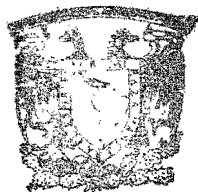


FACULTAD DE CIENCIAS



**BIBLIOTECA
CENTRO DE ECOLOGIA**

**efecto de las guanidinas
en la absorción de potasio
y respiración de raíces
aisladas de cebada**

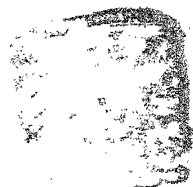
CARLOS VAZQUEZ YANEZ

Carlos Vazquez Yanez

**tesis profesional
ma. teresa bengochea cañas**

méxico, d. f.

1975



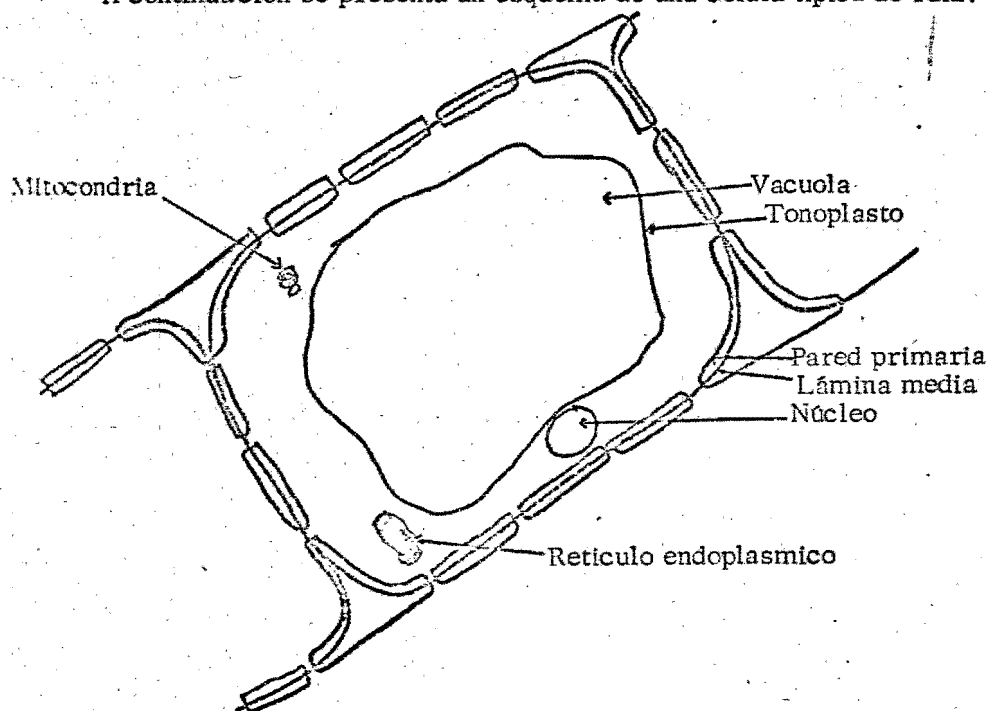
**EXAMENES
PROFESIONALES**

INTRODUCCION

La célula vista y descrita inicialmente por Robert Hooke en 1615, se considera como la unidad básica de la organización de los seres vivos, sin importar que ellos sean animales unicelulares, plantas u organismos grandes compuestos por millones de células, las cuales varían en muchas propiedades tales como tamaño, organización interna y externa.

Cada célula tiene una forma de aislar su medio interno del medio externo que la rodea, éste factor de aislamiento lo realiza la membrana plasmática. Las células vegetales y algunas animales tienen una capa adicional, una pared celular rígida la cual rodea exteriormente a la membrana plasmática.

A continuación se presenta un esquema de una célula típica de raíz.



La pared celular es el esqueleto de las células vegetales, aunque en algunos casos especiales pueden aparecer desnudas. Consta principalmente de pared primaria y lámina media. Es una estructura relativamente rígida - aún en células meristemáticas y esta rigidez y dureza de la pared secundaria es causada por la presencia de grandes cantidades de celulosa y hemicelulosa. Está altamente hidratada, permitiendo así el libre movimiento de sustancias en solución acuosa a través de ella, pero previniendo el movimiento de moléculas grandes (3).

Da a la célula consistencia, protección, soporte a las partes internas y hace posibles las alteraciones en las formas celulares las cuales son tan importantes para la diferenciación del tejido.

Aunque separa a la célula de lo que la rodea, su funcionamiento en este sentido es muy poco eficiente, pues la mayoría de los materiales que están en el medio de contacto, atraviesan la pared sin dificultad alguna.

La lámina media es una sustancia cementante entre dos células adyacentes y también se encuentra entre pared primaria y secundaria de pared celular, formada en gran parte por coloides pécticos (3).

En todas las células el citoplasma está rodeado por una membrana: la membrana plasmática, que se encuentra en estrecho contacto por dentro con la pared interior o primaria de la pared celular, tiene un grosor de 75-100 Å. Sirve para separar el contenido celular del medio ambiente. En células eucarióticas también sirve para definir el citoplasma delimitando varios organelos; sin embargo ella hace algo más que limitar, pues es además el sitio de muchos procesos bioquímicos muy complejos. Estos procesos incluyen -

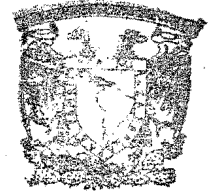
la toma de sustancias orgánicas é inorgánicas, selección y exclusión de ciertos iones de la superficie celular y la regulación de la toma de agua (3 , 8).

La importancia de esta estructura para la célula viva está por encima de toda ponderación teniendo en cuenta que encierra directamente al citoplasma y las inclusiones citoplasmáticas, se puede afirmar que ella contiene la totalidad del sistema vivo y lo protege.

Esta membrana realiza el vital papel de regular el paso de materiales hacia el interior y el exterior de la célula. En otras palabras goza de una permeabilidad diferencial gracias a la cual puede hacer que ciertas sustancias penetren en la célula y otras no lo hagan. Además representa una vía de entrada de una sola dirección para algunos materiales y no permite su salida. También impide en un grado muy importante la penetración de gran número de sustancias que son tóxicas al citoplasma (3).

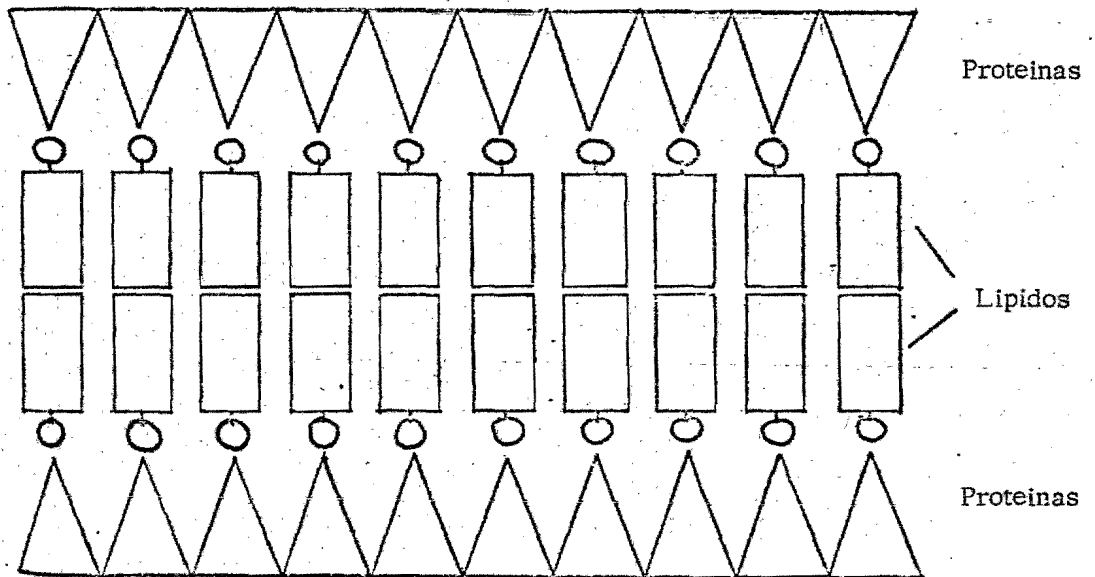
Cuando se observa con el microscopio óptico resulta muy difícil distinguir hasta dónde llega la membrana y en donde empieza el citoplasma, debido a que son iguales en color y refringencia, pero si se diferencian bien con el microscopio electrónico.

En una observación al microscopio electrónico se ve que esta membrana consiste de 2 capas externas rodeando a otra capa media. Esta estructura de la membrana aparece en todos los seres vivos y por esto ha sido designada como unidad de membrana (27). Desde los trabajos de Dawson y Danielli en 1935, hasta los de Robertson , Fox y Singer más recientemente , los modelos de membranas que se han postulado conservan todos básicamente una constitución semejante, las cuales explican las propiedades fisiológicas -



BIBLIOTECA
CENTRO DE ECOLOGIA

de la misma. En dichos modelos , la unidad de membrana consiste en una capa bimolecular lipídica , cubierta en ámbos lados con una capa proteica. - La parte soluble en agua ó polar son los extremos de la parte lipídica la cual da hacia afuera ó sea que está en contacto con las películas o capas proteicas (3 , 4).



Esquema de un modelo de membrana

El citoplasma de una célula meristemática está recorrido por un complicado sistema vesicular limitado por membranas llamado retículo endoplásmico o ergastoplasma. Se cree que las membranas que limitan éste sistema tienen una estructura lipoproteica hasta cierto punto análoga a la de la membrana protoplasmática.

De acuerdo con diversas observaciones, el retículo endoplásmico establece continuidad con la membrana nuclear y se extiende hasta la superficie de la célula. En realidad, se han encontrado membranas pertenecientes a este sistema en las paredes primarias de algunas células y penetrando incluso en las células vecinas. Se ha señalado que la continuidad de la membrana nuclear y el retículo endoplásmico implica la existencia de una extensa superficie de contacto entre el material nuclear y el citoplasma de la célula.

Los centros sintetizadores de ATP o mitocondrias, son corpúsculos de formas variadas, limitados por una doble membrana que encierra una matriz interior. La membrana interna presenta numerosos repliegues que avanzan profundamente en el seno de la matriz. Algunos de estos repliegues pueden llegar a formar un puente en el interior del condriosoma o mitocondria y establecer conexión con la membrana interna del lado opuesto. Todos estos tipos diversos de repliegues de la membrana reciben el nombre de crestas. Las crestas de los condriosomas han llamado profundamente la atención por su gran parecido con el sistema de laminillas que se encuentran en los cloroplastos.

El Aparato de Golgi está formado por dos estructuras diferentes; unos grupos de saquitos aplanados que son las cisternas, las cuales están limitadas

por una membrana y varias pequeñas vesículas esféricas que se agrupan junto a los bordes de las cisternas. Hay una hipótesis que dice que las vesículas se separan de la superficie de las cisternas por estrangulamiento de la membrana.

Las membranas del Aparato de Golgi se parecen en cierto modo a las del retículo endoplasmático. En efecto, algunos sostienen que puede haber alguna fusión entre las cisternas del Golgi y el retículo endoplásmico.

Distribuidas por todo el citoplasma se encuentran gotitas relativamente claras parecidas en muchos aspectos a burbujas de aire dentro del agua, estas gotitas reciben el nombre de vacuolas. A medida que la célula va madurando y va aumentando de tamaño, las pequeñas vacuolas se fusionan entre sí para formar al final una gran vacuola única que suele llenar casi totalmente la cavidad celular. En éste caso el citoplasma queda relegado a tapizar la pared celular, en forma de capa fina que rodea a la vacuola.

La vacuola está limitada por una membrana lipoproteica simple (tonoplasto) y encierra agua que contiene numerosos materiales en disolución y suspensiones que en general son llamados jugo celular. De la misma manera que en la membrana protoplasmática, la membrana vacuolar presenta permeabilidad selectiva.

El núcleo está limitado por una doble membrana de composición lipoproteica. Esta membrana separa el citoplasma de la sustancia granular (nucleoplasma) del núcleo. Por microscopía electrónica se saben dos cosas muy importantes de la membrana nuclear, que ella establece continuidad con el retículo endoplásmico, y segundo, que la membrana nuclear presenta poros

relativamente anchos. El núcleo es generalmente desplazado a un lado de la célula a resultas de la compresión del citoplasma contra la pared celular debida al crecimiento de la vacuola.

Las células vegetales exhiben características únicas para el transporte iónico, aunque dichos mecanismos, ya a nivel molecular, puedan tener semejanzas con células animales y microbianas.

No hay células de ningún otro organismo que superen a las plantas superiores en competencia y versatilidad en los mecanismos de transporte iónico. Esto es especialmente cierto en células de raíces de plantas fibrosas.

Las raíces que están en suelos tienen que adaptarse a hechos tales como:

1. - El aumento de la humedad en los intersticios entre las partículas sólidas del suelo después de la lluvia o de riego.
2. - La variabilidad en la composición del suelo, no es constante ni en el espacio, ni en el tiempo.
3. - Los cambios de PH, pueden ir desde 4.5 hasta 6.5, en un área muy reducida, dependiendo de la naturaleza de la fase sólida que esté más cerca.
4. - La posibilidad de que si hay sequía, se reducirá el volumen de la solución, en un volumen dado de suelo, elevando la concentración del suelo, dando como resultado cambios en su composición iónica.
5. - Variantes en la composición gaseosa.
6. - Los cambios de temperatura a que las raíces están sujetas, por ejemplo, día y noche.

Hay además otros tres atributos que caracterizan el transporte iónico en raíces y que a saber son:

- a. - La avidéz con la cual ellas extraen iones de nutrientes inorgánicos en soluciones extremadamente diluidas, acumulando concentraciones mucho más altas que las que había en la solución externa.
- b. - Una muy marcada selectividad en el transporte iónico y la discriminación que pueden efectuar entre dos cationes alcalinos, por ejemplo, - Na y K.
- c. - De las células de las raíces, las que más intervienen en éste tipo de transporte presentan marcadas diferencias con respecto a las células animales y de microorganismos, pues en éstas últimas se establece equilibrio con el medio. La razón para ésto en las raíces es la extremadamente baja concentración de muchos nutrientes iónicos en el medio externo, definiéndose éste como el espacio exterior en el cual los iones inorgánicos tienen libre y reversible acceso de difusión, y de donde las raíces obtienen los iones, acompañado del hecho de que como órganos las raíces no sólo acumulan iones sino que también los envían al tallo, de modo que el transporte iónico continúa aún cuando se haya obtenido un nivel estable de sales en la célula de la raíz.

Existen varias hipótesis para explicar el movimiento iónico. Entre ellas se encuentran:

1. - La teoría de poros o canales.
2. - La teoría de los acarreadores o de difusión facilitada.

La primera teoría se postuló en base a que se han demostrado (Hille) -

canales para el paso de Na, los cuales son también permeables a otros sustitutos orgánicos del Na e impermeables a cationes metilados. Los iones de Na se mueven por su propio movimiento térmico encontrando barreras un poco más grandes que aquellas que se encuentran en ordinaria difusión acuosa.

La teoría de difusión facilitada (acarreadores) implica que hay una interacción del sustrato con un componente de la membrana (acarreador). Aparentemente los acarreadores se unen al ión en la parte externa de la membrana formándose el complejo ión-acarreador. Este complejo atraviesa la membrana, gira y sufre otros desarreglos especiales dentro de ella, resultando que el ión es traído al lado interno. Simultáneamente, o después de este cambio, el complejo ión-acarreador se desliga como resultado del cambio en la configuración molecular del acarreador para que el ión se separe adentro. Cuando la absorción va en contra de gradiente de concentración, se visualiza de inmediato que se requiere gasto de energía.

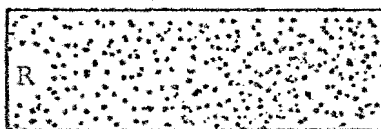
El siguiente esquema explica la teoría anterior, en donde la membrana es impermeable a iones libres, pero sin embargo no son libres los iones que penetran a ella, pues entran unidos al acarreador. Ya una vez dentro, el acarreador cambia su configuración, y en vez de aceptar al ión, lo rechaza, convirtiéndolo en ión libre, y por esto no puede salir, pues la membrana es impermeable a este tipo de iones. Así pues, los iones absorbidos son atrapados por la célula.

EXTERIOR

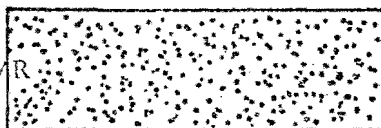
MEMBRANA

INTERIOR

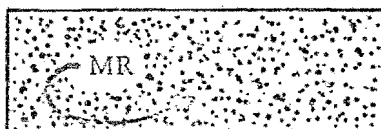
M



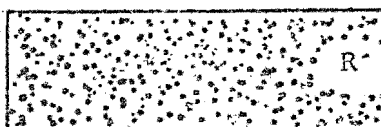
MR



MR



R M



M



M = Ión

R = Acarreador

MR = Complejo ión-acarreador

R' = Acarreador en su configuración de soltar iones.

Esquema de la teoría del Acarreador.

Este tipo de transporte puede ser de dos tipos:

Bomba primaria o traslocación primaria en la cual la traslocación está directamente unida a reacciones bioquímicas en las cuales se hidroliza el ATP a ADP + Pi utilizándose esta energía, estas traslocaciones pueden ser de grupo o por medio de enzimas.

Bomba secundaria o traslocación secundaria por definición no está unida a reacciones químicas o metabólicas, pero puede estar secundariamente acoplada por potencial electroquímico. Pueden ser, Uniport si la traslocación es de un solo sustrato por medio de un acarreador. Simport en el caso de que la traslocación sea de dos solutos hacia el mismo lado y Antiport si se trasloca un soluto hacia un lado y el otro hacia el lado opuesto (20, 21 Lehinger).

Para determinar la existencia de los acarreadores hay varios criterios:

- 1.- Saturación cinética en la absorción.
- 2.- Selectividad del sistema.
- 3.- Inhibidores específicos.
- 4.- Pueden demostrarse genéticamente.

Hay saturación cinética cuando un sistema que está realizando absorción de un sustrato a diferentes concentraciones, en un momento dado ya no puede aumentar su rango de absorción aunque las concentraciones del sustrato sigan aumentando.

Selectividad significa que para que un ión o grupo de iones sean transportados se unen a un acarreador o grupo de acarreadores específicos dando por resultado que si estos faltaran o fueran inhibidos, los iones no podrían ser transportados.

Inhibidores específicos son aquellos que inhiben directamente al acarreador apropiado para transportar un ion específico por ej. oabaina que inhibe el transporte del Na.

Demostración genética se ha visto que si se induce una mutación en donde se haya determinado la existencia de cierto acarreador, la siguiente generación no será capaz de absorber la molécula para la cual este acarreador era específico.

Respecto a la selectividad sabemos (11) que cuando se hace un análisis cinético, la absorción de un ion puede estar afectada por otro, ya sea acelerando o inhibiendo, o no teniendo efecto alguno, y se ve: que si inhibe, puede ser por efectos de interferencia competitiva, como en el caso de potasio, rubidio y cesio los cuales se ha propuesto interaccionan con sitios de un acarreador común (11).

Generalmente se acepta que la absorción iónica es llevada a cabo por acarreadores metabólicamente producidos . Al tratar de encontrar inhibidores específicos se han efectuado estudios de inhibidores respiratorios en la absorción iónica los cuales han cobrado mucha importancia. Lundegardh ha inhibido la absorción de sales con cianuro, Weeks y Robertson han inhibido la

absorción de sales en zanahorias con monóxido de carbono y se ha visto que es fotoreversible, Robertson también ha inhibido la absorción con 2,4 dinitrofenol, asimismo se ha usado oligomicina como inhibidor (18, 19, 23, 27).

La bibliografía revisada se inclina a relacionar al ciclo de Krebs con la absorción iónica y se ha tratado de determinar la relación entre el ciclo glicolítico y el de Krebs con los mecanismos de absorción, los resultados han indicado que los procesos metabólicos dan la energía necesaria para la absorción de iones (23).

ATP ó compuestos semejantes pueden estar involucrados en la absorción iónica, por ejemplo reaccionando como intermediarios del ciclo de Krebs para formar acarreadores iónicos o para destruirlos. De acuerdo con este punto de vista, el metabolismo necesita ambos tanto para proveer ATP, como intermediario, esto s últimos actuarían funcionando como acarreadores iónicos (8, 10, 12, 16, 19, 23). Sin embargo no se han encontrado en plantas inhibidores exclusivos de la absorción iónica.

Por otro lado el concepto de que los iones son transportados a las células vegetales de raíces por medio de acarreadores se basa en una gran variedad de experimentos y consideraciones las cuales han sido finalmente apoyadas por el hecho de que su cinética de absorción está de acuerdo con la cinética clásica (11) en cuanto a saturación y selectividad, como ya se menciona.

Se ha propuesto que este tipo de mecanismo (acarreador) radica en el plasmalema, ó sea la primera membrana que tiene contacto con los iones del-

medio externo. Los acarreadores ionicos de la clase postulada con base en la evidencia cinética, no se han identificado ni en plantas ni en animales pero si se han estudiado in vitro algunas sustancias que funcionan como acarreadores y son ciertos antibióticos polipeptidicos los cuales se unen a iones de K con alto grado de especificidad y aceleran su movimiento a través de la membrana, o sea que actuan como ionoforos o acarreadores ionicos como ejemplo tenemos a la valinomicina.

La naturaleza bioquímica de los acarreadores se propone en base a los estudios de Epstein y Hagen, que pensaron que deben ser semejantes a proteínas, ya que al interferir la síntesis proteica con inhibidores apropiados, se interferia la absorción ionica.

Se ha propuesto acarreadores especificos de K y Rb en raices de plantas superiores y esto fué lo que nos indujo a tratar de hallar un inhibidor de la absorción de dichos iones en raices de cebada. En estas investigaciones de absorción iónica se usa frecuentemente el ^{86}Rb como marcador radioactivo para el K, ya que el Rb es más conveniente de usar que el ^{42}K , pues el primero tiene 18,6 días de vida media en comparación con 12,5 horas del otro. Y como ya se menciona anteriormente estos dos iones presentan interferencia competitiva debido a que sus constantes de absorción son de la misma magnitud, indicando el mismo sitio de unión con el acarreador, pues iones relacionados por sus propiedades químicas pueden tener virtualmente afinidades iguales para el acarreador común por lo que éste no discrimina entre uno y otro - (6).

Se sabe (2) que las guanidenas y sus derivados pueden interactuar es-

pecíficamente con sitios receptores biológicos de cationes, que tienen efectos hipoglicémicos como la sintalina, que tienen afinidad con ciertas sustancias - como el Na en el canal de sodio del nervio (Hille) y que específicamente inhiben sistemas dependientes de K así como el transporte de K en levaduras (25) por eso se pensó que eran las sustancias más indicadas para intentar ver si - tenían efecto inhibitorio de la absorción de K y tratar de explicar como funcionaba este.

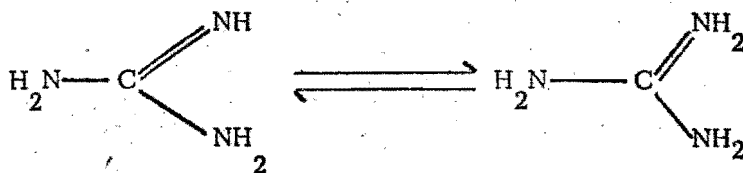
La investigación del uso de las guanidinas ha dado una gama de resultados como sustancias de investigación así como agentes terapéuticos, por ejem plo la Fenetilbiguanidina y la Alquilomonoguanidina las cuales inhiben a las mi tocondrias, la Tetrodoxina inhibe a las membranas eléctricamente excitables.

Las alquilguanidias son bases fuertes orgánicas con un pK de 12.5 en un pH fisiológico. Así pues casi todas las moléculas de guanidina menos una pequeña fracción de moléculas sin carga no se puede ignorar, ya que pueden - tener gran importancia en la farmacología de derivados de guanidinas.

La segunda cualidad de la guanidina es la simetría de la molécula pro-tonada, lo cual provee estabilidad. La sustitución de N destruye la simetría - y esto da en parte la tendencia a reasumir la forma simétrica insubstituible - que da a los derivados de las guanidinas sustituidas con fosfatos mucha ener - gía.

Otra característica es su tamaño y su forma, la guanidina es una mo- lécula plana con distancias del orden de \AA 13.2 mm. entre el carbono central - y cada nitrógeno, y esto es lo que probablemente la hace mucho más pequeña que el Na hidratado o el ión de K^+

La estructura de la guanidina es la siguiente:



La característica estructural común, o sea el residuo guanidina, no le da al grupo mayor especificidad que, por ejemplo, le da un grupo amino. A pesar de esto, ciertas respuestas biológicas a los derivados de las guanidinas parecen distinguirlas en un grupo aparte de otras bases orgánicas.

Es obvio que para cada uno de los compuestos de los derivados, la porción de la molécula ajena al grupo de guanidinas, debe proporcionar mucho de su especificidad. Sus características se basan en las dos principales cualidades estructurales: la base misma de la guanidina cargada positivamente y la cadena adyacente o grupos sustituyentes, muchos de los cuales son altamente hidrofóbicos. Desde luego, ninguna molécula con estructura hidrofóbica y cargada puede potencialmente actuar como detergente catiónico.

OBJETIVOS

Los objetivos de este estudio fueron:

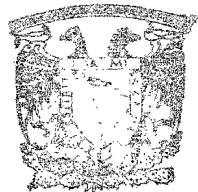
Ver el efecto de las alquilguanidinas, en especial de la Octilguanidina en la absorción de K.

Probar varias guanidinas en la respiración.

El sistema empleado fué raíces almidadas de cebada.

Con estos estudios se pretende disecar el fenómeno de la absorción para definir, primero si la guanidina puede ser simplemente un inhibidor metabólico, como podría esperarse de los trabajos de Gómez (15) - o un inhibidor de transporte de K, Peña (25).

Esto permite plantear para el futuro investigaciones en las que se intentara relacionar el transporte de iones con la fisiología general de la raíz o de toda la planta, principalmente con el crecimiento.



MATERIALES Y METODOS

BIBLIOTECA
CENTRO DE ECOLOGIA

Para el estudio se usaron semillas de cebada (Hordeum vulgare, variedad Apizaco MV-72). El procedimiento para germinar las semillas y obtener un cultivo fué el siguiente: las semillas se lavan tres veces con agua destilada, se ponen en aereación vigorosa y constante en la oscuridad durante 24 horas, se enjuagan y se siembran siguiendo el método modificado de Epstein(7), el cual basicamente consistió en los siguientes pasos:

Se ponen las semillas sobre una gasa, que está sostenida en una rejilla de plástico, ésta se dispone sobre una charola de plástico a la cual se le pusieron cinco litros de solución de CaSO_4 5 mM, introduciendo los bordes de la gasa en el medio de cultivo para que absorba por capilaridad. Se tienen en la oscuridad cubiertos para impedir las influencias de la luz y se dejan por espacio de 6 días a $24^\circ\text{C} \pm 3$ en aereación continua, y pasado este tiempo, se cortan segmentos de 2 cm descartando 5 cm del ápice y 3 cm de la base, y se enjuagan con agua destilada bien fría ($0 \pm 3^\circ\text{C}$). Se ponen grupos de 16 segmentos en agua helada hasta el momento de ser empleados.

Para los estudios de absorción se incuban los segmentos de raíces en una mezcla que contiene amortiguador 0.02 M de maleico (pH 6), CaSO_4 0.05 mM, y diferentes concentraciones de las alquilguanidinas con agua destilada hasta completar siembre un volumen de 4 ml.

El medio de incubación se mantiene en agitación constante en un baño de Dubnoff a 30°C . La solución se equilibra a la temperatura del baño durante 10 minutos, luego se añaden las raíces por el tiempo en el que van a absorber, el cual depende del experimento. Se decanta el líquido, se enjuagan 2 -

veces con 30ml RbCl 5mM y 0.5mM de CaSO_4 a $0 \pm 3^\circ\text{C}$, y se dejan en el segundo líquido durante 30 minutos para quitar el Rb adsorbido. Se decanta el líquido y se añaden 30 ml de agua destilada helada y se dejan ahí las raíces por 15 minutos, en seguida se secan entre 4 toallas de papel Kleenex poniendo 2 arriba y 2 abajo, luego se pesan y se incineran en una mufla durante 5 horas a 500°C , en una plancheta del contador de radiactividad.

Las cenizas son redisueltas con 0.2 ml de agua destilada, se secan con rayos infrarojos y se cuentan en el contador Geiger.

Para estudios de respiración, las raíces se germinan de la misma manera que se describió anteriormente para los estudios de absorción iónica, sin embargo, se usaron segmentos de 5 cm de largo; al cortar se eliminaron 1 cm apical y 4 cm basales de las raíces, luego se lavaron 3 veces con agua destilada y se integraron lotes con 51 segmentos que se conservaron en agua helada.

Se midió la respiración por el método Polarográfico (29) poniendo en el vaso del oxímetro 20 ml de solución, los cuales contienen 17 ml de agua destilada, 2 ml de CaSO_4 0.5 mM y 1 ml de amortiguador de maleico 0.02 M (pH 6) a 30°C . En los 20 ml de solución hay 8 microátomos de oxígeno.

Cuando se estabiliza la respiración de las raíces (aproximadamente a los 2 minutos de iniciada), se añaden las diferentes concentraciones de alquilguanidinas en un volumen que oscila entre 10 y 50 λ mbdas, para evitar la alteración de la cantidad de oxígeno por haber aumentado mucho el volumen.

Después del tiempo indicado se sacan las raíces, se secan entre 4 toallas de papel Kleenex y se determina el peso húmedo.

RESULTADOS

ABSORCION:

Las características del sistema de absorción del ^{86}Rb en raíces aisladas de cebada se observan en las figuras No. 1 y No. 2. La absorción del ^{86}Rb es una función lineal con respecto al tiempo de incubación de las raíces (15 minutos) Fig. 1. En la absorción del ^{86}Rb se ve que conforme aumentan las concentraciones de dicho elemento en el medio de incubación, aumenta la absorción del mismo, especialmente a las concentraciones más bajas, mostrando una cinética de saturación a las concentraciones más elevadas (1.5 y 2.0 μM). Siendo la máxima absorción de 1.68 n moles/mg de peso húmedo a una concentración de 2 mM (Fig 2).

En las figuras 3 A y 3 B, se observan los resultados de la acción de la Octilguanidina en la inhibición de la captación de ^{86}Rb durante un período de 15 minutos. En el primer caso (Fig 3 A) la Octilguanidina se agregó desde el principio de la incubación y en el segundo caso (Fig 3B) se incubaron las raíces durante 3 minutos con Rb y posteriormente se añadió la Octilguanidina. En ambos casos la Octilguanidina inhibe la absorción del ^{86}Rb , tomándole 3 minutos el empezar a actuar como inhibidor de la absorción de dicho isótopo en las raíces.

En la figura 4 se ve el efecto de la Octilguanidina a una concentración de 441 μM en la absorción de ^{86}Rb , cuando se usan diferentes concentraciones de éste isótopo (0.25, 0.50, 1.0, 1.5 y 2.0 μM); se observa que la Octilguanidina actúa como inhibidor de la absorción del ^{86}Rb a todas las concentraciones empleadas (fig 4).

Haciendo una gráfica de Lineaweaver-Burk (ó de dobles recíprocas) - de la absorción del ^{86}Rb por raíces de cebada y la acción inhibitoria de la Octilguanidina (fig. 5), se ve que la Octilguanidina no solo aumenta la K_m para el Rb (de .222 a .476 mM para la LI de 228 μM y de .222 a .588 para la LI de 441 μM) sino que además disminuye la V_{max} . desde 2 hasta .83 n moles/mg de peso húmedo para la LI de 228 μM y de 2 hasta .38 para la LI de 441 μM .

Se probaron diferentes concentraciones de Octilguanidina (114, 228 y 441 μM) en la absorción del ^{86}Rb 1 mM en un período de incubación de 10 minutos. Se observó que la Octilguanidina es un inhibidor a cualquiera de las concentraciones probadas, siendo la inhibición máxima media de 50 μM de Octilguanidina.

Se hizo un estudio comparativo entre cinco diferentes Alquilguanidinas (Octil, Hexil, Butil, Etil y Guanidina simple) para ver cómo influyen tanto las diferentes longitudes de la cadena alquil como las diferentes concentraciones a las cuales fueron estudiadas (114, 228, 556, 1000 y 1500 μM) en la absorción del ^{86}Rb . En la figura 6 se ve que el grado de inhibición depende del grado de lipofilicidad o sea de la longitud de la cadena de carbonos aumentando la acción inhibitoria conforme aumenta el número de átomos de carbono. Se nota además que las alquilguanidinas más polares, Butil y Etil inhiben la absorción en un máximo de 50 y 25% respectivamente, mientras que las menos polares, ó sean las más lipofilicas (Hexil y Octilguanidina), tienen una inhibición máxima de 80%. La guanidina simple a bajas concentraciones no sólo no inhibe, sino que acelera ligeramente el proceso de absorción (Fig 7).

La relación del número de átomos de carbono con la inhibición del - -

^{86}Rb se observa en la figura 8, en donde los resultados, tomando en cuenta las diferentes concentraciones de las alquilguanidinas y el número de átomos de carbono de cada una de ellas, son: a una concentración de 114 μM , la guanidina simple tiene un 20 % de aceleración en la absorción del ^{86}Rb , en otras palabras, no inhibe sino que ayuda a la absorción. La Etil, Butil y Hexilguanidinas aumentan su inhibición en ése orden, de creciendo la capacidad inhibitoria para la Octilguanidina.

A una concentración de 228 μM ; la guanidina simple aumenta la absorción del ^{86}Rb en una menor proporción que a la concentración anterior, mientras que la Etil, Butil y Hexilguanidinas aumentan su inhibición en ese orden, volviendo a decrecer para la Octilguanidina.

Para la concentración de 556 μM : todas las guanidinas (excepto la Octilguanidina) van aumentando la inhibición en la absorción del ^{86}Rb , según el número de átomos de carbono para las tres primeras guanidinas, pero la Hexil y la Octilguanidinas casi se igualan en su inhibición al mismo tiempo que se mantienen ya constantes, o sea que es la misma inhibición a éstas concentraciones para las dos (fig 8).

RESPIRACION:

En la figura 9 se ve la respiración basal en raíces aisladas de cebada, observándose el patrón de consumo de oxígeno en función del tiempo. Se determinaron 400 mg como la cantidad mínima de raíces en las cuales se puede medir la respiración, tardando el sistema entre 23 y 25 minutos en consumir los 8 microátomos de oxígeno que hay en los 20ml del vaso del oxímetro. El inicio de la respiración se hace con una velocidad de 1.50 microátomos de oxígeno

/min/mg de peso húmedo, teniendo el primer cambio a los cuatro minutos a una velocidad de 1.23 , el segundo cambio es a los 5.8 minutos a una velocidad de 0.91 y el último cambio es a los 23 minutos a una velocidad de 0.04 . - La disminución total de la velocidad desde el principio de la respiración hasta los 25 minutos fué de 1.46.

La variación entre las velocidades basales iniciales de los diferentes lotes de raíces estudiados oscilan dentro de un rango de 1.10 a 2.81 microatmos de oxígeno/min/mg de peso húmedo. Sin embargo la descripción anterior está tomada de un solo lote de raíces pero es una descripción representativa.

Se estudió el efecto de tres diferentes concentraciones de Octilguanidina (160, 320, y 800 μM) en la respiración, observándose que a las menores concentraciones no hay efecto significativo (Figuras 10A y 10B).

En la figura 10C se ve el efecto de la Octilguanidina a la más alta concentración que se probó donde se nota que hay efecto inhibitorio de la respiración, con una disminución de la velocidad de 0.95 de los tres a los cinco minutos, cabe comparar éste dato con el cambio de velocidad efectuado al mismo tiempo en la respiración basal el cual fué de 0.59 es decir que la disminución de la velocidad es el doble cuando se añadió la Octilguanidina .0080 μM .

Cuando se probaron las demás alquilguanidinas en la respiración a dos diferentes concentraciones (. 320 y 800 μM) se observó que ninguna de ellas produce efectos en la respiración (Figs. 11A hasta 14B).

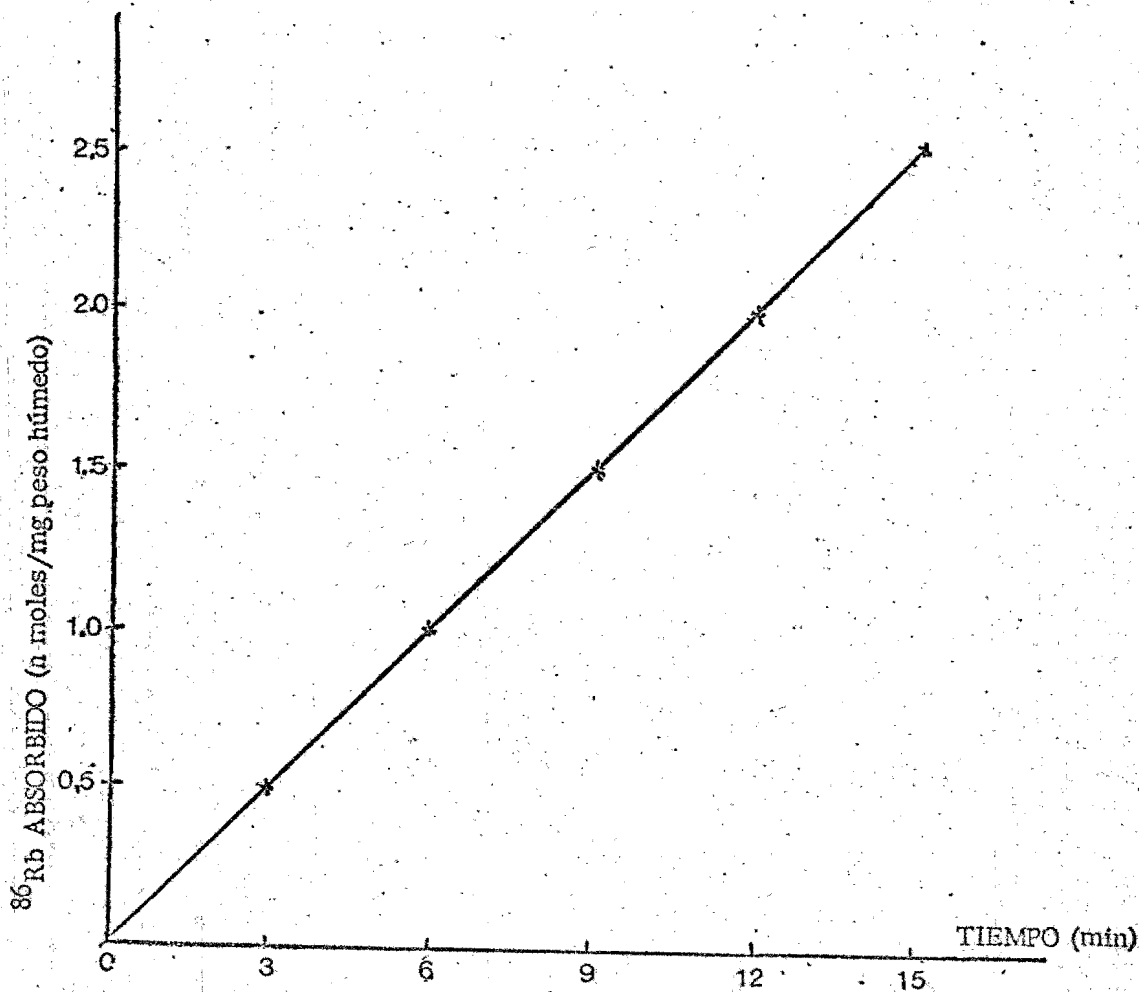


FIGURA 1. Absorción de rubidio por raíces aisladas de cebada, en función de diferentes tiempos. La concentración externa de RbCl fué de 1 mM.

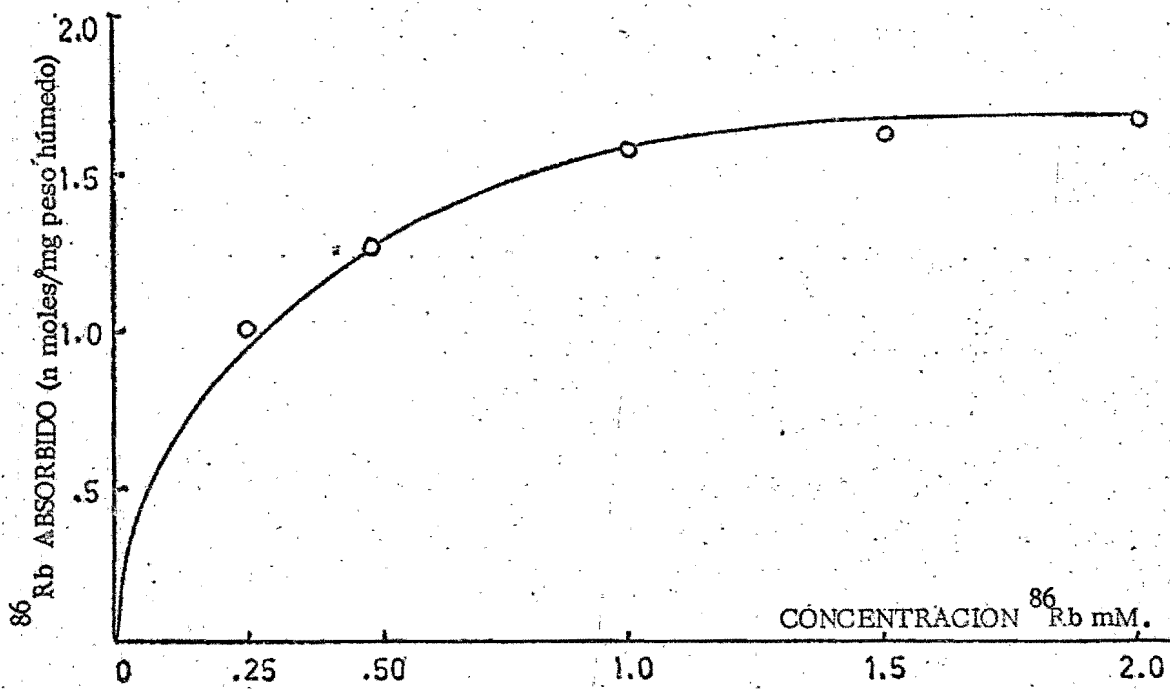


FIGURA 2.-Absorción de rubidio para raíces aisladas de cebada en función de diferentes concentraciones externas de ^{86}Rb .

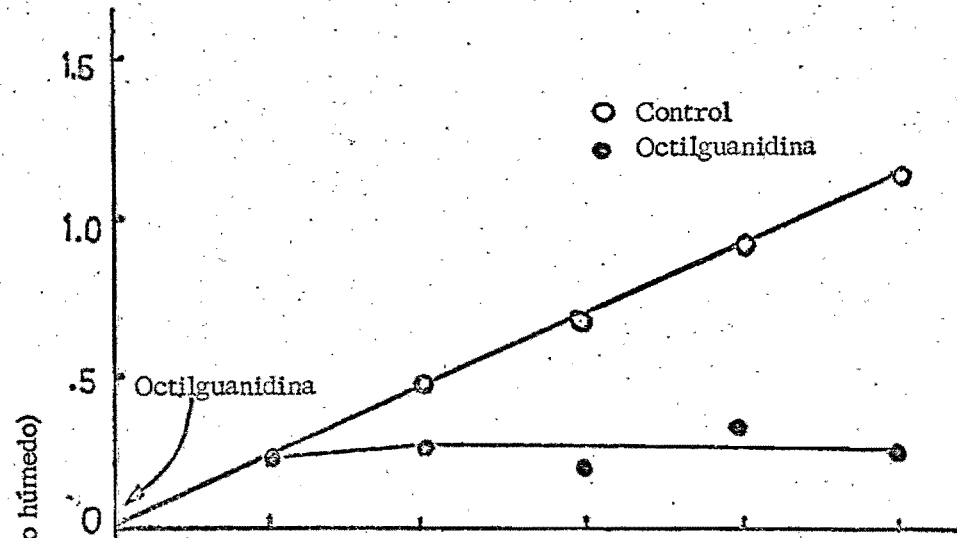


FIGURA 3a.-Absorción de rubidio por raíces aisladas de cebada en función del tiempo, en ausencia y presencia de Octilguanidina 441 μ M. La concentración externa de RbCl fué 1 mM. La Octilguanidina se añadió cuando todavía no había acumulación de ^{86}Rb .

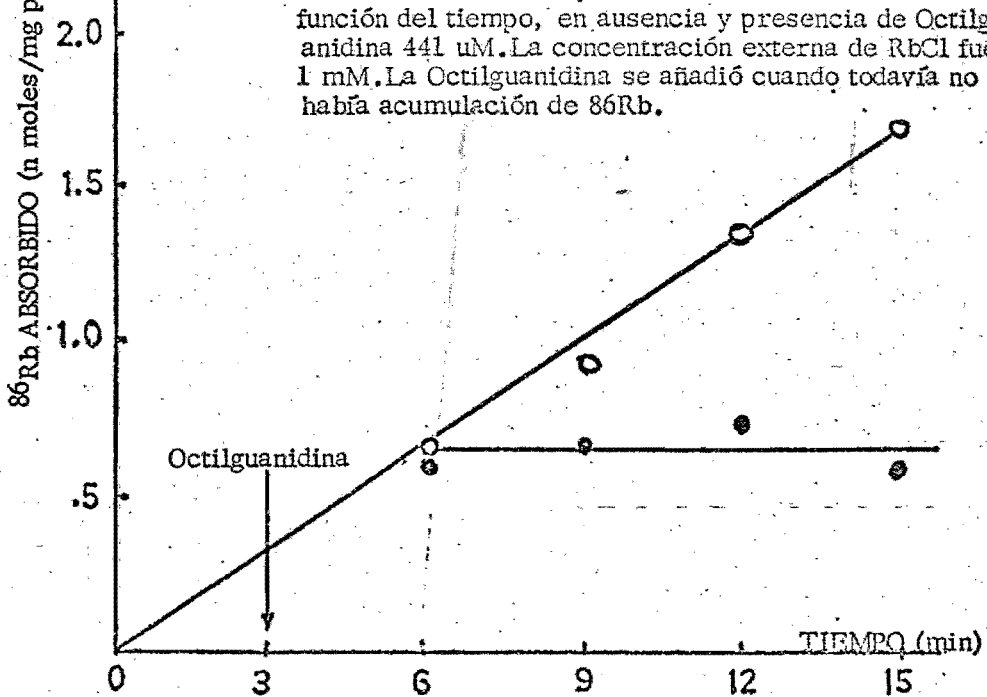


FIGURA 3b.-Absorción de rubidio por raíces aisladas de cebada en función del tiempo en ausencia y presencia de Octilguanidina 441 μ M. La concentración externa de RbCl fué 1 mM. La Octilguanidina se añadió después de 3 minutos de absorción de ^{86}Rb .

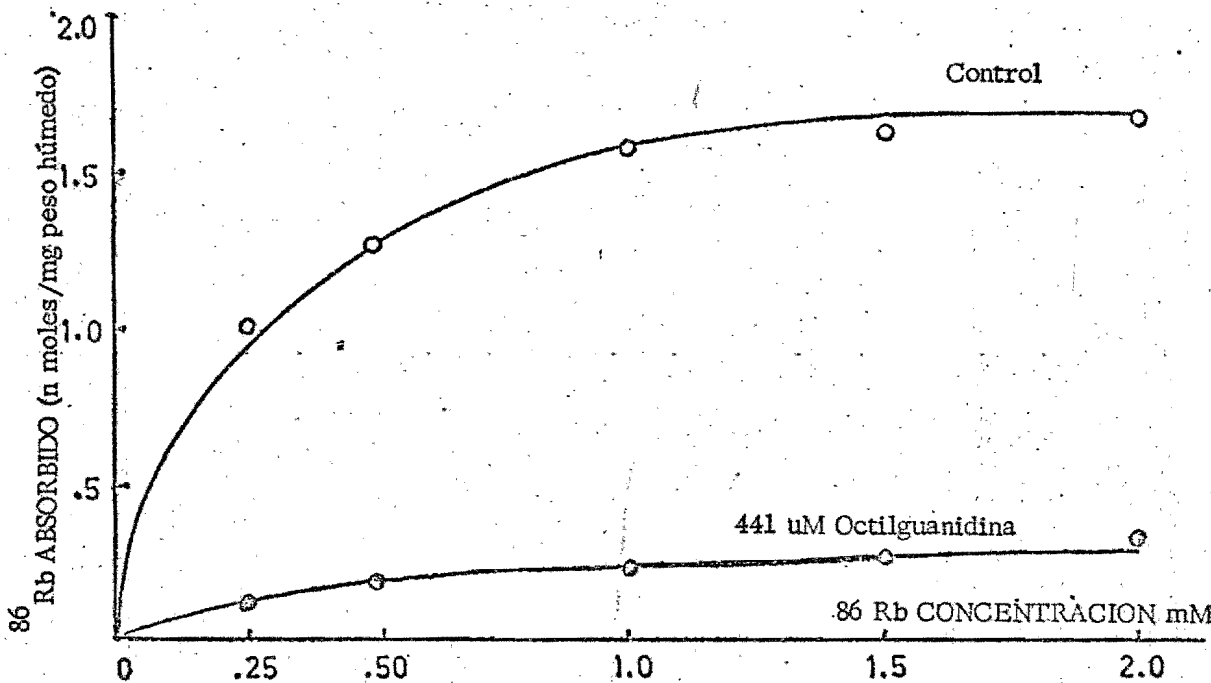


FIGURA 4.-Absorción de rubidio por raíces aisladas de cebada en función de diferentes concentraciones de ^{86}Rb externo en ausencia y presencia de Octilguanidina 441 μM , en un período de 10 minutos.

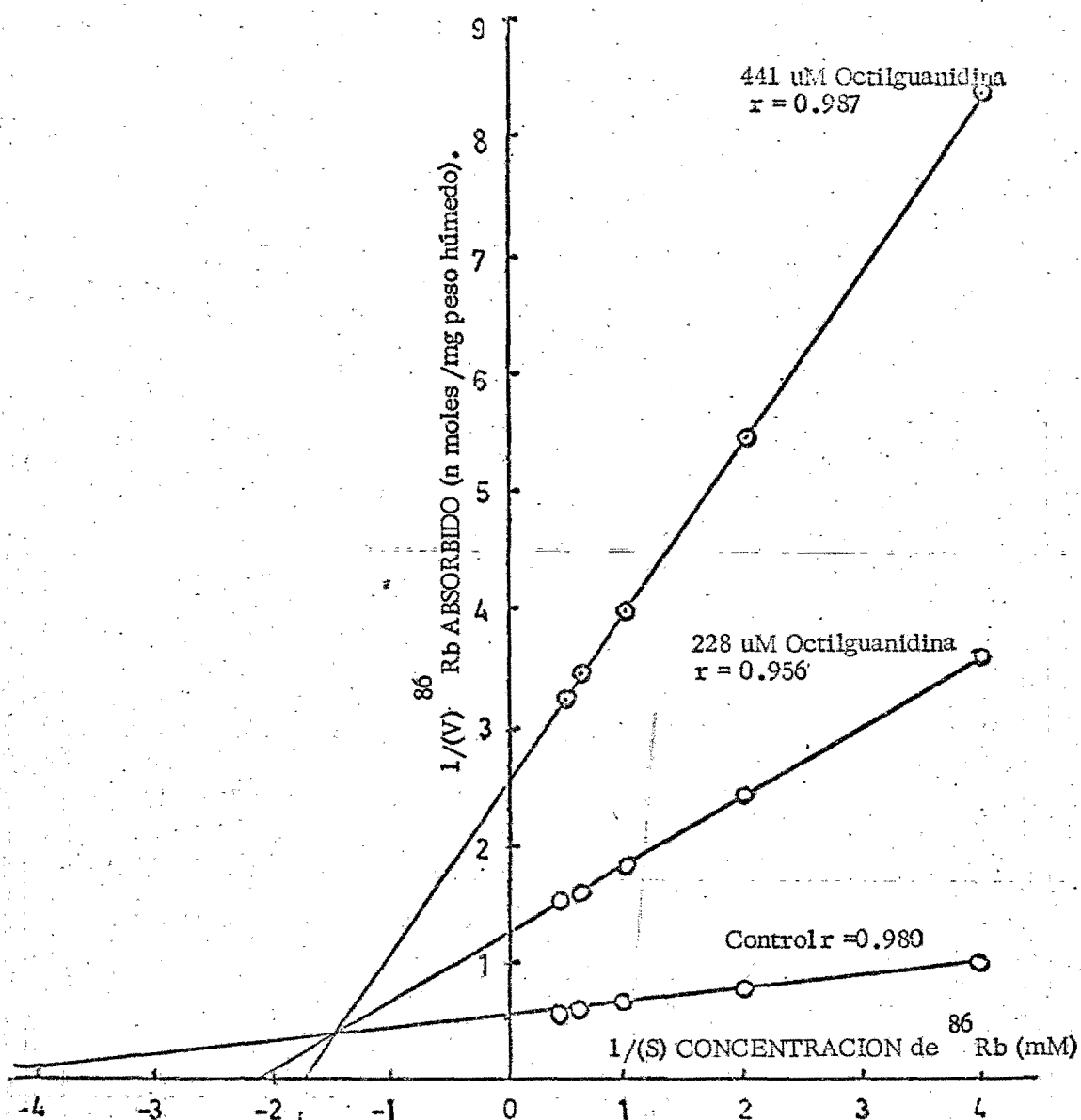


FIGURA 5.-Gráfica de dobles recíprocas que muestran el efecto de Octilguanidina 228 uM y 441 uM en la absorción de diferentes concentraciones externas de ⁸⁶Rb en raíces aisladas de cebada. Período de incubación de 10 minutos. r=Coficiente de correlación.

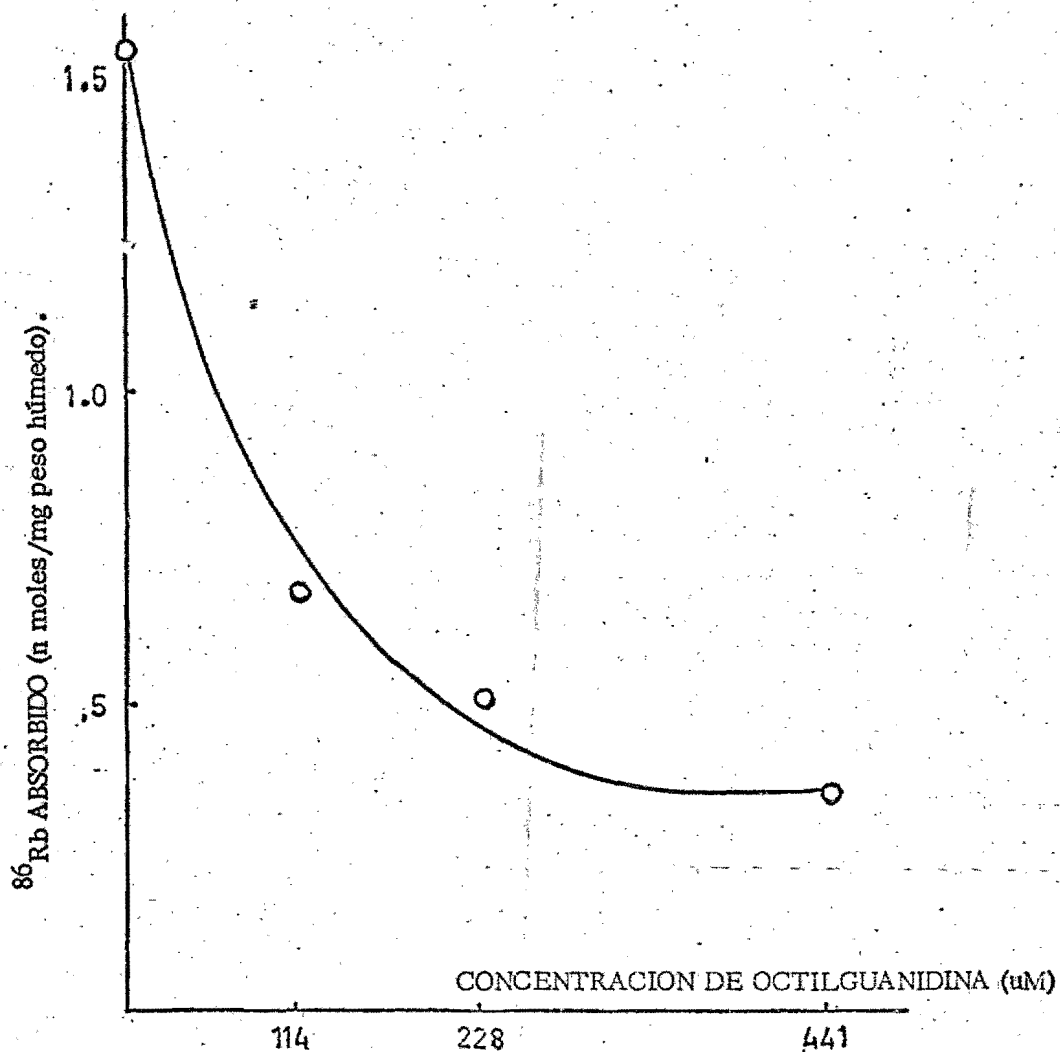


FIGURA 6.-El efecto de diferentes concentraciones de Octilguanidina en el transporte de ^{86}Rb por raíces aisladas de cebada. La concentración externa de RbCl fué 1 mM y el período de incubación fué de 10 minutos.

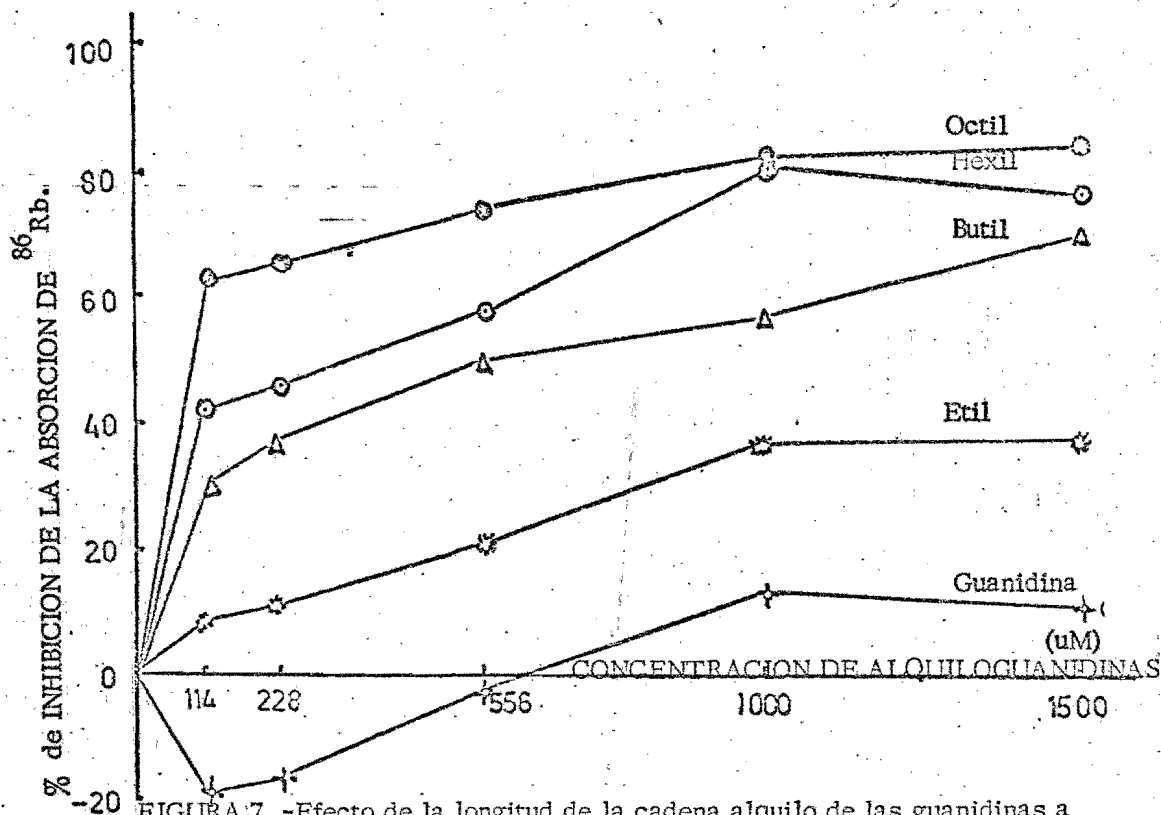


FIGURA 7. -Efecto de la longitud de la cadena alquilo de las guanidinas a diferentes concentraciones, en la absorción de ^{86}Rb por raíces aisladas de cebada. La concentración de RbCl externo -- fué de 1mM y el período de absorción fué de 10 minutos.

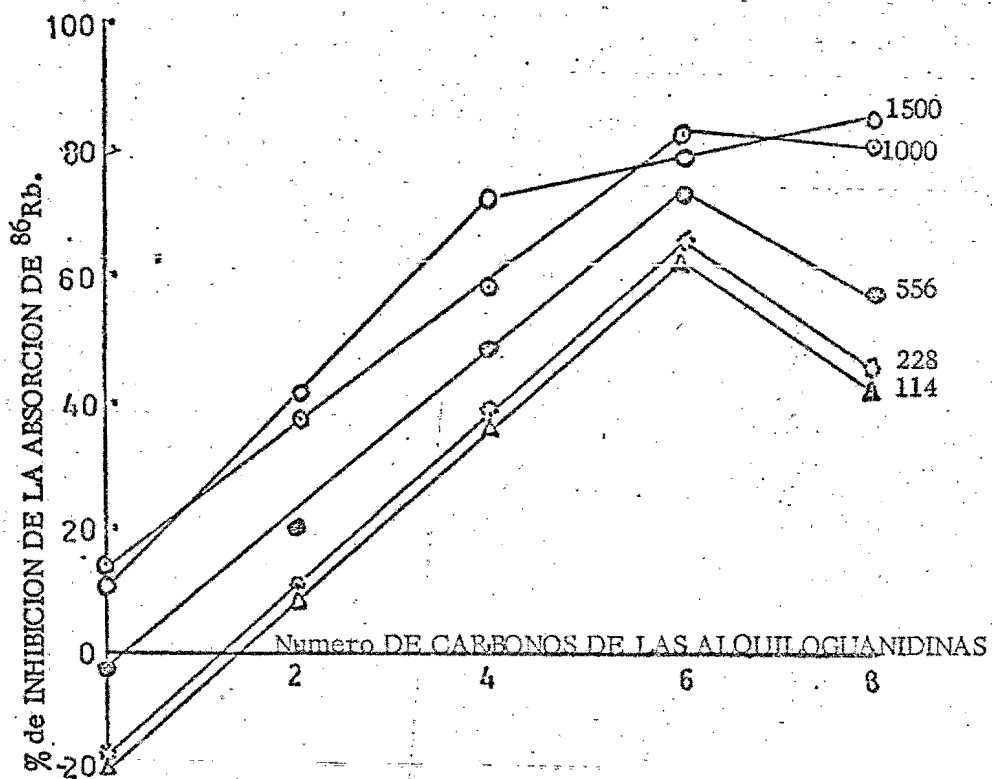
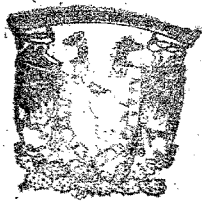
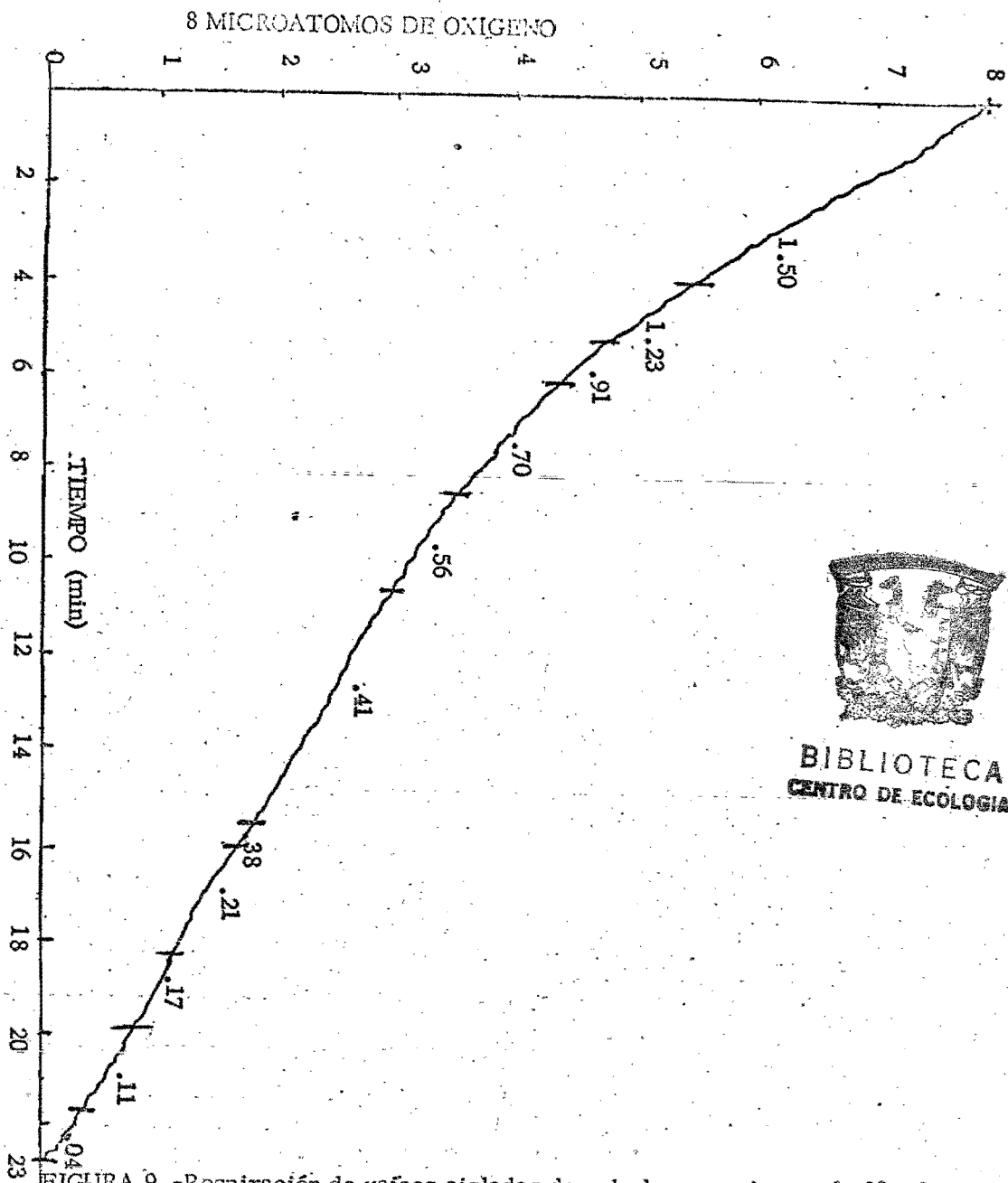


FIGURA 8.-Efecto del número de átomos de carbono de la cadena hidrofóbica de guanidinas a diferentes concentraciones en la absorción de ^{86}Rb por raíces aisladas de cebada. La concentración externa de RbCl fué 1 mM y el período de absorción de 10 minutos.



BIBLIOTECA
CENTRO DE ECOLOGIA

FIGURA 9, -Respiración de raíces aisladas de cebada en un tiempo de 23 minutos. El medio de incubación fué: 17 ml de agua destilada, 2 ml de -- CaSO_4 0.5mM y 1 ml de amortiguador maleico 0.02 (pH6).

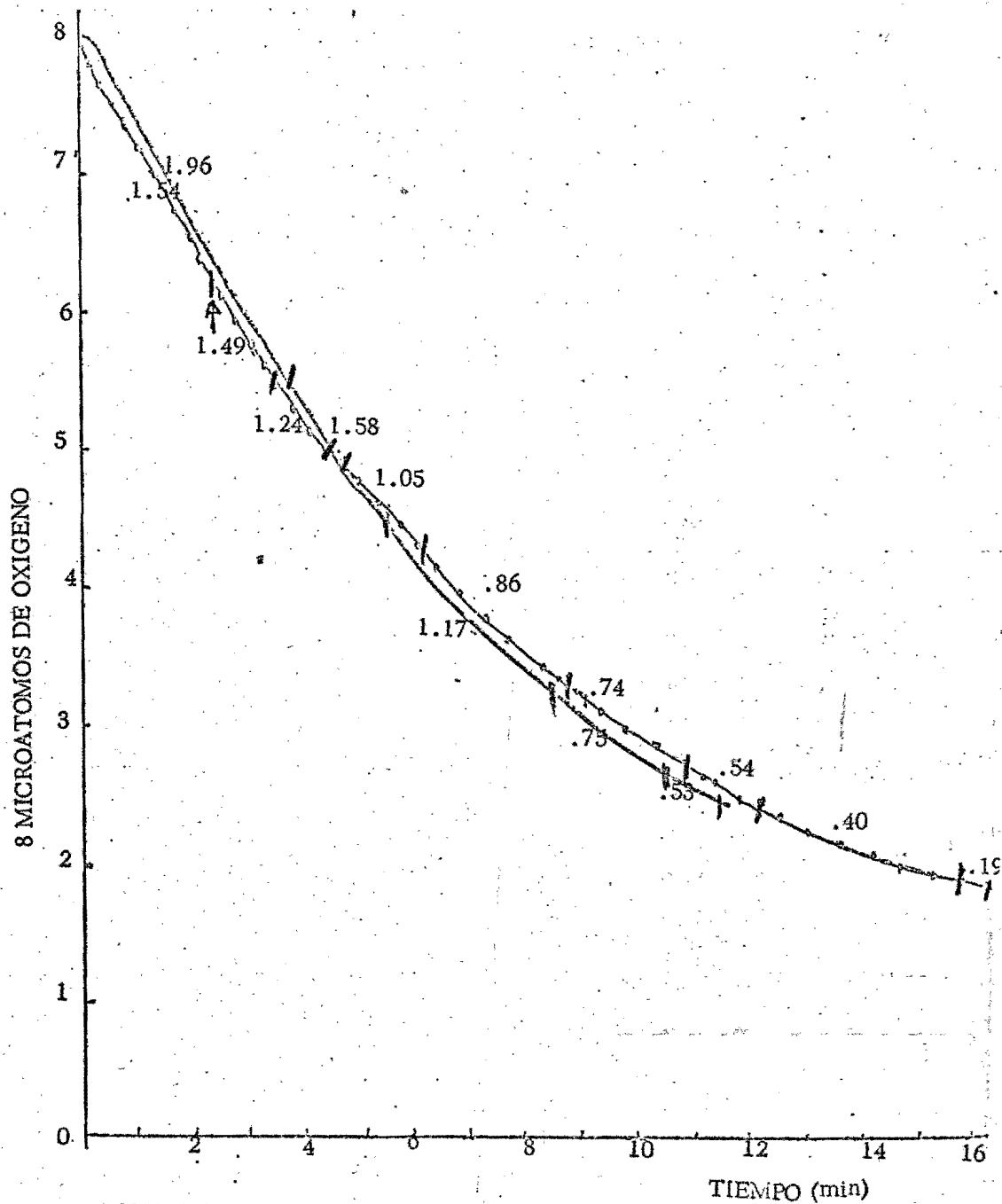


FIGURA 10a.-Respiraciones de raíces aisladas de cebada, sin (—) y con (---) una concentración 1.16 mM de Octilguanidina, la cual se añadió a los 2.50 min. de iniciada la respiración.

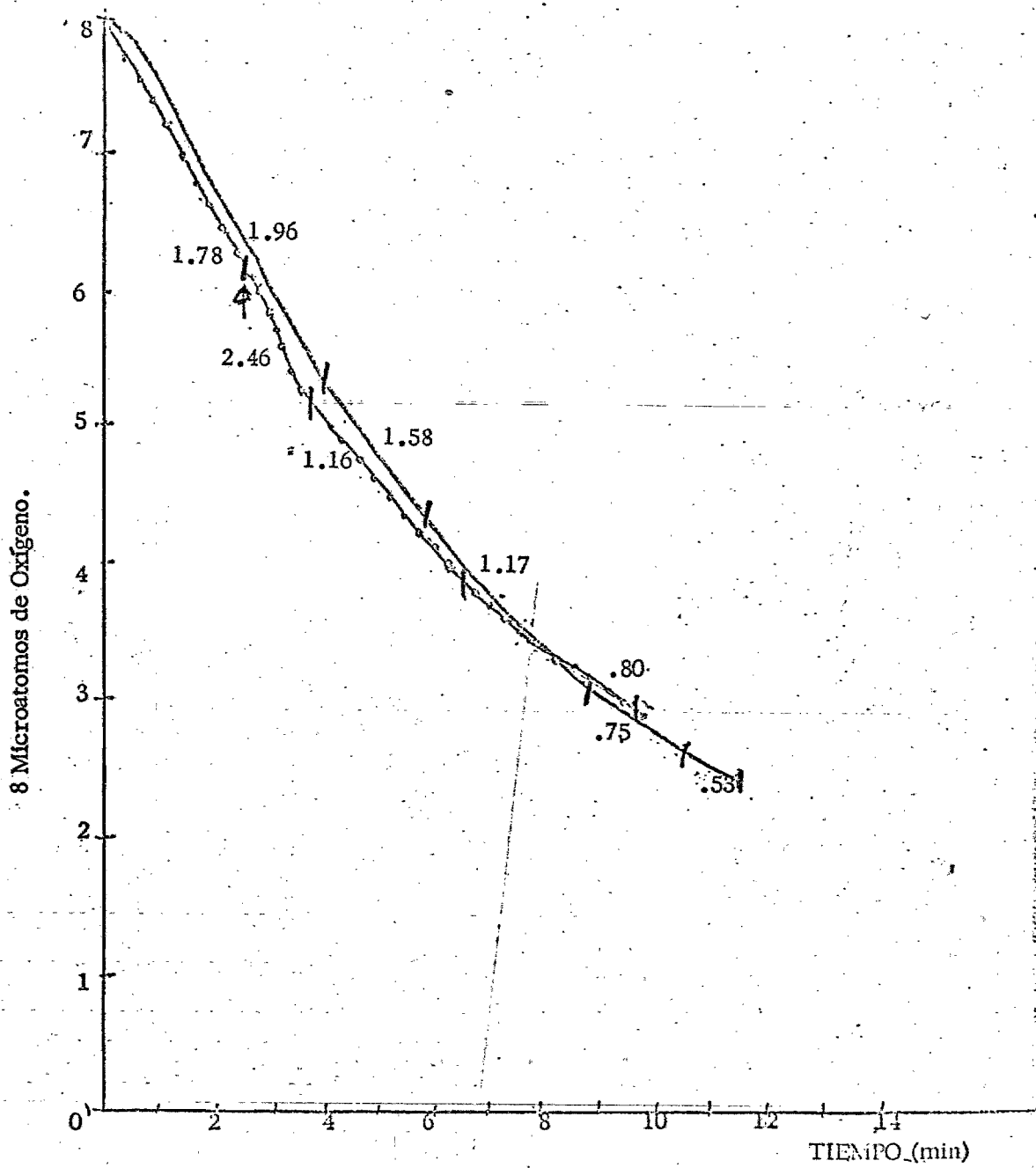


FIGURA 10B.- Respiraciones de raíces aisladas de cebada sin (—) y con (---) una concentración, 3.2 mM de Octilguanidina, la cual se añadió a los 2.50 min. de iniciada la respiración.

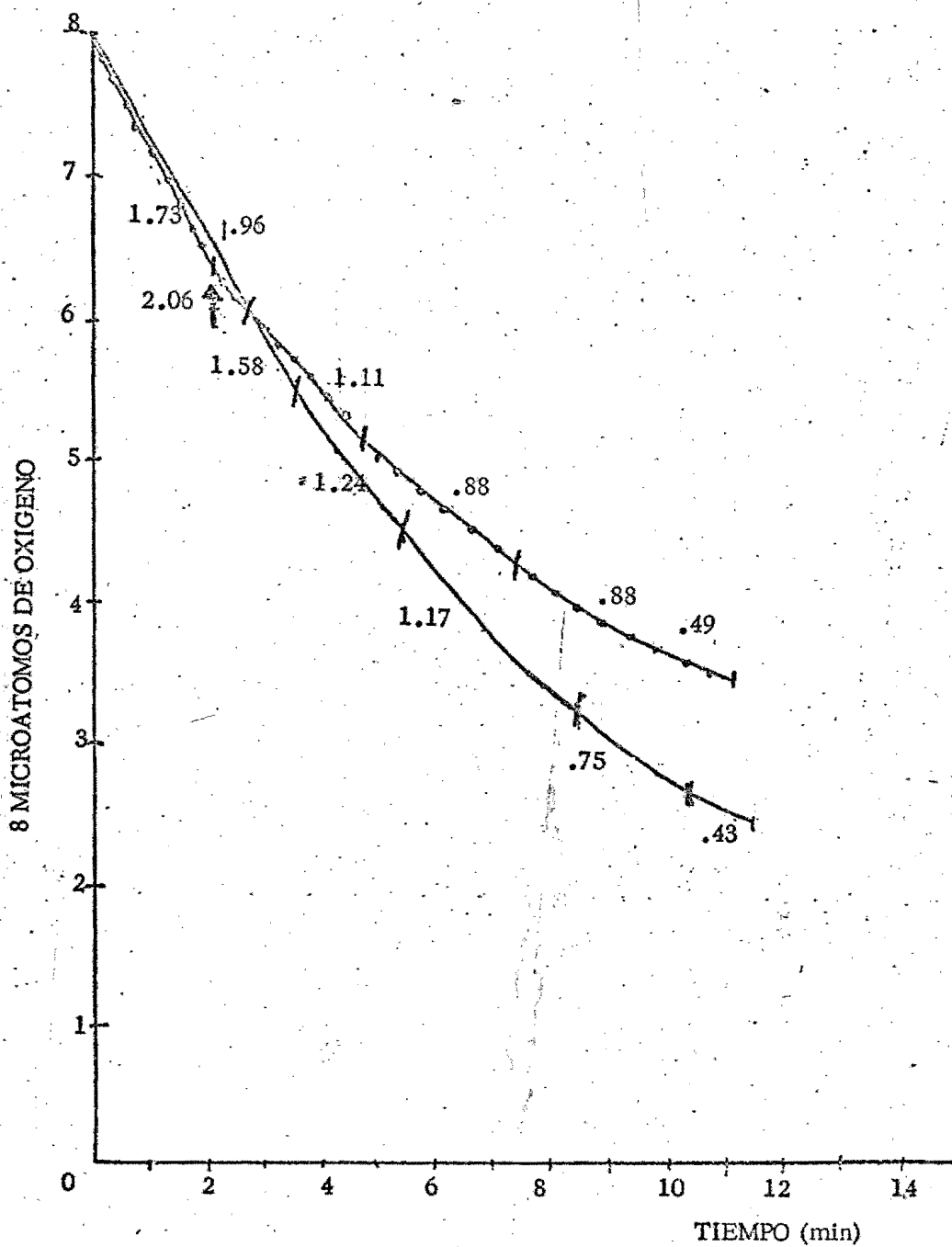


FIGURA 10c. - Respiraciones de raíces aisladas de cebada sin (—) y con (---) una concentración, 8 mM de Octilguanidina, la cual se añadió a los 2.50 min. de iniciada la respiración

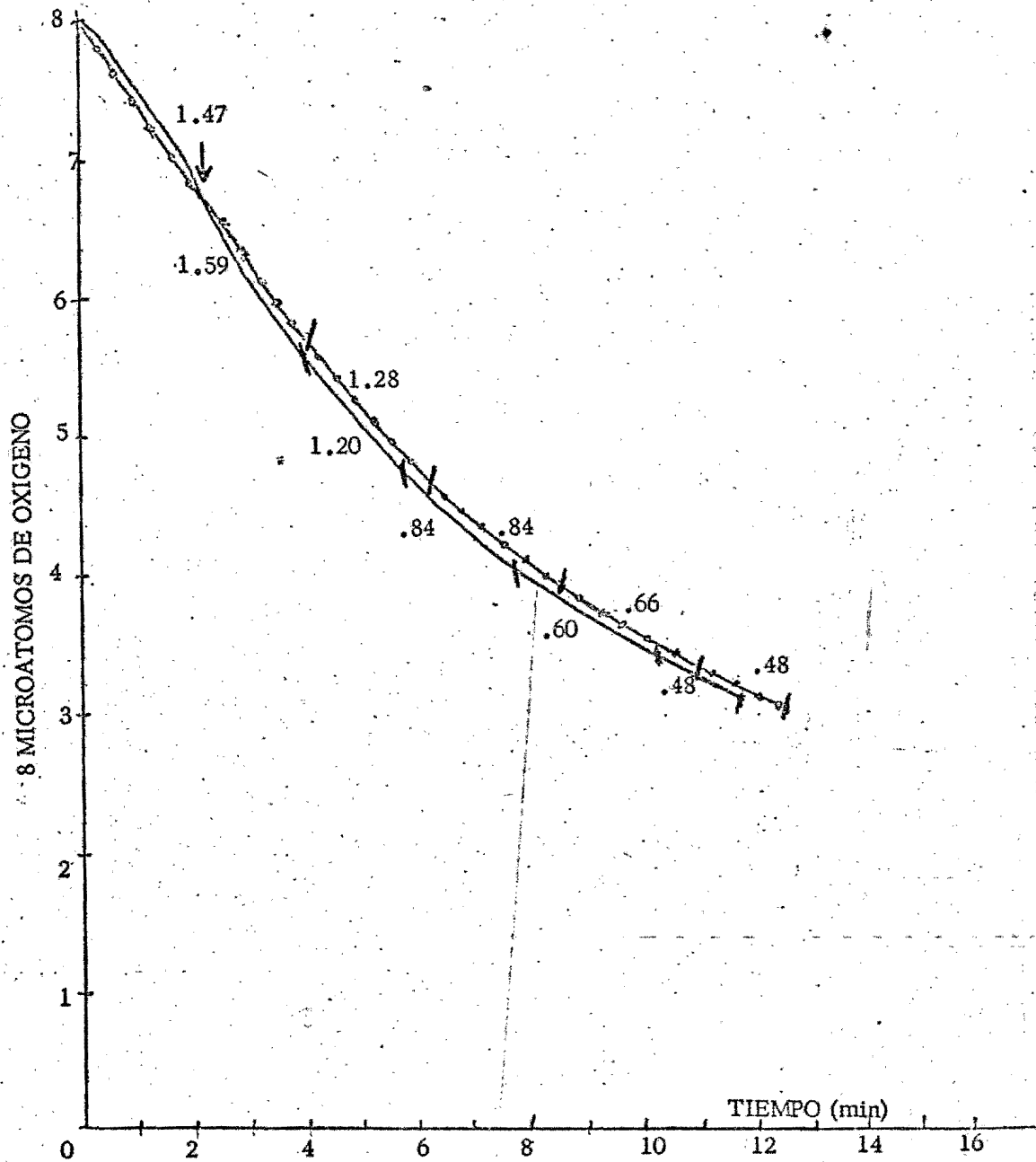


FIGURA 11a. -Respiraciones de raíces aisladas de cebada sin (—) y con (---) una concentración de guanidina, 3.2 mM. La guanidina se añadió a los 2.50 minutos de iniciada la respiración.

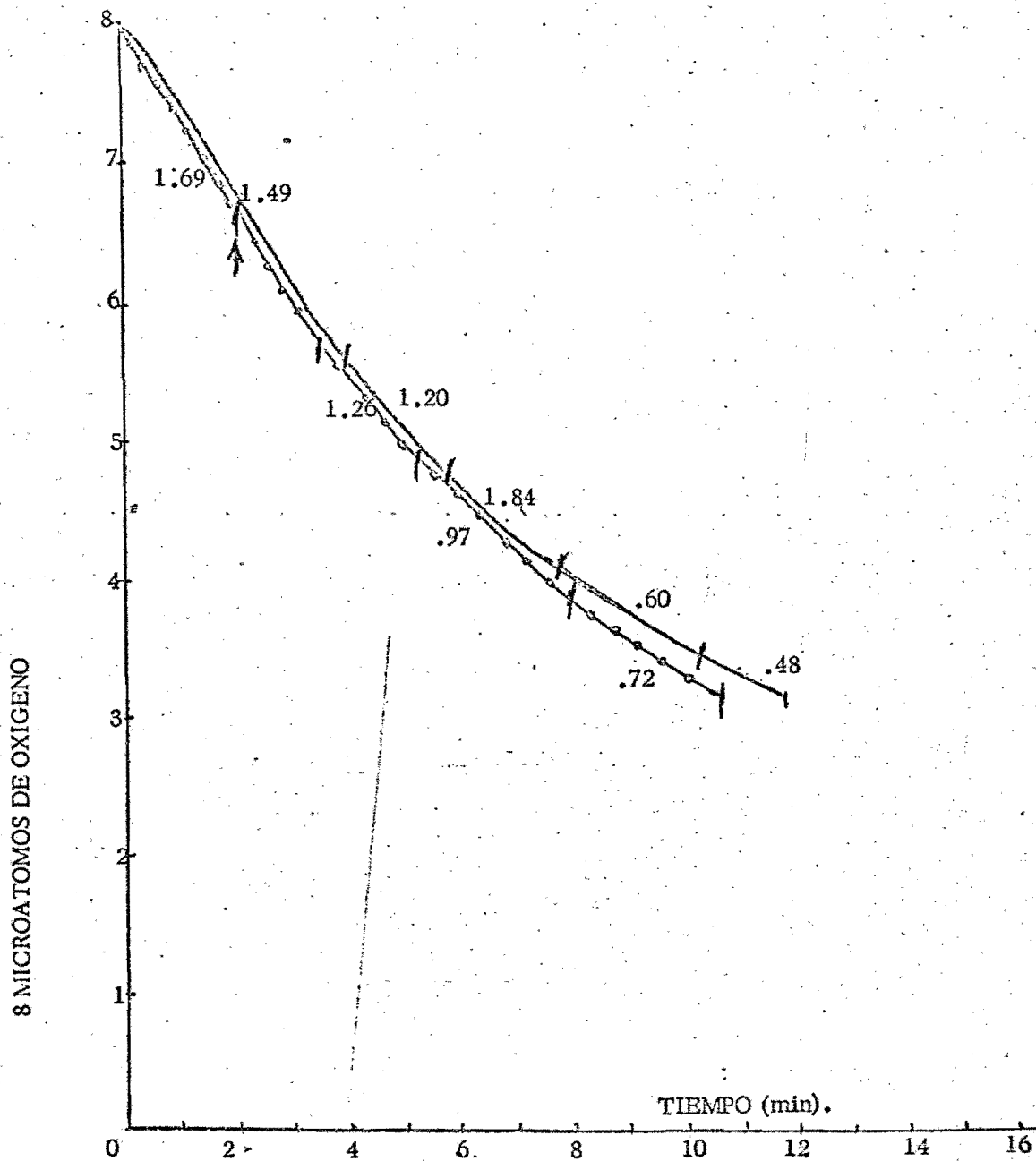


FIGURA 11b.-Respiraciones de raíces aisladas de cebada sin (→) y con (⇐⇐) una concentración de guanidina.8mM. La guanidina se añadió a los 2.50 minutos de iniciada la respiración.

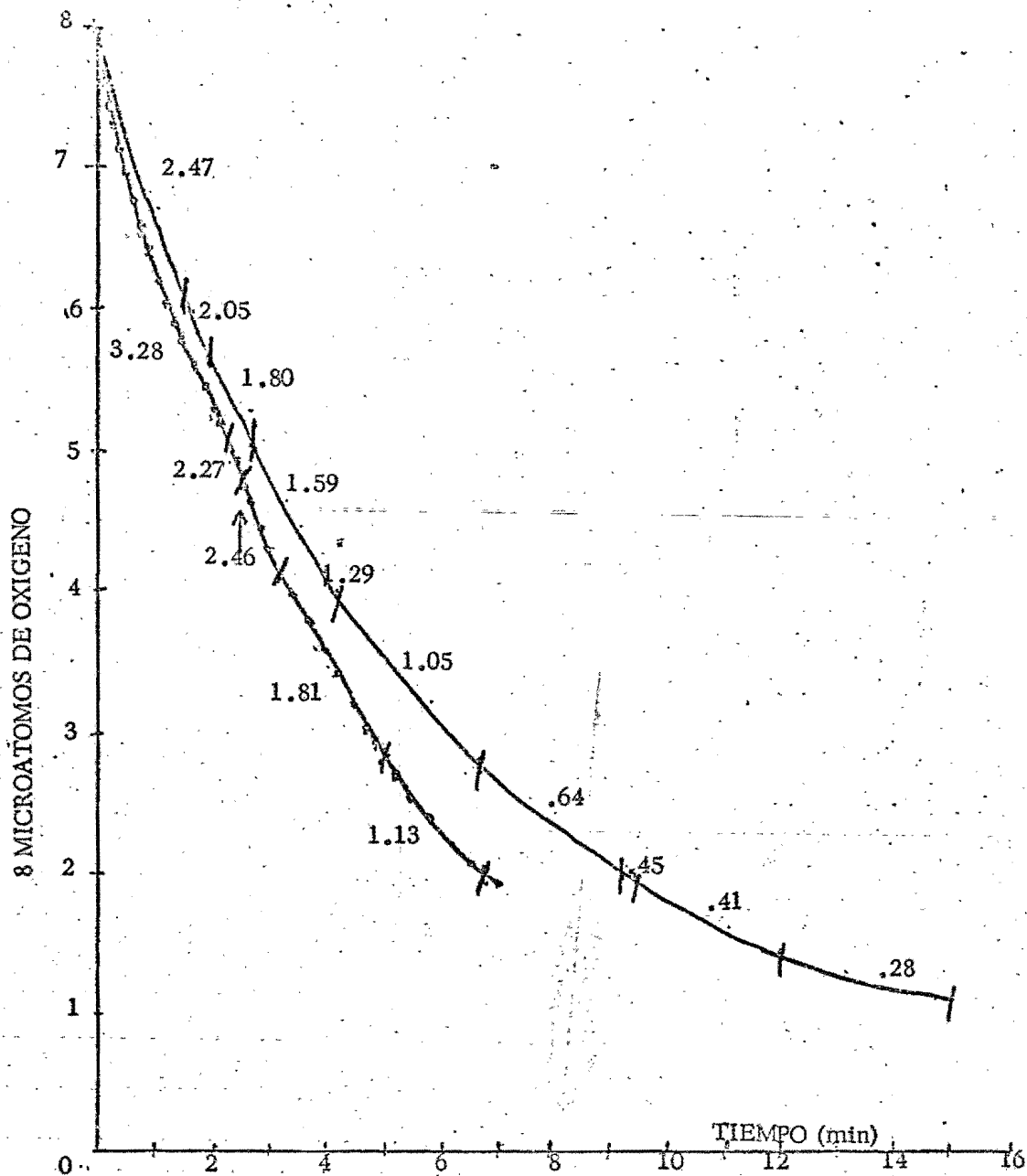


FIGURA 12a.-Respiraciones de raíces aisladas de cebada sin (—) y con (---) una concentración de Etilguanidina 3.2 mM. La Etilguanidina se añadió a los 2.50 minutos de iniciada la respiración.

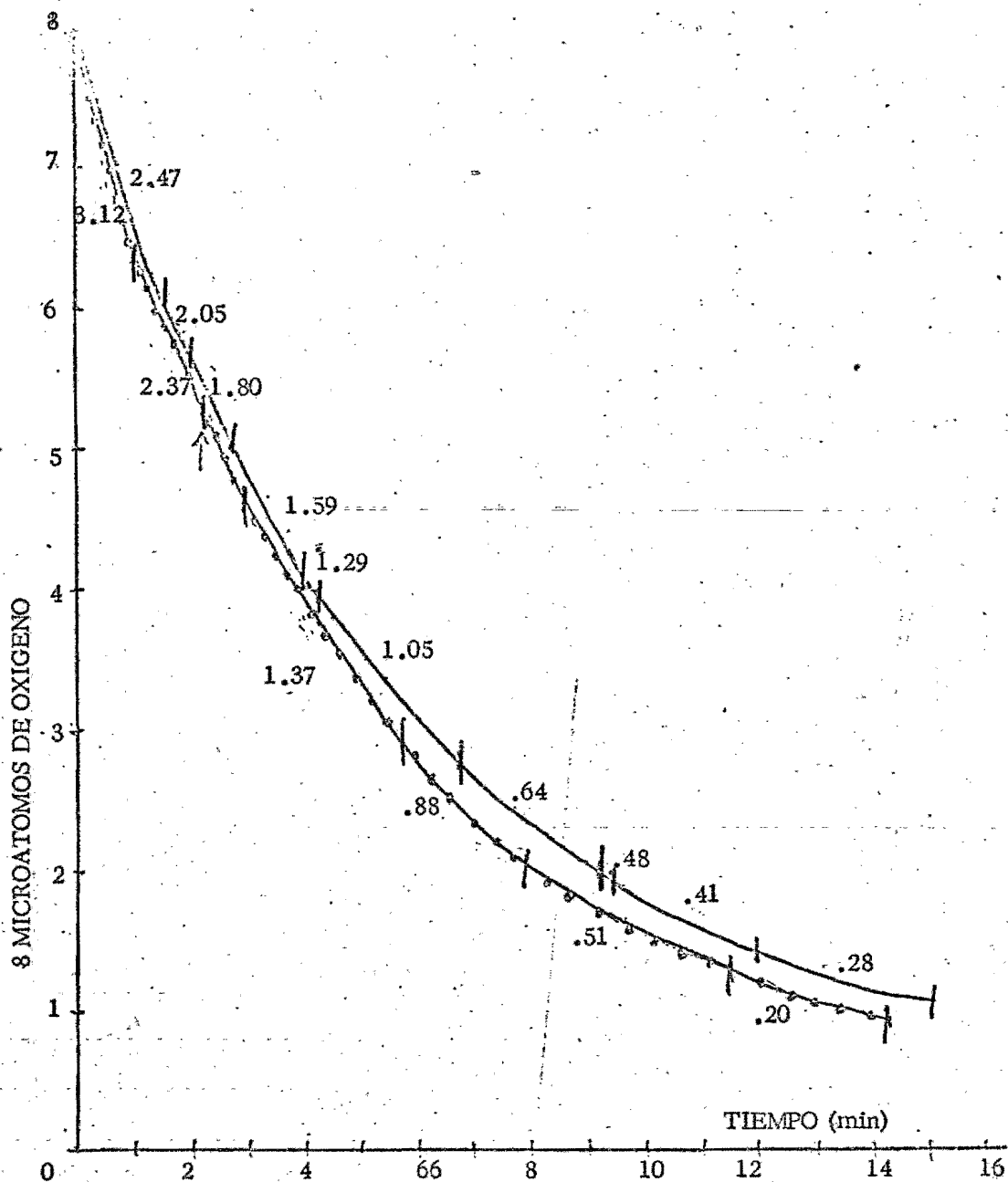


FIGURA 12b.-Respiraciones de raíces aisladas de cebada sin (—) y con (---) una concentración de Etilguanidina. 8 mM. La Etilguanidina se añadió a los 2.50 minutos de iniciada la respiración.

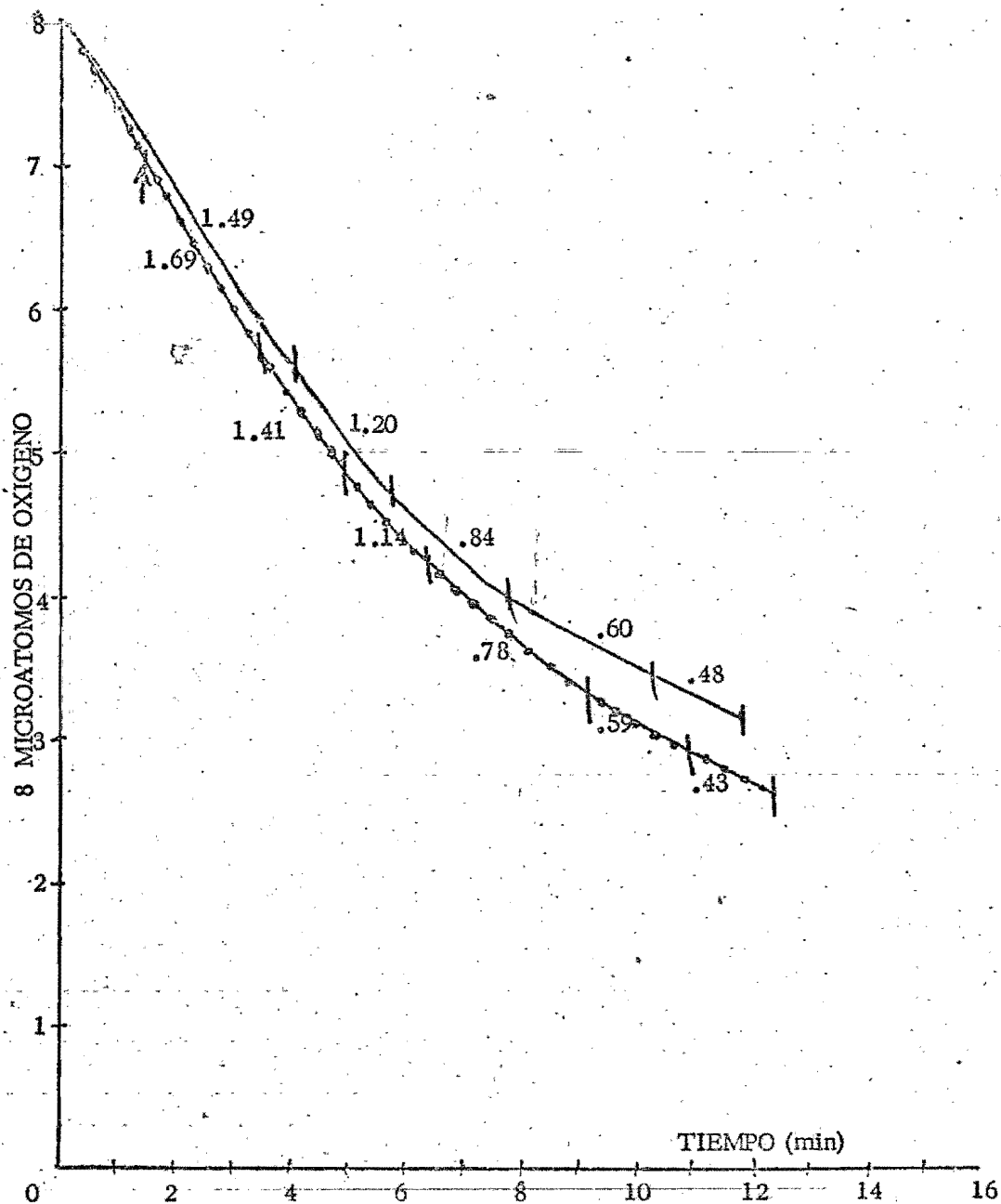


FIGURA 13a.-Respiraciones de raíces aisladas de cebada sin (—○—) y con (—●—) una concentración, 3 2mM de Butilguanidina. La Butilguanidina se añadió a los 2.50 minutos de iniciada la respiración.

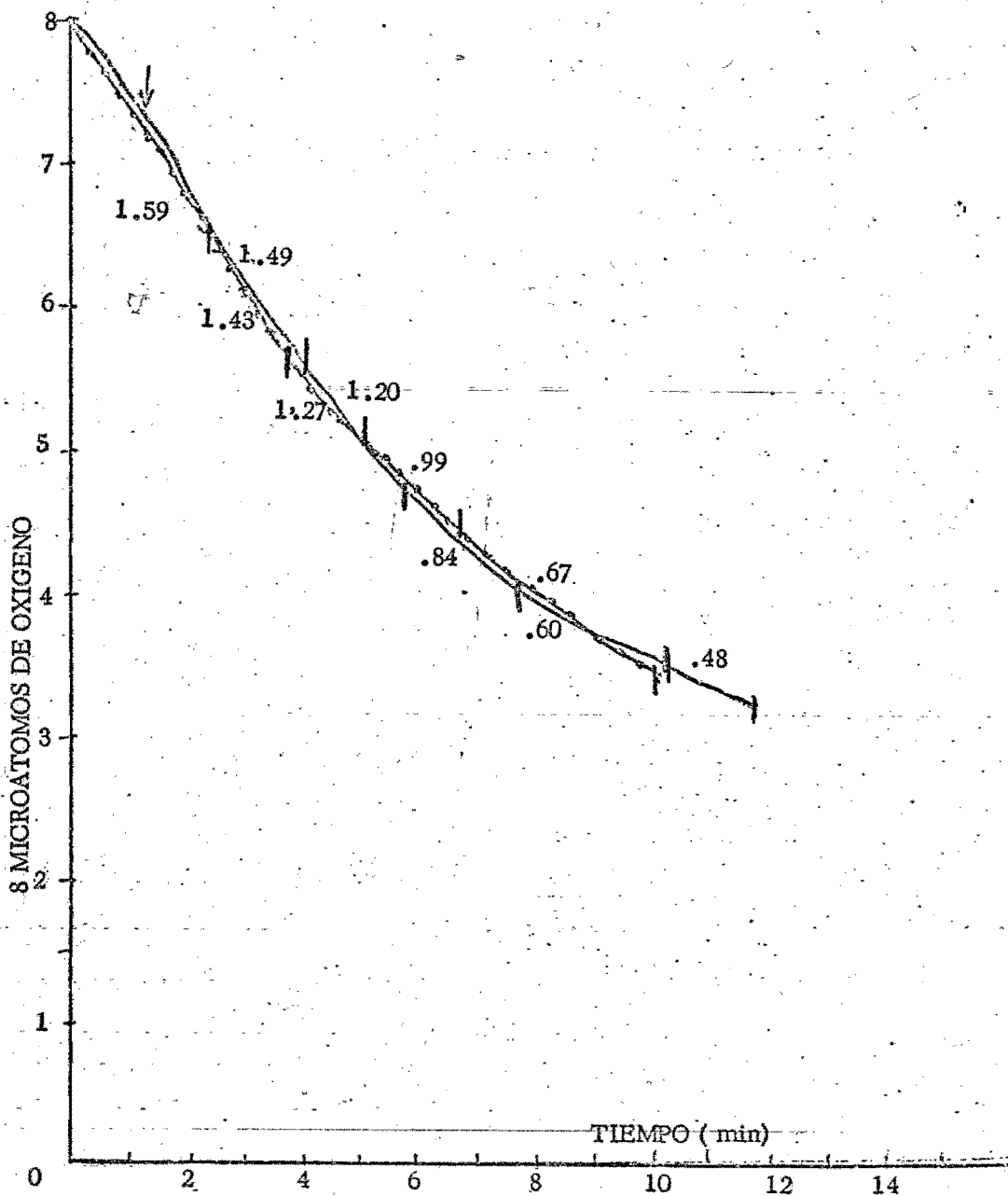


FIGURA 13b.-Respiraciones de raíces aisladas de cebada sin (—) y con (---) una concentración .8 mM de Butilguanidina. La Butilguanidina se añadió a los 2.50 minutos de iniciada la respiración.

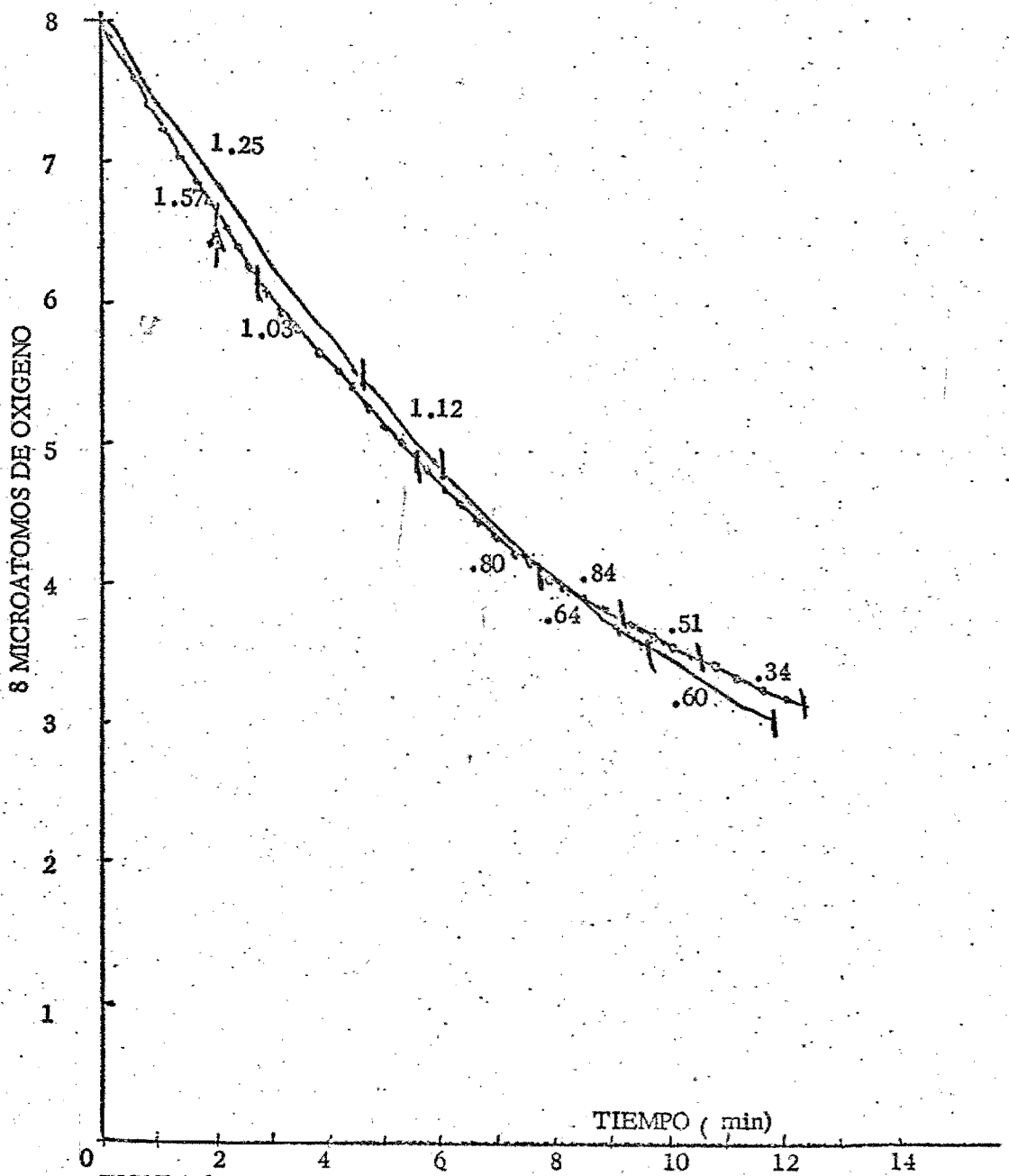


FIGURA 14a. -Respiraciones de raíces aisladas de cebada sin (—) y con (---) una concentración 3.2 mM de Hexilguanidina. La Hexilguanidina se añadió a los 2.50 minutos de iniciada la respiración.

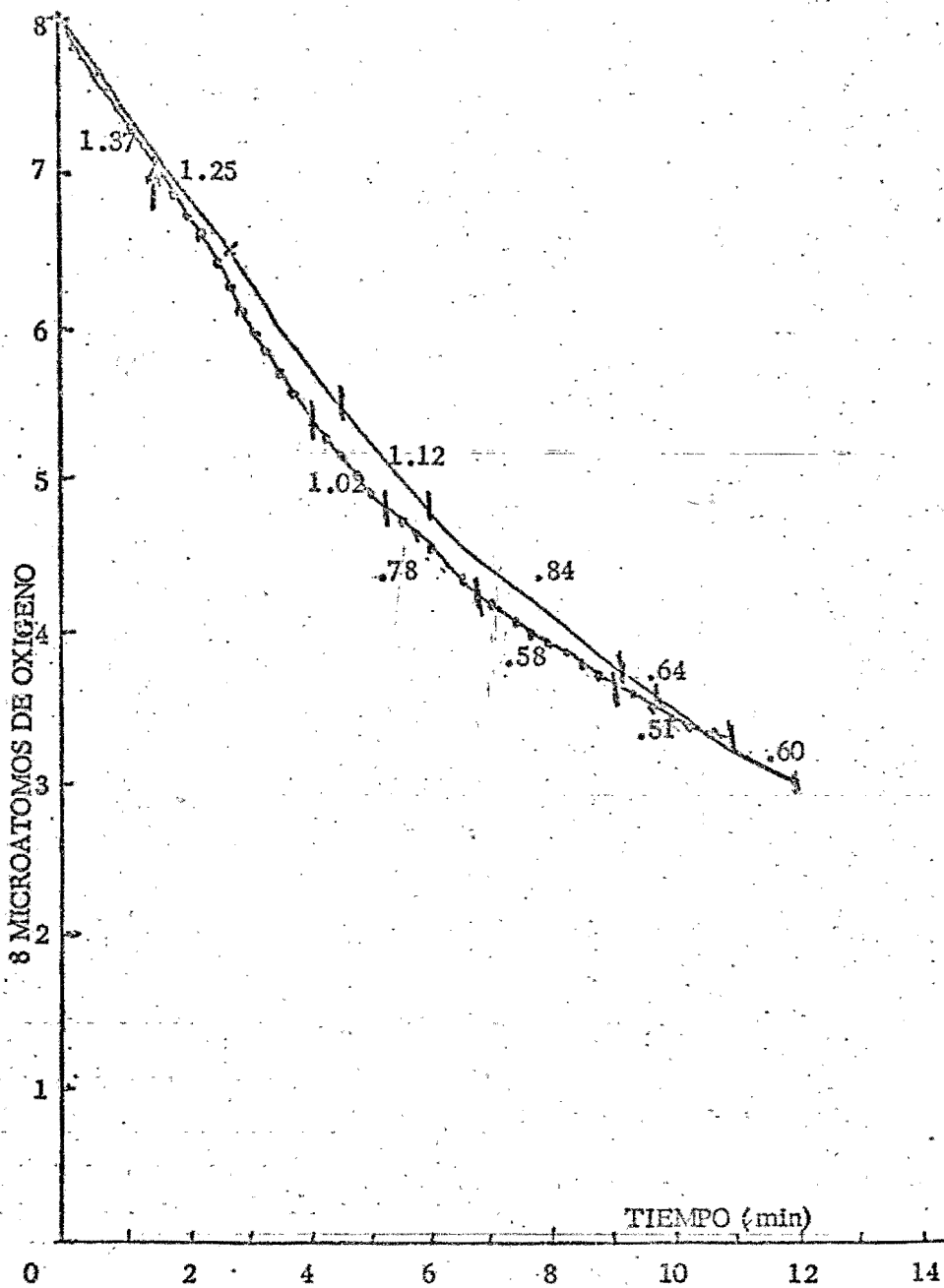


FIGURA 14b.-Respiraciones de raíces aisladas de cebada sin (—) y con (---) una concentración, 8 mM de Hexilguanidina. La Hexilguanidina se añadió a los 2.50 minutos de iniciada la respiración.

DISCUSION

Uno de los objetivos de éste trabajo fué ver la acción de la Octilguanidina en la absorción del ^{86}Rb partiendo de la base que ésta sustancia interfiere con iones metálicos en un gran número de sistemas biológicos (1, 22, 25, 26).

La Octilguanidina se considera como un catión lipofílico que posee una carga positiva en su núcleo ó centro guanidina y una cadena de 8 átomos de carbono la cual le confiere a la molécula un alto grado de lipofilicidad.

Por los resultados aquí obtenidos se ve que la acción de la Octilguanidina es inhibitoria de la absorción del ^{86}Rb .

De lo anterior se desprenden dos preguntas principalmente:

- 1). ¿Qué es lo que está inhibiendo la absorción del ^{86}Rb , el centro cargado guanidina, o la cadena alquil o ambas?
- 2). -Sea cualquiera la respuesta para los planteamientos anteriores. ¿En dónde actúa la Octilguanidina, en el sitio del propuesto acarreador del K o en algún otro lugar de la membrana, o en ambos sitios?

Al probar las guanidinas con diferentes longitudes en la cadena, incluyendo a la guanidina simple, se observó que la inhibición aumenta conforme aumenta la longitud de la cadena y que la guanidina simple añadida a altas concentraciones también inhibe. De lo anterior se deduce que tanto el centro cargado guanidina como la cadena alquil son importantes para la inhibición.

La cadena puede actuar pegándose a la parte lipídica de la membrana celular siendo mayor la adhesión conforme aumenta la longitud de la cadena o sea el número de átomos de carbono, mientras que la cabeza o núcleo guani-

dina, puede actuar sobre el supuesto acarreador del K^+ .

Como la absorción iónica es un proceso dependiente de energía siendo la fuente probable el ATP, el cual probablemente provenga de la respiración, se creó la necesidad de hacer experimentos de respiración para ver si las guanidinas estaban actuando a nivel energético.

Al probar diferentes concentraciones de guanidina se vió que en ninguna de las que se estudiaron, se obtuvo una inhibición clara de la respiración.

Para explicar esto hay dos posibilidades:

- 1). - Las guanidinas no pasan la membrana y por lo tanto no llegan a las mitocondrias y es por eso que no inhiben.
- 2). - Las guanidinas si pasan la membrana.

Se están actualmente realizando dos tipos de estudios los cuales nos darán información acerca de las dos posibilidades anteriores y son:

- 1). - Efecto de las alquilguanidinas en la respiración de mitocondrias aisladas de raíz de cebada.
- 2). - Absorción de guanidinas marcadas radioactivamente en raíces aisladas.

Independientemente de las posibilidades mencionadas y de acuerdo en parte a los resultados cinéticos se concluye que las alquilguanidinas son muy efectivas en la inhibición del transporte de Rb, sugiriendo que la inhibición de la absorción sea por la interacción del grupo guanidina cargado positivamente, con el supuesto acarreador de Rb mientras que la cadena alquil interaccione con el medio hidrofóbico de la membrana.

BIBLIOGRAFIA

1. Chappel, L. B. 1963. The effect of alkylguanidine on mitochondrial metabolism, *J. Biol. Chem.* 238: 410-417
2. Davidoff, F. 1973. Guanidine derivatives in medicine. *New England J. Med.* 287: 141-146
3. Devlin, R. 1970. Fisiología vegetal. Ediciones Omega. Barcelona, España. 1-29
4. Danielli, J. F. y Dawson, H. J. 1935. *Cell Comp. Physiol.* 5: 495.
5. Epstein, E. Y Hagen, C. E. 1951. A Kinetic study of the absorption of alkali cationes by barley roots. *Plant. Physiol.* 27: 457-474
6. Epstein, E. 1956. Mineral Nutrition of plants: Mechanism of ion uptake and transport. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 7: 1-24
7. Epstein, E. 1961. The essential role of calcium in selective cation-transport. *Plant Physiol.* 36: 437-444
8. Epstein, E., W. E. Schmid y D. W. Rains. 1963. Significance and technique of short term experiments on solute absorption by plant-tissue. *Plant Cell Physiol.* 4: 79-84
9. Epstein, E., D. W. Rains y O. E. Elzan. 1963. Resolution of Dual-mechanism of Potassium absorption by barley roots. *Plant Physiol.* -- 49: 684-692
10. Epstein, E. 1972. Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives. John Wiley and Sons, Inc. New York. Cap. 6: 103-143
11. Epstein, E. 1973. Mechanisms of ion transport through plant cell --- membranes. *Int. Rev. Cytol.* 34: 123-168
12. Fisher, L. D., D. Hansen y T. K. Hodges. 1970. Correlation between ion fluxes and ion-stimulated a denosin triphosphatase of plant roots.- *Plant Physiol.* 46: 812-814
13. Fried, M., y L. C. Noaggle. 1958. Multiple site uptake of individual cations by roots as affected by hydrogen ion, *Plant Physiol.* 33: 139-144

14. Fried, M., H. O. Oberlander y L. C. Noggle. 1961. Kinetic of --- rubidium absorption and translocation by barley. *Plant Physiol.* 36: 183-191
15. Gomez Puyou, A., F. Sandoval, B. Lotina y M. tuena de Gomez Puyou-1973. Guanidine sensitive transport of Na^+ and K^+ in mitochondria. -- *Bioch. Biophys. Research Communications.* 52: 74-78
16. Gómez Puyou, A., F. Sandoval, M. Tuena de Gómez Puyou, E. Chávez y E. Pinto. 1972. On the locus of action of Na^+ at site 1 of oxidative - phosphorylation. *Bioenergetics.* 3: 221-233
17. Higinbotham, N. 1973. The mineral absorption process in plant. *Bot. - Rev.* 39: 15-69
18. Hodges, T. K. 1966. Oligomycin inhibition of ion transport in plant - roots. *Nature* 209: 245-26
19. Jacoby, B. y Ora E. Plessner. 1970. Oligomycin effect on ion ab- sorption by excised barley roots and on their ATP content. *Plants - (Berl)* 90:215-221
20. Klingerberg, M. 1970. Metabolite transport in mitochondrial: an exa- ple for intracellular membrane fuction assays of *Biochemistry.* 6: 150-256.
21. Lauchli, A. y E. Epstein. 1970. Transport of potassium and rubidium in plant roots. *Plant Physiol.* 45: 639-641
22. Lotina, B., M. Tuena de Gómez Puyou y A. Gómez Puyou. 1973. --- Respiratory Changes induced by guanidines and cations in submitochon- drial particles. *Arch. Biochem. Biophys.* 159: 520-527
23. Ordín, L. y L. Jacobson. 1955. Inhibition of ion absorption and respi- ration in barley roots. *Plant Physiol.* 30: 21-27
24. Papa, S., F. Guerrieri y M. Lorusso. 1972. Action of local anaesthe- tics on passive and energy linked ion translocation in the inner mito- -tochondrial membrane. *Bioenergetics* 3: 553-568
25. Peña, A. 1973. Studies with guanidines on the mechanisms of K trans- port in yeast. *FEBS Letters.* 34: 117-119
26. Schafer, G. y D. Bojanowski. 1972. Interaction of biguanidines with -- mitochondrial and synthetic membranes. *Eur. J. Biochem.* 27: 364-375

27. Robertson, R. N., M. J. Wilkins y Weeks. 1951. Studies in the metabolism of plant cells. IX. The effects of 2, 4 dinitrofanol in salt --- accumulation and the respiration. Australian Jour. Sci. Research. --- 4: 248-264
28. Robertson, R. N. 1960. Ion transport and respiration. Biological --- Reviews. 35: 231-264
29. Sidney, P. Colowick y O. Nathan. Kaplan methods in Enzimology. -- Volume X. Oxidation and phosphorylation. Edited by Ronal W. Esta--brook.