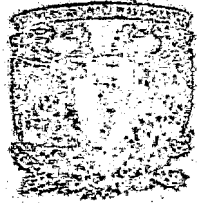




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

**Efectos del Beta Pineno sobre las Células
de Levadura y las Mitocondrias de Hígado
de Rata**

T E S I S

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

María del Rocío Alvarez Medina

México, D. F.

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

I.-	INTRODUCCION	1
II.-	MATERIALES Y METODOS	6
III.-	RESULTADOS	12
IV.-	DISCUSION	18
V.-	CONCLUSIONES	22
VI.-	PERSPECTIVAS	23
VII.-	BIBLIOGRAFIA	24
VIII.-	ABREVIATURAS	25

INTRODUCCION

AL ELOPATIA:

La alelopatía es la interacción bioquímica entre plantas y entre plantas y microorganismos a través de compuestos químicos nocivos arrojados al medio ambiente (Rice 1974).

Basándose en el organismo productor del inhibidor y en el organismo afectado, los inhibidores alelopáticos se clasifican en (Rice 1974):

Antibiótico.- Lo producen microorganismos para dañar a otros microorganismos.

Fitoncida.- Lo producen plantas superiores para dañar a microorganismos.

Marasmino.- Lo producen microorganismos para dañar a plantas superiores.

Kolione.- Lo producen plantas superiores para dañar a plantas superiores.

Hay algunas sustancias con acción mixta y existe también un fenómeno de auto intoxicación cuando estas sustancias alelopáticas se acumulan en los campos.

En los campos de cultivo se observa que los cardos dañan los cultivos de avena, el centeno daña el trigo y al sembrar en ciclos continuos de cultivo, trigo, avena y café disminuye la producción como consecuencia de una inhibición en el crecimiento de las semillas. Este efecto dañino no se debe a la falta de algún factor del medio ambiente (agua, luz, minerales) sino a compuestos exudados por las plantas (Chou y Waller 1980).

Las sustancias alelopáticas son liberadas al medio ambiente por diferentes medios, dependiendo del sitio específico en donde se producen en las plantas. Las hojas de las plantas almacenan la mayor parte de estas sustancias y en las flores, tallos, frutos, semillas y raíces existen sustancias alelopáticas en menor cantidad (Chou y Waller 1980 - A).

Las sustancias alelopáticas son exudadas por las hojas de las plantas al medio ambiente como vapores, en especial en días calurosos, confiriéndole un aspecto vidrioso a la atmósfera (Asplund 1968). Estas sustancias son arrastradas por el agua de lluvia y al caer al suelo entran en contacto con los microorganismos que ahí se encuentran, inhibiendo su crecimiento y reproducción.

Los mecanismos por medio de los cuales las diferentes sustancias alelopáticas causan inhibición no se conocen a fondo, pero hay datos en que se observa interferencia de dichas sustancias en procesos como la división celular, la captación de minerales, la respiración y el crecimiento.

Los terpenos volátiles cineol y alcanfor, procedentes de hojas maceradas de Salvia leucophylla evitan la mitosis en las raíces de Cucumis sativus (Muller 1969).

Diversos compuestos orgánicos han sido identificados como inhibidores alelopáticos y han sido agrupados en diferentes categorías (Rice 1974):

Ácidos orgánicos simples solubles en agua, alcoholes de cadena lineal, aldehídos alifáticos y cetonas como son: el acetaldehído, aldehído propiónico, acetona, metanol y etanol que son exudados como vapores por las hojas de

tomate, papa, rábano y raíces de zanahoria, respectivamente.

Lactonas simples insaturadas como son: el ácido parasorbico, identificado en Sorbus aucuparia, inhibe la respiración y es antibacteriano.

Antraquinonas, naftoquinonas y complejos de quinona como el Juglone, un tóxico potente producido por el nogal e identificado como la 5- hidroxinaftoquinona.

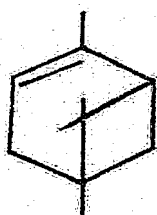
Los fenoles simples, el ácido benzoico y sus derivados son los compuestos más identificados como sustancias alelopáticas producidas por las plantas superiores, el ácido para-hidroxibenzoico y el ácido vainillico son los más comunes encontrados en los residuos de maíz, trigo, sorgo y avena.

Acido cinámico y sus derivados como: el ácido trans-cinámico producido por la raíz del guayule y que inhibe el crecimiento de las semillas y plantas jóvenes del guayule.

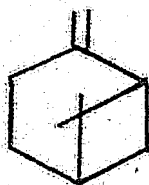
Los monoterpenos (C_{10}) son compuestos por dos unidades isoprenoides con diferentes grupos funcionales, anillos y grados de saturación (Rice, E., 1974).

En las plantas superiores hay gran cantidad de terpenos, pero solo unos cuantos son los involucrados en alelopatía y de estos los monoterpenos han sido identificados como los inhibidores predominantes; son también los componentes que se encuentran en mayor cantidad en los aceites esenciales. Han sido identificados como volátiles el alfa pineno, beta pineno, limoneno, pulegone, alcanfor y 1,8 cineol (Fig. 1) (Asplund 1968).

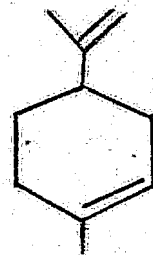
El cineol y el dipentano son sustancias emanadas por las hojas de



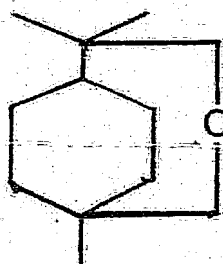
Alfa pineno



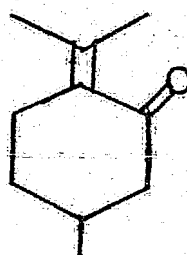
Beta pineno



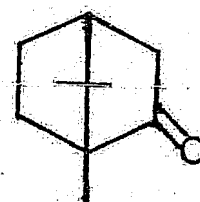
Limoneno



1,8 Cineol



Pulegon



Alcanfor

Figura 1.- Monoterpenos volátiles involucrados en Alelopatía.

Salvia leucophylla que reducen la captación de oxígeno (Muller 1969) en sus pensiones de mitocondrias de Avena fatua y Cucumis sativus. Sugiriendo los autores que la inhibición afecta el ciclo de Krebs y la permeabilidad de la membrana celular.

Asplund (1968) investigó la relación entre la estructura de diez monoterpenos y la inhibición de la germinación en semillas de rábano, encontrando que las estructuras con un grupo funcional cetona como el alcanfor y el pulegone, son más tóxicas en concentraciones menores que los monoterpenos carentes de dicho grupo funcional como son el cineol, alfa felandreno, alfa pineno y beta pineno. Estos compuestos han sido encontrados en Eucaliptus camandulensis.

Estas sustancias hidrófobas deben ser muy importantes como alelopátas, pues insectos como el Dendroctonus terebrans que durante su etapa larvaria vive en la corteza de los árboles y se alimenta de estas sustancias durante su ciclo vital, ha desarrollado un sistema llamado de oxidasas inespecíficas en el retículo sarcoplásmico, diseñado para metabolizar estas moléculas; este mismo sistema se ha descubierto en hígado de rata, siendo inducible por la inyección de alfa pineno intraperitoneal (White, Franklin y Agosin 1979).

Con el antecedente de que los monoterpenos inhiben el crecimiento de las plantas, siendo el efecto más intenso sobre la raíz que sobre el tallo (Anaya y cols, comunicación personal), se pensó, que si la diferencia entre el tallo y la raíz son las mitocondrias como fuente principal de producción de energía, estas sustancias podrían afectarlas.

Entre los microorganismos que se encuentran comunmente en el suelo están los hongos y las levaduras, estas últimas han sido estudiadas en este laboratorio por mucho tiempo (Peña y cols. 1972, Peña y Ramírez 1975, Peña y cols. 1979) se consideró un modelo adecuado para observar el efecto de dichas sustancias. Se utilizaron mitocondrias aisladas de hígado de rata (Peña y cols. 1977) debido a la dificultad de aislar las de levadura (Peña y cols. 1977-A) y al hecho de que estudios realizados en este laboratorio y otros, muestran que ambos tipos de mitocondrias son similares (Peña y cols. 1977, Peña y cols. 1977-A, Peña y cols. 1980).

Con estos estudios esperamos caracterizar el mecanismo por medio del cual los monoterpenos ejercen sus efectos alelopáticos, considerandolos como un paso esencial para explotar el potencial que estas sustancias pueden tener como herbicidas.

MATERIALES Y METODOS

Materiales:

Se utilizaron levaduras obtenidas comercialmente de la fábrica

" La Azteca " del género Saccharomyces cerevisiae.

Las mitocondrias de hígado de rata se obtuvieron de ratas blancas adultas, sin importar el sexo, obtenidas en el bioterio del C.I.F.C.

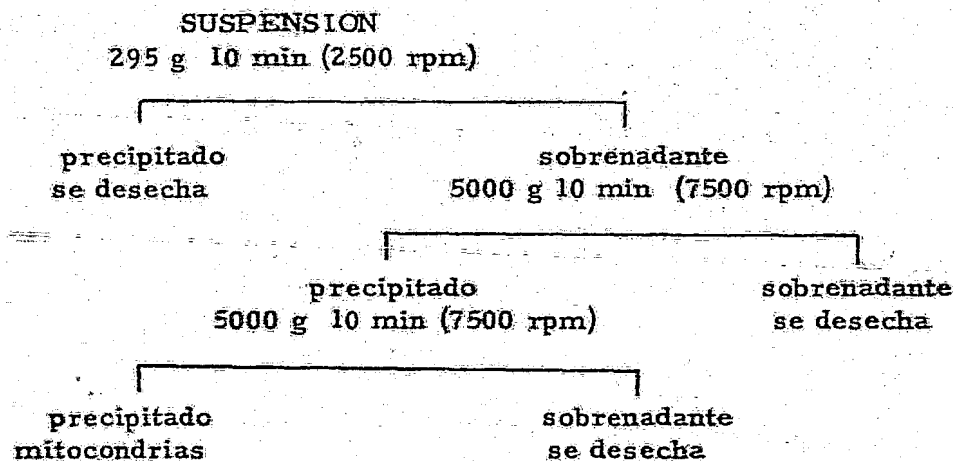
Los reactivos utilizados son de grado analítico. El beta pineno se obtuvo en Aldrich Chemical Company, Inc. y se usó sin ulterior purificación.

Métodos:

Tratamiento de la levadura (Peña y cols. 1977-A): De la levadura obtenida comercialmente se pesan 30 g. y se suspenden en un litro de medio de cultivo para levadura de De Klöet (De Klöet y cols. 1960) agregando 1 ml. de antiespumante FG 10 de Corning. Se incuba inyectando aire a través de un tubo de vidrio poroso durante ocho horas a temperatura constante de 30°C. Transcurridas las ocho horas se centrifuga en una centrifuga International No. 1 Tipo SB a 600 g (2000 rpm) durante 10 minutos, resuspendiendo en agua destilada y sometiendo a una segunda centrifugación. Estas células se resuspenden en agua destilada en un volumen total de 350 ml. y se dejan airear por 16 horas a temperatura constante de 30°C. Transcurrido este tiempo se centrifuga a 600 g (2000 rpm) durante 10 minutos, se pesan las levaduras y se suspenden en agua destilada en el doble del volumen total (ml) del peso obtenido (gramos).

Obtención de mitocondrias de hígado de rata (Peña y cols. 1977):

Se sacrifica al animal mediante dislocación cervical y decapitación dejándolo sangrar 30 segundos; se le extrae el hígado, que se lava en un vaso de precipitados inmerso en hielo conteniendo medio para preparación de mitocondrias de hígado de rata (Sacarosa 0.25 M EDTA Tris 1 mM, pH 7.4), y se pasa a otro vaso también en hielo que contenga medio limpio donde se corta en trozos pequeños, se pasa a un vaso de homogeneizador con vástago de teflón para homogeneizarlo, siempre en hielo; se le somete a centrifugación diferencial en una centrífuga Sorval RC 2-B con cabezal SS-34 a 4°C para aislar las mitocondrias de acuerdo al siguiente esquema:



Las mitocondrias así obtenidas se resuspenden en aproximadamente 0,5 ml. de medio para preparación de mitocondrias y se colocan en un tubo de ensaye en baño de hielo para su utilización que siempre es inmediata.

Cuantificación de proteína mitocondrial (Murphy 1960):

Se prepara una dilución (1:100) 0.99 ml. de agua y 0.01 ml. de la suspensión original de mitocondrias; de esta dilución se toma 0.1 ml. y se mezcla con 2.9 ml. de solución de hidróxido de sodio para dar una concentración final de hidróxido de sodio 5 mM. Se prepara otra solución de 3 ml. de hidróxido de sodio 5 mM que no contenga proteína, este tubo sin proteína es el blanco con el que se ajusta el aparato a cada longitud de onda, de 0 a 100 % de transmitancia. Se toma la lectura de absorbancia de la muestra comparada contra el blanco en un espectrofotómetro a 215 y 225 nm; la diferencia entre estas lecturas se multiplica por el factor 432 y se obtiene así la concentración de proteína en mg/ml en la suspensión original.

Oximetría:—El consumo de oxígeno se midió con un electrodo de Clark cubierto por una membrana de teflón, insertado en una cámara de volumen variable con baño a temperatura constante de 30°C. Dicho electrodo registra el oxígeno disuelto que se encuentra presente en el líquido contenido en la cámara y está conectado a un gráficoador de escala ajustable. Los datos obtenidos se reportan en nanoátomos gramo de oxígeno consumido por miligramo de proteína por minuto o bien como porcentaje de un control, considerando 80 nanoátomos gramo de oxígeno por mililitro de medio. Con este método se midieron la respiración de levaduras íntegras en un medio formado por Glucosa 100 mM, MES Tris 20 mM, pH 6.0, levadura íntegra 5 mg/ml y 10 mg/ml, en un volumen final de 5 ml. también se midieron los estados

tres, cuatro y control respiratorio en mitocondrias aisladas de hígado de rata, utilizando un medio de respiración compuesto por: Sacarosa 125 mM EDTA Tris 500 μ M pH 7.4, Tris HCl 10 mM, pH 7.4, H_3PO_4 Tris 10 mM pH 7.4 y como sustratos Glutamato- Malato 10 mM-1 mM, δ , Succinato 30 mM, mitocondrias de hígado de rata 1 mg/ml volumen final 3ml. y ADP 480 nmoles en 6 μ l de agua.

Método colorimétrico para determinación de ATPasa (Sumner 1944) :

Con mitocondrias de hígado de rata y conociendo su concentración se procede a colocar en tubos de ensaye un medio consistente en Sacarosa 125 mM EDTA Tris 500 μ M pH 7.4, ATP Tris 3 mM pH 7.4, KCl 50 mM en un volumen final de 1 ml y en presencia donde se indique de Oligomicina 1 mg/ml en DMF, 6 μ l, FCCP 6 mM en DMF, 1 μ l, $MgCl_2$ 3 mM, mitocondrias de hígado de rata 1 mg/ml, beta pineno en DMF 0.2 M para dar concentraciones finales de 100, 200, 400 y 800 μ M.

Para iniciar la reacción se agrega la mitocondria a cada tubo con intervalos de 10 segundos entre cada uno y se colocan en baño de agua a temperatura de 30°C y agitación constante durante 10 minutos. Se sacan los tubos en el mismo orden que se introdujeron y a iguales intervalos de tiempo y se agregan 0.2 ml de ácido tricloroacético al 30 % y se les coloca en baño de hielo. Se centrifuga a 3500 rpm durante 5 minutos. De este centrifugado se toma una alícuota de 0.5 ml y se agregan 3.1 ml de agua destilada, 0.5 ml de molibdato de amonio al 6.6%, 0.5 ml de ácido sulfúrico 7.5 N. Se agita mecánicamente y se agrega 0.4 ml de sulfato ferroso . Se deja reaccionar

durante 10 minutos, transcurridos los cuales se procede a leer en un colorímetro de Klett-Summerson con filtro rojo a 660 nm. Siguiendo el mismo proceso se prepara una solución estándar que contenga 0.5 μM de fosfato de potasio monobásico.

CALCULOS:

$$\mu\text{moles Pi/mg proteína 10 min.} = \frac{(\text{UK} - \text{UKb}) (\text{A}) (\text{F})}{(\text{UKstd}) (\text{C})}$$

UK .- Unidades Klett de la muestra.

UKb. = Unidades Klett del blanco.

A .- μmoles de Pi en la solución estándar.

F .- Factor de dilución.

C .- Miligramos de proteína utilizados por mililitro.

UKstd. Unidades Klett de la solución estándar.

Determinación de potasio en mitocondrias de hígado de rata (Peña 1975):

La determinación se efectuó con un electrodo detector de cationes acoplado a un gráficoador. Se utilizó un medio compuesto por Sacarosa 125 mM EDTA Tris 500 μM pH 7.4, Tris HCl 10 mM pH 7.4 y como sustratos Glutamato -Malato 10 mM-1 mM ó Succinato 30 mM en presencia de rotenona, en un volumen final de 3 ml. y temperatura constante de 30°C, mitocondrias de hígado de rata 1 mg/ml. Se agregó tritón para observar la salida de potasio total (30 μM).

Determinación del potencial de membrana mitocondrial en mitocondrias aisladas de hígado de rata. (Akerman y Wikström 1976): Usando safranina como monitor de absorbencia se midió el potencial de membrana mitocondrial en un espectrofotómetro de doble rayo Aminco DW2A a una longitud de onda de 511 y 533 nm , utilizando cuvetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz en un medio formado por Sacarosa 125 mM Tris 500 μ M pH 7.4, Tris HCl 10 mM pH 7.4, H_3PO_4 Tris 10 mM pH 7.4, Safranina 10 μ M, y como sustratos Glutamato - Malato 10 mM-1 mM ó Succinato 10 mM, mitocondrias de hígado de rata 3 mg/ml en un volumen final de 3 ml.

R E S U L T A D O S

1. - Efectos sobre la respiración en levaduras íntegras.

Se utilizaron levaduras íntegras a fin de obtener información sobre los efectos del beta pineno en dichos organismos, debido a que los antecedentes sugerían que el beta pineno no inhibía la captación de oxígeno (Muller, W. y cols., 1969).

Se observó en células de levadura íntegra el efecto sobre el consumo de oxígeno de cantidades crecientes de beta pineno obteniéndose (Tabla 1-A) con 5 mg/ml de levadura, a la menor concentración de beta pineno probada, 100 μ M, (Fig. 2-A), una inhibición en el consumo de oxígeno de 20%; con 200 μ M aumenta la inhibición hasta 55%, con 400 μ M la inhibición es de 76% y con 1.2 mM se inhibe 87%. Para observar posibles variaciones debidas al cambio en la concentración de levadura, se probó con el doble de células de levadura (10 mg/ml) y se obtuvo (Tabla 1-B), con 200 μ M de beta pineno una inhibición en el consumo de oxígeno de 22%, con 400 μ M de 47%, con 1.2 mM de beta pineno 68% y con 2.4 mM una inhibición de 87% (Fig. 2-B).

En estado desacoplado con FCCP, el efecto del beta pineno sobre el consumo de oxígeno en levadura íntegra es menor que en estado acoplado ya que a una concentración de 5 mg/ml de levadura (Tabla 2-A y Fig. 3-A) se observó que con 100 μ M de beta pineno el consumo de oxígeno aumenta en un 3% con respecto al control, con 200 μ M disminuye 3%, con 400 μ M disminuye 22% y con 1.2 mM disminuye 52%. Con el doble de levadura (10 mg/ml) (Tabla 2-B y Fig. 3-B) y 200 μ M de beta pineno el consumo de oxígeno aumenta 3%, con 400 μ M disminuye 12% y con 1.2 mM se inhibe 36%.

TABLA 1.- Efectos de beta pineno a diferentes concentraciones sobre el consumo de Oxígeno por células íntegras de levadura.

A.- 5mg/ml de levadura íntegra.

Beta pineno mM	natg O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹	Porcentaje del control
0	12.5 ± 1.8	100
0.10	8.6 ± 1.0	80.4 ± 3.7
0.20	5.8 ± 0.9	45.8 ± 1.1
0.40	3.0 ± 0.4	23.9 ± 1.4
1.20	1.5 ± 0.2	11.3 ± 1.7

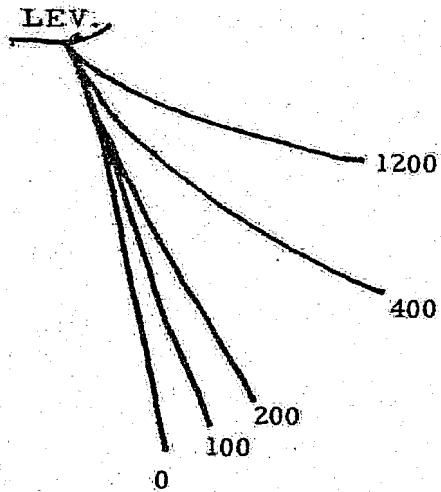
B.- 10 mg/ml de levadura íntegra.

Beta pineno mM	natg O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹	Porcentaje del control
0	10.8 ± 1.6	100
0.20	8.4 ± 1.0	78.8 ± 1.6
0.40	5.8 ± 1.0	53.3 ± 5.8
1.20	3.5 ± 0.6	32.4 ± 2.4
2.40	1.5 ± 0.3	13.5 ± 1.1

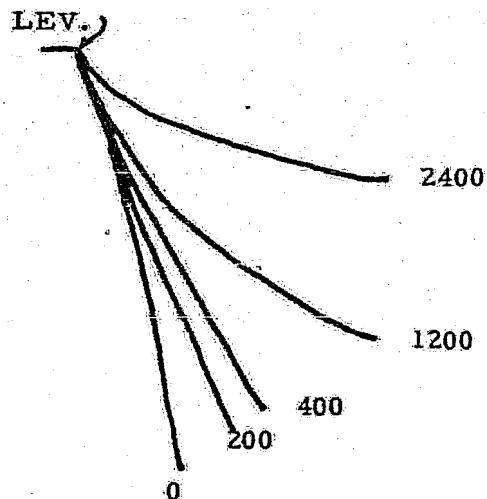
Condiciones experimentales: Glucosa 100 mM, Mes-Tris 20 mM pH 6.0, levadura íntegra lo que se indique, temperatura de incubación 30°C , en un volumen final de 5 ml.

FIGURA 2.- Efectos de beta pineno a diferentes concentraciones sobre el consumo de Oxígeno por células íntegras de levadura.

A.- 5 mg/ml de levadura íntegra.



B.- 10 mg/ml de levadura íntegra.



Concentraciones micro molares de beta pineno.

TABLA 2.- Efectos de beta pineno a diferentes concentraciones sobre el consumo de Oxígeno por células íntegras de levadura en estado desacoplado con FCCP.

A.- 5 mg/ml de levadura íntegra.

Beta pineno mM	natg O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹	Porcentaje del control
0	16.1 ± 1.8	100
0.10	16.1 ± 2.4	103.0 ± 2.8
0.20	15.5 ± 1.8	97.4 ± 1.1
0.40	11.8 ± 0.9	78.3 ± 6.6
1.20	7.5 ± 1.0	48.5 ± 5.2

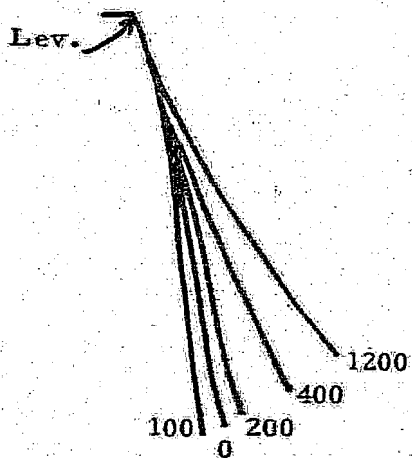
B.- 10 mg/ml de levadura íntegra.

Beta pineno mM	natg O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹	Porcentaje del control
0	18.2 ± 5.5	100
0.20	24.3 ± 7.3	133.0 ± 0.3
0.40	19.1 ± 4.2	104.7 ± 6.8
1.20	16.0 ± 2.5	87.8 ± 3.5

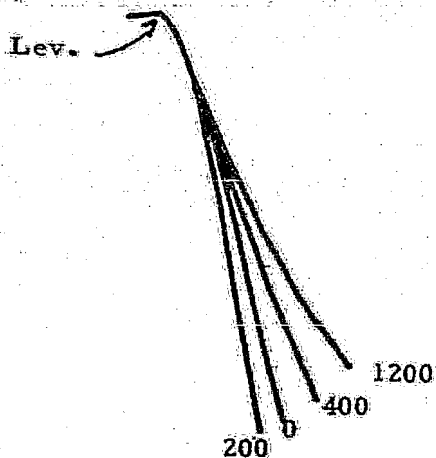
Condiciones experimentales: Glucosa 100 mM , Mes-Tris 20 mM
pH 6.0 , FCCP 6 μM, levadura íntegra lo que se indique , temperatura de incubación 30°C , en un volumen final de 5 ml.
El control sin beta-pineno también contenía 6 μM de FCCP.

FIGURA 3.- Efectos de beta pineno a diferentes concentraciones sobre el consumo de Oxígeno por células íntegras de levadura en estado desacoplado con FCCP.

A.- 5 mg/ml de levadura íntegra.



B.- 10 mg/ml de levadura íntegra.



Concentraciones micro molares de beta pineno.

Para descartar efectos debidos a simple hidrofobicidad de la molécula se emplearon sustancias hidrófobas con estructuras parecidas al beta pineno como el ciclohexano, benceno y decano. Se observó (Tabla 3) que a una concentración de 5 mg/ml de levadura con 1.2 mM de benceno, decano ó ciclohexano, el consumo de oxígeno aumenta con respecto al control 28,31 ó 15% respectivamente, al aumentar la concentración a 2.4 mM el consumo de oxígeno aumenta 40% para benceno, 45% para decano y 18% para ciclohexano. Al aumentar las concentraciones a 10 mM hay un aumento en el consumo de oxígeno de 44% con decano y de 39% con benceno, mientras que, con ciclohexano hay una disminución en el consumo de oxígeno de 20% por debajo del control.

2.- Efectos sobre la respiración en mitocondrias aisladas de hígado de rata.

Con base en el efecto del beta pineno sobre la respiración en levaduras íntegras, decidimos estudiar los efectos sobre la respiración en mitocondrias aisladas de hígado de rata. Para esto, a fin de lograr mayor información utilizamos dos tipos de sustratos, Glutamato-Malato y Succinato, además estudiamos los efectos sobre el estado tres, cuatro y el control respiratorio buscando un posible efecto sobre el acoplamiento de la respiración. En la Tabla 4, se observa que en estado cuatro, utilizando Glutamato-Malato como sustrato, con 100 μ M de beta pineno el consumo de oxígeno prácticamente no varía con respecto al control; con 200 μ M el consumo de oxígeno no aumenta 8.3%; con 400 μ M disminuye 50% y con 600 μ M disminuye 57%.

TABLA 3.- Efectos de benceno, decano y ciclohexano a diferentes concentraciones sobre el consumo de Oxígeno por células enteras de levadura.

Benceno mM	natg O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹	Porcentaje del control
0	11.5 ± 1.1	100
1.20	13.6 ± 0.3	128.0 ± 7.4
2.40	16.0 ± 0.7	140.9 ± 4.4
4.80	16.7 ± 0.8	147.7 ± 5.6
10.00	16.0 ± 0.8	139.4 ± 4.1
Decano mM	natg O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹	Porcentaje del control
0	11.5 ± 1.1	100
1.20	15.1 ± 1.2	131.4 ± 8.8
2.40	16.5 ± 0.9	145.2 ± 2.9
4.80	17.9 ± 1.3	157.8 ± 2.7
10.00	16.5 ± 0.8	144.1 ± 8.2
Ciclohexano mM	natg O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹	Porcentaje del control
0	11.5 ± 1.1	100
1.20	13.2 ± 1.5	114.9 ± 5.4
2.40	13.2 ± 2.2	117.9 ± 7.9
4.80	14.6 ± 2.8	126.2 ± 13.5
10.00	9.7 ± 0.9	84.9 ± 6.1

Condiciones experimentales: Glucosa 100 mM, Mes-Tris 20 mM
pH 6.0, levadura íntegra 5 mg/ml, temperatura de incubación
30°C, en un volumen final de 5 ml.

Tabla 4 .- Efectos de beta pineno a diferentes concentraciones sobre el consumo de oxígeno en estado tres, estado cuatro y control respiratorio en mitocondrias aisladas de hígado de rata.

GLUTAMATO - MALATO

Beta pineno μM	Estado cuatro		Estado tres		CR
	natg O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹	Por ciento del control	natg O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹	Por ciento del control	
0	24.9 ± 1.9	100	147.2 ± 9.4	100	5.9
100	23.3 ± 1.2	94.4 ± 4.8	143.7 ± 15.3	96.9 ± 7.2	6.0
200	27.5 ± 3.7	108.3 ± 7.1	118.1 ± 17.3	78.8 ± 6.9	4.6
400	12.5 ± 1.4	49.9 ± 3.8	12.5 ± 1.8	8.4 ± 0.5	1.0
600	11.1 ± 1.8	42.4 ± 4.0	11.1 ± 1.8	7.0 ± 1.1	1.0

SUCCINATO

0	67.4 ± 1.8	100	256.2 ± 9.8	100	3.8
100	63.2 ± 1.7	93.8 ± 1.9	281.2 ± 14.1	109.7 ± 3.3	4.5
200	159.4 ± 4.8	228.2 ± 0.8	251.2 ± 22.9	108.2 ± 7.7	1.6
400	198.0 ± 13.5	296.3 ± 2.6	198.0 ± 13.5	78.3 ± 7.7	1.0
600	53.2 ± 0.1	76.4 ± 2.7	59.9 ± 4.7	72.0 ± 2.1	1.1

Condiciones experimentales: Sacarosa 125 mM, EDTA Tris 500 μM, pH 7.4, Tris 10 mM HCl pH 7.4, H₃PO₄ Tris 10 mM pH 7.4, ADP 480 nmoles en 6 μl de agua, glutamato-malato 10 mM- 1mM ó succinato 30 mM, mitocondrias de hígado de rata 1 mg/ml en un volumen final de 3 ml a temperatura constante de 30°C.

Con el mismo sustrato, el estado tres es modificado por el beta pineno de la manera siguiente con 100 μM de beta pineno no se observan variaciones con respecto al control, con 200 μM disminuye 21%, con 400 μM se inhibe 91% y con 600 μM se inhibe 93% (fig. 4). El control respiratorio (CR) es el resultado de dividir el estado tres entre el cuatro, para el control es de 5.9, llega a 6.0 con 100 μM , baja a 4.6 con 200 μM y se colapsa a 1.0 con 400 y 600 μM de beta pineno.

Utilizando succinato como sustrato en estado cuatro (Tabla 4) se observa que con 100 μM de beta pineno tampoco hay cambio en el consumo de oxígeno con respecto al control, 200 μM aumenta 60%, con 400 μM aumenta 98% y con 600 μM disminuye 25% con respecto al control. Con el mismo sustrato en estado tres y 100 μM de beta pineno el consumo de oxígeno aumenta 10%, con 200 μM aumenta 8%, con 400 μM disminuye 22% y con 600 μM disminuye 78% con respecto al control (Fig. 5). El control respiratorio en este caso es de 3.8 para el control, llega a 4.5 con 100 μM , baja a 1.6 con 200 μM , se colapsa a 1.0 con 400 μM y es de 1.1 con 600 μM . Hay dos diferencias importantes con ambos sustratos. La primera con Glutamato-Malato no hay efecto en estado cuatro, mientras que con Succinato hay una estimulación muy marcada a 200 μM . La segunda diferencia consiste en la inhibición del estado tres a una concentración menor con Glutamato-Malato a 400 μM , mientras que con Succinato a 600 μM .

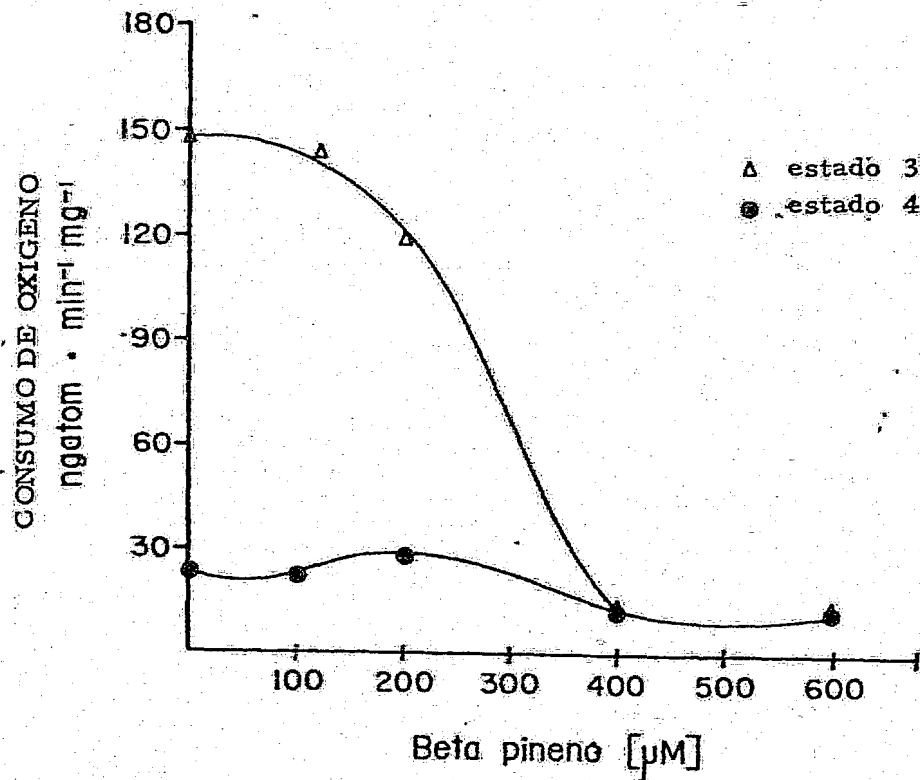


FIGURA 4 .- Efectos de diferentes concentraciones de beta pineno en el consumo de Oxígeno por mitocondrias de hígado de rata, con Glutamato -Malato como sustrato.

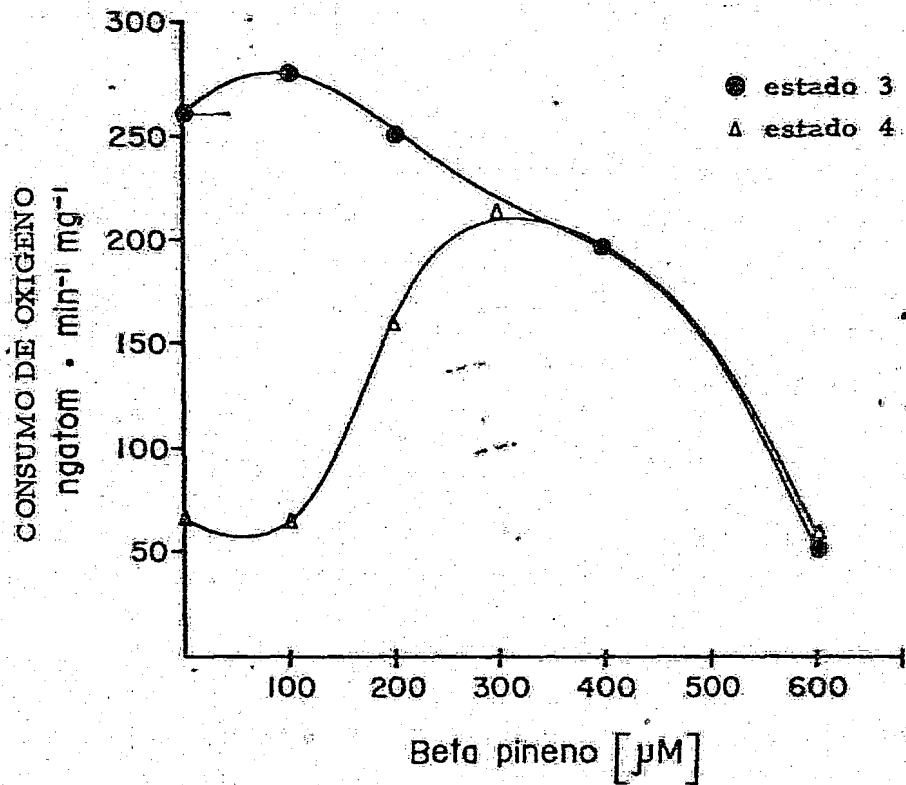


FIGURA 5 .- Efectos de diferentes concentraciones de beta pineno en el consumo de Oxígeno por mitocondrias de hígado de rata, con Succinato como sustrato.

3.- Efectos sobre la actividad de ATPasa.

Debido a que con Succinato se observó un efecto desacoplante del beta pineno, medimos la actividad de ATPasa. Pensando en la posibilidad de un daño mitocondrial, el experimento se efectuó en presencia y ausencia de magnesio. En la Tabla 5-A se observa el efecto del beta pineno a diferentes concentraciones sobre la actividad de ATPasa en mitocondrias de hígado de rata. En presencia de magnesio la actividad de ATPasa basal es de 0.0676 μ moles de Pi por mg. de proteína en 10 minutos, en presencia de 12 μ g de oligomicina es de 0.045 μ moles de Pi por mg. de proteína en 10 minutos y al agregar FCCP es de 0.187 μ moles de Pi por mg. de proteína en 10 minutos, al agregar diferentes concentraciones de beta pineno la actividad de ATPasa es mayor que el valor obtenido con FCCP pero a 800 μ M de beta pineno la actividad disminuye. El FCCP en presencia de 200 μ M de beta pineno no parece modificar la actividad de ATPasa.

En ausencia de magnesio la actividad de ATPasa basal es de 0.054 μ moles de Pi por mg. de proteína en 10 minutos, al agregar FCCP es de 0.231 μ moles de Pi por mg. de proteína en 10 minutos y al agregar diferentes concentraciones de beta pineno la actividad aumenta sobre el valor obtenido con FCCP siendo menor aún que en presencia de magnesio.

4.- Efecto del beta pineno sobre el contenido de potasio mitocondrial.

El aumento en la actividad de ATPasa es compatible con un aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial y para detectar daño en esta membrana, medimos la capacidad de las mitocondrias para retener el

TABLA 5.- Efectos de beta pineno a diferentes concentraciones sobre la actividad de ATPasa en mitocondrias de hígado de rata.

A.- En presencia de Mg^{++} .

Beta pineno μM	$\mu moles Pi/mg prot. 10 min.$
0	0.067 ± 0.024
100	0.239 ± 0.014
200	0.241 ± 0.022
400	0.212 ± 0.031
800	0.156 ± 0.025
200 + FCCP	0.231 ± 0.022
0 + FCCP	0.187 ± 0.015
0 + Oligo.	0.045 ± 0.002

B.- En ausencia de Mg^{++}

Beta pineno μM	$\mu moles Pi/mg prot. 10 min.$
0	0.054 ± 0.003
100	0.144 ± 0.029
200	0.157 ± 0.015
400	0.163 ± 0.020
800	0.141 ± 0.043
200 + FCCP	0.212 ± 0.031
0 + FCCP	0.231 ± 0.011
0 + Oligo.	0.026 ± 0.002

Condiciones experimentales: Sacarosa 125 mM EDTA Tris 500 μM pH 7.4; ATP Tris 3mM pH 7.4; KCl 50 mM, $MgCl_2$ 3mM; FCCP 6 μM Oligomicina 6 μM ; mitocondria 1 mg/ml, temperatura de incubación 30°C, por 10 min.

potasio interno (Fig. 6). No se observó efecto con 100 μM de beta pineno con respecto al control, con 200 y 300 μM la capacidad de la membrana para retener el potasio intramitocondrial se pierde, observándose que con 400 y 600 μM se recupera la impermeabilidad y ya no hay salida de potasio. Luego de observar estos flujos se agregó tritón para romper la membrana mitocondrial, observándose que el valor total del potasio en el medio era similar en todos los casos.

5.- Efecto del beta pineno sobre el potencial electroquímico de la membrana.

En vista del aumento de actividad de ATPasa desde 100 μM de beta pineno, decidimos estudiar el efecto sobre el potencial mitocondrial usando safranina como monitor de absorbencia, con Glutamato-Malato y Succinato como sustratos en ausencia y presencia de fosfato, pensando que el fosfato podría proteger a la membrana de la acción del beta pineno, basándonos en que en la determinación de actividad de ATPasa se omitió el fosfato del medio, a diferencia de los experimentos previos en que siempre se puso 10 μM de fosfato en el medio.

Usando Glutamato-Malato como sustrato no hay efectos con 100 μM de beta pineno con respecto al control, con 200 μM el potencial transmembranal disminuye rápidamente y a concentraciones mayores ya no se establece. Con Succinato, el potencial establecido en el control no es afectado con 100 μM de beta pineno y al aumentar la concentración de éste, desde 200 μM el potencial ya no se establece.

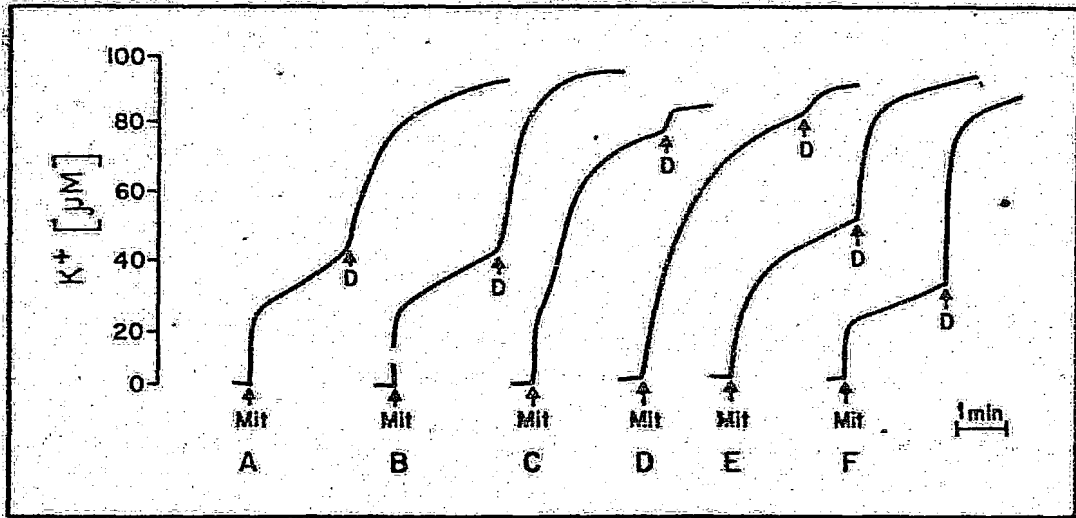


FIGURA 6.- Efecto de diferentes concentraciones de beta pineno sobre el contenido de potasio (K^+) en mitocondrias de hígado de rata. Concentraciones de beta pineno A control, B 100 μM , C 200 μM , D 300 μM , E 400 μM y F 600 μM .

Los experimentos en ausencia de fosfato muestran que tanto con succinato como con glutamato-malato los efectos del beta pineno se presentan a menores concentraciones que en presencia del anión (Fig. 7).

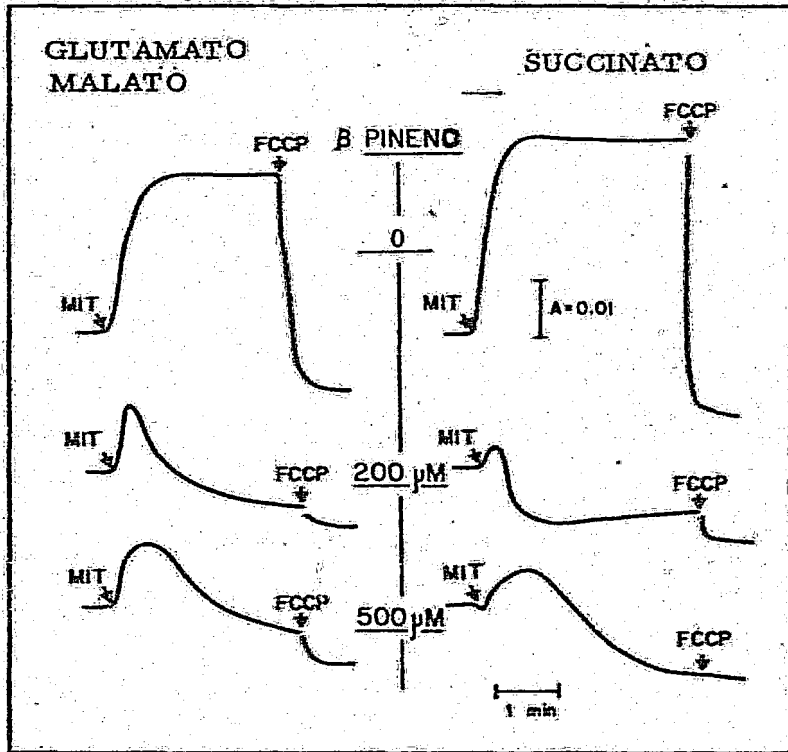


FIGURA 7 .- Efectos de diferentes concentraciones de beta pineno sobre el potencial electroquímico de membrana, medido con Safranina.

DISCUSION

En levadura íntegra el consumo de oxígeno es inhibido por el beta pineno, observándose que existe una relación entre la cantidad de beta pineno requerida para un porcentaje de inhibición dado y la cantidad de levadura. Con 200 μM de beta pineno y 5 mg/ml de levadura, el consumo de oxígeno se inhibe 55% y al duplicar la concentración de levadura 10 mg/ml se requiere el doble de beta pineno 400 μM para una inhibición de 48%, esta relación también se observa a otras concentraciones. Este hecho nos llevó a pensar en que el efecto del beta pineno sobre el metabolismo de la levadura podría ubicarse en la mitocondria.

En mitocondrias aisladas de hígado de rata observamos los efectos sobre las diversas funciones metabólicas, llevadas a cabo en estrecha relación con la membrana mitocondrial interna. La función más sensible es la actividad de ATPasa medida siempre en ausencia de fosfato la cual desde 100 μM de beta pineno se estimula, tanto en presencia como en ausencia de magnesio, a esta concentración el potencial transmembranal medido con safranina ya se encuentra afectado, independientemente del sustrato utilizado, pero solo en ausencia de fosfato. Si ponemos fosfato en el medio, entonces el potencial disminuye ligeramente. No medimos actividad de ATPasa con fosfato pues el método mide la cantidad de fosfato liberado por el ATP hidrolizado enzimáticamente y una adición de fosfato al medio en las altísimas proporciones usadas no permitiría distinguir el liberado por la

ATPasa. El flujo de potasio intramitocondrial medido siempre en presencia de fosfato es igual al del control y el consumo de oxígeno con glutamato malato ó con succinato como sustratos tampoco se ve afectado. Al aumentar la concentración de beta pineno a 200 μM se observa que mientras la ATPasa continúa aumentada, la mitocondria es incapaz de retener el potasio intramitocondrial existiendo un desacoplamiento de la respiración con succinato, observado como una aceleración del estado cuatro. Con glutamato-malato no hay efecto sobre el consumo de oxígeno y podría deberse a un aumento en la permeabilidad de la membrana, manifestado como la incapacidad de retener el potasio intramitocondrial. Esto permitiría el escape del NAD^+ como sucede con el potasio, con la resultante disminución en la efectividad de la NADH deshidrogenasa. Pensamos que esto puede demostrarse agregando NADH_2 al medio, que normalmente es incapaz de penetrar la matriz mitocondrial, por lo tanto no deberá provocar una aceleración del estado cuatro a menos que la membrana se haya permeabilizado, en tal caso se observará un aumento en el consumo de oxígeno, similar al provocado con succinato. A concentraciones más altas hay una inhibición de la respiración que con glutamato-malato requiere de 400 μM de beta pineno y con succinato de 600 μM , a estas concentraciones la impermeabilidad de la membrana parece recuperada parcialmente, pues el potasio intramitocondrial no se sale y el potencial transmembranal no se restablece pero el consumo de oxígeno no se encuentra inhibido casi por completo y no podemos diferenciar entre si está resellada la membrana o se trata de un artefacto.

Planeamos estudiar este fenómeno tratando de generar un potencial transmembranal mediante la ATPasa que no está inhibida o con valinomicina y si se restablece la permeabilidad de la membrana, entonces el potencial aparecerá a concentraciones altas.

Concentraciones mayores de beta pineno no presentan modificaciones.

Hay un dato incongruente en nuestros resultados, al agregar un desacoplante como el FCCP se revierte parcialmente la inhibición en el consumo de oxígeno por células de levadura íntegra, con 200 μ M de beta pineno y 5 mg/ml de levadura se inhibe 3% con respecto al control y a concentraciones mayores como 1.2 mM la inhibición es de 52%, menor aún que cuando están acopladas. Este efecto apuntaba hacia una probable inhibición de la actividad de ATPasa que inhibiera el consumo de oxígeno, siendo reversible por la adición de un desacoplante, y sin embargo, en mitocondrias aisladas, a todas las concentraciones probadas, la actividad de ATPasa se encuentra aumentada. Otra posibilidad en que podemos pensar es que con FCCP la levadura sea incapaz de captar tanto beta pineno como cuando está energizada, en este caso, nos encontraríamos con un fenómeno curioso, pues el beta pineno carece de carga que sea atraída por la energización de la membrana plasmática y habría que postular un mecanismo de transporte dependiente de energía, muy específico para esta molécula.

De cualquier manera, con los datos anteriores podemos concluir que el beta pineno interfiere con el metabolismo de las levaduras íntegras, probablemente a nivel mitocondrial y también es evidente la importancia de la

relación entre las concentraciones de beta pineno y la levadura o la mitocondria. Debido a que en los parámetros en que se observa inhibición tienen probablemente una relación muy estrecha con la fluidez de la membrana, que modularía su velocidad. Creemos que existe cierta posibilidad de que el beta pineno esté actuando como modificador de la matriz fosfolipídica de la membrana de un modo muy parecido al que ha sido propuesto para otras moléculas (Clement y Gould 1981, Pringle y Miller 1979). Para probar esta posibilidad pensamos estudiar en membranas modelo, posibles modificaciones en la bicapa fosfolipídica, provocadas por el beta pineno mediante polarización de fluorescencia usando marcadores como el difenil hexatrieno.

Planeamos también estudiar otros monoterpenos alelopáticos, para así poder establecer si existe un mecanismo común en su actividad como inhibidores del metabolismo de las levaduras.

CONCLUSIONES

El beta pineno inhibe el metabolismo de las levaduras, en una forma que sugiere fuertemente que el sitio de acción de esta molécula es la mitocondria.

En mitocondrias aisladas se observan diferentes efectos que dependen de la concentración de beta pineno utilizada. El fosfato protege parcialmente a la mitocondria de estos efectos.

Con 100 μM de beta pineno la actividad de la ATPasa se ve estimulada y este aumento de actividad no desaparece a concentraciones mayores probadas. El potencial transmembranal también disminuye en ausencia de fosfato.

Con 200 μM de beta pineno y succinato como sustrato hay un efecto desacoplante, aún en presencia de fosfato y la permeabilidad de la membrana al potasio aumenta.

Con 400 μM de beta pineno se presenta inhibición de la respiración sostenida por sustratos de primer sitio que parece revertirse al aumentar la permeabilidad al potasio y con 600 μM se inhibe también la de sustratos de segundo sitio.

Todos los efectos del beta pineno parecen ejercerse sobre procesos estrechamente relacionados con la membrana, sea en su integridad o en su fluidez. Por ello pensamos que la molécula puede tener su sitio de acción en la matriz fosfolipídica de la membrana.

PERSPECTIVAS

Como se mencionó durante la discusión, deseamos seguir estudiando el efecto del beta pineno sobre las membranas, la permeabilidad al potasio que provoca en la mitocondria, así como, la aparente recuperación de la impermeabilidad a mayores concentraciones de beta pineno.

También queremos estudiar otras sustancias alelopáticas del grupo de los monoterpenos y tratar de definir un mecanismo general de actividad como inhibidores del metabolismo.

A largo plazo sentar parámetros para estudiar estas moléculas como herbicidas potenciales, utilizables en la agricultura.

B I B L I O G R A F I A

- Akerman, R. y Winkström, M. (1976) FEBS letters 68, 2:191-197.
- Asplund, O. (1968) Phytochemistry 7:1995-1997.
- Clement, N y Gould, M. (1981) Biochem. 20, 6:1539-1543.
- Chou, CH. y Waller, G. (1980) J. Chem. Ecol. 6, 3:643-654.
- Chou, Ch. y Waller, G. (1980-A) Bot. Bull. Acad. Scien. 21:25-34.
- De Klöet, S., Van Wermeskerken, R. y Koningsberger, V. (1961) Bioch. Bioph. Acta 47:138-143.
- Muller, W., Lober, P., Haley, B. y Johnson, K. (1969) Bull. of the Torrey Bot. Club, 96, 1:89-95.
- Murphy, J. y Kies, M. (1960) Bioch. Bioph. Acta, 45:382-384.
- Peña, A., Cinco, G., Gómez-Puyou, A. y Tuena, M. (1972) Arch. Bioch. Bioph. 153:413-425.
- Peña, A. y Ramírez, G. (1975) J. Mem. Biol. 22:369-384.
- Peña, A., Chávez, B., Cárabez, A. y Tuena, M. (1977) Arch. Biochem. Bioph. 180:522-529.
- Peña, A., Piña, E., Escamilla, E. y Piña, E. (1977-A) FEBS letters 80, 1:209-213.
- Peña, A., Mora, M. y Carrasco, N. (1979) J. Mem. Biol. 47:261-284.
- Peña, A., Clemente, M., Borbolla, M., Carrasco, N. y Uribe, S. (1980) Arch. Bioch. Bioph., 201, 2:420-428.
- Pringle, M. y Miller, R. (1979) Biochem. 18, 15:3314-3320.
- Rice, L. (1974) en Allelopathy, Rice, L. Acad. Press Inc.
- Sumner, J. B. (1944) Science 100:43-
- White, R., Franklin, R. y Agosin, M. (1979) Pesticide Bioch. y Physiology 10:233-242.

ABREVIATURAS:

EDTA .- Acido etilendiamintetra acético

Tris .- Tris(hidroxi metil) amino metano.

ADP.- Adenosin difosfato.

ATP.- Adenosin trifosfato.

DMF.- Dimetilformamida

FCGP.- Trifluorometoxicarbonilcianida fenilhidrazona.

MES.- Acido 2(N-Morfolino) etano sulfónico.

NAD .- Nicotinamida adenín dinucleótido.