garantiza el acceso normal de ATP a un tejido con elevada demanda energética como es el músculo.

Se considera que la dinámica del ciclo de los ácidos tricarboxílicos está afectada en el organismo diabético a

tal punto que no permite la oxidación completa de los ácidos grasos hasta CO_2 y estimula la cetogénesis; de nuestros experimentos puede deducirse que la velocidad de reoxidación de las coenzimas en la cadena respiratoria del miocardio no es limitante del ciclo, no se modificó el flujo máximo de los electrones modulado por varios intermediarios y metabolitos aún en la diabetes crónica de 30 días. Debe especularse entonces con factores limitantes en otros puntos del metabolismo, por ejemplo la velocidad de reacciones anapleróticas para el flujo de intermediarios hacia el ciclo, las actividades de las enzimas que intervienen, los niveles mitocondriales de iones, factores y enzimas, disponibilidad de sustratos, factores de membrana.

Actividades enzimáticas en la mitocondria cardíaca de ratas tratadas con estreptozotocina: Según conceptos de Schäfer y Nägel (1968) "la velocidad respiratoria en condiciones óptimas está limitada por la actividad de las deshidrogenasas antes que por los niveles de citocromos". Se conocen varias enzimas cuya actividad catalítica está disminuida por efecto de la diabetes y podrían ser considerados determinantes de la depresión respiratoria, como succinato deshidrogenasa de músculo esquelético (Armstrong y Ianuzzo, 1976), adenina nucleótido translocasa y citocromo oxidasa hepática (Lerner y col., 1972) y IIBD hepática (Roldan y col. 1971; Vidal y col. 1977 a, 1977 b).

La administración de insulina a ratas no diabéticas estimuló la actividad de succinato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, glutámico deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa (NAD y NADP), glutamato-OA transaminasa (Schäfer y Nägel, 1968). Ilarano y col, (1969) contraponen a éstos, sus estudios en mitocondria hepática de ratas inyectadas con aloxano que demostraron que se mantienen inalteradas las actividades de las enzimas del ciclo del ácido cítrico.

Nuestras propias determinaciones de actividades enzimáticas en fracciones mitocondriales de corazón de ratas con estreptozotocina indicaron que la HBD sufrió un daño que afecta la velocidad de oxidación del 3-HB, en tanto la actividad NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa y citocromo oxidasa no se diferencia de la de testigos.

Actividad HBD, relación temporal: La actividad HBD cardíaca de las muestras obtenidas de ratas diabéticas disminuyó a la mitad del nivel en ratas normales. La aparición del efecto de la estreptozotocina en la primera semana de la diabetes de diferentes animales es dispar, ya que en algunas ratas se encontró aumentada y en otras disminuida la actividad específica, en cambio a los 30 días la disminución es francamente significativa.

Mayor desnivel se produjo en la mitocondria hepática donde llega a $1/3$ ó $1/5$ de su valor normal, coincidentemente con la bibliografía citada (Roldán y col. 1971; Vidal y col. 1977 a y b). Esta enzima es activa sólo en determinados tejidos a los que provee de sustrato para la respiración celular; el hígado contiene la mayor actividad específica de todo el organismo, donde ocurre la reducción del acetoacetato en su acción anabólica y el 3-HB es liberado a la circulación. El tejido hepático tiene también un importante papel en la interconversión de los cuerpos cetónicos, al punto que los animales hepatectomizados pierden la capacidad de llevar a un equilibrio la relación plasmática 3-HB/acetoacetato (McGarry y col. 1970). Del balance entre la síntesis hepática de ambos cuerpos cetónicos y su oxidación en los tejidos periféricos depende la concentración plasmática total y precisamente la disminución del 50% en la actividad de la HBD cardíaca sería uno de los determinantes del aumento patológico que se presenta en la diabetes.

En perros pancreatectomizados, según datos de Roldan y col.(1971), se incrementa casi 3 veces la concentración total de los cuerpos cetónicos y varía al mismo tiempo la relación 3-HB/acetoacetato de 1,8 a 0,7 ; estos resultados son compatibles con la menor actividad de la HBD hepática y de miocardio. En la diabetes el cuerpo cetónico liberado mayormente a la circulación y también el más utilizado es el acetoacetato, que puede aprovecharse para su oxidación completa en los tejidos eludiendo el paso parcialmente bloqueado catalizado por la HBD.

A pesar de que en la mitocondria cardíaca encontramos menor actividad HBD en ratas diabéticas, la velocidad de consumo de oxígeno de esas mitocondrias al oxidar 3-HB no estaba inhibida (ver tabla VI). Se da el caso entonces en las mitocondrias del diabético que la oferta del NADH a la cadena, modulada por la actividad de la HBD, queda reducida a la mitad de la velocidad normal, que es aún suficiente para promover el flujo máximo de electrones en la cadena asociado a esta enzima.

Actividad HBD; efecto de insulina: No alcanzó a revertir totalmente el daño enzimático producido por la estreptozotocina mediante la administración de insulina "in vivo". El miocardio responde al tratamiento de 15 días recuperando el 80% de su actividad normal HBD; este resultado podríamos tomarlo como evidencia preliminar en que tal vez no se llegó a un tratamiento adecuado para la reparación total. Un detalle llamativo de la tabla VIII es que no aumentó la actividad en las mitocondrias de ratas no diabéticas inyectadas con la hormona, si lo comparamos con el estímulo logrado por Schäfer y Nägel con 4 dosis de insulina que aumentó 10 veces la actividad basal de HBD de las mitocondrias de hígado.

El largo plazo desde la inyección de estreptozotocina o insulina requerido para que se manifieste la depresión o el estímulo posterior de la actividad, indica que no se trata de una acción primaria de la hormona sobre las mitocondrias cardíacas, sino que implica un desorden metabólico generalizado cuyas consecuencias son más difíciles de discriminar.

Detección de la actividad HBD: Esta enzima se diferencia de las clásicas deshidrogenasas dependientes del NAD por estar incluida en la estructura altamente organizada de la membrana y es difícil solubilizarla. Los estudios sobre orientación de la enzima en la membrana realizados por McIntyre y col. en 1978 evidenciaron su inserción parcial a través de la porción hidrofóbica dirigiendo los grupos funcionales hacia el medio acuoso de la matriz. Su actividad no es detectable en las mitocondrias intactas por el método corriente de la medida espectrofotométrica del NAD reducido en el curso de la reacción, debido a la barrera de permeabilidad al NAD. La entrada de 3-HB, en cambio, no está sujeta a restricción porque es independiente de transportadores y atraviesa las membranas por simple difusión (Moyle y Mitchell, 1973).

Esta disposición topológica explica las diferentes velocidades de reacción que resultan por los distintos métodos para la liberación de la actividad latente. Se llevaron a cabo simultáneamente con fracciones mitocondriales de corazón las pruebas de permeabilización y medida de la actividad HBD suponiendo que la resistencia particular a alguno de esos tratamientos podría revelar diferente fragilidad y velocidad de pasaje del NAD-NADH entre muestras diabéticas y testigos.

Los experimentos demostraron que: 1) la disminución de actividad enzimática en muestras diabéticas, del 50

al 60% en relación a sus testigos, no es un artificio de la preparación y se evidenció independientemente del procedimiento utilizado para permeabilizar las membranas. 2) la ruptura de la membrana externa de las mitocondrias expandidas en un medio hipotónico no permite la unión de la HBD con la coenzima que ocurre en la cara interna de la membrana interna, y la baja actividad detectada responde a daños leves en las crestas que permiten el lento pasaje de NAD-NADH. 3) el congelamiento y descongelamiento sucesivo de la fracción mitocondrial produce ruptura aleatoria y creciente en sus membranas; la figura VIII muestra que la velocidad de reacción en función del número de congelamientos creció paralelamente en las muestras diabéticas y sus controles (en este experimento mantuvieron una relación 1:4) y llegaron simultáneamente a su actividad máxima. Si la estructura u organización de la membrana interna estuviera alterada en las ratas inyectadas con estreptozotocina, no se manifestó en la velocidad de liberación de la actividad HBD latente. 4) la inversión de las membranas "inside-out" en las partículas submitocondriales facilita la formación del complejo enzima-NAD; si comparamos la velocidad de reacción catalizada por la preparación de partículas con las del método de choque osmótico, vemos que responde a la descripción de McIntyre y col. (1978) de la HBD con su centro activo en la cara M.

Diferencias de HBD cardíaca en ratas diabéticas: Al detectar un cambio enzimático asociado a una variación endócrina se plantea el interrogante: se produjo variación de la capacidad catalítica de la enzima, o nos encontramos ante un déficit de su contenido celular producido por modificación de la velocidad de síntesis o de degradación?

Un poco más adelante analizaremos las consecuencias de la diabetes de la rata sobre la síntesis de proteínas

en mitocondrias cardíacas, pero ese estudio no se refiere en realidad a la enzima IIBD, proteína sintetizada por los ribosomas citoplasmáticos e incorporada a la estructura de la membrana interna. No hay hasta el presente información acerca de la modulación de su síntesis por insulina, y más conflictivo aún es el conocimiento acerca de la velocidad de degradación de ésta y de todas las enzimas, tema tratado por Schimke en su revisión publicada en 1973.

Para justificar o localizar variaciones cualitativas debemos tener en cuenta, en una enzima ligada a la membrana, no sólo su estructura proteica sino incluir la porción lipídica y su entorno lipídico. Vidal y col. (1977 b; 1978 b) extrajeron apoIIBD de mitocondrias hepáticas de rata diabética y demostraron que reconstituida con lípidos mitocondriales normales aumenta la actividad enzimática que ya no se diferencia de la de ratas no diabéticas.

Las enzimas de membrana muestran sensibilidad a pequeñas variaciones de la estructura proteica o lipídica que se transmite aún a distancia a través del mosaico fluido. En el tejido cardíaco de ratas inyectadas con aloxano se determinó menor contenido de fosfolípidos totales por disminución de fosfatidiletanolamina y lisofosfatidilcolina, que es sensible al tratamiento insulínico; el contenido de fosfatidilcolina se mantiene inalterado. (Chauhan y Singh, 1978). También se conocen variaciones en la composición de ácidos grasos de los lípidos mitocondriales; Lerner y col. (1972) encontraron que mitocondrias de ratas con aloxano se enriquecen en ácido palmítico a expensas de deficiencias en ácido araquidónico y otros insaturados; este cambio de composición afecta la fluidez de la membrana y es el factor al que Vidal y col. (1978 a) consideran responsable de las modificaciones de la energía de activación de la IIBD hepática en membranas mitocondriales

o en vesículas de fosfolípidos con diferencias en sus componentes de ácidos grasos. Sin embargo, energías de activación similares para la HBD de tejido cardíaco de ratas diabéticas y control, que se dedujeron de las curvas en la figura VIII, argumentan en contra de una acción mediada por la membrana acerca de restricciones del cambio conformacional del estado activado en caso de diferente grado de saturación de las cadenas grasas.

Los estudios de Lenaz y col. (1972) de la variación de actividad de diversas enzimas de membrana con la temperatura de reacción demostraron, con una sola excepción, que sus energías de activación no son una constante y se presentan discontinuidades en los gráficos de Arrhenius a temperaturas definidas para cada enzima que se supone son dependientes de las temperaturas de separación de fase líquido-gel de sus componentes lipídicos; en el caso de HBD 18,5 °C es el límite entre 2 energías de activación: 18,2 y 10,9 kcal/mol.

Vidal y col. (1978 a) ensayaron la HBD de hígado de rata que no mostró transición entre 16 y 40 °C, rango en el que la energía de activación en partículas submitocondriales era de 11,2 kcal/mol. En un trabajo posterior (1978 c) en el que abarcaron temperaturas más bajas reconocieron un punto de inflexión a 18°C que aparece corrido, en el caso de muestras de ratas diabéticas, hacia zonas de mayor temperatura: 27°C.

Repetidos experimentos que llevamos a cabo con la enzima incluida en membranas fragmentadas de mitocondrias cardíacas mostraron gráficos de Arrhenius lineales entre 6 y 36°C y las energías de activación que calculamos para testigos y diabéticos: 9,26 y 8,7 kcal/mol respectivamente son cercanas a las que se encuentra en la bibliografía: 10,9 kcal/mol en mitocondrias congeladas de corazón de bo-

vino (Lenaz y col., 1972); 10 kcal/mol (Latruffe y Gaudemer 1974) y 11,2 kcal/mol (Vidal y col., 1978 a) en partículas submitocondriales de hígado de rata; 14,6 kcal/mol en apoenzima reconstituida con liposomas de dimiristoil lecitina (L-di C¹⁴, 1,2, dimiristoil-s n-glicero 3 fosforilcolina) en el mismo artículo que citamos de Vidal y col. y 15,2 kcal/mol en apoenzima de corazón de bovino reconstituida sobre liposomas de lecitina de soja (Menzel y Hammes, 1973). La proximidad de esta serie de datos expresa un comportamiento similar de la enzima ante cambios de la temperatura de reacción cuando la proteína enzimática está embebida en sistemas de ultraestructura diferente. La aparición de un punto de inflexión en las representaciones de Arrhenius está asociado, según Vidal y col. (1978 a), con la interacción de la apoproteína con el largo total de las cadenas de ácidos grasos, como podría estar ocurriendo en sus membranas sustituidas con dimiristoil-lecitina, y por el contrario es insensible a la transición de fase si interactúa con la región proximal de las cadenas. Basándonos en el esquema de McIntyre y col. (1978), sólo parte de la molécula anfipática de HBD se inserta en los lípidos de membrana, mientras la porción hidrofílica se mantiene con los sitios activos exteriores a la bicapa por lo que el efecto del lípido y su separación de fases debería esperarse que no afectara significativamente sus actividades; tal lo que aconteció con la muestras de HBD cardíaca. Más susceptibles deberían ser aquellas enzimas o sistemas transportadores que atraviesan totalmente la membrana (Singer, 1974). Sin embargo los resultados de Lenaz y col. que ya mencionamos son opuestos a esta suposición de Singer, ya que encontraron 2 energías de activación para las siguientes enzimas de corazón de bovino: ATPasa, HBD, succinato oxidasa, succinato cit c reductasa y fumarasa, en cambio una sola

energía para citocromo oxidasa, siendo esta enzima un complejo de gran tamaño y que atraviesa la membrana.

Gazzotti y col. (1975) demostraron que en la reactivación de apolHBD purificada de corazón de bovino con lecitinas de composición variable el largo de la cadena hidrocarbonada y el grado de insaturación no influyen mayormente en la energía de activación que es una constante cercana a la de la enzima en la membrana, y en una reciente publicación del mismo laboratorio, Isaacson y col. (1979) informan que localizaron en la región polar de los fosfolípidos la especificidad estérica y estructural necesaria para la actividad enzimática.

Cuando la enzima está pegada a la membrana se reconoce su sensibilidad al componente lipídico: el intercambio de dimiristoil-lecitina en la membrana produce cambios en velocidad de reacción y energía de activación, según Vidal y col. (1977 b, 1978 c) y la enzima de rata diabética recupera las características cinéticas de la enzima normal al aumentar la proporción de insaturación en las lecitinas de la membrana (1978 b). Esto podría indicar la existencia de factores intrínsecos de la membrana con un papel modulador de la enzima que se manifiesta cuando se modifica la relación de los fosfolípidos insaturados en la membrana pero no cuando cambia esa relación en los liposomas.

En una serie de experimentos intentamos cambiar la matriz hidrofóbica a la cual está unida la enzima cardíaca de rata sometiendo a vibración sónica juntamente vesículas submitocondriales y vesículas de lecitina de yema de huevo y en algunos ensayos se observó que la velocidad enzimática de la muestra diabética se acercaba al valor normal. Estos resultados sumamente preliminares no fueron utilizados para un dato estadístico debido a las imprecisiones de la metodología porque no se controló el tamaño de las vesículas

que tienden a formar agregados de gran tamaño o liposomas multilaminares que son fuente de error en la medida de la actividad HBD (Hexter y Goldman, 1973). Las partículas obtenidas por vibración sónica no son homogéneas y sus propiedades altamente dependientes de las condiciones precisas de la preparación. Para evitar la heterogeneidad de las partículas submitocondriales en las medidas de actividad deberían fraccionarse para analizar separadamente las diferentes poblaciones. De estos resultados tentativos surge la posibilidad de continuar con el tratamiento de la enzima separada de sus lípidos naturales, por ejemplo con los experimentos cruzados de apoenzima de rata diabética y lípidos de mitocondrias normales y viceversa, el análisis de los fosfolípidos de las mitocondrias cardíacas de ratas con estreptozotocina, etc. La posibilidad de la represión de la actividad HBD cardíaca basada en cambios en la ultraestructura de membrana por su composición lipídica es sólo una hipótesis y requiere su verificación experimental.

Tomando en cuenta la porción hidrofílica del componente proteico de la enzima que contiene grupos críticos para la catálisis, por ejemplo grupos ionizables y cisteicos, se investigó la variación de la actividad enzimática en diabetes con posibles alteraciones de los grupos funcionales. 1º) En el primer caso se determinó la velocidad inicial de reacción en función del pH en las muestras de ratas diabéticas y normales. En la titulación de los grupos funcionales se evidenció una zona paralela entre pH 7,5 y 8,5 (ver figura VII) que indica un comportamiento ácido base idéntico de las dos enzimas que debe corresponder a igual grado de disociación de los grupos polares que contribuyen a la conformación activa o que intervienen en el proceso catalítico. 2º) Se conoce la e-

xistencia de por lo menos 6 grupos cisteicos en cada cadena polipeptídica de HBD de corazón de bovino (Menzel y Hammes, 1973) algunos de ellos involucrados en la actividad catalítica. Wise y Lehninger señalaron en 1962 que la enzima en mitocondrias sonicadas se inactiva en aerobiosis con la posibilidad de recuperar la actividad incubándola con glutatión, BAL o cisteína, en combinación con NAD y el sustrato.

Los métodos utilizados por diferentes grupos de trabajo en la solubilización y fraccionamiento de esta enzima, a saber: a) a partir de corazón de bovino, por Sekuzu y col. (1963) con colato y sulfato de amonio, y b) a partir de hígado de rata, por Gotterer (1967) con sulfato de amonio y a elevado pH en presencia de NAD, separaron una apoenzima dependiente de reactivos de tiol y de lecitina. En otro caso, c) por digestión de la enzima de corazón de bovino con fosfolipasa A_2 (Fleischer y col. 1966) aislaron un producto independiente de protectores de sulfhidrilo, pero en una purificación posterior, d) Bock y Fleischer, (1974) encuentran que el ditioteitol es requisito para la estabilidad de la enzima.

Nuestras mitocondrias fragmentadas preparadas con corazones de ratas diabéticas tienen una actividad enzimática menor que las de ratas no diabéticas, independientemente de un efecto sobre los tioles del sitio catalítico; la cisteína no revirtió el déficit. La inclusión de cisteína 50 mM en la mezcla de reacción no estimuló la velocidad deshidrogenasa tanto de la muestra normal o diabética, y esto lleva a preguntarnos si en la mitocondrias de miocardio de rata no hay grupos tiol funcionales susceptibles de oxidarse, o si estos grupos se encuentran menos accesibles y por su inclusión en la membrana la enzima adopta una conformación que los protege de la inactivación aerobia;

este comportamiento puede ser la consecuencia de la unión apoproteína-fosfolípido y el papel "protector" podría estar a cargo de su misma coenzima, el NAD, que se une según Wise y Lehninger (1962) directamente a través de un tiol o "cubriendo" al grupo SH esencial para su actividad.

Latruffe y Gaudemer (1974) admiten la participación directa del grupo SH en la unión de la enzima con el NAD, y reactivos que forman uniones estables con tioles como el ethacrynato, N-etilmaleimida (NEM) o ácido ditionitrobenzoico (DTNB) se comportan como inhibidores competitivos del NAD.

La preparación enzimática para la medida de las constantes cinéticas de la enzima cardíaca estaba constituida por las membranas mitocondriales rotas acompañadas de los componentes de matriz que no se fraccionaron después del congelamiento de la fracción separada a 7700 xg, y el NAD endógeno, en su equilibrio ligado-libre, tiene la posibilidad de mantener la unión que previene a la enzima de su inactivación.

Parámetros cinéticos de la HRD cardíaca de ratas diabéticas: Las constantes de disociación del complejo binario (Enz-NAD) en muestras testigos y diabéticas son del mismo orden: 1,19 y 1,41 lo cual indica que la estabilidad del complejo que forma la coenzima con estas dos preparaciones es comparable. Como ya se comentó precedentemente que los grupos polares o SH del sitio activo tienen similar efectividad en ambas muestras, y coincidiendo con el hecho de que las constantes de disociación del NAD no varía significativamente por efecto de la estreptozotocina, podemos imaginar que los residuos de los aminoácidos que intervienen en la fijación o activación de los sustratos no han sido afectados por cambios importantes. Por otra parte demostramos que la enzima de rata diabética

requiere una concentración de NAD 2,6 veces mayor que la de rata no diabética para llegar a la mitad de su $V_{\text{Máx}}$. Esto es un indicativo claro de que existen diferencias cualitativas de HSD en las crestas, que no descarta la posibilidad de cambios cuantitativos, y parece afectar la habilidad de unirse al NAD de una manera que hasta el momento no ha sido aclarada.

La "afinidad" de la enzima por su sustrato 3-HB parece que no se modifica en la enzima de rata diabética, y las constantes de Michaelis mantienen la misma relación que las velocidades máximas de testigos y diabéticos de modo tal que se requiere una concentración de 3-HB 35% menor en los diabéticos para llegar a la mitad de su $V_{\text{Máx}}$, siendo esta $V_{\text{Máx}}$ a su vez 35% menor que la de las ratas testigos.

Se pueden mencionar series diferentes con datos para el análisis cinético de esta enzima estudiada en tejido hepático de rata o cardíaco de rata y bovino (el hígado de bovino no contiene actividad HSD significativa).

	corazón			hígado rata		
	bovino (c)	rata (b)	rata (a)	(b)	(d)	(e)
$V_{\text{Máx}}$ (mM/min/mg)	0,532	0,062	0,065	0,370	0,200	0,220
$K_{\text{M}}^{\text{NAD}}$ (mM)	0,260	0,138	0,093	0,067	0,250	0,080
$K_{\text{M}}^{3\text{-HB}}$ (mM)	0,842	1,201	0,548	0,802	0,500	0,440
$K_{\text{i}}^{\text{NAD}}$ (mM)	1,500	0,237	1,190	0,121	0,500	0,310

(a) datos propios, de la tabla XI, en mitocondrias congeladas.

(b) Tucker y Dawson (1979) en partículas submitocondriales.

(c) Nielsen y col.(1973) " " "

(d) Latruffe y Gaudemer (1974) " "

(e) Vidal y col.(1977 a) " "

Los K_{M} de la HSD hepática de las mismas ratas utilizadas en nuestro estudio de la enzima cardíaca, según Vidal

y col. son los que más se acercan a nuestros resultados, y coinciden en una constante para el NAD en la preparación de ratas diabéticas que supera a la de los testigos.

Por las condiciones diferentes de los ensayos, preparación de una muestra de enzima activa, tejido, animales y aún cepas distintas que participaron en cada estudio, no es sorprendente la diversificación en los datos citados ya que cada serie de datos corresponde estrictamente a la muestra y condiciones utilizadas en las medidas de la velocidad de reacción. La proteína activa que constituye nuestra enzima HSD cardíaca difiere de la de otros laboratorios en que a) no se rompieron las mitocondrias con ultrasonido, b) no se centrifugaron después de la ruptura, es decir, conserva los componentes originales en la mitocondria entera y conforma un medio de incubación particular que da lugar a una velocidad de reacción particular; y podemos mencionar que Nielsen y col.(1973) demostraron que la concentración de sales modifica la velocidad enzimática e incide en el valor del K_m de esta enzima de modo que es válido el análisis de nuestros resultados comparativos entre ratas tratadas con estreptozotocina y las no inyectadas, en ensayos paralelos.

La constante de Michaelis para el betahidroxibutirato es 0,548 mM y 0,360 mM normal y diabética, respectivamente, valores que superan en mucho la concentración normal de 3-HB en plasma: 0,17 mM según Harano y col.(1972), por lo tanto la velocidad de reacción crecerá junto con la concentración de sustrato que se eleva en las ratas con diabetes de acuerdo con la severidad de la cetosis (a 0,48 mM en diabetes sin cetosis si nos referimos a los mismos autores) forzando la entrada y degradación intracelular.

Después de discutir las características de la enzima en mitocondrias cardíacas y en especial en el animal diabé-

tico persiste el interrogante acerca de su papel fisiológico y su localización en la membrana interna, tan sugestiva de una interconexión con la cadena de transporte de electrones. Desde el punto de vista de su utilización los cuerpos cetónicos presentan una serie de cualidades; en todos los mamíferos sedentarios se los encuentra en la circulación en concentraciones bajas y pueden ser fácilmente transportados por la sangre y atravesar membranas celulares, su consumo provee una fuente adicional de energía que reduce la demanda de glucosa, la necesidad de la gluconeogénesis y por lo tanto de degradación proteica; como nutriente alternativo de la glucosa debería acentuarse el consumo de betahidroxibutirato en el diabético tanto como su correspondiente cetoácido pero esa expectativa parece impedida por el bloqueo parcial de la enzima interconversora.

Incorporación de aminoácidos a mitocondrias de ratas diabéticas: Nuestras experiencias con ratas tratadas con estreptozotocina lograron demostrar que existen impedimentos para el desarrollo normal de la síntesis proteica "in vitro", las mitocondrias de corazón de rata diabética incorporaron leucina- C^{14} a una velocidad 40% menor que las mitocondrias aisladas de ratas normales. Este efecto de la estreptozotocina, que no había sido medido hasta el presente en tejido cardíaco, se verificó a 7 días de inyectar la droga y es llamativo que se compensa en parte al transcurrir 4 semanas del inicio de la diabetes.

Datos de otros laboratorios indicaban que la velocidad de incorporación estaba disminuida en las mitocondrias aisladas de músculo esquelético, pero no de hígado, y tanto en ratas tratadas con aloxano (Möckel y Beattie, 1975) como con estreptozotocina (los mismos y Favelukes y col. 1973), cuando pasaron entre 5 y 10 días de inyectar el diabético.

e independientemente del estado cetósico del animal.

Favelukes y col. estimularon la incorporación de leucina a las mitocondrias de músculo esquelético de ratas diabéticas mediante la administración de insulina y nosotros conseguimos revertir totalmente el efecto de la estreptozotocina en mitocondrias de miocardio al prolongar el tratamiento insulínico durante 96 horas.

La síntesis proteica "in vitro", con mitocondrias aisladas e intactas, es dependiente de las proteínas sintetizadas en la fracción microsomal presentes en el momento del aislamiento subcelular y que se ensamblan en una relación estequiométrica con las proteínas nacientes; si se somete la rata a un desequilibrio hormonal, en nuestro caso al variar la insulinemia, el contenido de estas proteínas estará sujeto a las fluctuaciones propias del sistema citoplasmático de síntesis proteica y puede a su vez amplificar o deprimir la respuesta mitocondrial. Es ampliamente conocido que la diabetes de la rata deprime la velocidad de la traducción genética en el hígado y el músculo esquelético (Pilkis y Korner, 1971; Wool y col., 1968; Pain, 1973; Chain y Sender, 1973; Manchester y Young, 1960) y que la insulina restablece rápidamente la actividad (Manchester y Young, 1964). Se detectaron bloqueos en varios puntos del mecanismo de síntesis comenzando con la captación de aminoácidos por la célula que es dependiente de insulina (Castles y Wool, 1964) y en pasos posteriores independientes de su efecto sobre el transporte de aminoácidos, a nivel de las aminoacil-tARN sintetasa hepática (Cohen y Grinblat, 1972) y de músculo (Pain, 1973) o por disminución de la actividad de los citoribosomas de animales con aloxano (Wool y Cavichi, 1967) o pancreatectomía (Cohen y Grinblat, 1971).

En el músculo cardíaco de animales con deficiencia de

insulina, importante diferencia con músculo esquelético, no se modifica la velocidad de la marcación isotópica ni el perfil de polirribosomas en gradiente de sacarosa en los animales con 2 días de diabetes por aloxano (Rannels y col. 1970) o 7 días de diabetes con estreptozotocina (los mismos y Chain y Sender, 1973). Esta información indica que en los animales diabéticos la asociación en polirribosomas y su actividad está protegida en corazón pero no en músculo esquelético; por otra parte, la presencia de insulina en el medio de perfusión del corazón de animales no diabéticos estimuló la velocidad de incorporación de aminoácidos radiactivos a sus proteínas (Chain y Sender, 1973; Wool y Manchester, 1962).

Como la velocidad de la síntesis mitocondrial obedece a proteínas reguladoras del citoplasma (Ibrahim y col., 1973) podría adelantarse que en mitocondrias de corazón de ratas diabéticas se mantuviera inalterada tal como la velocidad de sus correspondientes actividades microsomales y que aumentara en las ratas normales tratadas con insulina. La primera suposición no se cumplió, evidenciando que la relación entre los dos sistemas no es tan directa. Debemos destacar que se había observado al sacrificar las ratas después de 7 días de estreptozotocina que sus corazones eran más pequeños que los de sus controles; el peso promedio del órgano y la velocidad de marcación mitocondrial con leucina-¹⁴C en los mismos animales disminuyeron bruscamente la primer semana y se recuperaron parcialmente a los 30 días, pero la variación de tamaño de los corazones de nuestros animales contradice la afirmación de Chain y Sender de que en sus ratas no observaron atrofia del corazón.

El estímulo que ejerce la insulina sobre la síntesis proteica citoplasmática del miocardio es generalizado, con elevados niveles en todos los productos de esa síntesis que

se detectaron en proteínas sarcoplásmicas por electroforesis en gel (Kurihara y Wool, 1968) y de las proteínas de miofibrillas (Sender y Garlick, 1973) dando a entender la inespecificidad del efecto insulínico. Aún cuando en corazón de diabéticos no se demostraron deficiencias significativas del rendimiento de la síntesis proteica ribosomal, no podemos descartar la posibilidad de alguna proteína moduladora que actúa en concentraciones mínimas cuya variación cuantitativa no haya sido detectada.

Un estudio discriminado de la síntesis proteica mitocondrial en diabetes, que proceda al fraccionamiento de sus componentes intramitocondriales, la separación de los mitorribosomas (Kalf y Faust, 1969) y componentes solubles (Greco y col., 1973) para seguir por etapas el proceso puede acercarnos al conocimiento del daño producido por la estreptozotocina y que da lugar al importante descenso de la velocidad de incorporación que quedó demostrado.

Las medidas paralelas de la actividad respiratoria y fosforilante de estas mitocondrias mostraban alta eficiencia del mecanismo conservador de energía, descartando el suministro de energía como limitante de la síntesis proteica. Por otra parte, las mitocondrias cardíacas utilizan una proporción ínfima de la energía generada en el metabolismo oxidativo con destino a la síntesis proteica, y la depresión pasajera de la respiración al segundo día de diabetes no puede considerarse responsable de la menor velocidad de incorporación a los 7 días de aplicar la droga.

En ratas con déficit de hormonas hipofisarias pudimos detectar también una tendencia a disminuir la velocidad de incorporación de leucina radiactiva. Se reconocen alteraciones muy marcadas en el balance endócrino del animal hipofisoprivo con cambios primarios y secundarios en el metabolismo de hidratos de carbono y proteínas, y las mitocondrias

son sensibles a la regulación hipofisaria. Favelukes y col. (1975) constataron que en las mitocondrias de músculo esquelético la incorporación de leucina es 37% menor que en las de animales control con operación fingida, posible de reversión por aplicación de hormonas de crecimiento y tiroxina. Desde los trabajos de Tata y col. en 1963 y 1966, o de Primack y col. (1971) el estímulo observado frente al tratamiento con hormona tiroidea sobre las mitocondrias: consumo de oxígeno y síntesis proteica simultáneamente, se presentan dos hipótesis que consideran a uno y otro causa y efecto, es decir que el estímulo hormonal sobre la síntesis de los complejos respiratorios produce aumento de la velocidad de las oxidaciones o en sentido inverso, la estimulación de la respiración está seguida de un aumento de la síntesis favorecida por el mayor nivel de ATP que se produce. En los experimentos con las ratas diabéticas de 7 días, ambos fenómenos parecen desconectados en razón de que las mitocondrias cardíacas que incorporaban aminoácido radiactivo a menor velocidad que sus testigos, respiraban y fosforilaban con la eficiencia normal.

Frente a la evidencia de la reducción de la incorporación de leucina surge la cuestión de identificar aquellas proteínas afectadas en su síntesis por la hiper o hipoin-sulinemia. Möckel y Beattie (1975) analizaron electroforéticamente los productos de la incorporación "in vitro", los cuales tienen correspondencia con las fracciones marcadas por la incorporación de aminoácidos radiactivos "in vivo" (Ibrahim y col., 1973; Coote y Work, 1971) pero no se presentaron diferencias en la distribución de radiactividad en las 5 bandas que se separan de muestras diabéticas y normales. Dentro de un número restringido de productos mitocondriales, en lo que inicialmente se llamó "proteínas

estructurales" por su profunda asociación con la estructura de membrana, se identificaron varios componentes de esa fracción compuesta por lipoproteínas que corresponden a las subunidades de mayor tamaño y con mayor contenido lipídico de los complejos enzimáticos de membrana, cuyo déficit origina membranas funcionalmente deficientes del tipo de las mutantes "petit" de levaduras, por omisión de transportadores de la cadena respiratoria (Linnane y Haslam, 1970). Se identificaron péptidos integrantes de la ATPasa, citocromo oxidasa, citocromo b y una proteína ribosomal, pero debemos aclarar que en los trabajos citados por Tzagoloff y col. (1979) en una reciente revisión, se hace referencia a levaduras, Neurospora crassa, o X.laevis, pero es limitada la información actual sobre productos sintetizados en tejidos de animales superiores o plantas, y no se excluye la posibilidad de algunas fracciones analizadas que contengan proteínas no catalíticas de más difícil caracterización y de función no demostrada.

Una porción importante, 20 a 25% de los péptidos que se sintetizan se integran al complejo de la citocromo c oxidasa o citocromo aa₃, y para determinar la cantidad y actividad de este integrante de la cadena de transporte de electrones se midió la actividad enzimática y el contenido de citocromos por su componente prostético. El citocromo aa₃ se toma habitualmente como uno de los índices del funcionamiento de la síntesis proteica mitocondrial, y en las mitocondrias cardíacas de ratas con estreptozotocina demostramos que no hay cambios cuantitativos ni funcionales por este tratamiento.

La actividad enzimática se midió en ratas a una y 4 semanas de la dosis y los resultados son consistentes con la observación simultánea de los niveles espectrales a 605 nm en las fracciones mitocondriales de corazón de ratas

diabéticas y testigos.

En las curvas de espectros diferenciales de absorción entre 500 y 630 nm se ubicaron los picos de mínima y máxima a las longitudes de onda que corresponden a los citocromos \underline{aa}_3 , \underline{b} , \underline{c}_1 y \underline{c} , y con alturas semejantes en muestras diabéticas y normales. Lerner y col. (1972) estudiaron estos espectros en mitocondrias hepáticas y cardíacas de ratas tratadas con aloxano; en las hepáticas encontraron el pico de 605 nm del citocromo \underline{aa}_3 de intensidad menor que en la preparación testigo, mientras que en mitocondrias cardíacas todos los picos son coincidentes. Boveris y col. (1969) demostraron que no hay diferencia en el nivel de los citocromos ($\underline{c}_1 + \underline{c}$) de mitocondrias hepáticas de ratas pancreatectomizadas.

Basándonos en que los transportadores de electrones, productos típicos de la síntesis intramitocondrial, se encontraron en una relación correcta y funcionalmente activos consideramos que la disminución en la incorporación de leucina a las mitocondrias aisladas de ratas con 7 días de diabetes no debe extrapolarse a la mitocondria en la célula entera o en el tejido de esos animales. Se desconoce la naturaleza del o de los péptidos cuya síntesis decrece como consecuencia de la estreptozotocina; el complejo del citocromo \underline{aa}_3 aparece cualitativa y cuantitativamente inalterado en corazón de rata así como la función respiratoria y su control por la concentración de ADP.

La falla descrita para la HFD cardíaca en la membrana interna de mitocondrias de ratas tratadas no se presentó sincrónica con la de la síntesis proteica, sino después de varias semanas; en ambos se destacó el efecto reparador de insulina que no es inmediato, y por tanto no puede considerarse como una acción directa de insulina sobre estos procesos metabólicos mitocondriales y hace pensar en una mani-

festación secundaria de previas alteraciones celulares.

El análisis de los efectos de la estreptozotocina sobre las mitocondrias cardíacas de rata provee una visión sobre determinadas funciones de estos organoides extendiendo la información disponible hasta el momento sobre las mitocondrias hepáticas al tejido cardíaco. El panorama emergente de este trabajo señala la estabilidad de las funciones vitales para el metabolismo aerobio en el caso diabético, la existencia de cambios sensibles en la enzima HSD que puede llevar a una mejor comprensión del defecto en la utilización del 3-HB, y la dificultad de realizar la síntesis de proteínas a la velocidad normal.

CAPITULO VII

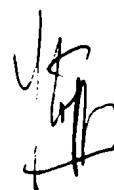
CONCLUSIONES

- 1 - El tratamiento de ratas con estreptozotocina no produce efectos significativos sobre la velocidad respiratoria de sus mitocondrias cardíacas provistas de sustrato y ADP en exceso, y un leve descenso de la velocidad respiratoria en el estado 4 al oxidar malato en presencia de glutamato y malonato. La eficiencia de la fosforilación oxidativa medida como índice ADP:O es estable cuando se oxidan diversos sustratos. No se observan cambios de tamaño y forma de estas mitocondrias y sus crestas por acción del diabetógeno.
- 2 - El malato, en presencia de glutamato y malonato, y el cetoglutarato se evidenciaron como sustratos óptimos para la respiración de mitocondrias cardíacas de rata, que inducen alta velocidad de consumo de oxígeno estimulada por adición de ADP.
- 3 - El efecto de estreptozotocina sobre la velocidad de la reacción catalizada por HBD cardíaca es la disminución del 50% de su actividad específica en mitocondrias congeladas y en partículas submitocondriales, que alcanza su mayor expresión a los 30 días de inyectar la droga.
- 4 - La depresión de la actividad deshidrogenasa no se refleja en la velocidad de consumo de oxígeno de las mitocondrias de ratas diabéticas con 3-HB, que se realiza a la misma velocidad que las normales.
- 5 - Dosis diarias de insulina permiten la recuperación parcial de la actividad HBD con 15 días de tratamiento. Iguales dosis de hormona no modifican la actividad HBD en ratas no diabéticas.

- 6 - El defecto de la enzima HBD cardíaca en membrana mitocondrial es independiente de cambios de pH o de la presencia de cisteína en el medio de reacción.
- 7 - La energía de activación de la enzima en las ratas con estreptozotocina es de valor igual al de ratas no tratadas.
- 8 - El estudio de los parámetros cinéticos de la reacción revela una importante modificación de la constante de Michaelis para la coenzima, que es 2,6 veces mayor en la muestra de rata diabética. El K_{m1} respecto al 3-HB y la constante de disociación del complejo Enz-NAD presentaron cambios de menor magnitud.
- 9 - Las flavoproteínas de las crestas mitocondriales de corazón de ratas: NADH deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa mantienen su capacidad catalítica normal en las ratas inyectadas con estreptozotocina, determinado en el primer caso por la velocidad máxima y el K_{m1} respecto a ferricianuro, y en el segundo caso por la velocidad de reacción succinato-MSF reductasa, con resultados equivalentes en ratas con diabetes de 7 y 30 días y en ratas normales.
- 10 - Los espectros diferenciales de absorción en la zona 500-630 nm de las mitocondrias de miocardio de ratas a 7 y 30 días de una inyección de estreptozotocina son indistinguibles de los correspondientes controles. Coinciden la posición de los picos y sus niveles, a las longitudes de onda reconocidos para citocromos mitocondriales. La relación aproximada de citocromos en las mitocondrias cardíacas son $a_{a_3} : b : c_1 : c = 4 : 3 : 1 : 2$ ó $4 : 2 : 1 : 2$ según los coeficientes de extinción elegidos.
- 11 - La actividad citocromo c oxidasa de miocardio es idéntica en ratas con 7 y 30 días de diabetes y en ratas

normales.

- 12 - La incorporación "in vitro" de leucina- ^{14}C a proteínas mitocondriales se realiza a menor velocidad en mitocondrias aisladas de ratas diabéticas que en las de ratas testigos. La diferencia es del 40% en ratas con diabetes de 7 días de duración, pero de menor magnitud y sin significancia estadística en las de 30 días. Paralelamente a la fluctuación del rendimiento de la síntesis proteica mitocondrial se produce disminución del peso del corazón de la rata, más evidente a 7 días de estreptozotocina, respecto a ratas no inyectadas.
- 13 - El sistema de síntesis de proteínas sensible a cloranfenicol es dependiente del suministro de energía para la formación de uniones peptídicas, y se realiza en la mitocondria de miocardio utilizando el mecanismo conservador de la energía de oxidación del malato con más eficiencia que mediante la adición de ATP con o sin sistema regenerador. La inhibición de la incorporación de leucina- ^{14}C por efecto de estreptozotocina se presenta en mitocondrias cuya respiración y fosforilación se desarrolla a la misma velocidad que en los controles.
- 14 - La insulina "in vivo" es capaz de revertir totalmente el efecto de la estreptozotocina estimulando la velocidad de la incorporación de aminoácidos proporcionalmente al número de dosis aplicadas. Las mitocondrias de ratas no diabéticas con tratamiento hormonal aumentaron igualmente la radiactividad incorporada.



CAPITULO VIII

BIBLIOGRAFIA

- Armstrong R.B., Ianuzzo C.D.; *Horm. Metab. Res.*, 8, 392 (1976)
- Arrigoni O., Singer T.P.; *Nature*, 193, 1256 (1962)
- Bancroft H.; *Introducción a la bioestadística*, Edit. EUDEBA, pág. 205 (1971)
- Barrett M.C., Mills D.J., Horton A.A.; *Biochem. J.*, 158, 635 (1976)
- Beattie D.S., Basford R.E., Koritz S.B.; *Biochemistry*, 6, 3099 (1967)
- Beyer R.E.; *Meth. in Enzymology*, X, 186 (1967)
- Bock H.G.O., Fleischer S.; *Meth. in Enzymology*, XXIII, 374 (1974)
- Bookelman H., Trubels J.M.F., Sengers R.C.A., Jansen A.J.M., Veerkamp J.H., Stadhouders A.M.; *Int. J. Biochem.* 10, 411 (1979)
- Boveris A.A., Cattaneo de Peralta Ramos M., Stoppani A.O.M., Foglia V.G.; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 132, 171 (1969)
- Bullock G., Carter E.E., White A.M.; *FEBS Lett.*, 8, 109 (1970)
- Campbell A.K., Hales C.N.; *The Cell in Medical Science*, Ed. F. Beck, J. B. Lloyd, Ac. Press, 4, pág 105 (1976)
- Castles J.J., Wool I.G.; *Biochem. J.*, 91, 11 (1964)
- Chain E.B., Sender P.M.; *Biochem. J.*, 132, 593 (1973)
- Chance B.; Hagihara B., modificado por Szarkowska L. y Klingenberg H.; *Biochem. Z.*, 338, 674 (1963)
- Chance B., Hollungen C.; *J. Biol. Chem.*, 248, 418 (1963)
- Chance B., Williams G.R.; *Nature*, 175, 1120 (1955) a
- Chance B., Williams G.R.; *J. Biol. Chem.*, 217, 395 (1955) b
- Chappell J.B., Perry S.V.; *Nature (London)*, 173, 1094 (1954)
- Chauhan U.P.S., Singh V.N.; *Life Sciences*, 22, 1771 (1978)
- Chua B.H., Shrago E.; *J. Biol. Chem.*, 252, 6711 (1977)
- Cleland W.W.; *Biochim. Biophys. Acta*, 67, 104 (1963)
- Cohen M.N.P., Grinblat L.; *FEBS Lett.*, 15, 299 (1971)
- Cohen M.N.P., Grinblat L.; *Horm. Met. Research*, 4, 249 (1972)
- Coote J.L., Work T.S.; *Eur. J. Biochem.*, 23, 564 (1971)
- Davis E.J.; *Biochim Biophys. Acta*, 162, 1 (1968)
- Devlin T.M., Sedell B.H.; *J. Biol. Chem.*, 235, 2134 (1960)

- Dow D.S.; *Biochemistry*, 6, 3350(1967)
- Favelukes S.S., Tarlovsky M.S., Stoppani A.O.M.; *Acta Physiol. Latinoam.*, 21, 30(1971)
- Favelukes S.S., Tarlovsky M.S., Bedetti C.D., Stoppani A.O.M.; en *Gene Expression and its Regulation*. Ed. F.T. Kenney, B.A. Hamkalo, G. Favelukes, J.T. August. Plenum Publishing Co. N.York. pág. 539(1973)
- Favelukes S.S., Tarlovsky M.S., Bedetti C.D., Stoppani A.O.M.; *Acta Physiol. Latinoam.*, 25, 107(1975)
- Fleischer B., Casu A., Fleischer S.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 24, 189(1966)
- Gazzoti P., Rock H.G.; Fleischer S.; *J. Biol. Chem.*, 250, 5782(1975)
- Giuditta A., Singer T.P.; *J. Biol. Chem.*, 234, 662(1959)
- Good N.E., Winget C.D., Winter W., Connolly T.N.; *Biochemistry*, 5, 467(1966)
- Gotterer G.S.; *Biochemistry*, 6, 2139(1967)
- Greco M., Cantatore P., Pepe G., Saccone C.; *Eur. J. Biochem.*, 37, 171(1973)
- Green D.E., Dewan J.G., Leloir L.F.; *Biochem. J.*, 31, 934(1937)
- Hagihara B.H., en *The Enzymes*, Ed. P.D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck, Ac. Press, N.Y., IV, 193(1960)
- Hall J.C., Sordhall A., Stefko P.L.; *J. Biol. Chem.* 235, 1536(1960)
- Handbook of Chemistry and Physics*, 38a.ed. Chemical Rubber Publishing Co., Cleveland, Ohio. pág. 1607(1956)
- Harano Y., DePalma R.G., Miller M.; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 131, 913(1969)
- Harano Y., DePalma R.G., Lavine L., Miller M.; *Diabetes*, 21, 257, (1972)
- Harris E.J., Van Dam K., Pressman B.C.; *Nature*, 213, 1126(1967)
- Haugaard E.S., Haugaard N.; *J. Biol. Chem.*, 239, 705(1964)
- Hers H.C.; *Ann. Rev. Biochem.*, 45, 167(1976)
- Hexter C.S., Goldman R.; *Biochim. Biophys. Acta*, 307, 421(1973)
- Horecker B.L., Kornberg A.; *J. Biol. Chem.*, 175, 385(1948)
- Hogeboom G.H.; *Meth. in Enzym.*, 1, 16(1955)
- Ibrahim N.G., Burke J.P., Beattie D.S., *FEBS Lett.*, 29, 73(1973)a
- Ibrahim N.G., Stuchell R.N., Beattie D.S.; *Eur. J. Biochem.*, 36, 519(1973)b

- Isaacson Y.A., Deroo P.W., Rosenthal A.F., Rittman R., McIntyre J.O., Rock H.G., Gazzotti P., Fleischer S.; *J. Biol. Chem.*, 254, 117 (1979)
- Jacobs E.E., Jacob M., Sanadi D.R., Bradley L.B.; *J. Biol. Chem.*, 223, 147 (1956)
- Junod A., Lambert A.E., Orci L., Pictet R., Conet A.E., Renold A.E.; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 126, 201 (1967)
- Jurtshuk Jr. P., Sekuzu I., Green D.E.; *J. Biol. Chem.*, 238, 3595 (1963)
- Kalf G.F., Faust A.S.; *Arch. Biochem. Biophys.*, 134, 103 (1969)
- Karl I.E., Garber A.J., Kipnis D.M.; *J. Biol. Chem.* 251, 844 (1976)
- Karunanayake E.H., Baker J.R.J., Christian R.A., Hearse D.J., Mellows G.; *Diabetologia*, 12, 123 (1976)
- Klingenberg M., Häfen H.; *Biochem. Z.*, 337, 128 (1963)
- Klingenberg M., Crebe K., Scherer B.; *Eur. J. Biochem.*, 52, 351 (1975)
- Krahl M.E.; *Ann. Rev. Physiol.*, 36, 331 (1974)
- Krebs H.A.; *Biochem. J.*, 80, 225 (1961)
- Kroon A.M.; *Biochim. Biophys. Acta*, 72, 391 (1963)
- Kroon A.M.; *Biochim. Biophys. Acta*, 91, 145 (1964)
- Kurihara K., Wool I.G.; *Nature (London)* 219, 721 (1968)
- LaNoue K.F., Malajtyc E.I., Williamson J.R.; *J. Biol. Chem.* 248, 7171 (1973)
- Latruffe N., Gaudemer Y.; *Biochimie*, 56, 435 (1974)
- Lehninger A.L., Sudduth H.C., Wise J.B.; *J. Biol. Chem.* 235, 2450 (1960)
- Lenaz G., Sechi A.M., Parenti-Castelli G., Landi L., Bertoli E.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 49, 536 (1972)
- Lerner E., Shug A.L., Elson C., Shrago E.; *J. Biol. Chem.* 247, 1513 (1972)
- Linnane A.W., Haslam J.M.; in *Current Topics in Cellular Regulation*, Ac. Press Inc., N.Y., 2, 101 (1970)
- Manchester K.L., Young F.G.; *Biochem. J.*, 70, 353 (1958)
- Manchester K.L., Young F.G.; *Biochem. J.*, 77, 386 (1960)
- Manchester K.L., Young F.G.; *Vit. & Hormones*, 19, 95 (1964)
- Margoliash E., Walasek O.F.; *Meth. in Enzymol.*, X, 339 (1967)
- Matsubara T., Tochino Y.; *J. Biochem (Tokio)* 66, 397 (1969)

- Naugh T.H., *Science*, 188, 920 (1975)
- McGarry J.D., Guest M.J., Foster D.W.; *J. Biol. Chem.* 245, 4382 (1970)
- McIntyre J.O., Bock H.G.O., Fleischer S.; *Biochim. Biophys. Acta*, 513, 255 (1978)
- McMillin Wood J., Teylor Wallick E., Schwzrtz A., Chang Ch.H. *Biochim. Biophys. Acta*, 486, 331 (1977)
- Menzel H.M., Hammes G.G.; *J. Biol. Chem.*, 248, 4885 (1973)
- Minakami S., Ringler R.L., Singer T.P.; *J. Biol. Chem.*, 237, 569 (1962)
- Möckel J.J., Beattie D.S.; *Arch. Biochim. Biophys.* 167, 301 (1975)
- Moyle J., Mitchell P.; *Biochem. J.*, 132, 571 (1973)
- Myers D.K., Slater E.C.; *Biochem. J.*, 67, 558 (1957)
- Nielsen N.C., Fleischer S.; *J. Biol. Chem.*, 248, 2549 (1973)
- Nielsen N.C., Zahler W.L., Fleischer S.; *J. Biol. Chem.*, 248, 2556 (1973)
- Nikkilä A.E., Hyvärinen A.; *Clin. Chim. Acta*, 7, 140 (1962)
- Packer L., Williams M.A., Criddle R.S.; *Biochim. Biophys. Acta*, 292, 92 (1973)
- Pain V.M.; *Biochim. Biophys. Acta*, 308, 180 (1973)
- Pande S.V., Blanchaer M.C.; *J. Biol. Chem.*, 246, 402 (1971)
- Parks Jr. R.E., Adler J., Copenhaver Jr. J.H.; *J. Biol. Chem.*, 214, 693 (1955)
- Parsons D.F., Williams G.R.; *Meth. in Enzymol.*, X, 443, (1967)
- Paul K.G.; *Arch. Biochem.*, 12, 441 (1947)
- Pilkis S.J., Korner A.; *Biochim. Biophys. Acta*, 247, 597 (1971)
- Primack M.P., Tapley D.F., Buchanan J.; *Biochim. Biophys. Acta*, 244, 349 (1971)
- Rakieten M., Gordon B.S., Beat A., Cooney D.A., Schein P.S.; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 151, 356 (1976)
- Rannels D.E., Jefferson L.S., Iljalmarsoon A.C., Wolpert E.B., Morgan H.E.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 40, 1110 (1970)
- Roldan A.G., del Castillo E.J., Boveris A., Caraza Pereira A. M., Stoppani A.O.M.; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 137, 791 (1971)
- Roodyn D.B., Reis P.J., Work T.S.; *Biochem. J.*, 80, 9 (1961)
- Schäfer G., Nägel L.; *Biochim. Biophys. Acta*, 162, 617 (1968)
- Schimke R.T.; *Advan. Enzymology*, 37, 135 (1973)

- Sekuzu I., Jurtshuk Jr. P., Green D.E.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 6, 71 (1961)
- Sekuzu I., Jurtshuk Jr. P., Green D.E.; *J. Biol. Chem.* 238, 975 (1963)
- Sender P.M., Carlick P.J.; *Biochem. J.* 132, 603 (1973)
- Schertzer H.G., Racker E.; *J. Biol. Chem.*, 251, 2446 (1976)
- Shug A.L., Lerner E., Elson Ch., Shrago E.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 43, 557 (1971)
- Singer S.J.; *Ann. Rev. Biochem.*, 43, 805 (1974)
- Smith L.; *Arch. Biochem. Biophys.*, 50, 285 (1954)
- Smith L., Conrad H.; *Arch. Biochem. Biophys.*, 63, 403 (1956)
- Tata J.R., Ernster L., Lindberg O., Arrhenius E., Pedersen S., Hedman R.; *Biochem. J.*, 86, 408 (1963)
- Tata J.R., Widnell C.C.; *Biochem. J.*, 98, 604 (1966)
- Tucker G.A., Dawson A.P.; *Biochem. J.*, 179, 579 (1979)
- Tyler D.D., Gonze J.; *Methods in Enzymol.*, X, 75 (1967)
- Tzagoloff A., Macino G., Sebald W.; *Ann. Rev. Biochem.*, 48, 419 (1979)
- VanGelder B.F., Slater E.C.; *Biochim. Biophys. Acta*, 58, 593 (1962)
- VanGelder B.F., Slater E.C.; *Biochim. Biophys. Acta*, 73, 663 (1963)
- Vanneste W.H.; *Biochim. Biophys. Acta*, 113, 175 (1966)
- Vester J.W., Stadie W.C.; *J. Biol. Chem.* 227, 669 (1957)
- Vidal J.C., Guglielmucci E.A., Stoppani A.O.M.; in *Advances in Exp. Med. & Biol.*, Edit. N.G. Bazan, R.R. Drenner, N.M. Giusto, Plenum Press, N.Y., 83, 203 (1977)a
- Vidal J.C., Guglielmucci A.E., Stoppani A.O.M.; *Federation Proc.* 36, 721 (1977)b
- Vidal J.C., Guglielmucci A.E., Stoppani A.O.M.; *Arch. Biochem. Biophys.*, 187, 138 (1978)a
- Vidal J.C., McIntyre J.O., Fleisher S.; *Federation Proc.*, 37, 1568 (1978)b
- Vidal J.C., McIntyre J.O., Fleischer S.; *Biophys. J.*, 21, 193 a, (1978)c
- Wheeldon L.W., Lehninger A.L.; *Biochemistry*, 5, 3533 (1966)
- Williams J.N. Jr.; *Arch. Biochem. Biophys.*, 107, 537 (1964)
- Williamson D.H., Mellanby J., Krebs H.A.; *Biochem. J.*, 82, 90 (1962)
- Williamson J.R.; *Ann. Rev. Physiol.*, 41, 485 (1979)
- Wise J.B., Lehninger A.L.; *J. Biol. Chem.*, 237, 1363 (1962)

- Wool I.C., Cavicchi P.; *Biochemistry*, 6, 1231 (1967)
- Wool I.C., Krahl M.E.; *Ann. J. Physiol.*, 196, 961 (1959)
- Wool I.C., Manchester K.L.; *Nature (London)*, 193, 345 (1962)
- Wool I.C., Stirewalt W.S., Kurihara K., Low R.B., Boyley P., Oyer O.; *Recent Progr. Hormone Res.*, 24, 139 (1968)
- Zaugg W.S., Rieske J.S.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 9, 213, (1962)

RESUMEN

Se estudiaron las consecuencias de la inducción de la diabetes a la rata con dosis de estreptozotocina de 65 mg/Kg sobre determinadas actividades metabólicas de las mitocondrias cardíacas.

Estas ratas presentaron glucemia elevada, superior a 300 mg% si se sacrificaron después de 7 días, y más de 400 mg% después de 30 días de la inyección del diabetógeno.

Partiendo de metodologías aplicadas a otros tejidos o animales se experimentaron varios métodos para aislar con alto rendimiento mitocondrias intactas de miocardio para que, incubadas en un medio adecuado, llevaran a cabo la oxidación de un sustrato con control de la respiración acoplado a la fosforilación oxidativa. Las fracciones mitocondriales obtenidas al tratar el músculo cardíaco con proteína nagarse eran representativas de ese tejido, con formas y tamaño que no evidenciaron por su observación ultramicroscópica el efecto de la estreptozotocina.

Metabolitos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos: malato (en presencia de glutamato y malonato), α cetoglutarato, succinato (en presencia de glutamato) eran los sustratos que inducían alta velocidad de consumo de oxígeno y sensibilidad a estimulación de esa velocidad con ADP o desacoplantes, mayor que en caso de los sustratos piruvato y betahidroxibutirato.

Se describieron experimentos que reflejan la estabilidad de la función respiratoria en las ratas que recibieron estreptozotocina y su relación temporal, midiendo la velocidad de utilización del oxígeno, el índice de control respiratorio y la relación ADP:O. La velocidad de consumo de oxígeno en el estado 4 durante la oxidación de malato (+gluta-

mate y malonato) aparece levemente disminuida en mitocondrias cardíacas de ratas con 30 días de diabetes, sin cambios en la velocidad en el estado respiratorio 3 ó en la relación P:O, en medidas polarográficas a tiempos cortos de 2, 4 y 7 días de diabetes, y a los 30 días de inducir la enfermedad.

La velocidad de consumo de oxígeno con el sustrato 3-HB no era sensible a estreptozotocina como podría esperarse dado que paralelamente se demostró que la actividad específica HBD en la membrana era 50% menor que en ratas no tratadas. La velocidad de la reacción catalizada por la HBD cardíaca se siguió espectrofotométricamente a 340 nm por la reducción de su coenzima NAD. El déficit enzimático se presentó en mitocondrias cardíacas con distintos tratamientos de permeabilización al NAD-NADH y en partículas submitocondriales y se comparó con el de la enzima hepática, ya reconocido por otros laboratorios. Se intentó la reversión con insulina "in vivo" llegando a recuperar el 80% de la actividad normal para lo cual requirió un tratamiento de 15 días. Se estudió el efecto de cambios de pH, temperatura y presencia de protectores de tior sobre la velocidad de reacción para determinar cambios cualitativos de la enzima cardíaca de ratas con estreptozotocina, estableciéndose que los grupos ionizables involucrados en la actividad HBD tienen igual grado de ionización en el caso diabético y normal, y grupos que intervienen en la catálisis no son sensibles a la presencia de cisteína; se mantuvo la diferencia de actividad en los rangos ensayados de pH 6 a 9,5 y de temperaturas 6 a 36°C; la energía de activación aparente que se calculó no difería en ambas muestras de mitocondrias. El estudio de las propiedades cinéticas reveló que el K_M respecto al NAD experimenta un salto en el caso diabético y es 2,6 veces mayor que en los testigos, hay menores diferencias en el K_M respecto al 3-HB y en la constante de disociación (Enz-NAD) y estos son índices cate-

góricos de cierta modificación en la enzima cardíaca de ratas diabéticas. No alcanzaron a definirse fallas en el componente de membrana salvo indicios en experimentos aislados que justifican un estudio más exhaustivo.

Se demostró que la estreptozotocina, a los 7 o 30 días de inyectada, no tiene acción sobre la actividad de las siguientes enzimas de membrana interna: a) succinato deshidrogenasa, b) NADH deshidrogenasa, c) citocromo oxidasa.

a) Se midió la actividad en mitocondrias fragmentadas considerándola proporcional a la velocidad succinato-MSF reductasa; resultaron iguales actividades específicas en mitocondrias de diabéticos y testigos. b) para la medida de NADH deshidrogenasa se utilizó $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$ como aceptor externo de electrones; la $V_{\text{Máx}}$ y el K_M respecto al ferricianuro son iguales en ambas muestras. c) la actividad citocromo oxidasa fué medida siguiendo espectrofotométricamente la oxidación aerobia de citocromo c reducido exógeno y se obtuvieron valores iguales de actividad específica en diabéticos y testigos.

En el caso de esta última enzima, citocromo c oxidasa, fué estudiada en su aspecto funcional y también cuantitativo, a través del espectro de absorción diferencial de su grupo prostético en estado oxidado y reducido. Se registraron los espectros diferenciales en la zona de 500 a 630 nm de fracciones mitocondriales de corazón de rata a 7 y 30 días de la estreptozotocina y de rata sin inyectar; las curvas eran similares en todos estos casos, coincidieron la ubicación y altura de los picos de la banda α de contribución simultánea de los citocromos aa₃, b, c₁ y c.

Se puso a punto el método para la incorporación "in vitro" de leucina marcada a mitocondrias de músculo cardíaco, medida por la radiactividad en proteínas precipitadas en TCA 5% y resistente al calentamiento a 85°C, adaptando técnicas semejantes para mitocondrias enteras de hígado y de

músculo esquelético. Se incubaron mitocondrias cardíacas de reciente aislamiento con un medio isotónico que aportaba la mezcla de aminoácidos, iones K^+ , Mg^{++} y fosfato, y se fijaron las condiciones óptimas para la síntesis proteica en estas mitocondrias, cuya velocidad se comparó luego con la de ratas diabéticas. La radiactividad medida en las proteínas extraídas con TCA correspondió exclusivamente al sistema mitocondrial de formación de uniones peptídicas, como se demostró por la cinética de incorporación y la sensibilidad diferenciada a los inhibidores cicloheximida y cloranfenicol. Se demostró la dependencia del proceso biosintético con el mecanismo mitocondrial de conservación de energía; el malato (en unión con glutamato) fué el sustrato, entre todos los ensayos, que indujo la mayor velocidad de incorporación.

En ratas con 7 días de diabetes se observó que decae la radiactividad incorporada, y recupera parcialmente en las ratas con 30 días de diabetes, momento en que la diferencia con los controles no alcanza significancia estadística; se destacó una relación entre velocidad de la incorporación mitocondrial de aminoácidos y el peso de los corazones de ratas testigos y con 7 y 30 días de diabetes.

Se concluyó que la aplicación de estreptozotocina a la rata dió lugar a un cambio en la mitocondria cardíaca que no afecta la actividad vital de respiración y fosforilación, e involucra a una enzima de la membrana que interviene en el metabolismo de los cuerpos cetónicos, la HBD, y al proceso biosintético de proteínas mitocondriales, cuyos productos no fueron identificados.