

# PROBLEMA BIOQUÍMICO

## ¿CUÁNTO ATP SE PRODUCE EN UNA MITOCONDRIA?

César Pastrana-Pineda (1), Jerónimo Gonce (1), Noé López (1),  
Emma Saavedra (1), Javier A. Belmont-Díaz\*(1)

(1) Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Ciudad de México, México

\*Autor de correspondencia correo E: [javier.belmont@cardiologia.org.mx](mailto:javier.belmont@cardiologia.org.mx); [belmont81@hotmail.com](mailto:belmont81@hotmail.com)

### RESUMEN

La fosforilación oxidativa (FOx) es la culminación del catabolismo en organismos que son dependientes de oxígeno. Este proceso es el responsable de generar la gran mayoría de moléculas de ATP que un organismo necesita para vivir. A pesar de la importancia que juega la FOx en la célula, muy pocas veces somos conscientes de la velocidad que debe tener este proceso para que la célula lleve a cabo sus procesos vitales. En este trabajo analizamos el flujo de la FOx a través de experimentos de respirometría utilizando un oxígrafo de alta resolución (Oroboros Instrument®) para calcular la velocidad de producción de ATP utilizando como modelo a *Trypanosoma cruzi*. El hecho de que este parásito posea una sola mitocondria nos ofrece una oportunidad única para estudiar mitocondrias individuales totalmente íntegras.

### PALABRAS CLAVE

Fosforilación oxidativa,  
respirometría,  
ATP,  
*T. cruzi*

### ABSTRACT

Oxidative phosphorylation (OxPhos) is the culmination of catabolism in aerobic organisms. This process is responsible for generating the most of ATP molecules that an organism needs to live. Despite the importance that OxPhos plays in the cell, we rarely know the rate that this process must have for the cell to carry out its vital processes. In this work, we analyze the OxPhos flow with a high-resolution oxygraph (Oroboros Instrument®) to calculate the rate of the production of ATP using *Trypanosoma cruzi* as a model. The fact that this parasite has only one mitochondrion offers a unique opportunity to study a fully intact individual mitochondrion.

### KEYWORDS

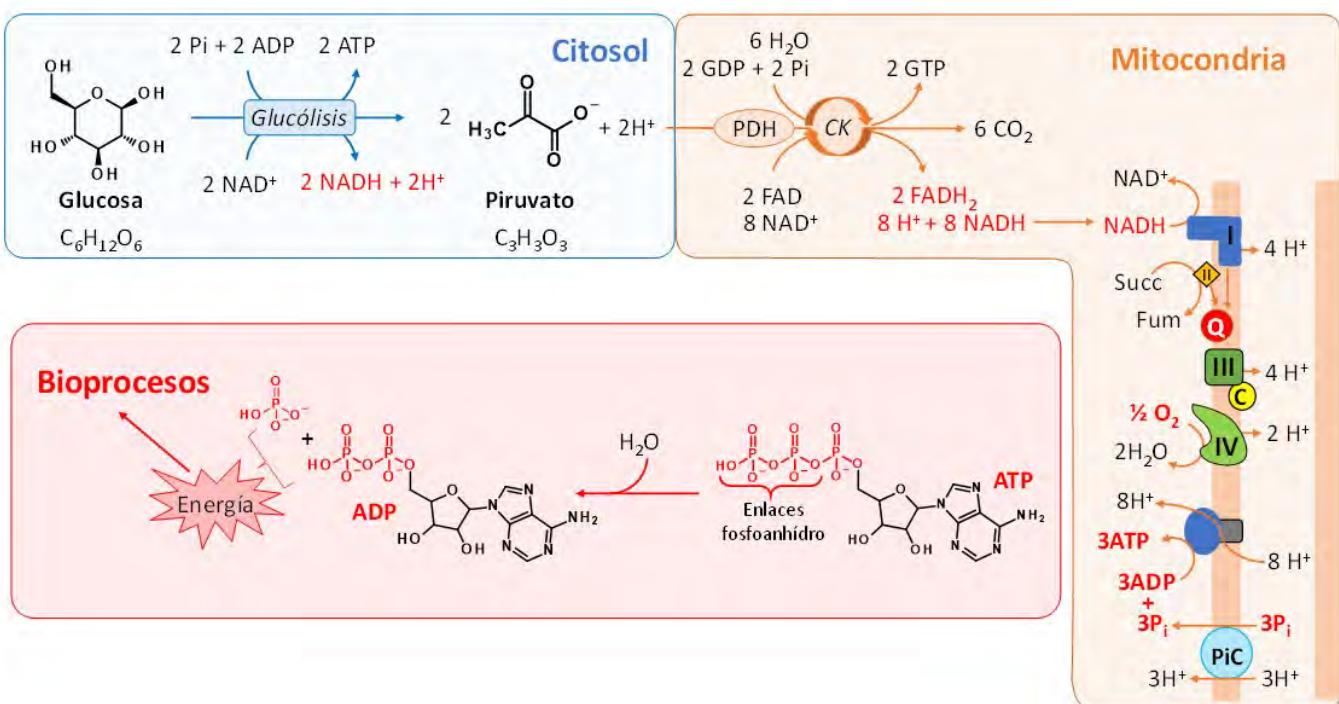
Oxidative phosphorylation,  
respirometry,  
ATP,  
*T. cruzi*

## INTRODUCCIÓN

Los organismos necesitan de la producción de trabajo para mantenerse vivos y poder reproducirse, por lo que requieren de un aporte significativo de energía. De esta manera, al considerarse como un sistema abierto, los organismos han desarrollado principalmente dos estrategias para llevar a cabo el intercambio de materia y energía con su entorno: la primera es absorber la luz solar (organismos fotosintéticos), y la segunda es consumir combustibles químicos, extrayendo la energía de su degradación (organismos heterótrofos) (1). Los alimentos que ingieren los organismos heterótrofos están constituidos de moléculas organizadas (ej. glucosa) que requieren de energía para formarse, por lo que, al romper sus uniones constituyentes durante su metabolismo, se libera parte de esta energía que puede ser usada en las actividades celulares.

La forma más común de almacenar la energía presente en los combustibles químicos y hacerla útil para la célula, es a través de los enlaces fosfoanhídrido del adenosín trifosfato (ATP) (2) (Fig. 1). Se ha estimado que el 90% de las necesidades energéticas de las células se satisface por la oxidación de sustratos, cuyos electrones se transfieren a través de un sistema proteico membranal donde el aceptor final es el oxígeno. Esta acción es mejor conocida como fosforilación oxidativa (FOx) y es llevada a cabo dentro de la mitocondria (3) (Fig. 1).

Comprender la FOx y poder analizarla bajo protocolos en tiempo real es de suma importancia puesto que permite expandir la bioenergética tradicional y estudiar el funcionamiento mitocondrial de manera dinámica. Esto podría ser útil para mejorar los diagnósticos y/o tratamientos de diversas enfermedades humanas (4).



**Figura 1. Transducción de la energía contenida en los enlaces químicos de la glucosa a los enlaces fosfoanhídrido del ATP.** La oxidación de la glucosa en CO<sub>2</sub> requiere de la glucólisis, de la actividad de piruvato deshidrogenasa (PDH) y del ciclo de Krebs (CK). Los equivalentes reductores producidos por la PDH y el CK son utilizados en la cadena de transporte de electrones (CTE) para producir una diferencia de potencial ( $\Delta\Psi_m$ ); la cual servirá como fuerza motriz para transportar fosfato (Pi) a través del acarreador de fosfato (PiC) y para la condensación entre fosfato (Pi) y adenosin difosfato (ADP) y producir finalmente ATP. Los enlaces fosfoanhídrido contienen parte de la energía producida por la oxidación de la glucosa, la cual es utilizada en los diferentes bioprosesos.

## Estudios de respirometría

**Oxígrafo.** La estimación del flujo de FOx puede llevarse a cabo a través de estudios de respirometría,

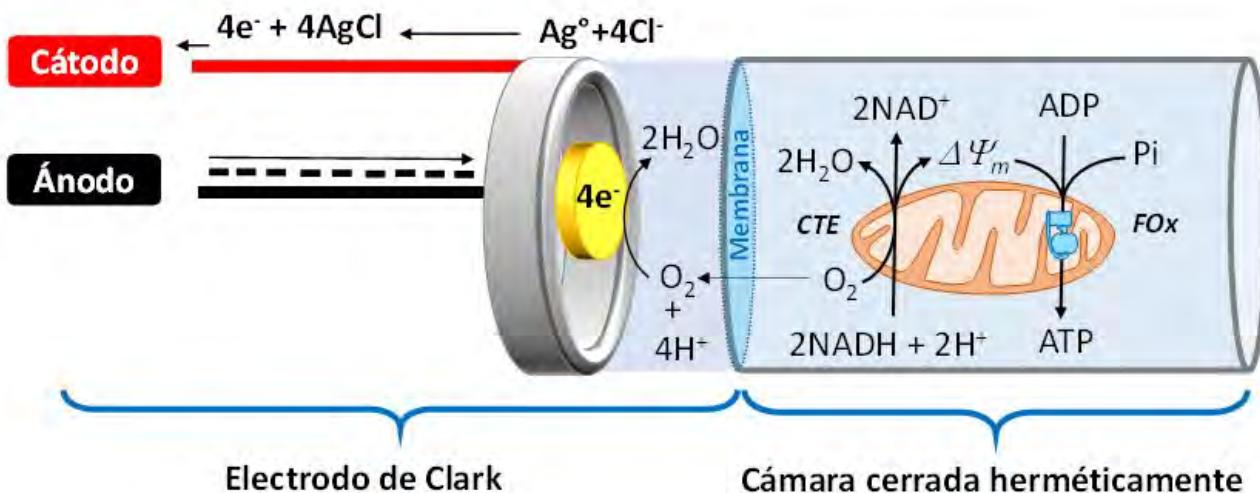
en los cuales se mide el consumo de O<sub>2</sub> en suspensiones mitocondriales o celulares mediante electrodos sensibles a O<sub>2</sub> (ej. electrodo de Clark) acoplados a cámaras herméticas (oxígrafo) (Fig. 2). La can-

tidad de  $O_2$  consumido cuando se utilizan células intactas se debe a procesos no mitocondriales (ej. actividad de enzimas como citocromos P450, xantina oxidasa, etc.) y a la reducción de oxígeno por el complejo IV en la matriz mitocondrial (Fig. 3A).

**Cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa.** Los electrones necesarios para la reducción del oxígeno por el complejo IV provienen

del NADH y del succinato, cuyos electrones pasan a través de los complejos de la cadena transportadora de electrones (CTE) hasta el  $O_2$  (1) (Fig. 3A).

El paso de electrones a través de los complejos I, III y IV produce la transferencia de iones hidronio ( $H^+$ ) de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal, lo que provoca que este espacio sea más positivo que la matriz y por lo tanto se forme un potencial electroquímico ( $\Delta\Psi_m$ ). En mitocondrias



**Figura 2. Oxígrafo diseñado para estudios de respirometría celular.** En una cámara acoplada a un electrodo de Clark (sensor de oxígeno) se coloca una suspensión celular o mitocondrial y se determina la concentración de oxígeno disuelto a través del tiempo ( $dO_2/dt$ ). En los experimentos de respirometría, comúnmente se adicionan inhibidores mitocondriales con el propósito de estudiar la actividad de los diferentes constituyentes de la respiración celular.

intactas o células, el consumo de  $O_2$  en el complejo IV está acoplado al  $\Delta\Psi_m$  (4), de tal forma que si se incrementa la concentración de  $H^+$  en el espacio intermembranal, aumenta el  $\Delta\Psi_m$  y se detiene la actividad del complejo IV. Por otro lado, si la concentración de  $H^+$  disminuye en el espacio intermembranal, el  $\Delta\Psi_m$  disminuye y aumenta la velocidad de reducción de  $O_2$  en el complejo IV (Fig. 3A). Los iones  $H^+$  pueden regresar a la matriz mitocondrial por dos caminos: a través de la ATP sintasa, lo que funciona como fuerza protón-motriz para la producción de ATP, y por vías independientes a la síntesis de ATP, lo que se conoce como fuga de  $H^+$  (5) (Fig. 3A).

**Experimentos de respirometría.** En un estudio básico de respirometría se utiliza oligomicina (oligo)

para inhibir a la ATP sintasa; esto produce un incremento en el  $\Delta\Psi_m$  y, por lo tanto, una inhibición en la velocidad del consumo de  $O_2$  por el complejo IV (Fig. 3B). Luego se adiciona un desacoplante mitocondrial como el carbonilcianuro-m-clorfenilhidrazona (CCCP) que puede transportar muy rápidamente a los  $H^+$  del espacio intermembranal a la matriz. Esto produce un  $\Delta\Psi_m \approx 0$  y por tanto el consumo de  $O_2$  por el complejo IV incrementa al máximo (Fig. 3B). Finalmente, se adiciona cianuro de potasio (KCN), el cual es un inhibidor del complejo IV, por lo que el consumo de oxígeno restante pertenece al consumo de  $O_2$  no mitocondrial (1) (Fig. 3B).

**Razón P/O.** El cálculo de moléculas de ATP sintetizadas a partir de los datos de oximetría se realiza

considerando la siguiente ecuación para la síntesis de ATP:



donde el valor de “x” se denomina razón P/O la cual representa la proporción de ATP producida por cada oxígeno atómico ( $\text{O} = \frac{1}{2} \text{O}_2$ ) consumido (6). En general, se considera que 10  $\text{H}^+$  son transportados al espacio intermembranal por cada NADH que transfiere sus electrones a la CTE, de los cuales 8 deben fluir a través de la ATP sintasa para producir 3 moléculas de ATP. Adicionalmente, tres moléculas

de fosfato (Pi) deben ser transportadas a la matriz mitocondrial; esto requiere de 3  $\text{H}^+$  (7) por lo que en total se necesitan 11  $\text{H}^+$  para sintetizar 3 moléculas de ATP. Con esta información se deduce que el P/O es 2.7 para el NADH como donador de electrones; sin embargo, el estimado experimental del P/O en células humanas es de 2.5 (8). En el caso del succinato, 6  $\text{H}^+$  son transportados al espacio intermembranal por lo que el P/O es 1.6 y el valor experimental es aproximadamente 1.5 (8). La estequiometría de los  $\text{H}^+$  necesarios para la síntesis de ATP depende del número de unidades c en F0 de la ATP sintasa, lo cual varía entre especies (1).

3A)

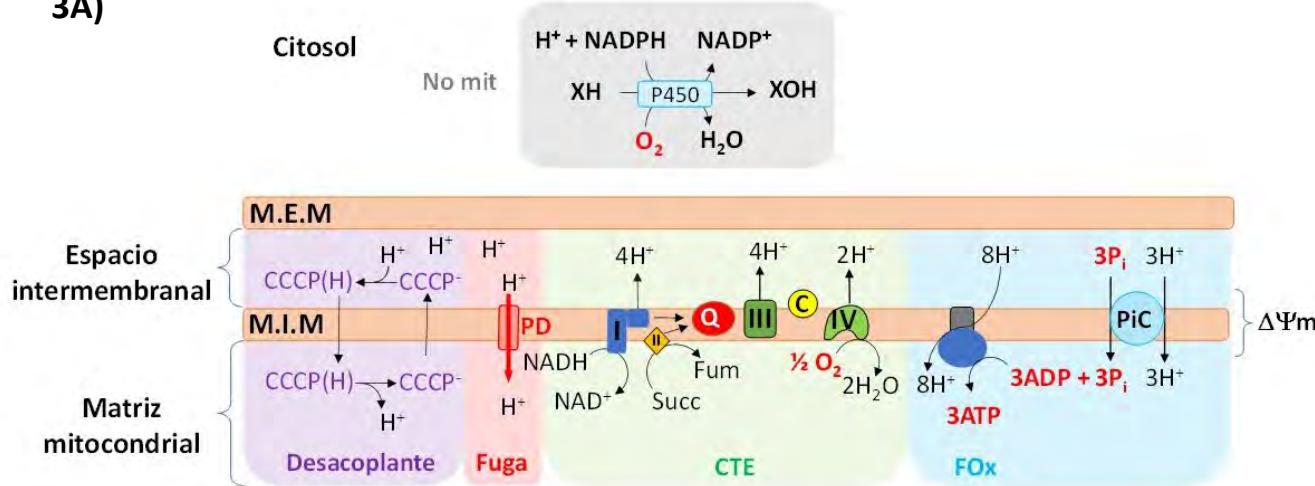
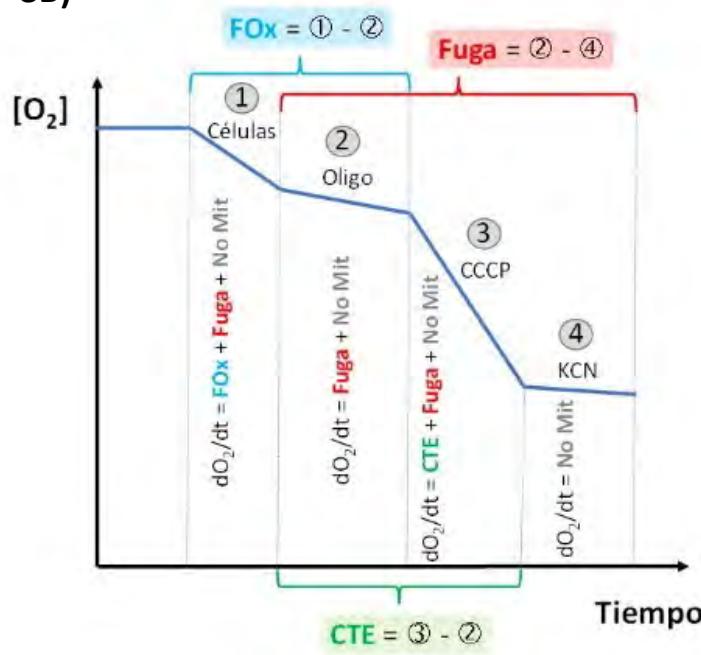


Figura 3. Análisis de los gráficos de respirometría.

A) Esquema de los procesos involucrados en el consumo de oxígeno celular. Se puede observar la presencia de los diferentes complejos mitocondriales (I-IV), junto con la Coenzima Q (Q), el citocromo (C), el acarreador de fosfatos (PiC), y una proteína desacoplante (PD). B) Trazo teórico de un experimento de respirometría con células intactas (1). Al inicio del experimento, el consumo de oxígeno celular es  $d\text{O}_2/dt = \text{FOx} + \text{Fuga} + \text{No mit}$ . Al agregar oligomicina (2) se inhibe la ATP sintasa y el  $d\text{O}_2/dt = \text{Fuga} + \text{No mit}$ . El CCCP colapsa el  $\Delta\Psi_m$  (3) y el  $d\text{O}_2/dt = \text{CTE} + \text{Fuga} + \text{No mit}$ . Finalmente, la adición de KCN inhibe al complejo IV (4) por lo que el  $d\text{O}_2/dt = \text{No mit}$ , es decir, los procesos que consumen oxígeno y que no son mitocondriales, como la actividad de citocromos P450 (P450) en retículo endoplásmico. Abreviaturas: CCCP (carbonilcianuro-m-clorfenilhidrazona), CTE (cadena de transporte de electrones), FOx (fosforilación oxidativa), No mit (no mitocondrial), P450 (citocromos P450), PD (proteína desacoplante), XH (xenobiótico), XOH (xenobiótico oxidado).

3B)



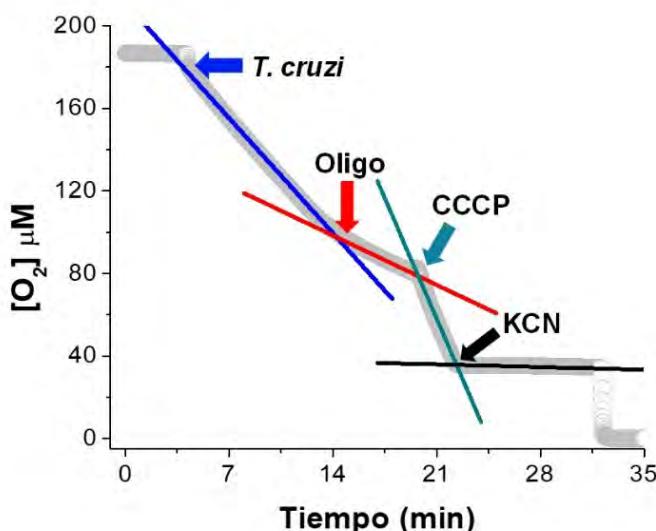
## PROBLEMA BIOQUÍMICO

En la figura 4, se presenta el trazo temporal de un experimento de respirometría, así como los datos que corresponden a la velocidad de consumo de oxígeno en las diferentes condiciones de inhibidores mitocondriales. El experimento se realizó utilizando  $74 \times 10^6$  de células de *T. cruzi*; es importante destacar que los tripanosomátidos, como *T. cruzi*, poseen una mitocondria por parásito, por lo que los estudios de

respirometría en este modelo celular nos ofrecen una oportunidad única para estudiar mitocondrias individuales totalmente íntegras.

Con los datos de la figura 4B, calcula el número de moléculas de ATP sintetizadas por cada parásito en un segundo como producto de la fosforilación oxidativa. Se debe tener en cuenta que el valor P/O en *T. cruzi* es 1.68 (8), además de que la capacidad del oxígrafo es de 2mL.

4A)



4B)

Condición	$dO_2/dt$ (pmol O <sub>2</sub> /mL x s)
<i>T. cruzi</i> = FOx + Fuga + No mit	116.82
Oligo = Fuga + No mit	45.56
CCCP = CTE + Fuga + No mit	278.48
KCN = No mit	5.11

**Figura 4. Experimento de respirometría en células intactas.** A) Trazo realizado con un oxígrafo de alta resolución utilizando parásitos de *T. cruzi* en el cual se registra el efecto de los inhibidores mitocondriales sobre el consumo de oxígeno. B) Tabla con los datos de la velocidad de consumo de oxígeno ( $dO_2/dt$ ) en las diferentes condiciones de inhibidores mitocondriales.