

MITOCONDRIA

Objetivos:

- Identificación de una fracción subcelular enriquecida en mitocondrias mediante la detección de actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH).
- Estudio de la ultraestructura de la mitocondria.

Introducción:

La mitocondria es el lugar donde ocurre la mayor parte de las reacciones del metabolismo oxidativo en las células eucariotas. Esto es, es el sitio en el cual se realiza la mayor parte de la degradación oxidativa de compuestos como carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos, que terminan dando lugar a la generación de energía en forma de síntesis de ATP. La mitocondria es un organelo de morfología y tamaño variables, pero que típicamente tiene una forma elipsoide, de aproximadamente 0,5 μm de diámetro y 1 μm de largo. Las mitocondrias están delimitadas por dos membranas, una membrana externa lisa y una membrana interna extensamente invaginada. El espacio entre ambas membranas se conoce como espacio intermembrana, y las invaginaciones de la membrana interna, que amplían enormemente su área, se denominan crestas (Figura 1). El compartimento interno de la mitocondria es la matriz mitocondrial. Mientras que la membrana externa permite la difusión libre de moléculas de hasta 10 kDa, la membrana interna sólo deja pasar libremente O_2 , CO_2 y H_2O , y posee varios transportadores que controlan el pasaje de diversos metabolitos.

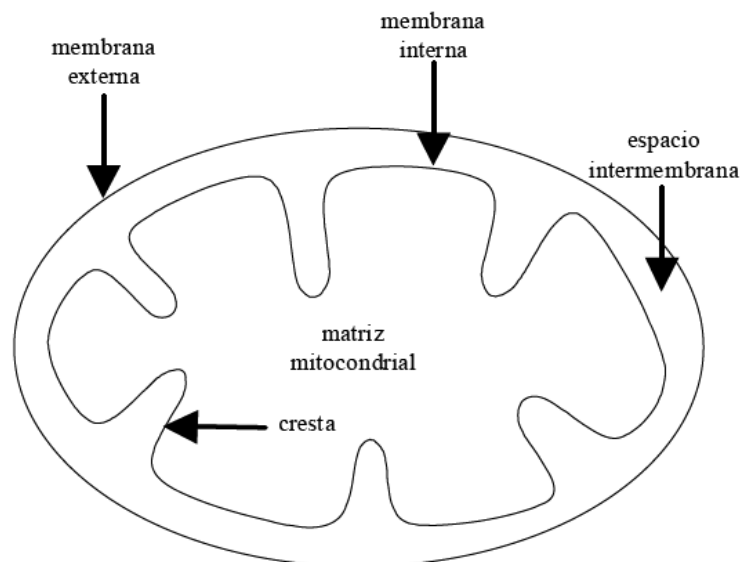


Figura 1: Representación de una mitocondria.

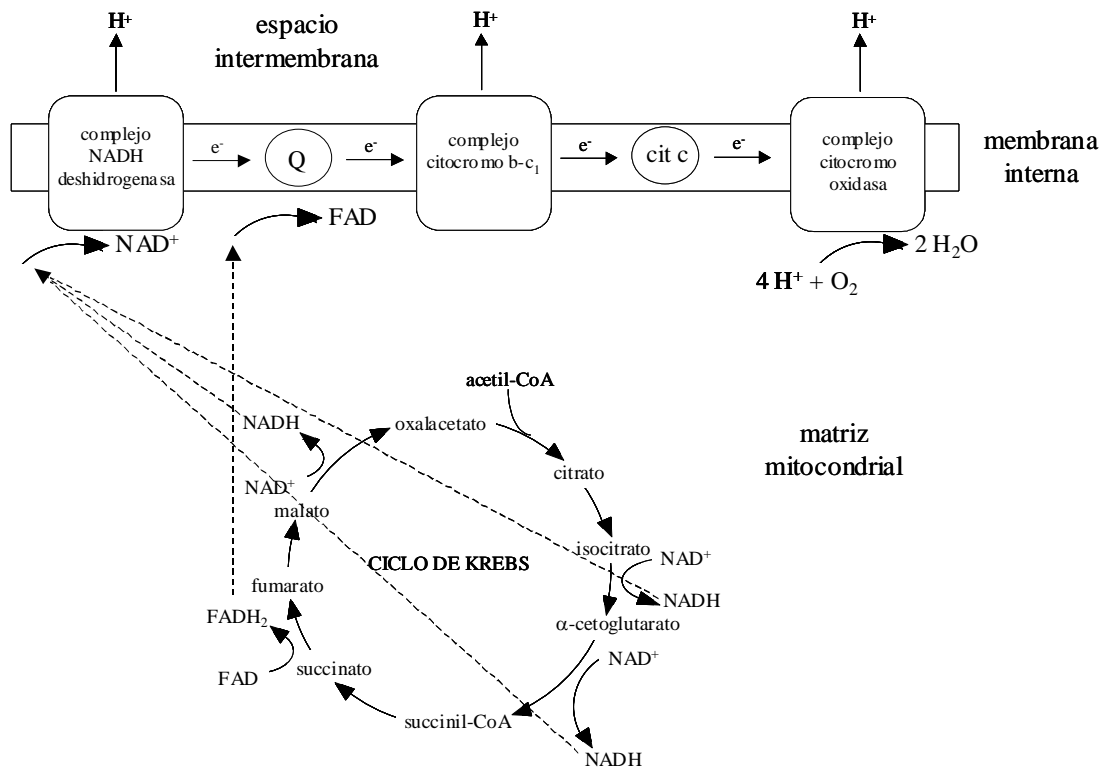


Figura 2: Resumen de las reacciones del ciclo de Krebs y de la cadena respiratoria que tienen lugar en la mitocondria.

En la figura anterior se esquematizan dos de los principales procesos metabólicos que ocurren en la mitocondria, y que nos van a permitir identificarla: el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria.

El resultado neto del ciclo de Krebs es la oxidación de un grupo acetilo ($\text{CH}_3\text{-C=O}$) perteneciente a la acetil-CoA a dos moléculas de CO_2 , y en paralelo la reducción de tres NAD^+ y un FAD para dar 3 NADH y un FADH_2 , respectivamente. Todas las enzimas que catalizan las reacciones del ciclo de Krebs se hallan en la matriz mitocondrial, excepto la succinato deshidrogenasa, cuya actividad mediremos, que está inserta en la membrana mitocondrial interna.

En la cadena respiratoria, los electrones de alta energía del NADH y el FADH_2 pasan por sucesivos complejos aceptores de potencial redox creciente, con lo que esta energía se va liberando. En cada complejo se bombean protones hacia el espacio intermembrana, con lo que se establece una diferencia de concentración de H^+ (y de carga) a través de la membrana mitocondrial interna. La energía liberada por el transporte de electrones queda almacenada en forma de un gradiente electroquímico.

Los tres complejos, así como los dos transportadores, que constituyen la cadena respiratoria, están insertos en la membrana mitocondrial interna. Los electrones provenientes del NADH pasan al complejo NADH deshidrogenasa, y de allí pasan a la coenzima Q, una pequeña molécula hidrofóbica, que los transporta al complejo citocromo b-c₁. Los citocromos son proteínas que contienen grupos hemo, en los que un átomo de hierro alterna entre los estados de oxidación Fe (II) y Fe (III) . Existen varios tipos de citocromos, que pueden hallarse formando parte de complejos, o bien aislados, como el citocromo c, que transporta electrones del complejo citocromo b-c₁ al complejo citocromo oxidasa. En este complejo, los electrones llegan a su aceptor final, el O_2 , para formar H_2O .

La oxidación del FADH₂ es menos favorable que la del NADH, y sus electrones entran en la cadena respiratoria más adelante, siendo cedidos a la coenzima Q. El FADH₂ está unido covalentemente a la succinato deshidrogenasa, que está inserta en la membrana mitocondrial interna, como mencionamos más atrás.

La succinato deshidrogenasa es una enzima que sólo se encuentra en mitocondrias, y por lo tanto la medición de su actividad puede usarse para detectar la presencia de mitocondrias en una fracción subcelular. Esto se puede realizar utilizando un aceptor artificial de electrones que tenga mayor afinidad por los electrones que el FAD. En el práctico utilizaremos 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP). Este compuesto cambia el color según su estado de oxidación: es azul cuando se encuentra en estado oxidado e incoloro cuando está reducido.

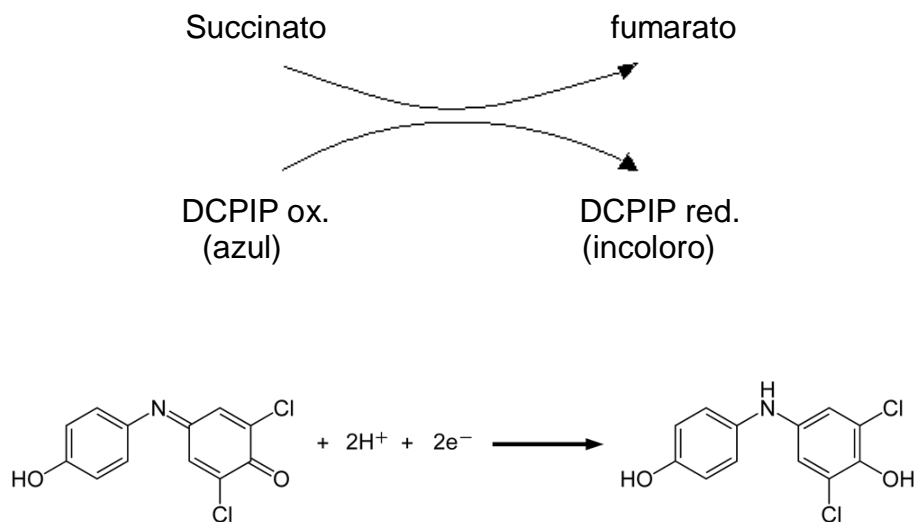


Figura 3: Esquema de las reacciones durante la reducción del aceptor artificial de electrones.

Protocolo de fraccionamiento subcelular para la obtención de mitocondrias (no será realizado en clase):

1. Homogeneización (en frío) de hígado de rata en un homogeneizador Potter-Elvehjem, en buffer Tris-HCl (15 mM) pH 7,4, sacarosa 0,33 M y EDTA 0,025 mM, a 1000 rpm, con 5 incursiones del émbolo.
2. Filtración en gasa del homogeneizado.
3. Centrifugación del filtrado a 800g durante 10 min a 4°C.
4. Se descarta el pellet y se centrifuga el sobrenadante por 10 min a 8200g a 4°C.
5. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en buffer de homogeneización. Se centrifuga igual que en paso 4).
6. El pellet resultante se resuspende en aproximadamente 0,5 ml de buffer de homogeneización y se guarda a -20° C hasta el momento de usarlo.