

ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE ALCALOIDES ANÁLOGOS A LA
GIRGENSOHNINA SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL
DE LARVAS DE *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).

MAYRA ALEJANDRA BORRERO LANDAZÁBAL

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2014

ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE ALCALOIDES ANÁLOGOS A LA
GIRGENSOHNINA SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL
DE LARVAS DE *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).

MAYRA ALEJANDRA BORRERO LANDAZÁBAL

Proyecto de grado para optar al título de

Química

DIRECTORA:

Dra. STELIA CAROLINA MÉNDEZ SÁNCHEZ.

CODIRECTORA:

AURORA LISSETE CARREÑO OTERO, *MSc.*

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2014

“A mis padres Carlos y Nubia, por darme el mejor legado que un padre le puede dejar a un hijo, la educación...”

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos quienes hicieron posible alcanzar este objetivo...

A mi profe Stelia, quien confió en mí para desarrollar este proyecto. Gracias por preocuparse como una madre, por ser la persona más optimista del mundo, por ver lo mejor de mí y por recordarme que siempre podemos mejorar.

A mis compañeros de los grupos de investigación GIBIM y CINTROP, por brindarme un espacio y un apoyo siempre que lo necesité. A Ruth, Natalia, Sharon del CINTROP por toda la colaboración; a Marlon, Daissy y Alba del GIBIM, por hacerme sentir tan a gusto en el laboratorio.

A mis amigos de toda la carrera, con quienes viví momentos inolvidables, y a quienes llevo en un lugar muy especial en mi corazón, Luis Carlos y Keyla, por ser incondicionales, por dejarme ver la mejor versión de ustedes y sacar la mejor versión de mí.

A mi amiga Camila, por estar presente en todos los momentos importantes de mi vida, buenos y malos, por ser otra mamá, por ser la mejor consejera, por alegrarse con mis victorias y por darme ánimo en las derrotas.

A mis padres, Carlos y Nubia, por hacer siempre lo imposible por darme lo mejor, por sentirse orgullosos de mí y por apoyarme en todas las decisiones que he tomado en la vida. A mis hermanos Carlos, Daniel y Laura, por ser los mejores hermanos del mundo, por sacarme una sonrisa en los momentos en que más la necesitaba.

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN	13
1. OBJETIVOS	15
1.1 OBJETIVO GENERAL	15
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2. MARCO TEÓRICO	16
2.1 DENGUE.....	16
2.1.1 Control del dengue.....	17
2.1.2. Control químico: larvicidas.....	19
2.1.3. Control químico: insecticidas.....	21
2.2 GIRGENSOHNINA.....	23
2.2.1 α -aminonitrilos análogos a la girgensohnina	24
2.3 LA MITOCONDRIA	26
2.3.1 Estructura y composición.....	27
2.3.2. Cadena respiratoria	29
2.3.2.1 Complejo I	30
2.3.2.2 Complejo II	31
2.3.2.3 Complejo III.....	33
2.3.2.4 Complejo IV	36
2.3.3 Síntesis de ATP.....	38
2.3.4 Agentes inhibidores de la transferencia electrónica	39
2.3.5 Activadores de los complejos de la cadena respiratoria.....	43
2.3.6 Especies reactivas de oxígeno	44
2.3.7 Efecto pro-oxidante de la ubiquinona.....	45
3. MATERIALES Y MÉTODOS	47
3.1 OBTENCIÓN DE LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i>	47
3.2 AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS DE LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i>	47
3.3 PREPARACIÓN DE LAS SUSPENSIONES MITOCONDRIALES.....	48

3.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA.....	48
3.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	49
3.5.1 NADH Oxidasa	49
3.5.2 NADH deshidrogenasa.....	50
3.5.3 Succinato deshidrogenasa	50
3.5.4 Succinato Oxidasa	50
3.5.5 Succinato citocromo c reductasa.....	51
3.5.6 Citocromo c oxidasa	51
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
4.1 ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	52
4.1.1 NADH oxidasa	52
4.1.2 NADH deshidrogenasa.....	54
4.1.3 Actividad Succinato oxidasa.....	55
4.1.4 Succinato deshidrogenasa	56
4.1.5 Succinato citocromo c reductasa.....	58
4.2 DISCUSIÓN.....	61
5. CONCLUSIONES.....	64
6. RECOMENDACIONES.....	65
7. BIBLIOGRAFÍA	66

Lista de figuras

Figura 1. Número promedio de casos de dengue y dengue grave notificados a la OMS cada año entre 1955-2007 y número de casos reportados en los recientes años, 2008-2010 (World Health Organization 2012).	17
Figura 2. <i>Girgensohnia oppositiflora</i> y <i>girgensohnina</i> (Kouznetsov and Arenas 2013).....	23
Figura 3. Síntesis del alcaloide <i>Girgensohnina</i>	24
Figura 4. Estructuras de los α -aminonitrílicos obtenidos y resultados de inhibición de la AChE.....	25
Figura 5. Estructura interna de la mitocondria.	28
Figura 6. Complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.	30
Figura 7. Sistema redox del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial.	31
Figura 8. Complejo II (succinato deshidrogenasa).....	33
Figura 9. Complejo del citocromo <i>bc</i> ₁ (complejo III).....	34
Figura 10. El ciclo Q.....	35
Figura 11. Complejo IV (citocromo c oxidasa)	37
Figura 12. Complejo de la ATP sintasa mitocondrial.	39
Figura 13 . Inhibidores del complejo I. 1, Rotenona; 2, pericidina A; 3, ácido barbitúrico; 4, BAL (British anti-Lewisite); 5, fenazaquín; 6, pirimidifén; 7, fenpiroximato; 8, AE F119209, aminopirimidina insecticida experimental	40
Figura 14. TTFA.....	41
Figura 15. Inhibidores del complejo III. 1, antimicina A; 2, mixotiazol; 3, fluacripirim; 4, hidroxinaftoquinonas: BTG540, R=OAc, BTG505, R=OH; 5, atovacuona; 6, acequinocil.	42
Figura 16. Estructura del azul de metileno.....	43
Figura 17. Esquema de reacción de NADH.	49
Figura 18. Esquema de la reacción de la NADH deshidrogenasa.	50
Figura 19. Efecto de AL-47, Al-48, AL-49 y AL-50 sobre la actividad enzimática de NADH oxidasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de dos experimentos independientes. El 100% corresponde a $20,917 \pm 6,498 \text{ nmol O} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.	53
Figura 20. Efecto de AL-47, Al-48, AL-49 y AL-50 sobre la actividad enzimática de NADH deshidrogenasa. Cada valor representa el promedio \pm	

desviación estándar de dos experimentos independientes. El 100% corresponde a $0,7 \pm 0,214$ nmol de ferricianuro reducido. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.....	55
Figura 21. Efecto de AL-47, Al-48, AL-49 y AL-50 sobre la actividad enzimática de succinato oxidasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de dos experimentos independientes. El 100% corresponde a $20,749 \pm 6,444$ nmol O . $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.....	56
Figura 22. Efecto de AL-47, Al-48, AL-49 y AL-50 sobre la actividad enzimática de succinato deshidrogenasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. El 100% corresponde a $0,827 \pm 0,435$ $\mu\text{mol O} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.....	58
Figura 23. Efecto de AL-47, Al-48, AL-49 y AL-50 sobre la actividad enzimática de succinato citocromo c reductasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de dos experimentos independientes. El 100% corresponde a $3,621 \pm 1,479$ $\mu\text{mol citocromo c reducido} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.....	59
Figura 24. Efecto de AL-47, Al-48, AL-49 y AL-50 sobre la actividad enzimática de citocromo c oxidasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de dos experimentos independientes. El 100% corresponde a $2,716 \pm 0,286$ $\mu\text{mol citocromo c oxidado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.....	61

RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE ALCALOIDES ANÁLOGOS A LA GIRGENSOHNINA SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL DE LARVAS DE *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) *

AUTOR: Mayra Alejandra Borrero Landazábal **

PALABRAS CLAVE: Fosforilación oxidativa, Girgensohnina, *Aedes aegypti*.

RESUMEN

El efecto de AL-47: 2-(3,4-Dimetoxifenil)-2-(piperidin-1-il) acetonitrilo, AL-48: 2-(3,4-Dioximetilenfenil)-2-(piperidin-1-il) acetonitrilo, AL-49: 2-(3,4-Dimetoxifenil)-2-(pirrolidin-1-il) acetonitrilo; AL-50: 2-(3,4-Dioximetilenfenil)-2-(pirrolidin-1-il) acetonitrilo), cuatro α -aminonitrilos análogos a la girgensohnina sobre los complejos I, II, III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial en larvas de mosquito *Aedes aegypti*. Las actividades enzimáticas de NADH y succinato oxidasas, se determinaron por métodos polarográficos, mientras que métodos espectrofotométricos fueron implementados para la determinación de las actividades enzimáticas de NADH y succinato deshidrogenasas, citocromo c reductasa y citocromo c oxidasa (a concentraciones de 8nM, 2 μ M, 8 μ M and 40 μ M). Los compuestos presentaron actividad inhibitoria sobre el complejo I, al reducir la actividad de la NADH deshidrogenasa de 20 a 25%, y la NADH oxidasa de 25 a 40%, las moléculas AL-49 y AL-50 presentaron una mayor actividad inhibitoria. La succinato oxidasa fue inhibida por los α -aminonitrilos de 20 a 40%, siendo el AL-49 el compuesto que presentó mayor inhibición. La succinato deshidrogenasa aumentó su actividad en presencia de los diferentes compuestos (de 50 a 150%), lo que sugiere un bloqueo en el transporte de electrones hacia el oxígeno que no involucra la succinato deshidrogenasa. La evaluación de los compuestos sobre la succinato citocromo c reductasa, no reveló un efecto significativo sobre la enzima; a diferencia de la citocromo c oxidasa, que aumentó su actividad de 25 a 100% en presencia de los alcaloides. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para las diferentes enzimas, se sugiere una pérdida de electrones mediada por la ubiquinona, favoreciendo la formación de especies reactivas de oxígeno. Los resultados explican el efecto larvicida previamente reportado para los compuestos.

* Trabajo de grado

** Facultad de ciencias. Escuela de química. Directora, Stelia Carolina Mendez, PhD. Codirectora, Aurora Carreño, Msc.

ABSTRACT

TITLE: STUDY OF THE MECHANISM OF ACTION OF ANALOG TO GIRGENSOHNINA ALKALOIDS ON MITOCHONDRIAL ENERGY METABOLISM OF LARVAE *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)^{*}

AUTOR: Mayra Alejandra Borrero Landazábal ^{**}

KEY WORDS: Oxidative phosphorylation, Girgensohnina, *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

The effects of AL47: 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(piperidin-1-yl) acetonitrile, AL48: 2-(3,4-dioxymethylenphenyl)-2-(piperidin-1-yl) acetonitrile, AL49: 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(pyrrolidin-1-yl) acetonitrile and AL50: 2-(3,4-dioxymethylenphenyl)-2-(pyrrolidin-1-yl) acetonitrile, 4 synthetic girgensohnine alkaloid analogs, were analyzed on *aedes aegypti* larvae mitochondria. The enzymatic activities of NADH and succinate oxidases were determined by polarographic methods. Spectrophotometric methods were used for enzyme activities determination of NADH, succinate dehydrogenase, cytochrome c reductase and cytochrome c oxidase (at concentrations of 8 nM, 2 μ M, 8 μ M and 40 μ M). The compounds showed inhibitory activity of complex I, by reducing the activity of NADH dehydrogenase 20 to 25%, and NADH oxidase from 25 to 40%, the molecules AL49 AL50 showed a higher inhibitory activity. Succinate oxidase was inhibited by 20 to 40%, the compound AL49 showed the higher inhibition. Succinate dehydrogenase activity increased in the presence of the compounds (from 50 to 150%), suggesting a blocking of electrons transportation to oxygen that does not involves the succinate dehydrogenase enzyme. Succinate-cytochrome c reductase evaluation do not revealed effect of the compounds on the enzyme; unlike cytochrome c oxidase, which increased its activity by 25 to 100% in the presence of the alkaloids. Considering the results obtained for the different enzymes, an electron leak of the respiratory chain is suggested, favoring the formation of reactive oxygen species. These results contribute to the explanation of larvicidal effect that was previously reported for these compounds.

* Bachelor Thesis

** Science Faculty. Chemistry School. Director, Stelia Carolina Mendez, PhD. Codirector, Aurora Carreño, Msc.

INTRODUCCIÓN

Enfermedades transmitidas por la picadura de artrópodos son la principal causa de muerte y morbilidad en el mundo (Elston 2004). El mosquito *Aedes aegypti*, es el principal vector de la enfermedad del dengue, este padecimiento de tipo viral se extiende rápidamente en zonas tropicales donde condiciones ambientales facilitan su proliferación. Se estima que en el mundo hay 2500 millones de personas en riesgo de ser infectadas por el virus del dengue (World Health Organization 2009). Entre las principales estrategias para el control del vector, se realizan campañas de limpieza en sitios de almacenamiento y estancamiento de aguas y se emplean larvicidas e insecticidas. Temephos, permethrin, Bti y piriproxifen son los tratamientos larvicidas más ampliamente usados. La aplicación prolongada de larvicidas e insecticidas como medio de control químico puede llevar al desarrollo de fenómenos de resistencia y de contaminación ambiental (Kittayapong 2000; World Health Organization 1992; Rose 2001).

La toxicidad de los insecticidas más comúnmente usados, como los organofosforados y los carbamatos, está relacionada con la capacidad de inhibición sobre la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (Fukuto 1990). De esta forma, se buscan nuevos compuestos que presenten capacidad inhibitoria sobre esta enzima. Por otra parte, la girsensohnina; es un compuesto cianogénico que se encuentra en la *Girgensohnia oppositiflora* (Amaranthaceae), planta originaria de los desiertos de Kazakhstan, al norte de Iraq y al sur de Pakistan (Sukhorukov 2007); dicho compuesto, fue sintetizado en estudios anteriores, descubriendo además su capacidad para inhibir la AChE. Posteriormente, se sintetizaron α -aminonitrilos análogos a la

girgensohnina, con el fin de incrementar la actividad inhibitoria sobre la enzima y además, se evaluó la actividad insecticida sobre larvas de *A. aegypti*. Se encontró que seis de estos compuestos presentaron mayor inhibición sobre la AChE con respecto a la girgensohnina, con valores de IC₅₀ de 42-51µM en ensayos *in vitro* de inhibición sobre AChE y actividad insecticida *in vivo* en concentraciones menores a 140ppm en larvas de *A. aegypti* (Carreño et al. 2014).

De acuerdo a los resultados obtenidos para estas moléculas en cuanto al efecto inhibitor sobre la enzima AChE y su actividad insecticida, se propuso profundizar en el estudio de las propiedades biológicas de dichos compuestos. Por lo tanto, en este trabajo se evalúa el efecto de los α-aminonitrilos previamente mencionados sobre los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial, en mitocondrias aisladas de larvas de mosquito *A. aegypti*. Los experimentos *in vitro* fueron realizados usando técnicas espectrofotométricas y polarográficas para la evaluación de la actividad enzimática de cada una de las enzimas de la cadena respiratoria.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de α -aminonitrilos diseñados con base en la estructura de la girgensohnina sobre el metabolismo energético mitocondrial de larvas de *Aedes aegypti*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Emplear una metodología que permita el aislamiento de mitocondrias de larvas de mosquito *A. aegypti*.
- Determinar los efectos de α -aminonitrilos análogos a la girgensohnina sobre la actividad enzimática de las siguientes enzimas de la cadena respiratoria:
 - NADH oxidasa.
 - NADH citocromo c reductasa.
 - NADH deshidrogenasa.
 - Succinato oxidasa.
 - Succinato citocromo c reductasa.
 - Succinato deshidrogenasa.
 - Citocromo c oxidasa.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 DENGUE

La infección con el virus dengue es una de las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad en las áreas tropicales y subtropicales alrededor de todo el mundo. El mosquito *Aedes aegypti* miembro de la familia *Flaviviridae*, circula el virus dengue en la naturaleza como cuatro distintos serotipos, 1-4. Los síntomas clínicos y patológicos causados por los cuatro serotipos son, indistinguibles y van desde una enfermedad benigna similar a la gripe hasta síntomas hemorrágicos severos y shock hemodinámico, con síntomas encefalopáticos (Bielefeldt-Ohmann 1998).

Se piensa que una infección primaria confiere inmunidad permanente contra el serotipo infectado, pero solo por 2 a 3 meses contra una re-infección por un serotipo diferente (Halstead 1974; World Health Organization 2009). Los individuos con una segunda infección por dengue producen reacción cruzada de anticuerpos no neutralizantes y células T de memoria, lo que puede aumentar la replicación del virus y sobreproducción de citoquinas, que a su vez son factores de riesgo para el dengue hemorrágico (Rothman and Ennis 1999).

El dengue es la enfermedad viral más rápidamente expansiva en el mundo. En los últimos 50 años, la incidencia se incrementó 30 veces (**Figura 1**), cada vez con mayor expansión hacia nuevos países, y de zonas urbanas a rurales. Se estima que ahora se producen de 50 a 100 millones de nuevas infecciones anuales en más de 100 países endémicos, poniendo casi la mitad de la población mundial en riesgo (World Health Organization 2012).

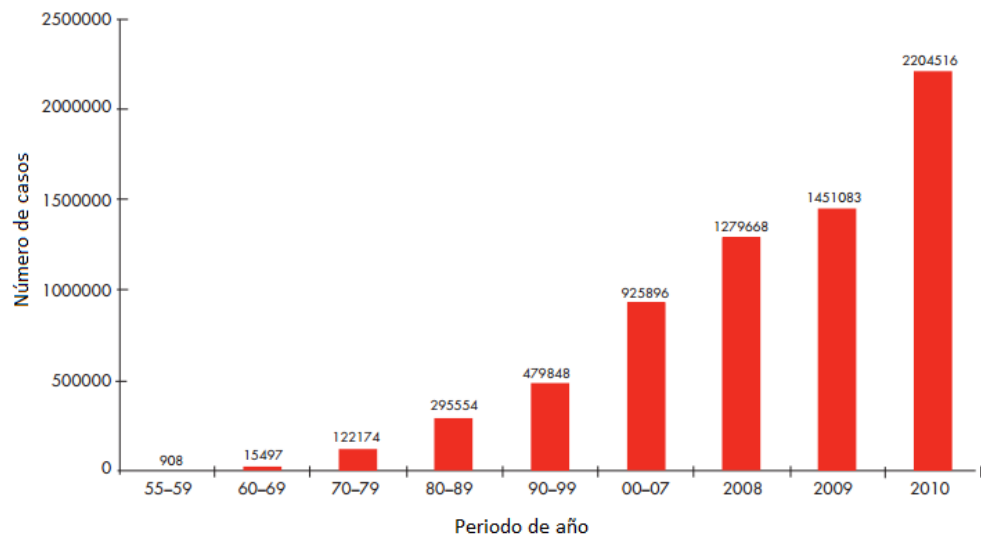


Figura 1. Número promedio de casos de dengue y dengue grave notificados a la OMS cada año entre 1955-2007 y número de casos reportados en los recientes años, 2008-2010 (World Health Organization 2012).

En comparación con otras enfermedades, el dengue puede causar tanto o más perjuicio social, que otras enfermedades transmisibles en algunas de las regiones más afectadas. En América Latina y el Caribe, por ejemplo, en la década de 1990 el dengue causó una carga social, económica y de salud pública, similar a enfermedades como la meningitis, la hepatitis, la malaria, el grupo de enfermedades de la infancia (poliomielitis, sarampión, tos ferina, la difteria y el tétanos) o la tuberculosis (World Health Organization 2012).

2.1.1 Control del dengue

Debido a la falta de vacunas que confieren inmunidad a los diferentes serotipos de la enfermedad y a la ausencia de medicamentos para su

tratamiento, la prevención o reducción de la transmisión del virus del dengue depende enteramente del control de los mosquitos vectores o la interrupción del contacto humano-vector.

Las actividades para controlar la transmisión deben estar dirigidas al mosquito *A. aegypti* (el vector principal) en los hábitats de desarrollo, etapas inmaduras y adultas, así como en otros lugares donde se presenta el contacto humano vector (por ejemplo, escuelas, hospitales y lugares de trabajo), a menos que exista sólida evidencia de que *A. albopictus* u otras especies de mosquito sean los vectores locales del dengue. El *A. aegypti* prolifera en espacios con agua estancada, tales como aquellos que se usan para el almacenamiento de agua doméstica, para plantas decorativas, depósitos expuestos y llenados por la lluvia, que incluyen llantas usadas, recipientes desechables de alimentos y bebidas, canales obstruidos y edificios en construcción. Generalmente, la mayoría de los mosquitos adultos permanece a menos de 100 metros del lugar de donde emergieron (World Health Organization 2009), ya que las hembras se alimentan casi enteramente de los humanos, principalmente durante las horas diurnas, tanto en interiores como en exteriores (Erlanger, Keiser, and Utzinger 2008).

Al seleccionar el método de control de vectores más apropiado (o la combinación de métodos), se debe tener en cuenta la ecología local y la conducta de las especies seleccionadas, los recursos disponibles para la implementación, el contexto cultural en el que se llevan a cabo las intervenciones, la factibilidad de aplicarlas de manera oportuna y la adecuación de la cobertura¹. Los métodos para el control de vectores incluyen la eliminación o el manejo de hábitats larvarios, eliminando las

¹ La adecuación de la cobertura implica definir las áreas o sectores de la comunidad, sobre las cuales se implementará dicho método de control.

larvas con insecticidas, el uso de agentes biológicos y la aplicación de adulticidas (Kittayapong 2000).

2.1.2. Control químico: larvicidas

La mayoría de los programas de control de mosquitos apuntan a estadios larvarios en sus lugares de cría con larvicida debido a que el adulticida sólo puede reducir las poblaciones de adultos lo cual permite un control solo temporal. Debido al dramático aumento de la resistencia de los mosquitos a los productos químicos conocidos y en ausencia de nuevos compuestos, se buscan mejores medios alternativos de control. La urgencia para cumplir con esta falencia se ha incrementado; especialmente tras la reciente conciencia pública sobre los peligros potenciales que emana del uso generalizado de insecticidas (M.-K. Kim et al. 2002). Uno de los larvicidas más comúnmente empleados para combatir los mosquitos *A. aegypti* es el Temephos[®]. A pesar de ser muy empleado, este insecticida organofosforado ha reducido su efectividad debido a la resistencia desarrollada por larvas de mosquitos de diferentes géneros entre ellos el *Aedes*. Este tipo de resistencia fue encontrada en mosquitos en Rio de Janeiro, Brasil, hace alrededor de 12 años. La resistencia inducida por Temephos ha sido reportada también por investigadores indúes para diferentes estadios de mosquitos *A. aegypti* (da Silva-Alves et al. 2013).

Varios escritos encontrados cerca del mediterraneo que datan del siglo VI o VII D.C, que hablan sobre temas agrícolas, revelan que las personas controlaron y eliminaron mosquitos y otras plagas de insectos domésticos por la eliminación física de ellos o mediante el uso de partes de plantas y derivados de plantas antes de la llegada de los productos químicos sintéticos

(Smith and Secoy 1975). Estas plantas contenían fitoquímicos insecticidas que estaban compuestos predominantemente de metabolitos secundarios producidos por las plantas para protegerse contra los insectos herbívoros (Casida 1980; Smith and Secoy 1976).

Actualmente, los compuestos de origen fitoquímico son un tema de gran interés científico; muchos estudios se han enfocado en las actividades biológicas (entre esas la insecticida y larvicida), que presentan extractos, aceites esenciales y metabolitos de un gran número de plantas (Garcez et al. 2009; Rajkumar and Jebanesan 2010). La mayoría de los estudios sobre los fitoquímicos se centran en las hierbas y otras plantas medicinales; esto porque el conocimiento experimental histórico y estudios científicos han demostrado que son particularmente activos contra ciertos organismos. Se ha encontrado que existe una conexión entre la actividad de las plantas contra agentes patógenos y la actividad insecticida contra los mosquitos (Shaalán et al. 2005).

La bioactividad de compuestos fitoquímicos contra las larvas de mosquitos puede variar significativamente dependiendo de la especie de planta, parte de la planta, edad de la planta, solvente usado en la extracción y mosquitos. Varios estudios se han centrado específicamente en la actividad larvicida de plantas medicinales en diferentes regiones geográficas (Garcez et al. 2009; Knio et al. 2008; Matasyoh et al. 2011; Ciccía, Coussio, and Mongelli 2000; Tennyson, Ravindran, and Arivoli 2012; Bobadilla, Sisniegas, and Zavaleta 2005; Shaalan et al. 2005).

2.1.3. Control químico: insecticidas

Los insecticidas abarcan un amplio rango de efectos en los insectos y otros artrópodos. Un ejemplo es la neuroexcitación que resulta en hiperactividad, temblor, y parálisis debido a la disminución de la energía y la fatiga neuromuscular, mientras la neuroinhibición causa inmovilidad y parálisis por causa de la posible privación del oxígeno y/o reducción de la capacidad respiratoria que finalmente conlleva a la muerte (Rattan 2010).

Entre los insecticidas más usados se encuentran los organofosforados, carbamatos y piretroides. Los compuestos organofosforados (OP) junto con los carbamatos son aún la clase de insecticidas más ampliamente usados en el mundo. Sus mecanismos primarios de toxicidad involucran la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE), induciendo a la toxicidad sistémica a partir de la hiperestimulación colinérgica (Guizzetti et al. 2005). Los insecticidas piretroides se desarrollaron en una secuencia clásica: Se observó actividad en un extracto natural, los compuestos responsables se aislaron e identificaron y posteriormente, se sintetizaron análogos para incrementar su actividad. Los piretroides se han evaluado para muchas aplicaciones y como posible remplazo para algunos de los insecticidas organofosforados, carbamatos, u organoclorados, ahora considerados inaceptables (Elliott and Janes 1974).

Por muchos años durante la producción, cultivo y almacenamiento pos-cosecha de frutas, el uso continuo y con poco apego a las normas de regulación y seguridad de insecticidas, pesticidas y plaguicidas generó un gran descontrol en los sistemas biológicos. Se han generado fenómenos de resistencia en algunas especies de insectos y alteraciones en el medio ambiente (Park et al. 2002). Esto provoca desde toxicidad profunda hasta desórdenes del sistema nervioso, cáncer y recientemente se ha encontrado

que algunos pesticidas pueden alterar los sistemas endocrinos y afectar la reproducción por interferencia con las hormonas naturales (Schierow and Esworthy 2012; Copeland 2012).

En la búsqueda de nuevos compuestos con posible actividad insecticida, se ha recurrido a las plantas como fuente de compuestos. El metabolismo primario de las plantas sintetiza compuestos esenciales y de presencia generalizada en todas las especies vegetales, sin embargo, los productos finales del metabolismo secundario como los alcaloides, aminoácidos no proteicos, esteroides, fenoles o taninos, pueden tener diferentes funciones biológicas. Dentro de éstas se destaca por su importancia, la actividad contra el ataque y proliferación de insectos evitando que las plantas sean consumidas por herbívoros. No se ha identificado un patrón de máxima producción, ni órganos especiales para el almacenaje de metabolitos secundarios, sin embargo, la mayor concentración de éste tipo de compuestos se encuentre en flores, frutos y semillas (Coats 1994). Se ha propuesto que los metabolitos secundarios que utilizan las plantas para su protección, pueden inhibir el desarrollo normal de los insectos actuando como:

Reguladores del crecimiento: al ser consumidas, las biomoléculas alteran el desarrollo normal del insecto, evitando que este alcance su crecimiento pleno y en muchas ocasiones su capacidad de desarrollar correctamente sus alas y volar.

Inhibidores de la alimentación: desarrollando una acción de bloqueo en la absorción de los nutrientes básicos para el crecimiento del insecto, por lo que después de que el insecto ingiere el fitometabolito muere por inanición.

Repelentes: ésta actividad la desarrollan básicamente los compuestos que ejercen efectos irritantes a los agentes que intentan atacar a la planta, como el hinojo (*Foniculum vulgare*), ruda (*Ruta graveolens*) y eucalipto (*Eucaliptus globolus*), entre otras plantas aromáticas (Vázquez, Pérez, and Díaz 2009).

Para el desarrollo de este trabajo, se usaron compuestos derivados de un metabolito aislado de la planta *Girgensohnia oppositiflora* (Amaranthaceae). A continuación, se describe su obtención y la actividad biológica conocida hasta ahora.

2.2 GIRGENSOHNINA

La girgensohnina es un metabolito cianogénico extraído con un rendimiento no mayor al 0.05% de *Girgensohnia oppositiflora* (Amaranthaceae), arbusto que crece en los desiertos de Rusia e Irán (**Figura 2**). Este es uno de los casos inusuales de compuestos cianogénicos con un anillo de piperidina sin un enlace glicosídico en su estructura (Sukhorukov 2007).

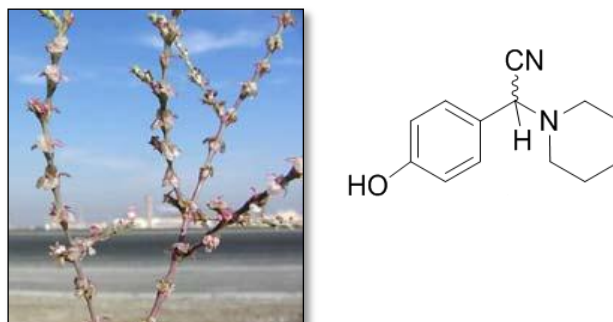


Figura 2. *Girgensohnia oppositiflora* y girgensohnina (Kouznetsov and Arenas 2013).

En el año 2008 el Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular LQOBio desarrolló una ruta sintética para acceder al alcaloide girgensohnina utilizando piperidina, p-hidroxibenzaldehído, KCN y cantidades catalíticas de InCl_3 . (**Figura 3**). El alcaloide se obtuvo con un rendimiento del 76%. En este mismo año, se reportaron los resultados de los estudios de inhibición de la girgensohnina sobre la enzima acetilcolinesterasa, mostrando que, aunque su inhibición no es mayor que la de patrones empleados, podría convertirse en un compuesto líder, que mediante transformaciones químicas ofreciera análogos que brinden una inhibición mayor.

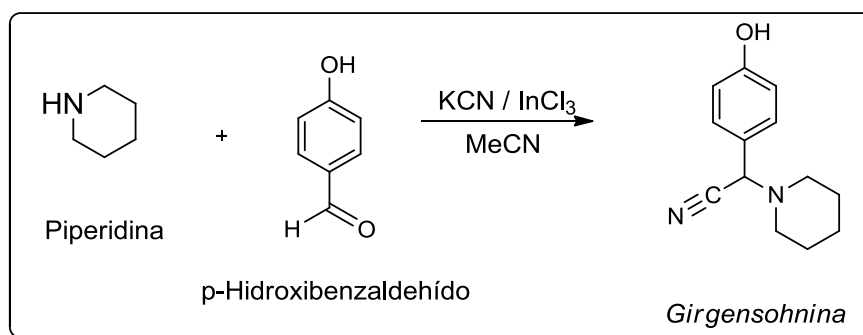


Figura 3. Síntesis del alcaloide Girgensohnina

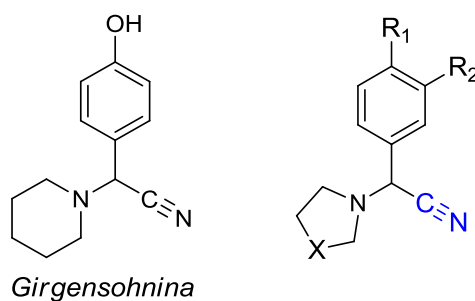
2.2.1 α -aminonitrilos análogos a la girgensohnina

En el LQOBio se desarrollaron estudios y se obtuvieron nuevos análogos estructuralmente similares a la girgensohnina (**Figura 3**). Se evaluó el efecto de cada uno de los análogos sobre la enzima AChE y la actividad insecticida sobre larvas de *A. aegypti*. Se encontró que seis de los compuestos estudiados presentaron de moderada a buena inhibición sobre la AChE comparado con el alcaloide natural, con valores de IC_{50} entre 42-51 μM , en

ensayos *in vitro* y actividad insecticida *in vivo* a concentraciones menores a 140 ppm en larvas de *A. aegypti* (Carreño et al. 2014).

De los seis compuestos mencionados anteriormente, se escogieron cuatro cuyas estructuras se relacionan por la presencia de la pirrolidina o piperidina y los grupos -OCH₃ y -OCH₂O (Figura 4).

Alcaloide Análogos α-
cabeza de serie aminonitrílicos



Análogo.	X	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (µg/mL)
<u>AL47</u>	CH ₂ CH ₂	OCH ₃	OCH ₃	11.6±0.2
<u>AL48</u>	CH ₂ CH ₂	OCH ₂ O		15±0.1
<u>AL49</u>	CH ₂	OCH ₃	OCH ₃	10.3±1
<u>AL50</u>	CH ₂	OCH ₂ O		11.6±0.2
<u>Girgensohnina</u>	CH ₂ CH ₂	OH	--	20.1±0.2

Figura 4. Estructuras de los α-aminonitrílicos obtenidos y resultados de inhibición de la AChE.

Se escogieron estas cuatro estructuras con el fin de encontrar una relación entre la presencia de la pirrolidina/piperidina y $\text{OCH}_3/\text{OCH}_2\text{O}$ y su efecto sobre la bioenergética mitocondrial. Por lo tanto, a continuación se hace una revisión sobre la mitocondria, donde se encuentra la cadena transportadora de electrones, la cual es nuestro objetivo de estudio.

2.3 LA MITOCONDRIA

La mitocondria es una organela con un origen ciertamente peculiar. Todas sus características estructurales y funcionales evidencian que en el nacimiento de la célula eucariota, una bacteria fue fagocitada por un microorganismo de mayor tamaño con el fin de aprovecharse de la energía, en forma de ATP, que ésta fabricaba mientras la célula anfitriona dotaba a su huésped de materias primas y protección. La simbiosis perfecta entre estos dos organismos primitivos, supone uno de los pasos más importantes de la evolución (Emelyanov 2003).

La mitocondria juega un papel importante en el metabolismo celular al mantener los niveles de ATP, dando la energía necesaria para el funcionamiento de la célula. A su vez, regula los niveles de mensajeros secundarios como Ca^{2+} y especies reactivas de oxígeno al citoplasma y también se destaca su participación en los procesos de inducción de muerte celular, la cual está relacionada con el aumento de la permeabilidad de sus membranas (Sims and Muyderman 2010).

2.3.1 Estructura y composición

La mitocondria tiene alrededor de 0.5-1 μ m de diámetro y hasta 7 μ m de longitud. Pueden aparecer como esferas, varillas u organismos filamentosos, pero la arquitectura general es la misma (**Figura 5**). El número de mitocondrias por célula, varía dependiendo de los requisitos de energía: los tejidos con una alta capacidad para realizar funciones metabólicas aeróbicas tales como el músculo esquelético o el riñón tendrá un mayor número de mitocondrias.

Las mitocondrias tienen dos membranas, cada una compuesta de una bicapa de fosfolípidos. Las dos membranas son muy diferentes en apariencia y en las propiedades físico-químicas, determinando así la función bioquímica de cada membrana (Krauss 2001). La membrana interna encierra el espacio de la matriz que contiene los sistemas de enzimas centrales del metabolismo intermediario de energía, incluyendo el ciclo del ácido tricarboxílico (CAT) y el sistema de β -oxidación de ácidos grasos. En la matriz se producen las reacciones terminales de descomposición y oxidación de moléculas combustible a dióxido de carbono, con la producción simultánea de equivalentes reductores para la cadena de transferencia de electrones mitocondrial. Una serie de complejos enzimáticos en la membrana interna mitocondrial (MIM), reducen el oxígeno a agua y convierten la energía de combustión en ATP, el cual tiene una gran carga de energía libre negativa de hidrólisis, capaz de conducir las reacciones endergónicas en redes de reacciones acopladas.

El mecanismo para la conversión de la energía de combustión, se basa en el bombeo redox de protones impulsados desde la matriz hacia el espacio intermembrana, con una formación de potencial electroquímico transmembrana a través de la membrana interna mitocondrial. El potencial es transformado en energía “química” de ATP por medio de F_1F_0 -ATP sintasa,

un motor nanoquímico, el cual, por medio de movimiento rotatorio provocado por el reflujo de protones, produce cambios de conformación en la proteína capaz de energizar la síntesis de ATP a partir de fosfato de dinucleótido de adenosina (ADP) y fosfato inorgánico (Pi) (Passarella et al. 2003; Ernster and Schatz 1981; Krauss 2001).

Para evitar el gasto indebido de energía en forma de calor, el potencial electroquímico no debe permitir disminuirse debido a la permeabilidad incontrolada de la membrana para moléculas cargadas. Incluso en estas condiciones, sustratos y algunos metabolitos claves deben ser capaces de entrar o salir de la mitocondria (quienes son dependientes del metabolismo citosólico). Este tipo de relaciones impuestas por compartimentación intracelular, ha llevado a la formación de una red metabólica intrincada del metabolismo energético que abarca el citosol y la mitocondria (Hassinen 2014).

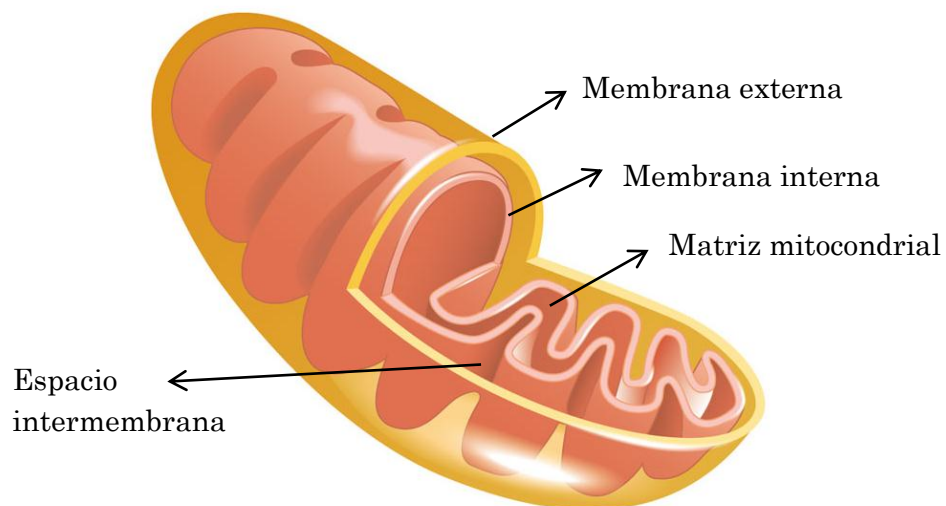


Figura 5. Estructura interna de la mitocondria (Vergara 2010).

2.3.2. Cadena respiratoria

Tradicionalmente la cadena respiratoria mitocondrial se define como el grupo de complejos enzimáticos involucrados en la transferencia de electrones al oxígeno, con simultánea conservación de energía, por medio de bombas de protones redox-impulsadas y la utilización del protón y el gradiente eléctrico en la síntesis de ATP. Los componentes son denominados complejo I, complejo II, complejo III, complejo IV y complejo V (**Figura 6**).

Las enzimas estrechamente relacionadas que alimentan la cadena respiratoria son las enzimas ubiquinona-reductoras, que contienen flavina adenina dinucleótido (FAD) (es decir, succinato-ubiquinona oxidoreductasa [Complejo II], flavoproteína de transferencia de electrones [ETF]-ubiquinona oxidoreductasa y glicerol-3-fosfato-ubiquinona oxidoreductasa), pero éstas, por si solas, no son capaces de bombear protones.

La función de bombeo de protones de las enzimas redox de la cadena respiratoria genera un gradiente de protones (ΔpH) y un potencial de membrana ($\Delta\psi$) a través de la membrana interna. Juntos, los gradientes de potencial de protones y de membrana representan una diferencia de potencial electroquímico de protones ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$), una carga de energía libre (kJ/mol) que conduce a la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi por la F_1F_0 -ATPasa (Hassinen 2014).

Con el fin de esclarecer el funcionamiento del transporte de electrones, se hablará de cada uno de los complejos enzimáticos que conforman la cadena respiratoria mitocondrial. Su morfología, función y mecanismo de transporte de electrones, son los temas que se tratan a continuación.

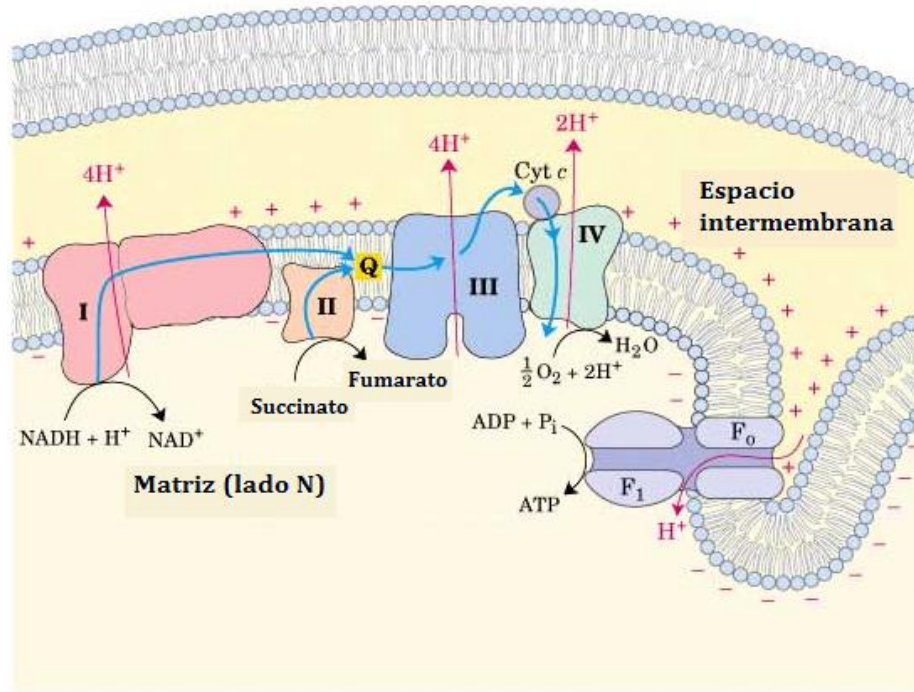


Figura 6. Complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (Lehninger, Nelson, and Cox 2008).

2.3.2.1 Complejo I

El complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa) es una de las más grandes enzimas con múltiples subunidades en la membrana interna de la mitocondria. En mamíferos, la enzima es un heterómero de 44 subunidades diferentes con una masa molecular total de 980kDa (Balsa et al. 2012). Su homóloga bacteriana es relativamente pequeña (550 kDa) y tiene sólo 14 subunidades (o 13 debido a la fusión de genes), que se consideran como el núcleo funcional de la enzima. Ambas enzimas de mamíferos y bacterianas tienen forma de L, con un brazo hidrofílico dirigido hacia la matriz y un brazo hidrofóbico embebido en la MIM. La enzima contiene unido, no covalentemente, mononucleótido de flavina (FMN), o riboflavina-5'-fosfato, en el sitio activo de unión-NADH del dominio hidrofílico y un sitio de unión ubiquinona en el dominio de la membrana. El NADH dona equivalentes

reductores a FMN, desde el cual, una secuencia de nueve centros de hierro-azufre transmite electrones al sitio de reducción de la ubiquinona Q (formándose ubiquinol QH₂), localizado en la región de unión entre los brazos membranosos e hidrofílicos (Hassinen 2014).

El complejo I funciona como una bomba de protones redox-impulsada. Una estequiometría 4H⁺/2e⁻, ha sido generalmente aceptada. El sistema redox se resume en la **Figura 7**.

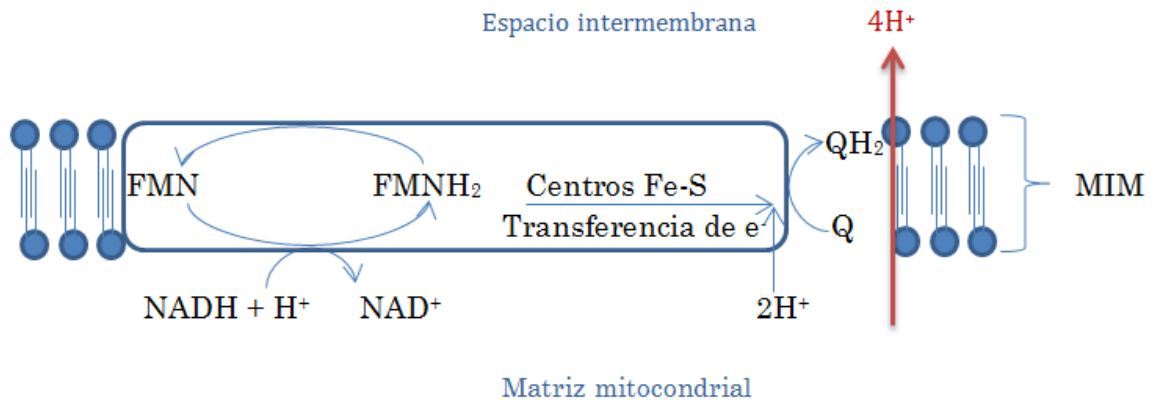


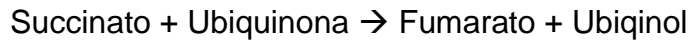
Figura 7. Sistema redox del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial.

Fuente: Autor.

2.3.2.2 Complejo II

Aunque no tiene la capacidad de conservar la energía redox como un potencial electroquímico, la succinato-ubiquinona oxidoreductasa (Complejo II, o succinato deshidrogenasa- SDH), una enzima clave del ciclo del ácido tricarbóxico, ha sido considerada como un miembro de la cadena respiratoria por históricas razones, ya que ésta es una enzima intrínseca a la membrana interna mitocondrial (Ishaaya, Nauen, and Horowitz 2007). La

succinato-ubiquinona oxidorreductasa transmite la reducción equivalente directamente al ciclo ubiquinona/ubiquinol con la reacción neta:



La estructura de la succinato-ubiquinona oxidorreductasa de mamíferos y aves ha sido determinada por medio de cristalografía de rayos X. La enzima es un heterómero de cuatro proteínas: una proteína de unión de FAD, una proteína hierro-azufre, y dos proteínas de anclaje de membrana. El complejo tiene una asimetría con forma de q, con un dominio hidrofílico globular y un dominio de membrana (Cecchini and Schro 2002).

El dominio globular contiene una molécula FAD unida covalentemente en la subunidad A y tres aglomerados de hierro-azufre en la subunidad B: uno binuclear (2Fe-2S), uno trinuclear (3Fe-3S), y una tetranuclear (4Fe-4S). Los aglomerados de hierro-azufre forman una cadena transportadora de electrones de 40Å desde el FAD hacia la ubiquinona y el hemo *b* en el dominio de membrana. Las subunidades C y D son proteínas integrales de membrana, cada una de ellas con tres hélices transmembrana. Contienen un grupo hemo, hemo *b* y un sitio de unión para la ubiquinona que es el aceptor final de electrones en la reacción catalizada por el complejo II (Davis and Hatefi 1970), ver **Figura 8**.

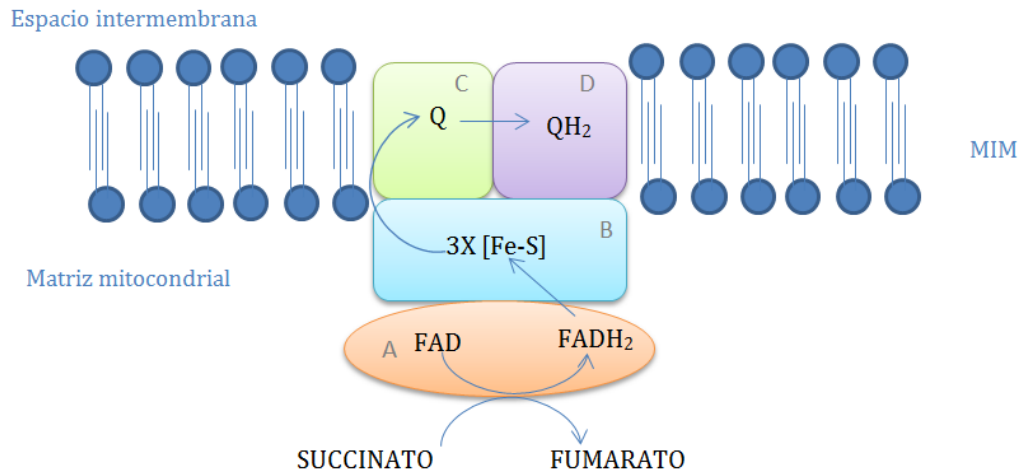


Figura 8. Complejo II (succinato deshidrogenasa). Fuente: Autor.

En la **Figura 8**, se esquematizan las dos subunidades transmembrana, C (verde) y D (violeta); las extensiones hacia la matriz contienen subunidades B (azul) y A (naranja). La subunidad B tiene 3 centros de hierro-azufre; la ubiquinona está unida a la subunidad C. Los electrones se desplazan (flechas azules) desde el succinato al FAD y seguidamente a través por los centros Fe-S a la ubiquinona.

2.3.2.3 Complejo III

El complejo III (ubiquinona- citocromo c-oxidoreductasa, o complejo citocromo *bc₁*) es un complejo enzimático heteromérico de 11 a 12 subunidades diferentes, que transporta electrones desde el ubiquinol hacia el citocromo c. La función del Complejo III se centra en el citocromo *b*, una proteína de membrana con 8 hélices transmembrana, dos grupos hemo *b* y dos dominios de unión a la ubiquinona (uno cercano al espacio intermembrana o lado P, Q_P; y otro cercano a la matriz mitocondrial o lado N,

Q_N) en cercanía a los grupos hemo. El grupo hemo de potencial bajo, (b_L , -30 mV) está localizado cerca al espacio intermembrana y el grupo hemo de potencial alto (b_H , +90 mV) cerca de la matriz mitocondrial. Además, el complejo contiene una única proteína Fe-S (proteína Rieske) y citocromo c_1 (en la **Figura 9**, se muestra la unidad dimérica funcional). (Iwata 1998; Gao et al. 2003).

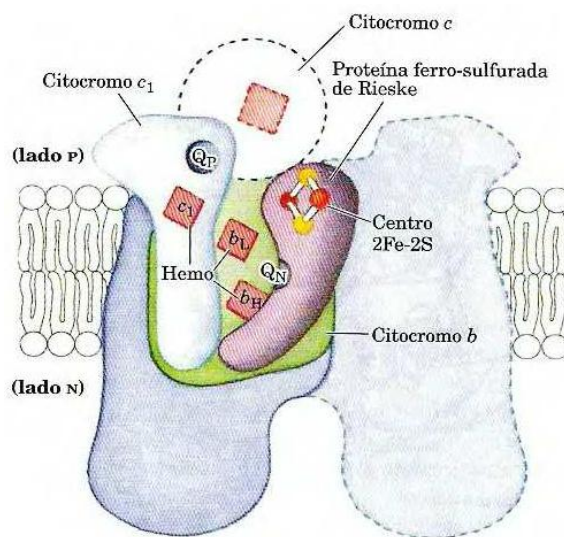


Figura 9. Complejo del citocromo bc_1 (complejo III) (Lehninger, Nelson, and Cox 2008).

El citocromo c_1 y la proteína ferro-sulfurada de Rieske se proyectan desde la superficie P y pueden interaccionar con el citocromo c del espacio intermembrana (aunque éste no forma parte del complejo funcional). El complejo III opera como una bomba de protones redox-impulsada con una relación $4H^+/2e^-$. Esto se basa en el llamado ciclo Q, donde la molécula ubiquinol es oxidada en Q_p por medio de un mecanismo bifurcado. En este caso, un electrón es donado hacia el hemo b_L , para luego ser transportado hacia b_H y el otro electrón es donado hacia el centro Fe-S Rieske, para ser transferidos hacia el citocromo c_1 y luego hacia el citocromo c en la parte

externa de la MIM. Por lo tanto, el citocromo *b* con sus dos hemos, funciona como un alambre vectorial de electrones transmembrana para la oxidación del ubiquinol en el sitio Q_P , junto con liberación simultánea de dos protones y la reducción de ubiquinona y su semiquinona en el sitio Q_N (secuencialmente en dos ciclos), con simultánea incorporación de protones. La proteína hierro-azufre Rieske está ligada al complejo por un dominio de eje, que permite un movimiento de péndulo del dominio que contiene Fe_2-S_2 para transmitir electrones desde el sitio Q_P al citocromo c_1 . Este proceso cíclico implica la translocación de una molécula de ubiquinol desde el sitio Q_N hacia Q_P , una molécula de ubiquinona y un electrón desde Q_P hacia Q_N (Mitchell 1975), (en la **Figura 10** se muestra el ciclo Q).

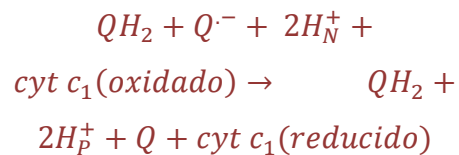
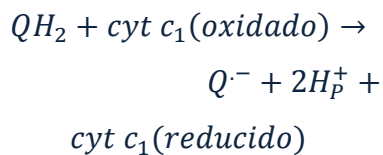
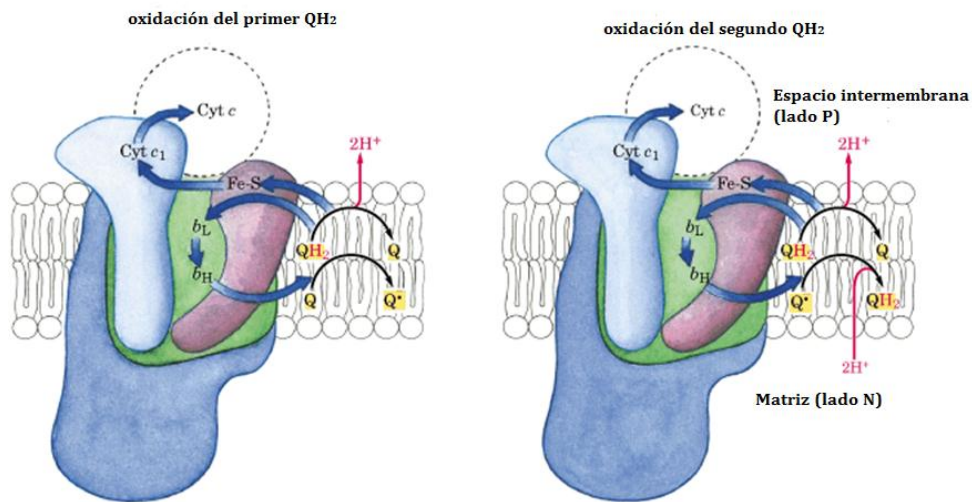


Figura 10. El ciclo Q (Lehninger, Nelson, and Cox 2008).

La ruta de los electrones a través del complejo III se muestra con flechas azules. En el lado P de la membrana, se oxidan dos moléculas de QH_2 a Q, liberando dos protones por Q (cuatro protones en total) en el espacio intermembrana. Cada QH_2 dona un electrón (a través del centro Fe-S de Rieske) al citocromo c_1 y un electrón (a través del citocromo b) a una molécula de Q cerca al lado N, reduciéndolo en dos pasos a QH_2 . Esta reducción también utiliza dos protones por Q, tomados de la matriz (Hassinen 2014).

2.3.2.4 Complejo IV

El complejo IV (citocromo c oxidasa; citocromo aa_3) cataliza la reducción del oxígeno a agua por medio del citocromo c reducido (ferrocitocromo c). Este cosustrato se difunde lateralmente desde el Complejo III y se adhiere al lado P de la MIM, de modo que la transferencia de electrones al sitio de reducción del oxígeno es vectorial a través de la membrana. Debido a que la dirección de la transferencia de electrones es hacia el interior y la captura de los protones para formar agua de la reducción de oxígeno se produce cerca del lado N de la membrana, la enzima produce un gradiente de protones electroquímico. Este gradiente se ve aumentado por el bombeo transmembrana de protones redox-impulsado desde la matriz mitocondrial con la estequiometría de $2\text{H}^+/2\text{e}^-$ (Wikstrom and Krab 1979).

La enzima en mamíferos es un heterómero con un tamaño de 220kDa de 13 subunidades, de las cuales las 3 más hidrofóbicas (I,II y III) están codificadas en el ADNmt. La subunidad II contiene dos iones Cu que forman complejo con los grupos $-\text{SH}$ de dos residuos de Cys en un centro binuclear (Cu_A) que se parece a los centros $2\text{Fe}-2\text{S}$ de las proteínas ferro-sulfuradas. La subunidad I contiene dos grupos hemo, designados a y a_3 , y otro ión cobre

(Cu_B). El hemo a₃ y el Cu_B forman un segundo centro binuclear que acepta los electrones del hemo a y los transfiere al O₂ unido al hemo a₃ (ver **Figura 11**) (Antontni et al. 1987).

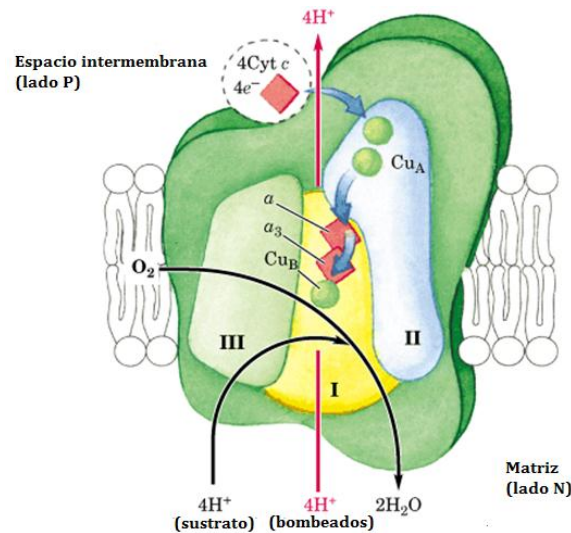
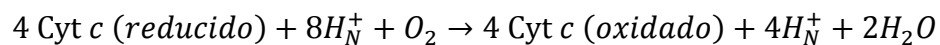


Figura 11. Complejo IV (citocromo c oxidasa) (Lehninger, Nelson, and Cox 2008).

La transferencia de electrones a través del complejo IV va del citocromo c al centro Cu_A, al hemo a, al centro hemo a₃-Cu_B y finalmente al O₂. Por cada cuatro electrones que pasan a través del complejo, la enzima consume cuatro H⁺ “sustrato” de la matriz (lado N) convirtiendo el O₂ en 2H₂O. También utiliza la energía de esta reacción para bombear un protón hacia el espacio intermembrana (lado P) por cada electrón que pasa, añadiéndose al potencial electroquímico producido por el transporte del protón impulsado por el potencial redox a través de los complejos I y III. La reacción global catalizada por el complejo IV es:



2.3.3 Síntesis de ATP

La F_1F_0 -ATPasa (complejo V, o F_1F_0 -ATP sintasa) es la versión mitocondrial de las ATPasas protón, “motores nanomecánicos”, los cuales emplean movimientos rotatorios para bombear protones a través de una membrana a expensas de la hidrólisis de ATP. Por el contrario, el Complejo V es capaz de sintetizar ATP cuando se energiza por un gradiente de protones electroquímico. La estructura espacial detallada de F_1F_0 -ATPasa de bovino y levadura se ha determinado por cristalografía de electrones y criotomografía (Abrahams et al. 1994; Davies et al. 2012).

El complejo enzimático se compone de tres dominios (**Figura 12**): un rotor incorporado en la membrana (F_0), un dominio catalítico hidrofílico (F_1) en el espacio de la matriz, y un tallo de unión. La parte F_1 consta de tres subunidades α , tres subunidades β y tres subunidades denominadas γ , δ , y ϵ . Los pares de subunidades α y β , forman tres sitios catalíticos capaces de hidrolizar o sintetizar ATP. Las subunidades γ , δ , y ϵ están fijadas a la parte F_0 y por lo tanto giran con él y forman un eje que se extiende hacia el centro de la parte F_1 . El complejo F_0 es un “rotor” y contiene las subunidades a, b y c, en la proporción ab_2c_{8-15} (Dmitriev, Jones, and Fillingame 1999). La subunidad c es un polipéptido pequeño (8000 Da), muy hidrofóbico, que consisten exclusivamente de dos hélices transmembrana, con un pequeño lazo que se extiende desde el lado de la matriz de la membrana. La rotación del rotor está acoplada mecánicamente al flujo de protones, que se canaliza a la subunidad c por la subunidad a. La rotación impulsada por protones de la subunidad rotor está unida a una protonación/desprotonación ordenada, de un residuo de ácido glutámico expuesto en la subunidad c. El número de protones necesarios para una revolución completa del rotor es igual al número de subunidades c en el mismo. El rotor acciona el giro de la subunidad γ asimétrica, que produce cambios de conformación en los tres

sitios activos del dominio F_1 . Estos proporcionan la energía para la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i . Una vuelta del rotor F_0 , resulta en la síntesis de tres moléculas de ATP, mientras que la estequiometría ATP/H^+ depende del número de subunidades c en el rotor. Las ocho subunidades c del rotor F_0 en células de mamífero, da una relación de H^+/ATP de $8/3 = 2,7$ (García and Morales 2008).

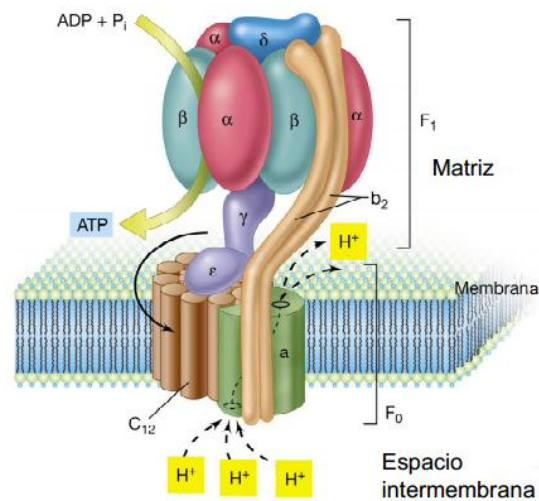


Figura 12. Complejo de la ATP sintasa mitocondrial (“Captación de Energía” 2006).

2.3.4 Agentes inhibidores de la transferencia electrónica

Una vez conocido el mecanismo de la transferencia de electrones, veremos como algunas sustancias pueden alterar el funcionamiento normal de la cadena respiratoria mitocondrial. Este tipo de compuestos llamados inhibidores, bloquean la transferencia de electrones entre los complejos multienzimáticos que forman la cadena respiratoria, muchos son específicos para determinado complejo. A continuación se describirán algunos inhibidores, clasificándolos de acuerdo al complejo que inhiben:

- Complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa): sustancias como la rotenona (Figura 13, 1), piericidina A (Figura 13, 2), barbitúricos (derivados del ácido barbitúrico, Figura 13, 3), amital, BAL (British anti-Lewisite) (Figura 13, 4), agentes mercuriales, etc; inhiben la transferencia de electrones desde un centro Fe-S a la ubiquinona (Xiong et al. 2012; Saldanha and Martins e Silva 1991). Basados en los análisis cinéticos de la enzima, hay dos grupos en los que se pueden clasificar estos inhibidores, representados por la piericidina A y la rotenona. El grupo I, lo conforman la piericidina A, fenazaquín (Figura 13, 5), pirimidifén (Figura 13, 6), fenpiroximato (Figura 13, 7), y amino- y alcoxi-pirimidinas relacionadas con la inhibición competitiva de la reducción de la ubiquinona (Figura 13, 8). En contraste, la rotenona (grupo II), fue caracterizado como un inhibidor no competitivo de la reducción de la ubiquinona.

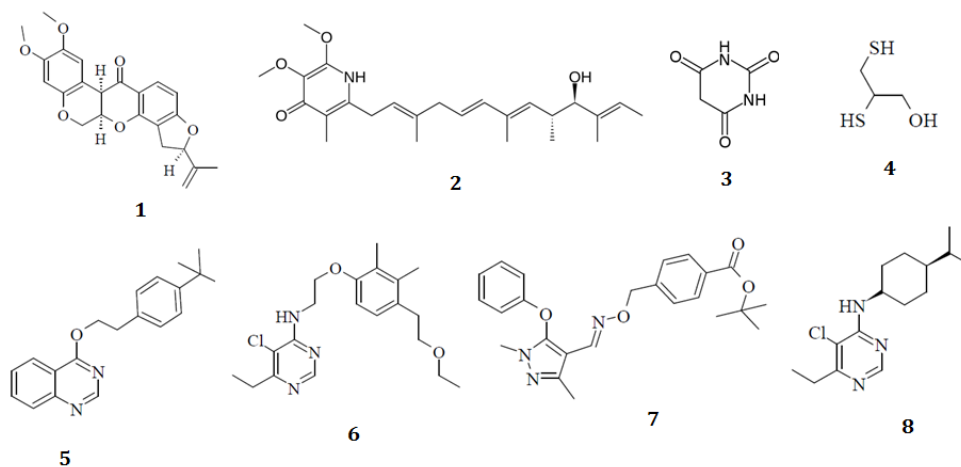


Figura 13 . Inhibidores del complejo I. 1, Rotenona; 2, piericidina A; 3, ácido barbitúrico; 4, BAL (British anti-Lewisite); 5, fenazaquín; 6, pirimidifén; 7, fenpiroximato; 8, AE F119209, aminopirimidina insecticida experimental (Hassinen 2014).

- Complejo II (succinato-ubiquinona oxidoreductasa): es inhibido por TTFA (2-tenoiltrifluoroacetona) y por carboxamidas, los cuales se unen al sitio de reducción de la ubiquinona evitando que esta interactúe con el complejo II (Avenot and Michailides 2010).

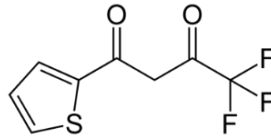


Figura 14. TTFA (Sigma-Aldrich 2014).

- Complejo III (ubiquinona-citocromo c oxidoreductasa): Los inhibidores de alta afinidad del complejo bc_1 , se unen al sitio de oxidación Q_P , o al sitio de reducción de la ubiquinona Q_N (**Figura 15**). Los inhibidores del sitio Q_N se representan por la antimicina A.

Los inhibidores de Q_P , conocidos también como tipo I, se dividen en: inhibidores tipo Ia, este grupo incluye β -metoxiacrilatos y mixotiazol, que bloquean el transporte de electrones entre el ubiquinol y la proteína de Rieske. Los inhibidores tipo Ib, están representados por el stigmatellin², un inhibidor tipo cromona (o 1,4-benzopirona). Se cree que bloquea la reducción del citocromo c_1 por la proteína de Rieske y desplaza hacia el rojo el espectro del hemo b_L . Finalmente, los inhibidores tipo Ic, como las 2-hidroxiquinonas, que bloquean la transferencia de electrones similar al stigmatellin, pero no tiene efecto sobre el espectro del citocromo b (Ishaaya, Nauen, and Horowitz 2007).

Otro compuesto también inhibidor del complejo III, pero no insecticida se conoce como BAL (British Anti Lewisite), que impide la transferencia de

² Compuesto aislado de la mixobacteria *Stigmatella aurantica*.

electrones desde la proteína Rieske hacia al Cyt c_1 (Chen et al. 2003; M. S. Kim and Kim 2004; Turrens, Alexandre, and Lehninger 1985).

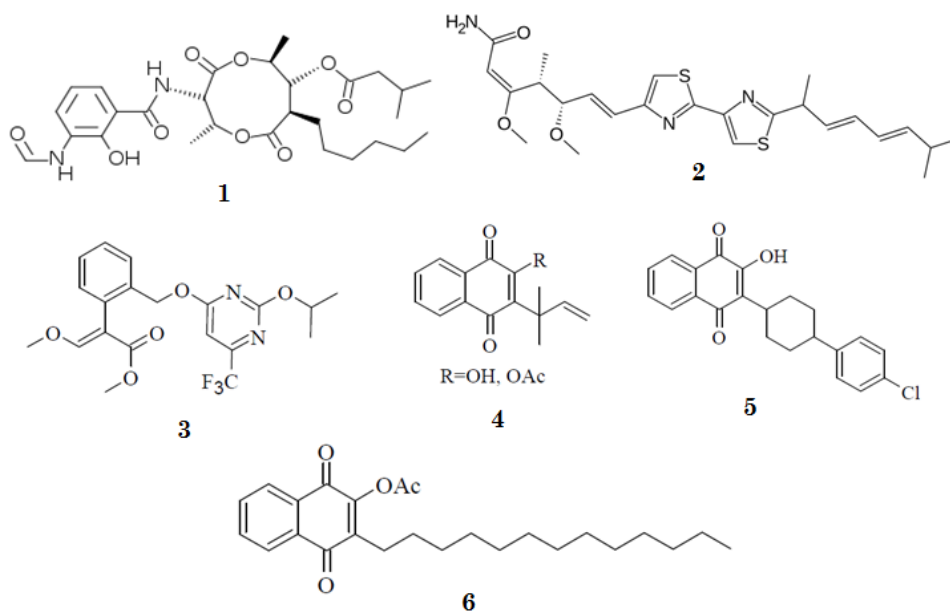


Figura 15. Inhibidores del complejo III. 1, antimicina A; 2, mixotiazol; 3, fluacripirim; 4, hidroxinaftoquinonas: BTG540, R=OAc, BTG505, R=OH; 5, atovacuona; 6, acequinocil (Hassinen 2014).

- Complejo IV (citocromo c oxidasa): este complejo es inhibido por monóxido de carbono y cianuro. El oxígeno se une a la enzima en el centro binuclear *hemo a₃/Cu_B*, al igual que el CO, por lo tanto esta inhibición es estrictamente competitiva con el O₂. El CN⁻ por el contrario, se une fuertemente al centro binuclear oxidado (Cooper and Brown 2008).

2.3.5 Activadores de los complejos de la cadena respiratoria

Al igual que existen compuestos con la capacidad de inhibir la actividad de las enzimas que pertenecen a la cadena respiratoria mitocondrial, también se han reportado agentes activadores, que aumentan su actividad enzimática. Existen varias enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la inhibición de los complejos enzimáticos, entre esas el Alzheimer (relacionada con la disminución de la citocromo c oxidasa). La disminución selectiva en el complejo IV mitocondrial, parece contribuir a la disfunción mitocondrial, hipometabolismo energético, y al estrés oxidativo (Hirai et al. 1991).

Estudios científicos han demostrado que el azul de metileno (3,7 Bis-dimetilamino-fenazationium), un indicador redox muy conocido, administrado *in vivo* beneficia el sistema nervioso central en ratas, incrementando la actividad de la citocromo c oxidasa (complejo IV) en el cerebro, en un 25% (después de una alta dosis) (Atamna and Kumar 2010).

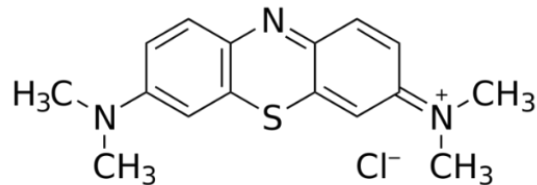


Figura 16. Estructura del azul de metileno (Sigma-Aldrich 2014)

2.3.6 Especies reactivas de oxígeno

Especies reactivas de oxígeno (EROS) es una frase usada para describir una variedad de moléculas con radicales libres derivados a partir de oxígeno molecular. Puesto que los dos electrones desapareados tienen el mismo espín, el oxígeno solo puede reaccionar con un electrón al tiempo y por lo tanto no es muy reactivo con los dos electrones involucrados en un enlace químico. Por otra parte, si uno de los electrones desapareados es excitado y cambia de espín, la especie resultante es un oxidante poderoso, ya que sus dos electrones tienen espines opuestos pueden reaccionar con otros pares de electrones, especialmente dobles enlaces (Turrens 2003).

La reducción del oxígeno por un electrón al tiempo produce intermediarios relativamente estables. El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el producto de una reducción del oxígeno por un electrón, es el precursor de las mayoría de EROS y un mediador en las reacciones oxidativas en cadena. La dismutación de $O_2^{\cdot-}$ (ya sea espontáneamente o por medio de una reacción catalizada por las superóxido dismutasas) produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que a su vez puede estar completamente reducido a agua o parcialmente reducido a radical hidroxilo ($OH\cdot$), uno de los oxidantes más fuertes en la naturaleza. La formación de $OH\cdot$ es catalizada por metales de transición reducidos por $O_2^{\cdot-}$, propagando este proceso (Liochev and Fridovich 1999).

Mientras que pequeñas fluctuaciones en la concentración de estos oxidantes pueden jugar un papel en la señalización intracelular, los incrementos incontrolados en las concentraciones de estos oxidantes conducen a reacciones en cadena de radicales libres, que se dirigen de forma indiscriminada hacia proteínas, lípidos, polisacáridos y ADN (DRÖGUE 2002).

El potencial estándar de reducción para la conversión del oxígeno molecular a $O_2^{\cdot-}$ es -0.160 V. la cadena respiratoria mitocondrial incluye una variedad de centros redox con potenciales estándar de reducción entre -0.32 V y $+0.39$ V. Dado el

entorno intramitocondrial altamente reductor, diversos componentes de la cadena respiratoria, incluyendo flavoproteínas, centros hierro-azufre y la ubisemiquinona, son termodinámicamente capaces de transferir un electrón al oxígeno. Por otra parte, la mayoría de los pasos en la cadena respiratoria implican reacciones de un solo electrón, lo que favorece aún más la reducción monovalente de oxígeno (Cadenas and Davies 2000).

2.3.7 Efecto pro-oxidante de la ubiquinona

La liberación de electrones a partir de la cadena respiratoria generando un aumento de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 , ha sido mostrado por varios investigadores, usando mitocondrias íntegras, partículas submitocondriales o complejos aislados de la cadena respiratoria. El sitio y mecanismo de esta liberación ha recibido mucha atención, y varios componentes de la cadena respiratoria están implicados. Entre estos, la ubiquinona ha sido propuesta como el principal sitio (Turrens, Alexandre, and Lehninger 1985), basado en las siguientes evidencias: i) Durante la respiración se forma ubisemiquinona, y las semiquinonas en general, reaccionan rápidamente con el oxígeno, produciendo $O_2^{\cdot-}$ (Bäcktröm et al. 1970); y ii) la producción de radicales es estimulada de 10 a 15 veces por la presencia de antimicina y un desacoplador, indicando que la liberación de electrones ocurre en el sitio sensible a la antimicina en la cadena respiratoria mitocondrial (Loschen, Flohé, and Chance 1971).

Sin embargo, la siguiente información argumenta la noción de que la ubisemiquinona es la fuente principal de pérdida de electrones durante la respiración mitocondrial: i) la ubisemiquinona formada durante la respiración mitocondrial es mantenida a un nivel relativamente alto (Bäcktröm et al. 1970), y se enlaza a los sitios específicos de enlace a ubiquinona de proteínas asociadas a los complejos I, II y III, que la estabilizan contra la auto-oxidación; agentes que modifican estos complejos, como TTFA en el caso del complejo II, o la antimicina en el caso del complejo III, alteran esta estabilidad de la ubisemiquinona; y ii) la

pérdida de electrones durante la oxidación del NADH se ha demostrado que ocurre en la presencia de rotenona, rhein y MPTP, agentes inhibidores del complejo I y por lo tanto de la reducción de la ubiquinona (Murphy et al. 1995).

En conclusión, la evidencia indica que la pérdida de electrones principalmente para la formación de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 ocurre en los complejos I, II y III de la cadena respiratoria, principalmente a través de la auto-oxidación de compuestos diferentes a la ubisemiquinona. Como otros antioxidantes, la ubiquinona puede obviamente actuar como un agente pro-oxidante bajo circunstancias especiales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 OBTENCIÓN DE LARVAS DE *Aedes aegypti*

Para realizar los experimentos se mantienen mosquitos de *A. aegypti* colonia Rockefeller en jaulas de cría (40x40x40 cm) en un insectario a $25 \pm 5^\circ\text{C}$, humedad de $70 \pm 5\%$ y fotoperiodo (12:12). A las hembras de *A. aegypti*, se les ofrece permanentemente una solución de miel al 10% y, cuando sea necesario obtener larvas para los experimentos, se alimentan los mosquitos con sangre de rata Wistar-UIS. Una vez alimentadas las hembras, se dejan reposar en la misma jaula permitiendo que realicen la ovipostura en un contenedor que permanece en el interior de la jaula revestido en su parte interna con papel filtro.

Los huevos se inducen a eclosionar hasta larvas y son mantenidas en bandejas de plástico (35.5cm x 21.5cm x 6.5cm) con aprox. 3.000 mL de agua declorizada. Después de alcanzar la etapa larval entre tercer y cuarto instar se cuentan, se separan y se transfieren con pipetas Pasteur desechables a tubos Falcon hasta su posterior uso.

El proceso de cría y obtención de larvas de mosquito fueron desarrollados en el Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales, CINTROP, bajo la dirección del Dr Jonny Duque.

3.2 AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS DE LARVAS DE *Aedes aegypti*

Las larvas fueron lavadas y separadas por filtración con gasa quirúrgica y colocadas en medio de aislamiento compuesto de sacarosa 250 mM, HEPES 10

mM, a un pH 7.2, EGTA 1 mM y BSA 0.1 %. Posteriormente las larvas fueron procesadas en homogeneizador tipo Van Potter.

La suspensión obtenida se filtró utilizando fibra de vidrio en una jeringa de 25 mL y la solución obtenida se centrifugó a 300 x g a 4°C durante 5 minutos. El sedimento se descartó y el sobrenadante fue centrifugado a 10000 x g, durante 10 minutos a 4°C. El precipitado obtenido, fue re-suspendido en medio de extracción y se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido fue re-suspendido en medio de extracción sin BSA y centrifugado a 10000 x g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado resultante contiene mitocondrias intactas de larva de mosquito las cuales se re-suspendieron en medio de extracción sin BSA y se congelaron a -70°C para su posterior fragmentación.

3.3 PREPARACIÓN DE LAS SUSPENSIONES MITOCONDRIALES

Las suspensiones obtenidas de acuerdo al ítem 3.2, fueron congeladas a -70°C hasta el momento de su uso, luego fueron fragmentadas por ultrasonido durante 5 minutos y se mantuvieron en baño de hielo durante el desarrollo de los ensayos. Los fragmentos mitocondriales se usaron como fuente enzimática.

3.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

La cuantificación de proteínas se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bradford 1976). Para esto se preparó una curva de calibración usando patrones de albúmina de suero bovino (fraction V, MERCK) disueltos en solución buffer de fosfato. Las absorbancias de los patrones y las muestras fueron medidas en un

ELISA marca Bio-Rad utilizando el programa Microplate Manager 6. Para esta cuantificación de prepararon 3 disoluciones 1:100, 1:200, 1:300 y un blanco.

3.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad de las enzimas relacionadas con la cadena respiratoria se determinó en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-1800 utilizando el programa UV-Probe 2.33 y polarográficamente en un oxígrafo marca Hansatech utilizando el programa Oxygraph plus. Las moléculas obtenidas como sólidos cristalinos se adicionaron en diferentes concentraciones (0,8nM, 2µM, 8µM y 40µM) que fueron escogidas basadas en los resultados de IC₅₀ obtenidos para los compuestos en la inhibición de la AChE (10 µg/mL, aproximadamente 40µM para todos los compuestos). A partir de esta concentración, se escogieron tres concentraciones menores, debido a que altas concentraciones de los compuestos podrían ocasionar daños en la mitocondria. Las diferentes concentraciones fueron preparadas a partir de una solución matriz de 8mM; los compuestos se incubaron por dos minutos con la proteína mitocondrial antes de inducir la reacción, para todas las enzimas estudiadas.

3.5.1 NADH Oxidasa

La actividad de la NADH oxidasa se determinó por el método de Singer. La velocidad de oxidación del NADH (**Figura 16**) se traduce en la velocidad de consumo de oxígeno, acompañado polarográficamente.

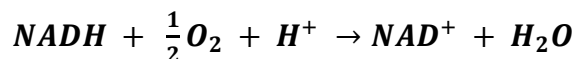


Figura 17. Esquema de reacción de NADH.

El sistema de reacción se compuso por tampón fosfato 80 mM (pH 7,4), EDTA 50 μ M, NADH 0,17 mM y 1 mg de proteína mitocondrial. La temperatura se mantuvo controlada a 28°C y la reacción fue iniciada por la adición de NADH (Singer 1974).

3.5.2 NADH deshidrogenasa

La actividad de la enzima será determinada por el método espectrofotométrico de Singer (1974), usando ferrocianato como receptor artificial de electrones en la presencia de rotenona, la reacción será monitoreada a 420 nm (**Figura 17**).

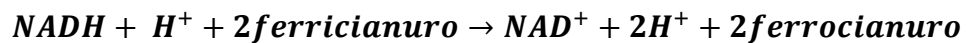


Figura 18. Esquema de la reacción de la NADH deshidrogenasa.

El sistema de reacción se compuso de: tampón fosfato 50 mM (pH 7.4), EDTA 2 mM, NADH 0,15 mM, ferrocianato 600 mM, rotenona 1mM, NaCN 1 mM y 0,1 mg de proteína mitocondrial.

3.5.3 Succinato deshidrogenasa

La actividad de la succinato deshidrogenasa fue determinada por el método de Singer, utilizando 2,6-diclorofenilindofenol (DCPIP) y fenazina metosulfato (PMS) como receptores artificiales de electrones. La velocidad de reducción del DCPIP fue monitoreada a 600 nm en un sistema de reacción compuesto por: tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 7,4), succinato de sodio 20 mM, EDTA 2 mM, NaCN 1 mM, rotenona 1 μ M, PMS 1 mM y 0,1 mg de proteína mitocondrial (Singer 1974).

Los reactivos presentes en el sistema, excepto el PMS y el DCPIP fueron incubados por 10 minutos a 28°C, la reacción fue iniciada por la adición de DCPIP 60 μ M.

3.5.4 Succinato Oxidasa

La actividad de la enzima se determinó en la velocidad de consumo de oxígeno, acompañado polarográficamente. El sistema de reacción se compuso por tampón fosfato 80 mM (pH 7,4), succinato 10 mM y 0,5 mg de proteína mitocondrial. La

temperatura se mantuvo controlada a 28°C y la reacción fue iniciada por la adición de succinato.

3.5.5 Succinato citocromo c reductasa

La actividad de esta enzima fue determinada por el método descrito por Somlo, midiendo la reducción del citocromo c después de bloquear la cadena respiratoria con NaCN 1 mM y rotenona 1 µM, la velocidad de reducción del citocromo c fue acompañada a 550 nm, usando un sistema de reacción compuesto por: tampón fosfato 50 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM, NaCN 1 mM, succinato de sodio 5 mM, rotenona 1 µM y 0,1mg de proteína mitocondrial. La reacción fue iniciada por la adición de 40 µM de citocromo c (Somlo 1965).

3.5.6 Citocromo c oxidasa

La actividad de esta enzima fue determinada por el método descrito por Mason. Acompañando la velocidad de oxidación del citocromo c a 550 nm, en un sistema de reacción constituido de: tampón fosfato 50 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM, citocromo c reducido 30 µM y 0,1 mg de proteína mitocondrial. La reacción fue iniciada por la adición de citocromo c reducido (Mason et al. 1973).

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los ensayos se realizaron por duplicado en 2 experimentos independientes. Se realizó un análisis de varianza y test Tukey de comparación de medias cuando la ANOVA arrojó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

Los análisis de actividad enzimática se desarrollaron con el fin de observar el efecto de los α -aminonitrilos en las diferentes concentraciones (8nM, 2 μ M, 8 μ M y 40 μ M), sobre cada una de las enzimas mitocondriales, de manera independiente de la formación de potencial de membrana. Es posible, a partir de estos ensayos determinar el efecto inhibitor o estimulante que puedan tener dichos compuestos sobre los complejos mitocondriales.

A continuación se reportan los resultados en porcentaje, de la actividad de cada enzima relacionada con la cadena respiratoria mitocondrial. Se representan en gráficas de barras los porcentajes de actividad, tomando como 100% la actividad correspondiente al ensayo realizado en ausencia de los α -aminonitrilos (control).

4.1.1 NADH oxidasa

El complejo I de la cadena respiratoria, como se menciona anteriormente, se denomina NADH deshidrogenasa; en este caso se evalúa la NADH oxidasa, que es el conjunto de complejos desde la NADH deshidrogenasa, pasando por la citocromo c reductasa (complejo III) y finalizando en la citocromo c oxidasa (complejo IV); es decir, en este ensayo se determina la velocidad del consumo de oxígeno molecular, al ser reducido a agua, cuando los electrones son aportados por el NADH.

El efecto de los α -aminonitrilos en sus respectivas concentraciones sobre la NADH oxidasa, se muestra en la **Figura 19**. En la gráfica se muestran las actividades agrupadas por cada compuesto (AL-47, -48, -49 y -50) y se compara la actividad de la enzima bajo las diferentes concentraciones de cada compuesto con respecto al control. Se observa un efecto inhibitor por parte de todos los compuestos, con

diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. También se observa un efecto dosis dependiente en todos los compuestos analizados. Se observa inhibición del 15 al 40% aproximadamente sobre la enzima.

Una mayor inhibición se observa para los compuestos AL-49 y AL-50, que en las concentraciones de 8 μ M y 40 μ M, provocaron inhibiciones del 40% aproximadamente. Este efecto podría estar relacionado con la presencia del fragmento pirrolidínico en sus estructuras, éste presenta una mayor basicidad que su análogo con fragmento piperidínico debido a la disponibilidad del par de electrones no enlazantes, lo que aparentemente le confiere a la molécula un mayor efecto inhibitor.

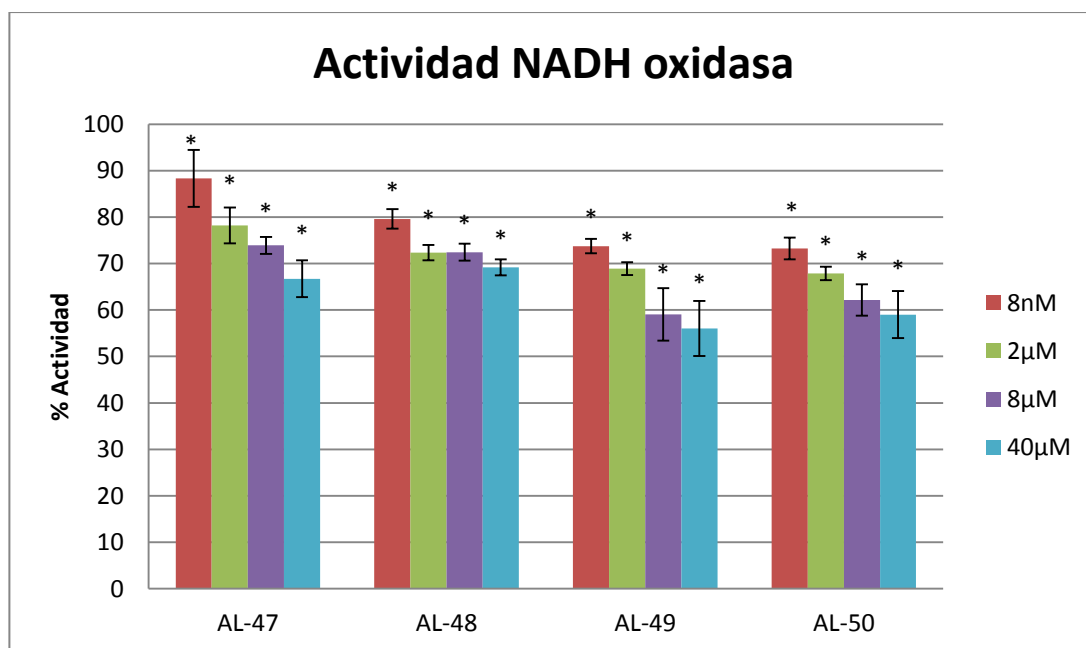


Figura 19. Efecto de AL-47, AI-48, AL-49 y AL-50 sobre la actividad enzimática de NADH oxidasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de dos experimentos independientes. El 100% corresponde a $20,917 \pm 6,498 \text{ nmol O} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

* Significativamente con respecto al control ($p \leq 0,05$).

4.1.2 NADH deshidrogenasa

Al igual que en la NADH oxidasa, se observa una disminución de la actividad de la enzima para todos los compuestos (entre 15 y 25%), pero a diferencia del caso anterior, no hay diferencias significativas para todos los compuestos en todas sus concentraciones. El compuesto AL-47, a pesar de que genera una disminución del 15% en la actividad de la enzima, no presenta diferencias significativas con respecto al control en ninguna de las concentraciones. AL-48, generó una disminución de la actividad enzimática con diferencias significativas en tres de las cuatro concentraciones (8nM, 8μM y 40μM). AL-49, presentó actividad inhibitoria con diferencias significativas en las cuatro concentraciones. AL-50, presentó diferencias significativas sólo para tres de las cuatro concentraciones (8nM, 2μM y 40μM). A diferencia de lo que se observó para la NADH oxidasa, ninguno de los compuestos presentó un comportamiento dosis dependiente para la NADH deshidrogenasa.

Teniendo en cuenta que los compuestos presentaron capacidad de inhibir la NADH oxidasa en todas sus concentraciones, y que presentaron inhibición sobre la NADH deshidrogenasa del 15 al 25%, se puede inferir que los diferentes compuestos tienen actividad inhibitoria sobre el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. Por lo anterior, no fue necesario realizar el ensayo para determinar la actividad de la NADH citocromo c reductasa, que evalúa el paso de electrones desde el complejo I hacia el complejo III (citocromo c reductasa).

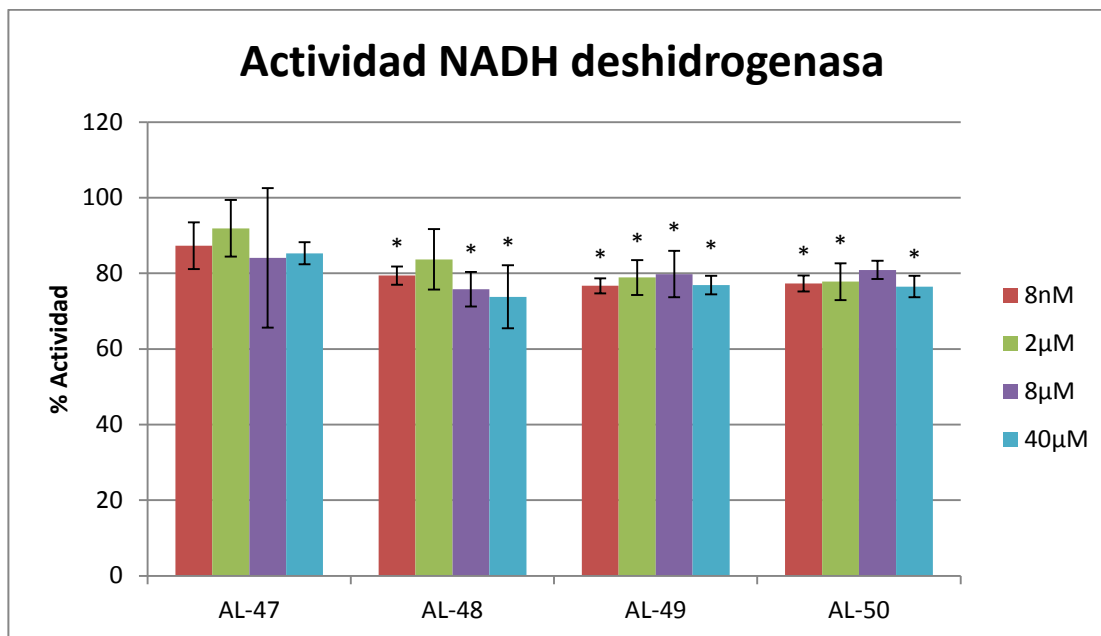


Figura 20. Efecto de AL-47, AL-48, AL-49 y AL-50 sobre la actividad enzimática de NADH deshidrogenasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de dos experimentos independientes. El 100% corresponde a $0,7 \pm 0,214$ nmol de ferricianuro reducido. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

* Significativamente con respecto al control ($p \leq 0,05$).

4.1.3 Actividad Succinato oxidasa

Se observa una disminución de la actividad enzimática para todos los compuestos en todas las concentraciones, pero AL-48 no presentó diferencias significativas con respecto al control en ninguna de las concentraciones. AL-47 presentó una disminución en la actividad del 20% aproximadamente, con diferencias significativas en tres de las cuatro concentraciones (8nM, 2µM y 40µM). AL-49 mostró inhibición del 20 al 40%, con diferencias significativas en tres de las cuatro concentraciones (8nM, 2µM y 40µM); no se evidencia un comportamiento dosis dependiente. El compuesto AL-50 presentó inhibiciones aproximadas del 20%, sólo con diferencia significativa con respecto al control, para la mayor concentración.

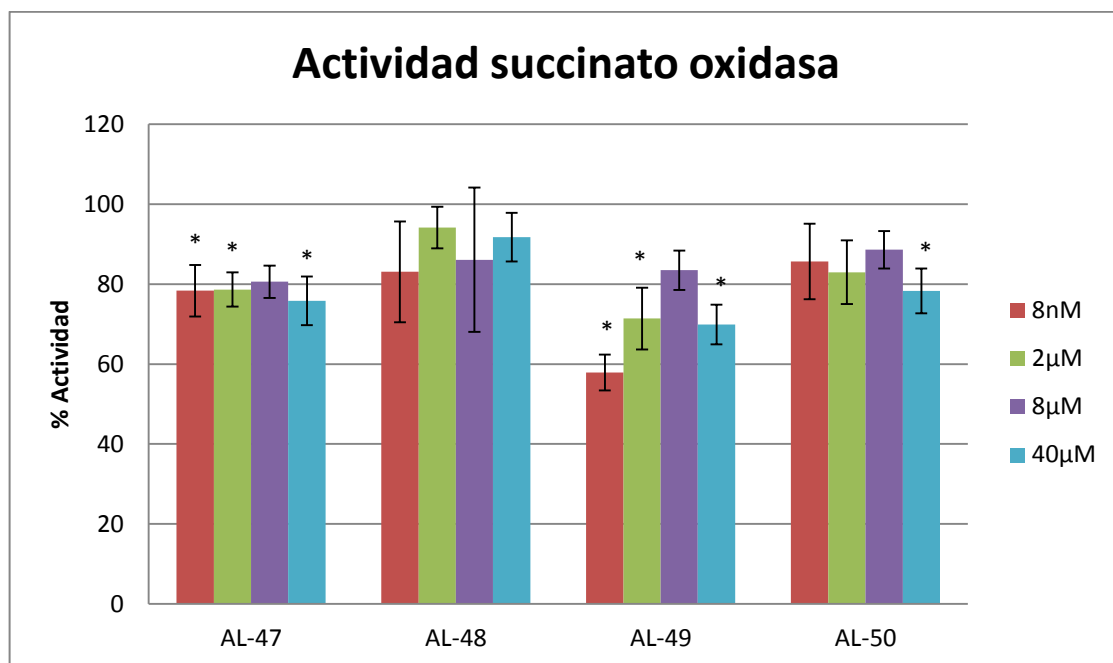


Figura 21. Efecto de AL-47, AL-48, AL-49 y AL-50 sobre la actividad enzimática de succinato oxidasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de dos experimentos independientes. El 100% corresponde a $20,749 \pm 6,444 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

* Significativamente con respecto al control ($p \leq 0,05$).

4.1.4 Succinato deshidrogenasa

Para esta enzima, los compuestos mostraron un efecto activador con valores de porcentajes de actividad que van desde 150 a 250%, es decir se observa activación del 50 al 150% sobre la enzima. El primer compuesto AL-47, muestra un comportamiento dosis dependiente, y presenta diferencias significativas solo en la mayor concentración con un efecto activador del 150%. AL-48 también presenta un comportamiento dosis dependiente, sin embargo, el efecto activador se mantiene alrededor del 100% para las tres primeras concentraciones (8nM, 2µM y 8µM); solo las dos concentraciones más altas presentaron diferencias significativas con respecto al control. A diferencia de los dos compuestos anteriores, AL-49 no mostró un comportamiento dosis dependiente, en las dos

concentraciones más bajas se presentó un porcentaje de activación de 225% aproximadamente y para las dos concentraciones más altas un porcentaje de activación de 175% aproximadamente; las primeras tres concentraciones presentaron diferencias significativas con respecto al control (8nM, 2μM y 8μM). El compuesto AL-50, tampoco presentó comportamiento dosis dependiente; se observaron diferencias significativas con respecto al control, en las tres concentraciones más altas del compuesto, con un porcentaje de activación alrededor de 150% para estas tres concentraciones.

Los resultados obtenidos para la succinato deshidrogenasa contrastan con los obtenidos para la succinato oxidasa. Los resultados revelan una activación muy marcada (del 50 al 150%) en la primera fase del complejo II, donde los electrones pasan del succinato al FAD, y una inhibición en el paso de los electrones del succinato hacia el oxígeno. Lo anterior indica que existe un bloqueo en algún punto entre el complejo II y el complejo IV. Esto implicaría una reducción en el paso de electrones por los diferentes complejos de la cadena respiratoria, de esta forma, disminuiría el bombeo de protones al espacio intermembrana y en consecuencia una reducción en el potencial de membrana. Todo esto se traduce en la disminución en la síntesis de ATP, lo que implica que la mitocondria deje de producir la energía necesaria para la mayoría de procesos que se llevan a cabo en la célula.

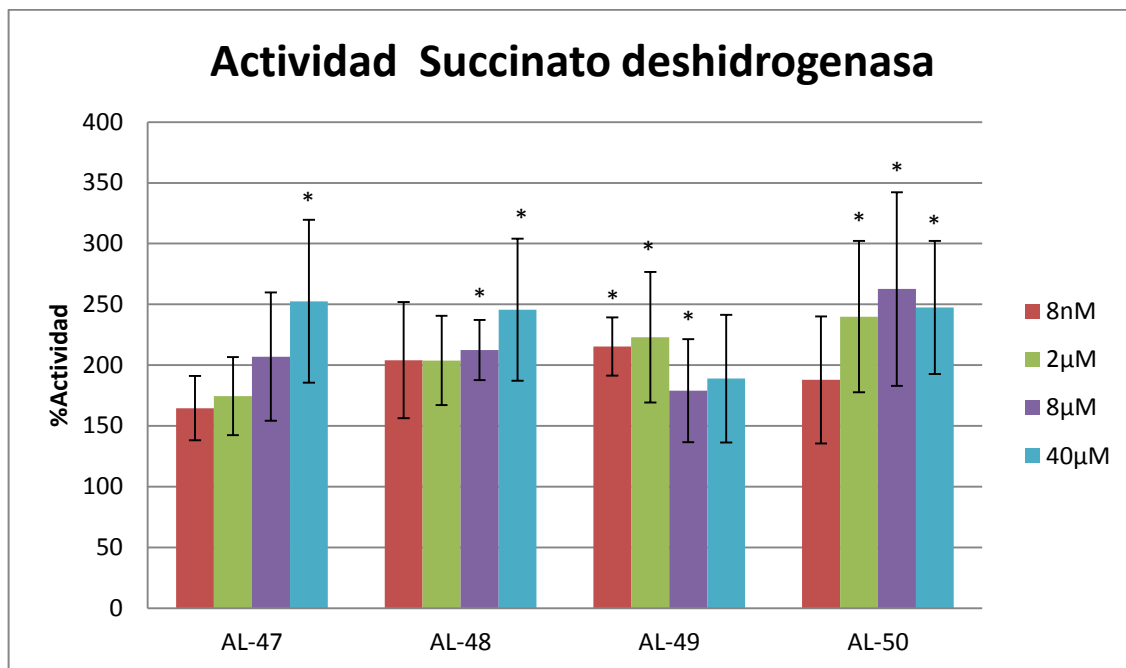


Figura 22. Efecto de AL-47, AI-48, AL-49 y AL-50 sobre la actividad enzimática de succinato deshidrogenasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. El 100% corresponde a $0,827 \pm 0,435 \mu\text{mol O} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

* Significativamente con respecto al control ($p \leq 0,05$).

4.1.5 Succinato citocromo c reductasa

En este ensayo se determinó la actividad de la enzima citocromo c reductasa (Complejo III), cuando los electrones provienen solo de la succinato deshidrogenasa (Complejo II); es decir se evaluó el paso de electrones desde el complejo II al complejo III.

Como se observa en la **Figura 23**, aunque todos los compuestos aumentaron la actividad de la enzima con respecto al control, solo se presentaron diferencias significativas para las dos concentraciones más altas en el compuesto AL-47 y para la concentración 2µM en el compuesto AL-48, ya que los porcentajes de activación para estos ensayos fueron del 100% aproximadamente con respecto al control. Teniendo en cuenta lo anterior, y que la mayoría de los compuestos en

todas sus concentraciones, presentaron un porcentaje de activación alrededor del 50% con respecto al control, se infiere que los compuestos no presentaron un efecto significativo sobre esta enzima.

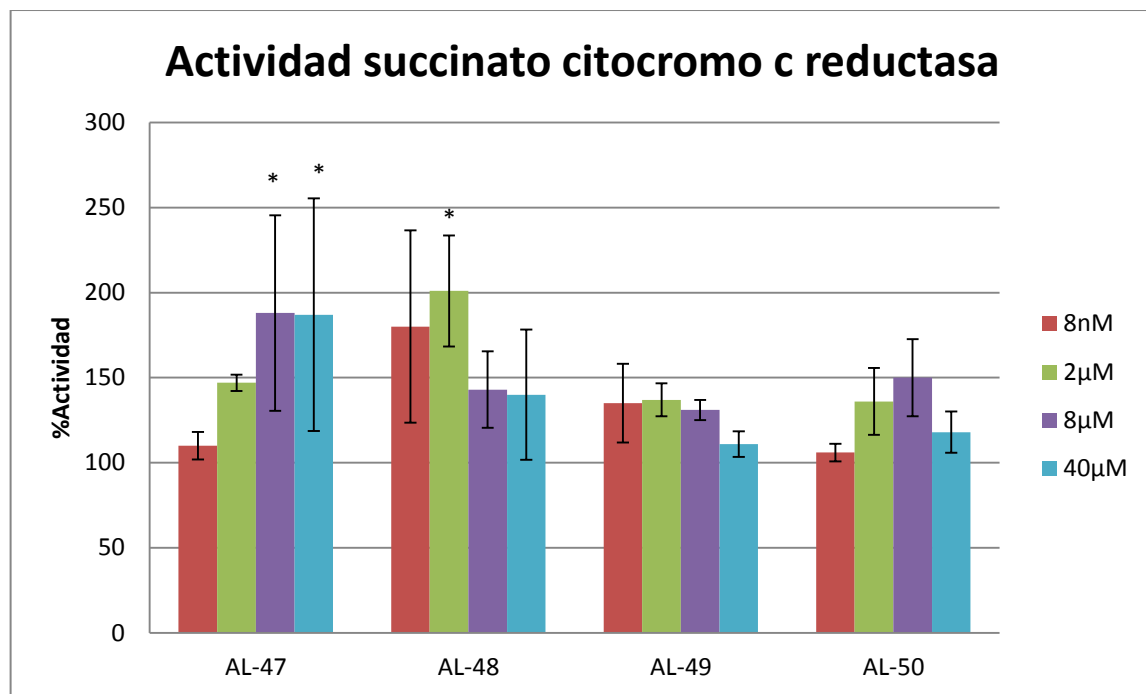


Figura 23. Efecto de AL-47, AL-48, AL-49 y AL-50 sobre la actividad enzimática de succinato citocromo c reductasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de dos experimentos independientes. El 100% corresponde a $3,621 \pm 1,479$ $\mu\text{mol citocromo c reducido} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

* Significativamente con respecto al control ($p \leq 0,05$)

4.1.6 Citocromo c oxidasa

Los compuestos presentaron un efecto activador sobre la citocromo c oxidasa, como se muestra en la **Figura 24**, con porcentajes de activación que van desde 50 a 200% para todos los compuestos en todas las concentraciones ensayadas. Solo el compuesto AL-48 presentó un comportamiento dosis dependiente con diferencias significativas para las tres concentraciones más altas (2µM, 8µM y 40µM). AL-47 solo presentó diferencias significativas para las dos concentraciones

más altas y el porcentaje de activación más alto fue de 50% que se observó para la concentración de 8 μ M. AL-49 presentó diferencias significativas en todas las concentraciones y se observó el mayor porcentaje de activación de todos los compuestos (100% aproximadamente). El compuesto AL-50 muestra un porcentaje de activación de 80% aproximadamente en la concentración más baja, y va disminuyendo su efecto activador conforme aumenta la concentración; solo se encontraron diferencias significativas con respecto al control para las tres concentraciones más bajas.

Los compuestos AL-48 y AL-49 presentaron los mayores efectos activadores sobre la enzima. AL-48 presenta un efecto activador del 75 al 80% y un comportamiento dosis dependiente similar al comportamiento del AL-49. Estructuralmente, estos compuestos se pueden diferenciar, teniendo en cuenta que son análogos estructurales, AL-48 contiene un fragmento piperidínico y un grupo OCH₂O en su estructura, mientras que AL-49 contiene un fragmento pirrolidínico y dos grupos metoxi. Por lo tanto, no es posible relacionar la actividad observada con las variaciones en sus estructuras.

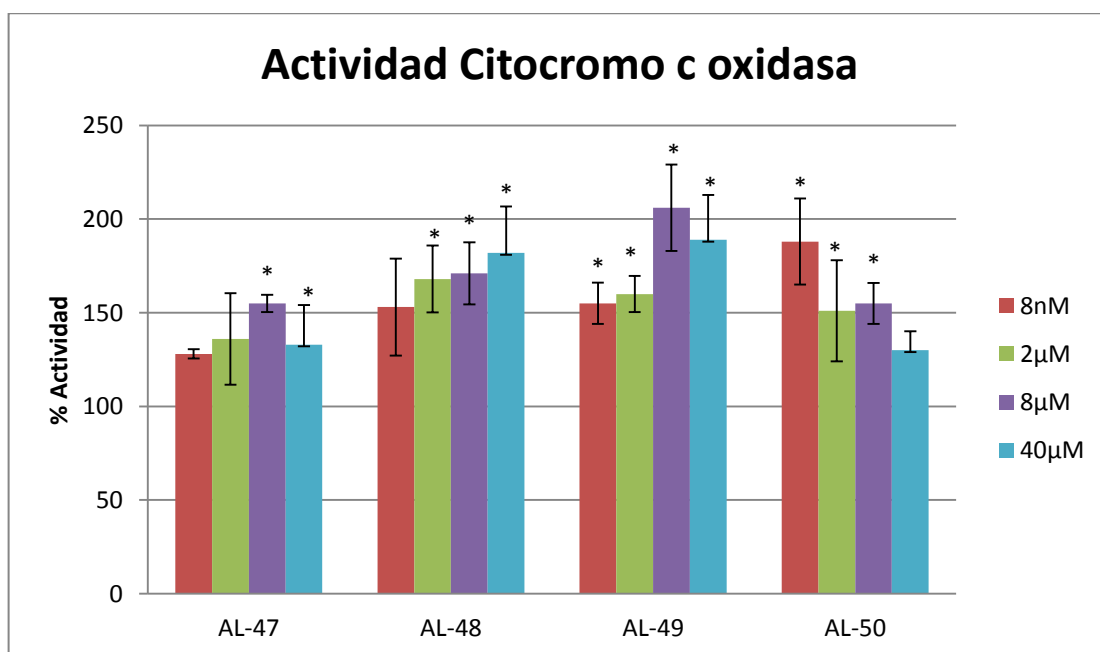


Figura 24. Efecto de AL-47, AL-48, AL-49 y AL-50 sobre la actividad enzimática de citocromo c oxidasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de dos experimentos independientes. El 100% corresponde a $2,716 \pm 0,286 \mu\text{mol}$ citocromo c oxidado. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

* Significativamente con respecto al control ($p \leq 0,05$).

4.2 DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos para el efecto de los α -aminonitrilos sobre la actividad de la NADH deshidrogenasa y sobre la NADH oxidasa, podemos asegurar que estos compuestos tienen un efecto inhibitor sobre el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. De esta manera, se explica la disminución de la velocidad de reducción del oxígeno a agua cuando se usa el NADH como sustrato, ya que los compuestos estarían bloqueando el paso de electrones del NADH hacia la ubiquinona.

Se observa que los compuestos AL-49 y AL-50, presentaron la mayor inhibición para la concentración más baja (8nM), tanto en la NADH oxidasa como en la NADH deshidrogenasa. Posiblemente, esto esté relacionado con la presencia del fragmento pirrolidínico en su estructura, ya que estos compuestos presentaron mayor efecto inhibitor que los compuestos que contienen el fragmento piperidínico en su estructura, AL-47 y AL-50. Este mayor efecto inhibitor de los compuestos con este fragmento, puede estar relacionado con una mayor afinidad al sitio de unión de la ubiquinona, implicando un mecanismo de inhibición competitivo sobre la enzima. Esto teniendo en cuenta que un amplio número de inhibidores conocidos del complejo I de la cadena respiratoria, son compuestos aminados secundarios o sistemas N-heterocíclicos que están relacionados con la inhibición competitiva de la reducción de la ubiquinona (también conocidos como tipo I) (Ishaaya, Nauen, and Horowitz 2007).

De acuerdo a los resultados obtenidos del efecto de los α -aminonitrilos sobre el complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial, se observó aumento de la actividad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, con todos los compuestos analizados. Los compuestos AL-48 y AL-50 presentaron mayor efecto activador, con porcentajes de activación del 100 al 150% aproximadamente. Estos compuestos están relacionados estructuralmente por la presencia del grupo dimetoxi, el cual podría estar relacionado con un mayor efecto activador de la enzima.

En contraste con los resultados obtenidos para el complejo I, en el complejo II, se observa un efecto activante sobre la succinato deshidrogenasa, cuyo ensayo evalúa el paso de electrones desde el succinato hacia el FAD, pero un efecto inhibitorio de la succinato oxidasa, donde se evalúa el paso de los electrones del succinato hasta el oxígeno. Lo anterior indica que los compuestos están generando una activación de la primera parte del complejo II, pero al mismo tiempo un bloqueo en algún punto del transporte de electrones desde el complejo II hacia el oxígeno, en el complejo IV.

Analizando el efecto de los compuestos sobre el paso de electrones del succinato al citocromo c (succinato citocromo c reductasa), se puede observar un aumento en la actividad de esta enzima, con diferencias significativas con respecto al control, sólo para los compuestos AL-47 (sólo en las dos concentraciones más altas) y AL-48 (sólo en 2 μ M). Los compuestos AL-49 y AL-50 no mostraron un porcentaje de activación mayor del 50% y tampoco diferencias significativas con respecto al control. Se podría sugerir que los compuestos no generan un efecto significativo sobre el complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial.

Teniendo en cuenta que los compuestos generaron un aumento en la actividad de la succinato deshidrogenasa del 100 al 150%, y que al evaluar el paso de electrones de esta enzima hasta la citocromo c oxidoreductasa, no se observa un aumento significativo en el flujo de electrones; es probable que esté ocurriendo

una pérdida de electrones en este paso. La ubiquinona está involucrada en pérdida de electrones en la cadena respiratoria; ésta, en presencia de compuestos que eviten su reducción completa a ubiquinol, forma la ubisemiquinona que a su vez genera los radicales superóxido $O_2^{\cdot-}$. Es probable que esté ocurriendo una pérdida de electrones mediada por la ubiquinona, desviando los electrones hacia el oxígeno formando especies reactivas de oxígeno EROS. Esto explicaría por qué aunque los compuestos aumentan el paso de electrones desde el succinato hacia el FAD (primera parte del complejo II, succinato deshidrogenasa), disminuyen su paso hasta el oxígeno molecular en el complejo IV, que se representa como una inhibición en la succinato oxidasa.

El ensayo de actividad enzimática de la citocromo c oxidasa (complejo IV), reveló que los compuestos generan un efecto activador sobre esta enzima; siendo AL-49 el compuesto que presenta mayor porcentaje de activación (del 50 al 100%), con diferencias significativas en todas las concentraciones. AL-50, presentó el mayor efecto activador con la menor concentración (80% de activación con 8nM); es posible que este efecto, al igual que en la inhibición del complejo I, esté relacionado con la presencia del fragmento pirrolidínico en estos dos compuestos, lo que los hace más básicos que los otros dos análogos. Sin embargo, este estudio no tiene la capacidad para revelarnos de qué manera la presencia del fragmento pirrolidínico está generando un mayor efecto inhibitorio (para el complejo I) y activador (para el complejo IV).

5. CONCLUSIONES

Los α -aminonitrilos análogos a la girgensohnina, presentan efecto sobre los diferentes complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, de mitocondrias aisladas de larvas de mosquitos *A. aegypti*.

Los compuestos AL-47, AL-48, AL-49 y AL-50, presentaron efecto inhibitor sobre el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, con porcentajes de inhibición que van desde el 15 al 40% para la NADH oxidasa y del 15 al 25% para la NADH deshidrogenasa.

Los compuestos AL-49 y AL-50 presentaron mayor efecto inhibitor sobre el complejo I de la cadena respiratoria, sugiriendo que la presencia del fragmento pirrolidínico en la estructura genera mayor inhibición en comparación con el fragmento piperidínico presente en las estructuras de los compuestos AL-47 y AL-48.

Se observa un efecto activador de los α -aminonitrilos sobre la succinato deshidrogenasa y la citocromo c oxidasa, con porcentajes máximos de activación de 150 y 100% respectivamente.

Los α -aminonitrilos evaluados, provocaron una disminución en el consumo de oxígeno cuando el aporte de electrones se lleva a cabo por el complejo II; esta actividad inhibitoria puede estar mediada por la pérdida de electrones en el paso del complejo II al complejo III. La ubiquinona podría estar implicada en esta pérdida de electrones, favoreciendo la producción de especies reactivas de oxígeno.

6. RECOMENDACIONES

Profundizar en el estudio del mecanismo de acción de los α -aminonitrilos análogos a la girgensohnina, sobre los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, con el fin de elucidar los sitios específicos involucrados en el efecto (inhibidor y/o activador) que presentaron los compuestos sobre los diferentes complejos.

Evaluar el efecto de los compuestos sobre el consumo de oxígeno en mitocondrias íntegras, para observar si además de afectar individualmente los complejos enzimáticos, también presentan un efecto sobre la cadena respiratoria en presencia de un potencial de membrana.

Estudiar el efecto de los α -aminonitrilos análogos a la girgensohnina, sobre la cadena mitocondrial de mitocondrias aisladas de mamíferos, y comparar los efectos con los obtenidos para larvas de mosquito.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abrahams, Jean, Andrew Leslie, René Lutter, and Jhon Walker. 1994. "Structure at 2.8 Å Resolution of F1-ATPase from Bovine Heart Mitochondria." *Nature* 370(6491): 621–28.
- Antontni, Giovanni, Francesco Malatesta, Paolo Sarti, and Michael T Wilson. 1987. "Cytochrome c Oxydase." *European Journal of Biochemistry* 169: 1–8.
- Atamna, Hani, and Raj Kumar. 2010. "Protective Role of Methylene Blue in Alzheimer's Disease via Mitochondria and Cytochrome c Oxidase." *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 20 (January): 439–52. doi:10.3233/JAD-2010-100414.
- Avenot, Hervé F., and Themis J. Michailides. 2010. "Progress in Understanding Molecular Mechanisms and Evolution of Resistance to Succinate Dehydrogenase Inhibiting (SDHI) Fungicides in Phytopathogenic Fungi." *Crop Protection* 29 (7). Elsevier Ltd: 643–51. doi:10.1016/j.cropro.2010.02.019.
- Bäcktröm, DAN, BIRGITTA Norling, ANDERS Ehrenberg, and LARS Ernster. 1970. "Electron Spin Resonance Measurement on Ubiquinone-Depleted and Ubiquinone-Replenished Submitochondrial Particles Submitochondrial." *Biochimica et Biophysica Acta* 197: 108–11.
- Balsa, Eduardo, Ricardo Marco, Ester Perales-Clemente, Radek Szklarczyk, Enrique Calvo, Manuel O Landázuri, and José Antonio Enríquez. 2012. "NDUFA4 Is a Subunit of Complex IV of the Mammalian Electron Transport Chain." *Cell Metabolism* 16 (3): 378–86. doi:10.1016/j.cmet.2012.07.015.
- Bielefeldt-Ohmann, H. 1998. "Analysis of Antibody-Independent Binding of Dengue Viruses and Dengue Virus Envelope Protein to Human Myelomonocytic Cells

and B Lymphocytes.” *Virus Research* 57 (1): 63–79.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9833887>.

Bobadilla, Miguel, Manuel Sisniegas, and Gina Zavaleta. 2005. "Evaluación larvícida de suspensiones acuosas de *Annona muricata* Linnaeus « Guanábana » Sobre *Aedes Aegypti* Linnaeus (Diptera , Culicidae)" *Revista Peruana de Biología* 12 (1): 145–52.

Bradford, M M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry* 72: 248–54.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>.

Cadenas, Enrique, and Kelvin J A Davies. 2000. "MITOCHONDRIAL FREE RADICAL GENERATION, OXIDATIVE STRESS, AND AGING." *Free Radical Biology & Medicine* 29: 222–30.

"Captación de Energía." 2006. *ATP-Sintasa de E. Coli*.
<http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/images/10atpasa.JPG>.

Carreño, Aurora L, Leonor Y Vargas, Jonny E Duque, and Vladimir V Kouznetsov. 2014. "Design, Synthesis, Acetylcholinesterase Inhibition and Larvicidal Activity of Girgensohnine Analogs on *Aedes Aegypti*, Vector of Dengue Fever." *European Journal of Medicinal Chemistry* 78 (2014). Elsevier Masson SAS: 392–400. doi:10.1016/j.ejmech.2014.03.067.

Casida, John E. 1980. "Pyrethrum Flowers and Pyrethroid Insecticides." *Environmental Health Perspectives* 34 (February): 189–202.

Cecchini, Gary, and Imke Schro. 2002. "Succinate Dehydrogenase and Fumarate Reductase from *Escherichia Coli*." *Biochimica et Biophysica Acta* 1553 (1553): 140–57.

- Chen, Qun, Edwin J Vazquez, Shadi Moghaddas, Charles L Hoppel, and Edward J Lesnefsky. 2003. "Production of Reactive Oxygen Species by Mitochondria: Central Role of Complex III." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (38): 36027–31. doi:10.1074/jbc.M304854200.
- Ciccia, G, J Coussio, and E Mongelli. 2000. "Insecticidal Activity against *Aedes Aegypti* Larvae of Some Medicinal South American Plants." *Journal of Ethnopharmacology* 72 (1-2): 185–89. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10967471>.
- Coats, Joel. 1994. "RISKS FROM NATURAL VERSUS SYNTHETIC." *Annual Review of Entomology* 39: 489–515.
- Cooper, Chris E, and Guy C Brown. 2008. "The Inhibition of Mitochondrial Cytochrome Oxidase by the Gases Carbon Monoxide, Nitric Oxide, Hydrogen Cyanide and Hydrogen Sulfide: Chemical Mechanism and Physiological Significance." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 40 (5): 533–39. doi:10.1007/s10863-008-9166-6.
- Copeland, Claudia. 2012. *Pesticide Use and Water Quality: Are the Laws Complementary or in Conflict ?*
- Da Silva-Alves, Diana C B, Janaína V dos Anjos, Nery N M Cavalcante, Geanne K N Santos, Daniela M Do a F Navarro, and Rajendra M Srivastava. 2013. "Larvicidal Isoxazoles: Synthesis and Their Effective Susceptibility towards *Aedes Aegypti* Larvae." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21 (4). Elsevier Ltd: 940–47. doi:10.1016/j.bmc.2012.12.006.
- Davies, Karen M, Claudio Anselmi, Ilka Wittig, José D Faraldo-gómez, and Werner Kühlbrandt. 2012. "Structure of the Yeast F₁F₀-ATP Synthase Dimer and Its Role in Shaping the Mitochondrial Cristae." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(34): 13602–7.

doi:10.1073/pnas.1204593109/-
/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1204593109.

- Davis, K, and Y Hatefi. 1970. "Succinate Dehydrogenase. I. Purification, Molecular Properties, and Substructure." *Biochemistry* 10 (13): 2509–16.
- Dmitriev, O Y, P C Jones, and R H Fillingame. 1999. "Structure of the Subunit c Oligomer in the F1Fo ATP Synthase: Model Derived from Solution Structure of the Monomer and Cross-Linking in the Native Enzyme." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (14): 7785–90.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=22139&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- DRÖGUE, Wulf. 2002. "Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function." *Physiol Rev* 82: 47–95.
- Elliott, By M, and N F Janes. 1974. "Synthetic Pyrethroids - A New Class of Insecticide" *Chemical Society Reviews* 2 (2): 473–505.
- Elston, Dirk M. 2004. "Prevention of Arthropod-Related Disease." *Journal of the American Academy of Dermatology* 51 (6): 947–54.
doi:10.1016/j.jaad.2004.06.011.
- Emelyanov, Victor V. 2003. "Mitochondrial Connection to the Origin of the Eukaryotic Cell." *European Journal of Biochemistry* 270 (8): 1599–1618.
doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03499.x.
- Erlanger, T E, J Keiser, and J Utzinger. 2008. "Effect of Dengue Vector Control Interventions on Entomological Parameters in Developing Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Medical and Veterinary Entomology* 22 (3): 203–21. doi:10.1111/j.1365-2915.2008.00740.x.

- Ernster, L, and G Schatz. 1981. "Mitochondria: A Historical Review." *The Journal of Cell Biology* 91 (3Pt2): 227s–255s. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2112799&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Fukuto, T R. 1990. "Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides." *Environmental Health Perspectives* 87 (July): 245–54. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1567830&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Gao, Xiugong, Xiaoling Wen, Lothar Esser, Byron Quinn, Linda Yu, Chang-An Yu, and Di Xia. 2003. "Structural Basis for the Quinone Reduction in the bc1 Complex: A Comparative Analysis of Crystal Structures of Mitochondrial Cytochrome bc1 with Bound Substrate and Inhibitors at the Qi Site." *Biochemistry* 42 (30): 9067–80. doi:10.1021/bi0341814.
- Garcez, Walmir S, Fernanda R Garcez, Lilliam M G E da Silva, and Lidilhone Hamerski. 2009. "Larvicidal Activity against *Aedes Aegypti* of Some Plants Native to the West-Central Region of Brazil." *Bioresource Technology* 100 (24). Elsevier Ltd: 6647–50. doi:10.1016/j.biortech.2009.06.092.
- García, José, and Edgar Morales. 2008. "Regulation of the F1F0-ATP Synthase Rotary Nanomotor in Its Monomeric-Bacterial and Dimeric-Mitochondrial Forms." *Journal of Biological Physics* 34 (1-2): 197–212. doi:10.1007/s10867-008-9114-z.
- Guizzetti, Marina, Shantha Pathak, Gennaro Giordano, and Lucio G Costa. 2005. "Effect of Organophosphorus Insecticides and Their Metabolites on Astroglial Cell Proliferation." *Toxicology* 215 (3): 182–90. doi:10.1016/j.tox.2005.07.004.

- Halstead, Scott B. 1974. "ETIOLOGIES OF THE EXPERIMENTAL OF SILER AND SIMMONS." *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 23 (5): 974–82.
- Hassinen, Ilmo E. 2014. "Mitochondria and Energy Metabolism: Networks, Mechanisms, and Control." In *Natural Biomarkers for Cellular Metabolism*, 1–33. CRC Press.
- Hirai, Keisuke, Gjurmakch Aliev, Akihiko Nunomura, Hisashi Fujioka, Robert L Russell, Craig S Atwood, Anne B Johnson, et al. 1991. "Mitochondrial Abnormalities in Alzheimer ' S Disease." *The Journal of Neuroscience* 21 (9): 3017–23.
- Ishaaya, Isaac, Ralf Nauen, and A Rami Horowitz. 2007. "Mitochondrial Electron Transport Complexes as Biochemical Target Sites for Insecticides and Acaricides." In *Insecticides Design Using Advanced Technologies*, 197–212.
- Iwata, S. 1998. "Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome bc₁ Complex." *Science* 281 (5373): 64–71. doi:10.1126/science.281.5373.64.
- Kim, Man Suk, and Young Jae Kim. 2004. "Enzymatic Properties of the Membrane-Bound NADH Oxidase System in the Aerobic Respiratory Chain of *Bacillus Cereus*." *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 37 (6): 753–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15607037>.
- Kim, Moo-Key, Young-Su Jang, Young-Joon Ahn, Dong-Kyu Lee, and Hoi-Seon Lee. 2002. "Larvicidal Activity of Australian and Mexican Plant Extracts Against *Aedes Aegypti* and *Culex Pipiens Pallens* (Diptera: Culicidae)." *Journal of Asia-Pacific Entomology* 5 (2). Korean Society of Applied Entomology, Taiwan Entomological Society and Malaysian Plant Protection Society: 227–31. doi:10.1016/S1226-8615(08)60157-0.

- Kittayapong, Pattamaporn. 2000. "Control of Dengue Vectors: Tools and Strategies", October 2006: 1–5.
- Knio, K M, J Usta, S Dagher, H Zournajian, and S Kreydiyyeh. 2008. "Larvicidal Activity of Essential Oils Extracted from Commonly Used Herbs in Lebanon against the Seaside Mosquito, *Ochlerotatus Caspius*." *Bioresource Technology* 99 (4): 763–68. doi:10.1016/j.biortech.2007.01.026.
- Kouznetsov, Vladimir V, and Diego R Arenas. 2013. "Rational Design of New Molecules of Biological Significance from Phenolic Plants as Renewable Materials." In *Chemistry and Pharmacology of Naturally Occurring Bioactive Compounds*, 141–65.
- Krauss, Stefan. 2001. "Mitochondria: Structure and Role in Respiration." *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–6. www.els.net.
- Lehninger, Albert, David Nelson, and Michael Cox. 2008. *Lehninger, Principles of Biochemistry*. Edited by Michael Nelson, David ; Cox. fifth. New York: W.H. FREEMAN AND COMPANY.
- Liochev, Stefan I, and Irwin Fridovich. 1999. "Critical Review Superoxide and Iron : Partners in Crime." *IUBMB Life* 48: 157–61.
- Loschen, G, L Flohé, and B Chance. 1971. "RESPIRATORY CHAIN LINKED H₂O₂ PRODUCTION IN PIGEON HEART MITOCHONDRIA." *FFBS LETTERS* 18 (2): 261–64.
- Mason, Thomas L, Robert O Poyton, C Wharton, and Gottfried Schatz. 1973. "ARTICLE : Cytochrome c Oxidase from Bakers ' Yeast : I . ISOLATION AND PROPERTIES c Oxidase from Bakers ' Yeast." *The Journal of Biological Chemistry* 248(4): 1346–54.

- Matasyoh, Josphat C, Euty M Wathuta, Samuel T Kariuki, and Regina Chepkorir. 2011. "Journal of Asia-Pacific Entomology Chemical Composition and Larvicidal Activity of Piper Capense Essential Oil against the Malaria Vector , Anopheles Gambiae." *Journal of Asia-Pacific Entomology* 14 (1). Korean Society of Applied Entomology, Taiwan Entomological Society and Malaysian Plant Protection Society. 26–28. doi:10.1016/j.aspen.2010.11.005.
- Mitchell, Peter. 1975. "THE PROTONMOTIVE Q CYCLE: A GENERAL FORMULATION." *FEBS Letters* 59 (2): 137–39.
- Murphy, Michael P, Matthew Krueger, Sergey Sablin, Rona R Ramsay, and Thomas P Singer. 1995. "Inhibition of Complex I by Hydrophobic Analogues of N-Methyl-4- Phenylpyridinium (MPP +) and the Use of an Ion-Selective Electrode to Measure Their Accumulation by Mitochondria and Electron-Transport Particles." *Biochem. J* 365: 359–65.
- Park, Il-Kwon, Sang-Gil Lee, Sang-Chul Shin, Ji-Doo Park, and Young-Joon Ahn. 2002. "Larvicidal Activity of Isobutylamides Identified in Piper Nigrum Fruits against Three Mosquito Species." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (7): 1866–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11902925>.
- Passarella, Salvatore, Anna Atlante, Daniela Valenti, and Lidia de Bari. 2003. "The Role of Mitochondrial Transport in Energy Metabolism." *Mitochondrion* 2 (5): 319–43. doi:10.1016/S1567-7249(03)00008-4.
- Rattan, Rameshwar Singh. 2010. "Mechanism of Action of Insecticidal Secondary Metabolites of Plant Origin." *Crop Protection* 29 (9). Elsevier Ltd: 913–20. doi:10.1016/j.cropro.2010.05.008.
- Rose, R I. 2001. "Pesticides and Public Health: Integrated Methods of Mosquito Management." *Emerging Infectious Diseases* 7 (1): 17–23. doi:10.3201/eid0701.700017.

- Rothman, Alan L, and Francis A Ennis. 1999. "MINIREVIEW Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever." *Virology* 257: 1–6.
- Saldanha, Carlota, and J Mrtins e Silva. 1991. *ACTAS DE BIOQUÍMICA, TEMAS E SESSOES INTERNAS*.
- Schierow, Linda-jo, and Robert Esworthy. 2012. *Pesticide Law : A Summary of the Statutes. CRS (Congressional Research Service) Report*.
- Shaan, Essam Abdel-Salam, Deon Canyon, Mohamed Wagdy Faried Younes, Hoda Abdel-Wahab, and Abdel-Hamid Mansour. 2005. "A Review of Botanical Phytochemicals with Mosquitocidal Potential." *Environment International* 31 (8): 1149–66. doi:10.1016/j.envint.2005.03.003.
- Sigma-Aldrich. 2014a. "2-Thenoyltrifluoroactone." <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/88302?lang=en®ion=CO#>.
- Sigma-Aldrich. 2014b. "Methylene Blue." *Methylene Blue*. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/m9140?lang=en®ion=CO#>.
- Sims, Neil R, and Hakan Muyderman. 2010. "Mitochondria, Oxidative Metabolism and Cell Death in Stroke." *Biochimica et Biophysica Acta* 1802 (1). Elsevier B.V. 80–91. doi:10.1016/j.bbadis.2009.09.003.
- Singer, Thomas P. 1974. "Determination of the Activity of Succinate. NADH. Choline. and a-Glycerophosphate Dehydrogenases." *Methods of Biochemical Analysis* 22: 123–75.
- Smith, Allan E, and Diane M Secoy. 1975. "Forerunners of Pesticides in Classical Greece and Rome." *J. Agric. Food Chem* 23 (6): 1050–55.

- Smith, Allan E, and Diane M Secoy. 1976. "A Compendium of Inorganic Substances Used in European Pest Control before 1850." *J. Agric. Food Chem* 24 (6): 1180–85.
- Somlo, Marie. 1965. "INDUCTION DES LACTICO-CYTOCHROME c REDUCTASES (D- ET L-) DE LA LEVURE AEROBIE PAR LES LACTATES (D- ET T-)." *Biochimica et Biophysica Acta* 4: 183–201.
- Sukhorukov, a. P. 2007. "Notes on the Taxonomy of Girgensohnia (Chenopodiaceae / Amaranthaceae)." *Edinburgh Journal of Botany* 64 (03): 317–30. doi:10.1017/S0960428607004751.
- Tennyson, Samuel, K. John Ravindran, and S. Arivoli. 2012. "Bioefficacy of Botanical Insecticides against the Dengue and Chikungunya Vector Aedes Aegypti (L.) (Diptera: Culicidae)." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2 (3). Asian Pacific Tropical Biomedical Magazine: S1842–S1844. doi:10.1016/S2221-1691(12)60505-X.
- Turrens, Julio F. 2003. "Mitochondrial Formation of Reactive Oxygen Species." *The Journal of Physiology* 552 (2) (October): 335–44. doi:10.1113/jphysiol.2003.049478.
- Turrens, Julio F, Adolf Alexandre, and Albert L Lehninger. 1985. "Ubisemiquinone Is the Electron Donor for Superoxide by Complex III of Heart Mitochondria ' Formation." *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS* 237 (2): 408–14.
- Vázquez, A., L. Pérez, and R. Díaz. 2009. "BIOMOLECULES WITH INSECTICIDAL ACTIVITY: AN ALTERNATIVE TO IMPROVE THE FOOD SAFETY." *Ciencia Y Tecnología Alimentaria* 5 (4): 306–13.

- Vergara, Fernando. 2010. "Ilustrared." *Mitocondria*.
<http://www.ilustrared.cl/v3/index.php/img/index/400/400/1?link=galerias/00193/01071/8285.jpg>.
- Wikstrom, Marten, and Klaas Krab. 1979. "Proton-Pumping Cytochrome c Oxidase." *Biochimica et Biophysica Acta* 549(2): 177–122.
- World Health Organization. 1992. *Vector Resistance to Pesticides: Fifteenth Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control*.
- World Health Organization. 2009. "Epidemiology, Burden of Disease and Transmission." In *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*, 2009th ed., 3–17.
- World Health Organization. 2012. *GLOBAL ESTRATEGY FOR DENGUE PREVENTION AND CONTROL 2012-2020*. *WHO Library Cataloguing in Publication Data*.
- Xiong, Nian, Xi Long, Jing Xiong, Min Jia, Chunnuan Chen, Jinsha Huang, Devina Ghoorah, Xiangquan Kong, Zhicheng Lin, and Tao Wang. 2012. "Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone-Induced Toxicity and Its Potential Mechanisms in Parkinson's Disease Models." *Critical Reviews in Toxicology* 42 (7): 613–32. doi:10.3109/10408444.2012.680431.