

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica  
Sección de Fisiología y Bioquímica de Valladolid  
(Director : Prof. Romo Aldama)

## Efecto Crabtree en homogenizados de levadura

por

E. Romo, J. Vázquez de Prada (\*) y B. Herreros

(Recibido para publicar el 15 de noviembre de 1965)

Uno de los problemas más intrigantes del metabolismo celular es el mecanismo o los mecanismos por los cuales la célula controla el grado y el curso de su actividad metabólica, de acuerdo con sus necesidades y las condiciones ambientales. Como exponentes de este control celular son conocidos desde hace mucho tiempo los llamados *efecto Pasteur* y *efecto Crabtree*. Este último, menos investigado que el efecto Pasteur, consiste en una disminución del consumo de oxígeno por la célula cuando ésta se incuba en presencia de glucosa (1). El efecto Crabtree lo presentan preferentemente las células tumorales, pero también se ha observado en aquellos tipos de células normales que habitualmente muestran una intensa glicolisis aerobia, por ejemplo en los leucocitos polinucleares de la sangre.

Nosotros presentamos aquí datos sobre la aparición en homogenizados de levadura de un posible efecto Crabtree, en ciertas condiciones experimentales.

### Material y métodos

En todas las experiencias hemos utilizado *levadura* fresca de panadería, lavada inmediatamente antes de su uso por centrifugación en agua destilada tres veces, y una vez más en buffer de fosfatos 0,067 M (pH 6,5).

Para la *preparación del homogenizado* hemos seguido el método de trituración en mortero con alúmina (5). La alúmina usada ha sido el óxido de aluminio Merck para cromatografía, lavado y neutralizado previamente con solución diluida de ClH y desecado a la estufa. Porciones de una parte de levadura y dos partes de alúmina (2 a 3 gramos en total) se mezclan y se trituran vigorosamente durante 4 a 5 minutos en un mortero refrigerado. El número de células que se rompen en estas condiciones es, por término medio, de un 50 a un 70 %, a juzgar por la tinción con azul de metileno. Cada una de las porciones trituradas es recogida con 1 c.c. de buffer de fosfatos 0,067 M a pH 6,5, y la mezcla total, mantenida en hielo, es finalmente centrifugada a 3000-

\* Con una beca de Protección Escolar.

3500 r.p.m. durante 5 minutos. El sobrenadante, totalmente desprovisto de células, es el utilizado en las experiencias.

Para cada una de las experiencias de consumo de oxígeno, realizadas con un aparato de Warburg de tipo convencional, utilizamos cinco vasitos, en cada uno de los cuales colocamos en el compartimento principal 0,8 c.c. de un mismo homogenizado y 0,2 c.c. de solución recién preparada de ATP, DPN y Mg (en forma de sulfato). A uno de los vasos (*basal*) se añade además 1 c.c. de buffer de fosfatos 0,067 M (pH 6,5), y a los otros cuatro 1 c.c. de solución de glucosa a distintas concentraciones en el mismo buffer. El volumen de reacción en cada vaso es, por tanto, de 2 c.c., con las concentraciones finales de ATP, DPN, Mg y glucosa que se indican en cada caso al describir los resultados. En algunas experiencias la solución de glucosa se añade desde el brazo lateral del vasito, después de cierto tiempo de incubación. Todos los vasos llevan 0,2 c.c. de potasa al 40 % en el compartimento central, y como fase gaseosa aire. La incubación se hace a 37° C durante una hora, realizando las lecturas manométricas cada 10 minutos, después de 7 a 8 minutos iniciales de equilibración. Los valores así obtenidos, corregidos para los cambios del termobarómetro, quedan en la primera hora muy aproximadamente dentro de una línea recta.

En todos los casos se han realizado un mínimo de 5 experiencias para cada variación de las condiciones experimentales, siendo los resultados concordantes dentro de cada grupo.

Las determinaciones de consumo de glucosa se han realizado valorando la glucosa con el método enzimático de la glucosa-oxidasa, utilizando el enzima y reactivos de la casa Boehringer. 0,1 c.c. del contenido del vaso del Warburg se mezcla con 1 c.c. de ácido perclórico al 3,3 %. Tras centrifugación, 0,2 c.c. del sobrenadante claro, o de una dilución

conveniente de éste cuando la concentración de glucosa es elevada, se mezclan con 5 c.c. de la mezcla enzimática-cromógeno, y pasados 35 minutos a temperatura ambiente, se hace la lectura a 436 milimicras en un espectrofotómetro Beckman junto a un blanco y un standard.

De los productos utilizados, el ATP y el DPN son de la casa Boehringer, la glucosa Merck, purísima, y los demás reactivos y materiales productos comerciales de pureza analítica.

### Resultados

En la figura 1 se muestran el consumo de oxígeno y la utilización de glucosa por el homogenizado en presencia de distintas concentraciones de glucosa y para

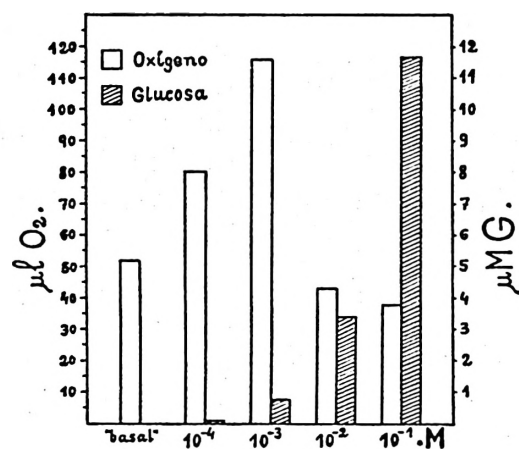


FIG. 1. — Consumo de oxígeno y utilización de glucosa por el homogenizado de levadura. Los cinco vasos contienen 0,8 c.c. de un mismo homogenizado y 0,2 c.c. de solución de ATP, DPN y Mg (concentración final de los tres:  $10^{-3}$  M en todos los vasos). Al «basal» se le ha añadido además 1 c.c. de buffer de fosfatos 0,067 M, pH 6,5, sin glucosa, y a los otros cuatro 1 c.c. de solución de glucosa en el mismo buffer para dar las concentraciones finales que se indican al pie de cada columna. Los resultados se expresan como microlitros de oxígeno y micromoles de glucosa consumidos por cada vaso en 60 minutos de incubación a 37° C.

una misma concentración de ATP, DPN y Mg. Se observa que el homogenizado consume más oxígeno en presencia de glucosa a bajas concentraciones, alcanzando un máximo cuando las concentraciones de glucosa y cofactores son iguales ( $10^{-3}$  M). A partir de aquí el aumento de la concentración de glucosa no incrementa el consumo de oxígeno, sino que, por el contrario, cuando la concentración de glucosa supera a la de cofactores se produce una ligera inhibición con respecto a la respiración basal del homogenizado.

Paradójicamente, la utilización de la glucosa aumenta en todos los vasos progresivamente en proporción a su concentración inicial, no guardando relación aparente con la cuantía de la respiración.

En las experiencias del tipo representado en la figura 1, el homogenizado, la glucosa y los cofactores son mezclados desde el principio en el compartimento principal del vaso del Warburg. Pero cuando la glucosa se añade desde el brazo lateral, se observa que tanto la estimulación como la inhibición del consumo de oxígeno aparecen inmediatamente, notándose ya estos efectos en los primeros diez minutos después de la adición (figura 2).

Variando las cantidades añadidas de ATP y DPN puede demostrarse que la aparición del efecto inhibitorio de la respiración va ligado a la discordancia entre las concentraciones de ATP y glucosa, siempre que la concentración de esta última supere a la de ATP. En consecuencia, cuando la concentración de ATP es diez veces menor que en las experiencias de la fig. 1, es decir,  $10^{-4}$  M, el máximo de consumo de oxígeno aparece en el vaso en el que la glucosa está también a una concentración de  $10^{-4}$  M, aun cuando en todos los vasos el DPN y el Mg sigan estando a una concentración de  $10^{-3}$  M.

Finalmente, en un grupo de experiencias con variaciones más graduales de las

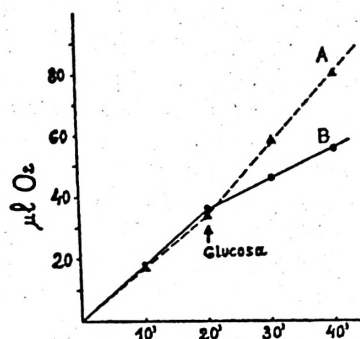


FIG. 2. — Efecto inmediato de la adición de glucosa. Los dos vasos A y B contienen idéntica cantidad de homogenizado y de cofactores. La glucosa es vertida desde el brazo lateral a los 20 minutos, quedando en el vaso A a una concentración de  $10^{-3}$  M y en el B de  $10^{-2}$  M. Las concentraciones finales de ATP, DPN y Mg son de  $10^{-3}$  M en los dos vasos.

concentraciones de glucosa, hemos podido observar que la inhibición aparece ya con la misma intensidad a concentraciones de glucosa dobles que las de ATP.

### Discusión

Las células intactas de levadura exhiben normalmente un claro efecto Pasteur al pasar del estado aerobio al anaerobio, pero no muestran el efecto Crabtree al incubarlas con glucosa. Lo que en estas circunstancias se observa es, por el contrario, un incremento progresivo del consumo de oxígeno al ir elevando la concentración de glucosa, hasta alcanzarse un nivel máximo de respiración cuando se satura la capacidad de transporte de la membrana y la utilización dentro de la célula. Una vez alcanzado este nivel máximo, un ulterior incremento de la concentración de glucosa puede no aumentar más el consumo de oxígeno, pero tampoco lo disminuye.

El comportamiento del homogenizado que nosotros presentamos aquí es claramente distinto. De hecho puede afirmarse que el homogenizado de levadura, pre-

parado en las condiciones experimentales indicadas, muestra un efecto Crabtree cuando se le incuba en presencia de ciertas concentraciones de glucosa, concretamente aquellas que sean superiores a la concentración de ATP. Se trata, pues, de un efecto Crabtree restringido a estas concentraciones, pues no aparece con cualquier adición de glucosa.

Como posibles causas que condicionen esta discordancia entre células intactas y homogenizado, hay que considerar una serie de factores que determinan profundas diferencias entre los dos sistemas.

En primer lugar, en el homogenizado hemos destruido la membrana celular, quitando así la barrera que normalmente impide un acceso masivo del sustrato a los sistemas enzimáticos de la célula. En este aspecto la situación en el homogenizado está en profundo contraste con lo que sucede en la célula intacta. SOLS y col. (3, 4) han demostrado que la membrana de la levadura posee un sistema de transporte específico común para la glucosa, fructosa y manosa, de una gran capacidad en potencia, pero que en condiciones normales limita la penetración del azúcar a las necesidades de la célula. Según estos autores, la glucosa, como las otras hexosas fermentables, no se acumulan dentro de la célula, salvo que se interfiera con su utilización intracelular, ajustándose el transporte a la utilización por un mecanismo feed-back de inhibición por la glucosa-6-fosfato, el producto final de la primera transformación enzimática de la glucosa. Es preciso hacer notar que este control del transporte parece ser en la levadura el único medio de limitar la utilización de la glucosa en sus primeras etapas, ya que, a diferencia de lo que ocurre en los tejidos animales, la hexoquinasa de la levadura no es inhibida por su producto final, la glucosa-6-fosfato (4).

Así, pues, una primera situación anómala es que en el homogenizado la glucosa tiene un acceso masivo y no li-

mitado en principio a los sistemas enzimáticos. Si esto fuera el factor principal que condiciona la aparición en este caso del efecto Crabtree, merecería la pena revisar cuál es la situación a este respecto en las células tumorales, las cuales presentan dicho efecto en condiciones normales.

Un segundo factor que diferencia al homogenizado de la célula intacta es la enorme dilución que han sufrido en aquél los sistemas enzimáticos, y esto puede afectar a la intensidad, la velocidad y la duración de las respuestas.

En tercer lugar no hay que olvidar que al preparar el homogenizado se desorganiza la estructura íntima de la célula, lo que indudablemente acarrea una profunda alteración de las relaciones estructurales de los sistemas enzimáticos dentro de la misma. En este sentido hay que tener presente que es posible que en los mecanismos de control del metabolismo celular juegue un importante papel la localización intracelular, y la redistribución entre las diversas estructuras, de las sustancias clave que ejercen este control (2). Este punto de vista implica también una limitación a los métodos usuales de investigación basados en análisis químicos de la concentración global de estas sustancias dentro de la célula.

En adición a los tres factores mencionados, hay que considerar además la posibilidad de que en el homogenizado de levadura existe muy probablemente un desequilibrio entre la potencia de los sistemas glicolítico y respiratorio. Con el método utilizado, concretamente, la extracción de la fracción glicolítica hidrosoluble de las células de levadura puede llegar a ser relativamente más completa que la liberación de la fracción respiratoria mitocondrial. Por otra parte, es posible que las propias mitocondrias liberadas estén afectadas en su capacidad respiratoria por algún grado de disrupción mecánica.

Todos los factores considerados, pero

especialmente el primero y el último, pueden ser la causa de que el homogenizado presente un efecto Crabtree mientras no aparece en las células intactas. En cualquier caso, creemos que el estudio de los mecanismos bioquímicos por los cuales el efecto se produce en este sistema puede contribuir a aclarar a su vez los mecanismos de este tipo de control metabólico en las células que lo presentan habitualmente. A este respecto, una indudable ventaja del homogeneizado sobre las células intactas es la posibilidad de adición directa al sistema de reacción de sustancias que no podrían penetrar a través de la membrana celular.

Los mecanismos de control implicados en el efecto Crabtree no están aclarados. El efecto se produce en las células que muestran intensa glicolisis aerobia, es decir, aquellas células que, como las tumorales, obtienen energía de la glicolisis con preferencia al sistema respiratorio mitocondrial, aún en presencia de oxígeno. CHANCE y HESS (2) creen, sin embargo, que esta conducta no está condicionada por un defecto básico del sistema respiratorio, como postuló Warburg para las células tumorales (6), sino por un estado de control más o menos permanente. Para las células de tumor ascitis concretamente, estos autores piensan que la inhibición del consumo de oxígeno después de la adición de glucosa, puede deberse a una deficiencia de ADP en la mitocondria. Así se explica que al añadir un agente desacoplante como el dinitrofenol, desaparece el efecto inhibitorio, obviamente porque la mitocondria no necesita más ADP.

En experiencias actualmente en curso con el homogeneizado de levadura, nosotros encontramos también que el efecto inhibitorio de las concentraciones altas de glucosa desaparece rápidamente al añadir ADP, pero es sorprendente que también desaparece con rapidez al añadir etanol, lo cual no parece pueda proporcionar ADP a las mitocondrias, sino en

todo caso DPNH. Es de sospechar, por lo tanto, que en el efecto Crabtree del homogenizado de levadura intervienen mecanismos de control más complejos que la simple competición por el ADP de ambos sistemas, el glicolítico y el respiratorio.

### Resumen

Se describe la aparición de un efecto Crabtree en homogenizados de levadura obtenidos por trituración en mortero con alúmina. La presentación de este efecto guarda relación con las proporciones relativas en que se encuentren la glucosa y el ATP, apareciendo cuando la concentración de glucosa supera a la de ATP.

El efecto desaparece tanto por la adición de ADP como de Etanol, lo que hace sospechar la intervención de mecanismos de control más complejos que la simple competición por el ADP por parte de los sistemas glicolítico y respiratorio.

### Summary

#### Crabtree effect on yeast homogenates

A description is made of the apparition of a Crabtree effect on yeast homogenates obtained through pulverizing in a mortar with alumina. The incidence of this effect has some connection with the relative proportions in which we find glucose and ATP, as it appears when the concentration of glucose is greater than that of ATP.

This effect disappears by the addition of either ADP or ethanol, which leads us to suspect the intervention of control mechanisms more complex than the simple competition for ADP by part of the glycolitical and respiratory systems.

### Bibliografía

- (1) CRABTREE, H. G. : *Biochem. J.*, **23**, 536, 1929.
- (2) CHANCE, B. and HESS, B. : *Science*, **129**, 700, 1959.
- (3) HEREDIA, C. F., DE LA FUENTE, G. y

- SOLS, A. : *Actas VII Jornadas Bioquim. Lat.*, p. 86, 1961.
- (4) SOLS, A., DE LA FUENTE, G., VIÑUELA, E. y HEREDIA, C. F. : *Biochem. J.*, **89**, 33, 1963.
- (5) UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H., STAUFFER, J. F. : «Manometric techniques». Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1959.
- (6) WARBURG, O. : *Science*, **123**, 309, 1956.