

## ARTÍCULOS ORIGINALES

# ACTIVIDAD DE ATPasa EN CORAZÓN DE COBAYOS DE ALTURA

LUZ OYOLA H\*, HAYDÉE ZÚÑIGA C\*, DELIA WHU W, EDGAR FLORENTINI R,  
ELIZABETH CARRANZA A\* Y ELIZABETH GONZÁLES L\*

\*INSTITUTO NACIONAL DE BIOLOGÍA ANDINA, FACULTAD DE MEDICINA,  
UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS LIMA - PERÚ, FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA.

### RESUMEN

Se compara la actividad de ATPasa, la relación ADP:O (P:O) y el Control Respiratorio (RCR) en mitocondria de corazón entre cobayos de altura (Morococha, 4540 m.s.n.m.) (Alt) y cobayos del nivel del mar (Lima, 150 m.s.n.m.) (NM). El estudio se realizó en 60 cobayos machos, 30 en cada nivel de altitud, con un peso promedio de 400 a 450 gramos. Las mitocondrias de corazón fueron obtenidas por centrifugación diferencial a 4° C. La relación P:O y el RCR fueron medidos polarográficamente por el método de Tyler, y la hidrólisis del ATP se realizó por el método de Holton et al. Los valores medios obtenidos en mitocondrias de corazón al NM y en Alt, expresados en micromoles de oxígeno consumido/mg de proteína/hora, fueron: con Glutamato + Malato como sustratos, respectivamente: P:O 2.90, RCR 6.02 y P:O 2.93, RCR 6.0; y con Piruvato + Malato como sustratos, respectivamente: P:O 2.60, RCR 5.0 y P:O 2.70, RCR 4.80. La actividad ATPasa fue al NM y en Alt, respectivamente: 57.50 y 64.50 mmoles de P/mg proteína/hora. Los resultados sugieren que los cobayos de altura han desarrollado la habilidad de realizar la fosforilación oxidativa en forma más eficiente, y el ligero incremento observado en la actividad de ATPasa indica que tal vez se realizan pequeños ajustes para mantener el equilibrio dentro del medio ambiente mitocondrial.

*Palabras Clave:* ATP, polarografía, mitocondria, fosforilación.

### SUMMARY

Heart mitochondrion ATPase activity, ADP:O ratio (P:O) and Respiratory Control (RCR) are compared between guinea pigs from high altitude (Morococha, 4540 m) (HA) and those from sea level (SL). The study comprised 60 male guinea pigs, 30 from each altitude level, with mean weight 400-450 grams. Heart mitochondria were obtained by differential centrifugation at 4°C. P:O ratio and RCR were measured polarographically by Tyler method, and ATP hydrolysis was done by Holton et al. Method. Mean values obtained for heart mitochondria at SL and HA, expressed in mmoles oxygen uptake/mg protein/hour, were, with Glutamate + Malate as substrates, respectively: P:O 2.90, RCR 6.02 and P:O 2.93, RCR 6.0; and, with Pyruvate + Malate as substrates, respectively P:O 2.60, RCR 5.0 and P:O 2.70, RCR 4.80. ATPase activity was at SL and HA, respectively: 57.50 and 64.50 mmoles P/mg protein/hour. The results suggest that high altitude guinea pigs may have developed the ability to perform oxydative phosphorylation more efficiently, and that the slight increment observed in ATPase activity indicates that some adjustments are made to maintain the equilibrium within the mitochondrial environment.

*Key words:* ATP, polarographically, mitochondria, phosphorylation.

### INTRODUCCIÓN

El Trifosfato de adenosina (ATP) es el transportador universal de energía libre, llamado también «moneda universal de energía libre». Se encuentra en todas las células vivas: animales, vegetales y microorganismos. Se sintetiza a partir de ADP y Pi en un proceso denominado fosforilación oxidativa, catalizado por una enzima denominada APTasa, que se encuentra en la interfase membrana interna - matriz mitocondrial y que utiliza energía electroquímica para trabajar; generada

por diferencia en las concentraciones de protones ( $H^+$ ) de los lados externo e interno de la membrana mitocondrial, muy similar a una pila voltaica biológica verdadera.

La oxidación completa de moléculas combustibles orgánicas de diferente estructura química como: la glucosa en la glucólisis, los ácidos grasos en la beta-oxidación y las proteínas mediante sus aminoácidos; transfieren hidrógenos y electrones

por reacciones de óxido reducción y fosforilación oxidativa liberando energía que es capturada por la molécula de ADP para formar ATP,  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ .

En la altura debido a la baja presión parcial del oxígeno y a la mayor exposición a radiaciones ultravioleta, el organismo humano y animal recurre a cambios fisiológicos adaptativos para satisfacer su demanda de oxígeno y mantener una vida normal.

En el Perú numerosos investigadores, entre ellos Reynafarje B., Reynafarje C, Velásquez T., Oyola L y otros han encontrado modificaciones en la actividad de algunas enzimas, lo que sugiere que son mecanismos de defensa natural de los organismos en la altura. Por esas razones, en esta investigación estudiamos la velocidad de utilización del oxígeno, control respiratorio y actividad de ATPasa en animales nativos de altura y de nivel del mar con la finalidad de dilucidar algunos aspectos bioquímicos relacionados con la bioenergética en la altura.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Animales de experimentación

El presente estudio se realizó en 60 cobayos machos con un peso promedio de 400 a 450 gramos: 30 cobayos de altura (Morococha) y 30 cobayos de nivel del mar (Lima).

### Obtención de mitocondrias

Las mitocondrias fueron obtenidas de un homogeneizado de tejido (corazón), utilizando un medio MSE (Manitol 0.225 M, Sucrosa 0.075 M, EDTA 0.05 mM) pH 7.4 a 4° C y sometido a centrifugación diferencial (Tyler).

El residuo mitocondrial después de la quinta centrifugación se resuspendió en MSE helado obteniéndose una suspensión de mitocondria, en ella se realizaron los estudios de fosforilación oxidativa (APD:O) y Control Respiratorio (RCR) mediante un polarógrafo utilizando un electrodo de oxígeno (Estabrook).

Las mediciones fueron realizadas en una mezcla de reacción que contenía Manitol 0.225 M, Sucrosa 0.070 M, EDTA 1 mM, Buffer de fosfato 0.010 M, pH 7.2 y una concentración de proteínas 2.5 mg.

Los sustratos añadidos: Glutamato, malato y piruvato fueron añadidos a una concentración 10 mM. La velocidad de consumo de oxígeno se midió en un

polarógrafo con electrodo de Clark después de la adición de 0.1 M de ADP. Los valores se expresaron como mmoles de oxígeno consumido por mg de proteína por hora. La temperatura fue de 22° C. La actividad de ATPasa se midió por el método de Holton et al y se expresó como mmoles de P/mg de proteína/hora. Se utilizó un período de incubación de cinco minutos según los procedimientos descritos por Boyer, Murphy y Oyola, 2,002.

## RESULTADOS

En la Tabla I se puede apreciar los valores medios y desviaciones estándar de la fosforilación oxidativa en mitocondrias de corazón de cobayos de altura (Morococha, 4540 m.s.n.m.) y de nivel del mar (Lima, 150 m.s.n.m.).

Los valores medios de la relación ADP:O y Control Respiratorio (RCR), expresados como mmoles de oxígeno consumido/mg de proteína/hora, son similares en los animales de altura y nivel del mar: cuando el sustrato es malato + glutamato: ADP:O 2.93, RCR 6.0 y ADP:O 2.90, RCR 6.02; y cuando el sustrato es piruvato + malato: ADP:O 2.70, RCR 4.80 y ADP:O 2.60, RCR 5.0.

En la Tabla II se observan los valores medios de actividad de ATPasa obtenidos en cobayos de altura 64.50 y nivel del mar 57.50, expresados como mmoles de P/mg de proteína/hora.

## DISCUSIÓN

Del análisis estadístico de los resultados obtenidos de la relación P:O (número de moléculas de ATP sintetizadas por par de electrones transportados a través del transporte electrónico), y el Control Respiratorio (relación entre la respiración en estado 3 y la correspondiente al estado 4) tanto en los animales de altura como del nivel del mar se hace evidente que la respiración mitocondrial está controlada por la presencia de ADP y los sustratos utilizados y que son los factores determinantes de la actividad respiratoria, y expresan el grado de acoplamiento entre los procesos de oxidación y de fosforilación (Flatt, Tyler y col., Alvarez y col., Reynafarje y Oyola).

La mayor actividad de ATPasa observada en los animales de altura se debería a la entrada de gran cantidad de protones a la matriz mitocondrial con el objeto de generar energía (ATP) a mayor velocidad cuando la concentración de oxígeno tisular no ha caído a niveles críticos que afectarían las reacciones de fosforilación oxidativa, concordando de esa

manera con los resultados obtenidos por Reynafarje B. y Oyola L. al estudiar la cinética de la fosforilación oxidativa utilizando diferentes concentraciones de ADP.

### CONCLUSIONES

Los cobayos de altura han desarrollado la habilidad de regular el flujo continuo de electrones de los

sustratos hasta el oxígeno en forma más eficiente, y que la mitocondria mantiene su integridad estructural.

El ligero incremento observado en la actividad de ATPasa en los cobayos de altura indica que tal vez se realicen pequeños ajustes para acumular ADP que estimule la respiración con la consiguiente activación de la resíntesis de ATP.

**TABLA I Fosforilación oxidativa en mitocondrias de corazón de cobayos**

Sustrato	Nivel del Mar (Lima, 150 m.s.n.m.) (30)		Altura (Morococha, 4540 m.s.n.m.) (30)	
	P:O	RCR	P:O	RCR
Glutamato + Malato	2.90	6.02	2.93	6.00
Piruvato + Malato	2.60	5.00	2.70	4.80

**TABLA II Comparación de la actividad de ATPasa en mitocondrias de corazón**

Sustrato	Nivel del Mar (Lima, 150 m.s.n.m.) (30)	Altura (Morococha, 4540 m.s.n.m.) (30)
Actividad de ATPasa mmoles P/mg de proteína/hora	57.50 ± 0.90	64.50 ± 0.53

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez S., Novoa B., Boveris A. 2001. *La mitocondria, estructura, función y especies reactivas del oxígeno*. Revisión temática actualizada de Revista Antioxidantes y Calidad de Vida 1994; 1:26:32.
- Boyer P.D. 2000. *Catalytic site forms and control in ATP Synthase Catalysis* 2000. Biochem Biophys Acta: 252 - 262.
- Estabrook R.W. 1967. *Mitochondrial Respiratory Control and the Polarographic measurement of ADP:O Ratios*. Methods in Enzymology; X: 41 - 57.
- Flatt JP, Pahud P., Ravussin E. 1984. et al. *An estimate of the P:O ratio in man*. TIBS; 9: 251.
- Holton F.A., Hulsmann W., Myers, Slater 1957. *ATP hydrolysis*. Biochem; 67: 579.
- Klingenberg M. *Structure function of the ADP/ATP carrier* 1992. Biochem. Soc. Trans; 20: 547-550.
- Mitchell P. Keilin's 1979. *Respiratory Chain concept and its Chemiosmotic consequences* 1148. Science, 206:
- Murphy M.P., Brand M.D. 1987. *Variable stoichiometry of proton pumping by the mitochondrial respiratory chain*. Nature; 329: 170.
- Reynafarje B. 1971. *Mecanismos moleculares en la adaptación a la hipoxia de las grandes alturas*. Tesis Doctorado, U.N.M.S.M., Lima.

10. Oyola L. 1971. *Mecanismos de transformación energética a nivel mitocondrial*. Tesis Doctoral, U.N.M.S.M. Lima,
11. Oyola de Bardales L. y col. 2002. *Actividad de ATPasa en animales de altura y de nivel del mar*. V World Congress on Mountain Medicine and High Altitude Physiology No. 64. Barcelona,
12. Shultz B.E. y Chan 2001. S.I. *Structures and Proton pumping Strategies of mitochondrial respiratory enzymes*. Ann. Rev. Biophys Biomol Struct.; 30: 23-65.
13. Tyler D. and Gozue J. 1967. *The preparation of heart mitochondria from laboratory animals*. Methods in Enzymology; X: 75.