



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

# Biblioteca Digital FCEN-UBA

## Actividad de oxidasa alternativa y respiración mitocondrial en plantas superiores

Beconi, Martha Teresa

1981

Tesis Doctoral

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Universidad de Buenos Aires

[www.digital.bl.fcen.uba.ar](http://www.digital.bl.fcen.uba.ar)

Contacto: [digital@bl.fcen.uba.ar](mailto:digital@bl.fcen.uba.ar)

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Fuente / source:

Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

ACTIVIDAD DE OXIDASA ALTERNATIVA Y  
RESPIRACION MITOCONDRIAL EN PLANTAS SUPERIORES  
(Tesis)

Autor: Martha Teresa Beconi  
Director de Tesis: Dr. Alberto Boveris  
Consejero de estudios: Dr. Juan M. Castagnino

Lugar de Trabajo: Instituto de Química Biológica, Facultad de Medicina  
Universidad de Buenos Aires

- 1981 -

1674  
Ej=2

Por cada cosa hay una estación  
y un tiempo para cada propósito bajo los cielos  
un tiempo para nacer y un tiempo para morir  
un tiempo para llorar y un tiempo para reir  
.....  
Un tiempo para guardar silencio y un tiempo  
para hablar  
un tiempo para sembrar y un tiempo para cosechar

A Julio

A mis padres

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Alberto Boveris por haberme brindado su brillante capacidad y sus amplios conocimientos científicos en la dirección de mi trabajo de Tesis. Quiero agradecerle además su incondicional apoyo que junto a sus oportunos consejos fueron aportes invalorable a mi evolución profesional.

Al Ing. Agr. Rodolfo A. Sánchez agradezco la colaboración con sus conocimientos en el campo de la Fisiología Vegetal y el gran aporte intelectual brindado durante mi trabajo.

Agradezco al Prof. Dr. Andrés O. M. Stoppani por haberme permitido realizar el trabajo de Tesis en el Instituto de su dirección ofreciéndome los laboratorios y los aparatos que allí se encuentran con total generosidad.

Al Dr. Juan M. Castagnino le agradezco por sus consejos en la elección de los cursos reslizados afines con el trabajo de Tesis.

Al Ing. Agr. Ichiro Mizuno le quiero agradecer el apoyo ofrecido para realizar el trabajo experimental correspondiente a esta Tesis en el Instituto de Química Biológica de la Facultad de Medicina y poder cursar las materias correspondientes para la obtención del grado.

Agradezco a la Lic. Adela A. Fraschina el haber compartido con su apoyo moral e intelectual mi trabajo durante estos años.

Le ofrezco mi agradecimiento a la Sra. María I. C. Dickhuth de Rodríguez por su eficiente colaboración técnica y amabilidad en la realización de las tareas.

Les quiero agradecer a Simón Bravo, Teresa Natrone y Zelmira G. de Jacquet la colaboración técnica brindada en los trabajos realizados con embriones de semillas de soja y raíces de maíz.

Deseo agradecer a todo el personal docente y no docente de la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Agronomía su apoyo moral para poder concretar mi trabajo.

Por último quiero expresar mi agradecimiento al personal docente y no docente del Instituto de Química Biológica de la Facultad de Medicina el apoyo incondicional brindado durante mis tareas.

El trabajo experimental se desarrolló en los laboratorios del Instituto de Química Biológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires durante mi desempeño como Jefe de Trabajos Prácticos con dedicación exclusiva en la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.

Los experimentos realizados en esta tesis han sido publicados o presentados según se detalla:

- "Antimycin cyanide-resistant respiration and superoxide anion production in fresh and aged tuber mitochondria".  
A. Boveris, R.A. Sánchez y M.T. Beconi. FEBS Lett. 92, 333-338 (1978)
- "The alternative oxidase of plant mitochondria".  
R.A. Sánchez, M.T. Beconi y A. Boveris. Rev. Lat-am. Microsc. Elect. Biol. Cel. 6, 135-142 (1979)
- "Respiración insensible a la antimicina y al cianuro y producción de anión superóxido en tejidos de reserva de Solanum tuberosum".  
A. Boveris, R.A. Sánchez y M.T. Beconi. XIII Reunión de la Soc. Arg. de Inv. Bioq., La Falda, Córdoba, 2-4 de noviembre de 1977.
- "Producción de anión superóxido y actividad de la oxidasa alternativa en mitocondrias de papas".  
R.A. Sánchez, A. Boveris y M.T. Beconi. VII Reunión y II Simposio Latinoamericano de Fisiología Vegetal. Mart del Plata, Buenos Aires, 4-7 de diciembre de 1978.
- "La oxidasa alternativa de las mitocondrias vegetales y su relación con la germinación".  
M.T. Beconi, R.A. Sánchez y A. Boveris. XV Reunión de la Soc. Arg. de Inv. Bioq., Bermejo, Mendoza, 21-24 de octubre de 1979.
- "La oxidasa alternativa de las mitocondrias vegetales y su relación con la germinación".  
M.T. Beconi, R.A. Sánchez y A. Boveris. VIII Reunión de la Sociedad Argentina de Biofísica, Tigre, Buenos Aires, 5-6 de diciembre de 1979.

INDICE

CAPITULO 1. INTRODUCCION . . . . .	1
1.1 Mitocondrias y respiración celular . . . . .	2
1.2 Fosforilación oxidativa . . . . .	5
1.3 Sitios de conservación de la energía (o sitios de fosforilación . . . . .	6
1.4 Rendimiento energético . . . . .	7
1.5 Control de la respiración por el ADP (control respiratorio) . . . . .	7
1.6 Inhibidores de la transferencia de electrones . . . . .	11
1.7 Características de la cadena respiratoria mitocondrial de plantas superiores . . . . .	12
1.8 Sitios de fosforilación . . . . .	18
1.9 Camino alternativo en mitocondrias de plantas superiores . . . . .	19
1.10 Actividad de la oxidasa alternativa in vivo . . . . .	24
1.11 Significado fisiológico de la cadena alternativa . . . . .	26
1.12 Estudios realizados para el trabajo de Tesis . . . . .	29
CAPITULO 2. MATERIALES Y METODOS . . . . .	31
2.1 Aislamiento de mitocondrias de tubérculos de papa. . . . .	32
2.2 Aislamiento de mitocondrias de plántulas de soja . . . . .	33
2.3 Aislamiento de mitocondrias de embriones de soja . . . . .	35
2.4 Aislamiento de mitocondrias de raíces de maíz. . . . .	36
2.5 Medida de la respiración mitocondrial . . . . .	37
2.5.1 Determinación de la velocidad respiratoria, control respiratorio y P:O en mitocondrias aisladas . . . . .	39
2.6 Determinación de la generación de anión superóxido. . . . .	41
2.7 Determinación de la actividad de superóxido dismutasa . . . . .	41
2.8 Determinación de la actividad de la citocromo oxidasa . . . . .	42
2.9 Determinación espectrofotométrica de proteínas . . . . .	43
2.10 Envejecimiento de los tubérculos de papa . . . . .	43
2.11 Medida de la respiración de embriones de soja . . . . .	44
2.12 TRATAMIENTOS . . . . .	44
2.12.1 Incubación de los discos de papa . . . . .	44
2.12.2 Germinación de semillas de soja . . . . .	44
2.12.3 Incubación de embriones de soja . . . . .	44
2.12.4 Germinación de semillas de maíz . . . . .	44
2.13 Reactivos . . . . .	45
RESULTADOS . . . . .	46

CAPITULO 3. Actividad de oxidasa alternativa y respiración en mitocondrias aisladas de tubérculos de papa . . . . .	47
3.1 Actividad respiratoria mitocondrial. Características generales . . . . .	48
3.2 Estudio de la actividad mitocondrial en mitocondrias aisladas de tubérculos de papa frescos utilizando diferentes sustratos . . . . .	49
3.3 Estudio de la actividad mitocondrial en mitocondrias aisladas de tubérculos de papa frescos y envejecidos . . . . .	53
3.4 Respiración resistente al cianuro y a la antimicina en mitocondrias de tubérculos de papa frescos y envejecidos . . . . .	55
3.5 Actividad de la oxidasa alternativa en mitocondrias de plantas superiores . . . . .	60
3.6 Producción de anión superóxido y actividad de superóxido dismutasa en mitocondrias de tubérculos de papa frescos y envejecidos . . . . .	64
CAPITULO 4. Respiración y actividad de oxidasa alternativa en mitocondrias aisladas en embriones y en plántulas de soja. . . . .	69
4.1 Estudio de la variación del consumo de oxígeno y del peso fresco en embriones de semillas de soja en función del tiempo de incubación . . . . .	70
4.2 Estudio de la sensibilidad al cianuro en embriones de semillas de soja en distintos tiempos de incubación. . . . .	71
4.3 Estudio de la eficiencia mitocondrial en plántulas de semillas de soja. . . . .	72
4.4 Estudio de la actividad mitocondrial y efecto del citocromo <u>c</u> en mitocondrias aisladas de embriones de semillas de soja en distintos tiempos de incubación . . . . .	75
4.5 Efecto de inhibidores en mitocondrias aisladas de embriones de semillas de soja en distintos tiempos de incubación . . . . .	80
4.6 Actividad de citocromo oxidasa en mitocondrias de embriones de semillas de soja en distintos tiempos de incubación . . . . .	80
4.7 Masa mitocondrial y respiración de ejes embrionarios de semillas de soja en distintos estadíos de incubación . . . . .	81
CAPITULO 5. Actividad de oxidasa alternativa y respiración en mitocondrias aisladas de raíces de maíz. . . . .	87
5.1 Respiración mitocondrial y sensibilidad a inhibidores en raíces de maíz. . . . .	88
5.2 Sensibilidad al cianuro en mitocondrias aisladas de semillas de maíz. . . . .	88
5.3 Sensibilidad a la antimicina y al SHAM en mitocondrias aisladas de raíces de maíz . . . . .	89

CAPITULO 6. DISCUSION . . . . .	95
6.1 La oxidasa alternativa . . . . .	96
6.2 La actividad de oxidasa alternativa en mitocondrias de tubérculos de papa frescos y envejecidos . . . . .	.103
6.3 La actividad de oxidasa alternativa en mitocondrias de embriones y ejes embrionarios de soja . . . . .	107
6.4 La actividad de oxidasa alternativa en mitocondrias de raíces de maíz . . . . .	.114
CAPITULO 7. CONCLUSIONES . . . . .	.118
CAPITULO 8. REFERENCIAS . . . . .	123
CAPITULO 9. RESUMEN . . . . .	.134

# 1. INTRODUCCION

### 1.1 Mitocondrias y respiración celular

Las mitocondrias son las organelas donde se lleva a cabo la respiración celular y donde se cataliza la fosforilación oxidativa en los tejidos aeróbicos. En los diferentes tipos de células las mitocondrias varían en tamaño, número y forma. Las mitocondrias están constituidas por una doble membrana que envuelve a la matriz mitocondrial. La membrana externa está en contacto con el citoplasma y constituye un saco cerrado que contiene a la membrana interna, caracterizada por unas invaginaciones denominadas crestas, las que penetran en la matriz mitocondrial. Entre la membrana interna y la membrana externa queda definido un espacio que se continúa dentro de las crestas y que se denomina espacio intermembranas o espacio intercrestal.

La superficie interior de la membrana interna se halla recubierta por unas partículas esféricas de alrededor de 9 nm de diámetro, unidas por un pedúnculo a la membrana. Estas partículas denominadas partículas elementales o esferas de la membrana interna han sido clasificadas con la enzima  $F_1$ -ATPasa responsable de la síntesis de ATP.

La membrana externa contiene enzimas características como la monoaminoxidasa, las tioquinasas de los ácidos grasos y una NADH-citocromo c reductasa insensible a la rotenona. La membrana interna es desde el punto de vista funcional la más importante, pues contiene los componentes de la cadena respiratoria y las proteínas necesarias para la síntesis de ATP. Otras proteínas, como la 3-hidroxi-butirato deshidrogenasa y las permeasas transportadoras de aniones y nucleótidos también se hallan integradas en la membrana mitocondrial interna. El espacio intermembranas contiene

entre otras enzimas, la adenilato quinasa. La matriz mitocondrial contiene en una alta concentración proteica a las enzimas solubles del ciclo tricarboxílico, la glutamato deshidrogenasa, las enzimas de oxidación de ácidos grasos, etc. (Lehninger, 1966; Mahler y Cor-des, 1971; Lehninger, 1975; Stoppani y Boveris, 1981).

#### Constitución de la cadena respiratoria

La cadena respiratoria está formada por una serie de transportadores de electrones, capaces de experimentar cambios reversibles en su estado redox. Los transportadores de electrones (Fig.1) pueden ser moléculas orgánicas relativamente simples, como la ubiquinona; nucleótidos como el NADH, ó estructuras proteicas, como las flavoproteínas, las hierro-sulfoproteínas y los citocromos. La estructura en membrana permite fijar firmemente a los componentes de la cadena respiratoria en un ordenamiento secuenciado que facilita la transferencia de electrones entre ellos, lo que determina una alta eficiencia del sistema. Cada componente está situado respecto a sus vecinos de manera tal que el transporte de electrones se realiza con la mayor especificidad evitándose reacciones laterales.

Por fraccionamiento salino de la membrana mitocondrial interna, en presencia de sales biliares, es posible aislar complejos constituidos por varias proteínas. La composición de esos complejos refleja el ordenamiento de los constituyentes de la cadena respiratoria. Esos complejos son: el Complejo I (NADH-ubiquinona reductasa); el Complejo II (succinato-ubiquinona reductasa); el Complejo III (ubiquinol- citocromo c reductasa); el Complejo IV (citocromo oxidasa); y el Complejo V (complejo  $F_1$ -ATPasa); en la figura 1 se explica la composición de cada uno de estos complejos.

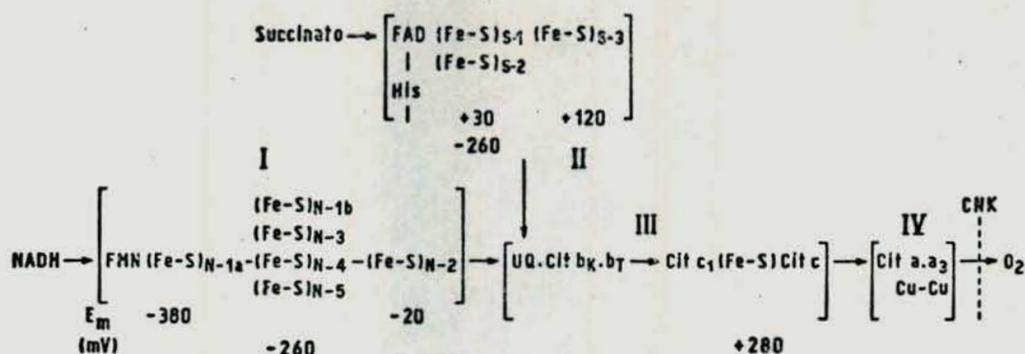


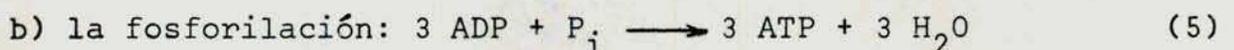
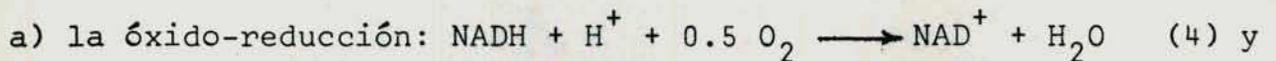
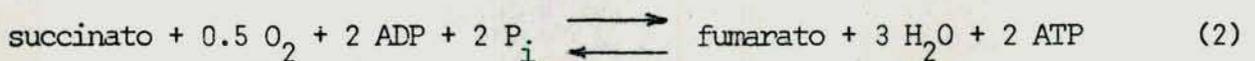
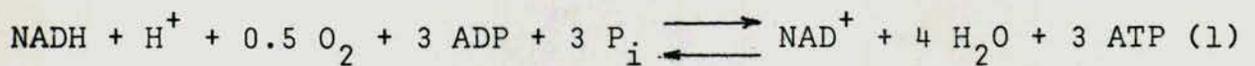
Fig.1 Componentes de la Cadena Respiratoria. Los grupos de componentes entre corchetes designan a los complejos I-IV

En el esquema de la cadena respiratoria de la figura 2 se indican además los puntos de entrada de los electrones provenientes de las distintas deshidrogenasas. Se observa que la ubiquinona es el colector de la gran mayoría de los electrones provenientes de los procesos oxidativos celulares. Los electrones son transferidos a la ubiquinona por las siguientes enzimas: 1) NADH-deshidrogenasa; 2) succinato deshidrogenasa; 3) glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; 4) acil (ácido graso)-CoA deshidrogenasa; 5) colina deshidrogenasa. Todas ellas son flavoproteínas. En cambio, hay un solo dador de electrones al oxígeno: el citocromo  $a_3$  ó citocromo oxidasa. Entre la ubiquinona y el citocromo  $a_3$  hay varios transportadores intermedios: los citocromos  $b$ ,  $c_1$  y  $c$  y algunas sulfo-hierro proteínas. Ninguno de éstos últimos transportadores es capaz de ceder electrones al oxígeno con velocidad comparable a la citocromo oxidasa, lo que determina el papel esencial de la oxidasa terminal para la respiración celular (Lehninger 1965; Mahler y Cordes, 1971; Lehninger, 1975; Stoppani y Boveris, 1981).

## 1.2 Fosforilación oxidativa

La fosforilación oxidativa es el proceso por el cual la energía química liberada por las reacciones de oxidación que tienen lugar en la cadena respiratoria mitocondrial, es utilizada para la síntesis de ATP. La fosforilación oxidativa es la fuente principal del ATP utilizada para el normal desarrollo de las funciones biológicas, lo que le da a la respiración su importancia fisiológica. La fosforilación oxidativa ocurre en la membrana mitocondrial interna e involucra reacciones químicas (óxido-reducciones y síntesis de ATP) y transporte de iones y moléculas. Las reacciones químicas y los procesos de transporte están íntimamente ligados y son interdependientes.

Las reacciones siguientes son modelos representativos de reacciones capaces de formar ATP en la membrana interna.



Las reacciones de óxido-reducción son exergónicas, mientras que la reacción de fosforilación es endergónica.

La reacción (1) representa la oxidación del NADH formado en la matriz mitocondrial y se demuestra experimentalmente con mitocondrias aisladas, utilizando sustratos que penetran fácilmente

la membrana interna, como L-glutamato, L-malato ó 3-hidroxi-butirato. Esos sustratos, una vez en la matriz mitocondrial, en presencia de  $\text{NAD}^+$  y por acción de deshidrogenasas específicas, generan NADH. La reacción (2) representa la oxidación del succinato, catalizada por la succinato deshidrogenasa y la cadena respiratoria. La reacción (3) se demuestra utilizando reductores artificiales del citocromo  $c$ , como el sistema de TMPD (N,N, N',N' tetrametil-p-fenilendiamina) y ácido ascórbico.

De las reacciones (1) (2) y (3) surgen relaciones entre el fosfato ( $\text{P}_i$ ) incorporado al ATP y el oxígeno utilizado para oxidar el sustrato. Esa relación se denomina relación P:O y su valor depende del sustrato oxidado. La relación P:O es de 3 con NADH; 2 con succinato y de 1 con citocromo  $c^{2+}$  (Lehninger, 1965; Lehninger, 1975; Stoppani y Boveris, 1981).

### 1.3 Sitios de conservación de energía (o sitios de fosforilación)

Si se tienen en cuenta los sitios de entrada de los electrones a la cadena respiratoria con NADH, succinato y ascorbato-TMPD, se pueden localizar los sitios de la cadena respiratoria donde se forma ATP (Fig.2). Estos sitios se denominan "sitios de conservación de energía" ó "sitios de fosforilación". Se admite que están ubicados en la cadena respiratoria en la vecindad de la NADH-deshidrogenasa (primer sitio); en el sector citocromo  $b$ -citocromo  $c_1$  (segundo sitio) y en el sector citocromo  $a$ -oxígeno (tercer sitio). La localización de los sitios se ha confirmado mediante estudios de espectrofotometría diferencial y mediante el uso de inhibidores respiratorios (Fig.2). Por ejemplo, la oxidación del NADH en presencia de cianuro y citocromo  $c^{3+}$  como oxidante, da una relación

P:0 de 2 (no opera el sitio 3).

La ubicación de los sitios de conservación de energía es una consecuencia de las propiedades termodinámicas de la cadena respiratoria, o en otros términos, de los potenciales redox de los transportadores de electrones. La Tabla 1 muestra los sitios de conservación de energía en la cadena respiratoria de acuerdo a los potenciales redox y los valores de  $\Delta G'_0$ .

#### 1.4 Rendimiento energético

El  $G'_0$  correspondiente a la reacción redox (exergónica) de oxidación de NADH es  $-220.3$  kJ/mol, mientras que el  $\Delta G'_0$  correspondiente a la fosforilación acoplada (endergónica) es  $+ 87.7$  kJ/mol. En consecuencia la reacción de fosforilación conserva aproximadamente 42% del total de la energía liberada durante la transferencia de un par de electrones del NADH al oxígeno. Si se compara este rendimiento con el de las máquinas térmicas creadas por el hombre (en general 30%) se advierte la notable eficiencia de la fosforilación oxidativa como máquina biológica (Lehninger, 1965; Lehninger, 1975; Stoppani y Boveris, 1981).

#### 1.5 Control de la respiración por el ADP (Control respiratorio)

Según las ecuaciones (1), (2) y (3) en las mitocondrias normales la reacción de oxidación del sustrato depende de la presencia de ADP y  $P_i$ . En condiciones fisiológicas, la matriz mitocondrial contiene alta concentración de  $P_i$ , de manera que la concentración de ADP resulta la reguladora de la actividad del sistema de transporte de electrones y por lo tanto de la respiración mitocondrial. La medida de la respiración mitocondrial con métodos adecuados, por ejemplo la polarografía de oxígeno, permite comprobar que en ausencia de ADP, la actividad es limitada, mientras

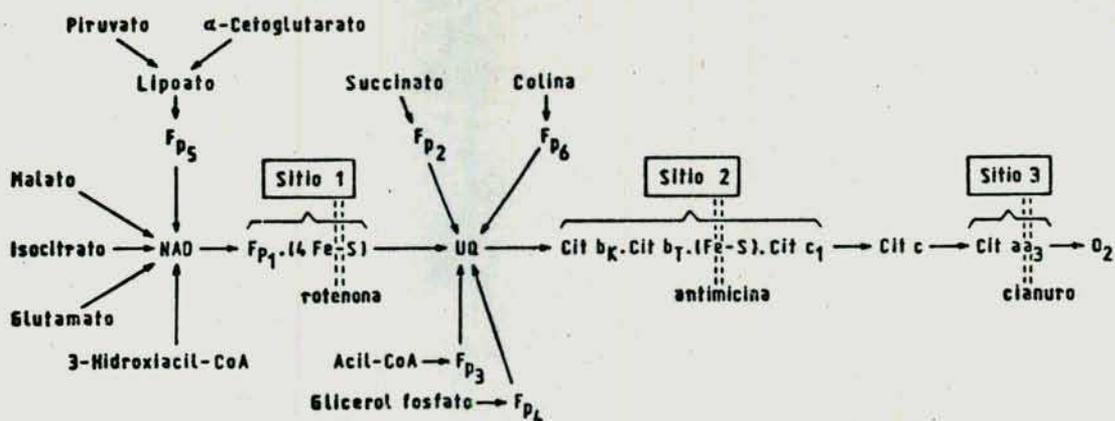


Fig.2 Constitución de la cadena respiratoria.  $FP_1$ , NADH deshidrogenasa;  $FP_2$ , succinato deshidrogenasa;  $FP_3$ , acil-CoA deshidrogenasa;  $FP_4$ , glicerofosfato deshidrogenasa;  $FP_5$ , dihidrolipoil deshidrogenasa;  $FP_6$ , colina deshidrogenasa.

TABLA 1. SITIOS DE CONSERVACION DE ENERGIA EN LA CADENA RESPIRATORIA.

Transportador de electrones	$E'_O$ (mV)	$\Delta E_h$ (mV)	$\Delta G'_O$ (kJ/mol)	Sitio de fosforilación
NAD	-320			
		380	48.9	+
Ubiquinona	+60			
Citocromo $b_T$	-30			
		285	53.9	+
Citocromo $c$	+255			
Citocromo $a_3$	+385			
		435	81.9	+
Oxígeno	+820			

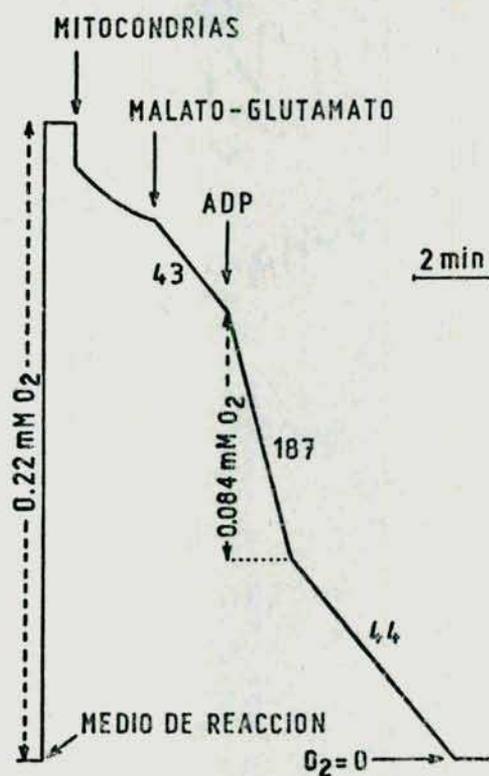


Fig.3. Control de la respiración por ADP. La respiración se mide polarográficamente con un electrodo de platino. Las mitocondrias se añaden al medio cuando la concentración de oxígeno es máxima ( $0.22 \text{ mM}$ ). En esas condiciones la actividad respiratoria es pequeña (estado metabólico 1). La adición de sustrato incrementa la respiración (estado 4); la adición de ADP ( $0.470 \text{ mM}$ ) aumenta aún más la respiración (estado 3) hasta que todo el ADP se convierte en ATP y la respiración retorna al estado 4.

que después de añadir ADP, la respiración se activa a niveles que pueden alcanzar hasta 20 veces el valor de la respiración en ausencia de ADP. Una vez que el ADP añadido ha sido totalmente convertido en ATP, la actividad respiratoria retorna a un nivel muy próximo al inicial. La figura 3 muestra el efecto del ADP sobre la actividad respiratoria mitocondrial. Al estado metabólico caracterizado por la presencia de sustrato oxidable, ausencia de ADP y consumo de oxígeno lento, se lo denomina "estado controlado" o "estado 4". La adición de ADP establece un consumo de oxígeno rápido y por ello a este estado se lo denomina "estado activo" o "estado 3" que se mantiene hasta que todo el ADP ha sido fosforilado a ATP, produciéndose entonces el retorno al "estado 4". La reacción (6) es la expresión de control que ejerce el aceptor de fosfato (el ADP) sobre el transporte de electrones mitocondrial. A ese cociente se lo denomina control respiratorio, tomándose como valor fidedigno de la respiración en "estado 4", el valor medido después del agotamiento del ADP.

$$\text{Control respiratorio} = \frac{\text{respiración en estado 3}}{\text{respiración en estado 4}} \quad (6)$$

El fenómeno de control respiratorio es de máxima importancia en la regulación fisiológica de la respiración celular. El control respiratorio y el índice P:O son muy usados para expresar el grado de acoplamiento entre los procesos de oxidación y fosforilación. Bajos valores de control respiratorio ó índice P:O indican mitocondrias desacopladas o dañadas.

El acoplamiento de los procesos de transporte de electrones y de síntesis de ATP puede ser modificado por agentes químicos y por alteración física de la membrana mitocondrial. Entre las sustancias capaces de inhibir la fosforilación oxidativa están por una parte las que

genéricamente se denominan desacopladores ó desacoplantes. Entre ellas se encuentran los fenoles sustituidos (pentaclorofenol, dinitrofenol (DNP), etc.) las fenilhidrazonas de cianuro de carbono (CCCP y FCCP), el dicumarol, los ácidos grasos de cadena larga y algunos antibióticos como la valinomicina y la gramicidina. Procesos físicos como la congelación y el tratamiento con soluciones hipotónicas también desacoplan el mecanismo conservador de energía. En las mitocondrias desacopladas, la energía liberada por el transporte de electrones se disipa en forma de calor. Este fenómeno es normal en mitocondrias de tejidos termogénicos como la grasa parda de ciertos roedores y los espádices de las aráceas.

La fosforilación oxidativa es también inhibida por los antibióticos como la oligomicina y la rutamicina, y por la dicitclohexilcarbodiimida. Estas sustancias a las que se suelen denominar inhibidores de la transferencia de energía ó inhibidores de la  $F_1$ -ATPasa, afectan simultáneamente la respiración y la fosforilación. En cambio no afectan el transporte de electrones en mitocondrias desacopladas. Estas propiedades los diferencian por una parte de los inhibidores de la transferencia de electrones (como el cianuro y la antimicina) y por la otra de los desacoplantes de la fosforilación, que en lugar de inhibir, estimulan la respiración (Lehninger, 1965; Lehninger, 1975; Stoppani y Boveris, 1981).

#### 1.6 Inhibidores de la transferencia de electrones

El uso de inhibidores específicos ha resultado de especial utilidad para el desarrollo de los conocimientos sobre el arreglo funcional de la cadena respiratoria y constituye actualmente una práctica corriente en los estudios de respiración celular. Los inhibidores de la transferencia de electrones más comunmente usados pueden

ordenarse en tres grupos principales según el sitio de la cadena respiratoria donde actúan. Un primer grupo de inhibidores actúa sobre la NADH-deshidrogenasa, bloqueando la transferencia de electrones entre la flavina y la ubiquinona. Los más representativos de este grupo son la rotenona, aislada de vegetales y utilizada como veneno de peces y la piericidina cuya estructura es muy semejante a la de la ubiquinona. Estos inhibidores se combinan estequiométricamente con la NADH-deshidrogenasa y pueden usarse para titular la flavoproteína presente. Inhibidores de localización similar son el amital, los esteroides, los detergentes, etc. Por su acción en la vecindad del primer sitio de fosforilación (Fig.2) se los suele denominar inhibidores del sitio 1. Un segundo grupo de sustancias actúa bloqueando la transferencia de electrones entre citocromos  $b$  y  $c_1$ . El ejemplo típico de este grupo es la antimicina que se combina estequiométricamente con un componente que está en relación equimolecular con los citocromos  $b_T$  y  $c_1$ . Inhibidores similares son la hidroxiquinolina-N-óxido y el BAL (British Anti-Lewisita, 2-3 dimercapto 1-propanol).

Se los denomina inhibidores del sitio 2. Un grupo de inhibidores actúa sobre el hemo  $a_3$  de la citocromo oxidasa impidiendo su interacción con el oxígeno; este grupo incluye al cianuro, al monóxido de carbono, a la azida, etc. A estos inhibidores se los denomina genéricamente inhibidores del sitio 3. Los sitios de acción de los inhibidores coinciden aproximadamente con los sitios de conservación de energía (Fig.2) (Lehninger, 1965; Mahler y Cordes, 1971; Lehninger, 1975; Stoppani y Boveris, 1981).

#### 1.7 Características de la cadena respiratoria en mitocondrias de plantas superiores.

Fue demostrado que las mitocondrias de plantas superiores tienen muchas actividades respiratorias que difieren de las mitocondrias animales: a) en espectros a baja temperatura ( $77^{\circ}\text{K}$ ) muestran tres picos de citocromo b comparado con dos en mitocondrias animales y dos picos de citocromo c los cuales son diferentes de los citocromos c y c<sub>1</sub> de mitocondrias animales (Chance y col. 1968; Lance y Bonner, 1968; Storey, 1969); b) la composición de las flavoproteínas en mitocondrias de plantas es aparentemente diferente de las mitocondrias animales (Erecinska y Storey, 1970; Storey, 1971); c) las mitocondrias de plantas pueden ser consideradas más permeables que las mitocondrias animales y tienen la habilidad de oxidar rápidamente el NADH externo aplicado (Ikuma y Bonner, 1967; Wilson y Hanson, 1969), bajas concentraciones aparentes de sustrato endógeno en mitocondrias aisladas de plantas (Ikuma y Bonner, 1967) y un relativamente rápido envejecimiento después de almacenamiento a  $0^{\circ}\text{C}$  (Ikuma, 1970); d) el modelo respiratorio de mitocondrias de plantas como se reveló en la relación de control respiratorio y la relación ADP:O muestra que las mitocondrias vegetales están menos acopladas (Ikuma, 1970; Ikuma y Bonner, 1967); e) la oxidación de malato procede rápidamente en mitocondrias de plantas aún en ausencia de piruvato o glutamato (Ikuma y Bonner, 1967); f) las mitocondrias de plantas contienen una succinil-CoA sintetasa específica para ATP (Palmer y Wedding, 1966) en contraste a la especificidad de la enzima para GTP en mitocondrias animales (Hager, 1962); g) la presencia de un camino "resistente al cianuro" ha sido detectado en mitocondrias de plantas (Beevers, 1961; Bendall, 1958; Chance y Hackett, 1959; Hackett y col. 1960; Ikuma, 1970); h) la rotenona que es un potente inhibidor del transporte de electrones en mitocondrias animales, es un

débil inhibidor de la respiración mitocondrial de plantas (Ikuma y Bonner, 1967b).

Existe evidencia de la presencia de dos sistemas de NADH deshidrogenasa accesible al NADH exógeno en mitocondrias de hipocóti-les de porotos (*Phaseolus aureus*) (Douce y col. 1973). Un sistema está localizado sobre la membrana externa y contiene una flavoproteína y citocromo  $b_{555}$ , que es insensible a la antimicina y es específico para los cuatro átomos de hidrógeno  $\alpha$  del NADH. La segunda NADH deshidrogenasa está localizada sobre la fase externa de la membrana interna, está ligada a la cadena respiratoria y es específica para los cuatro átomos de hidrógeno  $\beta$  del NADH.

Fue observado que la oxidación de diferentes sustratos ligados al  $\text{NAD}^+$  responden en forma diferente al agregado de piericidina A y oxalacetato (Brunton y Plamer, 1973) indicando que diferentes sustratos pueden dar NADH a diferentes deshidrogenasas internas. Hubo muchos trabajos indicando que el oxalacetato es un potente inhibidor del transporte de electrones (Douce y Bonner, 1972; Wiskich y col., 1964). Douce y Bonner (1972) reportaron que en mitocondrias de porotos la inhibición del consumo de oxígeno se produjo por el agregado de oxalacetato; la inhibición fue causada por la reversión de la málico deshidrogenasa y no por la oxidación del NADH por la cadena respiratoria. Se encontró que la oxidación de malato fue afectada en la misma forma que otros sustratos ligados al  $\text{NAD}^+$ . Brunton y Palmer (1973), trabajando con mitocondrias de trigo, observaron inhibición de la oxidación de la mayoría de los sustratos ligados al  $\text{NAD}^+$  excepto el malato, el cual fue sólo parcialmente inhibido por oxalacetato. La oxidación de malato resitente a la inhibición por oxalacetato se asume como siendo catalizada por la enzima

málica. El NADH producido por la enzima málica fue preferencialmente oxidado por la NADH deshidrogenasa y no estuvo rápidamente disponible para la oxidación por la reversión de la málico deshidrogenasa en la presencia de oxalacetato. Así parece que la enzima málica y la malato deshidrogenasa actúan como si existieran en diferentes compartimentos de la matriz de la mitocondria.

La piericidina A causó una poderosa inhibición de oxidación de malato (Brunton y Plamer, 1973) y la inhibición pudo ser completamente extraída por agregado de glutamato y de glutamato oxalacetato transaminasa para extraer el oxaloacetato (Palmer y Arron, 1976). Así, el agregado de piericidina alteró el metabolismo en forma tal que el NADH producido por la enzima málica pudo ser preferencialmente oxidado por reversión de la malato deshidrogenasa, más que por la NADH deshidrogenasa. Puede ocurrir que la enzima málica esté íntimamente relacionada a la NADH deshidrogenasa sensible a la piericidina en un compartimento, mientras que la malato deshidrogenasa está íntimamente asociada a la NADH deshidrogenasa, la cual puede baypasar el sitio sensible a la piericidina en otro compartimento. No se consideran los diferentes compartimentos como compartimentos estructurales separados por una membrana, sino como compartimentos cinéticos en los cuales las dos deshidrogenasas ocupan diferentes áreas sobre la superficie de la membrana interna.

Un esquema integrado que muestra la posible organización de las NADH deshidrogenasas y su relación a las deshidrogenasas ligadas al  $\text{NAD}^+$  es mostrado en la figura 4.

Existen tres tipos principales de citocromos  $b$ :  $b$ -566 ( $E_m = -70$  mV),  $b$ -560 ( $E_m = 40-80$  mV) y  $b$ -556 ( $E_m = 75-100$  mV) (Lambowitz y Bonner, 1974; Dutton y Storey, 1971). El citocromo  $b$ -566 es considerado análogo al

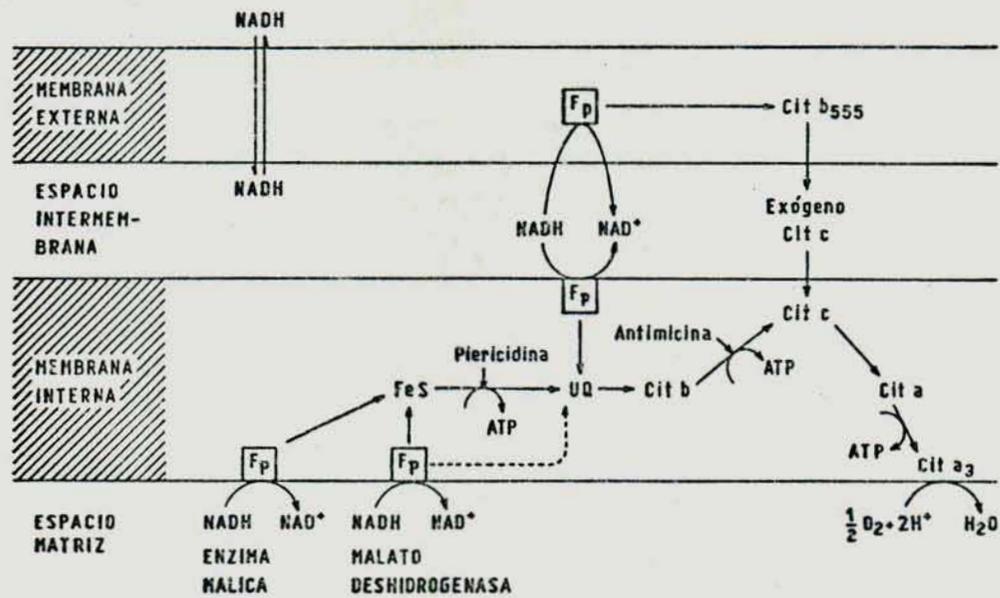


Fig.4 Representación diagramática de la organización de las NADH deshidrogenasas en mitocondrias de plantas superiores.

citocromo  $\underline{b}$ -566 ( $\underline{b}_T$ ) de mitocondrias de mamíferos y el citocromo  $\underline{b}$ -560 al citocromo de mamíferos  $\underline{b}$ -562 ( $\underline{b}_K$ ) (Lambowitz y col., 1974; Lambowitz y Bonner, 1974).

Storey (1969) encontró que había dos tipos de citocromo  $\underline{a}$ ; el citocromo  $\underline{a}_3$  que tiene máximos de absorción a 602 nm y a 445 nm, y el citocromo  $\underline{a}$  que tiene máximos de absorción a 602, 445 y 438 nm. La separación de  $\underline{a}$  y  $\underline{a}_3$  se puede efectuar midiendo los potenciales de oxidación-reducción: en mitocondrias de protos el potencial medio de  $\underline{a}$  a pH 7.2 es +190 mV; de  $\underline{a}_3$  + 380 mV (Dutton y Storey, 1971).

Existen dos tipos de citocromos  $\underline{c}$  (Ikuma, 1972), el citocromo  $\underline{c}_{549}$  y el citocromo  $\underline{c}_{547}$ . Por datos publicados (Lance y Bonner, 1968; Storey, 1970) sugirieron que el citocromo  $\underline{c}_{547}$  está más íntimamente aso-

ciado a la citocromo oxidasa que el citocromo  $c_{549}$ .

El potencial medio de oxidación-reducción de ambos citocromos a pH 7.2 es de +235 mV (Dutton y Storey, 1971). Una diferencia entre los dos citocromos es la extracción con sales:  $c_{547}$  es rápidamente extraíble por sales de mitocondrias de plantas en forma similar al citocromo  $c$  de mitocondrias de mamíferos, mientras  $c_{549}$  permanece unido a la membrana como el citocromo  $c_1$  de mitocondrias de animales (Lance y Bonner, 1968).

El componente ubiquinona de mitocondrias de porotos fue demostrado ser  $UQ_{10}$  (ubiquinona con 10 residuos isoprenilos en la cadena lateral) (Beyer y col., 1968).

Observaciones cinéticas sugieren que la ubiquinona acepta electrones de la succínico deshidrogenasa (Storey y Bahr, 1972) y los transfieren a la cadena de citocromos. Cuando el NADH exógeno fue usado como sustrato hubo un lag antes del comienzo de la reducción de la ubiquinona y se sugirió que la ubiquinona puede actuar como un pool de almacenamiento para equivalentes de reducción que entran a la cadena respiratoria sobre el lado del sustrato del segundo sitio de síntesis de ATP (Storey, 1970).

Se sabe poco sobre el rol de las sulfo-hierro proteínas en mitocondrias de plantas. Su presencia se dedujo cuando se usaron inhibidores como la rotenona o la piericidina A los cuales inhiben a nivel de los componentes de hierro-azufre en la NADH deshidrogenasa, que inhiben la respiración en mitocondrias de plantas. Schonbaum y col. (1971) fueron los primeros en publicar un espectro de resonancia electrónica paramagnética (EPR) que se obtuvo usando mitocondrias de plantas. Esto mostró una señal a  $g=2.0$  y  $1.94$  la cual es característica de hierro-azufre proteínas (Ohnishi, 1973). Cammack y Pal-

mer (1973) examinaron hierro-azufre proteínas en mitocondrias de achicoria de Jerusalem (*Helianthus tuberosus*) y en espádice de *Arum maculatum* usando técnicas de EPR. Esos estudios sugieren que el segmento NADH-ubiquinona reductasa de la cadena respiratoria contiene al menos tres centros hierro-azufre distinguibles. Dos de esos centros hierro-azufre corresponden a N-1 ( $g=2.02$ ; 1.93) y N-2 ( $g=2.05$ ; 1.92) que se encuentran en mitocondrias animales (Ohnishi, 1973; Ohnishi y col., 1974). Una tercera señal a  $g=2.10$ ; 1.87 puede ser la imagen de centros N-3 y N-4 aunque no fue posible resolver los dos centros con mitocondrias animales y de levaduras (Ohnishi, 1973).

Se encontraron centros  $S_1$  y  $S_2$  asociados con la succínico deshidrogenasa similar a los encontrados en mitocondrias animales (Ohnishi y col., 1974). Además se detectó una hierro-proteína de alto potencial similar al centro S-3 que está presente también en mitocondrias animales (Ingledey y Ohnishi, 1975; Ohnishi y col., 1975; Ohnishi y col., 1974).

En mitocondrias de plantas hay al menos cuatro flavoproteínas (Storey, 1970), las que fueron caracterizadas de acuerdo a sus características de fluorescencia-absorción y sus respectivos potenciales redox medios, como sigue:  $F_{plf}$ ,  $F_{pla}$ ,  $F_{pma}$ , y  $F_{pha}$ , donde  $f$  denota fluorescencia y  $a$  absorbancia de las flavoproteínas y donde  $l$ ,  $m$  y  $h$  significan los potenciales bajo, medio y alto respectivamente (Storey, 1970; 1971). El  $E_{m7.2}$  de esas flavoproteínas es -155, -70, +20 y + 110 mV respectivamente (Storey, 1971).

- 1.8 Sitios de fosforilación. Las mitocondrias aisladas de una variedad de tejidos de plantas muestran control respiratorio y relación ADP:O similares pero con valores menores que los encontrados en mi-

tocondrias de mamíferos (Ikuma, 1970; Wilson y Hanson, 1969). El número de sitios de fosforilación es 2 cuando se usa succinato como sustrato y NADH exógeno, un valor de 3 cuando se usa malato, piruvato e isocitrato y de 4 con  $\alpha$ -cetoglutaratato.

Se acepta en analogía con el caso de mitocondrias de mamíferos que la fosforilación se produce en tres sitios. Ikuma (1972) sugiere que hay dos sitios de fosforilación entre NADH y citocromo c cuando se usa malato como sustrato.

Dutton y Storey (1971) sugieren que el sitio II de acoplamiento está localizado entre los citocromos b y c y el sitio de acoplamiento III está entre los citocromos a y a<sub>3</sub>.

1.9 Camino alternativo en mitocondrias de plantas superiores

Es característico de mitocondrias de plantas que además del camino de los citocromos tienen un camino "resistente al cianuro" (Beevers, 1961; Bendall y col., 1958; Chance y Hackett, 1959; Hackett y col., 1960; Ikuma, 1970). Hay plantas o partes de plantas que son parcialmente inhibidas por cianuro y antimicina. Aquellas mitocondrias cuya respiración es solo parcialmente inhibida por cianuro o antimicina tienen una cadena respiratoria ramificada con una oxidasa para cada ramificación. El segmento de la ramificación donde no intervienen los citocromos es conocido como el camino alternativo y su oxidasa como la oxidasa alternativa. Se encontró que varios ácidos hidroxámicos sustituidos son inhibidores específicos del camino alternativo (Rich y Moore, 1976). Cuando se usa succinato como sustrato la relación ADP:O es cero, con malato es uno y con  $\alpha$ -cetoglutaratato se aproxima a dos pero es reducido a uno en presencia de cianuro. De todo esto se deduce que los electrones a partir de las deshidrogenasas ligadas al NAD<sup>+</sup> pasan solo a través del sitio de acoplamiento I sobre su paso por el camino alternativo y que la energía disponible para los si-

tios II y III debe ser perdida como calor. (Bonner, 1977). Aparentemente, la actividad de la oxidasa alternativa no está acoplada a la conservación de la energía (Henry y Nyns, 1975; Solomos, 1977). Desde el punto de vista experimental, la actividad de la oxidasa alternativa es usualmente entendida como el consumo de oxígeno el cual es insensible al cianuro 0.1-0.2 mM y a la antimicina y es inhibida por SHAM (ácido salicil hidroxámico, Fig.5).

El camino alternativo puede contribuir significativamente a la velocidad total de transporte de electrones desde los sustratos hasta el oxígeno bajo ciertas condiciones. Esta contribución se determinó a partir de titulaciones de la velocidad de estado estacionario deseado de la respiración mitocondrial con ácidos hidroxámicos (Bahr y Bonner, 1973a). Trabajaron con mitocondrias aisladas de repollo zorrino que tienen una alta actividad de oxidasa alternativa o sea existen los dos caminos de transporte de electrones. En ausencia de inhibidores y a concentraciones saturantes de sustrato la velocidad total,  $v_T$  debe compensar la suma de las velocidades de cada camino. En presencia de cianuro la velocidad observada es debida únicamente al camino alternativo y es la máxima velocidad posible para aquel camino  $V_{alt}$ . A medida que se incrementa la concentración de ácido hidroxámico, la actividad del camino alternativo disminuye. Los datos de titulación en presencia de cianuro define una función  $g(i)$  la cual describe la máxima velocidad posible del camino alternativo como una función de la concentración de ácido hidroxámico.

Se postuló que la contribución del camino alternativo a la relación total es  $f g(i)$  donde  $f$  es una constante entre uno y cero, y que la velocidad del camino del citocromo no se afecta por cambios

en la velocidad alternativa; la velocidad total resulta de la siguiente ecuación:

$$v_T = f g(i) + v_{cit}$$

Graficaron  $v_T$  en función de  $g(i)$  y la pendiente indicó el valor de  $f$  y el valor de  $v_{cit}$  se obtuvo de la ordenada al origen. Dicho gráfico lo hicieron en estado 3 y estado 4 en presencia de cianuro y a diferentes concentraciones de ácidos hidroxámicos dió pendientes diferentes para los estados 3 y 4 al dar una recta indicó que el camino alternativo no afectó el camino del citocromo.

Los resultados indicaron que: a) el camino alternativo no es totalmente activo en ausencia de cianuro y b) que la actividad depende del estado del camino del citocromo.

El punto de ramificación del camino alternativo a partir del camino clásico de los citocromos está del lado del sustrato del citocromo b y la ubiquinona fue identificada como un transportador común a ambos caminos (Storey, 1976). Como vimos antes, Bahr y Bonner (1973, 1973a) llegaron a la conclusión que la actividad del camino del citocromo regula la actividad del camino alternativo. Si el camino del citocromo puede aceptar menos electrones, por ej. si es bloqueado por cianuro o en el caso de las mitocondrias en estado 4, el camino alternativo llega a ser más operativo. Para explicar esto, Bahr y Bonner (1973a) sugieren que ambos caminos participan de un componente común, el cual puede reducir el primer transportador del camino alternativo cuando el componente común mismo es parcialmente reducido. Storey (1976) demostró que la ubiquinona llena los requisitos de este componente común. Su potencial medio redox es 50 mV más negativo que el primer trans-

portador del camino alternativo. Por lo tanto, si la ubiquinona está principalmente en el estado oxidado no reducirá el primer transportador del camino alternativo. Sin embargo, en estado 4 la ubiquinona de las mitocondrias está más reducida que en estado 3 y el camino alternativo llega a ser más activo cuando el camino de los citocromos no puede aceptar más electrones (Storey, 1976).

Storey y Bahr (1972) llegaron a la conclusión que la función de la ubiquinona en mitocondrias de plantas es la de transporte de electrones en paquetes de dos elementos entre las flavoproteínas de la cadena respiratoria. Esta función de la ubiquinona es diferente de las mitocondrias de mamíferos, donde parece haber una unión entre

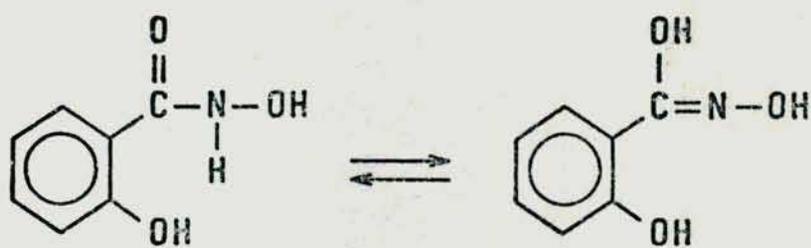


Figura 5. Estructura del ácido salicil hidroxámico

las deshidrogenasas y los citocromos b de la cadena respiratoria. Ya que el camino alternativo no es fosforilativo y que los potenciales redox medios de los transportadores en la región de ramificación son tales que los electrones son transportados vía el camino alternativo cuando se satura el camino de los citocromos, se discute la hipótesis que el camino alternativo es significativo en la regulación del estado redox de las células de las plantas (Bahr y Bonner, 1973). (Ver Fig.6).

Bahr y Bonner (1972) esquematizan la respiración insensible al cianuro en mitocondrias aisladas de diferentes especies de plantas superiores en la Tabla 2. La concentración de cianuro usado es la suficiente para saturar a la citocromo oxidasa.

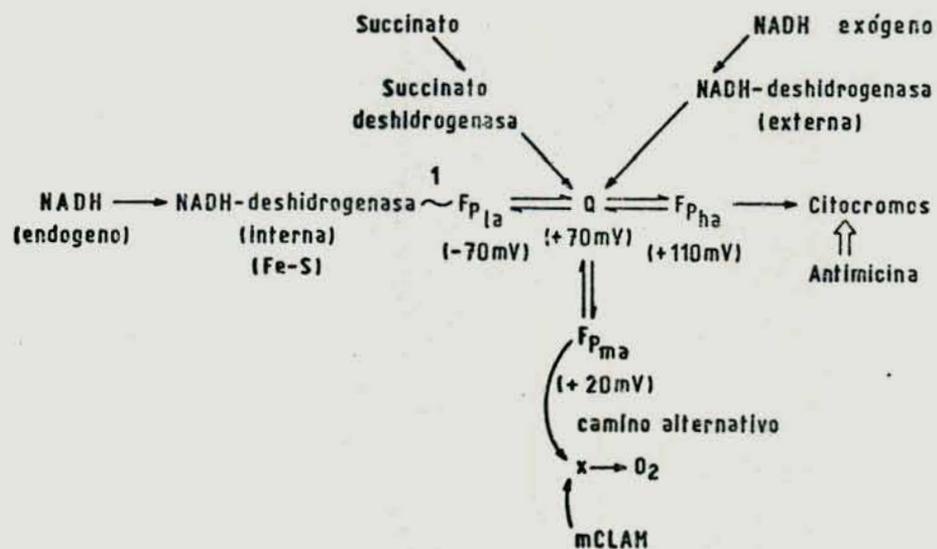


Figura 6. El camino de transporte de electrones de citocromos y el camino alternativo en mitocondrias de plantas superiores (Solomos, 1977).

TABLA 2. RESPIRACION INSENSIBLE AL CIANURO EN VARIOS TEJIDOS DE PLANTAS

Tejido	Porcentaje de respiración en estado "3" insensible a 0.3-0.5 mM de cianuro
Tubérculos de papa blanca ( <i>Solanum tuberosum</i> )	1.0
Hipocótilos de arvejas Alaska ( <i>Pisum sativum</i> )	10-15
Hipocótilos de porotos valentino negro ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	15-20
Hipocótilos de arvejas Black-eyed ( <i>Vigna sinensis</i> )	15-20
Hipocótilos de porotos ( <i>Phaseolus aureus</i> )	15-20
Tubérculos de papa dulce ( <i>Ipomea batatas</i> )	50
Espádices de repollo zorrino ( <i>Symplocarpus foetidus</i> )	66-82
Espádices de <i>Arum maculatum</i>	100
Espádices de <i>Sauromatum guttatum</i>	100

1.10 Actividad de la oxidasa alternativa in vivo. La actividad del camino alternativo está probablemente regulado por la intensidad del flujo de electrones a través del camino de los citocromos como ya se discutió. Por lo tanto, la resistencia al cianuro de la respiración de tejidos intactos o de mitocondrias aisladas no implica que el camino alternativo está operando en ausencia de inhibidores del camino de citocromos. El cianuro (0.1 mM) puede estimular la respiración de varios tejidos (Beevers, 1961; Passam, 1976; Solomos y Laties, 1976; Theologis y Laties, 1978b; Lambers y Van der Dijk, 1979) implicando que el cianuro puede estimular el flujo de electrones a través del camino alternativo. Una posible explicación para este efecto estimulatorio es que la relación ADP:O de la mitocondria disminuye después del agregado de cianuro dando como resultado un contenido menor de ATP y un contenido

mayor de ADP en las células (Solomos y Laties, 1976). Ambos factores pueden estimular el camino glucolítico (Turner y Turner, 1975). Theologis y Laties (1978) demostraron con experimentos de titulación que el camino alternativo in vivo en cortes de papa envejecidos (*Solanum tuberosum*) está operando solamente si la capacidad del transporte de electrones de la cadena de citocromos está excedida.

Si en general el camino alternativo opera únicamente cuando el camino de citocromos está saturado, ya sea por saturación de uno de los transportadores de electrones o por necesidad de fosforilación oxidativa, hicieron experimentos con inhibidores específicos de la cadena alternativa para dar más información sobre la actividad in vivo del camino alternativo. Van der Plas y col. (1977) usó ácido benzohidroxámico para inhibir la respiración de cortes de raíces de *Convolvulus arvensis* en 21%. Esto indica una actividad del camino alternativo el cual es un tercio del valor que se determinó en un experimento en el cual la respiración fue inhibida con cianuro. En raíces de especies de *Senecio* cerca del 70% de la respiración total de la raíz fue sensible al ácido salicil hidroxámico (SHAM) y también fue resistente al cianuro cerca del 70% (Lambers y Smakman, 1978). Por otro lado Theologis y Laties (1978) y Lambers y Van de Dijk (1979) no encontraron inhibición significativa por SHAM en tejidos (tejidos de almacenamiento de diferentes especies y tallos de *Senecio aquaticus*, respectivamente) los cuales poseen un camino de oxidasa alternativa. Lambers y Van de Dijk (1979) establecieron que la actividad de la cadena alternativa (como se determinó con SHAM) es alta en raíces jóvenes intactas de *Hypochaeris radicata* pero no en raíces viejas.

Sin embargo, la respiración de raíces más viejas es también resistente al cianuro, indicando que el camino alternativo está todavía presente en ese tejido.

Hay así evidencia para la actividad del camino alternativo in vivo en ausencia de inhibidores de la cadena de citocromos, aunque bajo ciertas condiciones la cadena puede operar menos que su capacidad máxima.

- 1.11 Significado fisiológico de la cadena alternativa. Desde el descubrimiento de la respiración resistente al cianuro, muchos autores especularon acerca del significado fisiológico de este fenómeno, en particular después de aclarar que el camino alternativo no está acoplado a la fosforilación oxidativa. Fueron propuestas varias hipótesis. Meeuse (1975) llegó a la conclusión que el camino alternativo es de significado fisiológico en la producción de calor en los espádices de Araceae. La temperatura en los espádices puede ser incrementada en más de 20°C respecto de la temperatura ambiente. El calor producido volatiliza los compuestos odoríferos que atraen a los polinizadores. En *Symplocarpus* (una Aracea) la inflorescencia y la polinización se producen aún a temperatura ambiente debajo de cero. Además de un incremento en la actividad del camino alternativo, la eficiencia de la fosforilación oxidativa disminuye debido a un desacoplamiento endógeno incrementado y a la actividad de ATPasa mitocondrial (Meeuse, 1975).

La respiración resistente al cianuro puede tener otras funciones aparte de la producción de calor, ya que se encuentra en tejidos donde la producción excesiva de calor ni se produce ni parece servir para ningún propósito si ocurriera.

Solomos (1977) sugirió un significado de la respiración resistente al cianuro en la producción de anión superóxido que puede estar involucrado en la biosíntesis del etileno, que es esencial en la maduración de frutos. Huq y Palmer (1978b); Rich y Bonner,

(1978); Boveris y col.(1978), reportaron que la producción de  $O_2^-$  no se tiene en cuenta para la actividad de la oxidasa alternativa.

Passam (1976) estudió la respiración resistente al cianuro en tubérculos de raíces de cassave, los cuales tienen glucósidos cianogénicos. La hidrólisis de esos compuestos libera CNH el cual puede inhibir a la citocromo oxidasa. Passam (1976) llegó a la conclusión que es posible que la capacidad de transporte de electrones de los citocromos y el camino alternativo esté relacionado al contenido de compuestos cianogénicos en el tejido.

Sin embargo, CNH y CO, los cuales inhiben también la citocromo oxidasa, presentes en tejidos de algunas plantas, son raramente encontrados en altas concentraciones. Una explicación alternativa a la dada es necesaria para explicar la amplia distribución de la respiración resistente al cianuro en plantas superiores.

Muchos tejidos de reserva tienen una actividad fisiológica muy reducida, por ej.bajo ritmo respiratorio y escasa capacidad de absorción activa de iones. Seccionando esos tejidos e incubándolos durante varias horas en una atmósfera húmeda (envejecimiento o reactivación de tejidos de reserva) se induce una alteración profunda de los mismos que se traduce en la activación de un gran número de procesos, como el consumo de oxígeno, la síntesis de proteínas, la división celular, la absorción de iones, etc.(Van Stevenink, 1975). Así, por ej.,las células de almacenamiento de tejido de tubérculos de papa recobran actividad mitótica después del corte y las células hijas se rediferencian a células suberizadas teniendo una función protectora (Fig.7) (Kahl,1973). Además, la incubación de cortes de tubérculos de papa en una atmósfera húmeda (envejecimiento) desarrollan considerable actividad de oxidasa alternativa (Hackett y col.,1960).

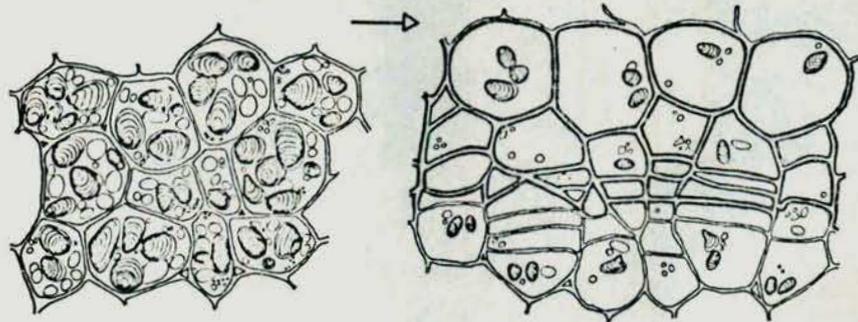


Figura 7. Tejido de tubérculos de papa. (A) antes del corte; (B) después del corte.

Roberts (1973) encontró que la germinación de varias especies de semillas de gramíneas puede ser estimulada por el cianuro,  $\text{CO}$  y  $\text{N}_3\text{Na}$ .

Yentur y Leopold (1976) comunicaron que la respiración de las semillas de soja (*Glycina max*) es más sensible al SHAM que al cianuro durante las primeras horas de germinación, mientras la sensibilidad a ambos inhibidores es similar después de 12 horas de germinación.

Wilson y Bonner (1971) encontraron que en ejes embrionarios de maníes (*Arachis hypogea*), en las primeras horas de inhibición las mitocondrias respiran lentamente y son deficientes en citocromo  $\underline{c}$ .

Møller (1978) aisló mitocondrias de raíces de maíz (*Zea mays*) que crecieron en una solución nutritiva a diferentes concentraciones. Midió el efecto del SHAM y del cianuro sobre el consumo de oxígeno en las mitocondrias aisladas. Encontró que el nivel salino del medio de cultivo afectó el camino alternativo. Sugirió, que una

explicación alternativa para la respiración estimulada por sales, pudo ser que la síntesis o ruptura de ácidos orgánicos acompañe el consumo de iones a partir de soluciones no balanceadas.

#### 1.12 Estudios realizados para el trabajo de Tesis.

Durante este trabajo de tesis se estudiaron actividades mitocondriales y la actividad de la oxidasa alternativa en mitocondrias aisladas de diferentes especies de plantas superiores.

Se estudiaron las mitocondrias aisladas de discos de tubérculos de papa frescos y envejecidos. Se encontró un incremento en la actividad de la oxidasa alternativa, en el consumo de oxígeno y en la masa mitocondrial, y una disminución en el control respiratorio y en la actividad de la citocromo oxidasa con el aumento del tiempo de incubación (Boveris y col., 1978).

Además, se demuestra que la producción de anión superóxido no es el producto primario de la oxidasa alternativa (Boveris y col., 1978).

En mitocondrias aisladas de embriones de soja a diferentes tiempos de incubación, no se encontró actividad apreciable de oxidasa alternativa, ni aún en los primeros estadíos de incubación, como había sido propuesto por otros autores (Yentur y Leopold, 1976).

Se encontró deficiencia en citocromo c en los primeros estadíos de germinación; el agregado de citocromo c produjo incremento respiratorio y disminuyó su influencia a medida que avanzó el tiempo de incubación. Se observó además que el 45% aproximadamente de la respiración total en embriones de soja es de origen mitocondrial.

Se estudió la actividad respiratoria en mitocondrias aisladas de raíces de maíz (*Zea mays*) creciendo en una solución nutritiva.

Usando inhibidores de la citocromo oxidasa y de la oxidasa alternativa se encontró que el 41% del consumo total de oxígeno se debe a la actividad de la vía alternativa.

Se observó, haciendo titulaciones con antimicina y con SHAM solos o en forma conjunta que dichos inhibidores actúan en sitios diferentes de inhibición y además cuando actúan juntos aumentan la afinidad del sitio de unión disminuyendo el valor de  $K_i$  en forma cooperativa.

## 2. MATERIALES Y METODOS

## 2.1 Aislamiento de mitocondrias de tubérculos de papa

Tubérculos de papa (Solanum tuberosum) recientemente cosechados fueron cortados en pedazos aproximadamente cúbicos de 5 mm de lado o en discos de 2 mm de espesor y 45 mm de diámetro y los discos a su vez fueron fraccionados en pequeños trozos. Tanto los cubos como los discos fueron usados lo más rápidamente posible después de cortados los tubérculos. Los discos y pedazos de tubérculos fueron sumergidos en solución de manitol 0.3 M, Tris-ClH 5 mM, pH 7.2 a 0-2°C los pocos minutos entre que los tubérculos fueron cortados y subsecuentemente homogeneizados.

Las mitocondrias fueron aisladas de acuerdo al procedimiento general descrito por Bonner (1967) modificado según Boveris y col. (1978) (esquema de la página 34). Se usaron 2 tubérculos ó 70 discos de tubérculos de papa y se homogeneizaron en 600 ml de una solución compuesta por: manitol 0.3 M (que provee la isotonicidad con el medio intracelular); EDTA 1 mM (ácido etilendiamino tetraacético; para complejar los metales pesados que puedan encontrarse en la preparación); Tris (trihidroximetil-aminometano)-ClH 5 mM (como amortiguador) pH 7.2; cisteína 4 mM y polivinil pirrolidona (PVP) 0.5% para minimizar la concentración de compuestos oxidantes, (por ej. quinonas y fenoles) que son formados durante la ruptura celular.

Para homogeneizar se usaron: a) un homogeneizador Waring blender durante 7 seg a baja velocidad o b) un Moulinex Professional Salad Maker durante 10 seg.

El homogenado fue filtrado a través de gasa e inmediatamente centrifugado a 17900 g (10500 rpm) en una centrífuga refrigerada Sorvall RC2-B con un rotor GSA a una temperatura de 0-2°C, por

min para separar las mitocondrias de los componentes citosólicos. El sedimento fue resuspendido en 20 ml de una solución conteniendo manitol 0.3 M, Tris-ClH 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7.2 (esta solución se nombrará en adelante como manitol-Tris-EDTA) utilizando un homogeneizador Potter-Elvehjem y centrifugando en una centrífuga refrigerada Sorvall RC2-B rotor SS-34 a 270 g (1500 rpm) durante 10 min para separar las mitocondrias del almidón, núcleos, restos celulares, fibras celulósicas, etc. El sobrenadante se centrifugó a 14500 g (11000 rpm) durante 10 min. El pellet mitocondrial se lavó con la misma solución de manitol-Tris-EDTA (20 ml), se suspendió finalmente en la solución de manitol-Tris-EDTA y se homogeneizó en un Potter-Elvehjem. Las mitocondrias fueron usadas no después de 3 horas de finalizada la preparación. Las suspensiones mitocondriales finales contenían 10-20 mg de proteína mitocondrial/ml. Los rendimientos fueron de aproximadamente, 40-130 mg de proteína mitocondrial/100 g de tubérculo de papa.

## 2.2 Aislamiento de mitocondrias de plántulas de soja

Semillas de soja (Glicina max) fueron incubadas en una cámara húmeda, sobre algodón y papel de filtro durante 24, 36 y 72 horas a 28°C en la oscuridad. Las mitocondrias fueron aisladas de acuerdo al procedimiento general descrito en el esquema de la página 34. Se usaron plántulas de aproximadamente 250 g de semillas de soja y se homogeneizaron en 700 ml de una solución de manitol 0.3 M, EDTA 1 mM, Tris-ClH 5 mM, pH 7.4, cisteína 4 mM, usando un Moulinex Electric Professional Salad Maker. El homogenado se filtró a través de gasa y luego se centrifugó en una centrífuga Sorvall RC2-B rotor GSA a 17900 g (10500 rpm) durante 10 min a temperatura entre 0-2°C

## OBTENCION DE MITOCONDRIAS DE PLANTAS SUPERIORES

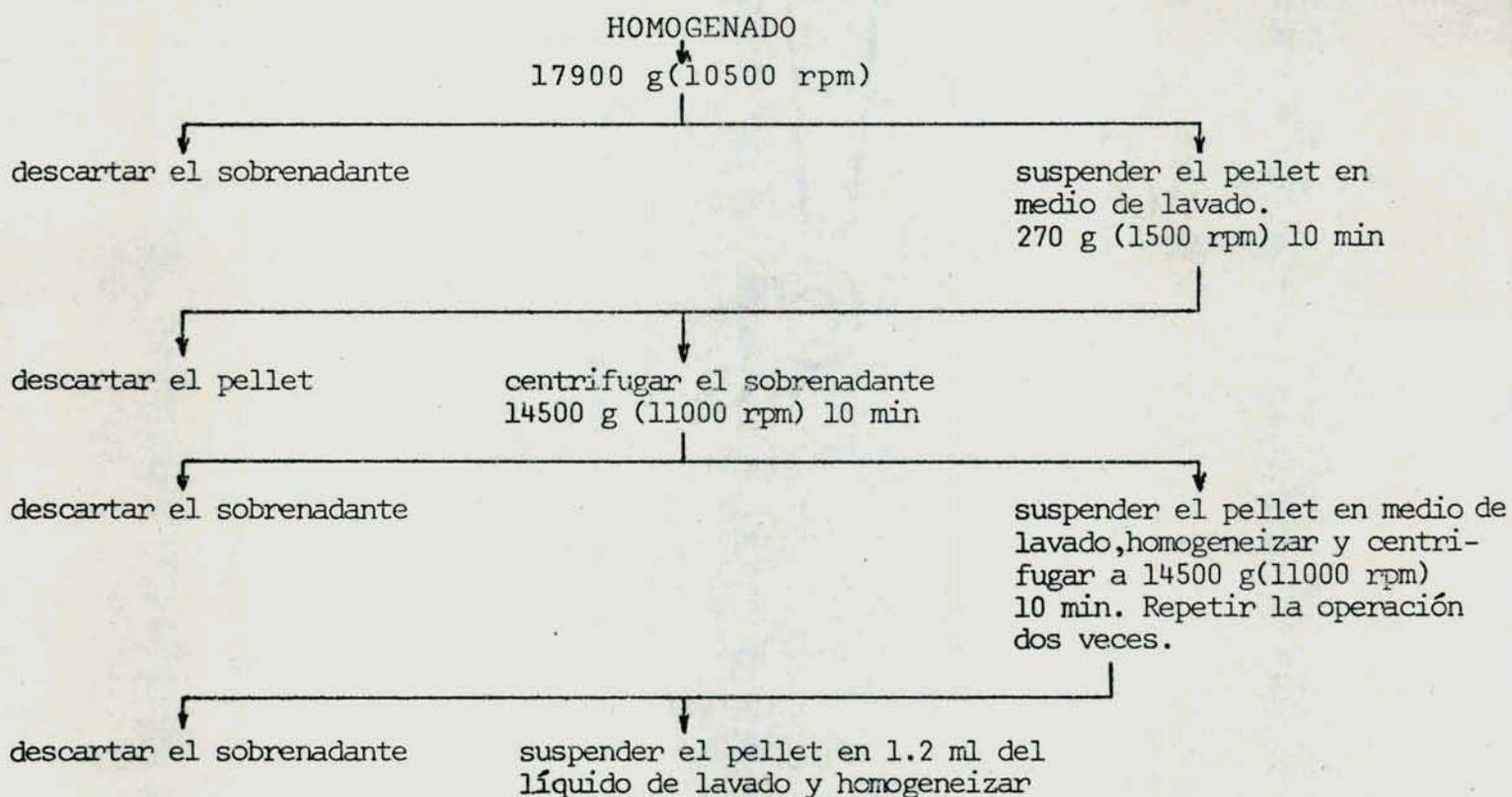
## 1. MEDIOS DE HOMOGENEIZACION

<u>Papas</u>	<u>Plántulas y embriones de soja</u>	<u>Raíces de maíz</u>
Manitol 0.3 M	manitol 0.3 M	manitol 0.45 M
Tris-ClH 5 mM pH 7.2	Tris-ClH 5 mM pH 7.2	Tris-ClH 5 mM ph 7.2
EDTA 1 mM	EDTA 1 mM	EDTA 1 mM
cisteína 4 mM	cisteína 4 mM	cisteína 4 mM
PVP 0.5 %		PVP 0.25 %

## 2. MEDIOS DE LAVADO

manitol 0.3 M	manitol 0.3 M	manitol 0.45 M
Tris-ClH 5 mM pH 7.2	Tris-ClH 5 mM pH 7.2	Tris-ClH 5 mM pH 7.2
EDTA 1 mM	EDTA 1 mM	EDTA 1 mM

## 3. FRACCIONAMIENTO CELULAR



para separar las mitocondrias de los componentes citosólicos. El sedimento fue resuspendido en 20 ml de manitol 0.3 M-Tris-ClH 5 mM, pH 7.4, EDTA 1 mM y se homogeneizó en un Potter-Elvehjem y se centrifugó a 270 g (1500 rpm) por 10 min usando un rotor SS-34 para separar las mitocondrias del almidón, núcleos, restos celulares, fibras celulósicas, etc. El sobrenadante se centrifugó a 14500 g (11000 rpm) en una centrífuga refrigerada Sorvall RC2-B rotor SS-34 por 10 min. El pellet mitocondrial se lavó 2 veces con la misma solución de manitol-Tris-EDTA (20 ml), se suspendió finalmente en la solución de manitol-Tris-EDTA y se homogeneizó en un Potter-Elvehjem. Las suspensiones mitocondriales finales contenían 5-10 mg de proteína/ml.

### 2.3 Aislamiento de mitocondrias de embriones de soja

Los embriones de semillas de soja fueron incubados en una cámara húmeda sobre algodón y papel de filtro durante 2, 4 y 14 horas a 28°C. Las mitocondrias fueron aisladas de acuerdo con el procedimiento general descrito en el esquema de la página 34. Los embriones (1000-2000) se homogeneizaron en 450 ml de una solución de manitol 0.3 M, EDTA 1 mM, Tris-ClH 5 mM, pH 7.4, y cisteína 4 mM, usando mortero durante 4 min y pasando luego por un homogeneizador Potter-Elvehjem. Se filtró a través de gasa y se centrifugó en una centrífuga Sorvall RC2-B rotor GSA a 17900 g (10500 rpm) por 10 min a 0-2°C, para separar las mitocondrias de los componentes citosólicos. El sedimento fue resuspendido en el medio manitol-Tris-EDTA y se homogeneizó en un Potter-Elvehjem y se centrifugó usando un rotor SS-34 a 270 g (1500 rpm) por 10 min a 0-2°C para separar las mitocondrias del almidón, núcleos, restos celulares, fibras celulósicas, etc. El sobrenadante se centrifugó a 14500 g (11000 rpm) por

10 min para aislar las mitocondrias. El pellet mitocondrial se lavó dos veces y se homogeneizó con 20 ml de una solución de manitol-Tris-EDTA usando un homogeneizador Potter-Elvehjem. Las suspensiones mitocondriales finales contenían 8-12 mg de proteína/ml.

#### 2.4 Aislamiento de mitocondrias de raíces de maíz

Raíces de maíz (*Zea mays*) fueron germinadas durante 7 días. Tres días incubadas en una cámara húmeda sobre algodón y papel de filtro a 25°C y durante 4 días en una solución nutritiva (solución Johnson 1%) en presencia de luz de invernáculo a 30-35°C. Las mitocondrias fueron aisladas con el procedimiento general descrito en el esquema de la página 34. Las raíces (200-300 g) se homogeneizaron en 650 ml de una solución de manitol 0.45 M, Tris-ClH 5 mM, pH 7.4, EDTA 1 mM, cisteína 4 mM y PVP (polivinilpirrolidona) 0.25%, usando un Moulinex Electric Professional Salad Maker. El homogenado se filtró a través de gasa y luego se centrifugó en una centrífuga Sorvall RC2-B rotor GSA a 17900 g (10500 rpm) durante 10 min a 0-2°C para separar las mitocondrias de los componentes citosólicos. El sedimento fue resuspendido en 20 ml de manitol 0.45 M, Tris-ClH 5 mM, pH 7.4, EDTA 1 mM, y se homogeneizó en un Potter-Elvehjem y se centrifugó a 270 g (1500 rpm) por 10 min usando un rotor SS-34 para separar las mitocondrias del almidón, núcleos, restos celulares, fibras celulósicas, etc.

El sobrenadante se centrifugó a 14500 g (11000 rpm) en una centrífuga refrigerada Sorvall RC2-B rotor SS-34 por 10 min. El pellet mitocondrial se lavó 2 veces con la misma solución de manitol-Tris-EDTA (20 ml), se suspendió finalmente en la solución de manitol-Tris-EDTA y se homogeneizó en un Potter-Elvehjem. Las suspensiones mitocondriales finales contenían 8-12 mg de proteína/ml.

## 2.5 Medida de la respiración mitocondrial

Las determinaciones de los parámetros de la respiración mitocondrial (velocidad de consumo de oxígeno, control respiratorio y relación P:O) se llevaron a cabo mediante una técnica polarográfica utilizando un oxígrafo de Gilson Medical Electronics (Middleton, Wisconsin, U.S.A.), modelo K-IC, el cual mide cambios rápidos en la velocidad de utilización de oxígeno por parte de células y sistemas subcelulares, basándose en la técnica polarográfica del electrodo de oxígeno. Está constituido por un microelectrodo oscilante de platino, conectado a un electrodo de calomel, unido a la cámara de reacción por un puente salino de solución saturada de cloruro de potasio. Cuando se impone un voltaje a través de los electrodos sumergidos en una solución que contiene oxígeno con el electrodo de platino negativo con respecto al de referencia, el oxígeno molecular sufre una reducción electrolítica. Si se grafica la corriente en función del voltaje de polarización se observa una meseta entre -0.5 y -0.8 volts. Con un voltaje de polarización de -0.6 volts, la intensidad de corriente ( $\mu\text{A}$ ) es directamente proporcional a la concentración de oxígeno de la solución. La corriente generada es amplificada y medida en un registrador. El vaso de reacción está termostatzado mediante agua mantenida a temperatura constante ( $30^\circ\text{C}$ ) que circula por una camisa que envuelve el vaso de reacción. Este está diseñado de tal modo que la difusión del oxígeno atmosférico hacia la solución es mínima y despreciable comparada con las velocidades de consumo de oxígeno que se miden.

El medio de reacción estaba compuesto por manitol 0.3 ó 0.45 M, Tris-ClH 20 mM,  $\text{PO}_4\text{HNa}_2\text{-PO}_4\text{H}_2\text{Na}$  5 mM, pH 7.2,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  2.5 mM, ClK 10 mM y fue saturado con aire a  $30^\circ\text{C}$ . A esa temperatura se conside

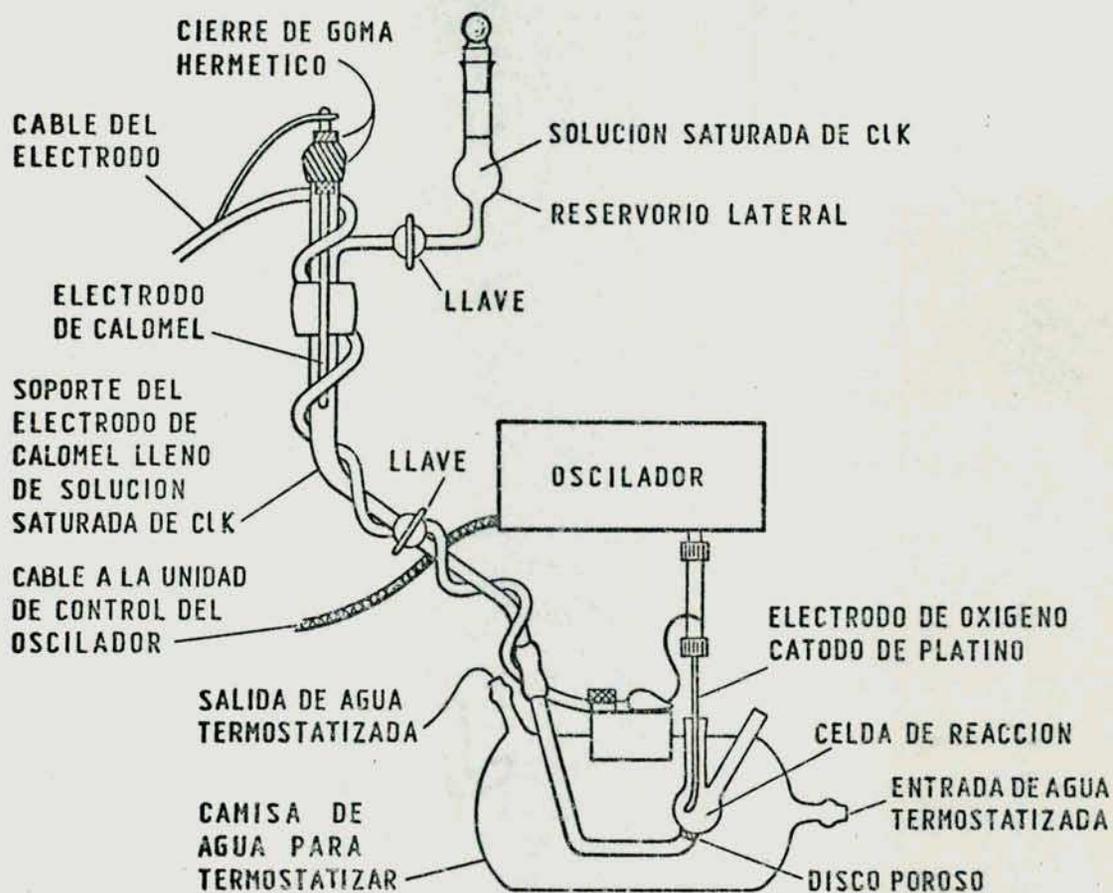


Figura 8. Esquema del oxígrafo utilizado (modelo KI, Gilson Medical Electronics, Middleton, Wisconsin, U.S.A.)

ró la concentración de oxígeno como igual a 0.22 mM (Estabrook, 1967). Se adicionaron normalmente 0.2-0.4 mg de proteína mitocondrial/ml. Los reactivos se agregaron a través de una pequeña abertura colocada en la parte superior. El vaso de reacción se limpió luego de cada medida eliminando el líquido de reacción por succión y lavado con agua destilada.

#### 2.5.1 Determinación de la velocidad respiratoria, control respiratorio y P:O en mitocondrias aisladas.

La velocidad respiratoria se determina agregando las mitocondrias al medio de reacción con el sustrato, en ese momento se inicia el consumo de oxígeno cuya velocidad se expresa en n moles  $O_2$ /min/mg proteína; es el estado lento de consumo de oxígeno, característico del estado de reposo o estado metabólico "4" (Chance y Williams, 1955; Chance y Williams, 1956). El agregado de ADP produce una inmediata aceleración del consumo de oxígeno instalándose el estado activo o estado metabólico "3" (Chance y Williams, 1955; Chance y Williams, 1956) y mostrando de esta manera que las mitocondrias se hallan acopladas. Una vez que todo el ADP ha sido convertido en ATP, la velocidad de consumo de oxígeno retorna a un valor característico del estado "4".

La relación entre la velocidad de consumo de oxígeno con ADP y sin ADP (velocidad en presencia de ADP/ velocidad en ausencia de ADP) se denomina control respiratorio. El control respiratorio es función del grado de acoplamiento entre el transporte de electrones y la fosforilación, resultando un criterio muy sensible y en general el de elección para juzgar la integridad mitocondrial. La relación ADP agregado: oxígeno consumido en estado activo, es equivalente a la relación P:O (Chance y Williams, 1955; Estabrook, 1967).

Tabla 3. ESTADOS METABOLICOS MITOCONDRIALES

Tomado de Chance y Williams (1956)

# Condición anaeróbica

Estado metabólico	Oxígeno	Nivel de ADP	Nivel de sustrato	Velocidad de la respiración	Factor determinante de la actividad respiratoria.
1	Disponible	Bajo	Bajo	Lenta	ADP
2	Disponible	Alto	Muy bajo	Lenta	Sustrato
3	Disponible	Alto	Alto	Rápida	Cad. respiratoria
4	Disponible	Bajo	Alto	Lenta	ADP
5	No disponible#	Alto	Alto	Nula	Oxígeno

La Tabla 3 reseña las condiciones correspondientes a los estados metabólicos mitocondriales según la clasificación de Chance y Williams (1956).

La cantidad de oxígeno consumido bajo el estímulo del ADP se calcula teniendo en cuenta la concentración de saturación de oxígeno (0.22 mM) a la temperatura de la experiencia (30°C).

Se pueden determinar dos controles respiratorios:  $CR_a$  (velocidad con ADP/ velocidad antes de agregar ADP) y  $CR_b$  (velocidad con ADP/ velocidad después de agotado el ADP). Chance y Hackett (1959) han expresado que resulta preferible tomar la velocidad sin ADP después de haberse agotado el ADP. En estos casos la relación de control respiratorio resulta un mejor índice para juzgar la integridad del mecanismo de acoplamiento entre oxidación y fosforila-

ción. La activación de la ATPasa mitocondrial (Slater, 1966) por daño estructural o agentes desacoplantes (por ej. ácidos grasos: Wojtczak y Lehninger, 1961; Van der Bergh, 1966) lleva al establecimiento de niveles estacionarios de ADP, sólo parcialmente limitantes de la velocidad de oxidación donde el ADP es fosforilado a ATP por el mecanismo de fosforilación oxidativa y producido de ATP por acción de la ATPasa activada.

## 2.6 Determinación de la generación de anión superóxido

Método del adrenocromo. La oxidación irreversible de la adrenalina a adenocromo por acción del anión superóxido es uno de los métodos más difundidos para medir la generación de este radical (Misra y Fridovich, 1972b). El método de detección es muy sencillo, pudiéndose medir generación de anión superóxido en un espectrofotómetro común de 480 nm ( $E = 4.0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) o preferentemente en uno de doble haz a 480-575 nm ( $E = 2.96 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (Green y col. 1956; Cadenas y col., 1977). La especificidad del método es, sin embargo, bastante pobre ya que por ejemplo el radical hidroxilo, puede dar la misma reacción (Bors y col., 1978).

Las mediciones realizadas con este método se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Aminco-Chance a 480-575 nm en manitol 0.23 M, sacarosa 0.07 M, EDTA 1 mM, Tris-ClH 30 mM pH 7.5, adrenalina 1 mM y los sustratos e inhibidores que se indican en cada caso.

## 2.7 Determinación de la actividad de superóxido dismutasa

Según Fridovich (1972), la actividad de superóxido dismutasa se define en términos de su habilidad para inhibir a un sistema de detección que reacciona con anión superóxido. Un ensayo muy utilizado para determinar la actividad de superóxido dismutasa consiste en

estudiar la inhibición que la enzima produce sobre la detección del anión superóxido por citocromo  $\underline{c}^{3+}$  (que se reduce a citocromo  $\underline{c}^{2+}$ ). Bajo condiciones definidas una unidad de superóxido dismutasa es la cantidad de enzima que inhibe en un 50% la velocidad de reducción del citocromo  $\underline{c}$  en concentración 10  $\mu\text{M}$  (aproximadamente 0.1 mg/ml) a pH 7.8 (McCord y Fridovich, 1969).

Las unidades medidas en estas condiciones suelen llamarse unidades Fridovich. Es muy importante fijar todas las condiciones ya que la superóxido dismutasa compite con el sistema de detección por el anión superóxido formado (Fridovich, 1974). La actividad puede también medirse en presencia de adrenalina en lugar de citocromo  $\underline{c}$ , esto resulta conveniente, sobre todo si se trabaja en presencia de sistemas transportadores de electrones capaces de oxidar o reducir al citocromo  $\underline{c}$ . En estos casos puede medirse la actividad de superóxido dismutasa como los  $\mu\text{g}$  de superóxido dismutasa pura que habrían sido necesarios para producir igual inhibición de la oxidación de la adrenalina a adenocromo.

Las determinaciones de la actividad de superóxido dismutasa fueron hechas en un espectrofotómetro de doble haz Amico-Chance a 48-575 cuando se utilizó adrenalina como método de detección ( $E=2.96 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) y a 550-540 ( $E=19 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) si se usó citocromo  $\underline{c}$ .

## 2.8 Determinación de la actividad de la citocromo oxidasa

La actividad de la citocromo oxidasa se determinó por el método diferencial espectrofotométrico de Yonetani y Ray (1965) midiendo la velocidad de oxidación aeróbica del citocromo  $\underline{c}$  reducido en concentración 20  $\mu\text{M}$  catalizada por la citocromo  $\underline{c}$  oxidasa en solución reguladora de fosfato 50 mM, pH 7.0, a 30°C.

Esta enzima de la cadena respiratoria oxida al citocromo c transfiriendo los electrones al oxígeno molecular.



El citocromo c se redujo no enzimáticamente por el agregado de ácido ascórbico como reductor y tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD) como intermediario redox. El ácido ascórbico remanente se eliminó dializando la solución contra solución reguladora de fosfato de sodio 20 mM, pH 7.2, durante 12 horas, determinando la presencia de ascorbato en el dializado por su absorción a 265 nm.

Las determinaciones se realizaron en un espectrofotómetro Beckman (modelo 1098) a 550 nm utilizando mitocondrias y homogenado de embriones y plántulas de semillas de soja como fuente de citocromo oxidasa ( $E = 19 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

## 2.9 Determinación espectrofotométrica de proteína

La determinación espectrofotométrica de las proteínas mitocondriales se efectuó por el método de Lowry y col. (1951).

Las determinaciones se realizaron en un espectrofotómetro Beckman modelo 1098 a 750 nm. Como referencia se utilizó una solución de albúmina de suero de bovino.

## 2.10 Envejecimiento de los tubérculos de papa

Para los experimentos en que se usaron tubérculos de papa envejecidos, estos fueron cortados en discos de 45 mm de diámetro y 2 mm de espesor con una cortadora de fiambre manual. Los discos fueron incubados en cámara húmeda 24 ó 48 horas sobre papel de filtro mojado con  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  1 mM.

### 2.11 Medida de la respiración de embriones de soja

La respiración de embriones de semillas de soja (*Glicina max*) se midió en un respirómetro diferencial Gilson a 25°C.

Se usaron en cada frasco 20 embriones sumergidos en un volumen de 0.7 ml, usando agua destilada como medio de suspensión y CNK 1 mM 10 mM como inhibidor; el vaso central contenía papel de filtro embebido en NaOH concentrado.

El consumo de oxígeno se expresó en  $\mu\text{l/h/g}$  peso fresco.

### 2.12 TRATAMIENTOS

#### 2.12.1 Incubación de los discos de papa

Los discos de papa se incubaron en 4 bandejas de 46 cm de largo y 36 cm de ancho sobre papel de filtro embebido en una solución de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  1 mM.

#### 2.12.2 Germinación de semillas de soja

Las semillas de soja se hicieron germinar en 5 bandejas de 46 cm de largo y 36 cm de ancho en una cámara húmeda formada con algodón de 1 cm de espesor y papel de filtro embebido en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

#### 2.12.3 Incubación de embriones de soja

Los embriones de soja se incubaron en 4 cajas de 14x14 cm en una cámara húmeda formada con algodón de 1 cm de espesor y papel de filtro embebido en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

#### 2.12.4 Germinación de semillas de maíz

Las semillas de maíz se hicieron germinar en 8 bandejas de 46 cm de largo y 36 cm de ancho en una cámara húmeda formada con algodón de 1 cm de espesor y papel de filtro embebido en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada durante 72 horas; luego se insertaron las raíces en 4 recipientes

de 39 cm de largo, 30 cm de ancho y 14 cm de profundidad sobre una malla plástica de 4 orificios/cm<sup>2</sup>, en una solución nutritiva (Epstein, 1972)

### 2.13 REACTIVOS

Bitartrato de adrenalina, citocromo c, superóxido dismutasa, ascorbato de sodio, NADH, succinato de sodio, malato de sodio, glutamato de sodio, ADP, malonato de sodio, tetrametil-p-fenilendiamina y antimicina fueron adquiridos de Sigma Chemical Company, St.Louis, Mo. USA. El ácido salicil hidroxámico fue adquirido en Aldrich Chem.Co., Milwaukee, Wi.,USA.

# RESULTADOS

3. ACTIVIDAD DE OXIDASA ALTERNATIVA  
Y RESPIRACION EN MITOCONDRIAS  
AISLADAS DE TUBERCULOS DE PAPA

### 3.1 Actividad respiratoria mitocondrial. Características Generales

En la Fig. 9 puede observarse la determinación de los parámetros más importantes de la actividad respiratoria mitocondrial, derivada del acoplamiento de los procesos de fosforilación y transporte de electrones. La determinación comienza con la observación de la estabilidad de la línea de saturación del medio de reacción con oxígeno a 30°C, suplementado con los sustratos; en este caso, succinato-glutamato. El agregado de la suspensión mitocondrial (0.1 ml) inicia el consumo de oxígeno cuya velocidad está dada por la pendiente del trazado y se expresa en nmoles de  $O_2$ /min/mg proteína.

El consumo de oxígeno lento (Fig.9, trazado A) (75nmoles  $O_2$ /min/mg proteína) es característico del estado de reposo o estado metabólico "4" (estado de respiración controlada, Chance y Williams, 1956). El agregado de ADP produce una inmediata aceleración del consumo de oxígeno (Fig.9, trazado B) (155 nmoles  $O_2$ /min/mg proteína) instalándose el estado activo o estado metabólico "3" (estado de respiración activa; Chance y Williams, 1956) y mostrando de esta manera que las mitocondrias se hallan acopladas. Esta velocidad respiratoria corresponde a la máxima velocidad fisiológica de consumo de oxígeno, en presencia de exceso de sustrato y aceptor de fosfato. Una vez que todo el ADP ha sido convertido en ATP, la velocidad de consumo de oxígeno retorna a un valor más lento (Fig.9, trazado C) característico del estado "4" correspondiente (40 nmoles  $O_2$ /min/mg proteína).

TABLA 4. CONSUMO DE OXIGENO, RELACION ADP:O Y CONTROL RESPIRATORIO EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE TUBERCULOS DE PAPA FRESCOS UTILIZANDO DIFERENTES SUSTRATOS.

SUSTRATO	CONSUMO DE OXIGENO nmoles de O <sub>2</sub> /min/mg proteína			ADP:O	CONTROL RESPIRATORIO
	Estados				
	"4"	"3"	"4"		
Succinato 10mM- glutamato 5 mM	83	241	91	1.8	2.9
Malato 9 mM-malo- nato 45mM-gluta- mato 9 mM	22	36	13	2.3	1.7
NADPH 12.5 mM	90	146	48	1.7	1.7
NADH 12.5 mM	109	152	55	1.7	2.3
Succinato 10 mM	75	276	116	1.7	3.7
Malato 9 mM	11	38	15	2.3	3.5
$\alpha$ -cetoglu- rato 10 mM	43	10	5.2	3.4	2.3

### 3.2 Estudio de la actividad mitocondrial en mitocondrias aisladas de tubérculos de papa frescos utilizando diferentes sustratos

Se estudiaron las variaciones en el consumo de oxígeno, la relación ADP:O y el control respiratorio en mitocondrias aisladas de tubérculos de papa frescos utilizando diferentes sustratos. En la Fig. 10 se utilizó como sustrato malato-glutamato-malonato y el consumo de oxígeno en estado "3" fue de 41 nmoles O<sub>2</sub>/min/mg proteína. En la Fig. 11 se utilizó como sustrato NADH y se obtuvo un consumo de oxígeno en estado "3" de 252 nmoles O<sub>2</sub>/min/mg proteína.

En la Tabla 4 se observa que el consumo de oxígeno en estado "3"

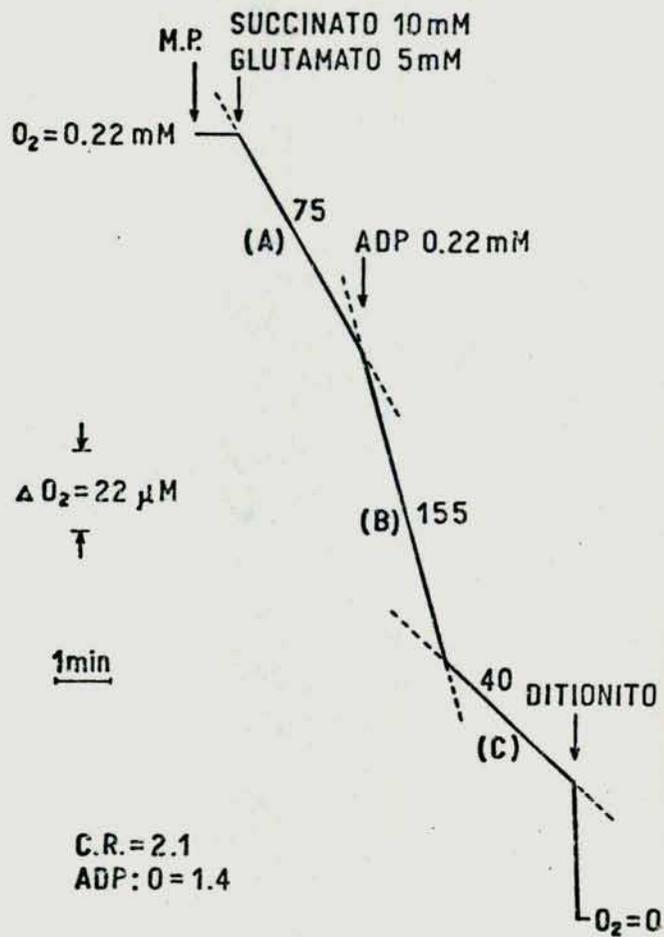


Fig.9. Determinación Polarográfica de consumo de oxígeno, control respiratorio y P:O de mitocondrias de tubérculos de papa frescos, usando succinato-glutamato como sustrato. El medio de reacción compuesto por manitol 0.3-0.45 M, Tris-ClH 20 mM,  $PO_4HNa_2-PO_4H_2Na$  5 mM de pH 7.2;  $Cl_2Mg$  2.5 mM, ClK 10 mM y se adicionaron 0.2-0.4 mg de proteína por ml.

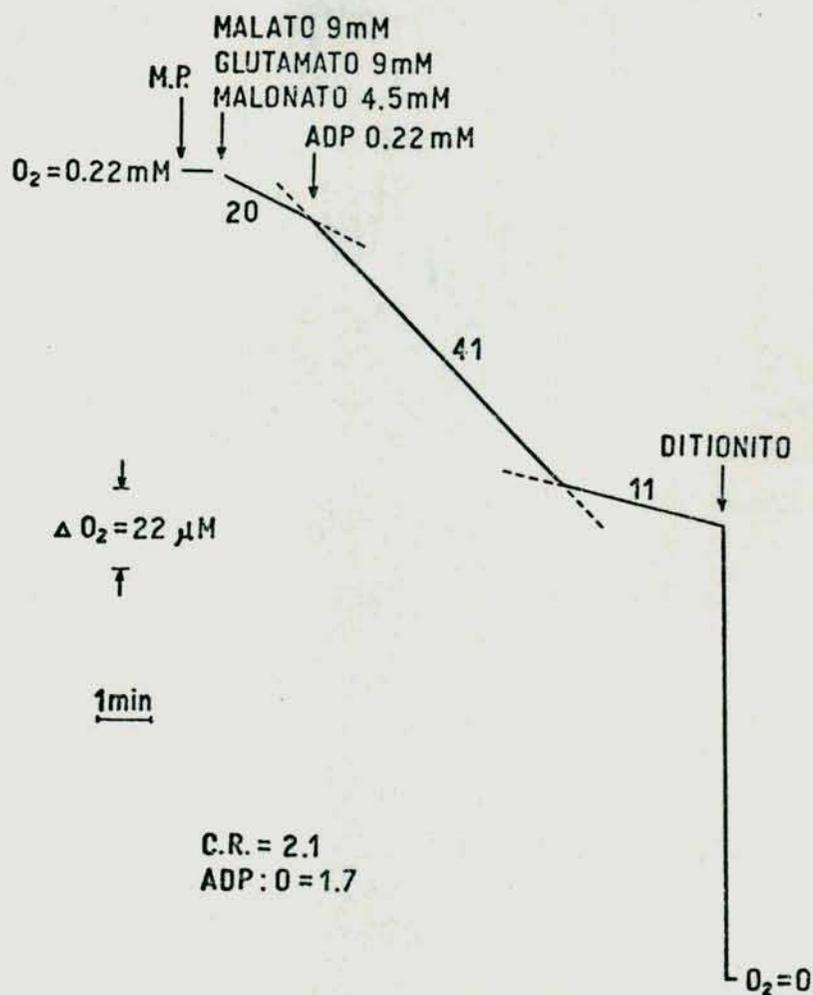


Fig.10 Determinación Polarográfica de consumo de oxígeno, control respiratorio y P:O de mitocondrias aisladas de tubérculos de papa frescos, usando como sustrato malato-glutamato-malonato.

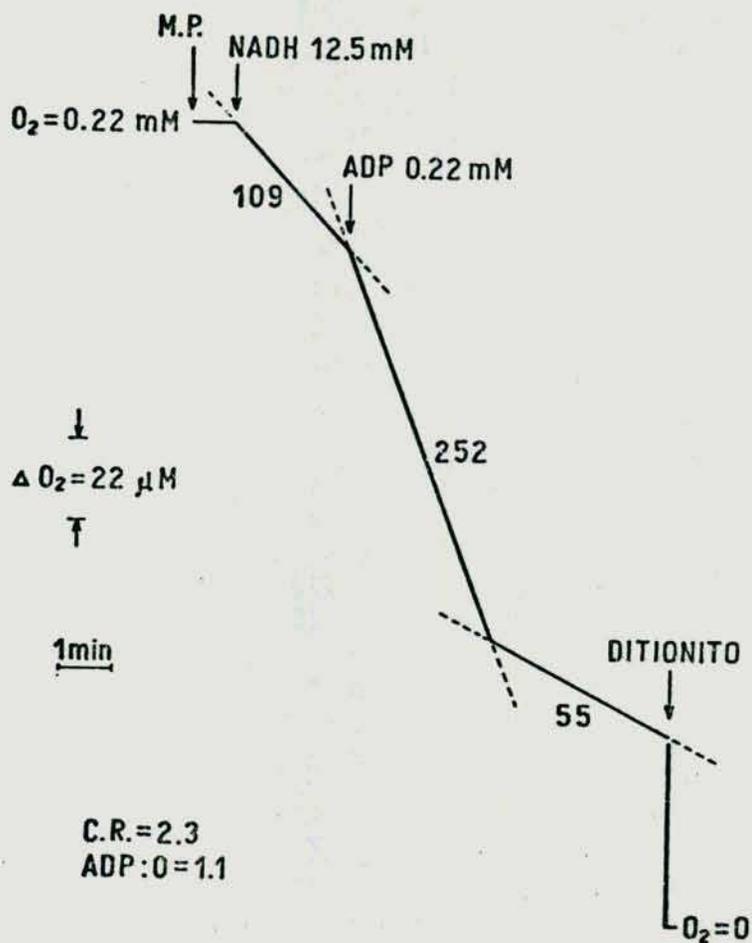


Fig.11. Determinación Polarográfica de consumo de oxígeno, control respiratorio y P:O de mitocondrias aisladas de tubérculos de papa frescos, usando NADH como sustrato.

es mayor usando sustratos que se oxidan cediendo electrones a la cadena respiratoria a nivel del conjunto ubiquinona-citocromo b y donde se producen solo dos fosforilaciones, como los casos succinato-glutamato, succinato, NADH y NADPH y es menor donde se oxidan sustratos que producen NADH endógeno acoplado al pasaje de los electrones por los tres sitios de conservación de energía como en el caso del malato y de la mezcla malato-glutamato-malonato.

Los controles respiratorios oscilan entre 1.7 y 3.7 usando distintos sustratos y no guardan relación directa con los nucleótidos reducidos ya sea NADH endógeno o NADH exógeno.

La relación ADP:O está entre 1.7-1.8 usando succinato-glutamato, succinato, NADH y NADPH, es decir los sustratos que proveen el pasaje de los electrones por los dos sitios de conservación de la energía. Esta relación es de 2.3 con los sustratos (malato y malato-glutamato-malonato) que producen NADH endógeno acoplado al pasaje de los electrones por los tres sitios de conservación de energía. El  $\alpha$ -cetoglutarato dió la máxima relación ADP:O observado, 3.4, por proveer una fosforilación ligada a sustrato a nivel de la succinil-CoA.

### 3.3 Estudio de la actividad mitocondrial en mitocondrias aisladas de tubérculos de papa frescos y envejecidos.

Muchos tejidos de reserva, como los de los tubérculos de papa tienen una actividad fisiológica muy reducida, como por ejemplo el bajo ritmo respiratorio y la escasa capacidad de absorción activa de iones. Seccionando esos tejidos e incubándolos 24 y 48 horas se consigue inducir una alteración profunda de los mismos que se traduce en la activación de un gran número de procesos como el consumo de oxígeno, la síntesis de proteínas, la división celular, la absorción de iones, etc. (Van Stevenink, 1975). Acompañando a esos

cambios metabólicos se producen modificaciones en el número y funcionamiento de las mitocondrias.

El envejecimiento de tubérculos de papa produce un incremento en la masa mitocondrial del tejido; las nuevas mitocondrias sintetizadas tienen una relativa pérdida de acoplamiento y una disminución de la actividad de la citocromo oxidasa (Tabla 5). Después del envejecimiento durante 24 y 48 horas, la proteína mitocondrial total se incrementó 3.1 y 3.3 veces, la relación del control respiratorio disminuyó un 52% y 98% y la actividad de la citocromo oxidasa disminuyó 49% y 54% respectivamente (Boveris y col.,1978), que está de acuerdo con trabajos anteriores (Hackett y col.,1960; Van der Plas y Verleur, 1976).

TABLA 5. CARACTERISTICAS Y PROPIEDADES MITOCONDRIALES EN DISCOS DE TUBERCULOS DE PAPA. INCUBADOS POR 24 y 48 HORAS.

	0 hs	24 hs	48 hs
Proteína mitocondrial total(mg/g tej.)	0.42	1.31	1.38
Proteína mitocondrial aislada(mg/g tej.)	0.17	0.36	0.38
Control respiratorio	3.55	2.24	1.05
Citocromo oxidasa ( $\text{min}^{-1}/\text{mg prot.}$ )	10.9	5.51	5.05

### 3.4 Respiración resistente al cianuro y a la antimicina en mitocondrias de tubérculos de papa frescos y envejecidos.

La respiración de mitocondrias de tubérculos de papa frescos es sensible al cianuro y a la antimicina y la respiración de tubérculos de papa envejecidos es más resistente a dichos inhibidores de la cadena respiratoria (Theologis y Laties, 1978;1978a;1978b)

Hackett y col.(1960) encontraron que en mitocondrias de tejidos envejecidos hay una disminución en la sensibilidad al CNK de las oxidaciones de ácidos orgánicos.

En la Tabla 6 se observa que el consumo de oxígeno resistente al cianuro fue de 8%, 12% y 27% de la respiración en estado "3" en las mitocondrias de tejido de papa fresco y con 24 y 48 horas de envejecimiento y esta insensibilidad no fue afectada por la presencia o ausencia de antimicina.

La respiración insensible a la antimicina, o sea la fracción del consumo de oxígeno que ocurre aún en presencia del inhibidor respiratorio, se estimó en 9%, 56% y 90% del consumo de oxígeno en estado "3" en las mitocondrias aisladas de los discos envejecidos durante 0, 24 y 48 horas respectivamente (Tabla 6 y Fig.12).

Las mitocondrias de tejidos envejecidos fueron más sensibles al cianuro que a la antimicina, especialmente a concentraciones de CNK mayores que 0.2 mM (Fig.13). El hecho que la inhibición por cianuro en mitocondrias de tejidos envejecidos de papa no es máxima al CNK 0.1 mM ya había sido mencionado por Hackett y col. (1960).

En la figura 14 se observa que en mitocondrias de tubérculos de papa el cianuro inhibe dos componentes con valores de  $K_i$  de aproximadamente 10 y 100 mM que pudo ser identificada con la citocromo oxidasa y con una oxidasa sensible a alta concentración

de CNK, respectivamente (Theologis y Laties, 1978a; Boveris y col. 1978; Goffeau y Crosby, 1978).

El cianuro pudo inhibir la respiración resistente a la antimicina de las mismas mitocondrias en 15%, 79% y 71%, respectivamente (Tabla 6).

El SHAM (ácido salicilhidroxámico), el conocido inhibidor de la oxidasa alternativa (Schonbaum y col., 1971; Ikuma, 1972; Bonner, 1977), disminuyó la respiración del estado "3" en 27%, 49% y 31% en las mitocondrias aisladas de discos incubados durante 0, 24 y 48 horas respectivamente y sobre una base de porcentaje que fue poco más efectivo sobre la respiración insensible a la antimicina de las mismas mitocondrias inhibiendo el 29%, 62% y 51%, respectivamente. Es importante notar que la respiración insensible a la antimicina y al cianuro, por ej. el consumo de oxígeno resistente a la suma de ambos inhibidores fue efectivamente inhibida por SHAM (42% y 52% en las 24 y 48 horas de incubado el tejido).

Similarmente, el consumo de oxígeno en presencia tanto de antimicina como de SHAM fue efectivamente disminuído (68%) por cianuro 1 mM en mitocondrias de tejido de papa envejecido y eso muestra diferente sensibilidad a la antimicina, al cianuro y al SHAM (Tabla 6).

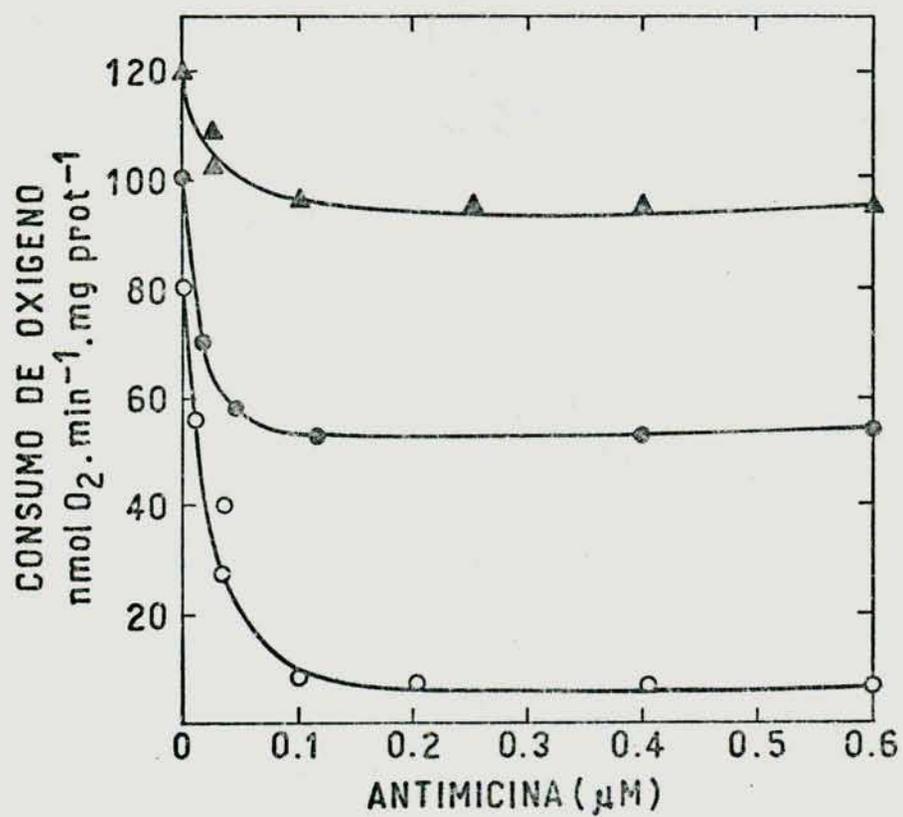


Fig.12. Efecto de la antimicina sobre la respiración en estado "3" de mitocondrias aisladas de discos de papa incubados 0 hs (○), 24 hs (●) y 48 hs (▲).

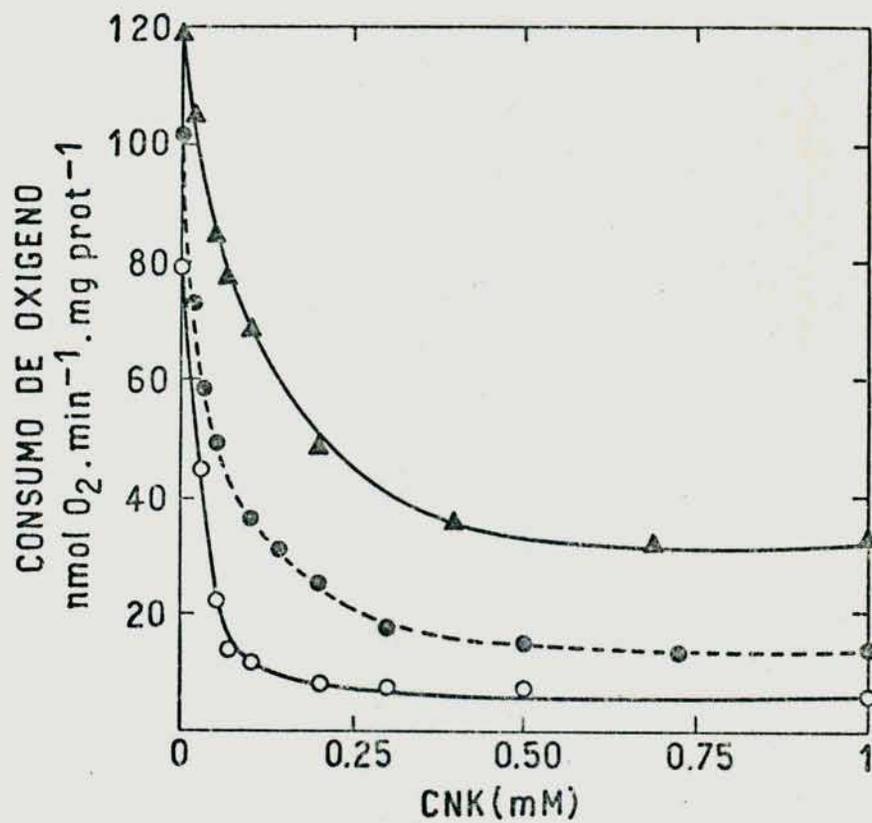


Fig.13. Efecto del cianuro sobre la respiración en estado "3" de mitocondrias aisladas de discos de papa incubados 0 hs ( o ), 24 hs ( ● ) y 48 hs ( ▲ )

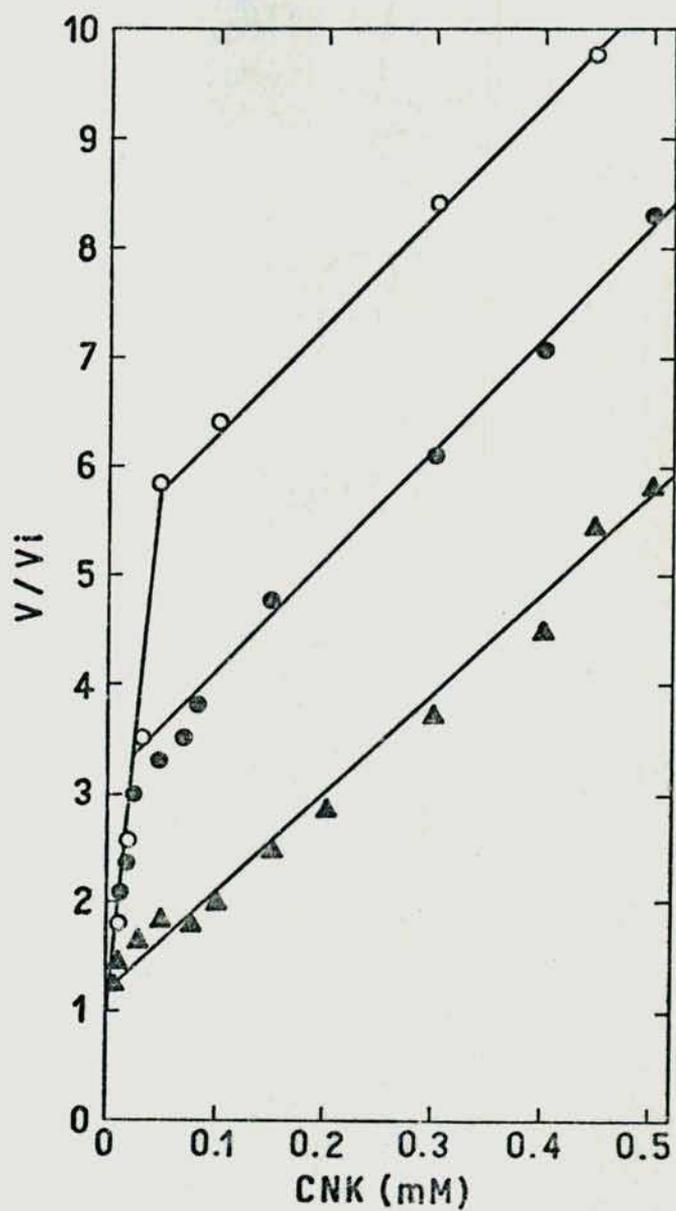


Fig.14. Inhibición del consumo de oxígeno por cianuro en mitocondrias aisladas de cortes de tubérculos de papa 0 hs ( o ), 24 hs ( ● ) y 48 hs ( ▲ ).

TABLA 6. CONSUMO DE OXIGENO Y EFECTO DE INHIBIDORES EN MITOCONDRIAS DE DISCOS INCUBADOS DE TUBERCULOS DE PAPA.

	0 hs	24 hs	48 hs
	Consumo de oxígeno (nmoles O <sub>2</sub> /min/ mg prot.)		
Estado "4"	22	45	117
Estado "3"	78	101	123
+ antimicina 0.4 M	7	57	111
+ CNK 1 mM	6	12	33
+ antimicina + CNK	6	12	37
+ SHAM 2 mM	57	51	85
+ antimicina + SHAM	5	22	55
+ antimicina + SHAM + CNK	5	7	18

### 3.5 Actividad de la oxidasa alternativa en mitocondrias de plantas superiores.

La presencia del camino alternativo en mitocondrias de plantas superiores es ilustrado en la experiencia de la figura 15. Este ensayo, similar al modelo clásico de Bendall y Bonner (1971), fue llevado a cabo con mitocondrias aisladas de discos de tubérculos de papa frescos (A) y a partir de discos de tubérculos de papa incubados 24 horas (B). Estas últimas mitocondrias poseen considerable actividad de oxidasa alternativa (Hackett y col., 1960).

Las mitocondrias respiran activamente en presencia de ascorbato y TMPD, una mezcla de sustrato y mediador que reduce específicamente al citocromo c. El agregado de cianuro 0.2 mM inhibe significativamente la respiración bloqueando la citocromo oxidasa. Bajo tales

condiciones, el agregado de succinato-glutamato activa el consumo de oxígeno si la oxidasa alternativa está disponible. La antimicina no tiene efecto sobre esta oxidasa, pero el SHAM es un efectivo inhibidor. La interpretación de esta secuencia es que hay una ramificación en la cadena principal de transferencia de electrones, localizada entre el sitio de la succinato deshidrogenasa y el sitio sensible a la antimicina (y citocromo c que conduce a una oxidasa capaz de reaccionar con oxígeno (Fig.16.)).

Desde el punto de vista experimental, la actividad de la oxidasa alternativa es usualmente entendida como el consumo de oxígeno el cual es insensible al cianuro 0.1-0.2 mM y antimicina y es inhibida por SHAM. De acuerdo con esta definición, la actividad de la oxidasa alternativa es calculada como se indica en la Tabla 7.

TABLA 7. ACTIVIDAD DE LA OXIDASA ALTERNATIVA EN MITOCONDRIAS DE DISCOS DE TUBERCULOS DE PAPA INCUBADOS POR 24 y 48 hs.

	0 hs	24 hs	48 hs
	Consumo de O <sub>2</sub> (nmoles O <sub>2</sub> / min/mg prot.)		
Estado "3"			
+ antimicina 0.4 μM	7	57	111
+ antimicina 0.4 μM + SHAM			
2 mM	5	22	55
Actividad de oxidasa			
alternativa	2	35	56

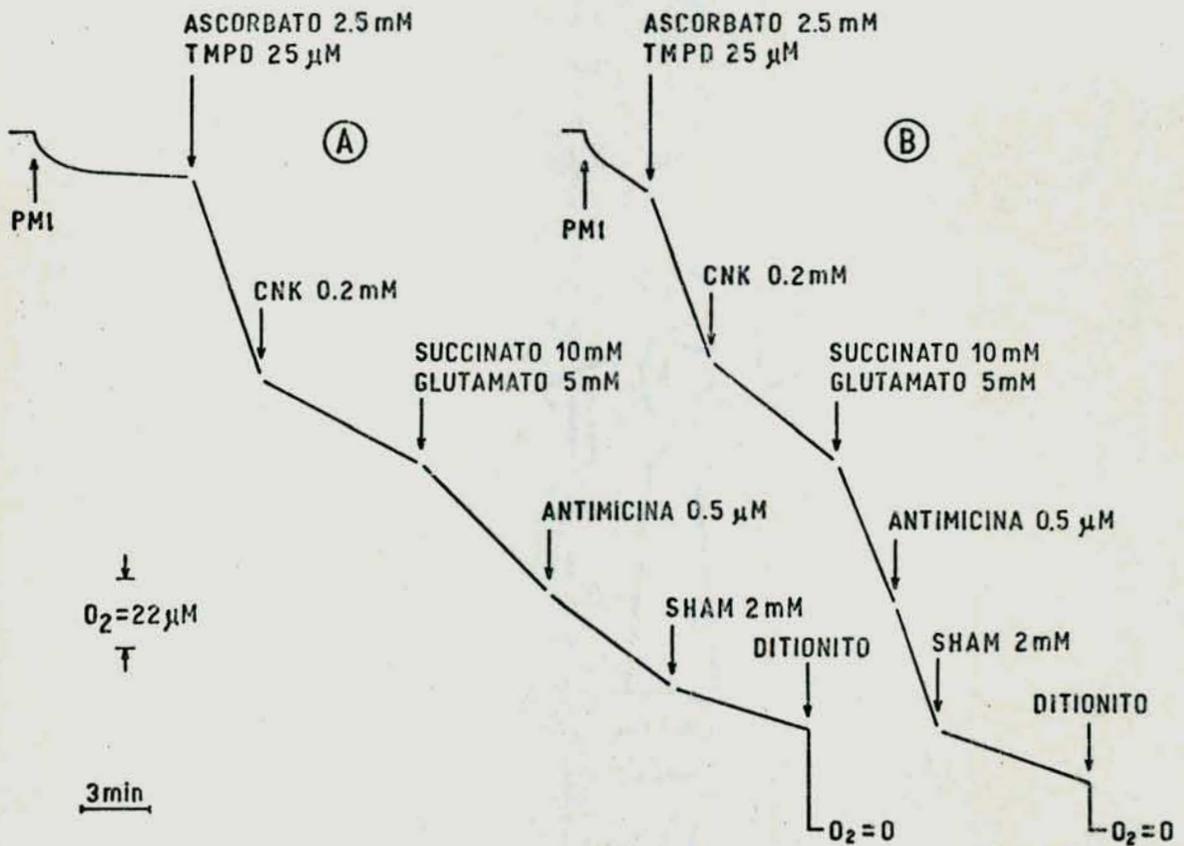


Fig.15. Respiración de mitocondrias aisladas de cortes de tubérculos de papa frescos (A) e incubados 24 horas (B) en  $Cl_2Ca$  0.2 mM. Los números cerca de los trazados indican nmoles  $O_2$ /min/mg.prot.

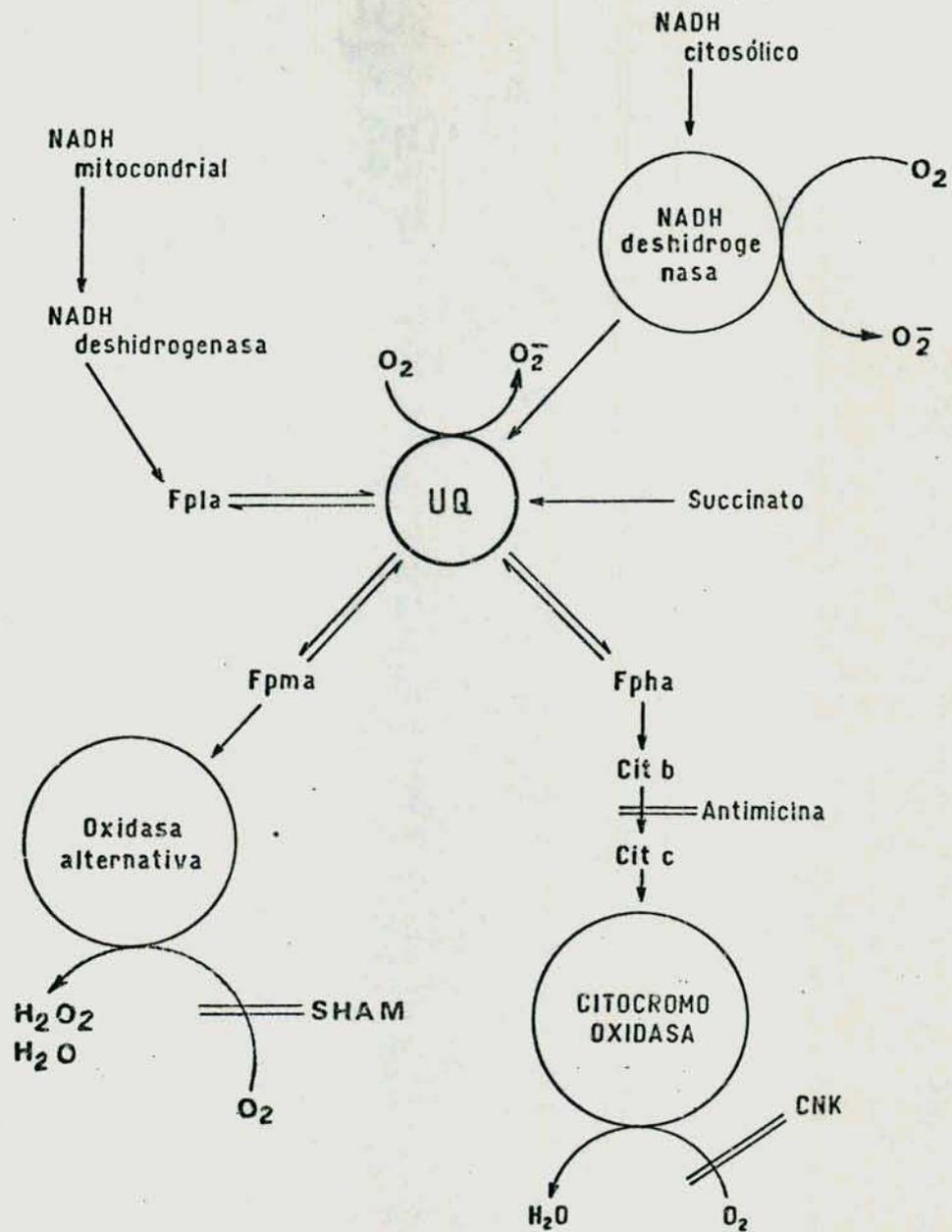


Fig.16. Sitios para la reducción del oxígeno en la cadena respiratoria de mitocondrias de plantas superiores. Tomado de Sánchez y col,1979. Modificado de Solomos, 1977.

### 3.6 Producción de anión superóxido y actividad de superóxido dismutasa en mitocondrias de tubérculos de papa frescos y envejecidos.

Fue sugerido por Bonner (1977) y por Solomos (1977) que en el camino de la oxidasa alternativa, el oxígeno era reducido a  $H_2O_2$  ya sea directamente o por dismutación del  $O_2^-$  vía superóxido dismutasa. En la figura 17 se ilustra la determinación de producción de  $O_2^-$  por mitocondrias de tubérculos de papa frescos. La formación de adrenocromo en ausencia de sustrato respiratorio fue de 12 nmoles/min/mg. prot. El agregado de succinato y glutamato incrementó esta velocidad cerca del 100%, mientras la antimicina mostró un pequeño incremento (9%). El agregado de SOD (superóxido dismutasa) a concentración saturante, da especificidad al ensayo, ya que inhibe la formación de adrenocromo dependiente de  $O_2^-$  y permite el cálculo de velocidad de producción de  $O_2^-$ .

En mitocondrias aisladas de tubérculos de papa frescos o envejecidos la producción de anión superóxido fue alrededor de 13-15 nmoles/min/mg prot. La producción de  $O_2^-$  por mitocondrias de papa fue solo débilmente afectada por el agregado de ADP o antimicina. Tanto el CNK 1 mM como el SHAM 1 mM fueron inhibidores efectivos como se observa en la Tabla 8.

La figura 18 muestra las titulaciones de la velocidad de formación de adrenocromo por superóxido dismutasa, CNK y SHAM en mitocondrias de tubérculos de papa frescos. Comparando el efecto de los tres inhibidores se observa que las mitocondrias de papa tienen capacidad de formar adrenocromo en una reacción que no involucra la producción de  $O_2^-$  y por eso es insensible a la superóxido dismutasa pero es sensible al cianuro y al SHAM. Esta actividad es probablemente debida a la fenol oxidasa (o-difenol: $O_2$  oxidoreductasa,

EC 1.10.3.1) de tejido de papa (Kubowitz, 1937).

Respecto a la actividad de superóxido dismutasa, se supone que un aumento de la actividad indica un aumento biológico en la producción de  $O_2^-$  (Fridovich, 1974) de acuerdo a la hipótesis que el sustrato induce a la enzima. En la Tabla 9 se observa la actividad de SOD en mitocondrias y citosol de discos frescos e incubados de tubérculos de papa y se encuentra que ni la enzima mitocondrial (Mn-enzima) ni la enzima Mn-citosólica (probablemente obtenida de las mitocondrias rotas) mostró variación con el envejecimiento. Además, la actividad de la SOD citosólica que contiene Cu-Zn se incrementó 3.6 y 7.2 veces después de la incubación aeróbica de los discos de papa durante 24 y 48 horas.

TABLA 8 . PRODUCCION DE SUPEROXIDO Y EFECTO DE INHIBIDORES EN MITOCONDRIAS DE DISCOS DE TUBERCULOS DE PAPA FRES-COS E INCUBADOS.

	0 hs	24 hs	48 hs
	Producción de $O_2^-$ (nmoles /min/ mg prot.)		
Estado "1"	4.5	9.6	11.2
Estado "4"	14.5	14.2	13.8
Estado "3"	13.2	13.5	13.4
+ antimicina 0.2 M	15.2	15.6	13.2
+ CNK 1 mM	0.9	0.7	0.9
+ SHAM 1 mM	0	0	0.2

TABLA 9. ACTIVIDAD DE SUPEROXIDO DISMUTASA EN MITOCONDRIAS Y CITOSOL DE DISCOS DE TUBERCULOS DE PAPA FRESCOS E INCUBADOS.

	0 hs	24 hs	48 hs
	Actividad de superóxido dismutasa (Unidades/mg prot.)		
Enzima- Mn mitocondrial	9.0	8.6	10.5
Enzima- Mn citosólica	17.1	14.2	10.2
Enzima-Cu-Zn citosólica	10.6	38.0	76.4

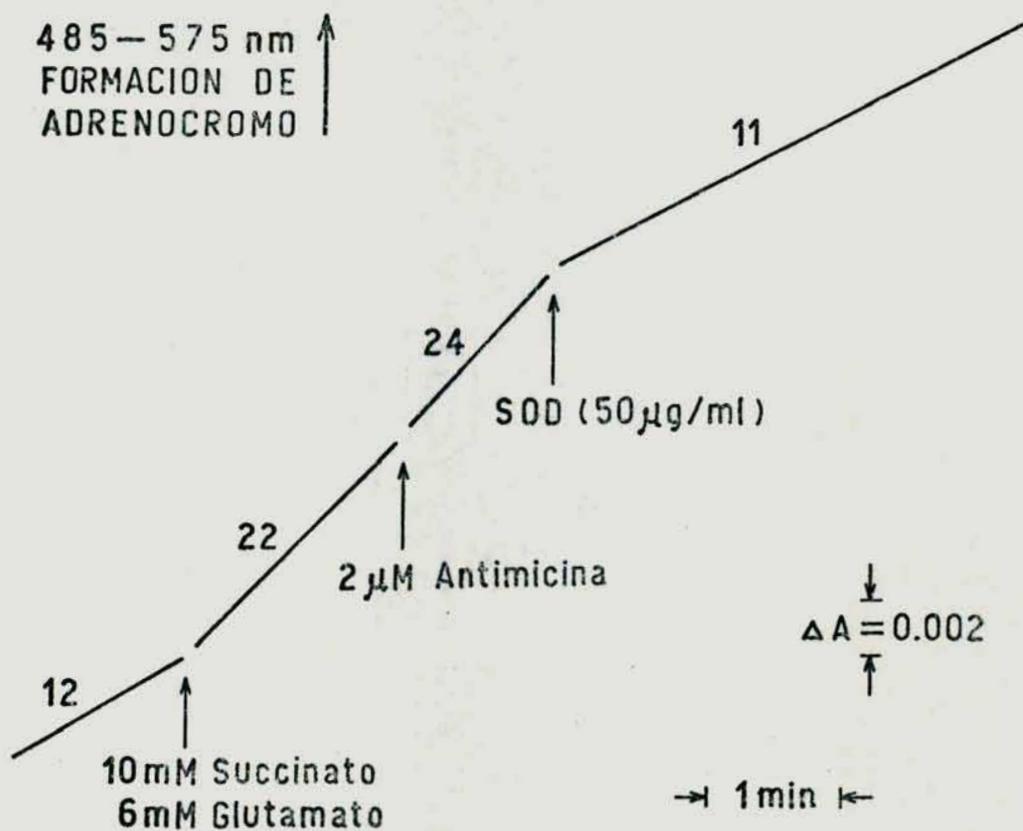


Fig.17. Producción de  $O_2^-$  por mitocondrias de tubérculos de papa frescos.

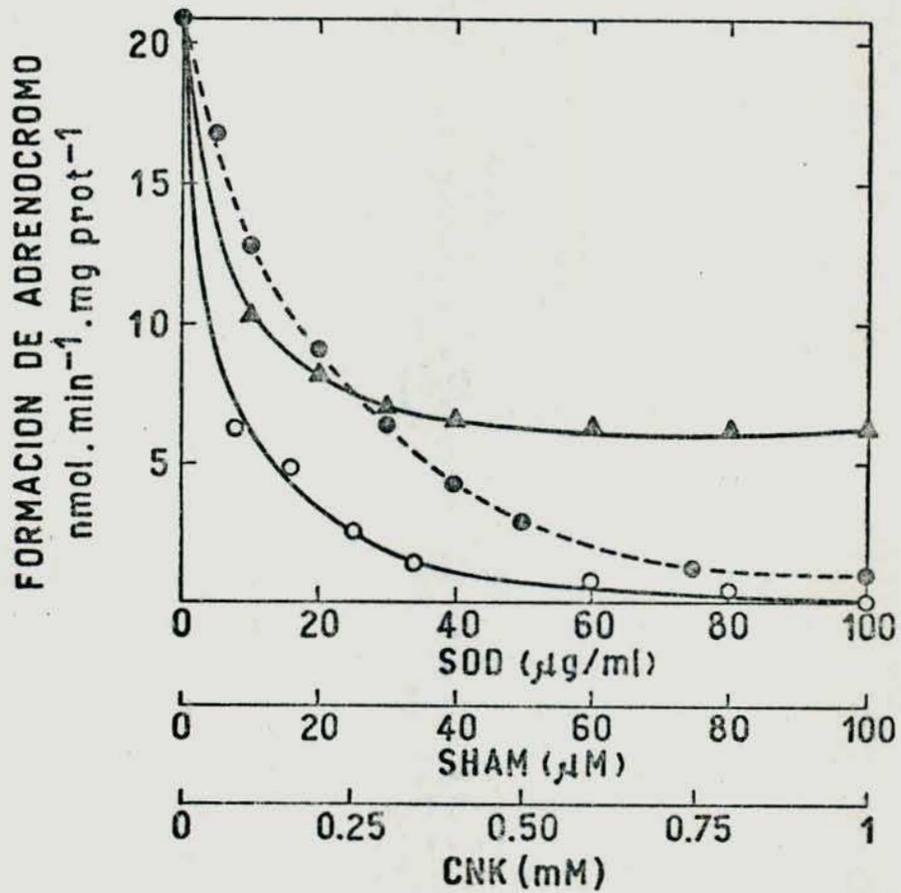


Fig.18. Efecto de superóxido dismutasa (▲). SHAM (o) y cianuro (●) sobre la velocidad de formación de adreno-  
cromo por mitocondrias de tubérculos de papa frescos.

4. RESPIRACION Y ACTIVIDAD DE OXIDASA  
ALTERNATIVA EN MITOCONDRIAS AISLADAS  
EN EMBRIONES Y EN PLANTULAS DE SOJA

4.1 Estudio de la variación del consumo de oxígeno y del peso fresco en embriones de semillas de soja en función del tiempo de incubación.

Se estudió la variación en el consumo de oxígeno y la variación del peso fresco, la cual fue determinada a distintos tiempos de germinación. Se observa en la figura 19 que hay un aumento paralelo en los dos parámetros a medida que avanza el tiempo de incubación, siendo aproximadamente dos veces mayor a las 14 horas respecto de las 2 horas.

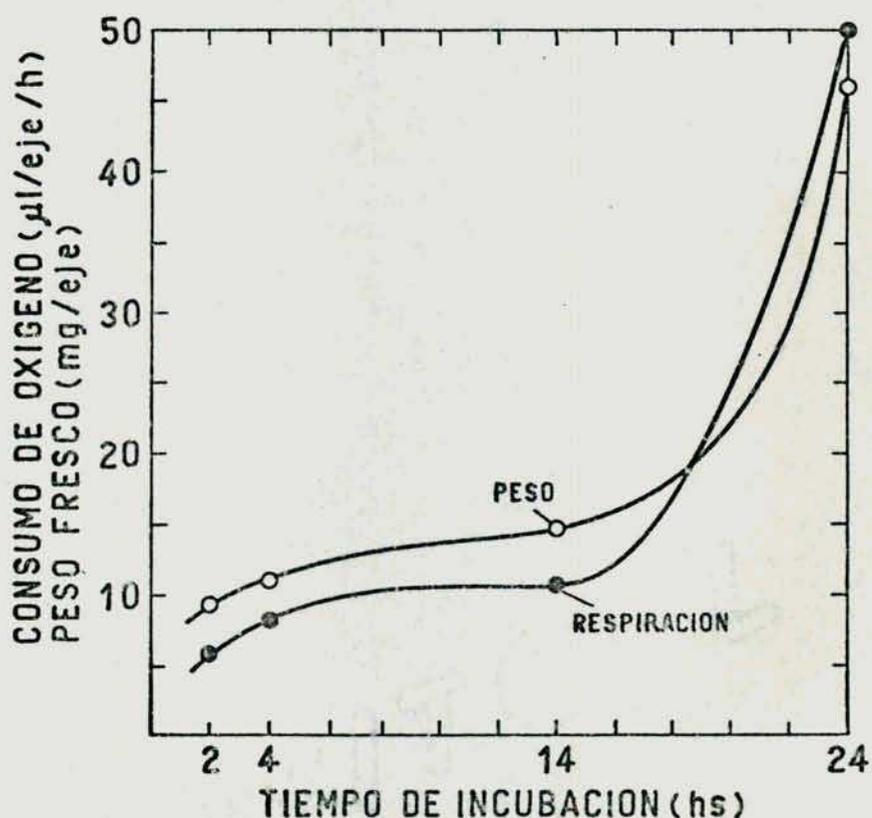


Fig.19. Consumo de oxígeno y peso fresco de embriones de semillas de soja en función del tiempo de incubación.

4.2. Estudio de la sensibilidad al cianuro en embriones de semillas de soja en distintos tiempos de incubación

Con el objeto de determinar la magnitud de la respiración insensible al cianuro se estudió la variación en el consumo de oxígeno en función de la concentración de cianuro en embriones de semillas de soja en distintos tiempos de incubación. Se observa que a las 4 y a las 14 horas de incubación hay un 54 y 53% de inhibición respectivamente con una concentración de cianuro de 1 mM y que esta inhibición va aumentando a medida que aumenta la concentración de cianuro como se observa en la figura 20.

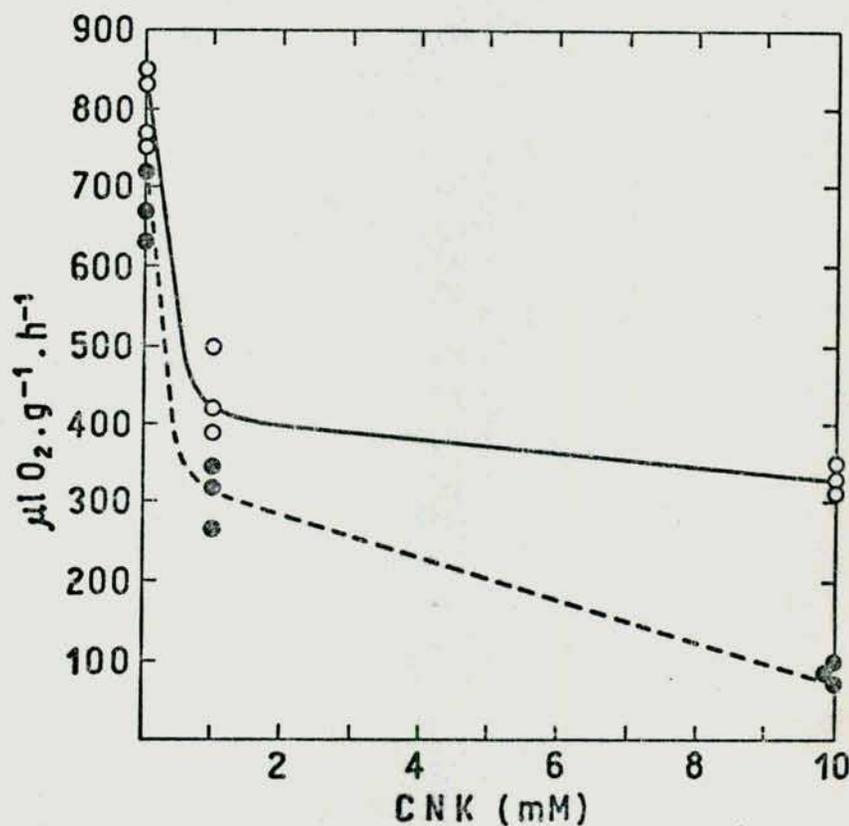


Fig. 20. Efecto del cianuro en ejes embrionarios de semillas de soja en distintos estadios de incubación. (●) 4 horas, (○) 14 horas.

#### 4.3 Estudio de la eficiencia mitocondrial en plántulas de semillas de soja.

Con el fin de caracterizar las propiedades de las mitocondrias aisladas de embriones y plántulas de soja se estudió la respiración mitocondrial y se determinaron parámetros respiratorios tales como la velocidad máxima de consumo de oxígeno (velocidad en estado 3), el control respiratorio y la relación ADP:O en plántulas de soja después de 72 horas de germinación en diferentes variedades.

En la Tabla 10 se observan los consumos de oxígeno, controles respiratorios y relaciones ADP:O usando diferentes sustratos y diferentes variedades de semillas de soja, en un caso con diferentes tiempos de cosecha.

En todas las variedades el consumo de oxígeno es mayor usando succinato-glutamato como sustrato comparado con malato-glutamato-malonato: en la variedad Bragg (cosecha 1979) es 2.4 veces mayor, en la variedad Hood (cosecha 1979) es 3.1, en la variedad Williams (cosecha 1978) es 3.7 y en la misma variedad (cosecha 1979) es 4.5 veces mayor.

La relación ADP:O está próxima a 2 en las variedades Bragg y Hood cosecha 1979, usando como sustrato succinato-glutamato que es el valor teórico máximo para dicho sustrato y fue inferior para las otras variedades. Usando malato-glutamato-malonato el valor ADP:O está cercano a 3 en las cosechas 1979 y es inferior en la variedad Williams cosecha 1978.

El control respiratorio fue 2.1 en la variedad Bragg usando como sustrato malato-glutamato-malonato y en las otras variedades los controles respiratorios oscilaron entre 1.3 y 1.6 ya sea usando como

TABLA 10. CONSUMO DE OXIGENO ,ADP:O Y CONTROL RESPIRATORIO DE MITOCONDRIAS AISLADAS DE PLANTULAS DE SOJA CON 72 HORAS DE GERMINACION DE DIFERENTES VARIEDADES DE SEMILLAS.

Variedad	Año Cosecha	Sustrato	Consumo de O <sub>2</sub> nmoles O <sub>2</sub> /min/mg prot.			ADP:O	Control Respiratorio
			"4"	Estados "3"	"4"		
Bragg	1979	succinato-glutamato	127	190	162	1.7	1.5
		malato-gluatamato-malonato	31	100	28	3.0	2.1
Hood	1979	succinato-glutamato	99	141	105	1.6	1.4
		malato-glutamato-malonato	30	46	19	2.7	1.6
Williams	1979	succinato-glutamato	95	116	94	0.8	1.3
		malato- glutamato -malonato	16	26	21	2.6	1.6
Williams	1978	succinato-glutamato	83	108	79	0.9	1.3
		malato-glutamato-malonato	22	29	15	2.0	1.3

TABLA 11. CONTENIDO DE MITOCONDRIAS Y ACTIVIDAD DE CITOCROMO OXIDASA OBTENIDAS EN PLANTULAS DE SOJA CON 72 HORAS DE GERMINACION EN DIFERENTES VARIEDADES DE SEMILLAS.

Variedad	Año Cosecha	Germinación (%)	Biomasa (g)	Mitocondrias mg proteína/ g planta	Actividad de Citocromo oxidasa(K') min <sup>-1</sup> . mg prot. <sup>-1</sup>
Bragg	1979	100	56	7.1	3.1
Hood	1979	100	65	4.9	2.3
Williams	1979	100	68	7.5	1.7
Williams	1978	90	50	9.1	1.4

sustratos malato-glutamato-malonato o succinato-glutamato.

En general puede decirse que las distintas variedades no representaron una diferencia marcada en ninguno de los parámetros mitocondriales determinados. Sin embargo la variedad Bragg 1979 resultó capaz de dar preparaciones mitocondriales con buenas velocidades respiratorias y adecuados controles respiratorios y relaciones ADP:O. En consecuencia, esta variedad fue seleccionada para el estudio de la actividad respiratoria mitocondrial en mitocondrias aisladas de semillas de soja.

Por último puede observarse, comparando en la Tabla 10 los valores para Williams 1979 y Williams 1978 que las semillas pueden conservarse adecuadamente por períodos de 18 meses sin alteración significativa de las propiedades de las mitocondrias aisladas de ellas.

En la Tabla 11 se observa el contenido de proteína mitocondrial por gramo de planta y la actividad de la citocromo oxidasa en las diferentes variedades de semillas de soja con 72 horas de germinación y en un caso con diferentes tiempos de cosecha. El contenido mitocondrial por gramo de planta resultó mayor en la variedad Williams, en orden decreciente en la variedad Hood y luego en la variedad Bragg. La actividad de citocromo oxidasa es mayor en la variedad Bragg, luego le sigue la variedad Hood en orden decreciente y es menor en la variedad Williams aunque no hay diferencias significativas entre diferentes épocas de cosecha en ésta última variedad.

#### 4.4 Estudio de la actividad mitocondrial y efecto del citocromo c en mitocondrias aisladas de embriones de semillas de soja en distintos tiempos de incubación

Se hizo el estudio de la actividad mitocondrial utilizando em-

briones de semillas de soja variedad Bragg cosecha 1979 en distintos tiempos de incubación con y sin agregado de citocromo c. Los embriones entre 2 y 14 horas se incubaron aislados de las semillas enteras y los de 36 horas se incubaron con la semilla. En la Tabla 12 se observa que el consumo de oxígeno y el control respiratorio aumentan en mitocondrias aisladas de embriones de soja entre las 2 y las 36 horas de germinación, sin el agregado de citocromo c. Los valores del consumo de oxígeno aumentan de 6.9 a 101.2 nmoles  $O_2$ /min/mg de proteína entre las 2 y las 36 horas de germinación.

TABLA 12. CONSUMO DE OXIGENO Y CONTROL RESPIRATORIO EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE EMBRIONES DE SOJA EN DISTINTOS TIEMPOS DE INCUBACION SIN EL AGREGADO DE CITOCROMO c.

Germinación horas	Consumo de Oxígeno nmoles $O_2$ /min/ mg prot.		Control Respiratorio
	estado "4"	estado "3"	
	2	6.9	
4	6.5	8.5	1.3
14	15.1	18.1	1.2
36	63.3	101.2	1.6

En la Tabla 13 se observa un aumento en el consumo de oxígeno y el control respiratorio en mitocondrias aisladas de embriones de soja entre 2 y 36 horas de germinación, con el agregado de citocromo c. El consumo de oxígeno se incrementa de 17.4 a 115.0 nmoles  $O_2$ /min/mg proteína entre las 2 y 36 horas de incubación. El efecto del citocromo c es mayor a las 4 horas y disminuye a medida que avanza el tiempo de incubación. Los controles respiratorios se incrementan entre 1.0 y 1.6 con y sin el agregado de citocromo c entre las 2 y las 36 horas de incubación.

TABLA 13. CONSUMO DE OXIGENO Y CONTROL RESPIRATORIO EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE EMBRIONES DE SOJA EN DISTINTOS TIEMPOS DE INCUBACION CON AGREGADO DE CITOCROMO c.

Germinación horas	Consumo de Oxígeno nmoles $O_2$ /min/mg prot.		Control Respiratorio
	estado "4"	estado "3"	
2	15.8	17.4	1.1
4	26.2	34.0	1.3
14	41.7	50.0	1.2
36	71.9	115.0	1.6

En la figura 21 se observa en los trazados de consumo de oxígeno la influencia del agregado de citocromo c en la respiración de mitocondrias aisladas de embriones de semillas de soja con 4 horas de incubación. La velocidad del consumo de oxígeno en estado "3" es 1.9 veces mayor en presencia de citocromo c (trazados (A) y (B)).

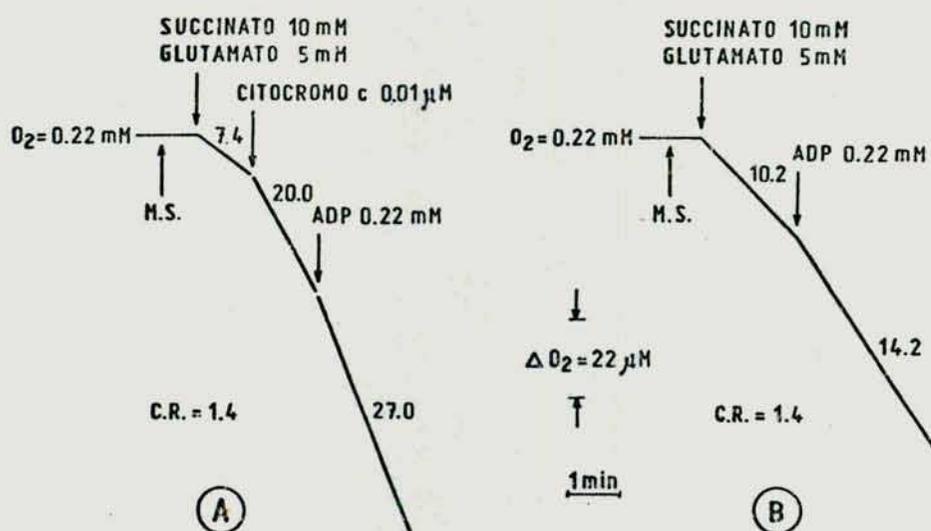


Fig.21. Determinación polarográfica de consumo de oxígeno y control respiratorio de mitocondrias aisladas de embriones de semillas de soja con 4 horas de incubación; (A) con agregado de citocromo c; (B) sin agregado de citocromo c.

En la figura 22 se observa la variación del consumo de oxígeno mitocondrial en función del tiempo de incubación. El incremento en el consumo de oxígeno es de 248% entre las 2 y las 14 horas de incubación sin el agregado de citocromo c y de 287% con el agregado de citocromo c.

El efecto del citocromo c es de aumento del consumo de oxígeno en un 400% a las 4 horas y en un 114% a las 36 horas de incubación.

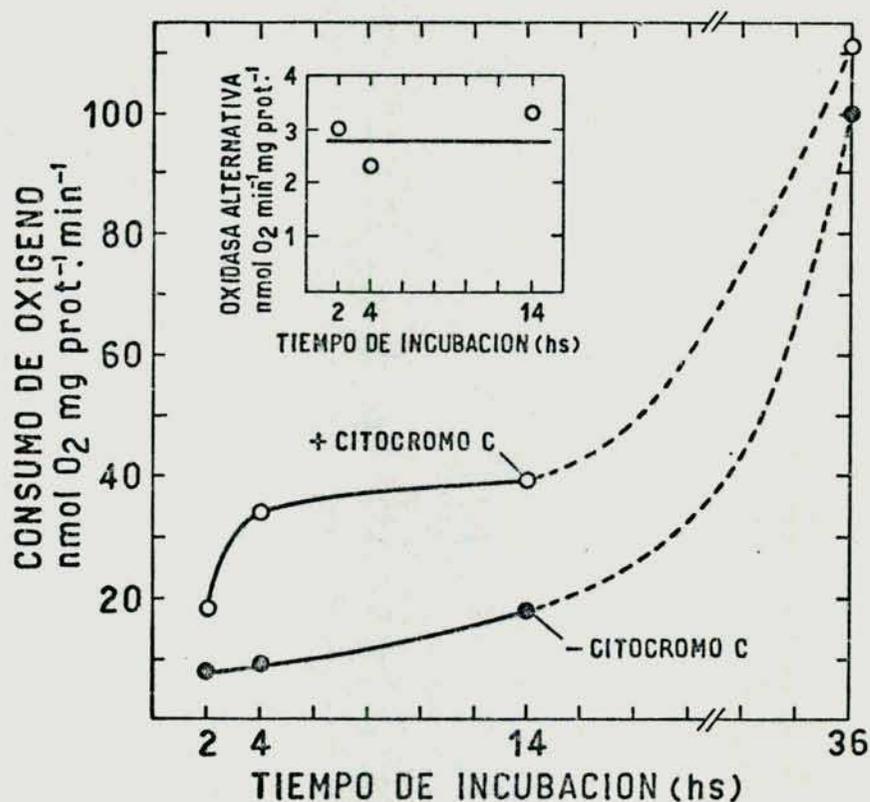


Fig.22. Consumo de oxígeno y actividad de oxidasa alternativa en mitocondrias aisladas de embriones de semillas de soja en función del tiempo de incubación.

#### 4.5 Efecto de inhibidores en mitocondrias aisladas de embriones de semillas de soja en distintos tiempos de incubación.

Se estudió el efecto de la antimicina, el cianuro y el SHAM en mitocondrias aisladas de embriones de semillas de soja, en función del tiempo de incubación. En la figura 23 se grafica el porcentaje de inhibición del consumo de oxígeno producido por inhibidores de la cadena respiratoria en función del tiempo de incubación. Se observa que a las 2 horas de incubación la resistencia al cianuro y a la antimicina es del 30-35% y al SHAM es del 50%. A medida que avanza el tiempo de incubación, la sensibilidad al cianuro y a la antimicina aumenta, mientras que la sensibilidad al SHAM disminuye. En base al criterio establecido por nosotros (Sánchez y col., 1979) de que el consumo de oxígeno insensible a la antimicina y sensible al SHAM constituye una medida de la actividad de la oxidasa alternativa, se determinó esta actividad (Fig. 22) y esta resultó ser de aproximadamente  $2.8 \pm 0.5$  nmoles  $O_2$ /min/mg proteína, manteniéndose constante entre las 2 y las 14 horas de incubación.

#### 4.6 Actividad de citocromo oxidasa en mitocondrias de embriones de semillas de soja en distintos tiempos de incubación.

La figura 24 muestra una curva que representa la variación en la concentración de citocromo c reducido en función del tiempo de su oxidación aeróbica catalizada por la citocromo oxidasa. La variación de la absorbancia del ferrocitocromo c en función del tiempo, en este sistema espectrofotométrico, obedece a una cinética de reacción de primer orden con respecto a la concentración de ferrocitocromo c. La actividad de citocromo oxidasa medida por este

método se expresa en términos de constantes de velocidad de primer orden (Smith y Conrad, 1956; Wharton y Griffiths, 1962). En la figura 25 se expresa la constante de velocidad de primer orden  $K(\text{min}^{-1})$  en función de la cantidad de proteína mitocondrial a distintos tiempos de incubación de los embriones. Se observa que la velocidad de reacción es mayor para la misma cantidad de proteína mitocondrial a medida que avanza el tiempo de incubación. En la figura 26 se determina la actividad de la citocromo oxidasa como  $K'$  que es la constante de la reacción de pseudoprimer orden,  $K$ , referida a mg de proteína mitocondrial ( $K' = K/\text{mg proteína}$ ;  $K'$  se expresa en  $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$ ) en función del tiempo de incubación. Se observa que a las 4 horas la actividad de la citocromo oxidasa es 157% mayor que a las 2 horas y a las 14 horas es 373% mayor respecto de las 2 horas. Se determinó la cantidad de proteína mitocondrial por eje embrionario en base a la relación de actividades de citocromo oxidasa en el homogenado y en las mitocondrias aisladas. Este valor es a las 4 horas 1.98 veces mayor que a las 2 horas y 3.2 veces mayor a las 14 horas respecto de las 2 horas (Fig.27).

#### 4.7 Masa mitocondrial y respiración de ejes embrionarios de semillas de soja en distintos estadios de incubación.

En la Tabla 14 se observa el valor de la masa mitocondrial calculada (columna III) de acuerdo con los valores de la actividad de la citocromo oxidasa en las mitocondrias aisladas (columna I) y en el homogenado (columna II). Con los datos obtenidos de los valores del consumo de oxígeno de las mitocondrias aisladas de los ejes embrionarios (Fig.22) y los valores del contenido de proteína mitocondrial (Fig.27) en distintos tiempos de incubación, se calculó el máximo

consumo de oxígeno mitocondrial (columna V). El consumo' de oxígeno mitocondrial calculado de esta forma fue 1.2 veces mayor a las 4 horas y 1.8 veces mayor a las 14 horas respecto de las 2 horas de incubación.

Con esos resultados se determinó el máximo porcentaje del consumo de oxígeno de origen mitocondrial (columna VII) respecto al consumo de oxígeno total determinado en los embriones enteros (columna VI y Fig.19) y se observa que el 40-46% de la respiración total podría como máximo ser de origen mitocondrial siendo el resto del consumo de oxígeno de origen extramitocondrial, pudiendo ser debido a la acción de fenoloxidasas, lipoxigenasas, etc.

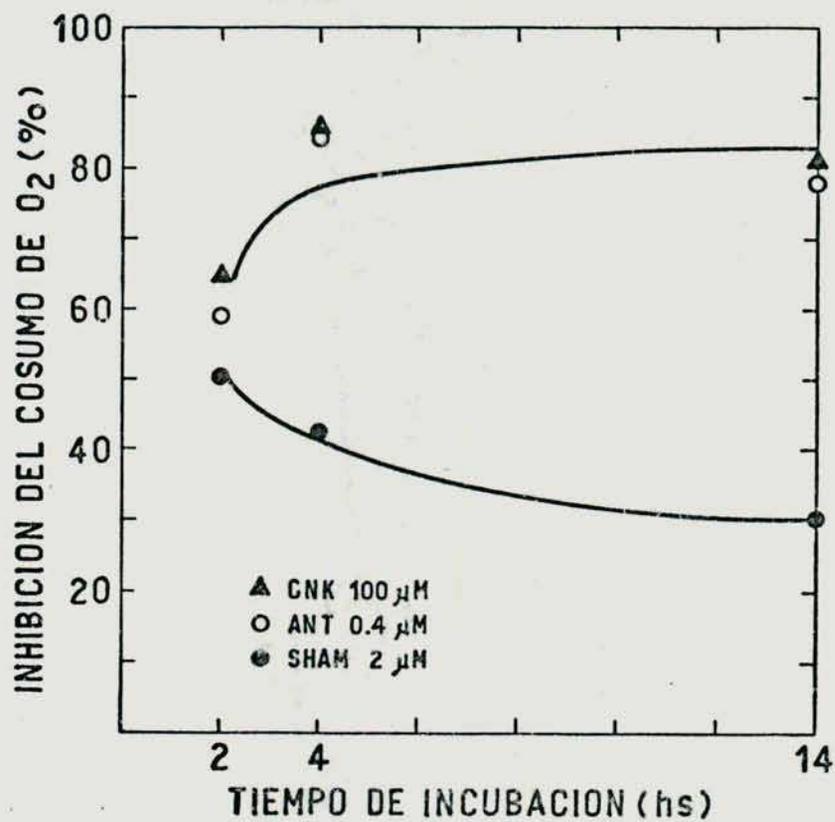


Fig.23. Inhibición por cianuro, antimicina y SHAM del consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de embriones de semillas de soja en función del tiempo de incubación.

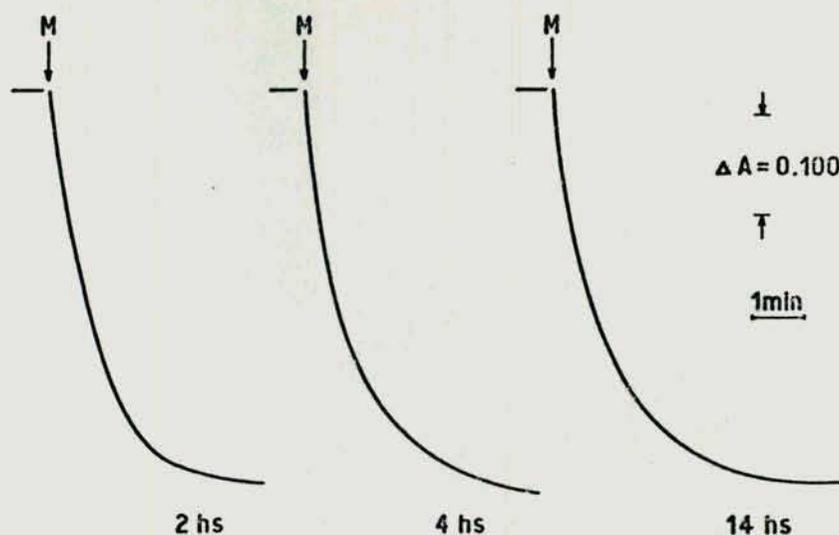


Fig.24. Determinación de la actividad de citocromo oxidasa. Trazados que muestran la determinación espectrofotométrica de la oxidación del ferrocitocromo  $c$  a 550 nm. M: mitocondrias de embriones de soja en distintos tiempos de incubación.

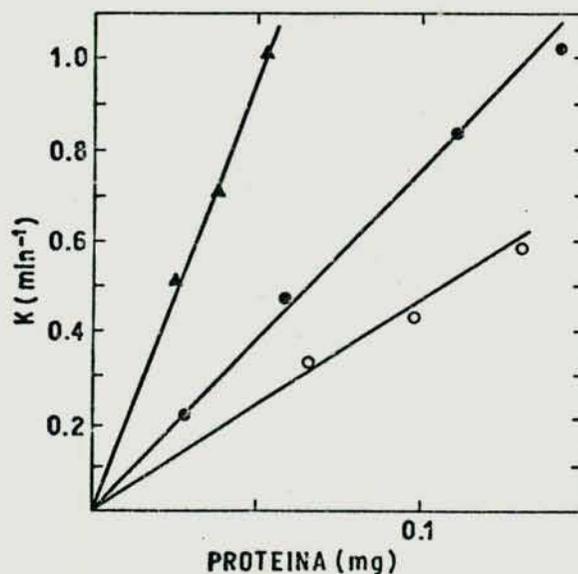


Fig.25. Dependencia de la constante de reacción de primer orden  $K$ ; de la cantidad de proteína mitocondrial de embriones de semillas de soja en distintos tiempos de incubación. ( o ) 2 hs, ( ● ) 4 hs y ( ▲ ) 14 hs.

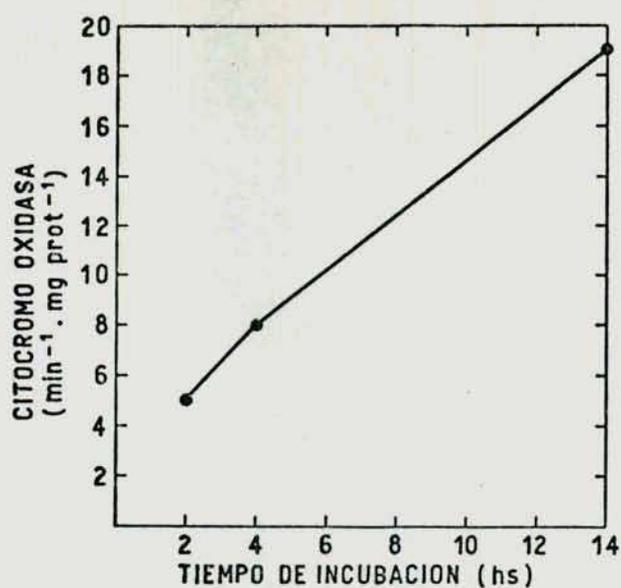


Fig.26. Actividad de citocromo oxidasa ( $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$ ) de mitocondrias de embriones de soja en distintos tiempos de incubación.

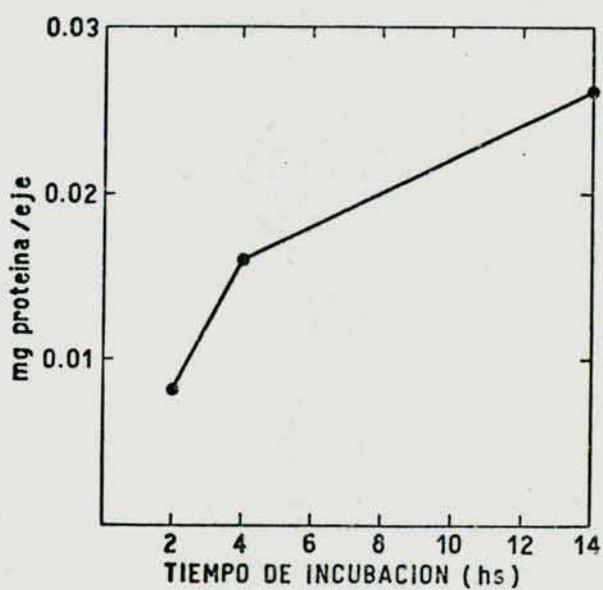


Fig.27. Cantidad de proteína mitocondrial/eje (mg prot./eje) en función del tiempo de incubación.

TABLA 14. MASA MITOCONDRIAL Y RESPIRACION DE EJES EMBRIONARIOS DE SOJA

Tiempo de incubación (horas)	Actividad de citocromo oxidasa Mitochondrias $K^M \text{ min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$	Homogenado $K^H \text{ min}^{-1} \cdot \text{eje}^{-1}$	Masa Mitochondrial Calculada (mg prot./eje)	Masa Mitochondrial Aislada (mg prot./eje)	Consumo de $O_2$ Mitochondrial Calculado ( $\mu\text{l } O_2/\text{h/eje}$ )	Consumo de $O_2$ Determinado ( $\mu\text{l } O_2/\text{eje/h}$ )	Consumo de $O_2$ Mitochondrial (%)
2	5.1	1.25	0.25	0.008	2.6	5.7	46
4	8.0	1.83	0.23	0.016	3.1	8.2	38
14	19.5	4.99	0.27	0.026	4.6	10.7	43

5. ACTIVIDAD DE OXIDASA ALTERNATIVA  
Y RESPIRACION EN MITOCONDRIAS AISLADAS  
DE RAICES DE MAIZ

### 5.1 Respiración mitocondrial y sensibilidad a inhibidores en raíces de maíz.

Las mitocondrias aisladas de raíces de plantas de maíz cultivadas en un medio hidropónico (Epstein, 1972) mostraron velocidades de consumo de oxígeno que pueden considerarse normales para la actividad respiratoria de mitocondrias vegetales. En el estado activo (estado "3") y en presencia de succinato-glutamato como sustrato este consumo de oxígeno fue de 84 nmoles  $O_2$ /min/mg de proteína. El grado de acoplamiento entre la fosforilación y la oxidación resultó aceptable ya que las mitocondrias tenían un control respiratorio de 1.7 (84/49 nmoles  $O_2$ /min/mg proteína; Tabla 15).

La sensibilidad al cianuro (0.1 mM) fue de 68%, a la antimicina 46% y al SHAM 49%. La actividad de la oxidasa alternativa calculada de acuerdo al consumo de oxígeno insensible al cianuro 0.1 mM y a la antimicina y sensible al SHAM, resultó de 34 nmoles  $O_2$ /min/mg proteína. Este valor da cuenta del 41% del consumo de oxígeno total y resulta comparativamente, una alta actividad de oxidasa alternativa.

### 5.2 Sensibilidad al cianuro en mitocondrias aisladas de semillas de maíz.

En la figura 28 se observa el efecto del cianuro sobre la respiración de mitocondrias aisladas de raíces de maíz. Cuando la concentración de cianuro es de 20  $\mu$ M se obtiene el 50% del efecto máximo inhibitorio (40 nmoles  $O_2$ /min/mg proteína) y a concentraciones saturantes de cianuro (0.2-1 mM) queda una respiración residual resistente que da cuenta del 17% del consumo de oxígeno.

En la misma figura se grafica el porcentaje de inhibición en función de la concentración de cianuro.

### 5.3 Sensibilidad a la antimicina y al SHAM en mitocondrias aisladas de raíces de maíz.

En la figura 29 se grafica el efecto de la antimicina sobre el consumo de oxígeno de las mitocondrias mencionadas, y se observa una inhibición igual al 50% (46.5 nmoles  $O_2$ / min/mg proteína) a una concentración de 0.35  $\mu M$  de antimicina. El consumo de oxígeno residual a concentraciones saturantes de antimicina (0.6-1.0  $\mu M$ ) da cuenta del 43% del consumo de oxígeno total.

La inhibición del consumo de oxígeno por antimicina en presencia de 2 mM de SHAM aumenta considerablemente. El 50% del efecto máximo de inhibición se produce a una concentración de 0.1  $\mu M$  de antimicina, siendo el consumo de oxígeno de 34.5 nmoles/min/mg proteína. A concentraciones saturantes de antimicina (0.4-1.0  $\mu M$ ) queda una respiración residual del 15%.

Los porcentajes de inhibición en el consumo de oxígeno en función de la concentración de antimicina con y sin el agregado de SHAM se grafica en la figura 30. O sea, se observa un marcado aumento de la sensibilidad y la afinidad a la antimicina en presencia de SHAM.

Se estudió la sensibilidad al SHAM en el consumo de oxígeno de las mitocondrias aisladas de raíces de maíz. Se observa en la figura 31 que el SHAM inhibe la respiración mitocondrial en un 50% (55 nmoles  $O_2$ / min/mg proteína) a una concentración de 1.8 mM y a concentraciones de 4 mM de SHAM da cuenta de un consumo de oxígeno residual del 25%.

El agregado de antimicina 0.6  $\mu M$  aumentó la sensibilidad al SHAM obteniendo el 50% de inhibición (25 nmoles  $O_2$ / min/mg proteína)

a una concentración de 0.6 mM. A una concentración 4 mM de SHAM se observa una inhibición total del consumo de oxígeno.

La figura 32 muestra los porcentajes de inhibición en el consumo de oxígeno por el efecto del SHAM en presencia y ausencia de antimicina.

Se hicieron los gráficos de Dixon donde se graficó la inversa del consumo de oxígeno en función de la concentración de los inhibidores (Fig. 33 y 34) y se obtuvieron los valores de  $K_i$  de 0.6  $\mu$ M sin el agregado de SHAM y de 0.15  $\mu$ M con el agregado de SHAM 2 mM para la antimicina y para el SHAM de 1.4 mM sin el agregado de antimicina y de 0.55 mM con el agregado de antimicina 0.6  $\mu$ M.

TABLA 15. ACTIVIDAD MITOCONDRIAL Y DE OXIDASA ALTERNATIVA Y SENSIBILIDAD A INHIBIDORES DE LA RESPIRACION EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE RAICES DE SEMILLAS DE MAIZ.

Sustrato	Consumo de Oxígeno nmoles $O_2$ /min/mg proteína	I%
Succinato-glutamato		
Estado "4"	49.0	
Estado "3"	84.0	
+ CNK 100 M	27.0	68.0
+ CNK 100 M + SHAM 2 mM	6.4	92.0
+ SHAM 2 mM	43.0	49.0
+ Antimicina 0.6 $\mu$ M	45.0	46.0
+ Antimicina 0.6 $\mu$ M + SHAM 2 mM	10.7	87.0
Actividad de oxidasa alternativa	34.0	

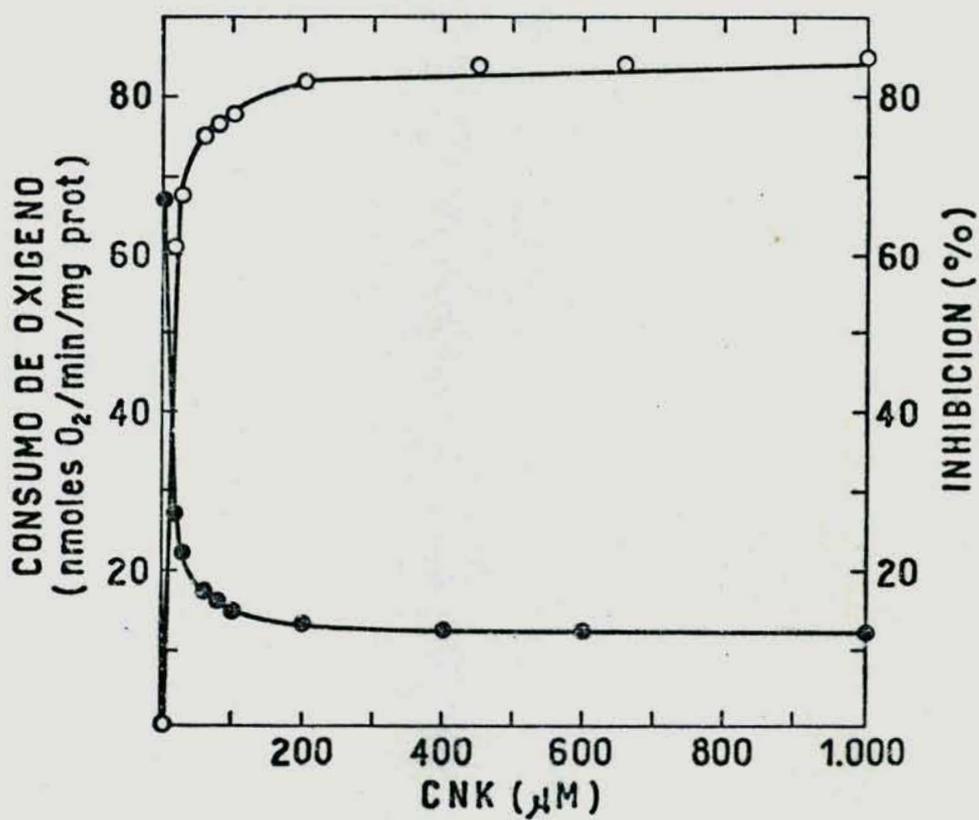


Fig.28. Efecto del cianuro sobre la respiración en estado "3" de mitocondrias aisladas de raíces de semillas de maíz. Consumo de oxígeno (●); inhibición % (○).

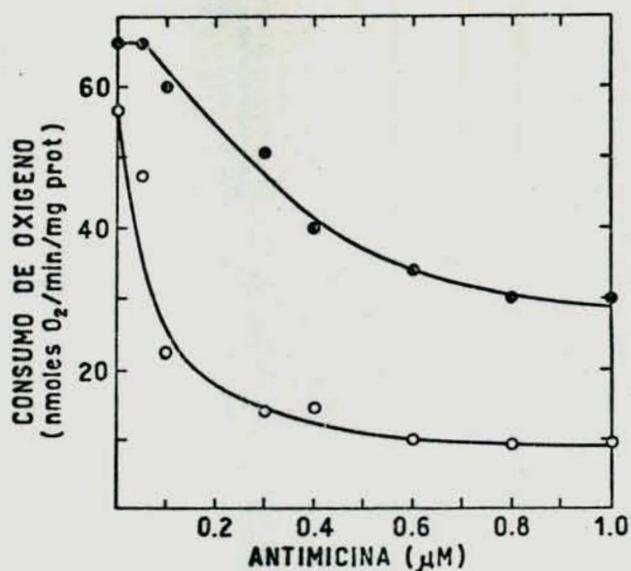


Fig. 29. Efecto de la antimicina sobre la respiración en estado "3" de mitocondrias aisladas de raíces de semillas de maíz, sin ( ● ) y con agregado de SHAM ( ○ ).

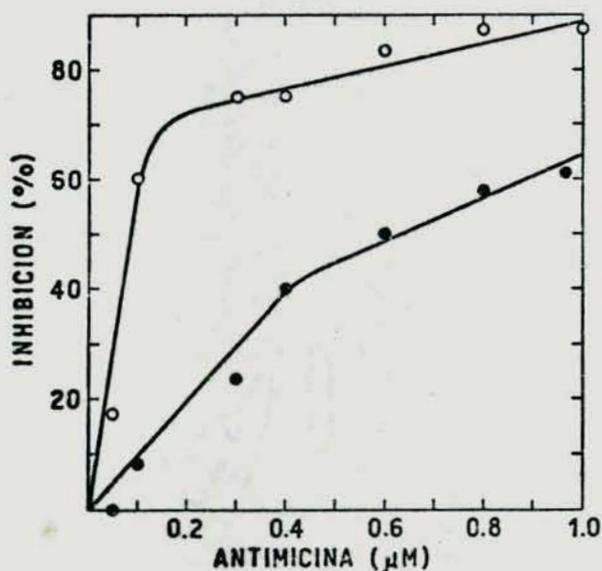


Fig. 30. Porcentaje de inhibición por efecto de la antimicina sobre la respiración en estado "3" de mitocondrias aisladas de raíces de semillas de maíz, sin ( ● ) y con ( ○ ) agregado de SHAM 2 mM.

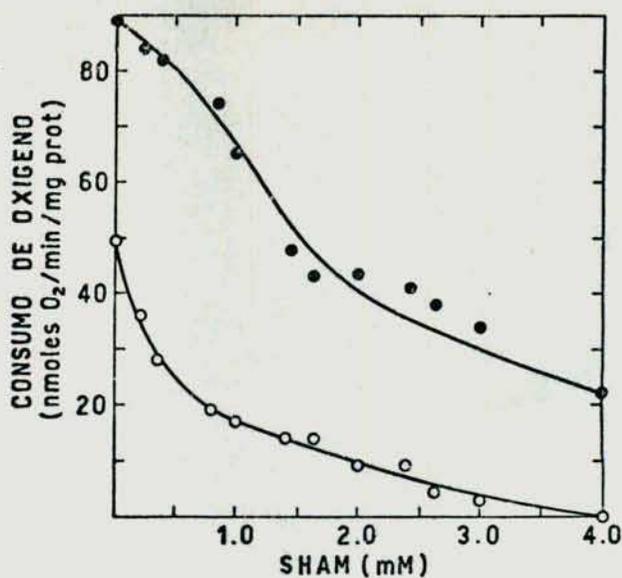


Fig.31. Efecto del SHAM sobre la respiración en estado "3" de mitocondrias aisladas de raíces de semillas de maíz, sin ( ● ) y con ( ○ ) agregado de antimicina 0.6  $\mu$ M.

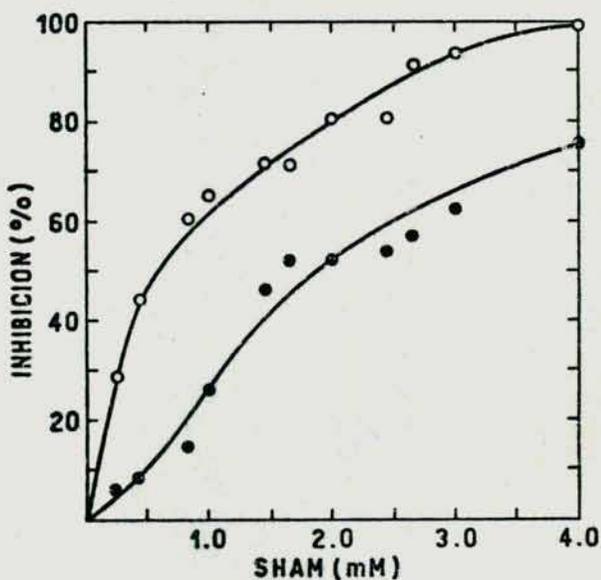


Fig.32. Porcentaje de inhibición por efecto del SHAM sobre la respiración en estado "3" de mitocondrias aisladas de raíces de semillas de maíz sin ( ● ) y con ( ○ ) agregado de antimicina 0.6  $\mu$ M.

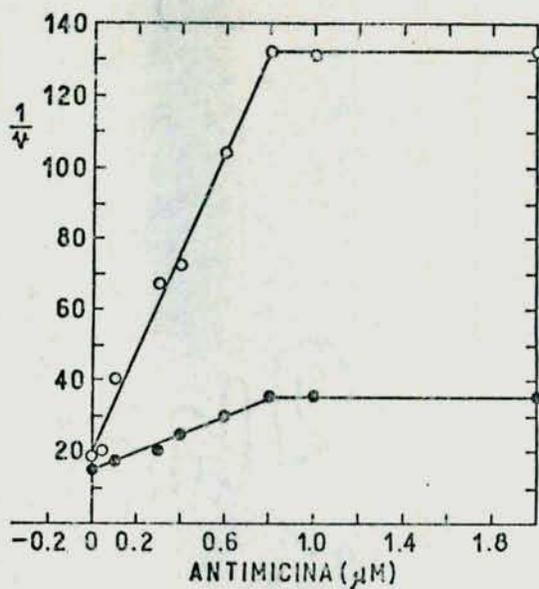


Fig.33. Gráfico de Dixon de la inhibición del transporte de electrones por antimicina en ausencia ( ● ) y presencia ( ○ ) de SHAM, en mitocondrias aisladas de raíces de semillas de maíz.

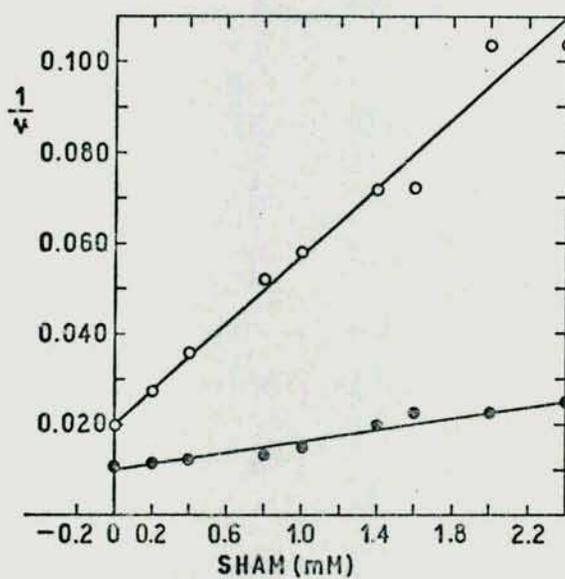


Fig.34. Gráfico de Dixon de la inhibición del transporte de electrones del camino alternativo por SHAM en ausencia ( ● ) y presencia ( ○ ) de antimicina, en mitocondrias aisladas de raíces de maíz.

## 6. DISCUSSION

### 6.1 La oxidasa alternativa

En la última década, y estimulada por el interés en el papel fisiológico de la oxidasa alternativa, se realizaron diversos estudios para determinar la naturaleza química de la oxidasa alternativa y su producto de reacción.

Bendall y Bonner (1971) sugirieron que una hierro-sulfoproteína, con hierro no hemínico, era un componente del camino alternativo y que esa hierro-sulfoproteína sería la inhibida por los ácidos hidroxámicos. Palmer (1976) consideró a los quelantes de hierro como inefectivos en quelar el hierro de la ferredoxina, que es una típica hierro-sulfoproteína, no hemínica poniendo dudas sobre el concepto anterior.

Huq y Palmer (1978a) aislaron una fracción con actividad de oxidasa alternativa de mitocondrias de espádice de Arum maculatum, los que son muy resistentes al cianuro. En esta preparación no pudo evidenciarse señal espectroscópica de algún citocromo u otras especies visibles, ni tampoco de especies identificables por EPR, tales como hierro-sulfoproteínas. Esto parece dar evidencia directa que la oxidasa alternativa no es ni un citocromo ni una hierro-sulfoproteína (Bendall y Bonner, 1971; Rich y Bonner, 1978a).

También, Huq y Palmer (1978a) sugirieron la presencia de una flavoproteína no fluorescente en la fracción de oxidasa alternativa aislada por ellos consistente con una participación de tal flavoproteína en el camino alternativo (Storey, 1976). La presencia de Cu sería consistente con la sugerencia de que estaría involucrada una metalo-enzima, sin embargo no fue posible detectar una señal de Cu por EPR (Huq y Palmer, 1978a).

Simultáneamente, Bonner y Rich (1978a) llegan a la conclusión que la oxidasa es una especie de ubiquinona o un componente que no se detecta ni por EPR ni por espectroscopía óptica y que facilita la interacción de las especies de ubiquinona con el oxígeno. Rich y Bonner (1978a) solubilizaron la oxidasa alternativa de mitocondrias de Arum maculatum y demostraron la existencia de una proteína capaz de oxidar quinoles a quinonas en una reacción insensible al cianuro y sensible a hidroxamatos.

Actualmente hay poca información que pueda considerarse definitiva acerca de la naturaleza química de la oxidasa alternativa.

De acuerdo con estudios realizados para determinar el sitio de acción de la oxidasa alternativa se llegó al acuerdo general que a nivel de la ubiquinona es donde el camino alternativo se ramifica de la cadena respiratoria principal. De acuerdo al ciclo de ubiquinona propuesto por Rich y Moore (1976) y revisado por Rich y Bonner (1978a), el punto de ramificación del camino alternativo sería un conjunto discreto de ubiquinonas localizado en la región de la succinato deshidrogenasa de la cadena respiratoria. En una serie de mitocondrias de plantas, así como en mitocondrias animales, fue observada la existencia de un componente paramagnético, detectable por EPR, que parece ser la ubisemiquinona (Rich y Moore, 1977), y es visto como una señal de ruptura a  $g=2$  que se relaja rápidamente. Esta señal se atribuyó a una especie de ubisemiquinona la cual produce una rápida relajación debido a su proximidad al centro S-3 de la succinato deshidrogenasa. La ruptura del acoplamiento paramagnético se produ-

ce por una segunda especie de ubisemiquinona que se relaja mucho más rápidamente la cual también está en íntima proximidad. De toda la evidencia acumulada se sugiere que la oxidasa alternativa media la reducción del oxígeno por una de esas especies de ubisemiquinona.

Rich y Bonner (1978a) estudiaron por EPR los cambios redox que se producen en el centro S-3 (que es un centro de hierro-sulfoproteína, que es paramagnético en estado oxidado) en una variedad de condiciones de estado estacionario y mostraron que las mitocondrias de plantas superiores que tienen actividad de oxidasa alternativa tienden a mantener este centro oxidado en presencia de succinato y cianuro. Los estudios fueron realizados con mitocondrias aisladas de espádice de Symplocarpus foetidus y Sauromatum gutatum que tienen alta actividad de oxidasa alternativa.

Rich y col. (1978) hicieron algunas deducciones a partir de experimentos de estado estacionario concernientes a la relación entre el centro S-3 y el camino de oxidación del NADH externo. En contraste el trabajo de Solomos (1977), el camino de oxidación del NADH externo involucra parte del conjunto de quinonas. Esto explica la relación P:O observada de 2 con NADH externo (Palmer, 1976) y es sostenido por el hecho que el NADH externo puede hacer aparecer la señal de la ubisemiquinona en estudios de EPR (Rich y col., 1978).

En mitocondrias de tubérculos de papa y de hipocótilos de porotos, el centro S-3 no fue notablemente reducido por NADH y esto sugiere que dicho centro no está involucrado en el transporte de electrones con NADH como sustrato. En mitocondrias aisladas de Sauromatum gutatum y Symplocarpus foetidus, se observó poca reducción

del centro S-3. El ácido salicílic hidroxámico, como se detectó por EPR, no afectó el centro S-3 en mitocondrias de plantas; de donde se deduce que es altamente improbable que un efecto quelante del hierro sobre esos centros Fe-S sea responsable de la inhibición o que ese centro sea el sitio de reducción alternativa del oxígeno.

Las propiedades del acoplamiento entre la oxidación y la fosforilación, asimismo como el mecanismo de la fosforilación oxidativa de las mitocondrias de mamíferos, fueron explicadas por la teoría quimiosmótica. El funcionamiento de la ubiquinona en la cadena respiratoria fue explicado por la propuesta del ciclo protomotriz de la ubiquinona (Mitchell, 1975). Ingledew y Ohnishi (1975) sugirieron que la reducción catalizada por la succinato deshidrogenasa es de  $QH^+$  a  $QH_2$  en mitocondrias de mamíferos.

Trabajos de EPR (Rich y Moore, 1976; Rich y col., 1977) sugieren que esa situación es similar para mitocondrias de porotos y apoyan la hipótesis de que el camino alternativo produce la oxidación de  $QH_2$  a  $QH^+$  (Fig.35).

Para determinar la naturaleza del producto de reducción del oxígeno en el camino alternativo se realizaron estudios; si el proceso de reducción implica la transferencia de cuatro electrones se produce agua, si el proceso transfiere dos electrones se produce  $H_2O_2$  y si se transfiere un electrón se produce anión superóxido (Rich y col., 1976). En mitocondrias intactas de hipocótiles de poroto japonés, no se pudo detectar  $H_2O_2$  durante la operación del camino alternativo, pero en partículas submitocondriales preparadas de esas mismas mitocondrias la producción de  $H_2O_2$

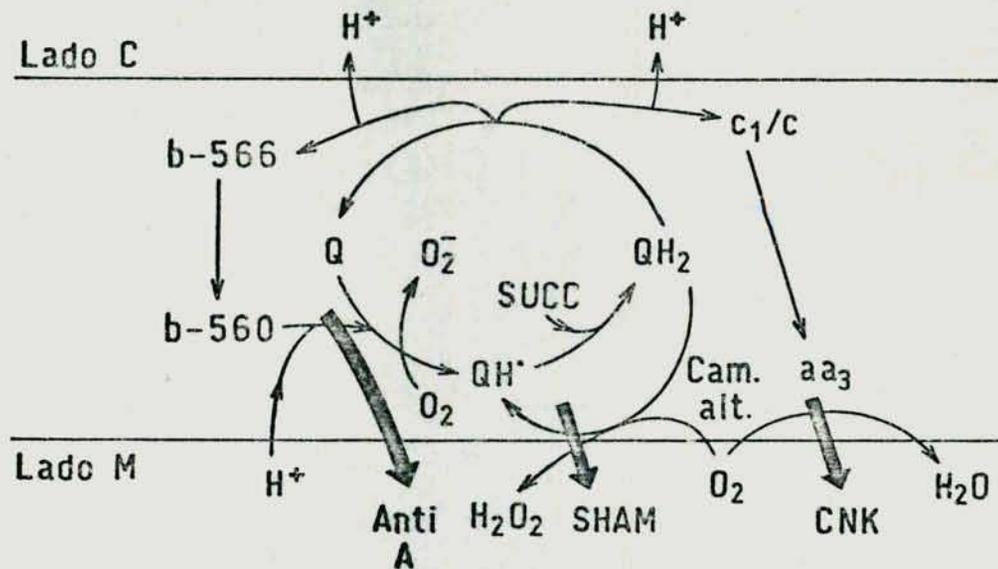


Fig.35. Esquema del ciclo protomotriz de la ubiquinona para el transporte de electrones en mitocondrias de plantas superiores (Rich y Moore, 1976; Rich y col.,1977).

dio cuenta del consumo de oxígeno por las partículas durante la operación del camino alternativo. Aparentemente el  $H_2O_2$  sería el producto de la reducción del oxígeno por la actividad de la oxidasa alternativa y las mitocondrias intactas contendrían cantidades significativas de catalasa y de peroxidasa y dadores de hidrógeno para la peroxidasa, con lo que podrían utilizar el  $H_2O_2$  producida por el camino alternativo y evitar su acumulación.

Huq y Palmer (1978b) trabajando con partículas submitocondriales de mitocondrias de Arum maculatum no pudieron confirmar las observaciones de Rich y col. (1976) y sugirieron que el  $H_2O_2$  y el anión superóxido que son producidos por partículas submitocondriales de Arum maculatum no son debidos a la oxidasa alternativa sino a otro componente de la cadena respiratoria, posiblemente a nivel de la NADH deshidrogenasa.

La conclusión de estos experimentos es que la oxidasa alternativa parece reducir sólo parcialmente al oxígeno, pero no está claro si esta reducción es de uno, dos o cuatro electrones, tampoco está claro si el  $H_2O_2$  fue producido directamente o vía la reacción de superóxido dismutasa (Mc Cord y Fridovich, 1969). Con el propósito de resolver este problema se hicieron experiencias para determinar los sitios a lo largo de la cadena respiratoria donde se producen aniones superóxido. La mayor parte de anión superóxido se produjo cuando a las mitocondrias se les agregó NADH exógeno como sustrato. La actividad de este NADH fue insensible al cianuro, a la antimicina y al ácido salicilhidroxámico (Boveris y col., 1979). Dichos resultados sugieren que la producción de anión superóxido proviene de la reducción directa del oxígeno por la flavoproteína NADH-deshidrogenasa la cual está localizada en la superficie externa de la membrana interna (Douce y col., 1973). Con succinato como sustrato la producción de superóxido es casi negligible y probablemente proviene de la reducción del oxígeno en la región de ubiquinona citocromo b de la cadena respiratoria. La conclusión de esos resultados es que la oxidasa alternativa puede producir peróxido de hidrógeno o agua a través de la reducción del oxígeno pero no anión superóxido.

De acuerdo con los resultados obtenidos, Sánchez y col. (1979)

han propuesto un esquema de los sitios de reducción del oxígeno en la cadena respiratoria de mitocondrias de plantas como se indica en la figura 16.

Para el estudio de la actividad de la oxidasa alternativa ha sido decisivo el uso de inhibidores como los ácidos hidroxámicos que se han considerado como específicos para dicha actividad. Los ácidos hidroxámicos fueron utilizados como inhibidores de la oxidasa alternativa por Schonbaum y col. (1971).

Según Bonner y Rich (1978) puede suponerse que la inhibición de la oxidasa alternativa por hidroxamato (por analogía con otras enzimas redox), es por competición con el sustrato reducido en el sitio de unión sobre la enzima. Parece claro que los ácidos hidroxámicos no actúan inhibiendo sobre el lado del oxígeno de la oxidasa alternativa como se suponía (Bonner y Rich, 1978).

Los hidroxamatos no son específicos de la oxidasa alternativa como se pensó inicialmente, sino que son poderosos inhibidores de otras enzimas redox como la peroxidasa (Schonbaum, 1973) y la tirosinasa (Rich y col., 1978; Boveris y col., 1978). Investigaciones sobre el modo de inhibición de hidroxamatos sobre esas enzimas mostraron que la inhibición es competitiva con respecto a la concentración de sustrato y no competitiva con respecto a la concentración de oxígeno (Bonner y Rich, 1978). Esos hallazgos son consistentes con el hecho de que la inhibición de la oxidasa alternativa es también no competitiva con respecto al oxígeno (Rich y col. 1978) y donde la  $K_i$  aparente es dependiente del flujo de electrones (Tomlinson y Moreland, 1975). Si se considera que el sustrato para la oxidasa alternativa es una forma reducida de la ubiquinona, la analogía entre esta oxidasa, peroxidasa y tirosinasa parece ser muy

próxima. Fue sugerido por Schonbaum (1973) que la unión reversible de los hidroxamatos a la peroxidasa puede ser por uniones de hidrógeno polifuncionales y quizás ocurra lo mismo con la tirosinasa y la oxidasa alternativa. Sin embargo, es también posible que una cesión parcial de electrones pueda tener lugar entre el hidroxamato y un grupo aceptor en la enzima formando así un "complejo de transferencia de carga" (Bonner y Rich, 1978). El mecanismo exacto de unión y de acción de los hidroxamatos requiere posteriores investigaciones para ser aclarado.

#### 6.2 La actividad de oxidasa alternativa en mitocondrias de tubérculos de papa frescos y envejecidos

Durante la incubación aeróbica de discos de tubérculos de papa en una cámara húmeda se produce el envejecimiento de los discos, donde se inicia la ruptura de los carbohidratos siguiendo la vía glucolítica y el ciclo de pentosas y se incrementa la actividad de varios otros caminos metabólicos que funcionan a bajo nivel en los órganos intactos, por ejemplo, el ciclo del ácido tricarboxílico, la biosíntesis de ácidos grasos y esteroides, etc. y además se produce un incremento en la masa mitocondrial (Kahl, 1973).

En nuestro trabajo observamos un aumento de la respiración mitocondrial en las mitocondrias aisladas y de la proteína mitocondrial aislada. Las mitocondrias aisladas mostraron una disminución en el control respiratorio y observamos también un aumento de superóxido dismutasa.

Del análisis de los datos de la Tabla 6 y de las figuras 12 y 13, resulta aparente que hay más de un sistema alternativo que consume oxígeno en las mitocondrias aisladas de tubérculos de papa. Uno de ellos produce  $O_2^-$ , es resistente a la antimicina y sensible al CNK y al SHAM; otro es el que usualmente se refiere como la oxidasa alter-

nativa, resistente a la antimicina y al cianuro pero sensible al SHAM; este sistema aparentemente produce  $H_2O_2$  (Rich y col., 1976) pero sin la participación de  $O_2^-$  como un producto intermedio. Hay todavía evidencia para otro sistema que consume oxígeno, inhibido por cianuro y resistente a la antimicina y al SHAM.

Se determinó la producción de anión superóxido para observar si era el producto primario de la oxidasa alternativa como habían propuesto Bonner (1977) y Solomos (1977) y se observó que la producción de  $O_2^-$  en las mitocondrias aisladas de tejido envejecido de tubérculos de papa, representa solamente una pequeña fracción del consumo de oxígeno total. Otros autores también lo comprobaron experimentalmente; así Rich y Bonner (1978) que trabajaron con partículas submitocondriales aisladas de hipocótilos de poroto japonés (Phaseolus aureus) de Arum maculatum y de repollo zorrino (Symplocarpus foetidus) y Huq y Palmer (1978b) que trabajaron con partículas submitocondriales de espádices de Arum maculatum, que desarrollan alta actividad de oxidasa alternativa, llegaron a la misma conclusión, esto es, que el  $O_2^-$  no es el producto primario de la oxidasa alternativa. Un resumen de estas investigaciones destinadas a relacionar la producción de  $O_2^-$  con la actividad de oxidasa alternativa está dado en la Tabla 16 (Sánchez y col., 1979).

Para calcular la relación (Producción de  $O_2^-$ ) / (Consumo de  $O_2$ ) es necesario tener en cuenta que en mitocondrias de papa tienen lugar las siguientes reacciones:



TABLA 16. PRODUCCION DE ANION SUPEROXIDO Y ACTIVIDAD DE OXIDASA ALTERNATIVA EN MITOCONDRIAS Y PARTICULAS SUBMITOCONDRIALES DE TEJIDOS VEGETALES.

	Producción de $O_2^-$ (nmoles/min/ mg prot. )	Actividad de oxidasa alternativa(nmoles $O_2^-$ / min/mg prot.)#	Ref.
<u>Mitocondrias</u>			
Tubérculos de papa, frescos	15	7	1
Tubérculos de papa, Incubados 24 hs	16	57	1
Tubérculos de papa, incubados 48 hs	13	111	1
Repollo zorrino ( <i>Symplocarpus foetidus</i> )	8	141	2
Espádice de <i>Arum maculatum</i>	2	758	2
Plántulas de soja	4	14	
<u>Partículas submitocondriales</u>			
Espádice de <i>Arum maculatum</i>	7-8	556-300	2,3
Hipocótiles de porotos	10	167	2

# Medida como el consumo de oxígeno en la presencia de succinato o de NADH como sustratos y antimicina.

1. Boveris y col. (1978); 2. Rich y Bonner (1978); 3. Huq y Palmer (1978b).

Un camino catalizado por superóxido dismutasa y catalasa resultará en la producción de  $4 O_2^-$  por  $O_2$  consumido, mientras que un camino catalizado por SOD y peroxidasa producirá  $2 O_2^-$  por  $O_2$  consumido. Considerando que la ecuación (10) prevalece absolutamente sobre la ecuación (9), la producción de  $O_2^-$  en tubérculos de papa daría cuenta solamente de un 7-12% de la respiración resistente a la antimicina y menos aún si algo del  $H_2O_2$  producida es descompuesta por la catalasa (reacción 9), más aún la producción de  $O_2^-$  no es suficiente para tenerlo en cuenta como intermediario de la actividad de la oxidasa alternativa.

Aunque la producción de  $O_2^-$  representa una pequeña fracción del consumo de oxígeno total de las mitocondrias de papa, sin embargo, su importancia fisiológica potencial no es para ser omitida ya que el  $O_2^-$  es una especie extremadamente reactiva (Fridovich, 1974; Chance y col., 1979). La interacción de  $O_2^-$  con  $H_2O_2$  puede producir  $OH^\cdot$  capaz de comenzar reacciones en cadena con un alto efecto amplificante (Chance y col., 1979).

Se puede especular acerca del impacto fisiológico de la producción incrementada de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  en el tejido envejecido. Entre los posibles efectos, puede ser considerada una más rápida peroxidación de lípidos (Kellog y Fridovich, 1977; Chin y Frenkel, 1976; Chance y col., 1979).

La incrementada formación de lípidos y peróxidos orgánicos puede disminuir la relación NADPH/NADP (Chance y col., 1979) y puede ayudar para explicar el incremento observado en la actividad del camino de pentosa fosfato (Kahl, 1973) en el tejido de tubérculo de papa envejecido.

Durante la incubación de cortes de tubérculos de papa en una

atmósfera húmeda (envejecimiento) se obtiene síntesis de mitocondrias con un aumento de la actividad de la oxidasa alternativa que va desde 2-56% del consumo de oxígeno total (Tabla 7) entre las 0 y 48 horas de incubación, mostrando estas mitocondrias un bajo acoplamiento entre la fosforilación y la oxidación.

### 6.3 La actividad de oxidasa alternativa, en mitocondrias de embriones y ejes embrionarios de soja.

Wilson y Bonner (1971) en un trabajo clásico referente a la actividad mitocondrial de ejes embrionarios en la germinación y estudiando las mitocondrias aisladas de ejes embrionarios de maníes secos y en imbibición temprana encontraron que estas mitocondrias son deficientes en el citocromo c, el penúltimo aceptor de electrones de la cadena respiratoria, que la fosforilación está muy poco acoplada al consumo de oxígeno, siendo en esas condiciones la respiración ineficiente y muy baja la producción de ATP.

Esas diferencias existen hasta alrededor de las 16 horas del comienzo de la imbibición por los embriones, cuando la respiración otra vez se incrementa y comienza la elongación de la radícula. Las mitocondrias ahora comienzan a asumir las características normales de aquellas encontradas en plantas adultas, con un contenido normal de citocromo c y deshidrogenasa y una respiración acoplada más eficiente.

En nuestro trabajo realizado con ejes embrionarios de semillas de soja se encontró que el consumo de oxígeno se incrementó con el tiempo de incubación y que ese incremento fue paralelo al aumento del peso fresco de los embriones a diferentes tiempos de incubación. En el estudio del consumo de oxígeno mitocondrial se observó un marcado incremento entre las 2 y 14 horas de incubación y uno mucho

mayor a las 36 horas. El consumo de oxígeno mitocondrial fue mayor con el agregado de citocromo c; dicho efecto fue mayor a las 4 horas y disminuyó su efecto a medida que avanzó el tiempo de incubación. El control respiratorio fue bajo entre las 2 y 14 horas de incubación o sea que hubo poco acoplamiento respiratorio en los primeros estadios en las mitocondrias aisladas de ejes incubados aislados y fue mayor en mitocondrias aisladas de ejes incubados 36 horas en la semilla entera. También estudiamos la evolución de la masa mitocondrial de los embriones durante la germinación. Para esto usamos el método de la citocromo oxidasa (Beconi y col., 1979). En la determinación de la actividad de la citocromo oxidasa se observa un incremento entre las 2 y 14 horas de incubación. La masa mitocondrial aislada se incrementa con el tiempo de incubación. El consumo de oxígeno mitocondrial calculado y determinado experimentalmente aumentaron entre las 2 y 14 horas de incubación.

Con los datos obtenidos se determinó el porcentaje del consumo de oxígeno de origen mitocondrial y este valor osciló entre 40-46% del consumo de oxígeno total.

El aumento de la proteína mitocondrial con el tiempo de incubación puede ser utilizado en completar las mitocondrias preexistentes o en sintetizar nuevas mitocondrias.

Wilson y Bonner (1971) sugirieron que el incremento en la respiración y la eficiencia respiratoria durante el crecimiento de embriones de maníes están asociados con la síntesis de nuevas mitocondrias, más que con la modificación de aquellas que funcionan durante la imbibición temprana.

Estudios de microscopía electrónica sobre la germinación de

embriones de arroz, también sugieren la biosíntesis de mitocondrias después de la toma de agua (Hallam y col., 1972).

Yoo (1970) observó que las crestas son más definidas en las mitocondrias de embriones de arvejas antes de la germinación visible.

Klein y col. (1971) hicieron estudios de microscopía electrónica sobre ejes de porotos y observaron que no hay cambios en la estructura o número de mitocondrias antes de la germinación visible. Ninguna de las observaciones hechas a partir de estudios de microscopía electrónica tienen alguna evidencia bioquímica sustancial para afirmarlos y esas afirmaciones no proveen suficiente evidencia para la biogénesis mitocondrial o reparación mitocondrial. Parece que hay desarrollo de nueva actividad mitocondrial después que ha ocurrido la imbibición, pero el modo de desarrollo de esas actividades y su regulación son todavía desconocidos.

Sobre la base de la acción del cianuro y de los ácidos hidroxámicos en la respiración y la germinación de semillas de soja, se ha postulado que durante las primeras etapas de la germinación el consumo de oxígeno se produce principalmente por la oxidasa alternativa, cuya actividad sería esencial para la germinación y que recién después de las 12-15 horas de incubación predomina la actividad de la citocromo oxidasa (Yentur y Leopold, 1976).

Las mitocondrias aisladas de embriones de maníes entre 2 y 15 horas de incubación, fueron siempre inhibidas al menos en un 70% por CNK 100  $\mu$ M, de acuerdo con una buena actividad de citocromo oxidasa (Wilson y Bonner, 1971).

En nuestro trabajo se encontró que en mitocondrias aisladas de ejes embrionarios de semillas de soja, la inhibición por CNK y antimicina fue en promedio de 70-75% durante las primeras 14 horas de

incubación. Además la actividad de la oxidasa alternativa se mantuvo constante ( $2.8 \pm 0.4$  nmoles  $O_2$ /min/mg proteína) durante ese período de incubación (Beconi, 1979). O sea que la actividad de la oxidasa alternativa no contribuye en cantidad apreciable en el consumo de oxígeno contrariamente a lo propuesto por Yentur y Leopold (1976).

Este trabajo fue presentado en el Congreso de la S.A.I.B. en 1979, cuando posteriormente Parrish y Leopold publicaron un trabajo aduciendo ese exceso de consumo de oxígeno a la actividad de la lipoxigenasa. O sea, que el consumo de oxígeno inicial in vivo en semillas de soja molidas embebidas no es inhibido por CNK y es inhibido por hidroxamatos; y que esta aparente respiración puede ser debida en parte a la actividad de la lipoxigenasa, una enzima que cataliza la dioxigenación de ciertos ácidos grasos no saturados (Christopher y col., 1970).

La actividad de esta enzima es resistente al CNK y es inhibida por el ácido salicilhidroxámico y el propil galato, teniendo este último además la propiedad de ser antioxidante. Los autores proponen que la respiración inicial (consumo de  $O_2$ ) por tejido de soja molido es insensible al cianuro e inhibido por hidroxamatos, su- puesta evidencia para la respiración alternativa. Estos resultados muestran que el criterio usado a menudo como evidencia para la actividad de oxidasa alternativa puede confundirse en preparaciones que tienen actividad de lipoxigenasa. Llegan a la conclusión que una parte del consumo de oxígeno por partículas de soja embebidas es debido a la actividad de la lipoxigenasa y sugieren que la insensibilidad al cianuro en tejidos intactos no es una evidencia convincente para la respiración alternativa y tampoco lo es la

inhibición del consumo de oxígeno por ácidos hidroxámicos como el SHAM (Van der Plas y col., 1977; Yentur y Leopold, 1976). En trabajos posteriores (Siedow y Girvin, 1980), se estudió el consumo de oxígeno durante las primeras horas de imbibición, en semillas de soja y porotos con semillas enteras y molidas y con mitocondrias lavadas y purificadas por gradiente de sacarosa y se estudió la acción de inhibidores de la oxidasa alternativa y de la lipoxigenasa.

TABLA 17. SENSIBILIDAD A LOS INHIBIDORES EN EL CONSUMO DE OXIGENO EN SEMILLAS Y EN PARTICULAS DE SEMILLAS DE SOJA EMBEBIDAS.

Inhibidor	Concentración mM	CONSUMO DE OXIGENO	
		Partículas de semillas	Semillas embebidas
nmoles O <sub>2</sub> /g peso fresco/min			
Control		263	50
CNK	0.25	244	0
SHAM	5.0	195	46
Propil galato	0.5	97	47

Los resultados obtenidos (Siedow y Girvin, 1980) con partículas de semillas de soja, fueron similares a los informados por Parrish y Leopold (1978). Una alta velocidad de consumo de oxígeno fue observada la cual fue insensible al CNK (7% de inhibición) pero fue inhibida por SHAM (26%) o propil galato (63%). En semillas intactas, la velocidad de consumo de oxígeno fue menor del 20% de la observada con las partículas de semillas y 0.25 mM de cianuro inhibió completamente esta velocidad.

Alternativamente, ni 5 mM de SHAM, ni 0.5 mM de propil galato tuvieron un efecto apreciable (10% de inhibición) sobre la velocidad de consumo de oxígeno en semillas intactas. Esto también de acuerdo con el poco efecto del SHAM sobre la quimioluminiscencia de semillas enteras de soja, propiedad que los autores proponen como derivado de la actividad de la lipoxigenasa (Boveris y col. 1980).

Se supone que al moler las semillas antes de la imbibición, se liberan la lipoxigenasa y los sustratos adecuados no saturados de dicha enzima. Se demostró también que en mitocondrias lavadas de porotos y de soja había actividad de lipoxigenasa y en mitocondrias purificadas en gradiente de sacarosa no se encontró dicha actividad. Esto indicaría que la lipoxigenasa no está localizada dentro del sistema de membrana de la mitocondria (Siedow y Girvin, 1980).

El propil galato no puede ser usado para distinguir entre el consumo de oxígeno mediado por la lipoxigenasa y el del camino alternativo (Siedow y Girvin, 1980). Los autores no pueden explicar sus resultados con los de Yentur y Leopold (1976) quienes observaron considerable inhibición del consumo de oxígeno por SHAM e in-

sensibilidad al CNK durante las primeras horas de imbibición con semillas de soja.

En nuestro estudio de actividad de oxidasa alternativa no encontramos actividad apreciable en mitocondrias de embriones de soja incubados. Además la baja actividad encontrada no es debida a la lipoxigenasa porque los sustratos usados fueron succinato-glutamato y no ácido linoleico como sería requerido por la lipoxigenasa.

En el estudio realizado del efecto del cianuro sobre el consumo de oxígeno en embriones de semillas de soja en distintos estadíos de incubación se observa a las 4 y 14 horas una inhibición del 54 y 53% respectivamente por cianuro 1 mM y aumenta la inhibición con el incremento de la concentración de cianuro, a diferencia de lo observado por Yentur y Leopold (1976) que encuentran un 27% de inhibición por CNK 1 mM en semillas enteras de soja y aumenta dicha inhibición a medida que transcurre el tiempo de incubación.

De acuerdo con los resultados obtenidos, que el 56-60% del consumo de oxígeno es de origen extramitocondrial, se deduce que puede ser debido a la acción de fenoloxidasa, lipoxigenasa, etc., que como fue observado por otros autores no actúan a nivel mitocondrial; se observa además que la inhibición de los embriones de soja por CNK 1 mM entre 4 y 14 horas de incubación puede ser debida a la inhibición del camino de los citocromos ya que la actividad de la oxidasa alternativa es despreciable en esos estadíos de incubación y el consumo de oxígeno insensible al cianuro puede ser debido a las enzimas extramitocondriales ya mencionadas.

#### 6.4 La actividad de oxidasa alternativa en mitocondrias de raíces de maíz.

En 1933, Lundergårdh y Burström propusieron una relación entre la absorción de aniones y la respiración sensible al cianuro en raíces de trigo. Estudios posteriores establecieron que la respiración de raíces es parcialmente dependiente de la absorción de sales ("respiración salina") y que tanto la respiración salina como la concomitante absorción de iones son inhibidas por el cianuro (Lundergårdh, 1940; Robertson, 1960). El potasio unido a aniones relativamente impermeables como el sulfato induce la respiración salina (Epstein, 1954; Handley y Overstreet, 1955) haciendo improbable que los aniones jueguen un papel especial como habría sugerido Lundergårdh (1955).

Ulrich (1941) encontró que el exceso de absorción de cationes con respecto a los aniones resulta en un incremento proporcional en ácidos orgánicos en raíces de cebada. Además encontró una disminución en el contenido de ácidos orgánicos en los casos de déficit de absorción de cationes. Osmond (1976) mostró una clara correlación entre el déficit de cationes y el contenido de ácidos orgánicos en hojas sugiriendo que el mecanismo sería de carácter universal. Además, Burström (1951) y Handley y Overstreet (1955) mostraron una posible conexión entre la respiración salina y el recambio de ácidos orgánicos.

Usando SHAM como inhibidor del consumo de oxígeno en raíces enteras de maíz, Lambers (1979) encuentra que la fracción de la respiración sensible al SHAM disminuye después de transferir las plantas desde un nutriente rico con alto contenido de sales, a una solución de  $\text{SO}_4\text{Ca}$  0.1 mM donde hay menos absorción de iones.

En estas condiciones, la actividad de la oxidasa alternativa determinada sólo por su sensibilidad al SHAM, disminuyó más que la del camino de la citocromo oxidasa. Así, la respiración estimulada por sales parecería involucrar más el camino resistente al cianuro y no el camino de la citocromo oxidasa como fuera propuesto por Lundergårdh (1955).

Collins y Reily (1968) encuentran, que exudados de raíces de tres días contenían más ácido succínico, málico y cítrico si crecen en una solución con aniones sulfato que con aniones cloruro, aparentemente la absorción de cloruro se produce a mayor velocidad que la de sulfato, requiriéndose la oxidación de ácidos orgánicos que producen  $\text{CO}_2$  y por acción de la anhidrasa carbónica  $\text{CO}_3\text{H}^-$  que intercambia por  $\text{Cl}^-$  con gran velocidad, para mantener la electro-neutralidad. Ha sido propuesto que la activa oxidación de dichos ácidos puede requerir la actividad del camino alternativo (Palmer, 1976).

Møller (1978) encuentra en mitocondrias aisladas de raíces de trigo creciendo a diferentes concentraciones salinas (de 1% a 100%) diferencias respiratorias que están ligadas a diferencias en la absorción de iones y en la producción de ácidos orgánicos. Las mitocondrias de raíces crecidas en una solución de baja concentración salina mostraron mayor actividad de oxidasa alternativa que las crecidas en un medio de alta concentración salina.

Sin embargo, hasta el presente no resulta claro el papel fisiológico de las actividades mitocondriales, entendiéndose por ello la actividad de la oxidasa alternativa y la actividad de la cadena respiratoria dependiente de los resultados obtenidos con raíces en

relación a los inhibidores respiratorios se complica por la respuesta fisiológica del órgano.

En nuestro estudio hemos encontrado una alta actividad de oxidasa alternativa que da cuenta del 41% del consumo de oxígeno total en las mitocondrias aisladas de raíces de maíz. Esta alta actividad puede explicarse considerando que el medio nutritivo utilizado contenía (además de otros iones) sales con  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$  que son de fácil entrada a la raíz. La entrada de  $\text{K}^+$  se asocia a una salida de  $\text{H}^+$  para mantener la electroneutralidad. Estos protones resultan de la disociación de ácidos orgánicos sintetizados en la célula. La concomitante entrada de  $\text{Cl}^-$  hace que los ácidos orgánicos se oxiden a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , saliendo  $\text{CO}_3\text{H}^-$  para compensar la entrada de dicho anión. La entrada de otros iones que contiene el medio nutritivo como  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{=}$ ,  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ , se produce con menor velocidad. El exceso de producción de ácidos orgánicos resulta en un exceso de disponibilidad de equivalentes de reducción que saturan la cadena de citocromos desviando el exceso de electrones por el camino alternativo.

Las curvas de sensibilidad a la antimicina de las mitocondrias aisladas de raíces de maíz (Fig.29) muestran que la adición de SHAM produce un marcado aumento de la afinidad de las mitocondrias por la antimicina observando una disminución en el valor de  $K_i$ . Similarmente, la adición de antimicina aumentó la afinidad de las mitocondrias por el SHAM con la consiguiente disminución del  $K_i$ .

Las pendientes de los gráficos de Dixon con estos inhibidores, donde se expresa el efecto del SHAM sobre la sensibilidad a la antimicina y el efecto de la antimicina sobre la sensibilidad al SHAM,

resultan no paralelas con el caso en que solo se usó un inhibidor. Esto indica que los dos inhibidores no están actuando en una forma mutuamente exclusiva para inhibir una dada actividad sino que están actuando en sitios separados (Segel, 1975). La acción de estos inhibidores puede entenderse como que tienen un efecto cooperativo sobre el sitio de unión del otro inhibidor (Gutfreund, 1972) explicándose así las disminuciones en los valores de  $K_i$ .

Theologis y Laties (1978a) hicieron la titulación del consumo de oxígeno en cortes de papa frescos con antimicina en presencia y ausencia de CLAM (ácido m-clorobenzohidroxámico) y propusieron la presencia de dos sitios de unión para la antimicina. Un sitio de inhibición de alta afinidad sensible al CLAM y un sitio de baja afinidad que inhibe la respiración en la misma extensión que lo hace el cianuro.

La diferente interpretación del efecto mutuo de la antimicina y el SHAM como (a) inhibidores que actúan en distintos sitios pero que tienen efecto cooperativo sobre el sitio de unión del otro inhibidor, en nuestro caso, y (b) dos sitios de unión para la antimicina, el de alta afinidad dependiente del ácido hidroxámico (Theologis y Laties, 1978a) puede ser comprendida en razón del sistema más purificado (mitocondrias aisladas) utilizado en nuestro caso y a diferencias de órganos.

## 7. CONCLUSIONES

1. Aislando mitocondrias de tejido de papa envejecido se puede demostrar un aumento en la masa mitocondrial con un concomitante aumento en el consumo de oxígeno y una disminución en el acoplamiento de las mismas.
2. Con el envejecimiento del tejido se incrementa la insensibilidad al cianuro y a la antimicina y la sensibilidad al SHAM, lo que es consistente con un aumento de la actividad de la oxidasa alternativa.
3. La producción de anión superóxido en las mitocondrias aisladas de tejido de papa representa solamente una pequeña fracción del consumo de oxígeno total, y no aumenta con el envejecimiento.
4. En mitocondrias aisladas de tejidos envejecidos hay más de un camino alternativo que consume oxígeno además del camino de la citocromo oxidasa: (a) uno de ellos produce  $O_2^-$ , aunque es resistente a la antimicina y sensible al cianuro y al SHAM; (b) otro que es la oxidasa alternativa clásica resistente a la antimicina y al cianuro y sensible al SHAM y (c) otro sistema que consume oxígeno, inhibido por cianuro y resistente a la antimicina y al SHAM.
5. El envejecimiento del tejido produce un considerable incremento en la actividad de superóxido dismutasa Cu-Zn citosólica, lo cual es consistente con un incremento en la producción citosólica de  $O_2^-$  en condiciones fisiológicas.
6. El consumo de oxígeno se incrementa en forma paralela al peso fresco en embriones de semillas de soja con el tiempo de imbibición.
7. En los primeros estadíos de imbibición de ejes embrionarios, la inhibición de la respiración por cianuro es de origen mitocondrial

(citocromo oxidasa), ya que la actividad de la oxidasa alternativa es despreciable en dichos estadios; el resto de la respiración insensible al cianuro se debe a la presencia de otras enzimas que consumen oxígeno como oxidasas, oxigenasas (tirosinasa, lipoxigenasas, etc.).

8. Las mitocondrias aisladas de ejes embrionarios de soja tienen bajo contenido de citocromo c y éste se incrementa con el tiempo de incubación.
9. La actividad de la oxidasa alternativa en mitocondrias aisladas de ejes de semillas de soja da cuenta del 40%, 33% y 15% del consumo mitocondrial de oxígeno y del 18%, 13% y 6% del consumo total de oxígeno de los embriones, a las 2, 4 y 14 hs de incubación.
10. El consumo de oxígeno en embriones de soja incubados es 46-50% de origen mitocondrial, siendo el resto del consumo de oxígeno de origen extramitocondrial debido a la actividad de lipoxigenasa, tirosinasa, etc.
11. Mediciones de la quimioluminiscencia (Boveris y col., 1980) mostraron una muy baja actividad de lipoxigenasa en semillas de soja enteras, mayor con semillas molidas y valores muy elevados con homogenados de semillas de soja. Aparentemente, en semillas molidas y en el homogenado se liberan la lipoxigenasa y su sustrato. Los resultados obtenidos por Yentur y Leopold (1976) con semillas enteras, por Parrish y Leopold (1978) en semillas molidas y en nuestro trabajo con ejes y mitocondrias que tienen relativamente poca actividad de oxidasa alternativa, son interpretados como que la insensibilidad al cianuro y la sensibilidad al SHAM encontradas en los trabajos mencionados serían debidas a la actividad de la lipoxigenasa y no a la oxidasa alternativa.

12. Se observó que en las mitocondrias aisladas de raíces de maíz el SHAM y la antimicina actúan en sitios separados, el SHAM inhibiendo la oxidasa alternativa y la antimicina actuando a nivel de los citocromos b-c, pero que muestran ligazón cooperativa entre ambos sitios.
13. De las determinaciones de sensibilidad al cianuro, antimicina y SHAM se deduce que las mitocondrias aisladas de raíces de maíz, que crecen en una solución nutritiva tienen una actividad de oxidasa alternativa de 34 nmoles  $O_2$ /min/mg proteína, dando cuenta de un 41% del consumo de oxígeno total.
14. En las mitocondrias de raíces de maíz, la actividad de oxidasa alternativa parece asociarse a la denominada "respiración salina" donde se produce un exceso de ácidos orgánicos destinado a mantener la electroneutralidad frente a la absorción de iones.
15. Los estudios realizados sobre la actividad de la oxidasa alternativa y su papel fisiológico, se han hecho sobre tejidos o sobre mitocondrias aisladas de los mismos. En los trabajos realizados con tejidos enteros hay que tener en cuenta varios factores para determinar si la actividad medida es la que corresponde a la oxidasa alternativa, entre ellos: (a) que la especificidad de los inhibidores es relativa, ya que éstos (por ej. el SHAM y el cianuro) inhiben múltiples actividades; (b) que la capacidad de difusión de los inhibidores a través del tejido es limitada y (c) que existen actividades extramitocondriales que consumen oxígeno (fenol oxidasa, tirosinasa, lipoxigenasa, etc.) las que a su vez son sensibles a algunos de los inhibidores usados.

El trabajo realizado para esta tesis, utilizando tejidos y mitocondrias aisladas, permite concluir que para evaluar la actividad de la oxidasa alternativa de un tejido es necesario determinarla en las mitocondrias aisladas de ese tejido.

## 8. REFERENCIAS

- ABU-SHARKA, S. y CHING, T.M. (1967). Mitochondrial activity in germinating new and old soybean seeds. Crop.Science 7, 115-117
- AKAZAWA, T. y BEEVERS, H. (1957). Mitochondria in the endosperm of the germinating castor bean. A developmental study. Biochem.J. 67, 115-118
- ARRON, G.P., HENRY, L., PALMER, J.M. y HALL, D.O. (1979). Superoxide dismutase in mitochondria from Helianthus tuberosum and Neurospora crassa. Biochem.Soc.Transac. (London) 7, 618-620
- BAHR, J.T. y BONNER, W.D. (1973). Cyanide-insensitive respiration. I. The steady states of skunk cabbage spadix and bean hypocotyl mitochondria. J.Biol.Chem. 248, 3441-3445
- BAHR, J.T. y BONNER, W.D.Jr. (1973a). Cyanide-insensitive respiration. II. Control of the alternate pathway. J.Biol.Chem. 248, 3446-3450
- BECONI, M.T., SANCHEZ, R.A. y BOVERIS, A. (1979). La oxidasa alternativa de las mitocondrias vegetales y su relación con la germinación. Resúmenes XV Congreso Soc.Argent.Investigación Bioquímica. Mendoza. N°4
- BEEVERS, H. (1961). Respiratory Metabolism in Plants. Harper and Row. New York.
- BENDALL, D.S. (1958). Cytochromes and some respiratory enzymes in mitochondria from the spadix of Arum maculatum. Biochem.J. 70, 381-390
- BENDALL, D.S. y BONNER, W.D.Jr. (1971). Cyanide-insensitive respiration in plant mitochondria. Plant.Physiol. 47, 236-245
- BEYER, R.E., PETERS, G.A. e IKUMA, H. (1968). Oxido-reduction states and natural homologue of ubiquinone (coenzyme A) in submitochondrial particles from etiolated mung bean (Phaseolus aureus) seedlings. Plant. Physiol. 43, 1395-1400
- BONNER, W.D.Jr. (1967). A general method for the preparation of plant mitochondria. Meth.Enzimol. 10, 126-133
- BONNER, W.D.Jr. (1977). Special aspects of plant respiration. En "Oxygen and Physiological Function" (Jobsis, F.F., ed.). Prof.Inform.Library. Dallas, Texas, p 26-38
- BONNER, W.D.Jr. y RICH, P.R. (1978). Molecular aspects of cyanide/antimycin resistant respiration. En "Plant mitochondria" (Ducet, G. y Lance, C., eds.). Elsevier. Amsterdam, p 241-247
- BORS, W., MICHEL, C., SARAN, M. y LENGFELDER, E. (1978). The involvement of oxygen radicals during the autoxidation of adrenalin. Biochim. Biophys.Acta 540, 162-172
- BOVERIS, A. (1977). The mitochondrial production of superoxide and hydrogen peroxide. Adv.Exptl.Med.Biol. 78, 67-82
- BOVERIS, A. y CADENAS, E. (1975). Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin-insensitive respiration. FEBS Lett. 54, 311-315

- BOVERIS, A., CADENAS, E. y STOPPANI, A.O.M. (1976). Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. Biochem.J. 156, 435-444
- BOVERIS, A., SANCHEZ, R.A. y BECONI, M.T. (1978). Antimycin and cyanide-resistant respiration and superoxide anion production in fresh and aged potato tuber mitochondrial. FEBS Lett. 92, 333-338
- BOVERIS, A., SANCHEZ, R.A., VARSAVSKY, A.I. y CADENAS, E. (1980). Spontaneous chemiluminescence of soybean seeds. FEBS Lett. 113, 29-32
- BOVERIS, A., TURRENS, J.F., SANCHEZ, R.A. y STOPPANI, A.O.M. (1979). Production of superoxide anion by NADH dehydrogenase. Abstr. Int. Congr. Biochem. 11th. Toronto. p 435
- BREINDENBACH, R.W., CASTELFRANCO, P. y CRIDDLE, R.S. (1967). Biogenesis of mitochondria in germinating peanut cotyledons II. Changes in cytochrome and mitochondrial DNA. Plant Physiol. 42, 1035-1041
- BREINDENBACH, R.W., CASTELFRANCO, P. y PETERSON, C. (1966). Biogenesis of mitochondria in germinating peanut cotyledons. Plant Physiol. 41, 803-809
- BRIDGEN, J., HARRIS, J.I. y NORTHROP, J. (1975). Evolutionary relationships in superoxide dismutase. FEBS Lett. 49, 392-395
- BRUNTON, C.J. y PALMER, J.M. (1973). Pathways for the oxidation of malate and reduced pyridine nucleotide by wheat mitochondria. Eur. J. Biochem. 39, 283-291
- BURSTROM, H. (1951). En Nutrition of Plants (Truog, E., ed.) Wisconsin Press. p 251-260
- CADENAS, E. BOVERIS, A., RAGAN, C.I. y STOPPANI, A.O.M. (1977). Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 180, 248-257
- CAMMARCK, R. y PALMER, J.M. (1973). EPR studies of iron-sulphur proteins of plant mitochondria. Ann. N.Y. Acad. Sci. 222, 816-823
- CHANCE, B. (1959) Ciba Found Symp. Regulation Cell. Metabolism. p 91 Little Brown. Boston. Massachusetts.
- CHANCE, B., BONNER, W. y STOREY, B.T. (1968). Electron transport in respiration. Ann. Rev. Plant Physiol. 19, 295-320
- CHANCE, B. y HACKETT, D.P. (1959). The electron transfer system of skunk cabbage mitochondria. Plant Physiol. 34, 33-49
- CHANCE, B., SIES, H. y BOVERIS, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol. Rev. 59, 527-605
- CHANCE, B. y WILLIAMS, G.R. (1955). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. J. Biol. Chem. 217, 409-427

- CHANCE, B. y WILLIAMS, G.R. (1956). The respiratory chain and oxidative phosphorylation. Adv.Enzymol. 17, 65-134
- CHERRY, J.H. (1963). Nuclei acid, mitochondria and enzyme changes in cotyledons of peanuts seeds during germination. Plant Physiol. 38, 440-446
- CHING, C.K. y FRENKEL, C. (1976). Influence of ethylene and oxygen on respiration and peroxide formation in potato tubers. Nature 264, 60
- CHRISTOPHER, J., PISTORIUS, E. y AXELROD, B. (1970). Isolation of an isozyme of soybean lipoxygenase. Biochim.Biophys.Acta 198, 12-19
- COLEMAN, J.O.D. y PALMER, J.M. (1972). The oxidation of malate by isolated plant mitochondria. Eur.J.Biochem. 26, 499-509
- COLLINS, J.C. y REILY, E.J. (1968). Chemical composition of the exudate from excised maize roots. Planta 83, 218-222
- DAY, P.R. (1977). Plant genetics: increasing crop yield. Science 197, 1334-1339
- DAY, D.A. y WISKICH, J.T. (1974). The oxidation of malate and exogenous reduced nicotinamide adenine dinucleotide by isolated plant mitochondria. Plant Physiol. 53, 104-109
- DIXON, M. (1953). The determination of enzyme inhibitor constants. Biochem.J. 55, 170-171
- DOUCE, R. y BONNER, W.D.Jr. (1972). Oxalacetate control of Krebs cycle oxidations in purified plant mitochondria. Biochem.Biophys.Res. Commun. 47, 619-624
- DOUCE, R., MANNELA, C.A. y BONNER, W.D.Jr. (1973). The external NADH dehydrogenases of intact plant mitochondria. Biochim.Biophys.Acta 292, 105-116
- DUTTON, L.P. y STOREY, B.T. (1971). The respiratory chain of plant mitochondria. IX. Oxidation-reduction potentials of the cytochromes of mung bean mitochondria. Plant Physiol. 47, 282-288
- EPSTEIN, E. (1954). Cation-induced respiration in barley roots. Science 120, 987-988
- EPSTEIN, E. (1972). Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives. John Wiley. New York. p 39
- ERECINSKA, M. y STOREY, B.T. (1970). The respiratory chain of plant mitochondria VII. Kinetics of flavoprotein oxidation in skunk cabbage mitochondria. Plant Physiol. 46, 618-624
- ERECINSKA, M. y WILSON, D.F. (1976). The effect of antimycin A on cytochrome  $b_{566}$  and their relationship to ubiquinone and the iron-sulfur centers S-1 (N-2) and S-3. Arch.Biochem.Biophys. 174, 143-157

- ESTABROOK, R.W. (1967). Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. Meth.Enzimol. 10, 41-47
- FORMAN, H. y FRIDOVICH, I. (1979). Superoxide dismutase: a comparison of rate constants. Arch.Biochem.Biophys. 158, 396-400
- FRIDOVICH, I. (1972). Superoxide radical and superoxide dismutase. Acc.Chemi.Res. 5, 321-326
- FRIDOVICH, I. (1974). Superoxide dismutases. Adv.Enzymol. 41, 35-97
- GOFFEAU, A. y CROSBY, B. (1978). A new type of cyanide-insensitive, azide-sensitive respiration in the yeast S.pombe and S.cerevisiae. En "Biochemistry and Genetics of Yeast" (Bacila, M., Horecker, B.L. and Stoppani, A.O.M., eds.) Academic Press. New York. p 81-96
- GREEN, S., MAZUR, A. y SHORR, E. (1956). Mechanism of the catalytic oxidation of adrenaline by ferritin. J.Biol.Chem. 220, 237-255
- GUTFREUND, H. (1972). Cooperative binding processes. En: Enzyme Physical Principles. John Wiley. London p 76-94
- HACKETT, D.P., HASS, D.W., GRIFFITHS, S.K. y NIEDEPRUEM, D. (1960). Studies on the development of cyanide-resistant respiration in potato tuber slices. Plant Physiol. 35, 8-18
- HAGER, L.P. (1962). Succinyl CoA synthetase. En: The Enzymes (Boyer, P.D., Lardy, H. y Myrback, K., eds.) Academic Press New York. Vol.6, p 387-399
- HALLAM, N.D., ROBERTS, B.E. y OSBORNE, D.J. (1972). Embryogenesis and germination in rye (Secale cereale L). II. Biochemical and fine structural changes during germination. Planta 105, 293-309
- HANDLEY, R. y OVERSTREET, R. (1955). Respiration and salt absorption by excised barley roots. Plant Physiol. 30, 418-426
- HENRY, M. (1978). Molecular aspects of the cyanide-insensitive respiratory pathway in saccharomycopsis lipolytica. En: Plant mitochondria. Ducet, G. y Lance C., eds. North-Holland Biomedical Press
- HENRY, M.F. y NYNS, E.J. (1975). Cyanide-insensitive respiration. An alternative mitochondrial pathway. Sub.Cell.Biochem. 4, 1-65
- HUQ, S. y PALMER, J.M. (1978). Oxidation of durohydroquinone via the cyanide-insensitive respiratory pathway in higher plant mitochondria FEBS Lett. 92, 317-320
- HUQ, S. y PALMER, J.M. (1978a). Isolation of cyanide-resistant duroquinol oxidase from Arum maculatum mitochondria. FEBS Lett. 95, 217-220
- HUQ, S. y PALMER, J.M. (1978b). Superoxide and hydrogen peroxide production in cyanide resistant Arum maculatum mitochondria. Plant Sci. Lett. 11, 351-358
- IKUMA, H. (1970). Necessary conditions for isolation of tightly coupled higher plant mitochondria. Plant Physiol. 45, 773-781

- IKUMA, H. (1972). Electron transport in plant respiration. Ann. Rev. Plant. Physiol. 23, 419-436
- IKUMA, H. y BONNER, W.D.Jr. (1967). Properties of higher plant mitochondria. I. Isolation and some characteristics of tightly-coupled mitochondria from dark-grown mung bean hypocotyls. Plant Physiol. 42, 67-75
- IKUMA, H. y BONNER, W.D.Jr. (1967a). Properties of higher plant mitochondria. II. Effects of DNP, m-Cl-CCCP, and oligomycin on respiration of mung bean mitochondria. Plant Physiol. 42, 1400-1406
- IKUMA, H. y BONNER, W.D.Jr (1967b). Properties of higher plant mitochondria. III. Effects of respiratory inhibitors. Plant. Physiol. 42, 1535-1544
- INGLEDEW, W.J. y OHNISHI, T. (1975). Properties of the S-3 iron sulfur centre of succinate dehydrogenase in the intact respiratory chain of beef heart mitochondria. FEBS Lett. 54, 167-171
- KAHL, G. (1973). Genetic and metabolic regulation in differentiating plant storage tissue cells. Bot. Rev. 39, 274-299
- KELLOG, E.W. y FRIDOVICH, I. (1977). Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide and hydrogen peroxide. J. Biol. Chem. 252, 6721-6728
- KLEIN, S., BARENHOLZ, H. y BUNDIK, A. (1971). The initiation of growth in isolated lima bean axes. Physiological and fine structural effects of actinomycin D, cycloheximide and chloramphenicol. Pl. Cell. Physiol. (Tokyo) 12, 41-60
- KOOSTRA, P.T. y HARRINGTON, J.F. (1969). Biochemical effects of age on membranal lipids of Cucumis sativus seed. Proc. Int. Seed Test. Ass. 34, 329
- KUBOWITZ, F. (1937). Uber die chemische zusammensetzung der kactofeloxydase. Biochem. Z. 292, 221-229
- LAMBERS, H.T. (1979). Energy metabolism in higher plants in different environments. PhD Thesis, Univ. of Groningen. Groningen. Holanda.
- LAMBERS, H. y SMAKMAN, G. (1978). Respiration of the roots of flood-tolerant and flood-intolerant Senecio species: affinity for oxygen and resistance to cyanide. Physiol. Plant. 42, 163-166
- LAMBERS, H. y VAN de DIJK, S.J. (1979). Cyanide resistant root respiration and tap root formation in two subspecies of Hypochaeris radicata. Physiol. Plant. 45, 235-239
- LAMBOWITZ, A.M. y BONNER, W.D.Jr. (1974). The b-cytochromes of plant mitochondria. J. Biol. Chem. 249, 2428-2440
- LAMBOWITZ, A.M., BONNER, W.D. y WIKSTROM, M.K.F. (1974). On the lack of ATP-induced midpoint potential shift for cytochrome b-566 in plant mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71, 1183-1187

- LANCE, C. (1974). Respiratory control and oxidative phosphorylation in *Arum maculatum* mitochondria. Plant.Sc.Lett. 2, 165-171
- LANCE, C. y BONNER, W.D.Jr. (1968). The respiratory chain components of higher plant mitochondria. Plant Physiol. 43, 756-766
- LATIES, G.G. (1967). Metabolic and physiological development in plant tissues. Aust.J.Sci. 30, 193-203
- LEHNINGER, A.L. (1965). The mitochondrion. W.A. Benjamin. New York.
- LEHNINGER, A.L. (1975). Biochemistry. Worth. New York.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, A.L., FARR, A.L. y RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193, 265-275
- LUNDEGÅRD, H. (1940). Investigations as to the absorption and accumulation of inorganic ions. Lantbrukshögskolans Ann. 8, 233-404
- LUNDEGÅRD, H. (1955). Mechanisms of absorption, transport, accumulation and secretion of ions. Ann.Rev.Plant Physiol. 6, 1-14
- LUNDEGÅRD, H. y BURSTROM, H. (1933). Untersuchungen über die Salzaufnahme der Pflanzen. III. Mitteilung: Quantitative Beziehungen zwischen Atmung und Anionenaufnahme. Biochem.Z. 261, 235-251
- MAHLER, H.R. y CORDES, E.H. (1971). Biological Chemistry. Harper y Row. New York.
- MANNELLA, C. y BONNER, W.D.Jr. (1975). Biochemical characteristics of the outer membranes of plant mitochondria. Biochim.Biophys.Acta 413, 213-225
- MCCORD, J.M. y FRIDOVICH, I. (1969). Superoxide dismutase. Enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). J.Biol.Chem. 244, 6049-6055
- MEEUSE, B.J. (1975). Thermogenic respiration in aroids. Ann.Rev.Plant Physiol. 26, 117-126
- MISRA, H.D. y FRIDOVICH, I. (1972). The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J.Biol.Chem. 247, 3170-3175
- MISRA, H.D. y FRIDOVICH, I. (1972a). The purification and properties of superoxide dismutase from *Neurospora crassa*. J.Biol.Chem. 247, 3410-3411
- MISRA, H. y FRIDOVICH, I. (1973). A peroxide-dependent reduction of cytochrome c by NADH. Biochim.Biophys.Acta 292, 815-824
- MITCHELL, P. (1975). Proton motive redox mechanism of the cytochrome b-c<sub>1</sub> complex in the respiratory chain: proton motive ubiquinone cycle. FEBS Lett. 56, 1-6
- MØLLER, I.M. (1978). Balance Between cyanide-sensitive and insensitive respiration in wheat root mitochondria, as influenced by salt concentration in the plant growth medium. Physiol.Plant. 42, 157-162

- MOORE, A.L., BONNER, W.D. y RICH, P.R. (1978). The determination of the proton-motive force during cyanide-insensitive respiration in plant mitochondria. Arch.Biochem.Biophys. 186, 298-306
- MOREAU, F. y LANCE, C. (1972). Isolement et propriétés des membranes externes et internes de mitochondries végétales. Biochimie 54, 1335-1348.
- OHNISHI, T. (1973). Mechanism of electron transport and energy conservation in the site I region of the respiratory chain. Biochim. Biophys. Acta 301, 105-128
- OHNISHI, T., INGLEDEW, W.J. y SHIRAIISHI, S. (1975). Existence of two distinct HIPIP-type iron-sulfur centers in mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 63, 894-899
- OHNISHI, T., WINTER, D.B., LINN, J. y KING, T.E. (1974). EPR studies on a HIPIP type iron-sulfur center in the succinate dehydrogenase segment of the respiratory chain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 61, 1017-1025
- OSMOND, C.B. (1976) *En Transport in Plants.* (Luttge, U. and Pitman, P.G., eds.) Springer-Verlag, Berlin p 347-372
- PALMER, J.M. (1976). The organization and regulation of electron transport in plant mitochondria. Annu. Rev. Plant. Physiol. 27, 133-157
- PALMER, J.M. (1979). The "uniqueness" of plant mitochondria. Biochem. Soc. Trans. (London) 7, 246-252
- PALMER, J.M. y ARRON, G.P. (1976). The influence of exogenous nicotinamide adenine dinucleotide on the oxidation of malate by Jerusalem artichoke mitochondria. J. Exp. Bot. 27, 418-430
- PALMER, J.M. y WEDDING, R.T. (1966). Purification and properties of succinyl-CoA synthetase from Jerusalem artichoke mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 113, 167-174
- PARRISH, D.J. y LEOPOLD, A.C. (1978). Confounding of alternate respiration by lipoxigenase activity. Plant Physiol. 62, 470-472
- PASSAM, H.C. (1976). Cyanide-insensitive respiration in root tubers of cassava (*Mannihot esculenta* Crantz). Plant Sci. Lett. 7, 211-218
- PASSAM, H.C. y PALMER, J.M. (1972). Electron transport and oxidative phosphorylation in *Arum* spadix mitochondria. J. Exp. Bot. 23, 366-374
- RICH, P.R. y BONNER, W.D. (1978). The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 188, 206-213
- RICH, P.R. y BONNER, W.D. Jr. (1978a) EPR studies of higher plant mitochondria II. Center S-3 of succinate dehydrogenase and its relation to alternative respiratory oxidations. Biochim. Biophys. Acta 501, 381-395

- RICH, P.R., BOVERIS, A., BONNER, W.D. Jr. y MOORE, A.L. (1976). Hydrogen peroxide generation by alternate oxidase of higher plants. Bioch. Biophys. Res. Commun. 71, 695-703
- RICH, P.R. y MOORE, A.L. (1976). The involvement of the proton motive ubiquinone cycle in the respiratory chain of higher plants and its relation to the branch point of the alternate pathway. FEBS. Lett. 65, 339-344
- RICH, P.R., MOORE, A.L., INGLEDEW, W.J. y BONNER, W.D. Jr. (1977). EPR studies of plant mitochondria I. Ubisemiquinone and its relation to alternative respiratory oxidations. Biochim. Biophys. Acta 462, 501-514
- RICH, P.R., WIEGAND, N.K., BLUM, H., MOORE, A.L. y BONNER, W.D. (1978). Studies on the mechanism of inhibition of redox enzymes by substituted hydroxamic acids. Biochim. Biophys. Acta 525, 325-337
- ROBERTS, E.H. (1973). Seed Ecology (Heydecker, W. ed.). Penn. State Univ. Press., University Park. p 189-218
- ROBERTSON, R.N. (1960). Ion transport and respiration. Biol. Rev. 35, 231-264
- SANCHEZ, R.A., BECONI, M.T. y BOVERIS, A. (1979). The alternative oxidase of plant mitochondria. Rev. Lat. Am. Micr. Electr. Biol. Cel. 6, 135-142
- SCHONBAUM, G.R. (1973) New complexes of peroxidases with hydroxamic acids, hydrazides and amides. J. Biol. Chem. 248, 502-511
- SCHONBAUM, G.R., BONNER, W.D. Jr., STOREY, B. y BAHR, J.T. (1971). Specific inhibition of the cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hydroxamic acids. Plant Physiol. 47, 124-128
- SEGEL, I.H. (1975). Multiple inhibition analysis. Enzyme Kinetics, John Wiley, New York. p 465-504
- SIEDOW, J.N. y GIRVIN, M.E. (1980). Alternative respiratory pathway. Its role in seed respiration and its inhibition by propyl gallate. Plant Physiol. 65, 669-674
- SLATER, E.C. (1966). Application of inhibitors and uncouplers for a study of oxidative phosphorylation. Methods Enzymol. 10, 48-57
- SMITH, L. y CONRAD, H. (1956). A study of the kinetics of the oxidation of cytochrome c by cytochrome c oxidase. Arch. Biochem. Biophys. 63, 403-413
- SOLOMOS, T. (1977). Cyanide-resistant respiration in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 28, 279-297
- SOLOMOS, T. y LATIES, G.G. (1976). Effects of cyanide and ethylene on the respiration of cyanide-sensitive and cyanide-resistant plant tissues. Plant Physiol. 58, 47-50

- STOPPANI, A.O.M. y BOVERIS, A. (1981). Reacciones de oxido-reducción y transporte de electrones y fosforilación oxidativa. Caps. 23 y 24 "Química Biológica" (Cardini, C., Torres, H.N., Carminatti, H. y Gómez, J.C., eds.). El Ateneo, Buenos Aires, 1981. En prensa.
- STOREY, B.T. (1969). The respiratory chain of plant mitochondria. III. Oxidation rates of the cytochromes c and b in mung bean mitochondria reduced with succinate. Plant Physiol. 44, 413-421
- STOREY, B.T. (1970). The respiratory chain of plant mitochondria. IV. Oxidation rates of the respiratory carriers of mung bean mitochondria in the presence of cyanide. Plant Physiol. 45, 447-454
- STOREY, B.T. (1971). The respiratory chain of plant mitochondria. X. Oxidation-reduction potentials of the flavoproteins of skunk cabbage mitochondria. Plant Physiol. 48, 493-497
- STOREY, B.T. (1976). Respiratory chain of plant mitochondria. Point of interaction of the alternate oxidase with the respiratory chain. Plant Physiol. 58, 521-525
- STOREY, B.T. y BAHR, J.T. (1972). The respiratory chain of plant mitochondria. Ordering of ubiquinone, flavoproteins and cytochromes in the respiratory chain. Plant Physiol. 50, 95-102
- THEOLOGIS, A. y LATIES, G. (1978). Relative contribution of cytochrome-mediated and cyanide-resistance electron transport in fresh and aged potato slices. Plant Physiol. 62, 232-237
- THEOLOGIS, A. y LATIES, G. (1978a). Antimycin-insensitive cytochrome-mediated respiration in fresh and aged potato slices. Plant Physiol. 62, 238-242
- THEOLOGIS, A. y LATIES, G. (1978b). Cyanide-resistant respiration in fresh and aged sweet potato slices. Plant Physiol. 62, 243-248
- THEOLOGIS, A. y LATIES, G. (1978c). Respiratory contribution of the alternate path during various stages of ripening in avocado and banana fruits. Plant Physiol. 62, 249-255
- TOMLINSON, P.F. Jr. y MORELAND, D.E. (1975). Cyanide-resistant respiration of sweet potato mitochondria. Plant Physiol. 55, 365-369
- TURNER, J.F. y TURNER, D.H. (1975). The regulation of carbohydrate metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. 26, 159-186
- ULRICH, A. (1941). Metabolism of non-volatile organic acids in excised barley roots as related to cation-anion balance during salt accumulation. Am. J. Bot. 28, 526-536
- VAN DER BERGH, S.G. (1966). The oxidation of fatty acids by intact rat liver mitochondria. "Reg. Metab. Proc. Mit." BBA Library 7, 125-133
- VAN DER PLAS, L.H.V., SHOENMAKER, G.S. y GERBRANDY, S.J. (1977). Cyanide-respiration in a *Convolvulus arvensis* cell structure. Plant Sc. Lett. 8, 31-33

- VAN DER PLAS, L.H.W. y VERLEUR, J.D. (1976). CN-resistant<sup>5</sup> respiration in potato (Solanum tuberosum) changes after storage of the tuber. Plant Sc.Lett. 7, 149-154
- VAN STEVENINK, R.F.M. (1975). The washing or "aging" phenomenon in plant tissues. Ann.Rev.Plant Physiol. 26, 237-258
- WEDDING, R.T., McCREADY, C.C. y HARLEY, J.L. (1973). Inhibition and stimulation of the respiration of Arum mitochondria by cyanide and its relation to the coupling of oxidation and phosphorylation, New Phytol. 72, 1-13
- WHARTON, D.C. y GRIFFITHS, D.E. (1962). Studies on the electron transport system. XXXIX. Assay of cytochrome oxidase. Effect of phospholipids and other factors. Arch.Biochem.Biophys. 96, 103-114
- WIKSTROM, M.K.F. y BERDEN, J.A. (1972). Oxidoreduction of cytochrome b in the presence of antimycin. Biochim.Biophys.Acta 283, 403-420
- WILSON, S.B. (1970). Energy conservation associated with cyanide-insensitive respiration in plant mitochondria. Biochim Biophys. Acta 223, 383-387
- WILSON, S.B. (1971). Studies on the cyanide insensitive oxidase of plant mitochondria. FEBS Lett. 15, 49-52
- WILSON, S.B. y BONNER, W.D. (1971). Studies of electron transport in dry and imbibed peanut embryos. Plant Physiol. 48, 340-344
- WILSON, R.H. y HANSON, J.B. (1969). The effect of respiratory inhibitors on NADH, succinate and malate oxidation in corn mitochondria. Plant Physiol. 44, 1335-1341
- WISKICH, J.T., YOUNG, R.E. y BIALE, J.B. (1964). Metabolic processes in cytoplasmic of the avocado fruit. VI. Controlled oxidations and coupled phosphorylations. Plant Physiol. 39, 312-322
- WOJTCZAK, L. y LEHNINGER, A.L. (1961). Formation and disappearance of an endogenous uncoupling factor during swelling and contraction of mitochondria. Biochim Biophys.Acta. 51, 442-456
- YENTUR, S. y LEOPOLD, C. (1976). Respiratory transition during seed germination. Plant Physiol. 57, 274-276
- YONETANI, T. y RAY, G.S. (1965). Studies on cytochrome oxidase. VI. Kinetics of the aerobic oxidation of ferrocytochrome c by cytochrome oxidase. J.Biol.Chem. 240, 3392-3398
- YOO, B.Y. (1970) Ultrastructural changes in cells of pea embryo radicles during germination. J. Cell. Biol. 45, 158-171
- YOUNES, M. y WESER, U. (1976). Reactivity of superoxide dismutase-active Cu (II) complexes on the rate of adrenochrome formation. FEBS Lett. 71, 87-90
- ZELITCH, I. (1975). Improving the efficiency of photosynthesis. Science 188, 626-635

## 9. RESUMEN

Se estudió la actividad de oxidasa alternativa y la respiración mitocondrial en mitocondrias aisladas de diferentes tejidos de plantas superiores.

Incubando tejido de tubérculos de papa en una cámara húmeda (envejecimiento) durante 24 y 48 horas se observó un incremento de la proteína mitocondrial con un concomitante aumento en la actividad de oxidasa alternativa. Además en dichas mitocondrias se observó un incremento en el consumo de oxígeno y una disminución en el control respiratorio con el tiempo de incubación.

Al determinar la producción de anión superóxido en mitocondrias aisladas de tubérculos de papa se encontró que representa una pequeña fracción del consumo de oxígeno total y que no se incrementa con el envejecimiento. El envejecimiento del tejido produce un considerable incremento en la actividad de superóxido dismutasa citosólica (enzima Cu-Zn) lo cual es consistente con un incremento en la producción citosólica de  $O_2^-$  en condiciones fisiológicas.

En la determinación de la actividad de oxidasa alternativa en mitocondrias aisladas de ejes embrionarios de semillas de soja no se observó una actividad apreciable de oxidasa alternativa durante los primeros estadios de incubación como habían propuesto Yentur y Leopold (1976) y su nivel se mantuvo bajo entre las 2 y las 14 horas de imbibición.

En embriones de soja se observó un incremento en el consumo de oxígeno que es paralelo al observado en el peso fresco entre las 2 y las 14 horas de imbibición.

En mitocondrias aisladas de ejes embrionarios de soja se observó un incremento en la respiración por el agregado de citocromo c exógeno, y una disminución del efecto del citocromo c con el tiempo de

imbibición.

Al medir la respiración de embriones de soja se observó que el 46-50% del consumo de oxígeno total es de origen mitocondrial siendo el resto del consumo de oxígeno extramitocondrial y debido a la actividad de otras enzimas como oxidasas, oxigenasas (por ej. tiro-sinasa, lipoxigenasa, etc.). Esto coincide con trabajos realizados con quimioluminiscencia (Boveris y col., 1980) donde se obtiene una gran actividad de lipoxigenasa en homogenados de semillas de soja. Esta actividad de lipoxigenasa es insensible al cianuro y a la antimicina, pero es sensible al SHAM, similarmente a la oxidasa alternativa que es sensible al SHAM e insensible a los otros dos inhibidores.

En mitocondrias de raíces de maíz que crecen en una solución nutritiva, se encontró una actividad de oxidasa alternativa que da cuenta del 41% del consumo de oxígeno total. En dichas mitocondrias la actividad de la oxidasa alternativa parece asociarse a la denominada "respiración salina" donde se produce exceso de ácidos orgánicos cuya función es mantener la electroneutralidad frente a la absorción de iones.

Se observó con el uso de inhibidores de la respiración, que en mitocondrias de raíces de maíz, el SHAM y la antimicina actúan en sitios separados, pero que muestran una ligazón cooperativa entre ambos sitios.

Los estudios realizados sobre la actividad de oxidasa alternativa y su papel fisiológico se han hecho sobre tejidos y mitocondrias aisladas de los mismos. En los trabajos realizados con tejidos enteros, no se puede afirmar que la actividad medida sea la que corresponde a la oxidasa alternativa, porque hay que conside-

rar otros factores que pueden influir en su determinación.

En el trabajo realizado para esta tesis utilizando tejidos y mitocondrias aisladas de los mismos permite concluir que para determinar la actividad de la oxidasa alternativa de un tejido hay que aislar las mitocondrias del mismo.

Alberto Bone

M. B.