

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

## Efectos del tromexano sobre la respiración y consumo de glucosa celular

por

E. Romo, A. Velasco y J. Vázquez de Prada

(Recibido para publicar el 23 de septiembre de 1968)

Las cumarinas con las naftoquinonas forman un grupo numeroso de sustancias sobre las que no abundan los datos acerca de su acción a nivel celular.

En 1947, WENDEL (8) hizo la primera observación de que los compuestos naftoquinónicos ejercían una acción sobre los procesos respiratorios. Con la 2-hidroxi-3-alkil naftoquinona encontró una inhibición del consumo de oxígeno en los parásitos de la malaria y una relación entre su poder antimalárico y el grado de inhibición. Desde entonces, otros autores han trabajado y ampliado este campo de investigación, tratando de aclarar los efectos a escala celular de estas sustancias. Se han empleado para ello, fundamentalmente, células de levadura, extractos mitocondriales y sistemas enzimáticos purificados, obteniendo respuestas variables en cuanto al consumo de  $O_2$ , pero encontrando siempre una inhibición marcada de la fosforilización oxidativa. Estos resultados han sido interpretados de maneras distintas por los diversos autores. Y así, KRAHL (3) piensa en un estímulo de la actividad ATPasa por estos agentes; LEHNINGER

(4), en una inhibición de las fosfotransferasas (o enzimas que transportan P al ADP para la formación de ATP); MARTIUS y LITZOW (6), en un bloqueo de la cadena respiratoria mitocondrial en el paso previo al citocromo C, y BALL y colaboradores (1), en una acción tóxica más general, similar a la de los cianuros.

Por otro lado, hay que tener en cuenta la semejanza estructural de estas sustancias con la vitamina K y el papel de ésta en la coagulación de la sangre.

Ya LINK (5) apuntó la idea del paralelismo que existía entre los tests de coagulación y la acción desacoplante de estas sustancias. MARTIUS (6) probó una serie de sustancias anticoagulantes tales como la naftil-cumarina, la carboxi-metilen-oxicumarina, la propiliden bis-oxicumarina, etc., y encontró que todas ellas inhiben la fosforilización oxidativa. De ahí que, para este autor, la acción anticoagulante de estos compuestos podía ser un efecto secundario o indirecto de una fosforilización oxidativa mitocondrial deficitaria en la célula hepática. Creemos que no se han hecho estudios comparativos de

la intensidad de esa acción desacoplante con el poder anticoagulante de cada una de esas sustancias, tan utilizadas en la clínica como tales y cuyo mecanismo íntimo de actuación todavía está poco claro (2). Tampoco han sido estudiados los efectos de estas sustancias sobre la glicolisis celular.

En este trabajo presentamos los resultados de un estudio del efecto del tromexano sobre la respiración y el consumo de glucosa de células de levadura, diafragma de rata y homogenizado de hígado del mismo animal.

### Material y métodos

Las medidas de los consumos de oxígeno se han hecho en un aparato de Warburg (7), tipo convencional, a temperatura constante de 37° y durante una hora.

Para las valoraciones de los consumos de glucosa se ha empleado el método enzimático de la glucosa-oxidasa, determinando la concentración de glucosa en el medio de incubación al principio y al fin de cada experiencia en fotocolorímetro Leitz, a 445 milimicras.

**EXPERIENCIAS DE LEVADURA.** La levadura fresca de panadería, renovada cada cinco días, era lavada antes de su uso tres veces en agua destilada y una vez en buffer de fosfatos 0,067 M (pH 6,5). En cada experiencia se utilizan vasos experimentales y vasos testigos, poniendo en cada uno de ellos 1 ml de suspensión de levadura y 0,8 ml de solución de glucosa en buffer para respiración exógena y 1 ml de suspensión de levadura con 0,8 ml de buffer de fosfatos para respiración endógena. A los experimentales se añadían, luego, 0,2 ml de tromexano en solución de KOH 0,01 N y a los testigos 0,02 ml de KOH 0,01 N. Finalmente, en el compartimento central, 0,2 ml de potasa al 40 por ciento.

El volumen final de cada vaso era de 2,2 ml.

**EXPERIENCIAS DE DIAFRAGMA DE RATA.** Inmediatamente después de matada la rata por decapitación (mantenida previamente 18 horas aislada y en ayunas), se extrae el diafragma, se le divide en cuadrantes, según la técnica habitual, y se le reparte en dos vasos, experimental y testigo. El medio de incubación es 1,8 ml de Krebs-Ringer fosfato con glucosa (para respiración exógena) y Krebs-Ringer fosfato sin glucosa (para respiración endógena). A los experimentales se añaden 0,2 ml de tromexano en solución alcalina 0,01 N, y a los testigos 0,2 ml de solución alcalina 0,01 N. Cada vaso lleva, además, 0,2 ml de potasa al 40 % en el compartimento central.

**EXPERIENCIAS DE HOMOGENIZADO DE HÍGADO.** Se prepara una solución de sacarosa 0,25 M, que se diluye en buffer de fosfatos pH 7,4 en la proporción de cinco a uno.

Se coloca un gramo de tejido por cada 9 ml de esta solución. Se tritura en un homogenizador tipo Potter-Elvehjem, durante dos o tres minutos, manteniendo el tejido en refrigeración (a 0°). El homogenizado así obtenido se utiliza íntegramente, sin hacer centrifugación para separar membranas y células ni añadir sustancias que le enriquezcan.

Para respiración del homogenizado se coloca: en el testigo, 1,50 ml de homogenizado con 0,3 ml de solución de sacarosa en buffer y 0,2 ml de solución alcalina 0,01 N. En el experimental, 1,50 ml de homogenizado, con 0,3 ml de solución de sacarosa en buffer y 0,2 ml de solución de tromexano.

Finalmente, 0,2 ml de solución KOH al 40 % en el compartimento central de los dos vasos.

**PRODUCTOS.** El tromexano fue suministrado por la Casa GEIGY en forma de polvo blanco, puro. El reactivo de glucosa fue proporcionado por la BOEHRINGER. La glucosa era MERK purísima y los de-

TABLA I

Efecto del tromexano ( $3,6 \times 10^{-4}$  M) sobre la respiración exógena y endógena y sobre el consumo de glucosa de células de levadura

	Test	Exp.	Media $\pm$ D.S. *	P **
Consumo de O <sub>2</sub> ( $\mu$ l/h)				
Respiración exógena	115	106	9,46 $\pm$ 6,31 (30)	< 0,001
Respiración endógena	17	25	7,71 $\pm$ 4,4 (7)	0,01 < P < 0,02
Consumo de glucosa (mg/h)	0,42	0,61	0,19 $\pm$ 0,0032 (13)	< 0,001

\* Media  $\pm$  D.S. de las diferencias entre pares de testigos y experimentales. Entre paréntesis el número de pares.

\*\* El análisis estadístico se ha hecho por el método de «comparación por pares», aplicando el t-test de Student.

más reactivos y materiales productos comerciales de pureza analítica.

### Resultados

EXPERIENCIAS DE CÉLULAS DE LEVADURA. En la tabla I se indican los resultados de la acción del tromexano sobre la respiración exógena (con glucosa) y endógena (sin glucosa) de las células de levadura y sobre el consumo de glucosa de las mismas, en las condiciones experimentales señaladas. La concentración usada del producto ha sido de  $3,6 \times 10^{-4}$  M, por ser ésta la dosis más adecuada, según algunos autores (2). De unas experiencias

a otras, hemos encontrado variaciones notables en el consumo de oxígeno, que son debidas al estado de la levadura, tiempo de almacenaje y empobrecimiento más o menos intenso de su contenido en sustrato endógeno. El porcentaje medio de inhibición de la respiración exógena es de un 10 % aproximadamente.

En los consumos de oxígeno en ausencia de glucosa (respiración endógena), el efecto estimulante del tromexano es más marcado, aunque las cifras totales son siempre más bajas que las obtenidas en la respiración exógena.

Sobre los consumos de glucosa, observamos una acción estimuladora del tromexano.

TABLA II

Efecto del tromexano ( $3,6 \times 10^{-4}$  M) sobre la respiración exógena y endógena y sobre el consumo de glucosa por diafragma de rata

	Test	Exp.	Media $\pm$ D.S. *	P **
Consumo de O <sub>2</sub> ( $\mu$ l/100 mg/h)				
Respiración exógena	106	60	46 $\pm$ 17,5 (9)	< 0,001
Respiración endógena	128	94	35 $\pm$ 24 (4)	0,02 < P < 0,05
Consumo de glucosa (mg/100 mg/h)	0,33	0,52	0,19 $\pm$ 0,02 (9)	< 0,001

\* Media  $\pm$  D.S. de las diferencias entre pares de testigos y experimentales. Entre paréntesis el número de pares.

\*\* El análisis estadístico se ha hecho por el método de «comparación por pares», aplicando el t-test de Student.

TABLA III

Efecto del tromexano sobre el consumo de oxígeno ( $\mu\text{l/h}$ ) de homogenizado de hígado de rata

Tromexano [M]	Consumo O <sub>2</sub> $\mu\text{l/h}$ Test Exp.		Media $\pm$ D.S. *	P **
$3 \times 10^{-4}$	88	84,5	4,20 $\pm$ 2,4 (5)	0,01 < P < 0,02
$1,8 \times 10^{-4}$	104	95	8,75 $\pm$ 4,6 (8)	< 0,001
$3,6 \times 10^{-4}$	89,1	65,1	24,00 $\pm$ 15,2 (10)	< 0,001
$7,2 \times 10^{-4}$	116	72	44,40 $\pm$ 16,8 (11)	< 0,001

\* Media  $\pm$  D.S. de las diferencias entre pares de testigos y experimentales. Entre paréntesis el número de pares.

\*\* El análisis estadístico se ha hecho por el método de «comparación por pares», aplicando el t-test de Student.

**EXPERIENCIAS DE DIAFRAGMA DE RATA.** En la tabla II se expresan los resultados de las experiencias de respiración exógena y endógena de diafragma de rata. A diferencia de lo que pasa en células de levadura, aquí el tromexano inhibe no sólo la respiración exógena, sino también la respiración endógena. El porcentaje medio de inhibición de la primera es superior al 30 % y de la segunda al 15 %.

Sobre el consumo de glucosa, se nota el mismo efecto estimulante del tromexano que en las células de levadura, pero hay una diferencia notable entre los dos casos: en la levadura, el consumo de oxígeno, en presencia de glucosa, es siempre muy superior al oxígeno consumido por estas células en ausencia de ese sustrato. En cambio, el diafragma tiene estos dos consumos muy parecidos. Es decir, que así como en la levadura la incubación con glucosa estimula la respiración, no ocurre lo mismo en el diafragma, el cual respira prácticamente igual con glucosa que sin ella.

**EXPERIENCIAS DE HOMOGENIZADO DE HÍGADO.** En la tabla III se recogen los resultados de estas experiencias, con el homogenizado preparado según el procedimiento descrito. Se observa que el tromexano inhibe ya la respiración de este

homogenizado a concentraciones del orden de  $3 \times 10^{-6}$  M. Con cantidades mayores, aumenta el efecto inhibitor sobre el consumo de oxígeno, llegando a un 30 % a la concentración de  $7,2 \times 10^{-4}$  M.

### Discusión

De los trabajos de LEHNINGER (4), MARTIUS (6) y BALL (1) se desprende que ciertos derivados naftoquinónicos, y las dicumarinas se comportan *in vitro* como inhibidores de la fosforilización oxidativa, variando la intensidad del efecto en proporción directa a las concentraciones de las drogas.

Con respecto al consumo de O<sub>2</sub>, se sabe que estos y otros agentes desacoplantes tienen efectos distintos según la concentración, estimulando ligeramente a pequeñas concentraciones e inhibiendo más intensamente a dosis altas; pero en ambos casos con disminución del cociente P/O.

Como derivado dicumarínico, es de esperar que el tromexano ejerza también una acción desacoplante de la fosforilización oxidativa, y nuestros resultados pueden explicarse sobre la base de tal mecanismo de acción. La estimulación de la respiración endógena en las células de levadura sería equivalente a la estimulación del consumo de O<sub>2</sub> producida por

los agentes desacoplantes a bajas concentraciones. Por otro lado, la inhibición de la respiración exógena acompañada de un aumento del consumo de glucosa podría deberse a un aumento de la glicolisis aerobia en presencia de abundante sustrato exógeno, como respuesta celular ante la inhibición de la fosforilización oxidativa.

Tal respuesta no sería posible en condiciones de respiración endógena por el empobrecimiento existente en el sustrato endógeno de las células que empleamos.

En el diafragma de rata, el tromexano, a la concentración empleada, inhibe el consumo de  $O_2$  tanto en presencia como en ausencia de glucosa exógena. Aunque la concentración de la droga en el medio fue la misma que para las células de levadura, la concentración intracelular puede haber sido más alta, habida cuenta de la mayor permeabilidad de la membrana de la célula animal.

Así, el efecto sobre la cadena respiratoria sería más intenso, apareciendo la típica inhibición del consumo de  $O_2$  de los agentes desacoplantes a altas concentraciones. Sin embargo, la inhibición de la respiración es mayor cuando se pone glucosa en el medio de incubación, y esto se acompaña de un aumento del consumo de glucosa exógena, como ocurre en la levadura. Parece, por lo tanto, que en el músculo también aparecería una respuesta celular de aumento de la glicolisis aerobia en sustitución de una cadena respiratoria deficitaria.

En el homogenizado de hígado hemos probado varias concentraciones de tromexano y todas producen una inhibición de la respiración. En estas condiciones, la concentración efectiva de la droga en contacto con los enzimas respiratorias debe ser, naturalmente, muy superior a las que habría en las células intactas y, como cabría esperar, la inhibición aumenta al aumentar la concentración.

## Resumen

Se han estudiado los efectos del tromexano sobre la respiración y el consumo de glucosa de células de levadura, diafragma de rata y homogenizado de hígado.

A una concentración de  $3,6 \times 10^{-4}$  M, la droga provoca una estimulación de la respiración endógena de la levadura y una inhibición ligera de la respiración exógena, con aumento del consumo de glucosa. En el diafragma de rata, la misma concentración provoca inhibición más marcada tanto de la respiración endógena como de la exógena, pero en este último caso también con aumento del consumo de glucosa exógena. Finalmente, el tromexano inhibe ya el consumo de oxígeno del homogenizado de hígado de rata a concentraciones de  $3 \times 10^{-6}$  M, y la inhibición aumenta al aumentar la concentración.

Se sugiere que estos efectos podrían ser debidos a una acción desacoplante de la fosforilización oxidativa, lo cual, en las células intactas, provocaría respuestas compensadoras en forma de un aumento de la glicolisis aerobia.

## Summary

### Effects of Tromexan on Cellular Respiration and Glucose Consumption

The effects of tromexan on cellular respiration and glucose uptake of yeast, rat diaphragm and liver homogenates have been studied.

At  $3.6 \times 10^{-4}$  M concentration, the drug produces a stimulation of the endogenous respiration and a weak inhibition of exogenous respiration, with an increase in the intake of glucose. In the rat diaphragm, the same concentration produces a marked inhibition of both endogenous and exogenous respiration, but the latter case exhibits an increase of glucose utilization. Finally, tromexan inhibits the oxygen uptake of homogenized rat liver at concentrations as low as  $3 \times 10^{-6}$  M, with an increase in inhibition, on increasing the concentration.

It is suggested that these effects could be

due to the uncoupling of oxidative phosphorylation, which in intact cells would provoke a compensatory action by increasing aerobic glycolysis.

### Bibliografía

1. BALI, E. G., C. B. ANFINSEN y O. COOPER: *J. Biol. Chem.*, **153**, 5, 1944.
2. COURIT, D. y W. D. WOSILAIT: *Biochem. Pharmacol.*, **15**, 1349, 1966.
3. KRAHL, G. H. A. y M. E. CLOWES: *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **11**, 21, 1938.
4. LEHNINGER, A. L.: *Science*, **128**, 450, 1958.
5. LINK, K. P. y MITARBEITER: *J. Biol. Chem.*, **153**, 5, 1944.
6. MARTIUS, C. y D. NITZ-LIZOW: *Biochim. Biophys. Acta*, **13**, 289, 1954.
7. UMBREIT, W. W., R. H. BURRIS y J. F. STAUFFER: «Manometric Techniques», Burgess & Publishing Co., Minneapolis, 1955.
8. WENDEL, W. B.: *Fed. Proc.*, **5**, 406, 1946.