

## Tesis de Posgrado

# Propiedades de las mitocondrias de cerebro de rata durante la maduración postnatal : Efecto del hipotiroidismo

Chepelinsky, Ana Berta

1970

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). 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, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Chepelinsky, Ana Berta. (1970). Propiedades de las mitocondrias de cerebro de rata durante la maduración postnatal : Efecto del hipotiroidismo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1354\\_Chepelinsky.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1354_Chepelinsky.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Chepelinsky, Ana Berta. "Propiedades de las mitocondrias de cerebro de rata durante la maduración postnatal : Efecto del hipotiroidismo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1970.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1354\\_Chepelinsky.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1354_Chepelinsky.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Resumen de la Tesis:

"PROPIEDADES DE LAS MITOCONDRIAS DE CEREBRO DE RATA DURANTE  
LA MADURACION POSTNATAL. EFECTO DEL HIPOTIROIDISMO"

Ana Berta Chepelinsky

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Química

=1354=

Reg. N° 1354

## RESUMEN

En el presente trabajo se estudiaron las características bioquímicas de las mitocondrias de cerebro de rata durante la maduración postnatal y el efecto de la tiroidectomía neonatal sobre las mismas.

Para ello primero se debió obtener una preparación de mitocondrias de cerebro de rata en satisfactorio estado de pureza, lo que se logró utilizando el método de Løvtrup y Zelander para su obtención. Las mitocondrias así obtenidas se encontraban en la conformación condensada y presentaban valores satisfactorios de P/O y C.R. con diversos sustratos oxidables.

### Maduración

Se estudió el período de maduración comprendido entre los 5 y 30 días de vida postnatal.

El contenido proteico de las mitocondrias purificadas, en base al peso de tejido fresco original, aumentó aproximadamente 4 veces entre los 5 y 30 días de edad.

La actividad de SDH, expresada en base al peso de tejido fresco original, presentó un aumento de aproximadamente 5 veces entre los 5 y 30 días; mientras que la actividad específica de la misma se duplicó durante este período.

Se estudió la fosforilación oxidativa utilizando piruvato+L-malato y succinato como sustratos oxidables. Con piruvato+L-malato se observó un aumento de 3 veces, tanto en el consumo de oxígeno como en el de fosfato inorgánico, entre los 5 y 30 días de edad; con succi-

nato el aumento observado en ambos parámetros fué de 2 veces. Tanto los valores de P/O como los de C.R. obtenidos con ambos sustratos fueron satisfactorios desde los 5 días y permanecieron constantes durante todo el período estudiado. Esto sugiere que tanto los sistemas involucrados en el transporte de electrones como en la síntesis de ATP aumentan paralelamente y se mantienen en un óptimo grado de acoplamiento durante el período de maduración postnatal.

La concentración de ubiquinona/mg de proteína mitocondrial aumentó aproximadamente 2 veces entre los 5 y 30 días de edad, produciéndose el aumento más importante entre el 10mo y 20mo día.

Los niveles de los citocromos/mg de proteína mitocondrial aumentaron aproximadamente 2 veces entre los 5 y 30 días de vida postnatal. Los citocromos c+o<sub>1</sub> y a presentaron los aumentos más importantes entre los 10 y 20 días; mientras que el citocromo b aumentó significativamente entre los 15 y 20 días de edad.

El aumento de la concentración de los componentes de la cadena respiratoria permite postular un aumento de la superficie de la membrana interna de la mitocondria cerebral durante la maduración postnatal.

Los resultados obtenidos, que indican que los diferentes parámetros estudiados no aumentan paralelamente, sugieren que la composición de la membrana interna de la mitocondria cerebral varía durante la maduración.

Por lo tanto, el aumento observado en el metabolismo oxidativo de las mitocondrias cerebrales durante la maduración se debería a los

cambios que ocurren en la composición de estos organoides, los que alcanzarían las características del animal adulto a los 20 días de vida postnatal.

### Hipotiroidismo

Se estudió la fosforilación oxidativa en mitocondrias de cerebro de ratas normales y radiotiroidectomizadas en el momento del nacimiento, a los 30 días de edad.

Quando se utilizó piruvato+L-malato como sustrato se observó una disminución del 17 % aproximadamente, tanto en el consumo de oxígeno como en el de fosfato inorgánico, en las preparaciones provenientes de las ratas oretinas. Utilizando succinato como sustrato se obtuvieron los mismos valores de consumo de oxígeno y de fosfato inorgánico en las ratas normales y en las hipotiroideas. Con los dos sustratos utilizados no se observaron alteraciones ni en el P/O ni en el C.R.

La actividad específica de SDH no fué modificada por efecto de la tiroidectomía neonatal.

Según estos resultados no se producirían alteraciones fundamentales en la composición de las mitocondrias cerebrales por efecto de la tiroidectomía neonatal. Se discute, en relación con diversos resultados, la hipótesis según la cual la falta de hormona tiroidea desde el nacimiento produciría una disminución en la síntesis de proteínas, que se reflejaría en una disminuida síntesis de las diferentes membranas. Por lo tanto, esto traería como consecuencia, una disminución en el número de las mitocondrias cerebrales, sin que se producan alteraciones fundamentales en la composición de las mismas.



U N I V E R S I D A D  
de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

PROPIEDADES DE LAS MITOCONDRIAS DE CEREBRO DE RATA DURANTE  
LA MADURACION POSTNATAL. EFECTO DEL HIPOTIROIDISMO

Ana Berta Chepelinsky

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Química

Director: Prof. Dr. Carlos Jorge Gómez

1970

=1354=

A mis padres

# AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fué realizado en la Cátedra de Química Biológica Patológica, Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Deseo expresar mi agradecimiento al Profesor Doctor Carlos Jorge Gómez, bajo cuya dirección realicé este trabajo, quien me ha brindado su apoyo e interés durante todo el transcurso del mismo.

También deseo hacer llegar mi reconocimiento:

Al Profesor Doctor Eduardo De Robertis, quien realizó el estudio de microscopía electrónica así como también me brindó la oportunidad de realizar en su laboratorio el estudio de citocromos y ubiquinona.

A las Doctoras Marta Piras y Georgina Rodríguez de Lores Arnaiz, cuyos consejos y críticas constructivas fueron muy útiles para el desarrollo de este trabajo.

A todos los miembros de la Cátedra de Química Biológica Patológica, quienes en todo momento me brindaron su apoyo y estímulo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por las becas que me fueron otorgadas y que hicieron posible la realización de esta tesis.

A la Biblioteca Médica "Laboratorio Gramon", quien gentilmente realizó la impresión de este trabajo.



## ABREVIATURAS

- AAT: aspartato aminotransferasa  
AcE: acetil colinesterasa  
A.E.: actividad específica  
A.E.R.: actividad específica relativa  
ADP: adenosina difosfato  
ATP: adenosina trifosfato  
C.R.: Control respiratorio  
EDTA: etilendiamino-tetraacetato disódico  
E.S.: error standard  
GABA: ácido  $\gamma$  amino butírico  
MC: mitocondrias crudas  
MP: mitocondrias purificadas  
 $P_i$ : fosfato inorgánico  
 $Q_n$ : ubiquinona con  $n$  unidades de isopreno en su cadena lateral  
SAB: sero albúmina bovina  
SDH: succinato dehidrogenasa

## INDICE

I- INTRODUCCION .....	pág.	1
1- Características de la maduración cerebral .....	"	1
2- Papel de la hormona tiroidea en la maduración cerebral .....	"	8
3- Composición y función mitocondrial .....	"	12
4- Finalidad de este trabajo .....	"	17
II- MATERIAL Y METODOS .....	"	19
Animales utilizados .....	"	19
Obtención de la fracción mitocondrial .....	"	20
Fosforilación oxidativa .....	"	22
Actividad de succinato dehidrogenasa .....	"	23
Actividad de acetilcolinesterasa .....	"	24
Determinación de ubiquinona .....	"	24
Determinación de citocromos .....	"	26
Determinación de proteínas .....	"	27
Microscopía electrónica .....	"	27
III- CARACTERISTICAS METABOLICAS DE LA FRACCION MITOCONDRIAL DE CEREBRO DE RATA .....	"	28
Discusión .....	"	38
IV- CAMBIOS EN LAS PROPIEDADES DE LAS MITOCONDRIAS DE CEREBRO DE RATA DURANTE LA MADURACION POSTNATAL .....	"	43
Discusión .....	"	62
V- EFECTO DE LA TIROIDECTOMIA NEONATAL SOBRE LAS PROPIEDADES DE LAS MITOCONDRIAS DE CEREBRO DE RATA .....	"	71
Discusión .....	"	74
VI- RESUMEN Y CONCLUSIONES .....	"	79
BIBLIOGRAFIA .....	"	82

## I. INTRODUCCION

### 1- Características de la maduración cerebral

La mayoría de los mamíferos presentan en el momento del nacimiento un alto grado de inmadurez de casi todas las estructuras anatómicamente diferenciadas del cerebro, especialmente la corteza cerebral, tanto desde el punto de vista histofisiológico como bioquímico. Si bien en estas especies el proceso de desarrollo cerebral se cumple durante los primeros estadios de vida postnatal, existen otras en las que tal proceso se cumple en la vida fetal. En base a esto, Himwich (1962) ha dividido a los mamíferos en dos grandes grupos. El primero comprende a aquellas especies que en el momento del nacimiento presentan una pobre capacidad motora, incapacidad de regular su temperatura y otras características menores; al mismo pertenecen la rata, el conejo, el gato y el ser humano, entre otras. Por el contrario, el segundo grupo se caracteriza por presentar en el momento del nacimiento una capacidad motora casi totalmente desarrollada, autocontrol de la temperatura, etc.; a este grupo pertenecen especies como el cobayo, la oveja y el caballo.

Los estudios histológicos y funcionales en especies de ambos grupos, han demostrado que las diferencias indicadas se correlacionan estrechamente con el grado de desarrollo que alcanza la corteza cerebral en el momento del nacimiento. En el cobayo, perteneciente al segundo grupo, Flexner (1955) ha demostrado que la maduración cerebral se cumple, tanto desde el punto de vista histofisiológico como bioquímico, entre los 40 y 50 días de vida intrauterina, presentando en el momento del nacimiento un sistema nervioso con características similares a las del animal adulto. Por el contrario, se ha demostrado que en la rata (Hamburgh y Flexner, 1957; Eayrs y Goodhead, 1959; García Argiz y col., 1967; Pasquini y col., 1967), el conejo (Schadé y col., 1964; Dalal y Einstein, 1969; Einstein

y col., 1970) y el gato (Purpura y col., 1964) el cerebro es marcadamente inmaduro en el momento del nacimiento y que su desarrollo, tanto histofisiológico como bioquímico, ocurre durante los primeros 30 días de vida postnatal.

Estos hechos demuestran claramente la existencia de una íntima correlación entre la maduración cerebral y la conducta del animal.

#### Aspectos neurohistológicos y fisiológicos de la maduración cerebral

Si bien los estudios de Flexner (1955) demostraron que en el cobayo la maduración histofisiológica y bioquímica de la corteza cerebral ocurre entre los 40 y 50 días de gestación, etapa a la que él denominó "período crítico"; estudios realizados en la rata, el ratón, el conejo y el gato, demostraron que en estas especies, dicho "período crítico" ocurre entre los 10 y 20 días de vida postnatal.

Tanto en la rata (Bayrs y Goodhead, 1959) como en el conejo (Schadé y col., 1964) y en el gato (Purpura y col., 1964) la corteza cerebral presenta en el momento del nacimiento un alto grado de inmadurez y recién alcanza las características del animal adulto hacia el final del mencionado período. Durante el mismo se producen cambios notables en las características histológicas de la corteza cerebral. Se ha demostrado que la densidad neuronal ó de empaquetamiento, que indica el número de células existentes por  $\text{mm}^3$ , disminuye drásticamente durante los primeros 5 días de vida postnatal y luego más lentamente hasta el 20mo día, presentando posteriormente sólo cambios menores. El volumen y el área porcentual del pericario disminuye marcadamente durante los primeros 20 días, mientras que por el contrario, el de las dendritas aumenta rápidamente entre los 5 y 20 días postnatales y luego mucho más lentamente hasta el día 30mo.

La expansión del área dendrítica, característica más importante del

desarrollo cortical, es la resultante de dos procesos: el aumento del número de dendritas que emergen de pericario y su posterior ramificación. El nacimiento de nuevas dendritas del pericario se produce hasta los 12 días, mientras que la arborización de las ya existentes presenta un marcado aumento entre los 18 y 24 días. El incremento de la longitud y densidad axónica es muy pequeño durante los primeros 6 días postnatales, se intensifica notablemente entre los 6 y 20 días, aumentando posteriormente en forma leve. La mielinización de los axones es el proceso que comienza a desarrollarse más tardíamente, aproximadamente a los 14 días postnatales, continuando en forma intensa hasta los 30-40 días. Se ha demostrado que como consecuencia del aumento del volumen ocupado por el área dendrítica y la red axónica (conjunto que se denomina neuropila), la probabilidad de interacción axo-dendrítica, dendro-dendrítica y dendro-somática aumenta 10 veces aproximadamente entre los 12 y 30 días de vida postnatal.

Estos cambios histológicos, caracterizados por la rápida expansión de la neuropila, presentan una correlación temporal muy estrecha con la aparición y desarrollo de la actividad eléctrica espontánea. Los estudios electrofisiológicos de Crain (1952) y de Bradley y col. (1960) han demostrado que en la rata la actividad eléctrica espontánea ya es observable a los 5 días de vida postnatal aproximadamente, pero sus características cambian notable y rápidamente, de tal manera que a los 15-20 días se puede observar un registro eléctrico similar al del animal adulto. Por lo tanto, los cambios neurohistológicos que ocurren durante el mismo período, pueden ser considerados como la base neuroanatómica del desarrollo de la actividad eléctrica, que adquiere las características del animal adulto al mismo tiempo que se produce la rápida expansión de la neuropila.

Al contrario de lo que ocurre en las neuronas, la densidad de empa-

quetamiento de las células gliales aumenta con la edad; esto ha sido demostrado por Brizzeo y col. (1964), quienes han observado en la corteza cerebral de la rata un aumento del índice glia/neurona a medida que aumenta la edad del animal. La posible explicación de estos cambios puede residir en que mientras el desarrollo neuronal se produce sin división celular concomitante, las células de la glia sí se multiplican por división celular. La relación entre el aumento del número de las células gliales y los procesos de mielinización y de desarrollo de fenómenos de permeabilidad selectiva, caracterizados por la existencia de la denominada "barrera hemato-encefálica" queda aún por ser explicada.

#### Aspectos bioquímicos de la maduración cerebral

Los cambios neurohistológicos que acabamos de comentar sugieren que la morfogénesis cerebral se caracteriza por una activa neoformación de membranas. Esta morfogénesis activa, que en las especies mencionadas ocurre durante los primeros 30 días de vida postnatal, implica necesariamente la existencia de una intensa síntesis de ácidos ribonucleicos y proteínas; lo que ha sido demostrado por diversos investigadores. Utilizando diversos modelos experimentales, ha sido demostrado que la síntesis de RNA es muy activa durante los primeros estadios del desarrollo, para decrecer luego con la edad (Adams, 1966; Johnson, 1967; Guroff y col., 1968); si bien los mecanismos involucrados en la regulación de la síntesis de RNA no han sido aún aclarados.

La síntesis de proteínas es mucho más intensa durante el período de morfogénesis activa que en el animal adulto (Sperry, 1962). Utilizando cortes de corteza cerebral (Orrego y Lipman, 1967; Vahvelainen y Oja, 1969), suspensiones de células cerebrales (Johnson y Luttges, 1966), sistemas ribosomales aislados (Murthy y Rappoport, 1965; Yamagary y col., 1966), así como en experiencias "in vivo" (Gaitonde y Richter, 1956;

Szijan y col., 1969) se ha demostrado que la síntesis de proteínas es muy activa durante los primeros estadios de vida postnatal decreciendo luego con la edad. Esta intensa síntesis de proteínas se ve reflejada en el importante aumento del contenido de proteínas por célula (Pasquini y col., 1967), que es muy notable entre los 5 y 30 días de vida postnatal, tanto en la corteza cerebral como en el cerebelo.

La síntesis de los diferentes lípidos también es muy activa durante los primeros estadios de vida postnatal (Sperry, 1962), siendo de interés señalar que la velocidad de síntesis y deposición no es la misma para los diferentes lípidos. Esto fué demostrado por Folch y col. (1959), quienes estudiaron los cambios en la concentración de los diferentes lípidos en cerebro de ratón. Observaron que mientras los gangliósidos aumentan muy rápidamente, llegando a los niveles del adulto a los 15-20 días de vida postnatal, otros lípidos como el colesterol, la esfingomiélin y los cerebrósidos se encuentran ausentes ó en muy pequeña concentración en el momento del nacimiento, aumentando luego en forma constante durante los primeros 50 días. Esta diferencia puede ser explicada teniendo en cuenta la localización de estos lípidos en las diferentes membranas; los gangliósidos son esencialmente constituyentes de las membranas neuronales, mientras que la esfingomiélin y especialmente los cerebrósidos se encuentran localizados principalmente en la membrana miélinica (Seminario y col., 1964; Lapetina y col., 1967). Por lo tanto, las diferencias en los cambios temporales de los diversos lípidos durante el período de maduración se deberían a las diferencias temporales en el desarrollo de las membranas neuronales y miélin, que han sido demostradas en los estudios neurohistológicos (Eayrs y Goodhead, 1959). Suzuki (1965) ha confirmado el rápido aumento de los gangliósidos en el cerebro de rata durante la maduración. Tanto Suzuki (1967) como Rubiolo de Maccioni (1967) han demostrado un aumento en la síntesis y turnover de los gangliósidos sólo durante el período de activa morfogénesis.

Los estudios relacionados con la composición lipídica de las diversas fracciones subcelulares del cerebro, han puesto en evidencia que la composición de las mismas cambia durante la maduración y que ello ocurre principalmente en las membranas mielínicas (Horrocks, 1968; Cuzner y Davison, 1968; Dalal y Einstein, 1969). Esto ha sido confirmado por las observaciones de Suzuki y col. (1967, 1968), quienes han encontrado cambios en la composición de los gangliósidos constituyentes de las membranas mielínicas: mientras que en la denominada mielina inmadura se encuentran los cuatro gangliósidos principales - un monosialo, dos disialo y un trisialo gangliósido -, durante el desarrollo ocurren cambios progresivos, de forma tal que en la mielina madura sólo está presente el monosialogangliósido. Todas estas observaciones sugieren que la composición de las diferentes membranas cambia durante el proceso de maduración cerebral.

Concomitantemente con la activa formación de estos componentes de membranas se produce un significativo aumento en la actividad de diversas enzimas que están localizadas en diferentes membranas. Se ha observado un importante aumento en la actividad de succinato dehidrogenasa (Hamburgh y Flexner, 1957; García Argiz y col., 1967), citocromo oxidasa (Hamburgh y Flexner, 1957), GABA transaminasa y glutamato decarboxilasa (van den Berg y col., 1965; García Argiz y col., 1967), aspartato aminotransferasa (Pasquini y col., 1967) y adenosin trifosfatasa (García Argiz y col., 1967) durante el período de maduración postnatal.

También se observan cambios en diversas actividades metabólicas de la corteza cerebral durante la maduración. Se sabe que la corteza cerebral metaboliza glucosa, y que parte de ella es transformada en aminoácidos del grupo del glutamato; este proceso, que involucra una actividad mitocondrial, aumenta durante este período (Gómez y Ramírez de Gu-



glielmone, 1967). Por otro lado, en la corteza muy inmadura la mayor parte de la glucosa metabolizada es transformada en lactato, mientras que en la rata adulta la mayor parte de la glucosa es oxidada a través del ciclo del ácido cítrico (Ghittoni, 1967). Si bien la disminución en la formación de lactato puede ser debida a cambios en la isoenzima de lactato dehidrogenasa predominante (Bonavita, 1964), la mayor capacidad de oxidar glucosa sugiere un aumento del número de mitocondrias ó una mayor capacidad oxidativa de las mismas a medida que el cerebro madura.

## 2- Papel de la hormona tiroidea en la maduración cerebral

Los estudios clínicos realizados por Smith y col. (1957) han demostrado que los signos de retardo mental y las alteraciones neurológicas concomitantes sólo se observan en los niños con cretinismo congénito y no en aquellos en los que el hipotiroidismo se produce luego de los primeros 18 meses de vida postnatal; observándose también que las mencionadas alteraciones sólo podían ser corregidas por medio de un tratamiento con dosis adecuadas de hormona tiroidea, iniciado antes del 4to mes de vida postnatal. Estos hallazgos han demostrado que en el humano la hormona tiroidea desempeña un importante papel en la maduración cerebral, semejante al observado en la metamorfosis de los anfibios (Etkin, 1964).

Diversos estudios neurohistológicos han demostrado que la tiroidectomía neonatal en la rata produce profundas alteraciones en el desarrollo histológico del cerebro. Barnett (1948) ha observado que en estas condiciones se produce un defecto en la mielinización. Eayrs (1961 a, b; 1966) ha realizado estudios cuantitativos en la corteza cerebral demostrando que la carencia de función tiroidea desde el nacimiento produce un marcado defecto en la dendrogénesis y en el desarrollo axónico. Legrand (1963, 1965) ha observado que el desarrollo postnatal del cerebelo de la rata también es marcadamente afectado por la tiroidectomía neonatal, produciéndose un retardo en la migración de la capa granular externa, un defectuoso desarrollo de los glomérulos cerebelosos y una disminución en la arborización de las células de Purkinje.

Estas alteraciones histológicas se reflejan en actividades funcionales, como ha sido demostrado por Bradley y col. (1960), quienes encontraron que el electroencefalograma de la rata cretina presenta significativas diferencias con respecto al de la rata normal. También se reflejan

en alteraciones de la conducta, como se deduce de las experiencias de aprendizaje y comportamiento realizadas por Eayrs (1961 b) en ratas, quien ha sugerido que las alteraciones en la conducta podrían ser la consecuencia de la defectuosa dendrogénesis, que produce una menor probabilidad de interacción axo-dendrítica, dendro-dendrítica y dendro-somática.

Hamburgh y Flexner (1957) fueron los primeros en demostrar que la tiroidectomía neonatal en la rata produce notables alteraciones en la diferenciación bioquímica de la corteza cerebral. Estos autores observaron que la carencia de función tiroidea desde el nacimiento produce una disminución significativa e irreversible en la actividad de succinato dehidrogenasa de la corteza cerebral, que se evidencia desde el 10mo día de vida postnatal. En nuestro laboratorio se ha encontrado que, además de la succinato dehidrogenasa, otras enzimas como la glutamato decarboxilasa, GABA transaminasa, adenosin trifosfatasa y aspartato transaminasa son notablemente afectadas por la tiroidectomía neonatal, tanto en cerebro como en cerebelo (García Argiz y col., 1967; Pasquini y col., 1967). Bálaaz y col. (1968) observaron algo similar con respecto a la glutamato decarboxilasa y Geel y Timiras (1967 a) demostraron que la evolución de la acetilcolinesterasa tanto en la corteza cerebral como en el hipotálamo eran notablemente afectadas por la ausencia de función tiroidea. También se ha observado que tanto el contenido de proteínas por célula como el de RNA por célula es significativamente más bajo en la corteza cerebral y el cerebelo de las ratas radiotiroidectomizadas en el momento del nacimiento que en las normales (Geel y Timiras, 1967 b; Pasquini y col., 1967).

Todos estos estudios relacionados con los efectos de la hormona tiroidea sobre la diferenciación bioquímica del cerebro concuerdan con

las alteraciones histológicas que ya hemos mencionado. Este paralelismo también se observa cuando se comparan los resultados neurohistológicos con los bioquímicos, en los casos en que se ha explorado el período durante el cual la hormona tiroidea ejercería sus efectos sobre la maduración. Las observaciones de Legrand (1963) en cerebelo y de Eayrs (1961b; 1966) en corteza cerebral han demostrado que las alteraciones histológicas se producen siempre que la tiroidectomía se realice antes del 12do día de vida postnatal y que en la rata cretina estas alteraciones pueden ser corregidas por la administración de hormona tiroidea, siempre que el tratamiento se inicie antes del 10mo-12do día de vida postnatal. Este fenómeno también ha sido observado en los estudios relacionados con la diferenciación bioquímica. Hamburgh y Flexner (1957) demostraron que la disminución de la actividad de succinato dehidrogenasa producida por la tiroidectomía neonatal sólo podía ser corregida por la administración de hormona tiroidea dentro de los primeros 10 días de vida postnatal. Ramirez de Guglielmone y Gómez (1966) observaron que la disminución de la concentración cerebral de ácido aspártico, que produce la tiroidectomía neonatal en la rata, se corregía por la administración de tiroxina a partir del 10mo día pero no cuando se comenzaba la terapia a los 15 días de edad. Geel y Timiras (1967a y b) observaron que la disminución de la actividad de acetilcolinesterasa y del contenido de RNA por célula podía ser corregida administrando tiroxina desde el 5to día de vida postnatal. Krawiec y col. (1969) también han confirmado la existencia de un período crítico al demostrar que las alteraciones en la concentración de ácidos nucleicos y en la actividad de succinato dehidrogenasa, GABA transaminasa y aspartato aminotransferasa sólo podían ser corregidas comenzando el tratamiento con hormona tiroidea el día 10mo; mientras que cuando la iniciación de la terapia de reemplazo se retardaba hasta el 15to día, la hormona no presentaba ningún efecto corrector. La concordancia entre los estudios bioquímicos e histológicos confirma la existencia de un período

crítico durante el cual la hormona tiroidea ejercería sus efectos sobre la maduración cerebral, hecho que ya había sido sugerido por los estudios clínicos de Smith y col. (1957).

Lo comentado anteriormente sugiere que la principal característica de la alteración producida por la carencia de función tiroidea desde el nacimiento es una marcada deficiencia en la formación de membranas. Lo que es indicado por el marcado defecto en la dendrogénesis, el desarrollo de la red axonal y la formación de mielina y por la notable disminución de la actividad de diversas enzimas que son constituyentes de diferentes organoides subcelulares.

Teniendo en cuenta que el contenido de RNA por célula está marcadamente afectado por el hipotiroidismo neonatal (Geel y Timiras, 1967b; Pasquini y col., 1967) y que las hormonas que actúan sobre los procesos de crecimiento y desarrollo lo hacen estimulando la síntesis de RNA y proteínas (Tata, 1966a), es lógico suponer que la ausencia de función tiroidea desde el nacimiento en la rata debe conducir a una disminución en la síntesis de proteínas. La alteración en la síntesis de proteínas cerebrales como consecuencia de la tiroidectomía neonatal ha sido demostrada por Bálazs y Gaitonde (1968) y por Geel y col. (1967) y ha sido confirmada en nuestro laboratorio por Szijan (comunicación personal). Si bien ha sido sugerido, sin suficiente evidencia experimental, que la hormona tiroidea estimularía el transporte de aminoácidos en el tejido cerebral (Geel y col., 1967) ó que actuaría sobre la síntesis de proteínas a nivel de la traducción (Bálazs y Gaitonde, 1968; Bálazs y col., 1968) el mecanismo por el cual actúa la hormona tiroidea estimulando la síntesis de proteínas en el cerebro aún no ha sido aclarado.

### 3- Composición y función mitocondrial

Las mitocondrias, estructuras halladas en las células de todos los organismos aeróbicos, contienen sistemas multienzimáticos capaces de acoplar la oxidación de metabolitos por el oxígeno molecular a la síntesis de ATP. Las reacciones oxidativas catalizadas por la mitocondria forman parte, principalmente, del ciclo del ácido cítrico, si bien hay otras reacciones que también pueden participar en los procesos de acoplamiento, como ser la oxidación de ácidos grasos,  $\alpha$ -glicerofosfato,  $\beta$ -hidroxibutirato, etc. (ver Figura 1). El sustrato oxidable preferencial depende del origen de la mitocondria.

La mitocondria está formada por dos sistemas de membrana: una membrana externa que encierra a la mitondria y otra interna que se irradia hacia el interior desde la periferia formando invaginaciones llamadas crestas, lo que hace que ésta última presente una gran superficie (aproximadamente  $100-200 \text{ m}^2/\text{cm}^3$ ). Ambos son sistemas lipoprotéicos que contienen distintos grupos de enzimas, diferentes subunidades y cumplen diferentes funciones (Green y MacLennan, 1967; Parsons y col., 1967; Pullman y Schatz, 1967; Lardy y Ferguson, 1969).

La membrana interna, lugar en que se produce la fosforilación oxidativa, está compuesta por subunidades, llamadas partículas elementales, que pueden ser resueltas en una membrana basal, en la que se encuentra la cadena de transporte de electrones y una parte separable fácilmente, que contiene la ATPasa mitocondrial (Green y MacLennan, 1967; Korn, 1969).

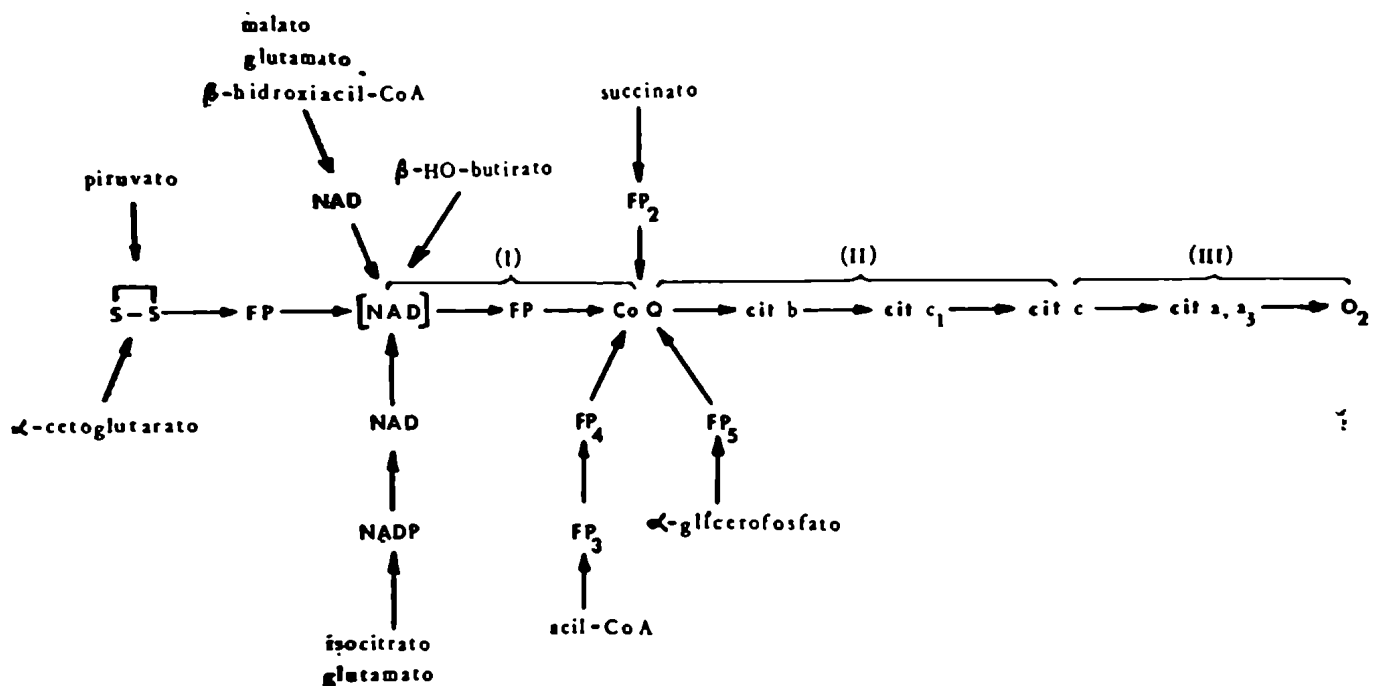
### Cadena respiratoria

La cadena respiratoria está formada por un complejo multienzimático que contiene grupos de óxido-reducción que transfieren los electrones desde el succinato y NADH al oxígeno. Está constituida por flavoproteínas, ubiquinona, citocromos ( $b$ ,  $c_1$ ,  $c$ ,  $a$  y  $a_3$ ), hierro no hemínico y cobre. Su ordenamiento, basado en estudios termodinámicos, cinéticos y efectos de inhibidores, se puede observar en el esquema presentado en la Figura 1. (Lehninger, 1965; Green y MacLennan, 1967; Klingenberg, 1968).

Los citocromos son hemo proteínas que se diferencian entre sí por los sustituyentes del anillo porfirínico  $\gamma/\delta$  en la proteína unida a este. Se han encontrado tres tipos de grupo hemo en los citocromos. Los citocromos  $c$  y  $c_1$  contienen el mismo grupo hemo pero se diferencian en la porción protéica, lo que les confiere distintas propiedades fisicoquímicas. En estos dos citocromos el grupo hemo se encuentra unido a la proteína por uniones covalentes, a diferencia de lo que ocurre en los otros citocromos (Okunuki, 1966). Con respecto a los citocromos  $a$  y  $a_3$ , se encuentra en discusión si forman una sola especie molecular ó son dos especies distintas (Okunuki, 1966; Gibson, 1968).

La coenzima Q ó ubiquinona fué descubierta en mitocondrias de corazón por Crane y col. (1957); estudios posteriores demostraron que es un componente de la cadena de transporte de electrones (Chance, 1965; Green y Brierley, 1965; Klingenberg y Kröger, 1967). Es una benzoquinona que tiene como sustituyentes dos grupos metoxilos, un grupo metilo y una cadena lateral de 30 a 50 átomos de carbono (6 a 10 unidades de isopreno), denominándose la  $Q_6$  a  $Q_{10}$  según las unidades de isopreno que contenga. La concentración y el tipo de ubiquinona varía según la especie y el órgano estudiado (Lester y Crane, 1959; Crane, 1965).

FIGURA 1

Esquema de la cadena respiratoria

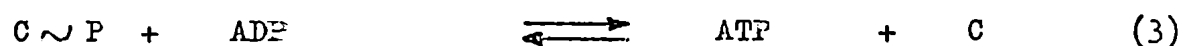
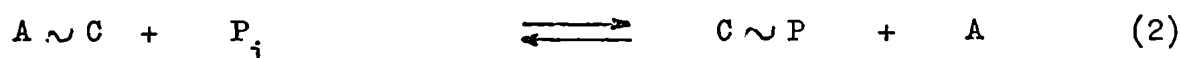
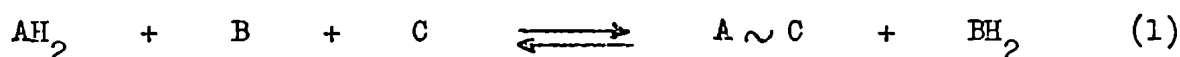
Se ha indicado el lugar de entrada de diversos sustratos oxidables y la localización de los sitios de fosforilación (I, II y III).



### Fosforilación oxidativa

Actualmente hay tres teorías que tratan de explicar el mecanismo por el que se produce el acople entre la energía liberada en el transporte de electrones y la formación de uniones de alta energía en la forma de ATP. Son la química, la quimiosmótica y la conformacional; se diferencian en el paso primario de la conservación de la energía considerado.

Según la teoría química (Slater, 1966; Pullman y Schatz, 1967) durante el proceso de oxidación de un transportador reducido de la cadena respiratoria  $AH_2$ , éste se combina con una sustancia C formando un compuesto de alta energía  $A \sim C$ , que posteriormente se fosforila ( $C \sim P$ ) y transfiere el fosfato al ADP para formar ATP.



La disponibilidad de C para la reacción (1) constituye la base del mecanismo de control respiratorio. El control respiratorio es una respuesta reversible de la velocidad respiratoria de la mitocondria, incubada en presencia de sustrato oxidable y oxígeno, a la disponibilidad de  $P_i$  y ADP (Chance, 1959; Slater y Hülsmann, 1959). En presencia de  $P_i$  y ADP la velocidad de respiración es alta, y en ausencia de alguno de los dos ó de ambos es baja. Se cree que esto se debe a que en ausencia de  $P_i$  y/ó ADP se acumula el intermediario  $A \sim C$  inhibiéndose por lo tanto la reacción (1), y la respiración estaría entonces limitada por la velocidad de hidrólisis de  $A \sim C$ . La existencia de los compuestos de alta energía no ha podido ser comprobada. Se supone que este acople se produce en tres lugares de la cadena respiratoria, indicados en la Figura 1.

Según la teoría quimiosmótica propuesta por Mitchell (Mitchell, 1966; Pullman y Schatz, 1967) el paso primario en el proceso de acoplamiento es la translocación de protones a través de la membrana acoplante. Como también se postula que esta membrana es impermeable a los iones en general, no sólo se produce un gradiente en la concentración de protones sino también un gradiente eléctrico, generándose de esta manera un potencial electroquímico. En presencia de ADP y  $P_i$ , la energía libre del potencial electroquímico creado por el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria es utilizado para sintetizar ATP, por medio de una ATPasa vectorialmente localizada en la membrana acoplante. En ausencia de ADP y  $P_i$  el potencial electroquímico no disipado controla el flujo de electrones, estableciendo el control respiratorio.

La teoría conformacional propuesta por Boyer (Pullman y Schatz, 1967; Boyer, 1968) postula que la energía derivada de la transferencia de electrones es conservada como un cambio conformacional de una enzima respiratoria, que estaría acoplado de alguna manera a una reacción de fosforilación.

Independientemente del mecanismo involucrado, se puede considerar a la mitocondria como un aparato de transducción de energía, en el que el flujo de electrones lleva a la formación de un compuesto de alta energía ó estado energizado que puede ser utilizado en la síntesis de ATP, en la translocación de iones, en la transhidrogenación entre piridin nucleótidos, en la activación de aminoácidos para la síntesis de proteína mitocondrial, en la activación de ácidos grasos ó en funciones mecanoquímicas (Lehninger, 1965; Pullman y Schatz, 1967; Lardy y Ferguson, 1969).

#### 4- Finalidad de este trabajo

Nuestro trabajo ha sido planeado con el fin de tratar de aclarar dos problemas.

La información existente en la bibliografía con respecto a las propiedades de las mitocondrias cerebrales durante el período de maduración postnatal es contradictoria. Las observaciones de Dahl y Samson (1959) sugieren que el aumento de la capacidad oxidativa del cerebro durante la maduración se debe a un mayor número de mitocondrias y no a un aumento de la actividad enzimática por mitocondria, al mismo tiempo que la capacidad de acoplar la fosforilación con la oxidación tendería a disminuir con la edad. Por el contrario, los resultados de Milstein y col. (1968) sugieren que tanto la capacidad oxidativa como la fosforilante, expresada en base al contenido proteico mitocondrial, aumenta con la edad. Por lo tanto, para tratar de comprender los cambios que ocurren en las mitocondrias cerebrales durante la maduración se estudiaron sus propiedades metabólicas durante los primeros estadios del desarrollo postnatal, una vez obtenida una preparación mitocondrial fuertemente acoplada y con satisfactorio grado de pureza.

El segundo problema que hemos tratado de aclarar se relaciona con el efecto de la tiroidectomía neonatal sobre las propiedades de las mitocondrias cerebrales. Los trabajos de Hamburg y Flexner (1957), Pasquini y col. (1967) y García Argiz y col. (1967) han demostrado que la actividad de enzimas mitocondriales como succinato dehidrogenasa, aspartato aminotransferasa y GABA transaminasa, medida en homogenizado de corteza cerebral, es notablemente afectada por la tiroidectomía neonatal. Esto ha planteado la duda si la disminuída actividad de las enzimas mitocondriales se debe a un defecto cualitativo en la formación de las mitocondrias ó a una disminución del número de estos organoides sin cambios aparentes en su

constitución. Nuestra segunda finalidad consistió, entonces, en estudiar las propiedades metabólicas de las mitocondrias cerebrales, aisladas de ratas normales y recientemente radiotimidodeoxigenadas, como medio de aclarar este problema.

## II. MATERIAL Y METODOS

### Animales utilizados

En todos los experimentos se utilizaron ratas de la cepa Wistar criadas en el vivero de este laboratorio, utilizando el método de continuo "inbreeding" con el fin de evitar inconvenientes de orden genético.

En todos los casos cada madre conservó 8 crías; éstas se separaron de la madre al 20mo día de vida; la alimentación posterior consistió en una dieta sintética (Forramez, Molinos Río de la Plata) y agua ad libitum.

Para estudiar los cambios durante la maduración normal se utilizaron animales entre 5 y 30 días de edad, con intervalos de 5 días.

Para estudiar los efectos de hipotiroidismo neonatal sobre las propiedades de las mitocondrias cerebrales todos los animales de una camada fueron inyectados por vía intraperitoneal con 100  $\mu\text{C}$  de  $\text{I}^{131}$  libre de portador, dentro de las cuatro primeras horas de vida, según la técnica de Goldberg y Chaikoff (1949). Se descartó la tiroidectomía quirúrgica ya que, además de no ser de fácil realización en la rata recién nacida, va acompañada de paratiroidectomía. También se desechó el uso del tiouracilo para producir el hipotiroidismo, pues esta droga presenta marcados efectos extratiroides, tanto en la utilización periférica de las hormonas tiroideas (Escobar del Rey y Morreale de Escobar, 1961) como en el metabolismo de las proteínas hepáticas (Yatvin y col., 1964).

Se inyectaron todas las crías de una camada y se usó como control otra camada sin inyectar, debido a que cuando se inyecta solamente la mitad de la camada la competencia por la alimentación materna es desventajosa para los animales inyectados con respecto a los controles, produciéndose de esta manera un porcentaje mucho más alto de mortalidad. Por otra parte, la eliminación biológica del yodo radioactivo por la orina podría producir complicaciones en los controles. Cada madre de ratas

inyectadas fué eliminada del plantel una vez finalizada la lactancia.

Para verificar la destrucción de la tiroides se realizó una prueba de captación según el método de Geel y Timiras (1967a), en una ó dos ratas de las camadas inyectadas y controles, a los 30 días de edad. Se inyectaron intraperitonealmente  $10 \mu\text{C}$  de  $\text{I}^{131}$  y a las 20 horas se midió la radiactividad en un trozo de tejido de la zona correspondiente a la tiroides y en una masa similar de músculo de muslo, en un contador de pozo. Se determinó la relación entre la captación en la tiroides y en el músculo de muslo; si esta relación era menor que 2 se consideraba un grado satisfactorio de hipotiroidismo y la camada era utilizada. En las ratas normales se obtenía una relación de 150-300.

Se compararon las propiedades de las mitocondrias aisladas de ratas normales y radiotiroidectomizadas en el momento del nacimiento, a los 30 días de edad.

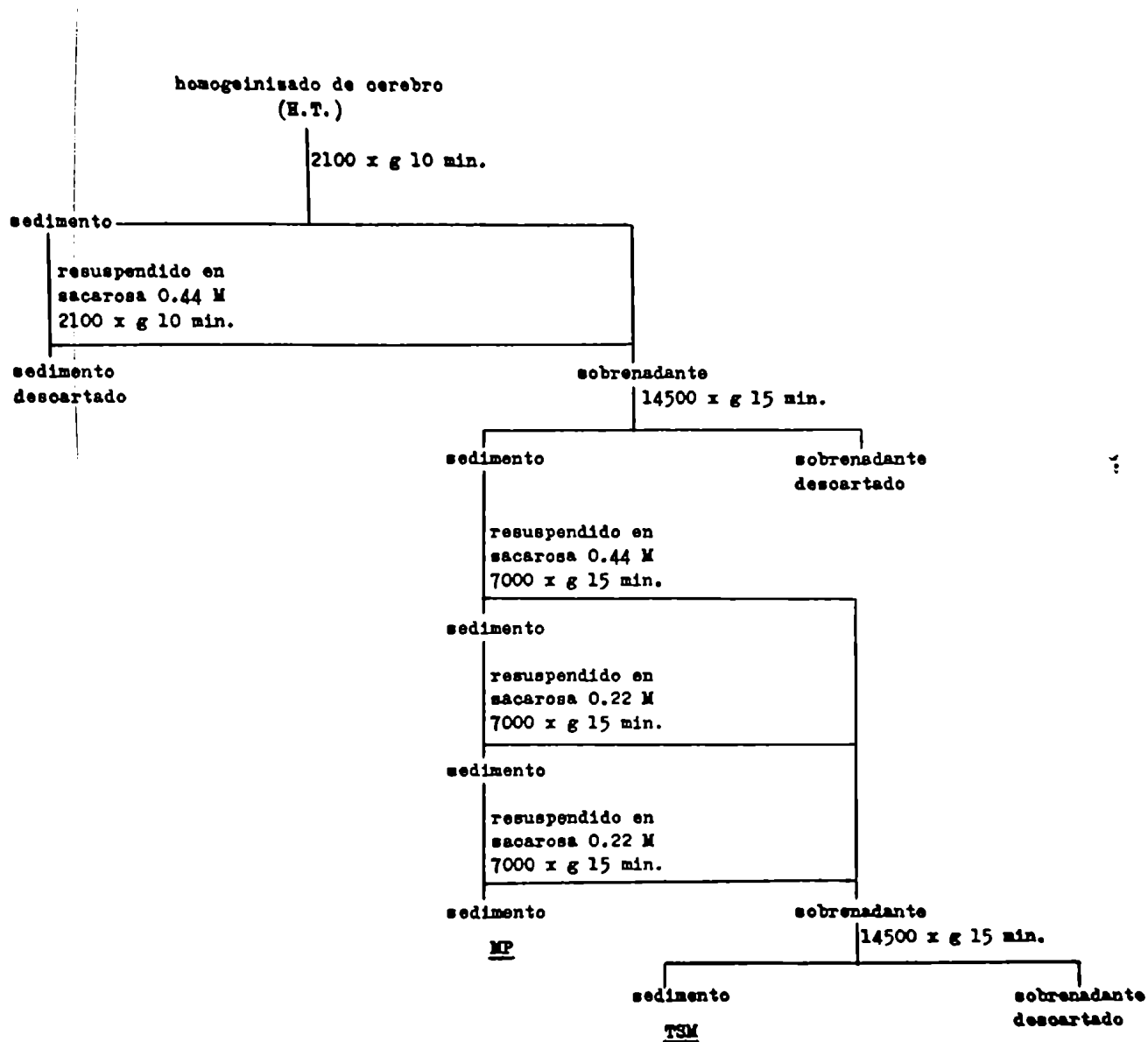
#### Obtención de la fracción mitocondrial

Las mitocondrias de cerebro de rata fueron obtenidas según el método descrito por Lovtrup y Zelander (1962).

Todas las operaciones se realizaron a  $0^{\circ}$ - $4^{\circ}\text{C}$ ; según la edad se usaron grupos de 3-50 ratas en cada fraccionamiento. Las ratas se sacrificaron por decapitación y los cerebros se sacaron rápidamente (en aproximadamente 40 segundos), se lavaron con una solución fría de sacarosa 0.44 M, se eliminó el exceso de líquido y se pesaron. El tejido se cortó en pequeños trozos y se homogeneizó con 5 volúmenes de sacarosa 0.44 M en un homogenizador Potter-Elvehjem, constituido por un tubo de vidrio y un émbolo de teflon, con una luz de 0.25 mm. El homogeneizado se diluyó al 10 % (p/v) con sacarosa 0.44 M obteniéndose así el homogeneizado inicial (H.T.) que se fraccionó según se indica en la Figura 2. Luego de cada centrifugación

FIGURA 2

Esquema del método de fraccionamiento utilizado para la obtención de las fracciones MP y TSM



a 7000 x g el sobrenadante se separó por inversión del tubo, de tal manera que sólo quedó el residuo marrón fuertemente adherido al mismo. El residuo se resuspendió en sacarosa 0.22 M y se rehomoginizó a mano; obteniéndose de esta manera la fracción de mitocondrias purificadas (MP) utilizada en los estudios de los cambios durante la maduración normal y de los efectos del hipotiroidismo sobre las propiedades de las mitocondrias.

### Fosforilación oxidativa

El consumo de oxígeno se midió manométricamente en un aparato de Warburg (Umbreit y col., 1957; Slater, 1967). Se utilizaron vasos de 5 ml; el volumen final del medio de incubación fué 1.25 ml y la composición del medio para medir el consumo de oxígeno en el estado 4 fué la siguiente: CLK 50 mM,  $SO_4Mg$  6.5 mM, EDTA 2 mM, FNa 10 mM, buffer fosfato pH 7.4 13.5 mM, albúmina cristalina bovina 2 mg/ml, sustrato oxidable 13 mM (cuando se usó piruvato ó L-glutamato, se agregó L-malato 1.3 mM), suspensión mitocondrial 0.5 mg de proteína/ml (excepto en las preparaciones mitocondriales provenientes de ratas de 5 días, en que se usó una concentración de 1.0 mg/ml), sacarosa en cantidad suficiente como para obtener una osmolaridad final de 0.22 M. Para medir el consumo de oxígeno en el estado 3, el medio de incubación también contenía ATP 1 mM, glucosa 28 mM; hexoquinasa (ATP: d-hexosa 6-fosfotransferasa, EC 2.7.1.1.; Sigma Tipo III) 0.12 mg/ml. En ambos casos el vaso central contenía 0.1 ml de una solución de KOH 20 %. La suspensión mitocondrial utilizada provenía de una preparación recién obtenida.

Cada experimento consistió en determinaciones por duplicado de cada una de las dos condiciones: en presencia de aceptor de fosfato (estado 3) y en su ausencia (estado 4). Las incubaciones se realizaron en atmósfera de aire, a 37°C; luego de 5 minutos de equilibración, se incubó durante 15 minutos, período durante el cual se mantuvieron lineales tanto el



consumo de oxígeno como el de fosfato inorgánico. Luego de la incubación se agregó rápidamente 0.25 ml de ácido tricloroacético 70 % a 0°C a los vasos que contenían mitocondrias en el estado 3; se dejó a 0°C durante 15 minutos aproximadamente, se centrifugó y en el sobrenadante se determinó fosfato inorgánico según el método de Fiske y Subbarow (1925). El consumo de fosfato inorgánico se midió por diferencia entre el presente a tiempo cero y el remanente al final de la incubación (Slater, 1967).

El consumo de oxígeno se expresó en microátomos de oxígeno/h/mg de proteína mitocondrial y el consumo de fosfato inorgánico en micromoles de fosfato inorgánico/h/mg de proteína mitocondrial.

La relación P/O, que expresa el rendimiento de la fosforilación oxidativa (Slater, 1966 y 1967), se determinó calculando el cociente entre el consumo de fosfato inorgánico y el de oxígeno.

El control respiratorio (C.R.), que es una medida del grado de acoplamiento entre el transporte de electrones y la fosforilación (Chance, 1959; Slater y Hülsmann, 1959), se determinó calculando la relación entre el consumo de oxígeno en presencia de aceptor (estado 3) y el consumo de oxígeno sin aceptor (estado 4).

#### Actividad de succinato dehidrogenasa

— La actividad de succinato dehidrogenasa (SDH) fué medida espectrofotométricamente según el método de Slater y Bonner (1952) modificado por De Robertis y col. (1962). El medio de incubación consistió en: succinato de sodio 22 mM, ferricianuro de potasio 1.1 mM, cianuro de potasio 11 mM, buffer fosfato pH 7.24 31.5 mM, 0.8-1.3 mg de proteína de H.T. 6 0.2-0.5 mg de proteína de suspensión mitocondrial; volumen final 2.7 ml. Se incubó 10 minutos a 37°C, se paró la reacción mediante

el agregado de 2 ml de ácido tricloroacético 35 %, se centrifugó y luego se midió la absorbancia a 420 m $\mu$  en un espectrofotómetro Beckman DU. Se calculó la diferencia entre la absorbancia medida a tiempo cero y al final de la incubación. Se definió una unidad como la cantidad de enzima que produce una disminución en la absorbancia de 0.100 por minuto a 37°C.

La actividad específica de la enzima se expresó en unidades/h/mg de proteína y la actividad total en unidades/h/gramo de tejido fresco original.

#### Actividad de acetilcolinesterasa

La actividad de acetilcolinesterasa (AcE) fué determinada según el método de Augustinsson (1957), modificado por De Robertis y col. (1962). La actividad de la enzima se expresó en micromoles de acetilcolina hidrolizada por hora.

#### Determinación de ubiquinona

Solventes utilizados:

El etanol fué purificado según el método indicado por Redfearn (1967): se calentó a reflujo durante una hora en presencia de zinc en polvo (20 g/litro) y KOH (40 g/litro), y luego se destiló. La purificación del metanol se realizó por calentamiento a reflujo durante una hora en presencia de ácido oxálico y posterior destilación. El éter de petróleo (G.A., punto de ebullición 40°-60°C, Merck) no contenía cantidades apreciables de benceno y por lo tanto fué utilizado sin destilar.

La extracción y determinación de ubiquinona se realizó según el método descrito por Redfearn (1967), que consiste en los siguientes pasos: a) extracción de los lípidos con éter de petróleo; b) elimina-

ción de los lípidos interferentes por partición del extracto entre éter de petróleo y metanol y c) determinación espectrofotométrica de la ubiquinona.

En las ratas de 20 a 90 días se extrajeron 9 a 13 mg de proteína mitocondrial; en cambio en las ratas más jóvenes se debieron utilizar cantidades mayores (15 a 30 mg de proteína) para poder extraer cantidades medibles de ubiquinona.

Una alícuota de suspensión mitocondrial (1 a 2 ml) conteniendo 9 a 15 mg de proteína/ml se colocó en un tubo de centrifuga de 10 ml de capacidad con tapa de vidrio esmerilada y se agregaron 2 ml de metanol y 2.5 ml de éter de petróleo. La suspensión se agitó mecánicamente durante un minuto con el fin de extraer la ubiquinona. Se centrifugó a 1500 rpm 5 minutos y la capa etérea superior se pasó a otro tubo similar. La suspensión mitocondrial desnaturalizada se extrajo nuevamente con 1.5 ml de éter de petróleo. Los extractos etéreos reunidos se trataron con 1 ml de metanol: agua (95:5), se agitó un minuto y luego se centrifugó. La capa superior etérea fué evaporada a 40°C, a presión reducida. El residuo se disolvió en 1 ml de etanol espectrofotométricamente puro y se centrifugó a 10000 rpm 15 minutos con el fin de separar partículas insolubles que pudieran alterar el espectro. En el sobrenadante se determinó el espectro de absorción en la zona de 230-320 m $\mu$ , en un espectrofotómetro Zeiss PLQ II. Luego se agregó en la misma cuba 3  $\mu$ l de solución de borohidruro de potasio en KOH 0.1 N (50 mg borohidruro/ml) preparado en el momento de ser usado y 3  $\mu$ l de ácido acético 1 N. Una vez que hubo cesado el desprendimiento de burbujas de hidrógeno se determinó nuevamente el espectro de absorción entre 230-320 m $\mu$ , la presencia de ubiquinona se reveló por la desaparición del máximo de absorción a 275 m $\mu$  (ubiquinona) y su desplazamiento a 290 m $\mu$  (ubiquinol)

(Pumphrey y Rodfearn, 1960).

La concentración de ubiquinona se calculó considerando la disminución en la absorbancia a 275 m $\mu$  y utilizando el coeficiente de extinción molecular para la diferencia en la absorción entre las formas oxidada y reducida de la ubiquinona  $(\epsilon_{ox} - \epsilon_{red})_{275} = 12.25 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Rodfearn, 1967).

Los niveles de ubiquinona se expresaron en milimicromoles/mg de proteína mitocondrial.

#### Determinación de citocromos

Para determinar los niveles de citocromos se utilizó un espectrofotómetro de doble haz, diseñado por Britton Chance (1954; 1957) construido en la Johnson Foundation, Philadelphia, Pennsylvania. Este aparato permite registrar, en función de la longitud de onda, la diferencia entre las densidades ópticas de dos suspensiones mitocondriales que difieren en su estado metabólico. Como consecuencia de su gran sensibilidad permite determinar el espectro diferencial debido a pequeños cambios en la absorción, sin interferencia de otras sustancias presentes que absorbieran fuertemente en esa misma zona del espectro.

Se determinó el espectro diferencial entre los estados oxidado y reducido de los citocromos (Chance y Williams, 1955; Chance, 1957).

Para la determinación de los citocromos c + c<sub>1</sub> y a, ambas cubas contenían: buffer fosfato pH 7.4 10 mM, sacarosa 0.22 M y suspensión mitocondrial 1.5-3 mg de proteína/ml. Se trazaba la línea de base y luego se agregaba a una de ellas succinato de potasio 10 mM; una vez producida la anaerobiosis se registraba el espectro diferencial. El citocromo b se determinó de una manera similar, excepto que junto con el succinato se agregó antimicina A (Sigma Chem. Co., Tipo III) en una concentración final de 0.44  $\mu\text{g/ml}$ ; la proteína mitocondrial fué

de 3-4 mg/ml. Las determinaciones se realizaron a 20°-22°C.

Cada experimento consistió en determinaciones por duplicado; se utilizaron 3-4 preparaciones mitocondriales para cada edad. Los niveles de citocromos obtenidos fueron los mismos en preparaciones mitocondriales frescas ó congeladas.

Los coeficientes de extinción milimolar y los pares de longitud de onda utilizados fueron: 24 para el citocromo a (605-630 m $\mu$ ) (van Gelder, 1966); 19.1 para los citocromos c + c<sub>1</sub> (551-540 m $\mu$ ) (Chance, 1957) y 20 para citocromo b (563-573 m $\mu$ ) (Chance y Williams, 1955).

Los resultados se expresaron en milimicromoles de citocromo/mg de proteína mitocondrial.

#### Determinación de proteínas

Las proteínas se determinaron según el método descrito por Lowry y col. (1951), usando seroalbúmina bovina cristalizada como standard.

#### Microscopía electrónica

Las fracciones particuladas fueron fijadas en una solución de glutaraldehído 3 % en buffer fosfato 0.1 M pH 7.3 y luego en tetróxido de osmio 1.5 % en buffer, según el método de Sabatini y col. (1963). Antes de la deshidratación, fueron sumergidas en acetato de uranilo acuoso 2 % durante 150 minutos y luego incluidas en Epon 812. Fueron seccionadas con un ultramicrotomo LKB y se montaron en grillas de cobre. Los cortes se trataron con citrato de plomo según la técnica de Reynolds (1963) y fueron observados bajo un microscopio electrónico Siemens Elmiskop I.

III- CARACTERISTICAS METABOLICAS DE LA FRACCION  
MITOCONDRIAL DE CEREBRO DE RATA

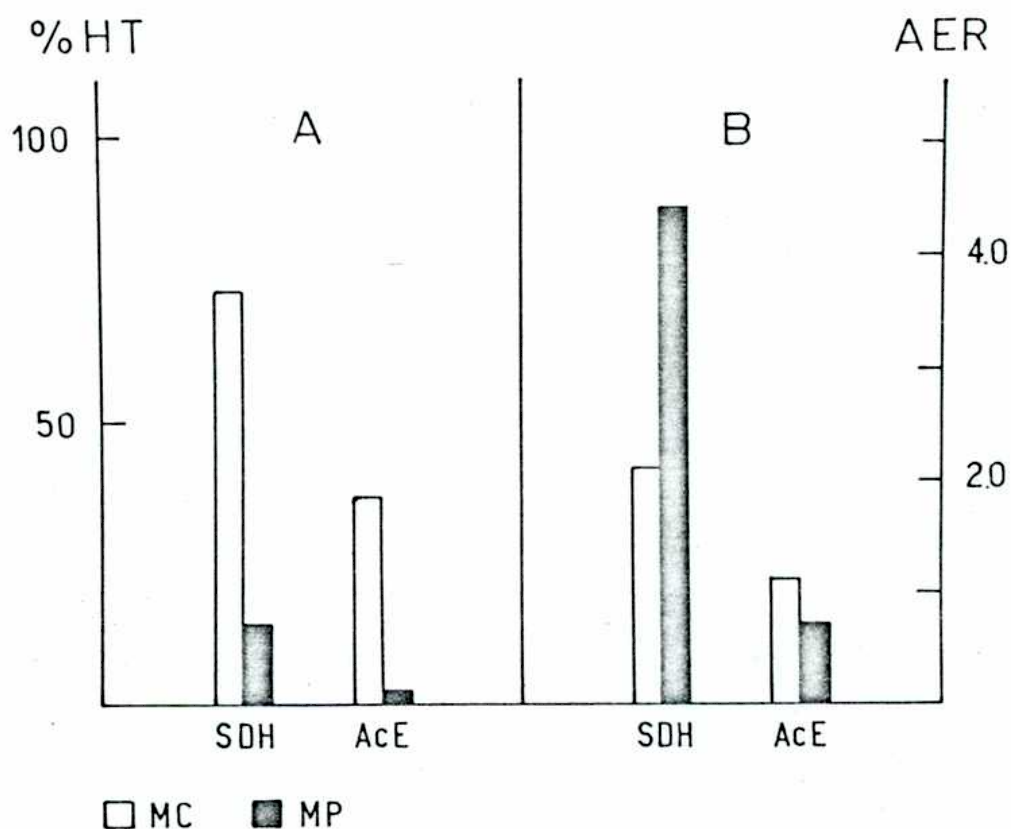
Abood y col. (1952) y Brody y Bain (1952) fueron los primeros en estudiar las características metabólicas de las mitocondrias cerebrales, y con tal fin adaptaron para su aislamiento las técnicas convencionales de centrifugación diferencial, originalmente desarrolladas para el aislamiento de las mitocondrias hepáticas. Observaron que para obtener un buen rendimiento era necesario utilizar mayores fuerzas gravitacionales que las necesarias para sedimentar las mitocondrias de hígado, entre 10000 y 20000 x g. Sin embargo, fué demostrado por De Robertis y col. (1961) que la fracción mitocondrial obtenida de esta manera presentaba una notable heterogeneidad en cuanto a su composición; además de mitocondrias, contenía fragmentos de mielina y terminales sinápticos. Utilizando gradientes de densidad en base a soluciones de sacarosa, De Robertis y col. (1962) lograron separar los distintos organoides que se encontraban en la fracción mitocondrial cruda, obteniendo una fracción constituida exclusivamente por mitocondrias libres.

Cuando intentamos estudiar las propiedades de la fracción mitocondrial obtenida por este método, obtuvimos muy bajos valores de relación P/O y de C.R., lo que indicaba que esta preparación, a pesar de su alto grado de pureza, estaba deteriorada desde el punto de vista funcional. Esto era de esperar, ya que las microfotografías electrónicas presentadas por De Robertis y col. (1962) muestran que las mitocondrias aisladas por este método presentan un alto grado de hinchamiento y cierto deterioro en sus crestas. Por lo tanto, el método de separación de las mitocondrias por medio de gradientes de sacarosa no fué considerado de utilidad para nuestros fines.

Diversos autores intentaron mejorar la purificación de las mitocondrias de cerebro sin alterar sus propiedades metabólicas (Løvtrup y Zelander, 1962; Jöbsis, 1963; Stahl y col., 1963; Ozawa y col., 1966). Dado que el método propuesto por Løvtrup y Zelander (1962) dió resultados satisfactorios, fué el que se adoptó para la obtención de la fracción mitocondrial utilizada en nuestro trabajo. La observación al microscopio electrónico de la fracción de mitocondrias purificadas (MP) obtenida por este método, mostró que el grado de purificación alcanzado era muy bueno; la preparación no contenía fragmentos de mielina y la contaminación con terminales sinápticos era baja. Además, las mitocondrias no presentaban hinchamiento y se encontraban en el estado de conformación condensada, según fuera definido por Hackenbrock (1968) (ver Figura 6).

Para estudiar bioquímicamente el grado de purificación alcanzado con este método de aislamiento, se compararon las actividades de dos enzimas en la fracción de mitocondrias crudas y en la de mitocondrias purificadas. Se eligió a la SDH, que es un constituyente exclusivo de las membranas mitocondriales (Green y MacLennan, 1967), como marcador de las mitocondrias y a la AcE como marcador de los terminales sinápticos (De Robertis y col., 1962). La Figura 3A muestra que por el procedimiento de purificación utilizado en este trabajo, el porcentaje de la actividad de SDH recuperado disminuye del 73 % del H.T. en MC a 14 % en MP. Si bien estos resultados indican una pérdida importante de mitocondrias por el proceso de purificación, ya que el porcentaje de actividad de SDH disminuye aproximadamente 5 veces, es de interés señalar que el porcentaje de la actividad recuperada de AcE disminuyó 10 veces por la purificación de las MC. El grado de purificación alcanzado está indicado por los cambios de las A.E.R. de ambas enzimas, como se muestra en la Figura 3B, donde puede observarse que mientras la A.E.R. de SDH aumenta 2 veces por la purificación, la de AcE disminuye aproxi-

FIGURA 3

Actividad de SDH y AcE durante la purificación de las mitocondrias

Los resultados son las medias de 3 experimentos utilizando cerebro de ratas de 30 días de edad. La determinación de SDH y AcE se realizó según se indicó en Material y Métodos. MC: fracción de mitocondrias crudas, sedimentada a 14500 x g 15 min.; MP: fracción de mitocondrias purificadas, sedimentada a 7000 x g 15 min. (ver Figura 2). % HT: por ciento de la actividad enzimática del homogenizado inicial recuperada en las fracciones MC y MP. AER: actividad específica relativa.



madamente a la mitad.

Estos resultados confirmaron los obtenidos por la observación al microscopio electrónico; por lo tanto, dado el grado satisfactorio de pureza alcanzado, se decidió estudiar el estado metabólico de las mitocondrias así obtenidas.

En la Tabla I puede observarse que cuando las MP fueron incubadas con piruvato + L-malato como sustrato oxidable, si bien los valores de P/O fueron satisfactorios, los de C.R. fueron bajos. El agregado de albúmina al medio de incubación no produjo modificaciones en la relación P/O, pero sí un considerable aumento en el C.R. Este efecto, que se debió a una disminución del consumo de oxígeno en el estado 4, sugiere la presencia de desacoplantes en la preparación mitocondrial.

En la Figura 4 se muestran los resultados obtenidos cuando se estudió el efecto de la concentración de proteína mitocondrial sobre la fosforilación oxidativa, manteniendo constante la concentración de albúmina y utilizando piruvato + L-malato como sustrato oxidable. En estas condiciones, tanto el consumo de oxígeno como la esterificación de  $P_i$  aumentaron linealmente hasta una concentración de proteína mitocondrial de 0.6 mg/ml, no manteniéndose la linealidad para concentraciones mayores. Estos resultados sugieren que al aumentar la concentración de mitocondrias en el medio de incubación, al mismo tiempo se incrementa la concentración de los agentes inhibidores y desacoplantes que las mismas contienen, superando la capacidad de la albúmina para fijarlos a concentraciones de proteína mitocondrial mayores de 0.6 mg/ml.

En la Figura 5 se pueden observar los resultados obtenidos

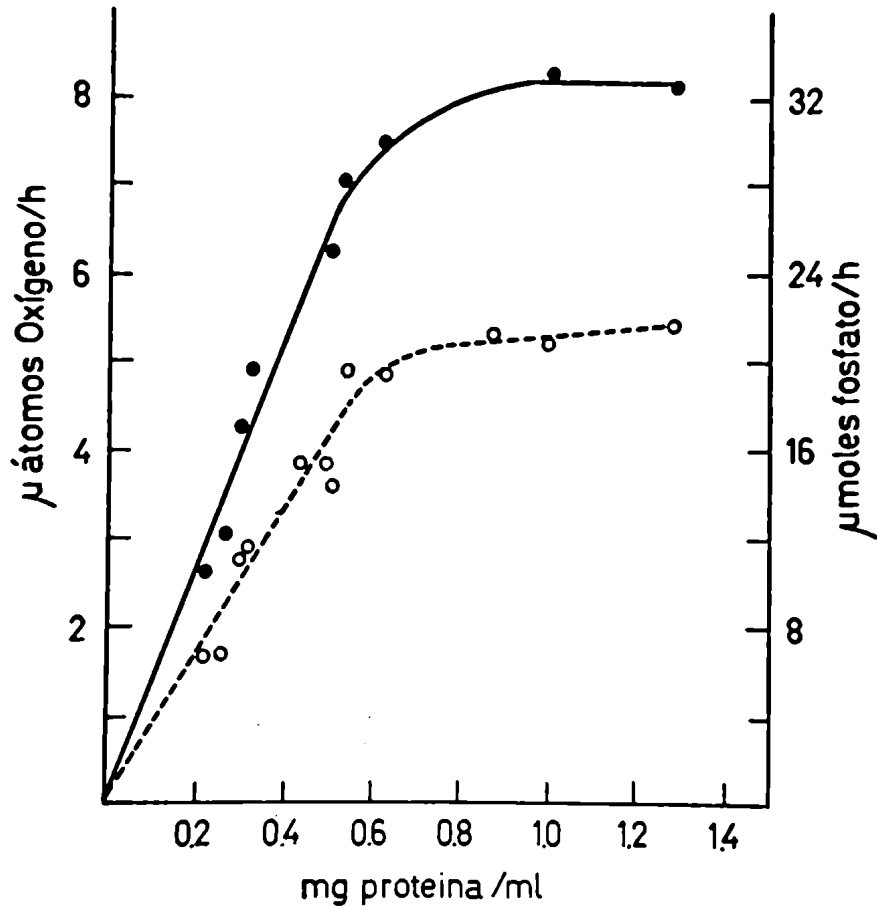
TABLA IEfecto del agregado de albúmina sobre la fosforilación oxidativa

	SAB	<u>consumo de oxígeno</u>		C.R.	P/O
		estado 3	estado 4		
Exp. I	-	8.4	4.2	2.0	3.1
	+	8.7	1.6	5.4	3.0
Exp. II	-	9.3	4.2	2.2	2.8
	+	10.2	2.0	5.1	2.7

Los resultados son las medias de determinaciones por duplicado en cada experimento, utilizando una fracción MP recién obtenida de cerebro de ratas de 30 días de edad. La composición del medio de incubación conteniendo piruvato + L-malato como sustrato es la indicada en Material y Métodos; se utilizó una concentración de proteína mitocondrial de 0.4 mg/ml. Cuando se agregó SAB la concentración fué de 2 mg/ml. El consumo de oxígeno se expresó en microátomos/h/mg proteína mitocondrial.

FIGURA 4

Fosforilación oxidativa en función de la  
concentración de proteína mitocondrial

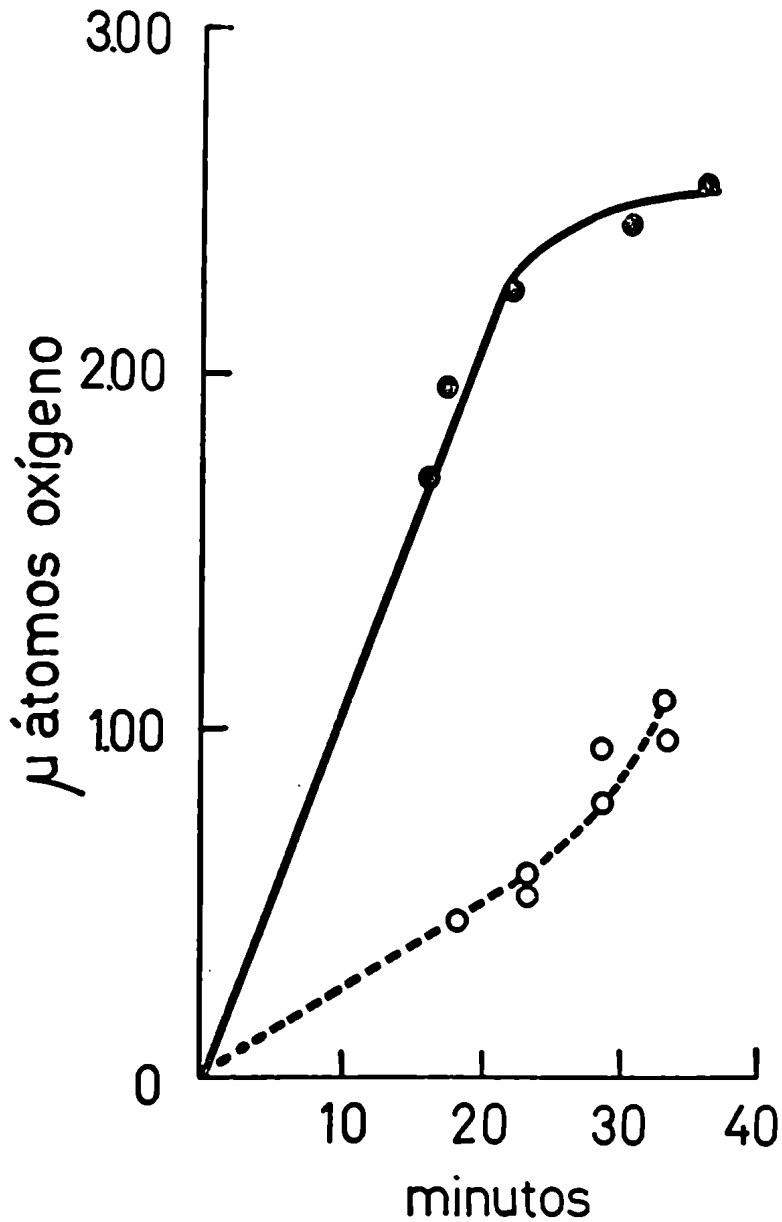


Los resultados son las medias de 3 experimentos individuales con fracción MP obtenida de ratas de 60-70 días de edad. El medio de incubación, conteniendo piruvato+L-malato, es el indicado en Material y Métodos.

- : consumo de oxígeno en el estado 3
- : consumo de fosfato inorgánico

FIGURA 5

Consumo de oxígeno en función del tiempo de incubación



Resultados obtenidos en 3 experimentos individuales utilizando la fracción MP obtenida de ratas de 30 días de edad. El medio de incubación conteniendo piruvato+L-malato, según se indicó en Material y Métodos; la concentración de proteína mitocondrial fué de 0.5 mg/ml.

●—● : consumo de oxígeno en el estado 3

○--○ : consumo de oxígeno en el estado 4

cuando se estudió el consumo de oxígeno en función del tiempo de incubación. En estos experimentos, en los que se utilizó piruvato + L-malato como sustrato, tanto la concentración de albúmina como la de proteína mitocondrial se mantuvieron constantes. En estas condiciones, el consumo de oxígeno en los estados 3 y 4 se mantuvo lineal hasta los 20 minutos de incubación; a tiempos mayores el consumo de oxígeno en el estado 3 disminuyó mientras que en el estado 4 aumentó, produciéndose así una notable disminución en el C.R. (a los 15 minutos el C.R. fué de 4.2 mientras que a los 30 minutos disminuyó a 2.9). Estos resultados son similares a los observados por Ozawa y col. (1966, 1967b) cuando agregaron inhibidores endógenos u oleato al medio de incubación. Por lo tanto, nuestros resultados permiten suponer que también durante la incubación se producen agentes desacoplantes a una velocidad tal que a tiempos mayores de 20 minutos ya superan la capacidad de fijación de la albúmina presente.

Se estudiaron los efectos de la fracción TSM, que contiene terminales sinápticos y fragmentos de mielina, además de mitocondrias, sobre la fosforilación oxidativa. La Tabla II muestra que el agregado de la fracción TSM, en una concentración de proteína aproximadamente el triple de la de MP, produjo una disminución del 20 % en la relación P/O y un descenso en el C.R. aún más marcado, 37 %; cuando la relación de la concentración de proteína de TSM a MP en el medio de incubación fué aproximadamente 7, la relación P/O disminuyó 40 % del valor obtenido en ausencia de TSM mientras que el C.R. descendió 65 %. Estos resultados indican la presencia de inhibidores y desacoplantes en la fracción TSM.

La eficiencia metabólica de la preparación de MP fué confirmada cuando se estudió la fosforilación oxidativa utilizando otros sustratos oxidables, según se puede observar en la Tabla III. Los valores de con-

TABLA II

Efecto del agregado de la fracción TSM sobre la fosforilación oxidativa

TSM mg prot./ml	consumo de oxígeno		consumo de P <sub>i</sub>	P/O	C.R.
	estado 3	estado 4			
0	12.9	2.8	38.6	3.0	4.6
1.3	4.6	1.6	11.0	2.4	2.9
2.6	2.9	1.7	5.2	1.8	1.6
4.0	2.5	1.3	3.7	1.5	1.9

Los resultados son las medias de determinaciones por duplicado. Se utilizaron fracciones MP y TSM recién preparadas, de cerebro de rata de 30 días de edad. Fraccionamiento y medio de incubación según se indicó en Material y Métodos. Sustrato utilizado y concentración de proteína mitocondrial, según se indicó en Tabla I. El consumo de oxígeno se expresó en microátomos/h/mg proteína y el de P<sub>i</sub> en micromoles/h/mg proteína.

TABLA III

Fosforilación oxidativa en presencia de diferentes sustratos

Sustrato	consumo de oxígeno		consumo de $P_i$	P/O	C.R.
	estado 3	estado 4			
succinato	12	8	21	1.8	1.5
piruvato + L-malato	11	2.2	32	2.9	5.0
L-glutamato + L-malato	8.2	1.3	23	2.8	6.3
$\alpha$ -glicero- fosfato	2.4	1.8	4.7	2.0	1.3

Los resultados son las medias de 3-4 experimentos individuales. Se utilizó la fracción MP recién obtenida de cerebro de ratas de 60-70 días de edad. La composición del medio de incubación y la concentración de sustratos según se indicó en Material y Métodos. El consumo de oxígeno se expresó en microátomos/h/mg proteína y el de  $P_i$  en micromoles/h/mg proteína.

sumo de oxígeno y de  $P_1$  fueron semejantes a los obtenidos por otros investigadores (Eslazs y col., 1963; Løvtrup y Svennerholm, 1963); los valores satisfactorios de P/O y C.R. indican que esta preparación mitocondrial se encuentra fuertemente acoplada en las condiciones fijadas para su incubación.

### Discusión

Los resultados que terminamos de presentar demuestran que cuando se intentan estudiar las propiedades de las mitocondrias cerebrales se deben tener en cuenta las precauciones necesarias para obtener una preparación con mínimo grado de contaminación y óptima actividad metabólica. Los resultados obtenidos en nuestros experimentos relacionados con la observación al microscopio electrónico, las actividades enzimáticas y los valores de P/O y C.R. obtenidos en las condiciones anteriormente especificadas, demuestran que la preparación obtenida por el método de Løvtrup y Zelander (1962) cumple con los requisitos mencionados.

Sin embargo, debe destacarse que para obtener esta preparación se debe sacrificar el rendimiento, ya que se pierden cantidades significativas de mitocondrias durante la purificación. Esto puede verse claramente en las microfotografías electrónicas de la fracción TSM (ver Figura 7), en la que se observan mitocondrias libres acompañando a los terminales sinápticos y a los fragmentos de mielina. La comparación de las microfotografías electrónicas de las fracciones MP y TSM (ver Figuras 6 y 7) sugiere que las mitocondrias que se pierden durante la purificación son de menor tamaño que las presentes en la fracción MP. La pérdida de mitocondrias que ocurre durante la purificación también se refleja en la baja recuperación de proteínas y de la actividad de SDH, que son sólo el 3 % del contenido proteico del H.T. y el 14 % de la actividad hallada en el H.T., respectivamente.



Nuestros resultados en relación con la recuperación de proteínas y actividad de SDH concuerdan con los obtenidos por Stahl y col. (1963) en mitocondrias de cerebro bovino, purificadas por un método similar al utilizado en nuestro trabajo, pero es mucho menor que el obtenido en nuestro laboratorio por Piras y col. (1970) en mitocondrias aisladas por el método de gradientes de densidad utilizado sacarosa; sin embargo, resulta de interés señalar que la actividad específica de SDH que hemos obtenido en nuestra preparación de MP, es similar a la observada por Piras y col. (1970), si se comparan preparaciones obtenidas de cerebros de ratas de 30 días de edad.

Nuestros resultados muestran que cuando las MP se incuban en ausencia de albúmina, los valores de P/O obtenidos son similares a los teóricos pero los de C.R. son significativamente bajos; el agregado de albúmina aumenta considerablemente el C.R. sin modificar el P/O. Ha sido demostrado que el efecto de la albúmina se debe a su capacidad de unirse con los ácidos grasos libres y otros agentes desacoplantes (Lehninger y Remmert, 1959; Helinsky y Cooper, 1960; Wojtczak y Wojtczak, 1960; Wojtczak y Lehninger, 1961; Chefurka, 1966). Por lo tanto, la albúmina eliminaría de esta manera las sustancias desacoplantes presentes en el medio de incubación.

Las experiencias de Ozawa y col. (1966; 1967a, b) demostraron que la isquemia cerebral post-mortem en la rata produce una significativa formación endógena de productos con características similares a las de los ácidos grasos, que presentan un marcado efecto inhibitor y desacoplante. Por otro lado, las observaciones de Lunt (1967) demostraron que durante la homogenización del tejido cerebral y su posterior fraccionamiento se liberan ácidos grasos que aparecen distribuidos en todas las fracciones subcelula-

res; esta liberación de ácidos grasos durante el fraccionamiento no se debería a una acción enzimática sino a la liberación de ácidos grasos no esterificados asociados con las diferentes membranas. Por consiguiente, es lógico suponer que la fracción MP utilizada en nuestras experiencias debe contener ácidos grasos libres en cantidad tal que manifiesten su efecto desacoplante, reflejado en el bajo C.R. observado, que es el índice más sensible de la integridad funcional de las mitocondrias; el agregado de albúmina al medio de incubación en una concentración de 2 mg/ml es suficiente para neutralizar tales efectos.

Hemos observado que tanto el consumo de oxígeno como el de  $P_i$  fueron lineales hasta una concentración de proteína mitocondrial de 0.6 mg/ml (ver Figura 4); esto sugiere que al aumentar la cantidad de inhibidores presentes en las mitocondrias, se saturaría la capacidad de la albúmina para combinarse con ellos. Sin embargo, resulta interesante señalar que en los casos en que se utilizaron MP obtenidas de cerebros muy inmaduros (ratas de 5 días de edad), la concentración de proteína mitocondrial pudo ser aumentada a 1.0 mg/ml sin que se observaran efectos inhibidores y desacoplantes. Esto nos permite suponer que tanto la formación endógena de inhibidores como su liberación durante los procesos de homogenización y fraccionamiento aumenta con la edad del animal.

También hemos observado que el consumo de oxígeno en los estados 3 y 4 es lineal sólo durante los primeros 20 minutos de incubación (ver Figura 5); cuando los tiempos de incubación son más largos se produce una disminución en el consumo de oxígeno en el estado 3 y un aumento en el estado 4, que trae como consecuencia una disminución del C.R. Este efecto, que es semejante al producido por oleato (Ozawa, 1967b) sugiere que durante la incubación

se produce un aumento en la concentración de los agentes inhibidores y desacoplantes. Lunt (1967) ha observado que cuando se incuban cortes de tejido cerebral a 37° C la cantidad de ácidos grasos libres presentes es 9 veces mayor que los hallados en el tejido fresco, los que posteriormente aparecen distribuidos en todas las fracciones subcelulares. Por otro lado, Chefurka y Dumas (1966) observaron un aumento en los niveles de ácidos grasos libres durante el "envejecimiento" de mitocondrias de hígado de ratón, probablemente por acción de una fosfolipasa mitocondrial. Estas observaciones permiten suponer que durante la incubación de las mitocondrias de cerebro se producen ácidos grasos libres que explicarían los resultados que acabamos de comentar.

Consideramos de suma importancia destacar el marcado efecto inhibitor y desacoplante de la fracción TSM (ver Tabla II), ya que esto es una clara demostración de que la preparación de mitocondrias crudas no puede ser utilizada para el estudio de las propiedades metabólicas de estos organoides.

Ozawa y col. (1966) han demostrado que la fracción de mitocondrias crudas contiene inhibidores y desacoplantes, de características semejantes a las de los ácidos grasos, que no se encuentran en la fracción de mitocondrias purificadas. Es probable que los ácidos grasos libres presentes en la fracción MP sean distintos de los que se encuentran en la fracción TSM ya que los estudios de Lunt (1967) han demostrado que la composición de ácidos grasos libres en la fracción de mielina y terminales sinápticos es distinta de la encontrada en mitocondrias. Teniendo en cuenta que Chefurka y Dumas (1966) han observado que tanto la longitud de la cadena hidrocarbonada como el número de dobles ligaduras modifican el carácter desacoplante de los ácidos grasos libres, podemos suponer que el efecto inhibitor y

desacoplante de la fracción TSM puede deberse a dos causas: a) a un efecto aditivo, aumentando la cantidad de ácidos grasos presentes en la fracción MP y b) a la presencia de algunos ácidos grasos de mayor efecto desacoplante, que se encuentren en concentraciones significativamente mayores en la fracción TSM.

Para finalizar, nuestros resultados demuestran con claridad que la purificación de las mitocondrias es un requisito indispensable para su utilización en estudios metabólicos y que la preparación de mitocondrias crudas no resulta útil para nuestros fines. Por lo tanto, hemos decidido utilizar en las experiencias que se incluyen en los capítulos siguientes nuestra preparación de MP, en las condiciones de incubación que han sido establecidas en este capítulo.

#### IV- CAMBIOS EN LAS PROPIEDADES DE LAS MITOCONDRIAS DE CEREBRO DE RATA DURANTE LA MADURACION POSTNATAL

Utilizando la fracción mitocondrial MP, cuyas características fueron presentadas en el capítulo anterior, se realizó el estudio de diferentes propiedades mitocondriales durante el período de maduración postnatal.

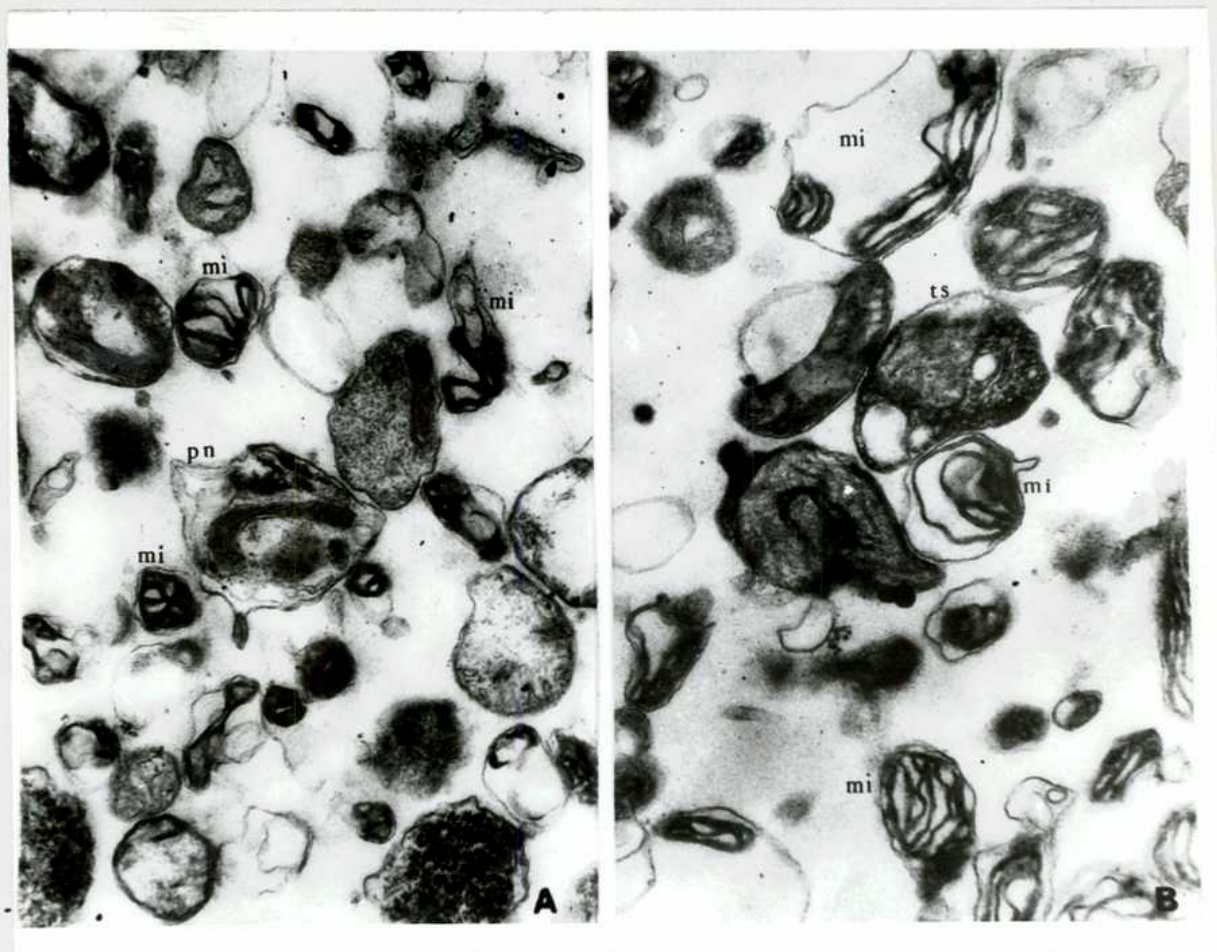
##### Microscopía electrónica

En la Figura 6 se pueden observar las microfotografías electrónicas de la fracción MP obtenida de cerebros de ratas de 5 y 30 días. En ambas edades, esta fracción estaba constituida principalmente por mitocondrias libres, la mayoría de las cuales se encontraban en la conformación condensada, según fuera definida por Hackenbrock (1968). El grado de contaminación fué bajo y semejante en ambas edades; a los 5 días los contaminantes fueron perfiles dendríticos y procesos neuronales, probablemente axones en crecimiento, mientras al día 30 los contaminantes fueron terminales sinápticos bien desarrollados.

En la Figura 7 se pueden observar las fracciones TSM aisladas de cerebro de ratas de 5 y 30 días. En ambas edades la fracción TSM contenía mitocondrias libres, de menor tamaño que las observadas en la fracción MP. En las ratas de 5 días estaba constituida principalmente por procesos neuronales y perfiles dendríticos, mientras que en las ratas de 30 días se encontraban principalmente fragmentos de mielina y típicos terminales sinápticos.

##### Contenido proteico

En la Tabla IV se pueden observar las variaciones en el contenido proteico de la fracción MP durante la maduración. Desde el día 5 al 30

FIGURA 6Constitución morfológica de la fracción MP

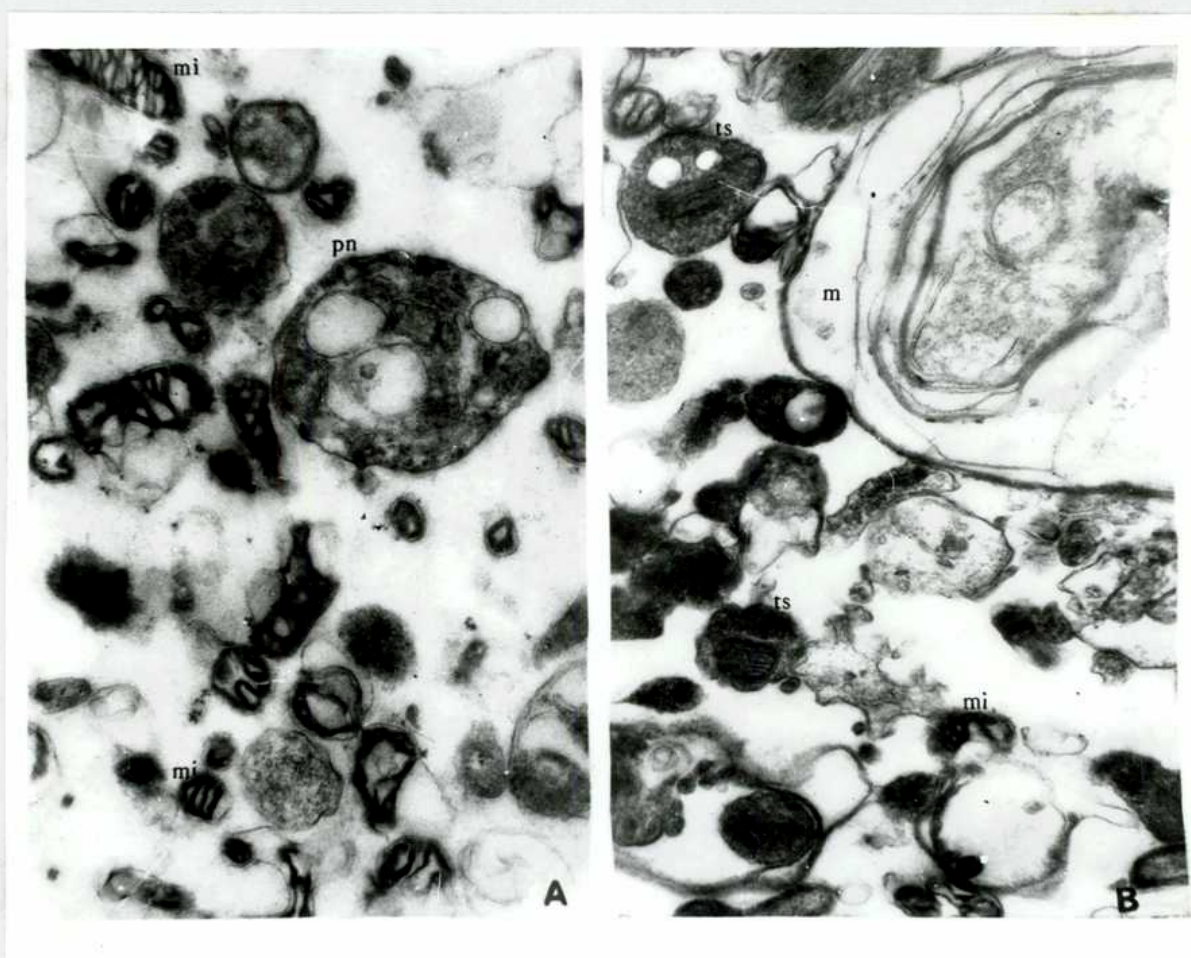
A: microfotografía electrónica de la fracción MP obtenida de cerebro de ratas de 5 días de edad.

B: microfotografía electrónica de la fracción MP obtenida de cerebro de ratas de 30 días de edad.

Aumento: 30000 x.

mi: mitocondrias; pn: procesos neuronales; ts: terminales sinápticos.



FIGURA 7Constitución morfológica de la fracción TSM

A: microfotografía electrónica de la fracción TSM obtenida de cerebro de ratas de 5 días de edad.

B: microfotografía electrónica de la fracción TSM obtenida de cerebro de ratas de 30 días de edad.

Aumento: 30000 x.

mi: mitocondrias; pn: procesos neuronales; ts: terminales sinápticos;  
m: mielina.

TABLA IVCambios durante la maduración en el contenido proteico de la fraccion MP

EDAD (días)	mg/g tej. fresco	% H.T.
5	1.15 $\pm$ 0.03	1.46 $\pm$ 0.03
10	1.64 $\pm$ 0.09	1.90 $\pm$ 0.12
15	2.02 $\pm$ 0.14	1.98 $\pm$ 0.13
20	2.60 $\pm$ 0.19	2.36 $\pm$ 0.16
25	3.58 $\pm$ 0.29	2.97 $\pm$ 0.22
30	4.04 $\pm$ 0.16	3.32 $\pm$ 0.14

Cada resultado es indicado como la media y su correspondiente E.S.

Se realizaron 5 a 7 experimentos para cada edad.

% H.T.: por ciento del contenido proteico del homogeinizado inicial recuperado en la fracción MP.



el contenido proteico basado en el peso de tejido fresco original aumentó aproximadamente 4 veces, mientras que la cantidad recuperada con respecto al homogenizado inicial aumentó aproximadamente 2 veces.

#### Actividad de SDH

En la Tabla V se puede observar la actividad de SDH en las distintas edades. La actividad de SDH, expresada en base al peso de tejido fresco original, presentó un aumento de aproximadamente 5 veces entre los 5 y 30 días; mientras que la actividad específica aumentó aproximadamente 2 veces. La recuperación con respecto al H.T. no presentó importantes cambios, variando los valores entre 7 y 13 % de la actividad encontrada en el H.T.

#### Fosforilación oxidativa

En los estudios de fosforilación oxidativa durante la maduración se utilizaron como sustratos oxidables piruvato+L-malato y succinato. Estos dos sustratos entran en distintos lugares de la cadena de transporte de electrones (ver Figura 1), por lo tanto, los datos obtenidos con ambos sustratos podrían dar información complementaria sobre los procesos involucrados durante la maduración.

En la Figura 8 se pueden observar los cambios producidos en el consumo de oxígeno y de fosfato inorgánico durante la maduración, cuando se utilizó succinato como sustrato oxidable. Ambos parámetros aumentaron paralelamente durante todo el período estudiado. Se observó un aumento de aproximadamente 2 veces entre 5 y 30 días de edad.

En la Figura 9 se presentan los resultados obtenidos durante la maduración utilizando piruvato+L-malato como sustrato oxidable. En este caso se observó un aumento de aproximadamente 3 veces tanto en el

TABLA VCambios en la actividad de SDH en la fracción MP durante la maduración

EDAD (días)	U/g tej. fresco	% H.T.	A.E.
5	0.58 $\pm$ 0.02	10.9 $\pm$ 0.9	0.57 $\pm$ 0.03
10	1.07 $\pm$ 0.07	10.5 $\pm$ 0.9	0.72 $\pm$ 0.05
15	1.24 $\pm$ 0.13	7.1 $\pm$ 0.4	0.76 $\pm$ 0.04
20	2.16 $\pm$ 0.20	11.0 $\pm$ 1.0	0.92 $\pm$ 0.02
25	3.10 $\pm$ 0.41	13.2 $\pm$ 2.0	1.04 $\pm$ 0.05
30	3.16 $\pm$ 0.32	13.5 $\pm$ 1.4	1.02 $\pm$ 0.04

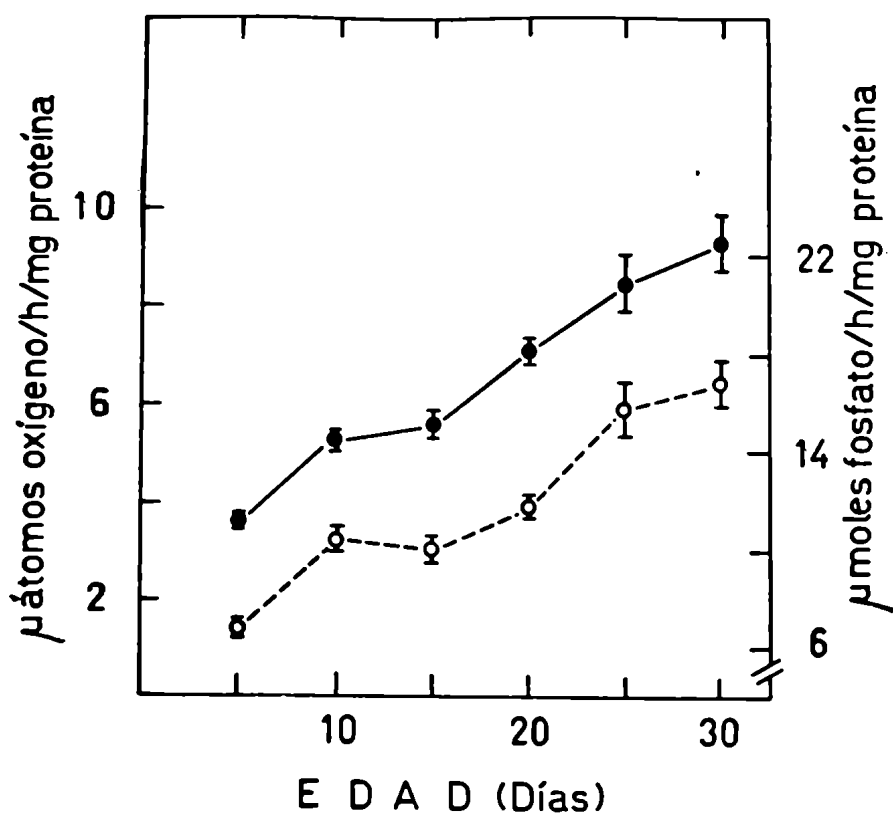
Cada resultado es indicado como la media y su correspondiente E.S. de 5 a 7 experimentos para cada edad. La actividad de SDH fué determinada según se indicó en Material y Métodos.

% H.T.: por ciento de la actividad enzimática presente en el homogeinizado inicial, recuperada en la fracción MP.

A.E.: U/h/mg proteína mitocondrial.

# FIGURA 8

Cambios durante la maduración en el consumo de oxígeno y de fosfato inorgánico utilizando succinato como sustrato oxidable



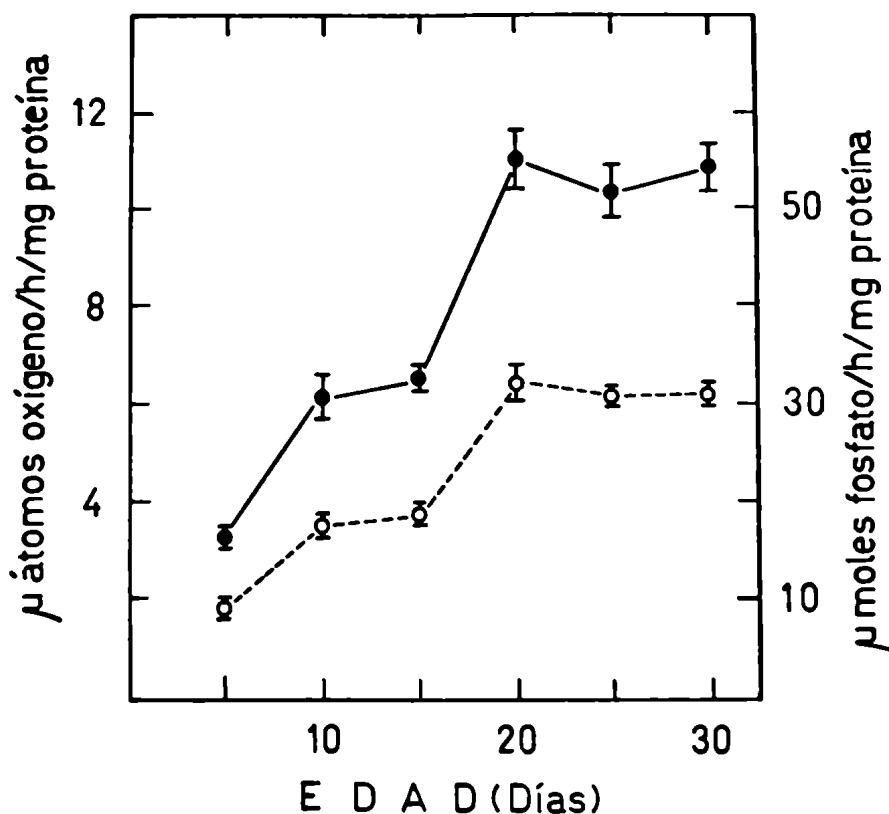
Cada punto representa la media y la barra vertical el correspondiente E.S. de 5-7 fraccionamientos para cada edad. La composición del medio de incubación conteniendo succinato es la indicada en la Tabla VI.

●—● : consumo de oxígeno en el estado 3

○- - ○ : consumo de fosfato inorgánico

## FIGURA 9

Cambios durante la maduración en el consumo de oxígeno y de fosfato inorgánico utilizando piruvato+L-malato como sustrato oxidable



Cada punto representa la media y la barra vertical el correspondiente E.S. de 5-7 fraccionamientos para cada edad. La composición del medio de incubación conteniendo piruvato+L-malato según se indicó en Material y Métodos.

●—● : consumo de oxígeno en el estado 3

○--○ : consumo de fosfato inorgánico

consumo de oxígeno como en el de fosfato inorgánico entre los 5 y los 20 días de edad, mientras que entre los 20 y 30 días no ocurrieron cambios significativos; ambos parámetros aumentaron paralelamente.

En la Tabla VI se presentan los valores de P/O y C.R. obtenidos en las distintas edades, utilizando succinato como sustrato; mientras que en la Tabla VII se muestran los resultados obtenidos con piruvato+L-malato. Se puede observar que con ambos sustratos se obtuvieron valores satisfactorios de P/O y C.R. durante todo el período de maduración estudiado; no se produjeron variaciones significativas entre las distintas edades.

#### Niveles de ubiquinona

En la Figura 10 se puede observar el espectro de ubiquinona extraída de mitocondrias de cerebro de ratas de 15 días. En todas las edades estudiadas se obtuvieron espectros semejantes. A 275  $\mu$ m se observa el pico de absorción correspondiente a la ubiquinona; luego de la reducción con borohidruro de potasio desaparece este pico y aparece el correspondiente al ubiquinol a 290  $\mu$ m.

El espectro observado con ubiquinona extraída de mitocondrias de cerebro de rata es semejante al obtenido con ubiquinona extraída de preparaciones mitocondriales de diversos órganos (Crane y col., 1957; Pumphrey y Redfearn, 1960). Si bien la mayoría de las especies contiene un solo tipo de ubiquinona en sus tejidos, se ha encontrado en distintos órganos de rata (hígado y corazón) una mezcla de  $Q_9$ - $Q_{10}$  (Crane, 1965); por lo tanto, es probable que la ubiquinona extraída de esta preparación mitocondrial de cerebro sea una mezcla de estos dos tipos de ubiquinona.

TABLA VI

Relación P/O y C.R. utilizando succinato como  
sustrato oxidable durante la maduración

EDAD (días)	P/O	C.R.
5	1.89 $\pm$ 0.08	1.1 $\pm$ 0.1
10	2.02 $\pm$ 0.11	1.5 $\pm$ 0.2
15	1.84 $\pm$ 0.10	1.3 $\pm$ 0.2
20	1.67 $\pm$ 0.04	1.2 $\pm$ 0.1
25	1.86 $\pm$ 0.05	1.4 $\pm$ 0.3
30	1.82 $\pm$ 0.09	1.5 $\pm$ 0.2

Cada resultado es indicado como la media y su correspondiente E.S. de 5 a 7 experimentos para cada edad. Medio de incubación según se indicó en Material y Métodos. La concentración de proteína mitocondrial fué de 0.4 mg/ml, excepto en las experiencias en que se utilizaron ratas de 5 días, en que fué de 1.0 mg/ml.

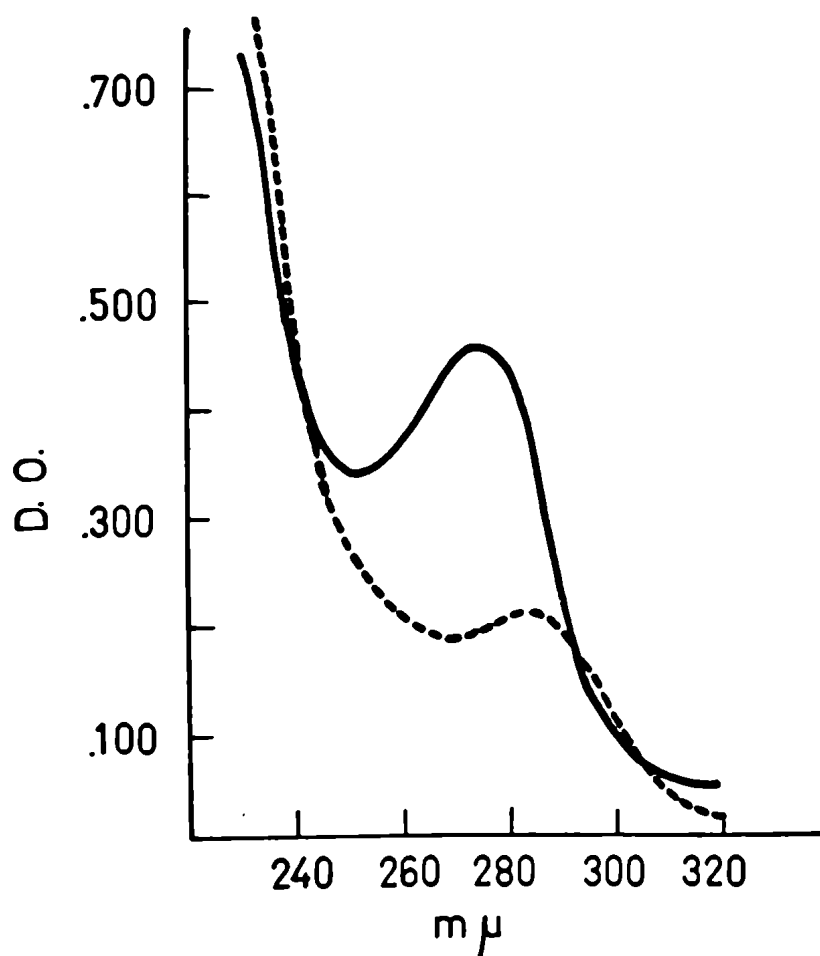
TABLA VII

Relación P/O y C.R. utilizando piruvato+L-malato como  
sustrato oxidable durante la maduración

EDAD (días)	P/O	C.R.
5	2.82 $\pm$ 0.08	5.5 $\pm$ 1.5
10	2.90 $\pm$ 0.07	6.2 $\pm$ 0.7
15	2.90 $\pm$ 0.07	6.6 $\pm$ 0.8
20	2.92 $\pm$ 0.08	5.9 $\pm$ 0.5
25	2.94 $\pm$ 0.10	5.7 $\pm$ 1.3
30	2.81 $\pm$ 0.08	4.8 $\pm$ 0.5

Cada resultado es indicado como la media y su correspondiente E.S. de 5 a 7 fraccionamientos para cada edad. Medio de incubación conteniendo piruvato+L-malato y concentración de proteína mitocondrial según se indicó en la Tabla VI.

FIGURA 10

Espectro de ubiquinona extraída de la fracción MP

La extracción y determinación de ubiquinona se realizó según se indicó en Material y Métodos. En este experimento se utilizó una cantidad de fracción MP equivalente a 22.7 mg de proteína, proveniente de cerebro de ratas de 15 días de edad.

—: espectro de ubiquinona

- - -: espectro de ubiquinol, obtenido luego de la reducción con borohidruro de potasio



Los niveles de ubiquinona por mg de proteína mitocondrial aumentaron de manera considerable durante las primeras etapas de la maduración postnatal del cerebro de rata. En la Figura 11 se puede observar que la concentración de ubiquinona permaneció sin cambios durante los primeros 10 días de vida postnatal, aumentando aproximadamente 2 veces entre los 10 y 20 días de edad; a los 20 días ya se alcanzaron los niveles observados en la rata adulta.

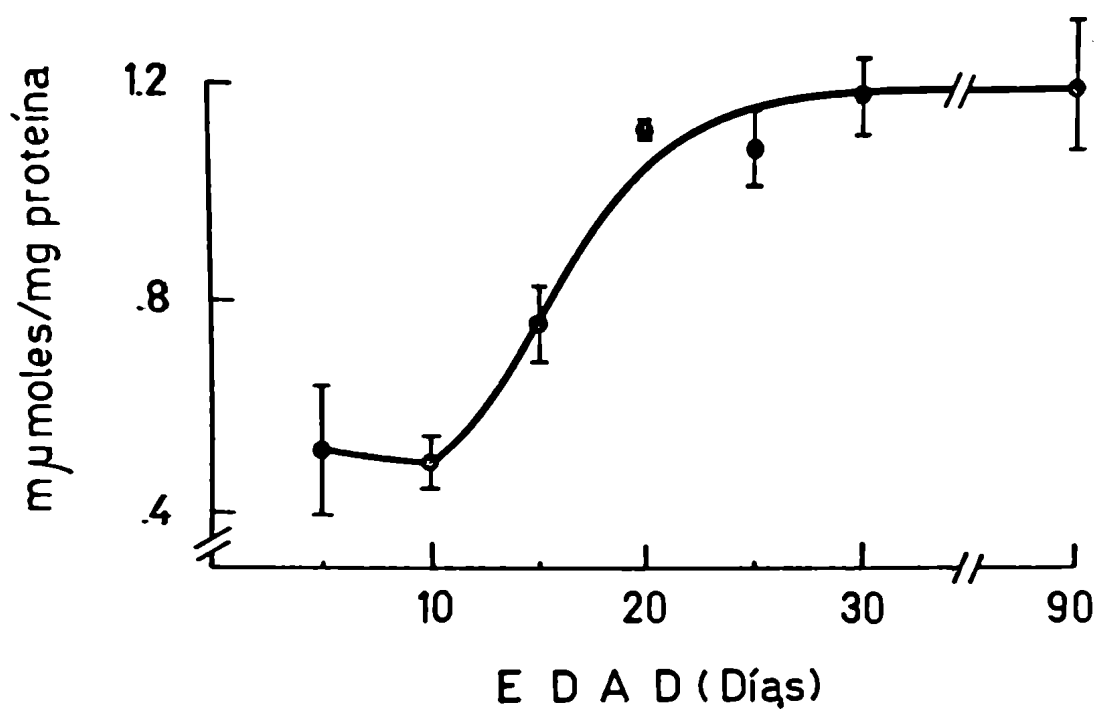
### Niveles de citocromos

En la Figura 12 se puede observar el espectro diferencial entre los estados oxidado y reducido, obtenido con una preparación mitocondrial proveniente de ratas de 15 días. En todas las edades se obtuvieron espectros similares. La distribución de los picos es semejante a la observada por Chance (1957) en mitocondrias de hígado y por Sacktor y Packer (1962) en mitocondrias de cerebro. A 445 m $\mu$  se observa la banda  $\gamma$  de los citocromos  $\underline{a}$  y  $\underline{a}_3$ ; a 551 m $\mu$  la banda  $\alpha$  de los citocromos  $\underline{a}$  y  $\underline{a}_1$ ; a 560 m $\mu$  el hombro del citocromo  $\underline{b}$ ; a 605 m $\mu$  la banda  $\alpha$  de los citocromos  $\underline{a}$  y  $\underline{a}_3$ ; a 465 m $\mu$  el pozo debido a la desaparición de la flavoproteína oxidada.

La contribución de los citocromos  $\underline{a}$  y  $\underline{a}_3$  al espectro diferencial de preparaciones de citocromo oxidasa ha sido estudiada por diversos autores (Yonetani, 1960; van Gelder y Slater, 1963; Tzagoloff y Wharton, 1965); cada uno de estos citocromos contribuye 50 % al espectro diferencial a 445 m $\mu$ , mientras que a 605 m $\mu$  el citocromo  $\underline{a}$  contribuye 81 %. En base a esto el pico a 445 m $\mu$  no pudo ser utilizado para la determinación del citocromo  $\underline{a}_3$ , contrariamente a lo que fuera indicado por Chance (1957) y para la determinación del citocromo

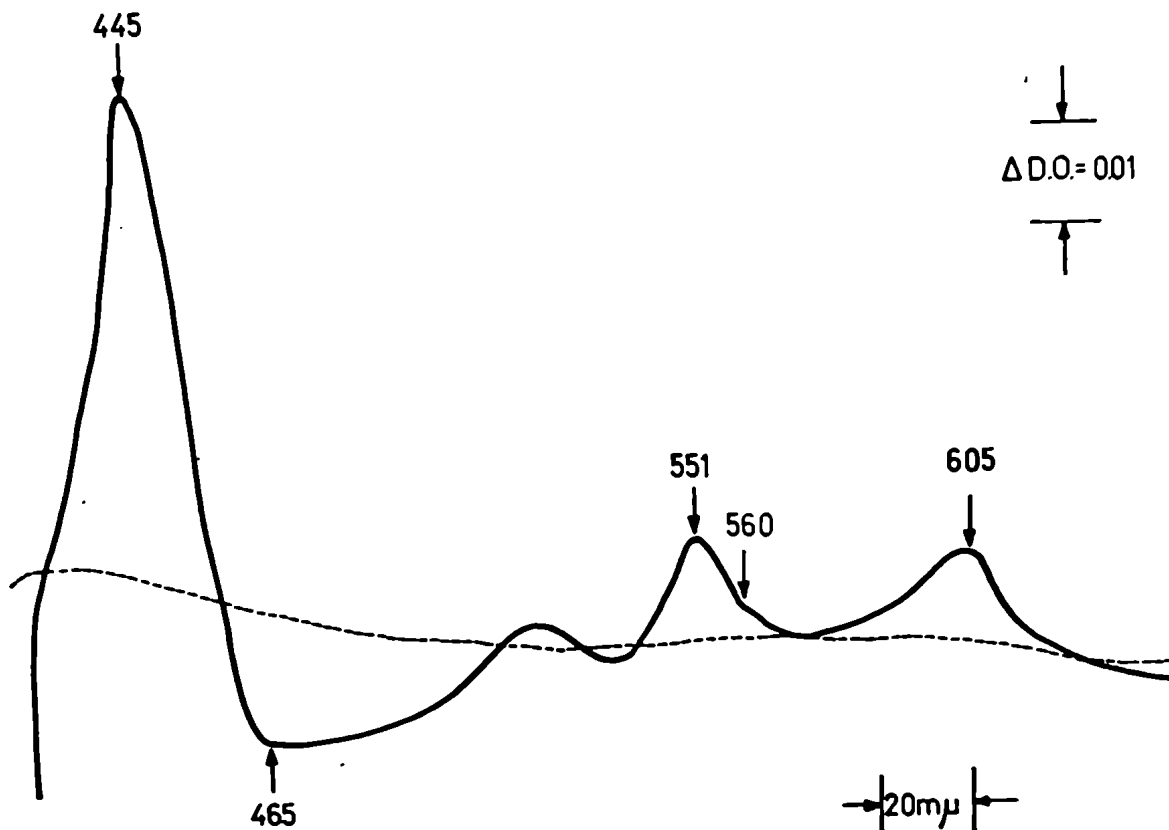
FIGURA 11

Cambios durante la maduración en los niveles de  
ubiquinona en la fracción MP



Cada punto representa la media y la barra vertical el correspondiente E.S. de 2-3 experimentos para cada edad. La determinación de ubiquinona se realizó según se indicó en Material y Métodos.

FIGURA 12

Espectro diferencial de la fracción MP

Se utilizó una fracción MP obtenida de cerebro de ratas de 15 días de edad. El trazado del espectro diferencial se realizó según se indicó en Material y Métodos; ambas cubas contenían 2.43 mg/ml de proteína mitocondrial.

-----: línea de base

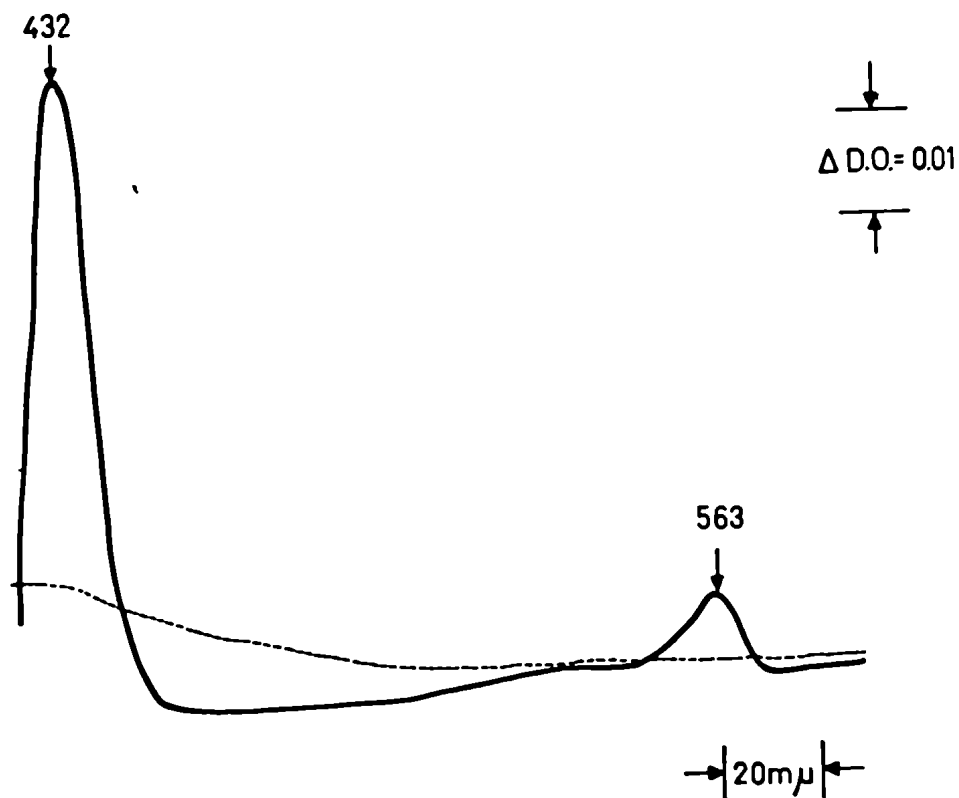
—: espectro diferencial, reducido menos oxidado.

no a se utilizó el pico a 605  $\mu$ .

En la Figura 13 se presenta el espectro diferencial obtenido en presencia de antinicina A. En estas condiciones sólo aparecen los picos correspondientes al citocromo b: la banda  $\gamma$  a 432  $\mu$  y la banda  $\alpha$  a 563  $\mu$  (Chance, 1957). Las características de este espectro no se modificaron con la edad.

Cuando los niveles de los diferentes citocromos se expresaron en base al contenido proteico de la preparación mitocondrial, se observó un aumento significativo durante los primeros 30 días de vida postnatal. La velocidad de los cambios que ocurren durante este período no fueron iguales para todos los citocromos. Como se puede observar en la Figura 14, el citocromo b no presentó cambios entre los 5 y 15 días, aumentó de manera considerable entre 15 y 20 días, edad a la que ya se obtuvieron los niveles observados en las preparaciones aisladas de cerebros de ratas adultas (90 días de edad). El citocromo a presentó un aumento continuado entre los 5 y 25 días, edad a la que alcanzó los niveles observados en el animal adulto. Los citocromos o + o<sub>1</sub> fueron los que presentaron mayor velocidad de aumento entre los 5 y 20 días, alcanzándose a esta edad los niveles del animal adulto. En general y a pesar de las diferencias en la velocidad de cambios que ocurrieron entre 5 y 30 días, la concentración de todos los citocromos aumentó aproximadamente 2 veces durante este período.

En la Tabla VIII se presentan las relaciones de los citocromos o + o<sub>1</sub> y b con respecto al citocromo a, en las distintas etapas del desarrollo. Se puede observar que la relación citocromos o + o<sub>1</sub>/citocromo a permaneció aproximadamente constante; en cambio, la rela-

FIGURA 13Espectro diferencial de la fracción MP, en presencia de antimicina

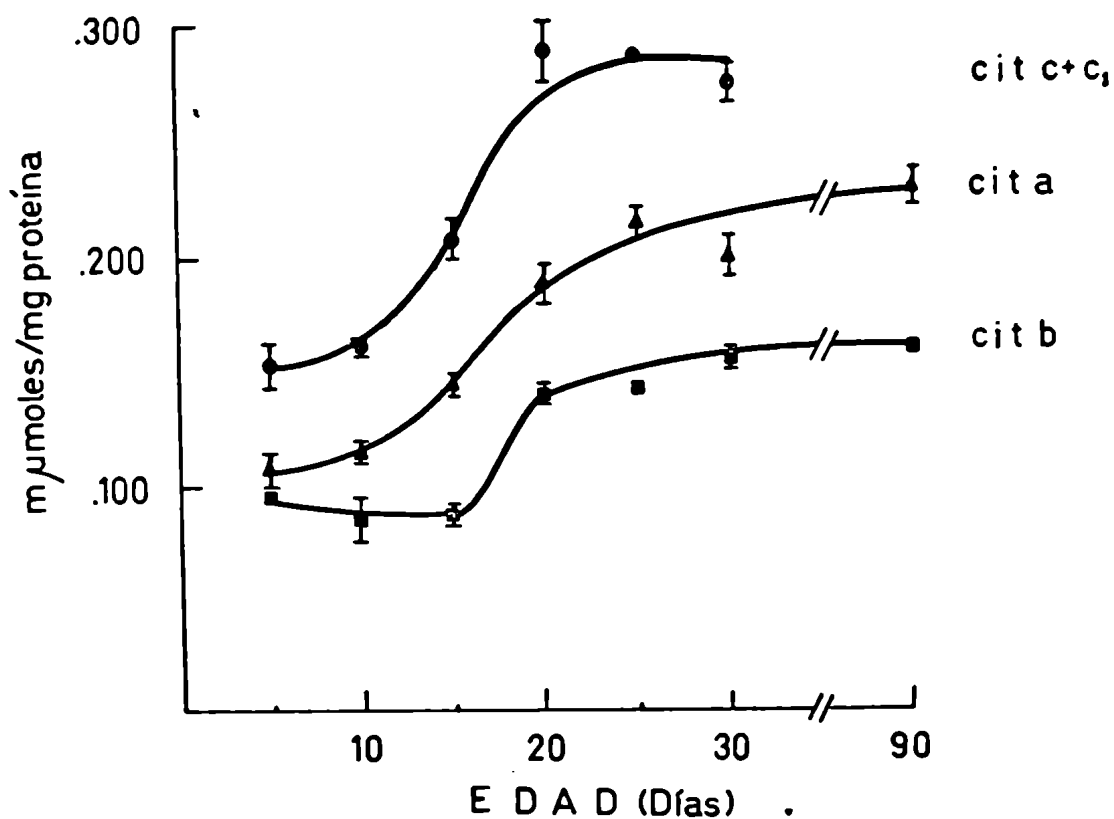
Se utilizó una fracción MP obtenida de cerebro de ratas de 15 días de edad. El trazado del espectro diferencial, en presencia de antimicina A, se realizó según se indicó en Material y Métodos; ambas cubas contenían 3.64 mg/ml de proteína mitocondrial.

-----: línea de base

—: espectro diferencial, reducido menos oxidado, en presencia de antimicina A

FIGURA 14

Cambios durante la maduración en los niveles de  
citocromos en la fracción MP



Cada punto representa la media y la barra vertical el correspondiente E.S. de 3-4 experimentos individuales para cada edad, excepto en los casos en que el E.S. no está indicado, que provienen de un solo experimento. La determinación de citocromos se realizó según se indicó en Material y Métodos.

TABLA VIII

Relación entre los distintos citocromos en mitocondrias  
de cerebro de rata durante la maduración postnatal

EDAD (días)	$\frac{c+c_1}{a}$	$\frac{b}{a}$
5	1.42	0.88
10	1.40	0.75
15	1.43	0.59
20	1.53	0.75
25	1.33	0.66
30	1.36	0.79

Estas relaciones fueron calculadas utilizando los promedios presentados en la Figura 14.

ción citocromo b/citocromo a mostró una diferencia significativa entre los 10 y 15 días ( $p < 0.05$ ) y entre 15 y 20 días ( $p < 0.001$ ). De esta manera se puede ver más claramente la diferente velocidad de cambio durante la maduración del citocromo b con respecto a los citocromos c+c<sub>1</sub> y a.

### Discusión

El cerebro de la rata presenta un alto grado de inmadurez en el momento del nacimiento y ocurre una morfogénesis muy activa durante las primeras etapas del desarrollo postnatal. Debido a que diversos estudios sugerían cambios cualitativos ó cuantitativos en las mitocondrias cerebrales durante este período (Hamburgh y Flexner, 1957; García Argiz y col., 1967; Ghittoni, 1967; Pasquini y col., 1967), consideramos muy importante tratar de aclarar este problema. Para cumplir tal propósito dispusimos, como lo hemos demostrado en el capítulo anterior, de una preparación de mitocondrias fuertemente acoplada y con bajo grado de contaminación, el que, como lo muestra la microfotografía incluida en la Figura 6 no variaba con la edad. Por lo tanto, esta preparación reunía los requisitos indispensables para estudiar sus propiedades y composición durante el período de maduración postnatal.

El aumento observado en el contenido de proteínas de la fracción MP, expresado por unidad de peso de tejido fresco, entre los 5 y 30 días de edad (ver Tabla IV), sugiere un aumento del contenido proteico por mitocondria ó del número de mitocondrias por gramo de cerebro. La información existente en relación con el cambio en el número de mitocondrias es contradictoria: mientras que Gregson y Williams (1969) sostienen que el cerebro de la rata neonata y adul-



ta contienen igual número de mitocondrias por unidad de peso, los estudios recientes de Pysh (1970) sugieren un aumento del número de mitocondrias durante el período de la maduración cerebral. Tanto Gregson y Williams (1969) como Pysh (1970) han observado que el tamaño de las mitocondrias no varía con la edad, si bien este último autor ha demostrado que lo que sí aumenta durante la maduración es el número de crestas por unidad de volumen mitocondrial. Dado que Neidle y col. (1969) han demostrado que en el cerebro existen poblaciones mitocondriales con distinta densidad y diferente composición enzimática, y teniendo en cuenta que en el aislamiento de la fracción MP utilizada en este trabajo se recupera sólo una parte de la población mitocondrial, la posibilidad de que nuestros resultados reflejen un aumento del número de mitocondrias más pesadas no debe ser descartada.

Los resultados obtenidos en los estudios metabólicos indican que con los dos sustratos utilizados la capacidad oxidativa de las MP, expresada por unidad de proteína mitocondrial, aumenta 2-3 veces entre los 5 y 30 días de edad (ver Figuras 8 y 9). Estos resultados, que concuerdan con las observaciones de Milstein y col. (1968), pueden ser interpretados como el reflejo de un aumento en la actividad de los sistemas enzimáticos involucrados en este proceso. Dahl y Samson (1959) han postulado que el aumento del metabolismo oxidativo que ocurre en el cerebro durante la maduración es la consecuencia del aumento del número de mitocondrias por célula y no de un incremento en la capacidad oxidativa por mitocondria. Tal hipótesis presenta una marcada discrepancia con nuestras observaciones; sin embargo, ésta puede ser fácilmente explicada teniendo en cuenta que los mencionados autores han utilizado una preparación de mitocondrias crudas en sus estudios. Ha sido demostrado que la preparación de mitocondrias crudas contiene además de mitocondrias, terminales

sinápticos y fragmentos de mielina, y en nuestro laboratorio Piras y col. (1970) han observado que el contenido proteico de estos orgánoides aumenta en forma significativa durante la maduración. Por lo tanto, la presencia de proteína no mitocondrial en la preparación utilizada por Samson y Dahl (1959) sería la causa por la cual estos autores no han observado diferencias en la capacidad oxidativa con la edad del animal.

Resulta de interés señalar que mientras la capacidad oxidativa de las mitocondrias aumentaba con la edad, los valores de la relación P/O y los C.R. fueron satisfactorios desde los primeros estadios del desarrollo postnatal y no se modificaron durante todo el período estudiado (ver Tablas VI y VII). Dahl y Samson (1959) sostienen que la relación P/O disminuye a medida que el cerebro madura, pero los resultados obtenidos por estos autores son la consecuencia de haber utilizado una preparación de mitocondrias crudas; por lo tanto, la disminución de la relación P/O puede ser atribuida a un aumento progresivo de la contaminación de su preparación mitocondrial con inhibidores y desacoplantes. Ha sido demostrado que en la rata la mielinización comienza a los 12 días de vida postnatal aproximadamente y es intensa hasta los 40 días de edad (Suzuki y col., 1967; Cuzner y Davison, 1968; Piras y col., 1970; Pysh, 1970), esto probablemente produzca un aumento en la concentración de inhibidores y desacoplantes en la fracción de mitocondrias crudas a medida que el cerebro madura.

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos en relación con la ausencia de cambios en los valores de C.R., que fueron satisfactorios desde los primeros estadios del desarrollo, concuerdan con los obtenidos por Milstein y col. (1968) cuando utilizaron succinato como sustrato oxidable; estos autores no han utilizado piruvato+L-

malato como sustrato, pero con L-glutamato ó  $\alpha$ -cetoglutarato han observado que tanto los valores de la relación ADP/O como los de C.R. aumentan durante la maduración. Si bien la diferencia entre nuestros resultados y los obtenidos por Milstein y col. (1968) puede ser atribuida a los distintos sustratos utilizados, la discrepancia podría deberse a que los mencionados autores no agregan albúmina al medio de incubación, como ha sido hecho en todos nuestros experimentos, ya que hemos observado que éste es un requisito indispensable para obtener una preparación fuertemente acoplada.

Según nuestros resultados el consumo de oxígeno en los estados 3 y 4 aumenta paralelamente permaneciendo constante el C.R. y la formación de ATP aumenta paralelamente el consumo de oxígeno en el estado 3 permaneciendo constante la relación P/O. Esto sugiere que tanto las enzimas involucradas en el transporte de electrones como en la fosforilación acoplada a éste sufren cambios paralelos y que ambos procesos se encuentran igualmente acoplados durante todo el período de maduración estudiado.

El aumento de la capacidad respiratoria de las mitocondrias sería la causa del incremento observado durante la maduración en el metabolismo oxidativo de la glucosa (Ghittoni, 1967) y también de la menor resistencia a la anoxia que ocurre a medida que el cerebro madura (Jilek, 1964). Por otra parte, vimos que el aumento de la capacidad oxidativa durante el desarrollo iba acompañado por una mayor capacidad de sintetizar ATP; esto debe desempeñar un papel importante en los cambios que ocurren durante este período en la actividad eléctrica cerebral, que alcanza las características del animal adulto a los 20 días de edad aproximadamente (Crain, 1952; Bradley y col., 1960).

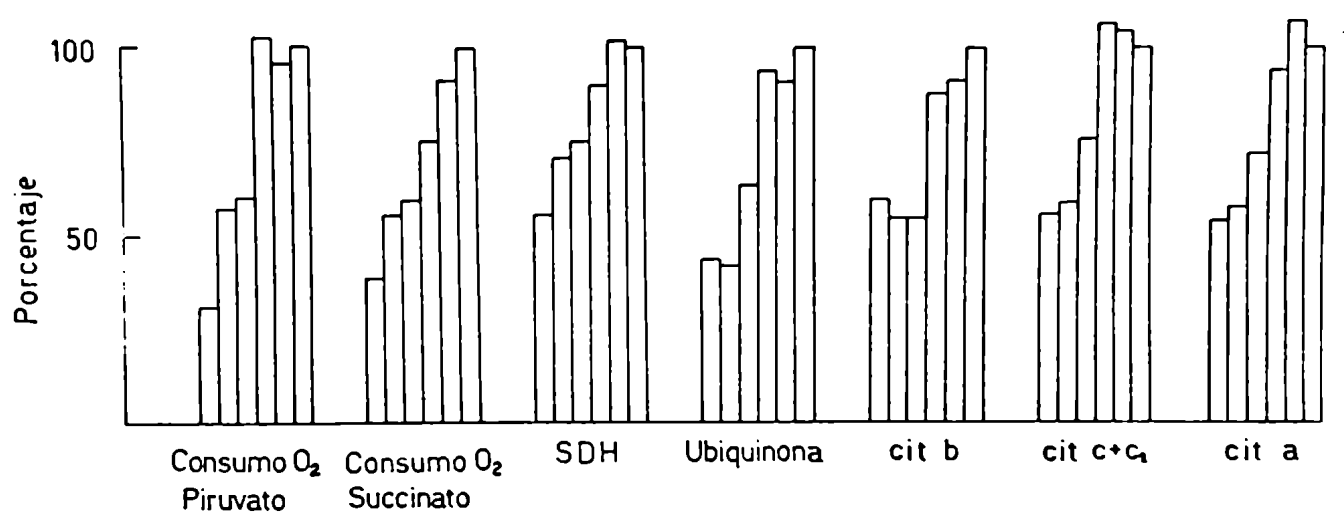
Nuestros resultados muestran que la actividad de SDH y los niveles de los constituyentes de la cadena respiratoria, ubiquinona y citocromos a, b y c+c<sub>1</sub>, aumentan en forma significativa durante el período de maduración postnatal; hemos observado que, en general, estos parámetros, expresados por unidad de proteína mitocondrial, aumentan aproximadamente 2 veces entre los 5 y 30 días de edad. Piras y col. (1970) observaron un aumento similar en la actividad específica de SDH entre los 5 y 30 días de edad. Gregson y Williams (1969) demostraron que la actividad de SDH y los niveles de citocromos por unidad de proteína mitocondrial son significativamente más altos en mitocondrias de cerebro de rata adulta que en las de la rata neonata. Los niveles de citocromos obtenidos por nosotros en ratas de 30 días de edad son similares a los encontrados por Sacktor y Packer (1962) y por Williams (1968) en mitocondrias de cerebro de ratas adultas, mientras que nuestros valores de ubiquinona son semejantes a los obtenidos por Kadenbach (1966) en ratas adultas. Por lo tanto, esto indicaría que los cambios en las propiedades y la composición de las mitocondrias cerebrales durante la maduración postnatal ocurren muy rápidamente, de forma tal que a los 30 días de edad ya presentan las características del animal adulto.

El aumento observado en la actividad de SDH y en la concentración de los componentes de la cadena respiratoria estudiados, por mg de proteína mitocondrial, nos permiten postular un aumento de la superficie de la membrana interna de la mitocondria durante el período de maduración postnatal. Las conclusiones de diversos trabajos nos permiten suponer que tal correlación es correcta. En sus estudios sobre el desarrollo de músculo de langosta, Brosemer y col. (1963) han observado la existencia de un estrecho paralelismo entre el aumento de la actividad de enzimas localizadas en la mem-

brana interna y el aumento de la densidad de esta membrana. Comparando mitocondrias de hígado y corazón también se encontró un paralelismo entre el contenido de citocromos y la densidad de las crestas (Klingenberg, 1968). Los recientes estudios histológicos de Pysh (1970) han demostrado que si bien el tamaño de la mitocondria no se modifica durante la maduración cerebral, lo que sí ocurre es un aumento significativo del número de crestas y de la densidad de la matriz. Estas observaciones apoyan nuestro postulado de un aumento de la superficie de la membrana interna de la mitocondria durante la maduración como consecuencia de que sus constituyentes se van depositando progresivamente sobre la misma; ya que esto se reflejará en un aumento de la densidad y/o del número de invaginaciones de esta membrana.

En los histogramas que se muestran en la Figura 15 se presentan los porcentajes alcanzados en las diferentes edades por los distintos parámetros estudiados, asignando un valor de 100 % a los datos obtenidos en la preparación de MP de ratas de 30 días de edad. El análisis de los histogramas demuestra que si bien los aumentos más significativos de todos los constituyentes estudiados, SDH, ubiquinona y citocromos, ocurren entre los 5 y 20 días los diferentes parámetros no aumentan paralelamente durante la maduración. Se puede observar que el citocromo b aumenta a una velocidad diferente a la de los citocromos c+c<sub>1</sub> y a (ver también Tabla VIII), lo que sugiere que los citocromos no se depositan en la membrana mitocondrial como unidad; algo similar ha sido observado por Herold y Borei (1963) durante el desarrollo de músculo de abeja. Dado que entre 10 y 15 días no se produce ningún aumento en el nivel de citocromo b, ésta podría ser la causa de la ausencia de cambios en el consumo de oxígeno con ambos sustratos, entre estas dos edades.

FIGURA 15

Cambios en la cadena respiratoria durante la maduración

Los resultados se expresaron como porcentaje alcanzado en las distintas edades, tomando como 100 % el valor a 30 días de edad. En cada histograma las barras se han ordenado de la siguiente manera: 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días de edad.

El aumento del consumo de oxígeno con piruvato+L-malato alcanza el valor máximo a los 20 días, en cambio con succinato sigue aumentando hasta los 30 días; esto sugiere que también deben de existir diferencias en la velocidad de síntesis de las diversas enzimas involucradas en el ciclo del ácido cítrico, en la formación de acetil coenzima A ó en la porción de la cadena de transporte de electrones anterior a ubiquinona.

Ha sido demostrado que los fosfolípidos desempeñan un papel importante en la integración de los componentes de la membrana mitocondrial y que son esenciales para la actividad respiratoria (Fleischer y col., 1962). Abdel-Latif y Abood (1965) observaron que en el cerebro de rata la síntesis de fosfolípidos y fosfoproteínas mitocondriales es muy activa entre los 12 y 15 días de vida postnatal; por otro lado, Cuzner y Davison (1968) demostraron que se produce un aumento significativo en el contenido de fosfolípidos de las mitocondrias cerebrales entre los 5 y 20 días de edad. Por lo tanto, es lógico suponer que durante la maduración, la integración de los componentes enzimáticos a la membrana mitocondrial va acompañada de la de los fosfolípidos.

Siekevitz y col. (1967) han postulado que las membranas biológicas se forman por etapas, durante las cuales se van depositando los diferentes constituyentes en forma escalonada sobre una estructura basal. Diversos autores han sugerido que las membranas mitocondriales se sintetizan por un mecanismo semejante (Henson y col., 1968; Chen y Charalampous, 1969; Haddock y col., 1969; Lenaz y Castelli, 1969). Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten postular que la formación de la membrana interna de las mitocondrias cerebrales también se realiza en diversas etapas, lo

que se reflejaría en cambios en su composición durante la maduración.

En base a lo demostrado por diversos investigadores, la biogénesis de las mitocondrias parece ser la resultante de un complejo proceso. Primero se formaría la membrana externa y luego comenzaría la síntesis de la membrana interna (Beattie, 1969). Esta última se formaría en diversas etapas: primero se sintetizaría la proteína estructural, lo que sería realizado por los ribosomas de la mitocondria (Beattie y col., 1967; Beattie, 1968) y luego se irían agregando las enzimas constituyentes de esta membrana y de la matriz, que serían sintetizadas por el retículo endoplásmico de la célula (Kadenbach, 1967, 1968; Beattie, 1968; Hanson y col., 1968).

En las mitocondrias de cerebro de rata el proceso de diferenciación finalizaría a los 20 días de vida postnatal, alcanzándose a esta edad la composición de los organoides del animal adulto. Por lo tanto, es posible concluir que la funcionalidad de las mitocondrias cerebrales cambia durante la maduración como consecuencia de los cambios que ocurren en su composición. Dado que nuestra preparación mitocondrial contiene mitocondrias que provienen tanto de células neuronales como gliales, la posibilidad de que los cambios observados se produzcan en uno o en ambos tipos de mitocondrias no puede ser descartada.



V. EFEECTO DE LA TIROIDECTOMIA NEONATAL SOBRE LAS PROPIEDADES  
DE LAS MITOCONDRIAS DE CEREBRO DE RATA

Se estudió la fosforilación oxidativa en preparaciones de mitocondrias purificadas, aisladas de cerebro de ratas normales y radio-tiroidectomizadas en el momento del nacimiento, ambas de 30 días de edad. Esta edad fué seleccionada basándonos en las observaciones anteriormente comentadas, en las que se demostró que a los 30 días las características metabólicas de las mitocondrias son similares a las del animal adulto; por lo tanto, cualquier alteración producida por esta condición experimental debería ser claramente observable a esta edad.

En la Tabla IX se pueden observar los resultados obtenidos cuando se utilizó succinato como sustrato oxidable. Tanto el consumo de oxígeno como el de fosfato inorgánico fueron esencialmente los mismos en las preparaciones de animales controles e hipotiroideos; tampoco se observaron variaciones en los valores de P/O, C.R., ni en la actividad específica de SDH.

Los resultados presentados en la Tabla X muestran que cuando se utilizó piruvato+L-malato como sustrato oxidable el consumo de oxígeno con la preparación obtenida de ratas cretinas es menor (19 %) que el obtenido en los controles normales y lo mismo fué observado en relación con el consumo de fosfato inorgánico, el que presentó un valor menor (16 %) en las preparaciones de ratas hipotiroideas con respecto a las normales; en ambos casos las diferencias fueron estadísticamente significativas, analizadas por medio del Test "t" de Student. Sin embargo, como en el caso anterior, ni la relación P/O ni los valores de C.R. fueron afectados por la carencia de fun-

TABLA IX

Fosforilación oxidativa y actividad de SDH en la fracción MP de ratas normales e hipotiroideas utilizando succinato como sustrato

	Normal	Hipotiroidea
Consumo de oxígeno (estado 3)	9.3 $\pm$ 0.9	8.6 $\pm$ 0.7
Consumo de P <sub>i</sub>	15.3 $\pm$ 1.2	13.6 $\pm$ 0.8
P/O	1.66 $\pm$ 0.06	1.60 $\pm$ 0.04
C.R.	1.48 $\pm$ 0.19	1.51 $\pm$ 0.11
SDH (A.E.)	0.88 $\pm$ 0.07	0.80 $\pm$ 0.06

Los experimentos se realizaron utilizando la fracción MP aislada de cerebro de ratas normales e hipotiroideas de 30 días de edad. La composición del medio de incubación fué la indicada en Material y Métodos, utilizando succinato como sustrato oxidable y una concentración de proteína mitocondrial de 0.4 mg/ml. El consumo de oxígeno se expresó en microátomos/hora y el consumo de P<sub>i</sub> en micromoles/hora, ambos por mg de proteína mitocondrial. Determinación de la actividad específica SDH según se indicó en Material y Métodos.

Cada resultado es la media y su correspondiente E.S. de 5 experimentos individuales para cada grupo. El análisis estadístico realizado por el test "t" de Student indicó que las diferencias no eran significativas en ninguno de los parámetros estudiados.

TABLA X

Fosforilación oxidativa en la fracción MP de ratas normales e hipotiroideas utilizando piruvato+L-malato como sustrato

	Normal	Hipotiroidea	p
Consumo de oxígeno (estado 3)	10.8 $\pm$ 0.5	8.8 $\pm$ 0.5	< 0.02
Consumo de P <sub>1</sub>	30.1 $\pm$ 0.9	25.2 $\pm$ 1.3	< 0.01
P/O	2.81 $\pm$ 0.08	2.90 $\pm$ 0.08	< n.s.
C.R.	4.8 $\pm$ 0.5	4.4 $\pm$ 0.7	n.s.

Los experimentos se realizaron con la fracción MP aislada de ratas normales e hipotiroideas de 30 días de edad. La composición del medio de incubación es la indicada en Material y Métodos, utilizando piruvato+L-malato como sustrato y una concentración de proteína mitocondrial de 0.4 mg/ml. El consumo de oxígeno y de P<sub>1</sub> se expresó según se indica en la Tabla IX.

Los resultados son la media y su correspondiente E.S. de 5 experimentos para cada grupo, los que se compararon estadísticamente por medio del test "t" de Student.

ción tiroidea desde el nacimiento.

### Discusión

Como ya ha sido señalado anteriormente, la hormona tiroidea ejerce marcados efectos sobre la maduración del sistema nervioso central, que se ven reflejados en la disminución de la actividad de enzimas que son constituyentes de las membranas mitocondriales, como consecuencia del hipotiroidismo neonatal (Hamburgh y Flexner, 1957; García Argiz y col., 1967; Pasquini y col., 1967). Teniendo en cuenta, por otra parte, que la hormona tiroidea regula el metabolismo oxidativo en el animal adulto (Tata y col., 1963; Tata, 1966b), nos interesó estudiar si la carencia de función tiroidea desde el nacimiento podía producir alteraciones en las propiedades de las mitocondrias cerebrales. Para realizar este estudio se utilizó la fracción mitocondrial MP, que es una preparación mitocondrial fuertemente acoplada y con mínimo grado de contaminación.

Los resultados obtenidos cuando se utilizó succinato como sustrato oxidable, en los que no se observaron cambios en el consumo de oxígeno, así como también el hecho de que la actividad específica de SDH no presente alteraciones por efecto de la tiroidectomía neonatal, sugieren que esta condición experimental no afecta los sistemas enzimáticos que intervienen en el transporte de electrones desde el succinato hasta el oxígeno. Por el contrario, la oxidación del piruvato+L-malato es significativamente menor en las preparaciones mitocondriales provenientes de ratas hipotiroideas que en las normales, lo que sugiere una posible alteración en alguna enzima ó grupos de enzimas que intervienen en la oxidación del piruvato+L-malato. Según los resultados obtenidos con succinato no habría cambios en la porción de la cadena respiratoria comprendida

entre ubiquinona y citocromo  $a_3$ ; por lo tanto, la alteración podría estar a nivel de la formación de acetil coenzima A, en alguna enzima del ciclo del ácido cítrico ó en la porción de la cadena de transporte de electrones anterior a la ubiquinona.

Es importante hacer notar que con ninguno de los dos sustratos utilizados la carencia de función tiroidea desde el nacimiento produce alteraciones en el acople entre la fosforilación y la oxidación, ya que se obtienen los mismos valores de P/O y C.R. tanto en los animales normales como en los hipotiroideos. Tata y col. (1963), que estudiaron los efectos de la tiroidectomía sobre las mitocondrias de hígado y músculo de rata, observaron que ésta producía una disminución en el consumo de oxígeno, cuya intensidad variaba según el sustrato utilizado, pero que en ningún caso esta condición producía alteraciones ni en la relación P/O ni en los valores de C.R. Por lo tanto, es posible postular que la hormona tiroidea no influye sobre el acoplamiento entre el transporte de electrones y la fosforilación, contrariamente a lo que fué sostenido por diversos autores (Martius y Hess, 1951; Hoch, 1962; Wolff y Wolff, 1964). Tata (1966a, b) ha sugerido que los efectos de la hormona tiroidea residen principalmente en la inducción de la síntesis de las enzimas oxidativas, estimulando en primer lugar el proceso de transcripción, ó sea, la síntesis de ácidos ribonucleicos.

En nuestro laboratorio ha sido observada una disminución en la actividad de las enzimas mitocondriales SDH, aspartato aminotransferasa y GABA transaminasa, por efecto del hipotiroidismo neonatal, cuando se determinan en homogenizado de tejido cerebral (García Argis y col., 1967; Pasquini y col., 1967). Nuestros resultados nos permiten sugerir que esto no refleja un cambio cualitativo en las mitocondrias sino que indicaría una disminución del número de orga-

noides en los que estas enzimas están localizadas. Esta hipótesis ha sido apoyada por los resultados obtenidos en un trabajo realizado en colaboración con las Dras. Irene Szijan y Marta Piras (Szijan y col., 1970), y del cual se incluyen diversos resultados en la Tabla XI; puede observarse que la concentración de proteínas es significativamente menor en las fracciones subcelulares formadas por fragmentos de mielina, terminales sinápticos y mitocondrias libres de cerebro de ratas hipotiroideas que en los controles normales. Por otra parte, al comparar los cambios en la actividad de SDH y AAT, puede observarse que cuando las actividades de estas enzimas son expresadas por unidad de tejido fresco, se encuentran significativamente disminuidas, por efecto de la tiroidectomía neonatal, en las fracciones que contienen cantidades considerables de mitocondrias, como son las constituidas por terminales sinápticos (fracciones C y D) y por mitocondrias libres (fracción E), pero que tal diferencia desaparece cuando los resultados se expresan como actividad específica.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, unidos a los que acabamos de comentar, nos llevan a postular que las alteraciones producidas por la tiroidectomía neonatal en la rata son la consecuencia de un defecto general en la formación de diversos constituyentes de membranas, sin que se produzcan cambios aparentes en la composición de las mismas. La base de esta alteración podría ser un defecto en la síntesis de proteínas, que sería una etapa determinante en la formación de las diferentes membranas; la disminución de la síntesis de proteínas cerebrales como consecuencia de la tiroidectomía neonatal ha sido observada por Geel y col. (1967) y por Bálaaz y Gaitonde (1968). Las experiencias de Walravens y Chase (1969) han demostrado una disminuída formación de mielina en los animales hipotiroideos como consecuencia de una disminución en la actividad de enzimas involucradas en la síntesis de cerebrósidos

TABLA XI

Efecto de la tiroidectomía neonatal sobre el contenido proteico y la actividad enzimática de fracciones subcelulares de cerebro de rata

	Proteínas mg/g tejido			
	A	C	D	E
N	4.2 ± 0.1	11.6 ± 0.4	7.9 ± 0.5	9.1 ± 0.4
H	2.6 ± 0.1	8.0 ± 0.2	5.4 ± 0.4	6.5 ± 0.3
P	< 0.001	< 0.001	< 0.005	< 0.001

	Actividad de SDH					
	U/g tejido			U/mg proteína		
	C	D	E	C	D	E
N	2.89 ± 0.20	4.51 ± 0.37	9.01 ± 0.48	0.25 ± 0.02	0.57 ± 0.04	0.99 ± 0.07
H	1.89 ± 0.14	3.13 ± 0.23	6.32 ± 0.37	0.24 ± 0.02	0.58 ± 0.05	0.97 ± 0.08
P	< 0.005	< 0.01	< 0.005	-	-	-

	Actividad de AAT					
	U/g tejido			U/mg proteína		
	C	D	E	C	D	E
N	20.8 ± 1.7	19.5 ± 1.5	15.2 ± 0.7	1.79 ± 0.18	2.47 ± 0.22	1.67 ± 0.17
H	15.7 ± 0.8	13.7 ± 0.8	11.0 ± 0.4	1.96 ± 0.24	2.53 ± 0.25	1.69 ± 0.14
P	< 0.025	< 0.01	< 0.001	-	-	-

Resultados obtenidos por Szijan y col. (1970) en ratas normales e hipotiroideas de 30 días de edad. Aislamiento de las fracciones según se ha indicado en el mencionado trabajo. N: ratas normales de 30 días de edad. H: ratas tiroidectomizadas al nacimiento, de 30 días de edad. A: fragmentos de mielina. C: terminales sinápticos colinérgicos. D: terminales sinápticos no colinérgicos. E: mitocondrias libres.

y sulfátidos.

Nuestra hipótesis de que la tiroidectomía neonatal conduce a una disminución en la formación de membranas sin que se produzcan defectos cualitativos también está apoyada por las recientes observaciones de Rálasz y col. (1969), que demuestran que como consecuencia de la tiroidectomía neonatal se produce una disminución significativa en la formación de mielina sin que se observen variaciones cualitativas en su composición, ya que las relaciones molares de cerebrósidos: colesterol: fosfolípidos son las mismas tanto en mielina purificada obtenida de cerebro de ratas normales como de hipotiroideas.

En resumen, todas estas observaciones sugieren que el hipotiroidismo neonatal produce una disminución en la síntesis de proteínas cerebrales que se reflejaría en deficiencias cuantitativas en la formación de membranas. En el caso de las mitocondrias, conduciría a una disminución del número de estos orgánoides sin producir alteraciones fundamentales en su composición.



## VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES

1.- Las mitocondrias de cerebro de rata fueron obtenidas por el método de Løvtrup y Zelander (1962).

Esta preparación mitocondrial presentó baja contaminación con terminales sinápticos y no se observaron fragmentos de mielina. Las mitocondrias se encontraban en estado satisfactorio, tanto desde el punto de vista morfológico como metabólico. Presentaban la conformación condensada y los valores de P/O y C.R. obtenidos con diversos sustratos oxidables fueron satisfactorios.

Se demostró que la fracción TSM, que contiene terminales sinápticos y mielina, además de mitocondrias, presenta un marcado efecto inhibitor y desacoplante, lo que confirmaría que la fracción de mitocondrias crudas no puede ser utilizada para realizar estudios metabólicos. Por lo tanto, la fracción MP fué la que se utilizó para estudiar las propiedades de las mitocondrias durante la maduración cerebral y el efecto de la tiroidectomía neonatal.

2.- Se estudiaron diversas propiedades de las mitocondrias de cerebro de rata durante el período de maduración postnatal.

El contenido proteico de las MP, en base al peso de tejido fresco original, aumentó aproximadamente 4 veces entre los 5 y 30 días de edad.

La actividad de SDH, expresada en base al peso de tejido fresco original, presentó un aumento de aproximadamente 5 veces entre los 5 y 30 días; mientras que la actividad específica de la misma se duplicó durante este período.

Se estudió la fosforilación oxidativa utilizando piruvato+L-malato y succinato como sustratos oxidables. Con piruvato+L-malato se observó un aumento de 3 veces, tanto en el consumo de oxígeno como en el de fosfato inorgánico, entre los 5 y 30

días de edad; con succinato el aumento observado en ambos parámetros fué de 2 veces. Tanto los valores de P/O como los de C.R. obtenidos con ambos sustratos fueron satisfactorios desde los 5 días y permanecieron constantes durante todo el período estudiado. Esto sugiere que tanto los sistemas involucrados en el transporte de electrones como en la fosforilación acoplada a éste aumentan paralelamente y se mantienen en un óptimo grado de acoplamiento durante el período de maduración postnatal. La concentración de ubiquinona/mg de proteína mitocondrial aumentó aproximadamente 2 veces entre los 5 y 30 días de edad; produciéndose el aumento más importante entre el 10mo y 20mo día.

Los niveles de los citocromos/mg de proteína mitocondrial aumentaron aproximadamente 2 veces entre los 5 y 30 días de vida postnatal. Los citocromos c+o<sub>1</sub> y a presentaron los aumentos más importantes entre los 10 y 20 días; mientras que el citocromo b aumentó significativamente entre los 15 y 20 días de edad.

El aumento observado en la actividad específica de SDH así como también el incremento de la concentración de ubiquinona y citocromos/mg de proteína mitocondrial permiten postular un aumento de la superficie de la membrana interna de la mitocondria de cerebro de rata durante el período de maduración postnatal.

Los resultados obtenidos indican que los diferentes parámetros estudiados no aumentan paralelamente, lo que sugiere que la composición de la membrana interna de la mitocondria cerebral varía durante la maduración.

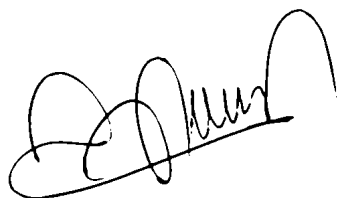
3.- Se estudió la fosforilación oxidativa en mitocondrias de cerebro de ratas normales y radiotiroidectomizadas en el momento

del nacimiento, a los 30 días de edad.

Cuando se utilizó piruvato+L-malato como sustrato se observó una disminución del 17 % aproximadamente, tanto en el consumo de oxígeno como en el de fosfato inorgánico, en las preparaciones mitocondriales provenientes de las ratas oretinas.

Cuando se utilizó succinato como sustrato oxidable se obtuvieron los mismos valores de consumo de oxígeno y fosforilación en las ratas normales y en las hipotiroideas. Con los dos sustratos utilizados no se observaron alteraciones ni en el P/O ni en el C.R. La actividad específica de SDH no fué modificada por efecto de la tiroidectomía neonatal.

Estos resultados, asociados a otros que se mencionan en la discusión correspondiente, sugieren que la falta de hormona tiroidea desde el nacimiento produce una disminución en la síntesis de proteínas, lo que se reflejaría en una disminución en el número de mitocondrias, sin que se produzcan alteraciones fundamentales en la composición de estos organelos.



BIBLIOGRAFIA

ABDEL-LATIF, A.A. y ABOOD, L.G.

Incorporation of ortho [<sup>32</sup>P] phosphate into the subcellular fractions of developing rat brain. *J. Neurochem.* 12 (1965) 157

ABOOD, L.G., GERAD, R.W., BANKS, J. y TSCHIRGI, R.D.

Substrate and enzyme distribution in cells and cell fractions of the nervous system. *Amer. J. Physiol.* 168 (1952) 728

ADAMS, D.H.

The relationship between cellular nucleic acids in the developing rat cerebral cortex. *Biochem. J.* 98 (1966) 636

AUGUSTINSSON, K.B.

Assay methods for cholinesterases. En "Methods of biochemical analysis". Vol. 5, (1957), pág.11. Editado por Glick, D. Interscience Publishers, Inc., New York

BALAZS, R., BIESOLD, D. y MAGYAR, K.

Some properties of rat brain mitochondrial preparations: respiratory control. *J. Neurochem.* 10 (1963) 685

BALAZS, R., BROOKSBANK, B.W.L., DAVISON, A.N., EAYRS, J.T. y WILSON, D.A.

The effect of neonatal thyroidectomy on myelination in the rat brain. *Brain Research* 15 (1969) 219

BALAZS, R. y GAITONDE, M.K.

Factors affecting protein metabolism in the brain. *Biochem. J.* 106 (1968) 1P

BALAZS, R., KOVACS, S., TEICHGRAEBER, P., COCKS, W.A. y EAYRS, J.T.

Biochemical effects of thyroid deficiency on the developing brain. *J. Neurochem.* 15 (1968) 1335

BARNETT, R.J.

Some aspects of the physiology of the experimental cretin-like animals. Thesis, Yale University, School of Medicine (1948)

BEATTIE, D.S.

Studies on the biogenesis of mitochondrial protein components in rat liver slices. *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 4027

BEATTIE, D.S.

The biosynthesis of the protein and lipid components of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 35 (1969) 67

BEATTIE, D.S., BASFORD, R.E. y KORITZ, S.B.

The inner membrane as the site of the "in vitro" incorporation of L- [<sup>14</sup>C] leucine into mitochondrial protein. *Biochemistry* 6 (1967) 3099

BONAVITA, V.

Molecular evolution of lactate dehydrogenase in the developing nervous tissue. En "Growth and maturation of the brain". Vol. 4, (1964), pág. 254. Editado por Purpura, D.P. y Schadé, J.P. *Progress in Brain Research*. Elsevier, Amsterdam

BOYER, P.D.

Oxidative phosphorylation. En "Biological oxidations". (1963), pág.193. Editado por Singer, T.P. *Interscience Publishers, Inc.*, New York

BRADLEY, P.B., EAYRS, J.T. y SCHMALBACK, K.

The electroencephalogram of normal and hypothyroid rats. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 12 (1950) 467

BRIZZEE, K.R., VOGT, J. y KHARETCHKO, X.

Postnatal changes in glia/neuron index with a comparison of methods of cell enumeration in the white rat. En "Growth and maturation of the brain". Vol. 4, (1964), pág. 136. Editado por Purpura D.P. y Schadé, J.P. *Progress in Brain Research*. Elsevier, Amsterdam

BRODY, T.M. y BAIN, J.A.

A mitochondrial preparation from mammalian brain. *J. Biol. Chem.* 195 (1952) 685

BROSEMER, R.W., VOGELL, W. y BUCHER, T.H.

Morphologische und enzymatische Muster bei der Entwicklung indirekter Flugmuskeln von *Locusta migratoria*. *Biochem. Z.* 338 (1963) 854

CRAIN, S.M.

Development of electrical activity in the cerebral cortex of the albino rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 81 (1952) 49

CRANE, F.L.

Distribution of ubiquinones. En "Biochemistry of Quinones". (1965), pág. 183. Editado por Morton, R.A. *Academic Press*, New York

CRANE, F.L., HANIFI, Y., LESTER, R.L. y WIDMER, C.  
Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 25 (1957) 220

CUZNER, M.L. y DAVISON, A.N.  
The lipid composition of rat brain myelin and subcellular fractions during development. *Biochem. J.* 106 (1968) 29

CHANCE, B.  
Spectrophotometry of intracellular respiratory pigments. *Science* 120 (1954) 767

CHANCE, B.  
Techniques for the assay of the respiratory enzymes. En "Methods in Enzymology". Vol. IV, (1957), pág. 273. Editado por Estabrook, R.W. y Pullman, M.E. Academic Press, New York

CHANCE, B.  
Quantitative aspects of the control of oxygen utilization. En "Ciba Foundation Symposium Regulation of cell metabolism". (1959), pág. 91. Editado por Wostenholme, G.E.W. y O'Connor, C.M. Churchill, London

CHANCE, B.  
Steady state and kinetics responses of ubiquinone in phosphorylating mitochondria. En "Biochemistry of Quinones". (1965), pág. 459. Editado por Morton, R.A., Academic Press, New York

CHANCE, B. y WILLIAMS, G.R.  
Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. II. Difference spectra. *J. Biol. Chem.* 217 (1955) 395

CHEFURKA, W.  
Oxidative phosphorylation in "in vitro" aged mitochondria. I. Factors controlling the loss of the dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase activity and respiratory control in mouse liver mitochondria. *Biochemistry* 5 (1966) 3887

CHEFURKA, W. y DUMAS, T.  
Oxidative phosphorylation in "in vitro" aged mitochondria. II. Dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase activity and fatty acid content of mouse liver mitochondria. *Biochemistry* 5 (1966) 3904

CHEN, W.L. y CHARALAMPOUS, F.C.  
Mechanism of induction of cytochrome oxidase in yeast. I. Kinetics of induction and evidence for accumulation of cytoplasmic and mitochon-

drial precursors. J. Biol. Chem. 244 (1969) 2767

DAHL, D.R. y SAMSON, F.E., Jr.

Metabolism of rat brain mitochondria during postnatal development. Amer. J. Physiol. 196 (1959) 470

DALAL, K.B. y EINSTEIN, E.R.

Biochemical maturation of the central nervous system. I. Lipid changes. Brain Research 16 (1969) 441

DE ROBERTIS, E., PELLEGRINO DE IRALDI, A., RODRIGUEZ G. y COLEZ, C.J.

On the isolation of nerve endings and synaptic vesicles. J. Biophys. Biochem. Cytol. 2 (1961) 229

DE ROBERTIS, E., PELLEGRINO DE IRALDI, A., RODRIGUEZ DE LORIS ARNAIZ, G. y SALGANICOFF, L.

Cholinergic and non-cholinergic nerve endings in rat brain. I. Isolation and subcellular distribution of acetylcholine and acetylcholinesterase. J. Neurochem. 2 (1962) 23

EAYRS, J.T.

The possible significance of neuropil for the mediation of cortical function. En "Regional Neurochemistry". (1961), pág. 423. Editado por Kety, S.S. y Elkes, J. Pergamon Press, Oxford

EAYRS, J.T.

Age as a factor determining the severity and reversibility of the effects of thyroid deprivation in the rat. J. Endocrin. 22 (1961b) 409

EAYRS, J.T.

Thyroid and central nervous development. Sci. Basis Med. Ann. Rev. (1966) 317

EAYRS, J.T. y GOODHEAD, G.

Postnatal development of the cerebral cortex of the rat. J. Anat. 93 (1959) 385

EINSTEIN, E.R., DALAL, K.B. y CSEJTEV, J.

Biochemical maturation of the central nervous system. II. Protein and proteolytic enzyme changes. Brain Research 18 (1970) 35

ESCOBAR DEL REY, F. y MORREALE DE ESCOBAR, G.

The effect of propylthiouracil, methylthiouracil and thiouracil on the peripheral metabolism of L-thyroxine in thyroidectomized, L-thy-

xine maintained rats. *Endocrinology* 69 (1961) 456

ETKIN, W.

Metamorphosis. En "Physiology of amphibia". (1964), pág. 427. Editado por Moore, J.A. Academic Press, New York

FISKE, C.H. y SUBBAROW, J.

The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66 (1925) 375

FLEISCHER, S., FRIERLEY, G., KLCUWEN, H. y SLAUTTERBACK, D.B.

Studies of the electron transfer system. XLVII. The role of phospholipids in electron transfer. *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 3264

FLEXNER, L.B.

Enzymatic and functional patterns of the developing mammalian brain. En "Biochemistry of the developing nervous system". (1955), pág. 281. Editado por Waelsch, H. Academic Press, New York

FOLCH, J., CASALS, J., POPE, A., MEATH, J.A., LE BARON, F.N. y LEES, M. Chemistry of myelin development. En "The Biology of myelin". (1959), pág. 122. Editado por Korey, S.R. Hoeber, P., New York

GAITONDE, M.K. y RICETER, D.

The metabolic activity of the protein of the brain. *Proc. Roy. Soc.* B-145 (1956) 83

GARCIA ARGIZ, C.A., PASQUINI, J.M., KAPLUN, B. y GOMEZ, C.J.

Hormonal regulation of brain development. II. Effect of neonatal thyroidectomy on succinate dehydrogenase and other enzymes in developing cerebral cortex and cerebellum of the rat. *Brain Research* 6 (1967) 635

GEEL, S.E. y TIMIRAS, P.S.

Influence of neonatal hypothyroidism and of thyroxine on the acetylcholinesterase and cholinesterase activities in the developing central nervous system of the rat. *Endocrinology* 80 (1967a) 1069

GEEL, S.E. y TIMIRAS, P.S.

The influence of neonatal hypothyroidism and of thyroxine on the ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid concentrations of rat cerebral cortex. *Brain Research* 4 (1967b) 135

GEEL, S.E., VALCANA, T. y TIMIRAS, P.S.

Effect of neonatal hypothyroidism and of thyroxine on L-(<sup>14</sup>C) leucine



incorporation in protein "in vivo" and the relationship to ionic levels in the developing brain of the rat. *Brain Research* 4 (1967) 143

GHITTONI, N.E.

Regulación hormonal del metabolismo de glucosa en corteza cerebral, durante su maduración postnatal. Tesis. Universidad de Buenos Aires. (1967)

GIBSON, Q.H.

Cytochromes. En "Biological oxidations". (1968), pág. 380. Editado por Singer, T.P. Interscience Publishers, New York

GOLDBERG, R.C. y CHAIKOFF, I.L.

A simplified procedure for thyroidectomy of the new born rat without concomitant parathyroidectomy. *Endocrinology* 45 (1949) 64

GOMEZ, C.J. y RAMIREZ DE GUGLIELMONE, A.E.

Influence of neonatal thyroidectomy on glucose-amino acids interrelations in developing rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* 14 (1967) 1119

GREEN, D.E. y BRIDGEMAN, G.P.

The role of coenzyme Q in electron transfer. En "Biochemistry of quinones". (1965), pág. 405. Editado por Morton, R.A. Academic Press, New York

GREEN, D.E. y MACLENNAN, D.H.

The mitochondrial system of enzymes. En "Metabolic pathways" I. (1967), pág. 47. Editado por Greenberg, D.M. Academic Press, New York

GREGSON, N.A. y WILLIAMS, P.L.

A comparative study of brain and liver mitochondria from new-born and adult rats. *J. Neurochem.* 16 (1969) 617

GUROFF, G., HOGANS, A.F. y UDENFRIEND, S.

Biosynthesis of ribonucleic acid in rat brain slices. *J. Neurochem.* 15 (1968) 489

HACKENBERG, C.R.

Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. II. Electron transport-linked ultrastructural transformations in mitochondria. *J. Cell Biol.* 37 (1968) 345

HADDOCK, J., JAKOVEIC, S., HSIA, D. y GETZ, G.S.

Mitochondrial development in liver of fetal and new-born rats. *Fed. Proc.* 28 (1969) 3342

HALBURGH, M. y FLENNER, L.B.

Biochemical and physiological differentiation during morphogenesis. XXI. Effect of hypothyroidism and hormone therapy on enzyme activities of the developing cerebral cortex of the rat. *J. Neurochem.* 1 (1957) 279

HELINSKY, D.R. y COOPER, C.

Studies on the action of bovine serum albumin on aged rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 3573

HEINSON, G.P., HIRLMAN, P., WEBER, C.M. y MAHLER, H.R.

Formation of yeast mitochondria. II. Effects of antibiotics on enzyme activity during derepression. *Biochemistry* 7 (1968) 4445

HEROLD, R.C. y BOREI, H.

Cytochrome changes during honey bee flight muscle development. *Dev. Biol.* 8 (1963) 67

HILWICH, W.H.

Biochemical and neurophysiological development of the brain in the neonatal period. *Int. Rev. Neurobiol.* 4 (1962) 117

HOCH, F.L.

Biochemical actions of thyroid hormones. *Physiol. Rev.* 42 (1962) 605

HORROCKS, L.A.

Composition of mouse brain myelin during development. *J. Neurochem.* 15 (1968) 483

JILEK, L., FISCHER, J., KRULICH, L. y TROJAN, S.

The reaction of the brain to stagnant hypoxia and anoxia during ontogeny. En "The Developing Brain". Progress in Brain Research. Vol. 9, (1964), pág. 113. Editado por Himwich, W.A. y Himwich, H.E. Elsevier, Amsterdam

JOBSIS, F.F.

A study of preparative procedures for brain mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 74 (1963) 60

JOHNSON, T.C.

The effects of maturation on "in vitro" RNA synthesis by mouse brain cells. *J. Neurochem.* 14 (1967) 1075

JOHNSON, T.C. y LUTTCES, M.W.

The effects of maturation on "in vitro" protein synthesis by mouse

brain cells. *J. Neurochem.* 13 (1966) 545

KADENBACH, B.

Effect of thyroid hormones on mitochondrial enzymes. En "Regulation of metabolic processes in mitochondria". (1966), pág. 508. Editado por Tager, J.M., Papa, S., Quagliariello, E. y Slater, E.C. Elsevier, Amsterdam

KADENBACH, B.

Synthesis of mitochondrial proteins: demonstration of a transfer of proteins from microsomes into mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 134 (1967) 430

KADENBACH, B.

Transfer of proteins from microsomes into mitochondria. Biosynthesis of cytochrome c. En "Biochemical aspects of the biogenesis of mitochondria". (1968), pág. 415. Editado por Slater, E.C., Tager, J.M., Papa, S. y Quagliariello, E. Adriatica Editrice, Bari

KLINGENBERG, M.

The respiratory chain. En "Biological oxidations". (1968), pág. 3. Editado por Singer, T.P. Interscience Publishers, New York

KLINGENBERG, M. y KROGER, A.

On the role of ubiquinone in the respiratory chain. En "Biochemistry of mitochondria". (1967), pág. 11. Editado por Slater, E.C. Kaniuga, Z. y Wojtczak, L. Academic Press, London

KORN, E.D.

Cell membranes: structure and synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 38 (1969) 263

KRAWIEC, L., GARCIA ARGIZ, C.A., GOMEZ, C.J. y PASQUINI, J.M.

Hormonal regulation of brain development. III. Effects of triiodothyronine and growth hormone on the biochemical changes in the cerebral cortex and cerebellum of neonatally thyroidectomized rats. *Brain Research* 15 (1969) 209

LAPETINA, E.G., SOTO, E.F. y DE ROBERTIS, E.

Gangliosides and acetylcholinesterase in isolated membranes of the rat brain cortex. *Biochim. Biophys. Acta* 135 (1967) 33

LARDY, H.A. y FERGUSON, S.M.

Oxidative phosphorylation in mitochondria. *Ann. Rev. of Biochem.* 38 (1969) 991

LEGRAND, J.

Maturation du cervelet et déficience thyroïdienne: données chronologiques. Arch. Anat. Micr. Morph. Exp. 52 (1963) 205

LEGRAND, J.

Influence du hypothyroïdisme sur la maturation du cortex cérébelleux. C.R. Acad. Sci. Paris 261 (1965) 544

LEHNINGER, A.L.

"The mitochondrion". Benjamin, W.A. New York, (1965)

LEHNINGER, A.L. y HELMERT, L.F.

An endogenous uncoupling and swelling agent in liver mitochondria and its enzymic formation. J. Biol. Chem. 234 (1959) 2459

LENAZ, G. y CASTELLI, A.

Studies on the morphogenesis of yeast mitochondria. Fed. Proc. 28 (1969) 813

LESTER, R.L. y CRANE, F.L.

The natural occurrence of coenzyme Q and related compounds. J. Biol. Chem. 234 (1959) 2169

LÓVTRUP, S. y SVENNERHOLM, L.

Chemical properties of brain mitochondria. Exptl. Cell Res. 29 (1963) 298

LÓVTRUP, S. y ZELANDER, T.

Isolation of brain mitochondria. Exptl. Cell Res. 27 (1962) 468

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J.

Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 (1951) 265

LUNT, G.G.

The composition and metabolism of unesterified fatty acids in brain. Thesis. University of Birmingham. (1967)

MARSHUS, C. y HESS, B.

The mode of action of thyroxine. Arch. Biochem. Biophys. 33 (1951) 486

MILSTEIN, J.M., WHITE, J.G. y SWAIMAN, K.F.

Oxidative phosphorylation in mitochondria of developing rat brain. J. Neurochem. 15 (1968) 411

MITCHELL, P.

Metabolic flow in the mitochondrial multiphase system: appraisal of the chemi-osmotic theory of oxidative phosphorylation. En "Regulation of metabolic processes in mitochondria". (1966), pág. 65.

Editado por Tager, J.M., Papa, S., Quagliariello y Slater, E.C. Elsevier Publishing Company, Amsterdam

MURTEY, M.R.V. y RAFFOORT, D.A.

Biochemistry of the developing rat brain. V. Cell-free incorporation of L-(1-<sup>14</sup>C) leucine into microsomal protein. Biochim. Biophys. Acta 95 (1965) 121

NEIDLE, A., VAN DEN BERG, C.J. y GRENBAULI, A.

The heterogeneity of rat brain mitochondria isolated on continuous sucrose gradients. J. Neurochem. 16 (1969) 225

OKUNUKI, K.

Cytochromes and cytochrome oxidase. En "Comprehensive Biochemistry".

Vol. 14, (1966), pág. 232. Editado por Florin, H. y Stotz, E.H.

Elsevier Publishing Company, Amsterdam

ORREGO, F. y LIFMANN, F.

Protein synthesis in brain slices. Effects of electrical stimulation and acidic amino acids. J. Biol. Chem. 242 (1967) 665

OZAWA, K., SETA, K., TAKEIDA, H., ANDO, K., HANDA, H. y ARAKI, C.

On the isolation of mitochondria with high respiratory control from rat brain. J. Biochem., (Tokio) 59 (1966) 501

OZAWA, K., SETA, K., ARAKI, H. y HANDA, H.

The effect of ischemia on mitochondrial metabolism. J. Biochem., (Tokio) 61 (1967a) 512

OZAWA, K., SETA, K., ARAKI, H. y HANDA, H.

Rapid liberation of potassium ion from brain mitochondria. J. Biochem., (Tokio) 62 (1967b) 584

PARSONS, D.F., WILLIAMS, G.R., THOMPSON, W., WILSON, D. y CHANCE, B.

Improvements in the procedure for purification of mitochondrial outer and inner membrane. Comparison of the outer membrane with smooth endoplasmic reticulum. En "Mitochondrial structure and compartmentation". (1967), pág. 29. Editado por Quagliariello, E.,

Papa, S., Slater, E.C. y Tager, J.M. Adriatica Editrice, Bari

- PASQUINI, J.M., KAPLUN, B., GARCIA ARGIZ, C.A. y GOMEZ, C.J.  
Hormonal regulation of brain development. I. The effect of neonatal thyroidectomy upon nucleic acids, proteins and two enzymes in developing cerebral cortex and cerebellum of the rat. *Brain Research* 6 (1967) 621
- PIRAS, M., SZIJAN, I. y GOMEZ, C.J.  
Enzymatic and ultrastructural changes in subcellular fractions from developing rat brain. *Acta Physiol. Latinoam.* (en prensa)
- PULLMAN, M.E. y SCHMIDT, G.  
Mitochondrial oxidations and energy coupling. *Ann. Rev. of Biochem.* 36 (1967) 539
- PUMPHREY, A.M. y REDFERN, E.R.  
A method for determining the concentration of ubiquinone in mitochondrial preparations. *Biochem. J.* 76 (1960) 61
- PURPURA, D.P., SEOFER, R.J., ROUSSELIN, E.M. y FORACK, C.R.  
Comparative ontogenesis of structure-function relations in cerebral and cerebellar cortex. En "Growth and maturation of the brain". *Progress in Brain Research*. Vol. 4, (1964), pág. 187. Editado por Purpura, D.P. y Schädé, J.P. Elsevier, Amsterdam
- PYSH, J.J.  
Mitochondrial changes in rat inferior colliculus during postnatal development: an electron microscopic study. *Brain Research* 18 (1970) 325
- RAMIREZ de GUGLIELMONE, A.E. y GOMEZ, C.J.  
Influence of neonatal hypothyroidism on aminoacids in developing brain. *J. Neurochem.* 13 (1966) 1017
- REDFERN, E.R.  
Isolation and determination of ubiquinone. En "Methods in Enzymology". Vol. X, (1967), pág. 381. Editado por Estabrook, R.W. y Pullman, M.E. Academic Press, New York
- REYNOLDS, E.  
The use of lead citrate as an electron dense stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17 (1963) 208
- RUBIOLO de MACCIONI, A.H.  
Cambios cuantitativos de las partículas subcelulares de cerebro de rata y de sus gangliósidos durante el desarrollo. Tesis. Universidad Nacional de Córdoba. (1967)
- SABATINI, D.D., HENSCH, K. y BARNETT, R.J.  
Cytochemistry and electronmicroscopy. *J. Cell Biol.* 17 (1963) 19

SACKTOR, B. y PACKER, L.

Reactions of the respiratory chain in brain mitochondrial preparations. J. Neurochem. 9 (1962) 371

SCHADE, J.P., VAN BACKER, H. y COLON, E.

Quantitative analysis of neuronal parameters in the maturing cerebral cortex. En "Growth and maturation of the brain". Progress in Brain Research. Vol. 4, (1964), pág. 150. Editado por Purpura, D.P. y J.P. Schade. Elsevier, Amsterdam

SEMENIARIO, L.M., JENN, N. y CONRZ, C.J.

Lipid distribution in subcellular fractions of the rat brain. J. Neurochem. 11 (1964) 197

SIEKEVITZ, P., PALADE, G.E., DALLNER, G., OHAD, I. y OMIURA, T.

The biogenesis of intracellular membranes. En "Organizational Biosynthesis". (1967), pág. 331. Editado por Vogel, H.J., Lampen, J.O. y Bryson, V. Academic Press, New York

SLATER, E.C.

Oxidative phosphorylation. En "Comprehensive Biochemistry". Vol. 14, (1966), pág. 327. Editado por Florin, M. y Stotz, E.M. Elsevier, Amsterdam

SLATER, E.C.

Manometric methods and phosphate determination. En "Methods in Enzymology". Vol. X, (1967), pág. 19. Editado por Estabrook, R.W. y Pullman, M.E. Academic Press, New York

SLATER, E.C. y BONNER, W.D., Jr.

The effect of fluoride on the succinic oxidase system. Biochem. J. 52 (1952) 185

SLATER, E.C. y EULSMANN, W.C.

Control of rate of intracellular respiration. En "Ciba Foundation Symposium Regulation of cell metabolism". (1959), pág. 58. Editado por Wolstenholme, G.E.W. y O'Connor, C.M. Churchill, London

SMITH, D.W., BLIZARD, R.M. y WILKINS, L.

The mental prognosis of hypothyroidism of infancy and childhood. Pediatrics 19 (1957) 1011

SPERRY, W.H.

The biochemistry of the brain during early development. En "Neuroche-

mistry". (1962), pág. 55. Editado por Elliott, K.A.C., Page, I.H. y Quastel, J.E. C.C. Thomas, Springfield

STAHL, W.L., SMITH, J.C., NAPOLITANO, L.M. y BASFORD, R.E.  
Brain mitochondria. I. Isolation of bovine brain mitochondria. J. Cell Biol. 19 (1963) 293

SUZUKI, K.

The pattern of mammalian brain gangliosides. III. Regional and developmental differences. J. Neurochem. 12 (1965) 969

SUZUKI, K.

Formation and turnover of the major brain gangliosides during development. J. Neurochem. 14 (1967) 917

SUZUKI, K., PODUSLO, S.E. y NORTON, W.T.

Gangliosides in the myelin fraction of developing rats. Biochim. Biophys. Acta 144 (1967) 375

SUZUKI, K., PODUSLO, J.F. y PODUSLO, S.E.

Further evidence for a specific ganglioside fraction closely associated with myelin. Biochim. Biophys. Acta 152 (1968) 576

SZIJAN, I., CHEPELENSKY, A.B. y PIRAS, M.

Effect of neonatal thyroidectomy on enzymes in subcellular fractions of rat brain. Brain Research 20 (1970) 313

SZIJAN, I., KALBERMAN, L.E. y GOMEZ, C.J.

Cambios en la síntesis de proteínas de diferentes estructuras cerebrales de rata durante el período de maduración postnatal. Resumen Vº Reunión Nacional de la Soc. Arg. de Invest. Bioquím. (1969) pág. 57

TATA, J.R.

Hormones and the synthesis and utilization of ribonucleic acids. Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. Vol. 5, (1966a), pág. 191. Editado por J.N. Davidson y W.E. Cohn. Academic Press, New York

TATA, J.R.

The regulation of mitochondrial structure and function by thyroid hormones under physiological conditions. En "Regulation of metabolic processes in mitochondria." (1966b), pág. 489. Editado por Tager, J.M., Papa, S., Quagliariello, E. y Slater, E.C. Elsevier, Amsterdam



TATA, J.R., ERNSTER, L., LINDBERG, O., ARRHENIUS, E., PEDERSEN, S. y HELMAN, R.

The action of thyroid hormones at the cell level. *Biochem. J.* 86 (1963) 408

TZAGOLOFF, A. y WEARTON, D.C.

Studies on the electron transfer system. LXII. The reaction of cytochrome oxidase with carbon monoxide. *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 2628

UMBERT, M.W., BURRIS, R.H. y STAUFFER, J.F.

"Manometric techniques". Burgess Publishing Minn. (1957)

VAHVELAINEN, M.L. y OJA, S.S.

The uptake and incorporation into protein of [<sup>3</sup>H] tyrosine by slices prepared from developing rat brain cortex. *Brain Research* 13 (1969) 227

VAN DEN BERG, C.J., VAN KEMPEN, G.M.J., SCHEDE, J.P. y VELDSTRA, H.

Levels and intracellular localization of glutamate decarboxylase and  $\gamma$ -aminobutyrate transaminase and other enzymes during the development of the brain. *J. Neurochem.* 12 (1965) 863

VAN GELDER, B.F.

On cytochrome c oxidase. I. The extinction coefficients of cytochrome a and cytochrome a<sub>3</sub>. *Biochim. Biophys. Acta* 118 (1966) 36

WALRAVENS, P. y CHASE, H.P.

Influence of thyroid on formation of myelin lipids. *J. Neurochem.* 16 (1969) 1477

WILLIAMS, J.N., Jr.

A comparative study of cytochrome ratios in mitochondria from organs of the rat, chicken, and guinea pig. *Biochim. Biophys. Acta* 162 (1968) 175

WOLFF, E.C. y WOLFF, J.

The mechanism of action of the thyroid hormones. En "The thyroid gland". Vol. 1, (1964), pág. 237. Editado por Pitt-Rivers, R. y Trotter, W.R. Butterworths, London

WOJTCZAK, L. y LEHNINGER, A.L.

Formation and disappearance of an endogenous uncoupling factor during swelling and contraction of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 51 (1961) 442

WOJTCZAK, L. y WOJTCZAK, A.B.

Uncoupling of oxidative phosphorylation and inhibition of ATP-P<sub>i</sub> exchange by a substance from insect mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 39 (1960) 277

YAMAGAMI, S., FRITZ, R.R. y RAPPOPORT, D.A.

Biochemistry of the developing rat brain. VII. Changes in the ribosomal system and nuclear RNA'S. Biochim. Biophys. Acta 129 (1966) 532

YATVIN, M.B., WANNEMACHER, R.W., Jr. y BANKS, W.L., Jr.

Effects of thiouracil and of thyroidectomy on liver protein metabolism. Endocrinology 74 (1964) 878

YONETANI, T.

Studies on cytochrome oxidase. I. Absolute and difference absorption spectra. J. Biol. Chem. 235 (1960) 845