

# EFECTO DEL LINALOOL SOBRE LA BIOENERGÉTICA DE MITOCONDRIAS DE HÍGADO DE RATA

## LINALOOL EFFECT ON MITOCHONDRIAL BIOENERGETICS RAT LIVER

Yenny BUENO-DUARTE, PhD<sup>1</sup>, Stelia Carolina MENDEZ-SÁNCHEZ<sup>1,\*</sup>, PhD.

Recibido: Junio 13 de 2014. Aceptado: Mayo 4 de 2015.

### RESUMEN

**Antecedentes:** El linalool (2,6-dimetil-2,7-octadien-6-ol) es un monoterpeno presente en más de 200 tipos de plantas, y constituye el componente mayoritario de varios aceites esenciales. El linalool posee una amplia variedad de potenciales propiedades farmacológicas; que van desde propiedades antisépticas, ansiolíticas, anti-inflamatorias, antifúngicas, antimicrobianas y proapoptóticas en diferentes líneas de células tumorales. Sin embargo, su principal uso está relacionado como una molécula odorante o fragancia en productos de uso tópico en productos cosméticos y en la industria del perfume. **Objetivo:** En este estudio se evaluó el efecto del linalool sobre la bioenergética de mitocondrias aisladas de hígado de rata. **Métodos:** El linalool en concentraciones entre (5-100 µg/mL) fue evaluado en mitocondrias aisladas de ratas machos albinas raza Wistar, de acuerdo al método descrito por Voss *et al* (1961). Inicialmente, se determinó el consumo de oxígeno en mitocondrias intactas mediante un método polarográfico por medio de un oxígrafo. Posteriormente, se determinó el efecto del compuesto sobre las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial usando métodos polarográficos y espectrofotométricos. **Resultados:** Los resultados obtenidos indican que el linalool en las concentraciones de 5, 10, 50 y 100 µg/mL, afecta la velocidad de consumo de oxígeno en el estado 3 y 4 de mitocondrias energizadas con glutamato-malato y succinato. Sin embargo, el efecto inhibitorio es mayor al usar glutamato-malato como sustrato. Por su parte, el análisis de la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial mostró que el linalool (50 µg/mL) inhibe los complejos I, III y la actividad ATPasa. **Conclusiones:** El linalool inhibe el complejo I, complejo III y la ATPasa, esta inhibición podría aumentar la generación de especies reactivas de oxígeno.

**Palabras clave:** Linalool, mitocondria, enzimas, consumo de oxígeno.

### ABSTRACT

**Background:** The linalool (2,6-dimethyl-2,7-octadiene-6-ol) is a monoterpene present in more than 200 types of plants, and it is the major component of several essential oils. The linalool has a wide range of potential pharmacological properties, such as antiseptic, anxiolytic, anti-inflammatory, antifungal, antimicrobial and proapoptotic in different tumor cell lines. However, its primary use is associated as

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga A.A. 678, Colombia.

\* Corresponding author: [scmendez@uis.edu.co](mailto:scmendez@uis.edu.co).

an odorant molecule or fragrance in topical products, in cosmetics products and fragrance industry. **Objective:** In this study the effect of linalool on the bioenergetics of isolated rat liver mitochondria was evaluated. **Methods:** Linalool in concentrations between (5-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was evaluated in isolated mitochondria of male albino Wistar rats, according to the method described by Voss et al (1961). Initially, the oxygen consumption by intact mitochondria was determined by polarographic method using an oxygraph. Subsequently, the effect of the compound on mitochondrial respiratory chain enzymes was evaluated, by using polarographic and spectrophotometric methods. **Results:** The results obtained indicated that linalool, at concentrations of 5, 10, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , affects the rate of oxygen consumption in state 3 and 4 of mitochondria energized with glutamate-malate and succinate. However, the inhibitory effect was greater when using glutamate-malate as substrate. For its part, the analysis of the enzyme activities of the mitochondrial respiratory chain showed that linalool (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) inhibits complex I, III, and ATPase activity. **Conclusions:** linalool inhibits complex I, complex III and ATPase, this inhibition could increase the generation of reactive oxygen species.

**Keywords:** Linalool, mitochondria, enzymes, oxygen consumption.

## INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, los humanos han dependido de la naturaleza, especialmente de plantas, para el tratamiento de un amplio espectro de enfermedades. Posteriormente, los avances en el conocimiento científico llevaron al desarrollo de compuestos bioactivos puros (productos naturales (PN)), que podrían ser aislados a partir de plantas; lo que con el tiempo permitió que la investigación química, farmacéutica y los avances en la química sintética, sirvieran para el desarrollo de compuestos semi-sintéticos y sintéticos con propiedades farmacológicas mejoradas” (1). A pesar del crecimiento explosivo de los medicamentos de síntesis química durante los años 1980 y 1990, los PN siguen siendo una valiosa fuente de nuevos fármacos (2-4).

Se han identificado cientos de compuestos presentes en plantas medicinales, entre ellos se destacan los alcaloides, polifenoles, saponinas y terpenos. Estos metabolitos han sido relacionados con actividad antiproliferativa y antimetastásica en varios tipos de cáncer, tanto *in vitro* como *in vivo* (5-7). Por su parte, los terpenos despiertan especial interés por sus propiedades antitumorales. Se ha establecido que actúan en las células cancerígenas, induciendo apoptosis por activación de caspasas, disminución de los niveles de proteína anti-apoptótica Bcl-2 y al activar la proteína apoptótica Bax, por estimulación del sensor de daño al ADN p53. La activación de Bax se genera por la activación de la caspasa 8 que hidroliza a Bid (tBid), el cual se desplaza a la mitocondria donde interactúa con Bax lo cual resulta muy interesante, al tener en cuenta que la mayoría de los tumores malignos presentan p53 mutante.

Por tanto, la capacidad de los terpenos para inducir la muerte celular programada, es de gran interés oncológico (8-10).

El linalool (2,6-dimetil-2,7-octadien-6-ol) es un monoterpeno que se encuentra en los aceites esenciales de más de 200 plantas; incluyendo lavanda (*lavanda officinalis*), semillas de cilantro (*Coriandrum sativum*) y albahaca (*Ocimum basilicum*), el linalool es el principal constituyente de los aceites de palo de rosa y aceite de hortensia con el 90 y 80% respectivamente (11-13). Actualmente, se usa en jabones, aceites, productos tópicos (14) y es uno de los productos químicos más usados en los productos cosméticos y la industria del perfume (15). Este monoterpeno ha mostrado fuerte actividad antimicrobial contra bacterias periodontopáticas y cariogénicas (16), actividad antifúngica (17), propiedades ansiolíticas y anti-inflamatorias (14).

En cuanto a su actividad antitumoral, se ha reportado que monoterpenos como el linalool en concentraciones entre 10-400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , desestabilizan la membrana y modulan funciones asociadas con la membrana, como permeabilidad y señalización celular; permitiendo así la muerte celular (18). Este monoterpeno ha mostrado citotoxicidad en células HeLa (19) y un estudio realizado por Miyashita y Sadzuka en 2013 (20), mostró que el linalool mejora la acción antitumoral de la doxorubicina, lo cual indica que el linalool podría ser un efectivo modulador de este antibiótico.

Del mismo modo, se ha establecido que el linalool en altas concentraciones (650 $\mu\text{M}$ ) presenta actividad antitumoral en células de leucemia *in vitro*. A pesar de la limitación farmacológica debida

a las altas dosis requeridas, la estructura química del linalool puede ser modificada y optimizada, lo que sugiere que el linalool puede ser fuente de potenciales compuestos antitumorales. Por otro lado, se ha establecido que las células de leucemia noproliferantes son resistentes a los agentes tóxicos convencionales; en el estudio realizado por Gu y colaboradores se ha determinado que el linalool en concentraciones inofensivas para las células normales ( $130\mu\text{M}$ ) disminuye la proporción de células Go/G1 (21). Otros estudios indican que el tratamiento con linalool desencadena apoptosis, a través de la activación de p53 y activación de inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDKIs) (22, 23).

Igualmente, el tratamiento con linalool sobre células de hepatoma humano (HepG2) mostró que este terpeno permea la membrana, difunde hasta las mitocondrias y disminuye la viabilidad de estas células tumorales. Usta y colaboradores sugieren que la inducción de muerte celular podría ser producto del efecto del metabolito sobre la bioenergética mitocondrial; al establecer que el linalool inhibe los complejos mitocondriales I y II, disminuye los niveles de ATP, incrementa los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) y disminuye los niveles de glutatión (GSH) (15).

En células eucariotas se ha establecido que los aceites esenciales pueden provocar despolarización de la membrana mitocondrial, debido a la disminución del potencial de membrana, afectando los canales iónicos de  $\text{Ca}^{2+}$ , otros canales y reduciendo el gradiente de  $\text{H}^+$ . Esos cambios en la fluidez de membranas desencadena fugas de los radicales libres, el citocromo  $c$ , calcio, otros iones, proteínas y fallas en la bioenergética mitocondrial que conducen a la muerte celular por apoptosis y necrosis (18).

El amplio uso del linalool en productos de uso tópico en la industria cosmética, alto porcentaje de linalool en varios aceites esenciales, y el efecto apoptótico de éstos mediante su acción sobre la mitocondria, demuestra la importancia de estudiar el efecto del linalool sobre la bioenergética mitocondrial. Por ello, en este trabajo se evaluó el efecto del linalool sobre parámetros propios de la bioenergética mitocondrial, específicamente sobre las velocidades de consumo de oxígeno y sobre las enzimas que forman la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Ratas machos albinas de raza wistar WI IOPS AF/Han, de peso aproximado entre 180–210 gramos, fueron obtenidas del Bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander. Los animales fueron sometidos a ayuno durante 12 horas y sacrificados por decapitación, bajo las disposiciones de la ley 84 de 1989 de investigación con animales y con aval del Comité de ética en investigación científica de la Universidad Industrial de Santander, acta 28 de 2014.

### Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata

Mitocondrias de hígado de rata fueron aisladas de acuerdo al procedimiento descrito por Voss *et al* (1961) (24) con algunas modificaciones, utilizándose como medio de aislamiento: D-manitol  $250\text{ mmol.L}^{-1}$ , HEPES  $10\text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7.2, EGTA  $1\text{ mmol.L}^{-1}$  y BSA 0.1 g% (Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA). El hígado fue inmediatamente retirado e inmerso en medio de extracción helado. Después de lavado, el órgano fue cortado y homogenizado mediante un homogenizador Van Potter Elvehjen. La suspensión obtenida fue centrifugada a  $320\times g$  a  $4^\circ\text{C}$  durante 5 minutos, para eliminación de células intactas, membranas y núcleos. El sedimento fue descartado y el sobrenadante centrifugado a  $12600\times g$  durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . El precipitado obtenido, constituido de mitocondrias intactas, fue resuspendido, lavado dos veces en medio de extracción por centrifugación a  $8100\times g$  durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Las mitocondrias obtenidas fueron resuspendidas en medio de extracción y mantenidas a  $4^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

### Determinación de la concentración de proteínas mitocondriales

La cuantificación de proteínas fue determinada espectrofotométricamente por el método descrito por Bradford *et al* (1976) (25) a  $595\text{ nm}$ , usándose albumina de suero bovino como patrón.

### Determinación del consumo de oxígeno

Se usaron mitocondrias de hígado de rata aisladas tal como se describió anteriormente. El medio de incubación estaba compuesto de: HEPES  $10\text{ mmol.L}^{-1}$  (pH 7.4), EGTA  $0.1\text{ mmol.L}^{-1}$ , manitol  $125\text{ mmol.L}^{-1}$ , KCl  $65\text{ mmol.L}^{-1}$  y suplementadas

con glutamato de sodio 5 mmol.L<sup>-1</sup> o succinato de sodio 3 mmol.L<sup>-1</sup>, Pi 1.6 mmol.L<sup>-1</sup> e ADP 0.6 mmol.L<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA). El linalool (97% v/v) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) fue el metabolito analizado y se adicionó en diferentes concentraciones (5, 10, 50 y 100 µg/mL), cada solución fue incubada durante dos minutos a temperatura ambiente, con la proteína mitocondrial antes de inducir la respiración mitocondrial.

Los experimentos fueron realizados bajo agitación constante en cámara termostaticada a 28°C (24). El consumo de oxígeno por las mitocondrias intactas fue determinado polarográficamente por medio de un oxígrafo, utilizando un electrodo tipo Clark, acoplado a un registrador. Los resultados fueron expresados en nmol de O<sub>2</sub> consumido. min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína considerándose la solubilidad del oxígeno en agua a la temperatura usada y a 1 atm (26).

### **Preparación de la suspensión de mitocondrias para la determinación de la actividad de las enzimas mitocondriales**

Las mitocondrias aisladas fueron congeladas a -70°C, fragmentadas en ultrasonido por diez minutos a temperatura ambiente, y mantenidas en baño de hielo hasta la realización de las pruebas enzimáticas. Los fragmentos de membrana de la mitocondria fueron usados como fuente de enzimas.

### **Determinación de la actividad de las enzimas relacionadas con la cadena respiratoria mitocondrial**

La actividad enzimática de la *NADH* y *succinato Oxidasa* fueron determinadas polarográficamente (27), la actividad de la *NADH*-deshidrogenasa (*NADH*: ubiquinona oxidoreductasa) y *succinato* deshidrogenasa fueron establecidas espectrofotométricamente de acuerdo al método descrito por Singer (1974) (27). La actividad de la *NADH* citocromo *c* reductasa (*NADH*: citocromo *c* oxidoreductasa) y *succinato* citocromo *c* reductasa (*succinato*: citocromo *c* oxidoreductasa) fueron medidas por reducción del citocromo *c* a 550nm tal como lo descrito por Somlo (28). La actividad del citocromo *c* oxidasa fue determinada a 550nm, de acuerdo a la metodo-

logía descrita por Mason y colaboradores (29). La actividad de la ATPasa en mitocondrias íntegras y fragmentadas fue evaluada de acuerdo a la metodología descrita por Pulmann y colaboradores (30). El fosfato inorgánico fue tomado del sobrenadante de la reacción siguiendo el método de Summer (1944) (31), y los resultados son expresados como nmol de Pi liberado por mg de proteína. La actividad ATPasa de mitocondrias íntegras fue realizada a temperatura ambiente en presencia y ausencia de carbonil cianida-4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona FCCP (1µmol).

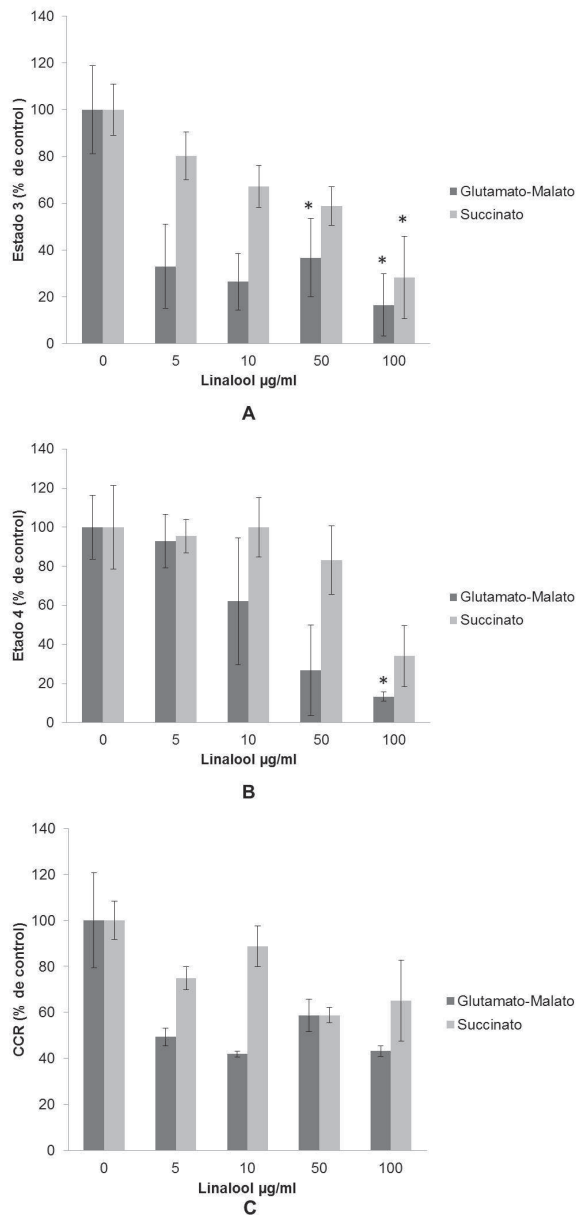
### **Análisis estadístico**

Los datos son presentados como la media ± D. E (desviación estándar). El análisis estadístico de los datos fue realizado como un análisis de varianza de una vía, seguida por el test de Tuckey de comparaciones múltiples para la comparación de promedios. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos cuando  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### **Efecto del linalool en el consumo de oxígeno mitocondrial**

Con el objetivo de conocer el efecto del *linalool* sobre la función mitocondrial, se usaron mitocondrias aisladas de hígado de rata para evaluar el consumo de oxígeno al adicionar ADP (estado 3), al consumirse el ADP (estado 4) en presencia de *linalool* (5, 10, 50 y 100 µg/mL) y el coeficiente de control respiratorio (CCR). Las figuras 1A, 1B y 1C muestran el efecto del *linalool* en los parámetros descritos, con el glutamato o succinato como sustratos oxidables, con el glutamato, el estado 3 de la cadena respiratoria fue inhibida en aproximadamente 67, 74, 63 y 89% y con succinato en aproximadamente 20, 31, 41 y 71% (Figura 1A) en presencia de 5, 10, 50 y 100 µg/mL de *linalool* respectivamente. Estos resultados no muestran una disminución lineal del consumo de oxígeno dependiente de la concentración, en presencia de Glutamato-Malato, en donde el estado 3 se inhibe drásticamente desde la menor concentración evaluada.



**Figura 1.** Efecto del linalool en el consumo de oxígeno usando como sustratos glutamato-malato y succinato. (A) Velocidad de consumo de oxígeno en el estado 3, la actividad del 100% para glutamato-malato y succinato corresponde a  $32,3 \pm 9,4$  y  $73,7 \pm 13,6$  nmol de  $O_2$  consumido  $min^{-1} mg^{-1}$  de proteína mitocondrial, respectivamente. (B) Velocidad de consumo de oxígeno en el estado 4, la actividad del 100% para glutamato-malato y succinato corresponde a  $6,5 \pm 1,9$  y  $24,6 \pm 8,2$  nmol de  $O_2$  consumido  $min^{-1} mg^{-1}$  de proteína mitocondrial, respectivamente. (C) Coeficiente de control respiratorio, la actividad del 100% para glutamato-malato y succinato corresponde a  $4,8 \pm 1,0$  y  $3,6 \pm 0,5$ , respectivamente. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* Resultados que presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto al control.

La velocidad del estado 4 (después del consumo de ADP) fue inhibida en aproximadamente 7,38, 73 y 87%, usando glutamato como sustrato; mientras que al usar succinato los porcentajes aproximados de inhibición fueron 5, 0, 17 y 66% (Figura 1B), en presencia de 5, 10, 50 y 100  $\mu g/mL$  de linalool, respectivamente. Los coeficientes de control respiratorio, usando glutamato como sustrato, presentaron una inhibición aproximada del 50% en todas las concentraciones. Por su parte, cuando el sustrato fue el succinato se presentaron diferentes variaciones del CCR, con porcentajes de inhibición entre el 11 y 41% (Figura 1C). Estos datos sugieren un efecto inhibitorio del linalool en la cadena respiratoria.

### Efecto del linalool en la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria.

Debido a la inhibición del linalool en el consumo de oxígeno, se estudiaron los efectos del linalool en la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria. En la Tabla 1 podemos observar que el linalool a una concentración de  $50 \mu g/mL$  presenta un efecto inhibitorio sobre la actividad de la NADH oxidasa y NADH deshidrogenasa en 49,1 y 36,9%, respectivamente. La succinato oxidasa, la NADH y succinato citocromo *c* reductasa fueron inhibidas en aproximadamente 57,6; 27,3 y 27,5%, respectivamente. El análisis de los complejos enzimáticos presentados muestra que el linalool inhibe la actividad de los complejos I y III. Por su parte, la actividad de la ATPasa en mitocondrias íntegras en presencia, ausencia de FCCP y en mitocondrias fragmentadas fue inhibida en aproximadamente 41, 16 y 12%, respectivamente (Tabla 2).

**Tabla 1.** Efecto de linalool en las enzimas de la cadena respiratoria.

ENZIMA	% de actividad con respecto al control
	Linalool 50ppm
NADH Oxidasa	50,9 $\pm$ 3,8*
NADH Deshidrogenasa	63,1 $\pm$ 2,1*
NADH Citocromo C Reductasa	72,7 $\pm$ 4,9*
Succinato Oxidasa	42,3 $\pm$ 14,5
Succinato Citocromo C Reductasa	72,5 $\pm$ 9,6*
Succinato Deshidrogenasa	95,1 $\pm$ 13,0
Citocromo C Oxidasa	94,8 $\pm$ 24,7

\*Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control  $p < 0,05$

Las condiciones experimentales fueron descritas en la sección de materiales y métodos. Los valores del control fueron del (100%) donde: NADH oxidasa:  $5,8 \pm 1,2$  nmol  $O_2$  consumido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial; NADH deshidrogenasa:  $0,47 \pm 0,11$   $\mu\text{mol}$  de ferrocianuro reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial; NADH Citocromo C reductasa:  $33,2$  nmol de Citocromo c reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial; Succinato Oxidasa:  $28,8 \pm 22,8$  nmol  $O_2$  consumido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial; Succinato Citocromo C Reductasa:  $386,4 \pm 13,0$  nmol de Citocromo c reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial; Succinato Deshidrogenasa:  $83,3 \pm 21,9$  nmol de DCIP reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial; Citocromo C Oxidasa:  $39,8 \pm 0,08$  nmol de Citocromo c oxidado  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial. Los resultados se expresan como % de actividad con respecto al control (100%) (media  $\pm$  D.E) de tres experimentos independientes con tres réplicas cada uno. \* Indica que las diferencias son estadísticamente significativas,  $p < 0,05$ .

**Tabla 2.** Efecto del linalool en la actividad ATPasa.

ENZIMA	% de actividad con respecto al control		
	Linalool 50ppm	FCCP	FCCP y
			Linalool 50ppm
ATP asa en mitocondrias íntegras	84,1 $\pm$ 13,4	203,6 $\pm$ 25,3	58,9 $\pm$ 8,6*
ATP asa en mitocondrias fragmentadas	87,6 $\pm$ 8,6*	-	-

\*Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control  $p < 0,05$

Los valores del control (100%) para el ensayo en mitocondrias íntegras fue  $178,2 \pm 30$  nmol de Pi liberado por  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, en mitocondrias fragmentadas fue  $4,4 \pm 0,3$   $\mu\text{mol}$  de Pi liberado por  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína. Los resultados se presentan como % de actividad con respecto al control (100%) (media  $\pm$  D.E) de tres experimentos independientes con tres réplicas cada uno. \* Indica que las diferencias son estadísticamente significativas,  $p < 0,05$ .

## DISCUSIÓN

Los monoterpenos despiertan gran interés debido a su baja toxicidad, bajo precio y su amplio

rango de propiedades farmacológicas (32-35). Estudios recientes indican que el linalool presenta una potente actividad antitumoral y las evidencias obtenidas a partir de experimentos *in vitro* e *in vivo* sugieren que la inducción de estrés oxidativo puede ser el responsable de su actividad anticancerígena (36). Igualmente, se ha establecido que el linalool activa a la proteína supresora de tumores p53 y a algunos inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDKI) (13, 21). Los resultados obtenidos en ese estudio muestran que el linalool afecta la velocidad de consumo de oxígeno en el estado 3 y 4 de mitocondrias aisladas de hígado de rata, probablemente como producto de la inhibición que causa en los complejos I, III y la actividad ATPasa. Está bien establecido que el complejo I es uno de los sitios de acoplamiento donde ocurre la transferencia de electrones desde el NADH a la coenzima Q (ubiquinona), allí posteriormente son transferidos al complejo III donde son entregados al citocromo c y transferidos al complejo IV. La inhibición de los complejos I y III sugiere la disminución en el número de electrones trasladados a través de la membrana interna, con la consecuente disminución en el gradiente de protones; la disminución de la síntesis de ATP y finalmente el compromiso de la función mitocondrial. La consecuencia más importante en la inhibición del complejo I es el aumento de las especies reactivas de oxígeno, producto de la oxidación del NADH en la matriz mitocondrial (37). Lo anterior sumado a la disminución del gradiente de protones y la inhibición de la ATPasa, genera disminución de la síntesis de ATP, con la posible formación de proteínas disfuncionales, lo cual podría afectar la función mitocondrial, favorecer el envejecimiento celular y permitir la muerte celular (38, 39).

Al comparar estos resultados con los reportados por Usta y colaboradores en 2009; en cuyo trabajo mostraron la disminución en la viabilidad celular de células HepG2 mediada por el linalool e identificaron en la mitocondria posibles blancos de acción, al observar la inhibición de los complejos I y II de la cadena respiratoria, la disminución en la producción de ATP dependiente del tiempo y el aumento de las especies reactivas de oxígeno (15), se observa similitud en la inhibición del complejo I, pero discrepan en la inhibición del complejo II. La diferencia podría ser consecuencia del modelo experimental usado, puesto que en este trabajo se usaron mitocondrias normales extraídas de hígado

de rata y en el trabajo de Usta y colaboradores se usaron mitocondrias extraídas de células tumorales HepG2, que además se ha establecido que presentan una mutación puntual (14203delA) en el gen mitocondrial para una subunidad del complejo I (ND6) la cual es responsable de la acumulación celular de especies reactivas de oxígeno (ERO) (40). Adicionalmente, se observan diferencias en el método de evaluación de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria, en este trabajo se evaluó la actividad con cinéticas no mayores a tres minutos, mientras que en el trabajo de Usta y colaboradores (15) se evaluaron cinéticas de treinta minutos. Lo anterior implicaría que mayor tiempo de exposición del metabolito podría generar un mayor efecto sobre esta enzima, tal como se ha establecido con algunos medicamentos que aumentan su efecto al aumentar el tiempo de exposición (41).

Con los resultados del presente se contribuye con el entendimiento del mecanismo de acción de la actividad antitumoral mostrada por el linalool en diferentes líneas celulares cancerígenas (36). Se ha establecido que en las células tumorales la presencia de especies ERO es importante para generar las mutaciones necesarias para mantener el metabolismo aberrante. Sin embargo, altas concentraciones de ERO generan daño de macromoléculas, permeación de la mitocondria, liberación de citocromo  $c$  e inducción de apoptosis (42-44). El conocimiento de los complejos enzimáticos inhibidos y el aumento de las especies reactivas de oxígeno, podrían representar una potencial estrategia para atacar las células tumorales, al afectar el estrecho margen de capacidad oxidante adicional que pueden resistir estas células. Del mismo modo la proteína p53, corresponde a un gen supresor de tumores que detiene el ciclo celular en la fase G1/S o en la fase G2/M y se encuentra mutada en la mayoría de los tipos de cáncer (45-50). El potencial efecto del linalool en el aumento de las especies de reactivas de oxígeno y en la activación de la proteína p53 (13, 21) sugiere que el linalool podría ser un buen candidato como potencial droga antitumoral.

Los datos obtenidos muestran que a concentraciones mayores a 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  este metabolito puede afectar los complejos I, III y la ATPasa; y se ha establecido que deficiencias en el funcionamiento de estos complejos enzimáticos está asociados con varios síndromes clínicos como acidosis láctica, cardiomiopatía y cataratas (51-53). Igualmente, el aumento en las especies reactivas de oxígeno en la

mitocondria, producto de deficiencias en el complejo I y III se han relacionado con el desarrollo y empeoramiento de enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica y enfermedad de Huntington (39, 54-56). La fuerte relación que existe entre diversas enfermedades y deficiencias en el funcionamiento de complejos enzimáticos en la cadena respiratoria mitocondrial y el uso generalizado del linalool en la industria cosmética y del perfume (13, 35), indica la importancia de realizar estudios de absorción del linalool, con el objetivo de determinar la concentración adecuada que debe usarse en los diversos preparados cosméticos.

Cabe resaltar que los resultados aquí reportados contribuyen al conocimiento del mecanismo de acción del linalool a nivel celular, para concluir sobre el efecto del linalool *in vivo* es necesario realizar los estudios pertinentes.

Se concluye con este estudio que el linalool afecta la velocidad de consumo de oxígeno y la actividad enzimática de los complejos I, III y ATPasa. Estos resultados podrían contribuir en el entendimiento del mecanismo de acción en la actividad antitumoral mostrada por el linalool en diferentes líneas celulares. Por otro lado, estos resultados ponen de manifiesto la importancia de usar concentraciones bajas en los preparados cosméticos, teniendo en cuenta la fuerte relación que existe entre la inhibición de estos complejos enzimáticos y diversas enfermedades.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue soportado por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander, proyecto 5183 y por “Patrimonio Autónomo Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas, Contrato RC-0572-2012-Bio-Red-CENIVAM”.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de interés en relación a la originalidad del trabajo y el contenido del mismo.

## REFERENCIAS

1. Grothaus PG, Cragg GM, Newman DJ. Plant natural products in anticancer drug discovery. *Current Organic Chemistry*. 2010; 14 (16): 1781-1791.

2. Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnini M, Bausi L, Mini E, et al. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*. 2009; 59 (6): 365-378.
3. Nirmala J, Samundeeswari A, Sankar P. Natural plant resources in anti-cancer therapy-A review. *Research in Plant Biology*. 2011; 1 (3): 01-14.
4. Das B, Satyalakshmi G. Natural products based anticancer agents. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*. 2012; 9 (2): 169-177.
5. Jayakumar S, Madankumar A, Asokkumar S, Raghunandhakumar S, Gokula Dhas K, Kamaraj S, et al. Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Mol Cell Biochem*. 2012; 360 (1-2): 51-60.
6. Chidambara KN, Jayaprakasha GK, Patil BS. D-limonene rich volatile oil from blood oranges inhibits angiogenesis, metastasis and cell death in human colon cancer cells. *Life Sci*. 2012; 91 (11-12): 429-439.
7. Mesa AC, Montiel J, Zapata B, Durán C, Betancur L, Stashenko E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of colombian *lippia alba* (mill.) N.E. brown: Composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104 (6): 878-884.
8. Deb DD, Parimala G, Saravana Devi S, Chakraborty T. Effect of thymol on peripheral blood mononuclear cell PBMC and acute promyelocytic cancer cell line HL-60. *Chem Biol Interact*. 2011; 193 (1): 97-106.
9. Xia H, Liang W, Song Q, Chen X, Chen X, Hong J. The *in vitro* study of apoptosis in NB4 cell induced by citral. *Cytotechnology*. 2013; 65 (1): 49-57.
10. Wiart C. Lead Compounds from Medicinal Plants for the Treatment of Cancer Chapter 2 Terpenes. W Christophc; 2013.97-265.
11. Letizia CS, Cocchiara J, Lalko J and Api AM: Fragrance material review on linalool. *Food Chem Toxicol*. 2003; 41: 943-964.
12. Ravizza R, Gariboldi MB, Molteni R, Monti E. Linalool, a plant-derived monoterpene alcohol, reverses doxorubicin resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncol Rep*. 2008; 20 (3): 625-630.
13. Aprotosoaic AC, Hãncianu M, Costache I-, Miron A. Linalool: A review on a key odorant molecule with valuable biological properties. *Flavour Fragrance J*. 2014; 29(4): 193-219.
14. Miller SG, Pritts TA. Linalool: A novel natural anti-inflammatory agent?: commentary on "Anti-inflammatory effects of linalool in RAW 264.7 macrophages and lipopolysaccharide-induced lung injury model". *J. of Surg. Res*. 2013. 185(1): e69-e70.
15. Usta J, Kreydiyyeh S, Knio K, Barnabe P, Bou-Moughlabay Y, Dagher S. Linalool decreases HepG2 viability by inhibiting mitochondrial complexes I and II, increasing reactive oxygen species and decreasing ATP and GSH levels. *Chem Biol Interact*. 2009; 180 (1): 39-46.
16. Park S, Lim YK, Freire MO, Cho E, Jin D, Kook J. Antimicrobial effect of linalool and  $\alpha$ -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. *Anaerobe*. 2012; 18 (3): 369-372.
17. Belletti N, Kamdem SS, Tabanelli G, Lanciotti R, Gardini F. Modeling of combined effects of citral, linalool and  $\beta$ -pinene used against *saccharomyces cerevisiae* in citrus-based beverages subjected to a mild heat treatment. *Int J Food Microbiol*. 2010; 136 (3): 283-289.
18. Erdogan A, Ozkan A. A comparative study of cytotoxic, membrane and DNA damaging effects of *Origanum majorana*'s essential oil and its oxygenated monoterpene component linalool on parental and epirubicin-resistant H1299 cells. *Biologia (Poland)*. 2013; 68 (4): 754-761.
19. Liu K, Chen Q, Liu Y, Zhou X, Wang X. Isolation and biological activities of decanal, linalool, valencene, and octanal from sweet orange oil. *J Food Sci*. 2012; 77 (11): C1156-C1161.
20. Miyashita M, Sadzuka Y. Effect of linalool as a component of humulus lupulus on doxorubicin-induced antitumor activity. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 53: 174-179.
21. Gu Y, Ting Z, Qiu X, Zhang X, Gan X, Fang Y, et al. Linalool preferentially induces robust apoptosis of a variety of leukemia cells via upregulating p53 and cyclin-dependent kinase inhibitors. *Toxicology*. 2010; 268 (1-2): 19-24.
22. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA. *In vivo* activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*. 2004; 303, 844-848.
23. Renouf B, Hollville E, Pujals A, Tétaud C, Garibal J, Wiels J. Activation of p53 by MDM2 antagonists has differential apoptotic effects on Epstein-Barr virus (EBV)-positive and EBV-negative Burkitt's lymphoma cells. *Leukemia*. 2009; 23, 1557-1563.
24. Voss DO, Campello AP, Bacila M. The respiratory chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. 1961; 4 (1): 48-51.
25. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-354.
26. Estabrook RW. Mitochondrial respiratory control and the polarography measurement of ADP/O ratios. *Meth. Enzymol*. 1976; 10: 41-47.
27. Singer TP. Determination of the activity of succinate, NADH, choline, and alphasglycerophosphate dehydrogenases. *Methods Biochem Anal*. 1974; 22: 123-175.
28. Somlo M. Induction of lactate-cytochrome c reductases (D- and L-) of aerobic. *Biochim Biophys Acta*. 1965; 97: 183-201.
29. Mason TL, Poyton RO; Wharton DC, Schatz G. Cytochrome c oxidase from bakers yeast. I- isolation and properties. *J. Biol. Chem*. 1973; 248(4): 1346-1354.
30. Pullman ME, Penefsky HS, Datta A, Racker E. Partial resolution of the enzymes catalysing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble, dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem*. 1960; 235: 3322-3329.
31. Summer JB. Specific apparatus and laboratory methods. A method for the colorimetric determination of phosphorus. *Science*. 1944; 100: 413-414.
32. Guimarães AG, Serafini MR, Quintans LJ. Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: A patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2014; 24 (3): 243-265.
33. González E, Gómez MP. Terpene compounds in nature: A review of their potential antioxidant activity. *Curr Med Chem*. 2012; 19 (31): 5319-5341.
34. Paduch R, Kandefor M, Trytek M, Fiedurek J. Terpenes: Substances useful in human healthcare. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2007; 55 (5): 315-327.
35. Gershenzon J, Dudareva N. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*. 2007; 3 (7): 408-414.
36. Jana S, Patra K, Sarkar S, Jana J, Mukherjee G, Bhattacharjee S, et al. Antitumorigenic potential of linalool is accompanied by modulation of oxidative stress: An *in vivo* study in sarcoma-180 solid tumor model. *Nutr Cancer*. 2014; 66(5): 835-848.
37. Duchen MR. Mitochondria in health and disease: Perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med*. 2004; 25 (4): 365-451.
38. Cadenas E. Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Mol Aspects Med*. 2004; 25 (1-2): 17-26.
39. Kirkinetzos IG, Moraes CT. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2001; 12 (6): 449-457.
40. Gao W, Xu K, Li P, Tang B. Functional roles of superoxide and hydrogen peroxide generated by mitochondrial DNA mutation in regulating tumorigenicity of HepG2 cells. *Cell Biochemistry and Function*. 2011; 29(5): 400-407.
41. Ciaioi C, Ferrero D, Pugliese A, Ortolano B, Borrione P, Pileri A. Modulation of *in vitro* chemosensitivity in acute myelogenous leukemia cell line by gm-csf: opposing effects observed with



- different cytotoxic drugs and time exposure. *Leukemia res.* 1999; 23(10): 931-938.
42. Cairns R, Harris I, Mak T. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Review.* 2011; 11: 85-95.
  43. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* 2002; 192 (1): 1-15.
  44. Montero AJ, Jassem J. Cellular redox pathways as a therapeutic target in the treatment of cancer. *drugs* 2011; 71 (11): 1385-1396.
  45. Foster I. Cancer: A cell cycle defect. *Radiography.* 2008; 14 (2): 144-149.
  46. Tchernev G. Apoptotic pathways, cell cycle regulation and cancer progression: Review. *Türkiye Klinikleri. Journal of Medical Sciences.* 2009; 29 (4): 952-958.
  47. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. *Nature Reviews Cancer.* 2009; 9 (3): 153-166.
  48. Zhang M, Yang H. Negative growth regulators of the cell cycle machinery and cancer. *Pathophysiology.* 2009; 16 (4): 305-309.
  49. Kastan M B, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cáncer. *Nature,* 432 (2004) 316-323.
  50. Williams GH, Stoeber K. The cell cycle and cáncer. *J Pathol.* 2012; 226 (2): 352-364.
  51. Rountree R. Roundoc rx: Mitochondria and disease-what clinicians need to know and why. *Alternative and Complementary Therapies.* 2014; 20 (1): 5-10.
  52. Singh RP, Thangaraj K, Kale RK. Mitochondria in health and disease. *Mitochondrion.* 2014; 16:1.
  53. Tao M, You C, Zhao R, Liu S, Zhang Z, Zhang C, et al. Animal mitochondria: Evolution, function, and disease. *Curr Mol Med.* 2014; 14 (1): 115-124.
  54. Camilleri A, Vassallo N. The centrality of mitochondria in the pathogenesis and treatment of parkinson's disease. *CNS Neuroscience and Therapeutics.* 201; 20(7): 591-602.
  55. Boczonadi V, Horvath R. Mitochondria: Impaired mitochondrial translation in human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 2014; 48 (1): 77-84.
  56. Anderson G, Maes M. Neurodegeneration in parkinson's disease: Interactions of oxidative stress, tryptophan catabolites and depression with mitochondria and sirtuins. *Mol Neurobiol.* 2014; 49 (2): 771-783.