

Tesis de Posgrado

Acción del dietilestilbestrol y análogos sobre la cadena de transporte de electrones mitocondrial

Diz de Otamendi, María Elisa

1969

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas 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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Diz de Otamendi, María Elisa. (1969). Acción del dietilestilbestrol y análogos sobre la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1348_DizdeOtamendi.pdf

Cita tipo Chicago:

Diz de Otamendi, María Elisa. "Acción del dietilestilbestrol y análogos sobre la cadena de transporte de electrones mitocondrial". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1969.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1348_DizdeOtamendi.pdf

Universidad de Buenos Aires

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Acción del dietilestilbestrol y análogos sobre la
cadena de transporte de electrones mitocondrial

María Elisa Diz de Otamendi

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Química

1969

1348
ej.3

Este trabajo se realizó en la Cátedra de Química Biológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

El tema que se desarrolla, fué propuesto por su director, Profesor Dr. Andrés O.M. Stoppani, a quien agradezco su dedicación y muy especialmente, que me brindara la oportunidad de colaborar en la investigación, tarea particularmente grata para mí.

A los integrantes de la Cátedra mi agradecimiento por el apoyo y estímulo recibido.

Resumen

El estilbestrol al igual que las hormonas esteroides, inhibe selectivamente la cadena de transporte de electrones mitocondrial. La NADH oxidasa es mucho más sensible que la succinato oxidasa, ubicándose inicialmente su sitio de acción en el segmento NADH-(Q, cit b).

Se ensayó un fraccionamiento de la cadena, con el objeto de eliminar sectores no involucrados, utilizándose partículas NADH y succinato citocromo c reductasa. En adelante se utilizaron segmentos funcionales, ya que las modificaciones preparativas introducidas por el fraccionamiento, alteraban las respuestas al estrógeno.

Se utilizó el segmento NADH-citocromo b. Con el estilbestrol y análogos, se determinaron por espectrofotometría diferencial modificaciones en los niveles de óxido-reducción de los componentes de la región "NADH flavoproteína" en primer lugar citocromo b y en segundo lugar flavoproteínas y otros componentes que contribuyen a las variaciones espectrofotométricas a 465-510 nm. Se determinó que el estilbestrol produce desplazamientos del nivel de estado estacionario de óxido-reducción del citocromo b hacia la oxidación en el sistema aeróbico y coincidentemente una inhibición de la reducción directa en el sistema inhibido por cianuro.

Se tituló el efecto del estrógeno y análogos sobre este sistema NADH-citocromo b y se encontró que actúan con la misma especificidad que sobre la respiración mitocondrial, sobre la NADH oxidasa y sobre la NADH-Q reductasa, segmento funcional utilizado posteriormente. Los dimetiléteres (fisiológicamente inactivos) no inhiben la transferencia de electrones.

La concentración $I_{(50)}$ para estos efectos fué para Stil: 2 μM . Sobre la NADH-oxidasa midiendo consumo de O_2 polarográficamente, se obtuvo un valor 0.75 μM .

Se encontró que el ascorbato potencia significativamente la inhibición por estilbestrol.

La antimicina A modifica el flujo de electrones hacia el b por acción sobre dicho componente, además del bloqueo que produce a un sitio inmediato posterior. No se observa efecto del Stil cuando el parámetro utilizado es reducción del b en sistema anaeróbico por cianuro más antimicina A. El ascorbato es capaz de antagonizar el efecto del antibiótico y restablecer el efecto de Stil.

En el sistema cerrado, con cianuro como inhibidor terminal el citocromo b se mueve libremente en presencia de Stil, en un equilibrio de óxido-reducción sumamente sensible a las variaciones del flujo de electrones desde el NADH. Se ensayó el agregado de Q_2 y fumarato. En todos los casos, la reoxidación del citocromo b resulta dependiente de la concentración del estrógeno, en función de su efecto primario: inhibición del transporte a un sitio anterior a b. Por lo tanto b no es el sitio de acción del estrógeno. Queda abierta la cuestión de una posible influencia sobre la conformación del mismo, pero no en relación con el sitio de acción fundamental.

El citocromo b, según criterios cinéticos no se encontró alineado en la cadena principal, sino en posición de salto tal como ocurre en general en este tipo de preparaciones no fosforilantes. La reoxidación observada del citocromo b en el sistema cerrado por cianuro se efectuaría a través de una vía paralela a la vía principal, insensible al cianuro.

En cuanto a las variaciones espectroscópicas a 465-510 nm (flavoproteínas), en el sistema aeróbico, Stil no modifica la reducción y sí la reoxidación. En sistemas cerrados, inhibidos con cianuro se produce una curva bifásica de reducción y sí el estrógeno se agrega a la flavoproteína ya reducida, se logra un pequeño aunque significativo desplazamiento hacia la oxidación. Agregando ascorbato al medio de reacción la acción de Stil se potencia, al igual que el caso observado del citocromo b y el sector NADH-deshidrogenasa se resuelve en dos componentes de óxido-reducción, uno de bajo potencial del lado sustrato y otro del lado O_2 del sitio sensible al Stil. El succinato resulta capaz de reducir a este último, además de su correspondiente flavoproteína.

Se ensayó la acción de Stil y análogos sobre el segmento NADH-Q exógena de la cadena respiratoria con idénticos resultados que los comentados para el segmento NADH-citocromo b.

Se mantiene el requerimiento de OH fenólicos libres. Las concentraciones inhibitoras 50 % (I_{50}) son para Q_2 μM 4.0 (Stil); 7.5 (Hex); 15 (Stil MME) y para Q_0 (Stil) 18; (Hex) 15 y (Stil MME) 30.

Los dimetiléteres no resultaron activos en ninguno de los sistemas ensayados.

Se determinó que la disminución de la actividad enzimática en presencia de Stil es proporcional a la cantidad de enzima presente y depende de la concentración del inhibidor en la mezcla de reacción. La inhibición se revierte por simple dilución de la mezcla enzima/inhibidor. La naturaleza reversible de la inhibición

permitió un tratamiento cinético en el estudio de la inhibición sobre el segmento NADH-Q. Se descarta una probable competencia entre Stil y quinona ya que los gráficos (Lineweaver y Burk) obtenidos dan una inhibición no competitiva de Stil con relación al sitio fundamental de entrada de la quinona. Los valores de K_i obtenidos confirman la naturaleza no competitiva de la inhibición en cuanto a la reacción de quinona con la cadena al sitio fundamental de entrada. Se hace un cálculo relativo de las contribuciones respectivas a dos sitios de entrada de la quinona exógena. Se analiza una supuesta competencia que resulta de la aparición de una actividad NADH-Q_o insensible al estrógeno a altas concentraciones de quinona. Esta actividad sería la consecuencia de una interacción directa de Q_o con el grupo flavina de bajo potencial de la NADH-deshidrogenasa. Como se esperaba, dicha actividad resultó competitiva con respecto al NADH.

Se ensaya el efecto de Stil sobre reacciones que involucran directamente a dicho grupo flavina tales como transhidrogenasa y ferricianuro reductasa. El estilbestrol no afecta estas actividades de acuerdo con lo encontrado para la actividad NADH-Q_o reductasa a altas concentraciones de la quinona. Se descarta el grupo flavina como sitio de acción del inhibidor.

En experimentos de preincubación de la enzima con Stil no directamente comparables se obtienen variaciones de las actividades NADH-citocromo c reductasas y ferricianuro reductasa que se deberían a cambios conformacionales de la NADH deshidrogenasa particulada funcional. En correspondencia se obtiene aumentada reactividad a mercuriales.

Todos estos resultados localizan el sitio sensible sobre el sector NADH deshidrogenasa en las proximidades del componente I (excluyendo al grupo flavina), dejando un segundo componente redox del lado oxígeno. La naturaleza de este segundo componente es por el momento discutible ya que se han propuesto dos esquemas diferentes.

Se ha ensayado el efecto de Stil y rotenona, resultando ~~editivas~~ las inhibiciones ó dando respuestas análogas cuando se ensayaron separadamente. Esto indicaría que ambos inhibidores afectarían al mismo componente enzimático, no necesariamente al mismo grupo ya que se encontraron diferencias en presencia de ferricianuro y ascorbato. Pueden suponerse diferentes mecanismos de acción dada la diferencia de estructuras.

Se ha postulado un probable mecanismo de acción en lo que respecta a la acción del estilbestrol y análogos, no comprobado, pero que responde a los hechos experimentales observados. El estilbestrol actuaría en este sistema por su capacidad de producir radicales libres $H\bullet$, capaces de ceder electrones a un sustrato orgánico adecuado, grupos disulfuro u otros equivalentes. El agregado de ácido ascórbico potenciaría al sistema por regeneración del difenol a partir de la doble quinona, explicándose así la mayor actividad del sistema ácido ascórbico-estilbestrol que el del estilbestrol aislado. El monometiléter tendría menor eficacia ya que daría 1 $H\bullet$ por mol en lugar de dos. El otro radical sería menos reactivo ya que puede estabilizarse por resonancia. Finalmente los dimetiléteres inactivos formarían bis-radicales pero no $H\bullet$, cumpliéndose de esta manera la proporcionalidad del efecto con el número de OH fenólicos libres. Los experimentos de preincubación aunque

no directamente comparables, sugieren la formación de grupos sulfhidrilos libres ya que se observa aumentada reactividad a mercuriales. El ferricianuro interferiría la reacción a nivel de la enzima compitiendo con el grupo Prot-S, por el electrón cedido por el átomo de hidrógeno. Esta hipótesis sería válida exclusivamente para el estilbestrol y análogos en coincidencia con los requerimientos para su acción estrogénica, no así para los estrógenos naturales en los cuales no se requieren OH fenólicos libres para la inhibición, como lo prueba la acción de los dimetil-derivados del 17 β estradiol.

I N D I C E

	Pág.
I. <u>Sitio de acción de hormonas esteroides sobre la cadena de transporte de electrones mitocondrial</u>	1
Descripción esquemática de cadena respiratoria...	2
Inhibición del transporte de electrones mitocondrial por hormonas esteroides.....	6
Acciones de esteroides sobre preparaciones fosforilantes: otros efectos.....	11
Efectos de esteroides sobre oxidaciones de NADH y succinato insensibles a antimicina A, en partículas de transporte de electrones.....	13
Efectos de estilbestrol y hormonas esteroides sobre estructura de membrana.....	15
Interacciones de hormonas esteroides y enzimas...	17
Localización actual del sitio de inhibición por hormonas esteroides sobre cadena respiratoria....	24
Referencias.....	27
II. <u>Materiales y Métodos</u>	
Preparaciones enzimáticas utilizadas.....	36
Medida de actividades enzimáticas.....	39
Actividades enzimáticas: condiciones de ensayo..	41
Reactivos utilizados.....	43
Referencias.....	44
III. <u>Inhibición por hormonas esteroides de la oxidación de succinato y NADH en sistemas citocromo c reductasa de miocardio.....</u>	45
Fraccionamiento de cadena respiratoria mitocondrial.....	45
Obtención y propiedades de una partícula NADH-succinato citocromo c reductasa de fragmentos sarcosomales.....	48

Acción de hormonas esteroides sobre actividades.. enzimáticas catalizadas por preparaciones NADH- succinato citocromo c reductasa.....	51
Discusión.....	54
Referencias.....	56
 IV. <u>Acción del estilbestrol y análogos sobre los componentes de óxido-reducción del segmento NADH-citocromo b de la cadena respiratoria</u>	 58
Efecto del estilbestrol sobre la cinética de óxido-reducción del citocromo <u>b</u>	59
Especificidad del efecto de Stil.....	62
Comparación del efecto de Stil sobre la reducción del citocromo <u>b</u> por NADH, succinato y menadiol.	62
Acción de Stil sobre la reducción del citocromo <u>c</u>	64
Experimento en presencia de ascorbato.....	66
Reducción de <u>p</u> por NADH en presencia de Stil. Efecto del ascorbato.....	67
Efecto de Stil sobre la reducción de <u>b</u> por NADH y succinato.....	69
Anulación por antimicina A del efecto de Stil sobre la reducción de <u>b</u>	69
Oxidación de <u>b</u> por fumarato en presencia de Stil.....	71
Titulación del efecto de Stil sobre la reoxida- ción de <u>b</u>	75
Efecto de la antimicina A sobre la reoxidación de <u>b</u> por el estilbestrol.....	76
Acción de Stil sobre citocromo <u>c</u> reducido por NADH.....	77
Efecto de Stil sobre la reducción de flavopro- teínas (absorbancia a 465-510 nm).....	78
Discusión.....	82
Resumen.....	88
Referencias.....	91

V. <u>Acción del dietiletilbestrol y análogos sobre el sector NADH-quinona de la cadena respiratoria...</u>	93
Efecto de Stil y análogos sobre la actividad NADH-Q ₀ y NADH-Q ₂ reductasa de miocardio.....	94
Efecto de la concentración de Q ₀ sobre la sensibilidad al Stil de la NADH-Q ₀ reductasa.....	95
Acción inhibidora de Stil, a diferentes concentraciones de NADH-oxidasa.....	96
Reversión de la inhibición por dilución.....	98
Variación de la actividad NADH-Q reductasa, con la concentración de la quinona.....	99
Efecto de Stil sobre el aparente Km para NADH-Q ₂ reductasa.....	100
Efecto de Stil sobre el Km aparente para NADH-Q ₀ reductasa.....	102
Variación de la actividad NADH-Q ₀ reductasa con la concentración de Q ₀ . Influencia de la concentración de NADH.....	103
Efecto de Stil sobre la reacción de transhidrogenación.....	104
Variación de la actividad ferricianuro reductasa con la concentración de ferricianuro. Influencia de Stil y rotenona.....	105
Discusión.....	106
Conclusiones.....	113
Referencias.....	115
VI. <u>Analogías y diferencias en las inhibiciones por estilbestrol y rotenona en los diferentes sistemas analizados.....</u>	117
Efecto de rotenona sobre la reducción de citocromo b, en sistemas aeróbico y anaeróbico.....	119
Efecto de AA, sobre la reoxidación del citocromo b por rotenona.....	121
Competencia entre Stil y rotenona sobre la reoxidación del citocromo b producida por ambos inhibidores.....	122

Reoxidación del citocromo b por rotenona y Stil. Efectos del ascorbato.....	123
Reducción de flavoproteína a 465-510. Influencia de Stil y rotenona en presencia y ausencia de ascorbato.....	124
Efecto de rotenona sobre la actividad NADH-Q _o reductasa.....	125
Efecto de rotenona sobre el aparente Km para NADH-Q _o reductasa.....	126
Variación de la actividad NADH-ferricianuro reductasa con la concentración de ferricianuro. Efecto de Stil y rotenona.....	127
Conclusiones.....	128
Referencias.....	129
VII. <u>Ensayos de acción de Stil sobre la NADH-deshidrogenasa funcional, particulada en el sistema completo no fosforilante.....</u>	131
Curva de efecto de concentración de estrógeno sobre consumo de O ₂ . Método polarográfico.....	137
Reactividad a mercuriales luego de preincubación con Stil.....	138
Efecto de Stil y Etil-maleimida sobre la oxidación de NADH.....	139
Discusión.....	140
Conclusiones.....	141
Referencias.....	143
VIII. <u>Discusión general.....</u>	145
Sitio de acción del estilbestrol sobre el transporte de electrones mitocondrial.....	145
Naturaleza de la inhibición.....	156
Efectos comparativos del estilbestrol y rotenona.....	157
Probable mecanismo de acción.....	159
Referencias.....	166
IX. Conclusiones.....	168

Abreviaturas

Stil: dietilestilbestrol
Hex: hexestrol
Stil-MME y Stil-DME: dietilestilbestrol monometil y dimetiléteres, respectivamente.
Hex-DME: hexestrol dimetiléter
NADH: nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
Fp: flavoproteína
CoQ: coenzima Q
APAD: acetilpiridin NAD
Q_o: 2,3 dimetoxi-2' metil p-benzoquinona
Rot: rotenona
AA: antimicina A
Asc: ascorbato
p-ClMB p-cloromercuribenzoato
EM: etil-maleimida
Fe-nh: hierro no hemínico
Tris: 2-amino-2-hidroxi metilpropane-1,3-diol
ATP: -5'adenosina trifosfato
ADP: -5'adenosina difosfato
NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducida)
ETP: partícula transportadora de electrones
S.D: succinato deshidrogenasa

CAPITULO I

Sitio de acción de hormonas esteroides sobre la cadena de transporte de electrones mitocondrial

Los efectos fisiológicos conocidos de las hormonas esteroides, se vincularon tempranamente a modificaciones de procesos bioquímicos endocelulares. Era presumible que las hormonas actuaran sobre "sitios específicos" dentro o sobre la superficie de la célula.

Por su importancia clave dentro del metabolismo, la actividad oxidativa de tejidos fué uno de los campos de elección, para el estudio de las acciones a nivel celular de las hormonas esteroides. En efecto "Interfiriendo con mecanismos de liberación de energía, los esteroides podrían afectar otras reacciones esenciales, tales como biosíntesis, transferencia a través de membranas, degradación de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos..."(1). Es importante señalar que diferentes sitios de acción (proteínas repressoras, genes operadores, membrana celular diferentes sistemas enzimáticos), no implican necesariamente diferentes modos de acción (2). Algunos de los efectos descritos de las hormonas esteroides, podrían tener significación fisiológica. De todos modos, mientras tal información no este disponible, los sistemas enzimáticos utilizados permiten conocer eventuales modos de acción de los esteroides a nivel molecular (3). Pese al esfuerzo hecho hasta el presente, los mecanismos básicos de la interacción hormonal, permanecen sin resolver (4).

La acción de hormonas esteroides sobre sistemas enzimáticos y más particularmente sistemas NADH y succinato oxidasa fueron objeto de amplia y detallada revisión (1,3). En esta introducción se mencionan solamente los hallazgos de interés fundamental para describir el cuadro actual de

conocimientos sobre la inhibición por hormonas esteroides del transporte de electrones mitocondrial. Entre la variedad de líneas de trabajo en este campo, una de ellas adquiere importancia comparativa. Es la interacción de las hormonas esteroides con macromoléculas en particular enzimas, ya que nuestro sistema de estudio es estructurado y multienzimático.

Descripción esquemática de cadena respiratoria

Se considera comúnmente cadena respiratoria al sistema multienzimático que cataliza la dehidrogenación de sustratos y la transferencia de equivalentes reducidos al O_2 . Por un extremo las dehidrogenasas, flavoproteínas estructuralmente ligadas, tales como NADH y succinato dehidrogenasa. Por el otro extremo la cadena de citocromos y ligando a ambos probablemente la ubiquinona (5). "Existirían relativamente grandes distancias a cubrir entre las dehidrogenasas y las cadenas de citocromos receptoras de los equivalentes de reducción. Podrían requerirse entonces, metabolitos transportadores que unieran dichas distancias por difusión" (5). La ubiquinona que está presente en gran exceso y es además, una molécula no ligada a proteína, parecería llenar ese papel (6).

Termodinámicamente, la secuencia de reacción de los componentes de cadena respiratoria puede ser determinada aproximadamente por los potenciales redox de los mismos, los cuales en conjunto abarcan el intervalo total de 1.200 mV entre sustrato y O_2 . Los potenciales normales determinados para los componentes aislados, no representan los de cadena intacta y hasta su acoplamiento con la transferencia de energía puede modificarlos.

Cinéticamente, puede ser analizada siguiendo directamente la transferencia de los equivalentes de reducción. La aplicación de técnicas espectrofotométricas desarrolladas por Chance y col. (7), fué uno de los caminos elegidos para el conocimiento de la naturaleza y secuencia de los componentes de cadena respiratoria. Otra vía de experimentación la constituyen los trabajos de fraccionamiento fundamentalmente llevados a cabo por Green y col. (8). El aislamiento de secciones de cadena en 4 complejos permitió conocer nuevos componentes probablemente involucrados en el transporte como por ejemplo Fe no hemínico entre flavoproteínas y citocromo b y entre citocromos b y c (9).

El uso de inhibidores constituye otro método que ha dado enorme información acerca de una serie de aspectos del funcionamiento del sistema fosforilante y del transporte de electrones. Se pueden citar verdaderos desacoplantes tales como el dinitrofenol, que permiten máxima velocidad de respiración; inhibidores de la fosforilación oxidativa que secundariamente, inhiben el transporte de electrones acoplados tales como oligomicina y verdaderos inhibidores del transporte sea en cadenas acopladas o desacopladas tales como antimicina A, rotenona y cianuro. Los esteroides pertenecen al tipo de inhibidores mixtos que influyen en determinadas condiciones el acoplamiento de energía y el transporte de electrones.

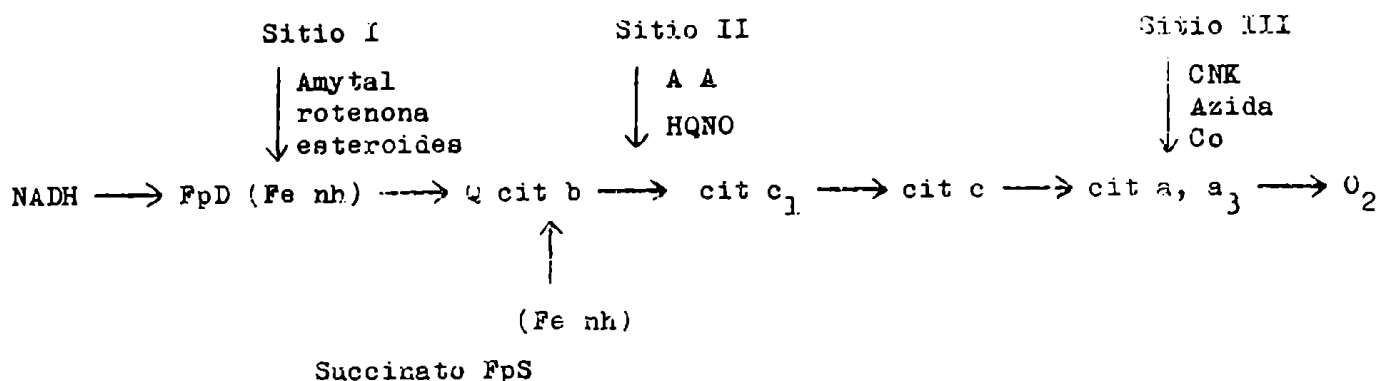
La energía liberada durante el pasaje de electrones del sustrato al O_2 , está acoplada a la síntesis de ATP. El sistema fosforilante intacto implica control de respiración. La presencia de ADP acelera el consumo de O_2 (estado metabólico activo 3), su agotamiento en el medio frena la respiración marcadamente (estado metabólico de

reposito 4) (7). Las cadenas desacopladas tienen máxima velocidad de consumo de O_2 .

Se ha supuesto una probable estequiometría entre el transporte y la fosforilación. En un sistema fuertemente acoplado, aproximadamente 3 moléculas de ATP serían sintetizadas por cada molécula de NADH oxidado. Esto ocurriría en 3 lugares de conservación de energía establecidos por Chance (7), basado en la observación de cambios en los niveles de estado estacionario de oxido-reducción de los componentes de cadena respiratoria. Recientemente ha sido modificada la ubicación del primer sitio (10).

Esquema de cadena respiratoria

Sitios de fosforilación e inhibición



Los mecanismos de la fosforilación oxidativa en cadena respiratoria no se han aclarado. En 1953 Slater postula el requerimiento de intermediarios de alta energía a la manera clásica. Esta hipótesis química no es fácilmente comprobable por la imposibilidad de aclarar la naturaleza de los

intermediarios hasta el presente. Por otra parte Mitchell (11) con su hipótesis quimio-osmótica explica la síntesis de ATP por reversión de la actividad de una enzima anisotrópica "ATPasa", ligada a membrana con determinada permeabilidad para H^+ y OH^- . La separación de cargas, manejaría la síntesis de ATP previa formación de un anhidrido intermediario de alta energía. Boyer postula una posibilidad alternativa (12); sugiere que el intermediario de alta energía represente simplemente un estado energizado acompañado de cambio conformacional proteico. Estas discusiones han promovido el estudio de los elementos ligados fundamentalmente a membrana interna. Racker y su grupo han tenido éxito en la reconstitución de fosforilación oxidativa con partículas submitocondriales no fosforilantes y agregado de factores proteicos acoplantes íntimamente ligados a membrana (13,14). Los experimentos realizados por este grupo permiten también confirmar que las enzimas solubilizadas de los complejos enzima-membrana modifican sus propiedades con relación a las ligadas estructuralmente (15). La estructura membrana de mitocondrias con las enzimas asociadas a ella, hacen que el arreglo estructural en la matriz lipoproteica, determine las interacciones mutuas de los componentes (16).

Klingenberg (5) discute los diferentes mecanismos propuestos para la transferencia de electrones propiamente dichos, que constituye otro aspecto del problema, "En todos los mecanismos debe suponerse que la transferencia electrónica está básicamente organizada para producir además, transferencia de energía. En todos los sistemas de cadena respiratoria aún desacoplados y fraccionados, deben estar presentes proteínas y lípidos esen-

ciales para la secuencia y organización de la transferencia electrónica, pero la función de los cuales puede ser entendida solamente, teniendo en cuenta la transferencia de energía".

Resumiendo: El arreglo, número y función de los transportadores de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial es actualmente incompleta. Los aceptores inmediatos para algunos de ellos, no están bien establecidos. Tampoco han sido identificados los componentes sensibles a los inhibidores anteriormente mencionados (10). Conviene desde ahora destacar que la ubiquinona ocupa una posición clave entre las flavoproteínas, NADH y succinato dehidrogenasas y los citocromos. Su ubicación del lado sustrato del citocromo c parece claramente establecida, no así su posición con relación al citocromo b (10). Recientemente se habla además, de un nuevo componente flavoproteico entre NADH y citocromo b (17).

Inhibición del transporte de electrones mitocondriales por hormonas esteroides

El dietilestilbestrol es un estrógeno sintético de gran potencia. Fué utilizado juntamente con el benzestrol por Mc Shan y Meyer quienes describieron su acción inhibitoria sobre succinato oxidasa de hígado y pituitaria de rata (18,19).

Case y Dickens (20) investigaron la acción del estilbestrol como probable inhibidor de la citocromo oxidasa. Los resultados no muestran sensibilidad a la hormona de las enzimas terminales de la cadena.

Gordan y Elliot (21,22) con homogenatos de corteza cerebral de rata, coincidieron en que la citocromo oxidasa no es el sitio de la inhibición. La interpretación de los resultados obtenidos con homogenatos es bastante compleja por la multiplicidad de factores que pueden incidir en el efecto.

En preparaciones libres de células, de levadura e hígado de rata, Hochster y Quastel (23,24) encontraron que el estilbestrol inhibe también la oxidación del glicerofosfato. Con los sistemas de levadura, postulan que el estilbestrol actúa como transportador competitivo participando en una conversión quinona-hidroquinona. La hormona podría competir como aceptor de hidrógeno con otro transportador, produciendo entonces inhibición de la actividad. En esa forma, variaría el curso de las oxidaciones intracelulares sin interferencia con las enzimas involucradas o sin competencia con los sustratos, afectando finalmente al metabolismo y crecimiento celular (23). En sistemas totalmente distintos (peroxidasas y fenolasas) Williams Ashman (25) sugiere que una forma de radical libre de los estrógenos fenólicos, podría servir como transportador de electrones.

Prosiguiendo con estudios sobre los sistemas oxidativos NADH y succinato oxidasas de músculo cardíaco y preparaciones de otras fuentes, incluso bacterias, Yielding y Tomkins (26) y Stoppani y col. (27,28) concluyeron casi simultáneamente que una variedad de hormonas esteroides y estilbestrol, a concentraciones micromolares inhiben al sistema específico para NADH con mucho mayor potencia que al sistema succinato oxidasa. Extendidas estas observaciones por ambos grupos, la localización del sitio de inhibición fué hecha sobre la actividad NADH citocromo c

reductasa (1,27) y tentativamente entre flavoproteína y CoQ (29).

Jensen, utilizando hormonas adrenocorticales (30,31) observó los mismos efectos sobre la NADH citocromo c reductasa. Para este tipo particular de hormonas, la inhibición resultó reversible y no competitiva con el sustrato. Este grupo de trabajos (1,26-31) introducen una conclusión importante a saber: que el transporte de electrones es afectado directamente por los esteroides. Alguna de las preparaciones utilizadas por ser fragmentos de mitocondrias permitían excluir la posibilidad de una acción de permeabilización sobre las mismas, con pérdida de coenzimas y cofactores. "Con la preparación de Keilin y Hartree la sensibilidad a hormonas, es una propiedad intrínseca del sistema oxidativo no dependiente de la disrupción de una estructura más compleja (mitocondrias, sarcosomas)" (1). Esto contradecía las interpretaciones de resultados anteriores por Gallagher y Packer y Bacila que atribuyeron a cambios de la estructura mitocondrial y consiguiente pérdida de coenzimas y cofactores, el origen de la inhibición sobre el transporte de electrones (32,33).

Stritmatter con sistemas bien caracterizados de fracciones celulares de corazón e hígado de pollo, concluyó que la inhibición por progesterona ocurre solamente en las actividades NADH citocromo c reductasa de mitocondrias sensibles a Antimicina A.

Stoppani y col. (1) discuten críticamente algunos resultados obtenidos por los diferentes grupos, en relación con la estructura lipoproteica mitocondrial nativa y aparición de contaminaciones microsomales o shunts

artificiales. Esto explicaría por ejemplo la muy activa NADH oxidasa insensible a esteroides (29), al agregar citocromo c exógeno a fracciones particuladas de hígado y otras (34).

Stoppani y col. ensayan la acción de los esteroides sobre reducción de quinonas exógenas (35) teniendo en cuenta que serían los intermediarios entre flavoproteínas y citocromos, en preparaciones de fragmentos sarcosomales tipo Keilin y Hartree. Sus resultados fueron consistentes con los observados anteriormente para progesterona (29).

Yielding y Tomkins (29) suponen idéntico sitio de inhibición para otro inhibidor de cadena respiratoria, Amytal (36). A pesar de ello la inhibición por hormonas esteroides es revertible por alfa-tocoferol, a diferencias con la inhibición por Amytal.

Dietrich (37) extrae NADH citocromo c reductasa que retienen sensibilidad al estilbestrol pero no al Amytal, de preparaciones mitocondriales de hígado de rata y adenocarcinoma.

Ambos grupos (Stoppani y col. y Yielding y Tomkins), además de establecer aproximadamente el sitio de adición, puntualizan el efecto como inherente a la transferencia de electrones propiamente dicha y enfatizan particularmente la importancia de la estructura lipoproteica en relación con la inhibición.

Las NADH oxidasas, partículas ricas en lípidos (26, 29) serían especialmente capaces de concentrar esteroides. Estos, no parecerían inhibir por interacción física inespecífica pues estructuras similares tienen efectos muy distintos. Stoppani y col. (1) concluyen por su parte que la inhibición de transporte electrónico no sería

el efecto inespecífico de una estructura carbonada policíclica insoluble en agua, ya que cambios limitados las hacen inefectivas con relación al efecto estudiado. Otros factores a tener en cuenta, señalan, serían su solubilidad en lípidos e interacción de intermediarios de oxido-reducción con lipoproteínas (38). "Disolviéndose preferentemente en estas últimas podrían afectar la interacción de componentes de oxido-reducción y como consecuencia inhibir oxidaciones intracelulares". Citan además, el refuerzo que dan a esta interpretación los ensayos de concentración de esteroides en interfase iniciada por Munck (39).

Para dar continuidad a los experimentos encaminados a dilucidar el sitio de acción de esteroides sobre el transporte de electrones propiamente dicho, incluiremos más tarde los relativos a otros efectos dentro del mismo campo de acción, (48,51) pero que son previos en el tiempo, e inspiraron además, el trabajo que se comenta seguidamente. Varicchio y Sanadi (40) utilizando partículas submitocondriales y espectrofotometría de doble haz, encuentran inhibición de la reducción de citocromo b por progesterona y azasteroide. En coincidencia con trabajos anteriores de Stoppani y Vallejos encuentran un sitio entre citocromo b y c que da cuenta de la inhibición por succinato y en la región citocromo oxidasa a mayores niveles de concentración de las hormonas ensayadas. Utilizan una NADH ubiquinona reductasa soluble (41,42) y quinonas como aceptores exógenos con igual resultado que en trabajos anteriores (29,31,43). El sitio queda entonces localizado entre NADH flavoproteína y CoQ o citocromo b.

Acciones de esteroides sobre preparaciones
fosforilantes: otros efectos

Wade y Jones (44,45), encontraron inhibición de la fosforilación oxidativa y aumento de actividad de ATPasa latente por la progesterona. En mitocondrias frescas de hígado de rata, se describen también activaciones de ATPasa (44,46,47) aunque a concentraciones relativamente altas 0.6 mM de acetato de deoxicorticosterona y progesterona.

Vallejos y Stoppani (48) concluyen que la inhibición del transporte electrónico en el sitio anteriormente localizado (1,29) es decir la región NADH flavoproteína, se confirma en mitocondrias fosforilantes y es de importancia primaria con relación a los procesos de "swelling" ó hinchamiento. Sin embargo con bajas concentraciones de progesterona y deoxicorticosterona la activación de la ATPasa es escasa y no hay "swelling", a pesar de la inhibición de la respiración. La inhibición de la oxidación del succinato se produce por interferencia al segundo sitio de fosforilación entre citocromos b y c₁. La inhibición del transporte no es revertida por desacoplantes como dinitrofenol en contraste con la respuesta positiva en mitocondrias de corazón de paloma (49,50).

En cuanto al uso del estilbestrol en estas preparaciones Stoppani y Vallejos (51), citan trabajos anteriores con resultados no del todo consistentes entre sí: Salmony (52) usando la "cicloforasa" como sistema de ensayo observó inhibición de la oxidación de glutamato por estilbestrol y también desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Packer y Bacila (32) encontraron inhibición de respiración y reducción de citocromo b en mitocondrias

estimuladas por ADP, mientras que en condiciones de reposo (estado metabólico 4) el estilbestrol activaba la respiración. Estos efectos como se dijo anteriormente, los atribuyeron a cambios en la estructura física de la mitocondria, imputables a fenómenos de hinchamiento. Concentraciones de estilbestrol que no eran capaces de producir "swelling", no provocaban cambios en la respiración, control respiratorio o eficacia de la fosforilación oxidativa. Contrariamente, Emmelot y Bos (53) podían inhibir la oxidación de glutamato usando estilbestrol a concentraciones que no producían alteración de la estructura mitocondrial.

Stoppani y Vallejos ensayan la acción del estilbestrol y compuestos relacionados sobre el metabolismo de mitocondrias de hígado de rata (51). Confirman el sitio de inhibición establecido para preparaciones no fosforilantes; con succinato como sustrato las concentraciones inhibidoras de estilbestrol son mayores. Por otra parte el estilbestrol, hexestrol y dienestrol desacoplan la fosforilación al tercer sitio. Actúan en forma distinta a los desacoplantes y no inducen activación significativa de la ATPasa latente aún en presencia de Mg^{++} , lo que descarta la posibilidad de un efecto detergente (55).

En cuanto a relaciones de estructura de los estrógenos con el efecto estudiado (51), la esterificación y alquilación de grupos OH disminuye la acción de estrógenos artificiales sobre el metabolismo mitocondrial. Es importante señalar (dicen los autores) que los derivados sustituidos con efecto nulo o menor, tienen también poca o ninguna actividad estrogénica (56).

El trabajo ya mencionado de Varicchio y Samadi (40) aparte de confirmar los resultados comentados sobre el sitio de inhibición primaria y los sitios secundarios a mayores concentraciones no agregan mucho sobre los otros efectos que se comentan. Destacan únicamente que no encuentran inhibición de transferencia de energía por progesterona ya que preparaciones estimuladas por ADP ó desacopladas por dinitrofenol, son igualmente inhibidas. Dan como posible causa la fuerte incidencia del efecto primario, ó sea inhibición del transporte.

En las apreciaciones sobre el probable mecanismo de acción resume las sugerencias hechas por Stoppani y col. (1), modificación de la interacción entre los componentes de óxido-reducción, como consecuencia de cambios en la estructura de la partícula oxidante. Una sugerencia similar, pero afectando a la enzima "per se" (57) y una acción sobre el medio lipídico como posibilidad relacionada (40).

Recientemente se describe un efecto distinto al estudiado, pero también sobre cadena respiratoria.

Efectos de esteroides sobre oxidaciones de NADH y succinato insensibles a Antimicina A, en partículas de transporte de electrones

Jensen y col. (58,59) comunican que cuando la oxidación de NADH por fragmentos mitocondriales es inhibida al máximo grado con Antimicina A (inhibidor de cadena respiratoria ya mencionado en los esquemas anteriores (60)), la actividad residual, oxidación NADH insensible a AA, es estimulada por bajas concentraciones, $< 50 \mu\text{M}$ de deoxicorticosterona, e inhibida por altas concentraciones del esteroide.

Se describen otros ensayos en los que la concentración afecta no solamente el grado, sino la dirección del efecto esteroide (61,62).

La velocidad de la reacción en estudio aumenta con el pH hasta un máximo idéntico al de la velocidad de oxidación de las partículas no inhibidas, a igual pH. Se produce H_2O_2 aunque no en relaciones estequiométricas (63).

La divergencia de efectos de esteroides a diferente concentración (estimulación o inhibición) parece consecuencia de la modificación de la curva de pH, en la dirección ácida para la actividad ensayada en presencia de hormona. La formación de H_2O_2 estaría de alguna manera vinculada al efecto esteroide. Una explicación teórica dada por Jensen, sería la posibilidad de cambios en las constantes de disociación para grupos disociables, en el sitio activo de las enzimas (64). Este posible origen del desplazamiento de pH, no sería comprobable por la complejidad del sistema involucrado. Establece la posibilidad de que este efecto tuviera vinculación con desplazamientos de curvas de pH encontrados para enzimas o proteínas simples en presencia de esteroides. Desplazamiento en dirección ácida por un número de esteroides del pH óptimo, para la aldehído dehidrogenasa (65). Alteración de la rotación óptica y desplazamiento de la curva de titulación en dirección ácida para proteínas ligadas a testosterona (66). A este tipo de efecto como línea independiente de trabajo, se lo mencionará más adelante.

Efectos de estilbestrol y hormonas esteroides
sobre estructura de membrana

Stoppani y Vallejos (48,51), demuestran claramente que los cambios físicos mitocondriales, revelados por "swelling" o sea alteración de la estructura mitocondrial no producen por sí, las respuestas metabólicas de los estrógenos. Citan el caso de un poderoso agente de swelling, el estilbestrol monometiléter, el cual prácticamente no afecta la respiración.

Weissman y Keisser, en relación con estas acciones encuentran actividad hemolítica a concentraciones aproximadas de 200-500 μM de esteroides (67,68). Basados en estos y en otros resultados (69) el grupo de Green ensaya efectos del estilbestrol sobre membranas mitocondriales (70). Los objetivos del trabajo no están encaminados a dilucidar la acción hormonal sino a aportar datos para la actual polémica desencadenada con el uso de la microscopia electrónica, sobre localización de enzimas, en las diferentes membranas mitocondriales, cuestión a la que han aportado valiosos datos también el grupo de Racker (71). A pesar de ello las conclusiones del trabajo llevan a incluirlo en esta introducción. En un trabajo anterior (72) encuentran las condiciones óptimas de fraccionamiento controlado de las membranas mitocondriales por estilbestrol y Mg^{++} . Como se dijo, la conclusión quizás más importante del trabajo sería la diferenciación de membranas en virtud del diferente comportamiento frente al agente perturbador: estilbestrol + Mg^{++} . En el caso de las membranas externas sufren disolución, rotura completa de las barreras de permeabilidad lo que involucra completa des-

trucción de las uniones proteína-fosfolípidos. En el caso de las membranas internas (cristae membranas), se produce simple debilitamiento de las uniones con transformación de su estructura tubular en vesicular, cambio quizás paralelo al "swelling" mitocondrial. En cuanto al efecto objeto de nuestro estudio las conclusiones del trabajo (70) serían: "La perturbación por estilbestrol lleva a las membranas internas a una transición de tubulares a vesiculares, a la pérdida de capacidad acoplante y a la pérdida o modificación del transporte electrónico". Las concentraciones usadas en el trabajo con aparición de actividades ATPásica e isocitrato dehidrogenasa son del orden 150-200 μM .

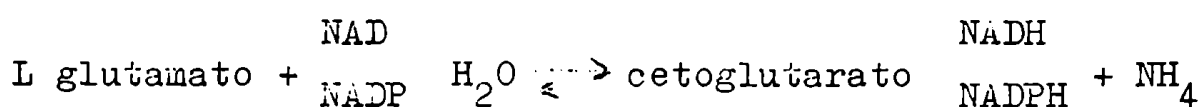
Se pueden mencionar algunos trabajos de la línea iniciada por Munck (39,73,74) Engel y otros sobre interacción a interfases y los más actuales sobre interacciones específicas e inespecíficas (75,76). Aunque estos trabajos constituyen una línea independiente por los sistemas utilizados, pueden resultar de utilidad sus conclusiones. A concentraciones in vitro $>10^{-5}$ M, aparecen efectos inespecíficos no relacionados a la actividad fisiológica y que podrían deberse a la capacidad de esteroides de concentrarse en interfase. Efectos producidos a través de mecanismos y probablemente sitios de ligadura que difieren de los específicos (75).

Las limitaciones de los sistemas organizados y multi-enzimáticos para el avance en este campo, llevaron a ensayar paralelamente otros modelos.

Interacciones de hormonas esteroideas y enzimas

Tomkins y Maxwell (3) hacen una revisión detallada hasta el año 1963.

Las observaciones descriptivas del efecto inhibitor de esteroide sobre la oxidación de NADH, por preparaciones mitocondriales llevaron a investigar las posibles consecuencias metabólicas de tal inhibición.



Esta reacción fué considerada de primordial interés en vista de sus conexiones con el metabolismo intermedio. Cuando la concentración de NAD fuera limitante, el fenómeno de inhibición de transporte estudiado o sea inhibición de oxidación de NADH, debía deprimir la oxidación de glutamato. Efectivamente se encontró acumulación en un sistema que contenía NAD, glutamato y preparación particulada de hígado (77).

Además de este efecto algunos estrógenos entre ellos el estilbestrol, podían inhibir directamente a la glutamato dehidrogenasa. La observación agregada de que ADP podía revertir la inhibición, hizo muy atractivo al sistema. La concentración mitocondrial del nucleótido, podría controlar la magnitud del efecto.

La glutamato dehidrogenasa existe en solución en un equilibrio dependiente de la concentración entre un peso molecular próximo a 2.000.000 y otro bajo de 320.000.

A su vez estos agregados están constituidos por subunidades idénticas de peso molecular 52.000 (78-80).

La actividad de la glutamato dehidrogenasa es inhibida por estrógenos, menos efectivamente por andrógenos y hormonas progestacionales y muy especialmente por el estrógeno sintético el estilbestrol (77,81-84).

Otros inhibidores cuyo sitio de acción coincide en la cadena respiratoria también afectan la actividad de la enzima como rotenona (85) y o-fenantrolina (86).

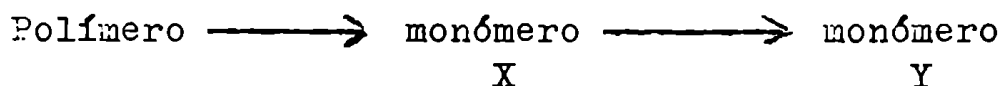
Estos efectos como se dijo fueron estudiados especialmente con el estilbestrol (81). Se observó que producía un decrecimiento del peso molecular de la proteína, cuando se usaban soluciones de alta concentración. Todos los metabolitos que producían desagregación de la molécula proteica, inducían un cambio de especificidad para el sustrato, pues emergía actividad de alanina dehidrogenasa (81-84,86). Como se esperaba de los experimentos cinéticos el ADP prevenía también, la desagregación. Pudieron correlacionarse los resultados de inhibición de actividad con los de ultracentrifugación (84,87).

La afinidad de la enzima por sus coenzimas (NAD, NADP) no era alterada por hormonas, pero si los sitios disponibles para la ligadura del sustrato, según técnicas de intensificación de fluorescencia (88).

Todos estos resultados, condujeron a postular que el mecanismo de estas acciones se debería a interferencia con uniones hidrofóbicas críticas. Podría suceder que las regiones hidrofóbicas estuvieran implicadas en la agregación. "El fenómeno no parecía tan simple ya que factores estéricos y requerimientos de coenzimas, estaban también implicados (82,83)". Se establece una

correlación con los fenómenos observados en respiración mitocondrial (83). (interacciones de esteroides con ligaduras hidrofóbicas entre los componentes del sistema de óxido-reducción).

La acción de estrógenos persistía sin embargo en soluciones a concentraciones tales que la enzima se encuentra al estado de monómero. Correlaciones cinéticas y de peso molecular por técnica de dispersión de luz sobre una misma mezcla de reacción, llevaron a la conclusión de que los monómeros de 320.000 PM pueden adoptar una de las conformaciones rápidamente interconvertibles, que difieren en cuanto a especificidad de sustrato y tendencia a agregación en polímeros (89-92).



Tomkins y Yielding (78) expusieron tempranamente la posibilidad de que la ligadura del estrógeno a la enzima favoreciera la conformación Y del monómero con mayor actividad de alanina dehidrogenasa y sin tendencia a agregarse. Se refieren a esta acción como situada a un sitio diferente al catalítico y que podría permitir regulación cualitativa y cuantitativa; regulación multivalente además, por la influencia de otros metabolitos sobre el efecto. Monod, Changeux y Jacob (93) llamaron regulación alostérica a este tipo de efecto.

Otros datos experimentales muestran que las hormonas esteroides inducen alteraciones estructurales sobre la enzima como ser: cambios en ligadura de coenzimas (88,94), cambios en las propiedades inmunológicas (95) y velocidades alteradas de inactivación térmica (96).

Recientemente se describen (97) experimentos diseñados para la selectiva marcación de los sitios catalíticos y alostéricos sobre la enzima. Estos reactivos poseen un grupo alquilante por el que podrían ligarse covalentemente a la enzima en el sitio específico.

La leucina y el ADP (98) antagonizan ambos el efecto hormonal, aunque por caminos diferentes. La leucina parece prevenir la ligadura del estilbestrol a la enzima, determinado por el método de diálisis de equilibrio. El ADP produce un efecto distinto.

En esta regulación multivalente y como tal elegida como modelo de interacción (78), es muy importante destacar que el efecto es dependiente de la concentración de coenzima (82,88,94). Ultimamente (98) se encuentran curvas de efecto esteroide, hiperbólicas a niveles saturantes de NADH y sigmoidea a bajas concentraciones de coenzima.

Alteraciones menores de la estructura proteica sin producir desagregación, fueron observadas por el mismo grupo sobre otras enzimas, piruvato kinasa de músculo de conejo (99) y aldehído dehidrogenasa de hígado de conejo (100). Ambos efectos fueron descriptos con detalle anteriormente (3).

La marcada alteración de actividad catalítica por las hormonas esteroides, sería el resultado de cambios conformacionales de estas enzimas (3). Permanece sin resolver la significación fisiológica de estos hallazgos, a nivel molecular. En ese sentido Grisolia y col. (101,102) estudiando glutamato dehidrogenasa de hígado y útero (bovina y humana), encuentran que las hormonas naturales a concentraciones fisiológicas ejercen mínimos efectos, no comparables con el estilbestrol. Si bien consideran excesivos el énfasis puesto en la regulación de la especificidad de sustrato y sus

vinculaciones al metabolismo en los trabajos descriptos anteriormente (83) recalcan la importancia del requerimiento de cofactor. Como observación adicional Mg^{++} a concentraciones intracelulares protege a la enzima de la inestabilidad inducida por estilbestrol + NADPH y NADH (102).

El estilbestrol y las hormonas esteroides parecerían regular además, la glutamato dehidrogenasa mitocondrial (103), de acuerdo con los resultados sobre la enzima cristalina, El estilbestrol no solamente altera la actividad de la enzima, sino también su ligadura a mitocondrias. El estilbestrol libera la actividad de glutamato dehidrogenasa de mitocondrias y el ADP es capaz de retardar este fenómeno (103).

Cabe consignar que a diferencia con estos resultados Angel y Scott en los primeros estudios sobre la glutamato dehidrogenasa encontraban estimulación de su actividad por corticosterona 10^{-8} M (104).

La glucosa 6P dehidrogenasa constituye otro ejemplo de dehidrogenasas, cuya actividad es afectada por hormonas. También se detallan (3) los primeros estudios sobre ella sin incluirla en la categoría de enzima cuya conformación fuera alterable por los esteroides. Posteriormente su actividad y la consecuente producción de NADPH fué correlacionado con la síntesis de corticoides (105). El efecto ACTH de estímulo a la síntesis de corticoides se debería a una acción sobre la dehidrogenasa con el consiguiente aumento de NADPH. Cada hormona trófica activaría la glucosa 6P dehidrogenasa de su órgano (106,107).

Durhan y Adams (108) ensayan el efecto in vitro sobre actividad de glucosa 6P dehidrogenasa microbiana. El efecto

requiere OH fenólicos no sustituidos, lo que recuerda la inhibición sobre el transporte de electrones (51). La inhibición resulta reversible y no competitiva para NADP. La explicación más aceptable del efecto sería según dichos autores una modificación en la configuración proteica por ligadura a un sitio distinto al catalítico, o sea inhibición alostérica. Estos resultados la incluyen entre las que sufren cambios conformacionales por acción de hormonas esteroides.

Anteriormente Mc Kerns (109) a la luz de sugerencias hechas por Williams Ashman (25) pensó que los estrógenos fenólicos podían ser oxidados reversiblemente por el sistema. Se examinaron sus características espectrales y no se encontraron evidencias de formas oxidadas en el espectro. Sus datos parecían indicar que los estrógenos sintéticos podrían competir con los sitios de ligadura de NADP sobre la apoenzima.

Los grupos ionizados del inhibidor activo en la forma trans, estarían a una separación de $15 \overset{\circ}{\text{Å}}$ correspondiente a la distancia interatómica determinada de modelos moleculares entre el pirofosfato y el fosfato terminal del NADP en su forma más extendida (109).

En previos estudios de ligadura de estrógenos en útero han sido implicados grupos SH (110) tejidos que responden a estrógenos tales como útero y vagina contienen cantidades mínimas de componentes llamados receptores de estrógenos que muestran gran afinidad por el estradiol. Grupos SH, de la sustancia receptora parecen esenciales a su capacidad para asociarse con estradiol. La presencia de reactivos de tioles en el medio, elimina la característica afinidad del tejido por el estrógeno. Además la presencia de mercuriales, eluye del tejido a los estrógenos

previamente ligados. El descubrimiento por Jensen y Jacobson de que el útero de rata es capaz de tomar selectivamente y retener 17 B estradiol, ha llevado a investigar la naturaleza de las especies moleculares involucradas en la ligadura. Experimentos de digestión con enzimas han indicado que probablemente se trate de una proteína. Con estradiol tritiado y centrifugación en gradientes de sacarosa, la radioactividad migra como un pico simple con coeficiente de sedimentación 9.5 S (111,112).

La glutamato deshidrogenasa de hígado y la piruvato kinasa de músculo ligan 17 B estradiol. Se ensaya el efecto de 4-mercuri-17 B estradiol sobre ambas enzimas en presencia y ausencia de la hormona (113). La formación del mercaptida aparece disminuida en presencia de la hormona, Posiblemente esta compete por un proceso de exclusión al sitio específico de ligadura. Estos trabajos así como los de Kallos y Tomkins (97) parecen encaminados a dilucidar la naturaleza del sitio de ligaduras de hormonas esteroideas sobre glutamato deshidrogenasa y otras enzimas.

En relación con la alteración de estructuras, puede citarse un reciente trabajo sobre capas monomoleculares (114) influenciados por hormonas esteroideas.

Pueden aportar datos interesantes al conjunto las series publicadas sobre interacciones proteína-esteroide por Westphal y col. de los cuales hay algunos muy recientes (115,116).

La acción sobre transhidrogenasas para piridin nucleótidos está detalladamente descripta (3). Su mecanismo no se ha aclarado aunque parece un fenómeno no relacionado con el que nos ocupa (26). Villee (117) resume también algunos de los mecanismos propuestos. Tanto estos como los mencionados anteriormente para explicar los efectos

de las hormonas esteroides sobre los diferentes sistemas en estudios permanecen aún en el plano de las postulaciones (4,78,115,118).

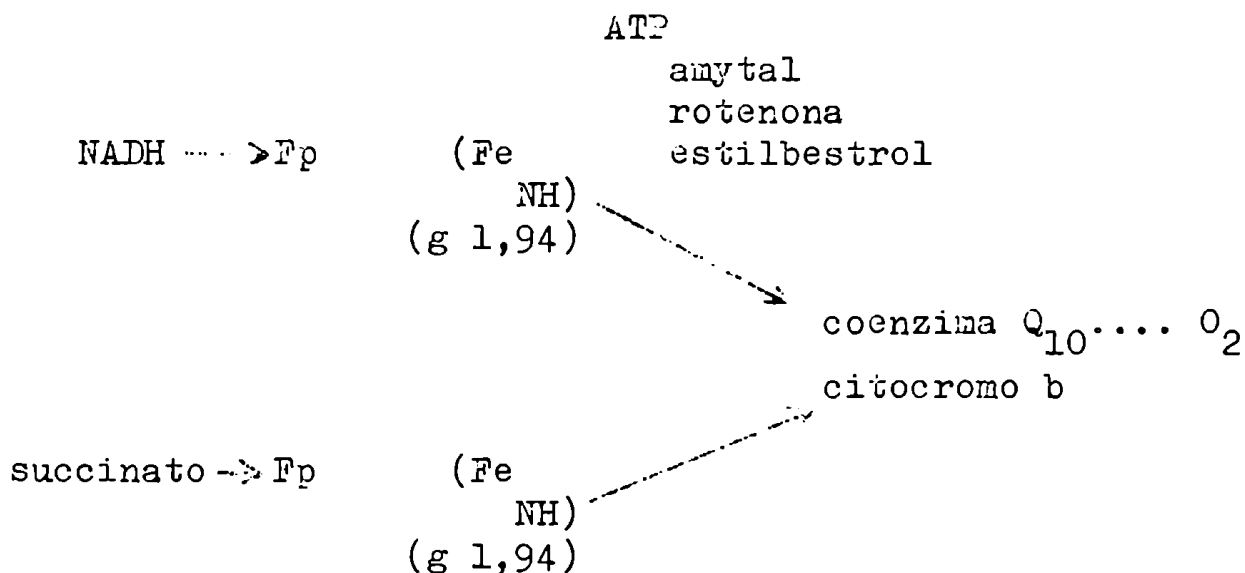
Estudios sobre el mecanismo de reacción orgánica vinculados a procesos bioquímicos, puede ayudar a avanzar en este campo. Un ejemplo de ellos lo constituye el publicado recientemente (119). Los estrógenos sintéticos hexestrol, estilbestrol parecen producir radicales de adición de hidrógeno en reacciones que se postulan como etapas mecanísticas de su acción hormonal. Esto surgiría de comparaciones establecidas con sus requerimientos para la acción estrogénica (120).

Resultan un paso adelante, las conclusiones sobre requerimientos estructurales de esteroides en lo que conciernen a la inhibición del transporte de electrones mitocondrial, establecidos recientemente por Stoppani y col. (121). En cuanto a la significación fisiológica del efecto, están en progreso estudios in vivo (122-124).

Localización actual del sitio de inhibición por hormonas esteroides sobre cadena respiratoria

Los trabajos (1,26-31,35,40,43,48,51) fundamentalmente, sitúan la acción del estilbestrol y derivados entre la NADH flavoproteína y CoQ o citocromo b.

Arreglo de los componentes respiratorios
en la región flavina de la cadena
respiratoria de mamíferos (10)



Desarrollo del plan de trabajo

Este trabajo fué realizado con preparaciones no fosforilantes tipo Keilin y Hartree (125,126). Esta preparación consiste de fragmentos mitocondriales (sarcosomas) probablemente derivados de membrana interna (16). Las mitocondrias fragmentadas no tienen en este caso capacidad para producir fosforilación oxidativa y síntesis de ATP, aunque mantienen la capacidad de producir reacciones dependientes de energía. De tal manera, estaría perturbada la transferencia final de energía (127-129). Tiene en general mayor actividad respiratoria que las mitocondrias intactas (16), es más indicada para estudios espectroscópicos, se eliminan complicaciones de interpretación por otros efectos sobre metabolismo mitocondrial (48,51) y tienen mayor accesibilidad varios metabolitos usados exógenamente.

- 1.- Se ensaya un fraccionamiento, con el objeto de eliminar segmentos no involucrados en la inhibición.
- 2.- Se estudia la acción del estilbestrol y derivados, sobre la reducción por NADH y succinato del citocromo b, con el objeto de descartar alguna acción del inhibidor sobre dicho componente.
- 3.- Se estudia la reversibilidad de la inhibición bajo las condiciones de medida de los experimentos cinéticos. Los resultados permiten ensayar una probable acción del estilbestrol sobre quinonas (dada su estructura y lipofili-
licidad), mediante un tratamiento cinético.
- 4.- Se establecen algunas respuestas diferenciales con rotenona, inhibidor de cadena respiratoria, cuyo sitio de acción coincide hasta el presente con el del estilbestrol (8,130).
- 5.- Se ensaya la acción del estilbestrol sobre la NADH dehidrogenasa funcional, para establecer posibles diferencias con las respuestas en sistemas solubles ensayados anteriormente (1,40).

Referencias

- (I-1) Stoppani, A.O.M.; Brignone, J.A.; de Brignone, C.C. y Badano, B.N. en "Perspectives in Biology" (C.F. Cori, V.G. Foglia, L.F. Leloir y S. Ochoa eds.) Elsevier. Amsterdam (1963) p. 537
- (I-2) Van Overbeek, J. Science 152 (1966) 721
- (I-3) Tomkins, G.M. y Maxwell, E.S. Ann.Rev.Biochem. 32 (1963) 677
- (I-4) Hechter, O. y Halkerston, I.D.K. Ann.Rev.Physiol. 27 (1965) 133
- (I-5) Klingenberg, M. en "Biological Oxidations" (T.P. Singer ed. Wiley N.Y. (1967) p. 3
- (I-6) Hatefi, Y. en "Advances in Enzymology", vol. 25. F.F. Nord Ed. Interscience N.Y. (1963) p. 275
- (I-7) Chance, B. y Williams, G.R. en "Advances in Enzymology", vol. 17. F.F. Nord Ed. Interscience N.Y. (1956) p. 65
- (I-8) Green, D.E. y Goldberger, R.F. en "Molecular Insights in to the Living Process" (Acad. Press, N.Y. (1966)
- (I-9) Beinert, H. en "Non heme Iron Proteins". A. San Pietro. Antioch. Press Yellow Springs. Ohio (1965) p. 23
- (I-10) Pullman, M.E. y Schatz, G. Ann.Rev.Biochem. 36 (1967) 539
- (I-11) Mitchell, P. y Moyle, J. Nature 208 (1965) 147
- (I-12) Boyer, P.D. en "Biological Oxidations". Singer, T.P. ed. Wiley N.Y. (1967) p. 193
- (I-13) Penefsky, H.S., Pullman, M.E.; Datta, A. y Racker, E. J.Biol.Chem. 235 (1960) 3330
- (I-14) Racker, E.; Tyler, D.D.; Estabrook, R.W.; Conover, T.E.; Parsons, D.F. y Chance, B. en "Oxidases and Related Redox Systems", eds. T.E. King, H.S. Mason and M. Morrison. Wiley N.Y. (1965)

- (I-15) Racker, E., y Bruni, A. en "Membrane Models and the Formation of Biological Membranes". L. Bolis, B.A. Pethica Eds. Wiley N.Y. (1968) p. 138
- (I-16) Slater, E.C. en "Advances in Enzymology", vol. 20. F.F. Nord Ed. Interscience N.Y. (1958) p. 147
- (I-17) Chance, B.; Ernster, L.; Garland, P.B.; Lee, C.P.; Light, P.A.; Ohnishi, T.; Ragin, C.J. y Wong, D. Proc.Nat.Acad. Sci. Wash. 57 (1967) 1498
- (I-18) Mc Shan, W.H. y Meyer, R.K. Arch.Biochem.Biophys. 9 (1946) 165
- (I-19) Mc Shan, W.H.; Meyer, R.K. y Erway, W.F. Arch. Biochem.Biophys. 15 (1947) 99
- (I-20) Case, M.E. y Dickens, F. Biochem.J. 43 (1948) 481
- (I-21) Gordan, G.S. y Elliott, H.W. Endocrinology 41 (1947) 517
- (I-22) Eisenberg, E.; Gordan, G.S. y Elliott, H.W. Endocrinology 45 (1949) 113
- (I-23) Hochster, R.M. y Quastel, J.H. Nature 164 (1949) 865
- (I-24) Hochster, R.M. y Quastel, J.H. Ann. N.Y. Acad. Sci. 54 (1952) 626
- (I-25) Williams-Ashman, H.G.; Cassman, M. y Klavins, M. Nature 184 (1959) 427
- (I-26) Yielding, K.L. y Tomkins, G.M. Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A. 45 (1959) 1730
- (I-27) Stoppani, A.O.M.; Brignone, J.A. y Brignone, C.C. de Rev.Soc.Arg.Biol. 35 (1959) 288
- (I-28) Stoppani, A.O.M.; Brignone, J.A. y Brignone, C.C. de Rev.Soc.Arg.Biol. 37 (1961) 13
- (I-29) Yielding, K.L.; Tomkins, G.M.; Munday, J.S. y Cowley, I.J. J.Biol.Chem. 235 (1960) 3413
- (I-30) Jensen, P.K. Nature 184 (1959) 451
- (I-31) Jensen, P.K. y Neuhard, J. Bioch.Biophys.Acta 52 (1961) 97

- (I-32) Packer, L. y Bacila, M. Acta Physiol.Latinoam. 8
(1958) 231
- (I-33) Gallagher, C.H. Biochem. J. 74 (1960) 38
- (I-34) Endall, B.R. y Kochakian, C.D. Biochim.Biophys.
Acta 54 (1961) 15
- (I-35) Stoppani, A.O.M.; Brignone, J.A.; Brignone, C.C. de
y Badano, B.N. Biochim.Biophys. Acta 58 (1962) 622
- (I-36) Minakami, S.; Cremona, T.; Ringler, R.L. y Sin-
ger, T.P. J.Biol.Chem. 238 (1963) 1529
- (I-37) Dietrich, L.S. Biochim.Biophys.Res.Comm. 4
(1961) 299
- (I-38) Green, D.E. en "Quinones en Electron Transport".
A Ciba Foundation Symposium J.J.A. Churchill Ltd.
London (1961) p. 130
- (I-39) Munck, A. Biochim.Biophys. Acta 24 (1957) 507
- (I-40) Varrichio, F. y Sanadi, D.R. Arch.Bioch.Biophys.
121 (1967) 187
- (I-41) Sanadi, D.R.; Pharo, R.L. y Sordahl, L. en
"Methods in Enzymology". (R. Estabrook y M. Pull-
man eds) vol. 8, Academic Press, N.Y. (1967)
- (I-42) Pharo, R.L.; Sordahl, L.A.; Vyas, S.R. y Sana-
di, D.R. J.Biol.Chem. 241 (1966) 4771
- (I-43) Boveris, A.A. y Stoppani, A.O.M. Rev.Soc.Arg.Biol.
43 (1967) 214
- (I-44) Wade, R. y Jones, H.W. Jr. J.Biol.Chem. 220 (1956)
547
- (I-45) Wade, R. y Jones, H.W. Jr. J.Biol.Chem. 220 (1956)
553
- (I-46) Maruyama, K. y Kobayashi, H. Enzymologia 18 (1957)
135
- (I-47) Blecher, M. y White, A. J.Biol.Chem. 235 (1960)
3404

- (I-48) Vallejos, R.H. y Stoppani, A.O.M. Bioch.Biophys. Acta 131 (1967) 295
- (I-49) Chance, B.; Hollunger, G. y Hahigara, B. Bioch. Biophys, Res. Commun. 8 (1962) 180
- (I-50) Chance, B.; Hollunger, G. y Hahigara, B. J. Biol. Chem. 238 (1963) 418
- (I-51) Stoppani, A.O.M. y Vallejos, R.H. Arch. Biochem. Biophys. 117 (1966) 573
- (I-52) Salmony, D. Biochem. J. 62 (1956) 411
- (I-53) Emmelot, P. y Bos, C.J. Exptl. Cell Res. 14 (1958) 132
- (I-54) Dickens, F. Salmony, D. Biochem. J. 64 (1956) 645
- (I-55) Witter, R.F. y Mink, J. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4 (1958) 73
- (I-56) Grundy, J. Chem. Revs. 57 (1957) 281
- (I-57) Han, M.H., Ph.D. Thesis Florida State University (1964)
- (I-58) Jensen, P.K. y Rorth, M. Proc. 2nd Intern. Cong. Steroid Hormones. Milán (1966) Excerpta Médica
- (I-59) Jensen, P.K. Bioch. Biophys. Acta 122 (1966) 167
- (I-60) Chance, B. Nature 169 (1952) 215
- (I-61) Dirscherl, W. Proc. 4th Intern. Cong. Biochem. Vienna (1958), vol. 4 Pergamon Press. Oxford (1959) p. 123
- (I-62) Breuer, H. en "Mechanism of Hormone Action". P. Karlson. Academic Press N.Y. (1965) p. 6
- (I-63) Jensen, P.K. Bioch. Biophys. Acta 122 (1966) 157
- (I-64) Dixon, M. y Webb, E.B. Enzymes Longmans London. 2nd ed (1964) p. 336
- (I-65) Maxwell, S.S. y Topper, Y.J. J. Biol. Chem. 236 (1961) 1032

- (I-66) Alfsen, A. Compt.Rend.Trav.Lab. Carlsberg 33
(1963) 415
- (I-67) Weissmann, G. y Keiser, H. Biochem.Pharm. 14
(1965) 537
- (I-68) Sessa, G. y Weissmann, G. Bioch.Biophys.Acta 150
(1968) 173
- (I-69) Graham, J.M. y Green, C. Biochem. J. 104 (1967) 24P
- (I-70) Smoly, J.M.; Byington, K.H.; Tau, W.C. y Green, D.E.
Arch.Biochem.Biophys. 128 (1968) 774
- (I-71) Kagawa, Y. y Racker, E. J.Biol.Chem. 241 (1966)
2475
- (I-72) Byington, K.H.; Smoly, J.M.; Morey, A.V. y
Green, D.E. Arch.Biochem.Biophys. 128 (1968) 762
- (I-73) Knox, W.E.; Averbach, V.H. y Lin, E.C.C. Physiol.
Rev. 36 (1956) 164
- (I-74) Engel, L.L. en "Mechanism of Action of Steroids
Hormones". (C.A. Villee and L.L. Engel Eds.)
Pergamon Press N.Y. (1961) p. 85
- (I-75) Munck, A. y Brinck-Johnsen, T. J.Biol.Chem. 243
(1968) 5556
- (I-76) Munck, A. en "Recent Advances in Endocrinology"
(V.T. James and R. de Mowbray Eds.) J. and A.
Churchill Ltd. London, in press
- (I-77) Yielding, K.L.; Tomkins, G.M.; Munday, J.S. y
Curran, F. Bioch.Biophys.Res.Comm. 2 (1960) 303
- (I-78) Tomkins, G.M.; Yielding, K.L.; Talal, N. y
Curran, J. Protein Structure and Biological
Regulation. Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol.
28 (1963) 461
- (I-79) Olson, J.A. y Anfinsen, C.B. J.Biol.Chem. 197
(1952) 67
- (I-80) Frieden, C. J.Biol.Chem. 234 (1959) 809

- (I-81) Yielding, K.L. y Tomkins, G.M. Proc.Natl.Acad.Sci. Wash., 46 (1960) 1483
- (I-82) Yielding, K.L. y Tomkins, G.M. Recent Progress in Hormone Research 18 (1962) 467
- (I-83) Tomkins, G.M. y Yielding, K.L. Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 26 (1961) 331
- (I-84) Tomkins, G.M.; Yielding, K.L. y Curran, J.F. Proc. Natl.Acad.Sci. Wash., 47 (1961) 270
- (I-85) Butow, R. Biochemistry 6 (1967) 1088
- (I-86) Yielding, K.L. y Tomkins, G.M. Fed.Proc. 20 (1961) 238
- (I-87) Yielding, K.L. y Tomkins, G.M. Proc.Natl.Acad.Sci. Wash., 47 (1961) 983
- (I-88) Tomkins, G.M.; Yielding, K.L. y Curran, J.F. J.Biol.Chem. 237 (1962) 1704
- (I-89) Yielding, K.L.; Tomkins, G.M.; Bitensky, M.W. y Talal, N. Canadian J. Biochem. 42 (1964) 727
- (I-90) Yielding, K.L.; Tomkins, G.M. y Bitensky, M.W. Proc. of the Fifth International Congress on Clinical Chemistry 11 (1965) 213
- (I-91) Bitensky, M.W.; Yielding, K.L. y Tomkins, G.M. J.Biol.Chem. 240 (1965) 663
- (I-92) Bitensky, M.W.; Yielding, K.L. y Tomkins, G.M. J.Biol.Chem. 240 (1965) 1077
- (I-93) Monod, J.; Changeux, J. y Jacob, F. J.Mol.Biol. 6 (1963) 306
- (I-94) Yielding, K.L. y Holt, B.B. J.Biol.Chem. 242 (1967) 1079
- (I-95) Talal, N.S.; Tomkins, G.M.; Mushinski, J.F. y Yielding, K.L. J.Mol.Biol. 8 (1964) 46
- (I-96) Bitensky, M.W.; Yielding, K.L. y Tomkins, G.M. J.Biol.Chem. 240 (1965) 668

- (I-97) Kallos, J. y Tomkins, G.M. Abstracts of the Second International Congress on Hormonal Steroids. Excerpta Medica (1966) Milán p.46
- (I-98) Yielding, K.L.; Tomkins, G.M.; Holt, B.B.; Summers, M.R. y Gaudin, D. en "Transactions of the Second International Congress for Hormonal Steroids". L. Martini Ed. Excerpta Medica. Milán (1967)
- (I-99) Kimberg, D.V. y Yielding, K.L. J.Biol.Chem. 237 (1962) 3233
- (I-100) Maxwell, E.S. J.Biol.Chem. 237 (1962) 1699
- (I-101) Grisolia, S.; Fernández, M.; Aneluxen, R. y Quijada, L.L. Biochem.J. 85 (1962) 568
- (I-102) Warren, J.C.; Carr, D. y Grisolia, S. Biochem.J. 93 (1964) 409
- (I-103) Mc Guire, J.S. y Culley, G. Abstracts of the Second International Congress on Hormonal Steroids. Excerpta Medica. (1966) Milán p.160
- (I-104) Engel, L.L. y Scott, J.F. Recent Progress in Hormone Research 14 (1960) p.79
- (I-105) Mc Kerns, K.W. Bioch. Biophys. Acta 69 (1963) 425
- (I-106) Kidwell, W.R.; Balogh, K. Jr. y Wiest, W.G. Endocrinology 79 (1966) 352
- (I-107) Mc Kerns, K.W. Bioch.Biophys.Acta 90 (1964) 357
- (I-108) Durham, N.N. y Adams, L.S. Bioch.Biophys.Acta 121 (1966) 90
- (I-109) Mc Kerns, K.W. y Bell, P.H. Recent Progress in Hormone Research 16 (1960) p.97
- (I-110) Jensen, E.V.; Hurst, D.Y.; De Sombre, E. y Jungblut, P.W. Science 158 (1967) 385
- (I-111) Toft, D. y Gorski, J. Proc.Natl.Acad.Sci. Wash., 55 (1967) 1574

- (I-112) Korenman, S.G. y Ramanath Rao, B. Proc.Natl.Acad. Sci. Wash., 61 (1968) 1028
- (I-113) Chang-Chen-Chin y Warren, J.C. J.Biol.Chem. 243 (1968) 5056
- (I-114) Gershfeld, N.L. y Pak, C.Y.C. Nature 219 (1968) 495
- (I-115) Ganguly, M. y Westphal, U. J.Biol.Chem. 243 (1968) 6130
- (I-116) Ganguly, M.; Carnigham, R.H. y Westphal, U. Biochemistry 6 (1967) 2803
- (I-117) Villee, C.A. en "Horm.Steroids Biochem.Pharm. and Therap." L. Martini and A. Pecile. Proc.Int.Cong. 1st Horm.Steroids vol.I, Academic Press N.Y. (1964) p.375
- (I-118) Engel, L.L.; Stoffyn, A.M. y Scott, J.F. en "Horm. Steroids Biochem.Pharm. and Therap." Proc.Int.Cong. 1st Horm.Steroids vol.I, Academic Press N.Y. (1964) p. 291
- (I-119) Glenn Limin, F. Jr.; Janko, R.; Herak, N. y Gordy, W. Proc.Natl.Acad. Sci. Wash., 58 (1967) 2329
- (I-120) Solmssen, U.V. Chem.Rev. 37 (1945) 481
- (I-121) Stoppani, A.O.M.; Brignone, C.C. de y Brignone, J.A. Arch.Biochem.Biophys. 127 (1968) 463
- (I-122) Brignone, J.A.; Brignone, C.C. de y Stoppani, A.O.M. Rev.Soc.Arg.Biol. 40 (1964) 135
- (I-123) Brignone, J.A.; Brignone, C.C. de y Stoppani, A.O.M. Rev.Soc.Arg.Biol. 42 (1966) 191
- (I-124) Brignone, J.A.; Brignone, C.C. de y Stoppani, A.O.M. Rev.Soc.Arg.Biol. 42 (1966) 208
- (I-125) Keilin, D. y Hartree, E.F. Biochem.J. 41 (1947) 503

- (I-126) Slater, E.C. Biochem.J. 45 (1949) 1
- (I-127) Lee, C.P.; Azzone, G.F. y Ernster, L. Nature 201
(1964) 152
- (I-128) Gawron, O.; Glain, A.J.; Nobel, S. y Gan, M.
Bioch.Biophys.Res.Commum. 16 (1964) 432
- (I-129) Haas, D.W. Bioch.Biophys.Acta 89 (1964) 543
- (I-130) Ernster, L.; Dallmer, G. y Azzone, G.F. J.Biol.
Chem. 238 (1963) 1124

CAPITULO II

Preparaciones enzimáticas utilizadas

Preparación no fosforilante tipo Keilin y Hartree de músculo cardíaco

Se obtuvo partiendo de corazones de cerdo por la técnica de Slater (1) ligeramente modificada. Los corazones de animales recién faenados fueron traídos del matadero enfriados con hielo. Se quitaron grasas y tejido conectivo. El músculo se picó y lavó por agitación con agua de la canilla seis veces durante 15 minutos. En cada caso el agua se eliminaba exprimiendo la carne colocada dentro de un lienzo. En general seis lavados eran suficientes para no obtener coloración del agua. En la misma forma se hacía un último lavado con agua destilada. El músculo se homogeneizó durante 45 segundos a máxima velocidad en un homogeneizador eléctrico comercial Waring, modelo CB-4 de 3.500 ml de capacidad, con 500 ml de fosfato disódico 10 mM cada 200 gr de carne picada.

El homogenato se centrifugó a 0° C durante media hora a 1.500 rpm (900 g) en una centrifuga refrigerada International, modelo PR 2. Se filtró el sobrenadante. Estos sobrenadantes reunidos se centrifugaron a 4° C en una centrifuga Servall en el rotor GSA a 9.000 rpm (14.000 g), durante 40 minutos. El residuo se homogeneizó con un volumen igual de buffer fosfato 0.2 M pH 7.4. La concentración final de proteína oscilaba aproximadamente entre 40-55 mg/ml.

Para usos espectrofotométricos la preparación se lavó con igual volumen de una solución de nitrito de sodio al 0.2 % para eliminar la interferencia de mioglobina y hemoglobina, según sugerencias de Chance (2). Se centrifugó

en una centrifuga Servall refrigerada 40 minutos en el rotor SS 34 15.000 rpm (27.000 g).

Preparación de músculo cardíaco con actividades NADH-succinato citocromo C reductasa. Fraccionamiento de la preparación anterior.

Se siguió para el fraccionamiento la técnica de Rabinowitz y De Bernard (3) quienes utilizaban como material de partida suspensiones mitocondriales y ETP.

Suspensiones de la preparación anterior en buffer fosfato 0.2 M pH 7.8, 0.25 M de sacarosa, congeladas a -15° C, se llevaron a temperatura ambiente, se diluyeron con solución 0.25 M de sacarosa hasta una concentración aproximada de 22 mg/ml.

Se le agregó colato de sodio neutro lentamente, gota a gota entre $0-4^{\circ}$ C hasta que la relación ácido cólico/proteína era 0.36 mg/mg prot. relación considerada extremadamente crítica. Luego se agregó solución saturada de sulfato de amonio pH 7 hasta 40 % de saturación. Se centrifugó a 50.000 g 15 minutos en el rotor 30 de la ultracentrifuga Spinco L. La fracción precipitada no se utilizó por contener citocromo oxidasa. El sobrenadante se fraccionó luego a 50 y 60 % de saturación, también con solución saturada de sulfato de amonio pH 7. Se controló el pH con hidróxido de amonio. Luego de cada etapa se dejó en reposo 15 minutos y se centrifugó a 60.000 g durante 10 minutos. El precipitado se suspendió en buffer fosfato 0.2 M pH 7.8, 0.25 M de sacarosa.

Eliminación de colato y $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ residuales: Para evitar la inactivación y obtener mayores actividades se diluyó a concentraciones aproximadas a 0.5 mg prot/ml. durante 30 minutos y se sedimentó posteriormente por

centrifugación 4 horas a 60.000 g. El precipitado suspendido igualmente en buffer fosfato 0.2 M pH 7.8, 0.25 M de sacarosa.

Solución de colato: Se disolvieron 3.70 g de hidróxido de sodio en 50 ml de buffer fosfato 0.1 M pH 7. Se agregaron 38 g de ácido cólico purificado por recristalizaciones sucesivas. Se ajustó el pH de la solución y el volumen se llevó a 100 ml con el mismo buffer.

Purificación del dioxano: Como solvente de esteroides se usó dioxano libre de peróxidos y aldehidos. El dioxano comercial se destiló en presencia de sulfato ferroso (101°-103° en baño de aceite) y posteriormente se pasó por columna de alumina. También se trató el dioxano comercial con bisulfito de sodio y lentejas de hidróxido de potasio 1 hora. Luego de un nuevo tratamiento con sulfito se lo secó con hidróxido de potasio. Luego fué destilado a 101°-103° y pasado por columna de alumina, para retener peróxido. El procedimiento seguido, de acuerdo a las especificaciones de Falk (6) y Cornford (7) dió un dioxano con reacción negativa frente al reactivo de Schiff y al test del ácido tiobarbiturico (8).

Purificación de etanol: Para uso espectrofotométrico, se le agregó Zn en polvo (20 g) e hidróxido de potasio (40 g) a 1 litro de etanol. La mezcla se refluja 1 hora, antes de ser destilada.

Metanol: Se refluja media hora y se destila luego, en presencia de ácido oxálico.

Determinación de proteínas: Las proteínas se determinaron por el método clásico de Biuret según Gornall y Bardawill (4) modificado por Slater (5). La curva de calibración se hizo con solución de albúmina cuya concen-

tración se determinó por Kjeldahl.

Medida de actividades enzimáticas: Se utilizó un Beckman DU monocromador ligado a un convertidor (Model 200 Gilford Inst. Lab. Inc.) con registrador Leeds y Northrup.

Espectro de absorción diferencial: Se utilizó un espectrofotómetro Beckman DK₂. El registro dió en un intervalo de longitudes de ondas 400-700 nm, la diferencia de absorción a temperatura ambiente para una misma suspensión dividida en las dos celdas de medida. Una de ellas aeróbica y la otra anaeróbica por agregado de ditionito ó sustratos. Se observaron así, los componentes enzimáticamente activos de la partícula NADH-succinato citocromo c reductasa.

Determinaciones espectrofotométricas
diferenciales de doble haz

Se utilizó un espectrofotómetro Aminco-Chance (American Instruments Co, Silver Springs, Maryland).

Este espectrofotómetro, alterna dos longitudes de onda, de las cuales una, sirve de referencia. Los pares elegidos por Chance, eliminan al máximo las interferencias debidas a otros pigmentos. El medio de reacción utilizado fué buffer fosfato 0.1 M, pH 7.4. La mezcla de reacción, se colocó en la celda del espectrofotómetro, termostatizada a $10^{\circ} \text{C} \pm 1$. Luego de ajuste óptico y equilibración térmica, la reacción se inició en cada caso por adición de los sustratos. Los reactivos se agregaron en volúmenes tales, que la variación de absorbancia por dilución de la mezcla de reacción resultara despreciable.

Se utilizaron los siguientes valores de $\Delta\epsilon$ ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

Citocromo b (562-575) : 23

Citocromo b (430-410) : 180

Citocromo c - c_1 (550-541) : 19

Flavoproteína (465-510) : 11

Todos estos valores, de acuerdo a Chance (11).

Polarografía: El consumo de oxígeno se ensayó polarográficamente con un electrodo de oxígeno de Clark.

Con un voltaje de polarización aproximado de -0.6 voltios, la corriente es directamente proporcional a la concentración de oxígeno de la solución. El polarógrafo consta de un registrador, que se calibra. La concentración de oxígeno del buffer a la temperatura de las experiencias se tomó de tablas (12). El medio de reacción utilizado fué buffer fosfato 0.1 M, pH 7.4. El volumen final de la celda de reacción es de 5 ml y utiliza agitador magnético recubierto, para facilitar el establecimiento del equilibrio entre el oxígeno disuelto y el que difunde a través del electrodo de oxígeno. El aparato se equilibra con el buffer saturado de aire a temperatura ambiente. Luego de cada registro se lava por succión exhaustivamente la celda de reacción.

Determinaciones fluorométricas de nucleótidos de piridina

Se hicieron utilizando el accesorio para fluorescencia Aminco, equipado con un filtro primario Chance 0 x 1 (máximo de transmitancia 366 nm) y recibiendo la luz emitida ($\lambda.450$) a 45° sobre la misma cara de la cubeta a través de un filtro Wratten 2 A.

Actividades enzimáticas

Condiciones de ensayo. Actividad NADH oxidasa: Se midió la variación de absorbancia a 30° C por el decremento de absorbancia a 340 nm. El medio de reacción fué el siguiente: buffer fosfato 0.1 M, pH 7.4; NADH 0.25 mM; enzima aproximadamente 0.1 mg/ml, en un volumen final de 3 ml. El coeficiente de extinción para NADH se consideró $6.22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$. La actividad específica se expresó como micromoles de NADH/min/mg proteína.

Actividades de citocromo c reductasa en partículas fraccionadas: La reducción de citocromo c se midió espectrofotométricamente a 30° C por el aumento de absorbancia a 550 nm. El medio de reacción fué el siguiente: buffer fosfato pH 7.8, 0.02 M; citocromo c 1 mg/ml; azida sódica 0.5 mM para evitar reoxidación de citocromo c y NADH 0.25 mM ó succinato 10 mM para iniciar las reacciones. Enzima, alrededor de 0.1 mg/ml en un volumen final de 3 ml. El coeficiente de extinción utilizado para citocromo c fué $19 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ (9).

Actividades de CoQ reductasa en partículas fraccionadas: Se siguió la variación de absorbancia a 275 nm. El medio de reacción fué el siguiente: Q_0 , 0.1 mM; sacarosa 0.2 M; buffer fosfato 0.1 M, pH 7.4; NADH 0.25 mM ó succinato 10 mM iniciaban las reacciones. Enzima, aproximadamente 0.1 mg/ml en un volumen final de 3 ml.

Actividad NADH-fumarato reductasa se midió de acuerdo a Slater (10).

Actividades enzimáticas de la preparación
no fosforilante tipo Keilin y Hartree

Para las medidas se utilizó un espectrofotómetro Beckman DU descrito anteriormente.

NADH - C_pQ reductasa: Se midió de acuerdo a Pharo y col (13). 1.- Actividad a concentración fija de Q₀, Q₁ y Q₂. 2.- Actividad máxima, a variadas concentraciones de las quinonas. En ambos casos el medio de reacción fué el siguiente: buffer Tris-sulfato 0.05 M pH 8; cianuro 1 mM; NADH 0.125 mM y quinona en las concentraciones indicadas.

Se siguió la variación de absorbencia a 340 nm y la reacción se iniciaba por agregado de NADH, luego de un minuto de adición de la quinona. La concentración de proteína se mantuvo en un rango no mayor de 0.2 mg/ml. Para Q₀ la velocidad resulta lineal, para Q₁ y Q₂ se utilizaron velocidades iniciales a los 15 segundos, período en que se mantiene lineal.

Ferricianuro reductasa: Se midió esta actividad, según Singer y col. (14) a velocidad máxima, siguiendo la variación de absorbencia a 420 nm. El medio de reacción utilizado fué buffer fosfato 0.04 M pH 7.4; NADH oxidasa alrededor de 0.05 mg/ml, volumen final 3 ml. Solución de ferricianuro 0.01 M agregado en volúmenes de 0.16 a 0.4 ml a los diferentes tubos de reacción. Para iniciar las medidas se agregaba NADH y luego de un minuto la enzima, descartando así la posible reducción no enzimática del ferricianuro. El NADH se utilizó a dos concentraciones diferentes, baja (0.15 mM) y alta (0.6 mM).

Medida de actividad transhidrogenasa: Se midió de acuerdo a Stein, Kaplan y Ciotti (15) con el siguiente medio de reacción: NADH oxidasa, del orden de 0.5 mg/ml;

NADH 0.13 mM; APAD 0.2 mM; CNK 1.0 mM; buffer fosfato 0.1 M pH 7.4 temperatura 30° C. Se siguió la variación de absorbencia a 375 nm, teniendo en cuenta que una variación de absorbencia de 0.0051 equivale a un nanomol de análogo reducido.

NADH-citocromo C reductasa: Se siguió el aumento de absorbencia a 550 nm. El medio de reacción fué el siguiente: buffer fosfato 0.1 M pH 7.4; cinauro 2 mM; citocromo C; 1 mg/ml y NADH 0.3 mM. La reacción se inició por adición del NADH.

Reactivos utilizados: NADH, STIL, AA y Tris de Sigma Chemical Co. Ascorbato de sodio de Roche Argentina. Hexestrol, estilbestrol monometiléter, estilbestrol-dimetiléter y hexestrol dimetiléter de Dextran Chemicals Inc., New York. Menadiol se obtuvo por reducción de la menadiona, según Fieser (16). Luego se determinó su concentración espectrofotométricamente.

Las Q_0 , Q_1 y Q_2 se obtuvieron de Merck-Sharp y Dohme Rahway, New Jersey por cortesía del Dr. K.Folkers.

El sulfato de amonio de Mallinckrodt; ferricianuro y sacarosa de BDH. Nitrito de sodio de Marck Darmstadt.

Acetil piridin -NAD se obtuvo de Pabst Laboratories, Milwaukee.

El hidróxido de sodio de BKA Sweden. Fosfato disódico de Hopkins y Williams Ltd. Fosfato monopotásico de May & Baker.

Otros reactivos utilizados eran de grado analítico. El H₂O, destilada sobre vidrio y desionizada.

Referencias

- (II-1) Slater, E.C. Biochem. J. 45 (1949) 1
- (II-2) Chance, B. J.Biol.Chem. 197 (1952) 557
- (II-3) Rabinowitz, M.; De Bernard, B. Bioch.Biophys. Acta 26 (1957) 22
- (II-4) Gornall, A.G.; Bardawill, C.J y David, M.M. J.Biol.Chem. 177 (1949) 751
- (II-5) Cleland, K.W. y Slater, E.C. Biochem. J. 53 (1953) 547
- (II-6) Falk, J.E. en "Porphyrins and Metalloporphyrins". Elsevier Co. N.Y. (1964) p.120
- (II-7) Cornford, P.A.D.; y Benson, A. J.Cromatog. 10 (1963) 141
- (II-8) Wilbur, A.; Bernheim, E. y Schapiro, G. Arch. Biochem.Biophys. 24 (1949) 305
- (II-9) Chance, B. y Hagihara, B. en "Proc. Fifth Int. Cong. Biochem". (1961) Pergamon Press, vol.V, p.3
- (II-10) Slater, E.C. Biochem. J. 46 (1950) 484
- (II-11) Chance, B. en "Methods in Enzymology". Colowick, S.P. y Kaplan, N.O. eds. Academic Press, N.Y. vol.IV (1957) p.180
- (II-12) "Handbook of Chemistry and Physics" 33rd ed. Chemical Rubber Publ. Co, Cleveland, Ohio (1951-1952) p.1481
- (II-13) Pharo, R.L.; Sordahl, L.A.; Vyas, S.R. y Sanadi, D.R. J.Biol.Chem. 241 (1966) 4771
- (II-14) Minakanni, S.; Ringler, R.L. y Singer T.P. J. Biol.Chem. 237 (1962) 569
- (II-15) Stein, A.M.; Kaplan, N.O. y Ceotti, M.M. J. Biol.Chem. 234 (1959) 979
- (II-16) Fieser, L.F. J.Biol.Chem. 133 (1940) 391

CAPITULO III

Inhibición por hormonas esteroides de la oxidación de succinato y NADH en sistemas citocromo c reductasa de miocardio

Fraccionamiento de cadena respiratoria mitocondrial

La cadena transportadora de electrones mitocondrial, desde el punto de vista de su estructura, es un complejo multienzimático compuesto de proteínas, lípidos y componentes involucrados en el transporte propiamente dicho, capaces de oxidarse reversiblemente en el sistema. "El concepto de cadena respiratoria como complejo de componentes individuales, no implica que la actividad de la misma pueda ser cuantitativamente reconstituida, poniendo en solución, sus componentes purificados". En el sistema intacto ó en partículas derivadas, la actividad es función no solamente de la actividad de los componentes individuales, sino de su integración en la estructura membranosa mitocondrial. Las enzimas solubles obtenidas hasta el presente, difieren en su comportamiento con las del sistema estructurado nativo, tal es el caso de la NADH deshidrogenasa (1).

Aún a riesgo de introducir modificaciones, se ensayaron fraccionamientos. Estos prometían complementar la información obtenida sobre sistemas intactos mitocondriales espectrofotométricamente y con el uso de inhibidores.

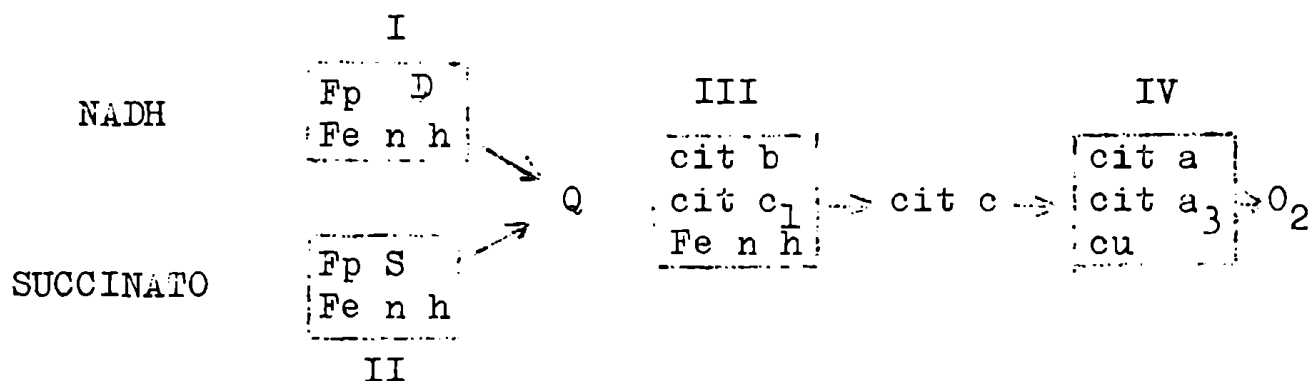
Los trabajos sobre reconstitución de actividad resultan complementarios, ya que una actividad reconstituida eficazmente constituye la prueba de correcta funcionalidad para los fragmentos obtenidos.

Se usaron en esta línea de trabajo como materiales de partida dos tipos de preparaciones: mitocondrias intactas y preparaciones no fosforilantes de diversos tipos: (Keilin y Hartree (2)) y partícula transportadora de electrones ATP (3) descrita por Green y col. y otras intermedias con capacidad fosforilante limitada, como las obtenidas por Cooper y Lehninger en 1955 (4). Las partículas mitocondriales contienen un 30-35 % de lípidos (5,6) que puede ser removido por tratamiento con acetona acuosa (6,7). El material restante, esencialmente proteico, es todavía insoluble en agua y soluciones salinas. Los componentes del sistema transportador permanecen ligados a esta fracción particulada, pero la actividad desaparece por extracción de los lípidos.

Para obtener complejos funcionales, se utilizaron en cambio diferentes reactivos químicos, tales como solventes orgánicos, sales, detergentes, etc.

Los materiales de partida señalados anteriormente, preparaciones no fosforilante tipo Keilin y Hartree, ATP y NADH oxidasas (8) son considerados sistemas cerrados. El citocromo c agregado exógenamente no puede interactuar a menos que se segmente funcionalmente la cadena con inhibidores terminales del tipo del cianuro (9). El tratamiento con los agentes mencionados, inducía un requerimiento absoluto de citocromo c que se llamó fenómeno de apertura "opening". Aparecen dos nuevas actividades NADH ó succinato citocromo c reductasa y ferrocitocromo oxidasa. Se comprobó que dicho fenómeno correspondía a la separación física de dos partículas NADH citocromo c reductasa (roja) y citocromo oxidasa (verde) (10).

Los trabajos de Green y col. culminaron con el aislamiento de 4 complejos funcionales, capaces de combinarse entre sí, de acuerdo a la secuencia esperada (11). A determinadas concentraciones de los complejos es posible reconstruir el sistema. Los aspectos fisicoquímicos y estequiométricos, junto a la falta de fosforilación del sistema reconstituido, no permiten valorarlo críticamente por ahora, según Lehninger (12).



Hatefi (11) Complejos funcionales de cadena respiratoria

Keilin y King (13,14) en estudios de fraccionamiento y reconstitución logran reconstituir la actividad de succinato oxidasa y obtienen complejos del tipo anterior, lo que permite correlacionarlos (15,16).

Ninguno de estos resultados reconstruye el sistema nativo, pero han aportado datos de interés como es la aparición de Fe no hemínico como probable componente involucrado en óxido-reducción.

Muy recientemente el grupo de Racker ha enfocado el problema desde un ángulo distinto. Reconstruyen actividad de succinato Q reductasa en un complejo funcional de cadena, al que le agregan, como requerimiento esencial una preparación particulada de citocromo b. Prueban de esta manera si el componente agregado cumple

además algún papel estructural ó de acoplamiento de energía (17).

Las preparaciones constituidas por segmentos físicos, complejos estructurados de cadena respiratoria con actividades parciales pero funcionalmente activos, ofrecían la posibilidad de ensayar la acción de hormonas esteroides sin la presencia de sectores no involucrados en la inhibición. Por ejemplo la partícula NADH-succinato citocromo c reductasa, contiene el sitio sensible y su entorno inclusive la rama para el succinato, pero no citocromo oxidasa.

Obtención y propiedades de una partícula
NADH-succinato citocromo c reductasa de
fragmentos sarcosomales

Se partió de preparaciones tipo Keilin y Hartree (2) congeladas a -15° C. Se siguió la técnica de Rabinowitz y De Bernard (18) pero con diferente material inicial.

Suspensiones de fragmentos sarcosomales de cerdo se trataron con colato de sodio a concentraciones críticas 0.36 mg/mg y se precipitó con sulfato de amonio a 50 y 60 % saturación seguido de centrifugación a 60.000 g durante 10 minutos.

Se ensayó una escala de pH entre 7 y 8 resultando este último el más conveniente para la reproducibilidad del fraccionamiento. Se descartaron las fracciones ppdas a 30 y 40 % saturación. Las fracciones a 50 y 60 % de saturación que se utilizaron se suspendían finalmente en buffer fosfato pH 7.8, 0.25 M sacarosa. Resultaron estables una semana a -15° C.

Resultados

Para descartar la posibilidad de que las actividades de citocromo c reductasa medidas, estuvieran involucrando actividades contaminantes ó no sensibles a los inhibidores clásicos (19) se probó la sensibilidad a antimicina A de estas preparaciones. A una relación 0.1 μg AA/mg prot se obtuvo una inhibición del 90 % de las actividades NADH y succinato citocromo c reductasa medidas.

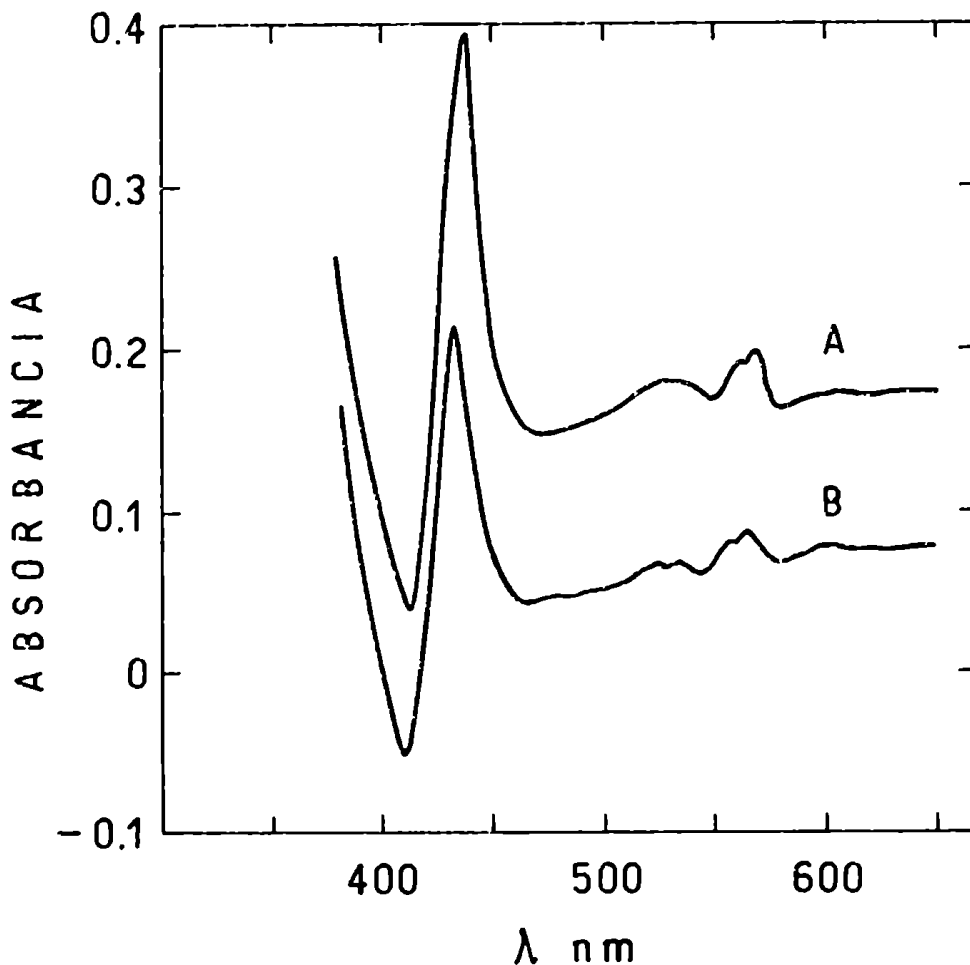


Fig.III - 1 .-Espectro diferencial de la partícula NADH-succinato-citocromo c reductasa.

Temp.ambiente; proteína 13,2 mg en 8ml fosfato 0.1 M pH 7.4; se utilizó dividida en dos cubetas; A , reducción con ditionito; B , succinato 2×10^{-3} M.

En la figura 1 se observa el espectro diferencial obtenido a temperatura ambiente, por reducción de la preparación con ditionito y succinato. Los citocromos b y c, son reducidos enzimáticamente por succinato hasta extensiones próximas a las obtenidas con ditionito como lo muestran los picos de absorción a las bandas características 562 para citocromo b y 554 para citocromos $c_1 + c$ (se presume escasa presencia de citocromo c, en base a resultados de trabajos anteriores) (18). No se observan picos alrededor de 600 nm lo que confirma la ausencia de citocromo oxidasa (banda característica 605 nm) (9).

TABLA I

EFFECTO SIMULTANEO DEL SUCCINATO NADH_2 SOBRE LA ACTIVIDAD DE PREPARACIONES DE NADH_2 -SUCCINATO-CITOCROMO C-REDUCTASA

	Actividad enzimática ($\mu\text{Moles cit. c/min/mg prot}$)		
	<u>Sustrato:</u> succinato	<u>Sustrato</u> NADH_2	<u>Sustratos:</u> Succinato NADH_2
<u>Fracción A:</u> Fragmentos sarcosomales con colato de sodio (0.36 mg/mg prot.) precipitado con $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ 50 % sat.	0.4	0.6	1
<u>Fracción B:</u> Fracción A diluida a 0.5 mg/ml y sedimentada a 60.000 x g para eliminar colato y $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ residual.	1.3	1.3	2.6
<u>Fracción C:</u> Igual a fracción A, pptada. con $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ a 60 % sat.	1	0.09	1
<u>Fracción D:</u> Fracción C centrifugada a 60.000 x g, como B.	1.2	1.2	2.4

Succinato y NADH cit. c reductasa: Fosfato 0.02 M pH 7.8; azida sódica 0.5 mM cit. c 1 mg/ml
 NADH : 0.25 mM, succinato 10 mM para iniciar reacciones Vol.
 final: 3ml

La tabla I nos muestra valores para actividades específicas de succinato y NADH citocromo c reductasas así como actividades en presencia de los dos sustratos simultáneamente. Para cada una de las fracciones A, B, C y D utilizadas y en todos los casos, la actividad específica para succinato + NADH resulta la suma con relación a las actividades para cada sustrato aisladamente. El NADH no compete con succinato por la cadena común y viceversa a diferencia de lo que ocurre en las preparaciones originales no fraccionadas. La actividad de las fracciones A y C (50 y 60 % saturación) mejoran notablemente cuando se eliminan el colato y sulfato de amonio residuales.

El procedimiento utilizado consistió en diluir a concentraciones de proteína inferiores a 0.5 mg/ml y posterior sedimentación a 60.000 g.

En vista de la separación de cadenas sugerido por los resultados de tabla I se midieron actividades NADH-fumarato reductasa (20) con resultados negativos en varios medios de reacción. Se tenía una evidencia más sobre la modificación estructural a nivel de la interacción entre ambas cadenas succinato y NADH para estas partículas.

Acción de hormonas esteroides sobre actividades enzimáticas catalizadas por preparaciones NADH-succinato citocromo c reductasa.

La tabla II muestra la acción de hormonas esteroides dietilestilbestrol, progesterona y estradiol sobre tres preparaciones diferentes precipitadas a 60 % saturación con sulfato de amonio a saber A, B y C. Resulta satisfactoria la reproducibilidad de los valores de actividades específicas, así como el efecto de las hormonas sobre ellas. Los esteroides inhiben con mayor potencia

TABLA II

ACCION DE ESTEROIDES SOBRE ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LA PREPARACION

NADH₂ -SUCCINATO CITOCROMO C REDUCTASA

Las cifras representan la actividad enzimática expresada como unoles de citocromo c reducido/min/mg prot. Concentración de hormona, 15 μ M. Entre paréntesis, inhibición por el esteroide.

Exp.	Sustrato	Testigo	Dietilestil- bestrol	Progesterona	Estradiol
A	NADH ₂	0.15	0.07(50)	0.08(46)	—
B	NADH ₂	0.08	0.04(50)	0.04(50)	0.0.(50)
C	NADH ₂	0.1	—	—	0.04(60)
A'	Succinato	0.7	0.09(88)	0.19(73)	—
B'	Succinato	0.8	0 (100)	—	—
C'	Succinato	0.7	0 (100)	0.3(55)	—

Succinato y NADH cit. c reductasa: Fosfato 0.02 M pH 7.8; azida sódica 0.5 mM oit c 1/mg/ml NADH y succ. 0.25 mM y 10 mM resp. A, B y C fracción 60 % sat SO₄ (NH₄)₂ de diferentes fraccionamientos, 0.1 mg prot/ml Vol. final: 3 ml

al sistema para el succinato. Llega prácticamente a 100 % a una concentración 15 μ M de los esteroides. La inhibición de la actividad NADH citocromo c reductasa en cambio, oscila entre 40 y 50 %. Esto indica una alteración de la sensibilidad a los esteroides si se lo relaciona con los resultados obtenidos en el sistema intacto. Se midieron estas mismas actividades con cianuro como inhibidor terminal en las preparaciones enteras una vez descongeladas y aún en presencia de la cantidad de colato/mg proteína utilizada en el fraccionamiento cuando se efectuaba. El sistema mostró mayor sensibilidad a los esteroides para el NADH como sustrato

y mucho menos para el succinato en coincidencia con resultados anteriores (I-1).

Es sabido que las hormonas esteroides inhiben la reducción de quinonas exógenas (I-1,35,40). Se ensayó entonces su acción sobre las actividades Q reductasas catalizadas por estas partículas. Se determinó el coeficiente de extinción (ox-red) para Q_0 que resultó ser $13,4 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ y se calcularon actividades con la fórmula

$$Q_0 = \frac{\text{absorb a } 275 \text{ m}\mu}{(EQ_{\text{ox}} - EQ_{\text{red}} - E_{\text{fumarato}}) (275)} = \frac{\text{absorb } 275 \text{ m}\mu}{(16-2,7-0.33)}$$

La contribución por aparición de fumarato (21) se tuvo en cuenta para las actividades con succinato.

TABLA III

ACCION DE ESTEROIDES SOBRE ACTIVIDADES NADH, SUCCINATO CITOCROMO C REDUCTASA,
NADH, SUCCINATO Q REDUCTASAS

Las cifras representan actividad específica (umol de aceptor/min/mg prot.)

ADICIONES		Cit c reductasa		Co Q reductasa	
		<u>Sustrato:</u> NADH	<u>Sustrato:</u> Succinato	<u>Sustrato:</u> NADH	<u>Sustrato:</u> Succinato
Control	A	0.18	0.9	0.10	0.23
dioxano	B	0.2	0.8	0.12	0.35
Estrógeno	A	0.09(50)	0.005	0.10(0)	0.07(70)
	B	0.12(40)	0.09(100)	0.12(0)	0.17(52)
Progesterona	A	0.09(50)	0.29(70)	0.10(0)	—
	B	0.12(40)	0.42(50)	0.12(0)	0.22(38)

Expt. A Fracción 50 % sat $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$; B Fracción 60 % sat $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$. Actividad NADH, Succinato Q reductasa: 0.15 mg proteína/ml; Vol. final, 3 ml; 100 μM Q; 200 mM sacarosa; 100 mM fosfato pH 7.4; NADH 0.25 mM & succinato 10 mM para iniciar la reacción; cit. c reductasa como en Tabla II.

La Tabla III correlaciona los efectos de hormonas esteroides sobre actividades de citocromo c reductasa y Q_0 reductasas para ambos sustratos NADH y succinato sobre la misma fracción 50 y 60 % saturación.

Los resultados sobre actividades citocromo c reductasas coinciden con los de Tabla II. Cuando Q_0 es el aceptor externo, en lugar de citocromo c, la actividad succinato Q_0 reductasa resultó un 70 % afectada por estilbestrol y 40 % por la progesterona. La actividad NADH Q_0 reductasa en cambio no resultó sensible a las hormonas.

Discusión

La acción de hormonas esteroides sobre estas partículas para el NADH, resultó en cualquier actividad medida citocromo c reductasa ó Q_0 reductasa mucho menor que en el sistema intacto. Esto no es difícilmente explicable. La región NADH flavoproteína que involucra al sitio sensible es sumamente sensible a varios agentes.

El tratamiento drástico con detergentes que implica el fraccionamiento podría seguramente alterar la actividad a esa región, compitiendo de alguna manera con un efecto posterior de la hormona. (Las actividades obtenidas para el NADH resultan bajas especialmente si se tiene en cuenta la concentración de componentes en estas partículas).

En cambio, la acción inhibitoria sobre la cadena del succinato es inesperada y difícilmente explicable.

Ya se habían observado alteraciones en la sensibilidad a inhibidores clásicos como Amytal y antimicina A en partículas semejantes a las utilizadas en este trabajo (22).

Muy recientemente se habría evidenciado la inducción de sitios de inhibición sin relación con los de cadena intacta por fraccionamientos, como es el caso de sitios de acción de rotenona en cadena respiratoria y en una partícula NADH-Q reductasa soluble (23).

A pesar de todas estas consideraciones, actualmente se sigue usando como criterio de reconstitución sensibilidad a inhibidores clásicos, en los fragmentos y luego en el sistema reconstituido (17).

En nuestro estudio, dada la complejidad de factores que pueden llevar a alteraciones como la observada se continuó con seccionamiento funcional de la cadena.

Referencias

- (III-1) Ringler, R.L.; Minakami, S. y Singer, T.P. Biochem.Biophys.Res.Comm. 3 (1960) 417
- (III-2) Keilin, D. y Hartree, E.F. Biochem. J. 41 (1947) 500
- (III-3) Crane, F.L.; Glenn, J.L. y Green, D.E. Biochim. Biophys.Acta 22 (1956) 475
- (III-4) Cooper, C. y Lehninger, A.L. J.Biol.Chem. 219 (1955) 489
- (III-5) Green, D.E. y Hatefi, Y. Science 133 (1961) 13
- (III-6) Green, D.E. y Fleischer, S. Biochim.Biophys. Acta 70 (1963) 554
- (III-7) Lester, R.L. y Fleischer, S. Biochim.Biophys. Acta 47 (1961) 358
- (III-8) Crane, F.L. y Glenn, J.L. Biochim.Biophys. Acta 24 (1957) 100
- (III-9) Yonetani, T. Proc. Fifth Int. Congress of Biochemistry vol. V (1961) Pergamon Press p.396
- (III-10) Mackler, B. y Nathar, Penn. Biochim.Biophys. Acta 24 (1957) 294
- (III-11) Hatefi, Y. en "Comprehensive Biochemistry" vol.14. Florkin, M. y Stotz, E.H. Eds.Elsevier, Amsterdam (1966) p.199
- (III-12) Lehninger, A.L. en "The Mitochondrion" (W.A. Benjamin Inc. N.Y. (1965)
- (III-13) Keilin, D. y King, T.E. Nature 181 (1958) 1520
- (III-14) Keilin, D. y King, T.E. Proc.Roy.Soc. B (London) 152 (1960) 163
- (III-15) Takemori, S. King, T.E. Biochim.Biophys.Acta 64 (1962) 192
- (III-16) Kuboyama, M.; Takemori, S. y King, T.E. Biochim. Biophys.Res.Comm. 9 (1962) 534

- (III-17) Yamashita, S. y Racker, E. J.Biol.Chem. 243
(1968) 2446
- (III-18) Rabinowitz, J. y De Bernard, B. Biochim.Biophys.
Acta 26 (1957) 22
- (III-19) Smith, L. y Stotz, E. J.Biol.Chem. 209 (1954)
819
- (III-20) Slater, E.C. Biochem. J. 46 (1950) 484
- (III-21) Alberty, R.A.; Massey, V.; Frieden, C.; y
Fuhlbrigge, A.R. J.Amer.Chem.Soc. 76 (1954) 2485
- (III-22) De Bernard, B.; y Sottocasa, G.L.; Prandini, B.D.
y Allieri, L. Boll.Soc.Ital.Biol.Sper. 34 (1958)
1946
- (III-23) Morgan, D.J. y Singer, T.P. Biochim.Biophys.
Res.Comm. 27 (1967) 356

CAPÍTULO IV

Acción del estilbestrol y análogos sobre los componentes de óxido-reducción del sector

NADH-citocromo b de la cadena respiratoria

La acción principal del estilbestrol y las hormonas esteroides sobre el transporte de electrones mitocondrial, se ubica en el sector NADH-citocromo b de la cadena. En efecto, Stoppani y col. (I-1,27,35) encuentran que la NADH-oxidasas es mucho más sensible a los esteroides que la succinato oxidasa y que la respuesta al estilbestrol de la NADH-quinona reductasa particulada de miocardio es comparable a la del sistema completo (NADH-oxidasas). Observaciones similares refieren otros investigadores (I-26,29,40).

En la zona NADH-flavoproteína de la cadena de transporte de electrones existen componentes cuyos niveles de óxido-reducción pueden medirse con precisión por espectrofotometría diferencial. En primer término está el citocromo b cuyas variaciones son susceptibles de interpretación directa. En segundo lugar es fácil medir el nivel de óxido-reducción de las flavoproteínas. En este caso, varios componentes de la cadena respiratoria pueden determinar cambios de absorbancia con el par 465-510 nm, a saber la flavina de la NADH-deshidrogenasa, Fe no hemínico, y según estudios recientes de Chance y col. una segunda flavoproteína que actuaría como intermediario de electrones entre la NADH-deshidrogenasa y portadores de potencial más positivo. Por último, en presencia de succinato, la flavina de la succinato deshidrogenasa también contribuye a las variaciones de absorbancia.

En este capítulo se expondrán, en primer término los efectos del estilbestrol sobre la óxido-reducción de b. En segundo lugar se consideran observaciones sobre la óxido-reducción de las flavinas.

Resultados

Efecto del estilbestrol sobre la cinética de oxido-reducción del citocromo b. La adición de NADH $300 \mu\text{M}$ produce un estado estacionario de oxidación. El nivel de reducción de b se ajusta al mismo y permanece constante durante unos minutos. En esas condiciones, la adición de Stil $24 \mu\text{M}$, modifica ese nivel en el sentido de la oxidación (Fig. IV-1, exp. A).

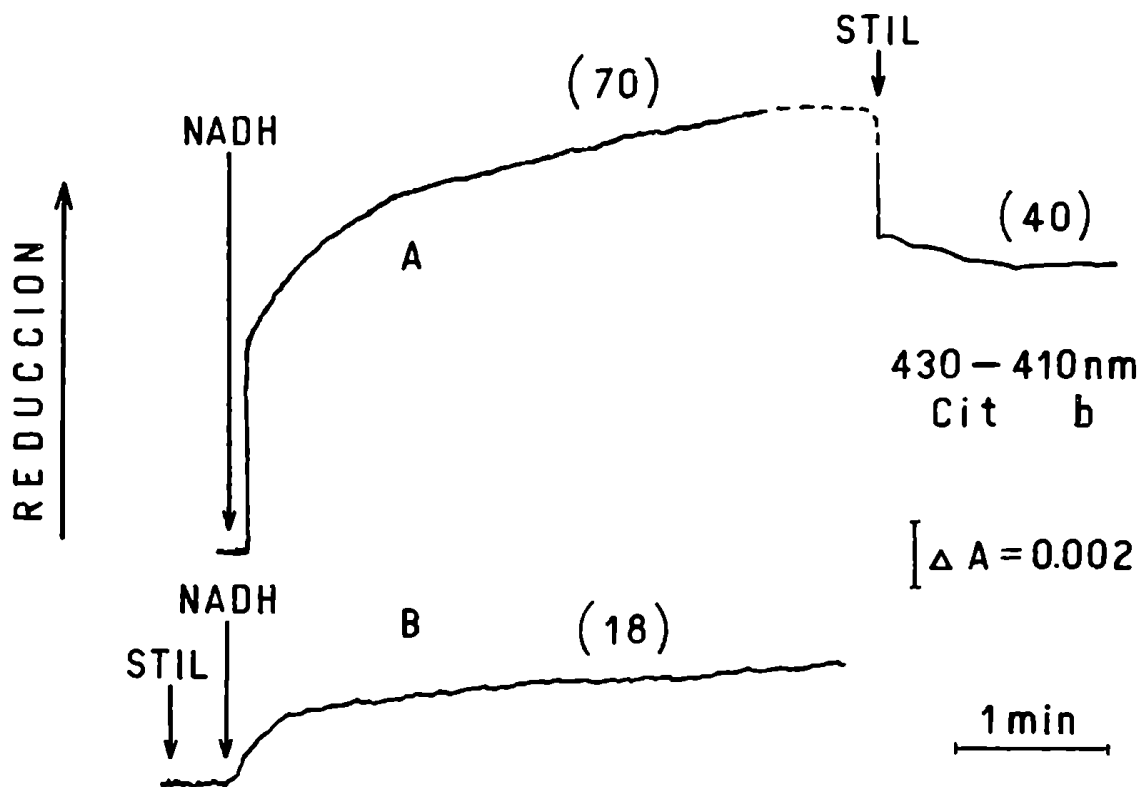


Fig. IV-1.- Variación del estado estacionario de oxido-reducción de cit. b por Stil. Efecto de agregado previo al sustrato.

NADH-oxidasa 0.2 mg/ml ; fosfato 0.1 M , pH 7.4; NADH 0.3 mM ; Stil $24 \mu\text{M}$. Vol. final 2.5 ml . Las cifras indican la concentración (nM) de cit. b reducido.

En el mismo sistema aeróbico, la adición de Stil antes que el NADH determina un nivel de reducción de b relativamente más bajo, desde el principio (Fig. IV-1, exp. B).

En presencia de cianuro (mM), se obtienen pulsos de reducción de b con concentraciones más bajas de NADH (30 μ M), como se observa en la Fig. IV-2, exp. B. También en esas condiciones la adición de Stil retarda la

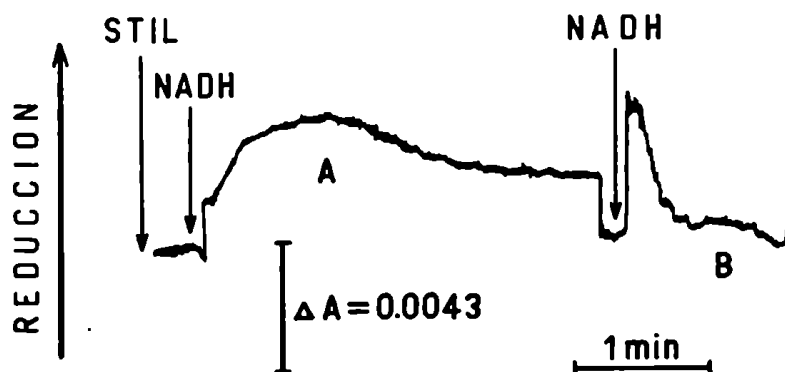


Fig. IV-2.- Acción de Stil sobre reducción de cit. b por NADH.
 NADH-oxidasa 1.4 mg/ml, cianuro 1.0 mM, NADH 30 μ M; Stil 18 μ M;
 fosfato 0.1 M, pH 7.4; cit. b 0.5 μ mol/ g prot. (ditionito).
 Vol final 2.5 ml.

reducción y reoxidación de b (Fig. IV-2, exp. A). La Tabla IV-1 muestra el efecto de distintas concentraciones de cianuro y NADH sobre los pulsos de reducción de b. De la misma resulta que las concentraciones mencionadas más arriba (cianuro mM; NADH 30 μ M) son óptimas para la verificación del efecto de Stil.

Tabla IV-1. Influencia de las concentraciones relativas del cianuro y NADH sobre la curva de red-reox del cit. b.

A 562-575 nm prot 1.9 mg/ml. Vol. final 2.5 ml; citocromo b, 0.47 μ Moles/g; fosfato 0.1 M pH 7.4.

Sustrato NADH (μ M)	Adiciones CNK (mM)	Nivel de reducción (μ M)		
		Inicial	30 seg	2 min
30	0.5	0.18	0.09	0.03
	1	0.28	0.18	0.16
15	2	0.22	0.09	0.03
30	2	0.32	0.36	0.18
60	2	0.36	0.40	0.40
30	3	0.32	0.38	0.38

La prolongación de los pulsos de reducción de b por acción de Stil es proporcional a la concentración del inhibidor como lo muestra la Tabla IV-2, sea que la reducción de b se mida sobre la banda α (par 562-575 nm)

Tabla IV-2. Efecto de la concentración de Stil sobre la duración de los ciclos oxidoreducción del cit b por NADH

Prot. 1.6 mg/ml (A); 0.2 mg/ml (B); NADH 30 μ M, cianuro mM vol. final: 2.5 ml. Fosfato 0.1 M pH 7.4. Absorbancia medida a 562-575 (A) o 430-410 (B).

		Control	Stil (μ M)		
			3.7	7.5	15
Tiempo para máx red (seg)	Exp. A	10	30	55	75
	Exp. B	7	22	35	50
Valores relativos para la duración del ciclo		1	3	5	7

ó la banda de Soret (par 430-410 nm). También hay proporcionalidad entre la concentración de Stil y la inhibición de la reducción de b como lo muestra la Fig. IV-3. El 50 % de inhibición se obtiene con 2 μ M Stil.

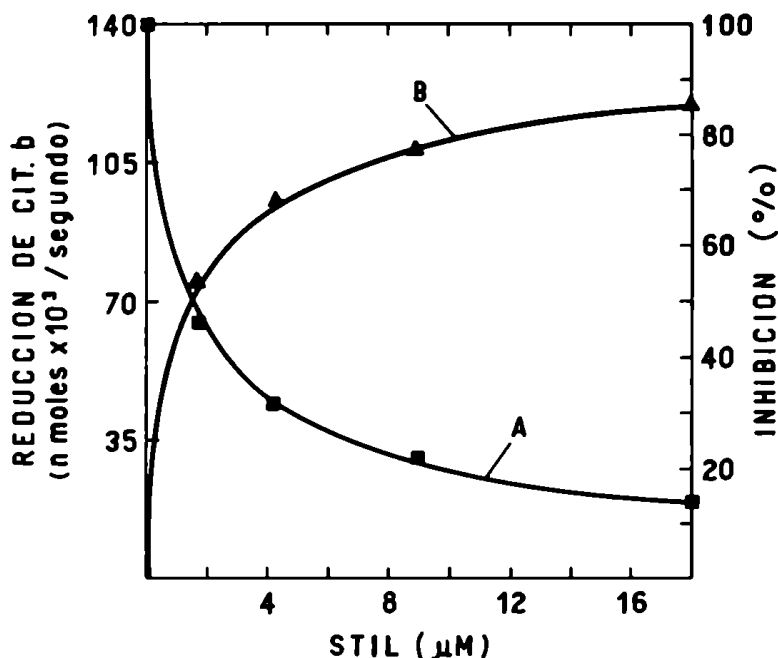


Fig. IV-3.- Acción inhibitoria de Stil sobre la reducción de cit. b. NADH-oxidasa, 1.6 mg/ml; fosfato 0.1 M, pH 7.4; cianuro 1.0 mM. NADH 30 μ M. Concentración de Stil indicada en la abscisa. Vol. final 2.5 ml. Cit. b (ditiocito; par 430-410 nm): 0.64 μ M. Línea A, velocidad de reducción de cit. b; B, efecto inhibitorio de Stil.

Especificidad del efecto de Stil. Inhibiciones similares a las descritas más arriba se obtienen con hexestrol y estilbestrol monometil eter. Por el contrario los dimetil éteres de estilbestrol y hexestrol son completamente inactivos (Tabla IV-3). La especificidad de los análogos

Tabla IV-3. Efecto de Stil y análogos sobre la reducción de cit. b por NADH.

1.6 (A) y 1.4 (B) mg/ml de NADH-oxidasa en fosfato 0.1 M, pH 7.4. CNK, 1.5 mM. Vol. total, 2.5 ml. Cit. b reducido con NADH (30 uM): 0.23 (A) y 0.36 (B) uM. En el exp. B la absorbancia de b se midió 430-410 nm.

Adiciones (uM)	Exp. A		Exp. B	
	Velocidad de reducción de <u>b</u> $(\frac{n \text{ mol}}{\text{seg}}) \times 10^3$	Inhibición de la reducción de <u>b</u> (%)	Velocidad de reducción de <u>b</u> $(\frac{n \text{ mol}}{\text{seg}}) \times 10^3$	Inhibición de la reducción de <u>b</u> (%)
Ninguna	100	--	110	--
Stil (9.0)	25	75	37	66
Stil (18)	13	87	20	82
Stil (36)	8	92	7	95
Stil-DME (18)	100	0	110	0
Stil-DME (36)	100	0	110	0
Stil-MME (18)	---	--	75	32
Hex (9.0)	50	50	---	--
Hex (18)	25	75	50	45
Hex (36)	8	92	37	66
Hex-DME (36)	100	0	110	0

respecto a la reducción del citocromo b es similar a la del sistema completo (NADH-oxidasa).

Comparación del efecto de Stil sobre la reducción del citocromo b por NADH, succinato y menadiol. En la cadena respiratoria intacta además del NADH, el citocromo b puede ser reducido por succinato y menadiol. La reducción por succinato es catalizada por la deshidrogenasa correspondiente y ubiquinona mientras que la reducción de b por menadiol es no-enzimática. Es conocida la rápida oxidación del menadiol por preparaciones tipo Keilin y Hartree insensible al Amytal, sensible al

cianuro y la antimicina A (1). La reducción del citocromo b por menadiol no es afectada por la antimicina A (2) lo que concuerda con el mecanismo no-enzimático aludido más arriba.

La Figura IV-4 muestra un conjunto de observaciones

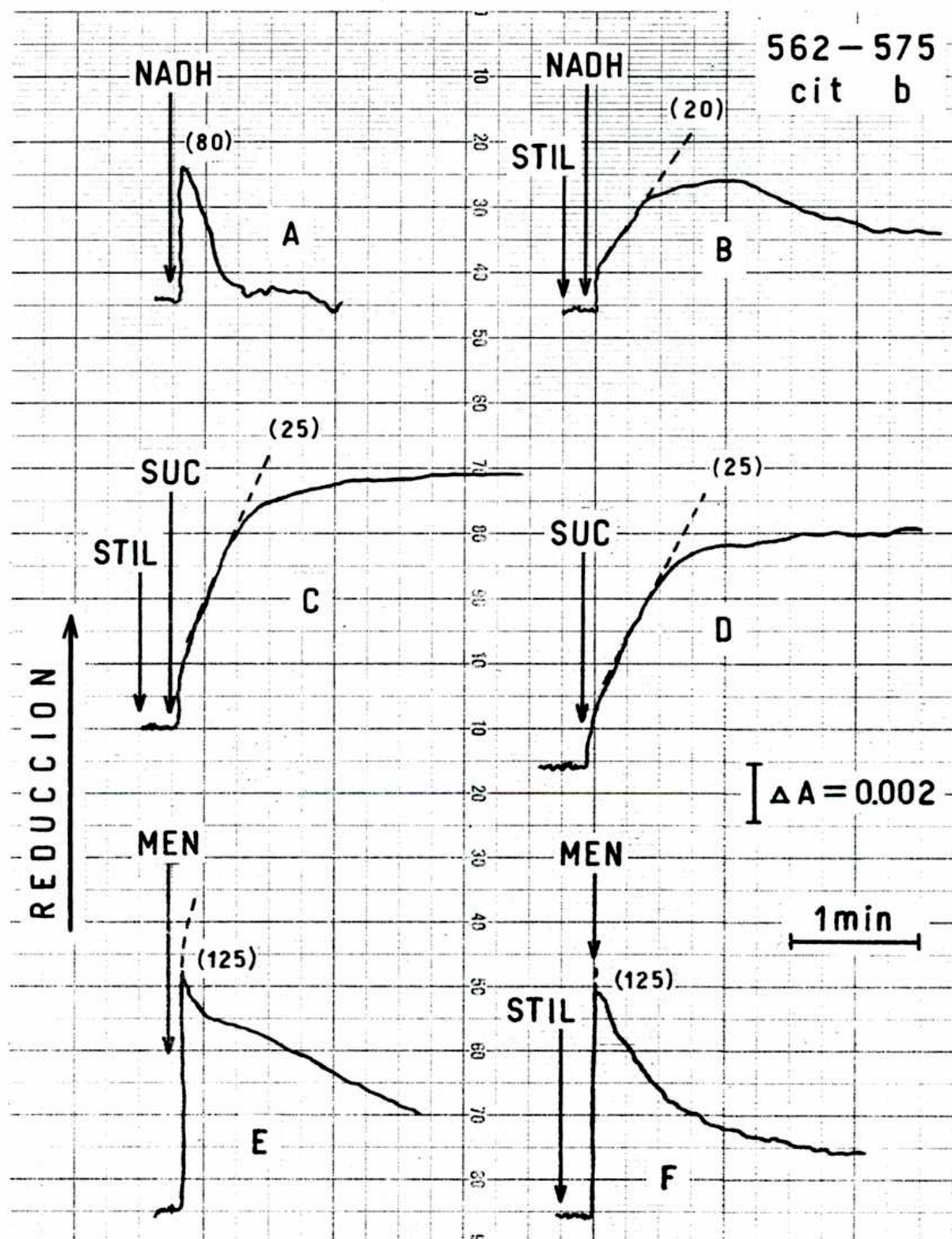


Fig. IV-4.- Acción de Stil sobre reducción de cit. b por NADH, succinato y menadiol.

NADH-oxidasa, 1.4 mg/ml, cianuro 1.0 mM; Stil 18 μ M; NADH 30 μ M, succinato 0.2 mM; menadiol 10 μ M fosfato 0.1 M, pH 7.4. Vol. final 2.5 ml; cit. b 0.5 μ mol/g prot. (ditionito). Las cifras indican velocidades promedio (nmoles/seg $\times 10^3$).

con los tres sustratos. En primer término llama la atención la lentitud de la reducción con succinato (expts. C y D) cuya curva toma la forma de una pseudo-reacción de primer orden. Con menadiol la reducción es aparentemente muy rápida.

A pesar de la diferencia anotada, Stil no afecta la reducción de b por succinato ó menadiol (Fig. IV-4; expts. C y F), en oposición a la inhibición con NADH (expts. A y B). Más aún, la reducción de b por menadiol es aparentemente acelerada por Stil (Fig. IV-4; expts. E y F).

Acción de Stil sobre la reducción del citocromo c.

Los tres sustratos citados en la acción anterior se emplearon para reducir a c. El NADH y el succinato actúan a través de las flavoproteínas respectivas mientras que la reducción de c por menadiol, sensible a la antimicina A, involucra inicialmente el citocromo b como se dijo más arriba. Si se comparan los registros de la Figura IV-5 con los de la Figura IV-4 se puede observar el sincronismo y la analogía en las formas de las curvas de reducción para los citocromos b y c con los tres sustratos mencionados, a saber NADH, succinato y menadiol. La reducción de c por succinato es también lenta lo que concuerda con la participación de b como intermediario en la reducción de c (Slater y Coolpa-Boonstra) (3). Sin embargo, atento a las condiciones experimentales dadas, las velocidades de reducción de c deben tomarse en forma relativa, a los efectos de verificar la acción del inhibidor.

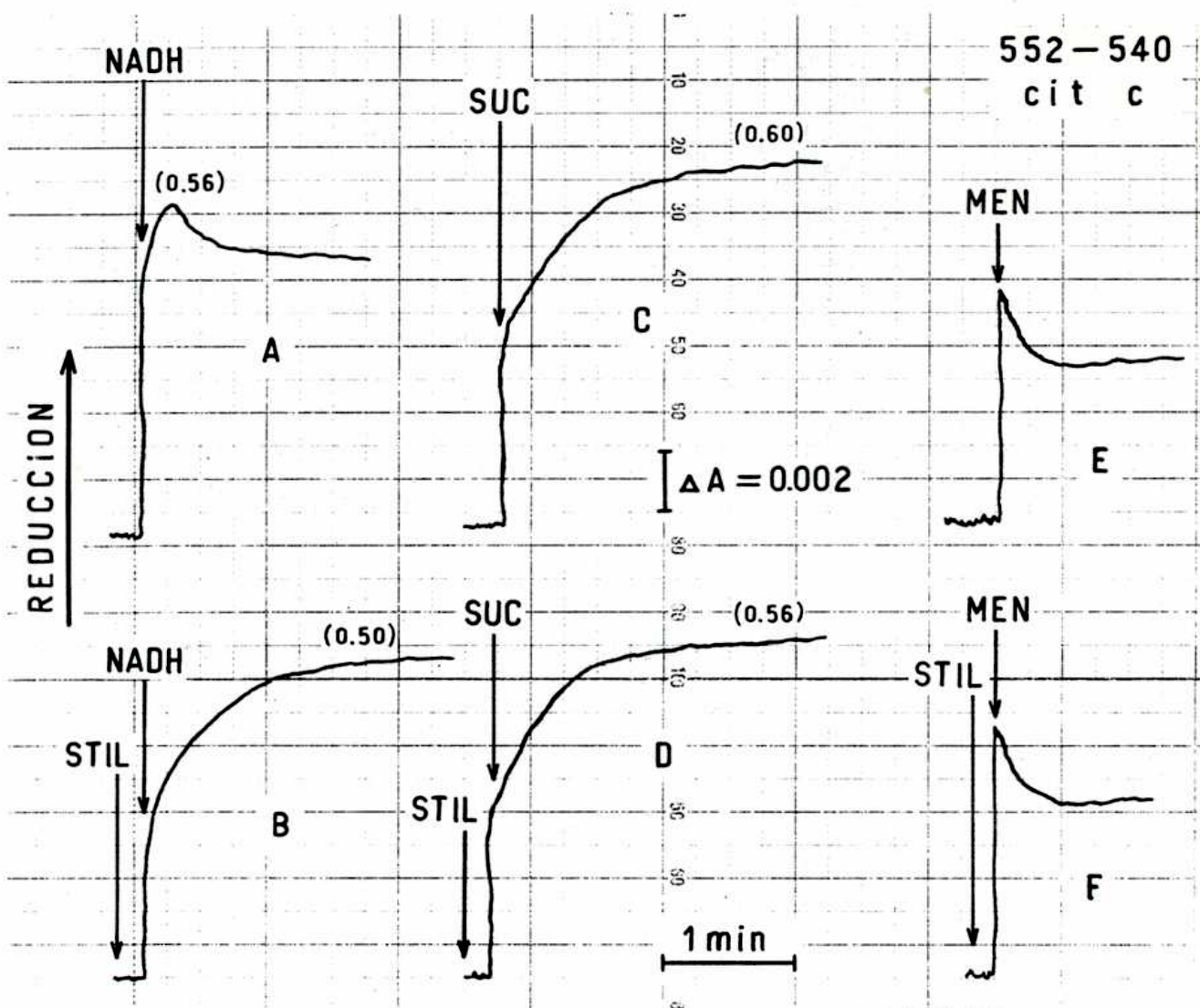


Fig. IV-5.- Acción de Stil sobre reducción de cit. c por NADH, succinato y menadiol.

NADH-oxidasa 1.4 mg/ml, cianuro 1.0 mM, 30 μ M, succinato 0.2 mM, menadiol 10 μ M; Stil 18 μ M; fosfato 0.1 M, pH 7.4. Vol. final 2.5 ml; cit. c 0.7 μ M (ditionito). Las cifras indican la concentración (μ M) de cit. c reducido.

La Figura IV-5 muestra que Stil inhibe la reducción de c con NADH como sustrato (expts. A y B). En cambio, no modifica la reducción de c con succinato y menadiol. Los experimentos con menadiol corroboran la inactividad de Stil, en la concentración empleada, sobre el sector b-c de la cadena de transporte de electrones.

Experimento en presencia de ascorbato. Chance (4) introdujo el ascorbato para eliminar la contribución de otros citocromos a la espectroscopía del citocromo b, pues este es el único que resiste la acción reductora del ascorbato. La validez de la proposición de Chance es confirmada por la Figura IV-6, que muestra la reducción total de c endógeno por el ascorbato en presencia de cianuro.

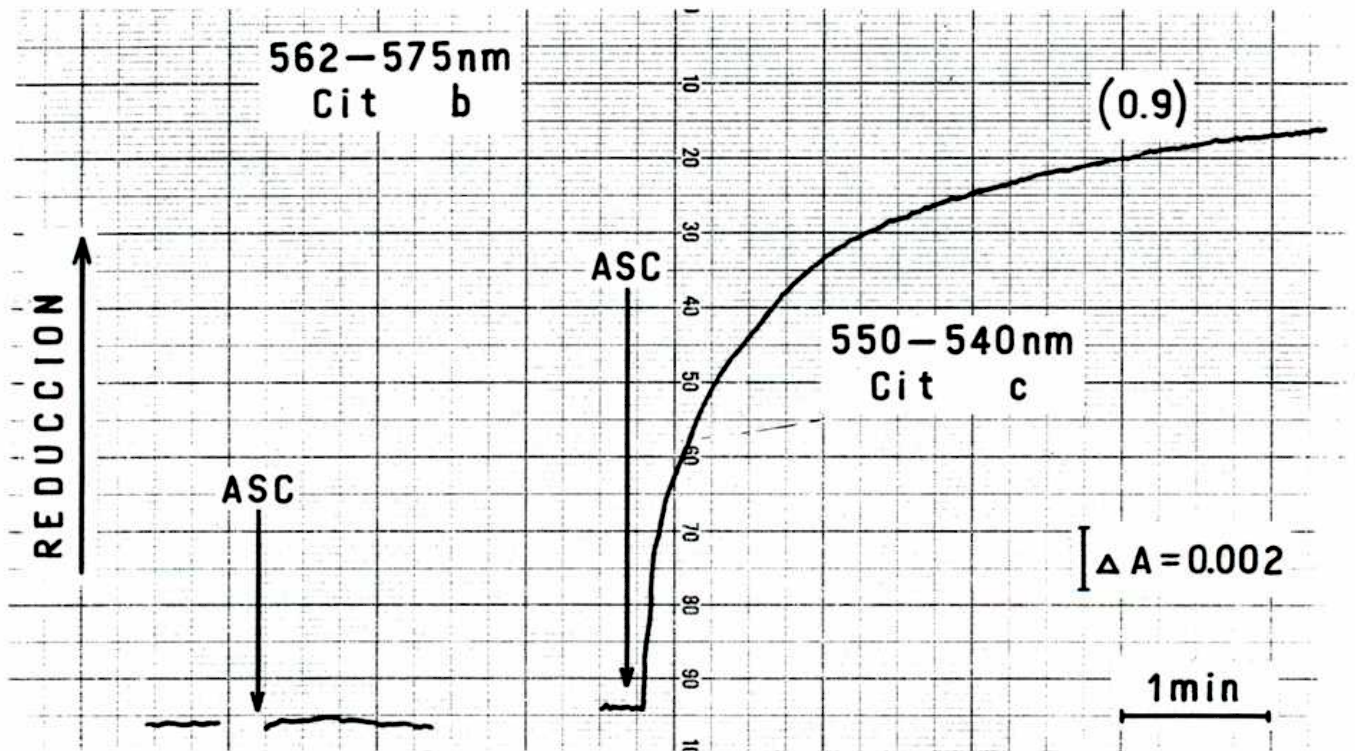


Fig. IV-6.- Reducción por ascorbato.

NADH-oxidasa 2.4 mg/ml; ascorbato 10 mM, cianuro 1.6 mM; fosfato 0.1 M, pH 7.4. Vol. final 2.5 ml. Las cifras indican concentración (μM) de cit. c reducido.

La Figura IV-7 muestra que la presencia de ascorbato modifica la cinética de los pulsos de reducción de b por el NADH. La reoxidación de b se hace más lenta. Además, la preincubación del sistema enzimático con ascorbato permite una reducción inicial más extensa de b, para las concentraciones utilizadas de NADH y cianuro. Los valores correspondientes se expresan en la Tabla IV-4.

Tabla (IV-4). Acción de ascorbato sobre la curva de red-reox del citocromo b en presencia de cianuro.

Prot.: 1.7 mg/ml CNK: 1 mM, ascorbato 10 mM, NADH 30 uM, Vol. final, 2.5 ml fosfato 0.1 M pH 7.4. Absorbancia medida a 562-575 nm.

Agregados	Nivel de reducción (uM)		
	Inst	30 seg	2 min
Control	0.22	0.06	0.03
Ascorbato	0.22	0.27	0.32
Ascorbato (preincubado 6 min.)	0.32	0.4	0.4

Reducción de b por NADH en presencia de Stil. Efecto del ascorbato. En presencia de ascorbato la curva de reducción del citocromo b es más intensa y prácticamente no hay reoxidación (Figura IV-7; experimentos A y C) a causa de la mayor anaerobiosis del sistema.

En este sistema el efecto de Stil: se magnifica (Figura IV-7; experimentos C y D).

La Tabla IV-5 expresa cuantitativamente estos resultados.

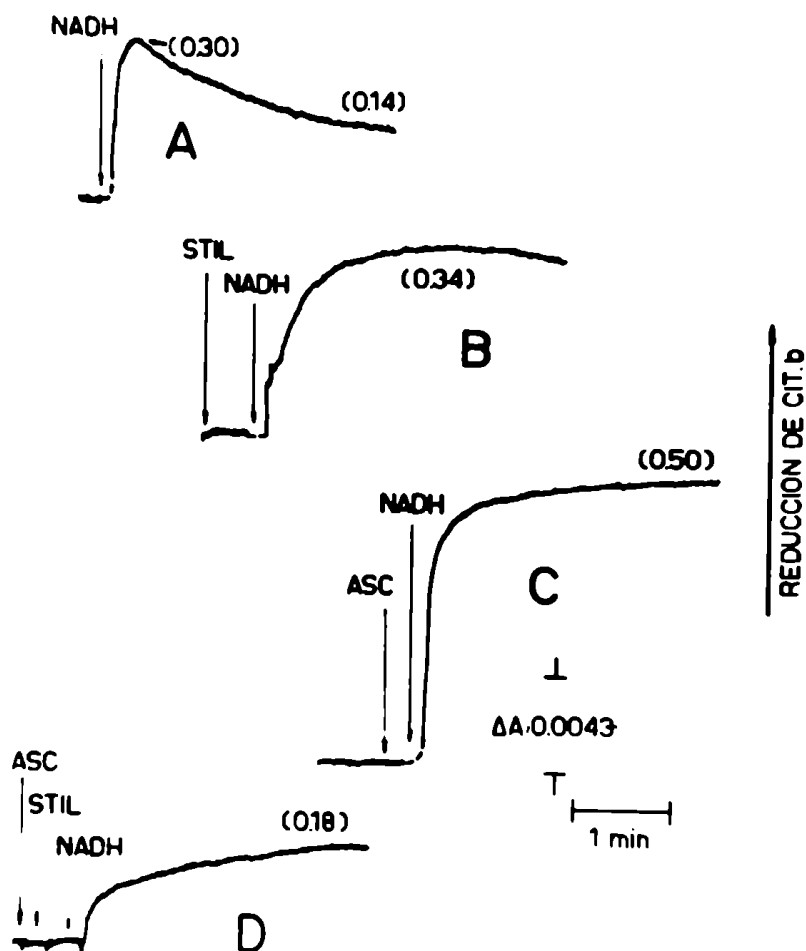


Fig. IV-7.- Efecto de Stil sobre la reducción de cit. b por NADH. Influencia del ascorbato.

NADH-oxidasa, 2.4 mg/ml; fosfato 0.1 M, pH 7.4; cianuro 2.0 mM. Donde se indica, NADH 30 μ M; ascorbato 10 mM; Stil 18 μ M. Vol. final 2.5 ml. Cit. b 0.75 μ M (ditionito). Las cifras entre paréntesis indican la concentración (μ M) de cit. b reducido.

Fig. IV- 7 a 12 , par 562-575 nm.

Tabla IV-5. Velocidad de reducción de citocromo b por NADH. Efecto de Stil en presencia de ascorbato.

Vol. final 2.5 ml. NADH 30 μ M, ascorbato 10 mM Stil 18 μ M cianuro 2 mM; fosfato 0.1 M pH 7.4.

Agregados	Velocidad de reducción del citocromo b (μ M/seg)
NADH	0.05
NADH + Stil	0.008
NADH + Ascorbato	0.065
NADH + Ascorbato + S ^T il	0.002

Efecto de Stil sobre la reducción de b por NADH y succinato. En presencia de ascorbato, Stil tampoco afecta la reducción de b por succinato (Figura IV-8; expts. A y B). Por otra parte, el exp. C muestra que la presencia de Stil no altera la reducción de b por succi-

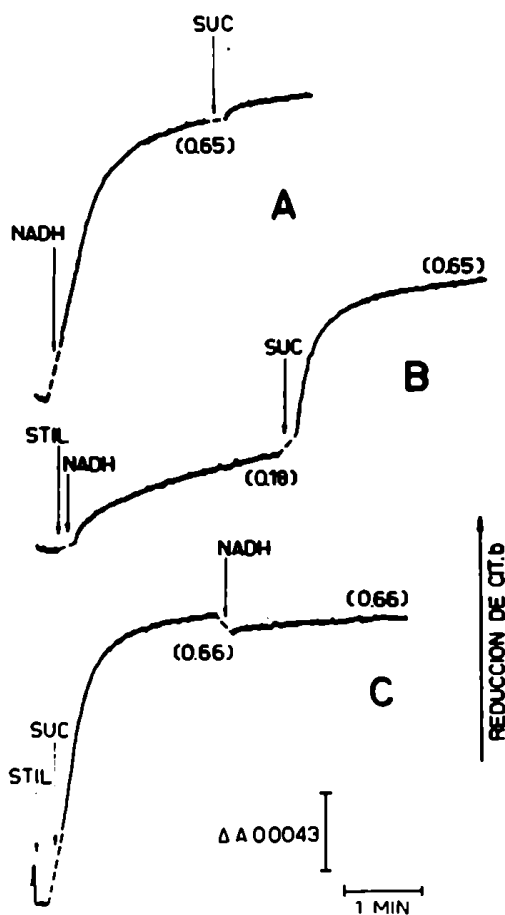


Fig. IV-8.- Reducción de cit. b por succinato en presencia de Stil. NADH-oxidasas, 2.8 mg/ml; fosfato 0.1 M, pH 7.4; ascorbato 10 mM; cianuro 2.0 mM; donde se indica, NADH 60 μ M y succinato 0.2 mM. Cit. b (ditiotionito): 1.1 μ M. Las cifras entre paréntesis significan nivel (μ M) de b reducido.

nato cuando este último se agrega antes que el NADH. En estas condiciones, ambos sustratos producen independientemente el mismo nivel de reducción de b.

Anulación por antimicina A del efecto de Stil sobre la reducción de b. La antimicina A inhibe la cadena de transporte de electrones entre los citocromos b y c (5). En nuestros registros se observa un marcado aumento de la reducción de b por NADH cuando se opera en presencia de antimicina A + cianuro, respecto al testigo sin anti-

micina A. Estos efectos repiten observaciones anteriores de Chance (4). En esas condiciones, la presencia de Stil no modifica la reducción de b por NADH (Tabla IV-6).

Tabla IV-6. Efecto de Antimicina A sobre reducción del citocromo b , en presencia y ausencia de Stil.

Prot.: 1.6 mg/ml, NADH 30 μ M, CNK: mM. Citocromo b 0.7 μ M;
 Stil: 15 μ M; AA: 0.6 μ g/mg proteína; fosfato 0.1 M pH 7.4.
 Absorbancia medida a 562-575 nm.

Agregados	Nivel de reducción (μ M)		
	Inst	30 seg	2 min.
Control	0.23	0.11	---
Stil	0.09	0.12	---
A.A.	0.46	0.46	0.46
AA + Stil	0.46	0.46	0.46

Un efecto similar ocurre cuando Stil se añade a la preparación en presencia de antimicina A + cianuro (Figura IV-9; expts. A y B). En esas condiciones no hay efecto de Stil, en oposición a lo que ocurre con el testigo sin antimicina A.

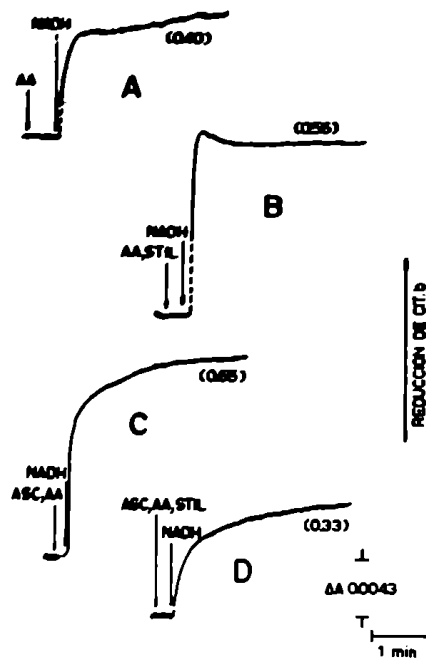
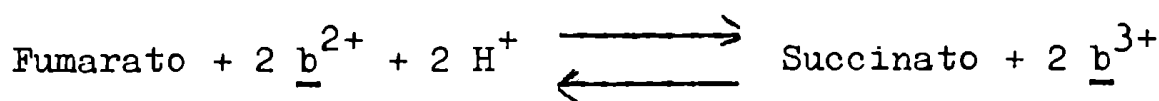


Fig. IV-9.- Efecto de Stil en presencia de antimicina A.
 NADH-oxidasa, 2.4 mg/ml; fosfato 0.1 M, pH 7.5; cianuro 1.6 mM. Donde se indica, ascorbato 10 mM; antimicina A (AA), 0.4 μ g/mg proteína; NADH 30 μ M y Stil 18 μ M. Cit. b (ditiocito): 0.75 μ M. Las cifras entre paréntesis significan nivel (μ M) de b reducido.

El ascorbato cotrarresta la acción de la antimicina A y el efecto de Stil se restablece (Figura IV-9; exp. C). Como se observa en la Figura IV-9; exp. D, la velocidad de reducción de b y el nivel de reducción recuerdan los de la Figura IV-7 y Tabla IV-5, en ausencia de antimicina A. El efecto del ascorbato resulta inesperado, pues ambas sustancias debieran actuar sinérgicamente reduciendo un eventual escape de electrones hacia el oxígeno a nivel del citocromo b, a saber, la antimicina A por inhibición de la cadena, y el ascorbato por competencia frente al citocromo c, y en última instancia al oxígeno.

Oxidación de b por fumarato en presencia de Stil.

Los registros de las Figuras IV-1 y IV-2 muestran que Stil, inhibe la reducción de b, por NADH, y al mismo tiempo retardan la reoxidación de b reducido, en los pulsos de oxido-reducción de b. Por otra parte, en condiciones en las que se magnifica el efecto de Stil sobre la reducción de b, como es la presencia de ascorbato, la adición de Stil desplaza a b hacia un mayor nivel de oxidación (Figura IV-10). A fin de establecer si esas variaciones de b se deben a una reacción directa con Stil ó a un bloqueo del flujo de electrones en otros sitios de la cadena, se realizaron los experimentos siguientes. En primer lugar, el Stil no interfiere con la oxidación de b reducido por fumarato. Esta reacción, muy rápida está representada según Chance (6) por la ecuación



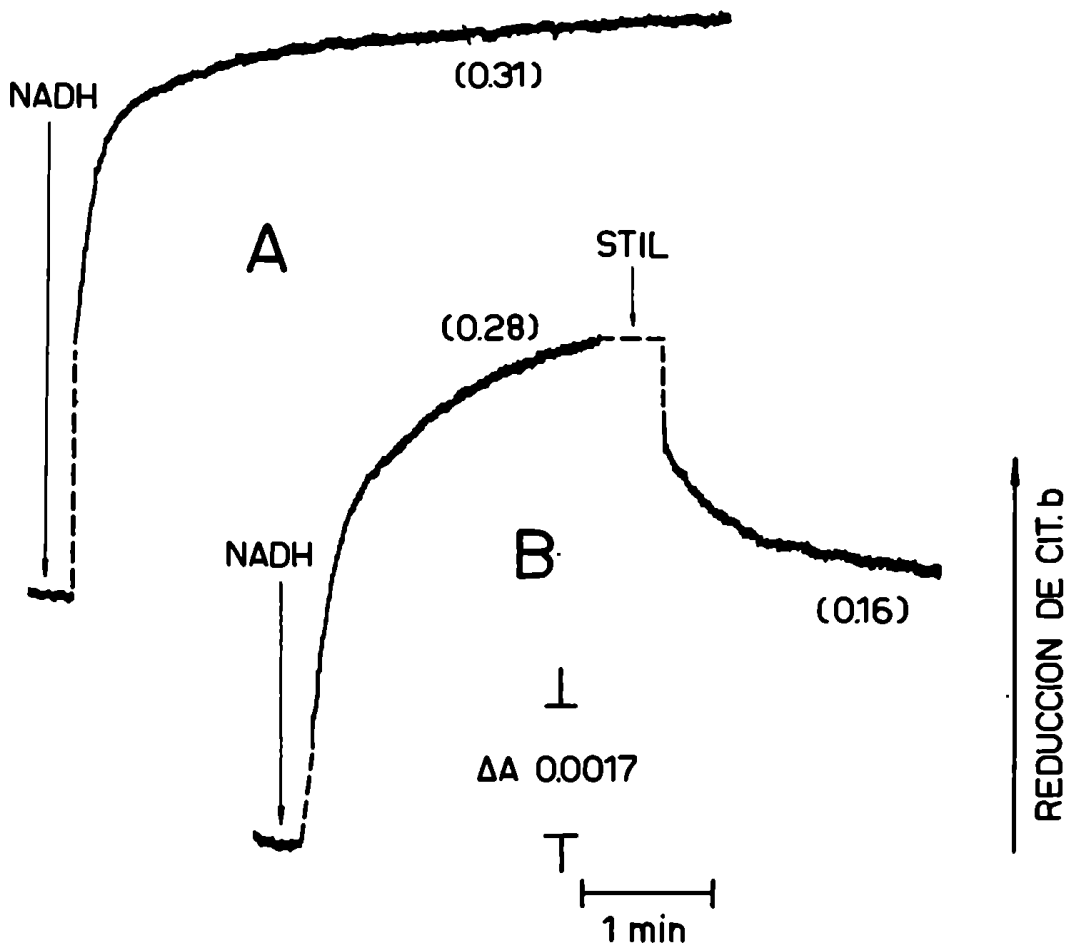


Fig. IV-10. Efecto de Stil sobre cit. b reducido por NADH.
 NADH-oxidasa 1.7 mg/ml; cianuro 2 mM; ascorbato 10 mM; NADH 25 uM;
 Stil 25 uM, cit. b 0.35 umoles/g prot. (ditionito); fosfato 0.1 M,
 pH 7.4. Vol. final 3 ml. Las cifras indican concentración (uM) de
 cit. b reducido.

La reacción es catalizada por la succinato deshidrogenasa. El experimento se realiza como lo muestra la Figura IV-11. El citocromo b se reduce con NADH; alcanzado el estado estacionario, se agrega fumarato que oxida parcialmente a b como consecuencia del creciente equilibrio (fumarato)/(succinato). Si la adición de fumarato se efectúa en presencia de Stil, no se encuentran diferencias respecto al testigo, Los porcentajes de reducción se presentan en la Tabla IV-7.

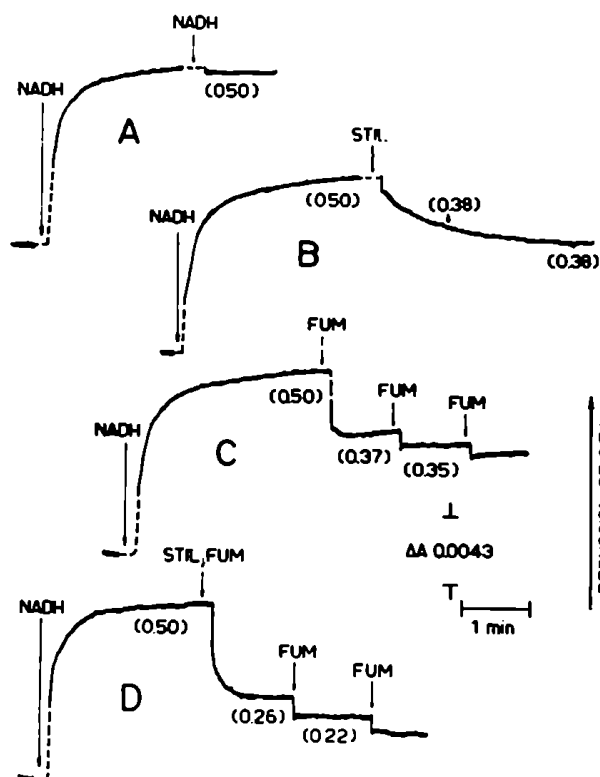


Fig. IV-11.- Reoxidación de cit. b en presencia de Stil y fumarato. NADH-oxidasa, 2.8 mg/ml; fosfato 0.1 M, pH 7.4; cianuro 1.0 mM; ascorbato 10 mM. Donde se indica NADH 30 μ M; Stil 18 μ M y fumarato (cada adición), 1 mM. Cit. b (ditionito): 1.1 μ M. Las cifras entre paréntesis indican la concentración (μ M) de cit. b reducido.

Tabla IV-7. Efecto de Stil y fumarato sobre la oxidación de cit. b reducido.

Condiciones experimentales como en la Fig. IV-11. Tiempo de incubación con adición: 1 min.

Expt.	Adiciones	Concentración de cit. b reducido (μ M)	Reoxidación de cit. b (%)
A	Ninguna	0.50	0
B	Estilbestrol 18 μ M	0.38	24
C	Fumarato 1 mM	0.37	26
D	Estilbestrol 18 μ M + Fumarato 1 mM	0.26	48 (B+C=50)

En contraste con los resultados descriptos más arriba están los obtenidos con la quinona Q_2 como oxidante (Figura IV-12 y Tabla IV-8). Q_2 aumenta el nivel de oxidación de b y esta oxidación aparente es inhibida por Stil, en cuanto a la suma de la oxidación alcanzada en presencia de Stil ó Q_2 , respectivamente. Así, la adición de Q_2 aparentemente oxida b (reducido) en 77 %; una

segunda adición de Q_2 oxida a b 85 % (Figura IV-12; exp. A). En el exp. C, la adición simultánea de Stil y Q_2 alcanza un nivel menor al correspondiente a Q_2 sola. Si se agrega primero Stil y luego Q_2 el efecto de esta última también disminuye frente al control (Figura IV-12; exp. D). La Tabla IV-8 muestra las variaciones porcentuales del nivel de oxidación de b en las condiciones descriptas.

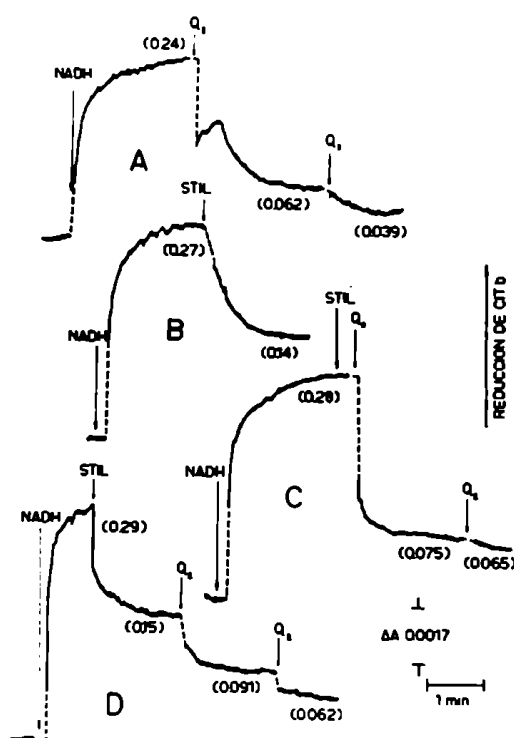


Fig. IV-12.- Reoxidación de cit. b en presencia de Stil y CoQ_2 . NADH-oxidasa, 1.8 mg/ml; fosfato 0.1 M, pH 7.4; cianuro 1 mM y ascorbato 10 mM. Donde se indica, NADH 30 μ M; Stil 18 μ M y $CoQ_2(Q_2)$, 12 μ M. Cit. b (ditiotionito) 0.6 μ M. Las cifras entre paréntesis significan nivel (μ M) de b reducido.

Tabla IV-8. Efecto de Stil y CoQ_2 sobre la oxidación de cit. b reducido.

Condiciones experimentales como en la Fig. IV-12. Tiempo de incubación con adición: 1 min.

Expt.	Adiciones	Reoxidación de cit. b (%)
	Ninguna	0
A	1) CoQ_2 12 μ M	77
	2) CoQ_2 12 μ M	85
B	1) Stil 18 μ M	48
C	1) Stil 18 μ M + CoQ_2 12 μ M	72($A_1+B_1=121$)
	2) CoQ_2 12 μ M	76
D	1) Stil 18 μ M	45
	2) CoQ_2 12 μ M	66($A_1+B_1=121$)
	3) CoQ_2 12 μ M	77

Titulación del efecto de Stil sobre la reoxidación de b. A medida que aumenta la concentración de Stil se verifica un aumento en la velocidad de reoxidación de b (Figura IV-13). Los valores correspondientes se toman por la velocidad inicial de la reoxidación, a partir del

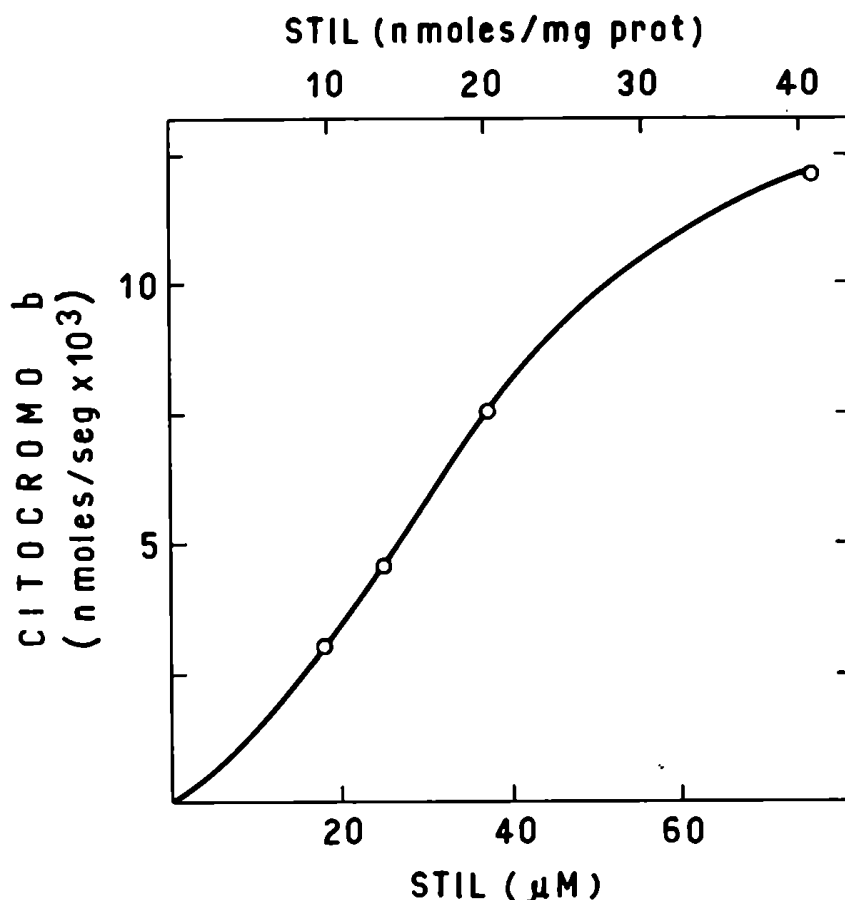


Fig. IV-13.- Titulación del efecto de Stil; sobre cit. b reducida por NADH.
 NADH-oxidasa, 1.8 mg/ml; NADH 37.5 μM ; cianuro mM cit. b reducido (sustrato) 0.3 μM (ditionito) 0.4 $\mu\text{mol/g}$ prot. fosfato 0.1 M, pH 7.4. Vol. final 3 ml.

momento de adición de Stil. Si el medio tiene ascorbato, las velocidades iniciales aumentan en concordancia con el efecto del ascorbato sobre el efecto primario de Stil ó sea la disminución del flujo de electrones entre NADH y b (Figura IV-7 y Tabla IV-5).

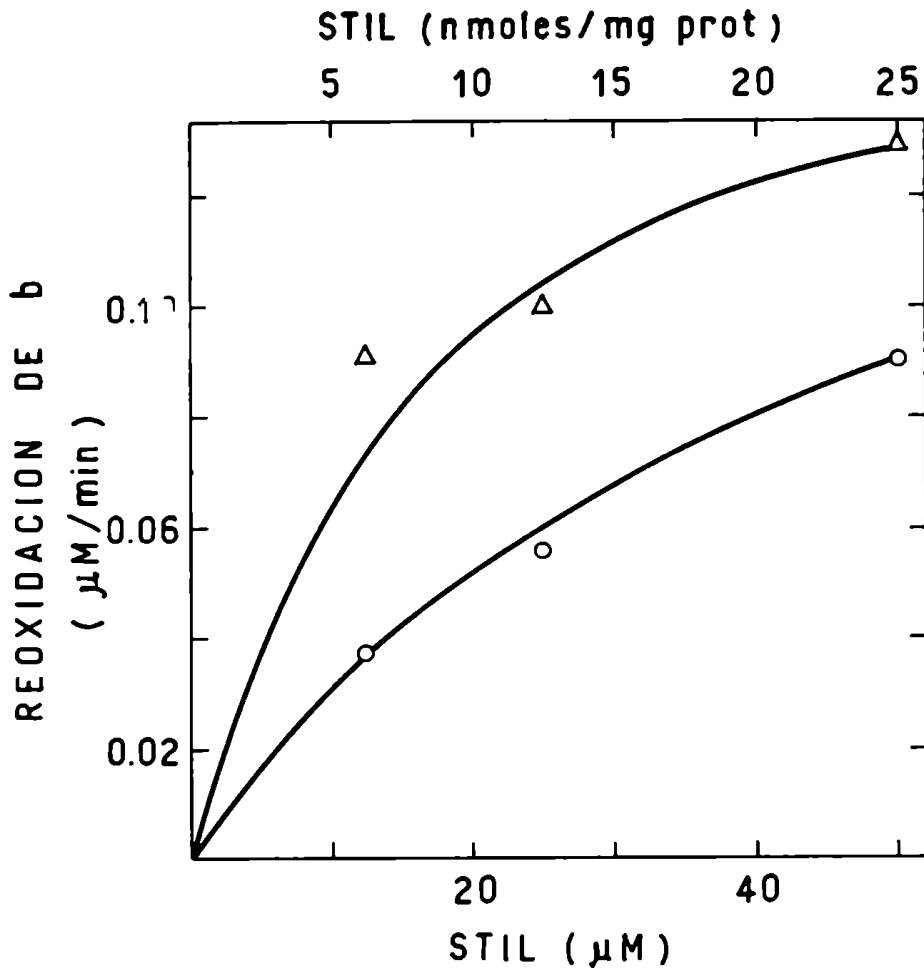


Fig. IV-14.- Titulación de la reoxidación aparente de b por Stil en presencia y ausencia de ascorbato.
 Iguales condiciones que en la Figura IV-13. Δ Ascorbato 10 mM \circ sin ascorbato.

Efecto de la antimicina A sobre la reoxidación de b por el estilbestrol. Es bien conocido (4) el aumento en la extensión y velocidad de reducción de b cuando se agrega antimicina A al sistema. En la Figura IV-15 se muestra un registro típico de la secuencia del desplazamiento.

Primero se reduce a b por agregado de NADH. Cuando se alcanza el nivel máximo de reducción, se agrega Stil, que lo desplaza en el sentido de la oxidación; finalmente, la adición de antimicina A produce una nueva reducción, muy lenta que lo lleva prácticamente al primer nivel de reducción. Este proceso muestra que antimicina A es capaz de aumentar la velocidad de reducción

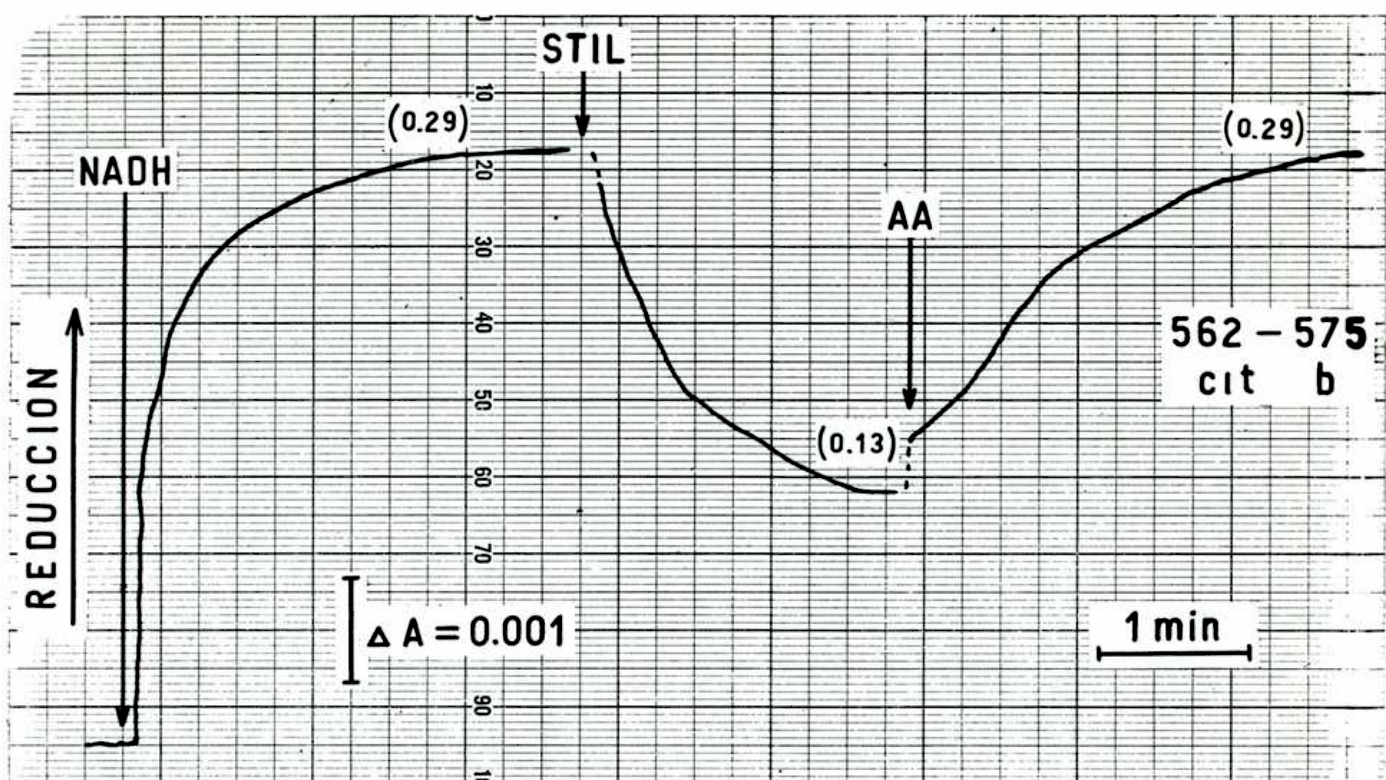


Fig. IV-15.- Efecto de antimicina A sobre la aparente reoxidación de b por Stil.

NADH-oxidasa 1.9 mg/ml; NADH 37.5 μ M; Stil 75 μ M; cianuro 2 mM; antimicina A (A.A) 0.15 μ g/mg prot; fosfato 0.1 M, pH 7.4. Vol. final 3 ml. Las cifras representan niveles (μ M) de reducción de cit. b.

de b oxidado, que prevalece entonces sobre la lenta reoxidación producida por Stil.

Con succinato como sustrato Stil no afecta el nivel de óxido-reducción de b, como era previsible (Figura IV-16; exp. A). En las condiciones descritas la adición de Stil no oxida a b reducido por succinato. El agregado de antimicina A aumenta el nivel de reducción de b que no se modifica posteriormente por adición de Stil (exp. B).

Acción de Stil sobre citocromo c reducido por NADH.

En contraposición a los resultados obtenidos respecto al citocromo b, la adición de Stil no afecta el nivel de reducción de c (c + c₁) por NADH (Figura IV-17).

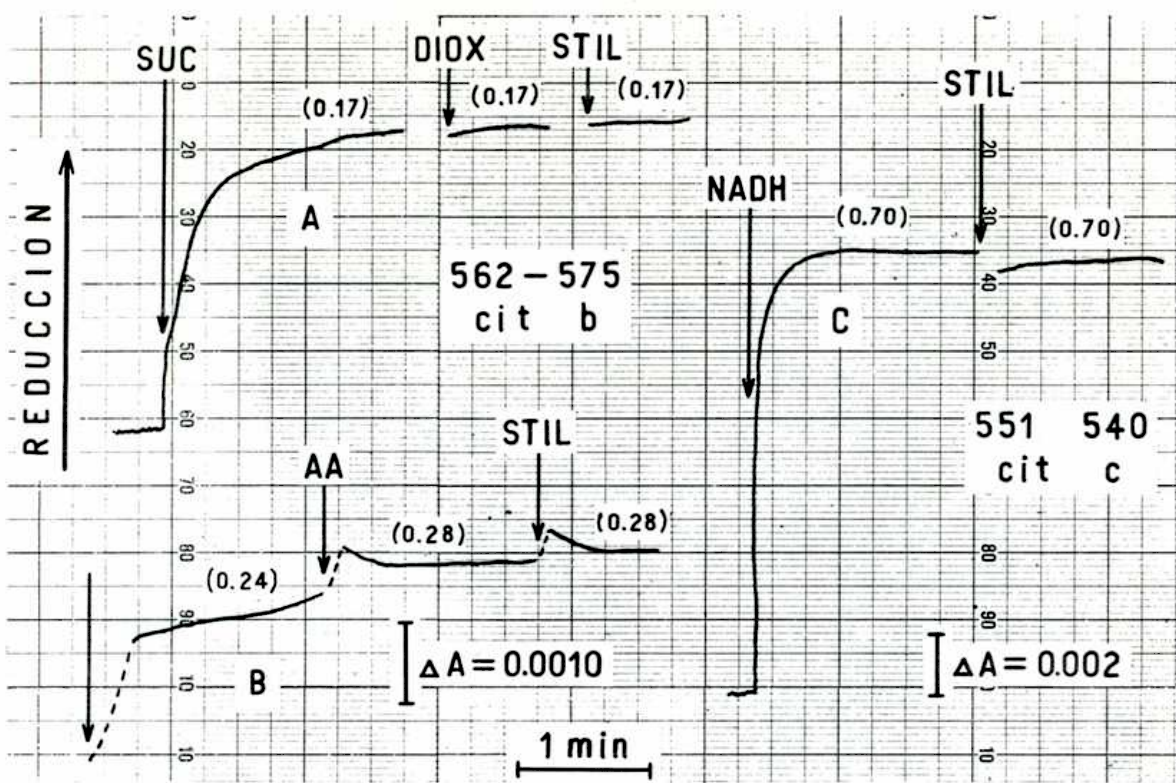


Fig. IV-16.- Efecto de Stil sobre b reducido por succ. y por NADH en presencia de AA.

A) NADH-oxidasa, 1.8 mg/ml; cianuro mM; ascorbato 10 mM; succinato 0.2 mM; Stil 18 μ M. B) igual anterior exp. A; NADH 37.5 μ M, AA 0.16 μ g/mg prot; Stil 75 μ M; fosfato 0.1 M, pH 7.4. Las cifras indican concentración (μ M) de cit. b reducido. Vol. final 3 ml. Cit. b reducido μ M 0.7 (ditionito).

Fig. IV-17.- Efecto de Stil sobre cit. c reducido por NADH.

NADH-oxidasa, 1.9 mg/ml; NADH 25 μ M; cianuro mM; cit. c reducido 0.9 μ M (ditionito); Stil 75 μ M; fosfato 0.1 M, pH 7.4. Vol. final 3 ml. Las cifras indican concentración (μ M) de cit. c reducido.

Las condiciones experimentales son idénticas en ambos casos, lo que excluye aparentemente la participación de c en la reoxidación de b.

Efecto de Stil sobre la reducción de flavoproteínas (absorbancia a 465-510 nm) Para investigar el efecto de Stil sobre la NADH flavoproteína se determinaron las variaciones de absorbancia con el par 465-510 nm. Es importante recordar que en la misma zona absorbe la deshidrogenasa succínica. La acción de Stil se ensayó en dos condiciones diferentes, primero con cadena abierta y luego, con cadena parcialmente inhibida. En el primer caso la reducción de la flavoproteína por NADH es muy rápida y variaciones eventuales de la reducción quedan indeterminadas, por las condiciones experimentales da-

das. En cambio, la reoxidación de la flavoproteína es retardada por la adición de Stil (Figura IV-18). En la Tabla IV-9 se dan datos del tiempo necesario para la reoxidación del 50 % de la flavoproteína reducida ini-

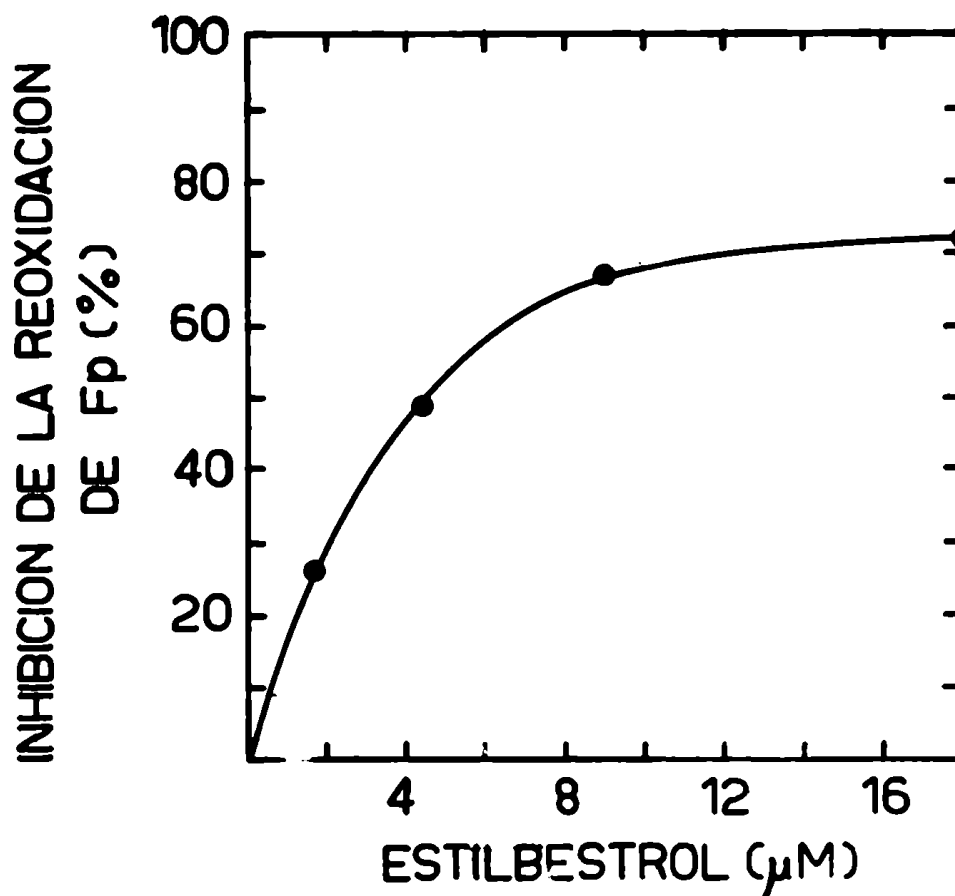


Fig. IV-18.- Efecto de Stil sobre la oxidación aeróbica de la flavoproteína reducida.

NADH-oxidasa, 1.4 mg/ml; fosfato 0.1 M, pH 7.4. Vol. final 2.5 ml.

Fp, flavoproteína (par 465-510 nm reducida con NADH 0.3 mM).

cialmente por NADH. Estos valores coinciden con observaciones de Varricchio y Sanadi (I-40).

Tabla IV-9. Efecto de Stil sobre la oxidación aeróbica de la flavoproteína reducida.

1.4 mg/ml de NADH-oxidasa en fosfato 0.1 M, pH 7.4. Vol. total, 2.5 ml. Fp, flavoproteína (par 465-510 nm; reducida con NADH 0.3 mM): 0.46 µM (1.15 nmoles).

Stil (µM)	Tiempo de reoxidación del 50% de Fp (seg.)	Inhibición de reoxidación de Fp (%)
0	100	--
1.8	135	26
4.5	195	49
9.0	300	67
18	360	72

Con el sistema parcialmente inhibido a nivel de la citocromo oxidasa (Figura IV-19) es factible una discriminación más precisa del efecto de Stil sobre los componentes flavoproteicos. La Figura IV-19 muestra que la adición de NADH determina una reducción inicialmente rápida que se estabiliza en un nivel estacionario. En esas condiciones, la adición de Stil (25 μM) produce

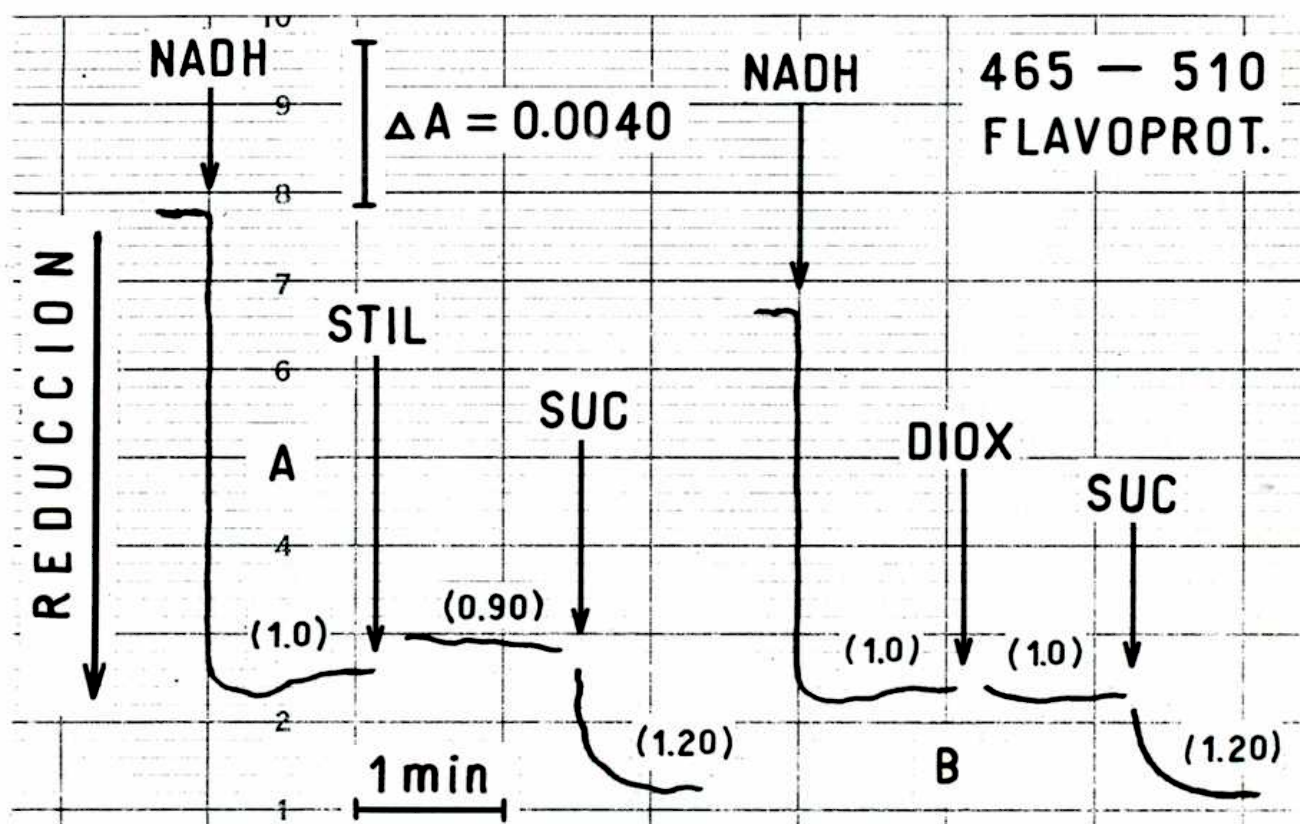


Fig. IV-19.- Efecto de Stil sobre la flavoproteína (Fp) reducida por NADH.

NADH-oxidasa, 1.8 mg/ml; NADH 25 μM ; cianuro 3 mM; Stil 25 μM ; succ, 0.6 mM. Flavoproteína reducida 2.8 μM (ditionito); fosfato 0.1 M, pH 7.4. Vol. final 3 ml. Las cifras indican nivel (μM) de reducción.

una ligera aunque significativa oxidación, que sugiere la presencia de un componente oxidable, situado del lado del oxígeno respecto al sitio sensible a Stil. En esas condiciones, la adición de succinato reduce por una parte al componente indicado y por otra, a la deshidrogenasa succínica como lo demuestran los respectivos controles.

Experimentos similares se han realizado en presencia de ascorbato (Figura IV-20). Con ascorbato la extensión

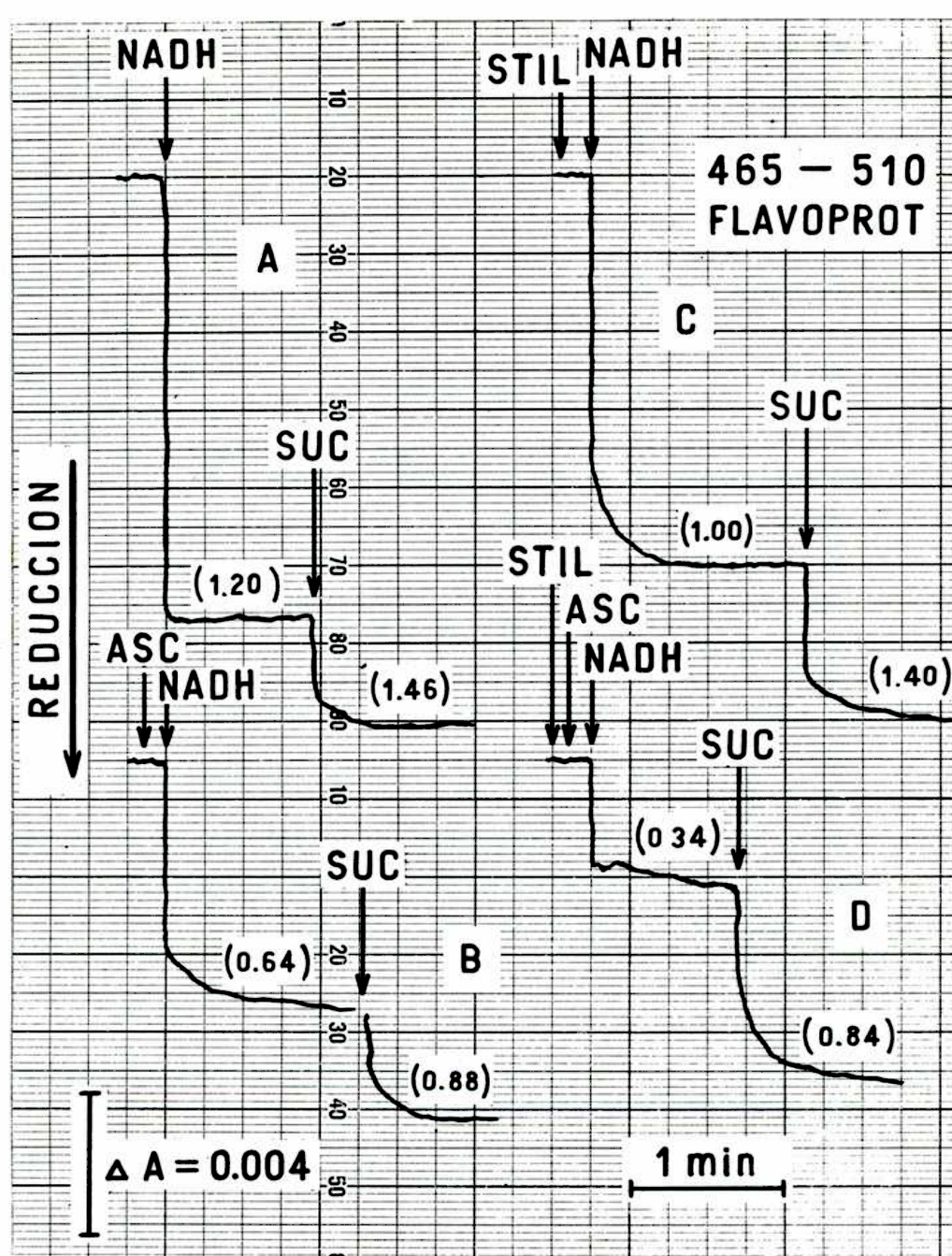


Fig. IV-20.- Efecto de Stil sobre la reducción a 465-510 nm en presencia y ausencia de ascorbato.

NADH-oxidasa 1.8 mg/ml; NADH 25 μ M succinato 0.6 mM; cianuro 2 mM; ascorbato 10 mM; Stil 25 μ M; (ditionito) 3.2 μ M; fosfato 0.1 M, pH 7.4. Vol. final 3 ml. Las cifras significan nivel de reducción (μ M).

de la reducción causada por la adición de NADH se reduce significativamente (40 %, en experimentos A y B). Por otra parte, el efecto de Stil se magnifica pues alcanza un valor de 50 % de la reducción inicial (expts. C y D) mientras que en ausencia de ascorbato fué de 10 % (Fi-

gura IV-20). En la Figura IV-20, la adición de succinato completa la reducción de la flavoproteína hasta el nivel de los testigos correspondientes (expts. A y B). Es oportuno destacar que en ausencia de ascorbato el agregado previo del Stil determina una velocidad bifásica para la reducción de la flavoproteína, que disminuye notoriamente después de alcanzar el 50 % de reducción (exp. C) mientras que en ausencia de Stil (exp. A) la velocidad de reducción es aparentemente instantánea.

Discusión

Los resultados descriptos en la Figura IV-1 y 2 muestran que Stil inhibe la reducción del citocromo b por NADH como sustrato. Este efecto es proporcional a la concentración del inhibidor en la relación que se observa en la Figura IV-3. Además los análogos del estilbestrol, hexestrol y en menor proporción Stil-MME, producen efectos similares (Tabla IV-3). En cambio los dimetil éteres, tanto de Stil como de hexestrol, son completamente inactivos. Es importante señalar, que la respuesta de la NADH oxidasa y del sector NADH-b a los estilbenos ensayados, concuerda con la actividad fisiológica de los mismos, ya que los derivados dialquilados de los estrógenos sintéticos, son fisiológicamente inactivos. (7)

Por otra parte, Stil y análogos actúan con la misma especificidad sobre la respiración mitocondrial, sobre la NADH-oxidasa y sobre el sector NADH-b. Concuerda además el orden de la concentración para un 50 % de inhibición, con el sistema completo, de donde la velocidad de reducción del citocromo b, constituye un nuevo parámetro en el estudio de la inhibición. El uso de succinato y menadiol como sustratos (Figura IV-4) demuestra en las condiciones experimentales descriptas, en especial de concentración, Stil

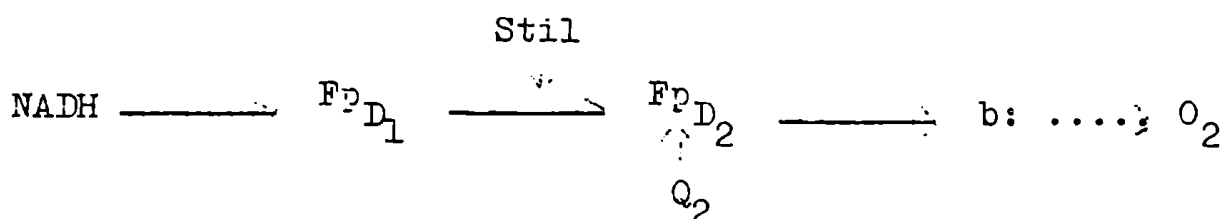
y análogos no actúan sobre la cadena respiratoria del lado del oxígeno, respecto al citocromo b tal como se observa en mitocondrias fosforilantes (I-40,51). En efecto, no se observa acción de Stil sobre la reducción del citocromo c por menadiol ni con succinato como sustrato.

Varios hechos coincidentes parecen demostrar que el citocromo b, no es afectado directamente por los estrógenos, sino a través de un sitio anterior en la cadena respiratoria. En efecto, a) el succinato es capaz de reducir a b, en presencia de Stil hasta igual extensión que en los testigos (Figura IV-8); b) el estilbestrol no altera la reoxidación por fumarato de b reducido (Figura IV-11 y Tabla IV-7). En esas condiciones el citocromo b parece moverse libremente, en un equilibrio sumamente sensible al flujo de electrones desde el NADH, a pesar del bloqueo por cianuro. Por otra parte, la adición de Stil determina la reoxidación de b reducido por NADH, en presencia de cianuro ó cianuro + ascorbato. Cualquiera sea el mecanismo de esta oxidación, ello permite concluir que en aparente oposición a los experimentos descritos en IV-1 y IV-2, Stil no afecta en forma directa la oxidación ni la reducción de b.

Con la hipótesis enunciada concurda el efecto de Stil sobre los niveles de óxido-reducción de las flavoproteínas de la cadena de transporte de electrones (Figuras IV-19 y 20). En estado estacionario de reducción de flavoproteínas, la adición de Stil produce una oxidación parcial, reversible por adición subsiguiente de succinato. En relación a estas variaciones en el nivel de óxido-reducción de las flavoproteínas es oportuno mencionar que recientemente (8,9) se han descrito dos flavoproteínas transportadoras de electrones en el si-

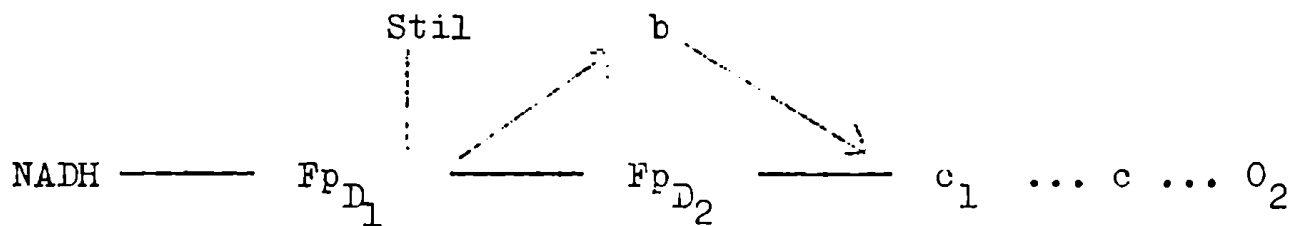
tio I. Una de ellas estaría situada del lado del sustrato NADH y la otra del lado oxígeno, respecto al sitio sensible a la rotenona. Los resultados presentados en las Figuras IV-19 y IV-20 indican una acción similar del estilbestrol. Más adelante se volverá sobre la cuestión.

El desplazamiento en el sentido de la oxidación de b (reducido por NADH) que muestran la Figura IV-12 y la Tabla IV-8 por agregado de Q_2 al sistema, pueden también interpretarse como disminución en la velocidad de reducción de b con respecto a la oxidación y desplazamiento del equilibrio a un nivel superior de oxidación. La quinona exógena toma electrones provenientes del NADH rápidamente, probablemente a nivel de la segunda flavoproteína postulada (8,9) y compite con la mayor eficacia por el flujo de electrones hacia el b. No escapan electrones hacia los citocromos ya que en otros experimentos se vió que la antimicina A no es capaz de aumentar la actividad NADH- Q_2 reductasa. El estilbestrol por su parte bloquea la llegada de electrones al citocromo b (Figura IV-2,3). También inhibe la NADH- Q_2 reductasa (I-35) de donde resultaría la aparente menor eficiencia de Q_2 para oxidar a b en presencia de Stil.



El esquema propuesto es difícilmente conciliable con los siguientes hechos 1) la pequeña reoxidación de Fp_{D_2} obtenida por Stil en el sistema cerrado (Figura IV-19) en contraste con la reoxidación de b (Figura IV-10) y

2) valores intermedios de oxidación aparente de b en presencia de ambos Q_2 y Stil, dada la conocida eficacia de Q_2 para tomar electrones que llegaran hasta ese nivel (Fp_{D_2}). Los hechos experimentales observados se explican mejor si se supone que luego del sitio de inhibición por Stil, llegan electrones al b y al resto de la cadena vía Fp_{D_2} , en forma para la cual ó sea el citocromo b ubicado fuera de la cadena principal



Según criterios cinéticos se había observado un comportamiento diferente del b en estas preparaciones con relación a mitocondrias fosforilantes (10-12) aunque parecería depender de la concentración en el caso del NADH (3) y de la presencia ó no de antimicina A (13). En este aspecto (ubicación del citocromo b), este último esquema coincidiría con el de Storey para otro tipo de preparaciones también no fosforilantes (14).

En resumen, las variaciones del nivel de óxido-reducción de b, por Stil se deberían a una inhibición del flujo de electrones en un sistema cerrado de manera incompleta, actuando Stil, del lado del sustrato de b sin afectar a este último de manera directa. La hipótesis concuerda con la supresión del efecto de Stil por antimicina A que cierra el flujo de electrones en el sistema parcialmente abierto (Figura IV-15). En cuanto al camino de reoxidación de b los hechos siguientes inducen a pensar que no se produce a través de la cadena de transporte de electrones 1) la insensibilidad del nivel de reducción del citocromo c a la adición de Stil; 2) la efecti-

vidad de Stil en presencia de ascorbato + cianuro que presumiblemente aseguran una anaerobiosis extrema.

Una primera posibilidad, de antigua data es la hipótesis de la auto-oxidabilidad de b, propuesta por Keilin (15). Dicha hipótesis, no se comprobó posteriormente. Cabe admitir sin embargo, una vía oxidante secundaria, a la que pertenece b, paralela a la vía principal, cianuro sensible, en coincidencia con recientes trabajos de Nicholls (16), también en preparaciones no fosforilantes. La segunda alternativa es un cambio en las propiedades de b, revelado por una variación en su espectro de absorción. Esta variación no implicaría una oxidación y podría cumplirse en un medio estrictamente anaeróbico. No se han hecho determinaciones encaminadas a detectar posibles desviaciones en las bandas del citocromo b por efecto de Stil, lo cual deja abierta esta cuestión.

Se admite que la antimicina A actúa sobre la cadena respiratoria entre los citocromos b y c (17,18). La mayor reducción de b en presencia del antibiótico implica cambios en las propiedades físicas de b, evidenciables por el espectro de absorción (3).

Se ha postulado la existencia de dos formas de citocromo b. Una de ellas es reducible lentamente por sustratos y activable por la más rápida transferencia de electrones que se produce en presencia de antimicina A. Slater (3) sugiere que la antimicina A se combina con ambas formas de b, aumentando su potencial de óxido-reducción y facilitando su reducción por los sustratos. Pumphrey (19) acepta ambas posibilidades pues el efecto del antibiótico sería distinto según el rango de concentración.

Rieske (20,21) ha obtenido recientemente en el complejo III de cadena respiratoria (III-11) curvas de titulación potenciométrica que parecen determinar que el potencial de óxido-reducción de b depende fuertemente de la presencia de antimicina A y del estado de oxidación del sitio sensible al antibiótico. En presencia de antimicina A + ascorbato (el cual reduce preferentemente al sitio sensible a antimicina A) se observó una baja sustancial del potencial de óxido-reducción del citocromo b.

Todo ello hace tentadora la hipótesis de un eventual efecto del Stil sobre la conformación de b, antagonista del que produce antimicina A. Por el momento parece improbable si se tiene en cuenta la ausencia de efecto de Stil sobre b con succinato y fumarato como sustratos (Figuras IV-11 y IV-16).

Más simple sería admitir que la demostrada acción de antimicina A sobre el citocromo b, modificación de su potencial de óxido-reducción y consiguiente aumento en la velocidad de su reducción, fuera lo que determinara las variaciones del efecto de Stil sobre el citocromo en su presencia. En apoyo de esta posibilidad se encontraría la análoga respuesta cuando el inhibidor utilizado es la rotonona (Figura VI-3).

En relación con las variaciones a 465-510m μ , se dijo al iniciar el capítulo que además de la flavina correspondiente a la NADH deshidrogenasa, varios componentes de la cadena parecen contribuir a las mismas, tal es el caso de Fe no hemínico (22-24) además de la flavoproteína succínica y otras en menor proporción. Se mencionó además la postulación de dos flavoproteínas transportadoras de electrones para el sitio I (8,9).

La región NADH deshidrogenasa es equivalente al complejo I de Hatefi (25). Este autor afirma la existencia de tres constituyentes básicos a saber a) NADH-deshidrogenasa ferroflavoproteína (Fp), b) "Iron Sulfur" proteína (IP) que no contiene flavina y c) proteína estructural. Propone un esquema diferente para el transporte de electrones en la región del sitio I (26,27). Los resultados espectroscópicos a 465-510 dan dos componentes Fp del lado sustrato del bloqueo por rotenona e "IP" del lado O_2 del mismo.

Los resultados obtenidos en la Figura IV-20 experimento A y los valores de la Tabla IV-9 muestran una reducción muy rápida por NADH a 465-510 y quedarían indeterminadas pequeñas variaciones, en presencia de Stil. El ascorbato elimina algunas contribuciones al espectro y refuerza el efecto de Stil, resolviendo el sector en dos especies redox una por debajo y otra por encima del sitio sensible al Stil, lo cual coincide con los resultados para rotenona en cualquiera de los dos esquemas propuestos (8,9,27). El succinato en presencia del inhibidor es capaz de llevar la absorbancia hasta el valor de los controles lo que debe interpretarse como que es capaz de reducir la segunda especie redox del sector NADH-deshidrogenasa, además de la flavoproteína succínica. Estos resultados estarían de acuerdo con los obtenidos recientemente en este laboratorio para mitocondrias fosforilantes (28).

Resumen

1) El estilbestrol y hexestrol inhiben la transferencia de electrones desde el NADH al citocromo b en la cadena respiratoria en sistemas aeróbicos ó inhibidos por cianuro.

2) Los derivados dimetilados del estilbestrol y el hexestrol (fisiológicamente inactivos) no inhiben la

transferencia de electrones.

3) La inhibición es selectiva para la cadena del NADH pues el sector succinato-citocromo b no es inhibida.

4) El estilbestrol no afecta la oxidación del citocromo b reducido por fumarato (a través de la succinato deshidrogenasa) ó por oxígeno (vía insensible al cianuro).

5) En presencia de antimicina A, la acción del estilbestrol se anula, lo que concuerda con un cambio en las propiedades del citocromo b producidas por la primera.

6) La quinona Q_2 favorece la oxidación del citocromo b reducido compitiendo con este último por el flujo de electrones provenientes del NADH. El Stil interfiere dicho proceso probablemente por inhibición de la NADH-Q reductasa.

7) El ascorbato potencia significativamente el efecto de Stil.

8) La reoxidación de \underline{b} se hace en este tipo de preparaciones por una vía diferente a la sensible al cianuro ($c_1, c \dots O_2$) ya que \underline{c} no se reoxida en las condiciones en que se observa significativa oxidación de \underline{b} y en segundo lugar ascorbato + estilbestrol producen una mayor reoxidación de \underline{b} a pesar de que el ascorbato presente reduce desde el citocromo c hasta el O_2 .

9) La reoxidación de \underline{b} resulta dependiente de la concentración del estrógeno, en función de su efecto primario: inhibición del flujo de electrones a un sitio anterior a \underline{b} .

10) El citocromo b parece no encontrarse en la cadena principal en las preparaciones enzimáticas utilizadas.

11) En sistema abierto no se observa modificación por

Stil de la reducción de flavoproteína por NADH. La reoxidación se hace más lenta a medida que aumenta la concentración del inhibidor.

12) En sistema cerrado se observa en presencia de Stil una curva de reducción bifásica con NADH y un pequeño pero significativo desplazamiento hacia la oxidación por agregado de Stil a las flavoproteínas reducidas por NADH.

13) En presencia de ascorbato el estrógeno resuelve al sector en dos componentes, uno del lado sustrato y otro del lado O_2 respecto del sitio sensible al Stil. El ascorbato produce por si disminución de absorbancia a esta banda.

14) El succinato reduce hasta el valor de los controles en cada caso, presencia y ausencia de ascorbato. Reduce entonces, además de la flavoproteína succínica al segundo componente redox del sector NADH-deshidrogenasa.

Referencias

- (IV-1) Colpa Boonstra, J.P. y Slater, E.C. Bioch.Biophys. Acta 27 (1958) 122
- (IV-2) Goldberger, R.; Pumphrey, A. y Smith, A.L. Bioch. Biophys.Acta 58 (1962) 307
- (IV-3) Slater, E.C. y Colpa Boonstra, J.P. en "Haematin Enzymes" (J.E. Falk, R. Lemberg y R.K. Morton eds) Pergamon Press, London vol. 2 (1961) p. 575
- (IV-4) Chance, B. J.Biol.Chem. 233 (1958) 1223
- ~~(IV-5)~~ Chance, B. y Williams, G.R. Adv.Enzymmol. 17 (1956) p. 93
- (IV-6) Chance, B. Nature 169 (1952) 215
- (IV-7) Grundy, J. Chem. Revs. 57 (1957) 281
- (IV-8) Chance, B.; Ernster, L.; Garland, P.B.; Lee, C.P.; Light, P.A.; Ohnishi, T.; Ragin, C.J. y Wong, D. Proc.Nat.Acad.Sci. Wash. 57 (1967) 1498
- (IV-9) Chance, B.; Lee, C.P. y Mela, L. Fed.Proc. 26 (1967) 1341
- (IV-10) Chance, B. y Williams, G.R. J.Biol.Chem. 217 (1955) 409
- (IV-11) Slater, E.C. Biochem.J. 46 (1950) 484
- (IV-12) Slater, E.C. Adv.Enzymol. 20 (1958) 147
- (IV-13) Jackson, F.L. y Lightbown, J.W. Biochem.J. 69 (1958) 63
- (IV-14) Storey, B.T. Arch.Biochem.Biophys. 121 (1967) 261
- (IV-15) Keilin, D. Proc.Roy.Soc. London B 104 (1928) 206
- (IV-16) Nicholls, P. Fed.Proc. 28 (1969) 472
- (IV-17) Reif, A.E. y Potter, V.R. J.Biol.Chem. 205 (1953) 279

- (IV-18) Myers, D.K. y Slater, E.C. *Biochem.J.* 67 (1957) 558
- (IV-19) Pumphrey, A.M. *J.Biol.Chem.* 237 (1962) 2384
- (IV-20) Rieske, J.S.; Baum, H.; Stoner, C.D. y Lipton, S.H. *J.Biol.Chem.* 242 (1967) 4854
- (IV-21) Rieske, J.S. *Fed.Proc.* 28 (1969) 471
- (IV-22) Minakami, S.; Cremona, T.; Ringler, R.L. y Singer, T.P. *J.Biol.Chem.* 238 (1963) 1529
- (IV-23) Klingenberg, M. y Bucher, T. *Biochem.Z.* 331 (1959) 312
- (IV-24) Bois, R. y Estabrook, R.W. *Arch.Biochem.Biophys.* 129 (1969) 362
- (IV-25) Hatefi, Y. en "Comprehensive Biochemistry" (M. Florkin y E.H. Stotz eds) Amsterdam, Elsevier vol. 14, (1966) p. 199
- (IV-26) Hatefi, Y. y Stempel, K.F. *Biochim.Biophys.Res. Comm.* 26 (1967) 301
- (IV-27) Hatefi, Y. *Proc.Nat.Acad.Sci* 60 (1968) 733
- (IV-28) Boveris, A. y Stoppani, A.O.M. *Rev.Soc.Arg.Biol.* (1969) en prensa

CAPITULO V

Acción del estilbestrol y análogos, sobre el sector NADH-quinona de la cadena respiratoria

El sistema NADH-oxidasa de miocardio, está constituido por varias enzimas y transportadores distribuidos en segmentos funcionales identificables mediante el empleo de aceptores de electrones adecuados. Las quinonas sustituidas, análogos de la ubiquinona, oxidan al NADH en presencia de la NADH-oxidasa, definiéndose como NADH-quinona reductasa, la porción del sistema enzimático que transfiere electrones desde el NADH a la quinona (1).

A pesar de la cantidad de trabajos encaminados a dilucidar el papel y la ubicación de la quinona endógena, no se ha resuelto definitivamente. Parecería aclarado que actúa entre flavoproteínas y citocromos (2).

Se acepta en general que la reducción de quinonas (endógena ó exógena) es inhibida por Amytal (3) y estilbestrol (4 y 5).

También la progesterona inhibe la reducción de la ubiquinona endógena por NADH (6) ó por Q_6 exógena (7).

El sitio principal de acción de los homólogos exógenos quedaría ubicado en la región NADH flavoproteína, sin conocerse su inmediato reductor. Podría tratarse de Q_{10} endógena, la cual está presente a altas concentraciones, en todas las preparaciones que exhiben actividad de Q reductasa sensible a Amytal y rotenona. "En dicho caso a la quinona, transportador de molécula chica se lo debería considerar ligado específicamente a un sector de la NADH deshidrogenasa" (1). El sitio más probable a la luz de trabajos recientes por lo menos para Q_2 sería la segunda especie redox en el sector NADH deshidrogenasa (8).

La acción del Stil sobre el sector NADH-quinona de la cadena respiratoria, podría efectuarse a nivel de la quinona, dadas las analogías químicas entre ambos tipos de compuestos, extensible a los homólogos y en cualquier caso se dispondría de un nuevo segmento funcional para el estudio que nos ocupa.

Resultados

Efecto de Stil y análogos sobre la actividad NADH-Q₀ y NADH-Q₂ reductasa de miocardio

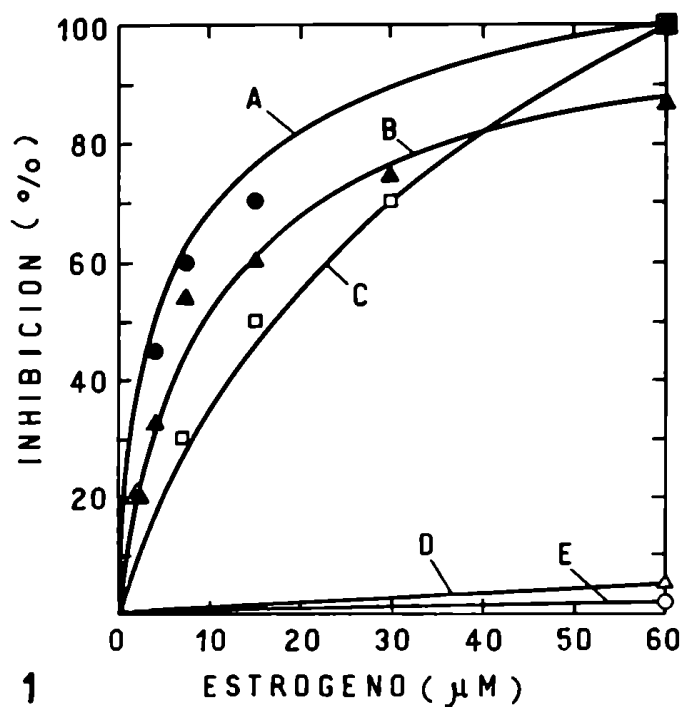


Fig. V-1.- Efecto de Stil y análogos sobre la actividad NADH-Q₀ reductasa.

NADH-oxidasa, 0.23 mg/ml; Tris-sulfato 0.05 M, pH 8; cianuro 1.0 mM; Q₂ 0.05 mM NADH 0.125 mM. A, Stil; B, Hex; C, Stil-MME; D, Hex-IME; E, Stil-IME.

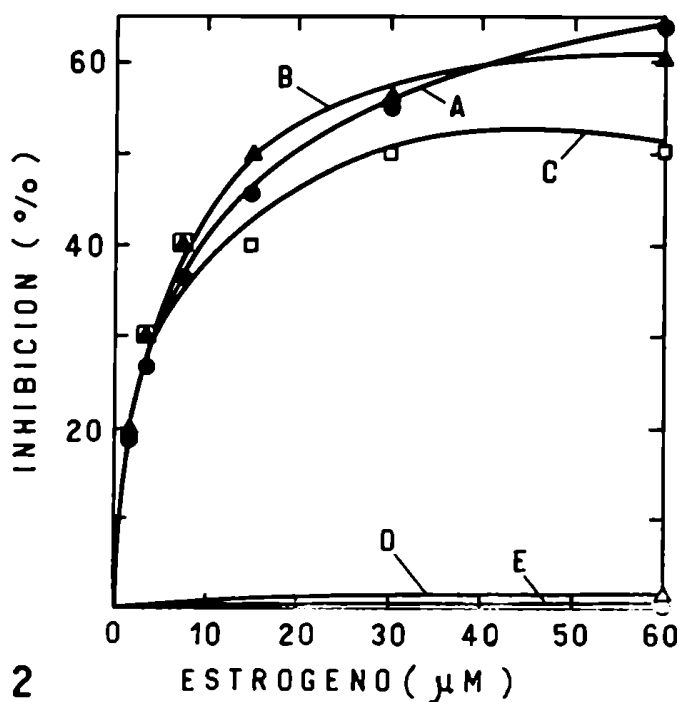


Fig. V-2.- Efecto de Stil y análogos sobre la actividad NADH-Q₂ reductasa.

NADH-oxidasa, 0.23 mg/ml; Tris-sulfato 0.05 M, pH 8; cianuro 1.0 mM; Q₀ 0.05 mM NADH 0.125 mM. A, Stil; B, Hex; C, Stil-MME; D, Hex-IME; E, Stil-IME.

La NADH-quinona reductasa de miocardio resulta sensible al Stil, cuando se utilizan las coenzimas Q_0 y Q_2 como aceptores de electrones (Figuras V-1 y 2). Con Q_2 se observa un mayor efecto de Stil y análogos, obteniéndose una inhibición del 90-100 % con la concentración 60 μM . Las concentraciones inhibitoras 50 % (I_{50}) son μM : 4.0 (Stil), 7.5 (Hex) y 15 (Stil M.M.E.). Los dimetil-éteres de Stil y Hex no son activos. Con Q_0 (Figura V-2) las inhibiciones son menores y no se alcanza un efecto total. Los I_{50} obtenidos son Q_0 (μM): 18 Stil, 15 (Hex) y 30 para (Stil M.M.E.).

Con Q_0 , la máxima inhibición observada fué del 60 %.

Efecto de la concentración de Q_0 sobre la sensibilidad al Stil de la NADH- Q_0 reductasa

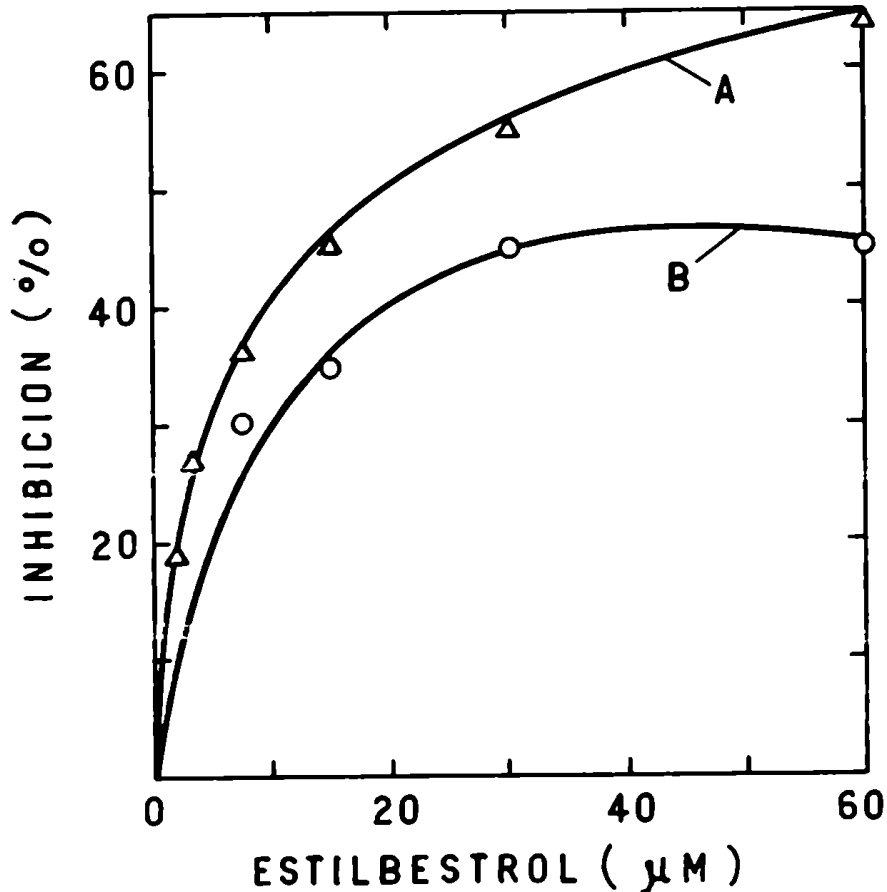


Fig. V-3.- Efecto de la concentración de Q_0 sobre la sensibilidad de Stil de la NADH- Q_0 reductasa.

NADH-oxidasa, 0.17 mg/ml; Tris-sulfato 0.05 M, pH 8; cianuro 1.0 mM; NADH 0.125 mM. A, Q_0 0.05 mM; B, Q_0 0.5 mM.

El efecto del estrógeno sobre la NADH-Q₀ reductasa depende también de la concentración de la quinona utilizada. Si se aumenta la concentración de Q₀ a 0.5 mM, la sensibilidad al Stil disminuye. Se obtiene a concentración 60 μ M de Stil 65 % de inhibición a concentraciones bajas de la quinona (0.05 mM) y 45 % a altas concentraciones (0.5 mM). Estos resultados concuerdan con la aparición de una nueva actividad de Q reductasa a altas concentraciones de Q₀, insensible al inhibidor.

A fin de establecer las características cinéticas de la inhibición, fué necesario determinar la naturaleza reversible de la misma. Para inhibidores con fuerte afinidad por la enzima correspondiente, la independencia de la inhibición respecto a la concentración enzimática concuerda con una acción reversible (9).

Acción inhibidora de Stil, a diferentes concentraciones de NADH-oxidasa

Tabla V-1. Acción inhibidora de Stil a diferentes concentraciones de NADH-oxidasa.

NADH-oxidasa suspendida en fosfato 0.10 M, pH 7.3. NADH, 0.6 mM. Velocidad de oxidación medida a 340 nm. Temp. 30°.

Stil (μ M)	NADH-oxidasa (mg/ml)			
	0.04	0.16	0.33	0.66
	Actividad específica (μ moles NADH/min/mg)			
	0.53	0.56	0.54	0.54
	Actividad relativa (%)			
0	100	100	100	100
0.15	68	68	61	61
0.75	49	50	51	51
1.5	34	35	40	42
7.5	19	14	17	19
15	10	5	10	5

En estas condiciones experimentales, la disminución de la actividad enzimática en presencia de Stil, es proporcional a la cantidad de enzima presente en el medio de reacción y depende de la concentración del inhibidor.

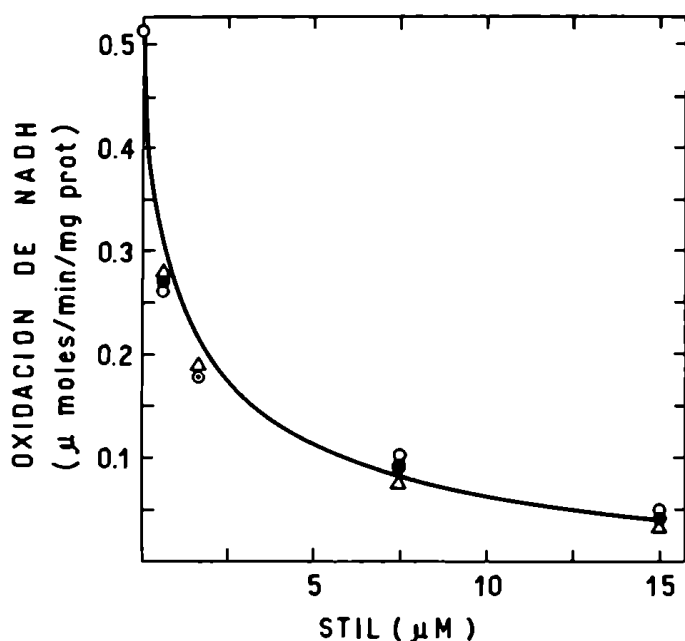


Fig. V-4.- Titulación de la inhibición por Stil de la oxidación de NADH. Relación con la concentración de proteína.

Condiciones como en la Tabla V-1. Concentración de proteína (mg/ml) ○, 0.66; △, 0.33; ● 0.16

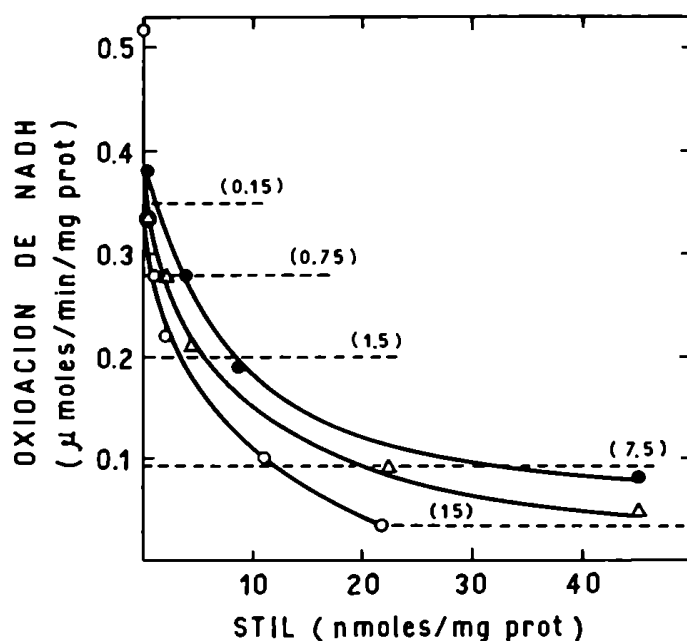


Fig. V-5.- Oxidación de NADH en función de la relación Stil/mg proteína.

Condiciones como en la Fig. V-4.

En los experimentos de las Figuras V-4 y 5 se utilizaron muestra de concentración variable hasta 2 mg/ml. Aunque la actividad del control para valores mayores de 1 mg/ml no son medibles con la concentración habitualmente empleada de NADH y en estas condiciones experimentales, a medida que la velocidad de la reacción es inhibida y el sustrato se hace utilizable, los valores de actividad específica caen dentro de los niveles esperados para concentración del estrógeno.

En la Figura V-5 se representa la actividad específica, en función de la relación inhibidor/enzima y se ve claramente que lo que determina en estas condiciones de medida el nivel de actividad es la concentración de Stil en la mezcla de reacción.

Reversión de la inhibición por dilución

Tabla V-2. Reversión del efecto de Stil por dilución.

Se preincubaban muestras de 3 mg/ml durante 10 min con Stil según se indica. Se toma alícuotas de 0.05 ml y se lleva al ensayo corriente para NADH oxidasa (Dilución 1/60). Testigos sin Stil con dioxano se tratan de la misma manera.

	Stil (μ M)	Actividad específica ($\frac{\mu\text{moles NADH}}{\text{m/mg prot}}$)
A	0	0.70
	5	0.70
B	0	0.65
	15	0.65
C	0	0.65
	30	0.53

Si se preincuba la NADH-oxidasa con Stil a concentración de 3 mg/ml durante 10 minutos y luego se llevan alícuotas al ensayo de actividad habitual, se observa en la Tabla V-2 que los valores de actividad específica coinciden con el control. En el ensayo directo se probó la inhibición dando a esas concentraciones de estrógeno un 80-95 % de inhibición. Aunque no resulta medible en la mezcla de incubación dicha inhibición, conocíamos el comportamiento del esteroide en las muestras del experimento de Figuras V-4 y 5, a concentraciones del orden 2 mg/ml. Esto permite descartar una falta de acción del mismo a esos valores de concentración de proteína. Aunque resulta evidente la reversión de la inhibición por dilución, no

se descarta y se ha observado en otro tipo de experimentos en este laboratorio, una cierta dependencia de la concentración de proteína con el grado de la inhibición por Stil. Este fenómeno podría deberse a dificultad de acceso del inhibidor en soluciones muy concentradas, ó disminución de la cantidad libre de inhibidor debido a la alta concentración proteica.

Variación de la actividad NADH-Q reductasa, con la concentración de la quinona

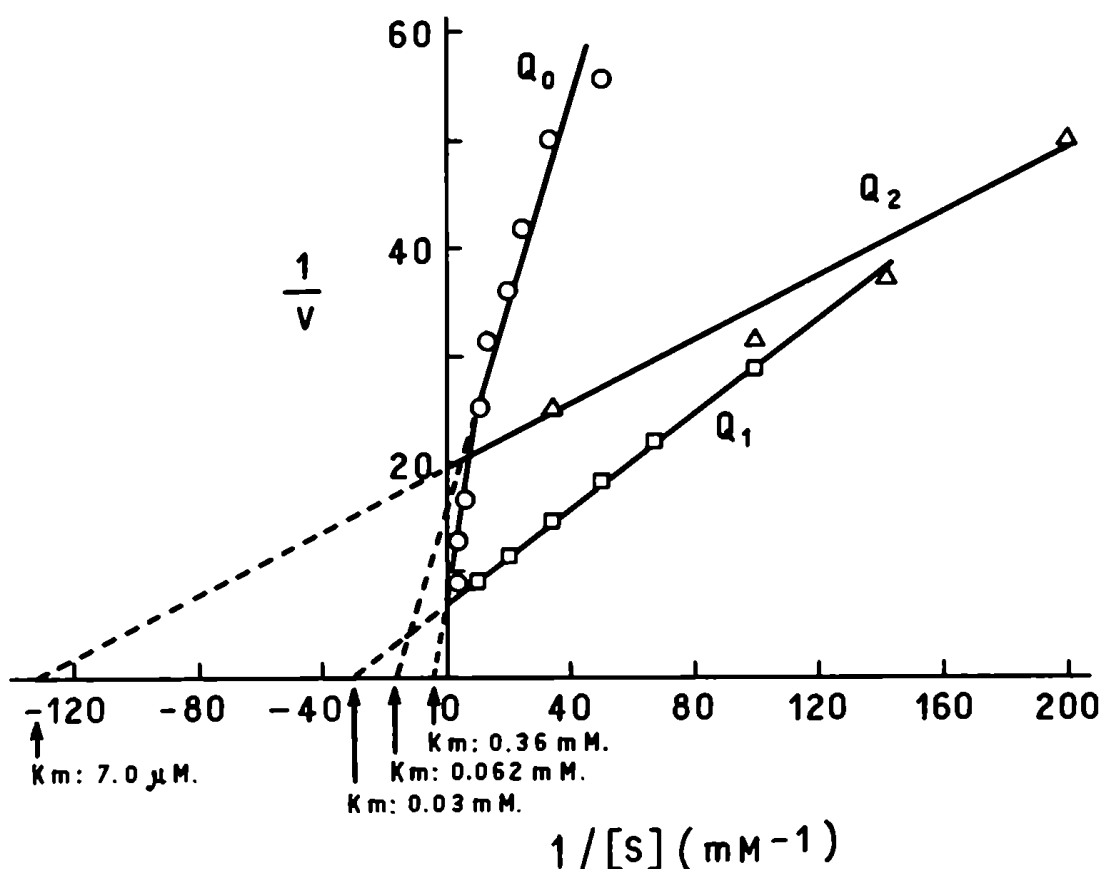


Fig. V-6.- Variación de la actividad NADH-Q reductasa con la concentración de quinona.

Abscisa, recíproca de la concentración de Q mM. Ordenada, recíproca de la variación de absorbancia cada 15 seg a 340 mμ en presencia de Q_0 , Q_1 ó Q_2 , según se indica. Otras condiciones como en Fig. 7 y 9.

Si se mide la actividad NADH-quinona reductasa con Q_0 , Q_1 y Q_2 como aceptores de electrones a concentraciones variables de quinona y los resultados se expresan por las recíprocas de las velocidades en función de las recíprocas de la concentración de sustrato (Método de

Lineweaver y Burk) (10), se obtienen las curvas presentadas en la Figura V-6. Para Q_1 y Q_2 se obtienen rectas, cuya intersección con la abscisa da los K_m correspondientes: 30 (Q_1) y 7 (Q_2) μM . El K_m para Q_2 concuerda con el hallado por Schatz y Racker para preparaciones submitocondriales fosforilantes de corazón de bovino (11).

Si se observa en cambio la curva para Q_0 , esta resulta bifásica. La explicación para la aparición de dicha inflexión, se encontraría en la existencia de dos sitios de reacción con diferentes afinidades, para los homólogos de ubiquinona.

En el caso de Q_0 , es posible observar el segundo sitio dadas las características de solubilidad de la misma, que no dificultan su utilización a mayores concentraciones. Efectivamente, la extrapolación de las rectas correspondientes da dos valores aparentes de K_m : 360 y 62 μM .

Efecto de Stil sobre el aparente K_m para NADH- Q_2 reductasa

El efecto del estilbestrol sobre la cinética de la reducción de Q_2 , se muestra en la Figura V-7. Se utilizaron dos concentraciones diferentes de Stil. Las pendientes de las curvas B (3.75 μM) Stil y A (15 μM) Stil se modifican, coincidiendo sobre la abscisa con el control A. En otros términos el Stil actúa en forma no competitiva respecto a Q_2 . El valor del K_m no se modifica y es en todos los casos igual a 7 μM , ó sea igual a lo obtenido en la Figura V-6.

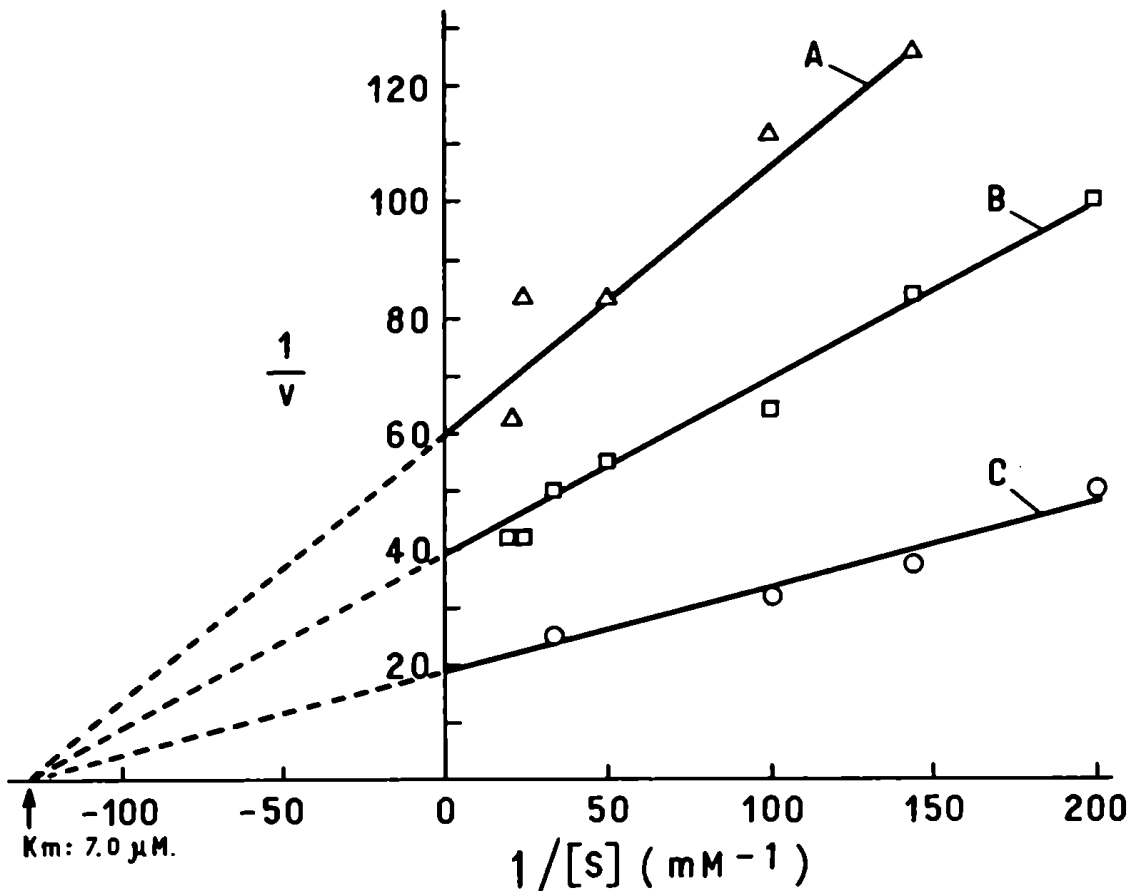


Fig. V-7.- Variación de la actividad NADH Q_2 reductasa con la concentración de quinona. Influencia de Stil.

NADH-oxidasa, 0.23 mg/ml; Tris-sulfato 0.05 M, pH 8; CNK 1.0 mM; NADH 0.125 mM. Abcisa, recíproca de la concentración de quinona (mM). Ordenada, recíproca de la variación de absorbancia cada 15 seg a 340 nm. A. Stil 15 μM ; B. Stil 3.75 μM ; C. testigo.

Aunque en este caso con la representación convencional de Lineweaver y Burk resultaba una inhibición pura, no competitiva, se graficaron los resultados en las cinco formas posibles (18b) y se obtuvo siempre una representación puramente no competitiva.

Se utilizaron además los métodos de Dixon y Hunter y Downs para obtener los valores del K_i , resultando respectivamente 5.4 y 4 μM y del tipo puramente no competitivo.

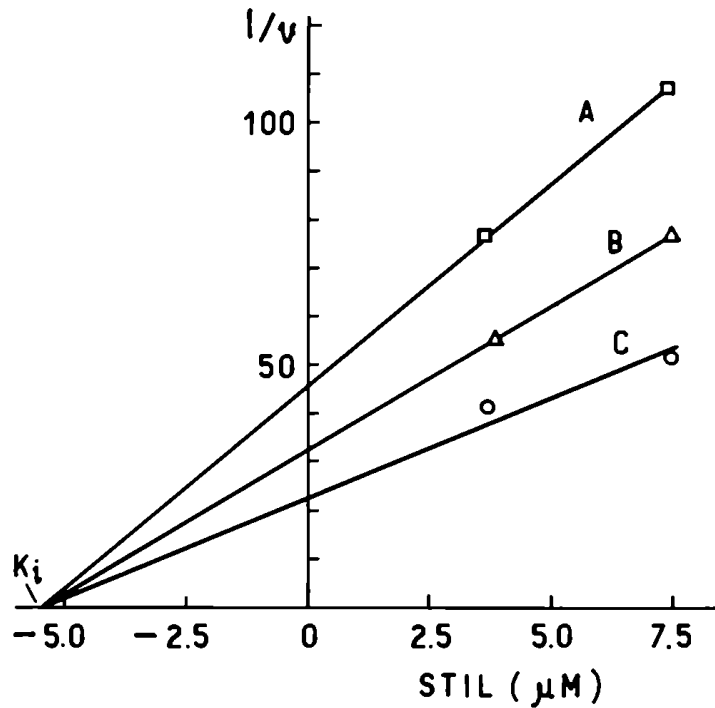


Fig. V-8.- Determinación gráfica del K_i método de Dixon.

Datos tomados de los experimentos tipo Fig. V-7. A) Q_2 7 μM B) Q_2 20 μM
C) Q_2 50 μM .

Efecto de Stil sobre el K_m aparente
para NADH-Q_0 reductasa

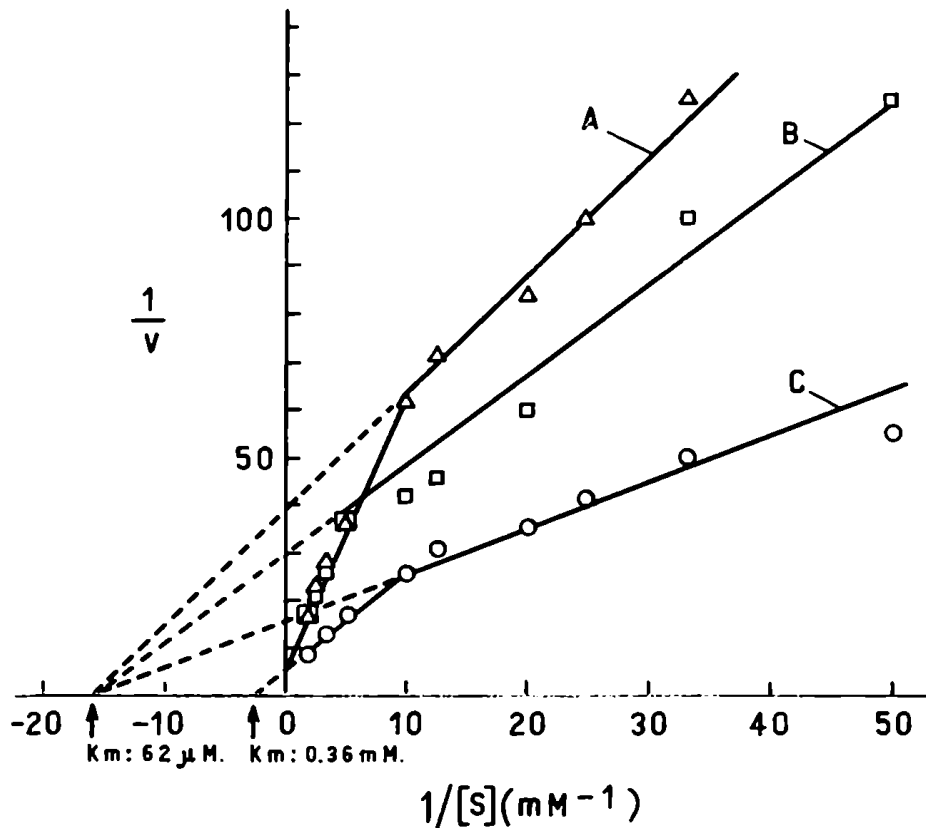


Fig. V-9.- Variación de la actividad NADH-Q_0 reductasa con la concentración de quinona. Influencia de Stil.

NADH-oxidasa , 0.17 mg/ml; Tris-sulfato 0.05 M, pH 8; CNK 1.0 mM; NADH 0.125 mM. Abcisa, recíproca de la concentración de quinona (mM). Ordenada, recíproca de la variación de absorbancia en 15 seg a 340 nm. A, Stil 30 μM ; B, Stil 5 μM ; C, testigo.

Cuando se utiliza Q_0 como aceptor de electrones, la extrapolación de las rectas correspondientes a las bajas concentraciones de Q_0 convergen a un punto sobre la abscisa (Figura V-9). El K_m para estas pendientes, tampoco es modificado por ninguna de las concentraciones utilizadas del esteroide y la inhibición puede compararse a la obtenida con Q_2 , cuya naturaleza es no competitiva. Para altas concentraciones de Q_0 hay una variación en la pendiente de las rectas en forma tal que para las dos concentraciones de estrógeno la recta se hace única y converge al valor de $1/V$ máx para el control, con aparente competencia a dicho sitio. Debe recordarse que a altas concentraciones se hace cada vez mayor la contribución de la actividad NADH- Q_0 reductasa (interacción directa con flavina) que podría resultar insensible a estrógenos. Existen evidencias sobre dicho tipo de actividades insensibles a Amytal y rotenona (12). Si se tratara del sitio flavina, el NADH debía competir y se ensayó entonces una cinética variando las concentraciones de Q_0 y NADH.

Variación de la actividad NADH- Q_0 reductasa con la concentración de Q_0 . Influencia de la concentración de NADH

Los resultados de la Figura V-10 muestran rectas A, B, C y D a diferentes valores de concentración de NADH, cuyas pendientes se diferencian netamente, convergiendo sobre la ordenada al valor $1/V$ máx para el control, levantado los K_m dando una típica competencia del NADH a dicho sitio.

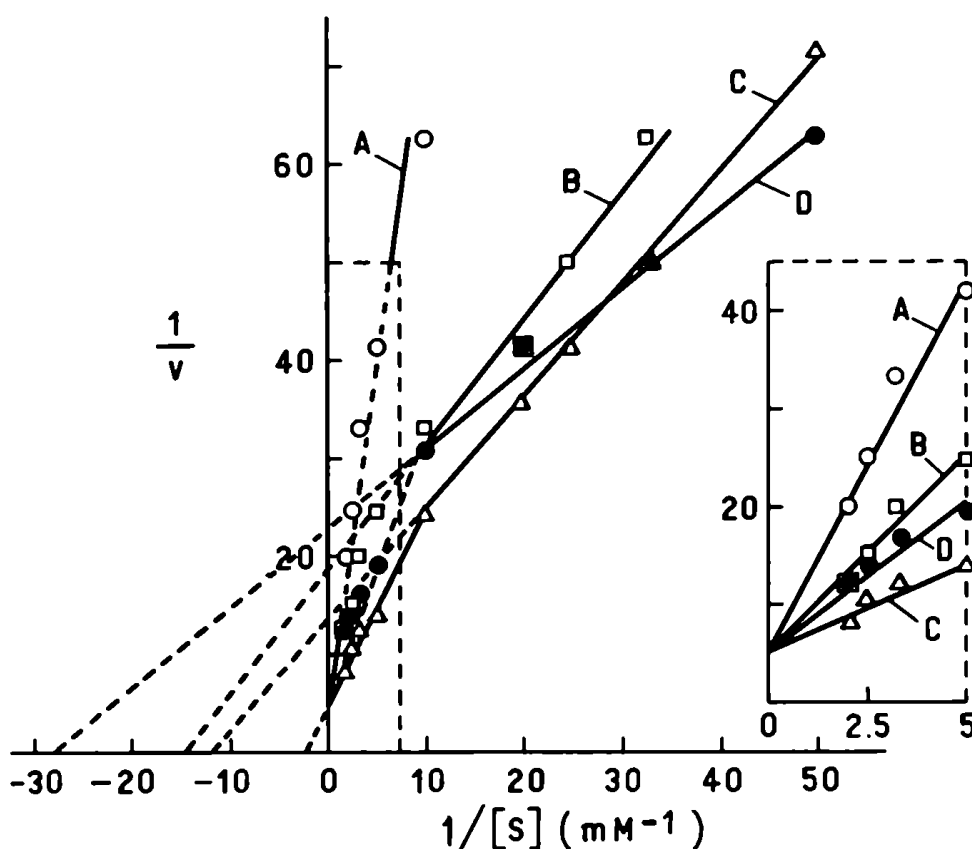


Fig. V-10.- Variación de la actividad NADH- Q_0 reductasa con la concentración de Q_0 . Influencia de la concentración de NADH.

NADH-oxidasa, 0.1 mg/ml; fosfato 0.1 M, pH 7.4; CNK 1 mM. Concentración de NADH (mM): 0.75 (A); 0.50 (B); 0.25 (C) y 0.05 (D). Abscisa, recíproca de la concentración de Q_0 (mM). Ordenada, recíproca de la variación de absorbancia en 15 seg a 340 nm.

Para comprobar que la interacción sustrato-flavina no era afectada por Stil, se ensayó la actividad de transhidrogenasa que la involucra directamente sin depender de la enzima (13,14).

Efecto de Stil sobre la reacción de transhidrogenación

Tabla V-3. Insensibilidad de la transhidrogenasa al Stil.

NADH-oxidasa, 0.55 mg; NADH, 0.13 mM; APAD, 0.2 mM, CNK, 1.0 mM; fosfato, 0.1 M. pH 7.4. Temp. 30°. Velocidad de reacción medida a 375 nm.

Stil (μM)	Actividad transhidrogenasa ($\frac{\mu\text{moles APAD}}{\text{min/mg proteína}}$)
0	0.25
36	0.25
180	0.25

La Tabla V-3 nos revela una total insensibilidad de la reacción $\text{NADH} + \text{APAD} \rightarrow \text{NAD} + \text{APADH}$ al estilbestrol. Los valores obtenidos concuerdan con los valores de transhidrogenasa corrientes para este tipo de preparaciones (13). También se la encontró insensible a Amytal (13).

Variación de la actividad ferricianuro reductasa con la concentración de ferricianuro. Influencia de Stil y rotenona

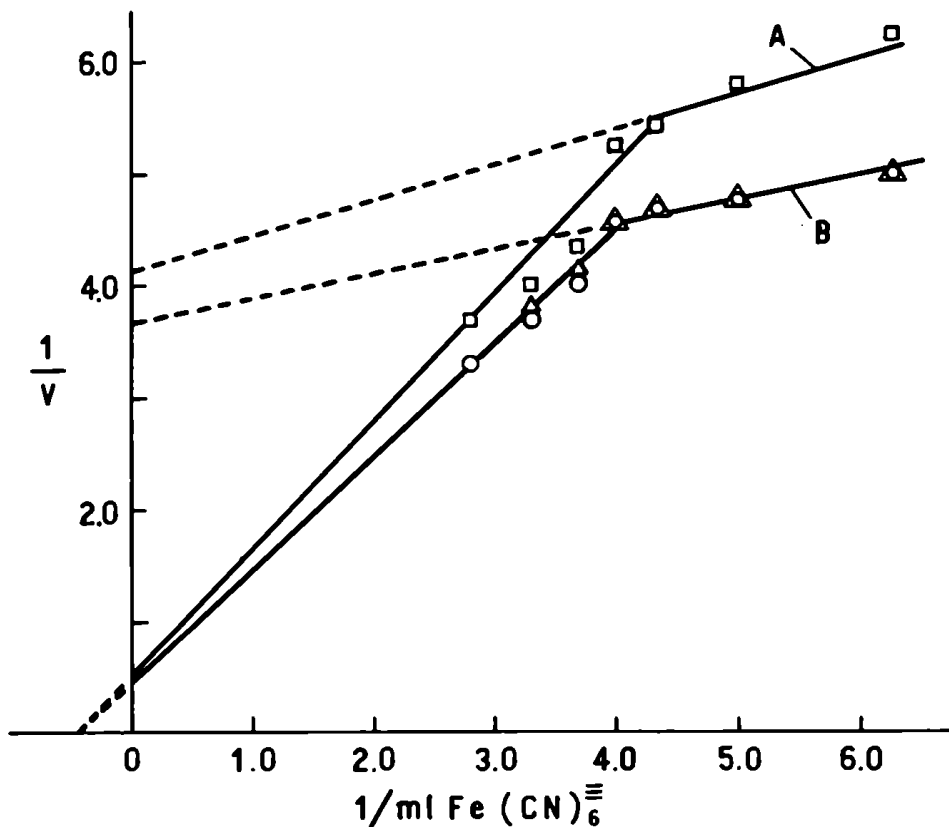


Fig. V-11.- Variación de actividad NADH-deshidrogenasa con la concentración de ferricianuro. Influencia de Stil y Rotenona.
 NADH-oxidasa, 0.06 mg/ml; fosfato 0.04 M, pH 7.4; NADH 0.6 mM.
 Abscisa, recíproca de la concentración de ferricianuro en ml de ferricianuro 0.01 M, añadidos a la mezcla de reacción. Vol. final 3 ml.
 Ordenada, recíproca de la variación de absorbancia por minuto a 420 mμ.
 A, rotenona 0.26 μM; B, testigo O, Stil 30 μM Δ.

En preparaciones multienzimáticas particuladas, del tipo Keilin y Hartree, la aparición de un segundo sitio de reacción a nivel del citocromo c para la reacción con ferricianuro, depende de la concentración de sustrato utilizada (15). A bajas concentraciones de ferricianuro

y altas de NADH, el flujo de electrones desde el NADH podría esperarse que excediera la velocidad de reoxidación de la flavoproteína por el ferricianuro, escapando equivalentes reducidos que serían tomados al segundo sitio. Al aumentar la concentración de ferricianuro, el sitio flavoproteína se saturaría respecto al oxidante y una mayor fracción de la actividad medida, es contribuida por la reoxidación directa de la flavoproteína por el ferricianuro (15).

La Figura V-11 muestra en nuestros resultados dos pendientes: la rama de menor pendiente tiene principal contribución de la actividad ferricianuro-reductasa a nivel de citocromo c ó sea, dicha actividad involucraría el sitio sensible al Stil en la secuencia de componentes. No se observa sin embargo, ningún efecto de Stil a diferencia con la rotenona. A medida que aumenta la concentración de ferricianuro se observa un ligerísimo desplazamiento por Stil. Estos resultados podrían tal vez asociarse a otras situaciones de flujo rápido que han impedido observar la acción inhibitoria de Stil, como por ejemplo presencia de antimicina A + cianuro en el sistema ó altas concentraciones de NADH en sistemas bloqueados. También puede significar algún tipo particular de acción del ferricianuro sobre la inhibición por Stil.

Discusión

Los resultados descriptos en este capítulo confirman y amplian observaciones anteriores que demostraban la inhibición por varios esteroides de la actividad NADH-Q₀, reductasa y menadiona reductasa de preparaciones de NADH-oxidasa de miocardio (4). Con Q₂ la inhibición es más importante que con Q₀ lo que resulta significativo

si se tiene en cuenta la mayor especificidad de la primera (Figuras V-1 y 2). La acción inhibitoria de los análogos de Stil, mantiene la misma especificidad que sobre las actividades NADH-oxidasa (16) NADH-citocromo b reductasa (17) y NADH-Q reductasa (Figura V-1). Para altas concentraciones de esteroides, pueden aparecer efectos sobre la concentración de quinona al sitio de acción (7). Esto explicaría acciones del Stil MME a altas concentraciones. Ello indicaría la inhibición de un sitio común a esos tres sistemas enzimáticos. Por otra parte se recalca igualmente que los dimetiléteres, inactivos fisiológicamente, se mantienen igualmente inactivos en este sistema. La inhibición por Stil de la NADH-Q reductasa, resultó dependiente de la concentración del esteroide. La disminución de sensibilidad para las altas concentraciones de Q_0 (Figura V-3) indicaría la existencia de por lo menos dos tipos de NADH- Q_0 reductasa, que se distinguirían por su sensibilidad al estrógeno. Para cualquiera de los homólogos de Q utilizados Q_0 , Q_1 y Q_2 , el sistema sensible al estilbestrol, representaría un segmento de la NADH-oxidasa, que involucra por lo menos hasta el componente sensible. La otra actividad NADH- Q_0 insensible, involucraría quizás nada mas que interacción directa con el grupo flavina como es el caso de las actividades insensibles a rotenona y a Amytal (1,12).

La inhibición reversible está caracterizada por un equilibrio entre enzima e inhibidor, definido por una constante de equilibrio, la cual es una medida de la afinidad (18). El sentido del término reversible, puede implicar espontánea desaparición de la inhibición por dilución ó diálisis (remoción del inhibidor libre) ó también posibilidad de remoción del inhibidor por reac-

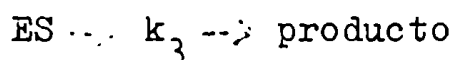
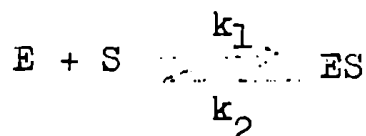
ción química con algunas sustancias ó fijación a ella, sin que implique una disociación espontánea.

Las Figuras V-4 y 5 sugerían reversibilidad (la inhibición dependía exclusivamente de la concentración del inhibidor). La reversión espontánea obtenida por dilución (Tabla V-2) confirmó dicha naturaleza reversible. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Jensen para corticoides (19).

Del estudio cinético de la inhibición, se desprende que la reducción de bajas concentraciones de Q_0 , Q_1 y Q_2 parecen involucrar etapas idénticas que la oxidación de NADH por O_2 en virtud de su alta sensibilidad al estrógeno. En este sistema multienzimático, se mide la reducción de quinona en condiciones de estado estacionario. El aparente K_m y velocidad máxima, caracterizan la interacción de la quinona con un componente de la cadena respiratoria.

El análisis de la cinética de una secuencia compleja de reacciones, catalizada por varias enzimas en sistemas organizados, medida bajo condiciones de estado estacionario, ha respondido a la expresión de cinética Michaeliana, aunque con constantes aparentes. Tratamientos cinéticos utilizando homogenatos (20) y preparaciones del tipo Keilin y Hartree (21) confirmaron el supuesto de que en condiciones de estado estacionario es posible utilizar las representaciones convencionales (Lineweaver y Burk) para obtener informaciones útiles sobre sitios de inhibición en estos sistemas.

Michaelis y Menten (22) proponen su teoría de acción enzimática con el complejo enzima sustrato:



suponiendo que k_1 y k_2 eran mucho mayores que k_3 de tal forma que las concentraciones de ES estuvieran determinadas por el equilibrio de la primera reacción. Se derivó así la fórmula que relaciona actividad enzimática a concentración de sustrato. Esta relación se expresa por constantes como K_m la cual es igual a la concentración de sustrato para la cual, la actividad es la mitad de la obtenible a infinita concentración de sustrato ó sea $V_{\text{máx}}$. Briggs y Haldane (23) derivan del estudio de cinética de estado estacionario una nueva expresión $K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$. Slater y Bonner (21) encuentran que en el caso particular de la succinato deshidrogenasa en el sistema succinato oxidasa se cumple esta última expresión. K'_3 es mayor K_2 y depende de las diferentes preparaciones enzimáticas y del método de medida.

Gutfreund y Jones (24) encuentran en sistemas organizados del tipo de la succinato oxidasa mitocondrial, constantes aparentes, más complejas pero perfectamente reproducibles, que dependen al involucrar por lo menos dos intermediarios enzimas sustrato (25), de las condiciones de medida y del tipo de preparaciones.

Los inhibidores reversibles actúan también sobre estos sistemas modificando las constantes para dar tipos de inhibición característica, que son útiles en la localización de sitio de acción, tal es el caso de la inhi-

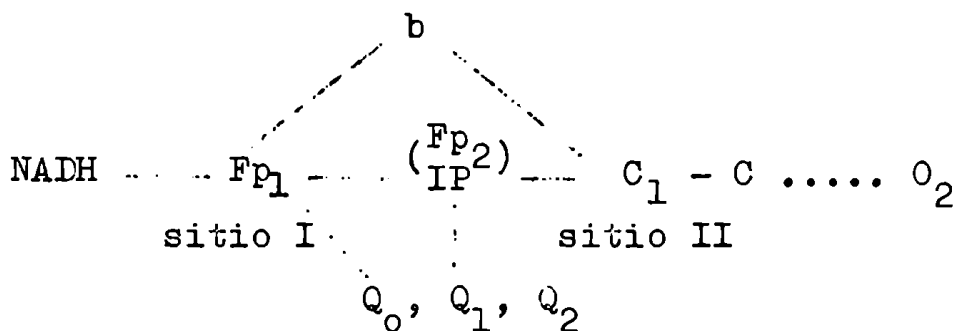
bición competitiva del NADH sobre la reducción del ferric-
cianuro (15), inhibición competitiva entre oxidación de
succinato y desacoplantes (26), inhibición competitiva
del fluoruro con respecto al succinato (27).

Sitios de entrada de las quinonas a cadena respirato-
ria. Efecto de Stil. La inhibición por estilbestrol, re-
sultó francamente no competitiva con respecto a la qui-
nona Q_2 (Figuras V-7 y 8). Se puede extender la conclu-
sión a la ubiquinona endógena y descarta la supuesta
competencia, por relación estructural con el estrógeno.

En vista de la obtención de dos K_m definidos, cuando
se varía el rango de concentraciones con amplitud, tal
es el caso de Q_0 (Figuras V-6 y 9), se confirman dos
sitios fundamentales de reacción de los homólogos de
quinona a cadena respiratoria. La inhibición no compe-
titiva es clara para el sitio de más bajo K_m (sitio II).
La actividad a dicho sitio involucra la etapa sensible
al estrógeno. La actividad NADH-Q reductasa entonces,
sería el resultado de la suma de dos contribuciones
fundamentales, que parecen depender fuertemente de la
concentración de quinona.

Para Q_2 (50 μ M) puede concluirse que el sitio funda-
mentalmente activo es el sitio II.

Se deduce del cálculo de las contribuciones a ambos
sitios



Actividad NADH-Q₂ reductasa = x + y

x: activ. sitio I insensible

y: activ. sitio II sensible

Actividad control = x + y = 140 nmoles/min/mg prot.

Activ^v(Stil 15 μM) = 40 nmoles/min/mg prot.

D_e (Fig. 4) Stil 15 μM inhibe 90 % actividad NADH-oxi-
dasa luego

$$x + 10 \% y = 40$$

$$140 - y = 40 - 10 \% y$$

$$100 = 90 \% y \quad \cdot \quad y = 111$$

$$x = 29 \text{ nmoles/min/mg prot.}$$

$$\text{Actividad NADH-Q}_2 \text{ reductasa} = x + y = 140 \quad 29 + 111 = 140$$

En los resultados, se ejemplifica la preponderancia del sitio II, sobre el sitio I de actividad insensible.

Acción del Stil, sobre la reducción de quinona al sitio flavina. La aparente competencia al sitio mayor K_m para Q_o (Figura V-9) no satisface los criterios para inhibición competitiva. Se habla de aparente competencia, ya que no se modifica V_{máx}. El efecto de un inhibidor competitivo, se traduce en un aumento aparente del K_m, por el factor (1 + i/K_i) donde i es la concentración del inhibidor. El K_m aumenta sin límite, y corresponde un aumento finito a variaciones finitas del inhibidor. En la Figura V-9y experimentos similares, no se obtienen pendientes diferenciables a distintas concentraciones del inhibidor. La ecuación teórica de velocidad a cada concentración de sustrato para dicho tipo de inhibición (18) supone velocidades no superponibles a dos concentraciones diferentes del inhibidor. Descartada así la competencia, podemos suponer, que a altas concentraciones de quinona, aumenten rápidamente las con-

tribuciones del sitio I (flavina) que serían insensibles al estrógeno, en concordancia con las supuestas interacciones directas entre flavina y quinona insensibles a Amytal y Rotenona (1,11,12).

No es posible en el caso de Q_0 un cálculo exacto de cada actividad, ya que puede actuar a nivel de citocromos (11) y puede ser reducida por otras flavinas de la preparación. Sin embargo, simplificando a los dos sitios fundamentales establecidos para Q_2 , se puede escribir

$$\text{Actividad } Q_0 \text{ reductasa (30 } \mu\text{M Stil)} = x + 10 \% y$$

$$\text{Actividad } Q_0 \text{ reductasa (5 } \mu\text{M Stil)} = x + 25 \% y$$

Si x y y (para altas concentraciones de quinona) un 15 % de diferencia sobre y (sensible) se hace más y más insignificante con el resultado de que las velocidades se acercan ó igualan a cada concentración de sustrato.

La competencia encontrada al sitio I entre NADH y quinona, refuerzan la interpretación de una interacción directa con flavina (Figura V-10).

Con relación a la naturaleza del sitio II en cadena respiratoria en estas condiciones, sería el segundo componente proteico del sector NADH deshidrogenasa, directa ó indirectamente vía quinona endógena (1), ya que no se han encontrado indicios de acción directa significativa sobre el citocromo b (Capítulo IV; Figura IV-12).

En coincidencia con estos resultados se pueden citar:

a) La velocidad de reducción de Q_0 , Q_1 y Q_2 por NADH, no varía prácticamente en los complejos particulados libres de citocromos, con relación a su reducción por la NADH oxidasa (1,28).

b) El sitio fundamental de entrada de Q_2 en el sector NADH deshidrogenasa, sería la FpD_2 de Chance (8) lo que equivale al segundo componente proteico del sector NADH deshidrogenasa.

La insensibilidad de la transhidrogenasa (29) y ferri-cianuro reductasa al Stil (Tabla V-3 y Figura V-11) permite decidir que el grupo flavina no sería afectado por Stil, ya que dichas reacciones lo involucran directamente. Serían reacciones equivalentes a la interacción de quinona al sitio I, también hallada insensible al esteroide (Figura V-9).

Conclusiones

1° Los estrógenos sintéticos Stil, Hex y Stil M.M.E., inhiben la actividad NADH-quinona reductasa de los fragmentos submitocondriales de miocardio (preparación de Keilin y Hartree). Los dimetiléteres no son activos.

2° La inhibición es mayor cuando se utiliza la quinona Q_2 en lugar de Q_0 .

3° La inhibición disminuye a medida que aumenta la concentración de Q_0 , en coincidencia con la aparición de actividades insensibles al estrógeno a altas concentraciones, lo que daría el aspecto de aparente competencia.

4° Para concentraciones bajas de Q_0 , Q_1 y Q_2 (actividades sensibles al Stil fundamentalmente) la cinética de la inhibición es típicamente no competitiva. Se descarta una acción competitiva del estrógeno a nivel de la quinona endógena, por analogías estructurales.

5° El estilbestrol no afecta al componente flavina de la NADH deshidrogenasa, ya que reacciones que lo involucran directamente resultan insensibles al mismo (transhidrogenasa ferricianuro reductasa, quinona reductasa al sitio I).

Referencias

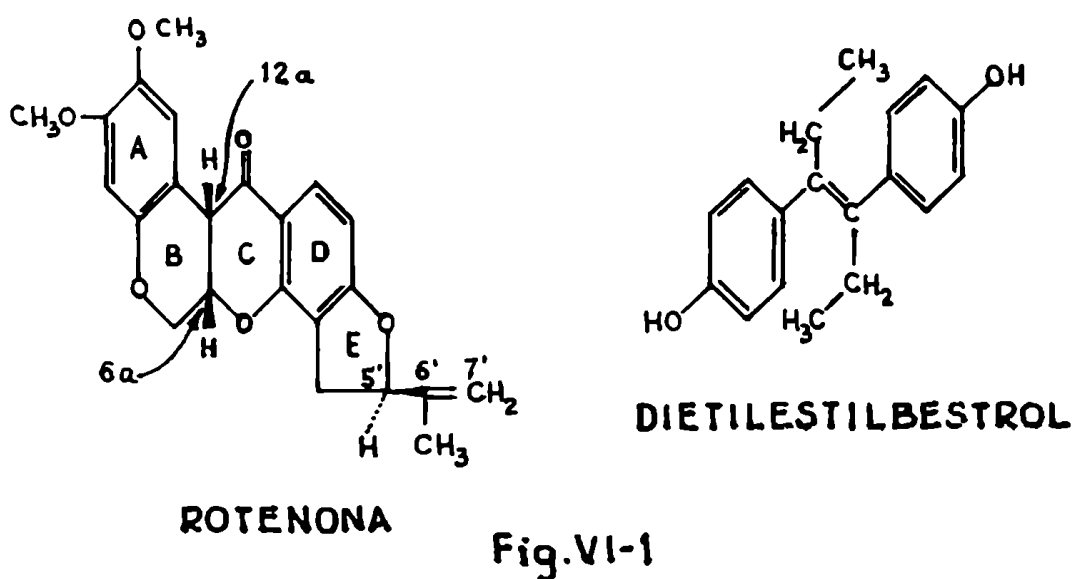
- (V-1) Machinist, J.M. y Singer, T.P. J.Biol.Chem. 240
(1965) 3182
- (V-2) Kröger, A. y Klingenberg, M. Biochem.Z. 344
(1966) 317
- (V-3) Redfearn, E.R. y Pumphrey, A.M. Biochem.J. 76
(1960) 64
- (V-4) Stoppani, A.O.M.; Brignone, J.A.; Brignone,
C.M.C. de y Badano, B.N. Bioch.Biophys.Acta 58
(1962) 622
- (V-5) Boveris, A.A. y Stoppani, A.O.M. Rev.Soc.Arg.
Biol. 43 (1967) 214
- (V-6) Yielding, K.L.; Tonkins, G.M.; Munday, S.J. y
Cowley, I.J. J.Biol.Chem. 235 (1960) 3413
- (V-7) Varicchio, F.; y Sanadi, D.R. Arch.Biochem.Bio-
phys. 121 (1967) 187
- (V-8) Ruzicka, F.J.; Awasthi, Y.C. y Crane, F.L. Fed.
Proc. 28 (1969) 471
- (V-9) Ackermann, W.W. y Potter, V.R. Proc.Soc.exp.Biol.
N.Y. 72 (1949) 1
- (V-10) Lineweaver, H. y Burk, D. J.Amer.Chem.Soc. 56
(1934) 658
- (V-11) Schatz, G. y Racker, E. J.Biol.Chem. 241 (1966)
1429
- (V-12) Machinist, J.M. y Singer, T.P. Proc.Nat.Acad.
Sci 53 (1965) 467
- (V-13) Minakami, S.; Cremona, T.; Ringler, R.L. y
Singer, T.P. J.Biol.Chem. 238 (1963) 1529
- (V-14) Kaplan, N.O.; Colowick, S.P. y Neufeld, E.F.
J.Biol.Chem. 205 (1953) 1
- (V-15) Singer, T.P. en "The Enzymes" 2nd.ed. vol. VII
(Boyer, P.D.; Lardy, H. y Myrback, K. eds)
Academic Press (1963) p. 345

- (V-16) Brignone, C.M.C. de; Stoppani, A.O.M. y Brignone, J.A. Rev.Soc.Arg.Biol. 43 (1967) 65
- (V-17) Otanendi, M.E.Dde y Stoppani, A.O.M. Rev.Soc. Arg.Biol. 43 (1967) 140
- (V-18) Dixon, M. y Webb, E.C. en "Enzymes" Snd.ed. (1964) p. 316
- (V-19) Jensen, P.K. y Neuhard, J. Bioch.Biophys.Acta 52 (1961) 97
- (V-20) Krebs, H.A.; Gurin, S. y Eggleston, L.V. Biochem.J. 51 (1952) 614
- (V-21) Slater, E.C. y Bonner, W.D., jun. Biochem.J. 52 (1952) 185
- (V-22) Michaelis, L. y Menten, M.L. Biochem.Z. 49 (1913) 333
- (V-23) Briggs, G.E. y Haldane, J.B.S. Biochem.J. 19 (1925) 338
- (V-24) Gutfreund, H. y Jones, E.A. Biochem.J. 90 (1964) 209
- (V-25) Gutfreund, H. y Sturtevant, J.H. Biochem. J. 63 (1956) 656
- (V-26) Van Dam, K. Bioch.Biophys.Acta 131 (1967) 407
- (V-27) Potter, V.R. y Schneider, W.C. J.Biol.Chem. 142 (1942) 543
- (V-28) Hatefi, Y.; Haavik, A.G. y Griffiths, D.E. J.Biol.Chem. 237 (1962) 1676
- (V-29) Stein, A.M.; Kaplan, N.O. y Ciotti, M.M. J.Biol.Chem. 234 (1959) 979

CAPITULO VI

Analgías y diferencias en las inhibiciones por
estilbestrol y rotenona en los diferentes sis-
temas analizados

Los rotenoides son productos de plantas tropicales, los cuales son usados como veneno de peces e insectos. El miembro más conocido del grupo, tiene la siguiente estructura



Se cree que su efecto tóxico es debido a su acción inhibitoria sobre la cadena de transporte (1).

Este compuesto inhibe la NADH-oxidasa mitocondrial, sin tener acción sobre la oxidación del succinato, bajo similares condiciones experimentales (2,3) ni tampoco sobre la transferencia de energía (2). Ernster, acepta la semejanza con la inhibición por Amytal, pero encuentra importantes diferencias. Por ejemplo, el Amytal parece tener efecto sobre la transferencia de energía, no así la rotenona. La inhibición por Amytal, se remueve por lavado, permaneciendo la rotenona ligada muy fuertemente a la enzima (2,4). Ambas inhibiciones se situaron inicialmente, entre NADH y flavoproteína (3).

Nuevos experimentos ubicaron el sitio entre la flavoproteína (5) y el citocromo b (5-7). Pullman y Schatz (8) describen detalladamente todo lo relativo a la inhibición por rotenona.

Como se dijo inicialmente se consideraba diferente la localización de la inhibición en partículas fosforilantes (9,10) y no fosforilantes (11,12) pero el hallazgo de que la reducción de flavina del succinato por NADH era inhibida por rotenona (7) y dificultades del método espectroscópico utilizado dieron una explicación a tales diferencias.

El hecho de que tanto Amytal como rotenona no inhibían ni la reacción de transhidrogenación ni la actividad ferricianuro reductasa hizo postular a Singer y col. (13-15) que el sitio de inhibición estaba del lado O_2 de la NADH flavoproteína sin importar el grado de capacidad fosforilante.

Se observó competencia entre la inhibición por Amytal y rotenona en cuanto a la ligadura de rotenona ^{14}C al segmento NADH deshidrogenasa de la cadena respiratoria (16).

Recientemente Chance y col. (17) han propuesto que el sitio para inhibición por rotenona, estaría situado entre dos componentes postulados flavoproteicos, llamados Fp_{D_1} y Fp_{D_2} (ver capítulo IV). Hatefi (18) por su parte sitúa la inhibición entre una flavohierroproteína y una hierroproteína en el sector NADH deshidrogenasa (ver capítulo IV y VII). Horgan (19) sugiere la participación de un componente lipídico en la inhibición por rotenona.

por rotenona.

Por estudios de espectroscopía E.P.R. Estabrook y col. (20) sugieren la participación de Fe no hemínico en la inhibición y por otro lado Palmer, Beinert, Singer y col. también por medio de espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica E.P.R. sitúan la inhibición del lado O_2 del Fe no hemínico de la NADH deshidrogenasa (21).

Más recientemente Hatefi (22) muestra evidencias para una acción sobre la NADH deshidrogenasa (Fp).

Como se ve hasta el presente por los métodos utilizados y en el sector NADH deshidrogenasa resulta indiferenciable el sitio para los inhibidores Amytal, rotenona, Piericidina A y aún estilbestrol, como se deduce de los resultados presentados.

Paralelamente a los experimentos hechos con Stil, en algunos casos, se utilizó rotenona comparativamente. Los resultados se resumen en este capítulo.

En cada caso, ver los capítulos que se señalan, para los correspondientes experimentos con Stil, cuando no se muestren juntos.

Efecto de rotenona sobre la reducción de citocromo b, en sistemas aeróbico y anaeróbico

En la Figura VI-2 experimento C se observa que la rotenona, prácticamente impide la reducción de citocromo b y se observa un estado estacionario, sin que se reoxide el citocromo b, a ese nivel. En el sistema anaeróbico por cianuro, la reducción del citocromo b es mucho más lenta y se mantiene reducido (Figura VI-2; experimentos A y B).

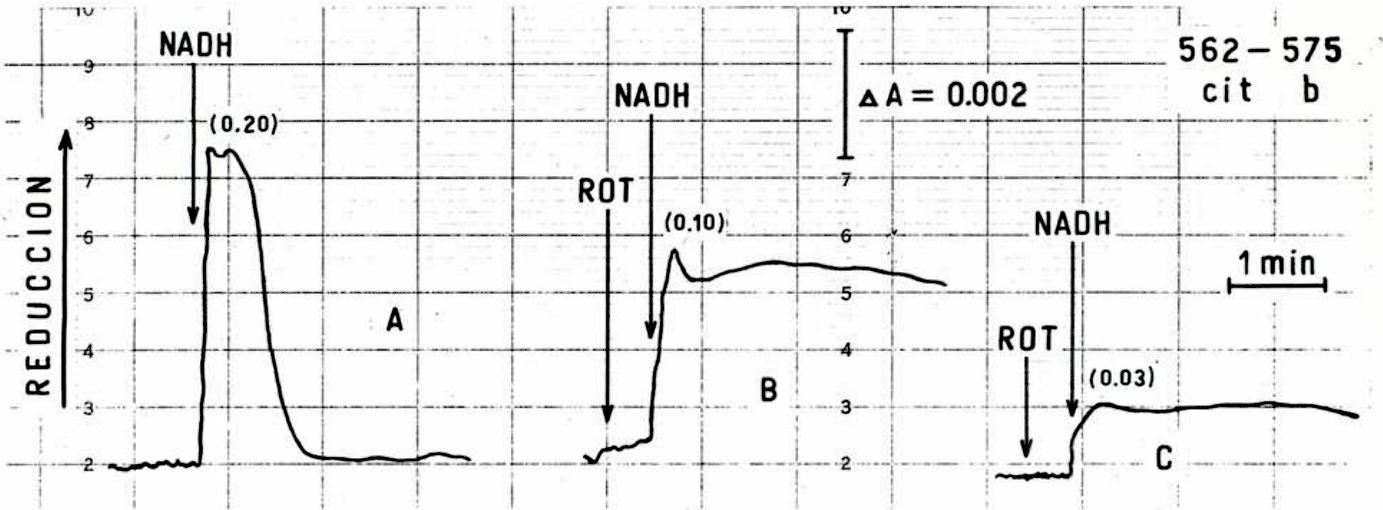


Fig. VI-2.- Efecto de rotenona sobre reducción de cit. b.

A y B sistema anaeróbico NADH-oxidasa 2 mg/ml; cianuro 2 mM. NADH 25 uM. Rot 0.25 nmoles/mg prot. fosfato 0.1 M, pH 7.4. Vol. final 3 ml. Las cifras indican nivel (uM de reducción de cit. b).

No se ha pretendido hacer un estudio de la inhibición por rotenona en cuanto a rango de concentraciones, pero estos resultados son suficientes para mostrar igual comportamiento en general que el estilbestrol. Se inhibe la reducción y en las mismas condiciones experimentales, se ~~rearda~~ retarda su oxidación. Ver capítulo IV Discusión y conclusiones. (Figuras IV-1 y 2).

Efecto de AA, sobre la reoxidación del citocromo b
por rotenona

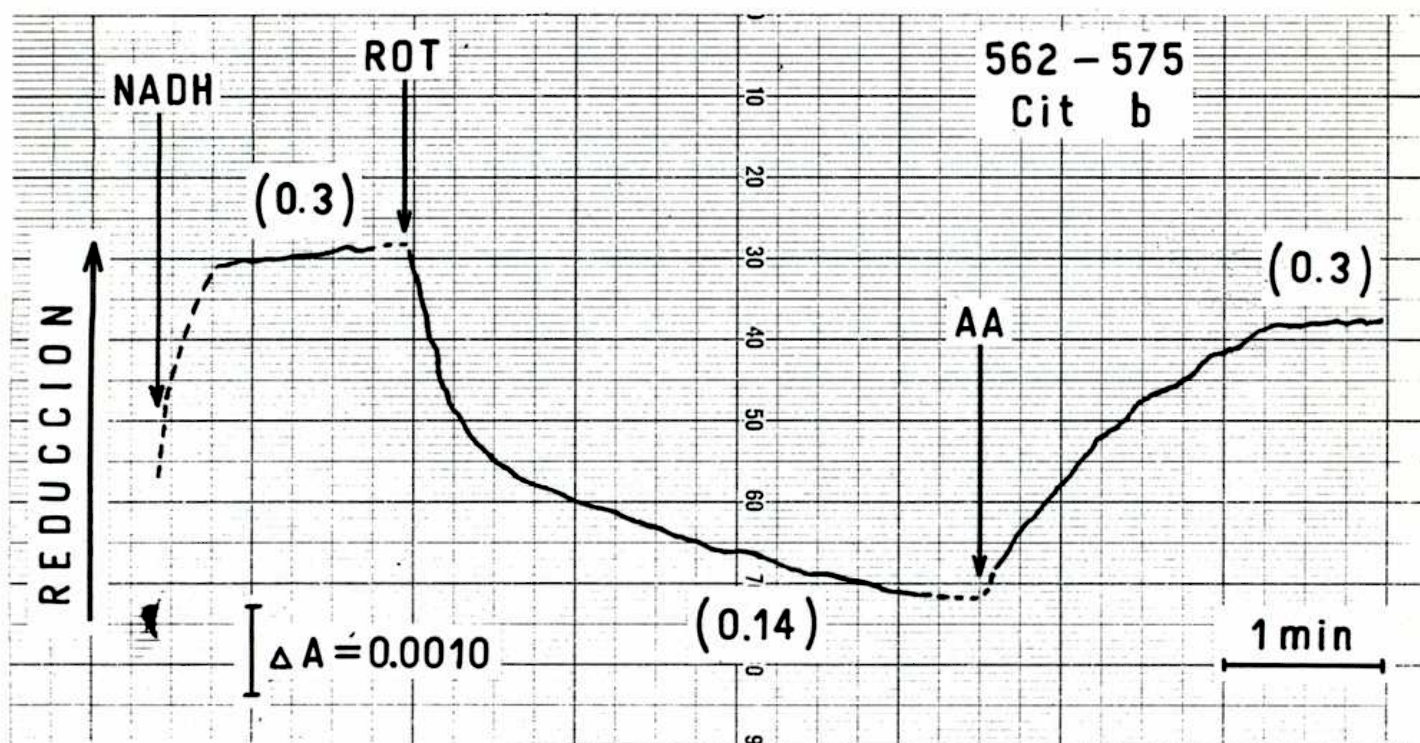


Fig. VI-3.- Efecto de antimicina A sobre la reoxidación de cit. b por rotenona.

NADH-oxidasa 1.8 mg/ml; cit. b red 0.7 μ M (ditionito); cianuro 2 mM; NADH 37.5 μ M; Rot 1.5 μ M A.A. 0.16 μ g/mg prot; fosfato 0.1 M, pH 7.4. Vol. final 3 ml. Las cifras indican niveles (μ M) de reducción de cit. b.

Se observa idéntico comportamiento del citocromo b reducido por sustrato frente a los dos inhibidores.

La AA es capaz de volver al nivel de reducción inicial el desplazamiento del citocromo b en el sentido de la oxidación producida por rotenona (Figura VI-3) ó estilbestrol (Figura IV-15).

Competencia entre Stil y rotenona sobre la reoxidación del citocromo b producida por ambos inhibidores

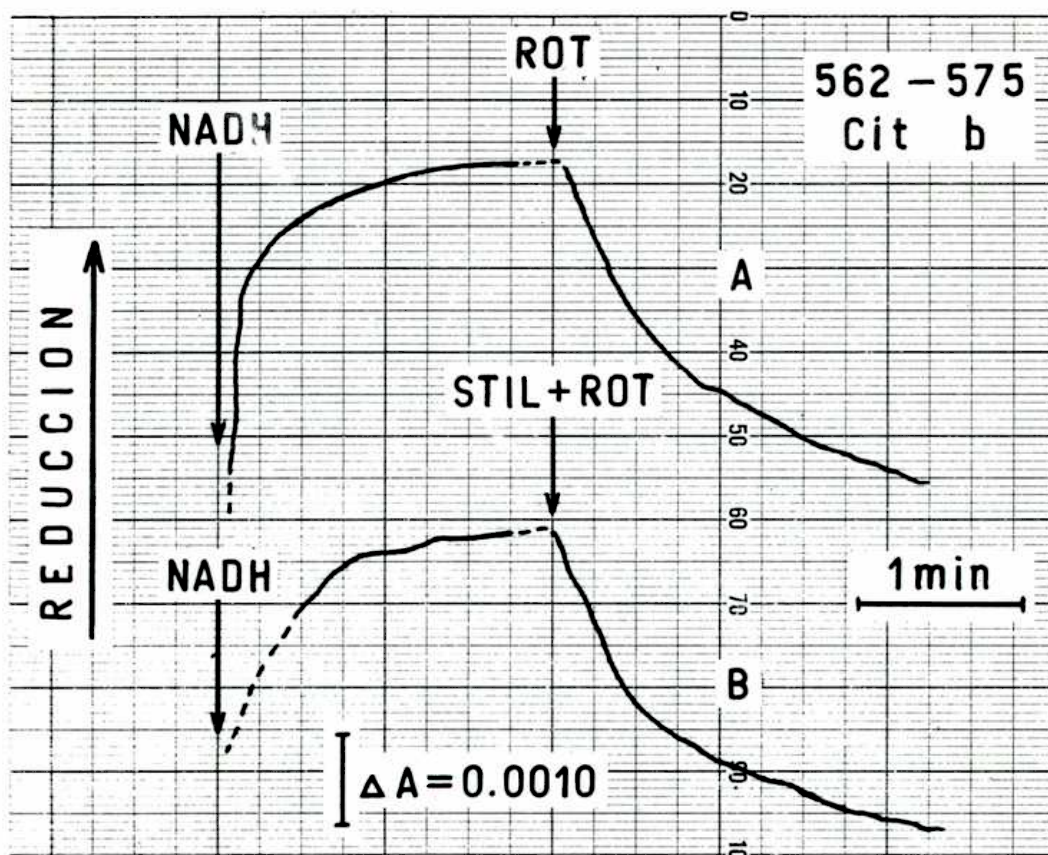


Fig. VI-4.- Competencia entre Stil y Rot sobre la reoxidación de b producida por ambos inhibidores.

NADH-oxidasa 1.8 mg/ml; cit. b red 0.7 μM (ditionito); NADH 37.5 μM ; Rot 0.8 nmol/mg prot; Stil 75 μM ; fosfato 0.1 M, pH 7.4. Vol. final 3 ml. Velocidad de reoxidación inicial 3 nM/seg en ambos casos.

Se observa claramente en la Figura VI-4 que en el efecto estudiado no solamente hay competencia en la extensión del desplazamiento, sino también en cuanto a la velocidad a que se produce, que es en ambos casos 0.003 $\mu\text{M}/\text{seg}$. (Figura VI-4; experimentos A y B).

Esta competencia es coincidente con las respuestas análogas y la indiferenciación de los sitios.

Reoxidación del citocromo b por rotenona y Stil.

Efectos del ascorbato

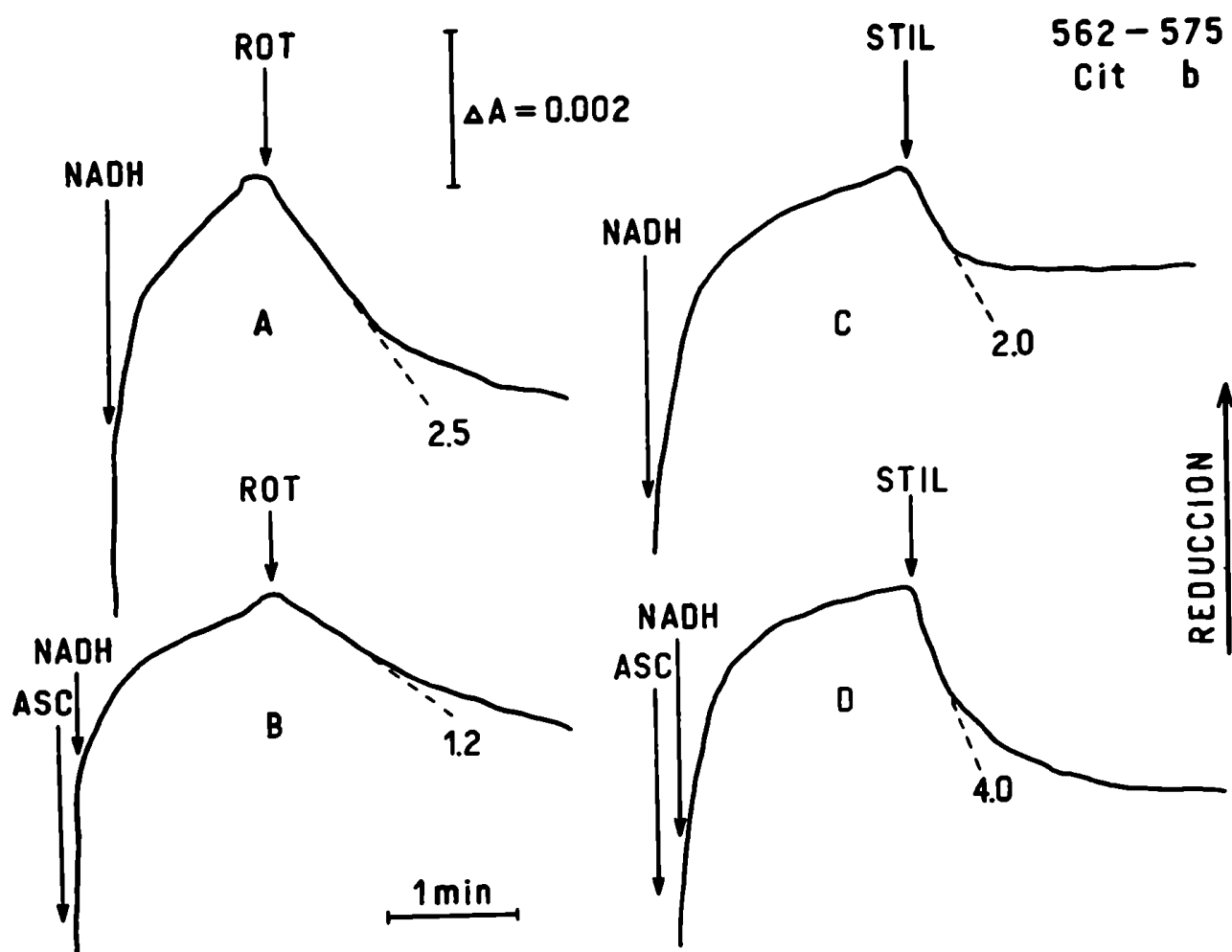


FIG. VI-5.- Reoxidación de cit. b por Stil y Rot en presencia y ausencia de ascorbato.

NADH-oxidasa 2 mg/ml; Rot 0.25 nmol/mg prot; Stil 25 μ M; cianuro 2 mM; ascorbato 10 mM; NADH 37.5 μ M fosfato 0.1 M, pH 7.4. Vol. final 3 ml. Velocidades iniciales orden cero mM/seg A: 2,5; B: 1,2; C: 2; D: 4.

Si se agrega ascorbato al sistema, la inhibición por Stil aparece muy potenciada (Figura IV-7). Era presumible que tuviera el mismo efecto sobre este sistema. Efectivamente la presencia de ascorbato, aumentó la velocidad de reoxidación por Stil de 2 a 4 nM/seg. Inversamente, la presencia de ascorbato disminuyó la velocidad de reoxidación por rotenona 2.5 a 1.2 (nM/seg.).

Reducción de flavoproteína a 465-510. Influencia de Stil y rotenona en presencia y ausencia de ascorbato

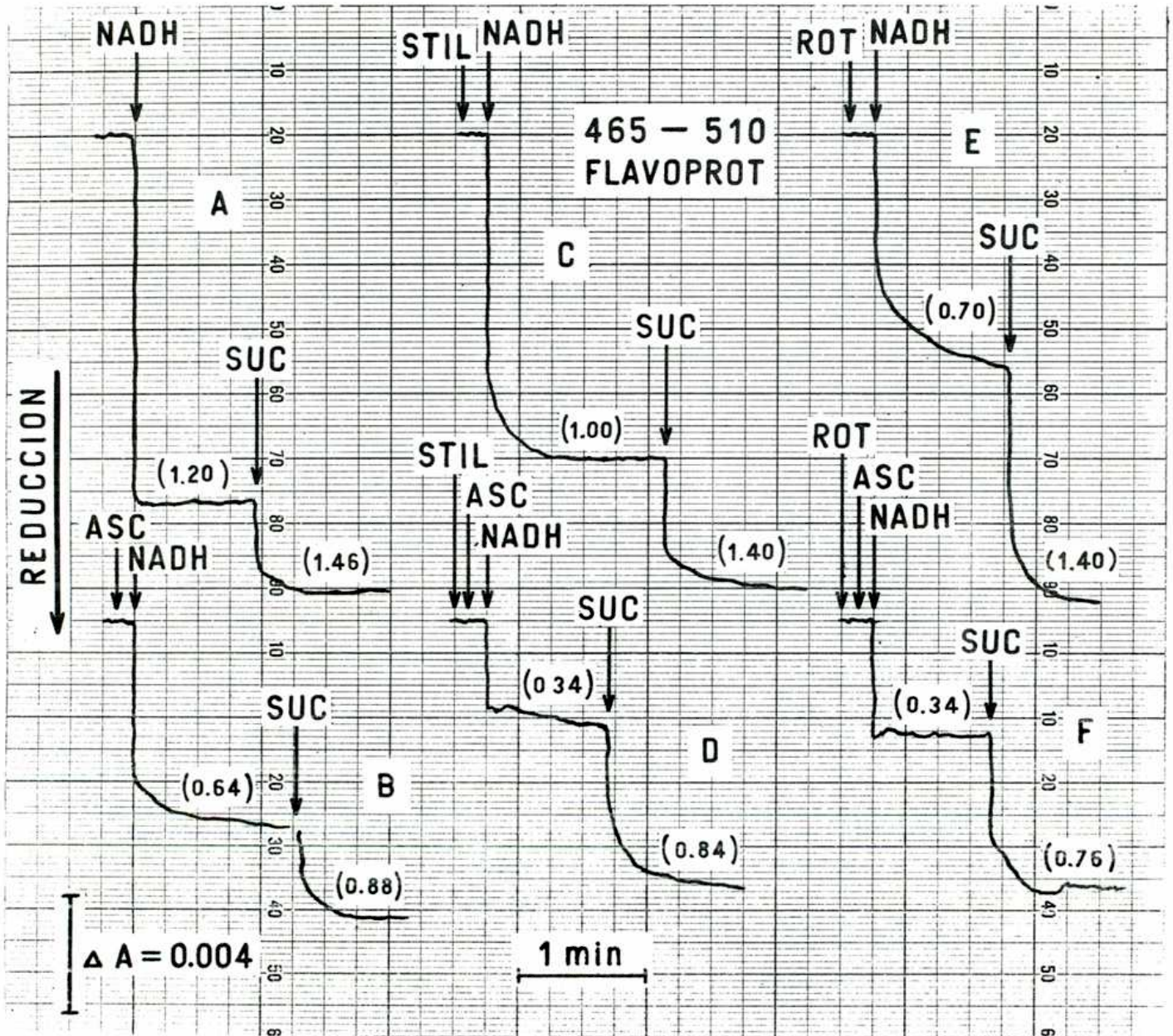


Fig.VI-6.- Efecto de Stil y Rot (Rotenona) sobre la reducción a 465-510 nm en presencia y ausencia de ascorbato.

NADH-oxidasa 1.8 mg/ml; NADH 25 μ M succinato 0.6 mM; cianuro 2 mM; ascorbato 10 mM; Stil 25 μ M; Rot. 0.8 nmol/mg prot. (ditionito) 3.2 μ M; fosfato 0.1 M, pH 7.4. Vol. final 3 ml. Las cifras significan nivel de reducción (μ M).

Los experimentos A, B, C y D de Figura VI-6, corresponden a los de Figura IV-20. En los experimentos E y F se observa la reducción a 465-510 por NADH con agregado

previo de rotenona, en presencia y ausencia de ascorbato.

Aparentemente, a concentraciones inhibitoras altas como es 25 μM estrógeno, resuelve poco los dos componentes redox. La presencia de ascorbato, aparte de eliminar contribuciones, potencia la inhibición de la reducción del segundo componente redox del sector NADH deshidrogenasa.

En los experimentos E y F se observa que si bien es alta la concentración de rotenona, se produce directamente una inhibición del 50 %, tanto en presencia como en ausencia del ascorbato. La extensión de la reducción es menor en presencia del ascorbato, en vista de la eliminación de contribuciones a dicha banda como ya se ha mencionado.

Efecto de rotenona sobre la actividad NADH-Q₀ reductasa

En un experimento análogo con estilbestrol Figura V-2 se obtienen valores muy semejantes de inhibición. A concentraciones altas de Q₀ (0.5 mM) la inhibición no alcanza al 60 %. Esto coincide con la aparición de actividad insensible a rotenona, a medida que aumenta la concentración de quinona.

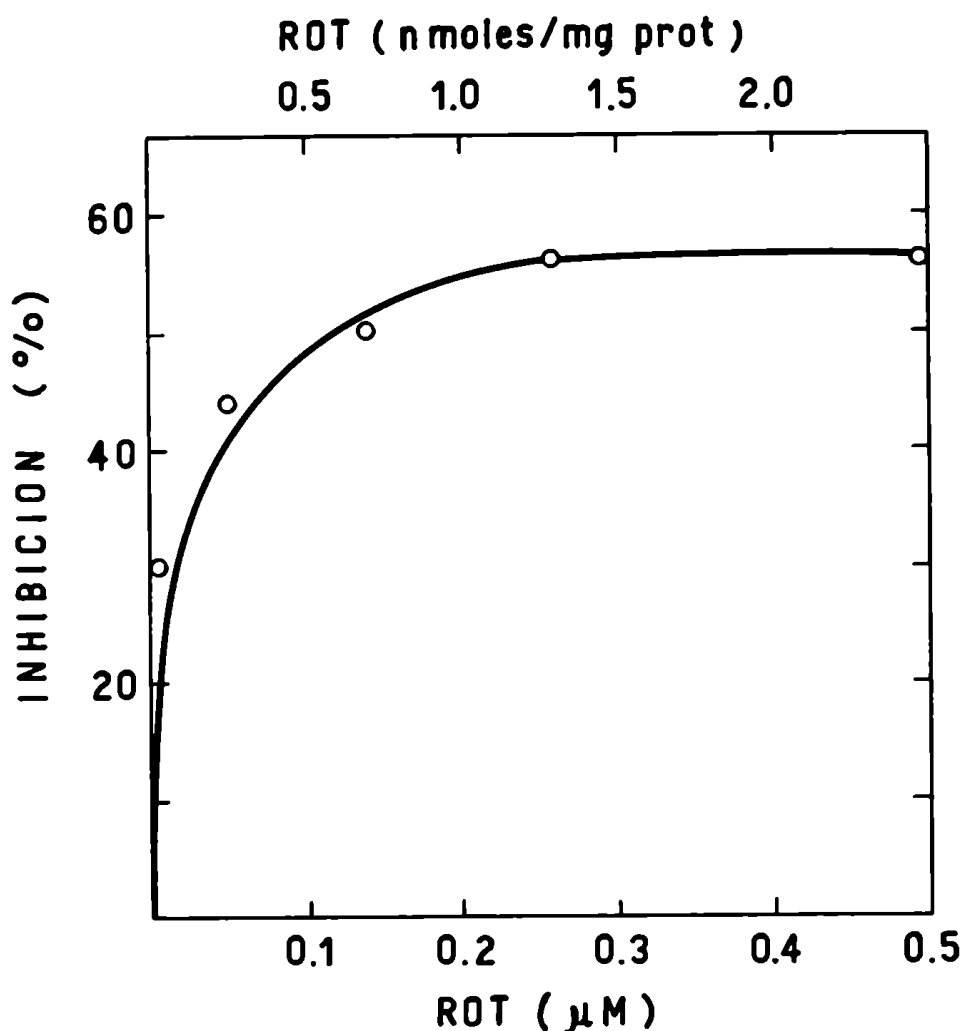


Fig. VI-7.- Efecto de Rotenona sobre la actividad NADH-Q_o reductasa.
 NADH-oxidasa 0.2 mg/ml. Tris-sulfato 0.05 M, pH 8; cianuro 1.0 mM;
 Q_o 0.5 mM NADH 0.125 mM. Vol. final 3 ml.

En un experimento que no se detalla se observó que la presencia de ambos inhibidores rotenona + Stil, dió la misma inhibición que cada uno de ellos por separado, una nueva evidencia de competencia entre Stil y rotenona.

Efecto de rotenona sobre el aparente K_m
para NADH-Q_o reductasa

Los valores concuerdan exactamente con los obtenidos cuando se utilizó estilbestrol. La inhibición resultó no competitiva para el sitio de mayor afinidad K_m = 62 μM y de aparente competencia para la entrada al primer sitio de K_m mayor: 360 μM .

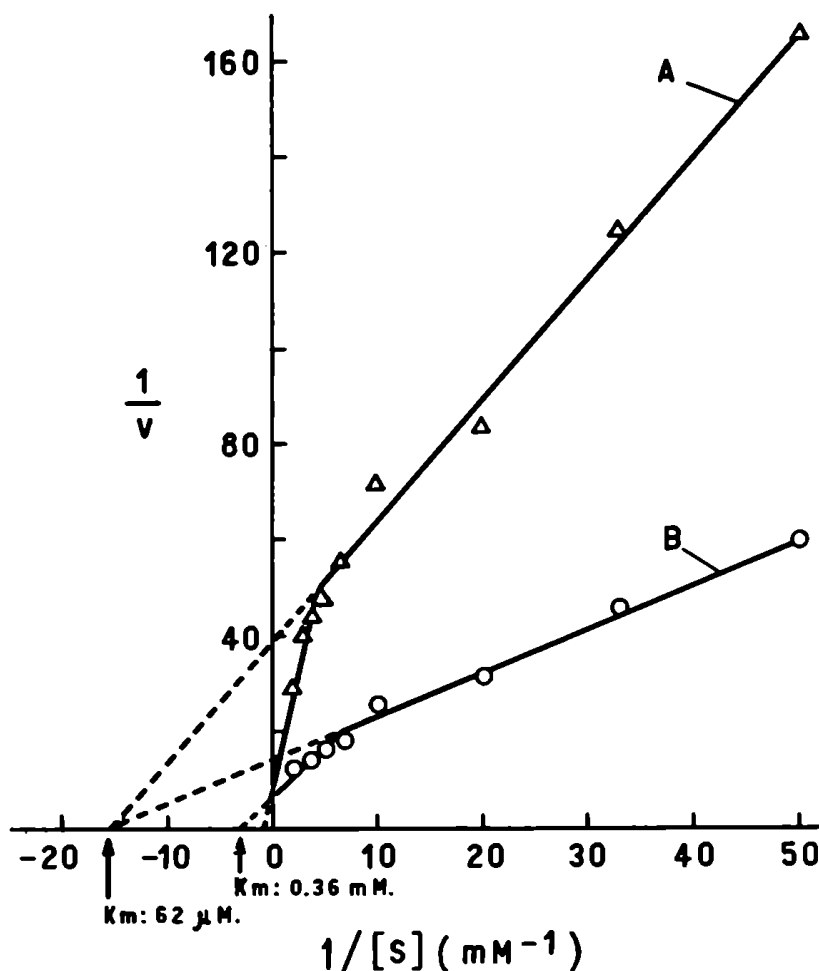


Fig. VI-8.- Variación de la actividad NADH-Q₁₀ reductasa con la concentración de quinona. Influencia de Rot.
 NADH-oxidasa 0.17 mg/ml; fosfato 0.1 M, pH 7.4; cianuro 1.0 mM; NADH 0.125 mM. Abscisa, recíproca de la concentración de quinona (mM). Ordenada, recíproca de la variación de absorbancia en 15 seg a 340 mμ.
 A, Rot 0.26 μM B testigo.

La interpretación hecha en el caso del estilbestrol vale para estos resultados y en este caso se encuentra análogo comportamiento de ambos inhibidores.

Variación de la actividad NADH-ferricianuro reductasa con la concentración de ferricianuro. Efecto de Stil y rotenona

A bajas concentraciones de ferricianuro se observa inhibición por rotenona a diferencia del estilbestrol.

Hay solamente un ligero desplazamiento del valor en algunos puntos para el estrógeno.

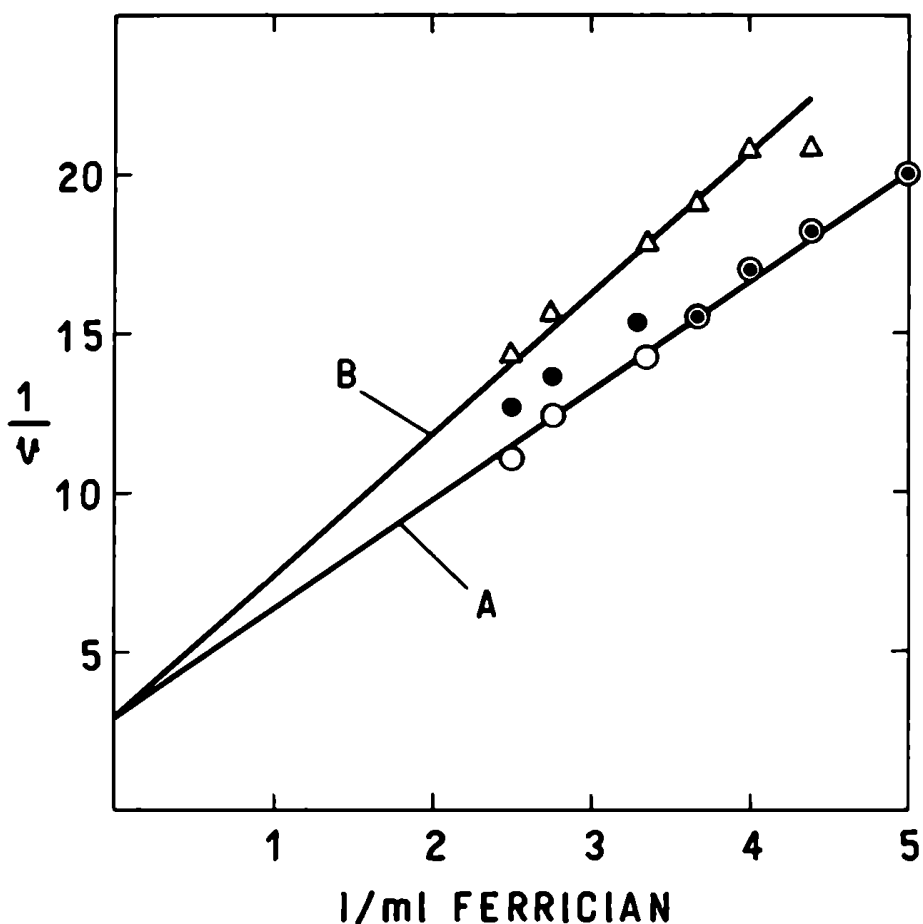


Fig. VI-9.- Variación de la actividad NADH-deshidrogenasa con la concentración de ferricianuro. Influencia de Stil y Rot.

NADH-oxidasas 0.03 mg/ml; NADH 0.15 mM fosfato 0.04 M, pH 7.4. Abcisa, recíproca de la concentración de ferricianuro en ml de ferricianuro 0.01 M agregados a la mezcla de reacción. Ordenada, recíproca de la variación de absorbancia/min a 420 nm. Vol. final 3 ml. Control \circ ; Rot 0.26 μM Δ ; Stil 30 μM \bullet .

Ya se había observado en otras condiciones experimentales, la misma diferencia entre Stil y rotenona (Capítulo V; Figura V-11).

Conclusiones. 1.- Los diferentes sistemas ofrecen evidencias de analogía y competencia (Figura VI-4 y observaciones sobre inhibición de reducción de quinona Q_0), como para suponer que ambas inhibiciones afectarían al mismo componente enzimático, no necesariamente al mismo grupo.

2.- Pueden suponerse sin embargo mecanismos de acción distintos ó fijación a distintos grupos sobre el mismo componente proteico, en vista de las diferencias encontradas en presencia de ferricianuro y ascorbato.

Referencias

- (VI-1) Lindahl, P.E. y Oberg, K.E. Nature 187 (1960) 784
- (VI-2) Ernster, L.; Dallner, G. y Azzone, G.F. J.Biol. Chem. 238 (1963) 1124
- (VI-3) Lindahl, P.E. y Oberg, K.E. Exptl.Cell Res. 23 (1961) 228
- (VI-4) Burgos, J. y Redfearn, E.R. Bioch.Biophys.Acta 110 (1965) 475
- (VI-5) Schatz, G. y Racker, E. J.Biol.Chem. 241 (1966) 1329
- (VI-6) Ernster, L.; Hoberman, H.D.; Howard, R.L.; King, T.E.; Lee, C.P.; Mackler, B. y Sottocasa, G. Nature 207 (1965) 940
- (VI-7) Tyler, D.D.; Gonze, J.; Estabrook, R.W. y Butow, R.A. en "Non-Heme Iron Proteins: Role Energy Conversion", Symp. Yellow Springs, Ohio (1965) p. 447
- (VI-8) Pullman, M.E. y Schatz, G. en "Ann.Rev.Biochem." vol. 36 (1967) p. 539
- (VI-9) Chance, B. en "Enzymes: Units of Biological Structure and Function". (Gaebler, O.H. ed.) Academic Press, N.Y. (1956) p. 447
- (VI-10) Oberg, K.E. Exp.Cell Res. 24 (1961) 163
- (VI-11) Estabrook, R.W. J.Biol.Chem. 227 (1957) 1093
- (VI-12) Ernster, L. y Lee, C.P. en "Ann.Rev.Biochem." 33 (1964) 729
- (VI-13) Minakami, S.; Ringler, R.L. y Singer, T.P. J.Biol.Chem. 237 (1962) 569
- (VI-14) Minakami, S.; Cremona, T.; Ringler, R.L. y Singer, T.P. J.Biol.Chem. 238 (1963) 1529
- (VI-15) Machinist, J.M. y Singer, T.P. Proc.Nat.Acad. Sci 53 (1965) 467

- (VI-16) Horgan, D.J. y Singer, T.P. Bioch.Biophys.Res. Comm. 27 (1967) 356
- (VI-17) Chance, B.; Ernster, L.; Garland, P.B.; Lee, C.P.; Light, P.A.; Ohnishi, T.; Ragan, E.I. y Wong, D. Proc.Nat.Acad.Sci 57 (1967) 1498
- (VI-18) Hatefi, Y. Proc.Nat.Acad.Sci 60 (1968) 733
- (VI-19) Horgan, D.J.; Singer, T.P. y Casida, J.E. J.Biol. Chem. 243 (1968) 834
- (VI-20) Bois, R. y Estabrook, R.W. Arch.Bioch.Biophys. 129 (1969) 362
- (VI-21) Palmer, G.D.; Horgan, J.; Tisdale, H.; Singer, T.P. y Beinert, H. J.Biol.Chem. 243 (1968) 844
- (VI-22) Hatefi, Y.; Stempel, K.E. y Hanstein, W.G. J.Biol. Chem. 244 (1969) 2358

CAPITULO VII

Ensayos de acción de Stil sobre la NADH-deshidrogenasa funcional particulada en el sistema completo no fosforilante

Se entiende por deshidrogenasas ligadas a cadena respiratoria, el grupo de flavoproteínas asociadas estructural y funcionalmente al sistema de transporte de electrones y las cuales sirven como portadores para la entrada a cadena respiratoria de los equivalentes reducidos, originados por los metabolitos oxidables (1). Los miembros típicos de este grupo de enzimas, están tan íntimamente ligados a la matriz membranosa insoluble, que su extracción es muy dificultosa. Por lo menos, en el caso de las enzimas de mamíferos, una vez obtenidas en forma soluble, no muestran ciertas reacciones de la deshidrogenasa particulada. Es imposible decidir hasta el momento, si la falta de determinada sensibilidad a inhibidores ó reactividad frente a algún aceptor, se debe a modificaciones preparativas, remoción de componentes sustanciales ó requerimiento de una estructura integrada para determinadas actividades. La NADH deshidrogenasa soluble ha mostrado un absoluto requerimiento de lípidos para reacciones con homólogos de Q_{10} , por ejemplo (2). Se está estudiando, en algunos sistemas de cadena respiratoria el fenómeno general de allotopía (3). Ciertas enzimas, ligadas a membrana exhiben propiedades que no son compartidas totalmente por las enzimas solubles.

En vista de la dificultad para romper los complejos enzimáticos, las "NADH deshidrogenasas" solubles obtenidas por diversos tratamientos (fosfolipasa de venenos de serpientes, ácido-etanol, urea, tiourea, etc) difieren

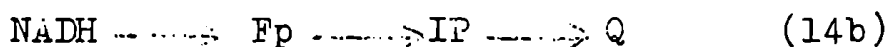
en valores de peso molecular, relaciones molares de componentes de óxido-reducción ligados como (FMN, Fe no hemínico y azufre lábil) y consecuentemente especificidad a los aceptores (4). Sobre estas bases, peso molecular, composición y actividad enzimática, estas preparaciones se pueden dividir en dos categorías (5).

1^o Con PM entre 70.000 y 140.000 que contienen flavina, Fe no hemínico y S lábil en una relación 1: 2-4: 2-4 respectivamente. En general se han obtenido por tratamiento ácido-etanol de partículas mitocondriales (6-10) con una excepción, King y Howard (11) quien la aisló también de mitocondrias, pero con fosfolipasa de veneno a 37° C.

2^o Con PM alto estimado en 500.000-800.000, la conocida NADH-deshidrogenasa mitocondrial de Singer y col. (12) obtenida por tratamiento con fosfolipasa pero a 30° C. Esta enzima tiene una relación de flavina: Fe no hemínico: S lábil igual a 1:18:28 a 1 nanomol de flavina/mg de proteína. Es capaz de dar enzimas de la primera categoría, luego de varios tratamientos incluyendo ácido-etanol, aunque diferentes entre sí con el aspecto de productos degradativos y sin actividad.

En el capítulo III se describe el fraccionamiento de la cadena respiratoria en complejos particulados capaces de interacción recíproca (13). Entre ellos el complejo particulado I, tiene un PM aproximado de 500.000, 1.5 nanomol FMN/mg de proteína y una relación flavina: Fe no hemínico; S lábil de 1:18:17-20; todo esto semeja bastante bien la composición de la NADH deshidrogenasa de Singer (12), pero además el complejo I contiene Q₁₀ y considerable cantidad de lípidos y proteína estructural.

Recientemente Hatefi y Stempel (14a) han resuelto dicho complejo por tratamiento con urea en a) una flavo-hierro proteína (FMN, Fe no hemínico y S lábil en relación molar 1:4:4; b) una hierro-proteína (Fe no hemínico y S lábil en relación 1:1 y c) un componente insoluble similar a proteína estructural. La capacidad de la hierro-proteína de servir como oxidante para la flavo-hierro proteína reducida por NADH, sugiere que la secuencia NADH-Q de mitocondria pueda ser formulada de esta manera.



Los experimentos mencionados podrían ayudar a clarificar la relación entre el complejo I y la NADH deshidrogenasa soluble de Singer con las más pequeñas NADH deshidrogenasas de PM aproximado 80.000 y que tienen relaciones molares de flavina a Fe no hemínico 1:2 ó 1:4. Podrían resultar similares a la hierro-flavo-proteína de Hatefi (14). Esta interpretación (10) es consistente con la demostración por el grupo de Singer de que las NADH deshidrogenasas de alto PM puedan ser transformadas por tratamientos con enzimas proteolíticas (15) ó urea ó tiourea (16), ácido-etanol (17) en las deshidrogenasas de bajo PM. Ya que reactivos como la urea, tiourea, muy probablemente actúen sin romper ligaduras covalentes, parecería preexistir como entidad discreta la NADH de bajo PM, ligada estructuralmente a otra proteína. El tratamiento con urea, parecería liberarla de un precursor de mayor peso, antes que producirla por degradación de otra proteína (10).

Separadamente Mackler y col. (10) por un lado y Hatefi y Stempel (5) por otro encuentran una NADH

deshidrogenasa soluble de PM aproximado de 70.000, homogénea y perfectamente reproducible, que representaría la flavo-proteína componente I del sector más complejo NADH deshidrogenasa, con su característica actividad NADH-citocromo c reductasa insensible a antimicina A en su forma soluble. Ambas proteínas son muy semejantes a pesar de haber sido obtenidas de materiales diferentes y por tratamientos distintos.

Como se dijo anteriormente, Singer y col. (18) logran fragmentar con una variedad de reactivos que ordinariamente no rompen ligaduras covalentes su NADH deshidrogenasa de alto PM (12). Estos procesos estaban acompañados por pérdida de la señal λ igual 1.94 de Fe no hemínico y S lábil, cambios en el espectro de absorción por pérdida de dichos componentes y cambios en la especificidad de sustrato.

Se observa emergencia de actividad catalítica hacia citocromo c y Q_1 (15). Aunque hay numerosos ejemplos en la literatura sobre la protección por sustrato de enzimas contra la desnaturalización e inactivación, parecía raro encontrar fenómenos de inactivación inducida por sustrato. Grisolia (19) que ha revisado estos casos, supone que ambos son diferentes aspectos de un mismo fenómeno: cambios conformacionales que ocurren durante la combinación de la enzima con su sustrato.

Este es el caso de la NADH deshidrogenasa de Singer soluble (12), la cual es fragmentada e inactivada por NADH en aire, pero fragmentada y no inactivada en anaerobiosis. Esto daba un indicio sobre la existencia de subunidades catalíticamente activas; pero se las interpretaba solamente como temporarias estabilizaciones del centro activo en el complejo enzima-sustrato (18). La

emergencia de actividades de citocromo c reductasa ha sido vista como uno de los síntomas de cambio conformacional inicial en la proteína (18). En este proceso degradativo se observaba una cinética muy compleja con aparición de fragmentos muy activos en actividad NADH ferricianuro reductasa aislados posteriormente, aunque la velocidad a concentración infinita de ferricianuro resultaba muy disminuída. Se hace en dicho trabajo (18), la mención de que igual fenómeno es observable aunque en proporción mucho menor en los sistemas particulados completos del tipo de las preparaciones utilizadas en nuestro estudio.

Los resultados de los experimentos anteriores (capítulos IV y V) sobre los segmentos funcionales NADH-citocromo b y NADH-Q reductasa señalaban a la NADH deshidrogenasa como el sitio de inhibición por el estrógeno. Se ensayó entonces, la preincubación de la NADH oxidasa con el mismo para observar un posible aumento de la actividad NADH-citocromo c reductasa, comparativamente con el efecto conocido de sustrato.

Se hizo pre-tratamiento con NADH (1 mM) y Stil (15 μ M) a temperatura ambiente en muestras de concentración 4.5 mg/ml. Al tiempo 0 una alícuota se lleva a la mezcla de reacción habitual para las actividades ferricianuro y NADH-citocromo c reductasas.

A los 90 minutos, se procedió de igual forma. La Tabla VII-1 nos muestra modificaciones en los % de actividad del control para las actividades NADH citocromo c reductasa y ferricianuro reductasa muy semejantes para el estrógeno y pre-tratamiento con NADH.

Tabla VII-1. Efecto de pretratamiento con NADH y Stil sobre actividades de ferricianuro y NADH-cit C reductasa

Preparación 4,5 mg/ml preincubadas con NADH (1 mM) y 6 Stil (15 μ M) a T. ambiente. A tiempo 0 una alícuota 0.05 ml al ensayo habitual para U_{max} ferric. y NADH cit. c reductasa a concentración fija. A los 90 min de cada control, se procede de igual forma. Las actividades de cit. c-reductasa μ mol/min/mg prot. Las de ferricianuro reductasa $\Delta A_{máx}$ a 420 nm

Condiciones de pretratamiento	Actividades				% Actividad inicial	
	Inicial		90 min		Ferric	Cit c
	Ferric	Cit c	Ferric	Cit c		
Control	1.25	1.26	1.25	1.30	100	104
NADH (1 mM)	1.25	1.26	0.7	1.63	56	130
Stil (15 μ M)	1.25	1.26	0.8	1.85	63	147
NADH + Stil	1.25	1.26	0.76	1.55	60	123

La presencia de ambos, no aumenta lo obtenido para cada uno de ellos separadamente.

Sea como efecto primario, relativo a la inhibición del transporte ó como consecuencia de un efecto más prolongado por el pre-tratamiento, tomado como ensayo de localización la acción del estrógeno parece situarse a nivel de la NADH deshidrogenasa. Esos resultados sugieren un cambio conformacional a consecuencia de la preincubación que podría producir consecuentemente una mayor reactividad a los mercuriales y otros reactivos de tioles.

Se han caracterizado y descripto los grupos SH reactivos de cadana respiratoria (20). El tipo IV ó

sulfhidrilo de reactividad muy lenta, que parece funcional en el sector próximo a la quinona de Minakami, Schindler y Estabrook (21) y el grupo III, altamente reactivo, que aparece asociado con el componente de EPR $g = 1.94$ de la NADH deshidrogenasa. Se postula la conversión de un grupo disulfuro presente en el estado inicial a un grupo reactivo a mercuriales con ligadura a Fe (22). Este sulfhidrilo reactivo al mercurial rápidamente, puede, en la interpretación de Singer (18) ser consecuencia del cambio conformacional supuesto, ya que aparece luego de pre-tratamiento con el sustrato. Tipos I y II aparecen exclusivamente, en las NADH-deshidrogenasas solubles (23,24).

Curva de efecto de concentración de estrogéno sobre consumo de O_2 . Método polarográfico

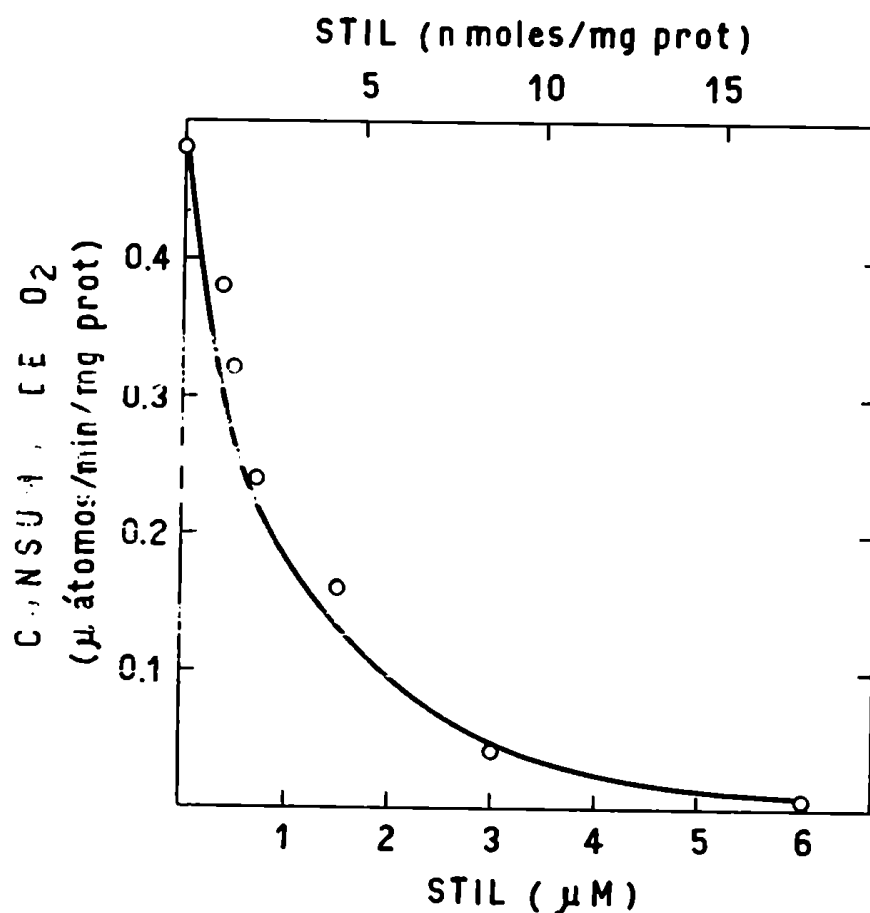


Fig. VII-1.- Efecto de Stil sobre consumo de oxígeno de la NADH-oxidasa. (método polarográfico) NADH-oxidasa 1.75 mg/5 ml O_2 ; 0.28 mM T 20 C; NADH 0.6 mM fosfato 0.1 M, pH 7.4. Vol. final 5 ml.

Como se utilizó un método polarográfico para los experimentos con reactivos de tioles era necesario contar con esta curva de efecto que resulta muy semejante a la obtenida titulando oxidación del NADH espectrofotométricamente $I_{(50)}$ igual a $0.75 \mu\text{M}$ de Stil.

Reactividad a mercuriales luego de preincubación con Stil

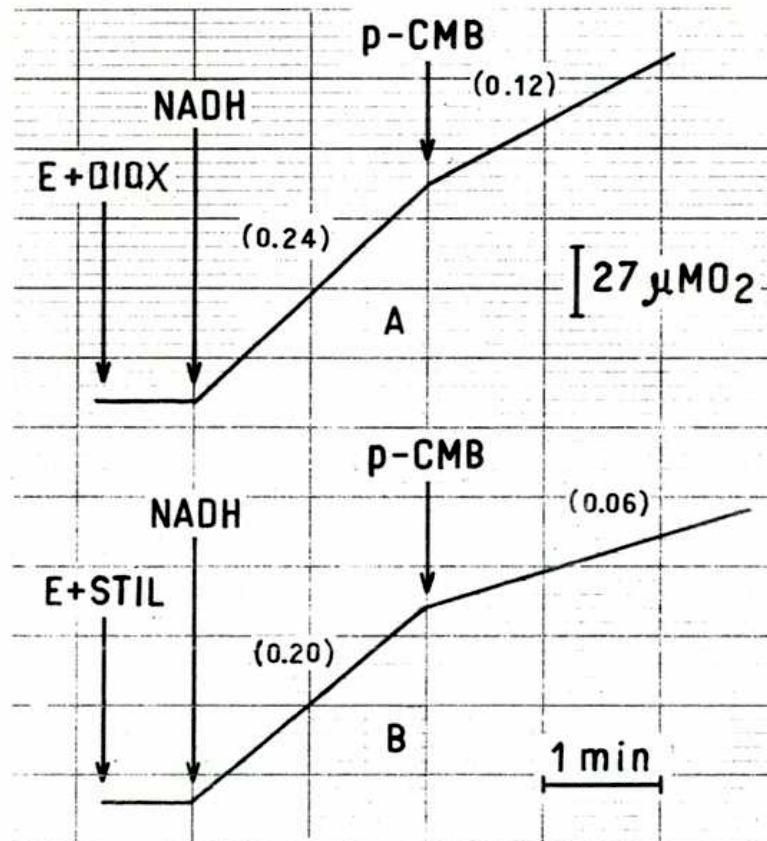


Fig. VII-2.- Reactividad a mercuriales luego de incubación con Stil. NADH-oxidasa $1.8 \text{ mg}/5 \text{ ml}$; NADH 0.6 mM ; p-Cl M B $20 \mu\text{M}$; fosfato 0.1 M , pH 7.4. Vol. final 5 ml . T: 24°C . Se incubó una muestra $4.5 \text{ mg}/\text{ml}$ con A: dioxano 5 B: Stil $15 \mu\text{M}$. Una alícuota 0.4 ml se lleva al Vol. final 5 ml y se mide actividad primero en ausencia y luego en presencia del p-Cl M B.

Tabla VII-2. Reactividad de NADH-oxidasa a mercuriales luego de tratamiento con Stil.

Condiciones como en la Fig. VII-2.

Agregados	Act. esp. (u átomo/min/mg prot)
Control (dioxano)	0.24
Idem, mas p-CMB	0.12 (50) ¹
Stil	0.20
Idem, mas p-CMB	0.06 (70) ¹

¹ Inhibición relativa (%)

Los resultados de Figura VII-2 y Tabla VII-2 muestran una reactividad aumentada a mercuriales luego de preincubación con estilbestrol. Con relación al control con dioxano en las mismas condiciones se obtiene un 50 % de la actividad en el sistema preincubado con Stil. Teniendo en cuenta los resultados anteriores a nivel de la NADH deshidrogenasa que daban actividad aumentada de citocromo c reductasa debería tratarse de grupos ahora reactivos de dicha proteína; estos resultados reforzarían entonces los de Tabla VII-1.

Redfearn y Burgos (25) encuentran que concentraciones de reactivos de tioles que por sí no modifican sustancialmente la actividad de NADH oxidasa, potencian la inhibición de la actividad por la rotenona, en el ensayo directo.

Aunque en las condiciones del experimento anterior es muy poco probable una acción de este tipo se ensayó dicha posibilidad relativa a la inhibición por el estrógeno.

Efecto de Stil y Etil-maleimida sobre
la oxidación de NADH

Tabla VII-3. Efecto de Stil y Etil-maleimida sobre la oxidación de NADH.

Control 24°C 1,8 mg prot/5 ml. NADH: 0.6 mM para iniciar las reacciones. Stil y EM agregados 1 minuto antes del agregado de NADH.

Adiciones	Actividad relativa %
Ninguna	100
EM (0.1 mM)	60
Stil (0.5 uM)	65
EM (0.1 mM) + Stil (0.5 uM)	50

La inhibición producida por etil-maleimida sobre la actividad de NADH oxidasa es mayor que la observada en los trabajos antes mencionados (25). Cabe recordar que varía con las preparaciones e inclusive con el buffer (26).

Sin embargo no se vé potenciada la inhibición. Si se toma como control la actividad residual en presencia del reactivo de tioles (Tabla VII-3 a) el esteroide es capaz de modificarla un 16 % (Tabla VII-3 c). Si se observan las actividades relativas % de la inicial, los efectos están muy lejos de sumarse. Es como si estuviera dificultada la acción del estilbestrol por la presencia del reactivo de tioles. Este experimento aparte de agregar una nueva diferencia a las consignadas en el capítulo VI entre rotenona y estilbestrol, descarta totalmente una interpretación de potenciación de la inhibición en el experimento anterior. En el caso de rotenona (25) una concentración inhibidora 50 % de rotenona en presencia de una concentración inhibidora del 30 % de etil-maleimida da 100 % de inhibición.

Discusión

De los trabajos de la literatura reseñados en el capítulo IV y en el presente parecen establecerse dos cuestiones que serían: a) el sector NADH deshidrogenasa contiene dos componentes proteicos redox separables funcionalmente por inhibición con Amytal, rotenona (14b) y (IV-8) ó estilbestrol (nuestros resultados; Boveris y Stoppani en prensa).

b) La posible existencia de una proteína de bajo PM aproximado de 80.000, flavo-hierro-proteína que puede liberarse del sector NADH deshidrogenasa, sin pérdida

de actividad catalítica (5,10) aunque integrada en cadena muestre diferentes propiedades. Esta especie redox representaría el componente I en el sector NADH deshidrogenasa. La enzima soluble y no la ligada a partícula, tiene actividad NADH-citocromo c reductasa, entre otras actividades tipo diaforasa. El fenómeno inducido por sustrato sobre la NADH deshidrogenasa, aún particulada observado por Singer (12), quedaría vinculado al componente I anteriormente citado y su relación estructural con el complejo "NADH deshidrogenasa".

En nuestros resultados, los ensayos de preincubación si bien sugieren un cambio conformacional, no están hechos en las condiciones de la inhibición directa; el aumento de actividad NADH-citocromo c reductasa y el aumento de reactividad frente a reactivos de tioles muy probablemente indican al componente I en el sector NADH deshidrogenasa como el sitio de acción del estrógeno. Sin embargo no ha sido establecido el nivel de inhibición de la NADH oxidasa frente a estos cambios, ni su relación con la reversibilidad de la acción del estrógeno.

Conclusiones

1° Se observa por preincubación con estilbestrol un aumento de actividad NADH-citocromo c reductasa, atribuido en un experimento análogo con NADH (18) a cambios en las propiedades de la NADH deshidrogenasa funcional, particulada, ligada a cadena respiratoria.

2° Consecuentemente frente a reactivos de tioles se encuentra reactividad aumentada con el mismo tratamiento.

3° La presencia de reactivos de tioles no refuerza la inhibición por estilbestrol a diferencia de lo observado por Burgos y Redfearn para rotenona (25).

4° Estos resultados sugieren un cambio conformacional a nivel de la NADH deshidrogenasa. Las concentraciones utilizadas de estrógeno (15 μ M) permiten suponer que no se trate de efectos inespecíficos y que como ensayo de localización tenga validez; en cuanto al mecanismo, ni en el plano de las sugerencias se puede establecer correlación entre el efecto primario de inhibición del transporte y los cambios aparecidos luego de preincubación.

Referencias

- (VII-1) Singer, T.P. en "Biological Oxidations".
(T.P. Singer ed.). Interscience Publishers
J. Willey y Sons (1968) p. 339
- (VII-2) Machinist, J.M. y Singer, T.P. J.Biol.Chem.
240 (1965) 3182
- (VII-3) Racker, E. y Bruni, A. en "Membrane Models".
(L. Bolis y B.A. Pethica eds) J. Willey y
Sons (1968) p. 138
- (VII-4) King, T.E.; Howard, R.L.; Kettman, J.;
Hedgekar, B.M.; Kubogania, M.; Nickel, K.S. y
Posschl, E.A. en "Flavins and Flavoproteins".
(E.C. Slater ed.) Elsevier, Amsterdam (1966)
p. 441
- (VII-5) Hatefi, Y. y Stempel, K.E. J.Biol.Chem. 244
(1969) 2350
- (VII-6) Mahler, H.R.; Sarkar, N.K.; Vernon, C.P. y
Alberty, R.A. J.Biol.Chem. 199 (1952) 585
- (VII-7) De Bernard, B. Bioch.Biophys.Acta 23 (1957)
510
- (VII-8) Pharo, R.L.; Sordahl, L.A.; Edelhoeh, H. y
Sanadi, D.R. Arch.Biochem.Biophys. 125 (1968)
416
- (VII-9) Mackler, B. Bioch.Biophys.Acta 50 (1961) 141
- (VII-10) Kumar, S.A.; Rao, N.A.; Felton, S.P.;
Huennekens, F.M. y Mackler, B. Arch.Bioch.
Biophys. 125 (1968) 436
- (VII-11) King, T.E. y Howard, R.L. J.Biol.Chem. 237
(1962) 1686
- (VII-12) Ringler, R.L.; Minakami, S. y Singer, T.P.
J.Biol.Chem. 238 (1963) 801
- (VII-13) Hatefi, Y.; Haavik, A.G. y Griffiths, D.E.
J.Biol.Chem. 237 (1962) 1676

- (VII-14a) Hatefi, Y. y Stempel, K.E. Bioch.Biophys.Res. Comm. 26 (1967) 301
- b) Hatefi, Y. Proc.Nat.Acad.Sci 60 (1968) 733
- (VII-15) Cremona, T.; Kearney, E.B.; Villavicencio, M. y Singer, T.P. Biochem.Z. 338 (1963) 407
- (VII-16) Cremona, T.; Kearney, E.B. y Valentine, G. Nature 200 (1963) 673
- (VII-17) Watari, H.; Kearney, E.B. y Singer, T.P. J.Biol.Chem. 238 (1963) 4063
- (VII-18) Rossi, C.; Cremona, T.; Machinist, J.M. y Singer, T.P. J.Biol.Chem. 240 (1965) 2634
- (VII-19) Grisolia, S. Physiol.Rew. 44 (1964) 657
- (VII-20) Mersmann, H.; Luthy, J. y Singer, T.P. Bioch. Biophys.Res.Comm. 25 (1966) 43
- (VII-21) Minakami, S.; Schindler, F.J. y Estabrook, R.W. J.Biol.Chem. 239 (1964) 2042
- (VII-22) Tyler, D.D.; Gonze, J. y Estabrook, R.W. en "Non heme Iron Proteins Symp." Antioch. Press Yellow Springs, Ohio (1965) p. 447
- (VII-23) Minakami, S.; Cremona, T.; Ringler, R.L. y Singer, T.P. J.Biol.Chem. 238 (1963) 1529
- (VII-24) Cremona, T. y Kearney, E.B. J.Biol.Chem. 240 (1965) 3645
- (VII-25) Burgos, J. y Readfearn, E.R. Bioch.Biophys. Acta 110 (1965) 475
- (VII-26) Schatz, G.; Racker, E.; Tyler, D.D.; Gonze, J. y Estabrook, R.W. Bioch.Biophys.Res.Comm. 22 (1966) 585

Discusión general

La casi totalidad de los datos experimentales reunidos en este trabajo, están vinculados fundamentalmente, con la localización del sitio de acción del estilbestrol, en el efecto conocido de inhibición del transporte mitocondrial. Se determinó además, la naturaleza de la inhibición, en las condiciones de medida de los experimentos cinéticos. Se obtuvieron algunas respuestas que diferenciarían la inhibición por rotenona y dietilestilbestrol y se reúnen algunos datos que permiten inferir la posibilidad de un mecanismo de acción.

Sitio de acción del estilbestrol sobre el transporte de electrones mitocondrial

Es importante mencionar que en los sistemas utilizados al efecto, las concentraciones del estrógeno se mantuvieron en el orden aproximado 1.5×10^{-5} M. A concentraciones 10^{-4} M ó por encima de las mencionadas aparecen seguramente acciones inespecíficas, debidas a la capacidad de concentrarse en interfases, con sitios de ligadura y mecanismos probablemente distintos a los específicos (I-75,76).

Establecida la necesidad de un fraccionamiento funcional (Capítulo III) se utilizaron los segmentos NADH-cit b (Capítulo IV) y NADH-Q_{exóg.} (Capítulo V).

Se discutieron en los capítulos respectivos los resultados obtenidos. Se descarta una acción sobre el citocromo b, en relación con la inhibición, así como también la supuesta competencia con la quinona endógena por analogía estructural, en vista de los resultados con

homólogos de la misma y por la falta total de competencia al sitio de entrada que probablemente involucre, directa ó indirectamente a la quinona endógena (V-8,28).

No parece comprometido en la inhibición, tampoco el grupo flavina debido a la insensibilidad al estrógeno de varias reacciones que parecen involucrarlo directamente (transhidrogenasa (V-29), ferricianuro, NADH-Q₀ altas concentraciones de quinona) ver Capítulo V.

Con estos resultados, la etapa sensible al estilbestrol, en la cadena de transporte de electrones mitocondrial quedaría situada sobre el sector "NADH deshidrogenasa", ya que se descartan Q y el citocromo b, del lado O₂ del grupo flavina.

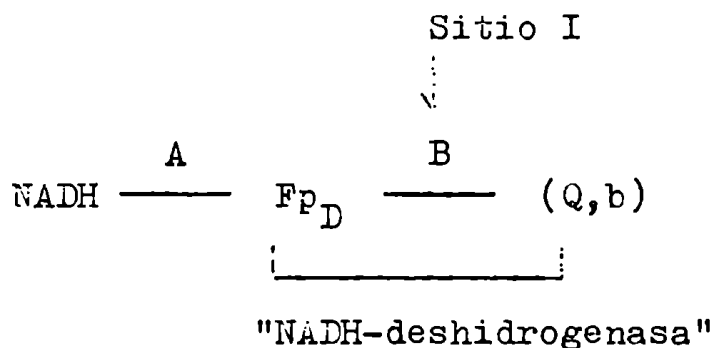
Parece necesario aclarar, que cuando un grupo de óxido-reducción no se encuentra implicado, la tendencia general es a localizar secuencialmente las etapas y se habla entonces, del lado O₂ del mismo como posibilidad para la etapa sensible. Sin embargo se debe tener en cuenta que cada componente proteico puede tener más de un grupo de óxido-reducción y si el efecto fuera sobre la proteína como tal, no puede inferirse tan fácilmente que al no estar involucrado dicho grupo, la ligadura del inhibidor sea anterior ó posterior en la secuencia. La "NADH deshidrogenasa" por ahora constituye quizás el segmento más complejo y menos resuelto de la cadena de transporte mitocondrial.

Varias líneas diferentes de trabajo, han llevado a resultados no del todo consistentes y conflictuales entre sí, que hacen difícil la interpretación de algunos de nuestros resultados experimentales. Aunque en cada caso se han mencionado, se trata ahora de reunir esa

información para aclarar en lo posible un problema de nomenclatura que es importante precisar.

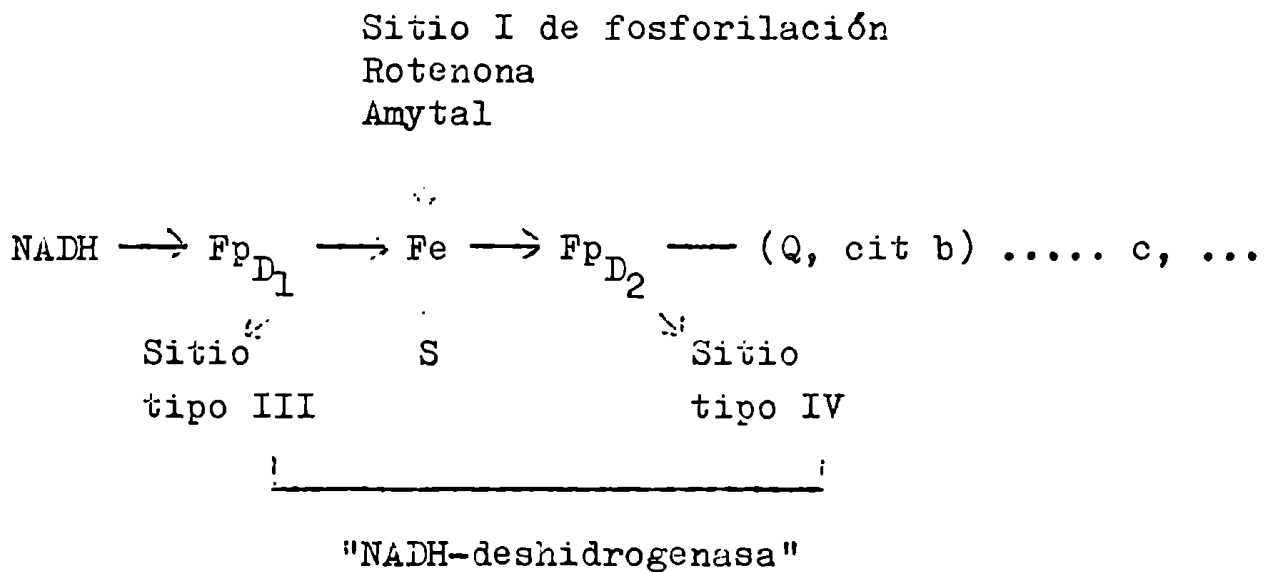
La información se acumula por varias vías independientes: estudios espectrofotométricos y de fluorescencia, fundamentalmente en mitocondrias fosforilantes (Chance y col. IV-8,9; VIII-1), estudios de fraccionamiento y caracterización de los componentes (Hatefi y col. IV-26,27; VII-5; Mackler y col. VII-10), estudios de resonancia paramagnética electrónica y señales características para el Fe no hemínico (Palmer, Beinert y col. VI-21); acciones relativas a dos grupos funcionales sulfhidrilos, lento tipo IV y rápido tipo III, también localizados sobre la "NADH deshidrogenasa" (Tyler, Gonze, Estabrook VII-17,20-24; VIII-2-4) todas ellas en relación con la fijación ó acción de los inhibidores conocidos a dicho sitio. Rotenona, Amytal, Piericidina A además, y el complemento de la línea de Singer, Horgan y Casida (VI-16,19) con fijación específica de los inhibidores marcados radioactivamente a las preparaciones submitocondriales (ETP) y extracción ó solubilización de la NADH deshidrogenasa de alto PM (VII-12; VIII-5).

La primera cuestión, aparentemente resuelta por el peso de las evidencias actuales es la de elección de A ó B en la secuencia del esquema que sigue para sitio de acción de los inhibidores mencionados y sitio I de fosforilación (VI-3,5-8; VIII-1,6).



Como queda claro el sitio se extiende sobre el sector comprendido entre la flavina de la "NADH-deshidrogenasa" hasta Q ó el citocromo b.

Espectros independientes de absorbancia y fluorescencia obtenidos por Chance (IV-8,9; VIII-1), en presencia y ausencia de los inhibidores Rotenona, Amytal, identifican los varios componentes involucrados en las transiciones sobre la "NADH-deshidrogenasa" como flavoproteínas (ver Capítulo IV).



Chance y col. (VIII-1)

Como el sitio de inhibidores es anterior al componente flavoproteico Fp_{D_2} y estudios de E.P.R. con partículas submitocondriales indican que el bulto de la señal para el Fe no hemínico, aparece del lado sustrato del bloqueo por Rotenona (observaciones de Schleyer y Lee (VIII-1), la posibilidad según Chance de que el Fe no hemínico contribuya a los cambios de absorbancia, parece apreciable solamente para Fp_{D_1} y no para Fp_{D_2} .

Con respecto a la posición relativa de sitio para inhibidores y Fe no hemínico Palmer, Horgan, Tisdale y Singer (VI-21), encuentran que el agregado de NADH

más próximo al sustrato resulta entonces involucrado en la señal, dada la ubicación del grupo III reactivo al mersalyl. Encuentran además un significativo decrecimiento de la señal en presencia de rotenona, durante el estado estacionario aeróbico, relativa a la observada anaeróbicamente. Desaparece un 50 % que suponen asociado a la succinato deshidrogenasa y su proteína de Fe no hemínico. Lo deducen de los valores $NADH + Rot + Succinato$ y $Rot + NADH + ascorbato$ (este último agregado para eliminar interferencias de citocromo oxidasa, Cu oxidado).

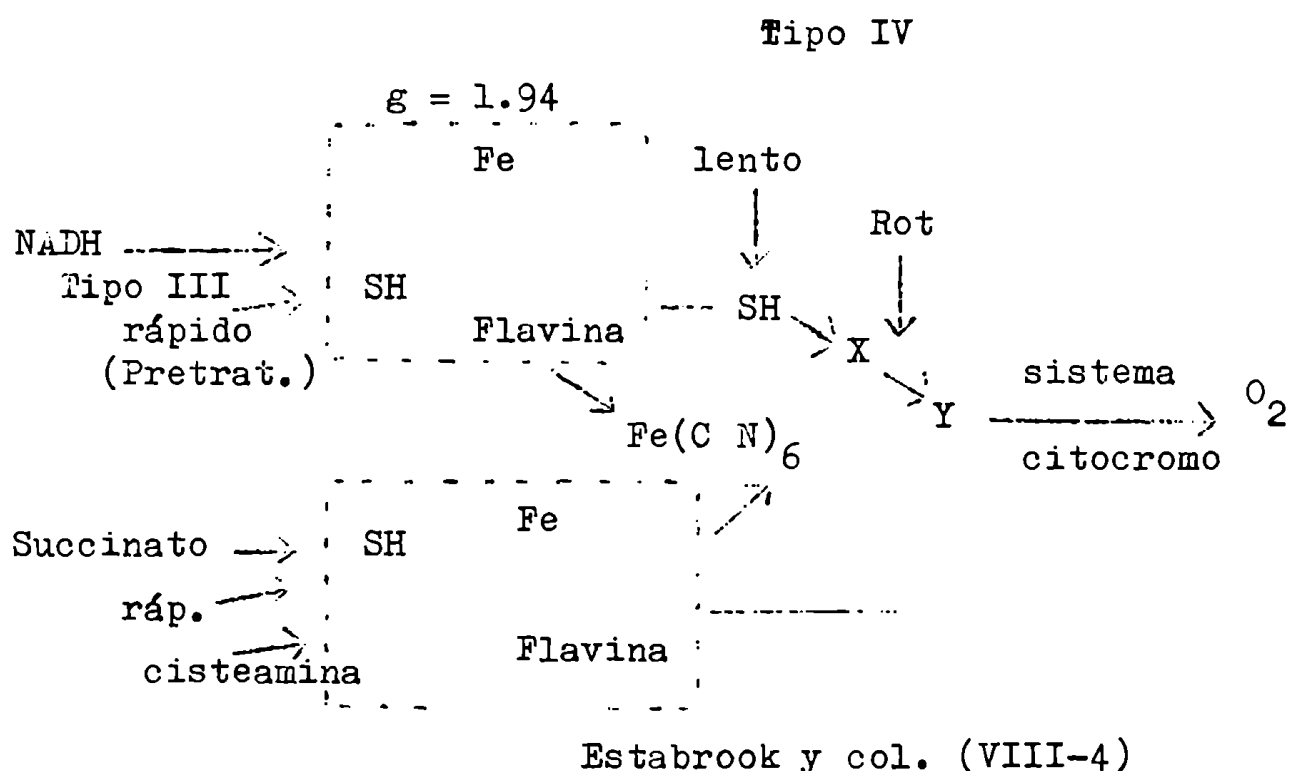
Esta es la primera conclusión que aparece en la literatura sobre el hecho de que rotenona impide la contribución de la S.D cuando se utiliza NADH como sustrato.

Como se observa, todavía no se había planteado si las contribuciones espectroscópicas a 460-500 nm y las señales g: 1.94 E.P.R. para el succinato solamente involucraban a la succinato deshidrogenasa ó algún componente del sector "NADH-deshidrogenasa". No encuentran definitiva evidencia para la existencia de un componente tipo ferredoxina y ubican los grupos III y IV mersalyl sensibles según este esquema.

1° : Qué relación existe entre estos componentes funcionales SH- y el esquema de Chance? ; Por qué sitúan el SH- lento previo al sitio sensible a rotenona X?

En cuanto a la primera cuestión se citan concretamente las asignaciones del propio Chance (VIII-1). Los grupos sulfhidrilos tipos III y IV encontrados por Estabrook se asignarían a Fp_{D_1} y Fp_{D_2} respectivamente.

Estabrook (VI-20) recientemente observa una pequeña contribución a 460-500 nm que persiste luego de reoxi-



dación de NADH en presencia de Rotenona. Coincide también con un cambio permanente en el E.P.R., luego del ciclo completo de oxidación del sustrato NADH en presencia de rotenona. Estos cambios sugieren para los autores el involucramiento del Fe no hemínico en la inhibición por rotenona.

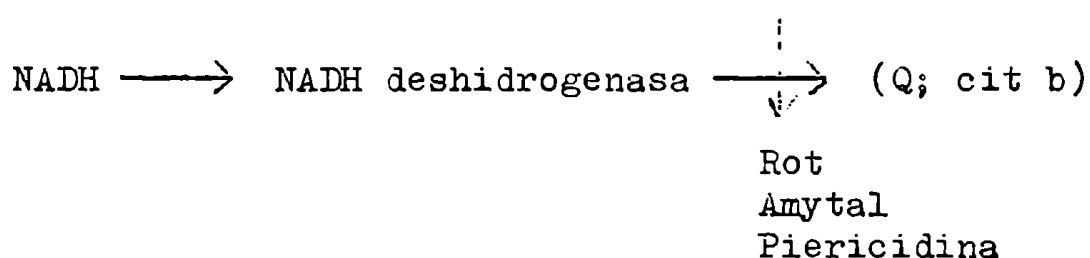
Observan en presencia de rotenona más NADH (VIII-4) un componente adicional, con un máximo de absorción a 432 nm (Descartan que se trate de citocromo b ya que no aparecen las bandas visibles).

En condiciones tales que el NADH pueda oxidarse totalmente igual al trabajo (VI-20) anterior, dicho cambio permanece luego de oxidada la flavina, en presencia de rotenona. Si ahora se trata la preparación submitocondrial como para dar la inhibición al tipo IV de SH-, se reduce la flavina, pero no aparece dicho cambio. Esto lleva a suponer el sitio rotenona posterior.

Si se compara el esquema de Estabrook y el de Chance aparece la primera inconsistencia. Sitio rotenona anterior a Fp_{D_2} en el esquema de Chance, quien asigna a dicho componente el -SH reactivo tipo IV. En el esquema de Estabrook aparece sitio rotenona del lado O_2 . Podría pensarse que el establecimiento de una secuencia es difícil en el experimento (VIII-4) ya que la reacción con mercuriales puede implicar cambios conformacionales proteicos con el consiguiente ocultamiento de grupos de óxido-reducción.

Palmer y col. (VI-21) en otras condiciones experimentales observa también la aparición de un pico a 430 nm muy lentamente, pero también las bandas visibles del citocromo b y como suponen aerobiosis por la mayor oxidación final de la citocromo oxidasa atribuyen la reducción del citocromo b a un segundo sitio de inhibición de menor significación.

En otro tipo de experimentos, Horgan, Singer y Casida proponen el siguiente esquema (VI-19).



Singer y col. (VI-19)

El esquema se basa en que fijada Rotenona C^{14} específicamente a las partículas submitocondriales, si se solubiliza la NADH-flavoproteína de Singer (VII-12) se recupera una cantidad insignificante del inhibidor.

En general tanto el esquema de Palmer y col. como

este de Singer confirmarían lo esperado, con relación a ubicar el bloqueo por los inhibidores mencionados del lado O_2 del Fe no hemínico de la "NADH-deshidrogenasa" y prevenir la reducción por NADH de la succinato deshidrogenasa, vía reacción cruzada a través del segmento inicial de la cadena respiratoria (VIII-5).

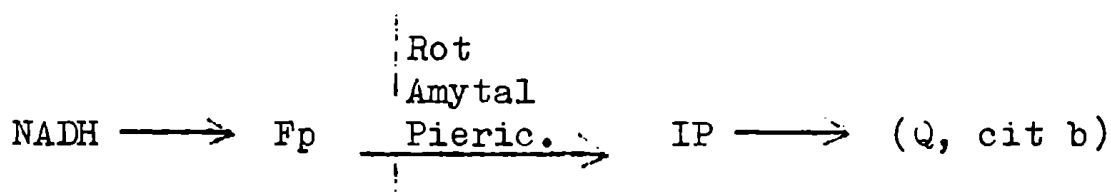
Como se ha aclarado anteriormente (Cap. VII) la NADH-deshidrogenasa es una organización compleja ligada a membrana y con propiedades características en su estructura integrada. La solubilización de la NADH-deshidrogenasa de Singer (VII-12) por tratamiento con fosfolipasa no excluye una acción del inhibidor sobre el componente proteico funcional en su capacidad para transferir electrones en la cadena. La cerrada estequiometría del contenido de flavina y rotenona ligada específicamente, parecerían sugerir a los autores a pesar del esquema inicial, la ligadura a la NADH-deshidrogenasa funcional particulada, y en dicho caso, en términos de secuencia de transferencia electrónica, insisten en colocarlo luego de flavina y del Fe no hemínico (VIII-5), dentro de ella.

Parecería lógico en este caso, un involucramiento lipídico, sugerido por los autores en coincidencia con postulaciones anteriores de Stoppani y col. (I-35), Redfearn y King (VIII-7), Burgos y Redfearn (VIII-8).

Los hallazgos de Hatefi y col. (IV-26,27; VII-14a, b) introducen un cambio en la nomenclatura del sector.

Se describen en el Capítulo IV y VII las evidencias que llevan a postular una hierro-proteína, asociada a la NADH-deshidrogenasa de bajo PM (VII-5) (a su vez flavo-hierro-proteína) y que en presencia de los inhibidores conocidos darían respuestas espectroscópicas

comparables a las de Chance (IV-8,9) en el sentido de dos componentes de óxido-reducción separables por Rotenona, Amytal sobre la NADH-deshidrogenasa. Aquí no cabe la posibilidad de la contribución de la succinato deshidrogenasa, ya que se ensaya sobre el complejo particulado I de Hatefi (VII-13,14).



Hatefi y col. (VII-14b)

A pesar del aislamiento de estos componentes proteicos separados, no está claro si IP contribuye ó no a la señal E.P.R.

Desde luego que si todo el Fe no hemínico se redujera antes del bloqueo, quedaría con un papel difícil de explicar una hierro-proteína posterior cuyo Fe no se redujera funcionalmente. Podrían haberse estimado anteriormente sin embargo como contribuciones del Fe no hemínico de la succinato-deshidrogenasa. Por otra parte los hallazgos de Hatefi y col. (VII-5) y Mackler y col. (VII-10) apuntan a la existencia de más de un componente proteico en la llamada "NADH-deshidrogenasa" asociados íntimamente y separables por procedimientos que no rompen ligaduras covalentes.

En el esquema de Chance el componente Fp_{D_1} con todo el Fe no hemínico, parecería ser equivalente a la NADH-deshidrogenasa de Singer (VII-12) como así también lo interpreta Slater en una discusión reciente (VIII-9).

En cambio en el esquema de Hatefi, componente I de la NADH-deshidrogenasa significaría la flavohierroproteína aislada por el mismo (VII-5).

En nuestros resultados de los experimentos espectroscópicos a 460-510 nm (Figura IV-20) es evidente que en el sistema con ascorbato, (donde por lo menos puede considerarse seguro el que no haya interferencias de la parte alta de la cadena) la interpretación de la existencia de un segundo componente redox de la NADH-deshidrogenasa envuelto en la reducción por succinato en presencia del inhibidor se basa exclusivamente en las evidencias de Chance (IV-8,9) y Hatefi (VII-14b) que parecerían establecerlo sin dudas. Los resultados cinéticos sobre la falta de competencia al sitio de entrada de quinonas y el estado de oxidación del segundo componente en el sistema bloqueado, parecería hablar en favor del no involucramiento de dicho componente en la inhibición por estilbestrol.

Los ensayos de preincubación del Capítulo VII si bien muestran modificaciones en la actividad de la "NADH-deshidrogenasa", presumiblemente al componente I, en proteínas íntimamente asociadas no puede descartarse la misma acción, por ligadura a un sitio próximo que desencadenara cambios durante el tiempo de preincubación. Son necesarios nuevos experimentos para decidir aún la cuestión.

Sin embargo parecería poder concluirse que el sitio de inhibición se situaría sobre la NADH-deshidrogenasa, en la proximidad del componente I.

Naturaleza de la inhibición

En cualquier estudio cuantitativo con inhibidores es importante determinar la reversibilidad de la inhibición ó de los efectos medidos. La pérdida de actividad enzimática puede estar asociada con algún tipo de inactivación sobre la enzima, cuestión que se descarta si la actividad puede ser restablecida por remoción del inhibidor. Por otra parte en ensayos cinéticos, las formulaciones dependen de si la inhibición es rápidamente reversible ó no, como para alcanzar el equilibrio.

Para inhibidores con altas afinidades por la enzima como parece ser el caso del estilbestrol, la cantidad ligada a la enzima es una fracción despreciable de la total y la concentración del inhibidor libre, puede ser tomada igual a la concentración total. Esto podría explicar que en soluciones concentradas de enzima, dependiera el efecto observado en algún caso, de la relación enzima/inhibidor.

En nuestro caso, en los ensayos cinéticos realizados, el efecto depende exclusivamente de la concentración del estrógeno en la muestra y se revierte espontáneamente por dilución de la mezcla enzima/inhibidor.

Esto además de confirmar la naturaleza reversible de la inhibición, descarta cualquier tipo de ligadura covalente del estrógeno y enzima, pudiéndose admitir solamente una asociación temporaria quizás en la fase lipoproteica y en equilibrio con la concentración en la muestra de reacción. Aunque se conocen casos de inhibición reversible, donde el inhibidor actúa exclusivamente por su concentración en la mezcla independientemente de la concentración de proteína no necesariamente ocurre

así en la mayor parte de las inhibiciones reversibles, y es sugestivo que se haya encontrado igual comportamiento para el NADH en su efecto de preincubación con partículas submitocondriales (VIII-4).

Efectos comparativos del estilbestrol y rotenona

En general no se observan diferencias en los sistemas utilizados en las respuestas frente a rotenona ó estilbestrol, en coincidencia con un idéntico sitio de acción para ambos en la cadena respiratoria mitocondrial.

La presencia de ferricianuro ó ascorbato en el medio parecen determinar ciertas diferencias en el comportamiento. Los efectos observados podrían ser indicativos de acción sobre distintos grupos dentro del mismo componente proteico ó mecanismos distintos sobre idéntico ó diferente grupo, lo que no resulta inesperado, dada la diferencia de estructuras.¹

El estudio del mecanismo de conservación de energía en el sector NADH-deshidrogenasa, supone la elección de métodos de ensayo satisfactorios que aseguren el ensayo de fosforilación oxidativa al primer sitio específicamente. Las preparaciones submitocondriales utilizadas en nuestro trabajo, mantienen la posibilidad de producir reacciones dependientes de energía, salvo la transferencia final al ADP (I-127-129). Estas reacciones, transporte iónico, flujo inverso, etc. si bien se supone que comparten algo del mecanismo catalítico de la fosforilación oxidativa, no está probado que utilicen el mismo camino en forma completa, de tal modo que en el caso de querer establecer una acción específica al primer sitio habría que utilizar partículas fosforilantes y sistemas

¹La rotenona no parece tener efecto sobre las reacciones de transferencia de energía (VI-1,2), mientras existen datos a favor en el caso de esteroides (Boveris y Stoppani).

de fosforilación específicos para el sitio I. El transportador en el segmento "NADH-deshidrogenasa" que forma el primer intermediario de alta energía (A.P.C) en términos de la hipótesis química ó la composición del "loop I" (en términos de la hipótesis quimio-osmótica) es desconocido por el momento. Butow y Racker (VIII-10) sugirieron recientemente el Fe no hemínico a este nivel. Esta suposición se basaba en que la o-fenantrolina era capaz de inhibir 50 % la actividad de la NADH oxidasa, sin afectar la actividad de la succinato oxidasa y esta inhibición desaparecería por agregado de $ADP + P_i$ ó desacoplantes, lo que recuerda el control respiratorio (VIII-11).

Pullman y Schatz (VIII-11) revisan también lo relativo a sitio I de fosforilación y sensibilidad a rotenona en levaduras. Recientemente Ohnishi, Racker, Schleyer y Chance (VIII-12) agregan algunas novedades en este campo. Se sabe que el sitio I de fosforilación y la etapa sensible a rotenona no existen en partículas submitocondriales de levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces carlsbergensis* (VIII-13-15) estando presentes en cambio en partículas mitocondriales de *Torulopsis utilis* (VIII-16,17). El estudio de la organización de ambas cadenas en la región NADH-deshidrogenasa, puede aclarar aspectos vinculados con ambos problemas. En la región NADH-deshidrogenasa de la cadena respiratoria de *T.utilis*, se encontró funcional al sitio sensible al mersalyl tipo III, así como la característica señal E.P.R. $g = 1.94$ para el Fe no hemínico a ese nivel. No se encontraron en *S.cerevisiae* (VIII-12,18). Esto sugiere una correlación entre presencia de ambos grupos, con aparición de sitio I de fosforilación y etapa sensible a rotenona y otros inhibidores. Es de hacer notar que estos grupos se sitúan sobre la "NADH-deshidrogenasa" en el componente I para cualquier esquema.

Probable mecanismo de acción

Los experimentos de preincubación, sugieren con las salvedades apuntadas, que la acción del estrógeno pudiera deberse a un cambio conformacional proteico, mecanismo ya enunciado como hipótesis general para interacciones esteroide-enzima por Yielding y Tomkins (I-78) y postulada por analogía como posibilidad para la acción sobre la cadena de transporte por Pullman y Schatz (VIII-11).

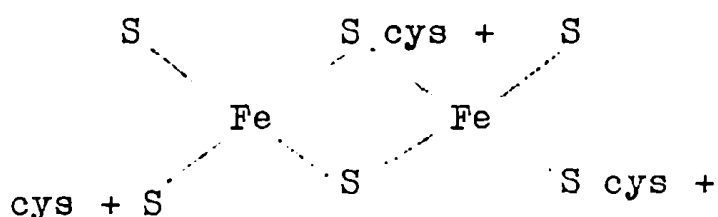
Green y col. (I-70) concluyen recientemente que "la perturbación por estilbestrol lleva a la membrana interna mitocondrial a una transición de tubular a vesicular, a la pérdida de capacidad acoplante y a la pérdida ó modificación del transporte de electrones". Aparecería así la inhibición del transporte como un efecto secundario de la acción del estilbestrol sobre la membrana. Las concentraciones utilizadas de estilbestrol en estos trabajos eran del orden 150-200 μ M. Stoppani y Vallejos (I-48,51) ya habían aclarado que los cambios físicos mitocondriales revelados por "swelling" ó sea alteración de la estructura mitocondrial no producían por sí, las respuestas metabólicas de los estrógenos. Stil M.M.E. afecta poco a la respiración y es un poderoso agente de "swelling".

En nuestros resultados la actividad ó transporte de electrones en las partículas fraccionadas, sometidas previamente a acción de detergentes (colato) y con casi total pérdida de proteína estructural resultaba sensible al estilbestrol. Como se dijo anteriormente estos efectos sobre membrana podrían situarse dentro de acciones no específicas a concentraciones próximas ó sobre 1×10^{-4} M.

Los datos obtenidos en nuestros resultados sobre la base de utilización de análogos, en el caso particular del estilbestrol parecen determinar que la acción estaría asociada al número y posición de oxhidrilos fenólicos en la estructura del estilbeno, cuestión también encontrada por Stoppani y Vallejos para mitocondrias fosforilantes (I-51).

Williams-Ashman (I-25) habían sugerido que una forma de radical libre de los estrógenos fenólicos podría servir como transportador de electrones en otros sistemas.

La conocida existencia, aunque no aclarada de grupos disulfuro pertenecientes a la "NADH-deshidrogenasa", como tales ó con ligadura a Fe



(VIII-19)

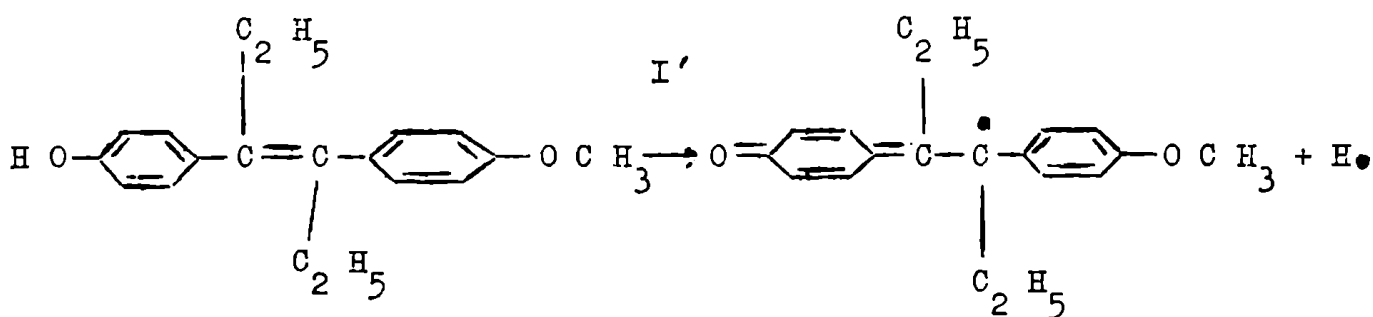
y los resultados obtenidos en presencia de ferricianuro y ascorbato permitirían la postulación de un probable mecanismo de acción.

El estilbestrol actuaría en este sistema por su capacidad según la reacción I de transformarse en una doble quinona y dos átomos de hidrógeno (H.) capaces de donar a un sustrato orgánico adecuado, un electrón cada uno y dar dos protones según la ecuación

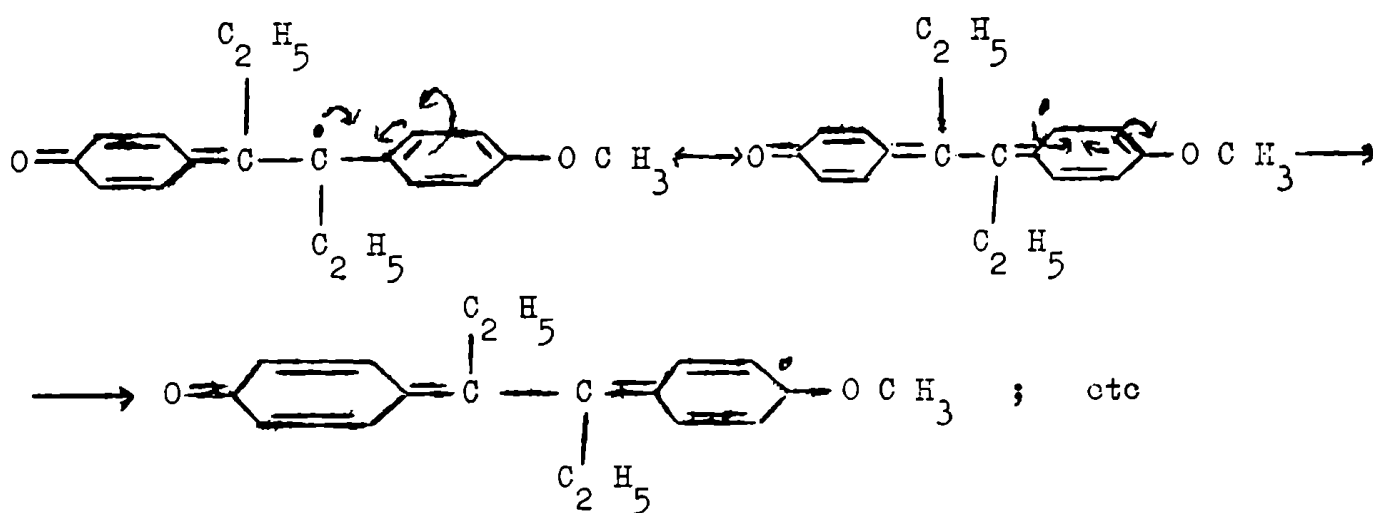


El agregado de ácido ascórbico potenciaría al sistema por regeneración del difenol (reacción II), a partir de la doble quinona y al aumentar así su concentración total por encima de la inicial, se explicaría la mayor actividad del sistema ácido ascórbico-estilbestrol que el de estilbestrol aislado y también el hecho de que el ácido ascórbico no actúe en ausencia del estilbestrol.

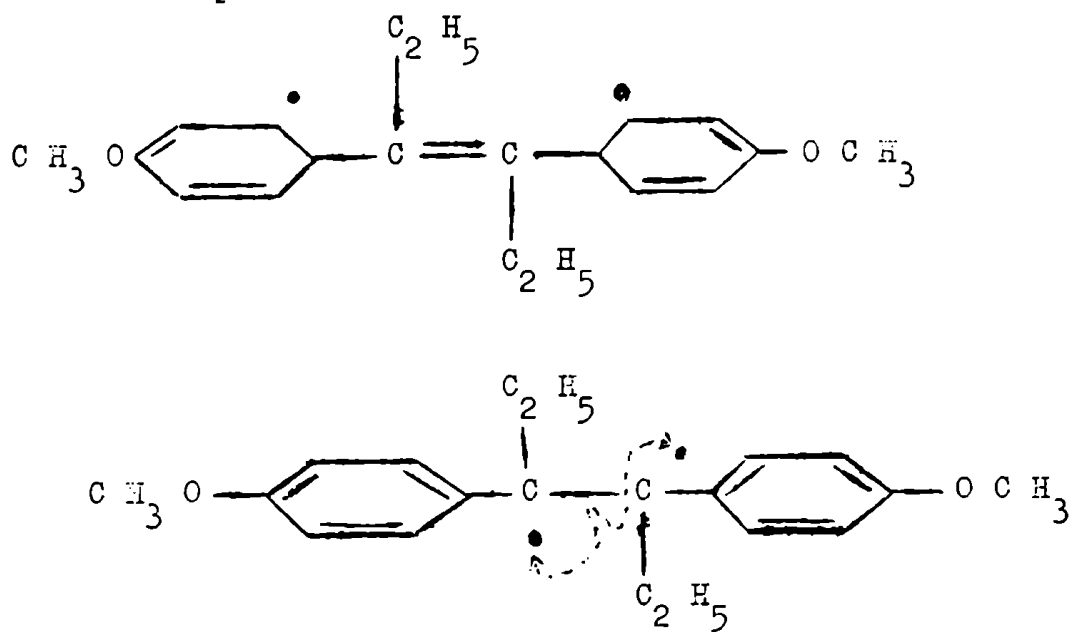
Se ha observado experimentalmente que el monometiléter del estilbestrol actúa con la mitad de la efectividad de este compuesto y que el dimetiléter no actúa en correlación con la actividad fisiológica. Es evidente que la acción es proporcional al número de oxhidrilos fenólicos libres sobre la estructura del estilbeno. La interferencia de los grupos metoxilos se explicaría en base a la siguiente ecuación I'



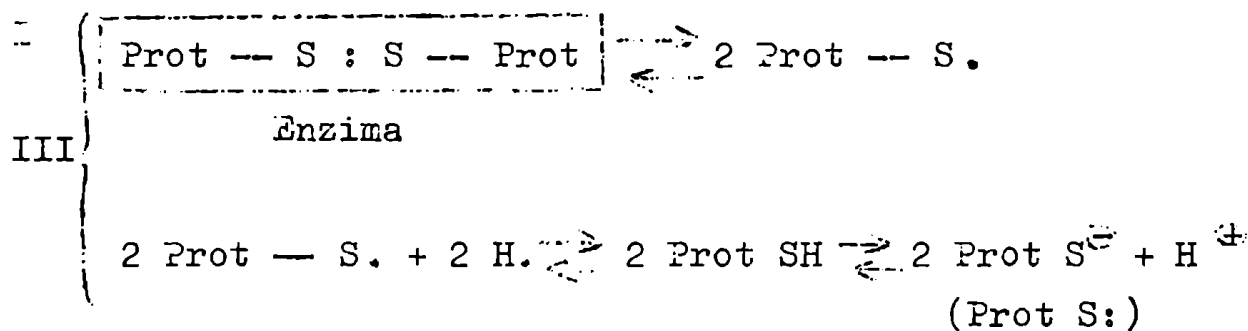
Se formaría todavía un átomo de hidrógeno, en vez de dos, pero el otro electrón no apareado quedaría sobre un átomo de carbono del producto de la reacción I' y sería muchísimo menos reactivo porque puede estabilizarse por resonancia según estructuras del tipo



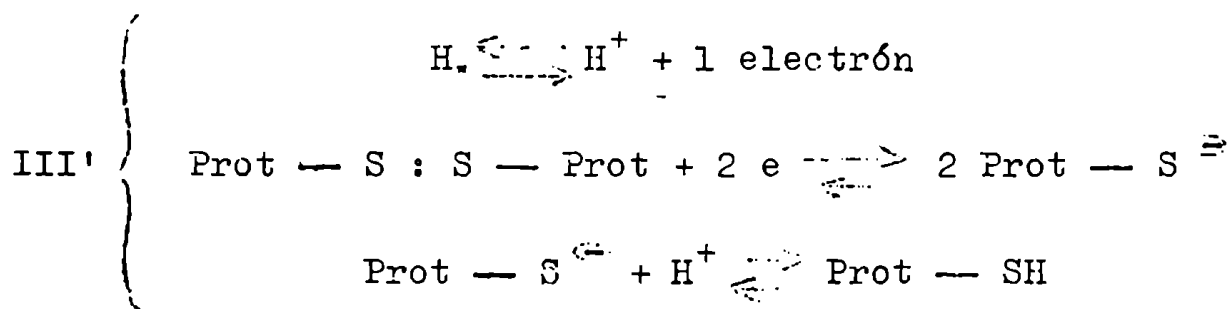
Lo fundamental es que produciría un sólo átomo de hidrógeno (H_•) en vez de dos como en la reacción I. Finalmente de emplearse el dimetiléter es de esperar la formación de bis radicales libres sobre átomos de carbono del tipo:



pero no hidrógeno (H_•) y por lo tanto no habría reacción con la enzima lo cual efectivamente se observa. En la enzima el mecanismo básico de interacción con los átomos de hidrógeno puede representarse así

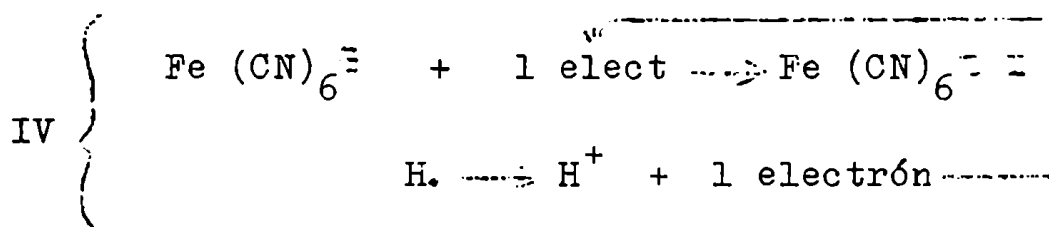


ó también



Ambas son mecanísticamente equivalentes, pues señalan que el átomo de hidrógeno producido en la reacción homolítica I (por radicales libres) es un reductor (toma un electrón al sustrato orgánico que es la enzima). Cabe señalar que se ha ejemplificado esta interacción como ocurriendo con un puente disulfuro pero que los hechos experimentales son consistentes con que se pudiera producir en otro tipo de unión reducible de la enzima como el representado anteriormente (VIII-19). Experimentos con preincubación y por lo tanto no directamente comparables parecen sugerir que se formarían grupos sulfhidrilos libres, ya que se observa una reactividad aumentada con mercuriales. Se ha observado finalmente, que el ferricianuro interferiría la reacción.

Las ecuaciones IV señalan la formación en este caso, de un nuevo sistema redox, superpuesto al III ó III', que competiría con el radical libre Prot-S, por el electrón cedido por el átomo de hidrógeno



Esta hipótesis sería válida exclusivamente para el estilbestrol y análogos, aunque en correspondencia con los requerimientos para su actividad estrógenica. Los estrógenos naturales no parecen requerir OH fenólicos libres, como lo prueba la acción de los dimetil derivados del 17 β - estradiol.

No existe evidencia concreta para esta postulación pero los hechos experimentales pueden por el momento explicarse en base a ella. Las uniones covalentes - S: S - u otras reducibles de la proteína ó susceptibles de ataque por H., producirían el cambio conformacional proteico ya postulado. No se excluye la posibilidad dentro de la hipótesis de que el complejo mecanismo de transferencia de electrones al sitio I fuera interferido por este proceso y el cambio conformacional fuera una consecuencia de dicha acción.

Nuevos experimentos darán validez ó no a la suposición. No sería difícil una acción del ascorbato sobre la etapa enzimática involucrada en la inhibición y en dicho caso sería probable una potenciación de la acción de más de un inhibidor al mismo sitio.

Estas interpretaciones serán útiles como hipótesis de trabajo y permiten el diseño de nuevos experimentos para esclarecer el estudio del tema tratado.

Referencias

- (VIII-1) Chance, B.; Mela, L. y Wong, D. en "Flavins and Flavoproteins". (Yagi Kunito ed.) University Tokyo Press. University Park Press. Baltimore and Manchester (1968) p. 107
- (VIII-2) Tyler, D.D.; Butow, R.A.; Gonze, J. y Estabrook, R.W. Bioch.Biophys.Res.Comm. 19 (1965) 551
- (VIII-3) Singer, T.P.; Mackler, B. y King, T.E. en "Flavins and Flavoproteins". (Slater, E.C. ed.) Elsevier Publishing Co. Amsterdam. London, N.Y. (1966) p. 482
- (VIII-4) Estabrook, R.W.; Tyler, D.D.; Gonze, J. y Peterson, J.A. en (igual referencia VIII-1) p. 268
- (VIII-5) Singer, T.P.; Horgan, D.J. y Casida, J.E. en (igual referencia VIII-1) p. 192
- (VIII-6) Chance, B. en "Flavins and Flavoproteins". (Slater, E.C. ed.) Elsevier. Amsterdam (1966) p. 510
- (VIII-7) Redfearn, E.R. y King, T.E. Nature 202 (1964) 1313
- (VIII-8) Burgos, J. y Redfearn, E.R. Bioch.Biophys. Acta 110 (1965) 475
- (VIII-9) King, T.E.; Bayley, P.M. y Mackler, B. en (igual referencia VIII-1) p. 132
- (VIII-10) Butow, R.A. y Racker, E. J.Gen.Physiol. 49 (1965) 149
- (VIII-11) Pullman, M.E. y Schatz, G. en "Ann.Rev.Biochem." 36 (1967) 539
- (VIII-12) Ohnishi, T.; Racker, E.; Schleyer, H. y Chance, B. en (igual referencia VIII-1) p. 122
- (VIII-13) Ohnishi, T.; Kawaguchi, K. y Hagihara, B. J.Biol.Chem. 241 (1966) 1797

- (VIII-14) Schatz, G. y Racker, E. Bioch.Biophys.Res.Comm. 22 (1966) 579
- (VIII-15) Mackler, B.; Collipp, P.J.; Dulkan, H.M.; Rao, N.A. y Huennekens, F.M. J.Biol.Chem. 237 (1962) 2968
- (VIII-16) Linnane, A.W.; Vitols, E. y Nowland, D. J.Cell.Biol. 13 (1962) 345
- (VIII-17) Ohnishi, T.; Sottocasa, G. y Ernster, L. Bull.Soc.Chim.Biol. 48 (1966) 1189
- (VIII-18) Schatz, G.; Racker, E.; Tyler, D.D.; y Gonze, J. y Estabrook, R.W. Bioch.Biophys.Res.Comm. 22 (1966) 585
- (VIII-19) Hatefi, Y.; Stempel, K.E. y Hanstein, W.G. J.Biol.Chem. 244 (1969) 2358

Conclusiones

1.- El estrógeno sintético dietilestilbestrol (Stil) tiene efecto inhibitor sobre la actividad de la cadena de transporte de electrones, cuando el sustrato utilizado es el NADH no así el succinato ni el menadiol.

2.- Los I_{50} obtenidos para los efectos sobre los diferentes sistemas ensayados son: 0.75 μM para el sistema NADH-oxígeno; 2 μM para NADH-citocromo b y 4 μM en el caso de NADH- Q_2 reductasa.

3.- La inhibición depende de la concentración del estrógeno en el medio de reacción.

4.- La inhibición es reversible por dilución de la mezcla enzima-inhibidor.

5.- No existe ligadura covalente del inhibidor con la enzima sino solamente una asociación temporaria.

6.- a) Los efectos del estrógeno sobre la reducción y aparente oxidación del b tanto en sistemas aeróbicos como cerrados por inhibidor terminal (cianuro), son la consecuencia de la inhibición del flujo de electrones desde el NADH en una etapa anterior al mismo. El citocromo b se descarta como sitio de acción fundamental.

b) Con relación a la flavoproteína el sector NADH deshidrogenasa se resuelve en dos componentes redox, uno del lado sustrato (comp. I) y otro del lado oxígeno del sitio sensible (comp. II). El succinato reduce al segundo componente, más la flavo proteína succínica.

c) En el segmento NADH-Q reductasa el tratamiento cinético permite descartar una probable competencia con la quinona. El estado de oxidación del segundo componente redox antes mencionado junto al resultado de inhibición no competitiva a dicho sitio excluyen al segundo componente como sitio de acción del inhibidor. Aparece una

actividad NADH-Q₀ reductasa a altas concentraciones de quinona, insensible al Stil.

d) Otras reacciones que involucran directamente al grupo flavina como transhidrogenación y ferricianuro reductasa no resultan afectadas por el estrógeno. El grupo flavina no es el sitio de la inhibición.

e) En experimentos de preincubación Stil modifica algunas propiedades de la NADH deshidrogenasa funcional particulada que sugieren un cambio conformacional. En correlación con estos resultados se encuentra reactividad aumentada a mercuriales luego de preincubación.

f) Se localiza así la inhibición en el sector NADH deshidrogenasa sobre ó próximo al componente I, excluyendo al grupo flavino.

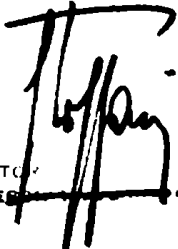
7.- El ascorbato potencia significativamente la inhibición por Stil.

8.- El ferricianuro parece interferir la inhibición.


9.- Los análogos del estilbestrol actúan con la misma especificidad sobre la NADH-oxidasa, NADH-citocromo b y NADH-Q reductasa. La acción resulta proporcional al número de OH fenólicos libres, siendo los dimetiléteres inactivos.

10.- Se observaron respuestas análogas de Stil y rotenona e inhibición aditiva cuando se utilizaba junto con el estrógeno. Esto indicaría que ambos inhibidores actuarían sobre el mismo componente enzimático, no necesariamente sobre el mismo grupo. Diferencias encontradas en presencia de ferricianuro y ascorbato hablan a favor de un distinto mecanismo de acción, lo que no resulta inesperado en vista de la diferencia de estructuras.

11.- Se postula un probable mecanismo de acción aunque exclusivo para el estilbestrol y análogos, pero en correspondencia con los requerimientos para su acción estrógena.


DOCTOR
PROFESOR

M. STOPPANI
QUIMICA BIOLOGICA


L. D. STANCU