

EVALUACIÓN II. Informe del práctico “Cadena de Transporte de Electrones”

Sofia Sosa Murguiondo

Grupo 4

Facultad de Veterinaria. Bioquímica
Metabólica

30 de septiembre de 2021

Objetivos

- Demostrar actividad biológica de la succinato deshidrogenasa (complejo II mitocondrial).
- Demostrar funcionamiento de transferencia de electrones a través de la cadena de transporte de electrones.
- Concluir en base a los resultados de la práctica que pasaría si en vez de usar Azida de Sodio como inhibidor se usara Rotenona.

Materiales y métodos

- Fracción mitocondrial de hígado de rata
- Succinato (**sustrato**)
- DCIP (**aceptor artificial de electrones**):
 - Azul: **oxidado** (sin captar electrones)
 - Incoloro: **reducido** (al captar electrones)
- Azida de Sodio (**inhibidor de complejo IV**)
- Espectrofotómetro
- Agua (**igualar volúmenes**)
- Buffer (**igualar pH**)

Experimento 1:

CON	SIN
AGUA+DCIP+BUFFER+FRACCION MITOCONDRIAL	SUCCINATO+AZIDA DE SODIO

Experimento 2:

CON	SIN
AGUA+DCIP+BUFFER+FRACCION MITOCONDRIAL+SUCCINATO	AZIDA DE SODIO

Experimento 3:

CON	SIN
AGUA+DCIP+BUFFER+FRACCION MITOCONDRIAL+SUCCINATO+AZIDA DE SODIO	

Nota: cada experimento tiene 1 tubo blanco con sus mismos componentes menos DCIP.

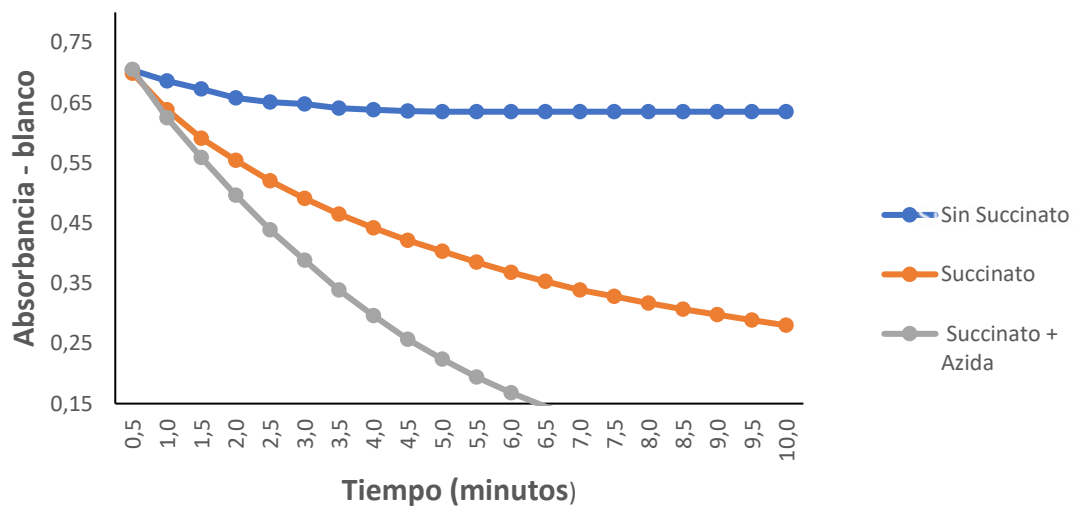
Tabla 1

Se toma la absorbancia de los experimentos cada 30 segundos hasta los 10 minutos

Tiempo (min)	Sin Succinato	Succinato	Succinato + Azida
0,5	0,704	0,699	0,705
1,0	0,686	0,638	0,625
1,5	0,673	0,591	0,559
2,0	0,658	0,554	0,496
2,5	0,651	0,520	0,439
3,0	0,648	0,491	0,388
3,5	0,641	0,465	0,339
4,0	0,638	0,442	0,296
4,5	0,636	0,421	0,257
5,0	0,635	0,403	0,224
5,5	0,635	0,385	0,194
6,0	0,635	0,368	0,168
6,5	0,635	0,353	0,145
7,0	0,635	0,339	0,126
7,5	0,635	0,328	0,109
8,0	0,635	0,317	0,096
8,5	0,635	0,307	0,083
9,0	0,635	0,298	0,073
9,5	0,635	0,289	0,065
10,0	0,635	0,280	0,058
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
ΔABS	0,069	0,419	0,647

(Δ ABS= ABS FINAL- ABS INICIAL)

Reducción de DCIP



Resultados y discusión:

Experimento 1

No contiene sustrato (succinato) ni inhibidor (azida de sodio), pero se termina obteniendo una variación de absorbancia pequeña al inicio de la gráfica, esto se debe al poder reductor endógeno que podría venir del ciclo de Krebs, NADH+H⁺, succinato, β oxidación, o lanzadera α glicerol-fosfato.

Experimento 2

Agregado de sustrato al complejo II, provoca mucho más flujo de electrones que en el experimento 1. El DCIP tiene el mismo poder reductor que la ubiquinona por lo que cuando se agrega succinato este se oxida otorgando 1e a cada uno, dando como resultado mayor variación inicial y final con respecto al experimento 1.

Experimento 3

Agregado de azida de sodio (inhibidor) bloquea el complejo IV, como consecuencia el citocromo c, complejo III y ubiquinona quedan reducidos. Al estar estos últimos complejos y coenzimas imposibilitados de recibir electrones, la oxidación del succinato en el complejo 2 transfiere todos los electrones a la DCIP dando como resultado mayor variación inicial y final de absorbancia con respecto al experimento 2.

- ✓ La comparación del experimento 1 y 2 nos permite determinar la actividad de la succinato deshidrogenasa mediante el agregado del sustrato succinato por vía de la reducción de DCIP.
- ✓ La comparación del experimento 2 y 3 permite determinar el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones mediante agregado de el inhibidor azida de sodio por vía de la reducción de DCIP.

¿Qué resultados esperarías si en el mismo diseño experimental planteado se colocara en el medio de reacción Rotenona en lugar de Azida de Sodio?

La rotenona es un inhibidor del complejo I (NADH deshidrogenasa) con estructura parecida a la ubiquinona, que provoca que los electrones provenientes de NADH no pueden entrar en la cadena de transporte de electrones por lo que no se puede genera ATP por la oxidación del NADH. Mucha rotenona ocasiona que se reduzca la formación de O₂ cuando se oxidan sustratos desde el complejo II. Debido a que bloquea el flujo inverso del complejo II al I, lo que genera O₂. Se vería una variación en la absorbancia, pero no igual que con la azida de sodio, ya que esta ultima bloquea casi todos los complejos provocando que la DCIP deba captar todos los electrones. La rotenona bloquea solamente el complejo I haciendo que la ubiquinona y la DCIP reciban electrones solamente de la oxidación del succinato y las otras vías.

Referencias bibliográficas

García Fernández, D. M. (2016) Desarrollo de técnicas farmacológicas para la identificación y cribado de fármacos mediante microarrays de membranas celulares. Edición del Autor.