

Tesis Doctoral

Efecto de naftoquinonas lipofílicas, productoras de radicales libres, sobre las funciones mitocondriales, en hígado de rata

de Witte, Natacha Viviana

2001

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 Master's and 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:

de Witte, Natacha Viviana. (2001). Efecto de naftoquinonas lipofílicas, productoras de radicales libres, sobre las funciones mitocondriales, en hígado de rata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3368_deWitte

Cita tipo Chicago:

de Witte, Natacha Viviana. "Efecto de naftoquinonas lipofílicas, productoras de radicales libres, sobre las funciones mitocondriales, en hígado de rata". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3368_deWitte

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

Centro de Investigaciones Bioenergéticas (CONICET-UBA)

**Efecto de naftoquinonas lipofílicas,
productoras de radicales libres,
sobre las funciones mitocondriales,
en hígado de rata**

Tesis

**presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires
(Orientación: Ciencias químicas)**

Autora: Lic. Natacha Viviana de Witte

Director: Dr. A. O. M. Stoppani

**Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

Centro de Investigaciones Bioenergéticas (CONICET-UBA)

**Effect of lipophilic, free radicals
producing naphthoquinones,
on rat liver mitochondrial functions**

Ph. D. Thesis

University of Buenos Aires

(Chemical Sciences)

Author: Lic. Natacha Viviana de Witte

Director: Dr. A. O. M. Stoppani

-2001-

A mi hijo, Franco

A mi marido, Ezequiel

A mis padres

Deseo expresar mi reconocimiento a todos aquellos cuya colaboración posibilitó la realización de este trabajo de tesis:

Al Consejo Nacional de investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por los medios económicos otorgados que hicieron posible el desarrollo de los estudios que aquí se describen y mi dedicación a la investigación científica.

A la Universidad de Buenos Aires y a los contribuyentes anónimos que financiaron este trabajo a través de sus impuestos y a los que espero poder retribuirles el esfuerzo.

A CEDIQUIFA, por la beca de estudiante que me otorgó, la cual me permitió iniciarme en la investigación.

Al Dr. Andrés O. M. Stoppani, por su apoyo y por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis bajo su dirección en el Centro de Investigaciones Bioenergéticas.

A la Dra. Marta Dubin, por su permanente apoyo durante todo este tiempo que compartimos en el laboratorio y por su especial dedicación a la corrección de este trabajo.

A la Dra Patricia Carrizo, por su afecto y enseñanzas, por estar siempre dispuesta a darme una mano y por haberme guiado durante mis primeros pasos en el laboratorio.

A la Dra Alcira Battle, por su colaboración y consejos.

A la Dra. Viviana Campos, por su participación en los cálculos de la fuerza iónica de las soluciones.

Agradecimientos

Al Bioquímico Alejandro Boveris por su colaboración en la realización de los espectros EPR.

A la Dra. Josefina Awruch, por sus sugerencias en el análisis de la reactividad química de las naftoquinonas.

A mis compañeros del CIBIERG: Silvia, Pilar, Dolores, Alejandra, Cristina, Ana María, Esther, María Inés, Joaquín, Paolo, Daniel, Dante y José, por su afecto, consejos, sugerencias, compañerismo y solidaridad.

A Graciela y a Sara por su constante colaboración.

A mi familia:

A mi marido, por su amor, ayuda, paciencia y apoyo.

A mi hijo, que nació cuando comencé este trabajo, por su cariño y por tantas horas que pasó a mi lado, jugando solo y en silencio para que yo pueda estudiar y escribir la tesis.

A mis padres, por haberme dado la vida y haberme cuidado con tanto cariño.

A mi papá por haberme enseñado ciencias exactas desde la cuna.

A mi mamá, mi tía Susy y mi abuelo Guille, por haber cuidado de mi hijo para que yo pudiera trabajar.

A mi médico neumonólogo, el Dr Miguel Tomiozzo, quien cuidó muy bien de mi salud y con tanto cariño, durante más de veinte años.

A quienes no he nombrado específicamente, pero me han brindado su apoyo de una u otra manera.

La β -lapachona, o-naftoquinona extraída del lapacho (*Tabebuia avellanadae*), ha sido propuesta como tripanocida, antiviral y citostático, induce apoptosis o necrosis en numerosas líneas celulares tumorales (Li y col, 1999; Planchon y col, 1999) e inhibe la transcripción del virus HIV (I) (Li y col, 1993). La CG 9-442, es una o-naftoquinona derivada de la β -lapachona, que ha sido sintetizada como posible agente antitumoral (Schaffner-Sabba y col, 1984).

En el presente estudio se demostró que la adición de CG 9-442 a una suspensión mitocondrial de hígado de rata: 1) estimuló el consumo de O_2 en estado "4" e inhibió el consumo de O_2 en estado "3", disminuyendo en consecuencia el índice de control respiratorio; en presencia de malato-glutamato o succinato, como sustratos respiratorios; 2) inhibió la peroxidación lipídica; 3) inhibió el aumento de volumen mitocondrial "swelling", por Ca^{2+} , y 4) inhibió el potencial de membrana.

En partículas submitocondriales, la adición de CG 9-442: 1) estimuló la oxidación de NADH insensible a rotenona, antimicina A, mixotiazol o cianuro ; 2) determinó la formación del radical semiquinona, detectado por EPR, y un estímulo en la producción del radical anión superóxido, en presencia de NADH y antimicina; 3) no consumió O_2 , en presencia de succinato, rotenona y cianuro; 4) inhibió la actividad NADH oxidasa, tanto en presencia como en ausencia de superóxido dismutasa y catalasa; 5) inhibió la actividad succinato oxidasa; 6) inhibió ligeramente las actividades succinato deshidrogenasa y succinato-ubiquinona óxido-reductasa, 7) no tuvo efecto significativo sobre las actividades NADH deshidrogenasa, NADH-citocromo c reductasa y citocromo c oxidasa.

Con fines comparativos se realizaron estudios con las p-naftoquinonas menadiona y atovaquone (esta última de uso clínico).

Los resultados aquí presentados muestran que la CG 9-442, produce daños en la función mitocondrial en células de mamíferos, que se traducen fundamentalmente en: la producción de radicales libres, un efecto inhibitorio sobre la cadena de transporte de electrones mitocondrial, un efecto desacoplante y la inhibición del potencial de membrana mitocondrial. Se postula a la mitocondria como blanco importante para la citotoxicidad de la CG 9-442 descartándose la peroxidación lipídica como causa de la misma. Los datos presentados no descartan otras organelas como blancos para los efectos citotóxicos de esta quinona.

Estos estudios pueden ser importantes para contribuir al diseño de diferentes naftoquinonas farmacológicamente activas. Teniendo en cuenta que, los parámetros químico cuánticos de la β -lapachona y su derivada CG 9-442, no difieren significativamente (Paulino y col., 1994), este trabajo constituye una contribución a las investigaciones realizadas con la β -lapachona, potencial citostático en estudio preclínico (Dolan y col., 1998).

Palabras clave: naftoquinonas, mitocondrias, partículas submitocondriales, radicales libres, β -lapachona.

β -lapachone, extracted from lapacho tree (*Tabebuia avellanadae*) has been proposed as trypanocidal, antiviral and cytostatic agent since it induces apoptosis or necrosis in numerous tumoral cell lines (Li et al, 1999; Planchon et al, 1999). CG 9-442 is an o-naphthoquinone derived from β -lapachone, which has been synthesized as a possible antitumoral agent (Schaffner-Sabba et al, 1984).

In the present study it was demonstrated that the addition of CG 9-442 to rat liver mitochondria: 1) stimulated the O_2 consumption in state "4" and inhibited the O_2 consumption in state "3" decreasing consequently, the respiratory control ratio in the presence of malate-glutamate or succinate, as respiratory substrates; 2) inhibited lipid peroxidation; 3) inhibited mitochondrial swelling by Ca^{2+} and 4) inhibited the mitochondrial membrane potential.

In submitochondrial particles, addition of CG 9-442: 1) stimulated the rotenone, antimycin A, myxothiazol or cyanide insensitive NADH oxidation, 2) determined the production of the semiquinone radical, detected by EPR, and stimulated the production of superoxide anion radical, in the presence of succinate, rotenone and cyanide, 3) did not consume O_2 , in the presence of succinate, rotenone and cyanide, 4) inhibited the NADH oxidase activity, both in the presence and in the absence of superoxide dismutase and catalase, 5) inhibited the succinate oxidase activity, 6) inhibited lightly the succinate deshydrogenase and the succinate-ubiquinone oxide-reductase activities, 7) did not affect to a significant degree NADH deshydrogenase, NADH-cytochrome c reductase and cytochrome c oxidase activities.

Comparative studies were carried out with the p-naphthoquinones menadione and atovaquone (the latter of clinical use)

The results presented here show that: CG 9-442 produced damage in the mitochondrial function of mammalian cells; mainly free radicals production, an inhibition of mitochondrial electron transport, the uncoupling of oxidative phosphorylation and the collapse of mitochondrial membrane potential. Mitochondria are postulated as an important target for CG 9-442 cytotoxicity, excluding lipid peroxidation as cause of mitochondrial damage. The data presented here do not rule out other organelles as targets for the cytotoxic effects of this quinone.

These studies can be important for the design of different naphthoquinones, pharmacologically active. Taking into account that the quantum-chemical parameters of β -lapachone and its derivative CG 9-442 do not differ significantly (Paulino et al, 1994), the present work is a contribution to the research carried out with β -lapachone, as a potential cytostatic agent in preclinic studies (Dolan et al, 1998).

Key words: β -lapachone, naphthoquinone, mitochondria, submitochondrial particles, free radicals.

CAT, catalasa

DCPIP, 2,6-diclorofenol-indofenol

DMFA, N,N-dimetilformamida (solvente de las quinonas estudiadas)

ICR, índice de control respiratorio

MDA, malondialdehído

SOD, superóxido dismutasa

TBA, ácido tiobarbitúrico

TCA, ácido tricloroacético

atovaquone, 2-[trans-4-(4-clorofenil) ciclohexil]-3-hidroxi-1,4-naftoquinona.

CG 9-442, 3,4 dihidro-2-metil-2-fenil-2H-nafto [1,2 b] piran-5,6 diona

CG 10-248, 3,4-dihidro-2,2-dimetil-9-cloro-2 H-nafto-[1,2 b] piran-5,6-diona

CG 8-935, 3,4-dihidro-2-metil-2-etil-2 H-nafto-[1,2 b] piran-5,6-diona

menadiona, 2-metil-1,4-naftoquinona

β -lapachona, 3,4-dihidro-2,2 dimetil-2H-nafto[1,2 b] piran-5,6-diona

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Especies reactivas del oxígeno.....	1
1.1.1. Radicales libres.....	2
1.1.2. Generación y metabolismo de las especies reactivas del oxígeno.....	2
1.1.3. Estrés oxidativo.....	7
1.1.4. Sistemas de protección contra el estrés oxidativo.....	8
1.1.4.1. Sistemas enzimáticos.....	9
1.1.4.2. Sistemas no enzimáticos.....	11
1.1.5. Peroxidación de lípidos.....	11
1.2. Mitocondrias.....	15
1.2.1. Cadena respiratoria.....	15
1.2.1.1. Características.....	15
1.2.1.2. Producción de especies reactivas del oxígeno.....	21
1.2.2. Transporte de electrones bi-trans-membrana.....	22
1.2.3. Acoplamiento entre cadena respiratoria y fosforilación oxidativa.....	23
1.2.4. Transporte de Calcio.....	25
1.2.5. Blanco de acción de drogas.....	28
1.3. Quinonas.....	28
1.3.1. Generalidades.....	28
1.3.2. Metabolización de las quinonas.....	29
1.3.3. Quinonas como potenciales agentes terapéuticos.....	30
1.3.3.1. p-Naftoquinonas.....	31
1.3.3.1.1. Menadiona.....	31
1.3.3.1.2. Atovaquone.....	31
1.3.3.2. o-Naftoquinonas.....	32

1.3.3.2.1. β -lapachona.....	33
1.3.3.2.2. Quinonas derivadas de la β -lapachona.....	34
1.4. Objetivos.....	37
2. MATERIALES.....	38
2.1. Animales de experimentación.....	39
2.2. Reactivos.....	39
3. MÉTODOS.....	40
3.1. En mitocondrias.....	41
3.1.1. Aislamiento de mitocondrias.....	41
3.1.2. Estudio de la peroxidación lipídica mitocondrial.....	42
3.1.3. Medida de la velocidad de respiración.....	43
3.1.4. Determinación del aumento de volumen mitocondrial (swelling).....	44
3.1.5. Medida del potencial de membrana mitocondrial.....	45
3.2. En partículas submitocondriales.....	46
3.2.1. Aislamiento de partículas submitocondriales.....	46
3.2.2. Medida de actividad NADH oxidasa.....	46
3.2.3. Medida de la velocidad de respiración.....	47
3.2.4. Determinación de la producción de anión superóxido.....	47
3.2.5. Espectro EPR del radical semiquinona de la CG 9-442.....	48
3.2.6. Medida del efecto de la CG 9-442, sobre diferentes actividades enzimáticas.....	49
3.2.6.1. Actividad NADH oxidasa.....	49
3.2.6.2. Actividad NADH deshidrogenasa.....	49
3.2.6.3. Actividad succinato oxidasa.....	50
3.2.6.4. Actividad succinato deshidrogenasa.....	50

3.2.6.5. Actividad succinato-ubiquinona óxido-reductasa.....	51
3.2.6.6. Actividad NADH-citocromo c reductasa.....	51
3.2.6.7. Actividad citocromo c oxidasa.....	51
3.3. Cálculo de la fuerza iónica de los medios.....	52
3.4. Determinación de la concentración de proteínas.....	53
3.5. Análisis estadístico.....	54
4. RESULTADOS.....	55
4.1. En mitocondrias de hígado de rata.....	56
4.1.1. Efecto de la adición de las o-naftoquinonas CG 9-442 y CG 8-935, y de las p-naftoquinonas menadiona y atovaquone, sobre el consumo de oxígeno mitocondrial.....	56
4.1.2. Efecto de la adición de las o-naftoquinonas CG 9-442 y CG 8-935, y de las p-naftoquinonas menadiona y atovaquone, sobre la peroxidación lipídica mitocondrial	67
4.1.3. Efecto de la adición de la o-naftoquinona CG 9-442 sobre el aumento de volumen mitocondrial (swelling), causado por la entrada de Ca ²⁺	71
4.1.4. Efecto de la adición de CG 9-442 sobre el potencial de membrana mitocondrial.....	75
4.2. En partículas submitocondriales de hígado de rata	76
4.2.1. Efecto de la adición de las o-naftoquinonas CG 9-442 y CG 10-248 , y de la p-naftoquinona atovaquone sobre la oxidación de NADH y el consumo de oxígeno.....	76
4.2.2. Efecto de la adición de la o-naftoquinona CG 9-442 y de la p-naftoquinona atovaquone, sobre la producción de anión superóxido.....	79

4.2.3. Espectro EPR del radical semiquinona de la CG 9-442.....	81
4.2.4. Efecto de la adición de CG 9-442, sobre los complejos I-IV de la membrana mitocondrial interna.....	83
4.2.4.1. Efecto de la adición de CG 9-442 sobre la actividad NADH oxidasa.....	83
4.2.4.2. Efecto de la adición de CG 9-442 sobre la actividad succinato oxidasa.....	85
4.2.4.3. Efecto de la adición de CG 9-442 sobre la actividad NADH deshidrogenasa.....	87
4.2.4.4. Efecto de la adición de CG 9-442 sobre las actividades succinato deshidrogenasa y succinato-ubiquinona óxido-reductasa.....	88
4.2.4.5. Efecto de la adición de CG 9-442 sobre las actividades NADH-citocromo c reductasa y citocromo c oxidasa.....	90
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	92
6. BIBLIOGRAFÍA.....	108

Introducción y objetivos

1.1. Especies reactivas del oxígeno

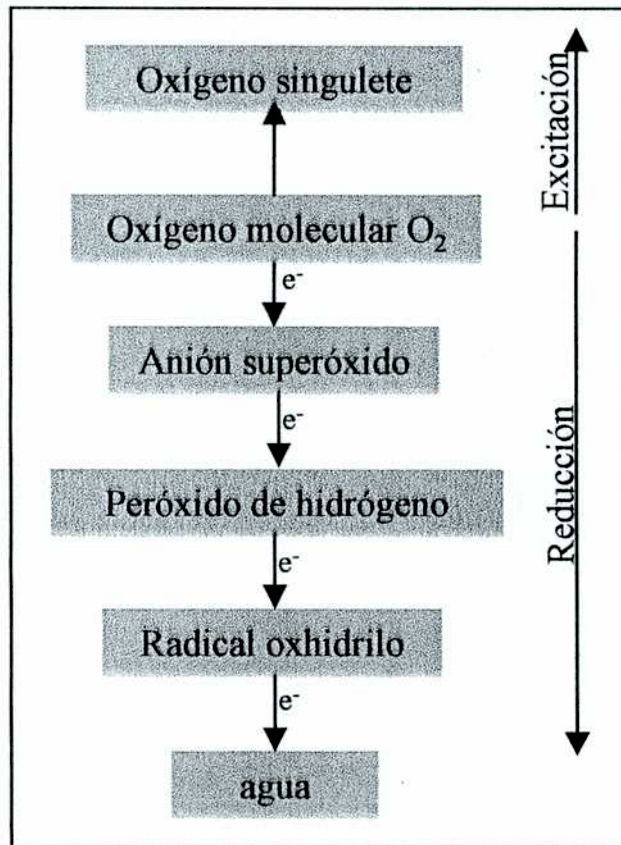
1.1.1. Radicales libres

Los radicales libres son moléculas o fragmentos de moléculas que contienen electrones desapareados en su último orbital, lo que representa una valencia libre, y confiriéndoles propiedades paramagnéticas. Los electrones desapareados, tienden a aparearse, de manera tal que los radicales libres son altamente reactivos y con una vida media muy corta. Las reacciones químicas de radicales libres son reacciones no enzimáticas y en cadena. Los radicales libres tienen funciones muy importantes, en biología y en medicina. Pueden generarse en el metabolismo de xenobióticos y en condiciones fisiológicas.

1.1.2. Generación y metabolismo de las especies reactivas del oxígeno

El oxígeno molecular posee dos electrones desapareados con spin paralelo; por lo tanto es un bi-radical capaz de aceptar electrones (uno por vez). Las especies reactivas del oxígeno son generadas a partir del oxígeno molecular por reducción parcial (radical anión superóxido $O_2^{\cdot-}$, peróxido de hidrógeno H_2O_2 , radical oxhidrilo $\cdot OH$) o por excitación (oxígeno singulete 1O_2)(figura 1.1). No todos los productos reactivos del O_2 , son radicales libres (1O_2 y H_2O_2 , no lo son), pero su reactividad y reacciones son muy similares a las de los radicales libres.

Figura 1.1 Especies reactivas del oxígeno (Fehér y col., 1987)



El radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es el producto de la reducción parcial del oxígeno por un electrón (figura 1.1). En los sistemas biológicos este radical tiene una reactividad limitada, ya que puede difundir antes de interactuar con otros radicales o moléculas. Además, puede comportarse como un agente reductor (Frimer, 1982) o como un oxidante, participando en las reacciones que llevan a la peroxidación de lípidos.

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una especie no radical resultante de la adición de un segundo electrón al anión superóxido (figura 1.1). En medios acuosos es estable, capaz de atravesar las membranas biológicas y, si bien tiene una reactividad limitada (Halliwell y Gutteridge, 1990), puede actuar como reductor u oxidante de hemoproteínas y moléculas con grupos tioles, dependiendo de las condiciones del medio (Chance y col., 1979; Halliwell y Gutteridge, 1984; Brunori y Rotilio, 1984).

Teniendo en cuenta que, en soluciones acuosas, el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 presentan moderada reactividad, el daño producido por estas especies se debe a su conversión a especies más reactivas (por ejemplo radical hidroxilo) (Halliwell y Gutteridge, 1990).

El radical hidroxilo (OH^{\cdot}) resulta de la adición de un tercer electrón al H_2O_2 (figura 1.1). Este radical es altamente reactivo y, por lo tanto, cuando es generado “in vivo”, reacciona en o muy cerca del sitio de su formación con azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, nucleótidos y ácidos orgánicos por mecanismos que implican captación de hidrógeno, adición o transferencia de electrones, entre otros. Durante estas reacciones se producen otros radicales con menor reactividad. En consecuencia, el tipo de daño producido por el OH^{\cdot} depende del sitio de su formación. Por ejemplo: la producción de OH^{\cdot} en una zona cercana al ADN puede llevar a la modificación de las purinas o pirimidinas o a la ruptura de las cadenas de ADN (Del Maestro, 1980; Halliwell y Gutteridge, 1984).

Por último, la adición de un cuarto electrón al radical hidroxilo lleva a la

formación de agua, la forma más reducida de la molécula de oxígeno (figura 1.1).

El $^1\text{O}_2$ es un estado electrónico excitado del O_2 (Chance y col., 1979) y reacciona rápidamente con varias moléculas biológicas tales como proteínas, lípidos y ADN, generando mutaciones (Joenje, 1989).

La protonación del $\text{O}_2^{\cdot-}$ lleva a la formación del radical perhidroxilo (HO_2^{\cdot}). A pH fisiológico, este radical se disocia para dar $\text{O}_2^{\cdot-}$, debido a su bajo pKa. Por lo tanto, sólo estará presente en medios ácidos tales como las vacuolas fagocíticas de los macrófagos o en las proximidades de las membranas. Este radical es un oxidante más fuerte que el $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Fehér y col., 1987) y menos polar que éste, pudiendo atravesar las membranas biológicas e inducir la peroxidación de lípidos (Halliwell y Gutteridge, 1990).

En la mayoría de los organismos animales y bajo condiciones fisiológicas, la enzima respiratoria citocromo c oxidasa, responsable de más del 98 % del consumo de oxígeno, reduce el oxígeno a agua sin la formación de ningún intermediario reducido del oxígeno (Ernster, 1986).

La auto-oxidación de compuestos biológicos como hemoproteínas, leucoflavinas, tetrahidrobiopterinas, catecolaminas, etc. produce $\text{O}_2^{\cdot-}$ y otras especies reactivas del oxígeno (Fridovich, 1983). Las especies reactivas del oxígeno también pueden provenir de la auto-oxidación de hidroquinonas, dihidrofumarato o ascorbato, en presencia de hierro, como así también de la metabolización de numerosos xenobióticos y compuestos exógenos. A su vez, estas especies pueden interactuar entre sí, aceptando o cediendo electrones, captando protones, por reacciones de

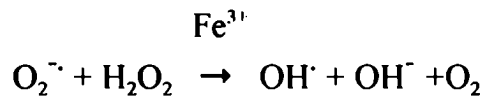
adición, dismutación o aniquilación produciendo una compleja mezcla de productos (Slater, 1984).

El $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 son metabolitos normales en la célula. En condiciones fisiológicas, se encuentran en concentraciones muy bajas. El $O_2^{\cdot-}$ es generado en las mitocondrias y microsomas de células aeróbicas, en reacciones catalizadas por enzimas específicas de determinados tejidos diferenciados, por ejemplo: la xantina oxidasa de hígado y la ferredoxina adrenal. La enzima NADPH-oxidasa presente en leucocitos polimorfonucleares y células fagocíticas también reduce al oxígeno molecular a $O_2^{\cdot-}$ (Emster, 1986). Por otra parte, la excitación del oxígeno a 1O_2 puede ser producida por la iluminación de pigmentos biológicos como clorofila, retinol, porfirinas y flavinas en presencia de oxígeno (Foote, 1982). El 1O_2 es también generado en ausencia de luz, por ejemplo, como resultado del proceso de peroxidación de lípidos y de ciertas reacciones enzimáticas llevadas a cabo por determinadas oxidases (peroxidases, citocromos, lipo-oxigenasas). También puede provenir de la descomposición de especies inestables tales como radicales peroxilos y H_2O_2 , en presencia de hipoclorito, $O_2^{\cdot-}$ o 1,2 dioxietanos (Cadenas, 1985; Kanofsky, 1989).

Las especies reactivas del oxígeno se forman a partir de la reducción parcial del mismo o por reacciones secundarias con protones, metales de transición y/o radicales libres.

En presencia de Fe^{3+} , el $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 interactúan entre sí generando radical hidroxilo, anión hidroxilo y oxígeno en un proceso conocido como reacción de

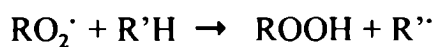
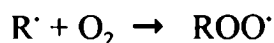
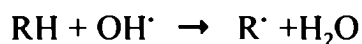
Haber-Weiss y que se muestra en la siguiente reacción:



“In vitro”, el ión ferroso reacciona con H_2O_2 formando también radical hidroxilo (OH^{\cdot}) según la reacción de Fenton:



Los radicales de naturaleza orgánica son muy importantes en los sistemas biológicos, tienden a reaccionar con otras sustancias y producir nuevos radicales (reacción en cadena), de manera tal que cuando el radical hidroxilo ataca a una molécula biológica (RH), le quita un electrón generando así un radical libre de la molécula (R^{\cdot}). Éste, reacciona rápidamente con el oxígeno, formando el radical peroxilo (ROO^{\cdot}). Si bien es menos reactivo, este radical peroxilo puede causar daño. Por ejemplo, puede remover otro átomo de hidrógeno de otra molécula biológica ($\text{R}'\text{H}$) para originar un peróxido orgánico (ROOH) más otro radical libre, como se muestra en las siguientes reacciones:



1.1.3. Estrés oxidativo.

Si bien el oxígeno es un componente esencial para los organismos vivos, algunos de los productos de la reducción parcial del mismo pueden ser altamente dañinos y tóxicos para las células, debido a su alta reactividad con lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El daño ocurre especialmente cuando la concentración de especies reactivas del oxígeno sobrepasa la capacidad de los sistemas celulares de defensa (Kappus y Sies, 1981).

El estrés oxidativo ha sido definido como una alteración en el balance entre oxidantes y antioxidantes en favor de los primeros, lo cual lleva a un daño potencial para la célula (Sies, 1991). Los efectos nocivos del estrés oxidativo incluyen una serie de alteraciones en el metabolismo celular como rupturas en las cadenas de ADN, modificación de las bases, aumento del Ca^{2+} libre intracelular, daño en los transportadores iónicos de membrana y otras proteínas específicas, inhibición enzimática y peroxidación de lípidos (Halliwell y col., 1992).

1.1.4. Sistemas de protección contra el estrés oxidativo

Los antioxidantes son aquellas sustancias que, presentes en concentraciones mucho más bajas que las de un sustrato oxidable, disminuyen o inhiben significativamente la oxidación del mismo (Halliwell y Gutteridge, 1989). Dicha definición comprende tanto a sistemas enzimáticos como no enzimáticos.

El proceso de desactivación de radicales libres consiste en la formación de un producto final no radical. La actividad antioxidante de compuestos naturales y

sintéticos involucra el pasaje de un electrón al radical libre, con la formación del radical del antioxidante. Otra función de importancia biológica en la acción de los antioxidantes es transferir la función radical a sitios o compartimientos celulares donde el daño producido sea menor. En general, esto significa transferir equivalentes de oxidación desde fases hidrofóbicas hacia fases acuosas; por ejemplo, desde la membrana hacia el citosol, o desde las lipoproteínas sanguíneas hacia la fase acuosa del plasma. Los antioxidantes más eficientes reaccionan con radicales libres tales como los radicales lipoperoxilo y, a su vez, son capaces de interactuar con compuestos solubles en agua para su posterior eliminación (Sies, 1993).

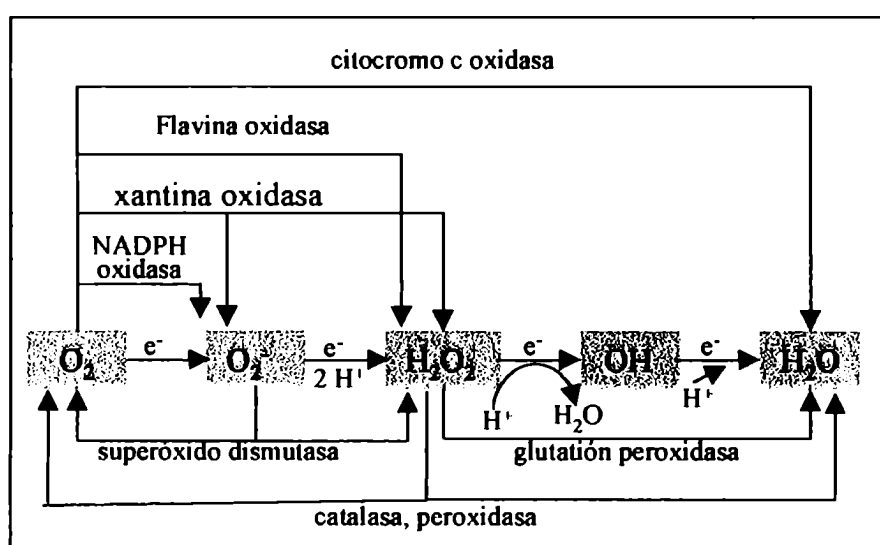
1.1.4.1. Sistemas enzimáticos

Las células aeróbicas tienen enzimas protectoras específicas que mantienen las concentraciones de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 a niveles extremadamente bajos, reduciendo al mínimo la posibilidad de formación de los radicales hidroxilo (figura 1.2). Ellas son: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GP). Mc Cord y Fridovich (1969) y Fridovich (1974 y 1975) han demostrado que las mitocondrias y el citosol contienen SOD, enzima que asegura la dismutación del radical $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 y O_2 ; mientras que la CAT presente en los peroxisomas y las peroxidases mitocondriales detoxifican al H_2O_2 formado.

En los tejidos como hígado, corazón y riñón, el H_2O_2 es normalmente degradado por la CAT, mientras que en los tejidos deficientes en esta enzima, el

H_2O_2 difunde a la sangre donde es destruido por la CAT de los eritrocitos. En algunos tipos celulares especializados existen peroxidadasas como la glutatión peroxidada (GP) de hígado, las cuales catalizan la descomposición del H_2O_2 acoplada a la oxidación de sustancias como el glutatión reducido (GSH). La depleción de GSH inhibe las enzimas citosólicas y mitocondriales que tienen como sustrato al GSH. Por ello, es necesario regenerar el GSH a partir de la reducción del glutatión oxidado (GSSG). La enzima glutatión reductasa (GR) reduce al GSSG a expensas de la oxidación del NADPH. El sistema enzimático glutatión peroxidada-glutatión reductasa es el responsable de la detoxificación de los peróxidos lipídicos. Por último, el ciclo de las pentosas participa en la inactivación de los peróxidos proveyendo los equivalentes de reducción (NADPH) necesarios para el proceso de reducción.

Figura 1.2 Rutas enzimáticas de algunas reacciones redox del oxígeno



1.1.4.2. Sistemas no enzimáticos

Además de los sistemas enzimáticos con capacidad antioxidante, las células cuentan con sistemas no-enzimáticos lipo- o hidrosolubles que cumplen la misma función. Entre los antioxidantes liposolubles se encuentran el α -tocoferol (vitamina E), el ubiquinol y los carotenos (vitamina A). Los otros antioxidantes como el ácido ascórbico (vitamina C), el ácido úrico y el glutatión reducido (GSH) son de naturaleza hidrosoluble (Cadenas, 1985). También se han sintetizado moléculas con capacidad antioxidante con el fin de emplearlas en forma terapéutica.

1.1.5. Peroxidación de lípidos

La exposición de membranas biológicas a estrés oxidativo resulta en una progresiva degradación de la estructura de las membranas y la pérdida de actividad llevando a la peroxidación lipídica. Los blancos de ataque oxidativo en las membranas son los fosfolípidos, que contienen alto número de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). La peroxidación lipídica es la formación y degradación de hidrolipoperóxidos, aductos dioxigenados de lípidos insaturados (Girotti, 1985; Dubin y col., 1990 a). Este proceso lleva a la formación de aldehídos y cetonas muy reactivos y radicales libres. La participación de la peroxidación lipídica como un mecanismo de toxicidad ha sido extensamente estudiada tanto "in vitro" como "in vivo". Sin embargo hay también efectos beneficiosos de la peroxidación lipídica,

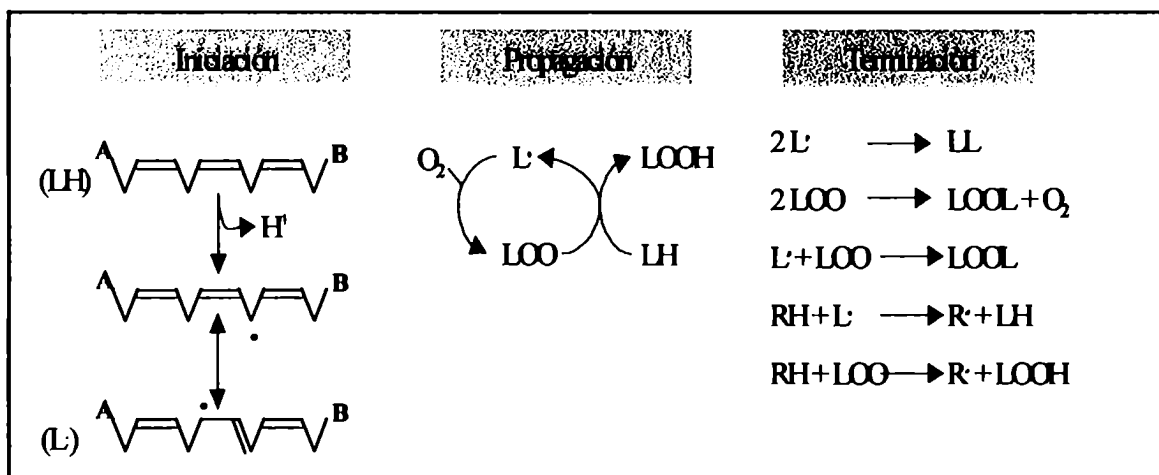
como por ejemplo en la biosíntesis de prostaglandinas y tromboxanos y posiblemente en el efecto bactericida de los neutrófilos.

La peroxidación lipídica implica un mecanismo de reacción por radicales libres, autocatalítica (Girotti, 1985; Gutteridge, 1992) y comprende las siguientes etapas (figura 1.3):

- a) **Iniciación:** la lleva a cabo una especie altamente reactiva, generalmente un radical libre, que sobrepasa la energía de disociación de un PUFA de una membrana, abstrayendo un átomo de hidrógeno del mismo y formando un radical del lípido, alquilo (L^{\cdot}).
- b) **Propagación:** a diferencia del PUFA, L^{\cdot} puede rápidamente unirse al oxígeno molecular con formación del radical peroxilo (LOO^{\cdot}). Este LOO^{\cdot} puede abstraer un hidrógeno alílico de otro lípido activando una segunda molécula lipídica con formación del hidrolipoperóxido ($LOOH$). El $LOOH$ puede sufrir ruptura homolítica (LO^{\cdot}) y en menor cantidad heterolítica (LOO^{\cdot}) catalizada por hierro. Estos radicales libres propagan la peroxidación lipídica sustrayendo nuevamente un hidrógeno lábil a un lípido insaturado. La descomposición de $LOOH$ también resulta en la acumulación de productos de cadena corta, especialmente aldehído. Uno de esos aldehídos, el malondialdehído (MDA) reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) dando un compuesto coloreado cuya intensidad a 535 nm, refleja el proceso peroxidativo (Buege y Aust, 1978).
- c) **Terminación:** se produce cuando dos radicales libres reaccionan entre sí o cuando las especies reactivas que se formaron durante la iniciación y la propagación son

secuestradas o transformadas en especies menos reactivas. Por ejemplo la vitamina E reduce el radical LOO^\bullet al correspondiente LOOH (Fukuzaka y col., 1985), mientras que la glutatión peroxidasa reduce el LOOH a alcohol (Ursini y col., 1985; Maiorino y col., 1985).

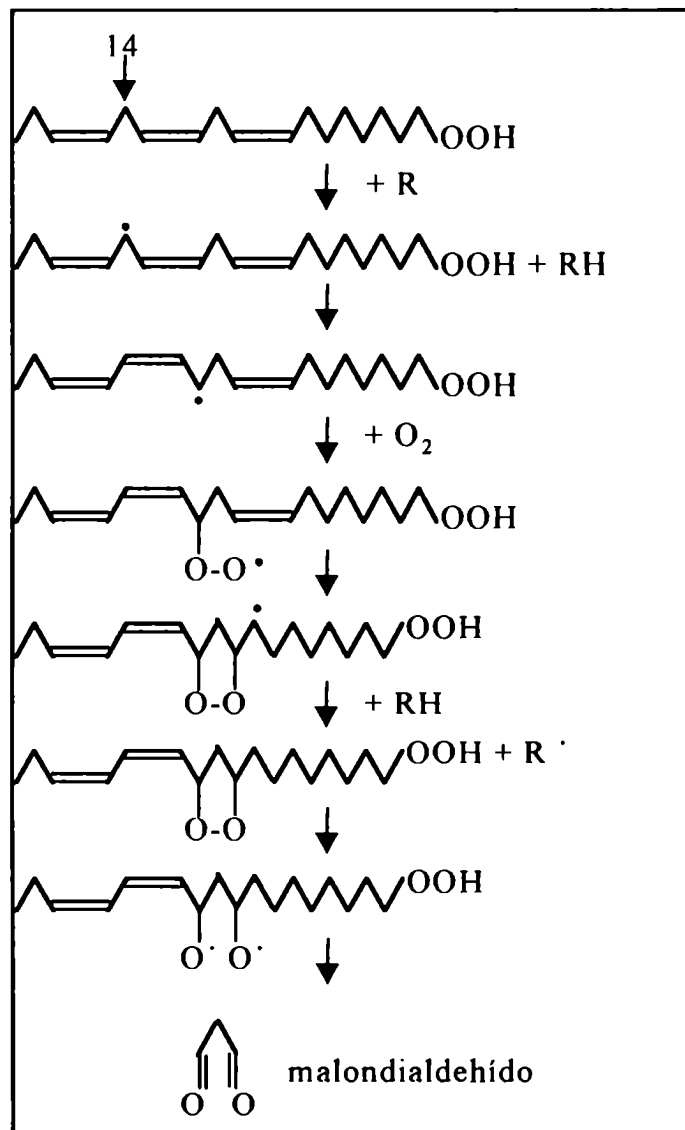
Figura 1.3 Etapas de la peroxidación lipídica (Girotti, 1985)



La peroxidación lipídica mitocondrial tiene mecanismos muy similares a la microsomal (Bindoli, 1988). En ambos casos el radical ión perferrilo fue postulado como agente iniciador de la peroxidación lipídica (Peterson y col., 1973). En la peroxidación lipídica microsomal, la enzima NADPH citocromo P450-reductasa del sistema microsomal, reduce al hierro férrico a ferroso, el cual en presencia de O_2 forma el radical ión perferrilo (Svingen y col., 1979). En la peroxidación lipídica mitocondrial, la NADH deshidrogenasa de la cadena respiratoria, situada en la

membrana mitocondrial interna, reduciría al Fe^{3+} , formando el radical ion perferrilo.

Figura 1.4 Esquema general de la peroxidación lipídica del ácido linolénico, con formación de malondialdehído. (Girotti, 1985)



1.2. Mitocondrias

1.2.1. Cadena respiratoria

1.2.1.1. Características

La figura 1.5 muestra la cadena de transporte de electrones mitocondrial, los sitios de traslocación de protones, la fosforilación oxidativa y los sitios de acción de algunos inhibidores (rotenona, antimicina, mixotiazol y cianuro). La cadena respiratoria mitocondrial está compuesta por cuatro complejos multiproteicos (CI, CII, CIII y C IV), una hemoproteína pequeña (el citocromo c) y la ubiquinona. La transferencia de electrones entre dichos componentes redox, no estequiométricos y específicos, es precedida por colisiones, azarosas y basadas en la difusión, entre los mismos. Todos los componentes de la cadena respiratoria, menos el citocromo c, difunden lateralmente en la membrana mitocondrial interna.

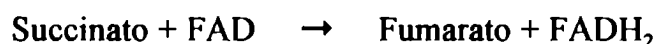
El citocromo c, en condiciones fisiológicas (fuerza iónica = 100-150 mM), se encuentra en el espacio intermembrana, a una concentración de 100-700 μ M, dependiendo de la conformación de la mitocondria (estado ortodoxo o condensado) (Lemasters, 1978) y sólo una décima parte del mismo permanece unida a la membrana mitocondrial interna (Cortese y col., 1998). En mitocondrias aisladas, suspendidas en un medio de fuerza iónica menor a 50 mM, el citocromo c se encuentra asociado a la cara externa de la membrana mitocondrial interna; en estas

condiciones la eficiencia de transporte de electrones del citocromo c es menor, ya que se requiere de una fuerza iónica igual o mayor a 100 mM para que la afinidad del citocromo c por la membrana sea mínima, permitiendo la máxima eficiencia de colisión del mismo con sus pares redox (Gupte y Hackenbrock, 1988).

La NADH deshidrogenasa (complejo I) es el mayor de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria. En bovinos tiene una masa molecular aproximada de 1000 kilodaltons y está formado por 43 cadenas polipeptídicas diferentes (Fearnley y Walker, 1992; Walker, 1992; Buchanan y Walker, 1996). Puede ser separado en tres dominios: flavoproteína (FP), proteína con grupos hierro-azufre (IP) y proteína hidrofóbica (HP) (Hatefi y Stempel, 1967; Hatefi, 1985). La FP es hidrosoluble y contiene un grupo prostético FMN, dos grupos hierro-azufre, 1 tetranuclear y 1 binuclear (Hatefi, 1999; Yano y col., 1996; Feeke y col., 1994) y 2 o más sitios de unión a NAD(P)H (Zakharova y col., 1999). La IP también es hidrosoluble y contiene dos grupos hierro-azufre, 1 tetranuclear y 1 binuclear y posiblemente otro tetranuclear (Ohnishi y col., 1985; Yano y col., 1995). El dominio hidrofóbico es el que contiene el mayor número de subunidades, dos de las cuales tienen los motivos de cisteínas necesarios para alojar grupos prostéticos de hierro-azufre tetranucleares (Walker, 1992); este dominio contiene los sitios de unión a los inhibidores liposolubles (rotenona, piericidina, capsaicina), superpuestos (Okun y col., 1999), encontrándose al menos dos formas diferentes de ubiquinona unidas (de Jong y Albracht, 1994). La transferencia de electrones del NADH a la ubiquinona, está acoplada a la traslocación de 2 protones por electrón a través de la membrana

mitocondrial interna (primer sitio de translocación de protones) (Wikström, 1984; Weiss y Friedrich, 1991; Galkin y col., 1999). Se propuso que en el dominio hidrofóbico ocurriría la reducción de la ubiquinona y la translocación de protones (Friedrich y Weiss, 1997). Es muy poco lo que se sabe hasta el momento en relación a la secuencia de transporte de electrones, el mecanismo de translocación de protones y el modo de acción de la gran cantidad de inhibidores específicos para este complejo. La NADH deshidrogenasa de *E. Coli* tiene la capacidad de reaccionar con la ubiquinona, tanto como con las naftoquinonas menaquinona y dimetilmenaquinona, en cultivos en anaerobiosis (Tran y col., 1997).

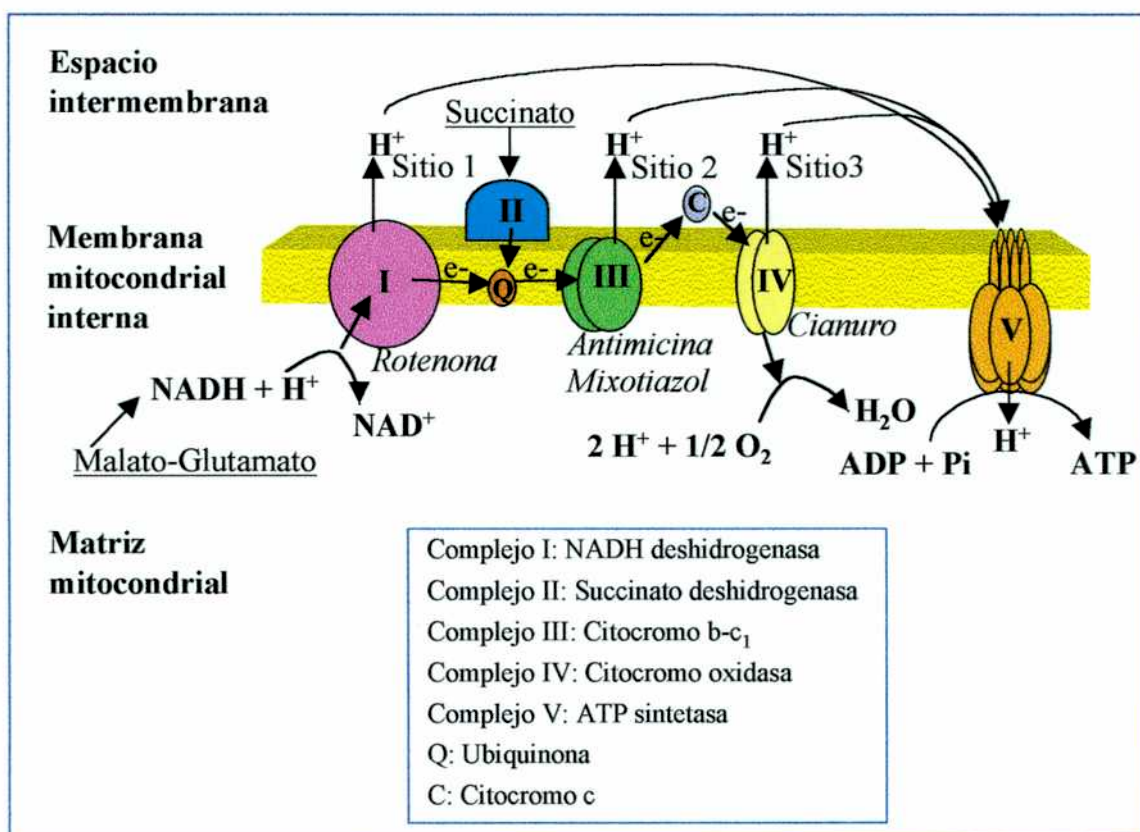
La succinato deshidrogenasa, complejo II de la cadena respiratoria, es también la única enzima asociada a membrana del ciclo de Krebs. Su peso molecular aproximado es de 125 KD (en bovinos). Está compuesta por cuatro subunidades: dos proteínas integrales de membrana, que contienen el sitio de unión a la ubiquinona, y están asociadas a un citocromo b; y dos proteínas hidrofílicas, una flavoproteína que contiene un grupo FAD unido covalentemente (FP) y una proteína con tres grupos hierro-azufre diferentes (2Fe-2S, 3Fe-4S y 4Fe-4S). Cataliza la siguiente reacción:



El FADH₂ producido por la oxidación del succinato no se disocia de la enzima, contrariamente a lo que ocurre con el NADH y la NADH-deshidrogenasa. Dos

electrones del FADH_2 son transferidos directamente a los grupos Fe-S de la enzima, los cuales reducen a la ubiquinona, entrando así en la cadena de transporte de electrones.

Figura 1.5 Cadena de transporte de electrones mitocondrial

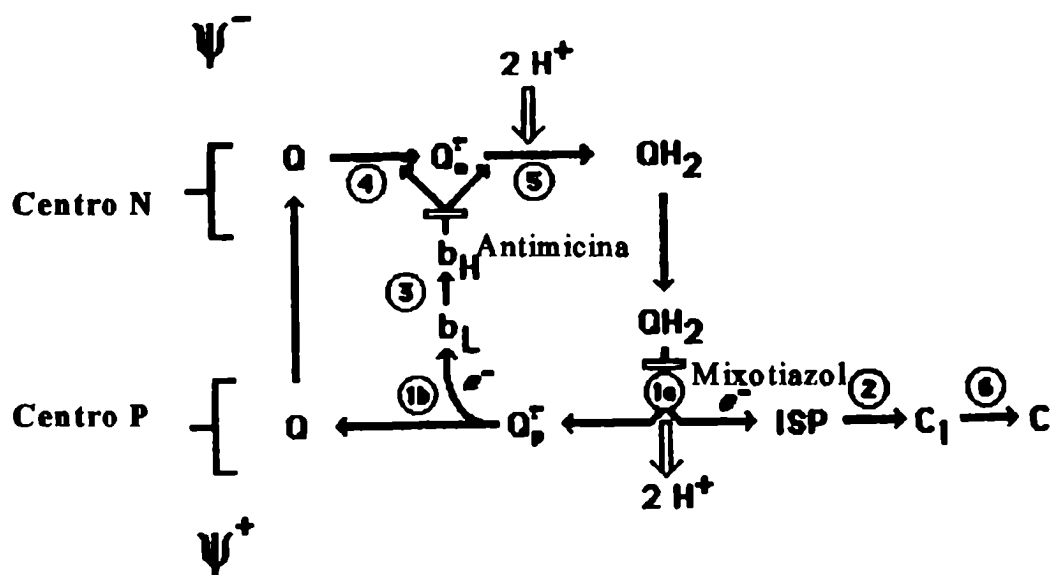


En el esquema, el flujo de electrones está indicado con flechas y con el símbolo " e^- "; los sitios 1, 2 y 3 de translocación de H^+ a través de la membrana están indicados con flechas y con el símbolo " H^+ ". Los inhibidores de los complejos I, III y IV están escritos con letra *itálica*. Los compuestos utilizados como dadores de electrones para cada sitio específico están subrayados.

La ubiquinona es una quinona liposoluble, que acepta los electrones provenientes de los complejos I y II, y los cede al complejo III.

El complejo de los citocromos b-c₁ (citocromo c reductasa o complejo III) bovina, contiene once cadenas polipeptídicas diferentes y tiene una masa molecular de 248 KD. Actúa como un dímero. Cada monómero contiene cuatro grupos prostéticos redox: citocromos b₅₆₆ (b_I) y b₅₆₂ (b_{II}), citocromo c₁ y un grupo de hierro-azufre de alto potencial (2Fe-2S). Las subunidades III, IV y V, alojan a los citocromos b, citocromo c₁ y grupo de hierro-azufre, respectivamente, y son las subunidades esenciales. El resto de las subunidades no contienen grupos prostéticos redox y se las denomina supernumerarias (Xia y col., 1997; Zhang y col., 1998; Iwata y col., 1998; Yue y col., 1991). La proteína con Fe-S es conocida como proteína de Rieske. Este complejo requiere la presencia de fosfolípidos neutros para su actividad catalítica normal. Además de los fosfolípidos neutros, el complejo III de mamíferos, contiene ocho o nueve moléculas de cardiolipina por monómero, las cuales tienen un rol estructural importante, ya que si son removidas la actividad catalítica se pierde en forma irreversible. Este complejo enzimático acepta los electrones de la ubiquinona y los transfiere al citocromo c. El mecanismo de acción de este complejo, el ciclo Q (figura 1.6), fue propuesto originalmente por Peter Mitchel (1976) y explica el transporte de electrones y la actividad protón-motriz del complejo bc₁ (segundo sitio de translocación de protones) (Trumpower, 1990).

Figura 1.6 Ciclo Q.



El esquema muestra la trayectoria del transporte de electrones, cíclico y ramificado, desde el ubiquinol (QH_2) hasta el citocromo c, a través de los 4 centros redox del complejo III. Los números rodeados por un círculo designan reacciones de transferencia de electrones. Las flechas representan el movimiento del ubiquinol y la ubiquinona (Q) entre el sitio donde el ubiquinol es oxidado, en el centro P, del lado positivo de la membrana (espacio intermembrana) y el sitio donde la ubiquinona y la ubisemiquinona son reducidas, en el centro N, del lado negativo de la membrana (matriz mitocondrial). En el paso 1, el ubiquinol es oxidado en el centro P, en una reacción en la cual un electrón es transferido del ubiquinol a la proteína de Rieske (ISP) (paso 1a), generando un anión ubisemiquinona ($Q_p^{\cdot-}$), el cual inmediatamente reduce al grupo hemo b_L (paso 1b). En el paso 2 el electrón transferido a la proteína de Rieske, es transferido al citocromo c_1 (C_1) y luego al citocromo c (C) (paso 6). En el paso 3, el electrón transferido al grupo hemo b_L es transferido al grupo hemo b_H . En el paso 4, el hemo b_H reduce a la ubiquinona a anión ubisemiquinona ($Q_n^{\cdot-}$). Cuando b_H es reducido por la repetición de las reacciones precedentes, b_H reduce al anión ubisemiquinona a ubiquinol (paso 5). La oxidación divergente del ubiquinol en el centro P y la transferencia de electrones a través de los 2 grupos hemo b al par Q/ QH_2 en el centro N ocurre 2 veces durante un ciclo Q completo. De esta manera, un ciclo Q completo deposita 4 protones del lado positivo de la membrana, reduce 2 moléculas de citocromo c y consume 2 protones del lado negativo de la membrana. Los rectángulos blancos muestran los sitios en los cuales el mixotiazol y la antimicina inhiben la transferencia de electrones dentro de este complejo. Tomado de Snyder y col. (1999).

El complejo citocromo c oxidasa (citocromo a-a₃ o complejo IV) está compuesto por dos monómeros, cada uno contiene trece cadenas polipeptídicas diferentes (en bovinos). Además, está unido a ocho fosfolípidos (cinco fosfatidil etanolaminas y tres fosfatidil gliceroles (Tsukihira y col., 1996). Cada monómero contiene dos grupos hemo A (denominados a y a₃) y 2 átomos de cobre (Cu A y Cu B). El hemo A está cerca del Cu A, en la subunidad II y el hemo A₃ está cerca del Cu B en la subunidad I. El citocromo c reducido dona su electrón al grupo hemo A- Cu A, el cual lo transfiere al grupo hemo A₃-Cu B, donde el O₂ es reducido en una serie de pasos, a dos moléculas de agua. Concomitantemente, el complejo IV transloca protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana (tercer sitio de translocación de protones).

1.2.1.2. Producción de especies reactivas del oxígeno

La cadena de transporte de electrones mitocondrial, en condiciones fisiológicas, produce cantidades constantes de anión superóxido. Durante muchos años se pensó que la NADH deshidrogenasa y la región ubiquinona (coenzima q) - citocromo b eran los sitios principales de formación de anión superóxido (Boveris y Chance, 1973; Chance y col., 1979; Loschen y col., 1971, Boveris, 1984 y Turrens, 1997). Recientemente, Mc Lennan y Esposti (2000), demostraron que el complejo II es el mayor productor de especies reactivas del oxígeno de la célula. El anión superóxido y otras especies reactivas del oxígeno y del óxido nítrico actúan como

moduladores fisiológicos de algunas funciones mitocondriales, pero también pueden dañar a la mitocondria. El agua oxigenada originada en la mitocondria, fundamentalmente a partir de la dismutación del anión superóxido, causa oxidación de los piridinnucleótidos mitocondriales y estimula la liberación de Ca^{2+} de la mitocondria intacta (Richter y col., 1995).

1.2.2. Transporte de electrones bi-trans-membrana

La oxidación aeróbica de NADH exógeno, insensible a rotenona, antimicina y mixotiazol, está comprendida por la siguiente secuencia de transportadores de electrones:

NADH → NADH citocromo b5 reductasa (membrana mitocondrial externa) → citocromo b5 (membrana mitocondrial externa) → citocromo c (espacio intermembrana) → citocromo c oxidasa (membrana mitocondrial interna) → oxígeno (Bernardi y Azzone, 1981).

Dicha oxidación de NADH, es estimulada por el agregado de citocromo c y por el aumento de la fuerza iónica del medio (Fedotcheva y col., 1985). Dado que está integrada por componentes de ambas membranas mitocondriales y del espacio entre ellas, se denomina transporte de electrones bi-trans membrana. Investigaciones recientes sugieren que dicha cadena de transporte de electrones está localizada en los sitios de contacto entre ambas membranas mitocondriales (Lofrumento y col., 1991; Marzulli y col., 1999; Doran y Halestrap, 2000). El citocromo b5 está normalmente

orientado hacia la cara citosólica de la membrana mitocondrial externa y sólo puede reducir al citocromo c endógeno si dicha membrana está rota o permeabilizada para la oxidación de NADH externo (Lemeshko, 2000).

Resultados obtenidos por La Piana y colaboradores (La Piana y col., 1998) sugieren que el transporte de electrones bi-trans membrana, activado por la transferencia de citocromo c de las mitocondrias al citosol, podría estar directamente involucrado en la generación de potencial de membrana durante el comienzo de la apoptosis. La regulación de la salida del citocromo c de las mitocondrias estaría mediada por cambios en la interacción entre proteínas en los sitios de contacto entre ambas membranas mitocondriales (Doran E. y Halestrap A.P., 2000).

1.2.3. Acoplamiento entre cadena respiratoria y fosforilación oxidativa

La translocación de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, a través de los complejos I, III y IV de la cadena respiratoria, produce un gradiente electroquímico de protones que provee la anergía potencial necesaria para que el complejo V pueda sintetizar ATP a partir de ADP y Pi (Boyer, 1997; Hatefi, 1985) (figura 1.5). El complejo V o ATP sintetasa, tiene una estructura tripartita que consiste en un dominio extramembrana (en la cara interna de la membrana mitocondrial interna), un dominio integral de membrana y otro que conecta a ambos (Boyer, 1997). Sin embargo la enzima se puede dividir en dos partes: F_1 , una unidad hidrosoluble y globular de aproximadamente 9-10 nm de

diámetro, que contiene los sitios de unión a los sustratos; y F_0 , una unidad hidrofóbica integral de membrana. El dominio que conecta a ambas unidades, está formado por componentes de F_1 y de F_0 . Cuando F_1 y F_0 están unidas, la enzima funciona en forma reversible como transportadora de H^+ y ATPasa o ATPsintetasa. En bovinos, el complejo F_1 está compuesto por cinco subunidades diferentes y el complejo F_0 , por diez (Walker y col., 1995).

En mitocondrias normales la reacción de oxidación del sustrato respiratorio ($NADH+H^+$ o succinato) depende de la presencia de ADP y P_i . En condiciones fisiológicas, la matriz mitocondrial contiene alta concentración de P_i , de manera que la concentración de ADP es la reguladora de la actividad del sistema de transporte de electrones y, por lo tanto, de la respiración mitocondrial. La medida de la respiración mitocondrial con métodos adecuados (por ejemplo, la polarografía de oxígeno) permite comprobar que en ausencia de ADP la actividad es limitada, mientras que después de añadir ADP la respiración se activa a niveles que pueden alcanzar hasta 20 veces el valor obtenido en ausencia del mismo. Una vez que el ADP adicionado ha sido totalmente convertido en ATP, la actividad respiratoria retorna a un nivel muy próximo al inicial. Al estado metabólico caracterizado por la presencia de sustrato oxidable, en ausencia de ADP y consumo de oxígeno lento se lo denomina "estado controlado" o "estado 4". La adición de ADP establece un consumo de oxígeno rápido, y por ello a este estado se lo denomina "estado activado" o "estado 3", que se mantiene hasta que todo el ADP ha sido fosforilado a ATP, produciéndose entonces el retorno al estado "4". El cociente entre la

respiración en estado "3" y la respiración en estado "4" se denomina índice de control respiratorio (Chance B. y Hollunger, 1963) y es la expresión del control que ejerce el aceptor de fosfato (el ADP) sobre el transporte de electrones mitocondrial. El fenómeno de control respiratorio es de máxima importancia en la regulación fisiológica de la respiración celular. El control respiratorio y el índice P:O son utilizados para expresar el grado de acoplamiento entre los procesos de oxidación y fosforilación. Bajos valores de control respiratorio o de índice P:O indican mitocondrias desacopladas o dañadas. El acoplamiento de los procesos de transporte de electrones y de síntesis de ATP puede ser modificado por agentes químicos y por alteración física de la membrana mitocondrial.

1.2.4. Transporte de Calcio

El transporte de Ca^{2+} mitocondrial tiene una función esencial en el metabolismo mitocondrial y celular. El Ca^{2+} intramitocondrial estimula la fosforilación oxidativa a través de la activación de una serie de pasos del metabolismo mitocondrial, incluyendo deshidrogenasas acopladas al ciclo de Krebs, (piruvato, isocitrato y 2-oxoglutarato deshidrogenasas) (Hansford y col., 1989; McCormack y col, 1990), la F_1/F_0 ATPasa (Rouslin y Broge, 1989; Yamada y Huzel, 1989; Territo y col., 2000) y la translocasa de nucleótidos de adenina en el hígado (Moreno-Sanchez, 1985; Moreno-Sanchez y Hansford, 1988). El mantenimiento de niveles bajos de Ca^{2+} libre en el citoplasma es una característica común a todas las

células eucarióticas (Pietrobon D., et al, 1990). Para mantenerlo existen varios mecanismos que regulan la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma y su acumulación en organelas (principalmente mitocondrias y retículo endoplasmático). La acumulación de Ca^{2+} dentro de la mitocondria determina el aumento del volumen de ésta "swelling", la cual se recupera en presencia de ATP-Mg o ATP-Mn (Lehninger A. L., 1964). El Ca^{2+} puede entrar a la mitocondria por 2 mecanismos alternativos, ambos dependientes de energía: uno rápido (hidroliza ATP) y el otro lento (requiere gradiente de H^+). La velocidad de salida de Ca^{2+} aumenta en forma directamente proporcional al aumento del cociente $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ (Lehninger A. L., 1978). Las principales moléculas transportadoras involucradas son: un uniporter (entrada de Ca^{2+}), dos antiporters Ca^{2+} - Na^+ , Ca^{2+} - H^+ (salida) y un "poro de permeabilidad transitoria" (PTP) cuya probabilidad de apertura aumenta al unirse al Ca^{2+} y disminuye en presencia de ciclosporina A (Gunter K. K. y Gunter T. E., 1994).

La permeabilidad transitoria mitocondrial (Gunter y Pfeiffer, 1990; Zoratti y Szabò, 1995; Bernardi, 1999), está propuesta como un evento temprano en varios modelos de apoptosis (Marzo y col., 1998; Green y Reed, 1998; Bernardi y col., 1999; Scorrano y col., 1999; Crompton, 1999) y se debe a la apertura del PTP. Hasta el momento no se conoce totalmente la identidad de las proteínas que componen el PTP. La translocasa de nucleótidos de adenina (AdNT) fue la candidata más aceptada durante mucho tiempo (Zoratti y Szabò, 1995; Ruck y col., 1998). Actualmente, la mayoría de los investigadores sugieren que el PTP es un complejo, ubicado en los sitios de contacto entre ambas membranas mitocondriales, formado por proteínas de

la matriz (ciclofilina D), de las membranas mitocondriales interna (AdNT) y externa (canal aniónico dependiente del voltaje -VDAC-, y quizás BAX) y del espacio intermembrana (creatina kinasa)(Zoratti y Szabò, 1995; Marzo y col., 1998, Crompton y col., 1998; Halestrap y col., 1998). Halestrap y colaboradores (2000), demostraron por reconstitución de los componentes puros, que el PTP se abre por un cambio conformacional de la AdNT unida a ciclofilina-D de la matriz, originado por la presencia de Ca^{2+} . Resultados obtenidos por los mismos autores (Halestrap y col., 2000), sugieren que el canal específico para la salida de citocromo c de la mitocondria, que se abre en presencia de miembros pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2 (como BAX) y se cierra en presencia de miembros anti-apoptóticos (como Bcl-XL), interactuaría directamente con la AdNT en los sitios de contacto entre ambas membranas mitocondriales. Además, fue propuesta la idea de que el PTP podría ser una manifestación del complejo de importación de proteínas de las mitocondrias (Lohret y col., 1997; Kushnareva y col., 1999). El descubrimiento de que el PTP es modulado por el flujo de electrones a través del complejo I, y de que puede ser inhibido por análogos de la ubiquinona (Fontaine y col., 1998 a y b), llevó a la hipótesis de que este complejo podría incluir esa parte de la cadena respiratoria. El PTP es inducido o inhibido por una gran variedad de condiciones y agentes (Gunter y Pfeiffer, 1990; Zoratti y Szabò, 1995); pero los dos requerimientos claves para su apertura son la presencia de Ca^{2+} y la despolarización de la membrana (Bernardi, 1992; Scorrano y col., 1997).

1.2.5. Blanco de acción de drogas

La mayor parte de la energía para el metabolismo celular, es generada a expensas de la respiración mitocondrial. Por lo tanto, la interacción de xenobióticos con las funciones mitocondriales puede afectar severamente al metabolismo general. Por otra parte, el metabolismo mitocondrial de xenobióticos puede generar grandes cantidades de especies reactivas del oxígeno, produciendo así un estrés oxidativo, el cual puede afectar a cualquier función celular. Por estas razones, la mitocondria es un excelente modelo para el estudio de la toxicidad celular de muchos xenobióticos y los datos obtenidos de estudios mitocondriales generalmente se correlacionan con los parámetros de citotoxicidad reportados en cultivos de células y en organismos enteros (Knobelock y col, 1990; Argese y col, 1995).

1.3. Quinonas

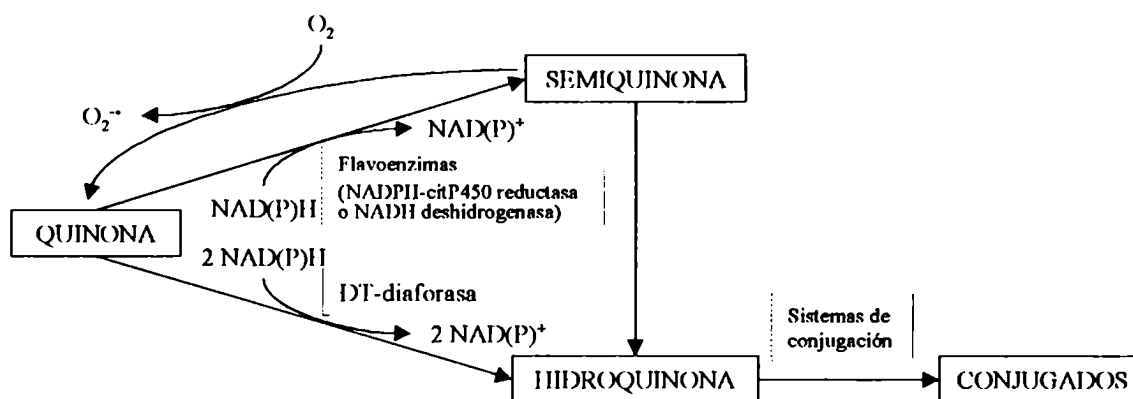
1.3.1. Generalidades

Las quinonas son derivados dicetona de compuestos aromáticos, ampliamente distribuidos en la naturaleza, algunos de ellos involucrados en procesos biosintéticos tales como la respiración celular y la fotosíntesis (Thompson y col., 1971). Las quinonas son compuestos lipofílicos capaces de generar radicales libres al ser reducidos en el medio intracelular produciendo un estrés oxidativo.

1.3.2. Metabolización de las quinonas

Las quinonas, en hepatocito aislado de rata, son reducidas a su radical semiquinona y a la hidroquinona, oxidándose el NADPH (Ernster, 1987)(figura 1.7). La mayoría de los radicales semiquinona reaccionan rápidamente con el oxígeno para formar anión superóxido; por lo tanto este ciclo redox puede llevar a la producción de grandes cantidades de este último (Kappus y Sies, 1981; Powis y col., 1981; Lind y col.,1982; Thor y col., 1982). Este proceso de reducción-oxidación no estequiométrico podría ser el responsable del daño oxidativo causado por quinonas. Por otro lado la mayoría de las hidroquinonas tienden a ser estables, por lo que son fácilmente conjugadas y excretadas de la célula. En consecuencia, la producción de hidroquinonas se acerca a un proceso metabólico protector (Ernster, 1987). Es necesario destacar que la DT-diaforasa (NQO1) (Ernster, 1987) es una enzima importante en la desintoxicación de las quinonas, ya que es capaz de metabolizar las quinonas a hidroquinonas.

Figura 1.7 Metabolismo de quinonas con reducción de oxígeno y oxidación de NAD(P)H, en hepatocitos aislados de rata (Ernster, 1987)



1.3.3. Quinonas como potenciales agentes terapéuticos

Muchos compuestos con estructura quinona son potenciales agentes terapéuticos aunque la aplicación clínica de algunas quinonas es discutida por su elevada toxicidad. Por ejemplo, la Adriamicina, ampliamente utilizada en la quimioterapia del cáncer (Carter, 1975), es cardiopélica (Young y col., 1981). Tanto el efecto terapéutico como el tóxico, generalmente se deben a la producción de un estrés oxidativo (Smith y col., 1985).

Muchas drogas antineoplásicas son quinonas (derivados de la antraciclina, mitomicina, actinomicina), o derivados de quinoides (quinolona, bactraciclina), o drogas que pueden convertirse fácilmente en quinonas por oxidación in-vivo. La actividad antitumoral de las quinonas se reveló hace más de veinte años, cuando el Instituto Nacional del Cáncer (USA) publicó un informe en el que se mencionan más de 1500 quinonas naturales o sintéticas con actividad citostática (Driscoll y col, 1974).

La posibilidad de acción de las drogas depende de diferentes factores que incluyen, entre otros, captación y localización intracelular, niveles celulares de agentes protectores como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión reducido, entre otros; disponibilidad de oxígeno y fundamentalmente la presencia de las enzimas comprometidas en la iniciación de la etapa de reducción.

1.3.3.1. p-Naftoquinonas

1.3.3.1.1. Menadiona

La menadiona (vitamina K)(figura 1.8), es una p-naftoquinona muy estudiada, que ejerce su acción citotóxica por reacciones redox cíclicas, causando estrés oxidativo, y por arilación de grupos nucleofílicos (Ross y col.,1986; Gant y col., 1988; Cohen y Stubberfield, 1990). Es activa contra *Plasmodium sp.* (agente etiológico de la malaria) "in vitro" y en modelos animales (López Charla K. , 1994). La exposición de hepatocitos aislados de rata, a la menadiona, lleva a una oxidación rápida del glutatión reducido (GSH), con la producción de niveles altos de (GSSG) (Bellomo y col., 1987). Esto está asociado a alteraciones importantes de la membrana plasmática, incrementos en los niveles citosólicos de Ca^{2+} y una marcada oxidación del NADPH. Por otra parte la menadiona, al igual que otras naftoquinonas, inhibe la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos (Wills, 1972 ; Dubin M. y col. 1990) y en hepatocitos aislados, de rata (Hogberg y col.,1975).

1.3.3.1.2. Atovaquone

El atovaquone (denominado BW- 566C80) (figura 1.8) es una hidroxí p-naftoquinona muy estudiada por su efecto contra protozoos, demostrado en modelos

animales. Esta droga fue sintetizada inicialmente como antimalárico, con potente actividad contra cepas resistentes de *Plasmodium falciparum*. El atovaquone es un potente inhibidor de la Dihidroorotato deshidrogenasa (DHOD), enzima clave en la biosíntesis de pirimidinas de novo y la principal fuente de electrones de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, en parásitos de la malaria, intraeritrocíticos (Ittarat J. y col., 1994). Además, el atovaquone colapsa el potencial de membrana mitocondrial e inhibe la respiración en parásitos de la malaria, pero no afecta el potencial de membrana en mitocondrias de mamíferos (Srivastava, I.K. y col., 1997). Las pruebas realizadas en pacientes con SIDA, revelaron que el atovaquone, si bien tiene menos efectos adversos, resulta menos efectivo que los tratamientos previamente utilizados, contra *Pneumocystis carinii* (una de las principales causas de muerte en pacientes con SIDA) (Hughes W. y col., 1993).

1.3.3.2. o-Naftoquinonas

En contraste con la abundante información existente sobre las propiedades, actividad y aplicaciones de las p-quinonas, las o-quinonas han sido menos estudiadas. Sin embargo, investigaciones recientes han puesto de manifiesto la acción de algunas o-naftoquinonas sobre líneas celulares tumorales (Planchon y col., 1999; Shiah y col., 1999; Hueber y col., 1999; Huang y col., 1999; Li y col., 1999), lo que ha renovado el interés por las mismas.

1.3.3.2.1. β -lapachona

La β -lapachona es una o-naftoquinona lipofílica extraída del lapacho (*Tabebuia avellanadae*) junto con el lapachol (figura 1.8). Posee muchos efectos farmacológicos, entre los que se encuentra su conocida actividad tripanocida (Docampo y col., 1978; Goijman y Stoppani, 1985; Molina Portela y col., 1991; Molina Portela y col., 1996). En los últimos años, el interés por la β -lapachona se ha orientado fundamentalmente hacia la búsqueda de efectos citostáticos, inicialmente en el cáncer de próstata y en las leucemias y posteriormente en otras líneas celulares tumorales. La β -lapachona induce muerte celular en un espectro importante de células tumorales humanas, incluyendo células no proliferativas. Induce apoptosis en células tumorales de próstata, ovario, colon, pulmón, mama y leucemias. Provoca necrosis en por lo menos cuatro líneas celulares de cáncer de mama y de hepatoma (Driscoll y col, 1974; Boothman y col, 1989; Li y col., 1993; Li y col., 1995; Chau y col., 1998; Wuerzberger y col., 1998; Lai y col., 1998; Vanni y col., 1998; Planchon y col., 1999; Shiah y col., 1999; Hueber y col., 1999; Huang y col, 1999; Li y col., 1999; Manna y col., 1999).

Se han observado también efectos letales sobre virus (Schaffner-Sabba y col., 1984; Li y col., 1993) lo que extiende las perspectivas terapéuticas de la β -lapachona. Según los estudios citados anteriormente, la β -lapachona inhibe reacciones enzimáticas esenciales para la conservación del genoma. Así, a) inhibe la poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP) de células CHO (Vanni y col., 1998); b) inhibe las

topoisomerasas I y II, (Li y col., 1993; Chau y col., 1998; Vanni y col., 1998; ; Shiah y col., 1999; Hueber y col., 1999; Krishnan y col., 2000); c) inhibe la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina (Schaffner-Sabba y col., 1984); inhibe la transcripción del virus HIV (I) (Li y col., 1993); y además induce aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas en células de tumor de ovario (Degrassi y col, 1993).

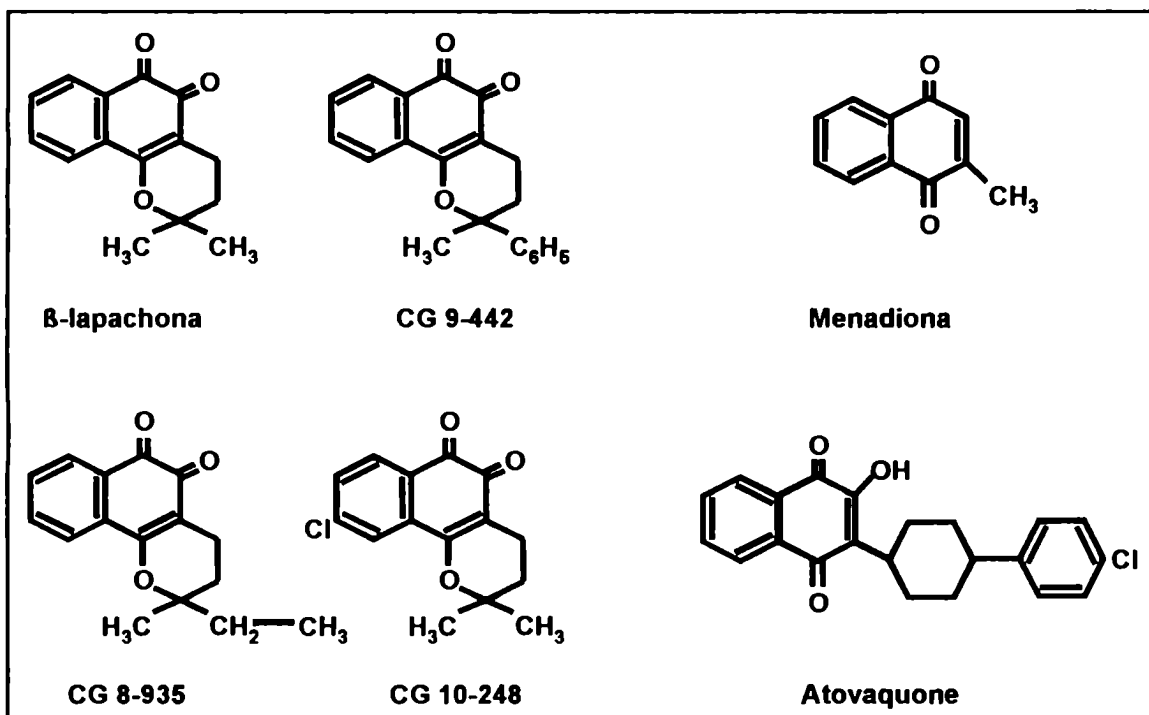
Los mecanismos moleculares que explican la actividad antineoplásica de la β -lapachona, han sido parcialmente dilucidados. La topoisomerasa I de eucariotas se considera uno de los blancos importantes de la β -lapachona. Esta quinona inhibe a la topoisomerasa I por un mecanismo diferente a la camptotecina, inhibidor típico de la topoisomerasa I. Estudios recientes han demostrado que la enzima NAD(P)H quinona óxido-reductasa (NQO1) (DT-diaforasa) incrementa la toxicidad de la β -lapachona. Estas investigaciones sugieren que, contrariamente a lo que ocurre con la menadiona y la mayoría de las quinonas, la reducción de la β -lapachona por la NQO1 conduce a un “ciclo fútil” entre la quinona y la hidroquinona por auto-oxidación de la hidroquinona inestable, con una pérdida concomitante de NAD(P)H (Pink y col., 2000).

1.3.3.2.2. Quinonas derivadas de la β -lapachona

Los efectos observados con la β -lapachona, han motivado la búsqueda de moléculas similares por síntesis o por extracción de vegetales. Así, Schaffner-Sabba

y colaboradores (Schaffner-Sabba y col., 1984) sintetizaron varias o-naftoquinonas derivadas de la β -lapachona: CG 8-935, CG 9-442 y CG 10-248 (figura 1.8), caracterizadas por la presencia de grupos específicos en la posición 2 del anillo pirano o en la posición 9 del anillo naftaleno. Estas quinonas CG, inhiben la DNA-Polimerasa dependiente de RNA y prolongan la vida de ratones infectados con el virus *Rauscher*, causante de leucemia (Schaffner-Sabba y col., 1984). Por otra parte las quinonas CG inhiben activamente el crecimiento de los protozoarios *Crithidia fasciculata*, *Leptomona seymouri* y *Tripanosoma cruzi* (Boveris y col., 1978; Goijman y Stoppani, 1985; Molina Portela y col., 1991; Molina Portela y col., 1996). En estudios previos (Dubin M. y col., 1990 b), realizados en nuestro laboratorio, se ha encontrado que dichas quinonas derivadas de la β -lapachona tienen diversos efectos sobre el sistema microsomal hepático en la rata: inhiben la peroxidación lipídica microsomal dependiente de NADPH en presencia de Fe, pero no la dependiente de hidroperóxido de ter-butilo o ascorbato; previenen la destrucción del citocromo P-450; inhiben las enzimas microsomales anilina 4-hidroxilasa, aminopirina N-demetilasa; estimulan la oxidación del NADPH y la producción de anión superóxido; estimulan, en presencia de ascorbato, la formación del radical semiquinona. Estos resultados llevan a postular la hipótesis de que estas o-naftoquinonas inhiben la peroxidación lipídica microsomal hepática y las reacciones catalizadas por el citocromo P-450, por desvío de electrones hacia la metabolización de las drogas estudiadas, con producción de O_2^- ; quedando así pocos equivalentes de reducción disponibles para la peroxidación lipídica y otros procesos (Dubin, 1990b).

Figura 1.8 Estructura molecular de las naftoquinonas estudiadas



β-lapachona, 3,4-dihidro-2,2 dimetil-2H-nafto[1,2 b] piran-5,6-diona; CG 8-935, 3,4-dihidro-2-metil-2-etil-2 H-nafto-[1,2 b] piran-5,6-diona; CG 9-442, 3,4 dihidro-2-metil-2-fenil-2H-nafto [1,2 b] piran-5,6 diona; CG 10-248, 3,4-dihidro-2,2-dimetil-9-cloro-2 H-nafto-[1,2 b] piran-5,6-diona; menadiona, 2-metil-1,4-naftoquinona; atovaquone, 2-[trans-4-(4-clorofenil) ciclohexil]-3-hidroxi-1,4-naftoquinona.

1.4. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta que: a) la β -lapachona, o-naftoquinona, induce muerte celular en un espectro importante de células tumorales humanas y está postulada como potencial citostático para la quimioterapia del cáncer, antiviral y tripanocida; b) la β -lapachona produce radicales libres del oxígeno con generación del radical semiquinona, en microsomas hepáticos; y c) la mitocondria es un blanco importante para la acción de drogas (principalmente a través de la producción de radicales libres); el objetivo del presente trabajo ha sido el estudio del mecanismo de acción de la o-naftoquinona CG 9-442, derivada de la β -lapachona, sobre la función mitocondrial de hígado de rata.

Estos estudios pueden ser importantes para contribuir al diseño de diferentes naftoquinonas farmacológicamente activas.

Materiales

2.1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratas macho, cepa Wistar, de 240-280 g de peso. Los animales se mantuvieron a 24°C sometidos a ciclos de luz y oscuridad de 12 hs de duración y fueron alimentados con dieta: Roedores número 3 (dieta similar a Purina provista por Nutrimentos S.A., Buenos Aires, Argentina) y agua *ad libitum*. Dicha dieta contiene un 23% de proteínas y todos los aminoácidos esenciales.

2.2. Reactivos

CG 9-442, CG 10-248 y CG 8-935 fueron provistas por Laboratorios Ciba-Geigy, Basle, Suiza; Atovaquone fue suministrado por laboratorios Wellcome, Langley Court, Beckenham, Kent, BR3 3BS, UK; dimetilformamida (DMFA) fue provista por May & Baker LTD., Dagenham, Inglaterra; FeCl₃, KCl, cianuro de K, MgCl₂, tartrato de Na y K, molibdato de amonio, ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico y TCA fueron adquiridos a Mallinckrodt Chemical Works, New York, U.S.A.; albúmina sérica bovina (A-4503), ATP, ADP (grado 4), L-glutamato, L-malato, malonato, succinato, NADH, sacarosa, TBA, trizma base, menadiona, rotenona, antimicina A, mixotiazol, Mops, rhodamina 123, citocromo c acetilado, superóxido dismutasa fueron adquiridos de Sigma Chemical Co., St. Louis Mo., U.S.A. Todos los otros reactivos utilizados fueron de grado analítico y de la más alta pureza disponible.

Métodos

3.1. En mitocondrias

3.1.1. Aislamiento de mitocondrias

A) Para estudiar: la velocidad de respiración, el aumento del volumen mitocondrial “swelling” por calcio y el potencial de membrana, se utilizó el método de aislamiento de mitocondrias de Johnson y Lardy (1967). Las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical, luego de 24 hs de ayuno. Se empleó sacarosa 0,24 M y EDTA 1 mM en solución Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) como medio de homogeneización y en proporción de 9 ml/g de hígado. El homogenado fue sometido a centrifugación diferencial a 4°C en una centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B, rotor SS-34. Los núcleos y restos celulares fueron sedimentados a 600 g durante 10 min. El sobrenadante fue centrifugado luego, a 6800 g durante 10 min, para sedimentar las mitocondrias. Después de realizar un lavado en la centrífuga a 6800 g con el medio de homogeneización, las mitocondrias fueron resuspendidas en el mismo medio, a una concentración de 10-20 mg de proteína/ml y fueron utilizadas dentro de las 4 hs luego del aislamiento.

B) Para estudiar: la peroxidación lipídica se utilizó el método de aislamiento de mitocondrias de Schneider W.C. (1948) modificado según Boveris y Stoppani (1970), el cual difiere del método descrito en el ítem A en el medio amortiguador utilizado. Los hígados fueron lavados, cortados y homogeneizados en una solución de manitol 0,23 M, sacarosa 0,07 M, EDTA 1 mM, TRIS-HCl 30 mM (pH 7,4). Las

mitocondrias obtenidas fueron lavadas tres veces con TRIS-HCl 50 mM (pH 7,4) para eliminar la sacarosa remanente que interfiere con el método de detección de malondialdehído (MDA). Los sedimentos se conservaron a -20°C hasta la utilización de las mitocondrias. Estas fueron desacopladas por congelamientos y descongelamientos sucesivos y resuspendidas en el momento de su utilización en TRIS-HCl 50 mM (pH 7,4).

3.1.2. Estudio de la peroxidación lipídica mitocondrial

La peroxidación lipídica se midió por el método de Placer E.A. (1966) modificado según Kukielka y col. (1994). En el mismo, se estima la magnitud de la peroxidación lipídica detectando (a 535 nm) un producto de reacción rojo que se obtiene al reaccionar el malondialdehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico (TBA), en medio ácido, a 100°C. La mezcla de reacción contenía mitocondrias desacopladas (0,4 mg de proteína/ml), NADH 1,5 mM y ATP-Fe⁺³ 0,05 mM (20:1) en solución TRIS-HCl 50 mM (pH 7,4). Las diferentes quinonas estudiadas fueron agregadas disueltas en dimetilformamida (DMFA), (las concentraciones finales se indican en las tablas y figuras correspondientes). La incubación fue realizada durante 60 minutos, a 37 °C, en erlenmeyers destapados, con agitación (90 ciclos/min). A los 0, 15 y 60 minutos de incubación, se sacaron alícuotas de 0,5 ml de cada erlenmeyer. La reacción fue detenida por el agregado de 1,5 ml de TCA 20% en hielo. Luego de enfriar durante 30 minutos (en hielo) y centrifugar (en una centrífuga refrigerada

Sorvall RT 6000) 15 min, a 3000 rpm y 4°C (para precipitar las proteínas), a 1 ml de cada sobrenadante se le agregó 1 ml de TBA (7,3 mg/ml) y se calentó en baño de agua a 100°C durante 15 minutos para que se desarrolle la reacción de color. Luego, se los dejó enfriar a temperatura ambiente. Las absorbancias fueron leídas en un espectrofotómetro Perkin Elmer 550 S UV/Vis a 535 nm, contra blancos que contenían todos los componentes excepto las mitocondrias. La concentración de MDA de las muestras fue calculada utilizando un coeficiente de extinción de $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.1.3. Medida de la velocidad de respiración

La velocidad de respiración fue medida polarográficamente empleando un oxígrafo Gilson modelo 5/6 (Gilson Medical Electronics, Middleton, Wisconsin, USA) provisto de un electrodo de Clark a 30°C. La mezcla de reacción (1,8 ml) contenía mitocondrias (1,0-2,0 mg de proteína/ml); sacarosa 0,24 M; KCl 34 mM; MgCl₂ 5 mM; EDTA 0,9 mM; Tris-HCl 9 mM, solución Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 6 mM (pH 7,4) y las diferentes drogas estudiadas disueltas en DMFA. Las concentraciones de sustrato utilizadas fueron las siguientes: L-malato 5 mM; L-glutamato 5 mM (más malonato 2,5 mM) o succinato 10 mM (más rotenona 3 μM). Se midieron las pendientes de los trazados correspondientes a los estados metabólicos "4" y "3" (antes y después del agregado de ADP 0,5 mM, respectivamente). El índice de control respiratorio fue calculado según :

$$\text{Índice de control respiratorio (ICR)} = \frac{\text{pend. estado "3"}}{\text{pend. estado "4"}}$$

3.1.4. Determinación del aumento de volumen mitocondrial "swelling"

Los cambios en el volumen mitocondrial fueron medidos a 30°C siguiendo el cambio de absorbancia de la suspensión mitocondrial a 540 nm (Boveris y Stoppani, 1971), con un espectrofotómetro Perkin Elmer 550 S UV/VIS. La mezcla de reacción contenía 0,16 mg de proteína/ml y DMFA o CG 9-442 (2,5; 5; 10 o 25 μM) en solución de sacarosa 0,1 M; KCl 50 mM; MOPS 20 mM; KH_2PO_4 0,2 mM (pH 7,2). Los ensayos fueron realizados con sustratos endógenos, o con el agregado de los siguientes sustratos: L-malato 1,7 mM - L-glutamato 1,7 mM (más malonato 0,8 mM) o succinato 5 mM (más rotenona 0,8 μM). La reacción se inició en presencia de CaCl_2 120 μM , se frenó con EGTA 0,1 mM y la recuperación mitocondrial se determinó después del agregado de ATP 2,5 mM y MgCl_2 5 mM. Las velocidades de aumento y de contracción del volumen mitocondrial fueron calculadas a partir de las pendientes de los trazados correspondientes y son expresadas como $\Delta A^{540} \times \text{min}^{-1} \times (\text{mg de proteína})^{-1}$. El aumento y la contracción máximos fueron calculados como la diferencia entre la absorbancia lograda después de su estabilización y el valor de absorbancia obtenido antes del agregado de Ca^{2+} o de ATP, respectivamente.

3.1.5. Medida del potencial de membrana mitocondrial

El potencial trans-membrana mitocondrial fue medido a través de la acumulación de rhodamina 123, un catión fluorescente que se distribuye a ambos lados de la membrana dependiendo de la diferencia de potencial (Johnson y col., 1981; Emaus y col., 1986; Wu y col., 1990; Hagen y col., 1997). Las incubaciones se realizaron en erlenmeyers de 25 ml destapados, a 37°C, bajo atmósfera de aire y con agitación, en un incubador New Brunswick Giratory Water Bath Shaker modelo G 76. La mezcla de reacción contenía: mitocondrias (1-2 mg de proteína/ml), ADP 0,5 mM, L-malato 5 mM, L-glutamato 5 mM, malonato 2,5 mM y CG 9-442 (2,5; 5; 10; 25 o 50 μ M) o DMFA, en solución de sacarosa 240 mM, KCl 34 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 0,9 mM, Tris-HCl 9 mM y Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 6 mM, (pH 7,4). A los 0 o 15 minutos de incubación, se les agregó rhodamina 123 1,5 μ M (concentración final). Después de incubar durante 10 minutos en las mismas condiciones, la mezcla de reacción se centrifugó a 6800 g. La acumulación de rhodamina 123 en las mitocondrias se determinó por diferencia entre las fluorescencias del sobrenadante y de una solución de rhodamina 123 1,5 μ M. Las lecturas de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorómetro Aminco SLM 8000 C, empleando una longitud de onda de excitación de 498 nm y una longitud de onda de emisión de 525 nm. Para los cálculos se utilizó una curva standard.

3.2. En partículas submitocondriales

3.2.1. Aislamiento de partículas submitocondriales

Se obtuvieron mitocondrias por el método de Johnson y Lardy (1967), las cuales fueron conservadas sedimentadas a -20°C . Luego de 24 hs del aislamiento, se suspendieron en pirofosfato 100 mM (pH 7,4); hasta una concentración proteica final de 20 mg/ml y 10 mM de pirofosfato. La suspensión se sonicó a 50 Watt, durante 30 seg., 3 veces. Se centrifugó a 26000 g, durante 15 min. El precipitado se descartó y el sobrenadante se centrifugó a 105000 g durante 45 min. El sedimento obtenido fue lavado 1 vez con el medio de homogeneización para mitocondrias. Este último se guardó suspendido en el mismo medio en proporción 0,12 ml/gr de hígado (15-25 mg de proteína/ml), a -50°C hasta su utilización. La actividad específica de NADH oxidasa de estas preparaciones fue de 100-190 nanomoles de NADH oxidados/min.x mg prot., a 30°C .

3.2.2. Medida de actividad NADH oxidasa

La mezcla de reacción contenía partículas submitocondriales (0,07 mg de proteína/ml), en solución de sacarosa 0,24 M; EDTA 1 mM; TRIS-HCl 50 mM (pH 7,4). La reacción fue iniciada por el agregado de NADH 0,25 mM y se frenó con cada uno de los siguientes inhibidores: cianuro 0,3 mM, antimicina A 3 μM ,

mixotiazol 3 μM o rotenona 2 μM . Luego se le agregó DMFA o CG 9-442 (1; 2,5; 5; 10; 18; 25; 38 o 50 μM). La actividad NADH oxidasa fue medida a 30°C observando la disminución de absorbancia producida por la oxidación de NADH a 340 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer 550 S UV/VI. Los cálculos se realizaron a partir de la diferencia entre la pendiente anterior y la posterior al agregado de la quinona, utilizando el coeficiente de extinción 6,22 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Los resultados son expresados como nanomoles de NADH oxidados/min. x mg. de proteína.

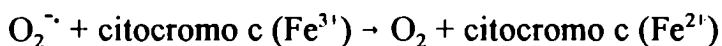
3.2.3. Medida de la velocidad de respiración

La velocidad de respiración fue medida polarográficamente, con el mismo aparato que en la sección 1.3, a 30°C. La mezcla de reacción (1,8 ml) contenía partículas submitocondriales (0,07 mg de proteína/ml); sacarosa 0,24 M; EDTA 1 mM; Tris-HCl 50 mM (pH 7,4). Las concentraciones de quinonas e inhibidores de la cadena de transporte de electrones se detallan en las leyendas de las tablas y figuras correspondientes. Como sustrato se utilizó succinato 10 mM (más rotenona 3 μM) o NADH 0,25 mM.

3.2.4. Determinación de la producción de anión superóxido

El anión superóxido fue medido por el método de Mc Cord y Fridovich (Mc

Cord y Fridovich, 1969). El anión superóxido es capaz de reducir al citocromo c según la siguiente reacción:



El citocromo c acetilado es reducido a una velocidad similar a la del citocromo c nativo. La mezcla de reacción contenía partículas submitocondriales (70 µg de proteína/ml), citocromo c acetilado 15 µM, NADH 0.25 mM, antimicina A 3 µM, sacarosa 240 mM y EDTA 1 mM en solución Tris-HCl 50 mM (pH 7,4). La reacción fue iniciada por el agregado de CG 9-442 (1; 2,5; 5; 10; 25 y 50) o DMFA, y luego frenada con superóxido dismutasa 50 U/ml. La velocidad de reacción fue medida a 30°C por el incremento de absorbancia a 550-540 nm en un espectrofotómetro Aminco DW-2a™ UV/Vis (coeficiente de extinción = 19 mM⁻¹.cm⁻¹).

3.2.5. Espectro EPR del radical semiquinona de la CG 9-442

Las medidas de EPR se realizaron en un espectrómetro EPR Bruker ECS 106 banda X (Bruker Analytische Messtechnik GMBH, Rheinstetten, Karlsruhe, Germany). Las condiciones generales instrumentales fueron: poder de microonda, 20 mw; frecuencia de microonda, 9,75 Ghz; frecuencia de modulación, 50 Khz; constante de tiempo, 1310,72 ms. El campo fue centrado a 3490 G.

La mezcla de reacción contenía: CG 9-442 1 mM, partículas submitocondriales 6 mg prot/ml y NADH 5 mM, en solución de sacarosa 0,24 M, EDTA 1 mM y Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), 1 % DMFA, bajo N₂.

3.2.6. Medida del efecto de la CG 9-442, sobre diferentes actividades enzimáticas

Incubación: la mezcla de reacción contenía partículas submitocondriales (0,6 mg de proteína/ml), en solución de fosfatos de sodio y potasio 50 mM (pH 7,4). La incubación fue realizada durante 15 minutos a 30°C en erlenmeyers destapados, con agitación (en el mismo aparato que en la sección 3.1.5). La incubación fue concluida por dilución, con la misma solución amortiguadora, en hielo. El resto de las condiciones, se indica en cada caso. En las partículas incubadas, se midieron las siguientes actividades enzimáticas:

3.2.6.1. Actividad NADH oxidasa.

La actividad NADH oxidasa fue medida observando la disminución de la absorbancia, a 30°C, producida por oxidación de NADH a 340 nm ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), en un espectrofotómetro Perkin Elmer 550 s UV/Vis. La mezcla de reacción contenía las partículas submitocondriales (previamente incubadas en presencia o en ausencia de NADH, catalasa y superóxido dismutasa), (0,125 mg de proteína/ml) y NADH 0.25 mM, en solución de fosfatos de sodio y potasio 50 mM (pH 7,4).

3.2.6.2. Actividad NADH deshidrogenasa.

La actividad NADH deshidrogenasa fue medida observando la disminución de la absorbancia, a 30°C, producida por la reducción del ferricianuro a 455 nm ($\epsilon = 150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), en un espectrofotómetro Perkin Elmer 550 s UV/Vis. La mezcla de

reacción contenía partículas submitocondriales 0,03 mg.de proteína/ml (previamente incubadas en presencia o en ausencia de NADH), antimicina A 3 μ M y ferricianuro de potasio 5 mM, en solución de fosfatos de sodio y potasio 100 mM (pH 7,6), EDTA 1 mM, albúmina bovina 0,1 %. La reacción fue iniciada por el agregado de NADH 0,25 mM.

3.2.6.3. Actividad succinato oxidasa.

Se midió el consumo de oxígeno polarográficamente, con el mismo aparato que en la sección 3.1.3. La mezcla de reacción contenía las partículas submitocondriales previamente incubadas (0,2 mg de proteína/ml), succinato 10 mM y rotenona 3 μ M, en solución de fosfatos de sodio y potasio 50 mM (pH 7,4).

3.2.6.4. Actividad succinato deshidrogenasa.

La actividad succinato deshidrogenasa fue medida observando la disminución de la absorbancia, a 30°C, producida por la reducción del ferricianuro a 455 nm ($\epsilon = 150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), en el mismo espectrofotómetro que en el ítem 3.2.5.2. La mezcla de reacción contenía partículas submitocondriales 0,2 mg. de proteína/ml (previamente incubadas en ausencia de dadores de electrones), cianuro de potasio 1 mM y ferricianuro de potasio 5 mM, en solución de fosfatos de sodio y potasio 100 mM (pH 7,6), EDTA 1 mM, albúmina bovina 0,1 %. La reacción fue iniciada por el agregado de succinato 40 mM.

3.2.6.5. Actividad succinato-ubiquinona óxido-reductasa.

La actividad succinato-ubiquinona óxido-reductasa fue medida observando la disminución de la absorbancia, a 30°C, producida por la reducción del diclorofenol-indofenol (DCPIP) a 600 nm ($\epsilon = 20,5 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), en el mismo espectrofotómetro que en el ítem 3.2.5.2. La mezcla de reacción contenía partículas submitocondriales 0,07 mg de proteína/ml (previamente incubadas en ausencia de dadores de electrones), cianuro de potasio 1 mM y DCPIP 74 μM , en solución de fosfatos 50 mM (pH 7,4). La reacción fue iniciada por el agregado de succinato 20 mM.

3.2.6.6. Actividad NADH-citocromo c reductasa.

La actividad NADH-citocromo c reductasa se midió observando el incremento de la absorbancia, a 30°C, producida por la reducción del citocromo c a 550-540 nm ($\epsilon = 19,6 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$), en el mismo espectrofotómetro de doble haz utilizado para medir anión superóxido. La mezcla de reacción contenía partículas submitocondriales 0,007 mg de proteína/ml (previamente incubadas en ausencia de dadores de electrones), citocromo c 15 μM , cianuro de potasio 30 μM y superóxido dismutasa 75 U/ml, en solución de fosfatos 50 mM (pH 7,4). La reacción fue iniciada por el agregado de NADH 0,25 mM.

3.2.6.7. Actividad citocromo c oxidasa.

La actividad citocromo c oxidasa se midió observando la disminución de la

absorbancia, a 30°C, producida por la oxidación del citocromo c reducido a 550-540 nm ($\epsilon = 19,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), en el mismo espectrofotómetro de doble haz utilizado para medir anión superóxido. La mezcla de reacción contenía partículas submitocondriales 0,01 mg de proteína/ml (previamente incubadas en ausencia de dadores de electrones), citocromo c reducido 6 μM y superóxido dismutasa 25 U/ml, en solución de fosfatos 50 mM (pH 7,4). El citocromo c fue previamente reducido con unos pocos cristales de ascorbato y dializado durante 46 hs. contra una solución de fosfatos de sodio y potasio 50 mM (pH 7,4), con 3 cambios de dicho medio, a 4°C. La concentración de citocromo c reducido fue determinada con ferricianuro 100 mM.

3.3. Cálculo de la fuerza iónica de las soluciones

Teniendo en cuenta que: a) el citocromo c, en condiciones fisiológicas (fuerza iónica = 100-150 mM), se encuentra en el espacio intermembrana, a una concentración de 100-700 μM (Lemasters, 1978) y sólo una décima parte del mismo permanece unida a la membrana mitocondrial interna (Cortese y col., 1998), y b) al aislar las partículas submitocondriales sólo se conservan las proteínas que están unidas a la membrana mitocondrial interna; se calculó la fuerza iónica de las soluciones amortiguadoras de pH, utilizadas para suspender a las partículas submitocondriales, como control de la presencia de citocromo c en nuestras preparaciones.

La fuerza iónica se calculó utilizando la siguiente fórmula: $I = 1/2 \sum C_i Z_i^2$, donde: I es la fuerza iónica, y C_i y Z_i son la concentración molar y la carga respectivamente, de cada uno de los electrolitos presentes en la solución.

Para calcular la fuerza iónica de las soluciones de fosfatos de sodio y de potasio 50 mM, pH 7,4, se estimó la composición iónica de las soluciones en el equilibrio (Butler y Cogley, 1998). Para ello se planteó un balance de carga y de masa de los electrolitos. Con el objeto de verificar el cálculo de I, se sustituyó el valor obtenido de I en las siguientes ecuaciones originales:

a) $a = \gamma \cdot c$; donde: a = actividad, γ = coeficiente de actividad y c = concentración.

b) Ley de Debye-Hückel: $-\log \gamma = A \cdot Z^2 \cdot I^{1/2}$ (para $I < 0,1$ M)

$$-\log \gamma = A \cdot Z^2 [I^{1/2} / (1 + I^{1/2}) - 0,07 I] \text{ (para } I > 0,1 \text{ M)}$$

donde: Z=carga de los iones, $A=1,825 \cdot 10^6 (E \cdot T)^{-3/2}$, T= temperatura (K),

E= constante dieléctrica del solvente.

c) Constante de disociación ácida termodinámica.

d) Ecuación de Henderson-Hasselbalch.

3.4. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se midió por el método de Biuret modificado por Gornall (Gornall y col., 1949) en presencia de desoxicolato de sodio 0,1 %. Se utilizó como standard una solución de albúmina bovina.

Para cada protocolo experimental, se ensayó la concentración óptima de proteínas a ser utilizada para estudiar el efecto de la quinona.

3.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se efectuó comparando los diferentes "tratamientos" con un ANOVA de parcela dividida (Steel, Torrie, 1985), con un nivel de significación del 5 %. Para la comprobación de la igualdad de matrices de varianzas y covarianzas se utilizó el programa BARGEN; el ajuste al modelo se comprobó utilizando el estadístico de máxima verosimilitud generalizado de Wilks (Morrison, 1986). En los casos de mal ajuste al modelo de ANOVA de parcela dividida, los tratamientos se compararon con un Diseño de Bloques al Azar y para la comprobación de no aditividad se utilizó el programa NONADD del paquete BIOM (Sokal, Rohlf, 1981). Se efectuaron pruebas de efectos simples en los casos en que correspondía y contrastes por el método de Dunnett (SYSTAT, INSTAT). Se considera $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. El efecto de las drogas fue calculado tomando como valor control el valor hallado en la muestra que contiene DMFA en iguales condiciones experimentales. Las muestras control recibieron el mismo volumen de solvente (DMFA), cuya concentración final no excedió el 1% v/v. En todos los experimentos se estudió el efecto de la DMFA, no observándose efecto significativo de la misma en ningún caso.

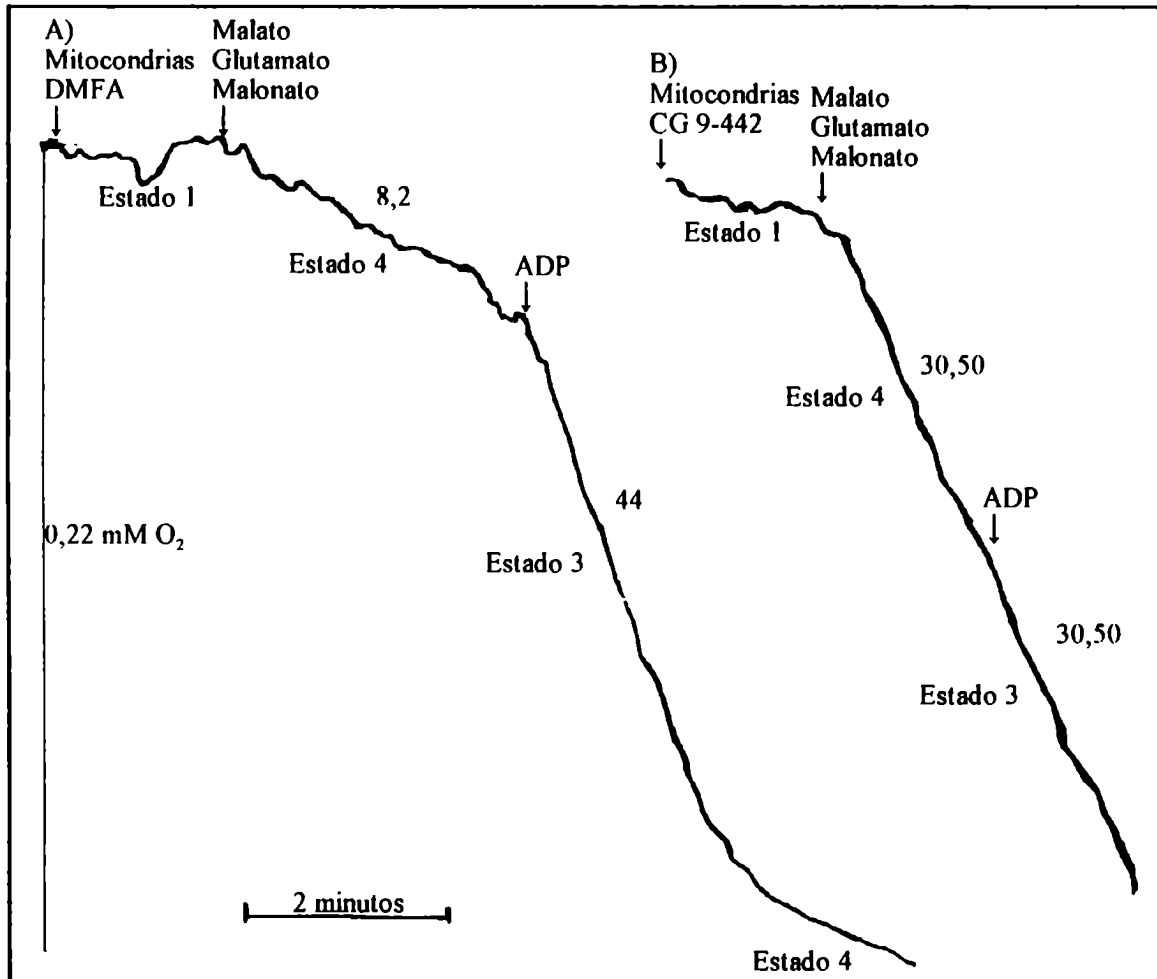
Resultados

4.1. EN MITOCONDRIAS DE HÍGADO DE RATA

4.1.1. Efecto de la adición de las o-naftoquinonas CG 9-442 y CG 8-935, y de las p-naftoquinonas menadiona y atovaquone, sobre el consumo de oxígeno mitocondrial

La tabla 4.1 y la figura 4.2. muestran el efecto de la adición de CG 9-442 sobre la velocidad de respiración mitocondrial en presencia de malato-glutamato o succinato como sustratos. Se observa: a) con malato-glutamato como sustratos y a₁) mitocondrias en estado metabólico "3" (mitocondrias activas o respiración descontrolada) (Chance B. y col., 1963), la CG 9-442 inhibió significativamente el consumo de oxígeno a las concentraciones de 10 y 25 μM ; a₂) en estado metabólico "4" (estado controlado) esta quinona aumentó la respiración significativamente a las concentraciones 5, 10 y 25 μM de la misma; a₃) como resultado de lo obtenido previamente en a₁ y a₂, el ICR (índice de control respiratorio) disminuyó significativamente a concentraciones iguales o superiores a 2,5 μM de CG 9-442 (la figura 4.1 muestra un experimento típico); b) con succinato como sustrato mitocondrial, b₁) en estado "3" se observó disminución de la respiración sólo a la concentración más elevada de la quinona, 25 μM ; b₂) la adición de CG 9-442 aumentó significativamente la velocidad de respiración en estado "4" a concentraciones iguales o superiores a 5 μM de esta quinona, b₃) observándose como resultado de b₁) y b₂) una disminución significativa del ICR a concentraciones iguales o superiores a 2,5 μM .

Figura 4.1 Trazados correspondientes a un experimento típico de medida de la velocidad de respiración



La respiración se midió polarográficamente con un electrodo de platino. La mezcla de reacción (1,8 ml) contenía mitocondrias (1,0-2,0 mg de proteína/ml); sacarosa 0,24 M; KCl 34 mM; MgCl₂ 5 mM; EDTA 0,9 mM; Tris-HCl 9 mM, solución Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 6 mM (pH 7,4) y la CG 9-442 disuelta en DMFA. Las concentraciones de sustrato utilizadas fueron las siguientes: L-malato 5 mM; L-glutamato 5 mM (más malonato 2,5 mM) o succinato 10 mM (más rotenona 3 μM). Las mitocondrias se añadieron al medio de reacción cuando la concentración de oxígeno era máxima (0,22 mM). En esas condiciones la actividad respiratoria es pequeña (estado metabólico 1). La adición de sustrato incrementa la respiración (estado 4); la adición de ADP (0,5 mM) aumenta aún más la respiración (estado 3) hasta que todo el ADP se convierte en ATP y la respiración retorna al estado 4. Los números sobre el trazado indican las velocidades de consumo de oxígeno (pendientes). A) Experimento control; B) Efecto de la adición de CG 9-442, 25 μM, sobre la respiración.

Tabla 4.1 Efecto de la CG 9-442 sobre el consumo de oxígeno mitocondrial

CG 9-442 (μ M)	Velocidad de oxidación (nanomoles de átomos de O/min x mg. prot.)		
	Estado "3" (A)	Estado "4" (B)	I.C.R. (A/B)
Sustrato: L-malato 5 mM + L-glutamato 5mM			
0	65,97 \pm 1,87	13,53 \pm 1,13	4,96 \pm 0,44
1	72,87 \pm 2,34	15,85 \pm 0,70	4,61 \pm 0,25 (7,06)
2,5	68,00 \pm 2,20	19,37 \pm 0,74	3,53 \pm 0,18 ** (28,83)
5	60,74 \pm 1,61	26,76 \pm 1,63 **	2,30 \pm 0,15 ** (53,63)
10	52,53 \pm 1,55**	35,21 \pm 2,15**	1,50 \pm 0,10 ** (69,76)
25	50,13 \pm 2,44**	50,50 \pm 2,77**	0,99 \pm 0,07 ** (80,04)
Sustrato: L-succinato 10 mM			
0	102,79 \pm 6,05	26,62 \pm 1,71	3,87 \pm 0,34
1	104,07 \pm 2,81	28,30 \pm 1,83	3,66 \pm 0,26 (5,43)
2,5	98,58 \pm 6,77	31,36 \pm 2,56	3,16 \pm 0,34 * (18,35)
5	95,07 \pm 6,95	39,45 \pm 2,71**	2,42 \pm 0,24 ** (37,47)
10	89,00 \pm 5,36	44,52 \pm 3,11**	2,00 \pm 0,18 ** (48,32)
25	76,82 \pm 5,79*	44,68 \pm 0,15**	1,71 \pm 0,13 ** (55,81)

Los resultados se expresan como promedio \pm error standard de la media de cuatro determinaciones independientes realizadas por duplicado. Diferencia significativa respecto al control: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Los números entre paréntesis corresponden a porcentajes de inhibición con respecto al control.

La tabla 4.2 y la figura 4.3 muestran el efecto de la adición de CG 8-935 sobre la velocidad de respiración mitocondrial en presencia ya sea de malato-glutamato, o succinato como sustratos mitocondriales. Los resultados muestran que: a) en presencia de malato-glutamato como sustratos y a₁) las mitocondrias en estado "3" la adición de CG 8-935 no modificó significativamente el consumo de oxígeno a ninguna de las concentraciones de quinona utilizadas; a₂) con mitocondrias en

estado "4", la quinona estudiada aumentó significativamente la respiración a las concentraciones de quinona de 5, 10 y 25 μM . A esta última concentración de quinona, el incremento fue de casi 5 veces respecto al control con solvente (DMFA); a₃) como resultado de los datos descritos en a y b, la adición de CG 8-935 disminuyó significativamente el ICR a las concentraciones de quinona 2,5 , 5, 10 y 25 μM (a esta última concentración el ICR disminuyó 5 veces respecto al control); b) en presencia de succinato como sustrato respiratorio, b₁) se observó una disminución significativa en el consumo de oxígeno en estado "3", sólo a la concentración 25 μM de CG 8-935; b₂) en estado metabólico "4", la adición de CG 8-935 estimuló significativamente el consumo de oxígeno a las concentraciones de quinona 10 y 25 μM y b₃) como resultado de los datos anteriores el ICR disminuyó significativamente a las concentraciones de quinona 2,5 , 5, 10 y 25 μM .

La menadiona, p-naftoquinona ampliamente estudiada y el atovaquone, p-naftoquinona de uso clínico, fueron estudiadas en este caso, con fines comparativos. La tabla 4.3 y la figura 4.4 muestran el efecto de la menadiona sobre la velocidad de respiración en mitocondrias acopladas, en presencia de malato-glutamato o succinato como sustratos. Se puede observar que: a) con malato-glutamato como sustratos y a₁) mitocondrias en estado metabólico "3", la menadiona no produjo modificación significativa del consumo de oxígeno, a ninguna de las concentraciones de droga utilizadas; a₂) con mitocondrias en estado metabólico "4", la menadiona incrementó la respiración significativamente a concentraciones de menadiona iguales o mayores a 5 μM); a₃) como resultado de lo obtenido en a₁ y b₂, el índice de control

respiratorio disminuyó significativamente a las concentraciones de menadiona 5, 10 y 25 μM ; b) con succinato como sustrato y b₁) mitocondrias en estado "3" la menadiona no afectó la velocidad de respiración; b₂) con mitocondrias en estado "4", la menadiona 25 μM estimuló significativamente la oxidación del succinato; b₃) el ICR disminuyó significativamente a las concentraciones 10 y 25 μM de esta quinona.

Tabla 4.2 Efecto de la CG 8-935 sobre el consumo de oxígeno mitocondrial

CG 8-935 (μM)	Velocidad de oxidación (nanomoles de átomos de O/min.x mg. prot.)		
	Estado "3" (A)	Estado "4" (B)	I.C.R. (A/B)
Sustrato: L-malato 5 mM + L-glutamato 5mM			
0	57,58 \pm 6,86	9,90 \pm 0,80	5,87 \pm 0,84
1	62,67 \pm 5,84	13,21 \pm 1,52	4,86 \pm 0,72 (17,21)
2,5	65,60 \pm 8,08	17,62 \pm 2,21	3,78 \pm 0,66** (35,60)
5	63,32 \pm 5,28	29,76 \pm 3,85**	2,19 \pm 0,34** (62,69)
10	65,27 \pm 4,22	43,07 \pm 3,81**	1,56 \pm 0,17** (73,42)
25	58,85 \pm 4,01	48,41 \pm 3,04**	1,22 \pm 0,11** (79,22)
Sustrato: L-succinato 10 mM			
0	80,84 \pm 4,75	23,54 \pm 2,23	3,77 \pm 0,42
1	76,45 \pm 6,01	25,45 \pm 1,82	3,18 \pm 0,34 (15,65)
2,5	75,32 \pm 7,20	28,09 \pm 1,79	2,89 \pm 0,33* (23,34)
5	74,98 \pm 6,44	33,35 \pm 3,86	2,48 \pm 0,36** (34,22)
10	69,65 \pm 6,85	36,35 \pm 4,75*	2,19 \pm 0,36** (41,91)
25	47,51 \pm 9,13*	35,78 \pm 3,12*	1,84 \pm 0,39** (51,19)

Los resultados se expresan como promedio \pm error standard de la media de cuatro determinaciones independientes realizadas por duplicado. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Los números entre paréntesis corresponden a porcentajes de inhibición con respecto al control.

Tabla 4.3 Efecto de la menadiona sobre el consumo de oxígeno mitocondrial

menadiona (μM)	Velocidad de oxidación (nanomoles de átomos de O/min.x mg.prot.)		
	Estado "3" (A)	Estado "4" (B)	I.C.R. (A/B)
Sustrato: L-malato 5 mM + L-glutamato 5mM			
0	45,26 \pm 2,67	7,95 \pm 0,30	5,72 \pm 0,40
1	46,47 \pm 3,01	8,86 \pm 0,50	5,36 \pm 0,46 (6,29)
2,5	44,66 \pm 2,61	8,97 \pm 0,75	5,13 \pm 0,52(10,31)
5	50,74 \pm 3,30	13,65 \pm 1,21**	3,85 \pm 0,42**(32,69)
10	52,49 \pm 2,99	16,18 \pm 0,78**	3,28 \pm 0,24**(42,66)
25	51,34 \pm 2,65	23,40 \pm 1,93**	2,22 \pm 0,22**(61,19)
Sustrato: L-succinato 10 mM			
0	75,01 \pm 4,37	17,71 \pm 1,73	4,35 \pm 0,49
1	74,89 \pm 4,46	18,30 \pm 1,12	4,13 \pm 0,35 (5,06)
2,5	74,54 \pm 5,86	20,28 \pm 2,21	3,74 \pm 0,50 (14,02)
5	77,97 \pm 3,95	22,04 \pm 1,33	3,58 \pm 0,28 (17,70)
10	79,18 \pm 3,86	24,30 \pm 2,31	3,37 \pm 0,36*(22,53)
25	76,81 \pm 3,43	26,50 \pm 1,16**	2,90 \pm 0,81**(33,33)

Los resultados se expresan como promedio \pm error standard de la media de cuatro determinaciones independientes realizadas por duplicado. Diferencia significativa respecto al control: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Los números entre paréntesis corresponden a porcentajes de inhibición con respecto al control.

La tabla 4.4 y la figura 4.5 muestran el efecto de la adición de atovaquone sobre la velocidad de respiración mitocondrial en presencia de ambos sustratos mitocondriales: malato-glutamato o succinato. Los resultados obtenidos muestran que: a) en presencia de malato-glutamato y a₁) las mitocondrias en estado metabólico "3", el agregado de atovaquone disminuyó significativamente el consumo de oxígeno a las concentraciones 0,5 y 1 μM ; a₂) con mitocondrias en estado "4", esta quinona produjo un leve incremento de la respiración sólo a la concentración 1 μM de la misma; a₃) como resultado de los datos de a₁ y a₂ la adición de atovaquone

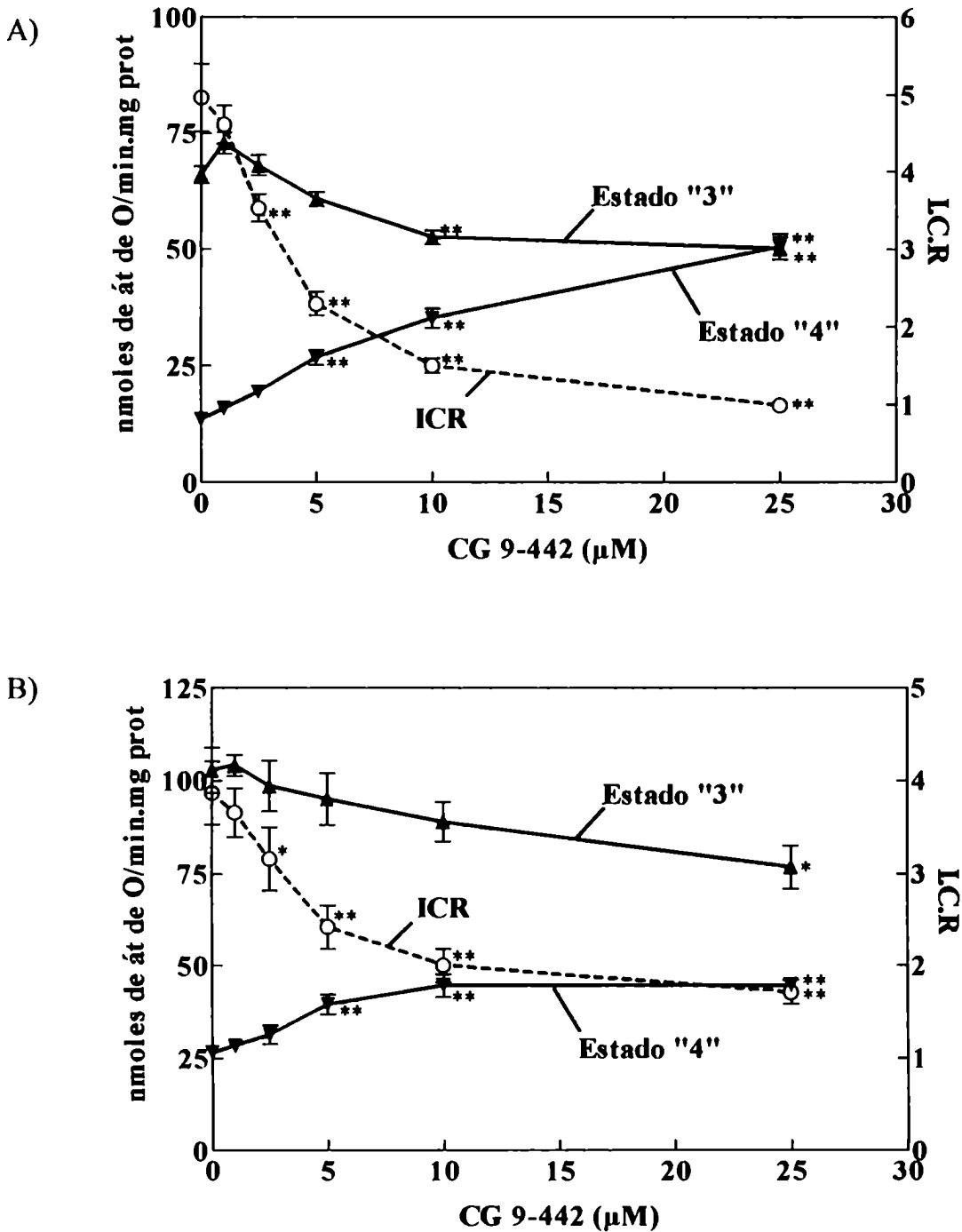
disminuyó significativamente el índice de control respiratorio a las concentraciones de quinona 0,25; 0,5 y 1 μM ; b) en presencia de succinato como sustrato respiratorio, b₁) la adición de esta quinona, disminuyó significativamente el consumo de oxígeno en estado "3", a las concentraciones 0,25; 0,5 y 1 μM , a esta última concentración la disminución fue del 90 % respecto al control; b₂) en estado "4", la adición de esta quinona disminuyó significativamente el consumo de oxígeno sólo a la concentración 1 μM ; b₃) como resultado de lo descrito en b₁ y b₂, el índice de control respiratorio disminuyó significativamente a las concentraciones de atovaquone 0,1; 0,5; 0,25 y 1 μM .

Tabla 4.4 Efecto del atovaquone sobre el consumo de oxígeno mitocondrial

atovaquone (μM)	Velocidad de oxidación (nanomoles de átomos de O/min x mg. prot.)		
	Estado "3" (A)	Estado "4" (B)	I.C.R. (A/B)
Sustrato: L-malato 5 mM + L-glutamato 5mM			
0	47,71 \pm 1,87	8,69 \pm 0,93	5,62 \pm 0,74
0,1	47,59 \pm 2,22	9,99 \pm 0,78	5,15 \pm 0,54(8,36)
0,25	39,00 \pm 1,38	9,89 \pm 1,13	3,97 \pm 0,17*(29,36)
0,5	34,58 \pm 5,62*	11,95 \pm 0,40	2,87 \pm 0,55**(48,93)
1	18,47 \pm 7,20**	13,38 \pm 2,26*	1,28 \pm 0,63**(77,22)
Sustrato: L-succinato 10 mM			
0	76,65 \pm 2,41	19,96 \pm 1,77	3,90 \pm 0,42
0,1	70,29 \pm 3,63	20,67 \pm 0,13	3,39 \pm 1,58(13,08)
0,25	51,58 \pm 1,42**	19,08 \pm 0,79	2,77 \pm 0,16**(28,97)
0,5	33,98 \pm 0,64**	16,16 \pm 2,13	2,20 \pm 0,34**(43,59)
1	8,26 \pm 2,08**	8,78 \pm 2,51**	0,97 \pm 0,43**(75,13)

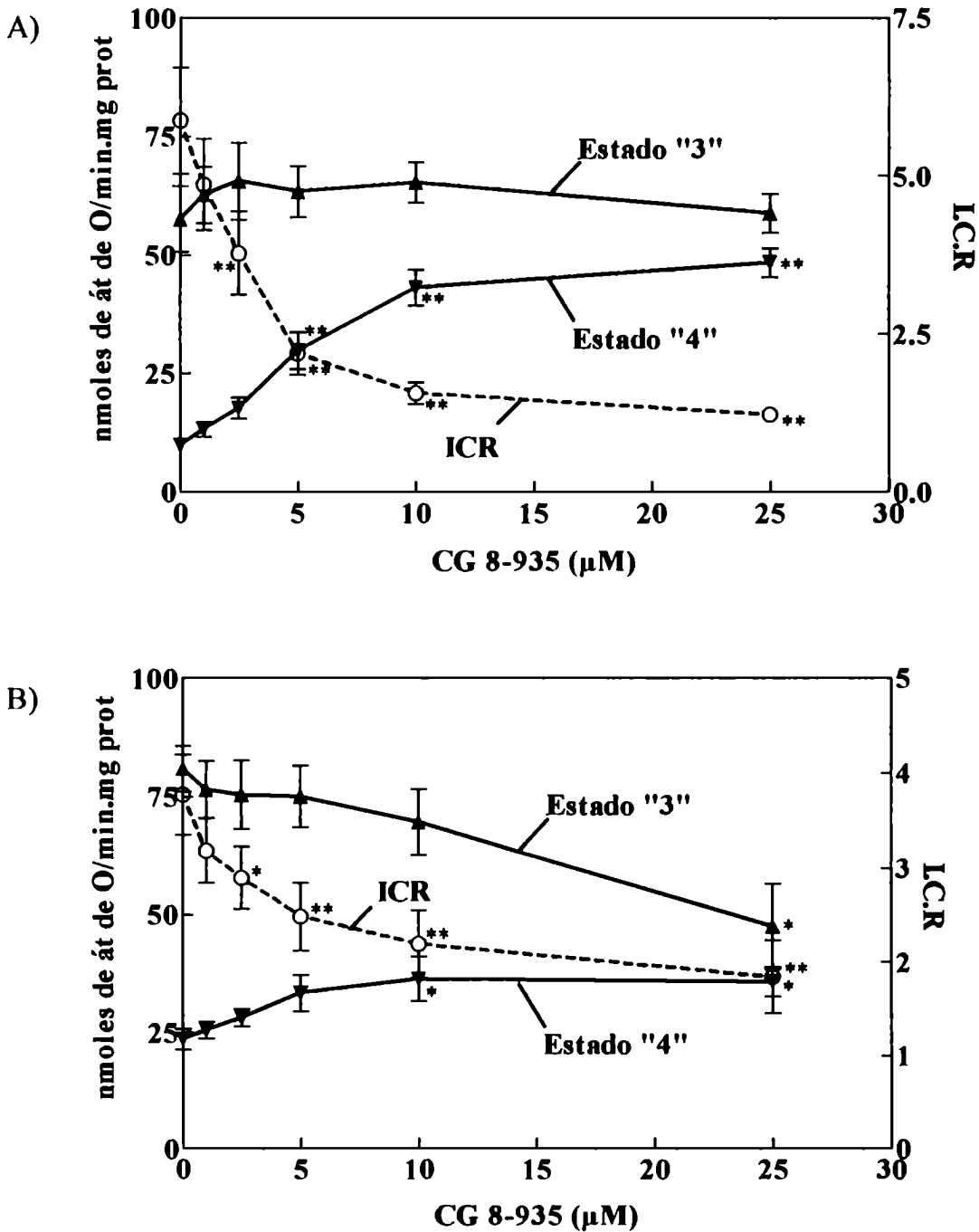
Los resultados se expresan como promedio \pm error standard de la media de tres determinaciones independientes realizadas por duplicado. *, P<0.05 ; **,P<0.01. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Los números entre paréntesis corresponden a porcentajes de inhibición con respecto al control.

Figura 4.2 Efecto de la CG 9-442 sobre el consumo de oxígeno mitocondrial



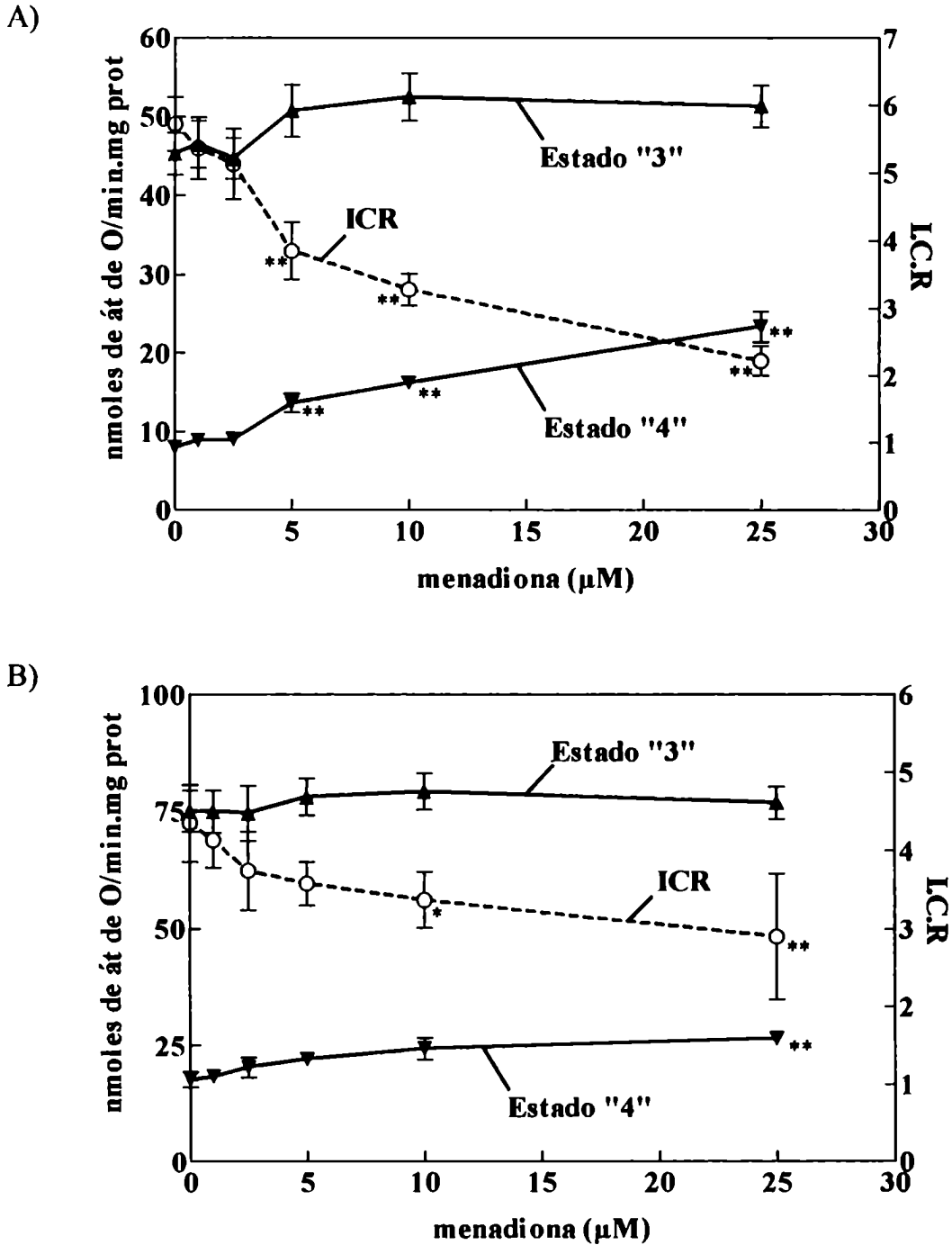
Los puntos son promedios \pm error standard de la media de cuatro determinaciones independientes realizadas por duplicado. Diferencia significativa respecto al control: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. Las condiciones experimentales se describen en materiales y métodos. Sustrato: A) L-malato 5 mM + L-glutamato 5 mM, B) L-succinato 10 mM.

Figura 4.3 Efecto de la CG 8-935 sobre el consumo de oxígeno mitocondrial



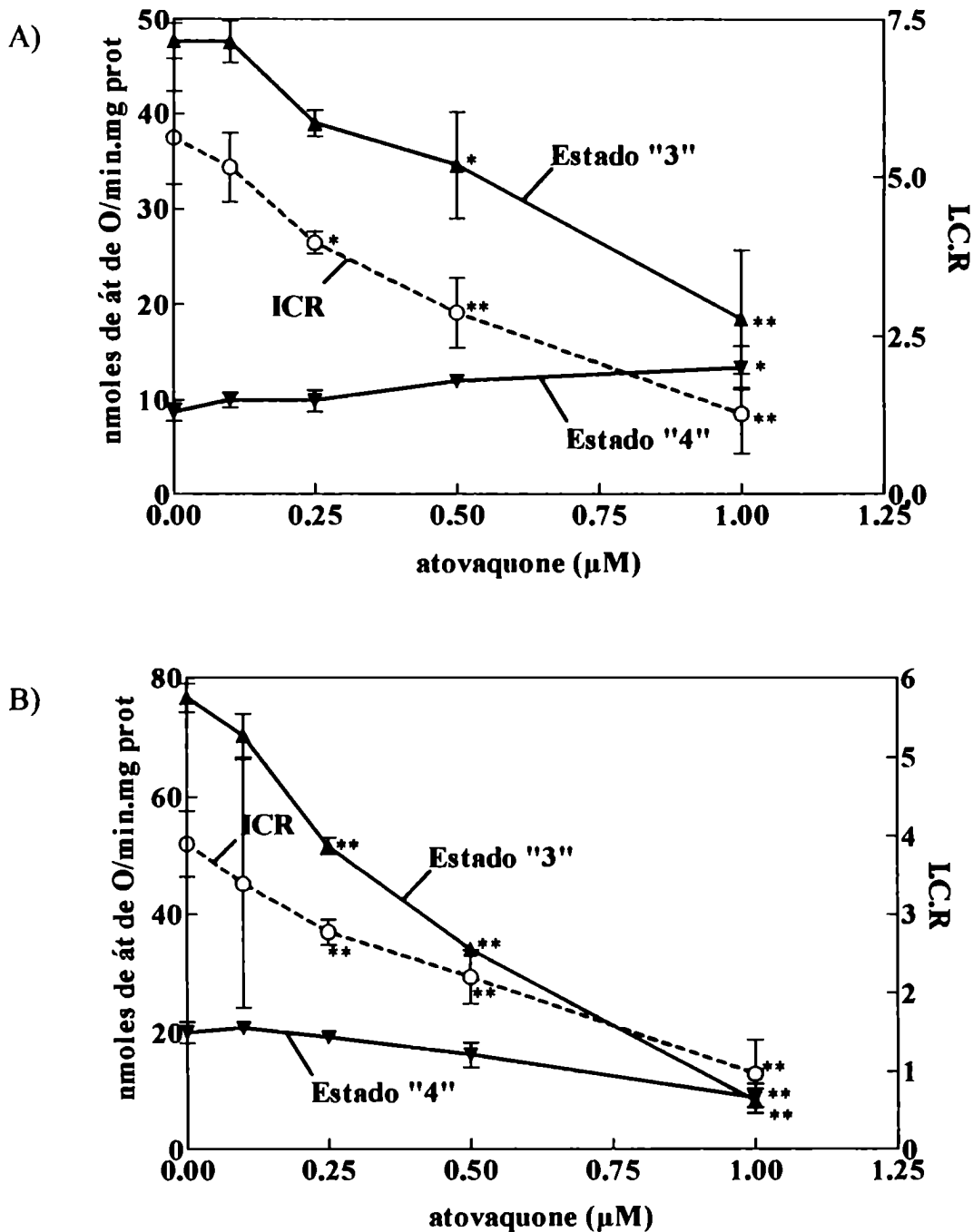
Los puntos son promedios \pm error standard de la media de cuatro determinaciones independientes realizadas por duplicado. Diferencia significativa respecto al control: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. Las condiciones experimentales se describen en materiales y métodos. Sustrato: A) L-malato 5 mM + L-glutamato 5 mM, B) L-succinato 10 mM.

Figura 4.4 Efecto de la menadiona sobre el consumo de oxígeno mitocondrial



Los puntos son promedios \pm error standard de la media de cuatro determinaciones independientes realizadas por duplicado. Diferencia significativa respecto al control: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. Las condiciones experimentales se describen en materiales y métodos. Sustrato: A) L-malato 5 mM + L-glutamato 5 mM, B) L-succinato 10 mM.

Figura 4.5 Efecto del atovaquone sobre el consumo de oxígeno mitocondrial



Los puntos son promedios \pm error standard de la media de tres determinaciones independientes realizadas por duplicado. Diferencia significativa respecto al control: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. Las condiciones experimentales se describen en materiales y métodos. Sustrato: A) L-malato 5 mM + L-glutamato 5 mM, B) L-succinato 10 mM.

4.1.2. Efecto de la adición de las o-naftoquinonas CG 9-442 y CG 8-935, y de las p-naftoquinonas menadiona y atovaquone, sobre la peroxidación lipídica mitocondrial

La peroxidación lipídica tiene una gran participación en el daño hepático producido por muchos agentes tóxicos (Bindoli A., 1988; Fehér J. y col., 1987). Es por este motivo que se investigó el efecto de diferentes orto y para-naftoquinonas sobre la producción de MDA en mitocondrias aisladas de hígado de rata.

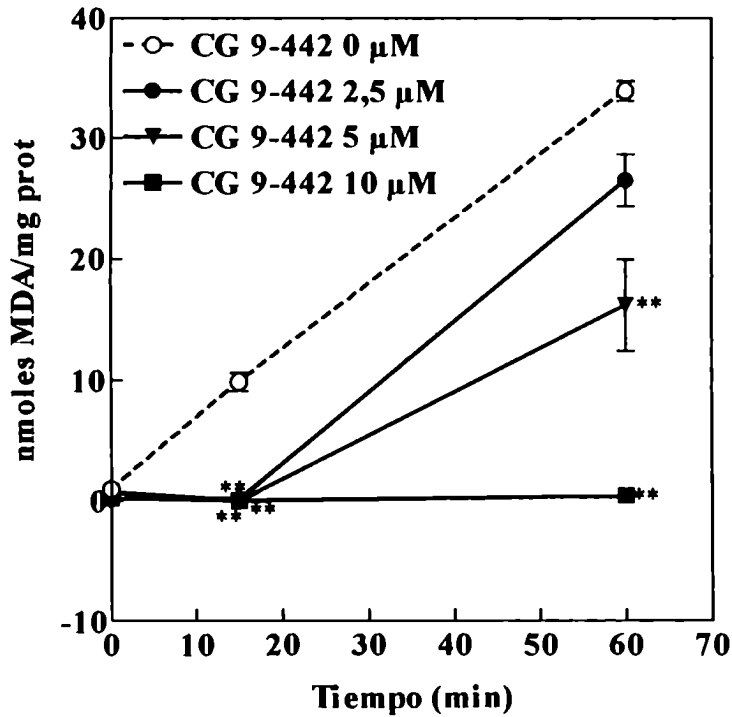
Los resultados presentados en la figura 4.6 muestran que: a) en mitocondrias control (DMFA, quinona: 0 μ M), la producción de MDA aumentó en función del tiempo de incubación; b) CG 9-442 inhibió la formación de MDA. A los 15 minutos de iniciada la incubación, se observó un 100 % de inhibición a todas las concentraciones ensayadas, en cambio a los 60 minutos, se observó un efecto inhibitorio en función de la concentración de quinona agregada al medio de incubación; el máximo de inhibición (99 %) fue para la máxima concentración de droga utilizada (10 μ M). La diferencia entre los efectos observados a los 15 y 60 minutos de incubación, probablemente se deba a la mayor cantidad de lipoperóxidos producidos a los 60 minutos.

Cuando se estudió el efecto de la adición de CG 8-935, a las mismas concentraciones que las ensayadas para la CG 9-442, sobre la peroxidación lipídica

mitocondrial hepática, se observó un efecto inhibitorio total a los 15 minutos para todas las concentraciones estudiadas, y a los 60 minutos un 54 % de inhibición para CG 8-935 5 μ M, (Fig. 4.7), análogamente a los resultados encontrados para la CG 9-442.

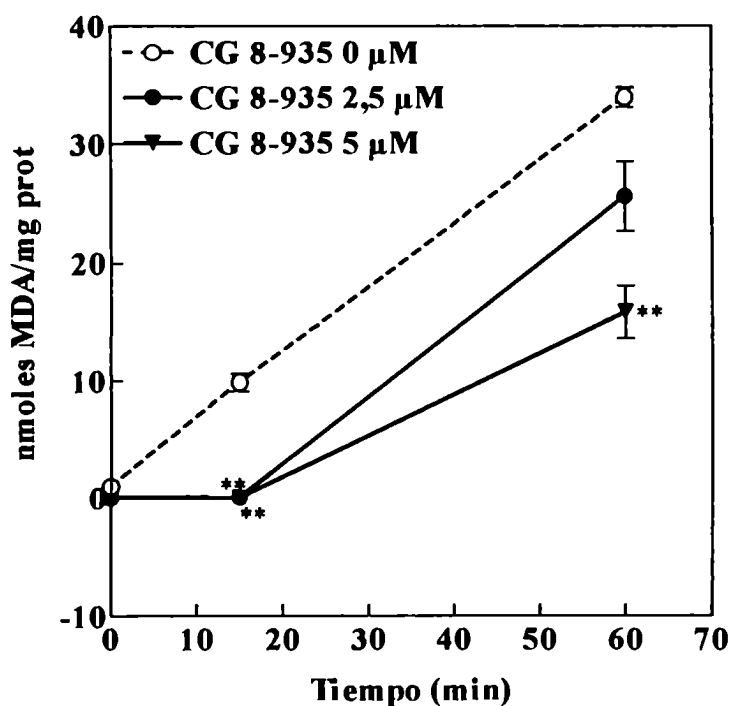
La menadiona y el atovaquone, p-naftoquinonas, fueron estudiadas, con fines comparativos. La figura 4.8 muestra que la menadiona inhibió la peroxidación lipídica mitocondrial hepática a concentraciones 25 veces inferiores (aproximadamente) a las utilizadas en presencia de CG 9-442 o CG 8-935, para producir el mismo efecto. En este caso, el efecto inhibitorio también se incrementó en función de la concentración de droga agregada al medio de incubación mitocondrial, tanto a los 15 como a los 60 minutos. A este último tiempo se observó 100 % de inhibición a la concentración 250 nM (datos no presentados). Por el contrario, la adición de atovaquone al medio de incubación (figura 4.9) no produjo un efecto significativo sobre la peroxidación lipídica mitocondrial hepática, respecto al control al mismo tiempo de incubación, a ninguno de los tiempos ensayados. Es necesario destacar, que en este caso el atovaquone fue ensayado a una concentración única (62 μ M) y mucho mayor a la que es capaz de inhibir el crecimiento de *Chrithidia fasciculata* (Stoppani y col., datos no presentados).

Figura 4.6 Efecto de la adición de CG 9-442 sobre la peroxidación lipídica mitocondrial



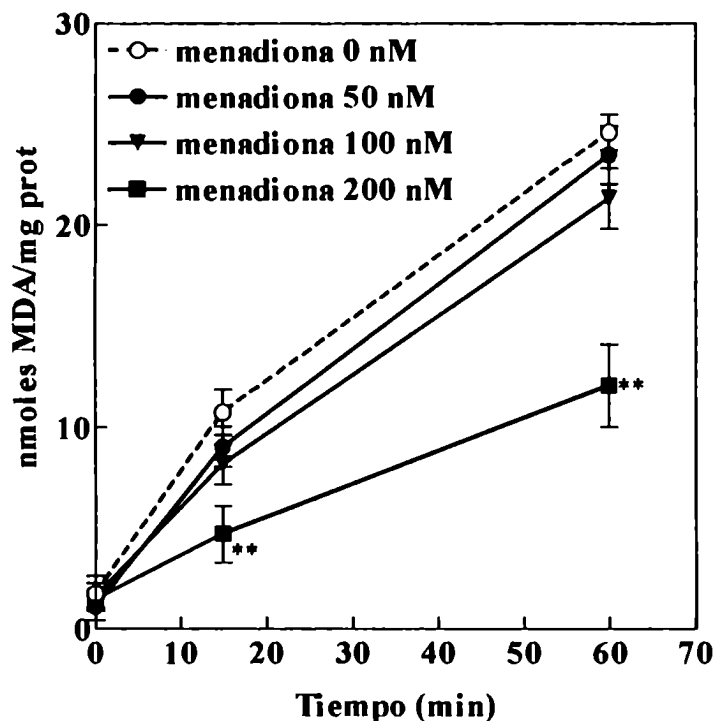
Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Los puntos son promedios de 7 determinaciones independientes realizadas por duplicado. **, $p < 0.01$.

Figura 4.7 Efecto de la adición de CG 8-935 sobre la peroxidación lipídica mitocondrial



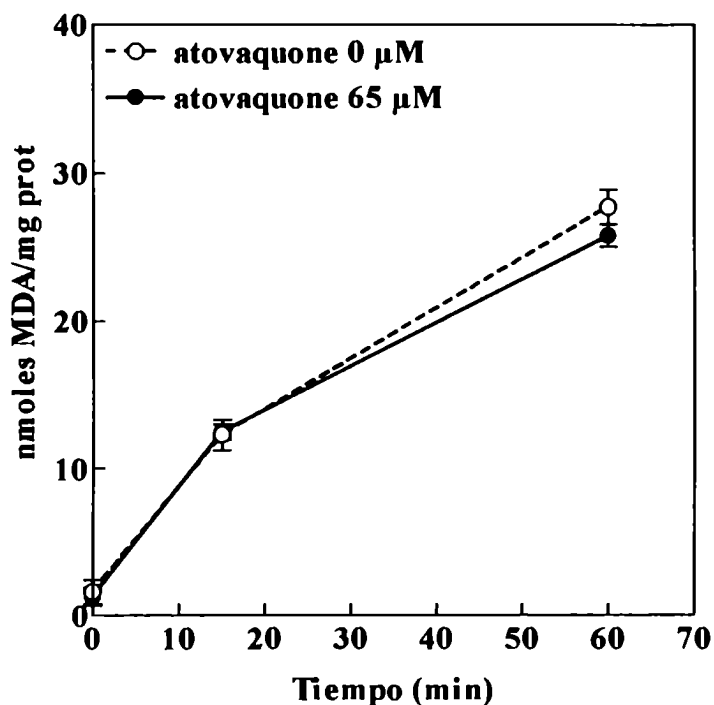
Los puntos son el promedio de 7 determinaciones independientes realizadas por duplicado. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. **, $p < 0.01$.

Figura 4.8 Efecto de la adición de menadiona sobre la peroxidación lipídica mitocondrial



Los puntos son el promedio de 4 determinaciones independientes realizadas por duplicado. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. **, $p < 0.01$.

Figura 4.9 Efecto de la adición de atovaquone sobre la peroxidación lipídica mitocondrial



Los puntos son el promedio de 3 determinaciones independientes realizadas por duplicado. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

4.1.3. Efecto de la adición de la o-naftoquinona CG 9-442 sobre el aumento de volumen mitocondrial (swelling), causado por la entrada de Ca²⁺

Tabla 4.5. Efecto de la CG 9-442 sobre el swelling mitocondrial hepático

CG 9-442 (μ M)	VS/mg prot	SM/mg prot	VC/mgprot	CM/mg prot
Sustratos endógenos				
0	0,110 \pm 0,014	0,123 \pm 0,014	0,018 \pm 0,003	0,024 \pm 0,004
2,5	0,073 \pm 0,006 ^b (-33,64)	0,097 \pm 0,008 (-21,14)	0,024 \pm 0,002	0,013 \pm 0,002 ^b (-45,83)
5	0,046 \pm 0,005 ^b (-58,18)	0,069 \pm 0,007 ^b (-43,90)	0,026 \pm 0,002	0,009 \pm 0,002 ^b (-62,50)
10	0,037 \pm 0,005 ^b (-66,36)	0,061 \pm 0,007 ^b (-50,41)	0,026 \pm 0,001	0,008 \pm 0,001 ^b (-66,67)
25	0,027 \pm 0,005 ^b (-75,45)	0,045 \pm 0,008 ^b (-63,41)	0,027 \pm 0,008	0,007 \pm 0,002 ^b (-70,83)
Sustrato: L-malato 5 mM + L glutamato 5 mM				
0	1,058 \pm 0,152	0,410 \pm 0,040	0,021 \pm 0,002	0,023 \pm 0,003
2,5	0,591 \pm 0,061 ^b (-44,14)	0,364 \pm 0,036 ^b (-11,22)	0,027 \pm 0,003 (+28,27)	0,020 \pm 0,003 (-13,04)
5	0,477 \pm 0,065 ^b (-54,91)	0,342 \pm 0,031 ^b (-16,58)	0,027 \pm 0,006 (+28,57)	0,018 \pm 0,001 (-21,74)
10	0,263 \pm 0,030 ^b (-75,14)	0,279 \pm 0,032 ^b (-31,95)	0,022 \pm 0,004 (+4,76)	0,016 \pm 0,002 ^a (-30,43)
25	0,090 \pm 0,005 ^b (-91,49)	0,157 \pm 0,024 ^b (-61,71)	0,068 \pm 0,004 ^b (+223,81)	0,011 \pm 0,001 ^b (-52,17)

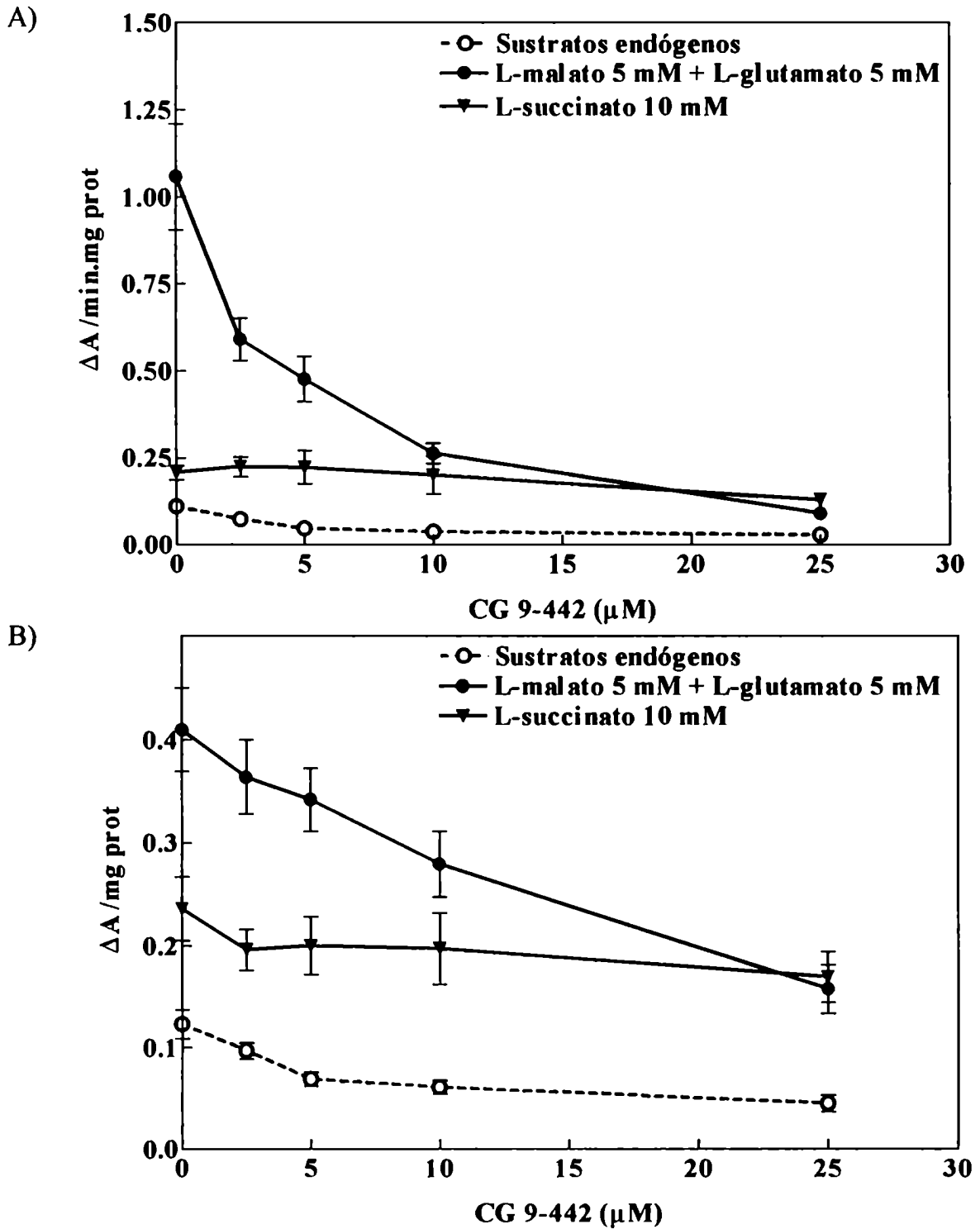
CG 9-442 (μM)	VS/mg prot	SM/mg prot	VC/mgprot	CM/mg prot
Sustrato: L-succinato 10 mM				
00	0,207 \pm 0,021	0,236 \pm 0,031	0,010 \pm 0,001	0,015 \pm 0,002
2,5	0,224 \pm 0,028	0,196 \pm 0,020 ^a (-16,95)	0,022 \pm 0,002 ^b (+120)	0,026 \pm 0,001 ^b (+73,33)
5	0,222 \pm 0,048	0,200 \pm 0,028 ^a (-15,25)	0,022 \pm 0,002 ^b (+120)	0,029 \pm 0,001 ^b (+93,30)
10	0,200 \pm 0,054	0,197 \pm 0,035 ^a (-16,52)	0,022 \pm 0,002 ^b (+120)	0,026 \pm 0,001 ^b (+73,33)
25	0,129 \pm 0,015	0,169 \pm 0,025 ^b (-28,39)	0,020 \pm 0,001 ^b (+100)	0,026 \pm 0,002 ^b (+73,33)

Los valores corresponden al promedio \pm error standard de la media de cuatro determinaciones independientes. Los números entre paréntesis corresponden a porcentajes de inhibición (-) o estímulo (+). VS, velocidad inicial de swelling ($\Delta A/\text{min} \times \text{mg prot}$); SM, swelling máximo ($\Delta A/\text{mg prot}$); VC, velocidad de contracción ($\Delta A/\text{min} \times \text{mg prot}$); CM, contracción máxima ($\Delta A/\text{mg prot}$). a: $p < 0.05$, b: $p < 0.01$. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

En presencia de un anión permeante, el Ca^{2+} es acumulado por las mitocondrias en un proceso dependiente de energía, que determina el aumento del volumen mitocondrial y la salida de H^+ (Lehninger y col., 1967; Pietrobon y col., 1990). En la tabla 4.5 y figura 4.10 se puede observar que la CG 9-442 inhibió el aumento del volumen mitocondrial en presencia de Ca^{2+} con todos los sustratos ensayados (sustratos endógenos, malato-glutamato y succinato). Se observó una correlación significativa entre los porcentajes de inhibición del swelling y del consumo de oxígeno en presencia de malato-glutamato, pero no con los otros sustratos (fig 4.11). El agregado de EGTA bloqueó el aumento del volumen mitocondrial en todos los casos, confirmando el efecto del Ca^{2+} en dicho proceso. La velocidad de contracción mitocondrial fue estimulada con todos los sustratos, mientras que la contracción

máxima aumentó con succinato, y disminuyó con los otros sustratos.

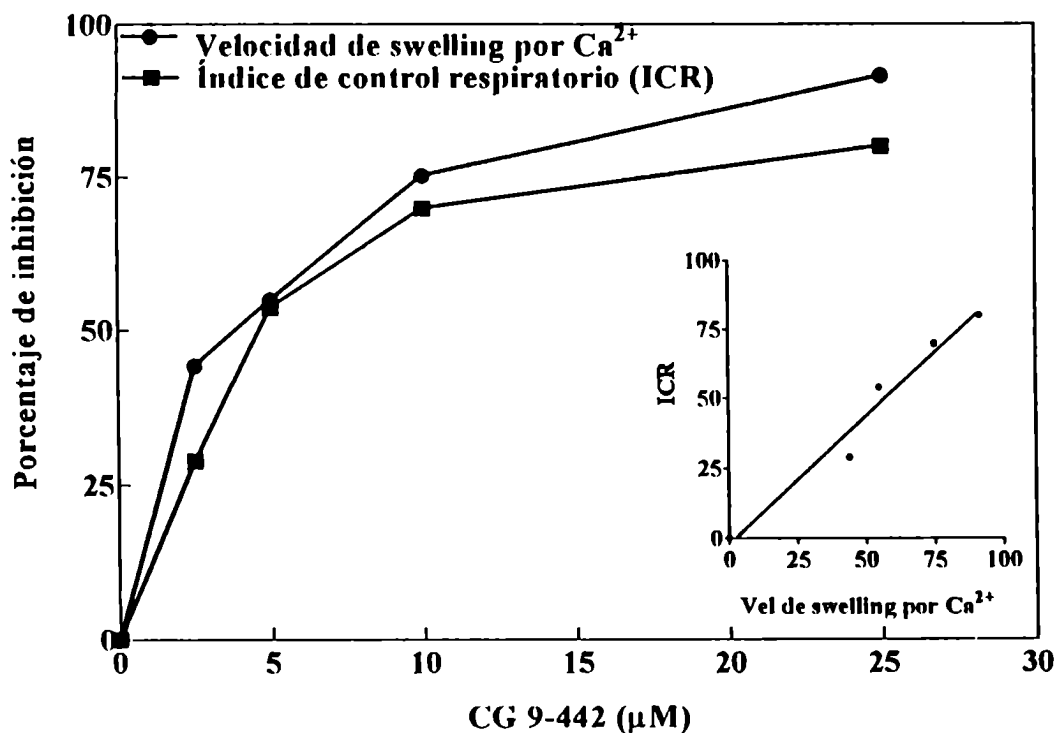
Figura 4.10 Efecto de la CG 9-442 sobre el swelling mitocondrial



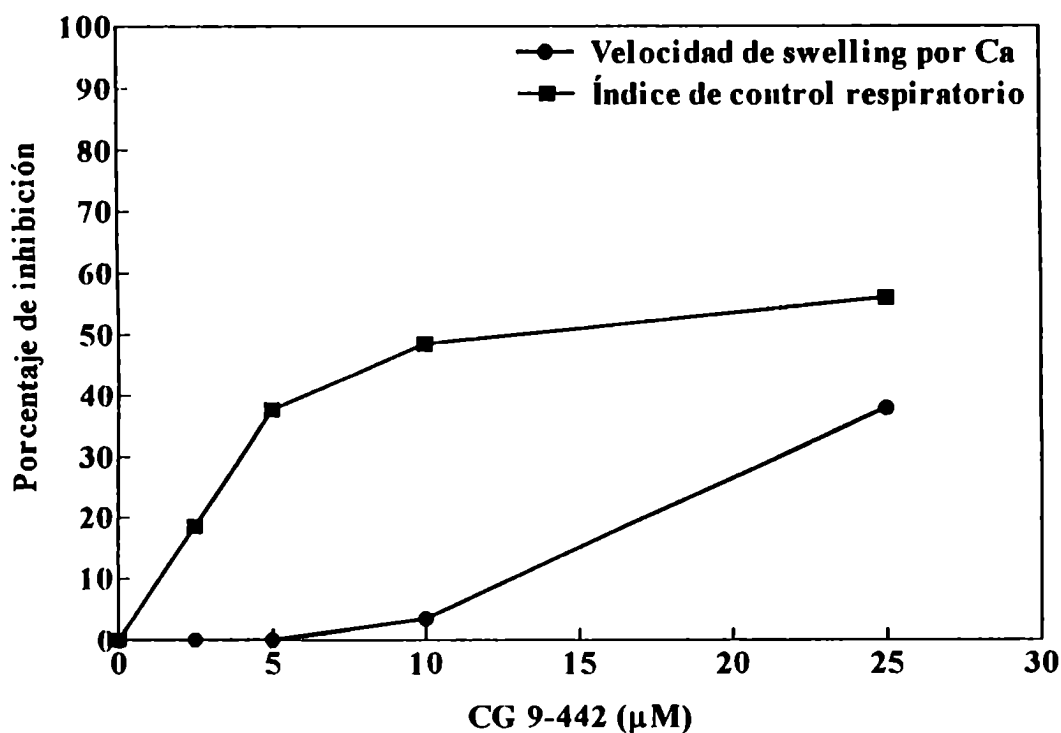
Los valores corresponden al promedio \pm error standard de la media de cuatro determinaciones independientes. A) velocidad inicial de swelling. B) swelling máximo ($\Delta A/mg$ prot).

Figura 4.11 Correlación entre los porcentajes de inhibición del swelling por Ca^{2+} y del índice de control respiratorio, en mitocondrias hepáticas en presencia de CG 9-442

A) Sustrato: L-malato 5 mM + L-glutamato 5 mM ($r = 0,9836$)



B) Sustrato: L-succinato 10 mM.



4.1.4. Efecto de la adición de CG 9-442 sobre el potencial de membrana mitocondrial

En la tabla 4.6 se muestra el efecto de la adición de CG 9-442 sobre el potencial de membrana mitocondrial. Las mitocondrias acopladas, en ausencia de CG 9-442, incorporan aproximadamente 0,50 nanomoles de rhodamina 123/mg de proteína. La adición de CG 9-442 25 μ M durante 10 minutos, determina una disminución significativa del potencial de membrana (21,6 %), la cual es función de la concentración de la quinona y del tiempo de incubación.

Tabla 4.6 Efecto de la CG 9-442, sobre el potencial de membrana mitocondrial

ADP	Tiempo de incubación (min.)	CG 9-442 (μ M)	Potencial de membrana (nmoles de rhodamina 123 incorporados/mg de proteína)
+	10	0	0,51 \pm 0,05
		25	0,40 \pm 0,03*(21,57)
		50	0,25 \pm 0,01**(50,98)
+	25	0	0,49 \pm 0,05
		25	0,26 \pm 0,04**(46,94)
		50	0,13 \pm 0,03**(73,47)
	25	0	0,16 \pm 0,009
		25	0,14 \pm 0,006
		50	0,16 \pm 0,006

Los resultados se expresan como promedio \pm error standard de la media de cinco determinaciones independientes realizadas por duplicado. Diferencia significativa respecto al control: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$. La rhodamina 123 fue agregada diez minutos antes del final de cada incubación. Otras condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Los números entre paréntesis corresponden a porcentajes de inhibición con respecto al control.

A concentraciones de CG 9-442 menores a 25 μ M no se observa inhibición del potencial de membrana (datos no presentados). En ausencia de ADP, las mitocondrias tienen un potencial de membrana muy bajo, el cual no difiere en presencia de CG 9-442.

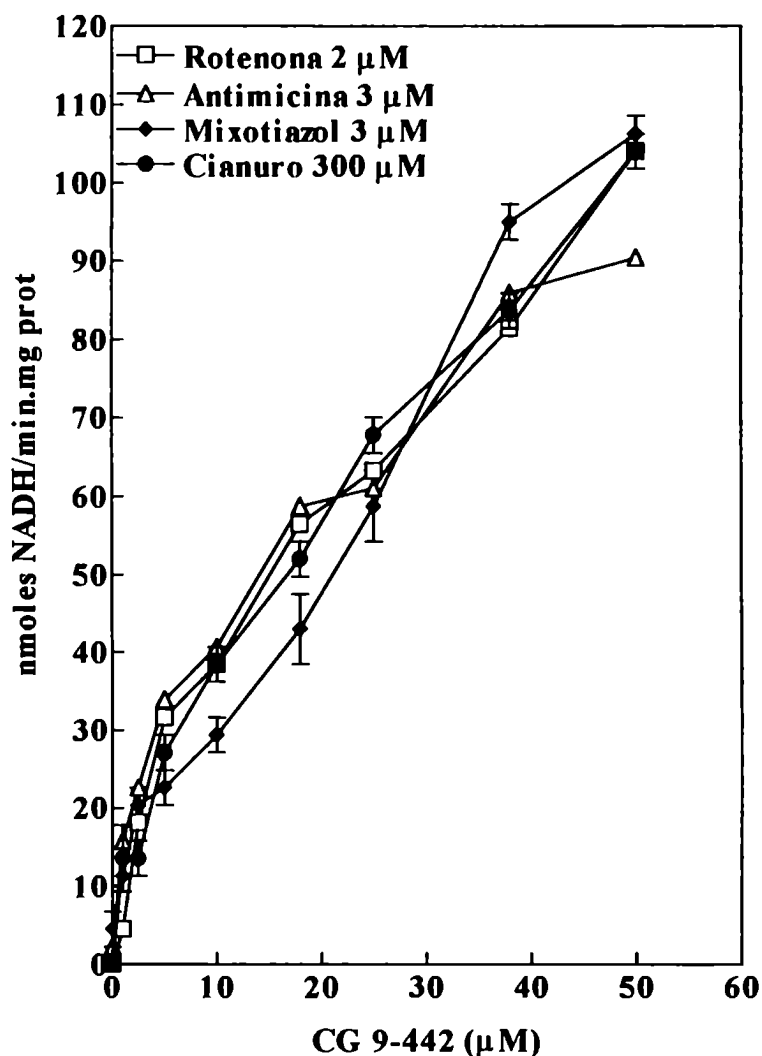
4.2. EN PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIALES DE HÍGADO DE RATA

4.2.1. Efecto de las o-naftoquinonas CG 9-442 y CG 10-248, y de la p-naftoquinona atovaquone sobre la oxidación de NADH y el consumo de oxígeno

Con el objeto de especificar el sitio de acción de la CG 9-442 sobre la cadena de transporte de electrones mitocondrial, se procedió a estudiar el efecto de dicha quinona sobre el consumo de NADH, en partículas submitocondriales hepáticas, en presencia de inhibidores de distintos sitios de la cadena de transporte de electrones. En la figura 4.12, se puede observar que la oxidación de NADH fue estimulada por la CG 9-442, en presencia de cada uno de los cuatro inhibidores ensayados (rotenona, antimicina A, mixotiazol y cianuro), no observándose diferencia entre los inhibidores. Estos resultados sugieren el desvío de electrones de la NADH deshidrogenasa mitocondrial hacia la reducción de la CG 9-442.

Para descartar un posible efecto similar sobre el complejo III de la cadena de transporte de electrones, se estudió, el consumo de oxígeno en presencia de CG 9-442 (50 μ M), succinato, rotenona y cianuro. No se observó consumo de oxígeno en dichas condiciones, lo cual indica que la succinato deshidrogenasa no transfiere electrones a la quinona (datos no presentados).

Figura 4.12 Efecto de la CG 9-442 sobre la oxidación de NADH en partículas submitocondriales hepáticas, en presencia de inhibidores de la cadena de transporte de electrones mitocondrial

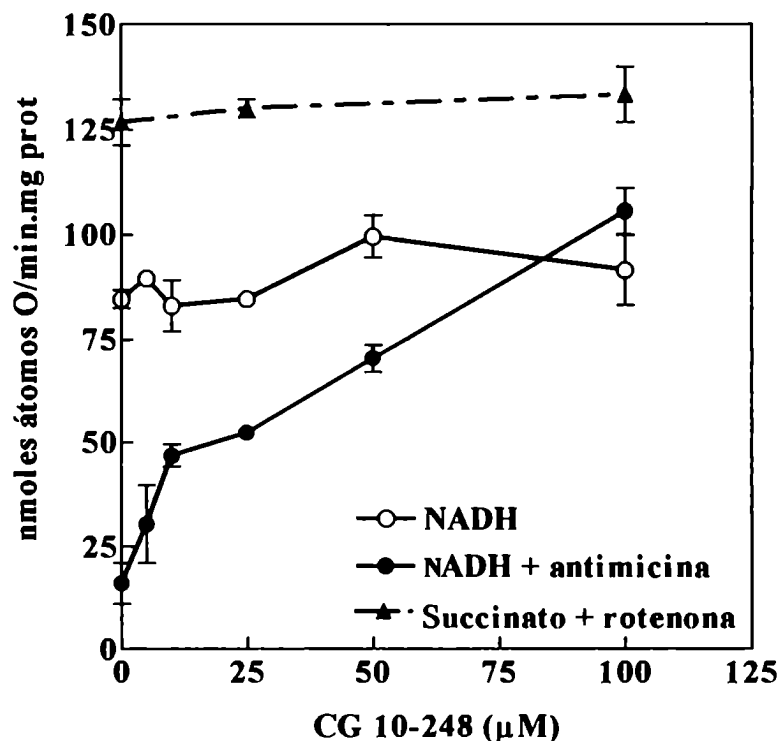


Los puntos del gráfico son promedios \pm error standard de la media de tres determinaciones. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. El estímulo de la actividad NADH oxidasa resultó ser significativo ($p < 0,01$) en presencia de concentraciones iguales o mayores a: 1 μM , en partículas submitocondriales inhibidas con cianuro y 2,5 μM , con los demás inhibidores.

Por otra parte, se investigó el efecto de la CG 10-248 (o-naftoquinona de analogía estructural con la CG 9-442) y del atovaquone (p-naftoquinona de uso clínico), sobre el consumo de oxígeno, en partículas submitocondriales. En la figura 4.13 se puede observar que: a) la adición de CG 10-248 50 μM estimuló el consumo

de oxígeno en partículas submitocondriales suplementadas con NADH; b) al inhibir la cadena de transporte de electrones por el agregado de antimicina, el efecto descrito en (a) se produjo a una concentración 5 μM de la quinona, y c) el consumo de oxígeno en presencia de succinato como dador de electrones, no fue modificado por el agregado de CG 10-248 100 μM . Por el contrario, el atovaquone inhibió el consumo de oxígeno en partículas submitocondriales suplementadas con succinato, a concentraciones iguales o mayores a 100 nM (tabla 4.7).

Figura 4.13 Efecto de la CG 10-248 sobre el consumo de oxígeno en partículas submitocondriales



Los puntos son promedios \pm error standard de la media dos determinaciones. El consumo de oxígeno en partículas submitocondriales suplementadas con NADH, fue medido en presencia de antimicina A (3 μM) y en ausencia de la misma. Otras condiciones experimentales se detallan en Materiales y Métodos.

Tabla 4.7 Efecto del atovaquone sobre la actividad succinato oxidasa, en partículas submitocondriales

Atovaquone (nM)	Actividad succinato oxidasa: (nmoles de átomos de O/min. x mg. de proteínas)
0	-9,8 ± 7,932
25	-8,25 ± 11,809
50	-30,8 ± 4,980
100	-58,29 ± 1,739
250	-155,64 ± 7,150
500	-175,43 ± 4,950
1000	-163,88 ± 5,924

Los resultados se expresan como promedio ± error standard de la media de la diferencia, con respecto al control sin droga ni solvente, de dos determinaciones. En cada caso se restó el valor obtenido de la pendiente previa a la adición de atovaquone. Las condiciones experimentales se detallan en Materiales y Métodos.

4.2.2. Efecto de la o-naftoquinona CG 9-442 y de la p-naftoquinona atovaquone, sobre la producción de anión superóxido

La figura 4.14 muestra el efecto de la adición de CG 9-442, sobre la velocidad de formación de anión superóxido, en partículas submitocondriales suplementadas con NADH (0,25 mM) e inhibidas con antimicina A (3 µM). La adición de CG 9-442 (2,5 µM) determinó un aumento significativo en la producción de anión superóxido (90 veces en comparación con las preparaciones control, que contenían igual volumen de DMFA). Dicho efecto fue directamente proporcional a la concentración de CG 9-442 presente en el medio de incubación. La producción de anión superóxido fue inhibida totalmente por el agregado de superóxido dismutasa, lo que confirma la producción del mismo. Además se observó una

correlación significativa entre la producción de anión superóxido y el consumo de NADH, en función de la concentración de CG 9-442, a partir de $5\mu\text{M}$ de la quinona, en partículas submitocondriales suplementadas con NADH e inhibidas con antimicina. (figura 4.15).

Por el contrario, el agregado de atovaquone 1 o $20\mu\text{M}$, no produjo anión superóxido, en partículas submitocondriales suplementadas con NADH e inhibidas con antimicina (datos no presentados).

Figura 4.14 Efecto de la CG 9-442 sobre la producción de anión superóxido, en partículas submitocondriales suplementadas con NADH e inhibidas con antimicina

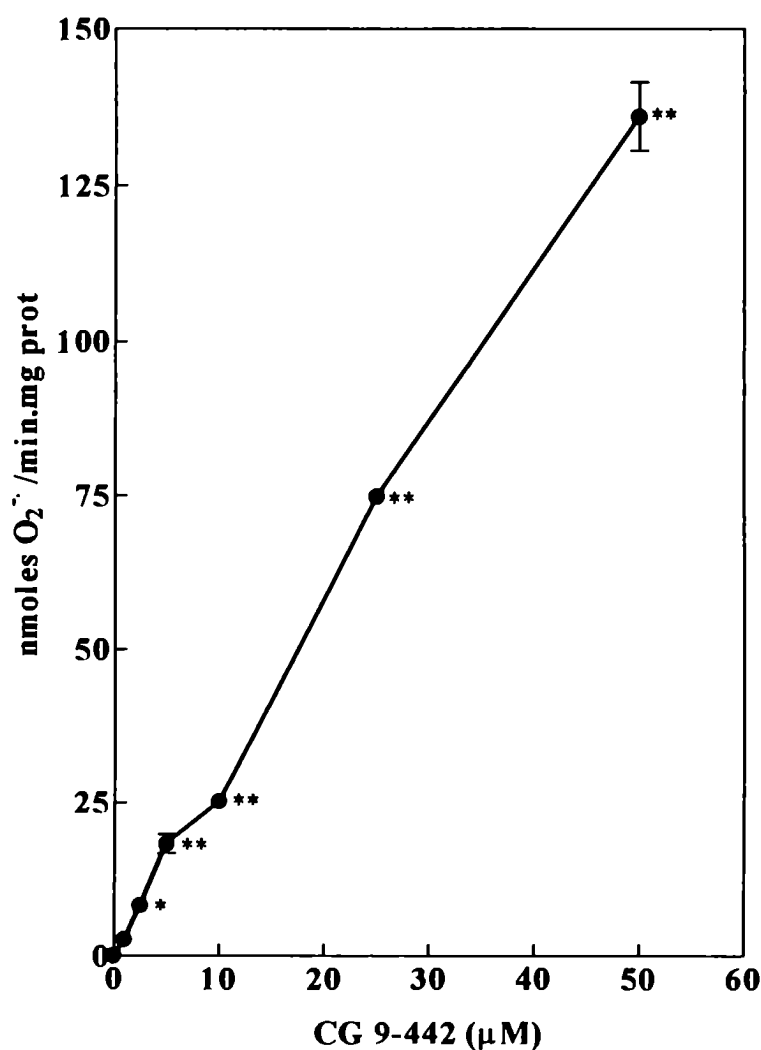
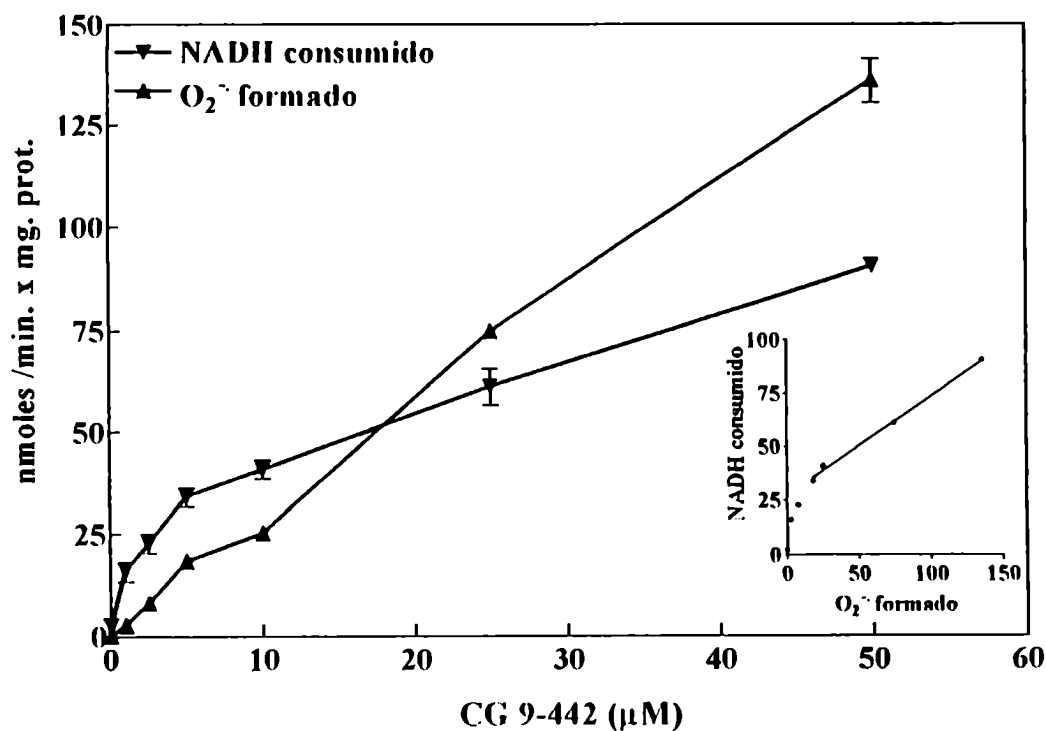


Figura 4.15 Correlación entre el consumo de NADH y la formación de anión superóxido, en partículas submitocondriales hepáticas inhibidas con antimicina, en presencia de diferentes concentraciones de CG 9-442

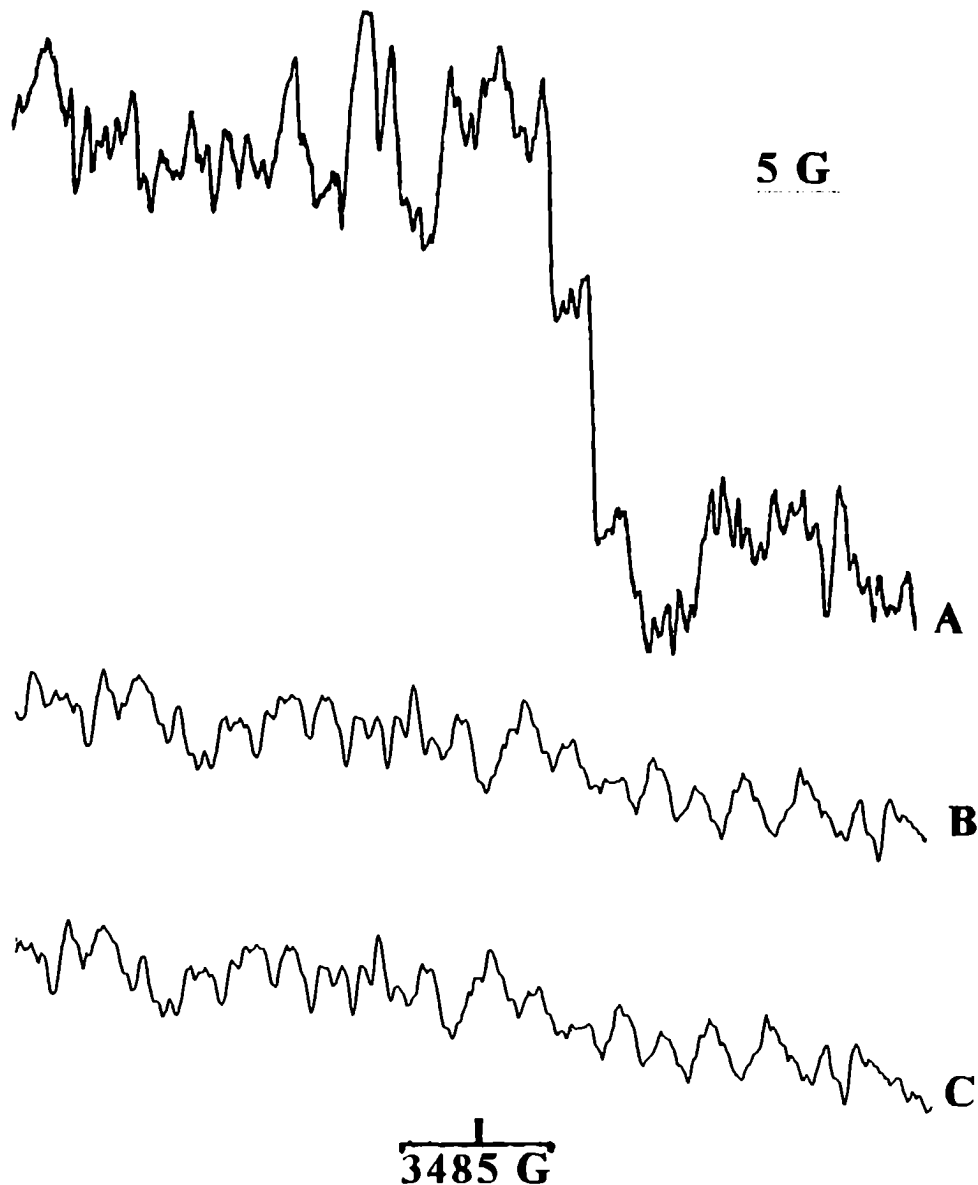


Los resultados son promedios de 4 o 3 determinaciones, para la formación de anión superóxido y la actividad NADH oxidasa respectivamente. (Coeficiente de correlación para una concentración de CG 9-442 $\geq 5 \mu\text{M}$: $r = 0,9981$).

4.2.3. Espectro EPR del radical semiquinona de la CG 9-442

La figura 4.16 muestra el espectro EPR del radical semiquinona de la CG 9-442 en partículas submitocondriales hepáticas suplementadas con NADH, en anaerobiosis.

Figura 4.16 Producción del radical semiquinona de la CG 9-442 en partículas submitocondriales suplementadas con NADH



A) Espectro EPR de la semiquinona CG 9-442 obtenido después de la reducción de la CG 9-442 por las partículas submitocondriales, suplementadas con NADH, en anaerobiosis. 1.ª mezcla de reacción contenía: CG 9-442 1 mM, partículas submitocondriales 6 mg prot/ml y NADH 5 mM, en solución de sacarosa 0,24 M, EDTA 1 mM y Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), 1 % DMFA, bajo N₂. B) Idem A excepto quinona. C) Idem A excepto las partículas submitocondriales. Otras condiciones experimentales se detallan en Materiales y Métodos.

4.2.4. Efecto de la adición de CG 9-442, sobre los complejos I-IV de la membrana mitocondrial interna

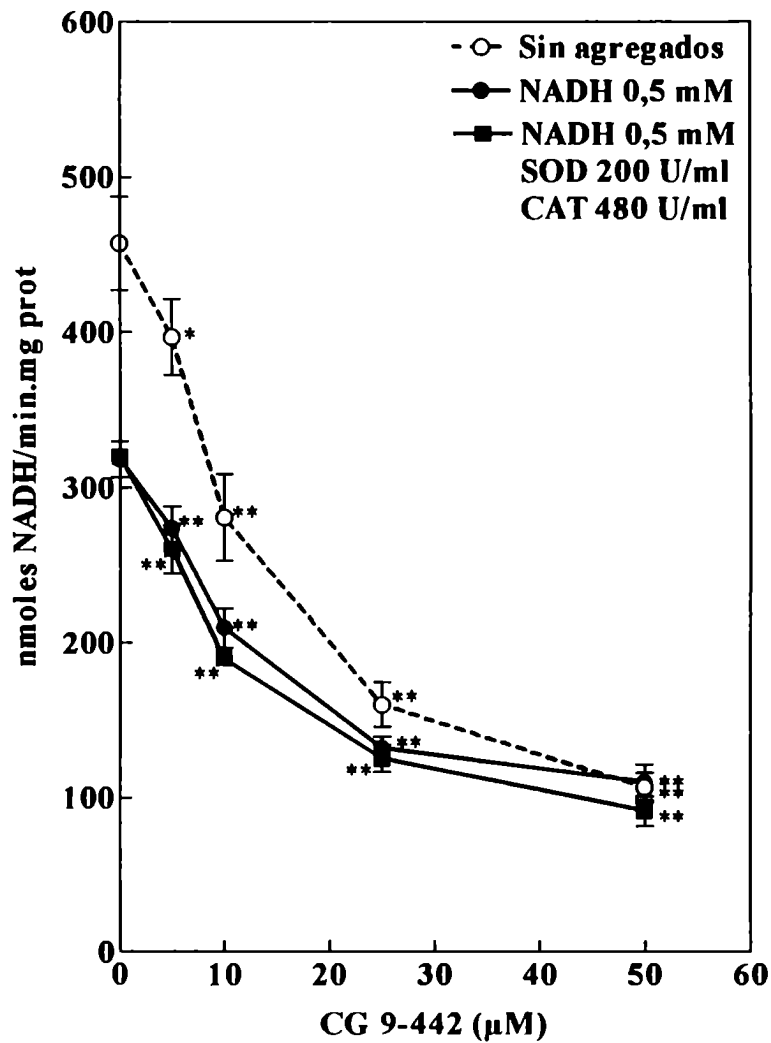
Con el objeto de dilucidar si la adición de la o-naftoquinona CG 9-442 produce un efecto irreversible sobre la respiración mitocondrial, se midieron las actividades NADH oxidasa, NADH deshidrogenasa, succinato oxidasa, succinato deshidrogenasa, succinato-ubiquinona óxido-reductasa, citocromo c oxidasa y NADH-citocromo c reductasa, en partículas submitocondriales preincubadas en presencia de dicha quinona.

4.2.4.1. Efecto de la adición de CG 9-442 sobre la actividad NADH oxidasa

En la tabla 4.8 y figura 4.17 se puede observar el efecto irreversible de concentraciones crecientes de CG 9-442 sobre la actividad NADH oxidasa, en partículas submitocondriales, tanto en presencia como en ausencia de NADH, superóxido dismutasa y catalasa. Estos resultados muestran una inhibición significativa de la actividad NADH oxidasa en función de la concentración de quinona agregada al medio de incubación, a partir de 5 μM de la misma. Los porcentajes de inhibición producidos por la CG 9-442, en presencia y en ausencia de NADH como dador de electrones, son muy similares (tabla 4.8). El agregado de catalasa y superóxido dismutasa, para eliminar los radicales libres del oxígeno producidos por las partículas submitocondriales en presencia de CG 9-442 y NADH,

no modifica significativamente los porcentajes de inhibición de la actividad NADH oxidasa producidos por la CG 9-442.

Figura 4.17 Efecto de la CG 9-442 sobre la actividad NADH oxidasa en partículas submitocondriales



Los resultados se expresan como promedio \pm error standard de la media de por lo menos 3 experimentos independientes realizados por duplicado. Luego de 15 minutos de incubación, las partículas fueron diluidas con buffer fosfato 50 mM, hasta una concentración de proteína de 0,12 mg./ml. Otras condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos

Tabla 4.8 Efecto de la CG 9-442 sobre la actividad NADH oxidasa de partículas submitocondriales

CG 9-442 (μ M)	NADH (mM)	SOD (U/ml)	CAT (U/ml)	nmoles NADH cons./ min. mg prot.
0				457,39 \pm 30,02
5				396,94 \pm 24,55*(13,22)
10	—	—	—	281,02 \pm 27,84**(38,56)
25				159,96 \pm 14,30**(65,03)
50				106,75 \pm 9,68**(76,66)
0				318,33 \pm 11,53
5				274,16 \pm 13,84**(13,87)
10	0,5	—	—	209,21 \pm 12,73**(34,28)
25				132,26 \pm 7,65**(58,45)
50				110,18 \pm 11,41**(65,39)
0				320,25 \pm 4,28
5				260,23 \pm 15,68**(18,74)
10	0,5	200	480	189,49 \pm 1,87**(40,83)
25				125,40 \pm 8,63**(60,84)
50				91,31 \pm 9,71**(71,49)

Los resultados se expresan como promedio \pm error standard de la media de por lo menos 3 experimentos independientes realizados por duplicado. Los valores entre paréntesis corresponden a los porcentajes de inhibición con respecto al control con el solvente de la droga. Luego de 15 minutos de incubación, las partículas fueron diluidas con buffer fosfato 50 mM, hasta una concentración de proteínas de 0,12 mg./ml. Otras condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Diferencia significativa respecto al control: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

4.2.4.2. Efecto de la adición de CG 9-442 sobre la actividad succinato oxidasa

La tabla 4.9 y la figura 4.18 muestran el efecto irreversible de la adición de CG 9-442 sobre la actividad succinato oxidasa en partículas submitocondriales hepáticas. El agregado de CG 9-442 10 μ M, determinó una inhibición significativa de la actividad succinato oxidasa, luego de 15 minutos de incubación, tanto en presencia de NADH o succinato como en ausencia de sustratos respiratorios.

Tabla 4.9 Efecto de la CG 9-442 sobre la actividad succinato oxidasa en partículas submitocondriales**A) Efecto directo de la quinona (se incubó sin el agregado de sustrato)**

CG 9-442 (μM)	Actividad succinato oxidasa (nmoles át O_2 cons./min. x mg. prot.)
0	262,53 \pm 6,04
5	224,03 \pm 19,92ns (14,66)
10	203,07 \pm 28,62* (22,65)
25	173,62 \pm 20,00** (33,87)
50	120,45 \pm 6,79** (54,12)

B) Sustrato: NADH (0,5 mM)

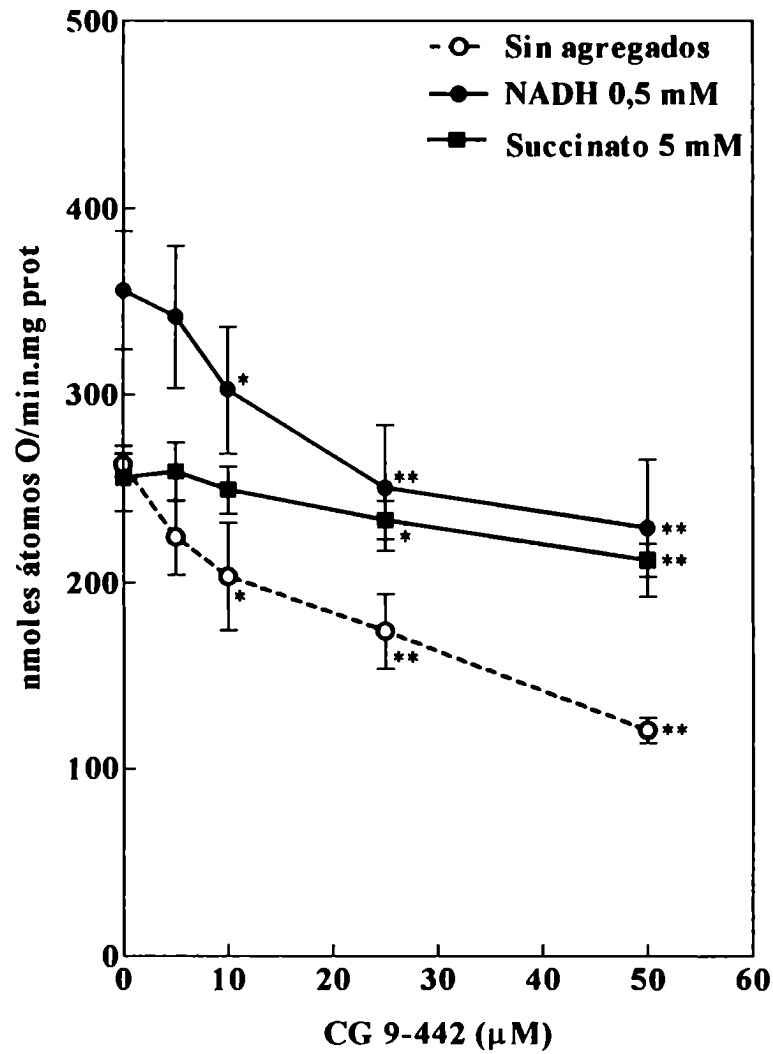
CG 9-442 (μM)	Actividad succinato oxidasa (nmoles át O_2 cons./min. x mg. prot.)
0	356,18 \pm 31,87
5	341,88 \pm 38,07ns (4,01)
10	302,61 \pm 33,84* (15,04)
25	250,36 \pm 33,69** (29,71)
50	228,91 \pm 36,46** (35,73)

C) Sustrato: Succinato (5 mM)

CG 9-442 (μM)	Actividad succinato oxidasa (nmoles át O_2 cons./min. x mg. prot.)
0	255,53 \pm 17,38
5	258,87 \pm 15,72 ns (0)
10	249,33 \pm 12,64 ns (2,43)
25	233,20 \pm 10,12* (8,74)
50	211,75 \pm 8,85** (17,13)

Los resultados se expresan como promedio \pm error standard de la media, de cinco (B y C) o tres (A) experimentos independientes realizados por duplicado. Los valores entre paréntesis corresponden a los porcentajes de inhibición con respecto al control con el solvente de la droga. Luego de 15 minutos de incubación las partículas fueron diluidas con buffer fosfato 50 mM, hasta una concentración de proteína de 0,2 mg./ml. Otras condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Diferencia significativa respecto al control: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ns, no significativo.

Fig 4.18 Efecto de la CG 9-442 sobre la actividad succinato oxidasa en partículas submitocondriales



4.2.4.3. Efecto de la adición de CG 9-442 sobre la actividad NADH deshidrogenasa

En la tabla 4.10 se puede observar el efecto de concentraciones crecientes de CG 9-442 sobre la actividad NADH deshidrogenasa. Dicha quinona, 50 µM, no tuvo

efecto significativo sobre la actividad NADH deshidrogenasa, luego de 15 minutos de incubación en ausencia de dadores de electrones.

Tabla 4.10 Efecto de la CG 9-442 sobre la actividad NADH deshidrogenasa de partículas submitocondriales

CG 9-442 (μ M)	Act. NADH deshidrogenasa. (nmoles NADH cons./min. x mg.prot.)
0	14,45 \pm 0,75
5	13,15 \pm 0,15
10	14,00 \pm 0,30
25	13,20 \pm 0,00
50	13,75 \pm 1,25

Los resultados se expresan como promedio \pm error standard de la media de dos experimentos independientes realizados por duplicado. La incubación fue realizada en ausencia de sustratos respiratorios. Luego de 15 minutos de incubación, las partículas fueron diluidas con buffer fosfato 50 mM, hasta una concentración de proteína de 0,03 mg./ml. Otras condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

4.2.4.4. Efecto de la adición de CG 9-442 sobre las actividades succinato deshidrogenasa y succinato-ubiquinona óxido-reductasa

En las tablas 4.11 y 4.12 se muestra el efecto de la adición de concentraciones crecientes de CG 9-442 al medio de incubación, sobre las actividades succinato deshidrogenasa y succinato-ubiquinona óxido-reductasa respectivamente. La adición de CG 9-442 50 μ M produjo una inhibición significativa de ambas actividades enzimáticas, de aproximadamente un 10 %, luego de 15 minutos de incubación culminados por una dilución. Por otra parte, el agregado de CG 9-442 en el momento de la determinación de la actividad succinato deshidrogenasa, produjo una inhibición significativa de dicha actividad a una concentración de la quinona 5 veces menor que

la necesaria para obtener la misma inhibición luego de incubar 15 minutos y diluir la preparación (12 % de inhibición, en presencia de CG 9-442 10 μ M).

Tabla 4.11 Efecto de la CG 9-442 sobre la actividad succinato deshidrogenasa en partículas submitocondriales

CG 9-442 (μ M)	Actividad succinato deshidrogenasa (nmoles succinato cons./min. x mg.prot.)	
	A)Efecto inmediato	B)Efecto tardío
0	550,69 \pm 15,40	672,22 \pm 47,30
5	531,24 \pm 9,71ns (3,53)	681,25 \pm 55,32 (0,00)
10	481,24 \pm 22,46** (12,61)	647,92 \pm 73,08 ns (3,61)
25	489,58 \pm 17,06** (11,10)	615,97 \pm 53,94 ns (8,37)
50	468,05 \pm 15,90** (15,01)	590,28 \pm 58,94* (12,19)

Los resultados se expresan como promedio \pm error standard de la media de cuatro experimentos independientes realizados por duplicado. Los valores entre paréntesis corresponden a los porcentajes de inhibición con respecto al control con el solvente de la droga. A) Las partículas submitocondriales no fueron preincubadas; la quinona fue agregada al medio de reacción en el momento en que se inició la medición de la actividad enzimática; la concentración proteica fue de 0,6 mg/ml. B) Las partículas submitocondriales fueron preincubadas en presencia de la quinona, en ausencia de sustratos respiratorios. Luego de 15 minutos de incubación, las partículas fueron diluidas con buffer fosfato 50 mM, hasta una concentración de proteína de 0,2 mg./ml. Otras condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Diferencia significativa respecto al control: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ns, no significativo.

Tabla 4.12 Efecto de la CG 9-442 sobre la actividad succinato ubiquinona óxido-reductasa en partículas submitocondriales

CG 9-442 (μ M)	Actividad succinato ubiquinona óxido-reductasa (nmoles succinato cons./min. x mg.prot.)
0	158,35 \pm 9,14
5	157,40 \pm 10,01 ns (0,6)
10	156,18 \pm 12,87 ns (1,37)
25	154,35 \pm 10,59 ns (2,53)
50	143,55 \pm 11,25* (9,35)

Los resultados se expresan como promedio \pm error standard de la media de cuatro experimentos independientes realizados por duplicado. Los valores entre paréntesis corresponden a los porcentajes de inhibición con respecto al control con el solvente de la droga. Las incubaciones fueron realizadas en ausencia de sustratos respiratorios. Luego de 15 minutos de incubación, las partículas fueron diluidas con buffer fosfato 50 mM, hasta una concentración de proteína de 0,07 mg./ml. Otras condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Diferencia significativa respecto al control: *, $p < 0,05$; ns, no significativo.

4.2.4.5. Efecto de la adición de CG 9-442 sobre las actividades NADH-citocromo c reductasa y citocromo c oxidasa

Teniendo en cuenta que: a) el citocromo c, en condiciones fisiológicas (fuerza iónica = 100-150 mM), se encuentra en el espacio intermembrana, a una concentración de 100-700 μ M (Lemasters, 1978) y sólo una décima parte del mismo permanece unida a la membrana mitocondrial interna (Cortese y col., 1998), y b) al aislar las partículas submitocondriales sólo se conservan las proteínas que están unidas a la membrana mitocondrial interna; se calculó la fuerza iónica de las soluciones amortiguadoras de pH, utilizadas para suspender a las partículas submitocondriales, como control de la presencia de citocromo c en nuestras preparaciones. La fuerza iónica se calculó como se indica en Materiales y Métodos. La fuerzas iónicas calculadas son las siguientes: a) 47 mM, para las soluciones de sacarosa 0,24 M, EDTA 1 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) y b) un valor comprendido entre 50 mM y 150 mM siendo 128 mM el valor estimado, para las soluciones de fosfatos de sodio y potasio 50 mM (pH 7,4). Estos resultados indican que la fuerza iónica de los medios de incubación de las partículas submitocondriales, utilizados en este trabajo, no supera a los valores de fuerza iónica fisiológicos. Dado que una disminución de la fuerza iónica, determina un aumento de la afinidad del citocromo c por la membrana mitocondrial interna, podemos afirmar que nuestras preparaciones contienen citocromo c asociado a la membrana.

En las tablas 4.13 y 4.14 se muestra el efecto de la adición de concentraciones crecientes de CG 9-442 al medio de incubación, sobre las actividades NADH-

citocromo c reductasa y citocromo c oxidasa respectivamente. La adición de CG 9-442 50 μ M no produjo una inhibición significativa de dichas actividades enzimáticas.

Tabla 4.13 Efecto de la CG 9-442 sobre la actividad NADH-citocromo c reductasa en partículas submitocondriales

CG 9-442 (μ M)	Actividad NADH-citocromo c reductasa (nmoles citocromo c red./min. x mg.prot.)
0	448,98 \pm 23,81
5	486,39 \pm 37,42 ns
10	489,79 \pm 44,22 ns
25	448,98 \pm 30,61 ns
50	467,68 \pm 1,70 ns

Los resultados se expresan como promedio \pm error standard de la media de dos experimentos independientes realizados por duplicado. Las incubaciones fueron realizadas en ausencia de sustratos respiratorios. Luego de 15 minutos de incubación, las partículas fueron diluidas con buffer fosfato 50 mM, hasta una concentración de proteína de 0,007 mg./ml. Otras condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Diferencia significativa respecto al control: ns, no significativo.

Tabla 4.14 Efecto de la CG 9-442 sobre la actividad citocromo c oxidasa en partículas submitocondriales

CG 9-442 (μ M)	Actividad citocromo c oxidasa (nmoles citocromo c ox./min. x mg.prot.)
0	303,14 \pm 23,38
25	332,06 \pm 32,06 ns
50	333,12 \pm 33,17 ns

Los resultados se expresan como promedio \pm error standard de la media de cuatro experimentos independientes realizados por duplicado. Las incubaciones fueron realizadas en ausencia de sustratos respiratorios. Luego de 15 minutos de incubación, las partículas fueron diluidas con buffer fosfato 50 mM, hasta una concentración de proteína de 0,01 mg./ml. Otras condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Diferencia significativa respecto al control: ns, no significativo.

Discusión y conclusiones

En el presente estudio se demostró que la adición de CG 9-442 (o-naftoquinona derivada de la β -lapachona) a una suspensión mitocondrial de hígado de rata: 1) estimuló el consumo de O_2 en estado "4" e inhibió el consumo de O_2 en estado "3", disminuyendo en consecuencia el índice de control respiratorio (ICR); en presencia de malato-glutamato o succinato, como sustratos respiratorios (tabla 4.1, figuras 4.1 y 4.2); 2) inhibió la peroxidación lipídica (figura 4.6); 3) inhibió el aumento de volumen mitocondrial "swelling", por Ca^{2+} (tabla 4.5 y figura 4.10), y 4) inhibió el potencial de membrana (tabla 4.6).

En partículas submitocondriales, la adición de CG 9-442: 1) estimuló la oxidación de NADH insensible a rotenona, antimicina A, mixotiazol o cianuro (figura 4.12); 2) determinó la formación del radical semiquinona, detectado por EPR (figura 4.16), y un estímulo en la producción del radical anión superóxido (figura 4.14), en presencia de NADH y antimicina; 3) no consumió O_2 , en presencia de succinato, rotenona y cianuro; 4) inhibió la actividad NADH oxidasa, luego de 15 minutos de incubación tanto en presencia como en ausencia de NADH, superóxido dismutasa y catalasa (tabla 4.8 y figura 4.17); 5) inhibió la actividad succinato oxidasa, luego de 15 minutos de incubación, tanto en presencia de NADH o succinato como en ausencia de dadores de electrones (tabla 4.9 y figura 4.18); 6) inhibió ligeramente las actividades succinato deshidrogenasa y succinato-ubiquinona óxido-reductasa (tablas 4.11 y 4.12), 7) no tuvo efecto significativo sobre las actividades NADH deshidrogenasa (tabla 4.10), NADH-citocromo c reductasa (tabla 4.13) y citocromo c oxidasa (tabla 4.14), luego de 15 minutos de incubación.

Todos los efectos mencionados anteriormente, se observaron en forma dependiente de las concentraciones de quinona utilizadas en cada caso. Estos resultados indican que los efectos observados, en mitocondrias y partículas submitocondriales, en presencia de la o-naftoquinona CG 9-442 podrían atribuirse principalmente a: A) la gran habilidad de estas quinonas para entrar en ciclo redox, B) un efecto inhibitorio de la quinona sobre la cadena de transporte de electrones mitocondrial y C) un efecto desacoplante.

A) La adición de CG 9-442 determinó: la formación del radical semiquinona, detectado por EPR (figura 4.16), y un estímulo en la producción del radical anión superóxido, en partículas submitocondriales suplementadas con NADH e inhibidas con antimicina (figura 4.14); un estímulo del consumo de oxígeno en mitocondrias en estado "4", con malato-glutamato como sustratos respiratorios (tabla 4.1 y figura 4.2); un estímulo de la actividad NADH oxidasa, en partículas submitocondriales inhibidas por rotenona, antimicina A, mixotiazol o cianuro (figura 4.12). Además, se observó una correlación significativa entre el consumo de NADH y la formación de anión superóxido, en partículas submitocondriales inhibidas con antimicina en presencia de distintas concentraciones de CG 9-442 (figura 4.15). Estos resultados demuestran la reducción de la quinona a radical semiquinona por la NADH deshidrogenasa de la membrana mitocondrial interna y la reoxidación del mismo en presencia de oxígeno, formando anión superóxido, produciéndose así un ciclo redox de la quinona a nivel del complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (figura 5.1). Estos resultados, concuerdan con los obtenidos por

Docampo y col. (1978), que observaron producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno, en mitocondrias y microsomas de células de sarcoma 180 de ratón, incubados en presencia de β -lapachona; y con los obtenidos en nuestro laboratorio con las o-naftoquinonas CG 9-442, CG 10-248 y CG 8-935 en hepatocitos aislados (Carrizo y col., 1998) y en microsomas de hígado de rata, con formación de radical semiquinona, anión superóxido y peróxido de hidrógeno (Dubin y col., 1990 b). Por otra parte, la adición de mansononas, o-naftoquinonas aisladas de *Mansonia altissima* (Galeffi y col., 1968) a microsomas de hígado de rata, produjo anión superóxido y radical semiquinona (Fernandez Villamil y col., 1990).

Nuestros resultados en partículas submitocondriales, en presencia de inhibidores de la cadena de transporte de electrones (figura 4.12), sugieren que el ciclo redox de la CG 9-442 a nivel de la NADH deshidrogenasa de la membrana mitocondrial interna, se produciría en un sitio anterior al sensible a la rotenona (figura 1.5). Dado que no se observó estímulo del consumo de oxígeno en partículas submitocondriales suplementadas con succinato e inhibidas con cianuro, se descarta el ciclo redox de esta quinona a nivel de los complejos II, III y IV de la cadena respiratoria.

La menadiona, p-naftoquinona, en mitocondrias de hígado de rata, muestra un incremento en el consumo de oxígeno en estado "4", de la misma magnitud que la CG 9-442 (a iguales concentraciones), pero sin modificar el consumo de oxígeno en "estado 3", asociado a una disminución en el índice de control respiratorio (tabla 4.3 y figura 4.4). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por De Groot H.,

col (1985) con esta misma p-naftoquinona, en mitocondrias de hígado de rata. Según estos autores (De Groot H., col., 1985), la menadiona 50 μM estimula 5 veces el consumo de oxígeno, en mitocondrias suplementadas con malato y glutamato; el cual es altamente inhibido por el agregado de antimicina A o cianuro de potasio, no afectándose por la rotenona. Dichos autores sugieren un camino metabólico de transporte de electrones mediado por la menadiona caracterizado por evitar el sitio sensible a la rotenona y por la introducción de electrones a la cadena respiratoria mitocondrial a nivel del citocromo b del complejo III, previamente al sitio sensible a la antimicina A. Estos resultados difieren de los obtenidos en este trabajo luego de la adición de CG 9-442 a partículas submitocondriales, en los cuales el consumo de oxígeno estimulado por la quinona no es inhibido por el agregado de rotenona, antimicina A, mixotiazol, ni cianuro. Por otra parte, la adición de menadiona a mitocondrias de hígado de rata, produce un ciclo redox, con producción del radical anión superóxido a nivel del ciclo Q, complejo III (Kolesova y col., 1989). Estos resultados (Kolesova y col., 1989) también difieren de los obtenidos en este trabajo con la CG 9-442, ya que no se observó consumo de oxígeno en partículas submitocondriales suplementadas con succinato e inhibidas con cianuro en presencia de CG 9-442, descartándose el ciclo redox de esta quinona a nivel del complejo III de la cadena respiratoria. Estas observaciones sugieren que tanto la menadiona como la CG 9-442, tienen la capacidad de aceptar electrones del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, y de cederlos al O_2 para formar el radical anión superóxido; en cambio la menadiona, a diferencia de la CG 9-442, puede aceptar y/o

ceder electrones a nivel del ciclo Q (complejo III).

Figura 5.1



El atovaquone, a diferencia de las otras orto- y para-naftoquinonas aquí estudiadas, no tiene efecto sobre la producción de anión superóxido en partículas submitocondriales suplementadas con NADH e inhibidas con antimicina (datos no presentados). Estos resultados descartarían el ciclo redox del atovaquone en partículas submitocondriales. En este caso, la presencia del OH en C2 sobre el núcleo de la naftoquinona, podría explicar esta diferencia observada en el efecto del atovaquone sobre la respiración en mitocondrias hepáticas, respecto a la menadiona; ya que la 2-hidroxi-1,4-naftoquinona tiene menor probabilidad de formar el radical semiquinona que la 1,4-naftoquinona, por tener un potencial de reducción muy bajo debido a la estabilización de la forma quinona por desprotonación del grupo oxhidrilo en la posición 2, tautomerización de la forma quinona y por donación de electrones del grupo oxhidrilo desprotonizado al anillo quinona (Öllinger y

Brunmark, 1991). Estos autores, demostraron que la 2-hidroxi-1,4-naftoquinona produce una muy baja tasa de respiración mitocondrial resistente al cianuro, respecto a la 1,4-naftoquinona, sugiriendo que el oxhidrilo en la posición 2 del anillo naftoquinona disminuiría la toxicidad de la misma (Öllinger y Brunmark, 1991).

Las especies tóxicas generadas en el ciclo redox de las quinonas, serían capaces de iniciar la peroxidación lipídica, como ocurre con la Adriamicina (Thayer, 1988; Griffin-Green y col., 1988). Sin embargo, los resultados aquí presentados muestran que las o-naftoquinonas CG 9-442 (figura 4.6) y CG 8-935 (figura 4.7), en nuestras condiciones experimentales, son importantes inhibidoras de la peroxidación lipídica mitocondrial hepática. Estos datos están de acuerdo con la inhibición de la peroxidación lipídica en microsomas de hígado de rata, observada luego de la adición de las mismas o-naftoquinonas utilizadas en este estudio (Dubin M. y col., 1990 b) y de mansononas, o-naftoquinonas aisladas de *Mansonia altissima* (Fernandez Villamil y col., 1990). El efecto inhibitorio de la peroxidación lipídica en mitocondrias de hígado de rata, podría explicarse por el desvío de electrones del NADH al oxígeno con producción de anión superóxido (figuras 4.14 y 2.15) de acuerdo con la hipótesis de Talcott y col., 1985, y Kostyuk y Lunets, 1983.

La menadiona, es mucho más potente inhibidora de la peroxidación lipídica mitocondrial hepática que las o-naftoquinonas estudiadas (figura 4.8). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Talcott R.E. y col (1985) en

microsomos de hígado de rata, en los que la concentración de menadiona requerida para inhibir la peroxidación lipídica dependiente de NADPH, fue aproximadamente dos órdenes de magnitud menor que la concentración requerida para estimular la oxidación del NADPH. Según estos mismos autores (Talcott R.E. y col, 1985), la menadiona sería dos órdenes de magnitud más potente como antioxidante que otras quinonas. Wills (1972), demostró que la menadiona inhibe, en microsomos de hígado de rata, la etapa de propagación de la peroxidación lipídica. Resultados similares se encontraron en hepatocitos aislados de rata incubados en presencia de menadiona (Hogberg J. y col., 1975 y resultados no publicados de este laboratorio).

El atovaquone, no tuvo efecto significativo sobre la peroxidación lipídica mitocondrial hepática en ratas (figura 4.9). Este resultado concuerda con la incapacidad de esta droga para generar anión superóxido en partículas submitocondriales. En este caso también, la presencia del OH en C2, podría explicar la diferencia en el efecto observado sobre la peroxidación lipídica mitocondrial hepática respecto a la menadiona.

Comparando los resultados obtenidos con las diferentes naftoquinonas aquí estudiadas, relacionados a la capacidad de las mismas para entrar en un ciclo redox e inhibir la peroxidación lipídica, podemos observar una menor diferencia entre las orto- y para-naftoquinonas, que entre el atovaquone (hidroxi-p-naftoquinona) y la menadiona (p-naftoquinona). Esta observación sugiere que la naturaleza y número de sustituyentes sobre el núcleo naftoquinona estarían más relacionados con la capacidad de estas moléculas para entrar en un ciclo redox e inhibir la peroxidación

lipídica, que la posición de los dos grupos carbonilo (orto o para).

B) La adición de CG 9-442, inhibió el consumo de O₂ en mitocondrias en estado "3" (tabla 4.1 y figura 4.2). Este resultado sugiere que el agregado de CG 9-442 produce, en nuestras condiciones experimentales, un efecto inhibitorio inmediato sobre la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Por otra parte, las actividades NADH oxidasa y succinato oxidasa fueron inhibidas por la CG 9-442 luego de 15 minutos de incubación, en ausencia de dadores de electrones, en partículas submitocondriales (tablas 4.8 y 4.9, figuras 4.17 y 4.18). Estos resultados sugieren un efecto inhibitorio directo de la quinona sobre algún componente de la cadena de transporte de electrones, que además es irreversible, ya que no se revierte por dilución de la mezcla de incubación.

Con el propósito de dilucidar el/los sitio/s de inhibición de esta quinona, se midieron las actividades NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, succinato ubiquinona óxido-reductasa, NADH-citocromo c reductasa y citocromo c oxidasa, en partículas submitocondriales (tablas 4.10, 4.11, 4.12, 4.13 y 4.14 respectivamente; resumido en la tabla 5.1). Teniendo en cuenta que: a) la cadena respiratoria completa (actividades NADH oxidasa y succinato oxidasa), fue inhibida por la CG 9-442 50 μM (en un 77 % y 54 % respectivamente), (tablas 4.8 y 4.9, figuras 4.17 y 4.18); b) las actividades succinato deshidrogenasa y succinato-ubiquinona óxido-reductasa fueron inhibidas por la CG 9-442 50 μM, aproximadamente en un 10 % en ambos casos (tablas 4.11 y 4.12 respectivamente); y c) las actividades NADH deshidrogenasa, NADH-citocromo c reductasa y

citocromo c oxidasa no fueron inhibidas en nuestras condiciones experimentales; podemos sugerir que la CG 9-442 inhibe dos sitios de la cadena respiratoria mitocondrial: 1) Considerando que las actividades succinato deshidrogenasa y succinato-ubiquinona óxido-reductasa fueron inhibidas aproximadamente en la misma magnitud (10 % con CG 9-442 50 μ M), y la actividad NADH-citocromo c reductasa no fue inhibida, en nuestras condiciones experimentales, podemos deducir que esta quinona produce una leve inhibición de la enzima succinato deshidrogenasa y descartar la inhibición a nivel de la ubiquinona. 2) El otro sitio de inhibición, probablemente sea el citocromo c ya que el transporte de electrones a nivel de todos los demás componentes de la actividad NADH oxidasa no fue inhibido (tablas 4.10, 4.13 y 4.14, resumido en la tabla 5.1). Dado que se requiere una concentración 10 veces mayor de la quinona para inhibir la actividad succinato deshidrogenasa respecto a la succinato oxidasa, se puede sugerir una inhibición a nivel de la succinato deshidrogenasa, a concentraciones de CG 9-442 iguales o superiores a 50 μ M; y otra inhibición, probablemente a nivel del citocromo c, a concentraciones de la quinona iguales o superiores a 5 μ M. Li y col. (1999) demostraron que la β -lapachona produce la salida de citocromo c de las mitocondrias, en diferentes líneas celulares de carcinoma humano, y que dicho efecto es un evento temprano tanto para la apoptosis como para la necrosis inducidas por β -lapachona. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis acerca de la inhibición del transporte de electrones mitocondrial a nivel del citocromo c, por la CG 9-442 (análoga estructural de la β -lapachona).

Tabla 5.1 Efecto de la CG 9-442 sobre los transportadores de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial.

Actividad enzimática	Dador de electrones	Aceptor de electrones	Transportadores de electrones	% de inhibición
NADH oxidasa	NADH	O ₂	NADH deshidrogenasa (C1) Ubiquinona Citocromo c reductasa (C3) Citocromo c Citocromo c oxidasa (C4)	76,66
NADH deshidrogenasa	NADH	Ferricianuro	NADH deshidrogenasa (C1)	0,00
NADH-citocromo c reductasa	NADH	Citocromo c	NADH deshidrogenasa (C1) Ubiquinona Citocromo c reductasa (C3)	0,00
Citocromo c oxidasa	Citocromo c reducido	O ₂	Citocromo c oxidasa (C4)	0,00
Succinato oxidasa	Succinato	O ₂	Succinato deshidrogenasa (C2) Ubiquinona Citocromo c reductasa (C3) Citocromo c Citocromo c oxidasa (C4)	54,12
Succinato deshidrogenasa	Succinato	Ferricianuro	Succinato deshidrogenasa (C2)	12,19
Succinato-ubiquinona óxido reductasa	Succinato	DCPIP	Succinato deshidrogenasa (C2) Ubiquinona	9,35

Los valores corresponden a los porcentajes de inhibición con respecto al control, de las actividades enzimáticas, en partículas submitocondriales, luego de 15 minutos de incubación en presencia de CG 9-442 50 µM y en ausencia de sustratos respiratorios.

El atovaquone, es un inhibidor mucho más potente del consumo de oxígeno en estado metabólico "3" que la CG 9-442 (tabla 4.4 y figura 4.5). La adición de atovaquone, a la suspensión mitocondrial, disminuyó el consumo de oxígeno en estado metabólico "3" a partir de 0,25 μM , sin modificar el estado "4" a concentraciones inferiores a 1 μM , con una importante disminución en el ICR (tabla 4.4 y figura 4.5). Además, el atovaquone inhibió el consumo de oxígeno en partículas submitocondriales suplementadas con succinato (tabla 4.7). Estos resultados sugieren un efecto inhibitorio directo del atovaquone sobre algún componente de la cadena respiratoria, distinto a la NADH deshidrogenasa. El atovaquone, en este estudio, fue ensayado a concentraciones hasta 25 veces inferiores a las utilizadas en la investigación de las otras naftoquinonas (CG 9-442, CG 8-935 y menadiona), lo que demuestra la gran actividad de esta quinona sobre la función mitocondrial, respecto a las otras quinonas estudiadas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Fry M. y Pudney M. (Fry M. y Pudney M., 1992) en mitocondrias de hígado de rata y de *Plasmodium falsiparum* y *Plasmodium yoelli*, quienes además demostraron que el atovaquone inhibe el complejo III de la cadena respiratoria, requiriéndose una concentración mil veces mayor de atovaquone para inhibir el complejo III en las mitocondrias de hígado de rata, que en las de las dos especies de *Plasmodium*. Por otra parte, la adición de menadiona (25 μM) a mitocondrias de hígado de rata no inhibió el consumo de oxígeno en nuestras condiciones experimentales (tabla 4.3 y figura 4.4).

C) La adición de CG 9-442 a mitocondrias suplementadas con succinato e

inhibidas con rotenona, determinó un aumento del consumo de oxígeno en estado "4" (tabla 4.1 y figura 4.2), lo cual podría deberse a un efecto desacoplante de la quinona y/o a un ciclo redox de la misma. Dado que no se observó estímulo del consumo de oxígeno en partículas submitocondriales suplementadas con succinato e inhibidas con cianuro, se descartaría el ciclo redox de la quinona, en estas condiciones experimentales, sugiriéndose un efecto desacoplante.

Como consecuencia de los efectos producidos por la CG 9-442 sobre las mitocondrias, en nuestras condiciones experimentales: A) ciclo redox y/o B) efecto inhibitorio sobre la cadena de transporte de electrones y/o C) efecto desacoplante; se observa una inhibición del potencial de membrana mitocondrial en función de la concentración de CG 9-442 (tabla 4.6). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Li y col (1999), con β -lapachona, quienes observaron una inhibición del potencial de membrana mitocondrial, determinada por el agregado de β -lapachona 4 μ M en células de carcinoma humano. La menadiona 200 μ M también inhibe el potencial de membrana en mitocondrias de hígado de rata (Frei y col., 1986). El atovaquone, p-naftoquinona de uso clínico, a pesar de inhibir fuertemente el potencial de membrana mitocondrial de *Plasmodium sp* ($EC_{50} = 260$ nM), no colapsa el potencial de membrana mitocondrial en linfocitos de ratón a mayores concentraciones (Srivastava y col., 1997).

La adición de CG 9-442 a la suspensión mitocondrial, produjo un efecto inhibitorio del aumento de volumen mitocondrial "swelling" por Ca^{2+} (tabla 4.5 y figura 4.10), interfiriendo así con la homeostasis del Ca^{2+} y la regulación del

volumen mitocondrial. Estos resultados coinciden con los obtenidos con la o-naftoquinona CG 10-248 (otro derivado de la β -lapachona)(figura 1.8), en mitocondrias de hígado de rata (Carrizo, P.H. y col., XIV Congreso Latinoamericano de Farmacología, 1994). Dicho efecto inhibitorio sugiere un deterioro en la capacidad de la mitocondria para captar y retener Ca^{2+} , el cual podría deberse a un efecto de dicha quinona sobre: a) el gradiente de H^+ y potencial de membrana mitocondriales, b) las proteínas transportadoras de Ca^{2+} de la mitocondria, c) oxidación e hidrólisis de los nucleótidos de piridina, d) la permeabilidad transitoria de la mitocondria. La correlación significativa entre los porcentajes de inhibición del “swelling” por Ca^{2+} y del índice de control respiratorio, en presencia de malato-glutamato y no en presencia de succinato como sustrato (figura 4.11), sugiere una relación entre los efectos de la quinona sobre: a) la NADH deshidrogenasa de la cadena de transporte de electrones y b) el swelling mitocondrial por Ca^{2+} .

Los resultados obtenidos en este trabajo, en mitocondrias y en partículas submitocondriales de hígado de rata, con la CG 9-442, concuerdan con los obtenidos en este laboratorio, con otras o-naftoquinonas derivadas de la β -lapachona (figura 1.8), la CG 10-248 (figura 4.13, y Carrizo y Col., Congreso 1994) y la CG 8-935 (tabla 4.2 y figura 4.3). Por otra parte, los parámetros químico cuánticos de la β -lapachona y sus análogas CG 9-442, CG 8-835 y CG 10-248, no difieren significativamente (Paulino y col., 1994). Estas observaciones sugieren un mecanismo de acción similar, sobre la función mitocondrial, para todas las o-naftoquinonas aquí estudiadas.

En las mitocondrias aisladas se han observado ciclos de contracción asociados con la fosforilación oxidativa. Se han descrito dos estados conformacionales de las mitocondrias (Hackenbrock, 1967 y 1968; Harris y col., 1968; Knoll y Brdiczka, 1980; De Robertis y De Robertis, 1984): a) estado conformacional ortodoxo, se observa a bajas concentraciones de ADP y cuando la mitocondria no fosforila, es aquél en el que la matriz mitocondrial ocupa prácticamente todo el compartimiento interno mitocondrial y la membrana interna presenta las características crestas, el espacio entre las membranas es mínimo; b) estado conformacional condensado, se observa a altas concentraciones de ADP y cuando la mitocondria es capaz de fosforilar, es aquél en el que la matriz mitocondrial se condensa y aproximadamente el 50 % del agua difunde hacia el espacio intermembrana. En el presente trabajo (tabla 4.6), se observó que el potencial de membrana mitocondrial se encuentra inhibido en ausencia de ADP y que, por lo tanto, no se observa efecto significativo de la CG 9-442 sobre el potencial de membrana en ausencia de ADP. Estos resultados concuerdan con observaciones de microscopía electrónica (resultados aún no publicados de este laboratorio), los cuales demostraron que, en presencia de ADP, las mitocondrias aisladas se mantienen en estado condensado y la CG 10-248 produce un efecto significativo sobre la conformación mitocondrial; mientras que en ausencia de ADP, las mitocondrias aisladas se mantienen en estado ortodoxo, no observándose ningún efecto de la CG 10-248 sobre la conformación mitocondrial.

Los resultados aquí presentados muestran que la CG 9-442, análoga estructural de la β -lapachona, produce daños en la función mitocondrial en células

de mamíferos, que se traducen fundamentalmente en: la producción de radicales libres, un efecto inhibitorio sobre la cadena de transporte de electrones mitocondrial, un efecto desacoplante y la inhibición del potencial de membrana mitocondrial. Se postula a la mitocondria como blanco importante para la citotoxicidad de la CG 9-442 y sus análogas, descartándose la peroxidación lipídica como causa de la misma. Los datos presentados no descartan otras organelas como blancos para los efectos citotóxicos de estas quinonas.

Es importante destacar que tanto la variación de las posiciones de los sustituyentes como la naturaleza de los mismos sobre el núcleo naftoquinona podrían tener una influencia importante en el efecto de las quinonas estudiadas. Estos estudios pueden ser importantes para contribuir al diseño de diferentes naftoquinonas farmacológicamente activas. Este trabajo constituye una contribución a las investigaciones realizadas con la β -lapachona, potencial citostático en estudio preclínico (Dolan y col., 1998).

Bibliografía

- Adams, G.E. y Stratford, I.J. (1986) *Biochem. Pharmacol.* 35:71.
- Argese, E., Betticol, C., Ghelli, A., Todescheni, R. y Miana, P. (1995) *Environ. Toxicol. Chem.* 14: 363-368.
- Bellomo, G., Mirabelli, F., Di Monte, D., Thot, H., Orrenius, C., Orrenius, S., (1987) *Biochem. Pharmacol.* 36:1311.
- Bensadaum, A. y Weinstein, D. (1976) *Anal. Biochem.* 70: 241.
- Bernardi, P., Scorrano, L., Colonna, R., Petronilli, V. y Di Lisa, F. (1999) *Eur. J. Biochem.* 264: 687-701.
- Bernardi, P. (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 8834-8839.
- Bernardi, P. (1999) *Physiol. Rev.* 79: 1127-1155.
- Bernardi, P. y Azzone, G.F. (1981) *J. Biol. Chem.* 256(14): 7187-92.
- Bindoli A. (1988) *Free Rad. Biol. Med.* 5 : 247-261.
- Bock, M., Haberkorn, A., Herlinger, H., Mayer, K. H. y Peterson, S. (1972) *Arzneim. Forsch (Drug Res.)* 22: 1564-1569.
- Boothman, D.A. y Pardee, A.B. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 4963-4967.
- Boveris, A., Stoppani, A.O.M., Docampo, R. y Cruz, F.S. (1978) *Comp. Biochem. Physiol.*, 61C: 327-329.
- Boveris, A. y Chance, B. (1973) *Biochem. J.* 134: 707-714.
- Boveris, A. (1984) *Methods. Enzymol.* 105: 429-435.
- Boveris, A. y Stoppani, A.O.M. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.* 141: 641-655.
- Boyer, P.D. (1997) *Annu. Rev. Biochem.* 66: 717-749.
- Brunori, M. y Rotilio, G. (1984) *Methods Enzymol.* 105: 22-35.
- Buchanan, S.K. y Walker, J.E. (1996) *Biochem. J.* 318: 343-349.
- Buege, J.A. y Aust, S.D. (1978) en: "Methods in Enzymology", Fleischer, S. y Packer, L., eds., Academic Press, New York, 52:302.
- Cadenas, E. (1985) en: "Oxidative Stress" (Sies H., ed.), Academic Press, New York, págs. 311-330.
- Carrizo, P.H., Dubin, M., Biscardi, A.M., Corazza, J.P., Tomás, R.E., Pellegrino de Iraldi, A., Stoppani, A.O.M. (1994) XIV Congreso Latinoamericano de Farmacología.
- Carrizo, P.H., Dubin, M., Fernández Villamil, S., Molina Portela M.P. y Stoppani, A.O.M. (1998) *Medicina (Buenos Aires)* 58: 631.
- Carter, S.K. (1975) *J. natn Cancer Inst.* 55:1265.

- Chance, B., Sies, H. y Boveris, A. (1979) *Physiol. Rev.* 59:527-605.
- Chance, B. y Hollunger, G.,(1963) *J.Biol. Chem.* 238 : 418- 431.
- Chau Y-P, Shiah S-G, Don M-J y Kuo M-L. (1998) *Free Rad. Biol. Med.* 24: 660-670.
- Cohen, G.M. y Stubberfield, C.R. (1990) *Free Rad. Res. Comun.* 8: 355-363.
- Cortese, J.D., Voglino, A.L. y Hackenbrock, C.R. (1998) *Biochemistry* 37(18): 6402-9.
- Crompton, M. (1999) *Biochem. J.* 341: 233-249.
- Crompton, M., Virji, S. y Ward, J.M. (1998) *Eur. J. Biochem.* 258: 729-735.
- de Jong, A.M.P. y Albracht S.P.J (1994) *Eur. J. Biochem.* 222: 975-982.
- De Robertis, E.D.P y De Robertis, E.M.F. (1984) en: "Biología Molecular y Celular", 10° edición, Librería "El Ateneo" Editorial Buenos Aires, págs. 257-259.
- De Groot, H., Noll, T. y Sies, H. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* 243: 556-562.
- Degrassi, F., De Salvia, R. y Berghella, L. (1993) *Mutat. Res.* 288: 263-267.
- Del Maestro, R.F. (1980) *Acta physiol. Scand.* 492: 153-168.
- Docampo, R., Cruz, F.S., Boveris, A., Muniz R.P.A.y Esquivel, D.M.S. (1978) *Biochem. Pharmacol.* 28: 723-728.
- Docampo, R. y Stoppani, A.O.M. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 197, 317.
- Docampo, R., de Souza, W., Cruz F.S., Roitman, I., Cover, V., Gutteridge, Z (1978) *Z. Parasitenkd.* 57:189.
- Dolan, M.E., Frydman, B., Thompson, C.B., Diamond, A.M., Garbiras, B.J., Safa, A.R., Beck, W.T. y Marton, L.J. (1998) *Anti-Cancer Drugs* 9: 437-448.
- Doran, E. y Halestrap, A.P. (2000) *Biochem. J.* 348(2): 343-50.
- Driscoll, J.S., Hazard, G.F. Jr y Wood, H.B. (1974) *Cancer Chemother. Rep.* 4: 1-362.
- Dubin M., Fernandez Villamil S.H., Stoppani A.O.M. (1990 b) *Biochem. Pharmacol.* 39,1151-1161.
- Dubin M.,Grinblat L.,Fernandez Villamil S.H., Stoppani A.O.M. (1987) *FEBS Lett.* 220: 197-200.
- Dubin,M., Grinblat, L. y Stoppani, A.O.M. (1990,a) en: "Enfermedades Digestivas", Vilardell, F. y col., eds., Jarpyo. Editores S.A., Madrid, Barcelona.
- Emaus, R.K., Grunwald, R. y Lemasters J.J. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 850: 436-448.
- Ernster, L. (1987) *Chemica Scripta* 27A, 1.
- Ernster, L. (1986) *Chemica Scripta* 26: 525-234.
- Fearnley, I.M. y Walker, J.E. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1140: 105-134.
- Fedotcheva, N.I., Pronevich, L.A., Mironova, G.D. (1985) *W. M. J.* 57(4): 38-43.

- Feeke, W., Sled, V.D., Ohnishi, T. y Weiss, H. (1994) *Eur. J. Biochem.* 220: 551-558.
- Fehér J., Csomós G., Vereckei A.(1987). "Free Radical Reactions in medicine" (Editorial Pa(s) , cap 1 , 3-10.
- Fernandez Villamil, S., Dubin, M., Galeffi, C. y Stoppani, A.O.M. (1990) *Biochem. Pharmacol.* 40 (10): 2343-2351.
- Fisque, C.H. y Subbarow, Y. (1925) *J. Biol. Chem.* 66: 375-400.
- Fontaine, E., Eriksson, O., Ichas, F. y Bernardi, P. (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 12662-12668.
- Fontaine, E., Ichas, F. y Bernardi, P. (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 25734-25740.
- Foote, C.S. (1982) en "Pathology of Oxygen", Foote CS. ed.), Academic Press, New York, págs. 21-44.
- Frei, B., Winterhalter, K.H. y Richter, C. (1986) *Biochemistry* 25: 4438-4443.
- Fridovich, I. (1975) *Annu. Rev. Biochem.* 44: 147-159.
- Fridovich, I. (1974) *Adv. Enzimol.* 41: 35-97.
- Fridovich, I. (1988) *Oxygen Radicals and Tissue Injury.* (Ed. Halliwell, B.) págs. 1 - 5 . The Upjohn Company, Bethesda, M.D.
- Fridovich, I. (1983) *Annu. Rev. Pharmac. Toxicol.* 23: 239-257.
- Friedrich, T. y Weiss, H. (1997) *J. Theor. Biol.* 187: 529-540.
- Frimer, A.A. (1982) en: "Superoxide Dismutase", (Overly LW, ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, vol. 2, págs. 83-125.
- Fry M. y Pudney M. (1992) *Biochem. Pharmacol.* 43: 1545-1553.
- Fukuzaka,K., Takase, S. y Tsukatani, H. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* 240: 117.
- Galeffi, C., Casinovi, C.G., Miranda Delle Monache, E. y Marini-Betollo, G.B. (1968) *Ann Ist Super Sanita* 4: 305-316.
- Galkin, A.S., Grivennikova, V.G. y Vinogradov, A.D. (1999) *FEBS Lett.* 451: 157-161.
- Gant, T.W., Rao, D.N.R., Mason, R.P., Cohen, G.M. (1988) *Chem-Biol Interact.* 65: 157-173.
- Girotti, A.W. (1985) *J.Free Rad. Biol. Med.* 1:87.
- Gojzman, S.G. y Stoppani, A.O.M. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* 240:273.
- Gornall,A.G, Bardawill,C.J. y David M.M. (1949) *J. Biol. Chem.* 177:751.
- Green, D.R. y Reed, J.C. (1998) *Science* 281: 1309-1312.
- Griffin-Green, E.A., Zaleska, M.M. y Erecinska, M. (1988) *Biochem. Pharmacol.* 37: 3071-3077.
- Grunberg, E. y Titsworth, E. H. (1973) *Ann. Rev. Microbiol.* 27:317.
- Gunter, T.E. y Pfeiffer, D.R. (1990) *Am. J. Physiol.* 258: C755-C786.

- Gupte, S.S. y Hackenbrock, C.R. (1988) *J. Biol. Chem.* 263(11): 5248-5253.
- Habekorn, A. y Gonnert, R. (1972) *Arzn. Forsch. (Drug Res.)* 22: 1570-1575.
- Hackenbrock, C.R. (1967) *J. Cell Biol.* 30: 269-297.
- Hackenbrock, C.R. (1968) *J. Cell Biol.* 37: 345-369.
- Hagen, T.M., Yowe, D.L., Bartholomew, J.C., Wehr, C.M., Do, K.L., Park, J.Y. y Ames, B.N. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 3064-3069.
- Halestrap, A.P., Kerr, P.M., Javadov, S. y Woodfield, K.Y. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* 1366: 79-94.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M. (1989) en: "Free Radicals in Biology and Medicine", 2º ed., Clarendon Press, Oxford, págs. 22-179.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M. (1984) *Biochem. J.* 219: 1-14.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M. (1990) *Methods Enzymol.* 186: 1-85.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. y Cross, C.E. (1992) *J. Lab. Clin. Med.* 119: 598-620.
- Hansford, R.G., Moreno-Sanchez, R. y Lewartowski, B. (1989) *Ann. NY Acad. Sci.* 573: 240-253.
- Harris y col. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59: 830-836.
- Hatefi, Y. y Stempel, K.E. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26: 301-308.
- Hatefi, Y. (1985) *Annu. Rev. Biochem.* 54: 1015-1069.
- Hatefi, Y. (1999) en: "Frontiers of Cellular Bioenergetics: Molecular Biology, Biochemistry and Physiopathology" (Papa, S., Guerrieri, F. y Tager, J.M. es.) págs. 23-47. Plenum Press, New York.
- Hogberg, J., Orrenius, S. y O'Brien, P. J. (1975) *Eur. J. Biochem.* 59: 449-455.
- Huang, L. y Pardee, B. (1999) *Mol Med.* 5: 711-720.
- Hudson, A.T., Dickins, M., Ginger, C.D., Gutteridge, W.E., Holdich, T., Hutchinson, D.B., Pudney, M., Randall, A.W. y Laffer, U.S. (1991) *Drugs Exp. Clin. Res.* 17: 427-435.
- Hueber, A., Esser, P., Heimann, K., Kzociok, N., Winter, S. y Weller, M. (1999) *Exp. Eye. Res.* 67: 525-530.
- Hughes, W., Leoung, G., Kramer, F., Bozzette, S.A., Safrin, S., Frame, P. (1993) *N. Engl. J. Med.* 328 (21): 1521-1527.
- Ittarat, I., Asawamahsakda, W., Meshnick, S.R. (1994) *Exp. Parasitol.* 79 (1): 50-56.
- Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S. y Jap, B. K. (1998) *Science* 281: 64-71
- Joenje, H. (1989) *Mutat. Res.* 219: 193-197.
- Johnson, D. y Lardy, H. (1967) *Methods Enzymol.* 10: 94-101.
- Johnson, L.V., Walsh, M.L., Bockus, B.J. y Chen, L.B. (1981) *J. Cell Biol.* 88: 526-535.

- Kanofsky, J.R. (1989) *Chem.-Biol. Interact.* 70: 1-28.
- Kappus, H. y Sies, H.(1981) *Experientia* 37:1233-1241.
- Kedderis, G.L. y Miwa, G.T.(1988) *Drug Metab. Rev.* 19,33.
- Knobelock, L.M., Blondin, G.A., Read, H.W. y Harkin, J.M. (1990) *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19: 828-835.
- Knoll, G. y Brdiczka, D (1980) *Eur. J.Cell Biol.* 22: 281-289.
- Kolesova, G.M., Vishnivetskii, S.A. y Iaguzhinskii, L.S. (1989) *Biokhimiia* 54(1): 103-111.
- Kostyuk, V.A, y Lunets, E.F. (1983) *Biokhimiia* 48: 1491-1495.
- Krishnan, P. y Bastow, K.F. (2000) *Biochem. Pharmacol.* 60: 1367-1379.
- Kukielka, E., Dicker, E. y Cederbaum, A. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* 309:377-386.
- Kushnareva, Y.E., Campo, M.L., Kinnalli, K.W. y Sokolove, P.M. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* 366: 107-115.
- La Piana, G., Fransvea, E., Marzulli, D. y Lofrumento, N.E. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246(2): 556-61.
- Lai, C.C., Liu, T.J., Ho, L.K., Don, M.J. y Chau, I.P. (1998) *Histol. Histopathology* 13: 89-97.
- Lehninger, A.L., Carafoli, A. y Rossi, C.L. (1967) *Adv. Enzimol.* 29: 260-320.
- Lemasters, J.J. (1978) *FEBS Lett.* 88: 10-14.
- Lemeshko, V.V. (2000) *FEBS Lett.* 472(1): 5-8.
- Li, C.J., Wang, C., Pardee, A.B. (1995) *Cancer Res.* 55: 3712-3715.
- Li, C.J., Averboukh, L. y Pardee, A.B. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 22463-22468.
- Li Y-Z, Li Ch-J, Pinto, A.V. y Pardee, A.B. (1999) *Mol. Med.* 5: 232-239.
- Li, C.J., Zhang, L.J., Dezube, B.J., Crumpacker, C.S. y Pardee, A.B. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1839-1842.
- Lind, C., Hochstein, P. y Ernster, L. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 216, 178.
- Lofrumento, N.E., Marzulli, D., Cafagno, L., La Piana, G. y Cipriani, T. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* 288(1): 293-301.
- Lohret, T.A., Jensen, R.E. y Kinnalli, K.W. (1997) *J. Cell Biol.* 137: 377-386.
- Lopez Shirley, K., Zhang, F., Gosser, D., Scott, M., Meshnick, S.R. (1994) *J. Lab. Clin. Med.* 123 (1): 126-130.
- Loschen, G., Flohe, L. y Chance, B. (1971) *FEBS Lett.* 18: 261-264.
- Maiorino, M., Roveri, A., Ursini, F. y Gregolin, C. (1985) *J. Free Rad. Biol. Med.* 1: 203.

- Manna, S.K., Gad, Y.P., Mukhopaahyay, A. y Aggarwal, B.B. (1999) *Biochem. Pharmacol.* 57: 763-774.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jürgensmeier, J.M., Susin, S.A., Vieira, H.L.A., Prévost, M.-C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J.C. y Kroemer, G. (1998) *Science* 281: 2027-2031.
- Marzulli, D., La Piana, G., Fransvea, E. y Lofrumento, N.E. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259(2): 325-30.
- Mc Cormack, J.G., Halestrap, A.P. y Denton R.M. (1990) *Physiol. Rev.* 70: 391-425.
- Mc Calla, D.R. (1983) *Environ. Mutagen.* 5: 745.
- Mc Cord, J.M. y Fridovich, I (1969) *J. Biol. Chem.* 244: 6049.
- Mc Lenan, H.R y Esposti, M.D. (2000) *J. Bioenerg. Biomembr.* 32(2): 153-162.
- Mitchel, P. (1976) *J. Theoret. Biol.* 62: 327-367.
- Molina Portela, M.P., Pahn, E.M. de, Galeffi, C. y Stoppani, A.O.M. (1991) *Rev. Arg. Microbiol.* 23: 1-14.
- Molina Portela, M.P., Fernández Villamil, S.H., Perissinotti, L.J. y Stoppani, A.O.M. (1996) *Biochem. Pharmacol.* 52: 1875-1882.
- Moreno-Sanchez, R. (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 12554-12560.
- Moreno-Sanchez, R. y Hansford, R.G. (1988) *Biochem. J.* 256: 403-412.
- Morrison, D (1976), "Multivariate Statistical Methods", Mac Graw-Hill, Inc.Kogakusha, Ltda.
- Ohnishi, T., Ragan, C.I. y Hatefi, Y. (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 2782-2788.
- Okun, J.G., Lümmen, P y Brandt, U. (1999) *J. Biol. Chem.* 274(5): 2625-2630.
- Öllinger, K. y Brunmark, A. (1991) *J. Biol. Chem.* 266(32): 21496-21503.
- Paulino, M., Hansz, M., Hikichi, N., Tabares, G., Molina Portela, M.P, Fernández Villamil, S.H., Sreider, C.M. y Stoppani, A.O.M. (1994) *An. Asoc. Quím. Argent.* 82: (5) 371-389.
- Pederson T.C., Buege J.A. y Aust S.D. (1973) *J. Biol. Chem.* 248 (7): 134.
- Peterson, F.J., Mason, R.P., Horsepian, J. y Holtzman, J.L. (1979) *J. Biol.Chem.* 254: 4009.
- Pietrobon, D., Di Virgilio, F. y Pozzan, T. (1990) *Biochem. J.* 193: 599-622.
- Pink, J.J., Planchon, S.M., Tagliarino, C., Varnes, M.E., Siegel, D. y Boothman, D.A. (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 5416-5424.
- Placer E.A., Cushmau L., Jolinton B. C. (1966) *Anal. Biochem.* 6:359.
- Planchon, S.M., Wuerzberger- Davis, S.M., Pink, J.J., Robertson, K.A., Bornman, W.G., y Boothman, G.A. (1999) *Oncol. Rep.* 3: 485-492.
- Powis, G., Svingen, B.A. y Appel, P. (1981) *Mol. Pharmacol.* 20:387.
- Richter C., Gogvadze, V., Laffranchi, R., Schlapbach, R., Schweizer, M., Suter, M., Walter, P., Yaffee, M.

(1995) *Biochem. Biophys. Acta* 1271:67-74.

Ross D., Thor H., Threadgill M.D., Sandy M.S., Smith M.T., Moldeus P., Orrenius S. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 248, 460-466.

Rouslin, W. y Broge, C.W. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 275: 385-394.

Ruck, A., Dolder, M., Walliman, T. y Brdiczka, D. (1998) *FEBS Lett.* 426: 97-101.

Schaffner - Sabba, K., Schmidt - Ruppin, K. H., Wehrli, W., Schuerch, A.R. y Wasley, J.W.F. (1984) *J. Med. Chem.* 27: 990.

Scheider, W.C. (1948) *J. Biol. Chem.* 176: 259.

Scorrano, L., Petronilli, V. y Bernardi, P (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 12295-12299.

Scorrano, L., Petronilli, V., Di Lisa, F. y Bernardi, P (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 22581-22585.

Shiah S-G, Chuang S-E, Chau Y-P, Shen S-Ch y Kuo M-L (1999) *Cancer Res.* 59: 391-398.

Sies, H. (1993) *Eur. J. Biochem.* 215: 213-219.

Sies, H. (1991) en: "Oxidative Stress: Oxidants and antioxidants" (Sies H. ed.), Academic Press, London, San Diego, págs. 15-22.

Slater, T.F. (1984) *Biochem. J.* 222: 1-15.

Smith, M.T., Evans, C.G., Thor, H. y Orrenius, S. (1985) en: "Oxidative Stress", Sies, H., ed., Academic Press, London, pp. 91-113.

Snyder, C.H., Merbitz-Zahradnik, T., Link, T.A. y Trumpower, B.L. (1999) *J. Bioenerg. Biomembr.* 31(3): 235-242.

Sokal, R. R. y Rohlf, F. J. (1981) "Biometry", W.H. Freeman and Company, San Francisco.

Srivastava, I. K. , Rottenberg, H. y Vaidya, A. B. (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 3961-3966.

Steel R.G.D. y Torrie (1985), "Bioestadística: Principios y procedimientos", Mc Graw-Hill, Colombia.

Svingen, B. A., O'Neal, F. O. y Aust, S.D. (1979) *J. Biol. Chem.* 254:5892.

Talcott, R.E., Smith, M.T. y Giannini, D.D. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* 241: 88-94.

Territo, P.R., Mootha, V.K., French, S.A. y Balaban, R.S. (2000) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278: C423-C435.

Thayer, W.S. (1988) *Biochem. Pharmacol.* 37: 2189-2194.

Thompson, R. H. (1971), *Naturally occurring Quinones.* Academic Press, London.

Thor, H., Smith, M.T., Hartzell, P., Bellome, G., Jewell, S.A. y Orrenius, S. (1982) *J.Biol.Chem.* 257:12419.

Tran, Q.H., Bongaerts, J., Vlad, D., Uden, G. (1997) *Eur. J. Biochem.* 244: 155-160.

Trumpower, B.L. (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 11409-11412.

- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yano, R. y Yoshikawa, S. (1996) *Science* 272: 1136-1144.
- Turrens, J.F. (1997) *Biosci. Rep.* 17: 3-8.
- Ursini, F., Maiorino, M. y Gregolin, C. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 839: 62.
- Van den Bossche, M. (1978) *Nature* 273:626.
- Vanni, A, Fiore, M., De Salvia, R., Cundari, E., Ricordy, R., Ceccarelli, R. y Degrassi, F. (1998) *Mut. Res.* 401: 55-63.
- Veeger, C., Der Vartanian, D.V. y Zeylemaker, W.P. (1969) en: "Methods in Enzymology", Lowenstein, J.M., eds., Academic Press, New York, 13: 81-84.
- Walker, J.E. (1992) *Q. Rev. Biophys.* 25:253-324.
- Walker, J.E., Collinson, I.R., van Raaij, M.J. y Runswick, M.J. (1995) *Methods. Enzymol.* 260: 163-190.
- Weiss, H. y Friedrich, T. (1991) *J. Bioenerg. Biomembr.* 23: 743-771.
- Wikström, M.K.F. (1984) *FEBS Lett.* 169: 300-304.
- Wills, E.D. (1972), *Biochem. Pharmacol.* 21:1879-1883.
- Wu E.Y., Smith, M.T., Bellomo, G. y Di Monte, D. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* 282: 358-362.
- Wuerzberger S.M., Pink, J.J., Planchon, S.M., Byres, K.L., Bornmann, W.G. y Boothman, D.A. (1998) *Cancer Res.* 58: 1876-1885.
- Xia, D., Yu, C.-A., Kim, H., Xia, J.Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L. y Deinsenhofer, J. (1997) *Science* 277: 60-66.
- Yamada, E.W. y Huzel, N.J. (1989) *Biochemistry* 28: 9714-9718.
- Yano, T., Yagi, T., Sled, V.D. y Ohnishi, T. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 18264-18270.
- Yano, T., Sled, V.D., Ohnishi, T. y Yagi, T. (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 5907-5913.
- Young, R.C., Ozols, R. F., Myers C. E. (1981) *New Engl. J. Med.* 305:139.
- Yue, W.H., Yu, L. y Yu, C.A. (1991) *Biochemistry* 30: 2303-230.
- Zakharova, N.V, Zharova, T.V. y Vinogradov, A.D. (1999) *FEBS Lett.* 444: 0211-216.
- Zhang, Z., Huang, L., Shulmeister, V.M., Chi, Y.-I, Kim, K.K., Hung, L.-W., Crofts, A.R., Berry, E.A. y Kim, S.-H. (1998) *Nature* 392: 677-684.
- Zoratti, M. Y Szabò, I. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1241: 139-176.