

ACCIÓN DEL OTOBAFENOL DE *Virola aff. pavonis* SOBRE LA PERMEABILIZACIÓN ORIGINADA EN LA MITOCONDRIA POR EL PROOXIDANTE *TERT*-BUTILHIDROPERÓXIDO

THE EFFECT OF OTOBAPHENOL EXTRACTED FROM *Virola aff. pavonis* ON THE MITOCHONDRIA
PERMEABILIZATION INDUCED BY THE PRO-OXIDANT *TERT*-BUTYLHYDROPEROXIDE

Luis Fernando López¹, Sigifredo Solano¹, Ricardo Torres², Diego Luis Aristizábal¹,
Dairo Alonso Rendón¹ y Víctor Lemeshko¹

Resumen

Se estudió el efecto del antioxidante natural otobafenol, extraído de las hojas de *Virola aff. pavonis*, sobre la permeabilización de mitocondrias de hígado de rata inducida por el prooxidante *tert*-butilhidroperóxido. Se mostró que el otobafenol, esencialmente, retrasa la transición de permeabilidad de mitocondrias a concentraciones relativamente bajas. A concentraciones más altas, el otobafenol causó la agregación de las mitocondrias, y su propia agregación en el medio sin mitocondrias. Los agregados formados de otobafenol también protegieron las mitocondrias de su permeabilización por el *tert*-butilhidroperóxido, lo cual sugiere que estos agregados podrían servir como un "búfer antioxidante". Los datos mostraron que la agregación de mitocondrias, tanto como su hinchamiento, pueden disminuir la absorbancia de la luz en la suspensión mitocondrial. Fue desarrollado un modelo físico para demostrar que el fenómeno de agregación aumentaría o disminuiría la dispersión de la luz, cambiando los valores de absorbancia. Tanto el modelo como los datos experimentales mostraron que no sólo la disminución de la absorbancia en la suspensión mitocondrial significa hinchamiento de las mitocondrias.

Palabras clave: antioxidantes, *Myristicaceae*, *Virola aff. pavonis*, otobafenol, mitocondrias.

Abstract

The effect of the natural antioxidant otobaphenol, extracted from *Virola aff. pavonis* leaves, on rat liver mitochondria permeabilization by the pro-oxidant *tert*-butylhydroperoxide, was studied. It was showed that otobaphenol essentially delayed permeability transition of mitochondria at its relatively low concentrations. At higher concentrations, otobaphenol caused the mitochondria aggregation and was itself aggregated in the medium without mitochondria. The formed otobaphenol aggregates were able to protect mitochondria against their permeabilization by *tert*-butylhydroperoxide, suggesting that these aggregates could serve as an "antioxidant buffer". The data show that the mitochondria aggregation, as well as their swelling, could lead to decrease in the light absorbance of mitochondrial suspension. A physical model was developed to demonstrate that the phenomenon of aggregation could increase or decrease light scattering changing the absorbance value. Both, the modelling and experimental data, show that the decrease of the light absorbance does not always mean the mitochondria swelling.

Key words: antioxidants, *Myristicaceae*, *Virola aff. pavonis*, otobaphenol, mitochondria.

Recibido: junio de 2001; aprobado para publicación: septiembre de 2001.

¹ Departamento de Física, Universidad Nacional de Colombia (sede Medellín), Medellín, Colombia, apartado 3840. E-mail: darendon@perseus.unalmed.edu.co.

² Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia (sede Medellín), Medellín, Colombia, apartado 3840. E-mail: rtorres@perseus.unalmed.edu.co.

INTRODUCCIÓN

La importancia del uso de los antioxidantes en medicina para el tratamiento de diferentes enfermedades y la posibilidad de obtención de este tipo de sustancias a partir de extractos vegetales justifica plenamente el estudio de sus actividades biológicas. El árbol *Virola aff. pavonis* es una especie de la familia *Myristicaceae* que se encuentra en la Amazonia, Araracuara y el Magdalena medio colombiano, y varias especies pertenecientes a esa familia han sido utilizadas por los indígenas en sus rituales curativos desde épocas precolombinas (Bennett y Alarcón, 1994). Según Martínez y Torres (1997), el extracto de hojas de *Virola aff. pavonis* posee varios neolignanos, encontrándose en una cantidad abundante el otobafenol. Se ha mostrado que los fenoles extraídos de plantas de la familia *Myristicaceae* poseen propiedades antioxidativas (Duggal y Kartha, 1956).

Las mitocondrias son las organelas celulares encargadas de la fosforilación oxidativa. Durante la síntesis del ATP acoplada con la respiración, hasta el 2 a 3% del oxígeno consumido por las mitocondrias puede ser convertido en productos reactivos de oxígeno (Vercesi *et al.*, 1997). Esos productos reactivos, entre los cuales particularmente se encuentra el radical libre OH^{\cdot} (resultado de la reacción Fenton), desencadenan problemas degenerativos del estado estructural y funcional de las mitocondrias. Recientes resultados de investigación en este campo muestran las alteraciones de carácter mitocondrial ocasionadas por varios factores, como un detonante de los procesos que conllevan al mal funcionamiento celular y más severamente a la muerte celular (Susin *et al.*, 1998). De ahí proviene la importancia del estudio de las propiedades antioxidativas de sustancias sintéticas, o de procedencia natural, y la evaluación de su carácter protector sobre el estado tanto estructural como funcional de las mitocondrias, cuando estas organelas están bajo estrés oxidativo.

Estructuralmente las mitocondrias están compuestas de dos membranas: una interna y otra externa. La membrana interna mitocondrial se caracteriza por ser prácticamente impermeable a los iones H^+ , garantizando el mantenimiento de su potencial elec-

troquímico utilizado en la síntesis del ATP mitocondrial. Muchos factores (Zoratti y Szabó, 1995), entre estos los prooxidantes, ocasionan el cambio en la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial (transición de permeabilidad) para diferentes iones y solutos, lo cual conlleva al hinchamiento de las mitocondrias y puede producir la ruptura de su membrana externa. En estas condiciones, con la membrana interna permeabilizada, las mitocondrias no pueden sintetizar el ATP que es crucial para la actividad celular. Por lo anterior, la permeabilización de las mitocondrias es un claro indicativo de la inducción de procesos que conducen a alteraciones estructurales-funcionales de las células e incluso a su muerte.

El presente trabajo estudia la posible propiedad protectora de una sustancia natural, el otobafenol, obtenida de hojas de *Virola aff. pavonis* (Martínez y Torres, 1997), contra la permeabilización de las mitocondrias inducida por el prooxidante *tert*-butilhidroperóxido (*t*-BuOOH). El hinchamiento de mitocondrias causado por su permeabilización fue monitoreado registrando la disminución de absorción de la luz por la suspensión mitocondrial (Cleland, 1952).

Se establecieron las condiciones óptimas para la protección de las mitocondrias contra su permeabilización por el estrés oxidativo, y además los niveles de concentración a los cuales el otobafenol causa una disminución brusca de absorbancia, inducida por la agregación de mitocondrias. También fue desarrollado un modelo físico con base en la dispersión de la luz dependiente de la agregación de moléculas y partículas para explicar estos fenómenos ópticos por agregación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las mitocondrias de hígado de rata fueron aisladas por el procedimiento estándar de centrifugación. Finalmente las mitocondrias se suspendieron en el medio, compuesto de 210 mM manitol, 70 mM sacarosa, 0.02 mM EGTA, 5 mM Hepes/KOH, pH 7.4, 0.3 mg/ml de albúmina de suero de bovino, libre de ácidos grasos (Lemeshko, 2001). La concentración final de mitocondrias en la suspensión fue alrede-

dor de 50 mg/ml de proteína. La proteína fue determinada por el método biuret (Gornall *et al.*, 1949).

El hinchamiento de mitocondrias fue monitoreado registrando la absorción de la luz por la suspensión mitocondrial con el espectrofotómetro Turner SP-850 (USA) a 540 nm, conectado a un registrador Linseis (USA). Los registros se realizaron a temperatura ambiente, agitando constantemente la suspensión con ayuda de un agitador magnético instalado al equipo. El medio de incubación estuvo compuesto de 210 mM manitol, 70 mM sacarosa, 5 mM HEPES KOH, 5 mM KH_2PO_4 , 5 mM succinato, pH 7.4 (medio MSHPS). Junto con las mitocondrias en el medio se adicionan también 2.5 μM rotenona con el propósito de inhibir el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. En los experimentos se utilizó otobafenol (8R, 8'R, 7R)-4'-hidroxi-5'-metoxi-3, 4-metilenodioxi-2',7, 8,8'-neolignano, disuelto en dimetil-sulfóxido (10 mg/ml). Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico de la firma Sigma.

RESULTADOS

En la figura 1 se muestra el efecto en el proceso de la permeabilidad mitocondrial inducido por el *t*-BuOOH y el retardo de este proceso debido al antioxidante butilhidroxitolueno (BHT). La curva *a* es el control y muestra la permeabilidad mitocondrial espontánea cuando las mitocondrias se encuentran en el medio isotónico MSHPS. La curva *b* indica el efecto del prooxidante *t*-BuOOH adicionado dos minutos después de agregar las mitocondrias al medio MSHPS; se ve una activación con respecto al control del proceso de permeabilidad de las mitocondrias. La curva *c* muestra el retardo por el antioxidante clásico BHT en la inducción del proceso de transición de permeabilidad debido a la adición del prooxidante *t*-BuOOH. La curva *d* muestra el efecto del otobafenol, en una concentración relativamente alta (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), sobre la suspensión de mitocondrias. Esta última curva muestra que el otobafenol, en vez de retardar la permeabilidad de las mitocondrias, indujo una disminución brusca de la absorbancia, con dos fases. Este proceso de la disminución brusca de la absorbancia causada por la adición del otobafenol fue insensible a la ciclosporina A (CsA), inhibidor específico del "poro" que se

abre en la membrana interna y lleva a la permeabilización mitocondrial (Zoratti y Szabó, 1995; y referencias). Por lo tanto se supone que la curva *d* no refleja hinchamiento de las mitocondrias. Analizando la suspensión mitocondrial, visualmente se observaba la formación de agregados, y esto puede afectar los registros de los cambios de absorbancia en los experimentos.

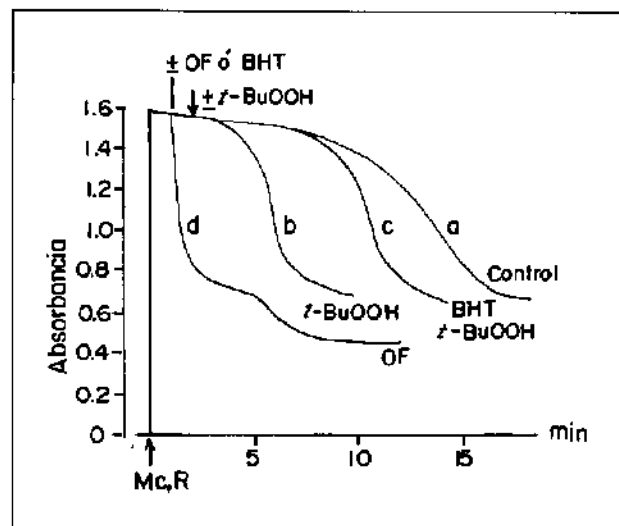


Figura 1. Los cambios de absorbancia de la suspensión de mitocondrias inducidos por el *t*-BuOOH, BHT y otobafenol (OF). Donde se indica, se ha agregado: mitocondrias (Mc), 0.5 mg de proteína/ml y 2.5 μM rotenona (R) en el medio MSHPS. *a*: control; *b*: 300 μM *t*-BuOOH; *c*: 25 μM BHT, 300 μM *t*-BuOOH; *d*: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de OF

Con el fin de tratar de elucidar la participación del otobafenol mismo en cambios adicionales de absorbancia no relacionados con el hinchamiento o la agregación de mitocondrias, se monitoreó la absorbancia y se realizó una observación visual de las muestras durante la incubación de solamente el otobafenol en el medio MSHPS (figura 2). Inicialmente, la absorbancia aumentaba alcanzando un máximo y luego decrecía llegando asintóticamente a un valor bajo de absorbancia. Las cubetas dibujadas en la parte superior de la figura reflejan esquemáticamente las observaciones visuales en tres etapas del proceso de agregación que experimentaba el otobafenol durante la incubación en el medio acuoso mencionado. Los resultados muestran que el otobafenol propicia la formación de agregados durante su incubación y ellos son los causantes del aumento ini-

cial y de la disminución posterior en la absorbancia. Esta observación llevó a estudiar con más detalle la influencia del otobafenol en los procesos de agregación y de hinchamiento mitocondrial al adicionar mitocondrias en diferentes etapas de agregación del otobafenol en el medio MSHPS (figura 3). La curva *a* muestra la adición de mitocondrias al medio en forma simultánea con el otobafenol. Esta curva presenta dos fases en la caída de absorbancia y es parecida a la curva *d* en la figura 1. La traza punteada *e* es el comportamiento de la absorbancia cuando el otobafenol está incubado sin mitocondrias. En la curva *b* las mitocondrias fueron adicionadas en el instante en que la absorbancia originada por la agregación de sólo el otobafenol alcanza un máximo. Esta curva muestra una caída de absorbancia, pero con la segunda fase queda ya más cerca de la primera. En la curva *c* las mitocondrias fueron adicionadas en la etapa final de agregación propia del otobafenol incubado en el medio MSHPS durante veinte a veinticinco minutos. En este último caso no se observó la caída brusca de la absorbancia de la suspensión mitocondrial; además, las mitocondrias adicionadas en esta etapa de agregación del otobafenol fueron más resistentes a la inducción de la permeabilidad mitocondrial por el prooxidante *t*-BuOOH (figura 3c), comparado con el efecto del *t*-BuOOH en ausencia del otobafenol (figura 3d).

La figura 4 muestra cómo cambia el efecto del otobafenol en las mitocondrias con alteraciones en la concentración del mismo. Aquí, diferentes concentraciones de otobafenol se adicionaban un minuto después de las mitocondrias. Estas curvas muestran

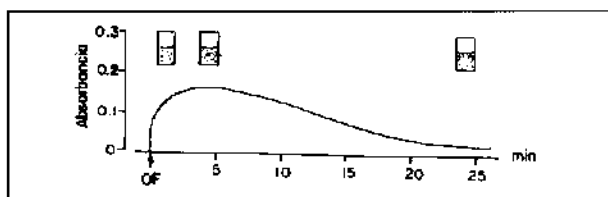


Figura 2. El cambio de absorbancia de sólo el otobafenol en el medio MSHPS. El otobafenol (OF) fue agregado en la concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$; los dibujos de la parte superior representan la observación visual de la formación de agregados en la cubeta. Inicialmente se observa una opalescencia; cuando la absorbancia es máxima se ven pequeños agregados y finalmente grandes agregados

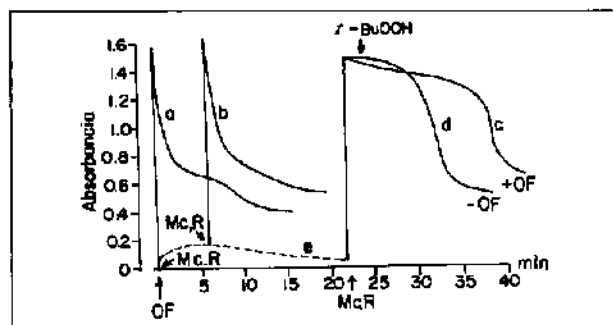


Figura 3. Los cambios de absorbancia por la adición de mitocondrias en las diferentes etapas de agregación del otobafenol en el medio MSHPS. Donde se indica, se ha agregado mitocondrias (Mc), 0.5 mg de proteína/ml, más 2.5 μM rotenona (R) en el medio MSHPS con 100 $\mu\text{g/ml}$ de otobafenol (OF). *a*: mitocondrias y rotenona fueron agregadas en forma simultánea con el otobafenol; *b*: mitocondrias y rotenona fueron agregadas en la segunda etapa de agregación del otobafenol; *c*: mitocondrias y rotenona fueron agregadas en la tercera etapa de agregación del otobafenol y en dos minutos se adicionaron 300 μM -*t*-BuOOH; *d*: mitocondrias y rotenona fueron agregadas en MSHPS sin otobafenol y en dos minutos se adicionaron 300 μM -*t*-BuOOH

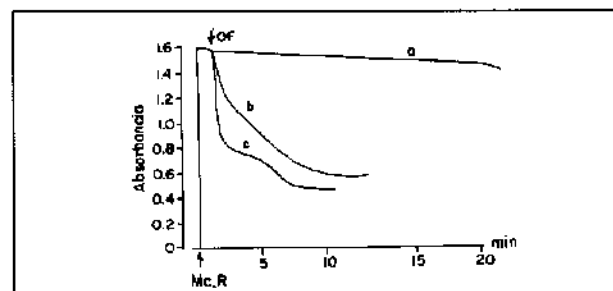


Figura 4. Los cambios en la absorbancia de suspensión de mitocondrias causados por diferentes concentraciones del otobafenol (OF). Mitocondrias (Mc), 0.5 mg de proteína/ml y 2.5 μM rotenona (R) se han agregado en el medio MSHPS. *a*: 10 $\mu\text{g/ml}$ de otobafenol; *b*: 30 $\mu\text{g/ml}$ de otobafenol; *c*: 100 $\mu\text{g/ml}$ de otobafenol

dos distintos efectos del otobafenol, dependientes de la concentración. Se observa una caída en la absorbancia que se retarda a medida que la concentración del otobafenol disminuye, mostrando dos fases para las concentraciones 100 $\mu\text{g/ml}$ (figura 4c) y 30 $\mu\text{g/ml}$ (figura 4b), pero no se observa la caída en la absorbancia de la suspensión mitocondrial a una concentración del otobafenol de 10 $\mu\text{g/ml}$ (figura 4a).

La figura 5 muestra el carácter protector del otobafenol con una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ sobre la

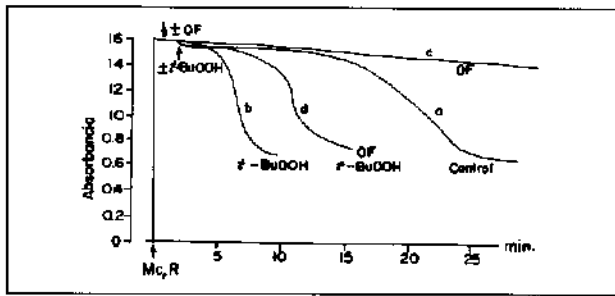


Figura 5. Los cambios de absorbancia de la suspensión mitocondrial, inducidos por *t*-BuOOH y otobafenol (OF). Mitocondrias (Mc), 0.5 mg de proteína/ml y 2.5 µM rotenona (R) se han agregado en el medio MSHPS. *a*: control (sin otobafenol y sin *t*-BuOOH); *b*: 300 µM *t*-BuOOH; *c*: 10 µg/ml de OF; *d*: 10 µg/ml de otobafenol más 300 µM *t*-BuOOH

permeabilización de mitocondrias por el prooxidante *t*-BuOOH. La curva *a* es el control (sin otobafenol y sin *t*-BuOOH). La curva *b* muestra que el prooxidante acelera significativamente el hinchamiento de mitocondrias. La curva *c* corresponde al efecto de 10 µg/ml de otobafenol en ausencia del prooxidante *t*-BuOOH y muestra que el otobafenol en este caso evita la permeabilización durante todo el tiempo que se mide la absorbancia. La curva *d* muestra que el otobafenol retarda el proceso de hinchamiento inducido por el prooxidante *t*-BuOOH.

Aparte de la observación visual de agregados, tal como se menciona al referirse a la figura 2, se visualizó también esta formación al microscopio (resultados no mostrados). Por ello se desarrolla a continuación un modelo físico que permite hacer una interpretación cualitativa de los cambios de absorbancia, su aumento y su disminución, debido a la agregación.

La ley de Beer-Lambert sólo considera la absorción como criterio de absorbancia, absorbancia que se obtiene tomando la partícula como un disco opaco cuya área representa la sección transversal efectiva σ_{ab} , "vista" por un fotón de frecuencia n . Si la frecuencia de la luz está lejos de la resonancia, el área es aproximadamente cero, y si n está cerca, el área es máxima. La energía absorbida por la partícula se toma igual a la energía que incide sobre un área σ_{ab} . Sin embargo, cuando las partículas aumentan paulatinamente su tamaño, además de la absor-

ción, la dispersión de la luz por las partículas también contribuye a la transmitancia (o absorbancia). Cuando las dimensiones de la partícula son del orden de la longitud de onda o mayores, la difracción, las sombras y otros fenómenos de óptica geométrica pasan a ser importantes en la transmitancia de la luz.

Un primer acercamiento al problema de la agregación utiliza la teoría de dispersión de Rayleigh y Gans y el fenómeno de sombras. Para partículas no absorbentes, de radio a , el coeficiente de exclusión $Q = \sigma/\pi a^2 = \sigma_{sc}/\pi a^2$ es (Van de Hulst, 1981):

$$Q = \begin{cases} \frac{4}{3} x^4 |\bar{n}^2 - 1|^2 & x \ll 1 \wedge \rho \ll 1 \\ 2x^2 (\bar{n} - 1)^2 & x \gg 1 \wedge \rho \ll 1 \\ 2 & x \gg 1 \wedge \rho \gg 1 \end{cases} \quad (1)$$

Donde $x = ka$, $r = 2x(\bar{n} - 1)$ y \bar{n} es el índice de refracción complejo de las partículas cuyo módulo es cercano a 1.

La sección eficaz de dispersión obtenida, en cm^2 , en términos del volumen de los agregados, es entonces:

$$\sigma = \begin{cases} \frac{3}{4\pi} k^4 |\bar{n}^2 - 1|^2 V^2 & V \ll 10^{-13} \text{ cm}^3 \\ \frac{3}{2} \sqrt{\frac{3}{4\pi}} k^2 (\bar{n} - 1)^2 V^{4/3} & V \approx 10^{-13} \text{ cm}^3 \\ \sqrt{\frac{9\pi}{2}} V^{2/3} & V \gg 10^{-13} \text{ cm}^3 \end{cases} \quad (2)$$

Donde la longitud de onda $\lambda = 540 \text{ nm}$ se utilizó para calcular el rango de validez señalado en la fórmula anterior.

El proceso de agregación consiste en que si inicialmente hay N_0 partículas por unidad de volumen, cada una de volumen V_0 , ellas se agrupan formando agregados de volumen V mayor que V_0 y disminuyendo aparentemente el número de partículas a un número N menor que N_0 .

La sección eficaz de exclusión total por unidad de volumen de solución con N agregados de partículas dispersoras en el medio es $N\sigma$, que no es otro que el denominado coeficiente de absorción del medio.

$$\gamma = N\sigma \quad (3)$$

La "absorción" considerada así no es más que el efecto de la dispersión en todas direcciones y posiblemente la absorción dentro de los agregados de partículas dispersoras.

Los resultados se mantienen independientemente del estado de polarización de la luz siempre y cuando las partículas sean esféricas y homogéneas y que las distancias entre ellas sean grandes comparadas con la longitud de onda (muy baja concentración).

La intensidad de la luz incidente I_0 decrece a medida que hace su recorrido dentro de la solución. Según la ley de Beer-Lambert, la intensidad I , después de un recorrido x , se puede escribir como:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\gamma x} \quad (4)$$

Por tanto la absorbancia en un recorrido de la luz en una distancia d es:

$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0} = N\sigma d \quad (5)$$

El comportamiento de la absorbancia de una concentración pequeña y constante de partículas en el medio depende del producto instantáneo del número de partículas por unidad de volumen de la solución y de la sección eficaz de exclusión de una partícula.

Considerando que el producto NV permanece constante ($NV = N_0V_0$) en cualquier instante del proceso de agregación, entonces $N\sigma$ se puede escribir como:

$$N\sigma = \begin{cases} \frac{3N_0V_0k^4}{4\pi} |\bar{n}^2 - 1|^2 V & V \ll 10^{-13} \text{ cm}^3 \\ \frac{3}{2} \sqrt{\frac{3}{4\pi}} N_0V_0k^2 (\bar{n} - 1)^2 V^{1/3} & V = 10^{-13} \text{ cm}^3 \\ \sqrt[3]{\frac{9\pi}{2}} N_0V_0V^{-1/3} & V \gg 10^{-13} \text{ cm}^3 \end{cases} \quad (6)$$

Si el volumen inicial de cada molécula del otobafenol, con peso molecular 326 g/mol y densidad media aproximadamente 1.0 g/cm³, es 5.4x10⁻²² cm³, y si inicialmente se tiene una concentración de

25 μM, entonces $N_0 = 1.5 \times 10^{16}$ moléculas/cm³ y el producto N_0V_0 será igual a 7.8x10⁻⁶.

La figura 6 muestra el comportamiento de la sección eficaz de exclusión total como función del volumen (ecuación 6) con los valores: $N_0V_0 = 7.8 \times 10^{-6}$, $\lambda = 540$ nm ($k = 2\pi/\lambda$) y módulo de $\bar{n} = 1.4$. El resultado de la simulación determina el comportamiento asintótico de la absorbancia para los casos de muy pequeños y muy grandes agregados.

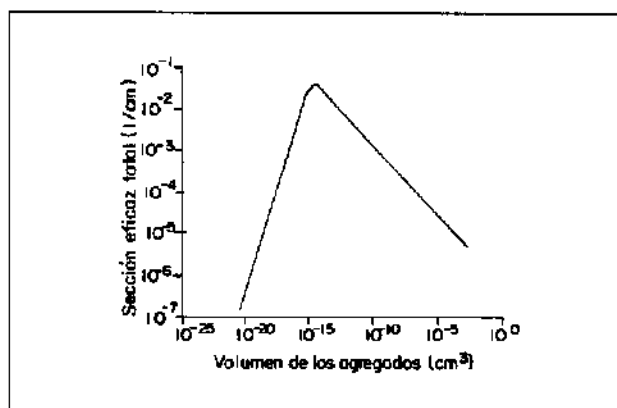


Figura 6. Simulación de la absorbancia como una función del volumen de las partículas crecidas de una cierta cantidad de moléculas que se encuentra en el sistema. La figura muestra la tendencia de la absorbancia (proporcional al coeficiente de extinción total por unidad de volumen), utilizando la dispersión de Rayleigh y Gans (curva ascendente) y el fenómeno óptico de sombras (curva descendente)

La forma de la curva de absorbancia al disolverse el otobafenol en el medio de incubación (figura 2), puede entenderse (basados en el modelo físico antes descrito) si se considera que los agregados de partículas inicialmente cumplen la condición de Rayleigh y Gans, aumentando la absorbancia, hasta que alcanzan un volumen del orden de 10⁻¹³ cm³ en muy corto tiempo. De ahí en adelante la sección eficaz de exclusión total disminuye con el aumento de volumen de los agregados, disminuyendo la absorbancia a medida que transcurre el tiempo.

DISCUSIÓN

Clásicamente el monitoreo de cambios en los volúmenes de organelas celulares se ha realizado registrando los cambios en la absorbancia de las suspensiones (Cleland, 1952). En el caso de las sus-

pensiones mitocondriales, el hinchamiento de las mitocondrias va acompañado de un aumento del volumen de la matriz mitocondrial que permite mayor transmitancia de la luz y por ende se registra una caída en la absorbancia de las muestras. En el presente trabajo se utilizó la absorbancia para el monitoreo del hinchamiento mitocondrial.

Se conoce que el prooxidante clásico *t*-BuOOH induce el aumento de permeabilidad de la membrana interna mitocondrial debido a la apertura de un "poro" (Novgorodov *et al.*, 1991). En la figura 1 el comportamiento de las curvas *a*, *b* y *c* corresponden a las típicas curvas de hinchamiento mitocondrial, a la aceleración de hinchamiento por el estrés oxidativo inducido por *t*-BuOOH y al efecto protector del antioxidante clásico BHT, reportadas en la literatura (Novgorodov *et al.*, 1991; Gudz *et al.*, 1997). La curva *d* (figura 1), en cambio, no corresponde a este tipo de curvas, debido a una brusca caída de absorbancia y la forma de dos fases. Además, la ciclosporina A, que es un inhibidor específico de la permeabilización de mitocondrias, no evitaba el efecto de la caída brusca de absorbancia causada por el otobafenol añadido a la suspensión mitocondrial (no se presentan los datos). Esto indica que la caída en la absorbancia de esa curva *d* no se debe a un aumento en la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial que conlleve al hinchamiento de las mitocondrias. Lo más evidente es que estos cambios en absorbancia eran el resultado de agregación de mitocondrias, lo que se observó visualmente y con microscopio óptico. También se confirmó la agregación del otobafenol en el medio acuoso sin mitocondrias, generando cambios en la absorbancia, que deben tenerse en cuenta en adelante.

Adicionando mitocondrias en distintas etapas de agregación del otobafenol en el medio MSHPS, se observaban las distintas curvas del cambio de absorbancia (figura 3). La curva *a* puede interpretarse de la siguiente forma: la caída inicial corresponde predominantemente a agregados de mitocondrias con el otobafenol como adherente. Estos agregados de mitocondrias tienen ya un tamaño de partículas cuando se forman, produciendo una caída fuerte en la absorbancia. La segunda fase mostrada en la curva

a se forma cuando la agregación mitocondrial prácticamente ha finalizado y la agregación de otobafenol que todavía continúa está produciendo un descenso en su absorbancia parecido al descenso que se muestra en la figura 2. Al adicionar las mitocondrias en la etapa intermedia de agregación del otobafenol, prácticamente desaparece la segunda fase observada en la curva *a* (figura 3), porque la segunda fase ya está más cerca de la primera. En la curva *c* (figura 3) se registra una protección de las mitocondrias contra la permeabilización causada por *t*-BuOOH, en presencia de agregados de otobafenol formados durante veinte a veinticinco minutos de incubación sin mitocondrias. Una posible explicación de la propiedad protectora es que en esta etapa en la que se han formado grandes agregados del otobafenol en el medio, se mantiene una mínima cantidad de este otobafenol que es libre de sus agregados y suficiente para exhibir el carácter protector contra la permeabilidad de mitocondrias causada por el prooxidante *t*-BuOOH. Esta interpretación fue adicionalmente confirmada utilizando el otobafenol en concentración de 10 µg/ml, que es suficientemente baja para que el otobafenol no presente cambios significativos en absorbancia por sí mismo y no cause agregación de mitocondrias (figura 4). Esta baja concentración de otobafenol es apropiada para mostrar el efecto protector de esta sustancia contra la permeabilización mitocondrial espontánea (figura 4), o inducida por el prooxidante *t*-BuOOH (figura 5).

Se pudo concluir que el otobafenol, en concentración de 10 µg/ml, extraído de las hojas de *Virola aff. pavonis*, presenta un carácter protector contra la permeabilización mitocondrial inducida por el prooxidante *t*-BuOOH. La suspensión de los agregados de esta sustancia natural, formados a partir de concentraciones del otobafenol relativamente grandes (más que 30 µg/ml), muestra también el efecto protector y se supone que puede tener varias aplicaciones prácticas en medicina como un "búfer antioxidante".

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación fue financiada por Ciencias, proyecto 1118-05-261-97 para la Universidad Nacional de Colombia (sede Medellín).

REFERENCIAS

- Bennett BC, Alarcón R. 1994. *Osteophloeum platyspermum* and *Virola duckey* (Myristicaceae): Newly reported as hallucinogens from Amazonian Ecuador. *Econ Bot* 48(20):152-158.
- Cleland KW. 1952. Permeability of isolated rat heart sarcosomes. *Nature* 170:497-499.
- Duggal SP, Kartha ARS. 1956. Antioxidants for edible oils and fats from seeds of indigenous *Myristica* species. *Indian J Agric Sci* 26(4):391-399.
- Gornall AG, Barbawill CJ, David MM. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177:751-766.
- Gudz T, Eriksson O, Kushnareva Y, Saris NE, Novgorodov S. 1997. Effect of butylhydroxytoluene and related compounds on permeability of the inner mitochondrial membrane. *Arch Biochem Biophys* 342 (1):143-156.
- Lemeshko VV. 2001. Failure of exogenous NADH and cytochrome c to support energy-dependent swelling of mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 388(1):60-66.
- Martínez JC, Torres R. 1997. Lignans from *Virola* aff. *pavonis* leaves. *Phytochemistry* 44(6):1179-1182.
- Nogorodov SA, Gudz TI, Kushnareva YE, Zorov DB, Kudrjashov YB. 1990. Effect of cyclosporine A and oligomycin on non-specific permeability of the inner mitochondrial membrane. *FEBS Lett* 270:108-110.
- Nogorodov SA, Gudz TI, Kushnareva YE, Roginsky VA, Kudrjashov YB. 1991. Mechanism accounting for the induction of non-specific permeability of the inner mitochondrial membrane by hydroperoxides. *Biochem Biophys Acta* 1058(2):242-248.
- Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. 1998. Mitochondria as regulator of apoptosis: Doubt no more. *Biochem Biophys Acta* 1366:151-165.
- Van de Hulst HC. 1981. *Light scattering by small particles*. Dover Publications, Inc. New York.
- Vercesi AE, Kowaltowski AI, Grijalba MT, Meinicke AR, Castilho RF. 1997. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability. *Bioscience Report* 17(1):43-52.
- Zoratti M, Szabó I. 1995. The mitochondrial permeability transition. *Biochem Biophys Acta* 1241:139-176.