



TECNICAS PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCION MITOCONDRIAL

1. Aislamiento de mitocondrias

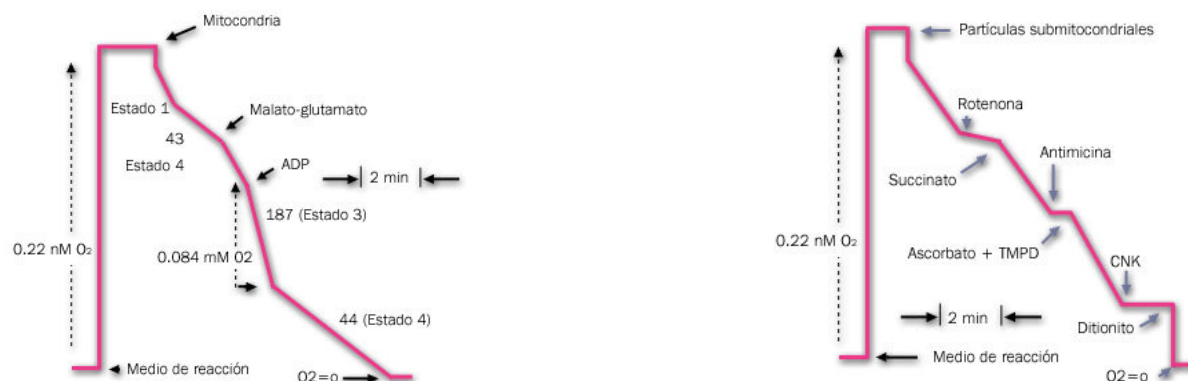
Las mitocondrias se aíslan como estructuras intactas, con su doble membrana. Los órganos (hígado y riñón) se pesan y se colocan en una solución amortiguadora MSTE, en una proporción de 9ml/g órgano. Se realizan sucesivos cortes y lavados de los órganos, y se homogeneizan utilizando un homogeneizador de teflón. Los homogeneizados se centrifugan a 700g durante 10 minutos para descartar núcleos y membranas celulares. Posteriormente, el sobrenadante se centrifuga a 8000g durante 10 minutos. El nuevo pellet es lavado y resuspendido en la misma solución amortiguadora, y consiste principalmente en mitocondrias intactas. Las centrifugaciones se realizan a 2-4 °C [i,ii].

2. Determinación del consumo de oxígeno

La velocidad de consumo de oxígeno se determina utilizando el electrodo de Clark, adosado a una cámara de incubación con un baño termostatzado de circulación y con agitación constante. El electrodo de oxígeno realiza lecturas polarográficas de forma continua del consumo de oxígeno en el interior de la cámara de incubación cerrada con una tapa de vidrio esmerilada. El electrodo de Clark mide la presión de oxígeno en forma de corriente eléctrica a un voltaje de polarización constante (0,6V vs. Ag/AgCl). Esta corriente es directamente proporcional a la presión parcial del oxígeno (pO₂) que difunde a la superficie reactiva del electrodo. Los datos se obtienen con un software específico.

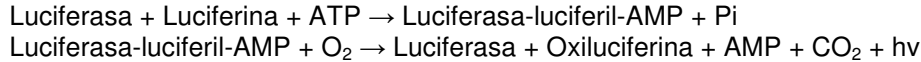
La respiración mitocondrial se evalúa en los estados 3 (alto contenido de ADP y sustrato) y 4 (bajo contenido de ADP y alto de sustrato) para calcular el control respiratorio (Velocidad en estado 3/estado 4). El mismo es función del grado de acoplamiento mitocondrial y es un indicador de la integridad mitocondrial.

Además, se pueden agregar distintos inhibidores o desacoplantes de la cadena respiratoria para evaluar el grado de inhibición de la misma.



3. Velocidad de producción de ATP

La mitocondria es la mayor fuente de ATP. Es fundamental que la determinación se realice en mitocondrias frescas y acopladas para que mantengan su potencial de membrana. La velocidad de producción de ATP se lleva a cabo por el sistema luciferina-luciferasa. La cinética de producción de ATP por la ATP sintasa se determina con un contador de centelleo o un luminómetro, a través de la reacción catalizada por la luciferasa:



La reacción produce un máximo de emisión a 560 nm, siendo la intensidad proporcional a la cantidad de sustrato (ATP) en la mezcla de reacción.

El ATP también se forma por la adenilato quinasa, por lo que se agrega di(adenosina)pentafosfato que es su inhibidor.

4. Actividad de los complejos de la cadena respiratoria

La suspensión de mitocondrias se congela y descongela 3 veces para romper las membranas y liberar los complejos. La determinación de la actividad de la NADH-citocromo c reductasa (complejo I-III) y de la succinato-citocromo c reductasa (complejo II-III) se fundamenta en la reducción del citocromo c^{3+} a citocromo c^{2+} , determinándose espectrofotométricamente el aumento de este compuesto durante 2 min a 550 nm. En tanto, la actividad de la citocromo oxidasa (complejo IV) se fundamenta en la oxidación del citocromo c^{2+} a citocromo c^{3+} , ya que esta enzima es capaz de oxidar el citocromo c^{2+} transfiriendo los electrones al oxígeno.

5. Producción de peróxido de hidrogeno

La generación mitocondrial de H_2O_2 se determina generalmente en estado 4 y constituye un parámetro indicador de la funcionalidad de la cadena respiratoria. El estado metabólico regula la producción mitocondrial de H_2O_2 . En estado de reposo los complejos respiratorios se encuentran en su forma reducida y la generación de H_2O_2 se encuentra aumentada.

La velocidad de producción de H_2O_2 mitocondrial se determina en mitocondrias intactas a través de una técnica fluorométrica que utiliza peroxidasa de rabano (HRP) en presencia de escopoletina. La escopoletina es un compuesto fluorescente en su forma reducida (EH2) y no fluorescente en su forma oxidada (E). El H_2O_2 forma un complejo enzima-sustrato con la peroxidasa. La EH2 reacciona con el complejo HRP(H_2O_2), dando lugar a la formación de escopoletina oxidada. Se determina la disminución de la fluorescencia a 365-450 nm a 30°C durante 2 minutos.

i Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J*, 134: 707-16. 1973.

ii Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 59:527-605. 1979.