

Métodos de aislamiento de partículas subcelulares

JESUS GUZMAN GARCIA*

SE CONOCE, debido al trabajo de numerosos investigadores que la célula es un sistema heterogeneo en el cual el citoplasma es el medio en el que se encuentran numerosos compartimientos y cuerpos de inclusión como son el núcleo, las mitocondrias, los lisosomas y el retículo endoplásmico con partículas de ribonucleoproteínas adosadas en algunas porciones. Se menciona además el aparato reticular de Golgi, así como otros cuerpos de inclusión en diferentes tipos de células como por ejemplo gránulos secretorios, gránulos de almidón o glucógeno y cloroplastos en algunas células vegetales.

Algunos de estos componentes, entre los cuales se pueden citar como ejemplo los cloroplastos, las mitocondrias o el núcleo, son estructuras discretas, visibles al microscopio óptico, pero otras fracciones celulares sólo se pueden caracterizar por sus propiedades, pudiendo mencionarse como ejemplo típico la "fracción sobrenadante" en algunos procedimientos de centrifugación diferencial.

Las interrelaciones y algunas de las características bioquímicas y morfológicas de las diferentes estructuras o partículas subcelulares será el tema de trabajos posteriores y esta presentación se destinará a resumir los procedimientos más comunmente empleados para su aislamiento.

El procedimiento ideal para el aislamiento de fracciones subcelulares sería aquel que permitiera obtener la o las fracciones desecadas sin alteraciones morfológicas y/o funcionales, sin contaminación con otras fracciones y con cien por ciento de rendimiento. Aunque no se ha logrado llegar a ese procedimiento ideal, es indudable la utilidad que tienen las preparaciones obtenidas por diversos medios, cuando se conocen y se toman en cuenta sus limitaciones y se tienen las precauciones adecuadas

* Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina, U. N. A. M.

para reducir al mínimo las alteraciones inevitables durante el procedimiento.

El aislamiento de fracciones o partículas subcelulares, como regla implica, después de escoger el material adecuado, la ruptura de las células y la suspensión del material resultante y finalmente la separación o aislamiento propiamente dicho de las partículas o fracciones deseadas.

En ocasiones es posible partir de suspensiones de una sola especie celular, como en los cultivos de protozoarios, algas o bacterias o suspensiones de eritrocitos, pero es más frecuente el fraccionamiento de material más complejo como en el caso de órganos o tejidos animales o vegetales, con una población celular heterogénea, que condiciona necesariamente una heterogeneidad similar en las fracciones subcelulares aisladas. Así por ejemplo, las preparaciones de núcleos o mitocondrias de hígado muestran toda una gama de formas o tamaños que indudablemente significan diferencias en características funcionales. Por lo tanto hay que tomar en cuenta que los datos obtenidos de preparaciones de material complejo son un "promedio" de propiedades o composición que puede dar lugar a errores cuando se utiliza o interpreta indiscriminadamente.

En el caso de algunos órganos o tejidos animales debe tenerse en cuenta la posible contaminación de algunas fracciones subcelulares con eritrocitos. La importancia de este hecho puede ser grande, y como ejemplo se puede citar que el hígado de rata contiene aproximadamente 20 ml de sangre por 100 g. de tejido¹; en ocasiones es útil la perfusión del órgano, previa al método de fraccionamiento², pero hay que tomar en cuenta que se han consignado alteraciones debidas a la perfusión, por ejemplo modificaciones morfológicas en mitocondrias de hígado de rata³.

Uno de los problemas más serios en el fraccionamiento celular es la rápida alteración post-mortem de algunas actividades celulares o los cambios también rápidos en algunas características de fracciones o partículas subcelulares aisladas; en este sentido se puede mencionar que según Osawa *et al.*⁴ el nivel de ATP del timo de rata se reduce a la mitad 15 minutos después de la muerte, o que el glucógeno hepático disminuye en un 60% a los cinco minutos del sacrificio⁵; es también conocida la disminución de la actividad fosforilante en las mitocondrias envejecidas, en ocasiones por sólo unos minutos. Muchos de estos cambios pueden reducirse o prácticamente abolirse con el manejo rápido y el enfriamiento adecuado de los tejidos y preparaciones subcelulares, y para mencionar sólo un ejemplo se puede citar que Weinbach⁶ consigna un método de

preparación de mitocondrias que conservan su actividad fosforilante por 24 horas o más.

Una vez escogido y preparado el tejido o material biológico que se utilizará para aislar fracciones o partículas subcelulares, el siguiente paso es la ruptura de las células y la suspensión de los restos celulares. La ruptura de las células puede realizarse en un medio acuoso o en un medio no acuoso; como regla, en el primer caso, el medio en que se rompen las células es el mismo en que quedan suspendidos sus restos. Los métodos de ruptura en los que se utiliza un medio no acuoso por lo general implican la liofilización y la trituración del tejido liofilizado o la ruptura en un solvente orgánico.

Sea cual fuere el procedimiento de ruptura empleado, es recomendable el trabajo rápido y a temperaturas bajas, pero no de congelación, y el empleo de los procedimientos menos drásticos que sean compatibles con la ruptura celular. Esto último puede ser un factor limitante cuando se desean obtener partículas subcelulares en cantidades grandes; en este caso es necesario emplear procedimientos más drásticos, pero que deben ser cuidadosamente controlados para poder obtener rendimientos altos de partículas intactas o sólo con alteraciones morfológicas o funcionales mínimas. Un ejemplo es la producción de mitocondrias en gran escala en el Instituto de Enzimas de la Universidad de Wisconsin, donde según datos del Green, de 1954 a la fecha se han aislado 200 kg de peso seco de mitocondrias de músculo cardíaco⁷, que al mantenerse en congelación conservan sus características morfológicas y funcionales por lapsos grandes de tiempo.

Los procedimientos de ruptura más frecuentemente utilizados son físicos, y en ellos se emplean homogeneizadores coaxiales o licuadoras de alta velocidad, molinos coloidales, paso de tejidos o suspensiones de células por orificios pequeños, ciclos de congelación y descongelación, agitación con abrasivos, trituración en molino de bolas, lisis por fuerzas osmóticas, energía ultrasónica con o sin abrasivos, liofilización y trituración subsecuente, etc. En el fraccionamiento de algunas partículas, como para la preparación de fragmentos o partículas submitocondriales, con frecuencia se emplean procedimientos que utilizan la acción de agentes químicos como algunos solventes de lípidos o agentes tensioactivos como el desoxicolato de sodio o la digitonina⁷.

Cada variante de los procedimientos antes mencionados tiene sus ventajas y desventajas, por ejemplo los homogeneizadores coaxiales per-

miten la obtención de mitocondrias prácticamente sin alteraciones, pero solo se pueden trabajar cantidades pequeñas de tejido y su rendimiento en ruptura celular es bastante bajo¹⁵; la homogeneización en licuadoras de alta velocidad es más efectiva para romper las células, pero produce con frecuencia alteraciones en las mitocondrias y otras partículas⁸; sin embargo, en condiciones estrictamente controladas permiten la obtención de cantidades grandes de mitocondrias en buen estado, como en los procedimientos empleados en el Instituto de Enzimas de la Universidad de Wisconsin⁹. Otros ejemplos de la versatilidad en el empleo de licuadoras de alta velocidad, en ocasiones con aditamentos de refrigeración para evitar o reducir al mínimo la inactivación de enzimas¹¹, es la preparación de núcleos de timocitos¹² o de células de linfomas¹³, cromosomas¹⁰, ¹⁴ o bien como prehomogeneizadores para alimentar molinos coloidales¹⁵. Los molinos coloidales tiene la ventaja de su capacidad relativamente grande y de su efectividad en la ruptura celular, pero a velocidades grandes rompen las mitocondrias y los núcleos, aprovechando esta característica, Mirsky y Ris¹⁰ desde hace diez años los emplearon para el aislamiento de cromosomas.

El rompimiento con energía ultrasónica, con o sin abrasivos, es útil para bacterias y algunos otros microorganismos, o para la preparación de algunas partículas submitocondriales⁷.

En una revisión reciente de X. Allfrey¹⁵ se discute ampliamente las características y aplicaciones de numerosos procedimientos de ruptura de células como un paso en el aislamiento de partículas subcelulares.

Un paso crítico en la secuencia del aislamiento de las partículas que nos ocupan es el medio en el cual quedan suspendidos los restos celulares después de la ruptura. Como ya se indicó este medio puede ser acuoso o no acuoso. En cualquiera de los dos casos el ideal sería aquel en el cual las partículas permanecieran morfológica, estructural y funcionalmente intactas. Aunque esto no se ha alcanzado desde un punto de vista estricto, ya que cualquier medio condiciona alteraciones más o menos importantes tanto morfológicas como funcionales, la selección de procedimientos y medios adecuados para fines específicos, ha permitido obtener una gran cantidad de datos valiosos acerca de la composición y características bioquímicas de las diversas partículas y fracciones subcelulares.

Los medios utilizados con más frecuencia son acuosos, aunque para la separación de núcleos, suelen emplearse mezclas de solventes orgánicos, ya que en general los núcleos aislados en medios acuosos pierden o absor-

ben componentes hidrosolubles¹⁵. El problema de pérdida o contaminación no está circunscrito a las preparaciones de núcleos, pues las mitocondrias aisladas en soluciones de sacarosa por los procedimientos de centrifugación diferencial están contaminadas en mayor o menor proporción con lisosomas¹⁶ y con frecuencia con partículas microsomales⁵¹; asimismo los cloroplastos aislados en polímeros del etilen glicol pueden absorber algunas proteínas solubles como la amilofosforilasa¹⁷. Por otro lado, Beinert¹⁸ ha demostrado que la fracción microsomal hepática obtenida después de añadir citocromo C radiactivo al homogenado absorbió una proporción considerable de dicha proteína. Sin embargo, la utilidad de los medios acuosos en el aislamiento de partículas subcelulares es indudable, y la inmensa mayoría de los datos existentes sobre la composición, actividad enzimática y otras características funcionales de las partículas subcelulares se han obtenido empleando estos medios.

Los medios acuosos empleados con más frecuencia son las soluciones de ácido para separar núcleos, de sacarosa para el aislamiento de mitocondrias lisosomas y microsomas, y las de electrolitos para fracciones subcelulares de algunos microorganismos.

Diversos autores han utilizado soluciones de ácido cítrico para el aislamiento de núcleos, y en la revisión de Allfrey¹⁵ se mencionan detalles de procedimientos que emplean este medio. La ventaja del procedimiento es su rendimiento alto y la poca contaminación con otras partículas, así como la rapidez del procedimiento, sin embargo, condiciona pérdidas serias de proteínas solubles¹⁸ y de ácido ribonucleico¹⁹.

Las soluciones de sacarosa también son útiles en la separación de núcleos, pero su empleo prácticamente universal es en el aislamiento de partículas citoplásmicas como mitocondrias, microsomas o lisosomas. En los primeros procedimientos se emplearon soluciones hipertónicas²⁰ pero en la actualidad se utilizan casi exclusivamente soluciones isotónicas para estudios de actividades enzimáticas y respiratorias en mitocondrias u otras partículas. Los diversos procedimientos empleados son en general variantes del método original de Schneider y Hogeboom²¹.

La concentración de sacarosa es una variable importante, por ejemplo, las soluciones altamente hipertónicas (0.88 M.) conservan las características morfológicas de las mitocondrias²⁰, pero dañan seriamente algunas características como el acoplamiento entre la fosforilación y la respiración. El empleo de soluciones isotónicas (0.25 M.) es de uso común para estudios bioquímicos con estas partículas. Se han consignado obser-

vaciones similares en preparaciones de núcleos, así, los obtenidos en solución isotónica son capaces de sintetizar proteínas y ácidos nucleicos, propiedades que se pierden al emplear sacarosa 0.44 M.^{12, 22}.

Se han empleado diversos aditivos a las soluciones de sacarosa para fines específicos, por ejemplo, la adición de iones calcio evita la aglutinación y gelificación frecuentemente observada en el aislamiento de núcleos^{12, 22}, el ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) se ha empleado para estabilizar los sistemas mitocondriales de oxidación del ácido alfa cetoglutarico^{24, 25} y Novikoff²⁶ ha señalado que la polivinil pirrolidona es útil para conservar la morfología mitocondrial en soluciones isotónicas de sacarosa, sin pérdida de las características funcionales.

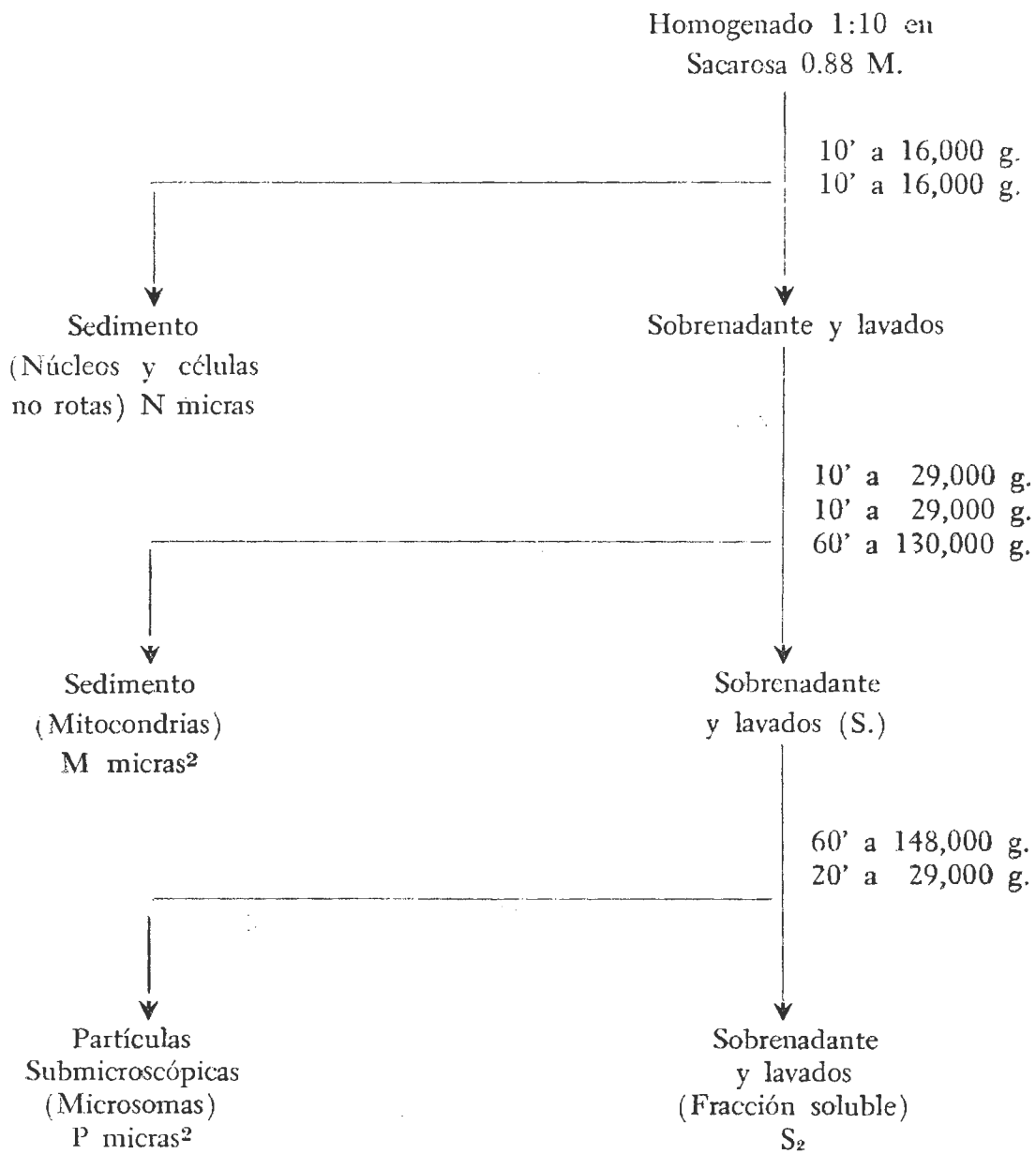
El pH de las soluciones de sacarosa es un factor crítico en la preparación de algunas partículas de células vegetales^{27, 28}, pero parece no serlo en el caso de algunos tejidos animales por ejemplo el hígado²⁹.

Las soluciones de electrolitos se utilizaron en los primeros procedimientos de fraccionamiento celular en tejidos animales, pero debido a que condicionan aglutinación o modificaciones morfológicas en mitocondrias^{20, 30} o núcleos^{18, 22} su empleo en este sentido se ha abandonado; sin embargo, en algunos sistemas son de gran utilidad, como por ejemplo en la preparación de cloroplastos con capacidad de fotofosforilación³¹ o de fracciones subcelulares de algunos microorganismos, en las que se conservan diversas características funcionales^{32, 33, 34}.

Los medios no acuosos, muy favorecidos en el aislamiento de núcleos se han desarrollado a partir de la separación de estas partículas consignada por Behrens en 1932³⁵. Estos medios generalmente son mezclas binarias de solventes orgánicos de diferente densidad, controlándose ésta por la proporción de cada solvente, de tal manera que la separación de los núcleos (partículas de densidad relativamente alta) se logra por sedimentación y/o flotación en un campo de fuerza centrífuga. Los solventes más empleados son el éter etílico, el cloroformo, el benceno, el tetracloruro de carbono, el ciclohexano y el éter de petróleo.

Las principales ventajas del empleo de medios no acuosos son la ausencia de absorción de materiales hidrosolubles y la eliminación de algunas alteraciones que pueden presentarse en medios acuosos, como son autólisis, efectos de pH, aglutinación, etc.; estas características hacen muy útiles las mezclas de solventes no acuosos en la separación de partículas para el estudio de sus componentes no lipóideos.

FIGURA 1
 FRACCIONAMIENTO DE CÉLULAS HEPÁTICAS
 (SCHEIDER Y HOGEBOON²¹)



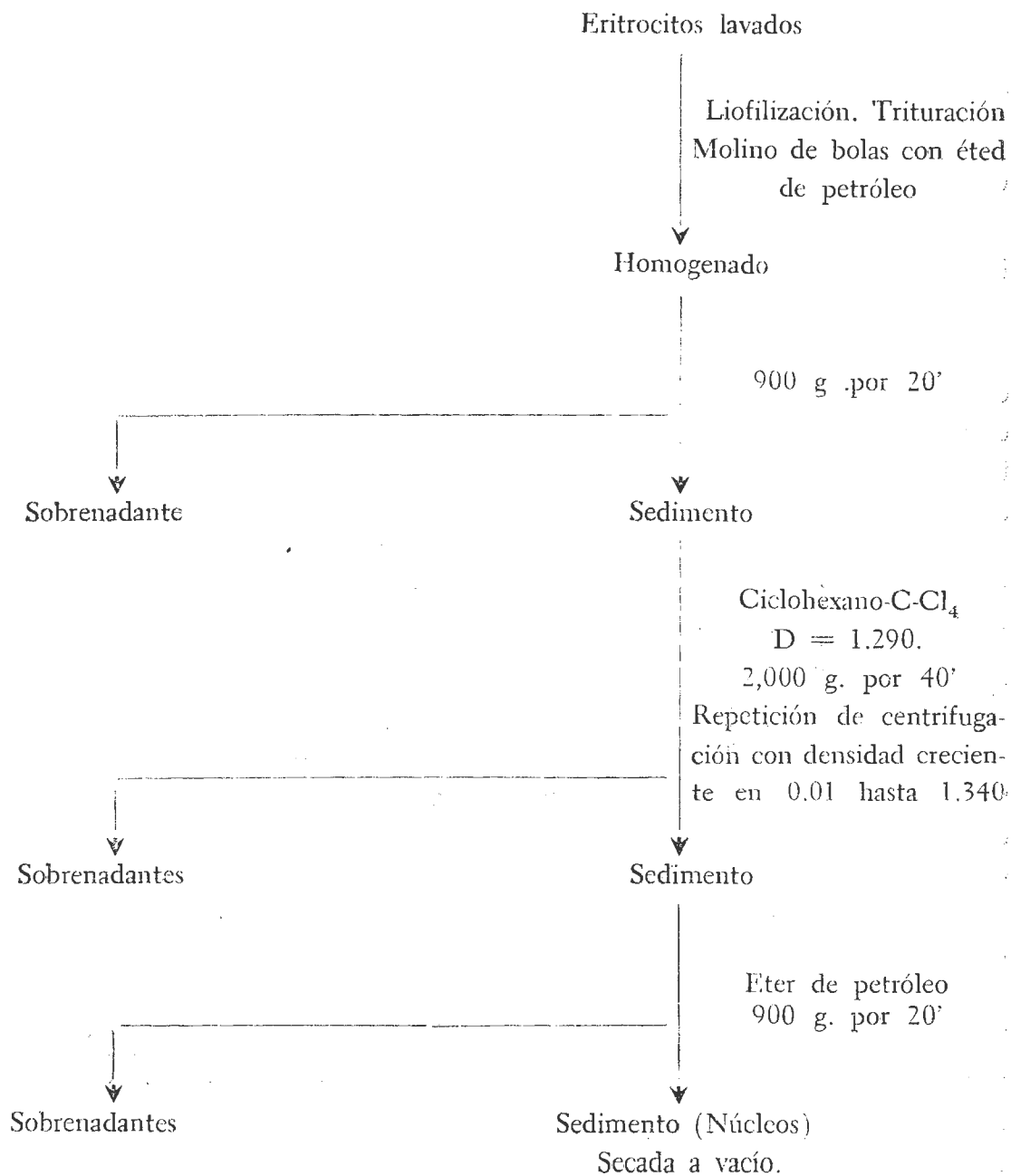
Las desventajas más serias de estos métodos son la pérdida de material lipóideo y la inactividad de algunas enzimas; la primera es la causa de que utilicen solventes orgánicos para el aislamiento de mitocondrias u otras partículas citoplásmicas ricas en lípidos, los cuales en muchos casos son cofactores o componentes de sistemas enzimáticos característicos. En lo que se refiere a la posible pérdida de actividades enzimáticas, Allfrey¹⁵ ha realizado un estudio crítico de estos procedimientos y concluye que la actividad enzimática de preparaciones de núcleos obtenidas con el empleo de los solventes mencionados es comparable a la de los polvos acetónicos, e inclusive sugiere que los numerosos datos consignados en la literatura para éstos se utilicen como guía para considerar la posibilidad de que determinados sistemas enzimáticos se inactiven o no al emplear solventes orgánicos en el aislamiento de partículas subcelulares.

El siguiente paso en los procedimientos para aislar partículas subcelulares es la separación de la mezcla de éstas obtenida en los pasos que se han revisado en los párrafos anteriores.

La diferencia de densidad, tamaño, carga, grado de solvatación, etc. entre las diversas partículas subcelulares es la base de los procedimientos para su separación. Los métodos más utilizados son la centrifugación diferencial o en un gradiente de densidad. El principio de los métodos de centrifugación es el hecho de que, en un medio de suspensión determinado, la velocidad de sedimentación de una partícula sometida a la acción de una fuerza centrífuga depende, entre otras variables, de su tamaño y densidad. En la centrifugación diferencial la variación en la intensidad de la fuerza centrífuga y en el tiempo de centrifugación permiten la separación de diferentes tipos de partículas. En un procedimiento típico, en el que se utiliza una solución de sacarosa como medio de suspensión²¹, se obtiene primero una fracción con núcleos y células no destruidas, otra de mitocondrias, y una tercera con partículas microsomales y finalmente la "fracción soluble", conocida también como sobrenadante. En la Fig. 1 se presenta un esquema típico que indica los detalles de este tipo de fraccionamiento celular.

La centrifugación diferencial también se emplea en los métodos que utilizan solventes orgánicos como medio de suspensión de los restos celulares, y en la Fig. 2 se presenta un esquema de un procedimiento para el aislamiento de núcleos por medio de solventes no acuosos.

FIGURA 2
 PREPARACIÓN DE NÚCLEOS DE ERITROCITOS DE AVES
 (ALLFREY¹⁵)



En los métodos clásicos a partir de homogenados en sacarosa²¹ las cuatro fracciones obtenidas, en ocasiones están contaminadas entre sí o con otras partículas. Así, la fracción nuclear contiene una proporción considerable de células íntegras; la porción mitocondrial contiene los lisosomas de de Duve³⁶; además Kuff y Schneider³⁷ han demostrado que las mitocondrias obtenidas en sacarosa isotónica por el método clásico de centrifugación diferencial tiene una marcada heterogeneidad enzimática que se pone de manifiesto al volver a fraccionar la preparación en un gradiente de concentración de sacarosa.

Las consideraciones teóricas acerca de la sedimentación de partículas en un campo de fuerza centrífuga se han tratado desde hace tiempo por diversos autores (por ejemplo Svedberg³⁸, y desde el punto de vista práctico Allfrey¹⁵ hace una serie de consideraciones interesantes, aplicadas a la separación de partículas, pero el contenido de estos aspectos sale de las posibilidades de esta plática y únicamente se indicará la importancia de las sedimentaciones repetidas (lavados), señalando que en un ejemplo citado por el mencionado autor se pone de manifiesto una contaminación de 40% de unas partículas con otras cuando se emplea una sola sedimentación.

Para finalizar este trabajo se mencionará brevemente el fraccionamiento de las mitocondrias en diversas partículas submitocondriales, estructuras de complejidad menor que la mitocondria original, que pueden considerarse "secciones" de ella, tanto desde el punto de vista estructural como funcional⁷. Este subfraccionamiento se ha realizado principalmente por el grupo de Green⁷, y el estudio de las subpartículas ha arrojado valiosos datos acerca del transporte de electrones y de la fosforilación oxidativa, que pueden considerarse como las principales contribuciones mitocondriales al metabolismo celular.

Los procedimientos para la obtención de estas partículas se han presentado en numerosos artículos originales y en diversos artículos de revisión^{7, 9, 40} y se pueden resumir como sigue:

Las mitocondrias preparadas en sacarosa isotónica (0.25 M.), generalmente con alteraciones estructurales, pueden separarse por centrifugación en mitocondrias pesadas y en mitocondrias ligeras. El tratamiento de estas últimas con etanol y fosfato lleva a la formación de dos partículas una conocida como mitocondria pequeña o PETP* y la otra denominada

* Partícula fosforilante y transportadora de electrones.

ETP**, ambas capaces de transportar electrones, pero sólo la primera con capacidad para acoplar la fosforilación y la respiración. El estudio de estas partículas al microscopio electrónico indica que la fosforilante (PETP) tiene la estructura de doble membrana característica de la mitocondria intacta, que no presenta la otra partícula (ETP). Actualmente se considera que la estructura de doble membrana es indispensable para el acoplamiento entre la fosforilación y el transporte de electrones por la cadena oxidativa.

El tratamiento de las mitocondrias pesadas con energía ultrasónica en condiciones adecuadas lleva a la producción de otra partícula submitocondrial, con doble membrana, conocida como ETPH, capaz de acoplar la fosforilación al consumo de oxígeno, que a su vez puede ser transformada en la partícula no fosforilante (ETP).

Se han preparado por diversos autores algunas otras partículas submitocondriales con capacidad de acoplar la fosforilación y la respiración. Por ejemplo las obtenidas por Pullman y sus colaboradores⁴¹ por tratamiento de la fracción mitocondrial de corazón en un desintegrador de Mickler las preparadas por Kielley y Bronk⁴² o por el grupo de Lardy⁴³ empleando la acción de la energía ultrasónica sobre mitocondrias de hígado. Lehninger y sus colaboradores⁴⁴ obtienen una partícula, a partir de mitocondrias tratadas con digitonina, la cual es capaz de catalizar la oxidación del beta-hidroxibutirato, acoplando la oxidación a la fosforilación con una relación P/O cercana a 2; esta partícula, que no es capaz de oxidar el succinato o el DPNH, se ha utilizado por dicho autor para estudiar el mecanismo de la fosforilación oxidativa y el sitio de acción de los agentes que la desacoplan; muchos de los datos de este grupo los consignan en un artículo del Symposium sobre la Regulación del Metabolismo Celular⁴⁵.

Volviendo a los trabajos del grupo de Green, su partícula no fosforilante (ETP) es el punto de partida para la preparación de una serie de partículas submitocondriales que representan diversas combinaciones de las enzimas encargadas del transporte de electrones en la mitocondria. La naturaleza y propiedades biológicas de algunas de estas partículas se presentan en la Tabla I.

** Partícula transportadora de electrones.

TABLA I

PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIALES OBTENIDAS DE MITOCONDRIAS DE MÚSCULO CARDÍACO.

Denominación	Observaciones	Preparación	Componentes**	Referencia
1) PETP	Fosforilante, con actividad de oxidasa de DPNH y de succinato.	Ver el texto.	$f_s f_d c^* a$	7,9
2) ETP	No fosforilante, con actividad de oxidasa de DPNH y de succinato.	Ver el texto.	$f_s f_d b c^* a$	7,9
3) Complejo de deshidrogenasa succínica y de DPNH citocromos b y c	Obtenida de ETP, tiene actividad deshidrogenante de DPNH y de succinato.	Tratamiento con colato y precipitación con sulfato de amonio, o tratamiento con alcoholes <i>t</i> -amílico e isobutírico* fosfato.	$f_s f_d b c^* a$	49, 50, 51
4) Complejo de deshidrogenasa succínica y de DPNH citocromos c_1 y c	Igual que la anterior, pero no requiere citocromo b .	Extracción de 2) con isobutanol.	$f_s f_d c_1 c$	52
5) Complejo de deshidrogenasa succínica-citocromos b y c_1	No contiene citocromo c , no oxida DPNH.	Tratamiento de 3) con colato y KCl.	$f_s b c_1$	46, 47, 51
6) Complejo de deshidrogenasa de DPNH citocromos b y c_1	No contiene citocromo c , no oxida al succinato.	Tratamiento de 2) o 3) con colato y sulfato de amonio.	$f_d b c_1$	47, 53
7) Oxidasa de DPNH	No presenta actividad de oxidasa de succinato.	Tratamiento de 2) con desoxicolato.	$f_d b c^* a$	54
8) Oxidasa modificada de DPNH	Oxidación aerobia de DPNH, requiere citocromo c añadido.	Tratamiento de 2) con desoxicolato.	$f_d b a$	55

Notas: * Modificada de Goodwin⁴⁰.

** Se emplea la notación de Green: a, b o c representan los citocromos, c^* cuando no se sabe si se trata de citocromo $c-1$ o c ; f_d y f_s indican las deshidrogenasas del DPNH o succínica respectivamente. Todas las enzimas de la cadena de transporte de electrones se han aislado⁷.

Muchos de los datos que han permitido un mejor conocimiento de las características funcionales de la mitocondria se han obtenido por el estudio de las partículas submitocondriales. La consideración detallada de estos aspectos sale de los límites y objeto de esta plática, sin embargo, se pueden mencionar algunos ejemplos. El aislamiento de un complejo deshidrogenasa succínica-citocromos *b* y *c₁* (partícula 3 de la Tabla I), y de otro deshidrogenasa del DPNH-citocromos *b* y *c₁* (partícula 4 de la Tabla I) es un fuerte indicio de que la cadena de transporte de electrones en la mitocondria consiste en dos cadenas separadas (aunque con algunos puntos de unión), una para la oxidación del succinato y otra para la oxidación del DPNH^{7, 40, 46, 47}, aún cuando no se puede excluir totalmente la existencia de una cadena común que transporte los electrones provenientes de la oxidación tanto del succinato como del DPNH^{7, 40}. Además, la estructura de estas partículas (deshidrogenasa succínica o del DPNH y citocromos *b* y *c₁*) significa un refuerzo a la consideración de que los citocromos *b* y *c₁* preceden al citocromo *c* en la cadena de transporte de electrones⁴⁰.

El papel de los lípidos de la mitocondria intacta y de algunas partículas submitocondriales ya sea como cemento y material de intercomunicación entre diversas enzimas o contribuyendo activamente al transporte de electrones (coenzima Q por ejemplo) también se ha podido dilucidar por el estudio de partículas obtenidas por desintegración de la mitocondria con agentes tensionales⁷. Se puede indicar también que algunas relaciones entre la estructura y la función de la mitocondria se han puesto de manifiesto gracias al conocimiento de la estructura de ciertas partículas submitocondriales y en este sentido ya se mencionó que la existencia de una doble membrana es condición *sine qua non* para el acoplamiento entre la fosforilación y el consumo de oxígeno.

La desintegración de la mitocondria en subunidades que representan fragmentos de la cadena de transporte de electrones hace pensar en la posibilidad de reconstrucción de partículas relativamente complejas a partir de sus componentes, de tal modo que el fragmento reconstruido se comporte como una entidad funcional definida que resista a la disociación, y no únicamente como un sistema enzimático cuyas partes estén conectadas funcional, pero no estructuralmente, por un intermediario. Esto se ha logrado por Hafeti y sus colaboradores⁴⁸, quienes han reconstruido partículas con actividad de DPNH-citocromo *c* reductasa, succinato-citocromo *c* reductasa o succinato-DPNH-citocromo *c* reductasa

($f_s b c_1$, $f_d b c_1$ o $f_s f_d b c_1$ respectivamente, de acuerdo con la nomenclatura de Green mencionada en la Tabla I) a partir de las siguientes partículas menos complejas:

- I) DPNH-coenzima Q reductasa (DPNH deshidrogenasa, fd)
- II) succinato-coenzima Q reductasa (deshidrogenasa succínica, fs) y
- III) coenzima Q reducida-citocromo c reductasa (citocromos b y c, bc_1).

Cada partícula no presentó otra actividad mensurable que la indicada en su denominación, y I y II tuvieron suficiente coenzima Q para que las partículas reconstruidas catalizaran la reducción del citocromo c por el succinato y/o el DPNH.

Las partículas reconstruidas no se disociaron, ni aún en solución diluida, y se comportaron como una sola unidad al someterse a un campo de fuerza centrífuga; además presentaron la actividad enzimática y sensibilidad a inhibidores (amital, tenoiltrifluoroacetona y antimicina A) correspondientes a partículas similares, pero obtenidas no por reconstrucción, sino por desintegración de fragmentos mitocondriales más complejos.

Estos ejemplos podrían hacer pensar en la reconstrucción de partículas de estructura más compleja, de toda la cadena de transporte de electrones, o aún de la actividad completa de la mitocondria; sin embargo, esto quedaría fuera de la realidad, ya que los componentes funcionales de la mitocondria son parte de un sistema estructural de gran complejidad y mientras esta estructura o su equivalente no pueda reproducirse, la reconstrucción no es posible.

REFERENCIAS

1. Harrison, M. F.: *Proc. Royal Soc. B.* 141: 203, 1953.
2. Hogeboom, G. H., Schneider, W. C. y Striebich, M. J.: *Biol. Chem.* 196: 111, 1952.
3. Anderson, N. G.: *Physical Techniques in Biological Research*. Oster, G. y Pollister, A. W. Editores, Vol. III, pág. 229. Academic Press, Nueva York, 1956.
4. Osawa, S., Allfrey, V. G. y Mirsky, A. E.: *J. Gen. Physiol.* 40: 491, 1957.
5. Tórgerson, O., Walles, O. y Ostgaard, A.: *Acta Path. et Microb. Scand. Sup.* 93: 168, 1952.
6. Weinbach, E. C.: *Anal. Biochem.* 2: 335, 1961.
7. Green, D. E.: *Structure and function of subcellular particles*. Sesión Plenaria, V Congreso Internacional de Bioquímica, Moscú, 1961.

8. Berthet, J. Berthet, L., Appelmans, F. y de Duve, C.: *Biochem. J.* 50: 182, 1951.
9. Green, D. E.: *Adv. Enzymol.* 21: 73, 1959.
10. Mirsky, A. E. y Ris, H.: *J. Gen. Physiol.* 34: 475, 1951.
11. Stern, R. y Bird, L. H.: *Biochem. J.* 44: 635, 1949.
12. Allfrey, V. G., Mirsky, A. E. y Osawa, S.: *J. Gen. Physiol.* 40: 451, 1957.
13. Allfrey, V. G.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 40: 881, 1954.
14. Mirsky, A. E. y Ris H.: *J. Gen. Physiol.* 31: 1, 1947.
15. Allfrey, V. G.: *The Cell*. Brachet, J. y Mirsky, A. E. Editores, Vol. I, Academic Press, Nueva York, 1957.
16. de Duve, C., Pressman, B. L., Gianetto, R., Wattiaux, R. y Appelmans, F.: *Biochem. J.* 60: 604, 1955
17. Stocking, C. R.: *Science* 123: 1032, 1956.
18. Allfrey, V. G., Stern, H., Mirsky, A. E. y Sactren, H.: *J. Gen. Physiol.* 35: 529, 1952.
19. Smelie, R. M. S., Humprey, G. F., Kay, E. R. M. y Davidson, J. N.: *Biochem. J.* 60: 177, 1955.
20. Hogeboom, G. H., Schneider, W. C. y Palade, G. E.: *J. Biol. Chem.* 172: 619, 1948.
21. Schneider, W. C.: *J. Biol. Chem.* 183: 123, 1950.
22. Allfrey, V. G., Osawa, S. y Mirsky, A. E.: *Nature* 177: 1042, 1955.
23. Schneider, R. M. y Peterman, R. M.: *Cancer Res.* 10: 751, 1950.
24. Slater, E. C. y Cleland, K. W.: *Biochem. J.* 55: 566, 1953.
25. Lewis, E. y Slater, E. C.: *Biochem. J.* 58: 207, 1954.
26. Novikoff, A. B.: *Symposia Soc. Exp. Biol.* 10: 92, 1957 ,citado en (15).
27. Stumpf, P. K. y Barber, G. A.: *J. Biol. Chem.* 227: 407, 1957.
28. Martin, E. M. y Morton, R. K.: *Biochem. J.* 65: 404, 1954.
29. Wilbur, K. M. y Anderson, N. G.: *Exptl. Cell. Res.* 2: 47, 1951, citado en (15)
30. Cleland, K. W.: *Nature*, 160: 197, 1952.
31. Arnon, D. I., Allen, M. B. y Whatley, F. R.: *Biochim. et Biophys. Acta* 20: 449, 1956.
32. Newton, J. W. y Kamen, M. D.: *Biochim. et Biophys. Acta* 25: 462, 1957.
33. Mc Quillen, K.: *Biochim. et Biophys. Acta* 18: 458, 1956.
34. Gale, E. F. y Folkes, J. P.: *Biochem. J.* 59: 661, 1955.
35. Behrens, M.: *Z. Physiol. Chem.* 209: 59, 1932, citado en (15)
36. de Duve, C.: *Exp. Ann. Bioch. Med.* 20: 197, 1958.
37. Kuff, E. L. y Schneider, W. C.: *J. Biol. Chem.* 199: 302, 1952.
38. Svedberg, T. y Pederson, K. O.: *The Ultracentrifuge*. Oxford University Press, Londres y Nueva York, 1940.
39. de Duve, C. y Berthet, J.: *Intern. Rev. Cit.* 3: 225, 1954, citado en (15).

40. Goodwin, T. W.: *Recent Advances in Biochemistry*. Pág. 18 et seq. J. y A. Churchill, Londres, 1960.
41. Pullman, M. E., Penefsky, H. S., Datta, A. y Racker, E.: *J. Biol. Chem.* 235: 330, 1960.
42. Kielley, W. W. y Bronk, J. R.: *Biochim. et Biophys. Acta* 23: 448, 1957. *ibid.* 24: 440, 1957; *J. Biol. Chem.* 230: 521, 1958.
43. Mc Murray, W. C., Maley, G. F. y Lardy, H. A.: *J. Biol. Chem.* 230: 219, 1958.
44. Lehninger, A. L.: *Harvey Lect. Ser.* 39: 176, 1953-1954, citado en (7).
45. Lehninger, A. L., Walkins, C. L. y Remmert, L. B.: *A Ciba Foundation Symposium on the Regulation of Cell Metabolism*, pág. 130. J. y A. Churchill, Londres, 1959.
46. Green, D. E. y Burkhard, R. K.: *Arch. Biochem. Biophys.* 92: 312, 1961.
47. Járnefelt, J., Basford, R. E., Tisdale, H. D. y Green, D. E.: *Biochem. et Biophys. Acta* 29: 125, 1958.
48. Hatefi, Y., Haavik, A. G. y Griffith, D. E.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 4: 447, 1961.
49. Rabinowitz, A. S. y de Bernard, B.: *Biochem. et Biophys. Acta.* 26: 22, 1957.
50. Green, D. E. Mii, S. y Kohout, P. M.: *J. Biol. Chem.* 217: 551, 1955.
51. Basford, R. E., Tisdale, H. D., Glenn, J. L. y Green, D. E.: *Biochem. et Biophys. Acta* 24: 107, 1957; *ibid.* 21: 16, 1957.
52. Green, D. E., Ziegler, D. M. y Doeg, K. A.: *Arch. Biochem. Biophys.* 85: 280, 1959.
53. Mackler, B. y Penn, N.: *Biochem. et Biophys. Acta* 24: 294, 1957.
54. Crane, F. L. y Glenn, J. L.: *Biochem. et Biophys. Acta* 24: 100, 1957.
55. Green, D. E., *Faraday Society Discussions*, citado en (40).