

00550

19

UNIVERSIDAD NACIONAL

AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

"EVALUACIÓN DEL EFECTO DE NUEVOS COMPUESTOS
ANTINEOPLÁSICOS SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO
EN MITOCONDRIAS Y CÉLULAS".

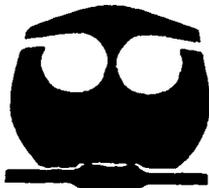
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

QFB. ALVARO LMARÍN HERNÁNDEZ

TUTOR: DR. RAFAEL MORENO SÁNCHEZ



MÉXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

JULIO 2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**" EVALUACIÓN DEL EFECTO DE NUEVOS
COMPUESTOS
ANTINEOPLÁSICOS SOBRE EL METABOLISMO
ENERGÉTICO
EN MITOCONDRIAS Y CÉLULAS"**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo intelectual.

NOMBRE: PABIN HERNANDEZ

ALCALÁ

FECHA: 25 JUNIO DEL 2003

FIRMA: 

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Rafael Moreno Sánchez en el departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Rafael Moreno Sánchez

Dr. Edmundo Chávez Cossío

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

El proyecto fue apoyado por CONACYT (G35012N). Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT (No. de registro 159991) para la realización de la presente tesis.

El jurado de examen de maestría estuvo constituido por:

PRESIDENTE Dra. Lena Ruiz Azuara

VOCAL Dr. Edgardo Escamilla Marván

SECRETARIO Dra. Marina Gavilanes Ruiz

SUPLENTE Dr. Edmundo Chávez Cossío

SUPLENTE Dr. Helidoro Celis Sandoval

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

C

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento :

Al CONACYT por el financiamiento del proyecto y por la beca que me otorgo.

Al Instituto Nacional de Cardiología " Ignacio Chávez" por haberme permitido utilizar sus instalaciones.

Al Dr. Rafael Moreno Sánchez por su apoyo y enseñanzas.

A la Dra. Lena Ruiz Azuara y a la M. en C. Isabel Gracia Mora por todo el apoyo brindado.

A las personas que forman parte del departamento de bioquímica por el compañerismo y el apoyo que demostraron.

A mis padres y a mi hermano quienes siempre han estado conmigo.

A mi esposa Sandra por todo su cariño, amor y confianza.

A todos mis amigos por su amistad.

**TESIS CON
FALLA DE URGEN**

D

ÍNDICE

RESUMEN

1

INTRODUCCIÓN

2

Mitocondria

2

Apoptosis

6

El cáncer y la mitocondria

7

Fármacos y la mitocondria

9

Fármacos antitumorales

9

El cisplatino

9

Casiopéinas

13

HIPÓTESIS

17

OBJETIVOS

17

DESARROLLO EXPERIMENTAL

18

MÉTODOS

19

Propagación de la línea tumoral AS-30D

19

Obtención de suspensión de células de AS-30D

19

Aislamiento de mitocondrias

19

Del hígado y del riñón

Del corazón

19

De la línea celular AS-30D

20

Preparación de partículas submitocondriales de hígado

21

Consumo de oxígeno (mitocondrias)

22

Potencial de membrana

23

Consumo de oxígeno partículas submitocondriales

25

Medición de las actividades de diferentes enzimas

26

α -cetoglutarato deshidrogenasa

26

Succinato deshidrogenasa

27

Citocromo *bc*1

28

ATP sintetasa

28

Hinchamiento mitocondrial

29

Medición de citocromo c

30

Células

31

Respiración

31

Cuantificación de ATP

31

RESULTADOS

33

Respiración y potencial de membrana en mitocondrias

33

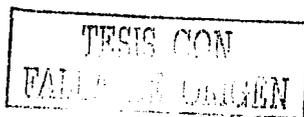
Medición de la actividad de enzimas específicas

43

Hinchamiento

47

E



Liberación de citocromo c	48
Células Intactas	52
DISCUSIÓN	56
CONCLUSIONES	67
PERSPECTIVAS	68
REFERENCIAS	70

TESIS CON
FALSO DE ORIGEN

F

ABREVIATURAS

ADP: Adenosín difosfato.

ATP: Adenosín trifosfato.

CCCP: Carbonil cianida m-clorofenilhidrazona.

CoA: Coenzima A.

CSII : Casiopeína II gly.

CSIII: Casiopeína III-I-a.

DCPIP: 2-6 diclorofenol-Indofenol.

DTT: Diltotrehitol.

EDTA: Ácido etilendiaminotetra-ácetico.

EGTA: Ácido etilenglicol-bis- β -aminoetil-éter-tetra-ácetico.

HEPES: Ácido hydroxi-etil-piperazina-etano sulfónico.

MOPS: Ácido morfolino propano sulfónico.

NAD⁺ : Dinucleótido de adenina y niacina oxidado.

NADH: Dinucleótido de adenina y niacina reducido.

NADP: Dinucleótido de adenina y niacina fosfato oxidado.

NADPH: Dinucleótido de adenina y niacina fosfato reducido.

PMS: Metasulfato de fenacina.

PTP: Poro de transición de la permeabilidad.

TPP: Tiamina de pirofosfato.

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACION

G

RESUMEN

La mitocondria es el sitio en donde se produce alrededor del 90% del ATP que requieren las células en los órganos aeróbicos como corazón, cerebro, riñón, páncreas e incluso hígado. De ahí la importancia de conocer los efectos que pueden ocasionar sobre ella algunos fármacos. En este trabajo se hace la evaluación del efecto tóxico de compuestos de coordinación con cobre (II) (Casiopelinas) sobre el funcionamiento de las mitocondrias tanto aisladas como dentro de la célula intacta. Para el estudio se utilizaron la casiopelina II-gly (CSII) y la casiopelina III-i-a (CSIII).

Se determinó que ambas casiopelinas inhibían la respiración y colapsaban el potencial de membrana, de manera dependiente de la concentración y del tiempo. La respiración fue más resistente al efecto inhibitorio de las casiopelinas con succinato como sustrato oxidable que con α -cetoglutarato. La CSII inhibió a la α -cetoglutarato deshidrogenasa ($CI_{50} = 10$ nmoles/ mg de proteína) y a la succinato deshidrogenasa ($CI_{50} = 200$ nmoles / mg de proteína). Además, la CSII indujo un aumento en el volumen intramitocondrial cuando se incubaban a las mitocondrias en un medio con KCl pero no en un medio con sacarosa. No solo había aumento del volumen con K^+ sino también en presencia de otros cationes monovalentes en orden decreciente del grado de hinchamiento $Rb^+ > K^+ > Na^+ > Li^+$. El ATP y el H_2O_2 bloquearon este efecto de la CSII. El aumento en el volumen interno correlacionó con la estimulación transitoria de la respiración (desacoplamiento) inducida por la CSII en un medio con K^+ . Estos datos sugirieron que la CSII activaba un canal de K^+ sensible a ATP (canal K_{ATP}). Después de la estimulación transitoria de la respiración se observó que la CSII también provocaba inhibición respiratoria, lo cual correlaciona con la liberación de citocromo c.

La sensibilidad de las mitocondrias del hígado, del riñón y tumorales hacia la CSII fue similar mientras que las mitocondrias del corazón fueron menos sensibles. En células intactas se observó que la CSII también inhibía la respiración sensible a oligomicina e inducía una disminución en el nivel de ATP, indicando inhibición de la fosforilación oxidativa.

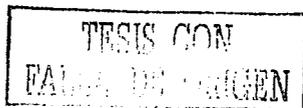
El estudio permite establecer que la CSII puede producir algunos de sus efectos tóxicos mediante su interacción con la mitocondria.

INTRODUCCIÓN

Mitocondria

La mitocondria es una parte importante en la generación de energía (ATP) y además está involucrada en otros procesos importantes como la apoptosis. Es un organelo intracelular, que varía en su tamaño y forma. Está compuesta de una membrana externa que es permeable a iones y solutos por abajo de 14 kDa, de una membrana interna que encierra a la matriz, en la cual están contenidas las enzimas que componen el ciclo Krebs y de la β -oxidación; es permeable sólo a compuestos como agua, O_2 , CO_2 , y NH_3 . Otros metabolitos y iones inorgánicos cruzan esta membrana debido a la presencia de canales específicos y proteínas acarreadoras, entre los que se encuentran el acarreador de fosfato, el translocador de ADP/ATP, los acarreadores de sustratos respiratorios (monocarboxilatos, dicarboxilatos y tricarboxilatos) y para iones (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+}) (Figura 1A).

En la membrana interna, se localiza la cadena respiratoria que está compuesta por cuatro complejos: la $NADH$ deshidrogenasa (complejo I), la succinato deshidrogenasa (complejo II), el citocromo bc_1 (complejo III), la citocromo oxidasa (complejo IV) e intermediarios que transportan equivalentes reductores (coenzimas); solo tres de los cuatro complejos (I, III y IV) translocan protones, generando así un gradiente electroquímico que es utilizado por la ATP sintetasa para la formación de ATP (Wallace y Starkov, 2000) (Figura 1B). Para que se lleve a cabo la generación de ATP se necesita de la producción del $NADH$ y del $FADH_2$ llevada a cabo por las



enzimas del ciclo de Krebs, a partir de la acetil-CoA proveniente de la oxidación de la glucosa, de los ácidos grasos y de los aminoácidos (Figura 2). Una vez que se forma el NADH, éste es oxidado por el complejo I de la cadena respiratoria que a su vez reduce a la ubiquinona; a diferencia de la oxidación del NADH, la oxidación del $FADH_2$ directamente dona los electrones a la ubiquinona, formándose ubiquinol que es oxidado por el complejo III que reduce al citocromo *c* y transfiere los electrones al complejo IV. El citocromo *c* es muy importante, ya que además de servir como un puente para el transporte de electrones entre el complejo III y IV interviene en el proceso de apoptosis (Skulachev, 1998; Lesnefsky *et. al.* 2001). Por último el complejo IV dona los electrones al oxígeno (Figura 1A y B).

El potencial de membrana acopla la actividad de la cadena respiratoria con la síntesis de ATP. Cuando hay una disminución de la concentración del ADP aumenta el potencial de membrana y disminuye el consumo de oxígeno (respiración en estado 4). En cambio con niveles altos de ADP el potencial de membrana disminuye y se estimula el transporte de electrones y el consumo de oxígeno (respiración en estado 3), porque se activa la síntesis de ATP. Sin embargo, este acoplamiento puede perderse por la presencia de agentes que ocasionan la disipación del gradiente electroquímico (proteína desacoplante, agentes químicos), debido a que solo hay paso de electrones al oxígeno y no hay síntesis de ATP.

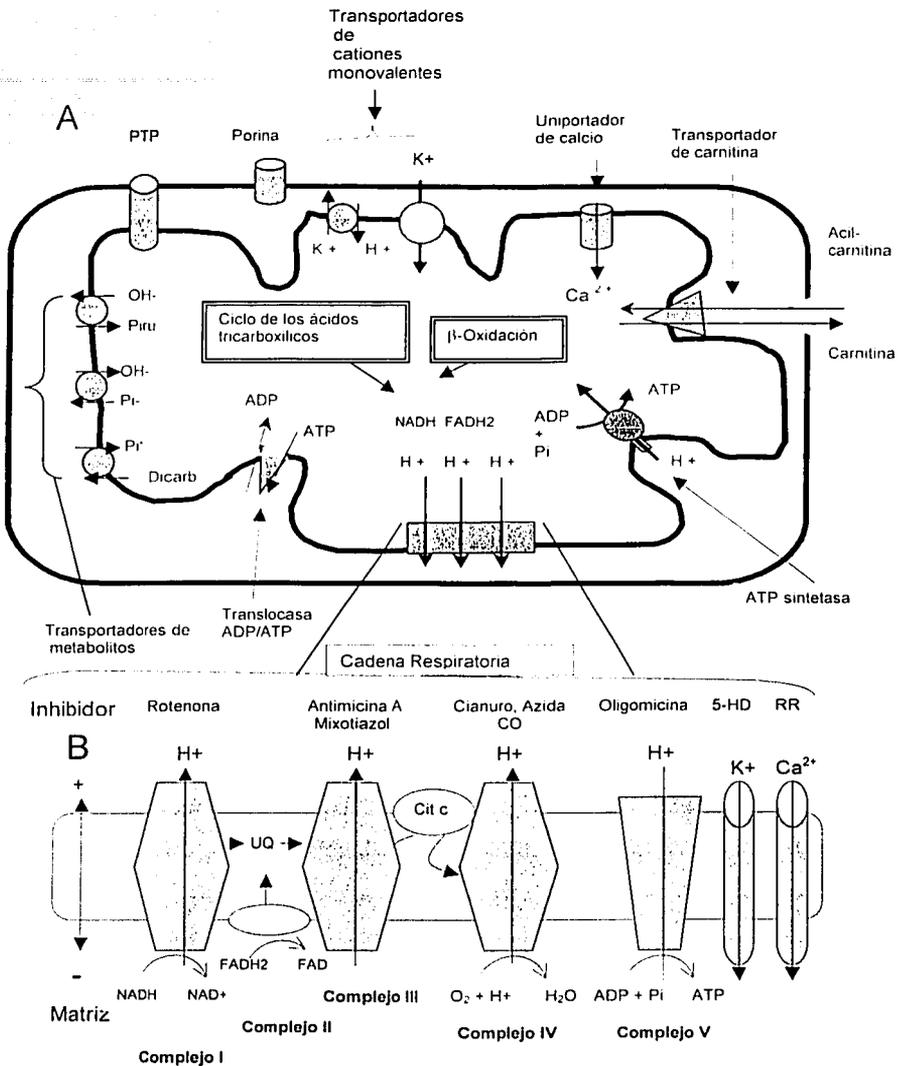


Figura 1. A) Representación esquemática de la mitocondria **B)** Cadena respiratoria, piruvato (piru); dicarboxilato (dicarbo); Ubiquinona (UQ); Citocromo c (Cit c); ácido 5-hiroxidodecano (5-HD); rojo rutenio (RR); Poro de transición de la permeabilidad (PTP).

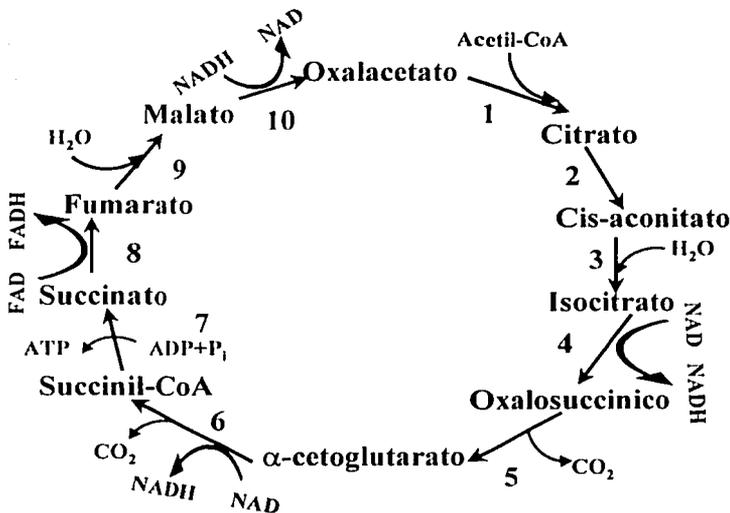


Figura 2. Ciclo de Krebs. 1) Citrato sintetasa; 2 y 3) Aconitasa; 4 y 5) Isocitrato deshidrogenasa; 6) α-cetoglutarato deshidrogenasa; 7) Succinil-CoA sintetasa; 8) Succinato deshidrogenasa; 9) Fumarasa; 10) Malato deshidrogenasa.

En la matriz mitocondrial, también se encuentran el ADN mitocondrial, el ARN mitocondrial y los ribosomas, útiles para la generación de diversas proteínas. El ADN mitocondrial contiene 37 genes que codifican 13 polipéptidos, entre los que se encuentran 7 subunidades del complejo I, el citocromo *b* del complejo III y 3 subunidades del complejo V (Penta *et al.* 2001).

Debido a que el ADN mitocondrial no está asociado a histonas y que los mecanismos para repararlo son muy deficientes (Clayton *et al* 1974, Cavalli y Liang, 1998) es muy susceptible al ataque de los radicales libres que se están generando continuamente en la mitocondria; durante la respiración normal aproximadamente el 2- al 4% del flujo de los electrones en la cadena respiratoria da como resultado la reducción parcial del oxígeno por los complejos I y III generándose así el ión superóxido (O_2^-). Para la eliminación de este ión se requiere de las enzimas superóxido dismutasa, la catalasa o del sistema formado por el glutatión, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa (Lesniewsky *et al.* 2001). Además muchos de los agentes químicos se unen con mayor afinidad al ADN mitocondrial que al ADN nuclear como: la aflatoxina B1 (Niranjan *et al.* 1982), algunos compuestos aromáticos policíclicos (Allen y Coombs, 1980; Backer y Weinstein, 1980; Salazar *et al.* 1982) y el cisplatino (Murata *et al.* 1990; Olivero *et al.* 1997). Por tal motivo hay mayor probabilidad de que se produzcan mutaciones en el ADN mitocondrial y de ahí que se relacione a la mitocondria con el cáncer. A este respecto existen reportes que indican que las células tumorales presentan alteraciones en la expresión de varias proteínas mitocondriales. (Cavalli y Liang, 1998; Penta *et al.* 2001).

Apoptosis

La muerte programada o apoptosis es un proceso que es capaz de eliminar a las células dañadas (mutaciones) o a las células que han cumplido con su función biológica y que pueden ser un peligro para el organismo. En general existen dos rutas para que se lleve a cabo la apoptosis, una es mediante la activación de los receptores de la muerte que se encuentran en la superficie de la célula y la otra ruta es mediada por la

mitocondria. Este último mecanismo se inicia con la liberación del citocromo *c*, que induce una cascada de eventos en el citosol que culminan con la activación de una familia de proteínas llamadas caspasas cuya función es digerir a la célula. No se ha esclarecido totalmente el mecanismo por el cual es liberado el citocromo *c*; sin embargo, se piensa que la mitocondria sufre un hinchamiento que da como resultado la ruptura de la membrana y liberación del citocromo *c*. Uno de los modelos propuestos lo constituye el poro de transición de la permeabilidad (PTP). Se presume que el PTP es un complejo formado por la porina, la translocasa ADP/ATP y la ciclofilina D, su apertura se favorece por la acumulación del Ca^{2+} , por algunos agentes oxidantes y por un bajo potencial de membrana mitocondrial. Para que el PTP sea capaz de permitir la salida del citocromo *c* se requiere su asociación con la proteína Bax formando un canal específico para el citocromo *c*. La salida de citocromo *c* puede ser prevenida por la proteína Bcl-2, por lo tanto el balance entre Bax y Bcl-2 permite vivir a la célula, pero éste puede alterarse por diversos fármacos (Szewczyk y Wojtczak, 2002).

El cáncer y la mitocondria

El cáncer es una enfermedad que se produce cuando se pierde la regulación de la duplicación celular que ocasiona una proliferación sin control de las células. Es causado por mutaciones que afectan la estabilidad del genoma, dando como resultado la alteración de proteínas relacionadas con el control de la división celular y del proceso de la apoptosis.

Algunas alteraciones en la mitocondria se han asociado con el desarrollo del cáncer y con la resistencia a algunos fármacos (cisplatino). Se sabe que bajas

concentraciones de intermediarios reactivos de oxígeno que son producidos por la mitocondria están implicados como segundos mensajeros para la inducción de la proliferación celular, así como también que la producción de ATP puede controlar el paso de una fase a otra del ciclo celular (Dorward *et al.* 1997). Por otro lado también se han detectado cambios en el potencial de membrana mitocondrial mediante el empleo de la rodamina 123 que se acumula en la mitocondria debido a que es un catión lipofílico. En un estudio con 200 líneas celulares de cáncer derivadas de tumores de riñón, de ovario, de páncreas, de pulmón, de piel, de hígado, de cervix, de vulva, de estómago y de tráquea, se encontró una mayor retención de está que en las células normales (Dorward *et al.* 1997). Se detectó un incremento en el potencial de membrana mitocondrial en las células tumorales (carcinomas) de alrededor de 60 mV con respecto a las células normales (180 mV) (Chen, 1988) ; dicha diferencia no se manifestó en algunos tipos de cáncer de pulmón, de colón, leucemias, linfomas, neuroblastomas y osteosarcomas. Posteriormente se demostró que las rodaminas tenían actividad antitumoral debido a que se acumulan preferentemente en las células tumorales debido al elevado potencial de membrana que tienen (Bernal *et al.* 1983; Summerhayes *et al.* 1982; Nadakavukaren *et al.* 1985; Davis *et al.* 1985; Modica-Napolitano y Aprille, 1987). Aprovechando esto se continuó la búsqueda de compuestos con características similares a las de las rodaminas (cationes lipofílicos), encontrándose hasta el momento varios compuestos de los que sobresalen el dequalinium (Weiss *et al.* 1987) y el MKT-077 (Koya *et al.* 1996; Dorward *et al.* 1997), este último debido a los buenos resultados ya está en evaluación clínica (Dorward *et al.* 1997).

Fármacos y la mitocondria

Desde el punto de vista farmacológico y toxicológico, la mitocondria es un blanco importante de un gran número de fármacos que ocasionan efectos tanto benéficos como adversos. Entre los fármacos que interactúan con la mitocondria se encuentran algunos antitumorales, (etoposido, doxorubicina); inhibidores y activadores del canal de potasio (K_{ATP}) (nicorandil, diazóxido, ácido 5-hidroxi-dodecano, glibenclamida); benzodiazepinas (clonazepam); inmunosupresores (ciclosporina A y tacrolimus); antivirales (AZT) ; anti-inflamatorios no esteroidales (diclofenaco, piroxicam, ácido salicílico, dipirona) y anestésicos locales (dibucaína, butacaína) (Szewczyk y Wojtczak, 2002).

Fármacos antitumorales

Los agentes antitumorales (Figura 3) interactúan con la mitocondria de diferente manera. Así la adriamicina induce apoptosis vía liberación del citocromo *c* por la generación de radicales libres (Szewczyk y Wojtczak, 2002), la bleomicina fragmenta el ADN mitocondrial (Lim y Neims, 1987), el tamoxifen afecta la respiración (en estado 4, en estado 3 y la desacoplada), con disminución del potencial de membrana mitocondrial (Cardoso *et al.* 2001). Además de estos compuestos hay otros agentes que interactúan con la mitocondria como el cisplatino (compuesto de coordinación)

El Cisplatino

El cisplatino (cis-diaminodicloroplatino II) compuesto de coordinación con platino (II) (figura 3), es un agente antineoplásico utilizado en el tratamiento de tumores sólidos (ovario, testículo, cervix, cuello y cabeza) (Rozenzweig *et al.* 1977; Williams y Einhorn,

1982), pero debido a sus efectos tóxicos sobre el riñón se ha limitado su uso por la retención y acumulación del platino (De Conti *et al.* 1973; Porter y Bennett, 1981; Chopra *et al.* 1982 ; Safirstein *et al.* 1984). Las lesiones encontradas tanto en ratas como en humanos tratados con cisplatino se caracterizan por degeneración del segmento S3 del túbulo proximal en donde se observan áreas de necrosis, hinchamiento celular, condensación de la cromatina, hinchamiento de las mitocondrias, formación de vesículas y ruptura de membranas celulares (Dentino *et al.* 1978; Dobyan *et al.* 1980; Jones *et al.* 1985; Goldstein y Mayor, 1993), cabe mencionar que la forma *trans* no causa toxicidad, como la forma *cis* (Goldstein y Mayor, 1993). En ratas tratadas con una dosis de 7mg / Kg de peso, se demostró una mayor acumulación de cisplatino en riñón (40 mg Pt / mg de tejido) que en hígado (19 mg Pt / mg de tejido) después de 72 horas de la inyección, En riñón se encontró en mayor cantidad en el citosol (150 ng de Pt/ mg de proteína; 0.77 nmoles de Pt /mg de proteína), en la mitocondria (200 ng de Pt/ mg de proteína; 1 nmol de Pt/ mg de proteína), en el núcleo (250 ng de Pt/ mg de proteína; 1.28 nmoles de Pt/mg de proteína) y en los microsomas (300 ng de Pt/ mg de proteína; 1.53 nmoles de Pt/mg de proteína) (Kuhlmann *et al.* 1997; Choie *et al.* 1980).

El cisplatino tiene gran afinidad por los grupos sulfidrilo (SH) los cuales se ven disminuidos durante el proceso de degeneración renal en mayor proporción en mitocondria y citosol (Levi *et al.* 1980). La formación de complejos estables proteína-S-CP da lugar a la pérdida de la función de varias proteínas asociadas a la membrana y al citosol (transportadores).

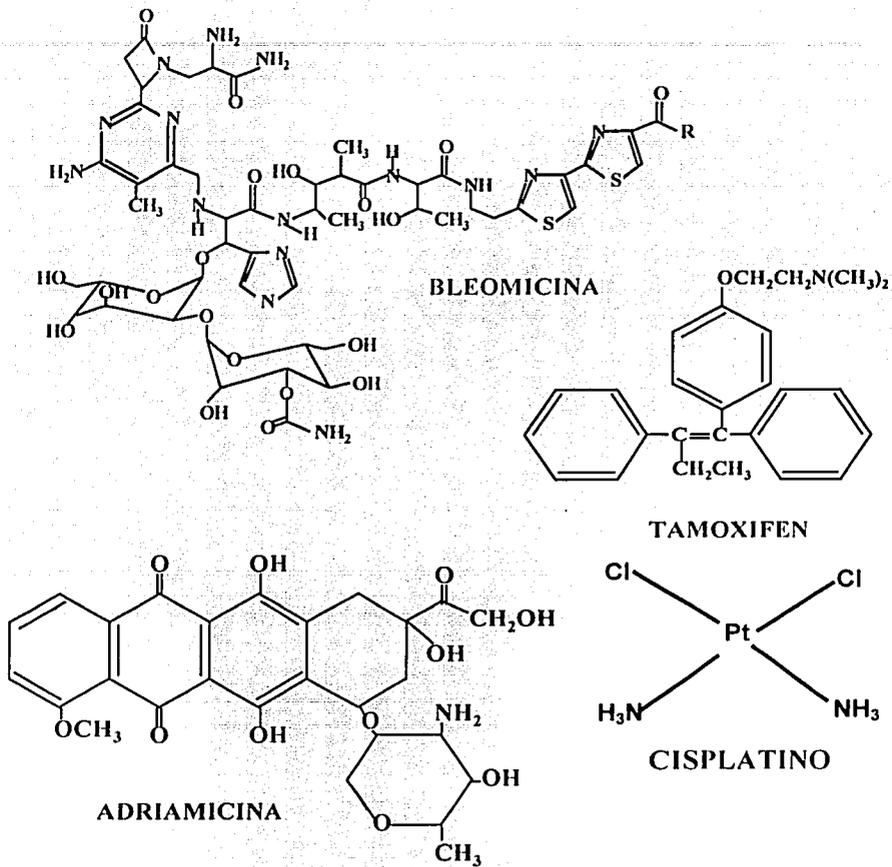
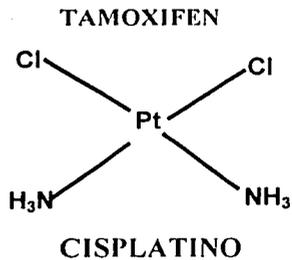


Figura 3. Estructura de algunos fármacos antineoplásicos



En la mitocondria de células de riñón, el cisplatino reduce la cantidad de glutatión (Zhang y Lindup,1993; Kruidering *et al.* 1997; Kharbangar *et al.* 2000) e inhibe a enzimas tales como la glutatión-S transferasa, la glutatión-reductasa (Kruidering *et al.* 1997) y la glutatión-peroxidasa. Por lo anterior, al disminuir el glutatión por la exposición al cisplatino, comienzan la acumulación de radicales libres que tienen como blanco la membrana de la mitocondria (peroxidación de lípidos) (Zhang y Lindup,1993) y el ADN (Kuhlmann *et al.* 1997) ocasionando cambios morfológicos (Gordon y Gattone, 1986 ; Singh, 1989; Rosen *et al.* 1992; Meléndez-Zajgla, 1999) y funcionales tanto *in vitro* como *in vivo*. Se ha reportado la disminución de la respiración en estado 3 en tubulos proximales de riñón de conejo (permeabilizados con digitonina) (Brady *et al.* 1990) y en mitocondrias de riñón de ratas que previamente habían sido inyectadas con cisplatino (Gordon y Gattone, 1986); hubo inhibición de los complejos respiratorios en células de túbulo proximal de cerdo (inhibición de 15-55%) (Kruidering *et al.* 1997) y en mitocondrias de ratón se reporta inhibición de los complejos I y II (Rosen *et al.* 1992) y se presentó una disminución del transporte de Ca^{2+} (Rosen *et al.* 1992) y el colapso del potencial de membrana mitocondrial (Kruidering *et al.* 1997). Estos efectos se presentan de manera tardía a una concentración de 10 μ M, que es la que se alcanza en los pacientes, sin embargo si estas concentraciones son mayores, los efectos se presentan rápidamente (Kuhlmann *et al.* 1997).

El mecanismo propuesto que favorece la actividad antineoplásica del cisplatino es la formación de aductos con el ADN con mayor afinidad por el ADN mitocondrial que por el ADN nuclear (Murata *et al.* 1990; Olivero *et al.* 1997;Gonzalez *et al.* 2001). Esto

trae como consecuencia una disminución en la síntesis de proteínas importantes (Kharbanger *et al.* 2000), que pueden propiciar así la inducción de la apoptosis por diversos mecanismos (Meléndez-Zajgla, 1999).

También en células tumorales se han descrito efectos a nivel de mitocondria, así en las células resistentes al cisplatino, se observan cambios morfológicos, una elevación en el potencial de membrana mitocondrial (Andrews and Albright, 1992), un incremento en la concentración de la citocromo *c* oxidasa, de glutatión, y de metalotioninas (Ara *et al.* 1994). Además presentan una mayor sensibilidad a inhibidores de la fosforilación oxidativa como la oligomicina (Dorward *et al.* 1997).

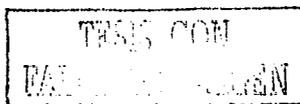
Casiopeínas

Debido a los efectos tóxicos provocados por el cisplatino se han buscado nuevos complejos de coordinación con una menor toxicidad como el carboplatino (Lebwohl y Canetta, 1998), sin embargo éste es inaccesible para la población de nuestro país por su alto costo, de ahí que se siga utilizando el cisplatino. La utilización del cisplatino en la clínica ha impulsado la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antitumoral, incorporando metales a las nuevas moléculas. En la actualidad se han desarrollado compuestos con galio, germanio, titanio, vanadio, rutenio, platino, cobre y oro, de los cuales algunos de platino, germanio y titanio están en fase de pruebas clínicas (Kopf-Maier, 1994).

En la Facultad de Química, UNAM, se seleccionó al cobre para sintetizar una serie de compuestos de coordinación de éste metal con ligantes quelatos diiminas

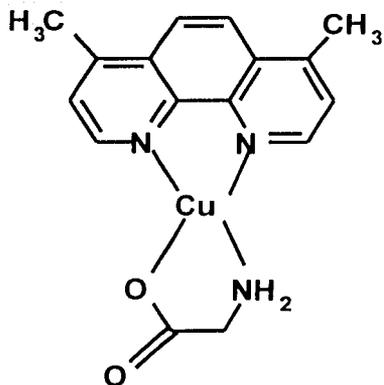
(N-N) y quelatos aminoacidatos o donadores (O-O), denominados casiopeínas (Ruiz- Azuara, 1993, 1996 y 1997); considerando que un fármaco compuesto de un metal endógeno sería menos tóxico debido a que se utilizaría los mecanismos establecidos en el organismo para su eliminación.

Las casiopeínas son compuestos registrados y patentados por la UNAM , han sido caracterizados por análisis elemental, espectrofotometría de infrarrojo y UV-visible (Ruiz-Ramírez y Gracia-Mora, 1992); además se ha establecido su estructura por rayos X (Solans *et al.* 1987 y 1988; Ruiz-Ramírez *et al.* 1992 y 1993). Estos compuestos han demostrado actividad antineoplásica *in vitro*, en cultivo de células humanas de cáncer de cervix en diferentes fases (HeLa, Siha, C33-A, CaSki) y células de origen murino (melanoma B16 y carcinoma de pulmón de Lewis). Las concentraciones inhibitorias medias establecidas para estos compuestos fueron menores a las estimadas para el cisplatino, mostrando mayor actividad la casiopeína II-gly (Figura 4) (HeLa: CSII 0.095 nM y cisplatino 35 mM; Siha: CSII 1.6 nM y cisplatino 4.5 μ M) (Gracia-Mora *et al.* 2001). En estudios *in vivo* empleando el modelo tumoral murino (modelo recomendado por el "National Cancer Institute", EUA), que consiste en implantar células tumorales (Sarcoma S180 o Melanoma B16) a ratones que posteriormente reciben un esquema de tratamiento con los fármacos en estudio se obtuvieron resultados muy alentadores, ya que dependiendo del esquema de tratamiento, dosis empleada y de la casiopeína de elección se lograron remisiones totales y un incremento en el tiempo de vida en comparación con el cisplatino (Huerta, 1992; Mayet, 1992).



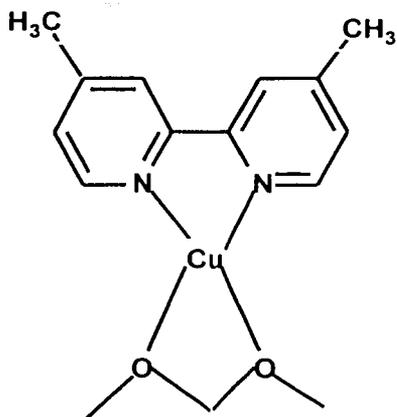
En ensayos de toxicidad en ratón y en rata, evaluados mediante estudios histológicos se demostró la presencia de lesiones importantes en hígado y riñón (Quiroz, 1992; Tinoco, 1992). Al continuar con esta línea de investigación Marín (2001) caracteriza las lesiones a nivel celular mediante la utilización de la microscopía electrónica de transmisión, en ratones tratados con dosis cercanas a la dosis letal media de la CS III-i (14 mg/kg). Los ratones presentaron diferentes manifestaciones como trastornos circulatorios, taquicardia, convulsiones, disnea y ataxia. Encontrándose a nivel microscópico lesiones y alteraciones en núcleos y organelos. Siendo la mitocondria uno de los organelos más afectados principalmente en las células de hígado, del músculo cardíaco y del riñón, en donde se observo principalmente dilatación de crestas, gigantismo y pérdida total o parcial de sus membranas (Marín, 2000). Esto hace suponer que las casiopéinas pueden ejercer su toxicidad a través de la mitocondria y también se sabe que la interacción de las casiopéinas con el ADN celular (formación de aductos) es la responsable de su citotóxicidad (Arnaudeau *et al.* 2000). Por lo tanto es importante caracterizar el efecto de las casiopéinas sobre la mitocondria midiendo parámetros como la respiración y el potencial de membrana mitocondrial, que van mas allá de las observaciones morfológicas. En este trabajo los compuestos que se utilizaron fueron la casiopéina II-gly (CSII) y la casiopéina III-i-a (CSIII-I) (Figura 4).

TESIS CON
CALIFICACIÓN



CASIOPEINA II-GLY

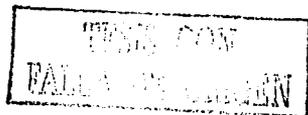
Acua(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) (glicina)
cobre (II) nitrato.



CASIOPEINA III-I-A

Acua(4,4' -dimetil-1, 2'-bipiridina) (acetilacetato)
cobre (II) nitrato.

Figura 4. Estructura de las Casiopeínas.

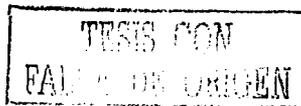


HIPÓTESIS

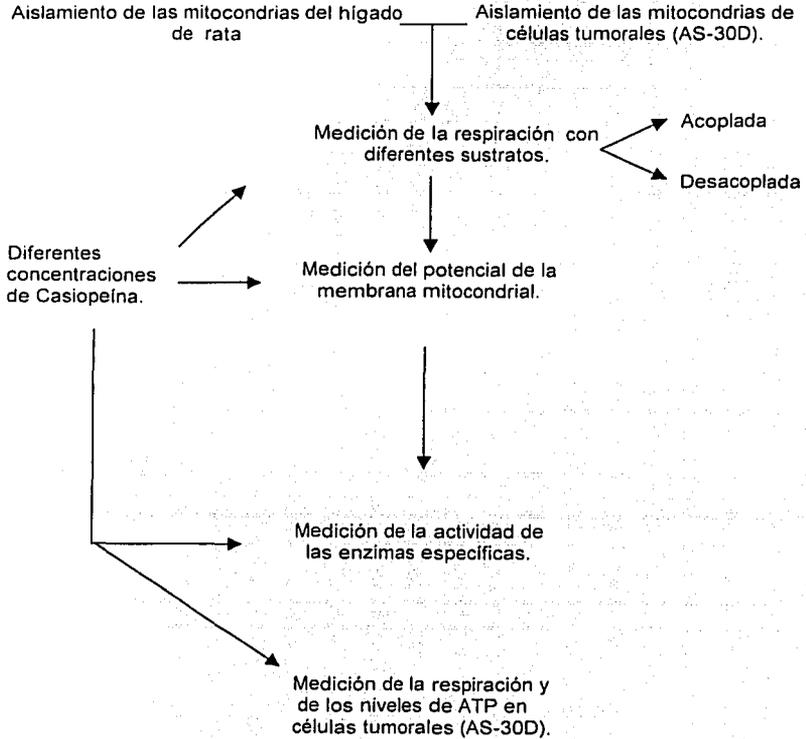
Algunos de los efectos tóxicos a nivel celular que ocasionan las casiopelinas se deben a su acción sobre la actividad mitocondrial.

OBJETIVOS

- Evaluar el efecto de las casiopelinas sobre diferentes funciones en mitocondrias aisladas de células no tumorigénicas y de células tumorales (AS-30D).
- Determinar a nivel de mitocondria cuales son los sitios sobre los que actúan las casiopelinas.
- Determinar la selectividad de las casiopelinas hacia las mitocondrias tumorales.
- Evaluar el efecto de las casiopelinas sobre la fosforilación oxidativa en células intactas (AS-30D).



DESARROLLO EXPERIMENTAL



MÉTODOS

Propagación de la línea tumoral AS-30D

La línea celular AS-30D fue propagada por inoculación de $2-4 \times 10^8$ células, suspendidas en 2 mL de líquido de ascitis, a la cavidad peritoneal de ratas hembras de la cepa *Wistar* de 250 g de peso. Las ratas inoculadas fueron alimentadas *ad libitum* por 8 a 11 días. Posteriormente se les practicó dislocación cervical y se extrajo el líquido de ascitis de su cavidad peritoneal.

Obtención de suspensión de células de AS-30D

Una vez que se extrajo el líquido de ascitis se centrifugó a 1800 rpm por 2 minutos a 4 °C . El sedimento, que contenía las células tumorales y componentes celulares sanguíneos fue resuspendido en 30 mL de medio Krebs-Ringer modificado (NaCl 125 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1.4 mM, KH₂PO₄ 1 mM, HEPES 25 mM y pH 7.4) y centrifugado a 1500 rpm. Este procedimiento se repitió 2 veces más, con centrifugaciones a 1300 rpm. Después de haber cuantificado la proteína por el método de biuret, las células se ajustaron a una concentración final de 53 mg de proteína celular/mL.

Aislamiento de las mitocondrias

Se utilizaron ratas hembras de la cepa *Wistar* con un peso aproximado de 250 a 300 g.

Del hígado y del riñón (Moreno-Sánchez, 1985).

Se extrajo el órgano y se homogeneizó en aproximadamente 25 mL de medio SHE (Sacarosa 220 mM, HEPES 10 mM , EGTA 1mM y pH 7.3) a 4° C. Se centrifugó a

2500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, se filtró a través de una gasa y se centrifugó nuevamente a 9800 rpm por 10 minutos a 4°C. El botón se resuspendió en 1 mL de medio SHE con 0.1 % de albúmina libre de ácidos grasos y 1mM de ADP . Se incubó 10 minutos a 4°C, al finalizar el tiempo de incubación se agregaron 40 mL de medio SHE y se centrifugó a 9800 rpm por 10 minutos a 4°C. El botón se resuspendió en 300 µL de medio SHE y se midió la proteína por el método de biuret (Gornall *et al.* 1949), utilizando un estándar de albúmina de 100 mg/mL.

Del corazón (Moreno-Sánchez y Hansford, 1988)

Se extrajo el corazón y se cortó en trozos pequeños. Se homogeneizó en 25 mL de medio SHE en presencia de 2 mg de proteasa Nagarse por cada corazón durante 9 minutos a 4°C. Se centrifugó a 9800 rpm por 10 minutos a 4°C. Después se resuspendió el botón en 25 mL de medio SHE mediante el empleo de tubos de ensaye llenos de hielo. Se homogeneizó nuevamente en el poter. Posteriormente se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C . Se recuperó el sobrenadante, se filtro a través de una gasa y se centrifugó nuevamente a 9800 rpm por 10 minutos a 4°C. El botón se resuspendió en 1 mL de medio SHE con 0.1 % de albúmina libre de ácidos grasos y 1mM de ADP . Se incubó 10 minutos a 4°C. Al finalizar el tiempo de incubación se agregaron 40 mL de medio SHE y se centrifugó a 9800 rpm por 10 minutos a 4°C. El botón se resuspendió en 300 µL de medio SHE y se midió la proteína por el método de biuret (Gornall *et al.* 1949), utilizando un estándar de albúmina de 100 mg/mL.

De la línea celular AS-30D (López-Gómez *et al* 1993; Moreadith y Fiskum, 1984)

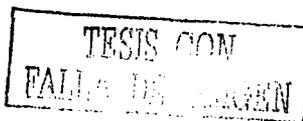
Se extrajo todo el líquido de ascitis (60 mL) y se centrifugó a 1700 rpm por 2 minutos. Se resuspendió el botón en el medio NKT (NaCl 150 mM, KCl 5 mM, Tris/HCl 10 mM y pH 7.5) y se centrifugó a 1700 rpm por 2 minutos. Éste proceso se repitió dos veces. Después se resuspendió el botón en 25 mL de medio SHE y se centrifugó a 1700 rpm por 2 minutos. Se resuspendió el botón, se midió la proteína y se llevó a una concentración final de 30 mg/mL.

Con agitación continua y con una concentración de 0.4% de albúmina se agregó gota a gota 30 µg de digitonina (marca Sigma, 50% pureza y lote 122H1068) por mg de proteína. Se incubó durante 3 minutos a 4°C. Al finalizar se agregó SHE dos veces el volumen inicial. Se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos a 4°C, al terminó se tomo el botón y se homogeneizó. Se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos a 4°C, se separó el sobrenadante y el botón se volvió a homogeneizar. El proceso para obtener el sobrenadante se repitió 2 veces más.

Los sobrenadantes recolectados se centrifugaron a 9500 rpm por 10 minutos a 4°C. El botón se resuspendió en 0.1% de albúmina y 1 mM de ADP. Se incubó por 10 minutos a 4°C. Al finalizar se adicionó SHE y se centrifugó a 9500 rpm por 10 minutos a 4°C. Finalmente el botón se resuspendió en SHE y se midió proteína.

Preparación de las partículas submitocondriales de hígado.

Una vez que se obtuvieron las mitocondrias de cinco hígados se siguió el procedimiento indicado por Thayer y Rubin, 1979. Se resuspendieron las mitocondrias en el medio SHE y se adicionaron 0.1-0.2% de albúmina libre de ácidos grasos. Se



ajustó la cantidad de proteína a 50 mg/mL y se agregó digitonina (0.07 mg de digitonina/ mg de proteína) en agitación a 4 °C. Después de 15 minutos de agitación se agregaron 3 volúmenes del medio SHE y se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Posteriormente el botón se resuspendió en el medio de sonicación, que contenía NADH 0.2 mM, succinato 1 mM, ATP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, Mops 10 mM y albúmina 1mg/mL y se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Posteriormente se resuspendió el botón en 10 mL de medio de sonicación y se agregó MgCl₂ hasta obtener una concentración final de 12 mM. Se sonicó cuatro veces a 0 °C por 15 segundos con intervalos de un minuto de descanso, al finalizar se centrifugó a 15000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Se separó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 45000 rpm por 45 minutos a 4 °C. Por último el botón restante se resuspendió en medio SHE y se midió proteína.

Consumo de oxígeno (mitocondrias)

El consumo de oxígeno se midió por medio de un electrodo tipo Clark en 1.9 mL de medio KME (KCl 120 mM, Mops 20 mM, EGTA 0.5 mM y pH 7.2) al cual se le adicionó de 1 a 2 mg de proteína, K₂HPO₄ 5 mM, α -cetoglutarato 10 mM o succinato 10 mM + rotenona 1 μ M. Al terminar el tiempo de incubación se agregó en el caso de la respiración acoplada, 600 nmoles de ADP y para la desacoplada 0.4 μ M de CCCP. Tomando en cuenta que a 30 °C y a la altura de la ciudad de México se tienen disueltos 400 ng átomos oxígeno/mL en KME.

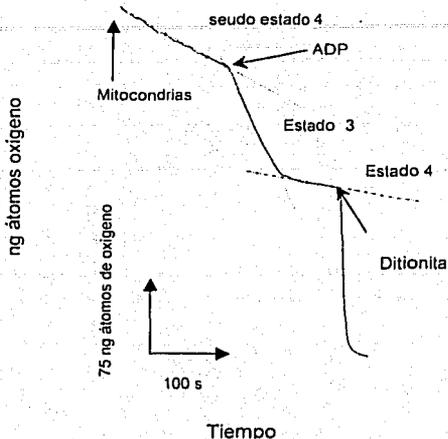


Figura 5. Trazo representativo de consumo de oxígeno.

Potencial de membrana

Se hizo la determinación cualitativa del potencial de membrana mediante la utilización de Safranina O 5 μM , Succinato 10mM, K_2HPO_4 5 mM , rotenona 1 μM , 1mg de proteína /mL en KME a 30 °C, en un espectrofluorómetro a 495 nm de excitación y 586 nm de emisión (Wieckowski *et al* 1998) .

La determinación cuantitativa se hizo mediante la distribución de tetrafenilfosfonio [^3H] TPP+. Se resuspendieron 2 mg de proteína en 0.5 ml de medio KME que contenía K_2HPO_4 5 mM , α -cetoglutarato 10 mM o succinato 10 mM + rotenona 1 μM y [^3H] TPP+ 0.8 μM (actividad específica 27.0 Ci/mmol) y se incubaron durante 4 minutos. Si era necesario se hacía la adición de ADP 10 mM al medio e inmediatamente se centrifugaba a 14000 rpm por 2 min a 4°C en una microcentrífuga. Al término se tomó del sobrenadante 150 μL y el botón se resuspendió completamente

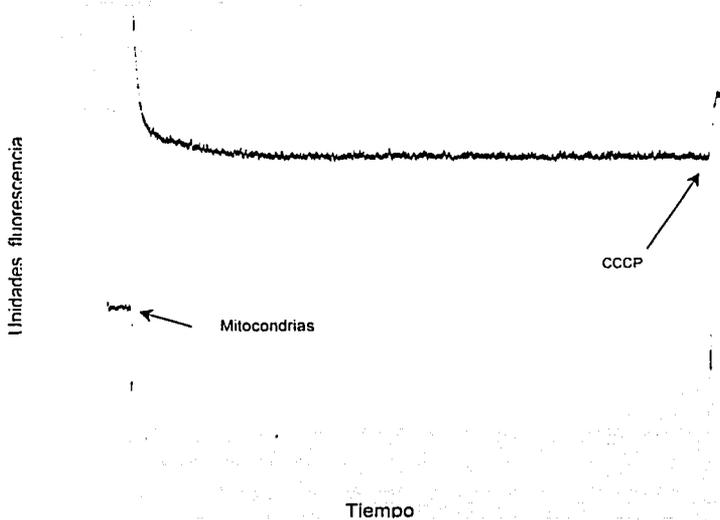
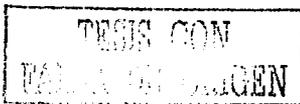


Figura 6. Trazo representativo de la medición cualitativa del potencial de membrana.

en 150 μ l de una solución de SDS al 0.5 %. En las muestras se hizo la medición de la distribución del [3 H] TPP+ y se calculó el potencial de membrana como lo describe Rottenberg, 1984.

$$\Delta \psi = RT/ZF \ln (RcVo-Ko)/(Vi+ Ki) \text{ a } 30^\circ \text{ C es igual a}$$

$$\Delta \psi = 60 \text{ mV} \log (RcVo-Ko)/(Vi+ Ki) \text{ donde :}$$



Rc= la relación entre el contenido del catión en las mitocondrias y en el medio (cuentas en el pellet / cuentas en el sobrenadante),

Vo= volumen del medio externo (volumen que se tomo del sobrenadante),

Vi= volumen de la matriz mitocondrial (1 μ L por mg de proteína),

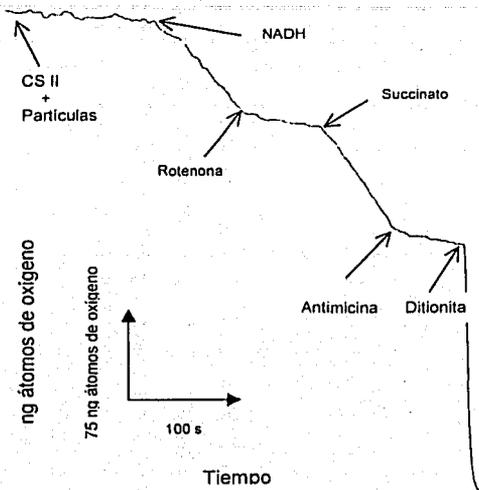
Ko= coeficiente de partición interno (7.9 μ L/ mg de proteína para el TPP+),

Ki= coeficiente de partición externo (14.3 μ L/ mg de proteína).

Consumo de oxígeno (Partículas submitocondriales.)

El consumo de oxígeno se midió a 30 °C en 1.9 mL de medio SHE con KCl 20 mM, se adicionó la concentración correspondiente de casiopelina y partículas (0.5 mg de proteína), se incubó por 4 minutos. Al término se agregó NADH 2 mM, posteriormente se agregó rotenona 1 μ M, poco después succinato 5 mM y finalmente antimicina 1 μ M. A la altura de la ciudad de México y a 30 °C se tomó en consideración que la solubilidad del oxígeno en medio SHE es de 390 ng átomos oxígeno/ mL.

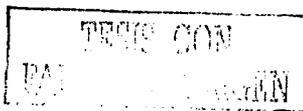
Figura 7. Trazo representativo del consumo de oxígeno de partículas submitocondriales.



Medición de las actividades de diferentes enzimas.

α -cetoglutarato deshidrogenasa (Rodríguez-Zavala *et al.* 2000)

La actividad se midió al cuantificar la aparición de NADH a una longitud de onda de 340 nm de excitación y 460 nm de emisión, calibrando la señal de fluorescencia con una concentración conocida de NADH. En 2 mL de medio KME a 30 °C y con agitación, se suspendieron las mitocondrias (1 mg de proteína), en el medio que contenía α -cetoglutarato 10 mM, Tritón 0.02%, rotenona 4 μ M, MgCl₂ 15 mM, TPP 0.85 mM, NAD⁺ 1 mM. Se incubó 4 minutos en presencia de la casiopeína y al término del periodo de



incubación se inició la reacción con la adición de CoA 0.1 mM. La adición de DTT 4 mM se hizo de acuerdo con las necesidades de los experimentos.

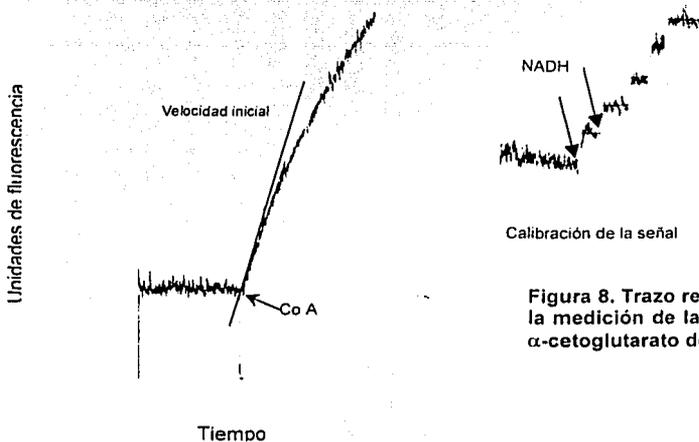


Figura 8. Trazo representativo de la medición de la actividad de la α -cetoglutarato deshidrogenasa.

Succinato deshidrogenasa

La actividad se midió al cuantificar la reducción del DCPIP a una longitud de onda de 600 nm a 28 °C. Se mezclaron mitocondrias (1 mg de proteína) en 2 mL de un medio KME que contenía DCPIP 0.2 mM, Tritón X-100 0.02% , PMS 0.2 mM, antimicina 1 μ M y al término de la incubación con el fármaco se inició la reacción con Succinato 10 mM.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Citocromo bc1

Fue determinada la actividad del citocromo *bc1* a 30°C en 2 mL de medio KME al que se le adicionó 1mg de proteína, 1.6 mM KCN, rotenona 1 µM, ferricianuro 1.5 mM. La reacción se inició agregando 5 mM de succinato. Se registró la actividad mediante la medición de la diferencia de absorbancia a 440-490 nm, calculando la actividad usando el coeficiente de extinción del ferricianuro de 0.59 mM⁻¹ cm⁻¹ (Stoner, 1987).

ATP sintetasa (Pacheco-Moisés *et al.* 2000)

Se midió la hidrólisis de ATP en 2 mL en un medio con KCl 120 mM, HEPES/KOH 40 mM, MgCl₂ 5 mM, EGTA 0.1 mM, Piranina 2 µM, y de partículas submitocondriales 0.6 mg. Se inició la reacción agregando ATP 2 mM y se detuvo con oligomicina 1 µM. La medición se hizo a longitud de onda de 450 nm de excitación y 507 nm de emisión; la señal de fluorescencia se calibró agregando una concentración conocida de NaOH.

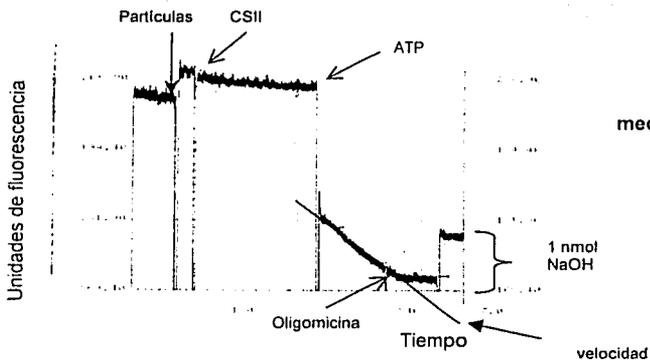
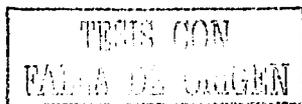


Figura 9. Trazo representativo de la medición de la actividad de la ATP sintetasa.



Hinchamiento mitocondrial

El hinchamiento se midió a 28 °C mediante el cambio de densidad óptica a 540 nm, en 2 mL de medio KME en presencia de las sales de amonio de succinato o α -cetoglutarato 100 mM. Se inició la reacción agregando 1 mg de proteína. Este procedimiento fue utilizado inicialmente al tratar de evaluar el efecto sobre los transportadores. Al final solo se utilizaba medio KME con 1 mg de proteína y se iniciaba el trazo agregando 25 nmoles/ mg de proteína de CSII ; al utilizar ATP se agregaba desde el inicio oligomicina 1 μ M.

En la curva de selectividad se utilizó un medio con MOPS 20 mM, EGTA 0.5 mM y pH 7.2, en 2 mL de este medio se adicionó 25 nmoles/ mg de proteína de CSII, 120 mM de cada una de estas sales RbCl, KCl, NaCl y LiCl. Se inició el trazo adicionando 1 mg de proteína.

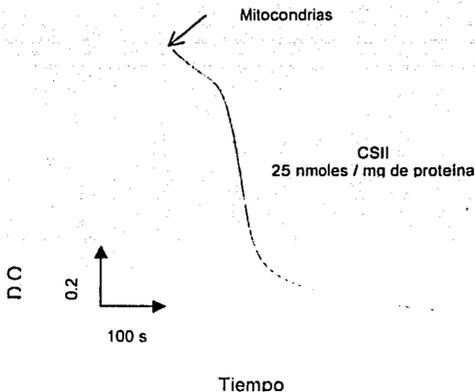


Figura 10. Trazo representativo de hinchamiento mitocondrial.

Medición de citocromo c

Las mitocondrias (10 mg de proteína) eran incubadas a diferentes tiempos a 30 °C en agitación orbital a 120 rpm en 3 mL de medio KME que contenía succinato 10 mM, rotenona 1 μ M, K_2PO_4 5 mM y diferentes concentraciones de CSII. Se inició la incubación agregando las mitocondrias, al término se centrifugó la mezcla a 14000 rpm por 3 min a 4 °C. Posteriormente se tomó 2 mL del sobrenadante, para cuantificar citocromo c.

La cuantificación de citocromo c se determinó por la obtención de los espectros de absorbancia de la muestra reducida con ditionita menos el espectro de absorbancia de la muestra oxidada con persulfato. Para calcular el contenido de citocromo c se calculó la diferencia en absorbancia de 550 menos 540 nm y un coeficiente de extinción de 19 $mM^{-1}cm^{-1}$ (Inomoto *et al.* 1994).

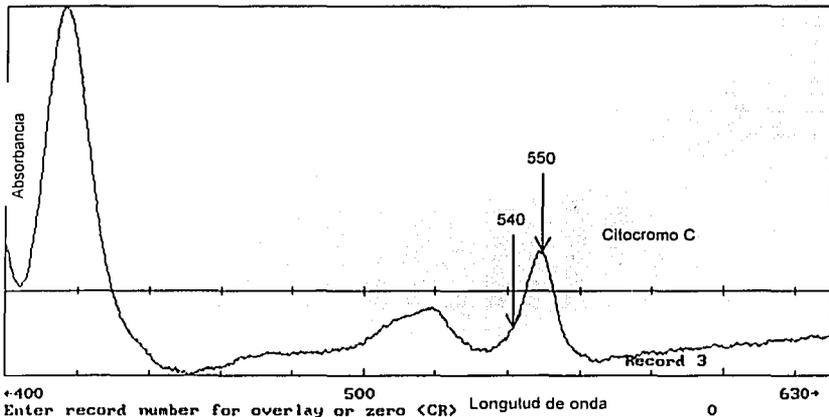


Figura 11. Espectro representativo de la cuantificación de citocromo c.

Células

En un volumen final de 1.5 mL de medio Krebs-Ringer modificado se adicionó 41 mg de proteína celular, después se incubó 5 min en agitación orbital (1500 rpm) a 37 °C, al terminó del periodo de incubación, se adicionó la CSII a las concentraciones establecidas y se incubó el tiempo necesario tomando como el tiempo cero la adición. Una vez que finalizó el tiempo de incubación se tomaron 4 mg de proteína celular para medir la respiración y 27 mg para la hacer la precipitación ácida.

Respiración

En 1.9 mL de medio Krebs-Ringer modificado se adicionaron 4 mg de proteína, durante el trazo se agregó oligomicina 5 μ M. Cuando el consumo de oxígeno se mantuvo constante se agregó rotenona 2 μ M. A 37°C se tomó en cuenta que en el medio Krebs-Ringer se tiene (disuelto) 380 ng átomos oxígeno/mL (190 μ H₂O).

Quantificación de ATP

Las alícuotas de las incubaciones fueron digeridas a 4°C en ácido perclórico (HClO₄) al 3% - EDTA (10 mM). La fracción proteica y membranal fue removida por centrifugación. El sobrenadante se neutralizó con una mezcla de KOH (10 N) – TRIS (0.1 M). El KClO₄ precipitado se eliminó por centrifugación y el sobrenadante neutralizado fue dividido en varias alícuotas y almacenado a –70 °C. El ATP se midió al cuantificar la aparición de NADPH mediante la hexocinasa y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en un medio que contenía 50 μ L del sobrenadante obtenido en la precipitación ácida, MgCl₂ 2 mM, HEPES 50 mM, EGTA 1 mM, glucosa 5 mM, NADPH

0.1 mM, pH 7.4 y una temperatura de 30 °C. La medición se hizo a una longitud de onda de 340 nm de excitación y 460 nm de emisión, calibrando la señal de fluorescencia con NADH a una concentración conocida.

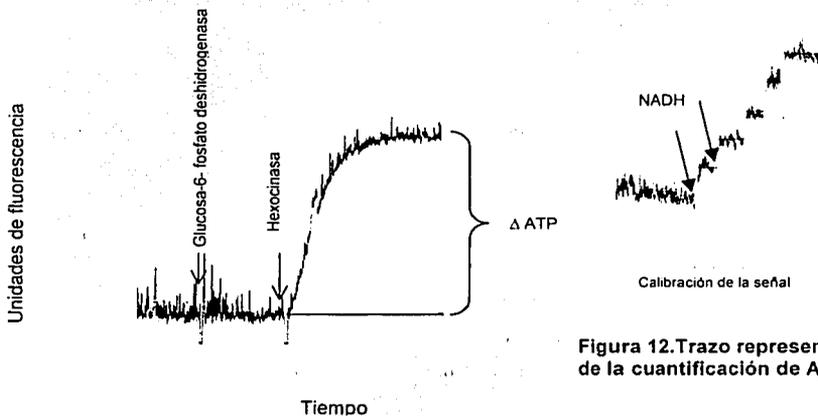


Figura 12. Trazo representativo de la cuantificación de ATP.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

Respiración y potencial de membrana en mitocondrias

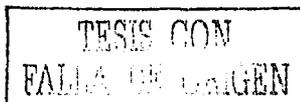
Como lo único que se tenía hasta antes de la realización de éste trabajo sobre la interacción de las casiopeínas (CS) con la mitocondria eran datos morfológicos, inicialmente se planteo como objetivo determinar el efecto de estos compuestos sobre la respiración. Se encontró que las casiopeínas inhibieron la respiración acoplada (Figura 13 B) e incrementaron la relación ADP/O (inserto de la Figura 13 B). Dichos parámetros son afectados de la misma manera por varios inhibidores de la fosforilación oxidativa, a diferencia de un agente desacoplante que hace que disminuya la relación ADP/O. Las casiopeínas también colapsaron el potencial de membrana que fue medido inicialmente mediante el empleo de safranina O (Figura 14). Tanto la inhibición de la respiración como el colapso del potencial de membrana fue dependiente de la concentración de ambas casiopeínas y del tiempo de incubación (Figura 14 B). Esto último sugirió que las casiopeínas no difundían rápidamente a través de la membrana mitocondrial. Cabe notar que la CSII inhibió la respiración a concentraciones menores que la CSIII (Figura 13). La diferencia en las concentraciones sugirió que la CSII (fenantrolina metilada) podía pasar más fácilmente la membrana mitocondrial que la CSIII (bipiridina).

Una vez que se demostró que las casiopeínas inhibían la respiración y colapsaban el gradiente de protones, se diseñaron experimentos que ayudaran a descubrir cuales eran los sitios sobre los que actuaban. Al utilizar el α -cetoglutarato se caracterizó el efecto de las casiopeínas sobre la α -cetoglutarato deshidrogenasa, la

NADH deshidrogenasa, el citocromo *bc1* y la citocromo oxidasa. En cambio al utilizar el succinato, se estudio el efecto sobre la succinato deshidrogenasa, el citocromo *bc1* y la citocromo oxidasa. El sistema fosforilante (la ATP sintetasa, el traslocador ADP/ATP y el transportador de fosfato) se evaluó cuando la respiración era acoplada. Conjuntamente con la respiración nuevamente se midió el efecto sobre el potencial de membrana pero ahora cuantificando el potencial mediante la distribución del H^3 -TPP⁺ utilizando los dos sustratos.

Cuando se utilizó como sustrato el succinato se encontró que las respiraciones (acoplada y desacoplada) eran menos sensibles a la inhibición provocada por las casiopéinas, lo que no ocurría al utilizar α -cetoglutarato (Tabla 1). Esta diferencia en sensibilidad ponía de manifiesto la existencia de al menos dos sitios de inhibición. Sin embargo de inicio se descartó al sistema fosforilante, debido a que entre la respiración acoplada (sistema fosforilante activo) y la respiración desacoplada (sistema fosforilante no activo) no había una diferencia en las concentraciones inhibitorias medias con un mismo sustrato. Así que los posibles blancos de las casiopéinas estarían ubicados en las enzimas de la cadena respiratoria (NADH deshidrogenasa, citocromo *bc1* y citocromo oxidasa) y del ciclo de Krebs (α -cetoglutarato deshidrogenasa y la succinato deshidrogenasa).

Otro punto importante que se valoró fue la selectividad de la CSII hacia diferentes tipos de mitocondrias, de ahí que se hayan utilizado mitocondrias aisladas



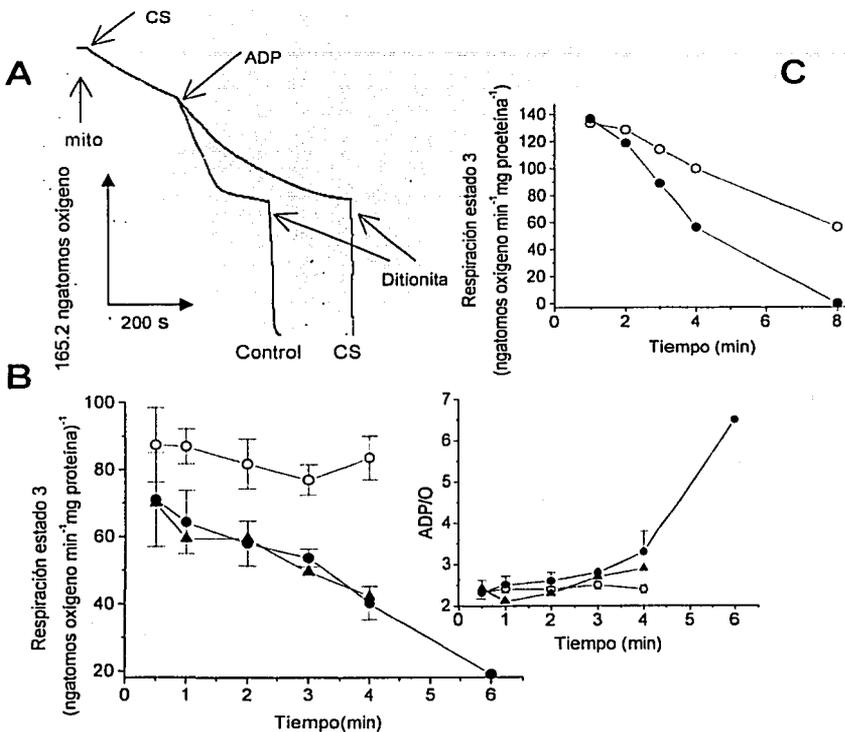


Figura 13. Efecto de las casiopeínas sobre la respiración a diferentes tiempos de incubación. A) Se muestra un trazo representativo del consumo de oxígeno en donde se indica el orden en que se agregó la casiopeína (CS), las mitocondrias (mito), el ADP y la ditionita. B) Éste gráfico indica la inhibición provocada por la CSIII ● (73 nmoles/mg de proteína) y la CSII ▲ (8.9 nmoles/mg de proteína), con respecto al control ○ a diferentes tiempos de incubación (sustrato α -cetoglutarato). El inserto muestra el efecto sobre la relación ADP/O con respecto al tiempo. C) Inhibición de la respiración provocada por la CSII ▲, con respecto al control ○ a diferentes tiempos de incubación (sustrato succinato). Los ensayos se realizaron en medio KME con α -cetoglutarato 10 mM o succinato 10 mM (+ rotenona 1 μ M), fosfato 5 mM, 2 mg de proteína, ADP 600 nmoles y 30 °C de temperatura.

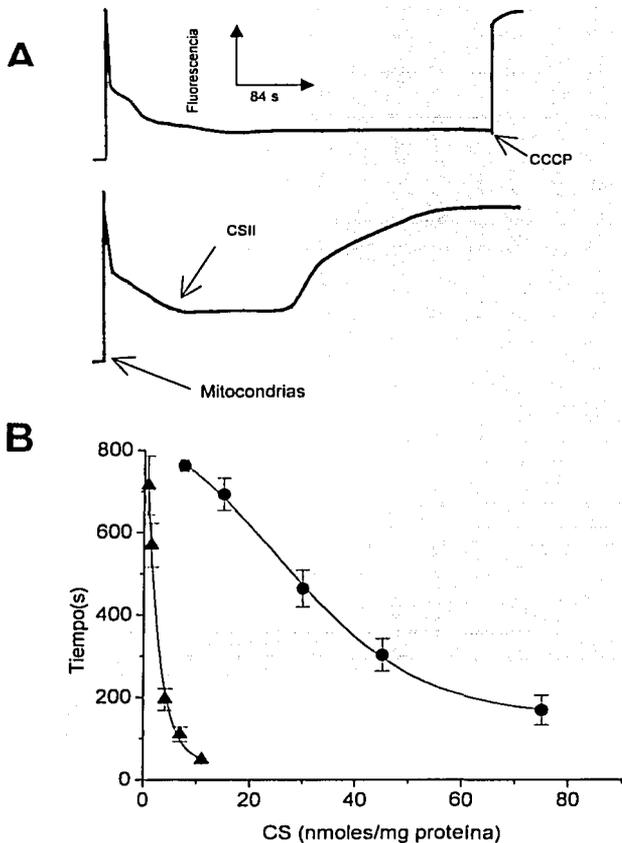


Figura 14. Inhibición del potencial de membrana mitocondrial. A) Trazo representativo de la medición del potencial de membrana con safranina O. **B)** El gráfico muestra diferentes concentraciones de CSIII ▲ y CSII ● contra el tiempo en que despolarizan la membrana mitocondrial. Se ensayo en medio KME con succinato 10 mM , rotenona 1 μ M, fosfato 5 mM, 1 mg de proteína, safranina O 5 μ M , a una longitud de onda de 495nm de excitación y 586 nm de emisión y 30 $^{\circ}$ C de temperatura.

del hígado, del riñón, del corazón y de la línea celular AS-30D. La concentración de la CSII para inhibir el 50% de la respiración acoplada y desacoplada en las mitocondrias del hígado y de la línea celular AS-30D fue la misma (Tabla 1, Figura 15). Sin embargo, las mitocondrias de corazón presentaron mayor resistencia al efecto de la CSII (Tabla 1). La diferencia en la sensibilidad entre las mitocondrias del corazón y del hígado a la CSII pudo deberse a que en el corazón existe una mayor cantidad de enzimas de la fosforilación oxidativa que en el hígado.

Con α -cetoglutarato, la relación ADP/O aumento en presencia de CSII tanto en las mitocondrias del hígado como en las mitocondrias de la línea celular AS-30D (Figura 16), debido a la inhibición de la respiración en estado 3. Con succinato, la relación ADP/O disminuyó en las mitocondrias del hígado y permaneció sin cambio en las mitocondrias de la línea celular AS-30D. La respiración en estado 4 con α -cetoglutarato se mantuvo constante en presencia de CSII en ambos tipos de mitocondrias a diferencia de con succinato (Figura 16 A), en donde está última se incremento hasta un 300% en las mitocondrias del hígado y ligeramente en las mitocondrias de la línea AS-30D (Figura 16 B).

El colapso del potencial de membrana por la CSII fue de una sensibilidad similar en las mitocondrias del hígado, de la línea celular AS-30D (Figura 17) y del riñón, mientras que las mitocondrias de corazón fueron más resistentes al efecto de la CSII (Tabla 1).

Cuando se llevo acabo la comparación de la concentración necesaria de CSII para inhibir un 50% de la respiración y del potencial de membrana, se encontró que no hubo diferencia cuando se utilizó α -cetoglutarato como sustrato (Tabla 1). En cambio, cuando se utilizó el succinato, las concentraciones para inhibir el 50% de ambos parámetros resultaron ser diferentes (21 ± 0.7 y 6.4 ± 0.2 nmoles / mg de proteína respectivamente), necesitándose una mayor concentración para inhibir la respiración, que el potencial de membrana. Esto último sugiere que la CSII actúa como un agente desacoplante cuando la mitocondria utiliza como sustrato de la respiración al succinato debido a que se estimula la respiración en estado 4 y se presenta una disminución en la relación ADP/O como sucede con otros agentes desacoplantes. Sin embargo esta propuesta no explica la inhibición de la respiración desacoplada.

CASIOPEÍNA II	Hígado				AS-30D				Riñón			Corazón	
	Respiración		Potencial		Respiración		Potencial		Potencial	Respiración		Potencial	
	Acop	Desa	Est3	Est4	Acop	Desa	Est3	Est4	Est3	Acop	Desa	Est3	
Succinato	21±0.7 (3)	16±3 (3)	6.4±0.2 (4)	5.8±0.5 (4)	18 (2)	27.5 (2)	7.4±0.6 (3)	9.1±1 (3)					
α-ceto	4.7±0.7 (3)	4.4±0.5 (4)	5.5±0.9 (4)	5.8±0.9 (4)	4.6±0.7 (3)	3.6±0.3 (3)	5.2±0.1 (3)	7.3±0.6 (3)	6.3 (2)	12±2 (3)	10.5±1.8 (3)	9.6±2.3 (3)	

CASIOPEÍNA III		
Succinato	239±12 (3)	330±15 (3)
α-ceto	77±4 (3)	90±12 (3)

Tabla 1. Concentraciones Inhibitorias Medias para las Casiopeínas (nmoles/mg de proteína) en mitocondrias. Se muestran media ± SD, el número entre paréntesis indica las preparaciones realizadas. Se calcularon las concentraciones a partir de las curvas de % de respiración vs concentración de CSII. Acop: acoplada; Desa: desacoplada; Est3: estado 3 y Est4: estado 4.

TESIS CON
 FIRMAS DE ORIGEN

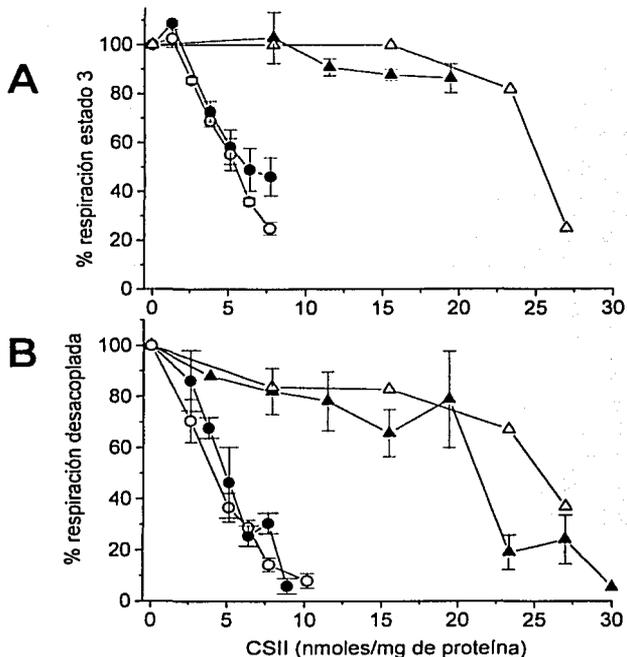


Figura 15. Efecto de diferentes concentraciones de CSII sobre la respiración de mitocondrias de hígado y de la línea celular AS-30D. A) Inhibición de la respiración en estado 3. B) Inhibición de la respiración desacoplada. Mitocondrias del hígado (α -cetoglutarato ●, Succinato ▲) y de la línea celular AS-30D (α -cetoglutarato ○, Succinato △). Se ensayó en medio KME con α -cetoglutarato 10 mM + 2 mg de proteína o succinato + 1 mg de proteína + rotenona 1 μ M, fosfato 5 mM y 30 °C de temperatura.

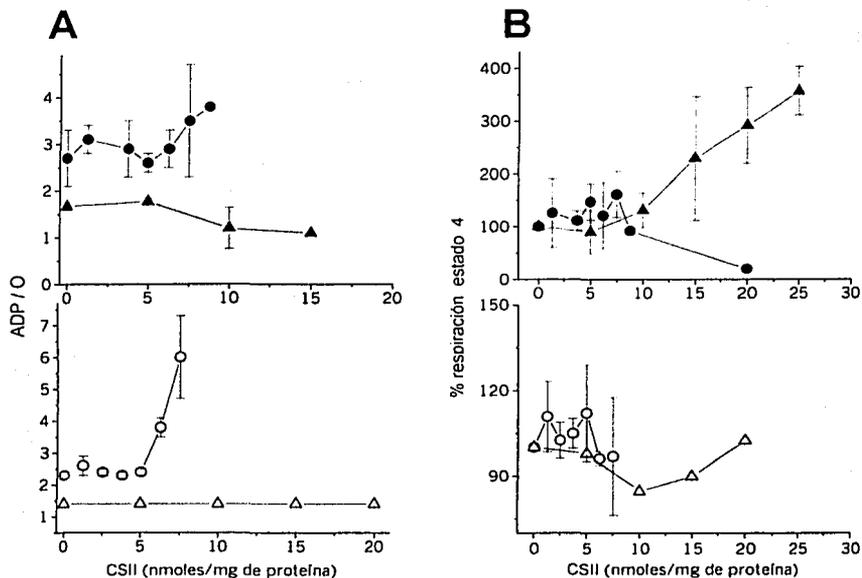


Figura 16. Efecto sobre la relación ADP/O y la respiración de estado 4. A) Relación ADP/O. B) Respiración en estado 4. Mitochondrias del hígado (α -cetoglutarato ●, Succinato ▲) y de la línea celular AS-30D (α -cetoglutarato ○, Succinato △). Datos calculados a partir de los resultados obtenidos de la respiración acoplada (respiración en estado 3) a diferentes concentraciones de CSII.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

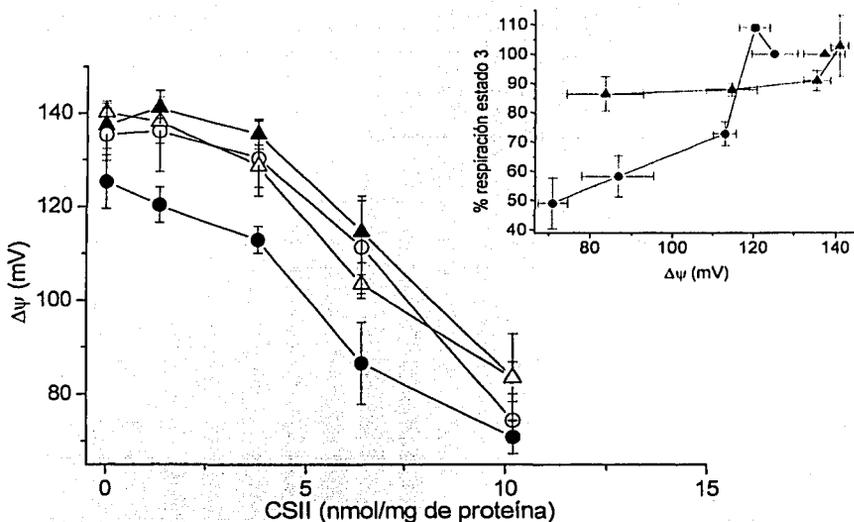


Figura 17. Inhibición del potencial de membrana. El gráfico muestra la inhibición que provocan diferentes concentraciones de CSII en mitocondrias de hígado (α -cetoglutarato ●, Succinato ▲) y de la línea celular AS-30D (α -cetoglutarato ○, Succinato △). El inserto relaciona la inhibición del potencial de membrana y la inhibición de la respiración en estado 3. Los experimentos se realizaron en medio KME con α -cetoglutarato 10 mM o succinato 10 mM (+ rotenona 1 μ M), fosfato 5 mM, proteína 2 mg, H^3 -TPP⁺ 0.8 μ M, ADP 600 nmoles, y temperatura de 30 °C.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Medición de la actividad de enzimas específicas

La medición indirecta de la actividad de la ATP sintetasa mediante la hidrólisis de ATP en mitocondrias intactas, cuantificando el potencial producido fue sensible a la CSII (Figura 17). Sin embargo, (midiendo directamente la hidrólisis de ATP) de la actividad de la ATP sintetasa no fue afectada por CSII (datos no mostrados). La actividad del citocromo *bc1* y de la NADH deshidrogenasa no se alteró en presencia de la CSII, pero sí la actividad de la succinato deshidrogenasa y de la α -cetoglutarato deshidrogenasa.

La actividad de la succinato deshidrogenasa fue inhibida a concentraciones por arriba de 75 nmoles /mg proteína (Figura 19 A), encontrándose una CI_{50} de 200 nmoles/ mg de proteína, que comparada con las concentraciones inhibitorias medias reportadas para la respiración con succinato en mitocondrias intactas (21 ± 0.7 y 16 ± 3 nmoles/mg de proteína para la respiración acoplada y desacoplada respectivamente), resulto ser 10 veces mayor. Por lo tanto, la inhibición de la succinato deshidrogenasa no esta relacionada con la inhibición de la respiración.

En el caso de la actividad de la α -cetoglutarato deshidrogenasa, inicialmente no se vio alterada, pero al parecer fue debido a que en el medio de reacción se adicionaba DTT, necesario para mantener a la enzima y a sus cofactores en forma reducida (Figura 19 B). Una vez que el DTT fue retirado del medio de reacción, la CSII inhibió la actividad de la enzima, sugiriendo que la CSII podría estar afectando grupos SH esenciales . Tratando de dilucidar si era el cobre de la CSII el responsable de la

inhibición, se enfrentó a la enzima a una concentración de 75 μM de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, pero solo hubo una inhibición del 50% de la actividad comparado con una concentración de 12 μM de la CSII que inhibió casi totalmente a la enzima. Esto sugirió que el cobre al

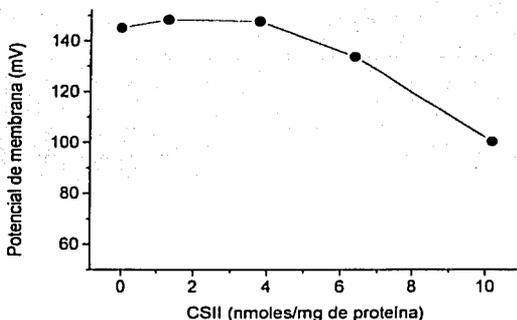


Figura 18. Efecto de diferentes concentraciones de CSII sobre la hidrólisis de ATP en mitocondrias intactas. Se ensayo en medio KME que contenía diferentes concentraciones de CSII, antimicina 0.25 μM , ATP 3 mM, fosfato 5 mM, $\text{H}^3\text{-TPP}^+$ 0.8 μM y temperatura de 30 °C. Se iniciaba la incubación (4min) adicionado 2 mg de proteína.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

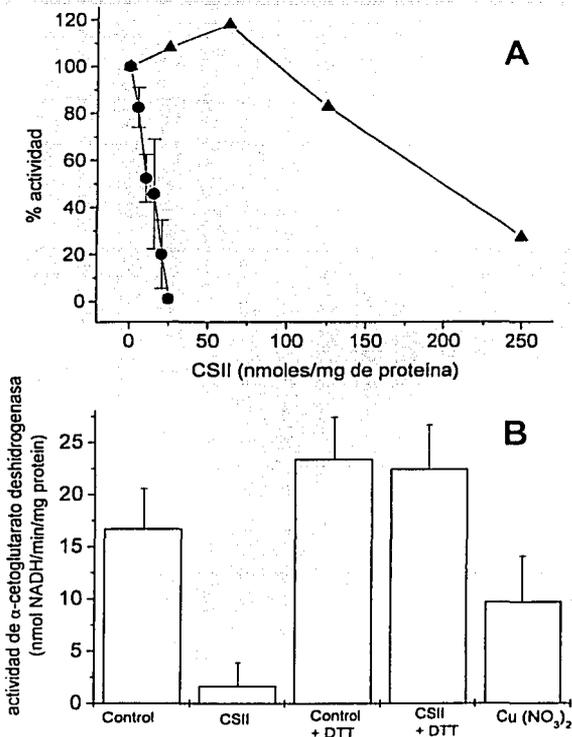


Figura 19. Inhibición de la actividad de la α -cetoglutarato deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa. A) Inhibición de la actividad de la α -cetoglutarato ● y la succinato deshidrogenasa ▲, por diferentes concentraciones de CSII. **B)** Comparación de la inhibición producida por CSII 25 nmoles/ mg de proteína, CSII 25 nmoles / mg de proteína + DTT 4 mM y Cu(NO₃)₂ 75 μ M, con respecto al control. Se midió la actividad de la α -cetoglutarato deshidrogenasa en medio KME con α -cetoglutarato 10 mM, tritón 0.02%, rotenona 4 μ M, MgCl₂ 15 mM, TPP 0.85 mM, NAD⁺ 1 mM, CoA 0.1 mM, 0.5 mg de proteína / mL y 30 °C de temperatura. La actividad de la succinato deshidrogenasa se determinó en medio KME con DCPIP 0.2 mM, tritón x-100 0.02%, PMS 0.2 mM, Antimicina 1 μ M, succinato 10 mM y 1 mg de proteína, se cuantifico la reducción del DCPIP a 600 nm y 28 °C de temperatura.

estar asociado a una molécula hidrofóbica podría interactuar más fácilmente que el cobre libre con grupos SH importantes de la enzima como lo es el ácido lipoico.

La CSII inhibió totalmente la actividad de la enzima con 25 nmoles/ mg de proteína (12 μ M). La CI_{50} fue de 10 nmoles/mg de proteína (Figura 19 A), que comparada con la CI_{50} 4.7 \pm 0.7 nmoles/ mg de proteína encontrada en la ensayos de respiración con α -cetoglutarato, permitía establecer a la α -cetoglutarato deshidrogenasa como uno de los sitios blanco de la CSII. La diferencia en las CI_{50} podría deberse a que la actividad de la enzima se ensayo en condiciones de velocidad, máxima, mientras que en los ensayos de respiración la α -cetoglutarato deshidrogenasa funciona a una menor velocidad y su inhibición requiere , por lo tanto, de una menor concentración de CSII.

La inhibición de α -cetoglutarato deshidrogenasa permitió aclarar la inhibición de la respiración con α -cetoglutarato. Sin embargo, todavía faltaba esclarecer que ocurría con la respiración con el succinato. Los últimos resultados indicaban que el sitio no se encontraba en la cadena respiratoria, porque en partículas submitocondriales, al medirse la respiración con el NADH y el succinato para evaluar el efecto sobre la NADH deshidrogenasa (complejo I) y sobre la cadena respiratoria, no se detectó inhibición en ninguno de los dos casos (Figura 7 en la sección de Métodos).

Como no se encontró efecto sobre la cadena respiratoria, ni sobre la succinato deshidrogenasa a nivel de partículas submitocondriales y la única diferencia entre las

mitocondrias y las partículas son los transportadores, se propuso que sobre el transportador de succinato era donde actuaba a CSII.

Hinchamiento

El transporte de succinato se midió mediante el hinchamiento producido por la sal de succinato de amonio. Esta técnica se basa en la entrada del amoniaco a la matriz mitocondrial en donde se genera el ion amonio que posee una carga positiva y que se estabiliza con su contralón (succinato), que al entrar utiliza su transportador. Cuando ocurre esto la mitocondria se hincha y éste cambio en el volumen interno puede medirse por una disminución en el paso de la luz en un espectrofotómetro (LaNoue y Schoolwerth, 1979).

La presencia de CSII no inhibió el hinchamiento producido por la sal de succinato de amonio, por el contrario, lo estimuló. Se observó que dicha estimulación dependía de la presencia del potasio (Figura 20 A) pues al emplear un medio con sacarosa este efecto no se observaba (Figura 20 C). Con α -cetoglutarato se encontró un hinchamiento menor (Figura 20 A).

Los mejores cationes para inducir hinchamiento con CSII fueron el Rb^+ y K^+ seguidos por el Na^+ y finalmente por el Li^+ . El perfil indicaba que se estaba abriendo un canal o transportador con selectividad a cationes monovalentes de radio iónico alto ($>1.3 \text{ \AA}$). En la mitocondria se ha reportado la presencia de un canal de potasio (K_{ATP}), que su apertura ocasiona hinchamiento de la mitocondria (Szewczyk *et al.* 1996;

Kowaltowski *et al.* 2001). Una característica importante del canal K_{ATP} es que presenta un perfil de selectividad a cationes monovalentes semejante (Szewezyk *et al.* 1996) al canal o transportador que activa la CSII (Figura 20 B). Además, la activación del canal K_{ATP} , estimula la respiración y disminuye el potencial de membrana; dichos efectos también son observados en las mitocondrias incubadas con CSII. Por tal motivo no era descabellado pensar que el canal activado por la CSII era el de K_{ATP} . Como el ATP es inhibidor del canal K_{ATP} , se propuso utilizarlo para inhibir el hinchamiento (Inoue *et al.* 1991; Paucek *et al.* 1992; Beavis *et al.* 1993; Szewczyk *et al.* 1996 y Jaburek *et al.* 1998). El ATP disminuyó el hinchamiento inducido por la CSII (en un medio con K^+), pero no el que provocaba la valinomicina (Figura 20 C). Este hallazgo era una prueba de que el canal que era estimulado por la CSII podría ser el canal K_{ATP} .

Debido a que la activación del canal K_{ATP} explicaba solamente la inhibición del potencial de membrana y el aumento de la respiración del estado 4 pero no la inhibición de la respiración, y a que existían reportes de que la apertura del canal K_{ATP} inducía la liberación del citocromo *c* dando como resultado una disminución de la respiración y sabiendo que la CSII tenía efectos muy similares al activar al canal K_{ATP} , se decidió cuantificar la liberación del citocromo *c*. (Holmuhamedov *et al.* 1998; Chiandussi *et al.* 2002).

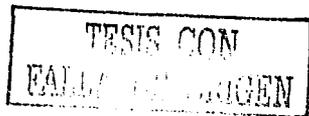
Liberación de citocromo c

Se observó una liberación del citocromo *c* cuando las mitocondrias de hígado se incubaron con diferentes concentraciones de CSII (5, 15 y 25 nmoles/mg proteína) y diferentes tiempos de incubación (1, 4 y 6 minutos) (Figura 21 A). La liberación del

citocromo *c* al parecer ocurre inmediatamente después de adicionar una concentración de 25 nmoles / mg de proteína de CSII, pues no se observó una diferencia en la concentración de citocromo *c* liberada (60 pmoles / mg de proteína) entre 1 y 6 minutos de incubación. En cambio cuando se utilizó una concentración 5 nmoles / mg de proteína hubo una liberación de 15 pmoles / mg de proteína en 6 minutos (Figura 21 B).

También se demostró que la liberación del citocromo *c* dependía de la presencia del potasio en el medio, ya que cuando las mitocondrias se incubaron con CSII en un medio con sacarosa no se detectó la liberación del citocromo *c* a pesar de que se utilizaron concentraciones de 25 y 50 nmoles / mg de proteína de CSII e incubaciones de hasta 6 minutos, en los cuales ya existía la liberación 60 pmoles / mg de proteína del citocromo *c* en un medio con potasio.

Una vez que se determinó la liberación de citocromo *c*, se decidió establecer si el poro de la transición de la permeabilidad (PTP) estaba involucrado. Para ello se utilizó un inhibidor específico de dicho poro la ciclosporina A (CSA), la cual inhibió parcialmente el hinchamiento producido por la CSII; además de esto también se utilizó H_2O_2 que se ha reportado inhibe a un canal semejante al K_{ATP} en plantas (Figura 20D) (Chiandussi y colaboradores 2002). Con este compuesto se obtuvo una inhibición semejante a la producida por el ATP.



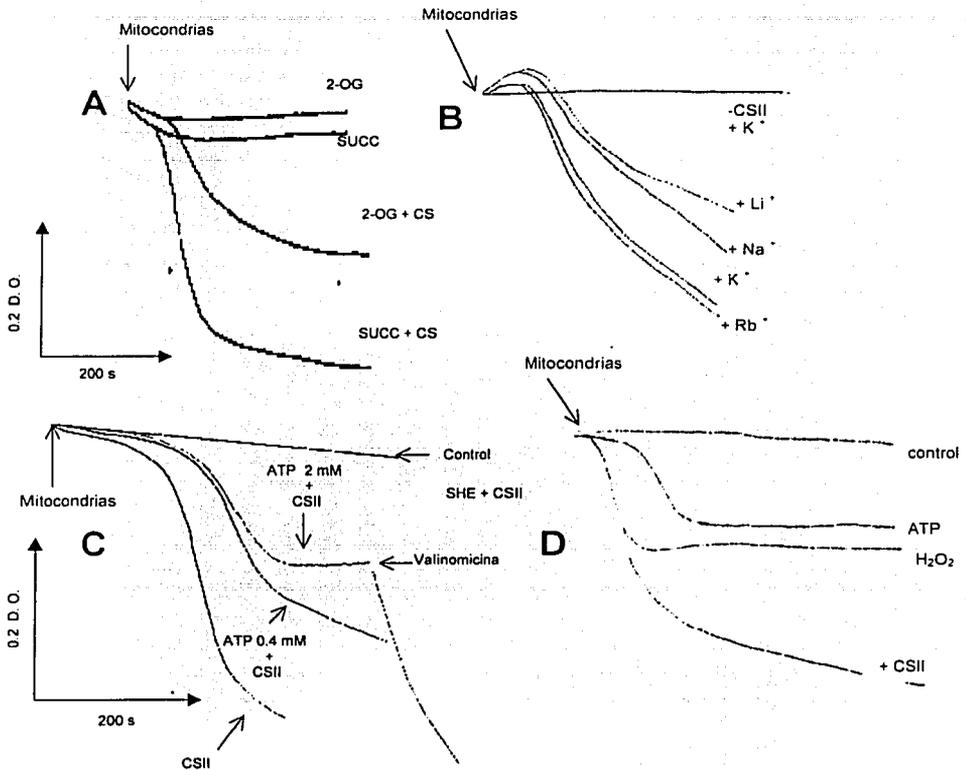


Figura 20. Hinchamiento inducido por la CSII. A) Diferencia en el hinchamiento producido en presencia de α -cetoglutarato o succinato, con CSII 25nmoles/mg de proteína. B) Hinchamiento inducido por la CSII en presencia de 120 mM de KCl, LiCl, NaCl y RbCl. C) Inhibición del hinchamiento por ATP en presencia de 25nmoles/mg de proteína de CSII. D) Efecto del H₂O₂ (4.4 μ M) sobre el hinchamiento inducido por la CSII.

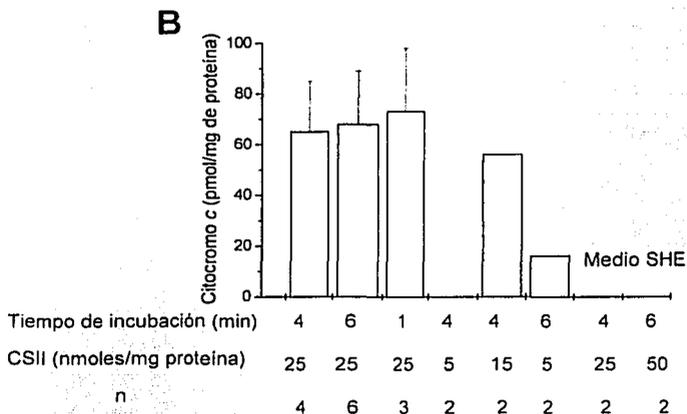
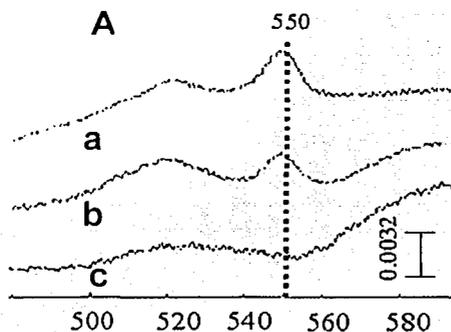


Figura 21. Liberación de citocromo C. A) Espectros representativos de cuantificación de citocromo c, a) Estándar, b) Espectro de sobrenadante después de incubar mitocondrias en KME 4 min en presencia de 25nmol/ mg de proteína de CSII y c) Espectro de sobrenadante después de incubar mitocondrias en SHE 4 min en presencia de 25nmol/ mg de proteína de CSII. B) La cuantificación de citocromo c liberado después de haber sido incubadas las mitocondrias a diferentes tiempos y diferentes concentraciones de CSII.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Células intactas

Una vez que se estableció cómo la CSII alteraba el funcionamiento de la mitocondria aislada, se procedió a evaluar su efecto sobre la respiración celular, el cual es un sistema mucho más complejo (la célula intacta). Esto tendría que reflejarse en un efecto sobre la respiración sensible a oligomicina (fosforilación oxidativa) y en los niveles de ATP. Para ello se utilizó en los ensayos la línea celular ascítica AS-30D, que tiene su origen en el hígado de rata, que se obtuvo de administrar 3'-metil-4-dimetilaminoazobenzeno intraperitonealmente a ratas *Wistar* (Smith *et al.* 1970). Según la clasificación de Pedersen (1978), esta línea pertenece a las células tumorales de rápido crecimiento. Presenta una alta velocidad de fosforilación oxidativa mayor que la velocidad de glucólisis y además el 95 % del ATP proviene de la fosforilación oxidativa (Rodríguez-Enríquez *et al.* 2001) . Por lo tanto, este tipo de células es un modelo adecuado para establecer si la CSII altera la función mitocondrial *in situ*, es decir, en la célula íntegra.

Debido a que se había observado que el efecto de la CSII era dependiente del tiempo de incubación, se inició incubando desde 1 a 10 minutos utilizando una concentración de 3 nmoles/ mg de proteína de CSII. Se observó disminución en la respiración sensible a oligomicina desde los 2 minutos de incubación e inhibición de un 80% a los 10 minutos (Figura 22 A) sin cambio en los niveles de ATP y la respiración resistente a oligomicina (Inserto Figura 22 A). Con base en estos resultados se tomó la decisión de incubar 4 minutos a diferentes concentraciones de CSII, en donde se observó una disminución de un 80 % de la respiración sensible a oligomicina con una concentración de 6 nmol/mg de proteína de CSII (Figura 22 B), sin cambio en la

cantidad de ATP (Inserto Figura 22 B). Con los datos anteriores se calculó una CI_{50} de 2.5 nmoles / mg de proteína, que fue menor a la encontrada en mitocondrias aisladas.

En estos experimentos a pesar de haberse inhibido casi totalmente la respiración sensible a oligomicina los niveles de ATP no cambiaron probablemente porque los tiempos de incubación eran muy cortos. Por lo tanto se incubaron a las células por tiempos prolongados, (Figura 23) con lo cual se consiguió observar cambios en los niveles de ATP (Inserto Figura 23). Sin embargo, se detectó un desfase entre la inhibición de la respiración y la disminución del ATP, porque a una concentración de 6 nmoles / mg de proteína de la CSII, la respiración había sido inhibida en un 80% a los 10 minutos, pero una disminución en el nivel de ATP de 12 a 2.5 nmoles/mg de proteína a los 20 minutos de incubación. Lo mismo ocurrió con 3 nmoles/ mg de proteína de la CSII, en donde el nivel de ATP disminuyó de 12 a 8 nmoles / mg de proteína.

Para descartar que el efecto de la CSII se debía a la acción sobre otros sitios diferentes a la fosforilación oxidativa; se utilizó a la oligomicina, inhibidor de la fosforilación oxidativa, a una concentración de $4\mu\text{M}$. El experimento se acompañó con concentraciones de CSII que inhibían casi totalmente la respiración sensible a oligomicina (Figura 24). En estos ensayos se observó que con la oligomicina, a pesar de que se inhibió la respiración totalmente, los niveles de ATP no disminuyeron concomitantemente. Una explicación es que la glucólisis también puede generar ATP, evitando su disminución inmediata. A esta concentración, la oligomicina inhibe totalmente la fosforilación oxidativa incubando a las células por 2-3 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

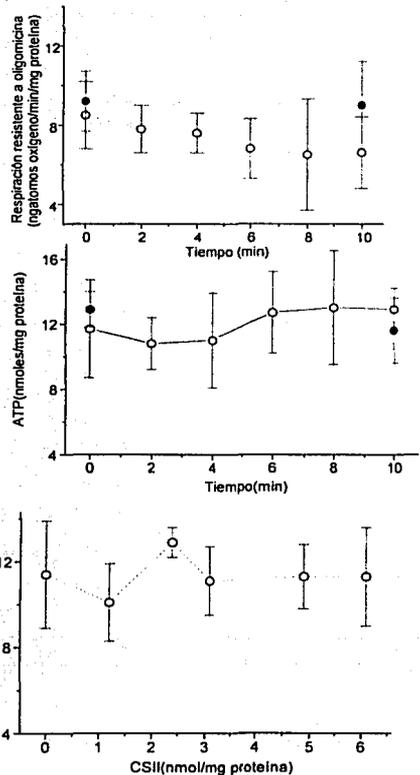
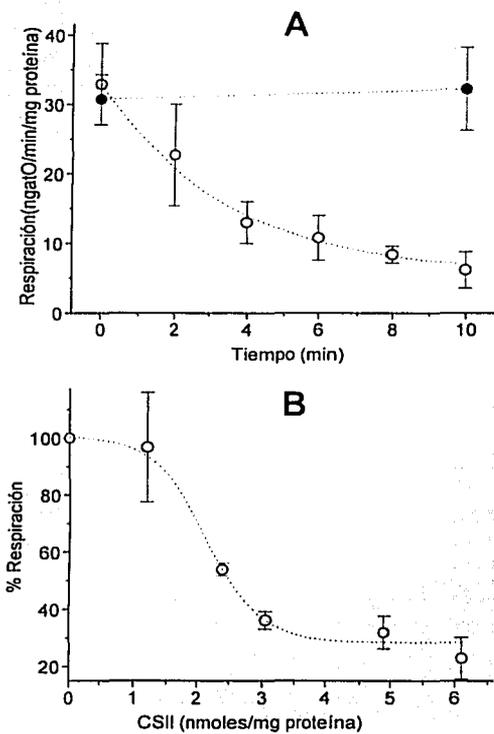


Figura 22. Inhibición de la respiración celular y cuantificación de los niveles de ATP. A) Inhibición de la respiración sensible a oligomicina con respecto al tiempo (CSII 3 nmoles/mg de proteína ○ y control ●). Insertos muestran el efecto sobre la respiración resistente a oligomicina y los niveles de ATP. **B)** Inhibición de la respiración sensible a oligomicina por diferentes concentraciones de CSII en una periodo de incubación de 4 min. El inserto indica los niveles de ATP.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

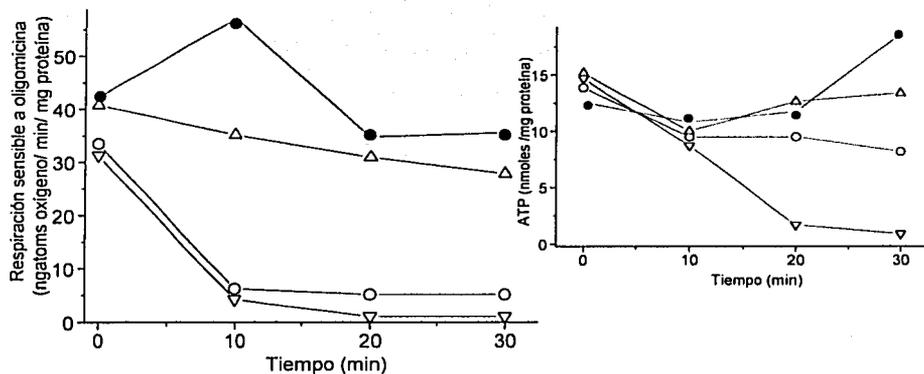


Figura 23. Inhibición de la respiración y disminución de los niveles de ATP. Efecto de diferentes concentraciones de CSII sobre la respiración sensible a oligomicina. CSII 6 ▽, 3 ○, 1.5 △ y control ●. Inserto muestra los niveles de ATP.

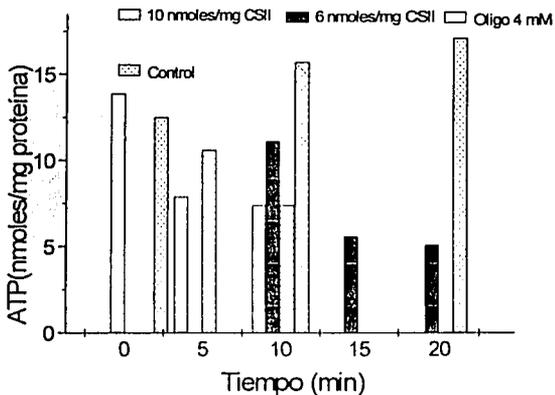


Figura 24. Efecto de la oligomicina y de diferentes concentraciones de CSII sobre los niveles de ATP. Las células se incubaron en medio Krebs-Ringer sin glucosa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Discusión

Los resultados demuestran que la CSII interactúa con la mitocondria tanto aislada como en la célula intacta, con efecto en diferentes sitios que ocasiona la inhibición de la fosforilación oxidativa, trayendo como consecuencia la disminución de los niveles de ATP.

Entre los sitios que afecta la CSII, está la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa, que tiene vital importancia, porque es una de las enzimas que produce el NADH necesario para la respiración y la fosforilación oxidativa (Cooney *et al.* 1981; Moreno-Sánchez *et al.* 1990). Además regula la concentración de α -cetoglutarato producido en la lanzadera aspartato-malato y en la desaminación de aminoácidos (Smith *et al.* 1974). La enzima esta constituida por tres componentes: la deshidrogenasa del α -cetoglutarato, la lipoamida transacetilasa y la lipoamida deshidrogenasa; se inhibe con fosfonatos análogos al α -cetoglutarato (Bunik *et al.* 1992), con el Zn^{2+} (Brow *et al.* 2000), con el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropirida (Mizuno *et al.* 1987) y con el 4-hidroxy-2nonenal (Humphries *et al.* 1998); éste último inhibe a la enzima porque ocasiona la reducción de grupos SH del ácido lipoico, importantes para su actividad (Bunik *et al.* 1990). Así la CSII podría inhibir a la enzima mediante el mismo mecanismo, ya que al parecer interactúa con grupos SH importantes como la CoA y el ácido lipoico. Además también podría inhibirse la piruvato deshidrogenasa, debido a que es un complejo enzimático parecido a la α -cetoglutarato deshidrogenasa.

Otro efecto que tiene la CSII es la activación del canal K_{ATP} , que juega un papel muy importante en la regulación del volumen en la mitocondria (Garlid, 1996; Szewczyk *et al.* 1996). Cuando el canal se activa se estimula la respiración basal (respiración de estado 4), se incrementa el volumen interno y se despolariza la membrana, debido a la entrada masiva de K^+ (Szewczyk *et al.* 1996; Kowaltowski *et al.* 2001). Todos estos efectos son observados con compuestos activadores de éste canal (ver Figura 25a) como el pinacidil (Houlmuhamedov *et al.* 1998; Kowaltowski *et al.* 20001), la cromakalim (Houlmuhamedov *et al.* 1998), el levosimedan (Kopustinskiene *et al.* 2001), el diazóxido (Kowaltowski *et al.* 20001) así como la CSII (la presente tesis). Al comparar la estructura de algunos de estos compuestos con la de la CSII, la única semejanza que existió fue que todos están conformados por anillos aromáticos, que al parecer son esenciales para poder activar el canal K_{ATP} .

Tanto el hinchamiento que es inducido por la CSII como por otros agentes es inhibido al eliminar el K^+ extramitocondrial y por la adición del ATP, agente que bloquea el canal K_{ATP} (Inoue *et al.* 1991; Paucek *et al.* 1992; Beavis *et al.* 1993; Garlid, 1996; Szewczyk *et al.* 1996, Holmuhamadov *et al.* 1998; Kopustinskiene *et al.* 2001). Además del ATP existen otros inhibidores como la glibenclamida (Paucek *et al.* 1992; Garlid, 1996; Jaburek *et al.* 1998), el ácido 5-hidroxidodecano (Szewczyk *et al.* 1996; Jaburek *et al.* 1998) (Figura 25b), el ADP (Paucek *et al.* 1992; Beavis *et al.* 1993), el AMP (Beavis *et al.* 1993) y la 4-aminopiridina (Szewczyk *et al.* 1996).

Además de los activadores que fueron mencionados anteriormente hay reportes de otros compuestos que activan el canal como el cobre (Cu^{1+}) (Wojtezak *et al.* 1996),

los mercuriales (Beavis *et al.* 1993), el óxido de fenilarsina (Chiandussi *et al.* 2002) y la N-metil-maleimida (Beavis *et al.* 1993, Chiandussi *et al.* 2002). Con los dos últimos compuestos que son agentes que bloquean grupos SH, se ha demostrado que en la regulación del canal K_{ATP} participan grupos SH (Bebavis *et al.* 1993; Chiadussi *et al.* 2002).

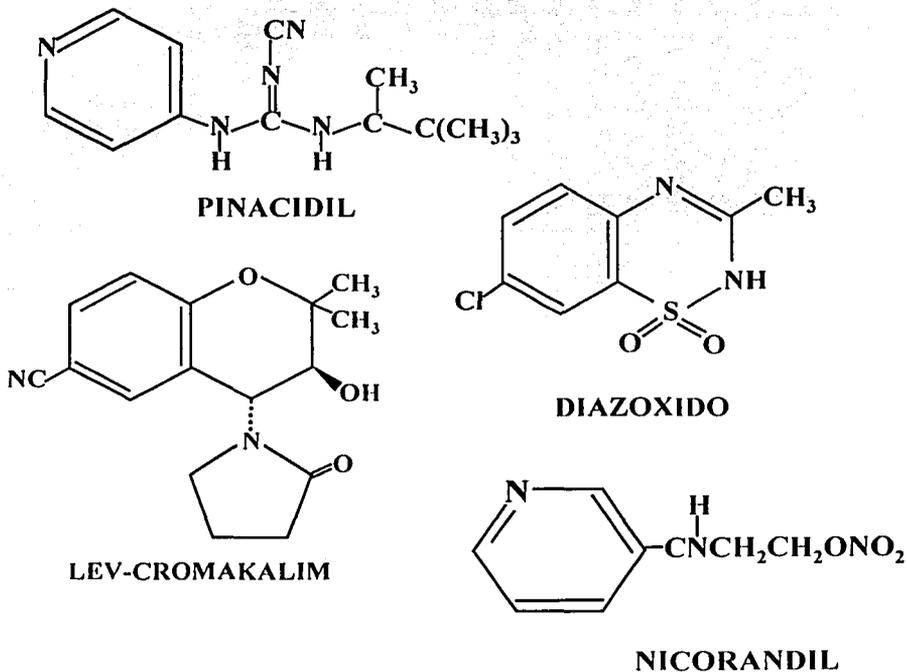
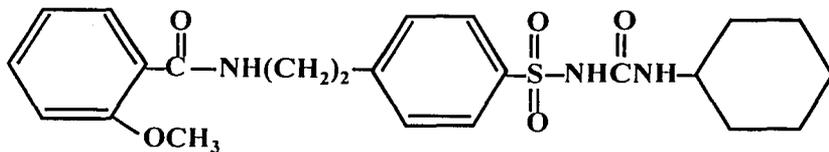


Figura 25a. Estructuras de compuestos que abren el canal de K_{ATP}



ACIDO 5-HIDROXIDECANOICO



GLIBENCLAMIDA

Figura 25b. Estructuras de compuestos que bloquean el canal de K_{ATP}

Por lo tanto, si la CSII estimula al canal de K_{ATP} se debería a que la CSII interactúa con grupos SH del canal, mecanismo propuesto para la inhibición de la α -cetoglutarato deshidrogenasa.

La activación del canal K_{ATP} provoca un aumento en el volumen intramitocondrial por la entrada masiva de potasio que trae como consecuencia la ruptura de la membrana externa y la liberación del citocromo *c* (O'Rourke, 1999), como ha sido reportado para el pinacidil, la cromakalim, la levcromakalim (Houlmuhamedov *et al.* 1998), la N-etilmaleimida, el oxido de fenilarsina (Chiadussi *et al.* 2002) y la CSII (presente tesis). Existen varias teorías para explicar la liberación del citocromo *c* (Desagher y Martinou, 2000). Una de ellas es la formación de un poro de aproximadamente 2-3 nm de diámetro en la membrana interna mitocondrial denominado poro de la transición de la permeabilidad (PTP), asociado al parecer a la porina de la membrana externa, al translocador de ADP/ATP y la ciclofilina D. Su apertura se favorece por la acumulación masiva de Ca^{2+} , la adición de algunos agentes oxidantes y por un bajo potencial de membrana mitocondrial (Kowaltowski y Wojtczak, 2002).

La liberación del citocromo *c* que es inducida por la CSII no parece estar mediada por el PTP, debido a que la CSA (inhibidor del PTP) no tiene un efecto significativo sobre el hinchamiento producido por la CSII, como el ATP, por lo que será necesario la realización de más experimentos para poder descartarlo completamente. Varios autores proponen que la apertura del PTP y la activación del K_{ATP} son eventos

independientes (Kowaltowski *et al.* 2001; Kim *et al.* 2001). Esto último está de acuerdo con algunos reportes que indican que activadores del canal previenen la apoptosis (Takashi *et al.* 1999), evento en el cual están relacionados el PTP y la liberación del citocromo *c*. En contraste, también hay reportes que indican que los activadores del canal K_{ATP} estimulan igualmente la apertura del PTP (Holmuhamedov *et al.* 1999; Katoh *et al.* 2002). Además parece que pueden estar involucrados efectos inespecíficos que podrían ser provocados por las variables de cada sistema experimental, así como de las concentraciones tanto de los activadores como de los compuestos empleados para bloquear el canal (Liu and O'Rourke, 2001).

La CSII afecta la actividad mitocondrial a nivel de la fosforilación oxidativa mediante varios mecanismos. Iniciando con la inhibición de la α -cetoglutarato deshidrogenasa a concentraciones menores de 10 nmoles / mg de proteína de CSII (sustrato α -cetoglutarato). A estas concentraciones se colapsa el potencial de membrana con succinato, lo que ocasiona un aumento en la respiración basal, pero sin inhibir la respiración en estado 3 como ocurre con α -cetoglutarato. A concentraciones de CSII arriba de 10 nmoles/ mg de proteína se comienza a liberar citocromo *c*, debido a la entrada masiva de potasio y que trae como consecuencia inhibición de la respiración con succinato como sustrato.

En las células la CSII disminuye la fosforilación oxidativa y los niveles de ATP, aunque estos últimos no disminuyen concomitantemente, como ocurre también con la oligomicina. Una explicación a esto es que los requerimientos de ATP sean menores

para el bloque consumidor (biosíntesis de proteínas, de ácidos nucleicos, de lípidos y homeostasis iónica en particular la ATPasa de Na^+K^+). Sin embargo cabe señalar que el estudio se hizo a tiempos cortos (10-30 min), tiempo insuficiente para la duplicación celular ya que su tiempo medio generacional es de 29 horas (ATCC, pagina electrónica, ver referencias) por lo tanto solo se consideraría como bloque consumidor a la ATPasa de Na^+K^+ . Otra explicación es que la glucólisis en esos tiempos cortos de incubación pueda estar aportando ATP suficiente que se refleja en una ausencia de cambios en los niveles, ligado a que esta línea no presenta efecto Pasteur. Finalmente otra alternativa sería que la célula tenga un excedente en ATP. Para descartar estas alternativas sería necesario hacer experimentos con inhibidores de las vías mencionadas y comparar los cambios en ATP en ausencia y presencia de CSII.

Una vez descubierto el mecanismo mediante el cual la CSII afecta a la mitocondria, es entendible que se observaran alteraciones a nivel de mitocondria en órganos de ratones tratados con dosis toxicas de CSII (Marín, 2000). En biopsias de riñón tanto de pacientes como de animales tratados con cisplatino, se reportan alteraciones a nivel de mitocondria como hinchamiento (Deantino *et al.* 1978, Dobyán *et al.* 1980, Chopra *et al.* 1982), así como también una mayor acumulación de platino con una disminución de glutatión (Levi *et al.* 1980) De estos estudios surgió la inquietud de saber qué ocurría con el funcionamiento mitocondrial así que se realizaron varios estudios que indicaban que el cisplatino inhibía la respiración y el potencial de membrana (Rosen *et al.* 1992, Krudering *et al.* 1997) de manera dependiente de la concentración y del tiempo de incubación. En el caso de la respiración se reporta una CI_{50} de 1mM a 40 minutos de incubación con células permeabilizadas de túbulo

proximal (Brady *et al.* 1990); una CI_{50} de 50 μM a 20 minutos de incubación con células intactas de túbulo proximal porcino (Kruidering *et al.* 1997) y una CI_{50} de 100 μM a 45 minutos de incubación con mitocondrias de hígado de ratón (Rosen *et al.* 1992). En comparación la CSII tuvo una CI_{50} de 4.7 μM (4.7 nmoles/ mg de proteína) y para la CSIII-i de 77 μM (77 nmoles/ mg de proteína) con α -cetoglutarato en mitocondrias de hígado y una CI_{50} de 68 μM (2.5 nmoles/mg de proteína) para la CSII en las células intactas de AS-30D después de 4 minutos de incubación. La diferencia en las concentraciones inhibitorias medias y el tiempo de incubación entre las casiopelinas y el cisplatino se puede deber al mecanismo mediante el cual causan la inhibición de la respiración.

El mecanismo propuesto para el cisplatino, mediante el cual genera la inhibición de la respiración mitocondrial es la formación de complejos estables de proteína-S-Cisplatino que reduce la cantidad de glutatión disponible (Zhang y Lindup, 1993, Kruidering *et al.* 1997, Karbangar *et al.* 2000), aunado a la inhibición de enzimas tales como la glutatión-S transferasa, la glutatión-reductasa (Kruideing *et al.* 1997) y la glutatión peroxidasa. Esto ocasiona la acumulación de radicales libres que tienen como blanco la membrana mitocondrial, sin embargo ensayos de Kruidering y colaboradores (1997), demuestran que aún con el empleo de antioxidantes el cisplatino sigue afectando a la mitocondria. Esto apoya los reportes que indican que el cisplatino afecta a enzimas de la cadena respiratoria de forma independiente de los radicales libres (Rosen *et al.* 1992; Kruideing *et al.* 1997).

Otro punto importante en relación al cisplatino es que afecta preferentemente al riñón que a otros órganos (Golstein y Gilbert, 1983; Gordon *et al.* 1986). Los experimentos que demostraron esto, consistieron en aplicar cisplatino a ratas que después de un periodo de tiempo fueron sacrificadas y aisladas las mitocondrias, a las que se les midió la respiración. Por lo anterior no es posible comparar los resultados obtenidos con la CSII y las mitocondrias aisladas de diferentes órganos (de hígado, riñón y corazón), porque los animales no fueron tratados previamente, por lo que es necesario hacer experimentos con animales tratados ya que el compuesto en el organismo dependiendo de su distribución podría afectar más severamente a un órgano más que a otro y no cumplirse lo que se encontró *in vitro*.

Sin embargo, no deja de ser interesante que las mitocondrias de corazón sean más resistentes al efecto de la CSII que las mitocondrias de hígado y de riñón. Esta diferencia puede atribuirse a un mayor número de proteínas mitocondriales. Como puede observarse en la tabla 2, las mitocondrias de corazón tienen una mayor cantidad de translocador (ATP/ADP) y de los sitios de conservación de energía sitio 1 (NADH deshidrogenasa) y sitio 2 (citocromo *bc1*), comparada con las mitocondrias de hígado y de riñón. Además la actividad que reporta Carvajal (2002), para la α -cetoglutarato deshidrogenasa en mitocondrias de corazón es de 200 nmoles NADH / min/ mg de proteína, que es 10 veces mayor a la actividad que se reporta en este trabajo para esa misma enzima pero en mitocondrias de hígado, que es de 25 nmoles NADH/ min / mg de proteína. Estas actividades son una explicación clara de porque la respiración que

depende de α -cetoglutarato como sustrato oxidable es más resistente en mitocondrias de corazón que en mitocondrias de hígado.

Por otro lado las mitocondrias tumorales (AS-30D) tienen una sensibilidad parecida al de las mitocondrias de células normales al efecto de la CSII. Este fue un resultado inesperado, porque se había planteado que la CSII, una molécula lipofílica con carga positiva (que puede favorecer su desplazamiento hacia sitios con carga negativa), afectaría más a las mitocondrias tumorales que a mitocondrias normales. Existen varios reportes que indican que las mitocondrias tumorales presentan un aumento en la cantidad de cardiolipina (fosfolípido negativo) y colesterol (que podría disminuir la difusión pasiva de H^+) en la membrana interna mitocondrial, lo cual ocasiona que la membrana interna tenga una mayor densidad de carga negativa y un gradiente de H^+ de mayor magnitud. Estas características se han utilizado para el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos.

Finalmente la importancia de este trabajo radica en que se logró establecer el mecanismo mediante el cual la CSII afecta a la mitocondria. El mecanismo permite predecir lo que puede ocurrir cuando esté en contacto la mitocondria con concentraciones de CSII que afecten su funcionamiento, como es el caso de una intoxicación. Además la evaluación hecha es útil para mejorar del diseño de nuevas moléculas.

Tabla 2. Concentraciones de algunas proteínas en diferentes órganos.

(pmol/mg de proteína)	Hígado	Riñón	Corazón
Translocador	300 (1-3,5)	613 (8)	1360 (8)
ATP/ADP	150 (4) 120 (6,7)		1500 (10)
ATP sintetasa	390 (4) 283 (5)	178 (8)	216 (8) 260 (10)
Transportador de Pi	7.8 (5)	7.1(8)	5.7 (8)
Sitio 1	180 (8)	86 (8)	172 (8) 400 (9) 80 (10)
Sitio 2	60 (8)		127 (8) 300 (9)

(1) Kunz *et al.* 1981; (2) Groen *et al.* 1982; (3) Tager *et al.* 1983; (4) Moreno-Sánchez, 1985; (5) Kunz *et al.* 1988; (6) Davis y Davis Van-Thienen, 1984; (7) Baggetto *et al.* 1984; (8) Moreno-Sánchez y Torres-Márquez, 1991; (9) Stoner, 1985; (10) Doussiere *et al.* 1984.

CONCLUSIONES

- Las casiopeínas (especialmente la CSII)afectan la respiración mitocondrial porque inhiben a la α -cetoglutarato deshidrogenasa y activan al canal de K_{ATP} que ocasiona la liberación del citocromo c.
- Las mitocondrias aisladas mostraron una sensibilidad similar a la CSII que las mitocondrias normales.
- Las casiopeínas inhiben la fosforilación oxidativa en células tumorales de rápido crecimiento.

PERSPECTIVAS

En este trabajo se han establecido los efectos producidos por la CSII sobre la mitocondria, así como los mecanismos mediante los cuales son provocados.

Del estudio del efecto de las casiopéptinas sobre la mitocondria se logró establecer que la α -cetoglutarato deshidrogenasa es inhibida, pero la forma en que la CSII lo hace no es clara, se propone que la interacción con sus cofactores (CoA y ácido lipoico) es la causa. Para establecer lo anterior es necesario hacer un estudio cinético, que permitirá deducir el mecanismo de inhibición. Además, sería conveniente ampliar esta observación hacia otras enzimas mitocondrias semejantes como la piruvato deshidrogenasa.

Para establecer solidamente que la CSII activa al canal K_{ATP} sería conveniente evaluar el efecto de otros inhibidores del canal como la glibenclamida y el ácido 5-hidroxidodecano.

Como uno de los objetivos de este trabajo era evaluar la selectividad de la CSII por algún tipo de mitocondria es preciso extender el estudio ahora hacia diferentes tipos celulares tanto tumorales como normales y tratar de buscar alguna diferencia en su sensibilidad.

Con relación al citocromo c sería importante hacer estudios enfocados en establecer si el PTP está relacionado con su liberación y si la CSII puede inducir su apertura. De ser así, determinar el mecanismo y si el Ca^{2+} puede estar implicado en su activación. En este sentido, se sabe que la CSII provoca apoptosis en células tumorales, pero se desconoce cómo se activa el proceso.

Por último es necesario explorar si la CSII provoca la generación de radicales libres y esto sea la causa de sus efectos sobre el funcionamiento en la mitocondria ya que el cobre que forma parte de la molécula, podría generarlos vía la reacción de Fenton.

REFERENCIAS

Allen, J.A., and Coombs, M.M. Covalent binding of polycyclic aromatic compounds to mitochondrial and nuclear DNA. *Nature* 287: 244-24, 1980.

Andrews, P.A. and Albright, K.D. Mitochondrial defects in cis-diamminedichloroplatinum(II)-resistant human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 52:1895-1901,1992.

Ara, G., kusumoto, T., Korbut,T.T., Cullere-Luengo, F. and Teicher, B.A. Cis-diamminedichloroplatinum(II) resistant human tumor cell lines are collaterally sensitive to PtCl₄ (Rh-123)₂ : evidence for mitochondrial involvement. *Cancer Res.* 54:1497-1502, 1994.

Arnaudeau, C., Tenorio, M.E., Jensen, D., and Helleday, T. Inhibition of DNA synthesis is a potent mechanism by which cytostatic drugs induce homologous recombination in mammalian cells. *Mutat. Res.* 461:221-228, 2000.

Backer,J.M. and Weinstein, I.B. Mitochondrial DNA is a major cellular target for a dihydrodiol-epoxide derivative of benzo[a]pyrene. *Science* 209: 297-299, 1980.

Baggetto, L., Gautheron. D. C. and Godinot, C. Effects of ATP on various steps controlling the rate of oxidative phosphorylation in newborn rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 232: 670-678; 1984.

Beavis, A. Yun lu., Garlid, K. On the regulation of K⁺ uniport in intact mitochondrial by adenine nucleotides and nucleotide analogs. *J. Biol. Chem.* 268: 997-1004,1993.

Bernal, S.D., Lampidis, T.J., McIsaac, R.M. and Chen, L.B. Anticarcinoma activity in vivo of rhodamine 123, a mitochondrial-specific dye. *Science* 222:169-172, 1983.

Brady, H.R., Kone, B.C., Stromski, M.E., Zeidel, M.L., Giebisch, G. and Gullans, S.R. Mitochondrial injury: an early event in cisplatin toxicity to renal proximal tubules. *Am. J. Physiol.* 258:F1181-F1187, 1990.

Brow, A.M., Kristal, B.S., Effron, M.S., Shestopalov, A.I., Ullucci, P.A., Rex Sheu, K.F., Blass, J.P. and Cooper, A.J.L. Zn²⁺ inhibits α -ketoglutarate-stimulated mitochondrial respiration and the isolated α -ketoglutarate dehydrogenase complex. *J. Biol. Chem.* 275: 13441-13447, 2000.

Bunik, V.I., Biryukov, A.I. and Zhukov, Y.N. Inhibition of pigeon breast muscle α -ketoglutarate dehydrogenase by phosphonate analogues of α -ketoglutarate. *FEBS* 303: 197-201, 1992.

Bunik, V.I., Buneeva, O.A. and Gomazkova, V.S. Regulation of α -ketoglutarate dehydrogenase cooperative properties in substrate binding by thiol-disulfide exchange. *Biochem. Int.* 21:873-881, 1990.

Cai, J., Yang, J., and Jones, D.P. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim. Biophys. Acta* 1366:139-149, 1998.

Carvajal, A. K. G. Efecto de la hipertrigliceridemia experimental en el metabolismo energético del corazón aislado de rata. (Tesis de Doctorado) Doctorado en ciencias biológicas y de la salud. UAM, 2002.

Cardoso, C. M., Custódio, J.B.A., Almeida, L. M., and Moreno, A. J.M. Mechanisms of the deleterious effects of tamoxifen on mitochondrial respiration rate and phosphorylation efficiency. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 176: 145-152, 2001.

Cavalli, L.R. and Liang, B.C. Mutagenesis, tumorigenicity and apoptosis: are the mitochondria involved?. *Mutation Res.* 398:19-26;1998.

- Chen, L.B. Mitochondrial membrane potential in living cells. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 4:155-181, 1988.
- Chiandussi, E., Petruzza, E., Macri, F., and Vianello, A. Modulation of plant mitochondrial K^+_{ATP} channel and its involvement in cytochrome c release. *J. Bioenerg. Biomembr.* 34:177-184, 2002.
- Choice, D.D., Del Campo, A. A. and Guarino, A. M. Subcellular localization of cis-dichlorodiammineplatinum (II) in rat kidney and liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 55: 245-252, 1980.
- Chopra, S., Kaufman, J.S., Jones, T.W., Hong, W.K., Gehr, M.K., Hamburger, R.J., Flamenbaum, W. and Trump, B.F. Cis-diamminedichloroplatinum-induced acute renal failure in the rat. *Kidney int.* 21:54-64, 1982.
- Clayton, A.D., Doda, J.N., and Fridberg, E.C. The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 71:2777-2781; 1974.
- Cooney GJ, Taegtmeier H, Newsholme EA. Tricarboxylic acid cycle flux and enzyme activities in the isolated working rat heart. *Biochem. J.* 200:701-703, 1981.
- Davis, E. J. and Davis- Van Thienen, W. I. A. Rate control of phosphorylation – coupled respiration by rat liver mitochondria . *Arch. Biochem. Biophys.* 233: 573-581; 1984.
- Davis, S., Weiss, J., Wong, J.R., Lampidis, T.J. and Chen, L.B. Mitochondrial and plasma membrane potentials cause unusual accumulation and retention of rhodamine 123 by human breast adenocarcinoma-derived MCF-7 cells. *J. Biol. Chem.* 260: 13844-13850, 1985.

De Coti, R.C., Toftness, B.R., Lange, R.C. and Creasey, W.A. Clinical and pharmacological studies with *cis*-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Res.* 33: 1310-1315, 1973.

Dentino, M., Luft, F.C., Yum, M.N., Williams, S.D. and Einhorn, L.H. Long term effect of *cis*-diamminedichloride platinum (CDDP) on renal function and structure in man. *Cancer* 41:1274-1281, 1978.

Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends. Cell. Biol.* 10:369-377, 2000.

De Vizcaya-Ruiz, A., Rivero-Muller, A., Ruiz-Ramirez, L., Kass, G.E.N., Kelland, L.R., Orr, R. M., and Dobrota, M. Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, casiopena II, in L1210 murine leukaemia and ch1 human ovarian carcinoma cells. *Toxicol. in Vitro* 14:1-5, 2000.

Dobyan, D. C., Levi, J., Jacobs, C., Kosek, J. and Weiner M.W. Mechanism of cis-platinum nephrotoxicity: II. morphologic observations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 213 :551-556, 1980.

Dorward, A., Sweet, S., Moorehead, R. and Singh, G. Mitochondrial contributions to cancer cell physiology: redox balance, cell cycle, and drug resistance. *J. Bioenerg. Biomembr.* 29: 385-392, 1997.

Doussiere, J., Ligeti, E., Brandolin, B. and Vignais, P. V. Control of oxidative phosphorylation in rat heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 766: 492-500; 1984.

Garlid, K.D. Cation transport in mitochondria-the potassium cycle. *Biochim. Biophys. Acta* 1275: 123-126, 1996.

Goldstein, R.S. and Mayor G.H. Minireview: the nephrotoxicity of cisplatin. *Life Sci.* 32: 685-690, 1983.

González, V.M., Fuertes, M.A., Alonso, C., and Pérez, J.M. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis?. *Mol. Pharmacol.* 59: 657-663, 2001.

Gordon J. A. and Gattone II, V. H. Mitochondrial alterations in cisplatin-induced acute renal failure. *Am. J. Physiol.* 250: F991-F998, 1986.

Gornall, A., Bardwill, C., and David, M. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177:751-766, 1949.

Gracia-Mora, I., Ruiz-Ramírez, L., Gómez-Ruiz, C., Tinoco-Méndez, M., Márquez-Quiñones, A., Romero-De Lira, L., Marín-Hernández, A., Macías-Rosales, L., and Bravo-Gómez, M.E. Knight's move in the periodic table, from Koper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, casiopeínas, evaluated by an *in vitro* human and murine cancer cell line panel. *Metal Based Drugs* 8:19-28; 2001.

Groen, A. K., Wanders, R. J., Westerhoff, H. V., Van der Meer, R. and Tager, J. M. Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration. *J. Biol. Chem.* 257: 2754-2757; 1982.

Holmuhamedov, E.L., Jovanovic, S., Dzeja, P.P., Jovanovic, A., and Terzic, A. Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels modulate cardiac mitochondrial function. *Am. J. Physiol.* 275:H1567-H1576, 1998.

Huerta, C. M. Evaluación antineoplásica de nuevos complejos de coordinación empleando el modelo tumoral murino sarcoma S180 (Tesis de Licenciatura). QFB. Orizaba (Veracruz) México : Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Veracruzana, 1992.

Humphries, K.M. and Szweda, L. Selective inactivation of α -ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry* 37: 15835-15841, 1998.

Inamoto, T., Tanaka, A., Mori, S., Jin, M., Sato, B., Yanabu, M., Tokuka, A., Kitai, T., Ozawa, K., and Yamaoka, Y. Changes in the distribution of the control of the mitochondrial oxidative phosphorylation in regenerating rabbit liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1188:311-317, 1994.

Inoue, I., Nagase, H., Kishi, K. and Higuti, T. ATP-sensitive K^+ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature*. 352: 244-247, 1991.

Jaburek, M., Yarov-Yarovoy, V., Paucek, P., and Garlid, K.D. State-dependent inhibition of the mitochondrial K_{ATP} channel by glyburide and 5-hydroxydecanoate. *J. Biol. Chem.* 273:13578-13582, 1998.

Jones, T.W., Chopra, S., Kaufman, J.S., Flamenbaum, W. and Trump, B.F. Cis-diamminedichloroplatinum (II)-induced acute renal failure in the rat. *Lab. Invest.* 52: 363-374, 1985.

Katoh, H., Nishigaki, N., and Hayashi, H. Diazoxide opens the mitochondrial permeability transition pore and alters Ca^{2+} transients in rat ventricular myocytes. *Circulation* 105:2666-2671, 2002.

Kharbanger, A., Khyriam, D. and Prasad, S.B. Effect of cisplatin on mitochondrial protein, glutathione and succinate dehydrogenase in Dalton lymphoma-bearing mice. *Cell Biol. Toxicol.* 16:363-373, 2000.

Kim, J., Kang, Y.S., and Lee, Y.S. Activation of Na⁻, K⁻, Cl⁻ cotransport mediates intracellular Ca²⁺ increase and apoptosis induced by pinacidil in HepG2 human hepatoblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 281: 511-519, 2001.

Kopf-Maier, P. Complexes of metals other than platinum as antitumor agents. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 47:1-16;1994.

Kopustinskiene, D.M., Pollesello, P., and Saris, N.K.L. Levosimendan is a mitochondrial K_{ATP} channel opener. *Eur. J. Pharmacol.* 428: 311-314, 2001.

Koya, K., Li, Y., Wang, H., Ukai, T., Tatsuta, N., Kawakami, M. and Shishido, T. Mkt-077, a novel rhodacyanine dye in clinical trials, exhibits anticarcinoma activity in preclinical studies based on selective mitochondrial accumulation. *Cancer Res.* 56: 538-543, 1996.

Kowaltowski, A.J., Seetharaman, S., Paucek, P., and Garlid, K. Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K⁺ channel of heart mitochondria. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 280:H649H657, 2001.

Kruidering, M., Vande Water, B., De Heer, E., Mulder, G.J., Nagelkerke, F. J. Cisplatin-inducen nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280(2):638-649,1997.

Kuhlmann, M., Burkhardt, G. and Köhler H. Insights into potencial cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol. Dial. Transplant.* 12:2478-2480,1997.

Kunz, W., Bohnensack, R., Bohme, G., Kuster, U., Letko, G. and Schonfeld, P. Relations between extramitochondrial and intramitochondrial adenine nucleotide systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 209: 219-229; 1981.

Kunz, W., Gellerich, F. N., Schild, L. and Schonfeld, Kinetic limitations in the overall reaction of mitochondrial oxidative phosphorylation accounting for flux dependent changes in the apparent $Gp/\mu H^+$ ratio. *FEBS Lett.* 233: 17-21; 1988.

LaNoue, K.F. and Schoolwerth A.C. Metabolite transport in mitochondria. *Ann. Rev. Biochem.* 48: 871-922, 1979.

Lebwohl D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur. J. Cancer* 34:1522-1534, 1998.

Levi, J., Jacobs, C., Kalman, S.M., Mctigue, M. and Weiner, M.W. Mechanism of *cis*-platinum nephrotoxicity: I. Effects of sulfhydryl groups in rat kidneys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 213:545-550,1980.

Lesnefsky, E.J., Moghaddas, S., Tandler, B., Kerner,J., and Hoppel, C.I. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia-reperfusion, aging, and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33: 1065-108;2001.

Lim, L.O. and Neims, .H. Mitochondrial DNA damage by bleomicina. *Biochem.Pharmacol.* 36:2769-2774; 1987.

Liu, Y., and O'Rourke, B. Opening of mitochondrial K_{ATP} channels triggers cardioprotection. *Circ. Res.* 88:750-752, 2001.

López-Gómez,F.J., Torres-Marquez, M.E.,and Moreno-Sanchez, R. Control of oxidative phosphorylation in AS-30D hepatoma mitochondria. *Int. J. Biochem.* 25:373-377, 1993.

Mayet, C. M. Cernimiento antineoplásico de nuevos compuestos de coordinación empleando el modelo tumoral murino melanoma B16. (Tesis de Licenciatura). QFB.

Orizaba (Veracruz) México : Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Veracruzana, 1992.

Marín, V. J. C. Caracterización ultraestructural de lesiones en ratones inducidas por la aplicación de casiopelna III-I. Tesis de Maestría, 2000.

Meléndez, Z.J., Cruz, E., Maldonado, V. and Espinoza, A.M. Mitochondrial changes during the apoptotic process of HeLa cells exposed to cisplatin. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 47(5):765-771, 1999.

Mizuno, Y., Saitoh, T. and Sone, N. Inhibition of mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143: 971-976, 1987.

Modica-Napolitano, J.S. and Aprille, J.R. Basis for the selective cytotoxicity of rhodamine 123. *Cancer Res.* 47: 4361-4365, 1987.

Moreadith, R. W. and Fiskum, G. Isolation of mitochondria from ascites tumor cells permeabilized with digitonin. *Analytical Biochem.* 137: 360-367, 1984.

Moreno-Sánchez, R. Regulation of oxidative phosphorylation in mitochondria by external free Ca^{2+} concentrations. *J. Biol. Chem.* 260:4020-4034, 1985.

Moreno-Sánchez, R. and Hansford, R.G. Dependence of cardiac mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity on intramitochondrial free Ca^{2+} concentration. *Biochem J.* 256:403-412, 1988.

Moreno-Sanchez R, Hogue BA, Hansford RG. Influence of NAD-linked dehydrogenase activity on flux through oxidative phosphorylation. *Biochem. J.* 268:421-428, 1990.

Moreno-Sánchez, R., Devars, S., Lopez-Gomez, F., Uribe, A. and Corona, N. Distribution of control of oxidative phosphorylation in mitochondria oxidizing NAD-linked substrates. *Biochim. Biophys. Acta.* 1060:284-292, 1991.

Moreno-Sánchez, R. and Torres-Márquez, M. E. Control of oxidative phosphorylation in mitochondria, cells and Tissues. 23: 1163-1174; 1991.

Murata, T., Hibasami, H., Maekawa, S., Tagawa, Toshiro and Nakashima, Kunio. Preferential binding of cisplatin to mitochondrial DNA and suppression of ATP generation in human malignant melanoma cells. *Biochem. Int.* 20:949-955, 1990.

Nadakavukaren, K.K., Nadakavukaren, J.J. and Chen, L.B. Increased rhodamine 123 uptake by carcinoma cells. *Cancer Res.* 45: 6093-6099, 1985.

Niranjan, B.G., Bhand, N.K. and Avadhani, N.G. Preferential attack of mitochondrial DNA by aflatoxin B₁ during hepatocarcinogenesis. *Science* 215; 73-75, 1982.

Olivero, O.A., Chang, P.K., Lopez-Larrazza, D.M., Semino-Mora, M.C., Poirier, M.C. Preferential formation and decreased removal of cisplatin-DNA adducts in Chinese hamster ovary cell mitochondrial DNA as compared to nuclear DNA. *Mutation Res.* 391:79-86, 1997.

O'Rourke, B. Apoptosis: rekindling the mitochondrial fire. *Cir. Res.* 85:880-883, 1999.

Pacheco-Moisés, F., García, J.J., Rodríguez-Zavala, J.S., and Moreno-Sánchez, R. Sulfite and membrane energization induce two different active states of the *Paracoccus denitrificans* F0F1-ATPase. *Eur. J. Biochem.* 267: 993-1000, 2000.

Página electrónica de la American Type Culture Collection (ATCC) <http://www.biotech.ist.unige.it/cldb/cl179.htm1>

Paucek, P., Mironova, G., Mahdi, F., Beavis, A.D., Woldegiorgis, G. and Garlid, K. D. Reconstitution and partial purification of the glibenclamide- sensitive, ATP-dependent K^+ channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 267:26062-26069, 1992.

Pedersen, P.L. Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Prog. Exp. Tumor Rev.* 22:190-274, 1978.

Penta, J.S., Jonson, F.M., Wachsman, J.T., Copeland, W.C. Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutation Res.* 488:119-133;2001.

Porter, G.A. and Bennett W.M. Nephrotoxic acute renal failure due to common drugs. *Am. J. Physiol.* 241:F1-F8, 1981.

Quiroz, G.F. Toxicidad aguda de casiopelna II por administración intravenosa en ratones. Estudio anatomohistológico. (tesis de licenciatura). México, D.F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM,1992

Rodríguez-Zavala, J.S., Pardo, J.P., and Moreno-Sánchez, R. Modulation of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex by inorganic phosphate, Mg^{2+} and other effectors. *Arch. Biochem. Biophys.* 379:78-84, 2000.

Rosen, M., Figliomeni, M. and Simpkins, H. The interaction of platinum drugs with mouse liver mitochondria. *Int. J. Exp. Path.* 73: 61-74, 1992.

Rottenberg, H. Membrane potential and surface potential in mitochondria: uptake and binding of lipophilic cations. *J. Membrane Biol.* 81:127-138, 1984.

Rozencweig, M., Von Hoff, D., Slavk, M., Muggia, F. *Cis*-diamminedichloroplatinum (II) : a new anticancer drug. *Ann. Intern. Med.* 86: 803-812, 1977.

Ruiz-Azuara, L. Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos. Tipo II. Patente, No 172248, 1993.

Ruiz-Azuara, L. Process to obtain new mixed copper aminoacidate from methylate phenanthroline complexes to be used as anticancerigenic agents. U.S. Patent No 5, 576, 326, 1996.

Ruiz-Azuara, L. Process to obtain new mixed copper aminoacidate complexes from phenylatephenanthroline to be used as anticancerigenic agents. U.S. Patent No 35, 458, 1997.

Ruiz-Azuara, L., Gasque, L. , Martínez, A., Moreno, E. R., Solans, X. Cooper (II) hydrate mixeo chelate complexes, Part II. *Acta Crystallographica*. 48: 1758-1788; 1992.

Ruiz-Azuara, L., Gasque, L. , Martínez, A., Moreno, E. R., Solans, X. Cooper (II) hydrate mixeo chelate complexes, Part III. *Acta Crystallographica*. 43: 429-432; 1993.

Ruiz-Azuara, L. y Gracia-Mora. Desion, síntesis, caracterización and In vivo antineoplastic test of anticancer research (memories). Creta, Grecia. Olympus Scientist 37-41: 1992.

Salazar, I., Tarrago-Litvak, L., Gil, L. and Litvak, S. The effect of benzo[a]pyrene on DNA synthesis and DNA polymerase activity of rat liver mitochondria. *FEBS Lett*. 138:45-49,1982.

Safirstein, R., Miller, P. and Guttenplan, J.B. Uptake and metabolism of cisplatin by rat kidney. *Kidney Int*. 25: 753-758, 1984.

Singh,G. A possible cellular mechanism of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicology*,58:71-80,1989.

Skulachev, V. P. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett*. 423:275-280, 1998.

Smith CM, Bryla J, Williamson JR. Regulation of mitochondrial alpha-ketoglutarate metabolism by product inhibition at alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 249:1497-1505, 1974.

Smith, D., Walborg, E.F., and Chang, J.P. Establishment of transplantable ascites variant or a rat hepatoma induced by 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* 30: 2306-2309, 1970.

Solans, X., Ruiz-Ramírez, L., Briansó, J. I. and Gasque, L. Structure of (1,10-phenanthroline) (salicylaldehydato) copper (II) nitrate. *Acta Crystallographica.* 43: 429; 1987.

Solans, X., Ruiz-Ramírez, L., Martínez, A., Gasque, L., and Briansó, J. L. Structures of chloro (glycinato) (1,10-phenanthroline) copper (II) monohydrate (1) and aquo (1,10-phenanthroline) (L-phenylalaninato) copper (II) nitrate monohydrate. *Acta Crystallographica.* 44: 628; 1988.

Stoner, C.D. Steady-state kinetics of the overall oxidative phosphorylation reaction in heart mitochondria. *J. Bioenerg. Biomemb.* 17: 85-108; 1985.

Stoner, C.D. Determination of the $P/2e^-$ stoichiometries at the individual coupling sites in mitochondrial oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 262: 10445-10453, 1987.

Summerhayes, I.C., Lampidis, T.J., Bernal, S.D., Nadakavukaren, J.J., Nadakavukaren, K.K., Shepherd, E.L. and Chen, L.B. Unusual retention of rhodamine 123 by mitochondria in muscle and carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 5292-5296, 1982.

- Szewczyk, A., Czyz, A., Wójcik, G., Wojtezak, L., and Nalecz, M.** ATP-regulated K⁺ channel in mitochondria: pharmacology and function. *J. Bionerg. Biomembr.* 28:147-152, 1996.
- Szewczyk, A. and Wojtezak, L.** Mitochondrial as a pharmacological target. *Pharmacol. Rev.* 54:101-127, 2002.
- Tager, J. M., Wanders, R. J. A., Groen A. K., Kunz, W., Bohnensack, R., Kuster, U., Letko, G., Bohme, G., Duszynski, J. and Wojtczak, L.** Control of mitochondrial respiration. *FEBS Letts.* 151: 1-9; 1983.
- Takashi, E., Wang, Y., Ashraf, M.** Activation of mitochondrial K_{ATP} channel elicits late preconditioning against myocardial infarction via protein kinase C signaling pathway. *Circ. Res.* 85: 1146-1153, 1999.
- Thayer, W.S. and Rubin E.** Effects of chronic ethanol intoxication on oxidative phosphorylation in rat liver submitochondrial particles. *J. Biol. Chem.* 254:7717-7723, 1979.
- Tinoco, M.C.** Administración de casiopelna I por vía intraperitoneal. Estudio anatomohistológico en ratones. (Tesis de licenciatura). México, D.F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1992.
- Wallace K.B. and Starkov A.A.** Mitochondrial targets of drug toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40:353-388, 2000.
- Weiss, M.J., Wong, J.R., Ha, C.S., Bleday, R., Salem, R.R., Steele, G.D. and Chen, L. B.** Dequalinium, a topical antimicrobial agent, displays anticarcinoma activity based on selective mitochondrial accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5444-5448, 1987.

Wieckowski, M. R. and Wojtczak L. Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Lett.* 423:339-342, 1998.

Zhang, J.G. and Lindup, W.E. Role of mitochondrial un cisplatin-induced oxidative damage exhibited by rat renal cortical slices. *Biochem. Pharmacol.* 45:2215-2222,1993.