



220
g.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Efecto de Benzoquinonas Sintéticas sobre los
mecanismos de conservación de energía de
Mitocondrias aisladas de hígado de rata”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

B I O L O G O

P R E S E N T A

HECTOR VIADIU ILARRAZA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

Julio de 1990



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

INDICE DE ABREVIATURAS	2
INDICE DE FIGURAS, TABLAS, GRAFICAS Y FORMULAS	4
RESUMEN	6
INTRODUCCION	7
EL AREA DE ESTUDIO DE LA BIOENERGETICA	7
LA PRODUCCION DE ATP POR LAS CELULAS	9
LA MITOCONDRIA ES UN ORGANULO TRANSDUCTOR DE ENERGIA	10
Distribución de las enzimas mitocondriales	11
SISTEMA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES Y FOSFORILACION OXIDATIVA	12
COENZIMA Q	16
Distribución de la coenzima Q	17
Propiedades químicas de la coenzima Q y compuestos relacionados	18
La química de homólogos de la coenzima Q	18
La química de análogos de la coenzima Q	19
Antagonistas de la coenzima Q	23
Funcionamiento de la coenzima Q	27
El ciclo Q protón-motriz	27
La poza de quinonas	30
Difusión de la coenzima Q en la membrana	36
Reacciones vectoriales de la coenzima Q	38
Proteínas que unen coenzima Q	39
PEREZONA	41
OBJETIVO	43
MATERIALES Y METODOS	44
RESULTADOS	49
DISCUSION	65
CONCLUSIONES	71
REFERENCIAS	73

INDICE DE ABREVIATURAS

a	Citocromo a
a ₃	Citocromo a ₃
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADP	Difosfato de adenosina
AP	Anilido de perezona
ARN	Acido ribonucleico
ATP	Trifosfato de adenosina
b ₅₆₂	Citocromo b ₅₆₂
b ₅₆₆	Citocromo b ₅₆₆
BAL	British-anti-Lowisite ó 2,3-dimercaptopropanol
c	Citocromo c
c ₁	Citocromo c ₁
CNQ	3- -ciclohexilooctil-2-hidroxi-1,4-naftoquinona
CoQ ₁₀	Coenzima Q, el subindice indica el número de unidades isopreno.
CoQ	7- -ciclohexilooctil-6-hidroxi-5,8-quinolinquinona
DB	2,3-dimetoxi-5-metil-6-decil-1,4-benzoquinona
DBMIB	2,5-dibromo-3-metil-6-isopropilbenzoquinona (dibromotimoquinona)
DCCD	Diciclohexilcarbodiimida
Delta μ_{H^+}	La diferencia de potencial electroquímico para los protones de dos fases separadas por una membrana (en mV); en ocasiones llamada fuerza protón-motriz
DNP	Dinitrofenol
E _m	Potencial redox estándar a un determinado pH (en mV)
EP	Epoxiperezona
EPR	Resonancia paramagnética del electrón
ESR	Resonancia del espín del electrón
F ₀	Una subunidad de la ATP sintasa
F ₁	La subunidad catalítica de la ATP sintasa de mitocondria
FAD	Dinucleótido de flavina y adenina
Fe-S	El grupo prostético de una clase de proteínas redox que contienen un hierro no hemo ácido lábil
FMN	Mononucleótido de flavina
H _e ⁺ , H _m ⁺	Los protones que se encuentran del lado de la matriz o del lado citoplasmico de la membrana
HFB	2,3-dimetoxi-5-hidroxi-6-farnesil-1,4-benzoquinona
HMHQ	7-(n-heptadecil)mercapto-6-hidroxi-5,8-quinolinquinona

HP	Hidroxiperezona
HPB	2,3-dimetoxi-5-hidroxi-6-fitol-1,4-benzoquinona
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y de adenina reducido
NADPH	Fosfato del dinucleótido de nicotinamida y de adenina
NMR	Resonancia magnética nuclear
P	Perezona
PB	2,3-dimetoxi-5-metil-6-pentil-1,4-benzoquinona
PDB	6-pentadecil coenzima Q ₆
Pi	Fósforo inorgánico
Q ₁₀	Coenzima Q, el subíndice indica el número de unidades isopreno
Q _m	Coenzima Q activa
Q _i	Coenzima Q inactiva
Q ₀ C ₁₀ NAPA	2,3-dimetoxi-5-metil-6-[10-[3-(azido-2-nitroanilino)-propionoxil]decil]-1,4-benzoquinona
Q-Q ₀ C ₁₀ TMPOC	2,3-dimetoxi-5-metil-6-[10-(2,2,5,5-tetrametil-3-pirrolin-1-oxil-3-carboxi)decil]-1,4-benzoquinona
TMPD	Tetrametil-p-fenalinindiamina (mediador rédox)
TFA	Tenoiltrifluoroacetona
UHDBT	5-n-undecil-6-hidroxi-4,7-dioxobenzotiazol
UQ, UQH, UQH ₂	Formas oxidada, semiquinona y reducida de la coenzima Q, los subíndices indican el número de unidades isopreno.

INDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRAFICAS

FIGURAS

Figura 1. Corte de una mitocondria de higado de rata	10
Figura 2. Esquema del sistema de transporte de electrones y fosforilación oxidativa	15
Figura 3. Coenzima Q	16
Figura 4. Reacción rédox de quinonas	19
Figura 5. Ciclo Q próton-motriz	27
Figura 6. Posible orientación de las quinonas isoprenoides en las bicapas lipídicas	35
Figura 7. Perezona	41 y 50
Figura 8. Hidroxiperezona	50
Figura 9. Anilido de perezona	50
Figura 10. Perezona reducida en la cadena lateral	50
Figura 11. Epoxiperezona	50
Figura 12. Derivado V	50
Figura 13. Derivado VI	50

TABLAS

Tabla 1. Pesos moleculares, polipéptidos, grupos prostéticos y abundancia relativa de los complejos I, II, III, IV y V en la membrana interna mitocondrial	13
Tabla 2. Concentración de los componentes rédox en las crestas mitocondriales	31
Tabla 3. Efecto de la perezona en la respiración con glutamato-malato y succinato	42
Tabla 4. Efecto de los derivados de la perezona sobre la respiración inducida por ADP en los sitios 1 y 2	51
Tabla 5. Efecto de la perezona reducida en la cadena lateral sobre la actividad de citocromo oxidasa	59
Tabla 6. Efecto de la perezona reducida en la cadena lateral y la hidroxiperezona sobre el estado IV mitocondrial ..	60

GRAFICAS

- Gráfica I. Efecto de la perezona reducida en la cadena lateral sobre la respiración estimulada de mitocondrias (glutamato-malato) 48
- Gráfica II. Efecto de la PRCL sobre la respiración estimulada de mitocondrias (succinato) 51
- Gráfica III. Efecto de la hidroxiperezona sobre la respiración estimulada de mitocondrias (glutamato-malato) ... 49
- Gráfica IV. Efecto de la HP sobre la respiración estimulada de mitocondrias (succinato) 52
- Gráfica V. Efecto de la PRCL sobre la respiración estimulada por valinomicina a diferentes temperaturas 56
- Gráfica VI. Efecto de la PRCL sobre la actividad de ATPasa de mitocondrias de hígado de rata 57

RESUMEN

En este trabajo se utilizaron derivados sintéticos de la perezona. La perezona interfiere con los procesos de oxidoreducción de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Se determinó el efecto de algunos derivados sobre el consumo de oxígeno y la actividad de ATPasa de mitocondrias aisladas de hígado de rata, con el objeto de esclarecer la interacción de estas benzoquinonas con el sistema de fosforilación oxidativa de la mitocondria. El objetivo principal de este proyecto es entender la participación de la coenzima Q en los mecanismos de conservación de energía de la cadena respiratoria mitocondrial.

Los derivados de la perezona con un radical polar en la cadena sesquiterpénica no inhiben el consumo de oxígeno. Los derivados que mostraron un efecto mayor sobre la respiración fueron la perezona reducida en la cadena lateral (PRCL) y la hidroxiperezona (HP). Esta inhibición ocurre en el segmento de la cadena que está entre la coenzima Q y el citocromo c. El sitio 2 es más sensible que el 1 a la inhibición por la PRCL y la HP. La concentración necesaria de PRCL para inhibir un 75% el consumo de oxígeno desacoplado (valinomicina) es de 8 nmoles por mg de proteína, mientras que la HP necesita 25 nmoles y la perezona 265 nmoles para producir el mismo efecto. La HP y la PRCL no mostraron un efecto protonofórico. La PRCL estimula la actividad basal de ATPasa y tiene un efecto bifásico de inhibición-estimulación de la actividad hidrolítica de ATPasa inducida por la valinomicina y el dinitrofenol (DNP).

El mecanismo propuesto para explicar el efecto de la perezona es que esta molécula actúa como un vertedero de electrones que a temperatura ambiente acepta los electrones de la cadena respiratoria y los regresa a ella muy lentamente, lo que resulta en una inhibición del consumo de oxígeno. Nuestros datos no pueden ser explicados por este modelo, ya que la inhibición por la PRCL no es reversible por la temperatura. Es probable que la inhibición producida por la PRCL y la HP sea directa sobre los sitios sensibles a antimicina y mixotiazol, de una forma similar a la producida por la 7-(n-heptadecil)mercapto-6-hidroxi-5,8-quinolinquinona (HMHQQ).

I N T R O D U C C I O N

Si preguntáramos al hombre comun como los organismos mantienen durante su vida una organización tan compleja, tal vez nos diria que debido al consumo y transformación de los alimentos ingeridos; sin embargo, para un fisico esta pregunta presenta un desafío muy especial, ya que los organismos vivos parecen contradecir una de las leyes fundamentales de la física, la enunciada por Clausius a mediados del siglo XIX, conocida como la segunda ley de la termodinámica, que dice que los conjuntos organizados de materia tienden a la desorganización, y que alcanzan mayor desorden a través del tiempo. En la actualidad se sabe que las células se ajustan al cumplimiento de esa ley, al mantener un orden interno en estado estacionario dinámico, a expensas de la luz solar y los elementos nutritivos transformados por el metabolismo (1).

El metabolismo desempeña cuatro funciones específicas: 1) obtener energía química a partir de la degradación de compuestos ricos en energía, provenientes del medio, o de la captura de la energía solar; 2) convertir las moléculas nutricias en agentes precursores de las macromoléculas de las células; 3) reunir dichos compuestos precursores a fin de sintetizar elementos más complejos como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, polisacáridos y otros componentes celulares y 4) sintetizar, así como degradar, las biomoléculas que se necesitan en las funciones especializadas de las células(1).

EL AREA DE ESTUDIO DE LA BIOENERGETICA

Del estudio de la primera de estas funciones, es decir la

obtención de energía química, se encarga la Bioenergética; aunque todas las reacciones bioquímicas incluyen cambios de energía, los especialistas tienden a restringir sus investigaciones a un tipo particular de procesos que ocurren en cierta clase de membranas. El tema central de la Bioenergética es el estudio de los mecanismos por medio de los cuales la energía disponible de la oxidación de sustratos o la absorción de luz, puede ser usada para realizar reacciones que implican un gasto de energía, tales como la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP) a partir de difosfato de adenosina (ADP) y fósforo inorgánico (Pi) o la acumulación de iones a través de una membrana (2).

Aun cuando en ocasiones la síntesis de ATP ocurre en sistemas solubles, la mayor proporción se verifica en complejos enzimáticos integrados a las membranas. Las membranas, a las que están unidas estas proteínas, se conocen como membranas transductoras de energía; las principales son la membrana plasmática de la mayoría de las bacterias, la membrana interna mitocondrial y la membrana tilacoidal del cloroplasto (2).

Las membranas transductoras de energía presentan rasgos característicos en cuanto a la síntesis del ATP. Cada una de ellas tiene dos sistemas proteicos distintos. Uno conocido como ATPasa, aunque más correctamente debería ser llamado ATP sintasa, que cataliza la síntesis no espontánea de ATP a partir de ADP y Pi. Todas las membranas transductoras de energía contienen dicha enzima. La naturaleza del segundo sistema depende de la fuente primaria de energía de que dispone cada membrana; en el caso de las mitocondrias o las bacterias aerobias es la cadena respira-

toría la que cataliza la transferencia espontánea de electrones de los sustratos oxidables a los aceptores finales, como el oxígeno (O_2). En el caso de los cloroplastos y las bacterias fotosintéticas, el segundo sistema es una cadena de electrones movilizadora por la absorción de luz visible dando lugar a la formación de oxígeno y a la generación de NADPH y ATP (2).

LA PRODUCCION DE ATP POR LAS CELULAS

La búsqueda de un intermediario químico que acoplara la oxidación de los sustratos oxidables a la síntesis del ATP originalmente propuesto por Slater (3), significó un gran esfuerzo, sin éxito. Fue hasta 1961 cuando Peter Mitchell (4), postuló la hipótesis quimiosmótica en la que propone que el intermediario buscado era un gradiente de protones generado a través de la oxidación de sustratos que cedían su energía a los complejos redox de la membrana. La parte fundamental de la hipótesis quimiosmótica establece que la cadena de transporte de electrones de las mitocondrias, los cloroplastos o las bacterias, está acoplada a la síntesis del ATP por el potencial electroquímico del protón ($\Delta \mu_{H^+}$) en las membranas transductoras de energía. El potencial electroquímico del protón es una medida termodinámica de cuán distante del equilibrio se halla el gradiente de protones. La transferencia de electrones y la síntesis del ATP son catalizadas por proteínas que funcionan por separado que bombean protones; esta transferencia y síntesis son reversibles. El $\Delta \mu_{H^+}$ generado por el transporte de electrones, se usa para que una bomba de protones dependiente de la hidrólisis del ATP funcione en dirección contraria, por ejemplo en la síntesis

LA MITOCONDRIA ES UN ORGANULO TRANSDUCTOR DE ENERGIA

Las funciones primarias de las mitocondrias consisten en la conservación de la energía proveniente de la oxidación de sustratos y su utilización para la síntesis del ATP. Una mitocondria promedio, ya sea la de un mamífero o de un eucarionte más simple, como la levadura, tiene aproximadamente las mismas dimensiones que la bacteria Escherichia coli. Comúnmente se presenta como una partícula ovalada de 1 a 2 μm de largo y 0.5 a 1 μm de ancho (6).

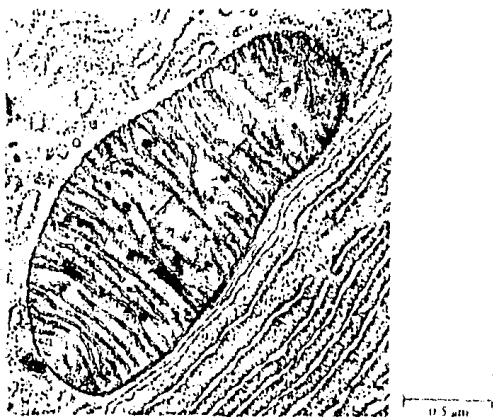


Figura 1. Corte de una mitocondria de hígado de rata que muestra las cuatro estructuras (7)

Típicamente, una mitocondria tiene dos membranas separadas, las cuales conforman dos espacios internos diferentes. La membrana periférica, conocida como externa, es una cubierta ininterrumpida que rodea totalmente el contenido del orgánulo. La segunda membrana es interna con respecto a la anterior y también

constituye un espacio continuo. Debido a que la membrana interna forma una serie de invaginaciones llamadas crestas, su longitud es mucho mayor que la externa (6).

El espacio intermembranal se localiza entre las membranas interna y externa, y la matriz está delimitada por la membrana interna (véase figura 1) (6).

Distribución de las enzimas mitocondriales

El desarrollo de algunas técnicas ha permitido la separación de las membranas mitocondriales y los componentes de los compartimientos. Gracias a dicha separación se ha podido precisar la distribución de diversas enzimas en el orgánulo (6).

A-Membrana externa. Contiene un número considerable de enzimas; sin embargo, no constituyen ninguna vía metabólica completa, y por lo tanto, los datos de composición no dan una idea clara acerca de la función de dicha membrana. Las dos enzimas más frecuentemente usadas como marcadores de la membrana externa son la monoamina oxidasa y la NADH-oxidasa insensible a rotenona, incluye asimismo varias enzimas relacionadas con la biosíntesis de los fosfolípidos. También tiene proteínas, llamadas porinas, que actúan como poros inespecíficos para solutos de menos de 10 kilodaltones (kD) (6).

B- Membrana interna. La fosforilación oxidativa es la función más importante de la mitocondria. Esta actividad es catalizada por cuatro complejos respiratorios y por la ATP sintasa. Estas cinco enzimas se localizan en la membrana interna y constituyen gran parte de la masa de la membrana. Además de los complejos respiratorios y la ATPasa, en la membrana interna se locali-

zan la piridin-nucleotido-transhidrogenasa, la β -hidroxibutirato-deshidrogenasa, y los sistemas responsables del transporte de iones, sustratos y nucleótidos. Las concentraciones de NADH y NADPH están separadas de las del citosol, mientras que las concentraciones del ADP y el ATP se encuentran comunicadas con las del citosol por medio del translocador de nucleótidos de adenina (6).

C-Espacio intermembranal. Se han encontrado muy pocas actividades enzimáticas en el espacio intermembranal, la más importante de ellas es la de la adenilato-ciclase la que probablemente mantiene el balance adecuado de nucleótidos de adenina en el orgánulo (6).

D-Matriz. Casi todas las enzimas solubles de la mitocondria se hallan en este espacio. La lista de actividades es muy extensa, pero las que encierran particular importancia son los sistemas enzimáticos del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y de la oxidación de ácidos grasos. La matriz contiene además ADN, ARN de transferencia, aminoacil-transferasas, ADN y ARN polimerasas, y otros componentes de la maquinaria mitocondrial de transcripción y traducción (6).

SISTEMA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES Y FOSFORILACION OXIDATIVA

El sistema de fosforilación oxidativa de los eucariotes se localiza en la membrana interna mitocondrial, la cual se integra con ~70% de proteína y ~30% de lípidos. Los lípidos predominantes son la fosfatidilcolina (~40%), la fosfatidiletanolamina (~35%) y la cardiolipina (~15%) (8). En mitocondrias de corazón de res. el ~50% de la proteína de la membrana interna está asociada con los

sistemas de enzimas que catalizan la fosforilación oxidativa, el resto incluye varias proteínas transportadoras y enzimas que actúan como donadoras de electrones a la cadena respiratoria. Funcionalmente, el sistema de fosforilación oxidativa está compuesto de cinco complejos enzimáticos lipoproteicos (9). Estos son:

- NADH:ubiquinona oxidorreductasa (complejo I),
- Succinato:ubiquinona oxidorreductasa (complejo II),
- Ubiquinol:ferricitocromo c oxidorreductasa (complejo III),
- Ferrocitocromo c:oxígeno oxidorreductasa (complejo IV), y
- ATP sintasa (complejo V) (9).

En la tabla 1 se presenta la información referente a pesos moleculares, composición polipeptídica, grupos prostéticos y proporciones relativas aproximadas de los complejos respiratorios en mitocondrias de corazón de res. De los aproximadamente 60 poli-

Complejo	A	B	C	D	E
I	0.7 a 0.9	25	- -	FMN, centros Fe-S	1
II	0.14	4 a 5	- -	FAD, centros Fe-S hemo b ₅₅₉	2
III	0.25	9 a 11	1	hemo b ₅₆₂ , b ₅₅₈ , c ₁ centro [2Fe-2S]	3
IV	0.16 a 0.17	13	3	hemo a _{a3} , Cu _a , Cu _{a3}	6 a 7
V	0.5	12 a 14	2	nucleótidos de adenina, Mg ²⁺	3 a 5

A- Peso molecular x 10⁶ (monomero). B- Polipéptidos. C- Polipéptidos codificados en el ADN mitocondrial. D- Grupos prostéticos. E- Abundancia relativa en mitocondrias.

Tabla 1. Características de los complejos I, II, III, IV y V de la membrana interna mitocondrial (9)

peptidos distintos que forman a estos cinco complejos enzimaticos, se sabe que en los mamiferos tan solo seis de ellos estan codificados por el ADN mitocondrial y son sintetizados dentro de la mitocondria; el resto de las proteinas son producto de los ribosomas citoplasmicos e importadas a las mitocondrias (10).

Los cinco complejos enzimaticos del sistema de fosforilacion oxidativa mitocondrial interactuan funcionalmente como se muestra en la figura 2. Los complejos I, II, III y IV, la coenzima Q y el citocromo c constituyen la cadena respiratoria. Los acarreadores de electrones de la cadena respiratoria son estructuras quinoides flavin-mononucleotido (FMN), flavin-adenin-dinucleotido (FAD) y coenzima Q (CoQ) y complejos de metales de transicion grupos fierro-azufre, hemo y cobre unido a proteinas. Las estructuras quinoides y los grupos fierro-azufre predominan en la region de potencial redox (E_m) < 0, y los hemo y el cobre en la region de E_m > 0. Como se observa en la escala del E_m en la parte superior de la figura 2, los acarreadores de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial parecen constar de tres regiones casi equipotenciales, en las cuales los cambios de energia son menores de 100 mV. Tambien existen intervalos (representados por los espacios entre los corchetes en la escala de E_m de la figura 2) en que las diferencias de energia entre los componentes de la cadena respiratoria son mayores de 100 mV. No se conoce el significado de estas caracteristicas en relacion al mecanismo de transduccion de energia por la cadena respiratoria mitocondrial; tan solo se sabe que en las regiones casi equipotenciales hay un maximo de conservacion de energia (9).

En tres reacciones de oxido-reduccion de la cadena respira-

toria (representadas por los complejos I, III y IV) la energía de oxidación se conserva por un proceso de translocación vectorial de protones y genera un potencial electroquímico ($\Delta\mu_{H^+}$) a través de la membrana. La energía potencial así producida puede ser utilizada para la síntesis del ATP. Si se cubre el gasto de energía necesario, toda la cadena respiratoria puede ser reversible, excepto el paso final donde la transferencia de electrones desde el citocromo a_3 al oxígeno no lo es. Este hecho es importante ya que desplaza el equilibrio del sistema hacia la translocación de protones (9).

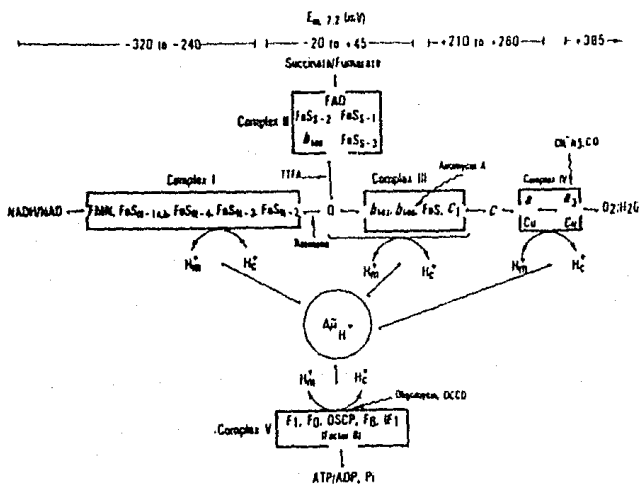


Figura 2. Esquema del sistema de transporte de electrones y fosforilación oxidativa, que muestra los componentes de los complejos I, II, III, IV y V, y el acople energético a través del $\Delta\mu_{H^+}$ entre los complejos transductores de energía I, III, IV y V. La escala E_m es aplicable a todos los componentes de la cadena respiratoria, excepto FeS_{N-1a} ($E_{m\text{comp}} = -400$ mV), FeS_{N-2} ($E_{m\text{comp}} = -400$ mV), y b_{558} ($E_{m\text{comp}} = -100$ mV) (9)

Los complejos I, III y IV aislados e incorporados a vesículas fosfolipídicas sintéticas catalizan la translocación de protones acoplada a la transferencia de electrones; además la incorporación conjunta de los complejos I o IV con la ATP sintasa en liposomas ha reconstituido la fosforilación oxidativa (11 a 13).

COENZIMA Q

El descubrimiento de la coenzima Q fue hecho por Crane, Hatefi, Lester y Widmer en 1957 (14). Realizaron este hallazgo al tratar de reconstituir el transporte de electrones con dos fracciones, una de deshidrogenasas y otra de citocromos, parecía que les faltaba algo para restaurar el flujo de electrones. Esta molécula faltante, que resultó ser la coenzima Q, fue hallada en extractos de los lípidos de la membrana mitocondrial.

En 1958 el grupo de Folkers (15) reportó por primera vez la estructura química de la coenzima Q con su núcleo 2,3-dimetoxi-5-metilbenzoquinona como estructura básica y su cadena de isoprenos monoinsaturados (véase figura 3). La serie completa de homólogos de la coenzima Q con 1 a 12 unidades isopreno fue sintetizada en 1971 por Mayer e Isler (16).

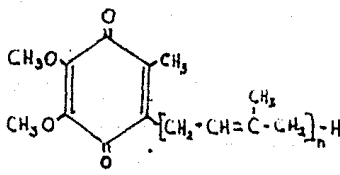


Figura 3. Coenzima Q_n
($n=1$ a 12)

Distribución de la coenzima Q

Existen tres quinonas lipídicas con largas cadenas laterales isoprenoides que se encuentran ampliamente distribuidas, estas son: coenzimas Q (ubiquinonas, 2-metil-5,6-metoxi-1,4-benzoquinona), plastoquinonas (2,3-metil-1,4-benzoquinona) y vitaminas K (menaquinonas, 2-metil-1,4-naftoquinona). La coenzima Q se presenta naturalmente tan sólo en animales; la plastoquinona no se encuentra no es absorbida ni metabolizada por los animales, mientras que la vitamina K debe provenir de una fuente externa, pero su forma activa no es como quinona. En plantas superiores se encuentran los tres tipos de quinonas, además del tocoferol. En la mayoría de microorganismos se encuentran coenzima Q o menaquinonas con cadena isoprenoide de distintos tamaños, en pocas bacterias están ambas presentes y en algunas no se encuentran quinonas (17).

En los animales superiores, la coenzima Q_{10} es la forma predominante; la rata es la excepción más notable, pues la Q_9 es el homólogo más abundante, con solamente una pequeña cantidad de Q_{10} (17). En cuanto a la distribución intracelular de coenzima Q en eucariontes, en su inicio se consideró que estaba predominantemente localizada en las mitocondrias, hasta que Sastry y col. presentaron por primera vez evidencia de que la coenzima Q se hallaba distribuida en los componentes celulares de la siguiente forma: núcleo 25 a 30%, mitocondria 40 a 50%, microsomas 15 a 20% y fracción soluble 5 a 10% (17).

El aparato de Golgi parece concentrar toda la coenzima Q de la fracción microsomal y se han encontrado evidencias de su par-

ticipación en la transferencia transmembranal de electrones. Se ha señalado que la membrana plasmática pudiera carecer de coenzima Q (17).

Propiedades químicas de la coenzima Q y compuestos relacionados

Las características más importantes de la química de la coenzima Q en relación a su función son las propiedades redox de su grupo quinona y las propiedades físicas de su cadena lateral isoprenoide (18).

-La química de homólogos de la coenzima Q

Como se muestra en la figura 3, la serie de la coenzima Q abarca el núcleo 2,3-dimetoxi-5-metil-6-poliprenilbenzoquinona con cadenas que contienen de 1 a 12 unidades isoprenoides.

Los homólogos de la coenzima Q del 1 al 12 son solubles en la mayoría de solventes orgánicos, aunque no en agua debido a sus largas cadenas laterales hidrofóbicas. Únicamente los homólogos del 6 al 12 pueden ser obtenidos en forma cristalina a temperatura ambiente (18).

Debido a que los potenciales de oxidación-reducción pueden ser determinados por polarografía o por titulación reductiva, hay una variación entre los valores reportados para compuestos puros y quinonas en varios orgánulos (18). El valor del potencial más frecuentemente citado está entre +104 mV y +112 mV para la coenzima Q aislada, para partículas submitocondriales de corazón de res es de +65 mV, para mitocondrias de vegetales es de +70 mV y para el par ubiquinona/ubiquinol en Rhodospseudomonas es de +92 mV. Las formas semiquinonas de muchas benzoquinonas sustituidas dan potenciales redox más altos, especialmente si son de vida

corta; en el caso de semiquinonas de la coenzima Q, los potenciales rédox de los radicales pueden ser disminuidos alrededor de los +100 mV al estabilizarlos por medio de la unión con la correspondiente apoproteína (18).

Las quinonas pueden presentar reacciones con aminas, con grupos sulfhidrilos, de oxido-reducción, de acetilación de oxidación de un fosfato quinol y de formación de quinhidronas (18). Las reacciones biológicas más simples y más frecuentemente observadas de las quinonas son las de oxidación-reducción (vease figura 4). La coenzima Q_{10} y sus homologos pueden ser parcialmente reducidos por un electrón a la forma semiquinona o totalmente a la forma ubiquinol cuando aceptan dos electrones. Las quinonas aisladas pueden ser fácilmente reducidas a compuestos leuco incoloros con ditionita de sodio alcalina, borohidrato alcalino, zinc, hidrogeno catalitico u otros agentes reductores. Estas formas leuco de quinonas pueden ser reoxidadas por exposición al aire u oxigeno (18).

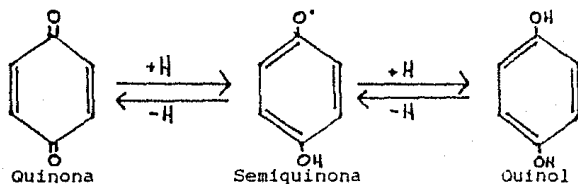


Figura 4. Reacción rédox de quinonas

-La química de análogos de la coenzima Q

Todos los aspectos de la estructura de la coenzima Q han sido modificados por síntesis, aunque algunos de sus análogos,

como la serie epoxiubiquinona y la rodoquinona se presentan en forma natural (18).

Entre los análogos con sustituyentes en el anillo benzoquinona se encuentran: la rodoquinona (2-2-amino-3-metoxi-6-metil-5-multiprenil-1,4-benzoquinona), los análogos hidroxí, los etoxi, los bromuro y los cloruro (18).

La rodoquinona ha sido el único compuesto del tipo de la coenzima Q encontrado en el músculo de Ascaris. Sato y col. (19) encontraron que la rodoquinona específicamente restablece la actividad de succinato oxidasa en mitocondrias del músculo de Ascaris, mientras que la coenzima Q no lo hace.

Los derivados 5-hidroxí de varios análogos de la coenzima Q 6-alkil benzoquinona han sido sintetizados y probados sobre la actividad de las NADH y succinato oxidasas de mitocondrias por Catlín y col. (20). En cada caso la actividad enzimática fue inhibida entre un 20 y un 60% por estos análogos de la coenzima Q.

La etoxicoenzima Q restablece en 40% la actividad de partículas transportadoras de electrones de mitocondrias de corazón de res extraídas con iso-octano; derivados de la coenzima Q sustituidos por dietoxi-, isoamiloxi- o diisoamiloxi- restablecen la actividad entre un 1 y un 10% (21).

Catlín y col. (20) encontraron que un grupo hidroxí en la posición 5 inhibía más que el bromo o el cloro como sustituyentes en el mismo sitio.

También se han sintetizado análogos de la coenzima Q con diversas modificaciones en la cadena lateral isoprenoide, entre estos cambios están la sustitución de la cadena lateral, la satu-

ración de la misma o la orientación del doble enlace.

La bromo-decil-coenzima Q fue sintetizada por Yu y Yu (22) para usarla en el análisis del segmento ubiquinol-citocromo c-reductasa de mitocondria, y demostraron que el espectro de la quinona unida a proteína se desplazaba a 282 nm, siendo que sin la proteína absorbe a 290 nm. También se emplea como patrón en el restablecimiento de la actividad en membranas carentes de quinona y fosfolípidos, ya que produce un restablecimiento total (22). La epoxiubiquinona muestra la misma actividad in vitro que la coenzima Q para restablecer la actividad de succinato oxidasa, pero el sistema de NADH oxidasa es inhibido en un 85% (18).

La dihidro coenzima Q₁₀, la cual difiere de la coenzima Q₁₀ en que tiene un isopreno terminal saturado o reducido, restablece de igual forma que la coenzima Q₁₀ la actividad de mitocondrias extraídas con acetona, es decir las modificaciones en la cadena lateral de la molécula de coenzima Q no son críticas para la actividad (18).

La fitil- ó hexahidro-coenzima Q₄ pueden recuperar un 40% de la actividad de la succinato oxidasa (23).

Cuando a una rata se le administra intracardialmente perhidro-coenzima Q, molécula en que la cadena lateral está totalmente saturada, ésta es retenida en el hígado por periodos más largos que la coenzima Q normal. Finalmente, un 40% de la quinona total del hígado de la rata es sustituida por el análogo de cadena lateral saturada, pero no se observan diferencias en la función mitocondrial (18).

Imada y Morimoto (24) probaron isómeros *cis* y *trans* de

varios análogos de coenzima Q en la recuperación de la actividad de la succinato-oxidasa en mitocondrias de hígado de rata extraídas con acetona y concluyeron que el doble enlace trans-2',3' de la cadena lateral isoprenoide era esencial para la máxima actividad de la succinato-oxidasa.

Para identificar las proteínas que unen a la coenzima Q, Yu y Yu (22 y 25) han sintetizado algunos análogos marcados radioactivamente, tales como el Q₁₀C₁₀ NAPA (2,3-dimetoxi-5-metil-6-[10-[3-(4-azido-2-nitroanilino)-propionoxil]decil]-1,4-benzoquinona) y otros derivados azido de la coenzima Q, con sustituciones del grupo azido en las posiciones 2, 3 y 6 del anillo quinona. Estos derivados de la coenzima Q han resultado ser extremadamente valiosos en el aislamiento de las proteínas que unen a la coenzima Q y en estudios de reconstitución.

Con la idea de indagar el ambiente próximo a la coenzima Q en su sitio de unión, Yu y Yu (26) construyeron un derivado de la coenzima Q marcado con spin llamado coenzima Q₁₀ TMOPOC (2,3-dimetoxi-5-metil-6-[10-(2,2,5,5-tetrametil-3-pirrolin-1-oxil-3-carboxil)decil]-1,4-benzoquinona). Cuando este derivado marcado con spin interaccionaba con la ubiquinol-citocromo c-reductasa depletada de coenzima Q y fosfolípidos, la marca del spin se inmobilizó completamente. Sin embargo, cuando estos fosfolípidos se agregaron, la marca del spin fue similar a la mostrada en un ambiente hidrofóbico. Indicando que la cadena lateral alquil de la coenzima Q está extendida dentro de la región hidrofóbica de la reductasa intacta y tiene cierto grado de movilidad.

-Antagonistas de la coenzima Q

Hay dos tipos de antagonistas de la coenzima Q: 1) aquellos que muestran modificaciones de la estructura de coenzima Q en el anillo benceno o en la cadena lateral. Muchos de éstos ya han sido discutidos, pero aquí se hará énfasis en los análogos de la coenzima Q que muestran una mayor actividad biológica en mitocondrias aisladas y otros sistemas; 2) aquellos cuya estructura química no es similar a la de coenzima Q, pero que son inhibidores efectivos de las cadenas de transporte de electrones in vitro (18).

A. Antagonistas con similitudes estructurales a la coenzima Q

Hendlin y Cook (21) y Lenaz y col. (23), probaron diversos análogos de la coenzima Q modificados con variaciones en la longitud y la saturación de la cadena lateral isoprenoide y en el núcleo quinona. Concluyeron que para restablecer la actividad de mitocondrias de corazón de res extraídas con isooctano, se requiere de la estructura 2,3-dimetoxi-5-metil-6-alkilbenzoquinona con al menos 15 átomos de carbono. Ramasarma y Lester (27), también observaron la oxidación y reducción de muchas quinonas en mitocondrias.

Crane y Ehrlich (28) encontraron que se necesitaban lípidos neutros para la recuperación de la actividad de succinato-oxidasa con coenzima Q₁₀ y quinonas con cadenas laterales largas isoprenoides; los análogos de la cadena corta fueron más efectivos en ausencia de lípidos neutros presentes (7).

Catlin y col. (20 y 29) sintetizaron y probaron análogos 5-hidroxi de la coenzima Q con variaciones de la cadena lateral de

geranil a nonadecil; en mitocondrias intactas el mejor inhibidor de los sistemas de NADH y succinato-oxidasa fue la 2,3-dimetoxi-5-hidroxi-6-fetil-1,4-benzoquinona. Cuando sustituyeron Br o Cl en la posición cinco del anillo bencénico, la coenzima resultante no fue tan inhibitoria como cuando tenia el grupo hidroxilo. Bogentoft y col. (30) obtuvieron análogos 5-hidroxi de la coenzima Q₁, y compararon su actividad en los sistemas NADH y succinato-oxidasa. Muchos de estos análogos con variaciones en la cadena lateral isoprenoide inhibieron más del 50% de la actividad.

Wan y Folkers (31), encontraron que la 2,3-dimetoxi-5-metil-6-pentil-1,4-benzoquinona (PB) y la 2,3-dimetoxi-5-metil-6-decil-1,4-benzoquinona (DB), que son análogos de la coenzima Q₁ y la Q₂, eran tan buenos para restablecer la actividad como los dos homólogos de la coenzima Q. El 6-pentadecil coenzima Q₃ (PDB) no era tan bueno como los análogos Q₁ y Q₂. Ackrell y col. (32) observaron que la PB podía ser usada como aceptor de electrones en el sistema de succinato-ubiquinona-reductasa, pero que bloqueaba el transporte de electrones desde la succinato-deshidrogenasa al depósito de quinonas en el lado del oxígeno del centro HiFIP.

Phelps y Crane (33), midieron la inhibición del transporte de electrones mitocondrial del NADH, el succinato o el duroquinol al oxígeno con los siguientes análogos de quinona: 5-ciclohexil-n-pentil-6-hidroxi-2,3-dimetoxi-1,4-benzoquinona y 2-ciclohexil-n-pentil-3-hidroxi-1,4-naftoquinona.

Jeng y col. (34), probaron muchos análogos de la piericidina A como inhibidores del transporte mitocondrial de electrones. Se han encontrado dos sitios de acción de la piericidina A: 1) uno

de inhibición a bajas concentraciones de piericidina A altamente específico cerca de la NADH-deshidrogenasa, que puede ser el mismo que el sitio de la rotenona; y 2) otro en la vía de la succinato-deshidrogenasa donde la inhibición es reversible por coenzima Q.

Las ubicidinas son unas sustancias relacionadas a la piericidina A. Gutman y Kliatchko (35) determinaron su capacidad de inhibición. Estos compuestos fueron derivados 2-alkil de la 5,6-metoxi-3-metil-4-piridona, con una longitud variable de la cadena lateral desde prenil, geranil, farnesil y fitil hasta solanesil. La ubicidina-3 inhibe en el mismo sitio que la piericidina A; el efecto de estos dos inhibidores es aditivo, y la ubicidina-3 puede prevenir la unión de la piericidina A.

Otro antagonista de la coenzima Q, que ha mostrado que inhibe la oxidación del succinato y del NADH por mitocondrias de levadura, es la 5-n-undecil-6-hidroxi-4,7-dioxobenzotiazol (UHDBT), como demostraron Roberts y col. (36). Trumpower y Haggerty (37) localizaron la inhibición por UHDBT en el segmento de citocromos bc₁ de la cadena respiratoria. Bowyer y col. (38), han usado UHDBT en Rhodospseudomonas sphaeroides para ver la inhibición del centro Rieske hierro-azufre y la reducción del citocromo c₂.

La 7-(n-heptadecil)mercapto-6-hidroxi-5,8-quinolinquinona (HMHQQ) es otro antagonista de la coenzima Q, como mostraron Roberts y col. (36), al inhibir la oxidación del NADH y el succinato en mitocondrias de levaduras. El grupo de Slater usó HMHQO para identificar dos sitios diferentes de unión de la

coenzima Q en la QH_2 -citocromo c-oxidoreductasa (39).

B. Inhibidores competitivos de la coenzima Q

En 1971, el grupo de Folkers (40) sintetizó y probó 16 5,8-quinolinquinonas como antimetabolitos de la coenzima Q. Dos de estos compuestos fueron efectivos: 7- -ciclohexiloctil-6-hidroxi-5,8-quinolinquinona (COQ) y 3- -ciclohexiloctil-2-hidroxi-1,4-naftoquinona (CNO). Posteriormente, Skelton y col. (41), encontraron que la COQ y la CNO inhibían la NADH-citocromo c-reductasa y la succinato-coenzima Q-reductasa competitivamente.

La 7- -octadecilmercapto-6-hidroxi-5,8-quinolinquinona es un buen inhibidor de las actividades de NADH y succinato-oxidasas (18). La 6- -ciclohexiloctil-7-hidroxiquinolinquinona también inhibe la actividad de succinato-oxidasas y mostró potencialidades como una droga antimalárica (42). Los análogos hidroxi de la coenzima Q han sido probados en mitocondrias de levaduras por Castelli y col. (43); quienes encontraron inhibición producida por la 2,3-dimetoxi-5-hidroxi-6-fetil-1,4-benzoquinona (HPB). Las coenzimas Q_2 y Q_6 pueden revertir la inhibición de la NADH-oxidasas, pero no de la succinato-oxidasas. La HPB y la 2,3-dimetoxi-5-hidroxi-6-farnesil-1,4-benzoquinona (HFB) actúan como inhibidores de la coenzima Q_6 , el homólogo de la coenzima Q más abundante en la levadura.

Trebst y col. (44) informaron que el análogo de la ubiquinona 2,5-dibromo-3-metil-6-isopropilbenzoquinona (dibromotimoquinona, DBMIB) bloquea el transporte de electrones en cloroplastos a nivel de la plastoquinona, así como que actuaba como un inhibidor competitivo en mitocondrias de corazón de res, al nivel de los

citocromos bc_1 . También se ha observado una inhibición reversible del transporte de electrones por DBMIB en Escherichia coli.

Funcionamiento de la coenzima Q

El ciclo Q proton-motriz. En su forma original la teoría quimiosmótica predice la existencia de tres asas redox distintas, una por cada sitio de acoplamiento; sin embargo, la evidencia obtenida mediante una amplia variedad de estudios, no apoya esta predicción. El número de componentes de la cadena respiratoria que transporta a los protones y electrones es muy limitado. La formación de dos diferentes asas redox es directa; pero la construcción de una tercera asa distinta requiere la incorporación de componentes hipotéticos que aun no se descubren (45).

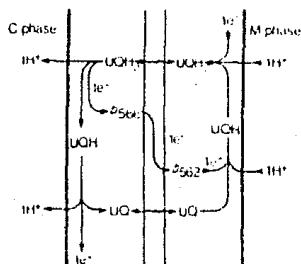


Figura 5. Ciclo Q proton motriz (46)

A fin de explicar la pérdida aparente de una tercera asa redox, Mitchell modificó su proposición original y propuso la existencia de un ciclo Q (véase figura 5), en que un par de electrones pueden translocar cuatro protones conforme se movilizan a través de las moléculas acarreadoras asociadas con la coenzima Q y el citocromo bc_1 (complejo III). En este modelo revisado, el complejo I translocaría dos protones (esto corres-

pondería con el sitio de acoplamiento I) y serían cuatro los protones translocados por la coenzima Q y los citocromos bc₁ (lo que correspondería con los sitios de acoplamiento II y III); no se translocaría ningún protón adicional en la última parte de la cadena respiratoria, en donde al parecer no existe ningún aceptor de protones (45).

Antes de que fuese postulado el ciclo Q, se tenían dos problemas que eran difíciles de reconciliar con la idea de una cadena respiratoria lineal, en la que los electrones fluían del sustrato al oxígeno. El primero de ellos era explicar la translocación de protones de una vía de dos electrones desde el sustrato hasta el sistema de los citocromos a una vía de un solo electrón desde los citocromos hasta el oxígeno. Un segundo problema era que el estado redox del citocromo b era diferente del esperado en una cadena de transporte lineal de electrones. Una evidencia crucial en contra de la participación del citocromo b en una cadena lineal, se encontró al ver que la adición de 2,3-dimercaptopropanol (British-anti-Lewisite o BAL) o antimicina corta el flujo de electrones entre los citocromos b y c, mientras que al utilizar los dos a la vez se inhibía la reducción de los b (46).

En 1975, Mitchell postuló que la coenzima Q desempeña un papel no sólo en la transferencia de equivalentes de reducción del NADH y el succinato, sino también en la transferencia de electrones entre los citocromos b y c₁. También mostró cómo los citocromos b transportaban los electrones a través de la membrana, y catalizan la reducción y la oxidación de la ubisemiquinona (o su dismutación), con el resultado de que dos protones son translocados por cada electrón transferido al citocromo c₁ (46).

Existen diversas evidencias en favor del ciclo Q en mitocondrias, entre las cuales se encuentran las siguientes:

1) Para la reducción del citocromo b hay dos vías, una requiere de las proteínas Fe-S de Rieske, por lo tanto, es sensible a BAL pero no a antimicina, y la otra es sensible a antimicina pero no a BAL. La primera se explica por la reducción del ferricitocromo b_{558} por ubisemiquinona externa que es formada por la oxidación de QH_2 por el grupo Fe-S. La cantidad de citocromo b rápidamente reducible es equiparable a la cantidad del grupo Fe-S que sobrevive al tratamiento con BAL. Esta vía también es sensible a mixotiazol, que se cree previene la reacción del QH_2 con la proteína Fe-S, y a varios análogos de la coenzima Q, que incluyen a la HMQO, que inhibe la oxidación de la proteína Fe-S por el citocromo c_1 . La segunda vía es la reducción del b_{562} por la QH_2 , cerca de la cara interna de la membrana, vía el reverso de la oxidación del citocromo b por la ubisemiquinona interna, que normalmente ocurre en el transcurso del ciclo Q. Esta reacción es sensible a antimicina. Ambas vías son sensibles a HMQO, pero a bajas concentraciones se inhibe específicamente la segunda vía (46).

2) Se han identificado mediante RPE las dos especies de ubisemiquinonas postuladas por Mitchell (47).

3) Ya que la concentración de ubisemiquinona libre en equilibrio con la quinona libre y el quinol es muy baja, y la dismutación es muy alta, la detección de las especies de semiquinona implica que deben estar preferencialmente unidas (con respecto al quinol y la quinona), presumiblemente a las proteínas que unen quinona, des-

cubiertas por King y su grupo; por lo tanto, la existencia de estas proteínas es una evidencia a favor del ciclo Q (46).

4) Cuando se introducen electrones dentro de la QH_2 :citocromo c oxidoreductasa por medio de un pulso de luz en presencia de centros de reacción aislados de cromatóforos, citocromo c de mamífero y antimicina, la velocidad con que el citocromo b_{562} es reducido es la misma que la de los citocromos c + C_1 (46).

A pesar de todos estos datos a favor del ciclo Q, también existen otros resultados que no pueden ser explicados con este modelo. Para abarcar todos estos datos se ha propuesto que el complejo III funciona como un dímero (48); sin embargo, no ahondaremos más en este tema ya que el modelo del ciclo Q es igual de útil y más fácil de abordar para nuestra discusión.

La poza de quinonas. En las mitocondrias existe una gran poza de coenzima Q funcional entre las deshidrogenasas primarias y la porción citocromo de la cadena de transporte de electrones (49 y 50). Su localización está bien establecida gracias al uso de inhibidores que evitan tanto la oxidación como la reducción de la quinona (26). Se ha visto que la extracción de la quinona de la membrana interrumpe la reducción por NADH o succinato en casi todos los citocromos (51).

La coenzima Q es de 5 a 10 veces más abundante que las deshidrogenasas o los citocromos (véase tabla 2). Lo que ha motivado la aseveración de que se encuentra como un depósito redox entre las deshidrogenasas y los citocromos. También la cinética de su oxidación-reducción es consistente con su función (51). Green había vislumbrado que la coenzima Q, por ser liposoluble, podría ser un

acarreador móvil de bajo peso molecular entre los grandes complejos fijos de proteínas, tales como los complejos I y II y el complejo III (51). Klingenberg ha enfatizado la similitud del NADH y la coenzima Q como coenzimas con capacidad de transferir hidrógenos, al actuar la coenzima Q como un colector de electrones de las distintas enzimas unidas a flavoproteínas (51).

Componente	Concentración ($\mu\text{mol/g prot}$)
Deshidrogenasa del succinato (FAD)	0.28
Deshidrogenasa del NADH (FMN)	0.23
Hierro no-hemo	3.3
Coenzima Q	3.4 a 4.5
Citocromo b (total)	0.8
Citocromo c + c ₁	0.3
Citocromo a + a ₃	1.6
Cobre	1.6

Tabla 2. Concentración de los componentes redox en las crestas mitocondriales (51)

No se tiene certeza de como se encuentra el depósito de quinonas en la membrana, pero las posibilidades parecen ser limitadas y estar sujetas a estudio experimental. Crane (51), correlaciona varios estudios relativos a las reacciones redox de quinonas, la extracción, la exposición a la superficie y las relaciones entre la estructura y la función con conceptos de la estructura de la membrana para encontrar un lugar para la coenzima Q en la membrana; sus conclusiones son las siguientes:

1. El intercambio redox completo de todas las moléculas de coenzima Q. Kroger y Klingenberg han mostrado que el 90% de la coen-

zima Q mitocondrial sufre un cambio redox proporcional a la tasa de oxidación del succinato o el NADH y que esta coenzima Q (Q_m) actúa como un depósito homogéneo. El 10% de la coenzima Q (Q_1) es inactiva y la Q_1 aumenta conforme la membrana envejece (51).

2. La coenzima Q no está unida a proteína. La facilidad con que se extrae la ubiquinona de la membrana con solventes orgánicos, se ha tomado como evidencia de que la quinona no está fuertemente unida a proteína (51). Un argumento más convincente puede surgir de la observación de que es posible incorporar más de tres veces el contenido original de coenzima Q activa en una membrana extraída con pentano (51). La coenzima Q en la membrana tiene un máximo de absorbencia a 275 nm al igual que en etanol, por lo tanto no se puede observar una desviación espectral que indique que está unida a proteína (51); sin embargo, este punto aún está en discusión, como veremos más adelante, ya que Yu y Yu (52) han mostrado pruebas de la existencia de proteínas que unen quinona.

3. La larga cadena lateral isoprenoide. Las cadenas laterales de las coenzimas Q_6 a Q_{10} (25 a 45 carbonos) son aproximadamente tan largas como las cadenas de ácidos grasos combinadas en las bicapas membranales (dos ácidos grasos tienen de 28 a 40 carbonos). Todos los dobles enlaces de la coenzima Q son trans, lo que produce una configuración recta que podría extenderse completamente a través de la bicapa lipídica. Como alternativa, la coenzima Q podría formar una capa dentro de la bicapa lipídica con las cadenas isoprenoides perpendiculares a las cadenas de ácidos grasos de los lípidos (51).

4. Los efectos de la modificación de la cadena isoprenoide. Al

restablecer la actividad de oxidasa después de la extracción con solventes, la cadena lateral toda cis o completamente saturada tiende a ser menos activa que el compuesto natural todo trans (51).

La presencia de un doble enlace en el primer carbono de la cadena lateral o de un grupo hidroxilo en el tercer carbono, reducen mucho la actividad. La larga cadena recta toda trans es más activa, ya que al alterar la posición del doble enlace o al adicionar un grupo hidroxilo puede cambiar la posición del anillo quinona en relación a la proteína de la membrana (51).

5. El anillo quinona no está expuesto en la superficie de la membrana. Los compuestos hidrofílicos que no penetran en las crestas de la membrana no causan la oxidación o reducción de la coenzima Q en ella, aunque sí producen su oxidación o reducción al estar suspendida en agua. La adición de una coenzima Q liposoluble de cadena corta (u otra quinona como la menadiona), permite la interacción con la coenzima Q interna. Para alcanzar una alta tasa de oxidación de $UO_{1.0}H_2$ por las membranas de las crestas, se necesita añadir detergente. Parece que el anillo quinona está protegido en ambos lados de la membrana por una capa hidrofóbica. Esto es consistente con la observación de Chance en cuanto a que el apagado de la fluorescencia del anillo quinona, ocurre solamente con una sonda bifluorescente que penetra 14 Å dentro de la membrana, es decir, cerca de la mitad de la bicapa lipídica (51).

6. La extracción diferencial y el restablecimiento de quinonas. Frecuentemente se ha observado que la extracción parcial de la coenzima Q por pentano, no inhibe en la misma proporción todos los sistemas de oxidasas. En mitocondrias de corazón la actividad

de succinato-oxidasa se pierde antes que la de la NADH-oxidasa. En mitocondria de cerebro, la actividad de α -glicero-fosfato-oxidasa se pierde primero, seguida por la NADH-oxidasa y succinato-oxidasa. El restablecimiento también muestra diferencias, la actividad de succinato-oxidasa se restablece con niveles más bajos de coenzima Q que la de la NADH-oxidasa en mitocondrias de corazón, y la actividad de NADH-oxidasa es restablecida completamente con niveles menores de coenzima Q, que la succinato-oxidasa de mitocondrias de cerebro. Parte de la diferencia entre la pérdida y el restablecimiento de la actividad por diferentes cadenas, puede estar relacionada con la extracción de factores desconocidos; por ejemplo, el factor P, el cual restablece la actividad de la succinato-oxidasa sin coenzima Q en mitocondrias de corazón extraídas con pentano, u otros factores lipídicos desconocidos (51).

Como conclusión, Crane dice que el depósito de coenzima Q parece ser cinéticamente homogéneo, pero estructuralmente diferenciable, con el anillo quinona escondido de la superficie de la membrana. La pregunta continua siendo si el anillo quinona está en el interior hidrofóbico de la bicapa lipídica (véase figura 6) o en el interior hidrofílico de una doble bicapa (51). En ambos arreglos los anillos quinona pueden interactuar todos como un depósito, además se sabe que las tasas de difusión lateral en las bicapas lipídicas son rápidas (10^9seg^{-1}), mientras que el "flip-flop" a través de las membranas tiende a ser lento (10^{-9}seg^{-1}) (53). La doble bicapa permitiría un depósito aparentemente simple, pero si la quinol deshidrogenasa para la cadena del NADH está en

una bicapa y la deshidrogenasa para el succinato en la otra, podrían ser explicadas la extracción diferencial y el restablecimiento. Los protones para la formación de la hidroquinona podrían estar más accesibles en la región hidrofílica (51).

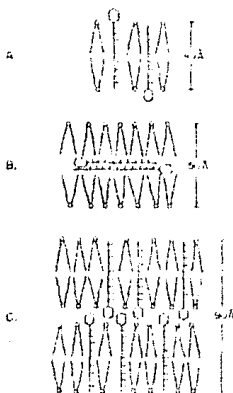


Figura 6. Posible orientación de las quinonas isoprenoides en las bicapas lipídicas. La alternativa B mantiene al anillo quinona protegido del ambiente acuoso por una capa hidrofóbica (51)

Por otro lado, es generalmente más aceptada una estructura de bicapa simple más aceptada para la organización lipídica de la membrana y la extracción diferencial podría estar relacionada al pegado diferencial de la quinona u otros lípidos a la quinol deshidrogenasa y las proteínas asociadas. La colocación hidrofóbica también es favorecida por las pruebas fluorescentes (51).

Puede ser que los solventes orgánicos extraigan los compuestos del interior de una bicapa más fácilmente que los elementos de la bicapa misma (51).

Ciertos inhibidores del transporte de electrones actúan en la porción de la ubiquinona-citocromo c-reductasa; algunos pueden reaccionar en el sitio primario de deshidrogenasa, mientras que otros actúan en otros componentes del complejo deshidrogenasa. El uso de estos inhibidores, tales como los mencionados en la sección de antagonistas de la coenzima Q, ayuda a definir el sitio o los sitios del complejo donde puede ocurrir la oxidación del quinol (51).

Difusión de la coenzima Q en la membrana. La organización estructural de la cadena respiratoria es aún controvertida, particularmente en la región de la coenzima Q. Se pueden visualizar dos condiciones extremas: a) La cadena está organizada en un estado líquido; los grandes complejos lipoproteicos están azarosamente distribuidos en el plano de la membrana, donde se mueven libremente por difusión lateral. La coenzima Q y el citocromo c son también acarreadores electrónicos móviles, y su velocidad de difusión es más rápida que la de los grandes complejos proteicos; sus frecuencias de difusión acopladas a colisión pueden ser mayores o menores que cualquier paso de reacción en los complejos, y consecuentemente la transferencia de electrones puede estar limitada por la reacción o la difusión. b) Alternativamente los componentes de la cadena están presentes como agregados, que van desde pequeños agregados de pocos complejos hasta el extremo de un complejo en estado sólido. Los agregados pueden ser permanentes o temporales, pero su duración en el tiempo debe ser mayor que cualquier reacción de transferencia de electrones. La diferencia entre los dos modelos concierne al mecanismo de transfe-

rancia de electrones: en el modelo azaroso la ubiquinona asegura la transferencia de electrones al difundirse entre los complejos, mientras que en el modelo en grupos todas las reacciones redox ocurren por transferencia de electrones en estado sólido (54).

El modelo de colisión azarosa ha sido elaborado por Hackenbrock y su grupo, quienes han mostrado evidencia convincente que bajo las condiciones comúnmente empleadas todos los componentes de la cadena respiratoria realizan difusión lateral independiente y la transferencia de electrones es un proceso acoplado a la difusión. Hackenbrock también ha postulado que la transferencia de electrones tiene una velocidad limitada por la difusión de sus componentes redox más rápidos (la coenzima Q y el citocromo c) (54).

La difusión de la coenzima Q en sistemas modelo y en la membrana mitocondrial interna, probada por el apagamiento de la fluorescencia, en pruebas de unión de membranas, se ha visto que es muy alta, con un coeficiente de difusión de $10^{-6} \text{cm}^2 \text{seg}^{-1}$, lo que sugiere que la coenzima Q está en el plano medio de la membrana. El cálculo de las distancias recorridas en el trayecto azaroso de la quinona en la membrana da como resultado que se produzcan gran número de colisiones por reacción de la cadena respiratoria. Las evidencias indican que la ubiquinol-citocromo c-reductasa no trabaja al límite de difusión de su sustrato ubiquinol y que la transferencia completa de electrones no está controlada por la difusión de la coenzima Q entre el complejo I y los citocromos b-c₁ (la actividad de NADH-citocromo c-reductasa es independiente de la distancia entre los complejos) (55).

Reacciones vectoriales de la coenzima Q. El grupo de Hauska (56 y 57) estudio las reacciones vectoriales de quinonas, compararon la capacidad de distintas moléculas quinoideas para conducir electrones y protones de la ditionita al ferricianuro contenido en liposomas. Obtuvieron los siguientes resultados:

1. La plastoquinona y las ubiquinonas, con una cadena lateral de más de dos isoprenos, son mucho mejores mediadores que sus homólogos de cadenas más cortas. También otras benzoquinonas sin una larga cadena lateral son malos catalizadores, excepto la dimetilmetilendioxi-p-benzoquinona, compuesto altamente autooxidable. El tocoferol es asimismo un buen catalizador (56).
2. Las vitaminas K_1 (filoquinona) y K_2 (menaquinona) son mediadores ineficientes en comparación con la vitamina K_3 (56).
3. La reacción catalizada por quinonas con cadenas laterales largas tiene una energía de activación tres veces mayor, independientemente de su eficiencia catalítica (56).
4. La reacción catalizada por quinonas sin una cadena lateral larga sigue una cinética de pseudoprimer orden, mientras que las quinonas con una cadena lateral larga siguen una cinética de orden mayor (56).
5. La tasa de reacción con la coenzima Q_1 aumenta al subir el pH, en tanto que la de la coenzima Q_3 disminuye (56).
6. La reacción mediada por quinonas de cadena corta se satura con concentraciones más bajas de ditionita (56).

Con base en estos datos, Hauska y su grupo concluyeron que las quinonas isoprenoides pueden translocar protones y electrones en membranas lipídicas, y que la cadena lateral es determinante

en el mecanismo (56 y 57).

Proteínas que unen coenzima Q. La esencia del ciclo Q es la participación de los radicales ubisemiquinona en ambos lados del citocromo b, tanto en el lado de la matriz como en el lado del citoplasma. La constante de estabilidad del radical semiquinona en fosfolípidos con un pH neutro, ha sido estimada en alrededor de 10^{-12} , la cual es bajísima como para participar en la reacción de transferencia de electrones en el sitio II de la cadena respiratoria. Por lo tanto, la estabilización del radical semiquinona a través de la formación de un complejo con uno o más componentes redox es necesaria para llevar el E_m de OH/Q y QH_2/OH a los niveles cinéticamente competentes de los otros componentes redox del sitio II y así inhibir la dismutación de la coenzima Q. Esto implica la unión de la coenzima Q a proteína durante la reacción de transferencia de electrones (58).

La diferente distribución de la coenzima Q entre los complejos lipoproteicos podría ser utilizada como evidencia de la interacción específica de la coenzima Q con los componentes redox. Quizá la naturaleza hidrofóbica de la coenzima Q, el exceso molar de la coenzima Q presente en la membrana mitocondrial interna (comparada con los componentes redox) y la facilidad con la cual la mayor parte de la coenzima Q es extraída de las partículas mitocondriales han hecho que los investigadores enfatizen la función de la coenzima Q como una molécula móvil y subestimen la unión específica entre la coenzima Q y la proteína (58).

En preparaciones de succinato-citocromo c-oxidoreductasa cuando la concentración de coenzima Q disminuye por debajo del

nivel del citocromo c_1 , se observa una estimulación de la actividad al añadir coenzima Q exógena. Esta fue el primer indicio de una proteína que uniera a la coenzima Q en la succinato-citocromo c-oxidoreductasa. Si la coenzima Q estuviera únicamente disuelta en la fase fosfolipídica de la succinato-citocromo c-oxidoreductasa, no esperaríamos una estequiometría fija (58).

El hecho de que los fosfolípidos sean removidos antes que la coenzima Q al precipitarse con sulfato de amonio y colato, ha apoyado la idea de una interacción entre la coenzima Q y proteínas. También se ha visto que se requiere de determinada secuencia de adición de la coenzima Q y los fosfolípidos para restablecer al máximo la actividad de la succinato-citocromo c-oxidoreductasa carente de coenzima Q y fosfolípidos. La actividad máxima u original fue restablecida solamente cuando la coenzima Q fue añadida antes que los fosfolípidos. La adición de los fosfolípidos previa o junto con la coenzima Q, restablece sólo parcialmente la actividad, a menos de que se use con abundante exceso la coenzima Q. Esto sugiere que hay sitios de unión específicos para la coenzima Q en la succinato-citocromo c-oxidoreductasa y que son cubiertos muy fácilmente por los fosfolípidos cuando no está la coenzima Q (58).

Se ha realizado el aislamiento de un polipéptido denominado QPs, que une coenzima Q y convierte a la succinato-deshidrogenasa soluble en la succinato-coenzima Q-reductasa. Se ha propuesto la existencia de proteínas con funciones similares en la NADH-deshidrogenasa y en el segmento de los citocromos $b-c_1$ (58).

PEREZONA

La perezona es una benzoquinona sesquiterpenica (vease figura 7), aislada por vez primera por Rio de la Loza en 1852, que se obtuvo de raices de plantas del genero Perezia (59). Su estructura quimica fue definitivamente establecida por resonancia magnetica nuclear y comprobada al realizar su sintesis total (60).

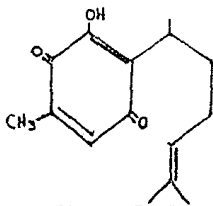


Figura 7. Perezona

La perezona pura se presenta en forma de unos cristales dorados con un punto de fusión entre 100 y 103°C, con una desviación óptica de -17° (en éter) y con una absorción en el ultravioleta en la región de 206 (log e 4.15), 266 (log e 4.05) y 412 nm (log e 3.01) (61). El potencial rédox de la perezona fue determinado por titulación potenciométrica y espectrométrica, y es de +487 mV en solución acuosa. El pK del grupo OH disociable es de 6.9 (62).

Las características químicas de la perezona sugieren que puede ser útil en el estudio de sistemas de óxido-reducción en los cuales las quinonas desempeñan un papel importante como intermediarios en el transporte de electrones (62).

La perezona inhibe la respiración mitocondrial estimulada por ADP, valinomicina, gramicidina y desacoplantes como el 1799 con glutamato-malato y succinato como sustratos oxidables (véase

tabla 3) (62).

El efecto de la perezona en el consumo de oxígeno estimulado por valinomicina es críticamente dependiente de la temperatura; a 20°C inhibe en 80 a 90% la respiración, mientras que a 35°C disminuye drásticamente la inhibición (62).

	Consumo de O ₂ (nát O ₂ /mg prot*min)			
	Glut-Malato		Succinato	
	Control	Perezona (265 nmoles/ mg prot)	Control	Perezona (265 nmoles/ mg prot)
Estado IV	25	24	32	30
ADP	175	38	170	50
Valinomicina	197	50	196	60
Gramicidina	160	45	156	65
1799	180	38	142	60

Tabla 3. Efecto de la perezona en la respiración con glutamato-malato y succinato (62)

La perezona es un compuesto donador y aceptor de electrones que se comporta de una forma similar a la naftoquinona. Sirve de mediador en el transporte de electrones desde un centro de reacción de Rhodopseudomonas sphaeroides a citocromo c (62). La baja tasa de respiración de mitocondrias de hígado de rata carentes de coenzima Q₁₀ se ve aumentada por la perezona. La actividad de transporte de electrones de la perezona ha sido demostrada con mutantes E3-24 de levadura carentes de la coenzima Q (62).

OBJETIVO

El trabajo que presentamos consiste en la determinación del efecto de algunos derivados sintéticos de la perezona sobre el consumo de oxígeno y la actividad de ATPasa de mitocondrias aisladas de hígado de rata.

El objetivo principal de este proyecto es entender la participación de la coenzima Q en los mecanismos de conservación de energía de la cadena respiratoria mitocondrial, en los complejos I, II y III de la cadena de transporte de electrones. En lo particular, nuestro proyecto con los derivados sintéticos de la perezona, junto con el realizado en el laboratorio con la perezona (62), está enfocado hacia el esclarecimiento de la interacción de estas benzoquinonas con el sistema de fosforilación oxidativa de la mitocondria; para ello se utilizaron derivados sintéticos de la perezona con modificaciones en las distintas partes de su estructura.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

REACTIVOS

1. Medio para aislar mitocondrias de higado de rata

Sacarosa 0.25 M - EDTA 1mM pH 7.4 (ajustado con TRIS).

2. Determinación de proteína, método de Biuret

NaOH 10%

Colato de sodio 4%

Sulfato de cobre 1%

3. Determinación del control respiratorio y el consumo de oxígeno

Sacarosa 0.25 M pH 7.4 2.6 ml (glutamato-malato)

2.7 ml (succinato)

2.6 ml (ascorbato-TMPD)

Cloruro de potasio 1 M 10 µl

Cloruro de magnesio 0.1 M 80 µl

Acido fosfórico 0.1 M pH 7.4 0.1 ml

Glutamato 0.1 M pH 7.4 0.1 ml

Malato, o 0.1 M pH 7.4 0.1 ml

Succinato, o 0.1 M pH 7.4 0.1 ml

Ascorbato 15 mg/ml pH 7.4 0.1 ml

TMPD 1.4 mg/ml pH 7.4 0.1 ml

ADP 20 mg/ml pH 7.4 10 µl (control resp.)

4. Determinación de actividad de ATPasa

Sacarosa-EDTA 0.25 M pH 7.4 0.75 ml

TRIS 0.2 M pH 7.4 50 µl

Cloruro de potasio 1 M 50 µl

Cloruro de magnesio 0.1 M 40 µl

Mitocondrias	100 mg/ml		10 μ l
ATP	60 mg/ml	pH 7.4	0.1 ml
5. Determinación de fosforo por el método de Sumner			
Molibdato de amonio	6.6%		
Acido sulfurico	7.5 N		
Sulfato ferroso	10%.	añadir 1 ml de ácido sulfurico 7.5 N por cada 50 ml	
Estándar: Fosfato monobásico de potasio	0.01 M		

6. Los derivados de la perezona utilizados en este trabajo fueron sintetizados por la M en C Ma. Esther Garcia y Virgilio Mendoza, de la Escuela Quimica-Farmacobiologica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

METODOS

1. Obtención de mitocondrias por fraccionamiento (63)

Todos los pasos descritos a continuación, excepto el primero, se efectuaron a una temperatura de 0 a 4°C.

- Se sometió a ayuno a una rata macho de -250 g por 12 horas.
- Se sacrificó a la rata con un golpe en la cabeza. Se extrajo el hígado y se picó en la solución de sacarosa con objeto de lavar la sangre remanente y se repitió el lavado dos veces.
- Se elaboró una suspensión de aproximadamente 30% (un volumen de hígado picado por dos volúmenes de solución de sacarosa).
- Se homogenizó con un homogenizador Evenheimer de pastilla de teflón acoplado a un motor a aproximadamente 2,500 rpm en un vaso de 50 ml.
- Se diluyó con la solución de sacarosa el producto homogenizado aproximadamente al 10% y se centrifugó a 660 x g por 10 minutos.

- f) Se decantó el sobrenadante con precaución para evitar que se contaminara con el paquete, para lo cual éste se desechó.
- g) Se centrifugó el sobrenadante a $6,800 \times g$ por 15 minutos. Se desechó el sobrenadante.
- h) Se volvió a suspender delicadamente el paquete, con una pipeta y solución de sacarosa (1 ó 2 ml por tubo de centrifuga). Se llevó a la mitad del volumen utilizado en el paso "e" y se centrifugó a $9,770 \times g$ por 15 minutos.
- i) Se eliminó el sobrenadante, y se removió con cuidado la capa floja. Se volvió a suspender el paquete en la forma descrita anteriormente. Se llevó a un cuarto del volumen empleado en el paso "e" y se centrifugó a $9,770 \times g$ por 15 minutos.
- j) Se eliminó el sobrenadante, y se removió con cuidado la capa floja, se suspendió el paquete en aproximadamente 1 ml de solución de sacarosa y con 0.5 ml de la misma solución, se lavaron los tubos. Se determinó la proteína y se diluyó de ser necesario, hasta obtener una concentración exacta de 100 mg/ml.

NOTA: Las mitocondrias obtenidas por este método tuvieron controles respiratorios en presencia de glutamato y malato, como sustratos oxidables, de 5 o más.

2. Determinación de la concentración de proteína por el método de Biuret (64)

A 0.5 ml de muestra de proteína en agua se le añadieron 2.0 ml de NaOH (10%) y 0.2 ml de colato de sodio (4%), se mezclaron bien y se añadieron 0.3 ml de sulfato de cobre (1%). Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y leyó a 540 nm.

El estándar se preparó a partir de una solución de albumina de bovino (20 mg/ml, 0.5 ml = 1.0 mg).

3. Determinación del consumo de oxígeno y del control respiratorio en mitocondrias aisladas de hígado de rata en solución de sacarosa

Se añadieron los componentes del medio de respiración enumerados anteriormente (excepto las mitocondrias y el ADP), en la cámara de un oxímetro Yellow Springs (modelo 55), previamente calibrado, a temperatura de 25°C con agitación constante; una vez estabilizado el trazo, se añadieron las mitocondrias y se registró este consumo inicial durante 1 o 2 minutos, en seguida se añadió el ADP y se siguió el consumo de oxígeno hasta su retorno al estado IV, se repitieron estas adiciones de ADP 2 o 3 veces. El cálculo de un control respiratorio se realizó por la obtención de los nátomos de O consumidos por minuto durante las dos fases de la transición estado III-IV. El volumen final fue de 3 ml.

Cuando se deseaba determinar el consumo de oxígeno por los distintos complejos de la cadena respiratoria, se añadieron los sustratos adecuados al medio de respiración: glutamato y malato para el sitio 1, succinato para el 2 y ascorbato y TMPD para el 3. Una vez estabilizado el trazo, se adicionaron las mitocondrias, y se inició el trazo experimental.

Al determinar el consumo de oxígeno a diversas temperaturas, la cámara del oxímetro se colocó en un baño de agua, con ésta a la temperatura deseada.

4. Determinación de la actividad de ATPasa

Se pusieron las soluciones del medio de reacción (excepto las mitocondrias y el ATP) en un tubo de ensayo a 4°C. Todavía en hielo, se agregaron las mitocondrias. Se incubaron un minuto en un baño de agua a temperatura ambiente mediante agitación constante. En caso de que no se midiera la actividad basal de ATPase se añadió el inductor e incubó durante otro minuto. La reacción se llevó a cabo en el baño, se arrancó con el ATP y se incubó durante diez minutos; el volumen final fue de 1 ml. La reacción se detuvo con 1 ml de ácido tricloroacético al 30% y se introdujo en el hielo. Se centrifugó durante diez minutos. Se tomaron 0.2 ml del sobrenadante para determinar la concentración de Pi por el método de Sumner.

5. Determinación de la concentración de Pi por el método de Sumner (65)

A 0.2 ml del sobrenadante del medio donde se realizó la reacción de ATPase se le añadieron 3.4 ml de agua, 0.5 ml de molibdato de amonio 6.6%, 0.5 ml de ácido sulfúrico 7.5 N y 0.4 ml de sulfato ferroso 10%. Se agitó bien después de cada adición. Se incubó durante diez minutos a temperatura ambiente y se leyó en el colorímetro.

RESULTADOS

-Fórmulas y características de los derivados de la perezona

La perezona y sus derivados utilizados en este trabajo fueron sintetizados por la M en C Ma. Esther Garcia y Virgilio Mendoza, de la Escuela Química-Farmacobiológica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Los derivados de la perezona con los que se experimentó fueron: la hidroxiperezona (2-(1,5-dimetil-4-hexenil)-3,6-dihidroxi-5-metil-p-benzoquinona, HP) (fig 8), el anilido de perezona (2-(1,5-dimetil-4-hexenil)-3-anilido-5-metil-p-benzoquinona, AP) (fig 9), la perezona reducida en la cadena lateral (2-(1,5-dimetil-4-hexenil)-3-hidroxi-5-metil-p-benzoquinona, PRCL) (fig 10), la epoxiperezona (2-(1,5-dimetil-4,5-epoxi-hexenil)-3-hidroxi-5-metil-p-benzoquinona) (fig 11) el derivado V (2-(1,5-dimetil-4-hexanona)-3-hidroxi-5-metil-p-benzoquinona) (fig 12), y el derivado VI (2-(1,5-dimetil-4-(5)-hexenona)-3-hidroxi-5-metil-p-benzoquinona) (fig 13).

La hidroxiperezona tiene la misma estructura química que la perezona más un radical hidroxilo en la posición 6 del anillo benzoquinona. El anilido de perezona tiene un radical anilido en la posición 3 del anillo quinona, donde la perezona contiene un grupo OH. La perezona reducida en la cadena lateral posee la cadena lateral isoprenoide totalmente saturada. La epoxiperezona tiene un grupo epoxi en los carbonos 4 y 5, lo cual aumenta la polaridad de la cadena lateral isoprenoide. Los derivados V y VI tienen un grupo cetona en el carbono 4 lo cual también incrementa la polaridad de la cadena lateral; la única diferencia entre

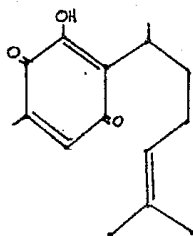


Figura 7. Perezona (P)

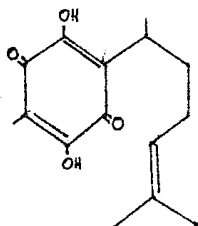


Figura 8. Hidroxiperezona (HP)

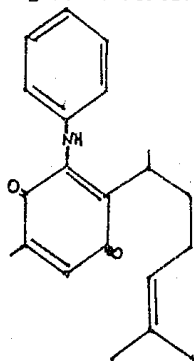


Figura 9. Anilido de perezona (AP)

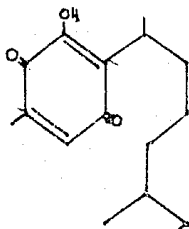


Figura 10. Perezona reducida en la cadena lateral (PRCL)

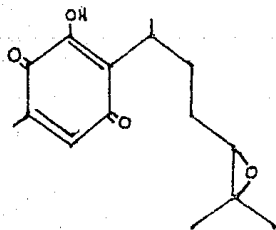


Figura 11. Epoxiperezona (EP)

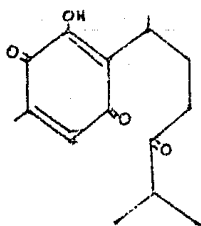


Figura 12. Derivado V

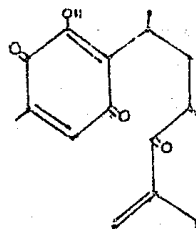


Figura 13. Derivado VI

estas dos moléculas es que el derivado VI tiene un doble enlace entre los carbonos 5 y 6 de la cadena lateral.

- Efecto de los derivados de la perezona sobre el consumo de oxígeno inducido por ADP con sustratos de los sitios 1 y 2

Por lo reportado por Cárabez y Sandoval (62), se sabe que la perezona inhibe la respiración en estado III (con ADP en exceso) en más de un 80% al usar glutamato y malato como sustratos, y en más de un 70% si se emplea succinato.

En la tabla 4 se muestra el efecto de la perezona y sus derivados sobre la respiración en estado III. Se añadieron 130 nmoles de derivado por mg de proteína mitocondrial y se midieron los nátomos de oxígeno consumidos por mg de proteína por minuto.

TABLA 4. EFECTO DE LA PEREZONA Y SUS DERIVADOS SOBRE LA RESPIRACION INDUCIDA POR ADP EN LOS SITIOS 1 Y 2

Derivado (130 nmoles/ mg de proteína mitocondrial)	Sitio 1 Glutamato-Malato +Derivado (nát O ₂ /mg prot*min)	Sitio 2 Succinato +Derivado (nát O ₂ /mg prot*min)
Control (sin derivado)	71.9	98
P	19.6	32.6
HP	9.8	14.7
AP	39.2	60.4
PRCL	6.5	4.9
EP	58.8	94.7
Derivado V	62.1	75.1
Derivado VI	62.1	98

Encontramos que con base en los resultados de la tabla 4 podemos agrupar a los derivados en tres clases segun su efecto sobre el consumo de oxigeno: alto, medio y bajo.

La hidroxiperezona y la perezona reducida en la cadena lateral produjeron una disminuci3n cercana al 100% en el consumo de oxigeno, tanto cuando se utiliz3 glutamato y malato como sustratos como cuando se us3 succinato. La epoxiperezona y los derivados V y VI no causaron un cambio significativo en la tasa de respiraci3n del estado III. Y el anilido de perezona tuvo un efecto intermedio al inhibir en un 40% la respiraci3n estimulada por ADP. Los resultados de la perezona coincidieron con los ya reportados.

Con estos datos no pudimos establecer diferencias importantes en los porcentajes de inhibici3n de un mismo derivado en los sitios 1 y 2.

- Efecto de los derivados sobre el consumo de oxigeno del sitio 3.

Observamos que la perezona y sus derivados no modificaban el consumo de oxigeno del 3ltimo tramo de la cadena respiratoria mitocondrial.

La actividad de citocromo oxidasa al usar ascorbato y TMPD, no se afect3 de manera importante por ninguno de los derivados, en concentraciones de 100 μ g de derivado por mg de proteina.

Despu3s de haber realizado estos experimentos preliminares, del grupo de derivados de la perezona seleccionamos la PRCL y la

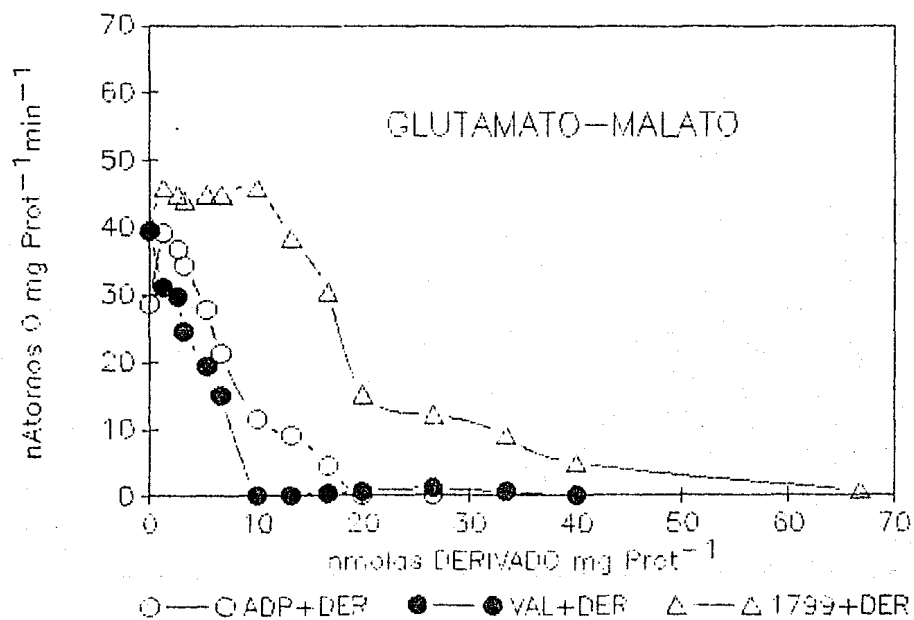
HP por ser los que producen una fuerte inhibición del consumo de oxígeno.

A partir de tal selección se caracterizó de manera más pormenorizada su mecanismo de acción. Para ello realizamos curvas de concentración de la PRCL y la HP sobre el consumo de oxígeno de los sitios 1, 2 y 3 de la cadena de transporte de electrones.

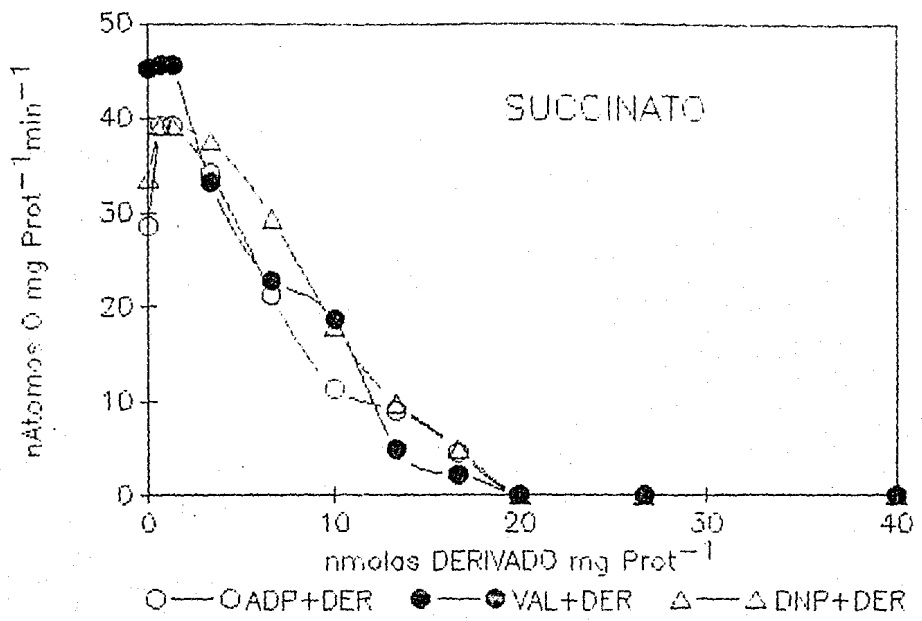
- Efecto de la perezona reducida en la cadena lateral sobre la respiración de los sitios 1 y 2 estimulada con ADP, valinomicina, DNP y 1799

En la gráfica I se aprecia el efecto de distintas concentraciones de la PRCL sobre la respiración mitocondrial con glutamato y malato como sustratos estimulada con ADP, valinomicina o 1799. Cada curva representa el promedio de 3 ó 4 experimentos. Los valores control, es decir los que corresponden a 0 nmolas de derivado, están sobre el eje de las ordenadas. Aquí observamos que las tres curvas muestran una inhibición del consumo de oxígeno que llega al 100%. La actividad inducida por el ionóforo de potasio valinomicina es la más sensible ya que se inhibe en un 100% con 10 nmoles de PRCL por mg de proteína, mientras que la respiración estimulada con ADP necesita 20 nmoles y con el protonóforo 1799 requiere de 66 nmoles para inhibirse totalmente. La PRCL inhibe de igual manera la respiración inducida por 1799 que por el desacoplante DNP. En la misma gráfica vemos una pequeña estimulación, que se presentó en todos los experimentos. Este pequeño aumento en el consumo de oxígeno se observó a concentraciones bajas, menores de 10 nmoles de derivado, en las curvas de

GRAFICA I. EFECTO DE LA PEREZONA REDUCIDA EN LA CAD. LAT.
 SOBRE LA RESPIRACION ESTIMULADA DE MITOCONDRIAS.



GRAFICA II. EFECTO DE LA PEREZONA REDUCIDA EN LA CAD. LAT
 SOBRE LA RESPIRACION ESTIMULADA DE MITOCONDRIAS.



ADP y 1799.

En la gráfica II tenemos las curvas de concentración de la PRCL sobre la respiración del sitio 2. No existe una diferencia significativa entre las curvas de ADP, valinomicina y DNP con succinato como sustrato. Se obtiene un 100% de inhibición con 20 nmoles de derivado por mg de proteína en cualquiera de las tres curvas. La PRCL tuvo un efecto similar sobre la respiración de sitio 2 estimulada con DNP o con 1799.

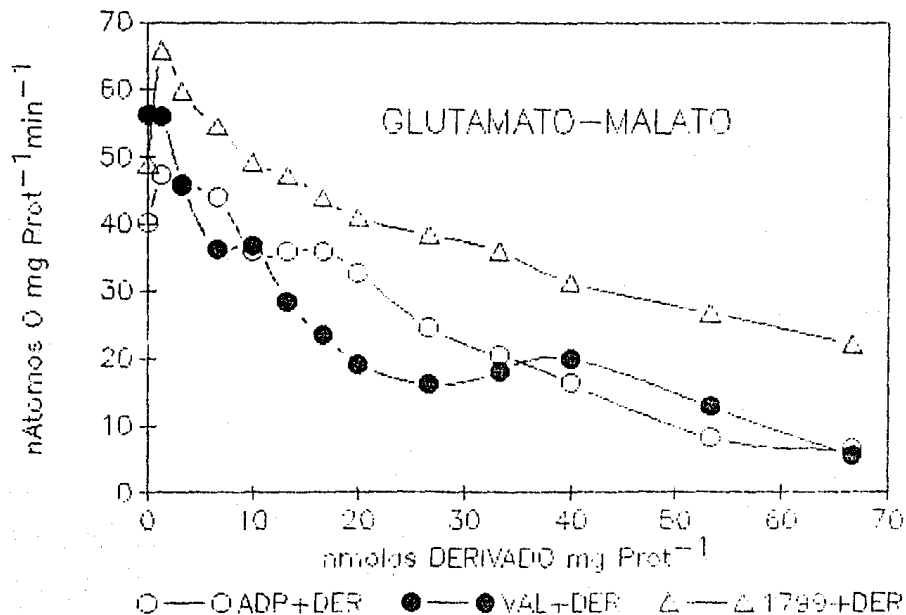
De nuevo se presentó estimulación del consumo de oxígeno a concentraciones menores a 5 nmoles de PRCL en las curvas de ADP y DNP.

- Efecto de la hidroxiperezona sobre la respiración de los sitios 1 y 2 estimulada con ADP, valinomicina, DNP y 1799

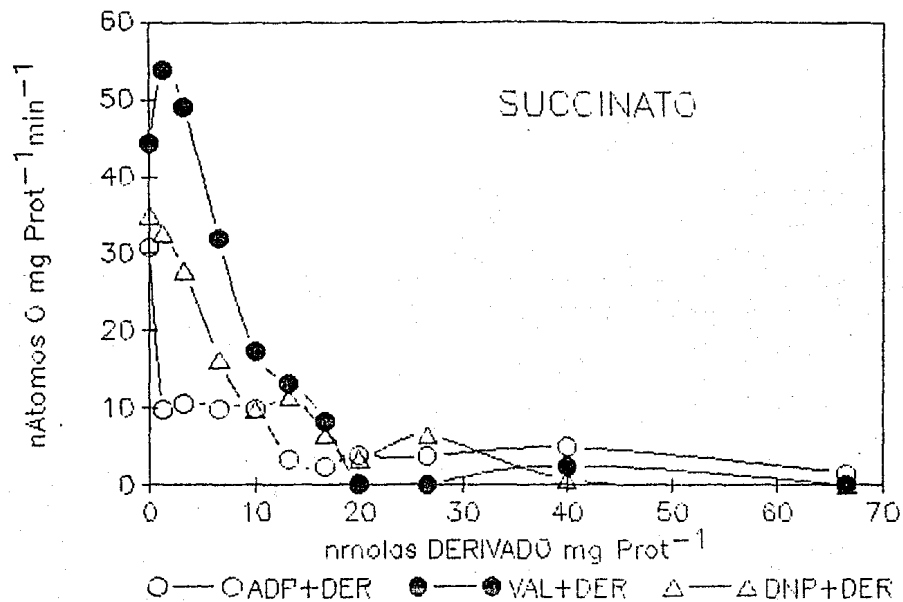
En la gráfica III presentamos una curva dosis-respuesta de la HP sobre el consumo de oxígeno con las mismas condiciones que en la gráfica I. La diferencia más importante que observamos es que la inhibición no llega a un 100% en ninguna de las curvas, sino que se tienen unas inhibiciones máximas de entre 80 y 90%. Asimismo el consumo de oxígeno inducido por valinomicina es el más sensible pues inhibe un 70% con 25 nmoles por mg de proteína, seguido del de ADP con una inhibición del 70% a 52 nmoles y, por último, el consumo de oxígeno inducido por 1799 disminuye un 70% con 70 nmoles de HP por mg de proteína. La curva con DNP fue similar a la del 1799.

Con la HP volvimos a encontrar que a bajas concentraciones

GRAFICA III. EFECTO DE LA HIDROXIPEREZONA
 SOBRE LA RESPIRACION ESTIMULADA DE MITOCONDRIAS.



GRAFICA IV. EFECTO DE LA HIDROXIPEREZONA SOBRE LA RESPIRACION ESTIMULADA DE MITOCONDRIAS.



produce una pequeña estimulación de la respiración inducida por ADP y 1799.

En la gráfica IV tenemos las curvas de concentración de la HP sobre la respiración del sitio 2. Se observa que la sensibilidad a la inhibición con valinomicina, ADP o DNP también es total o está cercana a un 100% con 20 nmoles del derivado. La respiración estimulada con ADP bajo drásticamente un 70%, con 2 nmolas de HP. Y la respiración con valinomicina se estimuló ligeramente, con menos de 5 nmoles del derivado. La HP modifico de igual forma la respiración estimulada por DNP que por 1799.

- Efecto de la perezona reducida en la cadena lateral sobre el consumo de oxígeno del sitio 3

En la tabla 5 se muestra el consumo de oxígeno por la citocromo oxidasa con ascorbato y TMPD al utilizar diferentes concentraciones de PRCL. El intervalo de concentraciones utilizado fue muy amplio y no encontramos afectada la actividad de la citocromo oxidasa.

TABLA 5. EFECTO DE LA PEREZONA REDUCIDA EN LA CADENA LATERAL SOBRE LA ACTIVIDAD DE CITOCROMO OXIDASA

Cantidad de PRCL (nmoles/mg de proteína)	Consumo de O ₂ nát O ₂ /mg prot*min
Control	19.3
6.66	17.1
66.66	18.8
666.66	22.9

- Efecto de la perezona reducida en la cadena lateral y la hidroxiperezona sobre la respiración en estado IV

Se midió el efecto de la PRCL y la HP sobre el consumo de oxígeno durante el primer estado IV y el segundo estado IV. El primer estado IV señala al consumo de oxígeno de las mitocondrias con el medio de respiración y con sustratos oxidables; el segundo estado IV se refiere a la tasa de respiración una vez que las mitocondrias han agotado todo el ADP que tenían.

TABLA 6. EFECTO DE LA PEREZONA REDUCIDA EN LA CADENA LATERAL Y LA HIDROXIPEREZONA SOBRE EL ESTADO IV MITOCONDRIAL

	Moles de derivado (nmoles/mg de proteína)		Consumo de O ₂ (nát O ₂ /mg prot*min) Glutamato-malato	
	PRCL		HP	
	1er edo IV	2do edo IV	1er edo IV	2do edo IV
Control	0.7	9.2	1.3	13.6
6.66	1.6	12.3	1.6	16.3
13.33	5.7	11.4	5.7	13.1
20.00	3.3	12.3	3.3	6.5
26.66	3.3	10.6	6.5	*
33.33	*	10.6	*	9.8
40.00	*	*	4.1	*
66.66	0.8	*	*	9.8
100.00	1.6	*	*	*
133.33	2.4	*	*	*

* Datos no obtenidos

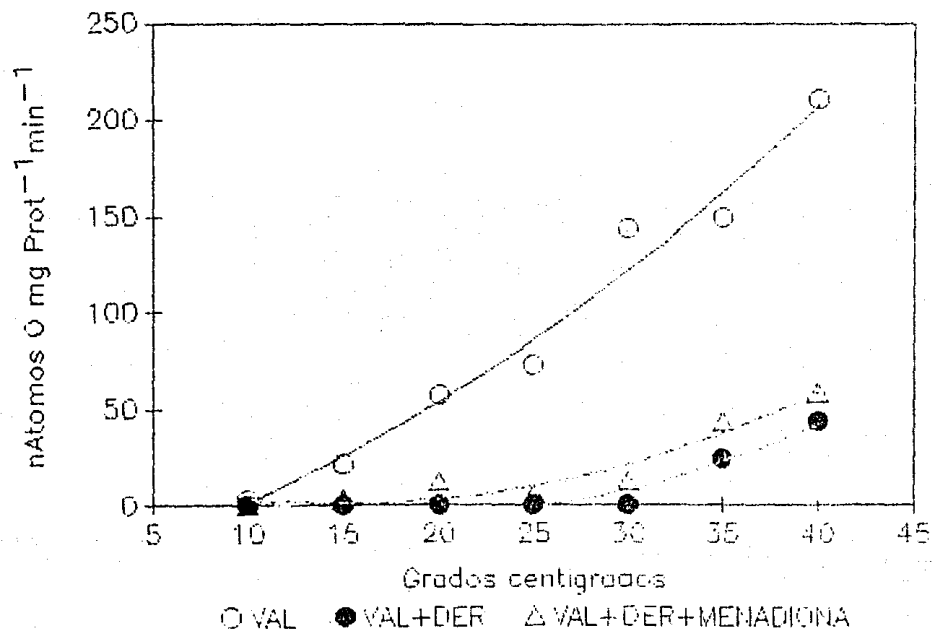
En la tabla 6 se muestran los datos obtenidos mediante el uso de glutamato y malato como sustratos. Por estos datos se aprecia que no hubo diferencias significativas entre el consumo de oxígeno control y cuando se utilizó PRCL y HP en muy diversas cantidades, tanto en el primer como en el segundo estado IV. No se muestran los datos, sin embargo los resultados tanto al utilizar succinato como sustrato oxidable fueron similares; esto coincide con lo esperado ya que el efecto desacoplante es independiente del sustrato que se utilice.

- Efecto de la perezona reducida en la cadena lateral sobre la respiración estimulada por valinomicina a diferentes temperaturas

Para comprobar si la inhibición de la respiración era dependiente de la temperatura, decidimos ver el efecto de distintas temperaturas sobre la inhibición de 20 nmoles de PRCL, cantidad que a 25°C inhibe un 100%.

En la gráfica V vemos que el consumo de oxígeno inducido por valinomicina aumenta rápidamente conforme aumenta la temperatura, hasta llegar a 210 nátomos de oxígeno por mg de proteína por minuto a los 40°C. La inhibición por PRCL es completa a los 30°C, disminuye un 15% a los 35°C y un 20% a los 40°C. Esta inhibición no fue reversible por menadiona a ninguna de dichas temperaturas.

GRAFICA V. EFECTO DE PEREZONA REDUCIDA EN CAD. LAT.
SOBRE LA RESP. ESTIMULADA POR VALINOMICINA A DIF. TEMP.

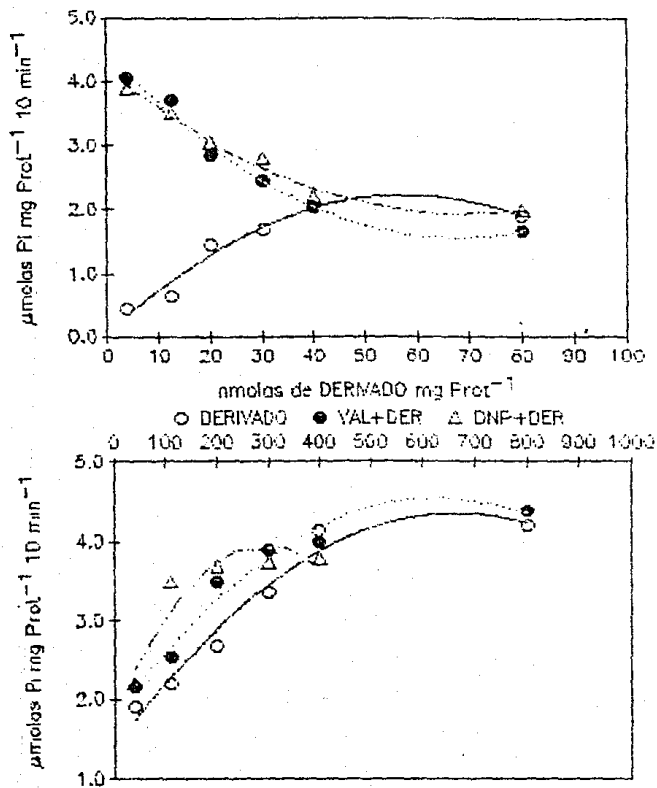


- Efecto de la perexona reducida en la cadena lateral sobre la actividad de ATPasa

Observamos que la PRCL estimula la actividad basal de la ATPasa hasta un máximo de 4 μ moles de Pi por mg de proteína por 10 minutos con 0.4 μ moles del derivado sobre mg de proteína.

La PRCL tiene un efecto bifásico sobre la inducción de la actividad hidrolítica por la valinomicina y el DNP (véase gráfica VI). A concentraciones menores de 40 nmoles, disminuye la hidrólisis de 4 μ moles de Pi por mg de proteína por 10 minutos a 2 μ moles. A concentraciones mayores de 40 nmoles de PRCL, la hidrólisis aumenta hasta que a 0.4 μ moles recupera el valor control, que es de 4 μ moles de Pi.

GRAFICA VI. EFECTO DE LA PEREZONA REDUCIDA EN LA CAD. LAT.
 SOBRE LA ACTIVIDAD DE ATPasa DE MITOCONDRIA.



D I S C U S I O N

Cárabez y Sandoval (62) reportaron que la perezona modifica los procesos de oxido-reducción de la cadena respiratoria mitocondrial, probablemente debido a su estructura quinona. Y propusieron que la perezona actúa como un vertedero de electrones que produce la inhibición del transporte de los mismos al aceptar de la cadena los electrones provenientes de los sustratos oxidables.

El trabajo que implicó esta tesis fue desarrollado con seis derivados sintéticos de la perezona con distintas modificaciones en su estructura. Dos de ellos, la hidroxiperezona (fig 8) y el anilido de perezona (fig 9), presentan modificaciones en el anillo quinona; el resto tan sólo cambios en la cadena isoprenoide lateral.

Como se aprecia en los datos de la tabla I y los obtenidos con el sitio 3, los derivados modificados por un oxígeno en la cadena isoprenoide lateral (la epoxiperezona, fig 11; el derivado V, fig 12 y el VI, fig 13) no mostraron un efecto importante sobre el consumo de oxígeno de ninguno de los tramos de la cadena de transporte de electrones. Este hecho prueba que la estructura hidrofóbica isoprenoide de la cadena lateral es una característica importante para producir el efecto inhibitorio.

Al reducir el doble enlace de la cadena lateral, como en la perezona reducida en la cadena lateral (fig 10), se mantiene la capacidad de disminuir drásticamente la tasa de consumo de oxígeno, tanto en sitio 1 como en el 2.

En los dos compuestos que mostraron una modificación en el anillo quinona respecto a la perezona, la hidroxiperezona con un grupo OH en la posición 6 del anillo y el anilido de perezona una anilina en lugar del OH de la posición 3 del anillo benzoquinona, se conservó el efecto inhibitorio sobre los sitios 1 y 2 de la cadena respiratoria.

Decidimos estudiar más detalladamente el mecanismo de acción de la PRCL y la HP debido a que eran los inhibidores más potentes. Aunque el AP también podría resultar interesante, ya que es el único de los derivados que no tiene el OH disociable, característica que evita el problema de distinguir entre los efectos protonofórico y quinona que pueden producir estas moléculas.

A continuación comparamos los efectos de la perezona con los de la PRCL y la HP. La PRCL inhibe más rápidamente la respiración mitocondrial en sitio 1 que la HP o la perezona; la dosis necesaria de la PRCL para inhibir un 75% el consumo de oxígeno inducido por valinomicina es de 8 nmoles, mientras que la HP necesita 25 nmoles y la perezona 265 nmoles para producir el mismo efecto.

La PRCL llega a inhibir totalmente la respiración en sitio 1, a diferencia de la HP y la perezona que nunca alcanzan a inhibir el 100%.

También observamos que la inhibición de la respiración estimulada con 1799 es menos sensible que la obtenida con valinomicina o ADP; esta diferencia cabría explicarla debido a

que en la respiración inducida por el 1799, la PRCL y la HP compensar su efecto quinona inhibitorio con su efecto protonofórico, con lo que se obtendría una menor sensibilidad a la inhibición. Si bien esta última explicación es factible, mas adelante se señalará por que se considera incorrecta.

En las gráficas I y II vemos que todas las curvas que hicimos de concentración de PRCL y HP, al medir la respiración inducida por ADP y 1799, repetidamente presentan, a bajas concentraciones, valores por encima de los controles. Ya que demostramos que no actúan como desacoplantes, una posible explicación es que a pequeñas concentraciones afectarían la permeabilidad de la membrana, resultando en una estimulación del consumo de oxígeno.

La gráfica III no presenta cambios importantes en la forma en que la PRCL inhibe la respiración inducida por ADP, valinomicina o DNP; se alcanza un 100% de inhibición con 20 nmoles del derivado. La gráfica IV muestra efectos similares con la HP. Tampoco se observan grandes diferencias en la eficacia de inhibición de la PRCL y la HP cuando se utiliza succinato como sustrato.

Una conclusión importante que cabe destacar de estas gráficas es que, por lo general, el sitio 2 fue más sensible a la inhibición por los derivados que el sitio 1.

Al comprobar que la PRCL y la HP no inhiben la actividad de la citocromo-oxidasa y tener en mente los datos de las gráficas I

a IV pensamos que estos derivados, al igual que la perezona, actúan en el tramo de la cadena respiratoria comprendido entre la coenzima Q y el citocromo c.

Dado que la PRCL y la HP, al igual que la perezona, tienen un grupo OH disociable es factible que actúen como desacoplantes. Hecho que nos llevó a determinar el efecto de la PRCL y la HP sobre el estado IV mitocondrial, el cual es característicamente estimulado por los agentes desacoplantes.

Como muestran los datos de la tabla 6 no encontramos un efecto importante de la PRCL o la HP sobre la respiración mitocondrial en estado IV. De estos resultados podemos concluir que no tienen un efecto desacoplante considerable.

Cárabez y Sandoval (62) reportaron que la inhibición de la respiración mitocondrial por perezona disminuye un 80% a 35°C; dato que, junto con otros, apoya el modelo de vertedero; modelo que propone que la perezona a temperatura ambiente acepta los electrones de la cadena respiratoria y los vuelve a regresar muy lentamente a la cadena, al tiempo que se observa una inhibición del consumo de oxígeno; por lo que se propuso que el aumento de la temperatura coincide con el de la velocidad de oxidación de la perezona y de esta manera se restablece la respiración mitocondrial.

La inhibición por PRCL tampoco es reversible por temperatura cuando se añade menadiona, lo que indica que no es del tipo de la rotenona que actúa sobre la NADH-deshidrogenasa.

Por último, medimos el efecto de la PRCL sobre un sistema en el que sus características rédox no influyeran.

Los resultados obtenidos respecto al efecto de la PRCL sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa son difíciles de explicar; por ejemplo, la estimulación de la actividad basal de la ATPasa al agregar PRCL no se puede explicar únicamente por un efecto protonofórico del compuesto, ya que la PRCL no estimula el estado IV mitocondrial. Tampoco podemos explicar el efecto bifásico de inhibición-estimulación que presenta la PRCL sobre la actividad hidrolítica de ATPasa estimulada por valinomicina o DNP. Una observación que podría resultar importante es que en el intervalo de concentración que estimula el valor de hidrólisis nunca rebasa al control; ello puede señalar que en altas concentraciones la PRCL anula su efecto inhibitorio y no, como cabría asimismo suponer, que tenga un efecto estimulatorio sobre la ATPasa. También sería importante conocer cómo influye la PRCL sobre la F_1 soluble, para así poder explicar los resultados de la gráfica VI.

El potencial rédox de la perezona es de +487 mV (62) y los de los derivados utilizados durante este trabajo no se conocen. En caso de que los potenciales rédox de la PRCL y la HP fueran parecidos al de la perezona, resultaría difícil explicar de esta forma la inhibición de la cadena de transporte de electrones. La dificultad radica en que normalmente la coenzima Q, con un potencial rédox cercano a 0, acepta los electrones de las flavoproteínas y los cede a los citocromos b y a la proteína Rieske; para que los derivados pudieran realizar esta función

deberían tener un E_m similar al de la coenzima O.

Creemos que la inhibición por los derivados es más directa; por ejemplo, se ha reportado que el análogo de la coenzima O denominado HMQO (21) inhibe, en altas concentraciones, la oxidación de la proteína Fe-S por el citocromo c_1 , en el mismo sitio que inhiben el BAL y el mixotiazol; a concentraciones menores inhibe la reducción del citocromo b_{562} por la OH_2 por la reversa de la oxidación del citocromo b, donde también inhibe la antimicina.

Von Jagow y col. (66) mencionan que los análogos que inhiben la oxidación del quinol (UHDBT, UHNO y HMQO), los cuales han sido estudiados en detalle, contienen un sistema 1,4-quinona bicíclica con un grupo hidroxilo en la posición 3 que determina la hidrofobicidad de la molécula. Estos elementos estructurales comunes sugieren que los sistemas bicíclicos quinona pueden acomodarse en el centro de reacción quinol-oxidante, mientras que las cadenas laterales alquil pueden situarse en la zona hidrofóbica de la membrana.

Si bien la perezona no es una quinona bicíclica creo que el parecido estructural con estos análogos es suficiente como para poder suponer un mecanismo similar. El hecho que la inhibición por los derivados no sea reversible por la temperatura, es una prueba indirecta de un mecanismo de inhibición de este tipo.

CONCLUSIONES

Con base en la discusión de los resultados obtenidos concluimos lo siguiente:

- Es fundamental que los derivados de la perezona no incluyan radicales polares en la cadena isoprenoide, para observar su efecto inhibitorio sobre el consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de hígado de rata.
- La inhibición del transporte de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial, producida por la perezona reducida en la cadena lateral y la hidroxíperezona, ocurre en el tramo entre la coenzima Q y el citocromo c.
- La PRCL y la HP inhiben la respiración mitocondrial a dosis considerablemente menores que la perezona.
- El sitio 2 es más sensible que el 1 a la inhibición por PRCL y HP.
- Ninguno de los derivados utilizados tienen un efecto sobre la citocromo oxidasa.
- Los derivados no presentaron un efecto protonofórico clásico que estimulara la tasa de respiración en el estado IV mitocondrial.
- No encontramos grandes diferencias en los efectos de la PRCL y la HP, aunque sí en la dosis necesaria para producirlos.
- La inhibición por la PRCL no se explica con el modelo del

vertedero de electrones de la perezona, ya que su inhibición no es reversible por el aumento de la temperatura.

- La PRCL estimula la actividad basal de ATPasa y tiene un efecto bifásico de inhibición-estimulación de la actividad hidrolítica de la ATPasa inducida por valinomicina y DNP.
- Probablemente la inhibición producida por la PRCL y la HP sea directa sobre los sitios sensibles a antimicina y mixotiazol, de forma similar a la lograda por la HMHOG.

REFERENCIAS

1. Lehninger, A. (1984). Principios de Bioquímica. Omega, Barcelona. 1013 pp.
2. Nicholls, D. (1982). Bioenergetics. Academic, London. 190 pp.
3. Slater, E. C. (1953). Nature (Londres) 172:975-976.
4. Mitchell, P. (1961). Nature (Londres) 191:423-427.
5. Mitchell, P. (1979). Science 206:1148-1159.
6. Tzagoloff, A. (1982). Mitochondria. Plenum, Nueva York. 342 pp.
7. Harold, F. M. (1986). The vital force: A study of Bioenergetics. Freeman, Nueva York. 577 pp.
8. Fleischer, S., Brierley, G. y Klouwen, H. (1961) J. Biol. Chem. 236:2936-41.
9. Hatefi, Y. (1985). Ann. Rev. Biochem. 54:1015-69.
10. Borst, P., Grivell, L. A. y Groot, G. S. P. (1984). Trends Biochem. Sci. 9:128-130.
11. Wikström, M., Krab, K. y Saraste, M. (1981). Ann. Rev. Biochem. 50:681-714.
12. Ragan, C. I. y Hinkle, P. C. (1975). J. Biol. Chem. 250:8472-76.
13. Racker, E. y Kandrach, A. (1971). J. Biol. Chem. 246:7069-71.
14. Crane, F. L., Hatefi, Y., Lester, R. L. y Widmer, C. (1957). Biochim. Biophys. Acta 25:220-221.
15. Wolf, D. E., Hoffman, C. H., Trenner, N. R., Arison, B. H., Shunk, C. H., Linn, B. O., McPherson, J. F. y Folkers, K. (1958). J. Biol. Chem. Soc. 80:4752.
16. Mayer, H. y Isler, O. (1971). En Methods in Enzimol. 18(C):182-213.
17. Ramasarma, T. (1985). Coenzyme Q, ed. G. Lenaz. J. Wiley, Nueva York. pp. 67-81.
18. Crane, F. L. y Barr, R. (1985). Coenzyme Q, ed. G. Lenaz. J. Wiley, Nueva York. pp. 1-37.
19. Sato, M., Yamada, K. y Ozawa, H. (1972). Biochem. Biophys. Res. Commun. 46:578-582.
20. Catlin, J. C., Pardini, R. S., Daves, G. D. Jr., Heildker, J. C. y Folkers, K. (1968). J. Am. Chem. Soc. 90:3572-3574.
21. Hendlin, D. y Cook, Th. M. (1960). J. Biol. Chem. 235:1187-1191.
22. Yu, L. y Yu, C. A. (1982). J. Biol. Chem. 257:2016-2021.
23. Lenaz, G., Daves, G. D. Jr. y Folkers, K. (1968). Arch. Biochem. Biophys. 123:539-550.
24. Imada, I. y Morimoto, H. (1964). Chem. Pharm. Bull. 12:1051-56.
25. Yu, C. A. y Yu, L. (1982). J. Biol. Chem. 257:6127-6131.
26. Yu, C. A. y Yu, L. (1981). Biochem. Biophys. Res. Commun. 98:1063-69.
27. Ramasarma, T. y Lester, R. L. (1960). J. Biol. Chem. 235:3309-3314.
28. Crane, F. L. y Ehrlich, B. (1960). Arch. Biochem. Biophys. 89:134-138.
29. Catlin, J. C., Daves, G. D. Jr. y Folkers, K. (1971). J. Med. Chem. 14:45-48.

30. Bogentoft, C., von Klaudy, A. y Folkers, K. (1972). J. Med. Chem. 15:1135-1138.
31. Wan, Y. P. y Folkers, K. (1978). En Methods Enzymol. 53(D):600-609.
32. Ackrell, B. A. C., Ball, M. N. y Kearney, E. B. (1980). J. Biol. Chem. 255:2761-69.
33. Phelps, D. C. y Crane, F. L. (1975). Biochemistry 14:116-122.
34. Jeng, M., Hall, C., Crane, F. L., Takahashi, N., Tamura, S. y Folkers, K. (1968). Biochemistry 7:1311-1322.
35. Gutman, M. y Kliatchko, S. (1976). FEBS Lett. 67:348-353.
36. Roberts, H., Choo, W. M., Smith, S. C., Marzuki, S., Linnane, A. W., Porter, T. H. y Folkers, K. (1978). Arch. Biochem. Biophys. 191:306-315.
37. Trumpower, B. L. y Haggerty, J. G. (1980). J. Bioenerg. Biomembr. 12:151-164.
38. Bowyer, J. R., Dutton, P. L., Prince, R. C. y Crofts, A. R. (1980). Biochim. Biophys. Acta 592:445-460.
39. Zhu, G. S., Berden, J. A., DeVries, S., Folkers, K., Porter, T. y Slater, E. C. (1982). Biochim. Biophys. Acta 682:160-167.
40. Porter, T. H., Bowman, C. M. y Folkers, K. (1973). J. Med. Chem. 16:115-118.
41. Skelton, F. S., Porter, T. H., Littarru, G. P. y Folkers, K. (1973). Int. J. Vitam. Nutr. Res. 43:150-164.
42. Bowman, C. M., Skelton, F. S., Porter, T. H. y Folkers, K. (1973). J. Med. Chem. 16:206-209.
43. Castelli, A., Bertoli, E., Littarru, G. P., Lenaz, G. y Folkers, K. (1971). Biochem. Biophys. Res. Commun. 42:806-812.
44. Trebst, A., Harth, E. y Draber, W. (1970). Z. Naturforsch. 25B:1157-59.
45. Karp, G. (1984). Cell Biology. McGraw-Hill, Nueva York. 896 pp.
46. Slater, E. C. (1983). TIBS. 8:239-242.
47. Kostantinov, A. A. y Ruuge, E. K. (1977). FEBS Lett. 81:137-141.
48. De Vries, S., Albracht, S. P. J., Berden, J. A. y Slater, E. C. (1982). Biochim. Biophys. Acta 681:41-53.
49. Kröger, A. y Klingenberg, M. (1973). Eur. J. Biochem. 39:313-23.
50. Kröger, A. y Klingenberg, M. (1973). Eur. J. Biochem. 34:58-68.
51. Crane, F. L. (1977). Ann. Rev. Biochem. 46:439-469.
52. Yu, C. A. y Yu, L. (1987). En Bioenergetics: Structure and Function of Energy Transducing Systems, eds. Ozama, T. y Papa, S. Japan Sci. Soc. Press, Tokio/Springer-Verlag, Berlin. pp. 81-99.
53. Marsh, D. (1988). En Physical Properties of Biological Membranes and their Functional Implications, eds. Hidalgo, C. Plenum Press, Nueva York. 236 pp.
54. Lenaz, G., Fato, R., Castelluccio, C., Degli Esposti, M., Samworth, C.M., Battino, M. y Parenti Castelli, G. (1988). En Integration of Mitochondrial Function, eds. Lemasters, J. J., Hackenbrock, C. R., Thurman, R. G. y Westerhoff, H. V. (1988). Plenum, Nueva York. pp. 33-52.

55. Lenaz, G., Fato, R., Battino, M., Mandrioli, E., Parenti Castelli, G. (1987). En Bioenergetics: Structure and Function of Energy Transducing Systems, eds. Ozawa, T. y Papa, S. Japan Sci. Soc. Press, Tokio/Springer-Verlag, Berlín. P. pp. 49-61.
56. Futami, A., Hurt, E. y Hauska, G. (1979). Biochim. Biophys. Acta 547:583-596.
57. Futami, A. y Hauska, G. (1979). Biochim. Biophys. Acta 547:597-608.
58. Yu, C. A. y Yu, L. (1981). Biochim. Biophys. Acta 639:99-128.
59. Rio de la Loza. (1852). Academia de Medicina, México, Documento de octubre 30.
60. Walls, F. Salmón, M. Padilla, J. Joseph-Nathan, P. y Romo, J. (1965). Bol. Inst. Quím. (UNAM) 17:1-15.
61. Padilla, J., Romo, J., Walls, F. y Crabbé, P. (1967). Rev. Soc. Quím. Mex. 11:7-11.
62. Cárabez, A. y Sandoval F. (1988). Arch. Biochim. Biophys. 260:293-300.
63. Schneider, W. C. y Hogeboom, G. H. (1950). J. Biol. Chem. 183:123-127.
64. Gornall, A. C., Bardawill, C. J. y David, M. M. (1949). J. Biol. Chem. 177:751-766.
65. Sumner, J. S. (1944). Science 100:413.
66. Von Jagow, G., Link, T. A. y Ohnishi T. (1986). J. Bioenerg. Biomemb. 18:157-179.