

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Sección de Fisiología y Bioquímica de Valladolid
(Prof. Dr. E. Romo Aldama)

Acción de los esteroides sexuales y del Dietilestilbestrol sobre la respiración de la levadura

por

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

(Recibido para publicar el 15 de diciembre de 1966)

En 1949, SCHACTER (12) observó que ciertos esteroides, tales como la progesterona, y la testosterona así como el estrógeno de síntesis dietilestilbestrol (DEB), producían una estimulación de la respiración endógena de la levadura. Por el contrario, cuando la respiración era medida en presencia de glucosa exógena, estos productos inhibían el consumo de oxígeno. Posteriormente el mismo autor investigó con más detalle la acción del DEB, observando que el efecto estimulador de la respiración endógena se tornaba en inhibición a concentraciones altas del estrógeno (13).

SALMONY (11) extendió estos estudios a otros estrógenos de síntesis, llegando a la conclusión de que sus efectos sobre el consumo de oxígeno de la levadura no estaban en relación con la respectiva capacidad estrogénica de los productos, siendo solamente activas aquellas sustancias que, como el DEB, poseen dos grupos fenólicos libres y cadenas alquílicas no polares en los carbonos que unen los dos anillos bencénicos. Por otra

parte, según este autor, los estrógenos naturales, estrona y estradiol, no estimulan la respiración endógena de la levadura como lo hacen los estrógenos de síntesis.

Más recientemente, DIRSCHERL y GEISSLER (1) han estudiado este mismo problema, confirmando que el DEB tiene una intensa acción inhibitoria sobre la respiración exógena de la levadura y otra tan intensa acción estimuladora del consumo de oxígeno endógeno. Pero además encuentran acciones idénticas, aunque mucho menos llamativas, con las hormonas sexuales naturales y otros esteroides no sexuales.

Por lo tanto, todos los autores están de acuerdo en los efectos del DEB, y es posible que la disparidad de resultados con otras hormonas sexuales se deban, al menos parcialmente, a las distintas cepas de levadura o condiciones experimentales empleadas. Sin embargo, el

* Becario de Protección Escolar.

problema no resuelto es el de aclarar los mecanismos íntimos por los que se producen tales efectos en este tipo de células. Realmente, de las investigaciones mencionadas no se desprende ninguna explicación clara de la acción inhibitoria sobre la respiración exógena, y con respecto a la estimulación endógena SALMONY (11) ha sugerido que, al menos en el caso del DEB, puede explicarse por un efecto desacoplante de la fosforilización oxidativa. Los resultados que nosotros presentamos aquí son concordantes con este punto de vista, pero ~~además~~ ~~sugieren~~ que ~~la~~ ~~inhibición~~ de la respiración exógena puede ser debida a un bloqueo del transporte o la utilización del substrato exógeno a nivel de la membrana de las células de levadura.

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).

Los homogenizados de levadura se prepararon por trituración en mortero con alúmina, según el proceder previamente descrito (8), enriqueciendo el producto final con cofactores (ATP, Mg y DPN).

Las determinaciones de consumo de oxígeno se realizaron en un aparato de Warburg de tipo convencional, a temperatura de 37°, con aire como fase gaseosa y potasa al 40 % en el compartimento central. En cada experiencia se utilizaron a la vez vasos experimentales y testigos con las mismas cantidades de levadura o de homogenizado, añadiendo a los primeros el DEB o las hormonas sexuales inmediatamente antes de iniciar la incubación a 37°. Estos compuestos fueron vehiculados disueltos, a las concentraciones apropiadas, en 0,2 c. c. de

KOH 0,01 N, y para evitar diferencias en el pH, se añadió a los testigos una cantidad equivalente de KOH. Otros detalles de las condiciones experimentales se indican en cada caso al describir los resultados.

El consumo de glucosa se determinó por la glucosa desaparecida del medio de incubación en el tiempo de duración de la experiencia, valorando el azúcar con el método enzimático de la glucosa-oxidasa.

Un mínimo de ~~reactivos~~ fueron para cada variación de las condiciones experimentales, siendo los resultados concordantes dentro de cada grupo.

Las hormonas empleadas, testosterona, progesterona, estrona y estradiol, así como el DEB, nos fueron amablemente proporcionadas por la casa Schering en forma de producto puro en polvo. El ATP, el DPN y el enzima y reactivos para la valoración con glucosa-oxidasa, eran de la casa Boehringer. La alúmina (óxido de aluminio para cromatografía) y la glucosa, purísima, de la casa Merck. El 2,4-dinitrofenol de la casa Schuchardt. Los demás reactivos empleados fueron productos comerciales de pureza analítica.

Resultados

En primer lugar, hemos tratado de comprobar los efectos de las hormonas sexuales y del DEB sobre la respiración endógena (sin glucosa) y exógena (con glucosa) de las células de levadura. En la figura 1 están representados los valores medios de estos efectos en las condiciones experimentales allí señaladas, expresados en forma de porcentajes de inhibición o de estimulación de la respiración producidos al añadir los distintos compuestos. En ella se ve que todos los productos probados tienen una acción estimuladora de la respiración en-

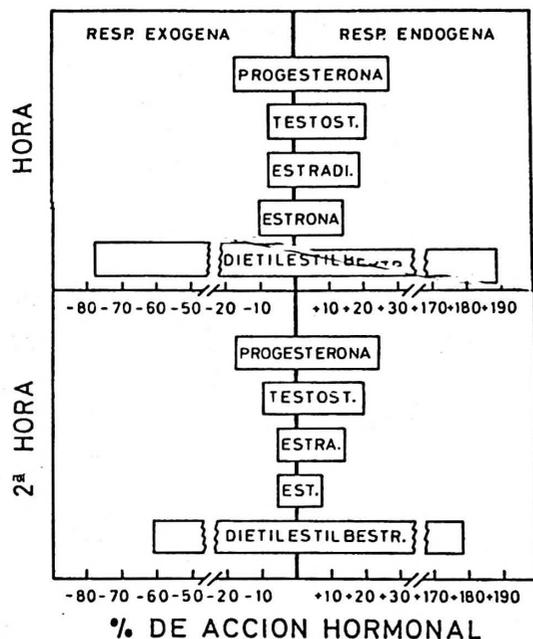


FIG. 1. Acción de las hormonas sexuales y del DEB sobre la respiración exógena y endógena de las células de levadura. Se representan los porcentajes de inhibición y de estimulación producidos por la adición de los distintos productos a una concentración final de 150 gammas por ml. Las experiencias de respiración exógena se realizaron mezclando en cada vaso del Warburg 1 c. c. de suspensión de células (10.000 a 30.000 por mm³) en buffer de fosfatos 0,067 M (pH 6,5) y 1 c. c. de solución de glucosa al 0,4 % en el mismo buffer. Para la respiración endógena se utilizó un número de células 5 a 10 veces mayor, suspendidas en 2 c. c. de buffer sin glucosa. En ambos casos el consumo de oxígeno se determinó durante 2 horas consecutivas.

dógena y una acción inhibitoria de la respiración exógena. Estas acciones son ya notables en el caso de la progesterona, pero son sobre todo llamativas con el DEB.

EFFECTO DEL pH. Al tratar de comprobar los hallazgos de otros autores (11, 13) en el sentido de que la acción estimuladora del DEB sobre la respira-

ción endógena se torna en inhibición al aumentar la concentración del producto, hemos encontrado que este fenómeno guarda relación con el pH del medio de incubación utilizado en la experiencia. Así, en la figura 2 se muestran los efectos de diferentes concentraciones de DEB a pH de 4,5 y de 6,5. Se observa que las concentraciones más altas (225 y 300 gammas por c. c.) inhiben la respiración endógena a pH de 4,5, pero la estimulan intensamente a pH de 6,5. Por el contrario, la inhibición de la respiración exógena no es influenciada por el pH del medio, apareciendo tanto a pH de 4,5 como de 6,5 en todo el intervalo de concentraciones probadas (75 a 300 gammas por ml).

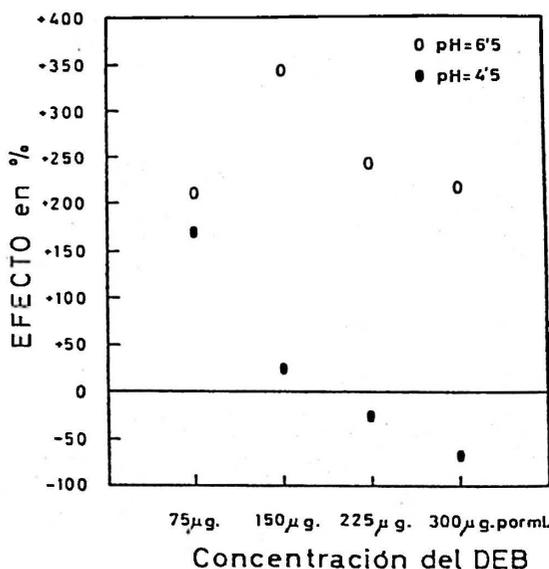


FIG. 2. Efectos de diferentes concentraciones de DEB sobre la respiración endógena de la levadura a pH de 4,5 y de 6,5. Se representan los porcentajes de estimulación o de inhibición en los vasos experimentales (conteniendo DEB) en relación con los testigos (sin DEB). En ambos se colocó la misma cantidad de levadura (alrededor de 130.000 células por milímetro cúbico) suspendida en 2 ml de buffer de fosfatos 0,067 M (pH 4,5 y 6,5).

INHIBICIÓN DE LA RESPIRACIÓN EXÓGENA CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLUCOSA. Cuando la levadura es incubada en presencia de concentraciones crecientes de glucosa, el consumo de oxígeno se incrementa progresivamente. Sin embargo, cuando en estas circunstancias se añade DEB, la respiración se mantiene inhibida prácticamente al mismo nivel, independientemente de la concentración de glucosa (fig. 3). En consecuencia, el porcentaje de inhibición de la respiración exógena producido por el DEB aumenta al aumentar la concentración de glucosa.

ACCIÓN DEL DEB SOBRE EL CONSUMO DE GLUCOSA. Junto a la inhibición de la

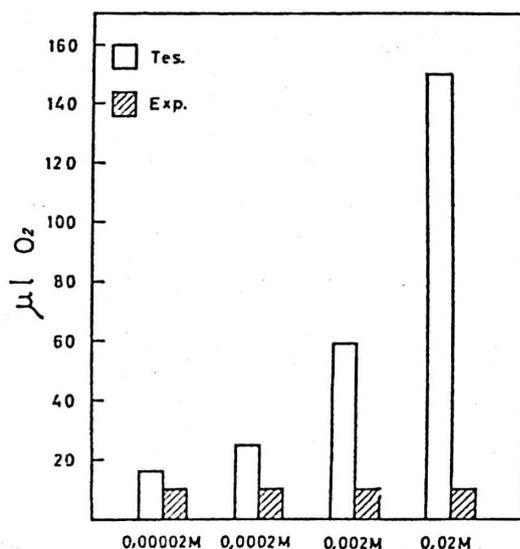


FIG. 3. Inhibición de la respiración exógena por el DEB con distintas concentraciones de glucosa. Se representa el consumo de oxígeno durante una hora de incubación a 37°, en las siguientes condiciones experimentales: todos los vasos contienen la misma cantidad de levadura (alrededor de 50.000 células por mm³) suspendida en buffer de fosfatos 0,067 M (pH 6,5), con las concentraciones iniciales de glucosa que se indican al pie de cada columna. A los vasos experimentales se añadió DEB (150 gammas por c. c.) al comienzo de la incubación.

respiración exógena, el DEB inhibe también la captación de glucosa por las células de levadura, a juzgar por la desaparición del azúcar en el medio de incubación (fig. 4, izquierda). Por otra parte, el porcentaje de inhibición de la captación de glucosa es casi equivarable al de inhibición del consumo de oxígeno.

EFFECTOS DEL DEB EN EL HOMOGENIZADO DE LEVADURA. En la figura 4 (derecha) se muestra el efecto del DEB sobre el consumo de oxígeno y la utilización de glucosa por el homogenizado de levadura. Se observa que los vasos experimentales consumen más oxígeno que los testigos, es decir, hay una estimulación de la respiración del homogenizado en presencia del DEB, pero prácticamente no aparece efecto alguno en cuanto al consumo de glucosa.

Puesto que el homogenizado ha sido incubado con la adición de glucosa exógena en condiciones en las que esta adición aumenta el consumo de oxígeno (8), podemos equiparar estas experiencias a las de respiración exógena de las células intactas. En este sentido, el efecto del DEB en el homogenizado es totalmente distinto al que se observa con las células intactas, ya que no hay inhibición, sino estimulación, de la respiración exógena del homogenizado, y tampoco hay inhibición del consumo de glucosa.

Por otra parte, cuando el homogenizado se incubaba sin la adición de glucosa exógena, simplemente enriquecido en cofactores, el DEB también incrementa el consumo de oxígeno, siempre que su concentración no sea superior a 150 gammas por c. c.

Estos datos sugieren que la acción inhibidora del DEB sobre la respiración exógena de la levadura intacta depende de la integridad estructural de las células, probablemente de la integridad de la membrana celular.

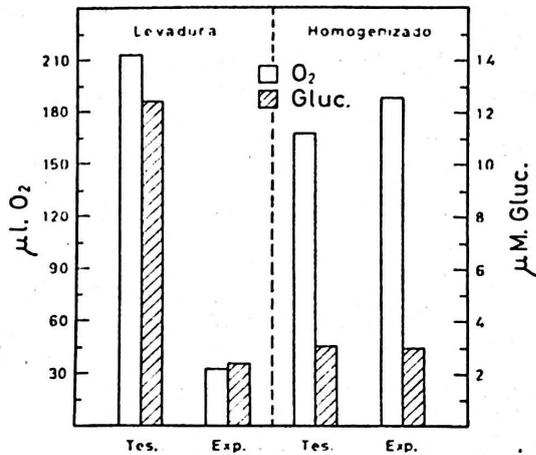


FIG. 4. Respiración y consumo de glucosa de las células intactas y del homogenizado levadura en presencia de DEB. En la mitad izquierda de la figura se ha representado el consumo de oxígeno y la captación de glucosa por la levadura intacta en las siguientes condiciones : todos los vasos contienen la misma cantidad de levadura (alrededor de 100.000 células por mm³) suspendida en buffer de fosfatos 0,067 M (pH 6,5) ; al comienzo de la experiencia se añadió a todos ellos glucosa para dar una concentración de 10⁻² M, y a los experimentales además DEB (150 gammas por c. c.) ; se midió el consumo de oxígeno durante 1 hora, y al cabo de este período se valoró la glucosa en el medio de incubación. La mitad derecha de la figura corresponde a experiencias similares realizadas con el homogenizado de levadura. En todos los vasos se puso la misma cantidad de homogenizado (enriquecido con ATP, Mg y DPN, 5 × 10⁻³ M) y de glucosa (5 × 10⁻³ M), añadiendo a los experimentales DEB (150 gammas por c. c.) ; la glucosa se valoró al comienzo y al final de la incubación.

ACCIÓN DESACOPLANTE DEL DEB. — En la figura 5 se comparan las acciones del Dinitrofenol y del DEB sobre el efecto Crabtree del homogenizado de levadura. Como previamente hemos descrito (8) este efecto se produce cuando el homogenizado se incuba con concentraciones

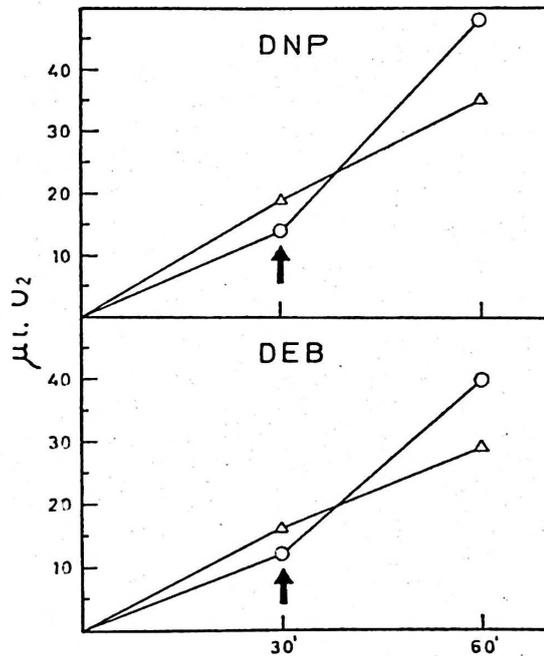


FIG. 5. Acción del DEB y del Dinitrofenol (DNP) sobre el «efecto Crabtree» del homogenizado de levadura. Representación del consumo de oxígeno del homogenizado a los 30 y 60 minutos de incubación en las siguientes condiciones : en cada experiencia se utilizaron dos vasos con la misma cantidad de homogenizado y de cofactores (ATP, Mg y DPN, 10⁻³ M), uno de ellos con glucosa a concentración de 6 × 10⁻³ M (O) y otro sin ella (Δ). A los 30 minutos se añade desde el brazo lateral el DEB o el DNP al vaso con glucosa, y una cantidad equivalente de álcali sin productos al otro, determinando el consumo de oxígeno durante otros 30 minutos.

de glucosa superiores a los de ATP, y consiste en una inhibición del consumo de oxígeno al añadir la glucosa. Se sabe que esta inhibición desaparece al añadir un desacoplante de la fosforilización oxidativa, por ejemplo el Dinitrofenol. Pues bien, en la figura 5 se observa que el DEB se comporta de manera idéntica al Dinitrofenol con respecto al efecto Crabtree del homogenizado.

Discusión

En la primera parte de nuestro trabajo, hemos comprobado que el DEB ejerce intensas acciones sobre la respiración de la levadura, y que los esteroides sexuales naturales también muestran cierta actividad en este sentido aún cuando mucho menos marcada. Este último hallazgo está parcialmente en desacuerdo con los resultados de SALMONY (11), quien no encontró efecto alguno con la estrona y el estradiol.

Pero a este respecto hay que señalar que incluso con el DEB se encuentran a veces grandes fluctuaciones en la intensidad del efecto de unas experiencias a otras, lo cual probablemente está en relación con variaciones en el estado o preparación de la levadura, por ejemplo la cantidad de substrato endógeno que contienen las células. Puesto que los efectos observados con los estrógenos naturales son poco llamativos, las discrepancias entre los distintos autores podrían ser debidas a la utilización de distintas cepas de levadura, o a pequeñas variaciones en los métodos de preparación.

SHACTER (13) y SALMONY (11) demostraron que, por encima de ciertas concentraciones, el DEB no estimula la respiración endógena sino que la inhibe, y nosotros hemos encontrado que la concentración del producto a la que tiene lugar esta reversión del efecto varía con el pH del medio de incubación. Si, como afirma ROTHSTEIN (9, 10), la concentración de hidrogeniones intracelular en la levadura no es influenciada prácticamente por el pH extracelular, hay que pensar entonces que el efecto de este último sobre la acción del DEB se ejerce fuera de la célula. La explicación más sencilla sería que los cambios del pH modifican el grado de ionización de los dos grupos fenólicos que el DEB posee en su molécula, y esto hace que varíe la cantidad de producto que penetra al interior de

las células, suponiendo que la membrana de la levadura es más permeable a las moléculas no ionizadas que a las que llevan carga eléctrica. Así, cuanto más ácido sea el pH del medio, mayor cantidad de DEB podrá penetrar en las células a una determinada concentración, y en consecuencia, se alcanzará antes la concentración intracelular que produce inhibición de la respiración endógena.

Puesto que la inhibición de la respiración exógena no es influenciada por el pH del medio, esto indicaría, de acuerdo con la explicación anterior, que el DEB no necesita penetrar en las células para producir este efecto. Ciertamente, nuestros resultados sugieren que en este caso el DEB actúa a nivel de la membrana celular, produciendo una inhibición de la utilización o del transporte de la glucosa en este punto, y este hecho sería a su vez la causa de la inhibición del consumo de oxígeno.

Los datos en que apoyamos esta sugerencia son los siguientes:

1.º Cuando la levadura se incuba con glucosa y DEB, lo que se inhibe es el incremento de la respiración que debería producirse al añadir la glucosa, pero aún en estas condiciones el consumo de oxígeno es todavía mayor que el correspondiente a la respiración endógena de esa levadura.

2.º La inhibición del consumo de oxígeno se acompaña de una inhibición paralela de la captación de glucosa por las células intactas; y

3.º Cuando se suprime la membrana celular, es decir, en el homogenizado, el DEB a las concentraciones apropiadas no produce inhibición sino que estimula la respiración tanto en presencia como en ausencia de glucosa exógena, no inhibiendo tampoco en estas circunstancias el consumo del azúcar.

LEFEBRE (6, 7) observó que el DEB tiene una acción inhibitoria sobre el transporte de glucosa por la membrana

del eritrocito humano. Por otra parte, diversos autores han comunicado alteraciones de la glucemia y glucosuria en animales tratados con este producto (2, 3, 4, 5), y nosotros mismos hemos observado inhibición de la captación de glucosa por el diafragma de rata *in vitro*. Todos estos datos, en unión de la inhibición encontrada también en la levadura, sugieren la existencia de algún tipo de similitud en los mecanismos de transporte del azúcar en los diversos tipos de células, o bien que el DEB actúa de manera inespecífica sobre la membrana celular, modificando la permeabilidad de la misma para este tipo de substratos.

Por lo que a la levadura se refiere, nuestros resultados sugieren además que la inhibición de la captación de glucosa es de tipo no competitivo, puesto que no se observa disminución del efecto con concentraciones crecientes del azúcar.

Finalmente, lo observado respecto a la acción del DEB sobre el efecto Crabtree del homogenizado de levadura, está de acuerdo con los resultados de SALMONY (1), apoyando su interpretación de que la acción estimuladora sobre la respiración endógena puede ser debida a una acción desacoplante de la fosforilización oxidativa.

Resumen

Se ha estudiado la acción de los esteroides sexuales (Testosterona, Progesterona, Estrona y Estradiol) y del Dietilestilbestrol sobre la respiración de la levadura, observando que el Dietilestilbestrol, especialmente, produce una intensa estimulación de la respiración endógena y una inhibición de la respiración exógena con glucosa, como ya habían descrito otros autores.

La estimulación de la respiración endógena se torna en inhibición a concentraciones altas del estrógeno, pero la concentración crítica para que se invierta el efecto varía con el pH del medio de incubación, probablemente porque con ello varía el grado de ionización del producto y la velocidad de penetración en las células.

La inhibición de la respiración exógena se acompaña de una inhibición paralela de la captación de glucosa por las células. En el homogenizado de levadura, sin embargo, el Dietilestilbestrol no produce inhibición, sino que estimula tanto la respiración endógena como la exógena, y no inhibe el consumo de glucosa. Estos hechos sugieren que la inhibición de la respiración exógena en las células intactas es debida a una inhibición del transporte de glucosa por la membrana celular. El Dietilestilbestrol hace desaparecer el efecto Crabtree en el homogenizado de levadura de manera idéntica a como lo hacen los agentes desacoplantes. Así, la estimulación de la respiración endógena podría deberse efectivamente a una acción desacoplante de la fosforilización oxidativa, como previamente han sugerido otros autores.

Summary

Action of the sexual steroids and of Diethylestilbestrol on the respiration of yeast

A study has been made of the action of the sexual steroids (Testosterone, Progesterone, Estrone and Estradiol) and of Diethylestilbestrol on the respiration of yeast, it being observed that Diethylestilbestrol, especially, produces an intense stimulation of the endogenous respiration and an inhibition of the exogenous respiration with glucose, as had already been described by other authors.

The stimulation of the endogenous respiration becomes inhibition at high concentrations of the estrogen, but the critical concentration, if the effect is to be inverted, varies with the pH of the incubation medium, probably because with it the degree of ionization of the product and the speed of penetration into the cells also vary.

The inhibition of the exogenous respiration is accompanied by a parallel inhibition of the intake of glucose by the cells. In the homogenate of yeast, however, Diethylestilbestrol does not produce inhibition, but rather stimulates both endogenous and exogenous

respiration, and does not inhibit the consumption of glucose. These facts suggest that the inhibition of the exogenous respiration in the intact cells is due to an inhibition of the transport of glucose by the cellular membrane. Dichylestylbestrol makes the Crabtree effect disappear in the homogenate of yeast in exactly the same way as do the disconnecting agents. Thus the stimulation of the endogenous respiration might, in fact, be due to oxidizing phosphorylation, as has been previously suggested by other authors.

Bibliografía

1. DIRSCHERL, W., y GEISLER, G.: *Zeitschrift für Vitamin Hormon und fermentforschung*, **11**, 10, 1960/61.
2. HOUSSAY, B. A., y MAZZOCCO, P.: *Rev. Soc. argent. Biol.*, **22**, 366, 1946.
3. INGLE, D. J.: *Endocrinology*, **29**, 838, 1941.
4. INGLE, D. J., y NEZAMIS, J.: *Endocrinology*, **33**, 181, 1943.
5. JAMES, R. G., y DAWSON, H.: *Endocrinology*, **38**, 10, 1946.
6. LEFEBRE, P. G.: *Science*, **130**, 104, 1959.
7. LEFEBRE, P. G.: *Pharmacol. Rev.*, **13**, 39, 1961.
8. ROMO, E., VÁZQUEZ DE PRADA, J., y HERREROS, B.: *R. esp. Fisiol.*, **21**, 173, 1965.
9. ROTHSTEIN, A.: *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **8**, 165, 1954.
10. ROTHSTEIN, A.: *Disc. Faraday Soc.*, **21**, 229, 1956.
11. SALMONY, D.: *Biochem. J.*, **62**, 411, 1956.
12. SHACTER, B.: *Arch. Biochem.*, **23**, 321, 1949.
13. SHACTER, B.: *Arch. Biochem.*, **46**, 312, 1953.