

29  
303



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CARACTERIZACION DEL EFECTO DEL GOSSYPOL  
SOBRE LAS REACCIONES LUMINOSAS DE LA  
FOTOSINTESIS EN CLOROPLASTOS DE CHICHARO  
(Pisum Sativum) in vitro.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**Q U I M I C A**

P R E S E N T A :

**XOCHITL PEREZ MARTINEZ**



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1994



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 está 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.



Jurado asignado

EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUÍMICA

Presidente: Dr. Blas Lotina Hennsen  
Vocal: Dra. Noráh Yolanda Barba Behrens  
Secretario: Dr. José Manuel Méndez Stivalet  
1er. suplente: Dra. Marina Gavilanes Ruiz  
2do. suplente: Dra. Rachel Mata Essayag

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 115 del Departamento de Bioquímica de la División  
de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, UNAM

Asesor:

Dr. Blas Lotina Hennsen

(Fm. Blas Lotina)

Sustentante:

Xochitl Pérez Martínez

[Firma]

*Quisiera que estuvieras aquí, que pudieras leer mi tesis,  
que pudieras seguir compartiendo conmigo este camino  
que aún permanece lleno de aquellos sueños e ilusiones,  
de aquellas alegrías y satisfacciones, de aquella  
incertidumbre y angustia, de aquel temor. Ahora sólo  
estoy yo para seguir adelante.*

*¿Porqué no puedo platicar contigo, llorar contigo?*

*¿Porqué no estás aquí? ¿Porqué tenía que ser así?*

*Te extraño, y sin embargo no sé si pudo ser de otro modo.*

*Te extraño, y sin embargo no puedo hacer nada,  
nada.*

*Yo sólo quisiera que estuvieras aquí.*



*Dedico este trabajo a mi mamá y a mi papá, quienes han permanecido siempre en los momentos más importantes de mi vida, en los más hermosos y los más difíciles.*

*A mi hermana Nanui, porque si no hubiera estado ella todos estos años para brindarme compañía, cariño, apoyo y para pelearse conmigo ¿qué sabor hubiera tenido la vida en familia?*

*A los Q'89 con quienes compartí toda una carrera llena de alegrías, sufrimientos y satisfacciones, y a quienes por cierto quiero mucho: Paty, Estrella, Toño, Julio, Bernardo, Hugazo, Rubén y Ernesto.*

*A los polímeros de aquellos gloriosos tiempos en que lo más importante era estar juntos: Marco, Alicia, Jorge, Carlos, Tomás, Virgilio, Erich, Águeda, Pepe, Lobsang, Fernando, Ceci, Maripás, Adina.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México, por el orgullo de formar parte de ella.*

*Y finalmente, quiero dedicar este trabajo a esas cosas color verde mejor conocidas como "plantas", y que la mayor parte del tiempo ignoramos excepto cuando buscamos sombra en un caluroso día de verano. ¿Quién podía imaginar que al invadir un poco de sus intimidades iba yo a encontrarme con un mundo complejo, perfecto y maravilloso?*

## AGRADECIMIENTOS

*Al Dr. Blas Lotina, porque a través de él pude conocer este mundo color verde, y por el tiempo en que se preocupó por mi formación.*

*A la Dra. Noráh Barba, a la Dra. Marina Gavilanes y al Dr. José Manuel Méndez, por su importante contribución a este trabajo mediante la revisión que hicieron de mi tesis. A la Dra. Silvia Castillo y a Sigfrido Escalante por hacer posible la impresión de este trabajo.*

*A la Biól. Patricia Fierro, por sufrir conmigo y con los chicharos por las inclemencias del tiempo.*

*A Bety, José Luis, Gaby, Emanuel, Haydeé, Silvia, Leslie, al Dr. Rogelio, Fermín, Sobeida, Oscar, Socorro, Alejandro, Carlos, Helen, Antonio, Mireya, Elisa, Alicia, a la Dra. Adriana y a todos los habitantes del Departamento, por hacer que la vida sea más agradable en este lejano rincón de Ciudad Universitaria.*

*Muy especialmente, agradezco a Gerardo Ferrer Sueta, por todo el tiempo que le dedicó a esta chillona, por el apoyo incondicional que siempre me brindó, y porque hay cosas en este mundo que simplemente forman parte de un tesoro invaluable.*

*A Champi, por darme hospedaje en el lejano Cuautitlán para que pudiera jugar con el gossypol, el SQUAD y el TRIANG.*

*Al proyecto del CONACyT 1106-E9201 y al subprograma 127 de formación de investigadores por el apoyo proporcionado durante el desarrollo de esta tesis.*

*A la Sociedad Mexicana de Bioquímica y al proyecto de PADEP 005014, por darme las facilidades para asistir al VIII Congreso de Bioenergética y Biomembranas.*

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	1
<b>2. OBJETIVOS.</b>	5
<b>3. ANTECEDENTES.</b>	
A. FOTOSÍNTESIS Y EL CLOROPLASTO.	8
B. REACCIONES LUMINOSAS DE LA FOTOSÍNTESIS.	
I. GENERALIDADES.	10
II. CAPTACIÓN DE LUZ.	10
III. TRANSPORTE DE ELECTRONES.	12
IV. GENERACIÓN DEL POTENCIAL ELECTROQUÍMICO Y SÍNTESIS DE ATP.	14
C. COMPUESTOS QUE AFECTAN A LA FOTOSÍNTESIS.	
I. INHIBIDORES DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES.	18
II. INHIBIDORES DE LA TRANSFERENCIA DE ENERGÍA.	18
III. DESACOPLANTES.	19
IV. ACEPTORES DE ELECTRONES.	20
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	21
<b>5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.</b>	
I. TRANSPORTE DE ELECTRONES.	29
II. CAPTACIÓN DE PROTONES Y SÍNTESIS DE ATP.	40
III. $Mg^{2+}$ -ATPasa.	43
IV. REACCIONES PARCIALES DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES.	45
V. COMPORTAMIENTO ÁCIDO-BASE DEL GOSSYPOL EN MEDIOS ACUOSOS Y NO ACUOSOS.	51
VI. DISCUSIÓN GENERAL.	58
<b>6. CONCLUSIONES.</b>	62
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.</b>	64
<b>8. APÉNDICE: ABREVIATURAS EMPLEADAS.</b>	68

# ***INTRODUCCIÓN***

## 1. Introducción.

El gossypol (1,1',6,6',7,7'-hexahidroxi-3,3'-dimetil-5,5'-diisopropil-2,2'-binaftil-8,8'-dialdehído)(Fig. 1.1) es un pigmento polifenólico que está presente en las glándulas pigmentarias de hojas, tallo, raíz y principalmente en semillas de la planta de algodón del género *Gossypium*. Por lo menos otros catorce pigmentos están presentes, pero su concentración es despreciable comparada con la del gossypol. Pondey y Thejapa reportan en 1975 un contenido promedio del pigmento de 1.32% en la semilla de la especie *G. hirsutum*, mientras que Carter reporta en 1966 que el contenido de gossypol en algunas especies llega a ser de un 9% (1).

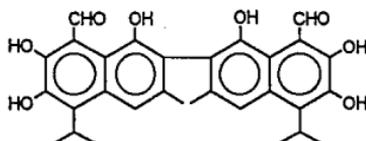


Figura 1.1. Estructura del gossypol.

El gossypol generalmente se aísla de la semilla del algodón como una mezcla de isómeros (+) y (-) por extracción con 2-butanona, precipitando posteriormente con ácido acético y recristalizando con una mezcla ácido acético-2-butanona, obteniéndose el complejo gossypol-ácido acético con más del 98% de pureza (2).

En la década de los 60's se encontró que el gossypol causaba esterilidad reversible en machos de diversas especies, incluyendo al ser humano (3). A partir de este descubrimiento se ha estimulado la investigación en torno a este compuesto con la finalidad de entender su sitio y mecanismo de acción, su farmacocinética, reacciones adversas y su toxicidad. El mecanismo de acción preciso no se conoce aún, sin embargo, evidencias de estudios *in vivo* e *in vitro* indican que es capaz de inhibir muchas enzimas (4), algunas de ellas asociadas a la membrana (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Inhibición de enzimas y de procesos biológicos por gossypol.

Enzimas inhibidas	
$\alpha$ cetoglutarato deshidrogenasa.	Aconitasa.
Succinil deshidrogenasa.	Lactato deshidrogenasa x.
NAD-isocitrato deshidrogenasa.	Succinil-CoA sintetasa.
ATPasa dependiente de $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Ca}^{2+}$ .	Pepsinógeno.
$\text{Mg}^{2+}$ -ATPasa malato deshidrogenasa.	Cinasa dependiente de $\text{Ca}^{2+}$ .
Piruvato deshidrogenasa.	Glutación-S-transferasa.
Araquinodato 5 y 12-lipoxigenasas.	Adenilato ciclasa.

Procesos inhibidos	
Espmatogénesis.	Síntesis de ADN.
Síntesis de proteínas.	Utilización de glucosa.
Movilidad y maduración del espermatozoide.	Biosíntesis de progesterona.

Aparte de su importancia como agente anticonceptivo en hombres, se ha encontrado que el gossypol tiene un efecto inhibitorio en la proliferación de células cancerígenas *in vivo* e *in vitro* (7); además, se ha encontrado que es un potente inhibidor de la aldosa reductasa, enzima que se ha propuesto que interviene en el desarrollo de las complicaciones renales y visuales que acompañan a la diabetes mellitus, en donde esta enzima se encuentra aumentada (8).

Por otro lado, estudios realizados con gossypol radiactivo indican que mitocondrias aisladas de células testiculares incorporan más compuesto que otros organelos. Así, uno de los efectos más importantes del gossypol en sistemas biológicos es su habilidad para desacoplar la fosforilación oxidativa mitocondrial (5, 6), inhibiendo el metabolismo energético de la célula.

## 1. Introducción.

Aunque la semilla del algodón es un subproducto de la planta, su procesamiento tiene gran importancia ya que se puede obtener aceite, alimento, y borra entre otros. Aparte de las dificultades que se tienen por la presencia del gossypol, se ha incrementado el interés por la semilla ya que tiene un alto valor nutritivo como complemento proteico.

No existe la duda de que el gossypol es un compuesto tóxico en humanos que en la actualidad se considera como desecho. Sin embargo, las grandes cantidades de gossypol potencialmente disponible (se estima que por 25 millones de toneladas de semilla se obtienen 78000 toneladas del compuesto) y la gran variedad de derivados que se pueden preparar, ha llevado a crear interés en su utilización. Así se han propuesto los siguientes usos:

Como colorante al diazonizarse con aminas aromáticas.

En lubricantes.

Como antioxidante.

Como estabilizador de compuestos vinílicos para prevenir su polimerización.

Para análisis cualitativo y cuantitativo de algunos metales (molibdeno, uranio, niobio, vanadio y titanio).

En la industria farmacéutica.

Como insecticida.

Inhibiendo el crecimiento de algunos microorganismos.

Sin embargo, no existe ningún estudio acerca del efecto que el gossypol puede tener sobre las plantas, y de su posible utilización como herbicida natural. En este trabajo se caracterizarán algunas propiedades del gossypol sobre uno de los procesos fundamentales en la planta, la fotosíntesis.

# ***OBJETIVOS***

Este trabajo tiene como finalidad identificar el efecto del gossypol sobre la fase luminosa de la fotosíntesis a través del manejo de diversas técnicas experimentales para:

⇒ Contribuir a la comprensión de los procesos de transducción de energía en membranas fotosintéticas y postular una posible relación con la actividad del compuesto y su acción sobre otras membranas transductoras de energía.

⇒ Ampliar el estudio sistemático de los compuestos que afectan a la fotosíntesis y que pueden presentar actividad como herbicidas.

⇒ Contribuir al estudio de la acción del gossypol sobre varios sistemas metabólicos, y de esta forma aportar información para la comprensión de sus mecanismos de acción y de sus posibles aplicaciones sobre sistemas biológicos.

# ***ANTECEDENTES***

## A. FOTOSÍNTESIS Y EL CLOROPLASTO.

La **fotosíntesis** es el proceso mediante el cual algunos organismos utilizan la energía de la radiación electromagnética del sol para sintetizar material orgánico a partir de  $\text{CO}_2$  y agua. Sus principales productos son glucosa, almidón y celulosa, además de producir  $\text{O}_2$  por descomposición del agua. La fotosíntesis puede dividirse en dos procesos conocidos como fase luminosa y fase oscura (o procesos secundarios). En la primera se producen  $\text{O}_2$ , NADPH, y ATP. Los dos últimos compuestos son utilizados en la fase oscura para reducir el  $\text{CO}_2$  ambiental y transformarlo principalmente en carbohidratos.

La maquinaria enzimática del proceso de fotosíntesis se localiza en unos organelos conocidos como **cloroplastos** (Fig. 3.1). En las plantas superiores, estos organelos son cuerpos elipsoidales verdes con un diámetro de 4 a 10  $\mu\text{m}$  y de 2 a 3  $\mu\text{m}$  de ancho. Cada uno se delimita del citoplasma por una envoltura de dos membranas que contienen a la matriz hidrofílica o estroma, el cual posee DNA, ribosomas, plastoglóbulos, aminoácidos, nucleótidos, ácidos orgánicos, carbohidratos, iones y por lo menos 200 tipos de proteínas.

Dentro del estroma hay una serie de sacos llamados **tilacoides**, los cuales se acumulan en pilas llamadas grana que están interconectadas con membranas llamadas interlamelas(9). Las células de plantas superiores generalmente tienen entre 50 y 200 cloroplastos cada una.

La membrana tilacoidal contiene lípidos y proteínas en proporción aproximada de uno a uno. Esta contiene principalmente glucolípidos y lipoproteínas formando generalmente complejos con la clorofila (Tabla 3.1). La fase luminosa de la fotosíntesis se lleva a cabo en las membranas tilacoidales, mientras que las enzimas que fijan el  $\text{CO}_2$  y lo reducen, se localizan en el estroma.

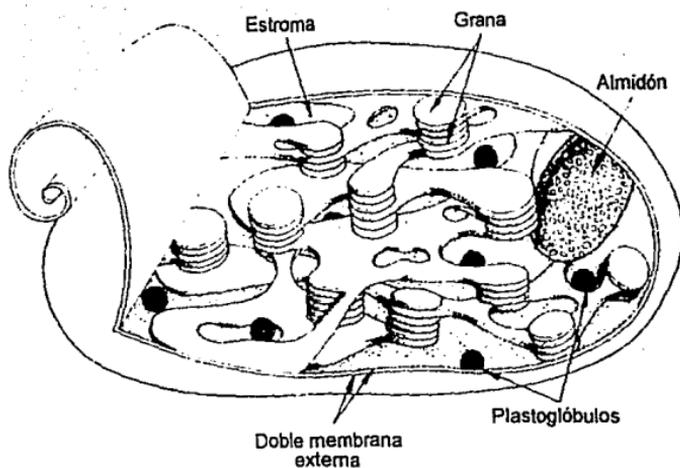


Figura 3.1. Representación de la estructura de un cloroplasto.

Tabla 3.1. Principales componentes lipídicos de la membrana tilacoidal (10).

Lípidos.	% en peso.	moles / 100 moles de clorofila.
Clorofila	20-22	100
Carotenoides	3	22
Galactolípidos	40-50	200-300
Sulfoquinovosil diglicérido	≈ 5	20-25
Fosfatidil glicerol	≈ 5	20-30
Plastoquinonas	≈ 3	20
No identificados	≈ 12	

## B. REACCIONES LUMINOSAS DE LA FOTOSÍNTESIS.

### I. GENERALIDADES.

Primero, la luz es absorbida por *pigmentos antena* (clorofilas y carotenos) y transferida a centros de reacción fotoquímicos. A continuación se lleva a cabo un transporte de electrones desde agua hasta  $\text{NADP}^+$  a través de una serie de componentes multienzimáticos. Acoplada a estos eventos, está la formación de un gradiente de protones a través de la membrana tilacoidal, el cual es utilizado para la fotofosforilación del ADP con ortofosfato catalizada por la  $\text{H}^+$ -ATPasa.

El poder reductor del NADPH producido se utiliza directamente para los procesos secundarios, mientras que la diferencia de potencial electroquímico de protones se convierte en ATP que ahora será utilizado en la fijación de  $\text{CO}_2$ . De esta manera, la intervención de los pigmentos antena, el transporte de electrones y el potencial electroquímico generado, están acoplados entre sí.

Cada cadena transportadora de electrones se considera como una unidad fotoquímica o *fotosistema* y se compone de proteínas, acarreadores de electrones, pigmentos antena y un centro de reacción. En las plantas superiores se conocen dos fotosistemas: el fotosistema I (FSI) y el fotosistema II (FSII).

### II. CAPTACIÓN DE LUZ.

En las plantas superiores la luz es absorbida por unos pigmentos específicos entre los cuales se encuentra la clorofila a y la clorofila b (Fig.3.2). Los otros pigmentos de importancia que existen son los carotenoides.

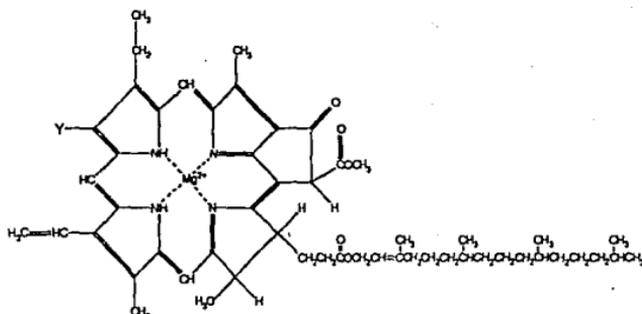


Figura 3.2. Estructura de la clorofila donde  $Y = \text{CH}_3$  y  $\text{CHO}$  para la clorofila a y b respectivamente.

Las clorofilas y carotenoides conocidos como *pigmentos antena* tienen la función de absorber luz y canalizar su energía a los centros de reacción. Estos centros contienen moléculas de clorofila formando generalmente dímeros. Ahora bien, cuando una molécula de clorofila absorbe un cuanto de luz, esta eleva su energía y desplaza uno de sus electrones a un nivel energético mayor. La molécula puede disipar esa energía por diferentes mecanismos (11), siendo los más importantes:

- 1) La transferencia de su energía a otra molécula de clorofila cuando su electrón excitado cae al estado basal; entonces esta energía se utiliza para elevar al estado excitado a un electrón de una molécula vecina. El mecanismo preciso es muy complejo y en parte depende de la distancia entre las moléculas; así, la eficiencia de transferencia es casi del 100% cuando las clorofilas están a 2.5 nm, y decrece en un 50% a 7.5 nm. Los pigmentos cosechadores de luz disipan su energía de esta forma. Los fotones absorbidos pasan de una molécula a otra hasta que alcanzan a los pigmentos de los centros de reacción.

2) Una molécula de clorofila excitada puede regresar a su estado basal realizando trabajo en una reacción química que generalmente involucra la pérdida de un electrón de la molécula de pigmento. La clorofila de los centros de reacción disipa su energía de esta forma. Se conocen dos centros de reacción en las plantas superiores, P<sub>680</sub> y P<sub>700</sub> para el FSII y el FSI respectivamente. La pérdida de un electrón en la clorofila deja una carga neta positiva que se cubre con un electrón proveniente de alguna molécula donadora. En el FSII los electrones provienen de la oxidación del agua, mientras que en el FSI la donadora de electrones es la plastocianina (Fig. 3.3).

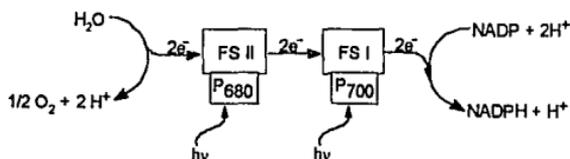


Figura 3.3. Se presenta la manera en que están conectados los dos fotosistemas y los centros de reacción en la cadena redox.

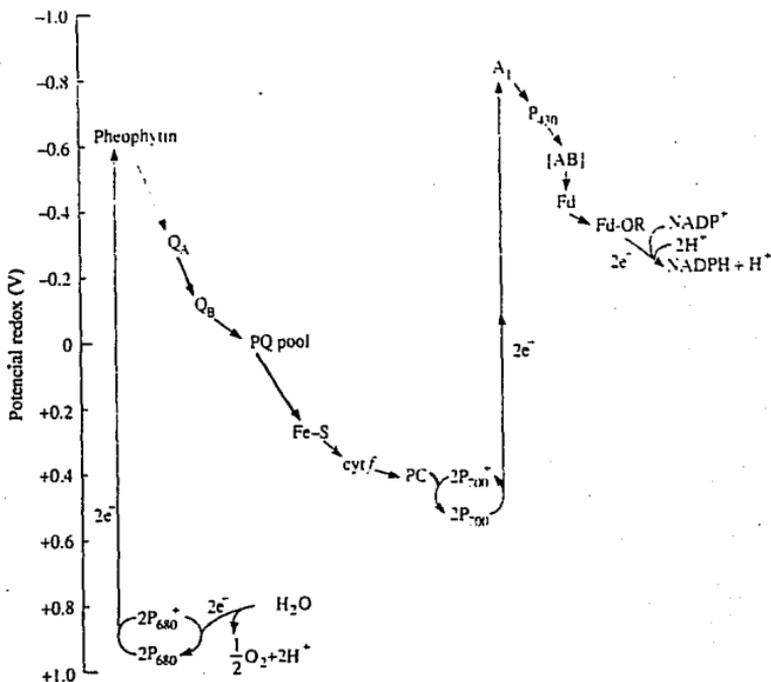
### III TRANSPORTE DE ELECTRONES.

La transferencia de electrones de agua a NADP involucra un gran número de componentes multienzimáticos. La secuencia en que estos operan se representa en el *esquema Z* de la figura 3.4 (11).

Cuando el centro de reacción del FSII interacciona con la luz, se genera un estado  $\text{P}_{680}^+$  que debe regresar a  $\text{P}_{680}$  para continuar con las fotorreacciones. La reducción de  $\text{P}_{680}^+$  se lleva a cabo cuando el agua cede electrones mediante la siguiente reacción:



El complejo de fotólisis del agua contiene *in vivo* por lo menos 20 polipéptidos (12). El sitio de oxidación del agua está formado por cuatro iones Mn con números de oxidación que varían entre 2+ y 4+ durante el proceso de descomposición del agua, 2 a 3 iones  $\text{Ca}^{2+}$  y varios cloruros.



**Figura 3.4.** Esquema Z del transporte de electrones en la fotosíntesis. La *feofitina* es un derivado de la clorofila a que carece del magnesio central;  $Q_A$ ;  $Q_B$  y la plastoquinona (PQ) son quinonas. De PQ los electrones se transfieren a un complejo que contiene citocromo f, citocromo  $b_{583}$  y una proteína Fe-S; La *plastocianina* (PC), es una proteína que tiene cobre en su sitio activo. A1 es una clorofila que se une débilmente a  $P_{700}$ , mientras que las proteínas  $P_{430}$ , A y B ([AB]) y la *ferredoxina* (Fd) tienen Fe-S en su sitio activo. Esta última reduce al  $\text{NADP}^+$  del estroma en una reacción catalizada por la *ferredoxina:NADP<sup>+</sup> oxidoreductasa*.

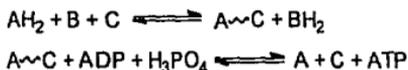
#### IV. GENERACIÓN DEL POTENCIAL ELECTROQUÍMICO Y SÍNTESIS DE ATP.

##### 1. HIPÓTESIS QUE EXPLICAN LA SÍNTESIS DE ATP.

Existen varios modelos que explican la forma en que el transporte de electrones se acopla a la síntesis de ATP en mitocondrias, cloroplastos y bacterias. Los más importantes se enlistan a continuación:

##### *Hipótesis de fosforilación de E. C. Slater. (13)*

Se propone la formación de un intermediario de alta energía. La ruptura de su enlace se acopla a la formación de ATP mediante el siguiente mecanismo:



Donde  $\text{AH}_2$  y B son miembros adyacentes de la cadena respiratoria y C es un componente requerido para su interacción. Sin embargo, al paso de los años no se pudo identificar al intermediario de alta energía y esta hipótesis fue reemplazada por otros modelos.

##### *Hipótesis quimiosmótica de Mitchell. (14)*

Este modelo se basa en los siguientes puntos:

⇒ La cadena de transporte de electrones tiene una distribución asimétrica en la membrana de tal forma que se acopla a una translocación de protones (bomba primaria de protones), dando lugar a un gradiente electroquímico de protones que contiene dos partes: un potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ) y un  $\Delta\text{pH}$ , y que se define de acuerdo a la siguiente ecuación: (15)

$$\Delta\mu_{\text{H}^+} = F\Delta\psi - 2.3RT\Delta\text{pH}$$

Esta fuerza protón motriz es usada por la enzima  $H^+$ -ATPasa para sintetizar ATP, y al hacerlo trasloca protones en sentido opuesto (bomba secundaria de protones) a la cadena redox. La  $H^+$ -ATPasa se encuentra localizada asimétricamente en la membrana y en sentido contrario al flujo de protones de la cadena redox.

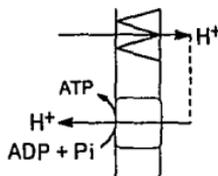


Figura 3.5. Circuito de protones en membranas transductoras de energía.

⇒ Para el acoplamiento quimiosmótico se requiere que la membrana sea impermeable a los  $H^+$ .

⇒ Las membranas transductoras de energía tienen translocadores de sustratos y de iones que se acoplan al transporte de protones.

⇒ El acoplamiento de la fosforilación al transporte de electrones causa un estrés mecánico y eléctrico considerable a través de la membrana, de tal forma que el acoplamiento se afecta y varía. Es de esperarse hinchamiento o encogimiento de la membrana acompañando a la actividad del sistema.

Esta hipótesis contiene postulados adicionales que tienen relación con la estequiometría y mecanismos precisos de síntesis de ATP. Sin embargo los puntos anteriores son los fundamentales. De hecho, esta hipótesis es en la actualidad aceptada en general como el mejor modelo para explicar la transducción de energía en las biomembranas, y ha llegado a ser el dogma central de la bioenergética, aunque aún es motivo de debate la estequiometría del transporte de protones y la reacción catalítica de la bomba secundaria, así como el mecanismo preciso de fosforilación del ADP.

### ***Modelo del cambio conformacional de Boyer. (16)***

Este modelo presenta otra alternativa a través de la cual el  $\Delta\mu_{H^+}$  puede utilizarse en la síntesis de ATP: Al formarse un  $\Delta\Psi$  y un  $\Delta pH$ , se favorece el movimiento de grupos cargados de la membrana de un lado a otro de la misma; estos grupos podrían ser carboxilos en una proteína.

Ahora bien, si el movimiento de estos grupos se asocia a cambios conformacionales en la ATPasa, la afinidad del ADP, Pi y ATP por el sitio catalítico se modifica dando como resultado la síntesis de ATP.

### ***Hipótesis de Westerhoff et al. del acoplamiento de mosaico protónico localizado. (17)***

En la hipótesis quimiosmótica las fases acuosas donde los protones se translocan son homogéneas y por lo tanto existe una difusión libre de estos protones en toda el medio acuoso. Este modelo se basa en los postulados básicos de la hipótesis quimiosmótica, pero en esta propuesta los protones no se difunden libremente desde su sitio de translocación hacia el resto de la fase acuosa en el organelo, sino que permanecen en una región cercana a la bomba primaria de  $H^+$  y a la ATPasa, y como consecuencia, cada sitio de acoplamiento en la membrana actúa independientemente.

## **2. GENERACIÓN DEL GRADIENTE DE PROTONES.**

Los componentes de la cadena transportadora de electrones se encuentran distribuidos de manera heterogénea en el espesor de la membrana tilacoidal de acuerdo a la figura 3.6. Como resultado de esta distribución, el movimiento de electrones ocasiona un flujo de protones hacia el interior del tilacoide generando un  $\Delta\mu_{H^+}$ .

La oxidación de dos moléculas de agua libera cuatro protones dentro del tilacoide. Cuando dos electrones llegan a PQ, esta toma dos protones del estroma y se reduce a plastoquinol ( $PQH_2$ ). Posteriormente los libera en el espacio intratilacoidal cuando se oxida nuevamente a PQ (11).

### 3. ATP SINTETASA.

Es el complejo multienzimático que se encarga de sintetizar ATP a partir de ADP y Pi como resultado del acoplamiento con el transporte de electrones. Esta enzima se localiza en la membrana tilacoidal y está formada de dos partes:

⇒ Una porción hidrofóbica conocida como CF<sub>0</sub> que se encuentra embebida en la membrana y que al parecer funciona como canal específico de salida de protones durante la actividad de la ATPasa. Se han identificado 3 subunidades conocidas como I, II, y III. (18).

⇒ Una porción hidrofílica conocida como CF<sub>1</sub> que se localiza en la superficie estromal de la membrana. Esta parte se compone de 5 subunidades diferentes con estequiometría  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$  (19). CF<sub>1</sub> es la enzima que cataliza la síntesis de ATP en respuesta al  $\Delta pH$  generado al iluminar a los cloroplastos. La enzima sufre entonces un cambio conformacional respecto a las subunidades  $\gamma$  y  $\epsilon$  que al parecer participan en su activación (20). El sitio activo se localiza en la subunidad  $\beta$  o entre  $\alpha$  y  $\beta$ . (21)

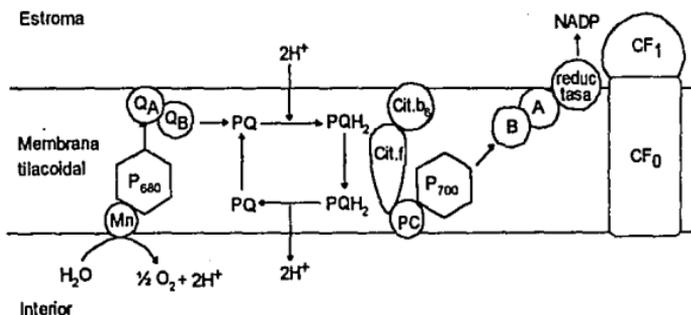


Figura 3.6. Distribución de los intermediarios de la cadena de transporte de electrones en la membrana tilacoidal.

## C. COMPUESTOS QUE AFECTAN A LA FOTOSÍNTESIS.

Existen compuestos que pueden afectar las reacciones luminosas de la fotosíntesis de diferentes maneras. Estos compuestos se clasifican de la siguiente forma: (22)

### I. INHIBIDORES DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES.

Estos compuestos inhiben el transporte de electrones en presencia y ausencia de ADP y Pi o en presencia de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como desacoplante, así como la síntesis de ATP al afectar a uno o más intermediarios de la cadena fotosintética. En la tabla 3.2 se presenta una lista de los inhibidores más estudiados.

Tabla 3.2. Inhibidores de la fotosíntesis.

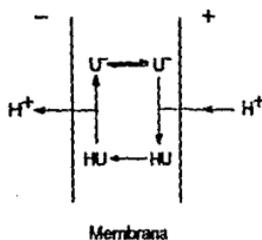
Inhibidor	Sitio de acción	Referencia
Hidroxilamina Tris	Fotólisis del agua	23, 24
DCMU	Entre $Q_A$ y $Q_B$	25
DBMIB	PQ	22
EDAC	Entre PQ y Cit f	26
KCN	PC	27
DSPD	Complejo ferredoxina	26

### II. INHIBIDORES DE LA TRANSFERENCIA DE ENERGÍA.

Son compuestos que afectan directamente a la enzima que se encarga de llevar a cabo la fotofosforilación al interferir con la actividad catalítica de  $\text{CF}_1$  o  $\text{CF}_0$ . Esta inhibición no tiene efecto sobre la velocidad de transporte de electrones en ausencia de ADP y fosfato y con desacoplantes, así como la magnitud del gradiente de protones. Algunos ejemplos son NEM (28), DCCD (29) y Dio-9 (30).

### III. DESACOPLANTES.

Son compuestos que eliminan el acoplamiento que existe entre el transporte de electrones y la fosforilación; no inhiben el transporte de electrones pero la síntesis de ATP es sensible a estos compuestos ya que disipan el gradiente electroquímico de protones. De acuerdo a la hipótesis quimiosmótica, los desacoplantes son ácidos débiles y lipofílicos que colapsan el potencial electroquímico de protones al transferirlos de un lado al otro de la membrana transdutora de energía. Los compuestos que desacoplan de esta forma se conocen como **protonóforos**. Aunque los desacoplantes se han utilizado ampliamente, su mecanismo de acción detallado no se conoce con precisión. El modelo más simple es el que muestra la figura 3.7 (31) y se basa en el esquema original de Mitchell.



**Figura 3.7.** Mecanismo protonóforo para desacoplantes que son ácidos débiles: La forma aniónica del desacoplante se adsorbe en la interfase membranal y se protona para formar la especie neutra. Esta cruza la membrana y libera el protón en la fase acuosa para formar la especie básica la cual se mueve hacia la interfase membranal positiva. De esta forma se cierra el circuito protonóforo dando como resultado la disipación del  $\Delta pH$ .

Los desacoplantes estimulan el transporte de electrones en ausencia y presencia de ADP y Pi, abaten el  $\Delta pH$ , el  $\Delta \Psi$  y la síntesis de ATP, estimulan la hidrólisis de ATP y eliminan el efecto de los inhibidores de la transferencia de energía (32).

Sin embargo, existen compuestos que no tienen un grupo ácido y que también inducen desacoplamiento, aunque son menos potentes que los protonóforos y requieren concentraciones mayores. Tal es el caso de algunos compuestos catiónicos e hidrofóbicos como los colorantes tri-S-C<sub>4</sub> y tri-S-C<sub>7</sub> y el complejo (o-fenantrolina)<sub>2</sub>-Cu<sup>2+</sup> que requieren Pi para desacoplar la fosforilación oxidativa, y que modifican una proteína de 29 KDa presente en la H<sup>+</sup>-ATPasa de mitocondrias de hígado de rata (33).

Hay compuestos que inducen desacoplamiento que prácticamente no afecta al  $\Delta \mu H^+$  medido en mitocondrias y cloroplastos. Tal es el caso de algunos ácidos grasos y detergentes no iónicos (34), que probablemente disipan sólo a los protones que están ocluidos en las regiones de la membrana cercanas a la ATPasa o bomba secundaria.

#### IV. ACEPTORES DE ELECTRONES.

Son compuestos que compiten con algunos intermediarios de la cadena de transporte de electrones para reducirse. Algunos de estos son empleados para estudiar reacciones parciales de la fotosíntesis; tal es el caso del ferricianuro de potasio y el PMS (35).

Algunos compuestos como el Diquat o el metilviológeno interfieren con el aceptor del PSI y presentan actividad herbicida dando como resultado la desviación del transporte de electrones de su camino natural (36).

***MATERIALES***

***Y***

***MÉTODOS***

## MATERIAL BIOLÓGICO.

Se trabajó con hojas de plantas de chícharo (*Pisum sativum*) de la variedad *Perfection*. Se utilizaron lotes con tres a cuatro semanas de crecimiento con un fotoperíodo de 10 horas.

## AISLAMIENTO DE CLOROPLASTOS.

El proceso de aislamiento de cloroplastos debe llevarse a cabo en frío y en la obscuridad. Los cloroplastos aislados de esta forma se emplearon en todos los experimentos realizados excepto en la prueba de la actividad de la  $Mg^{2+}$ -ATPasa. Los cloroplastos clase I (cloroplastos con la doble membrana externa íntegra) se aislaron a partir de 30 g de hojas de chícharo; estos se lavaron con agua destilada y se homogeneizaron por 5 segundos en un vaso de licuadora con 150 ml de un medio que contiene sacarosa 400 mM,  $MgCl_2$  5mM, KCl 20 mM y tricina 30 mM a pH 8. Este homogenado se filtró con 20 capas de gasa previamente humedecida con el medio de aislamiento. El filtrado se centrifugó a 4000 rpm por 5 minutos a 4°C en una centrifuga Beckman modelo J2-21 en un rotor de ángulo fijo JA-20. El sobrenadante se eliminó y los cloroplastos se resuspendieron en uno o dos ml de medio de aislamiento. Antes de comenzar los experimentos los cloroplastos se dejaron reposar en la obscuridad durante una hora.

## DETERMINACIÓN DE CLOROFILA.

La clorofila se cuantificó de acuerdo al método de Arnon (37). Se tomó una alícuota de 50  $\mu$ l de cloroplastos y se aforó a 5 ml con acetona al 80%. Esta solución se mantuvo en la obscuridad por 5 minutos para permitir la extracción y solubilización de la clorofila.

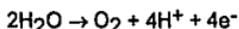
A continuación se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos en una centrifuga clínica con el fin de sedimentar proteínas y otros residuos de los cloroplastos. Al sobrenadante se le tomaron lecturas de absorbancia a 663 nm y 645 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU 7000.

El contenido de clorofila total en las muestras se determina de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$[\text{Chl}] = 8.05A_{663} + 20.29A_{645} \quad [\text{Chl}] = \mu\text{g Chl/ml}$$

#### EVALUACIÓN DE LA VELOCIDAD DE TRANSPORTE DE ELECTRONES.

El transporte de electrones (T.e.) se mide indirectamente al monitorear el oxígeno que se libera de la fotólisis del agua, ya que con la ecuación



se pueden correlacionar ambos eventos. La evolución de oxígeno se determinó con un oxímetro YSI modelo 5300 y con un electrodo de Clark. El oxímetro se conectó a un registrador gráfico Beckman.

Se emplearon 3 ml de un medio de reacción que contiene sacarosa 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, KCl 10 mM, tricina 15 mM (pH 8) y el volumen de cloroplastos equivalente a 60  $\mu\text{g}$  de clorofila. Es importante observar que el medio tiene una osmolaridad más baja que la del medio de aislamiento. Esto provoca que la membrana externa de los cloroplastos se rompa (cloroplastos clase II), dejando en solución a la ferredoxina (38) en el momento del ensayo. Por esto es necesario adicionar al medio un aceptor de electrones artificial; se empleó metil viológeno 50  $\mu\text{M}$ , el cual acepta electrones a nivel de los centros Fe-S del FSI (36).

Los cloroplastos a 25°C y bajo agitación se iluminaron con una lámpara de proyector de 250 Watts. El haz luminoso se hizo pasar a través de una botella plana con  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 2% (lente de Izawa) que sirve como filtro luminoso y de calor. La velocidad del flujo de electrones se cuantificó al adicionar al medio sin MV 10  $\mu\text{l}$  de una solución de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  40 mM como aceptor final de electrones y al iluminar a los cloroplastos por un minuto.

En este experimento se manejaron tres condiciones experimentales:

- T. e. Basal: Medio de ensayo descrito anteriormente.  
T. e. Fosforilante: Medio basal + ADP 1mM + Pi 3mM  
T. e. Desacoplado: Medio basal + NH<sub>4</sub>Cl 5mM como desacoplante.

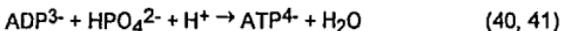
### CAPTACIÓN DE PROTONES.

El transporte de iones, particularmente de protones, está asociado a la transferencia de electrones y a la transducción de energía en el cloroplasto, así que para medir el transporte de protones en la membrana tilacoidal se empleó la técnica reportada por Dilley (39). Se registraron los cambios de pH en la solución con cloroplastos con un potenciómetro Corning Modelo 12 de escala expandida al cual se conectó un registrador gráfico y un electrodo combinado marca Orion.

Con agitación constante se iluminaron 3 ml de medio que contiene sacarosa 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, KCl 100 mM, Tricina 1 mM (pH 8), MV 50 μM y el equivalente a 60 μg de clorofila con una lámpara de proyector de 250 watts a través de una lente de Izawa. El cambio de pH se cuantificó al adicionar al medio de reacción 20 μl de solución estándar de KOH 0.01M en presencia de cloroplastos sin iluminar.

### SÍNTESIS DE ATP.

Además de medir la captación de protones de los tilacoides, la técnica anterior puede servir para medir la velocidad de fotofosforilación en los cloroplastos, ya que se sabe que a pH 8 se consume irreversiblemente un protón por cada molécula de ATP sintetizada mediante la siguiente reacción:



El medio de reacción tiene la misma composición que el empleado para medir la captación de protones, pero además tiene ADP 1mM y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3mM. La técnica experimental es igual a la citada anteriormente.

### ACTIVIDAD DE LA $Mg^{2+}$ -ATPasa

$CF_1$  tiene una actividad de ATPasa latente, por ello es necesario activar a la enzima para que hidrolize ATP. Esta activación puede llevarse a cabo modificando a la subunidad  $\gamma$ , la cual tiene un puente disulfuro que está relacionado con dicha activación tanto para la síntesis como para la hidrólisis de ATP. Al iluminar los cloroplastos se genera un  $\Delta pH$  que causa un cambio conformacional en la enzima y de esta manera se expone el puente disulfuro de  $\gamma$  a agentes reductores. En el interior del cloroplasto el reductor es un grupo ditiol que se encuentra en la tioredoxina, una proteína que sirve como donadora de electrones en varias reacciones. Esta proteína es reducida al iluminar los cloroplastos a través del sistema ferredoxina-tiorredoxina reductasa. Aparentemente la tioredoxina se aproxima lo suficiente para formar un complejo intermolecular con  $CF_1$  durante la activación reductiva del puente disulfuro en  $\gamma$ , aunque aún es desconocida la manera en que esta se compleja con  $CF_1$  en la membrana. La subunidad  $\epsilon$  aparentemente presenta impedimento estérico para que la tioredoxina se acerque a  $\gamma$ , siendo el inhibidor natural de la ATPasa (42).

El método que se empleó para cuantificar la actividad de la  $Mg^{2+}$ -ATPasa es el reportado por Mills *et al.* (43).

#### ***Aislamiento de cloroplastos.***

Se homogeneizaron plantas de chícharo en un medio con sorbitol 350 mM, ácido ascórbico 5 mM y MES 20 mM (pH 6.5).

El homogenado se centrifugó a 4850 rpm durante 60 segundos y la pastilla conteniendo a los cloroplastos se lavó con medio de resuspensión que contiene sorbitol 350 mM, EDTA 2 mM,  $MgCl_2$  1mM,  $MnCl_2$  1 mM y HEPES 50 mM (pH 7.6). Los cloroplastos se resuspendieron en la mínima cantidad de medio y se determinó la clorofila.

**Activación de  $CF_0$ - $CF_1$ .**

El medio que se empleó tiene la siguiente composición:

1. 250  $\mu$ l de sorbitol 1.2 M y tricina 100 mM (pH 8).
- 2.. 650  $\mu$ l de  $MgCl_2$  5 mM y tricina 15 mM (pH 8).
- 3.. 100  $\mu$ l de cloroplastos con 0.3 mg de clorofila aproximadamente.

Este medio se iluminó dos minutos con una lámpara de proyector de 250 watts a través de una lente de Izawa.

**Medición de la hidrólisis de ATP.**

Inmediatamente después de iluminar dos minutos se tomó una alcuota de 100  $\mu$ l de la suspensión de cloroplastos activados y se adicionaron a 0.9 ml de un medio que contiene  $MgCl_2$  2 mM,  $NH_4Cl$  1.1 mM, ATP 2.2 mM, KCl 50 mM y tricina 15 mM (pH 8). Se agitaron por un minuto en oscuridad y se paró la actividad de ATPasa con 500  $\mu$ l de TCA al 10%. El medio de reacción se centrifugó por 5 minutos a 2000 rpm en centrifuga clínica para eliminar el precipitado y determinar el fosfato liberado en el sobrenadante.

**Cuantificación de fosfato.**

Se hizo mediante el método colorimétrico de Sumner (44): A 1.4 ml del sobrenadante se agregaron 250  $\mu$ l de Molibdato de amonio al 6.6% y 400  $\mu$ l de agua destilada. A continuación se agregaron 250  $\mu$ l de ácido sulfúrico 7.5 N y se agitó la mezcla suavemente para formar el ácido fosfomolibdico. Este se redujo con 200  $\mu$ l de una solución acidulada de sulfato ferroso al 9.8% para desarrollar un color azul. La mezcla se dejó reposar 20 minutos y la absorbancia se midió a 660 nm. Se hizo una curva de calibración con  $KH_2PO_4$  seco.

### SOLUCIÓN DE GOSSYPOL.

Se trabajó con gossypol-ácido acético obtenido de *ICI Biochemicals*. Debido a su baja solubilidad en agua fué necesario preparar una solución del compuesto en una mezcla de DMF y propilén-glicol en proporción uno a uno. Es importante mantener esta solución a 4°C y en la obscuridad para evitar una descomposición prematura del compuesto. El volúmen de solución que se empleó en los experimentos fué menor al que presentaba efecto sobre las diversas actividades fotoquímicas.

### EXTRACCIÓN DE GOSSYPOL CON OCTANOL.

Se prepararon soluciones acuosas de gossypol en un medio que contiene sacarosa 100 mM, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y tricina o MES 30 mM de acuerdo al pH de trabajo. El gossypol se extrajo con un volúmen igual de octanol, agitando vigorosamente durante un minuto en una campana de extracción. Las dos fases se separaron por centrifugación a 2000 rpm en centrífuga clínica durante 5 minutos y se obtuvieron espectros UV-visible del gossypol en la fase orgánica.

### DETERMINACIÓN DEL pKa DEL GOSSYPOL.

Se prepararon soluciones de gossypol en un medio que contiene HEPES, MES, TES o tricina 30 mM de acuerdo al pH de trabajo, y se ajustó la fuerza iónica con KCl 50 mM. Se hicieron barridos UV-visible de las soluciones de gossypol a diferentes valores de pH. Los datos se alimentaron a dos programas de computación conocidos como TRIANG y SQUAD (45).

El primer programa estima la cantidad de especies que absorben radiación en el sistema a partir de los datos de absorbancia en función de la longitud de onda y del error en las lecturas de transmitancia ( $\Delta T$ ).

Al alimentar al programa SQUAD los datos espectrofotométricos, el pH de cada solución, la concentración de las mismas y la cantidad de especies que absorben, este puede estimar el (los) pKa de la especie, así como los coeficientes de absorptividad molar de las especies que absorben.

***DISCUSIÓN***  
***DE***  
***RESULTADOS***

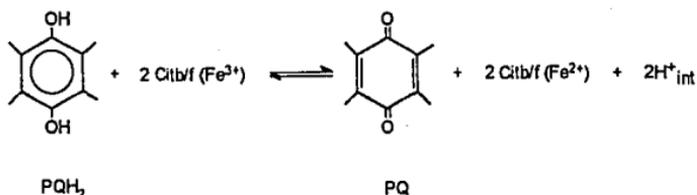
## I. TRANSPORTE DE ELECTRONES.

En la figura 5.1 se muestran los trazos obtenidos al medir la velocidad del transporte de electrones de agua a MV cuando los cloroplastos son iluminados durante un minuto. Se encontró que en la actividad basal una concentración 20  $\mu\text{M}$  de gossypol induce un incremento en la velocidad del transporte del 102.4%.

Si se considera que la transferencia de electrones y la fosforilación están "acopladas", es de esperarse que no haya síntesis de ATP si no hay transporte de electrones en cloroplastos. De igual manera, no debería haber transporte de electrones si no hay ADP y Pi en el medio de reacción para permitir la fosforilación simultánea. Sin embargo, los cloroplastos aislados siempre presentan algo de actividad residual (t.e.basal) debido probablemente a imperfecciones en el sistema membranal causadas por el proceso de aislamiento. El grado de acoplamiento depende de las condiciones para medir el transporte de electrones y del estado de los cloroplastos aislados (26). Es por esto que se observó una actividad basal que es sensible al gossypol.

Cuando se tiene ADP y Pi en el medio la velocidad de transporte de electrones es estimulada un 103.3% por gossypol 20  $\mu\text{M}$ . Esta estimulación es similar a la inducida por el compuesto en el transporte de electrones basal.

El flujo de electrones por PQ es el paso limitante del transporte de electrones de acuerdo a la reacción (10):



## 5. Discusión de resultados.

Esta reacción es sensible al pH, ya que la concentración de protones en el interior del tilacoide influye en la posición del equilibrio de la reacción. Así, los compuestos químicos que hacen a la membrana permeable a protones o que actúan como transportadores de  $H^+$  (desacoplantes) permitiendo la disipación del  $\Delta pH$ , inducen un incremento de la velocidad de oxidación de PQ (10), que puede alcanzar su máxima velocidad. Por lo tanto, los datos encontrados en este trabajo sobre la estimulación del gossypol en el transporte de electrones basal y fosforilante sugieren que este compuesto puede estar actuando como desacoplante.

Cuando el sistema de flujo de electrones está previamente desacoplado con  $NH_4Cl$  5 mM se observa que el gossypol 20  $\mu M$  induce inhibición en un 53.7%. Este efecto es más pronunciado de lo que se esperaría para el gossypol o cualquier desacoplante clásico. Este hecho se discutirá más adelante.

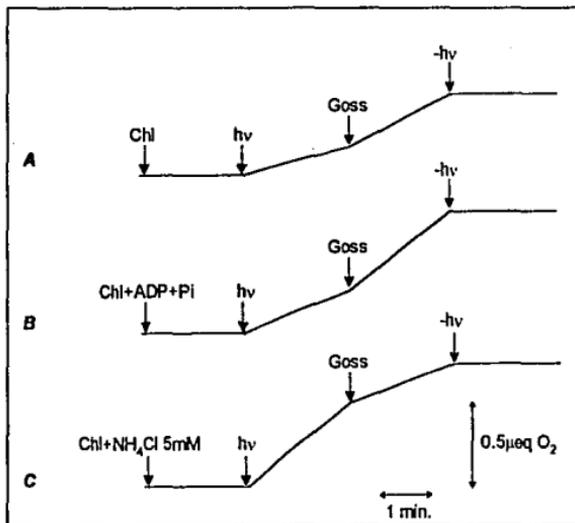


Figura 5.1. Transporte de electrones basal (A), fosforilante (B) y desacoplado (C) de  $H_2O$  a MV en presencia de gossypol 20  $\mu M$  a pH 8.

Se estudió el comportamiento del gossypol en presencia de algunos inhibidores de la transferencia de energía. En la figura 5.2 se muestran los trazos obtenidos al medir la velocidad de transporte de electrones de agua a MV en presencia de DCCD.

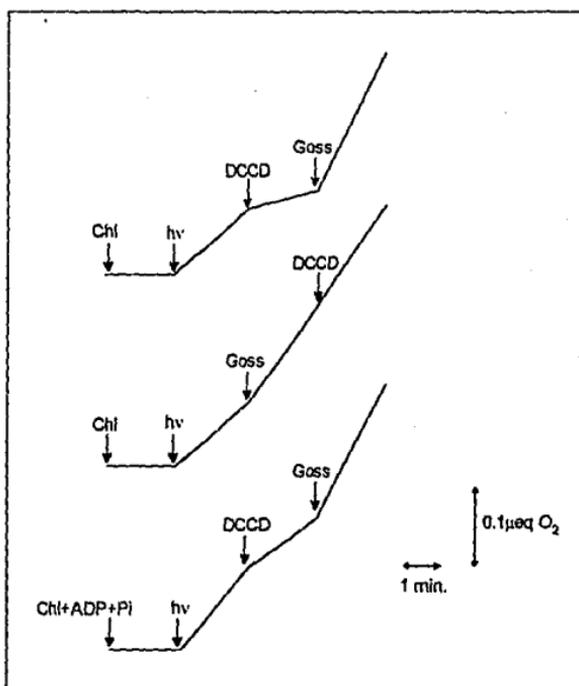


Figura 5.2. Transporte de electrones de H<sub>2</sub>O a MV en presencia de DCCD 67 μM y de gossypol 15 μM a pH 8 y 25 °C.

En presencia de un inhibidor de la transferencia de energía, la estimulación del transporte de electrones y del flujo de protones asociado a la fotofosforilación disminuirá debido a la inhibición de  $CF_0$  o  $CF_1$ . El DCCD bloquea grupos carboxilos de un proteolípido de  $CF_0$  que tiene capacidad para traslocar protones a través de la membrana. Este compuesto bloqueará el paso de los mismos y la utilización del  $\Delta pH$  para sintetizar ATP (29). Es por esto que el DCCD inhibe el transporte de electrones basal en un 60% aproximadamente, aunque no afecta al transporte de electrones desacoplado. Esta inhibición se pierde al adicionar gossypol 15  $\mu M$ , y se obtiene no sólo la recuperación de la actividad del control, sino una estimulación adicional del 103% como la esperada de acuerdo a los resultados de la figura 5.1. Se encontró que en condiciones fosforilantes este compuesto inhibe el transporte de electrones en un 40% aproximadamente, y que el efecto se revierte cuando se adiciona gossypol al medio, con una estimulación adicional del 127% respecto al control. Por otro lado, se observó que en presencia de gossypol, el transporte de electrones basal y fosforilante no es afectado por DCCD.

Adicionalmente a estos experimentos se empleó florizina como inhibidor de la transferencia de energía que actúa a nivel de  $CF_1$ , y que aparentemente inhibe la fotofosforilación al interferir con la utilización de  $P_i$  (46). Este compuesto no presenta efecto en el t. e. basal y desacoplado, mientras que el t. e. fosforilante es inhibido en un 85% aproximadamente. Si se adiciona gossypol 15  $\mu M$  al medio, esta actividad se recupera con una estimulación adicional del 115%.

Todos estos trazos se hicieron con  $NH_4Cl$  5mM como desacoplante en vez de usar gossypol y se encontró el mismo comportamiento. En la tabla 5.1 se muestra el comportamiento del gossypol y del  $NH_4Cl$  en presencia de DCCD y florizina. Estos resultados apoyan la sugerencia de que el gossypol actúa como desacoplante de la fotosíntesis.

**Tabla 5.1.** Efecto de desacoplantes sobre el transporte de electrones de H<sub>2</sub>O a MV como aceptor de electrones en presencia de DCCD 67  $\mu$ M o de florizina 2 mM

Experimento con orden de adición.	$\mu$ eq e <sup>-</sup> /mgChl hr (% del Control)	
	Gossypol 15 $\mu$ M	NH <sub>4</sub> Cl 5mM
<b>Experimento I</b>		
Chl	262.1 (100)	272.4 (100)
+ DCCD	106.2 (40.5)	108.3 (39.9)
+ Desacoplante	531.0 (202.9)	611.72 (227.1)
<b>Experimento II</b>		
Chl	258.6 (100)	268.7 (100)
+ Desacoplante	379.3 (146.7)	662.1 (246.3)
+ DCCD	382.8 (148)	579.3 (215.6)
<b>Experimento III</b>		
Chl + ADP + Pi	438.5 (100)	446.1 (100)
+ DCCD	270.8 (61.7)	261.9 (58.7)
+ Desacoplante	733.3 (227.8)	869.2 (194.8)
<b>Experimento IV</b>		
Chl + ADP + Pi	415.4 (100)	407.7 (100)
Desacoplante	548.7 (132.1)	1015.38 (249.1)
DCCD	238.5 (129.6)	638.5 (156.6)
<b>Experimento V</b>		
Chl + ADP + Pi	414.8 (100)	414.8 (100)
+ Flo	66.7 (15.8)	59.2 (14.2)
+ Desacoplante	874.1 (215.1)	1022.2 (230.6)

El DCCD inhibe la salida de protones a través de CF<sub>0</sub> para sintetizar ATP, por lo tanto se inhibe el transporte de electrones basal y fosforilante. Si en el medio ahora hay un desacoplante, habrá una recuperación de la salida de protones hacia el estroma, solo que esta vez será inespecífica. Habrá transporte de electrones basal y fosforilante, pero no habrá síntesis de ATP.

## 5. Discusión de resultados.

En el caso de la florizina no se observa inhibición en el transporte de electrones basal y desacoplado ya que actúa directamente sobre  $CF_1$ , así que el efecto sólo se observará en presencia de ADP y Pi. Al adicionar gossypol al medio se revierte el efecto de la florizina por las razones expuestas anteriormente.

En la figura 5.3 se muestra el efecto del gossypol a diferentes concentraciones sobre el transporte de electrones de agua a MV basal, fosforilante y desacoplado.

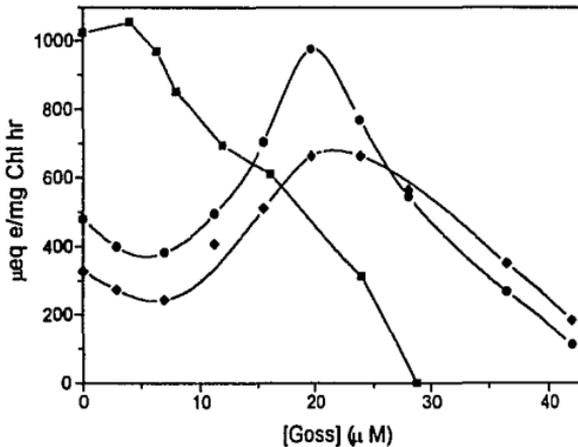


Figura 5.3. Efecto del gossypol sobre el transporte de electrones de  $\text{H}_2\text{O}$  a MV basal (◊), fosforilante (●) y desacoplado (■) a pH 8 y  $25^\circ\text{C}$ .

Se encontró que entre 7 y 20  $\mu\text{M}$  de gossypol el t. e. basal se estimula hasta un 102.4% y a mayores concentraciones esta actividad es inhibida. El mismo tipo de curva se obtiene en presencia de ADP y Pi, aunque el patrón bifásico no es idéntico en ambos casos. Este tipo de comportamiento se observa comúnmente en los desacoplantes clásicos en que inicialmente hay una estimulación del transporte de electrones y a mayores concentraciones hay una inhibición debida a la interacción de estos compuestos con intermediarios de la cadena redox fotosintética.

Sin embargo, este tipo de desacoplantes por lo general no presentan una inhibición drástica sobre el transporte de electrones desacoplado como la que induce el gossypol. En presencia de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5mM es de esperarse incluso una ligera estimulación del transporte de electrones si el desacoplante es más potente que el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  o en todo caso, es común observar una inhibición máxima de esta actividad del 20 %.

Es importante hacer hincapié en lo que sucede en la región de bajas concentraciones de gossypol, entre 0 y 7  $\mu\text{M}$ , en que se observó una inhibición del 20 al 25% sobre el t. e. basal y fosforilante, mientras que el t. e. desacoplado es insensible al compuesto.

El hecho de que el gossypol no presente el efecto esperado para un desacoplante clásico sobre el transporte de electrones desacoplado, sugiere que si bien este compuesto puede estar actuando como desacoplante, su efecto no es puro, sino que induce por otro lado un efecto como inhibidor de la cadena fotosintética. Esta sugerencia es apoyada por el comportamiento observado en el transporte de electrones en ausencia y presencia de ADP y Pi entre 0 y 7  $\mu\text{M}$  de gossypol, que nos indica la existencia de una competencia entre dos efectos, uno de inhibición y otro de desacoplamiento.

Por otro lado, el hecho de que exista similitud en el comportamiento del gossypol sobre el t. e. basal y t. e. fosforilante, y de que el patrón del t. e. desacoplado no se adapte a lo esperado para un desacoplante puro, indica que este compuesto induce un doble efecto que es sensible al estado de energización de la membrana:

A bajas concentraciones de gossypol, éste induce una ligera inhibición en el transporte de electrones con y sin ADP/Pi, mientras que si la membrana se desenergiza con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5mM, no se observa un efecto de inhibición. Si el transporte de electrones basal y fosforilante está estimulado por el gossypol, el sistema previamente desacoplado se inhibe drásticamente.

A continuación se midió el efecto del gossypol sobre el t. e. basal a diferentes valores de pH del medio de ensayo ( $\text{pH}_{\text{ext}}$ ). Se encontró que esta actividad es sensible al pH aun en ausencia de gossypol (figura 5.4). A partir de pH 6.5 la velocidad del control se incrementa con el pH. Este tipo de comportamiento ha sido estudiado por Bamberger, Rottenberg y Avron (47), quienes encontraron que la velocidad de transporte de electrones depende del pH en el espacio tilacoidal ( $\text{pH}_{\text{in}}$ ), con un valor óptimo cercano a 5 usando varios aceptores de electrones como el FeCN, DCPIP, NADP y cit. c. Cuando el  $\text{pH}_{\text{ext}}$  es bajo, inicialmente el  $\text{pH}_{\text{in}}$  está cercano a 5. Cuando se genera el  $\Delta$  pH, este valor queda por abajo del óptimo y la velocidad del transporte de electrones es pequeña. Si el  $\text{pH}_{\text{ext}}$  es alto (cercano a 8.5), el  $\Delta$ pH que se genera al iluminar a los cloroplastos hace que el  $\text{pH}_{\text{in}}$  caiga a valores cercanos al óptimo y la velocidad de transferencia de electrones es alta. Por otro lado, se ha encontrado que el potencial redox de las quinonas y del citocromo b de la cadena fotosintética dependen del pH (48), y por lo tanto, este es otro factor que afecta la velocidad del transporte de electrones.

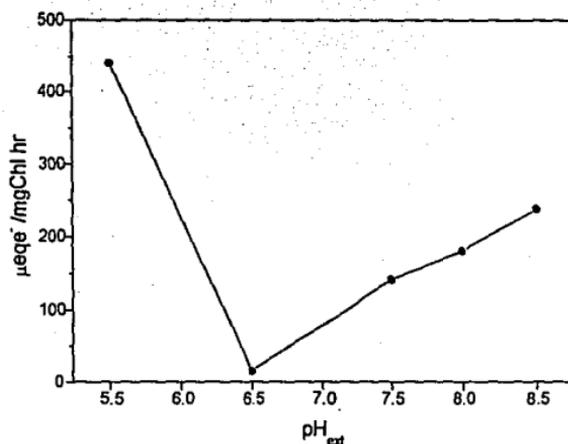


Figura 5.4. Efecto del  $\text{pH}_{\text{ext}}$  sobre la velocidad del transporte de electrones basal de  $\text{H}_2\text{O}$  a MV en ausencia de gossypol.

En presencia de gossypol se observó el mismo patrón bifásico obtenido en el experimento de la figura 5.3 a todos los  $\text{pH}_{\text{ext}}$  ensayados, sin embargo cada curva presentó características diferentes. En la figura 5.5 se presenta el efecto del  $\text{pH}_{\text{ext}}$  sobre la máxima estimulación de la velocidad inducida por el gossypol. Se encontró que a un pH de 6.5 la estimulación del transporte de electrones debida al gossypol alcanza un 10800% del control, y al aumentar el  $\text{pH}_{\text{ext}}$  este efecto decrece gradualmente. En la figura 5.6 se muestra la influencia del  $\text{pH}_{\text{ext}}$  sobre la concentración de gossypol a la cual se obtuvo dicha estimulación máxima.

## 5. Discusión de resultados.

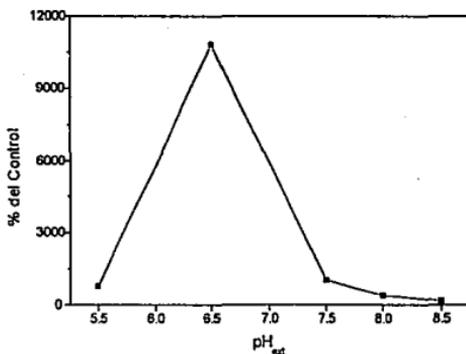


Figura 5.5. Efecto del gossypol sobre la máxima estimulación del transporte de electrones basal de H<sub>2</sub>O a MV a diferentes pH<sub>ext</sub>. La velocidad máxima en cada pH<sub>ext</sub> es 3384 (pH 5.5), 1542.8 (pH 6.5), 1444.7 (pH 7.5), 694 (pH 8) y 360 (pH 8.5)  $\mu\text{eq}^{\circ}/\text{mgChl hr}$

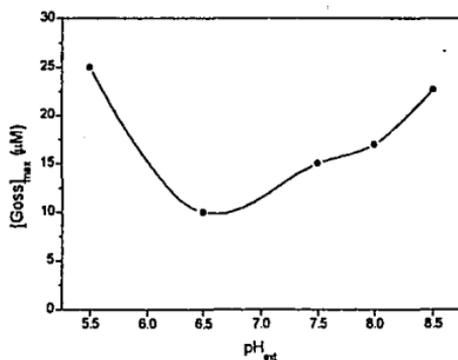


Figura 5.6. Concentración de Gossypol a la cual se obtiene la máxima estimulación del transporte de electrones a cada valor de pH<sub>ext</sub>.

Nuevamente, a  $pH_{ext}$  de 6.5 se requiere la menor concentración del compuesto para obtener la máxima estimulación de la velocidad de transporte de electrones, mientras que a  $pH_{ext}$  mayores esta concentración aumenta, al igual que a  $pH_{ext}$  5.5.

Es interesante observar lo que sucede con la región de bajas concentraciones de gossypol, entre 0 y 7  $\mu M$ . En el experimento de la figura 5.3 se encontró una inhibición del 20 al 25% del t. e. basal en esta región de concentraciones. Al incrementar el  $pH_{ext}$ , dicha inhibición es más pronunciada, de tal forma que a  $pH_{ext}$  menor de 7.5 ya no se observa inhibición alguna en esta región (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. % de estimulación (+) o inhibición (-) del control a diferentes valores de  $pH_{ext}$  a una concentración 5  $\mu M$  de gossypol.

$pH_{ext}$	% del control.
6.5	+7503.1
7.5	+366.7
8	-25.3
8.5	-53.1

Todos estos resultados indican que el gossypol es un desacoplante más potente a pH 6.5, y cuyo efecto disminuye gradualmente al incrementarse el  $pH_{ext}$ , al igual que a pH 5.5. Estos resultados pueden deberse a que:

⇒ La velocidad del transporte de electrones depende no sólo del  $pH_{in}$ , también del  $pH_{ext}$  y del  $\Delta pH$ . Si se impone el  $pH_{ext}$  con buffer, el  $pH_{in}$  será sólo función del  $\Delta pH$  que se tenga en el control y a diferentes concentraciones de gossypol. A valores bajos de  $pH_{ext}$  la presencia de este compuesto como desacoplante abate el  $\Delta pH$  generado, de tal forma que el  $pH_{in}$  no cae por debajo del valor óptimo, mientras que a  $pH_{ext}$  alto, la presencia del gossypol no permite que el  $pH_{in}$  baje a valores cercanos al óptimo.

Cuando el  $pH_{ext}$  es de 6.5, la concentración requerida de gossypol para que el  $pH_{in}$  sea el óptimo es menor, ya que seguramente se requiere abatir menos el  $\Delta pH$  que a otros valores de  $pH_{ext}$ . Es de esperar que una parte de la inhibición observada en la figura 5.3 para el t. e. basal y fosforilante se deba a este efecto. La velocidad del transporte de electrones de máxima estimulación decrece con el  $pH_{ext}$  (Fig. 5.5) debido probablemente a que al aumentar el pH del medio, el efecto de inhibición del gossypol adquiere importancia.

⇒ A que la especie del gossypol que predomina en la fase acuosa a  $pH_{ext}$  6.5 tiene mayor capacidad para desacoplar que la especie presente a valores de pH más altos o a pH 5.5. Por otro lado, se han hecho estudios de la reactividad del gossypol con algunas proteínas, y se ha encontrado que este compuesto puede reaccionar fácilmente con los grupos amino libres que están presentes en estas moléculas a través de reacciones con sus grupos carbonilo; así, un efecto que está presente, puede ser el debido a la reactividad del gossypol frente a las proteínas fotosintéticas que varía de acuerdo al pH del medio (65).

## II. CAPTACIÓN DE PROTONES Y SÍNTESIS DE ATP.

La iluminación de una suspensión de cloroplastos pobres en capacidad amortiguadora induce un aumento importante del pH del medio en ausencia y presencia de ADP y Pi como se muestra en la figura 5.7. En el primer caso (captación de protones), este aumento se atribuye al transporte vectorial de protones acoplado a la transferencia de electrones de agua a MV, aunque este aumento no es una medida del  $\Delta pH$  tilacoidal que se genera. En el segundo caso (Síntesis de ATP), el incremento del pH se debe a que la reacción de fotofosforilación de una molécula de ADP requiere del consumo de un protón como se mencionó en el capítulo 4.

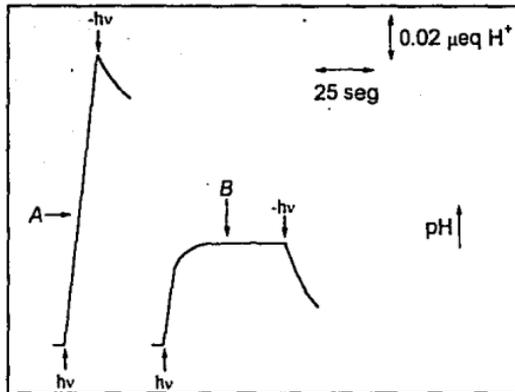


Figura 5.7. Incremento del pH observado al iluminar cloroplastos en condiciones fosforilante o de síntesis de ATP (A) y basal o de captación de protones (B) a pH inicial de 8, usando MV como aceptor de electrones.

El gossypol induce inhibición tanto de la síntesis de ATP como de la captación de protones (Fig 5.8). Estos datos confirman que el gossypol actúa como desacoplante. Es importante observar que la capacidad del cloroplasto de traslocación de protones se inhibe paralelamente a la síntesis de ATP, de tal manera que a 15 μM de gossypol ya no hay actividad por parte del cloroplasto. Estos resultados indican que este compuesto puede estar desacoplando con un mecanismo protonóforo, ya que la síntesis de ATP acoplada al transporte de electrones se ve afectada paralelamente a la disipación del transporte vectorial de protones.

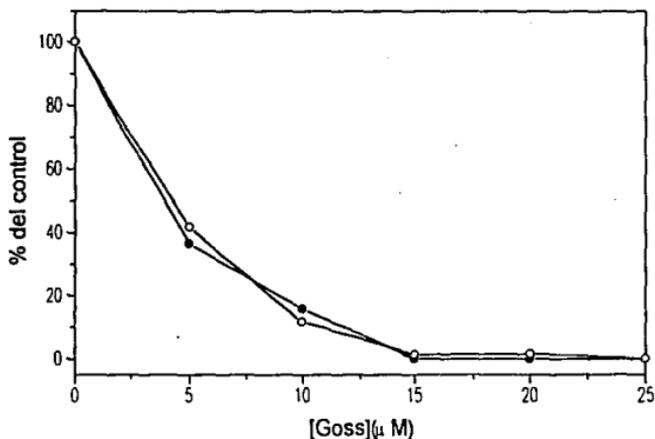
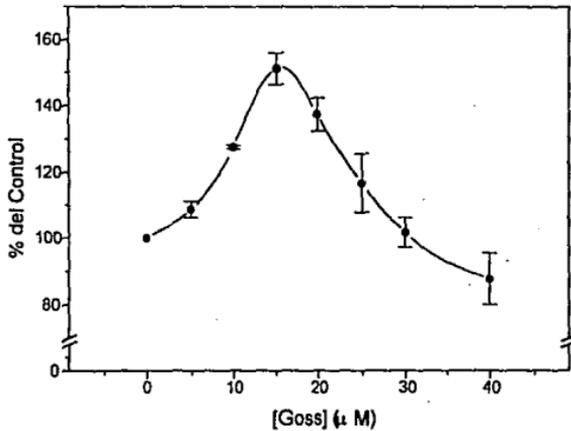


Figura 5.8. Efecto del gossypol sobre la captación de protones (●) y la síntesis de ATP (○) en presencia de MV a pH 8. La velocidad del control para la captación de protones es  $40.3 \mu\text{eq H}^+/\text{mgChl hr}$  y para la síntesis de ATP es  $659.4 \mu\text{mol ATP}/\text{mgChl hr}$ .

### III. $Mg^{2+}$ -ATPasa.

La actividad de ATPasa de  $CF_0$ - $CF_1$  es sensible al gossypol cuando hay potasio en el medio. En la figura 5.9 se observa el efecto bifásico que este compuesto presenta: A bajas concentraciones de gossypol induce una estimulación de la hidrólisis de ATP, y después de 15  $\mu M$  se observa una inhibición creciente de dicha actividad.



**Figura 5.9.** Efecto de gossypol sobre la actividad de la  $Mg^{2+}$ -ATPasa de cloroplastos a pH 8. La velocidad del control es de 164.73  $\mu$ moles de ATP/mgChl hr.

Se ha demostrado que los desacoplantes clásicos presentan un efecto bifásico sobre la  $Mg^{2+}$ -ATPasa respecto al tiempo de reacción en presencia de estos compuestos y a concentración de los mismos: inicialmente se induce una estimulación de la enzima seguida de una inhibición de su actividad (49, 51):

⇒ Se considera que la síntesis e hidrólisis de ATP son procesos inversos que se pueden dar simultáneamente; por lo tanto, para observar una de las dos reacciones, es necesario que la otra esté inhibida. Durante la activación con luz se genera un estado de alta energía que los desacoplantes disipan. Cuando el  $\Delta pH$  disminuye, el ATP puede hidrolizarse a través del proceso inverso a la fosforilación. Con bajas concentraciones de desacoplante se inhibe parcialmente cualquier síntesis de ATP dependiente del  $\Delta pH$  y por lo tanto se estimula la actividad de ATPasa. Se ha encontrado además que una vez que la enzima está activada y en presencia de ATP, esta puede captar protones para contribuir al  $\Delta pH$  generado durante la etapa de iluminación; así que concentraciones moderadas de desacoplante permitirían que el  $\Delta pH$  fuera el óptimo para la hidrólisis de ATP, y no así para la fosforilación (50).

⇒ La inhibición observada después de cierta concentración de desacoplante puede explicarse como la caída del  $\Delta \mu_H^+$  abajo del nivel mínimo requerido para que la enzima retenga su conformación activa en la obscuridad, ya que esta actividad requiere un mínimo de energización de la membrana (49). Sin embargo, existe evidencia experimental que sugiere que la inhibición puede deberse a una interacción específica de los desacoplantes con la enzima (51).

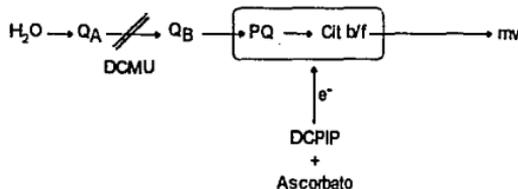
Es importante observar que el patrón bifásico es similar al obtenido para el transporte de electrones. Sin embargo, mientras que el gossypol induce una estimulación máxima del t. e. basal y t. e. fosforilante del 102% aproximadamente, esta enzima se estimula en sólo 52.4%. Esta diferencia puede deberse a que el medio de reacción propuesto por Mills, *et al.* (43) contiene  $NH_4Cl$  1 mM aproximadamente, de tal manera que este compuesto "enmascara" una parte del efecto del gossypol como desacoplante.

#### IV. REACCIONES PARCIALES DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES.

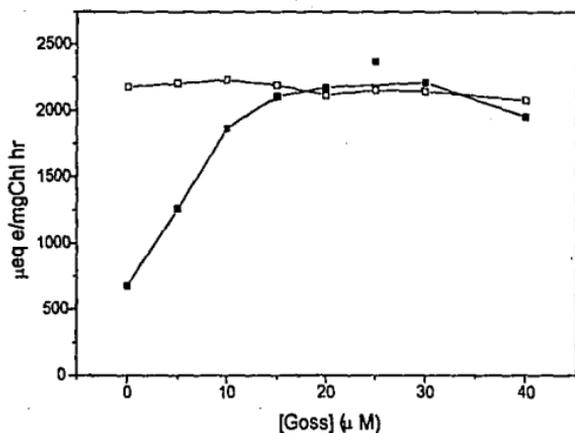
Hasta el momento era claro que el gossypol no presentaba un efecto puro de desacoplamiento; pues este compuesto inducía también una inhibición del transporte de electrones sensible al pH externo.

Con la finalidad de identificar el sitio de acción del gossypol como inhibidor de la cadena redox, es necesario analizar el efecto del compuesto en pequeños fragmentos de la cadena fotosintética. Para ello fueron empleados donadores y aceptores de electrones artificiales, así como inhibidores de la cadena redox.

El primer paso consistió en identificar si el gossypol inhibe el FSI o el FSII. Para estudiar el efecto de este compuesto sobre el FSI se empleó DCMU 10  $\mu\text{M}$  (25) como inhibidor de la enzima  $Q_B$  con la finalidad de impedir el flujo de electrones proveniente del FSII, DCPIP 100 $\mu\text{M}$ /Ascorbato 300  $\mu\text{M}$  (52) como sistema donador de electrones a nivel de PQ y MV como el aceptor final de acuerdo al siguiente esquema.

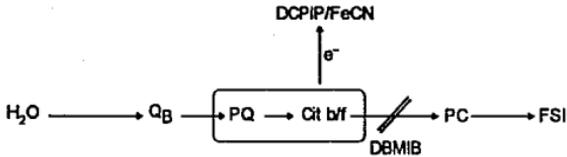


Se encontró que el t. e. desacoplado del FSI es insensible al gossypol, mientras que en condiciones basales el compuesto induce una estimulación que en una concentración aproximada de 15  $\mu\text{M}$  alcanza su máximo (212.9%) como resultado del desacoplamiento debido a este compuesto (Fig. 5.10). Estos resultados indican que el FSI es sensible al gossypol como desacoplante, pero no como inhibidor de la cadena fotosintética.



**Figura 5.10.** Efecto del gossypol sobre el transporte de electrones del FSI en presencia de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 mM (□) y basal (■) de DCPIP/Ascorbato a MV a pH 8.

A continuación se midió el efecto del gossypol sobre la cadena fotosintética en que el agua es el donador natural de electrones y el aceptor final es el sistema DCPIP 50  $\mu\text{M}$  / FeCN 300  $\mu\text{M}$  (53). Para impedir el paso de los electrones hacia el fotosistema I se utilizó DBMIB 1  $\mu\text{M}$  (54) como se muestra en el siguiente esquema.



Se encontró que una concentración de gossypol 25  $\mu M$  inhibe totalmente el t. e. desacoplado, mientras que el t. e. basal es ligeramente menos sensible al compuesto, ya que sólo una concentración 30  $\mu M$  del compuesto inhibe totalmente esta actividad (Fig. 5.11). Este resultado sugiere protección contra la inhibición del gossypol por energización de la membrana. Es claro entonces que este compuesto tiene su efecto inhibitorio de la cadena redox a nivel del FS II, entre PQ y el complejo de fotólisis del agua.

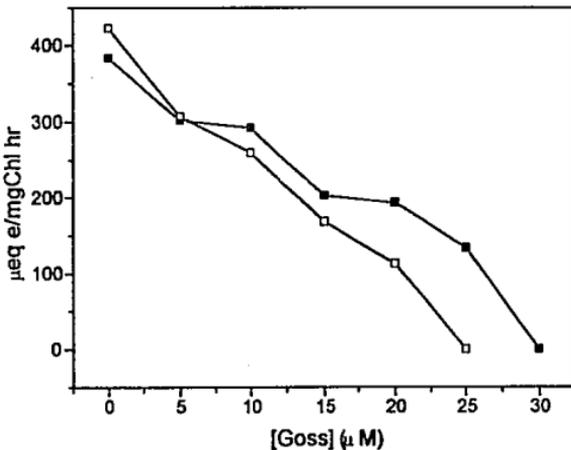
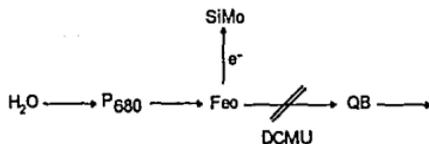


Figura 5.11. Transporte de electrones basal del PSII(■) y en presencia de  $NH_4Cl$  5 mM (□) de agua a FeCN a pH 8.

A continuación se analizó un fragmento más pequeño del FSII, en que el donador es agua y el aceptor final es silicomolibdato (SiMo) 200  $\mu\text{M}$  (55). Para evitar el flujo de electrones más allá de  $Q_A$  se utilizó DCMU 10  $\mu\text{M}$  como inhibidor de acuerdo al esquema siguiente:



En la figura 5.12 se muestra el efecto del gossypol sobre esta parte de la cadena fotosintética. Se observa una inhibición drástica del transporte de electrones por parte de este compuesto, de tal forma que a una concentración 20  $\mu\text{M}$  de gossypol ya no se detecta ningún flujo de electrones. Estos resultados indican que el sitio de inhibición del gossypol está entre el complejo de fotólisis del agua y la feofitina.

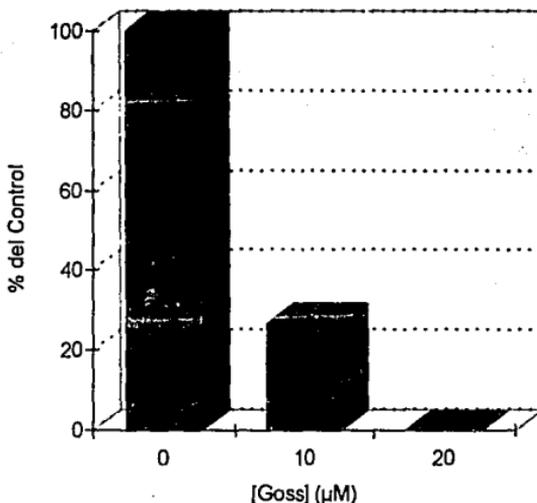
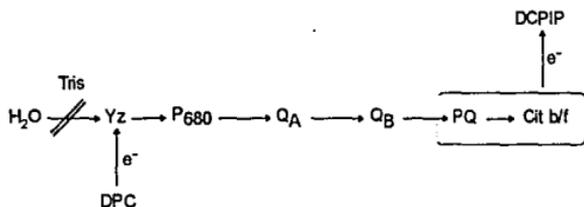


Figura 5.12. Transporte de electrones de agua a SiMo a pH 8. La velocidad del control es  $91.2 \mu\text{eq e}^-/\text{mgChl hr}$ .

Con el objeto de localizar el sitio donde actúa el gossypol como inhibidor, se estudió un fragmento de la cadena redox más pequeño en que se excluye al centro de fotólisis del agua inhibiéndolo mediante un tratamiento con Tris. En este caso, el donador de electrones es DPC  $200 \mu\text{M}$  y el aceptor final es DCPIP  $100 \mu\text{M}$  (23). Cuando  $\text{P}_{680}$  pierde un electrón, este es reducido por un residuo de tirosina conocido como Yz que forma parte de D1, uno de los polipéptidos que intervienen en la producción de oxígeno; entonces, el complejo de oxidación del agua, el cual contiene cuatro iones manganeso que forman un tetrámero, reduce a  $\text{Yz}^+(56)$ .

## 5. Discusión de resultados.

Para inhibir al complejo de fotólisis del agua, los cloroplastos se incubaron en la oscuridad por 40 minutos con Tris 0.8 M (pH 8) a 25 °C, y a continuación se centrifugaron a 5000 rpm por dos minutos y se resuspendieron en el medio de transporte de electrones sin MV y con tricina de acuerdo al capítulo 4. El tratamiento con tris elimina a un polipéptido de 33 KDa que es importante para que el tetrámero de Mn sea activo; además se pierden dos polipéptidos de 17 y 24 KDa y algunos iones Mn(II) del complejo de oxidación del agua (57).



En la figura 5.13 se observa que esta parte de la cadena fotosintética no es sensible a la inhibición con gossypol, lo cual indica que el sitio de acción del compuesto se localiza en el tetrámero de manganeso o en alguno de los polipéptidos necesarios para que este complejo oxide al agua, antes del sitio de donación de DPC (58).

Adicionalmente se empleó metilviológeno como aceptor final de electrones, y se encontró que la cadena redox en estas condiciones tampoco era sensible a la inhibición por gossypol. Incluso se obtuvo una ligera estimulación de esta actividad debida al desacoplamiento producido por el compuesto. También se midió el efecto del gossypol sobre la cadena fotosintética en ausencia de DPC o de cualquier otro donador de electrones en cloroplastos inhibidos con tris y en presencia de MV. Esta actividad, como era de esperarse, resultó nula porque no hay donadores de electrones en el medio, y la adición de gossypol hasta una concentración de 50  $\mu\text{M}$  no cambió esta situación, lo cual indica que el compuesto no presenta efecto como donador de electrones en este intervalo de concentraciones.

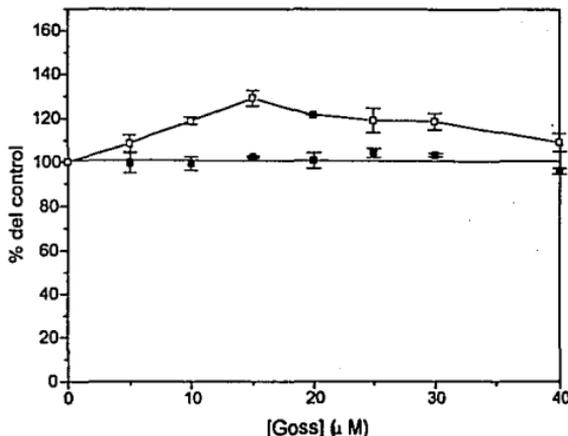


Figura 5.13. Efecto del gossypol sobre el transporte de electrones de DPC a DCPIP (■) y de DPC a MV (□). La reducción del DCPIP se siguió espectrofotométricamente, ya que la especie oxidada absorbe a 660 nm. La velocidad del control es 465.12 y 300  $\mu\text{eqe}^{\cdot}/\text{mgChl hr}$  en presencia de DCPIP y DPC respectivamente.

## V. COMPORTAMIENTO ÁCIDO-BASE DEL GOSSYPOL EN MEDIOS ACUOSOS Y NO ACUOSOS.

### Gossypol en medios acuosos.

En la figura 5.14 de la página 56 se muestran los espectros UV-visible del gossypol en agua a diferentes valores de pH. Es importante observar los cambios que se registran en estos espectros cuando el pH se incrementa:

## 5. Discusión de resultados.

La  $\lambda_{\text{max}}$  se recorre hacia el rojo con el pH, y sus valores de absorbancia aumentan. Por otro lado, se observa que el valle localizado alrededor de los 320 nm se hace más pronunciado al incrementar el pH (Tabla 5.3). Estos espectros indican que de acuerdo al pH del medio predominará cierta especie del gossypol, y se propone que estas especies son las debidas al comportamiento ácido-base del compuesto.

Se ha reportado que el gossypol puede existir en tres formas tautoméricas en medios acuosos de acuerdo a la figura 5.15 (67).

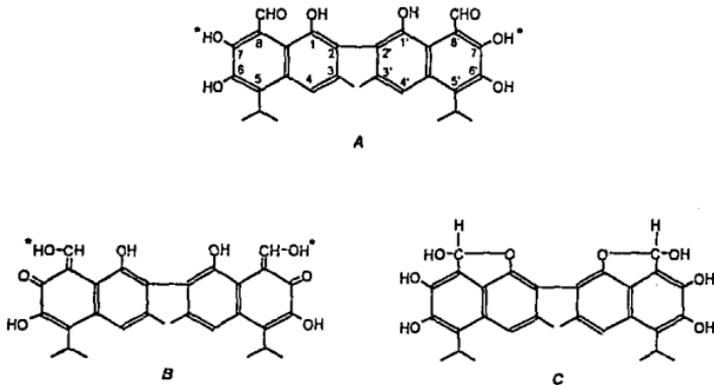


Figura 5.15. Estructuras tautoméricas del gossypol en medios acuosos.

En donde las estructuras *A* y *B* son las formas ceto-enólicas del gossypol y *C* es la estructura de hemiacetal. Este último tautómero se obtiene al hacer reaccionar al gossypol comercial con ácido acético glacial con reflujo por 24 horas (68). La dificultad para obtener este tautómero indica que las especies que se manejaron en este trabajo son la *A* y la *B*. El grupo ácido de estas especies es el marcado en la figura 5.15 con un asterisco, y lo que se observó en los espectros de la figura 5.14 es un promedio de la interconversión rápida de estos dos tautómeros tanto en su forma de enol como de enolato.

Tabla 5.3. Datos espectrofotométricos de algunas soluciones acuosas de gossypol a diferentes pH.

pH	$\lambda_{max}$ (nm)	$A_{max}$	$\lambda_{min}$ (nm)	$A_{min}$
5.5	378	0.467	327	0.230
6.1	380	0.467	325	0.214
6.5	383	0.464	325	0.192
7.7	388	0.492	320	0.147
8.1	390	0.497	320	0.143
8.7	392	0.504	320	0.148

Se alimentaron los datos espectrofotométricos de 17 soluciones de gossypol al programa TRIANG con la finalidad de estimar el número de especies que absorben en el sistema (45). Para ello, fué necesario introducir el error sobre la transmitancia, el cual queda definido como

$$\Delta T = \{(\text{Error instrumental}^2 + \text{Error volumétrico}^2)\}^{1/2}$$

Donde el error instrumental está asociado al error en las lecturas de absorbancia y es función del espectrofotómetro empleado.

El error volumétrico es el que se comete en la manipulación de las soluciones y en el material empleado. El error instrumental es de 0.01 en %T, y el error volumétrico se estima como de 2 a 3 veces el error instrumental. De acuerdo a este dato TRIANG propuso que son dos las especies que absorben en el sistema.

Con esta información se alimentaron los datos espectrofotométricos al programa SQUAD, que propuso la existencia de un solo pKa en el intervalo de pH que se manejó (entre 5.5 y 8.7). El valor del pKa estimado es de  $6.6372 \pm 0.0307$ .

SQUAD propone los coeficientes de absorptividad molar de cada especie y sus concentraciones empleando el algoritmo de Newton-Raphson. En la figura 5.16 se muestran los coeficientes de absorptividad molar que este programa calculó para la especie ácida y básica del gossypol.

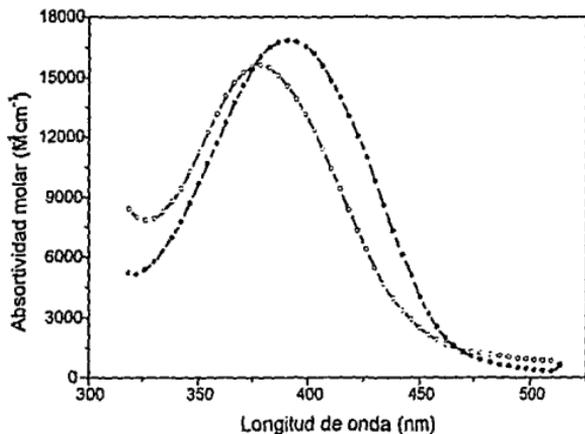


Figura 5.16. Espectros UV-visible propuestos por SQUAD para la especie ácida (▲) y la especie básica (●) en agua.

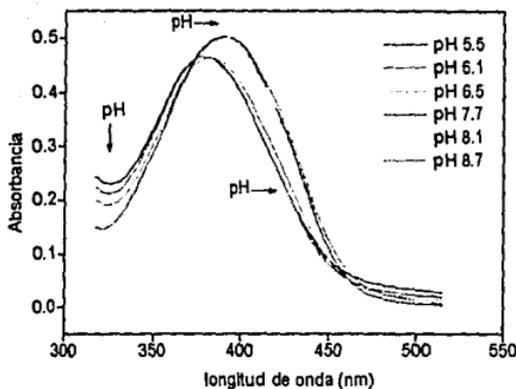
## 5. Discusión de resultados.

Se observa que la especie básica tiene más desplazada hacia el rojo su máxima absorción respecto a la especie ácida, y que el valle alrededor de 320 nm es más pronunciado en la base.

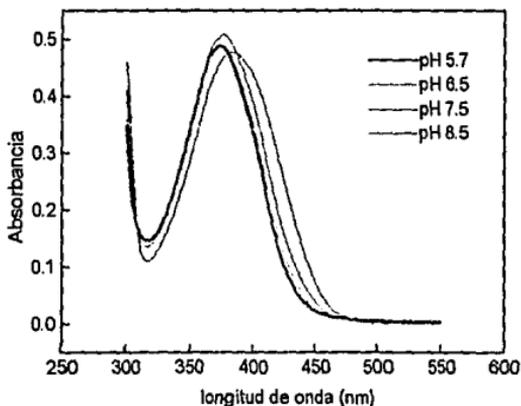
A partir del pKa propuesto por SQUAD se calculó la proporción en que se encuentran las especies ácida y básica del gossypol a los valores de pH en que se midió el transporte de electrones basal (Fig. 5.5). En la tabla 5.4 se observa que si el pH es 6.5 ( el óptimo para el gossypol como desacoplante), la distribución de ambas especies es muy parecida; por lo tanto, no es posible explicar el efecto del gossypol encontrado en este  $pH_{ext}$  en función de la presencia de una especie u otra en mayor proporción. Por otro lado, se observa que la especie que predomina casi totalmente a pH mayores es la básica, así que es posible atribuir a esta especie el efecto del gossypol como inhibidor de la cadena fotosintética.

**Tabla 5.4.** Distribución de las especies ácida (Ac) y básica (B) del gossypol en el medio acuoso a diferentes pH.

pH	% B	%Ac
5.5	6.79	93.21
6.5	42.17	57.83
7.5	87.94	12.06
8.0	95.84	4.16
8.5	98.65	1.35



**Figura 5.14.** Espectros UV-Visible del gossypol 30 μM en agua-DMF/Pg 1% a diferentes valores de pH y a 25 °C.



**Figura 5.17.** Espectros UV-Visible del gossypol en octanol después de extraerlo de soluciones acuosas a diferentes pH. La concentración del gossypol en la solución es de 30 μM.

### **Gossypol en octanol.**

Es importante conocer el comportamiento del gossypol frente a solventes inmiscibles con agua, ya que resulta un sistema simple para evaluar la transferencia del compuesto a biomembranas. En este estudio se ha empleado el sistema octanol-agua ya que presenta varias ventajas:(59).

- ⇒ Es el sistema con mayor número de valores determinados.
- ⇒ Es un sistema que se ha usado como modelo para describir las fuerzas de unión entre moléculas pequeñas y macromoléculas.
- ⇒ El octanol es un solvente que representa satisfactoriamente a las biomembranas en cuanto a propiedades hidrofóbicas se refiere.
- ⇒ Se han realizado estudios de desacoplantes en este sistema, y se ha encontrado que estos compuestos incrementan el intercambio de protones entre el hidroxilo del octanol y el agua. (60).

El gossypol es un compuesto que presenta solubilidad preferencial en octanol. Después de extraer al compuesto de soluciones acuosas a diferentes valores de pH se obtuvieron los espectros UV-Visible que se presentan en la figura 5.17.

En la tabla 5.5 se muestra la forma en que los espectros del gossypol van cambiando. A medida que el pH se incrementa la longitud de onda máxima se desplaza desde 375 hasta 384 nm. El valle alrededor de los 320 nm se hace más pronunciado con el pH, y la absorbancia en  $\lambda_{max}$  se incrementa al aumentar la basicidad del medio.

Si se comparan los cambios en los espectros UV-visible del gossypol en agua y después de extraerlo con octanol de soluciones acuosas con diferentes pH, se observa que existe gran similitud en estos espectros. Estos resultados sugieren que de acuerdo al pH en la solución acuosa, tanto la especie ácida como la básica pueden estar presentes en medios poco polares como el octanol.

Como la absorbancia en  $\lambda_{\max}$  del gossypol extraído a pH 8.5 es menor a la esperada a pesar de ser la especie predominante en el medio acuoso, es posible que la forma básica del gossypol tenga menor afinidad por este tipo de medios, aunque sigue presentando afinidad preferencial por el octanol respecto a medios acuosos.

**Tabla 5.5.** Variación de los espectros de gossypol en octanol al ser extraídos de medios acuosos a diferentes pH con una concentración de gossypol de 30  $\mu\text{M}$  y proporción de las especies ácida y básica del compuesto en el medio acuoso antes de la extracción con octanol.

pH	$\lambda_{\max}$ (nm)	$A_{\max}$	$\lambda_{\min}$ (nm)	$A_{\min}$	[Ac] <sub>ac</sub> ( $\mu\text{M}$ )	[B] <sub>ac</sub> ( $\mu\text{M}$ )
5.5	375	0.488	318	0.147	26.89	3.11
6.5	375	0.489	318	0.145	17.35	12.65
7.5	377	0.509	317	0.137	3.62	26.38
8.5	384	0.477	317	0.112	0.41	29.59

## VI. DISCUSIÓN GENERAL.

A lo largo de este trabajo se ha presentado una serie de experimentos que caracterizan al gossypol como desacoplante de la fotosíntesis, ya que se ha encontrado que:

⇒ Estimula el transporte de electrones en ausencia y presencia de ADP y Pi, de tal forma que con una concentración aproximada de 15  $\mu\text{M}$  de gossypol se obtiene la máxima estimulación de estas actividades.

⇒ Abate la captación de protones paralelamente a la síntesis de ATP al aumentar la concentración de gossypol cuando los cloroplastos son iluminados.

⇒ Estimula a la  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPasa cuando ésta es activada por luz.

⇒ Revierte el efecto de inhibidores de la transferencia de energía como el DCCD y la florizina en ausencia y presencia de ADP y Pi. El transporte de electrones previamente desacoplado con gossypol 15  $\mu\text{M}$  es insensible a estos compuestos en condiciones basal y fosforilante.

⇒ Presenta un patrón de comportamiento sobre el transporte de electrones basal a diferentes valores de  $\text{pH}_{\text{ext}}$  que ha sido previamente descrito para algunos desacoplantes clásicos (61).

⇒ Adicionalmente, estudios realizados por el grupo de J. Reyes (66) indican que el gossypol interacciona con monocapas y bicapas lipídicas de diferente composición afectando sus propiedades eléctricas.

Estos resultados se adaptan al comportamiento esperado para desacoplantes con un mecanismo protonóforo en mitocondrias, cloroplastos y bacterias. Al paso de los años se han logrado establecer algunas características estructurales comunes a todos los desacoplantes clásicos. Estas se enlistan a continuación (31, 32, 60-62, 64):

⇒ La presencia de un grupo ácido disociable con valores de pKa entre 5.5 y 6.9. Se ha propuesto que este grupo es el que interviene en la transferencia de protones a través de la membrana transductora de energía. El comportamiento ácido-base del gossypol cumple con esta propiedad, ya que se encontró que tiene un pKa de 6.6372 de acuerdo a la figura 5.15.

⇒ Una estructura con capacidad para deslocalizar la carga negativa de la especie básica con la finalidad de tener una mayor estabilidad en membranas poco polares. El gossypol tiene grupos aldehído en las posiciones 8 y 8' que contribuyen a esta deslocalización de carga. Adicionalmente, el sistema de orbitales  $\pi$  de los anillos aromáticos contribuyen a este efecto. Sin embargo, Wood *et al.* (63) encontraron que la posición relativa de los anillos de naftaleno de este compuesto es de casi  $90^\circ$ , de tal manera que la dispersión de carga por efecto de resonancia es menor a la esperada. De igual forma, se ha encontrado que algunos de los desacoplantes protonóforos más estudiados tienen una estructura dinámica que no es plana.

Por ejemplo, el SF-6847 (Fig. 5.18) es un desacoplante que en ambientes poco polares presenta un ángulo entre el anillo aromático y el grupo malonitrilo de 40° aproximadamente (64).

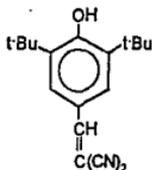


Figura 5.18. Estructura del desacoplante protonóforo conocido como SF-6847.

⇒ Grupos que den hidrofobicidad a la molécula con la finalidad de favorecer la unión del desacoplante a la membrana para que permanezca en ella mientras lleva a cabo su efecto. De hecho, se encontró que el gossypol tiene alta preferencia por medios poco polares como el octanol. Cuando se extrae el compuesto de medios acuosos con diferentes pH se encuentra que la especie predominante en el octanol es la ácida, sin embargo la básica puede estar presente cuando el gossypol se extrae de una solución a pH 8.5, aunque con menor afinidad por el octanol. Esto sugiere que la actividad del gossypol como desacoplante puede deberse a la especie ácida del compuesto, aunque estos resultados no presentan una evidencia concluyente de esta propuesta.

Los resultados obtenidos sugieren que el efecto del gossypol como desacoplante e inhibidor es dependiente del estado de energización de la membrana tilacoidal, ya que el transporte de electrones basal y fosforilante es sensible a diferentes concentraciones de gossypol con un efecto bifásico similar en ambas condiciones experimentales, mientras que si la membrana se desenergiza previamente con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como desacoplante, el gossypol induce una inhibición drástica del transporte de electrones. De igual manera, la transferencia de electrones de  $\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{FeCN}$  (FSII) es más sensible a la inhibición con gossypol cuando la membrana está desenergizada con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  que si las condiciones son basales.

En este trabajo se encontró que los procesos primarios de la fotosíntesis son sensibles al gossypol; este hecho sugiere que el compuesto podría ser utilizado en el futuro como herbicida natural. Sin embargo, antes de poder proponerlo como tal, será necesario hacer experimentos para caracterizarlo como herbicida y una serie de estudios que consideren factores toxicológicos, selectividad en su acción herbicida, factibilidad económica y daños ecológicos.

# ***CONCLUSIONES***

⇒ El gossypol es un desacoplante de la fotosíntesis, de tal forma que con una concentración de aproximadamente  $15\mu\text{M}$  del compuesto se induce un efecto máximo. De acuerdo a los experimentos realizados que lo caracterizan como desacoplante, y a sus características estructurales, se propone que su mecanismo de desacoplamiento es protonóforo.

⇒ Este efecto está en competencia con una inhibición de la cadena fotosintética, de tal forma que a pH básicos, el poder desacoplante es menor. El sitio de inhibición del gossypol se localiza en el complejo de fotólisis del agua, antes del sitio de donación de Yz. Debido a que este complejo se localiza en la parte interna del tilacoide, es claro que las propiedades hidrofóbicas del gossypol son importantes para explicar la inhibición encontrada, aunque con los experimentos presentados no es posible determinar si es la especie ácida o la básica del compuesto la que inhibe a la cadena redox. Los datos indican que el gossypol es un desacoplante-inhibidor.

⇒ Ambos efectos son sensibles al estado de energización de la membrana, de tal forma que si ésta se desenergiza con  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , predomina el efecto inhibitorio, mientras que si la membrana está energizada (en ausencia y presencia de ADP y Pi), el efecto del gossypol como desacoplante es más importante.

⇒ El gossypol no presenta efecto como donador de electrones a la cadena fotosintética, ya que ésta no es sensible al gossypol si se inhibe la fotólisis del agua y se suprime cualquier donador artificial de electrones en presencia de MV como aceptor final.

⇒ Este compuesto presenta alta afinidad por medios poco polares como el octanol, y pueden estar presentes tanto la especie ácida como la básica (esta última con un poco menor afinidad por el octanol), lo cual sugiere que su mecanismo de acción como desacoplante e inhibidor puede estar asociado a interacciones con la membrana.

# ***BIBLIOGRAFÍA***

## 7. Bibliografía.

1. Randel, R. D. *et al.*, *J. Anim. Sci.*, 70: 1628-1638, (1992).
2. Liener, I. E., *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs*, 2a ed. Academic Press, Inc. (1980).
3. Pösö, H. *et al.*, *The Lancet*, 1: 885, (1980).
4. Ueno, H. *et al.*, *Contraception*, 37(3): 333-341, (1988).
5. Abou-Donia, M. & Dieckert, J. W., *Life Sci.*, 14: 1955-1963, (1974).
6. Reyes, J. & Benos, D. J., *Am. J. Physiol.*, 254: C571, (1988).
7. Band, V. *et al.*, *Gynecol. Oncol.*, 32: 273-277, (1989).
8. Deck, L. M. *et al.*, *J. Med. Chem.*, 34: 3301-3305, (1991).
9. Ellis, R. J., *Chloroplast Biogenesis*. Cambridge University Press, London, (1989).
10. Hooper, J. K., *Chloroplasts*, Plenum Press, NY, (1984).
11. Anderson, J. W. & Beardall, J., *Molecular Activities of Plant Cells. An Introduction to Plant Biochemistry.*, 1ª ed., Blackwell Scientific Publications, USA (1991).
12. Debus, R. J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1102: 269-352, (1992).
13. Slater, E. C., *Nature*, 172: 975-978, (1953).
14. Mitchell, P., *Nature*, 191: 144-148, (1961).
15. Nicholls, D. G., *Bioenergetics. An Introduction to the Chemiosmotic Theory.*, Academic Press, (1982), 41-62.
16. Boyer, P. D. *FEBS Letters*, 58(1): 1-6, (1975).
17. Westerhoff, H. V., *et al.*, *FEBS Letters*, 165 (1): 1-5, (1984).
18. Nelson, N., *Current Topics in Bioenergetics*, Vol. II: 1-33, Academic Press, Inc., (1981).
19. Merchant, S., & Selman, B. R., *Photosynthesis Res.*, 6: 3-31, (1985).
20. Ketcham, S. R., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 259(11): 7286-7293, (1984).
21. Bruntim, F., *et al.*, *Biochemistry*, 20: 6298-6305, (1981).
22. Moreland, D. E., *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 31: 597-638, (1980).
23. Vernon, L. P. & Shaw, E. R., *Plant Physiol.*, 44: 1645-1649, (1969).
24. Izawa, S. & Ort, D. R., *Biochim. Biophys. Acta*, 357: 127-143, (1974).
25. Astier, Ch. *et al.*, *FEBS Letters*, 167(2): 321-326, (1984).
26. *Encyclopedia of Plant Physiology.*, Editado por Trebst, A. & Avron, M., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, N. Y., Vol. 5: 266-279, (1977).

27. Ouitrakul, R. & Izawa, S., *Biochim. Biophys. Acta*, 305: 105-118, (1973).
28. Melandri, B., *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 376: 72-81, (1975).
29. McCarty, R. E., & Racker, E., *J. Biol. Chem.*, 242(15): 3435-3439, (1967).
30. Guillory, R. J., & Racker, E., *J. Biol. Chem.*, 240(12): 4822-4823, (1965).
31. Benz, R. & McLaughlin, S. *Biophys. J.* 41: 381-398, (1983).
32. Terada, H., *Environmental Health Perspectives*, 87: 213-218, (1990).
33. Shinohara, Y., & Terada, H., *Biochim. Biophys. Acta*, 890: 387-391, (1987).
34. Rottenberg, H., *Biochim. Biophys. Acta*, 1018: 1-17, (1990)
35. Mahler, H. R., & Cordes, E. H., *Biological Chemistry*, 1a ed. Harper & Row, N.Y. (1966).
36. Zweig, G., Shavit, N., & Avron, M., *Biochim. Biophys. Acta.*, 109: 332-346, (1965).
37. Arnon, D. I., *Plant Physiol.*, 24: 1-15, (1949).
38. Hall, D. O., *Nature New Biol.*, 235: 125-126, (1972).
39. Dille, R. A., *Methods in Enzymology*, Vol. XXIV, ED. by Anthony San Bietro, Academic Press, 68-74, (1972).
40. M. Nishimura, T., Ito, & B. Chance, *Biochim. Biophys. Acta.*, 59:177-182, (1962).
41. Nishizaki, Y. *Biochim. Biophys. Acta.*, 314: 312-319, (1973).
42. Dann, M. S., & McCarty, R. E., *Plant Physiol.*, 99: 153-160, (1992).
43. Mills, J. D., Mitchell, P., & Schürmann, P., *FEBS Letters*, 112(2):173-177, (1980).
44. Sumner, J. B., *Science*, 100(2601): 413-414, (1944).
45. Morales, A. *Tesis de Maestría*, FES Cuautitlán, (1993).
46. Winget, G. D., Izawa, S., & Good, N. E., *Biochem.*, 8(5): 2067-2074, (1969).
47. Bamberger, E. S., Rottenberg, H., & Avron, M., *Eur. J. Biochem.*, 34: 557-563, (1973).
48. Knaff, D. B., *FEBS Letters*, 60(2): 331-335, (1975).
49. Carmeli, C., *Biochim. Biophys. Acta*, 189: 256-266, (1969).
50. Carmeli, C., *FEBS Letters*, 7(3): 297-300, (1970).
51. Pick, U., *Biochemistry*, 27: 8284-8290, (1988).

52. Hauska, G. A., McCarty, R. E., & Racker, E., *Biochim. Biophys. Acta.*, 197: 206-218, (1970).
53. Gromet-Elhanan, Z. & Avron, M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 10(3): 215-220, (1963).
54. Izawa, S., & Pan, R. L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 83(3): 1171-1177, (1978).
55. Takahashi, Y, Satoh, K., & Itoh, S., *FEBS Letters*, 255(1): 133-138, (1989).
56. Debus, R. J., *et al.*, *Biochemistry*, 27: 9071-9074, (1988).
57. Tamura, N., & Cheniae, G., *Biochim. Biophys. Acta*, 890: 179-194, (1987).
58. Preston, C., & Seibert, M., *Biochemistry*, 30: 9615-9624, (1991).
59. Leo, A., & Hansch, C., *J. Org. Chem.*, 36(11): 1539-1544, (1971).
60. Terada, H., *Biochim. Biophys. Acta*, 725: 254-260, (1983).
61. Terada, H., *Biochim. Biophys. Acta*, 387: 519-532, (1975).
62. Terada, H., *Biochim. Biophys. Acta*, 639: 225-242, (1981.)
63. Wood, A. B., Robinson, F. V., & Araujo, R. C., *Chem. & Ind.*, 1738-1739, Nov. (1969).
64. Terada, H, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 767: 192-199, (1984).
65. Lyman, C. M., Baliga, B. P., & Slay, M. W., *Arch. Biochem. Biophys.* 84: 486-497, (1959).
66. Reyes, J. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 259(15): 9607-9615, (1984).
67. Adams, R., & Geissman, T. A., *Chem. Rev.*, 60: 555-574, (1960).
68. Reyes, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.*, 863: 101-109, (1986).

# ***APÉNDICE***

## ABREVIATURAS EMPLEADAS.

Goss.....	Gossypol.
NADPH.....	fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina reducido.
ATP.....	Adenosina trifosfato.
ADP.....	Adenosina difosfato.
Pi.....	Ortofosfato.
FSI (II).....	Fotosistema I ( Fotosistema II).
P <sub>680</sub> y P <sub>700</sub> .....	Centros de reacción del FSII y FSI respectivamente.
feo.....	Feofitina.
PQ.....	Plastoquinona.
PQH <sub>2</sub> .....	Plastoquinol.
cit.f.....	Citocromo f.
cit. b <sub>563</sub> .....	Citocromo b <sub>563</sub> .
cit.c.....	Citocromo c.
PC.....	Plastocianina.
Fd.....	Ferredoxina.
F.....	Constante de Faraday.
$\Delta\Psi$ .....	Potencial de membrana.
$\Delta pH$ .....	Gradiente de protones.
$\Delta\mu_H^+$ .....	Potencial químico de protones.
Tris.....	Tris(hidroximetilaminometano).
DCMU.....	3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetil urea.
DBMB.....	dibromometilisopropil- <i>p</i> -benzoquinona.
EDAC.....	N-etil-N'-(dimetilaminopropil)-carbodiimida.
DSPD.....	disalicilidén-propano-diamina.
NEM.....	N-etilmaleimida.
DCCD.....	N,N-diciclohexilcarbodiimida.
Flo.....	florizina: (4,4'6'-trihidroxi-2'-glucósido dihidrochalcona).
PMS.....	fenazina-metosulfato
MV.....	Metilviológeno.
FeCN.....	Ferricianuro de potasio.

U <sup>-</sup> .....	Especie básica del desacoplante.
HU .....	Especie ácida del desacoplante.
DMF .....	N,N-dimetil-formamida.
Pg .....	Propilénglicol.
Chl .....	Cloroplastos.
t. e. ....	Transporte de electrones.
Tricina .....	N-Tris(hidroximetil)metilglicina.
MES .....	ácido 2(N-Morfolino)etano sulfónico.
HEPES .....	ácido N-2,hidroxietilpiperazina-N'-2 etanosulfónico.
TES .....	ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetano sulfónico.
EDTA.....	ácido etiléndiamintetraacético.
TCA.....	ácido tricloroacético.
hv .....	Luz.
μM .....	micromolar.
μeq.....	microequivalentes.
μeq <sup>-1</sup> /mgChl hr .....	μeq de electrones por miligramo de clorofila por hora.
DCPIP .....	2,6-diclorofenol-indofenol oxidado.
DCPIPH <sub>2</sub> .....	2,6-Diclorofenolindofenol reducido.
SiMo.....	silicomolibdato de sodio.
DPC.....	1,5-difenilcarbazida.
KDa.....	Kilodaltones.
nm .....	nanómetros.
λ.....	longitud de onda.
A.....	Absorbancia.
Ac.....	Especie ácida del gossypol.
B.....	Especie básica del gossypol.
SF-6847 .....	3,5-di-ter-butil-4-hidroxibencilidén-malonitrilo.