



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

Caracterización del Transporte de Amino Acidos
en Levaduras Saccharomyces cerevisiae.

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

FROYLAN MIGUEL GOMEZ LAGUNAS

México, D. F.

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Abreviaturas.....	0
Introducción.....	1
Materiales y Métodos.....	15
Resultados.....	17
Discusión y Conclusiones.....	45
Bibliografía.....	48

ABREVIATURAS

NaN_3 = Azida de Sodio

Ant = Antimicina

CCCP = Carbonil Cianida m-Clorofenil Hidrazona

TEA = Trietanol Amina

MES = Acido 2(N-Morfolino) Etano Sulfónico

HEPES = Acido N-2-Hidroxietyl Piperazina N¹-2-Etanosulfónico

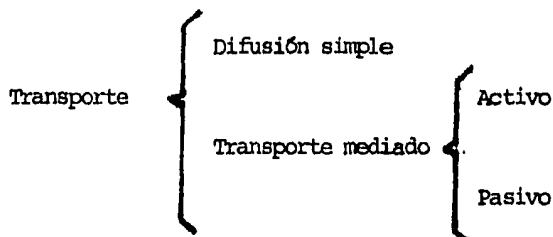
TRIS = Tris(Hidroximetil) Aminometano

Leu = Leucina

INTRODUCCION

Generalidades :

El transporte de sustancias a través de membranas, constituye tal vez el fenómeno fisiológico central para las células de todos los organismos, como resulta claro tanto de su papel en los procesos de conservación, transferencia y abastecimiento de energía, como de su participación en una amplia gama de fenómenos, que van desde la regulación de la presión osmótica, hasta la transferencia de mensajes en las células excitables (1, 2, 3,). Existen varias formas en que una sustancia puede ser transportada a través de una membrana biológica; éstas difieren tanto desde el punto de vista energético, como en la participación de la membrana misma en el proceso de transporte, en vista de lo cual se ha establecido la siguiente clasificación (4) :



Difusión simple :

Es un mecanismo de transporte, que solo depende de fuerzas físicas, esto es, durante él, la sustancia transportada no interactúa con ningún componente de la membrana (5) ; la difusión de una sustancia "j" va siempre en el sentido de movimiento de j desde una zona en que su potencial electroquímico (μ_j) es alto, hacia otra en que es bajo, para el caso del movimiento de j a través de una membrana, μ_j está

dado por :

$$\mu_j = \mu_j^* + RT \ln c_j + z_j F \psi \dots (a)$$

donde :

μ_j^* = Potencial electroquímico de j

c_j = Concentración de j

z_j = Valencia de j

F = Constante de Faraday

ψ = Potencial eléctrico

R = Constante de los gases

T = Temperatura (°K)

Así, si suponemos que μ_j sólo varía en una dirección "x", se tiene que el flujo de j (J_j) estará dado por :

$$J_j = -u_j c_j \left(\frac{\partial \mu_j}{\partial x} \right) \dots (b)$$

donde:"

u_j = Movilidad de j (5)

Si suponemos que no existen gradientes de potencial eléctrico, o que j es eléctricamente neutro ($z_j = 0$), de la igualdad (b) tenemos que :

$$J_j = -D_j \left(\frac{\partial c_j}{\partial x} \right) \dots (c)$$

donde :

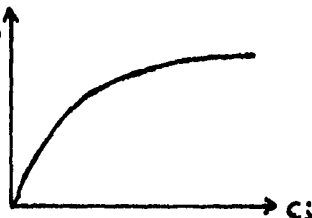
$D_j = RT u_j$

La igualdad (c) se conoce como la Primera Ley de Fick de la difusión.

Quando una sustancia atraviesa una membrana por difusión simple, la velocidad con que lo hace, es directamente proporcional al gradiente de concentraciones que exista a ambos lados de la misma.

Transporte mediado :

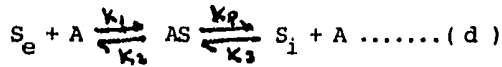
A diferencia del caso que acabamos de ver, en el que la velocidad con que una sustancia atraviesa una membrana es directamente proporcional a su diferencia de concentraciones, existen otros casos en los que la velocidad (V_j) de transporte en función de la concentración (C_j) de la sustancia transportada, sigue una cinética de saturación como la que es característica de las reacciones catalizadas por enzimas (6, 7), según lo muestra la siguiente figura :



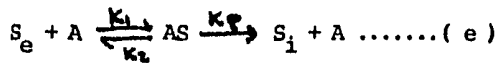
Como para el caso de las reacciones enzimáticas, esto se interpreta en el sentido de que la cinética de saturación, en el transporte, se debe a la existencia en la membrana de un cierto número de estructuras portadoras, o mediadores de tipo proteico, a las que j se une para ser transportada al otro lado de la membrana. De ahí se deriva el nombre de mediado para los tipos de transporte que presentan este comportamiento. Así mismo, a partir de esta concepción, resulta claro que el transporte mediado, debe involucrar al menos tres fases a saber (8) :

- I) Formación de un complejo entre el componente de membrana (A) y la sustancia que va a ser transportada (S).
- II) El transporte de S a través de la membrana.
- III) Descomposición del complejo entre A y S (AS), en el lado opuesto de la membrana.

Estas tres fases las podemos representar empleando la notación para reacciones químicas como :



Donde los subíndices "e" e "i", indican exterior e interior de la célula respectivamente. Con objeto de derivar la ecuación que relaciona v_j con c_j , para este tipo de transporte, se suele suponer que la "reacción" inversa, es decir el transporte del interior hacia el exterior, es insignificante, lo cual experimentalmente, sólo es válido cuando el proceso se estudia en tiempos suficientemente cortos como para que la concentración de S_i sea significativa, por lo que la representación (d) se transforma en :



Para que la fase de transporte de S se pueda dar, es necesario que se forme el complejo AS, por lo que la velocidad de transporte (v) de S, es proporcional a la concentración de dicho complejo, esto es :

$$v \propto [AS] \text{ por lo tanto : } v = K_p [AS] \dots\dots (f)$$

Ahora bien, si $[A]_t$ denota la concentración total del portador en la membrana, y $[A]$ la concentración del portador sin unirse a S, entonces es claro que :

$$[A]_t = [A] + [AS] \dots\dots (g)$$

por tanto, dividiendo la igualdad (f) por $[A]_t$, obtenemos :

$$v / [A]_t = K_p [AS] / [A] + [AS]$$

y entonces :

$$v / K_p [A]_t = [AS] / [A] + [AS] \dots\dots (h)$$

En el caso de que la concentración de S en el exterior, sea mucho mayor que $[A]_t$, se establecerá un estado estacionario, en el que

la concentración de AS permanecerá constante; esto es, su velocidad de formación (v_1) será igual a su velocidad de descomposición (v_2), y a partir de la proposición (e) es claro que :

$$v_1 = K_1 [A] [S]_e$$

$$v_2 = K_2 [AS] + K_p [AS]$$

Por tanto, en condiciones de estado estacionario :

$$K_1 [A] [S]_e = (K_2 + K_p) [AS]$$

y entonces :

$$[AS] = (K_1 / K_2 + K_p) [A] [S]_e \dots\dots (i)$$

Así, substituyendo la identidad (i) en la (h), y denotando a $[S]_e$ simplemente como $[S]$, obtenemos :

$$v / [A]_t K_p = [S] / K_m + [S] \dots\dots (j)$$

donde :

$$K_m = K_2 + K_p / K_1 \dots\dots (k)$$

Ahora solo resta observar, que como la velocidad de transporte es directamente proporcional a la concentración del complejo AS, se obtendrá la velocidad máxima (v_{\max}) cuando todo el portador se encuentre en forma del complejo AS, esto es : $[A]_t = [AS]$.

Por lo que de (f), se sigue que :

$$v_{\max} = K_p [A]_t$$

por lo tanto :

$$v = v_{\max} [S] / K_m + [S] \dots\dots (l)$$

La ecuación (l), se conoce como la ecuación de Michaelis-Menten,

y originalmente se utilizó para la descripción de reacciones catalizadas por una enzima, con un solo sitio de unión para el sustrato (6,7), de hecho la deducción anterior es idéntica a la propuesta por Segel (6) para dicho proceso, pero en virtud de la semejanza formal que los pasos de este tipo de reacciones guardan con las tres fases previamente mencionadas de un transporte mediado, como acabamos de ver, también se puede aplicar en el campo del transporte. Sin embargo, un aspecto importante a tener en cuenta, es que en este último caso, los factores que afectan los parámetros de dicha ecuación, K_m y v_{max} , pueden ser muy distintos de aquellos que los afectan en una reacción enzimática; por ejemplo, un factor a considerar en algunos procesos de transporte, y que parece no afectar a las reacciones enzimáticas, es el potencial de superficie de la membrana (9,10) .

Otro aspecto que dificulta los estudios de transporte, es la ocurrencia de valores múltiples de K_m y v_{max} asociados con la captura de una sustancia, lo cual puede deberse, o bien a que la sustancia en cuestión es transportada por varios sistemas, o a que es transportada por un solo sistema con varios sitios de unión para el sustrato (8, 11, 12), siendo en general difícil distinguir entre ambas posibilidades .

Transporte Activo :

Como anteriormente se mencionó, el transporte mediado puede ser activo o pasivo; se dice que una sustancia que se mueve entre dos compartimentos es objeto de un transporte activo, si como resultado de tal movimiento, se incrementa su potencial químico (o electroquímico) a través de la barrera (membrana) de separación de ambos compartimentos;

a éste se contrapone el transporte pasivo, también conocido como difusión facilitada (7). Así el movimiento de una sustancia a través de una membrana biológica, puede darse mediante un proceso activo, solo si acoplado a éste, existe algún mecanismo que proporcione la energía requerida. Con objeto de precisar los conceptos subyacentes a estos tipos de transporte, resulta conveniente emplear la terminología desarrollada por Mitchell (13); de acuerdo con ésta, los procesos de transporte mediado, se pueden dividir en dos grupos a saber :

I) Transporte Primario .-

Es aquel, en el que la translocación del sustrato, está directamente acoplada a una reacción bioquímica, pudiendo ser de dos tipos; en uno conocido como translocación de grupos, la energía necesaria para lograr la captura activa del sustrato, se obtiene mediante la modificación química de éste, como resultado de una reacción catalizada por un sistema enzimático orientado a través de la membrana (8, 13); en el otro conocido como translocación de solutos dependiente de enzimas, el sustrato mismo no participa en el intercambio de enlaces covalentes, pero es transportado como resultado de tales reacciones, un ejemplo de este proceso es la ATP-asa de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ de las células de mamíferos.

II) Transporte Secundario .-

Es aquel, que por definición, no está directamente acoplado a una reacción bioquímica, aunque lo puede estar de manera indirecta; el más simple de estos tipos de transporte es el "uniport", el cual consiste en la translocación de un solo sustrato por el portador, en aquella dirección que produce un decremento en la diferencia de potencial electroquímico del sustrato a través de la membrana, a este proceso

corresponde a la difusión facilitada mencionada con anterioridad. Otra forma de transporte secundario, es la conocida como co-transporte (13, 14, 15), en ella dos solutos se equilibran a través de la membrana, de tal manera que la translocación de un soluto, está acoplada con la translocación de otro en la misma dirección; esto es, durante este proceso el gradiente electroquímico que produce el movimiento de un sustrato, dirige el movimiento del otro por el mismo portador, aún cuando éste último pueda estarse moviendo en contra de su propio gradiente electroquímico. Finalmente, el transporte secundario, puede darse por contra-transporte; durante este proceso, dos solutos se equilibran a través de la membrana, de tal manera que la translocación de un soluto, está acoplada con la translocación del otro en la dirección opuesta.

Para ejemplificar lo que se ha dicho respecto a los tipos de transporte activo, cabe señalar, que en las bacterias, existen al menos tres clases distintas de sistemas de transporte (8, 12); en uno de ellos, conocido como "sistemas unidos a membrana", las proteínas requeridas para el transporte, se encuentran firmemente unidas a la membrana, y por lo tanto se preservan al formar vesículas de membrana por sonicación. Estos sistemas, utilizan la energía de los gradientes iónicos que hay a través de la membrana, y principalmente el del H^+ , para realizar el transporte de sus sustratos; otro tipo de sistemas de transporte, conocido como "sistemas de proteínas de unión", se caracterizan por presentar al menos un componente que se pierde durante la formación de vesículas, los sistemas pertenecientes a este grupo, uti-

lizan el ATP o algún otro compuesto relacionado para energizar el transporte de los sustratos, por último hay una clase de sistemas de transporte de "translocación de grupos", que llevan a cabo el transporte activo de los sustratos, empleando la energía derivada de la modificación química a que somete a éstos (8).

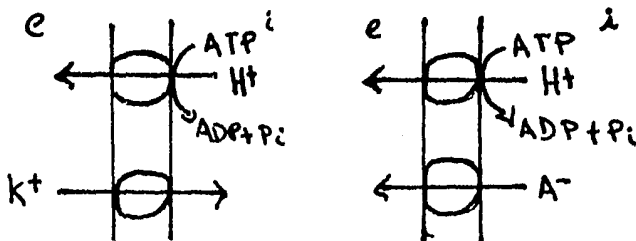
Por lo que se refiere a las plantas superiores, existen indicios de que al igual que en las bacterias, el gradiente electroquímico del H^+ es la principal fuerza propulsora de la mayoría de los sistemas de transporte secundario (15).

Así, la visión que emerge, es que si bien los gradientes iónicos utilizados por las células para energizar los procesos de transporte secundario son básicamente los de H^+ y los de Na^+ , es principalmente el gradiente de H^+ , el que emplean tanto las bacterias, como las plantas superiores (8, 12, 15). En cuanto al Na^+ , los gradientes de éste ion son empleados para transportar sustancias, principalmente por las células de los mamíferos (1, 11), siendo más bien rara su utilización en procesos de transporte, por parte de microorganismos; incluso en bacterias existen reportes de que el Na^+ puede inhibir el transporte de ciertos aminoácidos (16,17).

Transporte en levaduras :

Por lo que se refiere a microorganismos eucariotes¹⁷, como son las levaduras, cabe preguntarse, si en el acople energético de sus sistemas de transporte, éstos se asemejan a los de los procariontes, o si más bien se parecen a los de los eucariontes superiores, o más aún

si presentan aspectos propios, dada su posición filogenética. La importancia de esta pregunta, queda manifiesta no solo en la famosa frase de Dobzhansky " En biología nada tiene sentido si no es a la luz de la evolución "(18), sino también por las grandes ventajas que las levaduras presentan como objetos experimentales dentro de la biología. Con relación a lo anterior, cabe señalar que a diferencia de lo que sucede en las bacterias, y pese a los esfuerzos realizados, aún subsisten muchas dudas sobre los sistemas de transporte en levaduras; la historia de estos esfuerzos, se remonta a la década de 1950, cuando el grupo de Conway, estableció la existencia de un intercambio $K^+ - H^+$, dependiente de energía por parte de estas células, postulando la existencia de un sistema redox en la membrana plasmática para energizar el intercambio (19). Tiempo después en la década de 1960, Peña demostró que a pH del medio bajo, el K^+ adicionado al medio en que se encuentran las levaduras, producía un aumento en los niveles de NADH, ADP y Pi, y que la elevación del pH del medio, por sí solo, era capaz de provocar estos mismos efectos, y que en estas condiciones el K^+ ya no tenía ningún efecto sobre los niveles de NADH, ADP y Pi (20). Esto venía a descartar la idea de Conway de que la fuerza propulsora del transporte era el poder reductor proveniente del metabolismo, emergiendo la hipótesis de que los movimientos de K^+ y H^+ aunque acoplados, se llevan a cabo por sistemas de transporte diferentes, siendo la salida de H^+ energizada por el ATP, y balanceada por la entrada de K^+ , o bien por la expulsión de aniones en ausencia de K^+ :



En apoyo a esta hipótesis, Peña ha demostrado que es posible inhibir el transporte de K^+ , sin inhibir la expulsión de H^+ (21,22), así como que es posible inhibir el transporte de K^+ , mediante el uso de desacoplantes, sin llegar a disminuir la concentración de ATP, hasta niveles críticos (23).

Parece ser que la correlación existente entre los movimientos de K^+ y H^+ , permite a las levaduras crear un gran pH a través de la membrana plasmática, sin que varíe grandemente su diferencia de potencial e eléctrico (24), lo que hace que las células tiendan a alcanzar una relación H_e^+/H_i^+ , constante (25). Es importante mencionar, que la ATPasa de la membrana plasmática de las levaduras del género Saccharomyces, ya ha sido aislada, y que la enzima purificada, tiene esencialmente, todas las propiedades cinéticas de la unida a membrana (26) :

- I) pH óptimo de 6.0 a 7.5, a diferencia de las ATPasas mitocondriales cuyo pH óptimo está entre 8.0 y 9.0 .
- II) El sustrato real de la enzima es Mg-ATP, los valores de K_m publicados están entre 0.7 y 3.8 mM .
- III) La oligomicina, venturicidina y azida, inhibidores típicos de las ATPasas del tipo F_0-F_1 , no inhiben a esta enzima.
- IV) El vanadato y el dietilbestrol, inhiben a esta enzima, pero no a las del tipo F_0-F_1 .

V) El DCCD, Dio-9 y octilguanidina son inhibidores de ambos tipos de ATPasas.

VI) El K^+ , no es un participante obligatorio en el ciclo de transporte de H^+ .

Por lo que toca al transporte de aminoácidos en la levadura, se sabe que además de permeasas específicas, existe una permeasa general de aminoácidos, capaz de mediar la entrada a las células de aminoácidos básicos y neutros, con excepción de la prolina (27), se ha dicho que tanto la permeasa general de aminoácidos, así como las permeasas específicas, con excepción de la de serina, son constitutivas (27;28) . Se ha dirigido una gran cantidad de esfuerzos a tratar de comprender los mecanismos de acople energético que permiten el transporte exergónico de los aminoácidos a través de estas permeasas, y por consiguiente al que juegan los iones H^+ , K^+ y Na^+ , dentro de dichos procesos. El grupo que más ampliamente ha tratado este aspecto, es el de Eddy, quien trabajando con células en las cuales el metabolismo había sido severamente restringido, mediante el uso de inhibidores de la glucólisis y la respiración, encontró entre otras cosas que:

- La velocidad inicial de captación de glicina, leucina, fenilalanina y ácido aminoisobutírico es mayor a pH 4.5 que a 7.4 (29).

- En células a pH 4.5, se observa una entrada extra de H^+ , al agregar distintos aminoácidos; así en *S. carlsbergensis*, encontró que hay una entrada de uno a dos equivalentes extra de H^+ , con L-citrulina, glicina, leucina, metionina, fenilalanina y prolina, dependiendo el número de H^+ absorbidos, tanto de la cepa de levadura, como de la naturaleza del aminoácido (30;31). El balance de carga extrínseca se mantiene por un eflujo de K^+ (32), en estas condiciones, el K^+ agregado al medio en que

se encuentran las levaduras, se comporta como un inhibidor del transporte (29;33).

En resumen, con base en estos trabajos, se podría concluir que en células de levadura del género Saccharomyces, en las que el metabolismo ha sido limitado, el gradiente electroquímico de H^+ es la fuerza propulsora del transporte exergónico de aminoácidos, y el balance de carga eléctrica se mantiene por un eflujo acoplado de K^+ . Sin embargo, los resultados anteriores no resuelven el problema en su totalidad, pues falta determinarla manera en que el transporte es energizado cuando las células se encuentran en condiciones metabólicas óptimas (no limitadas); Así el propio Eddy, ha encontrado, que al menos por lo que toca a la glicina, el sistema de transporte funciona de manera distinta en condiciones metabólicas óptimas (33). A su vez el papel de los iones K^+ y Na^+ dentro del transporte de aminoácidos, tampoco está del todo aclarado, pues a diferencia del efecto inhibitorio del K^+ reportado por Eddy, Kotyk (34) ha señalado que al menos por lo que toca a la glicina, ácido aspártico y lisina, ni el Na^+ , ni el K^+ juegan un papel específico en su captura.

Por lo que toca en particular al transporte de leucina, éste ha sido objeto de estudio en un amplio margen de condiciones metabólicas por parte del grupo de Stoppani, en levaduras S. cerevisiae (35,36) y S. ellipsoideus (37). Algunos de los resultados obtenidos por este grupo en S. cerevisiae, son los siguientes:

- En el proceso de transporte, interviene una fase denominada por este grupo "fase de captación muy temprana" (fct), que es una extrapolación del transporte al tiempo cero de incubación en presencia de leucina.

- La fct representa hasta un 40% de la captura total en células ayunadas, aunque su contribución es pequeña en células alimentadas con glucosa.
- La cinética del transporte de leucina muestra que este se lleva a cabo por medio de dos sistemas de transporte, cuyos valores de K_m y V_{max} dependen del estado metabólico.
- Para uno de los dos sistemas de transporte de leucina, se obtuvieron, valores negativos de K_m y V_{max} en células ayunadas, que según los autores, se debió a la contribución de la fct.
- La presencia de glucosa, aumenta la captura de leucina, pero a concentraciones de 5 mM, se observa un efecto inhibitorio.

Estos resultados, nos han hecho pensar, que la caracterización del sistema de transporte de aminoácidos presenta algunas dificultades. Así, pensamos que es necesario realizar un estudio de las características cinéticas, energéticas y de los efectos de distintos cationes, sobre el transporte de aminoácidos en levaduras del género Saccharomyces, tanto en condiciones metabólicas restringidas, en ausencia de fuentes de energía, y/o con inhibidores del metabolismo, como en condiciones metabólicas óptimas. Es por esto, que como parte del proyecto, decidimos estudiar el transporte de leucina, en la levadura Saccharomyces cerevisiae, con el objeto de caracterizar:

- Dependencia del transporte, con el estado metabólico de las células.
- Características cinéticas del transporte.
- Efecto de cationes monovalentes (H^+ , K^+ , Na^+), sobre el transporte.

Estos y otros estudios adicionales nos deberán permitir hacer algunas conclusiones respecto al mecanismo del transporte de leucina en S. cerevisiae.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES :

Se trabajó con la levadura Saccharomyces cerevisiae , obtenidas comercialmente de la fábrica "La Azteca".

Todos los reactivos utilizados, son de grado analítico. La L-leucina no-radiactiva fue obtenida de Sigma Chemical Company; la L-[3,4,5-³H]-Leucina, se obtuvo de New England Nuclear, con una actividad específica de 158.0 Ci/mmol.

METODOS :

Tratamiento de la levadura previo a cada experimento (38) .-

Se pesaron 30 g de la levadura, y se suspendieron en un litro de medio de cultivo para levaduras de De Kloet (39), añadiendo un mililitro del antiespumante FG-10 de Corning. La mezcla se incubó durante ocho horas a 30°C, burbujeando aire a través de un tubo de vidrio poroso. A las ocho horas, las levaduras se lavaron dos veces por centrifugación durante 10 minutos a 600 g (2000 r.p.m.), hecho esto, las células se resuspendieron en agua destilada, en un volumen total de 350 ml, y se dejaron aerear durante 16 horas a 30°C; transcurrido este tiempo, las células se lavaron dos veces por centrifugación durante 10 minutos a 600 g (2000 r.p.m.), después de lo cual, se pasó la levadura y se resuspendió en agua destilada en un volumen total igual al doble del peso de la levadura.

Determinación del transporte de leucina.-

Para determinar el transporte de leucina, se tomaron de cada mezcla

de ensayo dos muestras (t,f) de 100 μ l cada una. La muestra f se lavó por filtración en filtros marca Sartorius de 0.45 μ m, con 15 ml de una solución a 0°C de 5 mM de CaCl₂, 10 mM de KCl y 20 mM de leucina; a los filtros así obtenidos, se les agregó 5 ml de líquido de centelleo tritosol (40), y se contaron en un contador de centelleo líquido Packard TRI-CARB 300 C. A la otra muestra (t) se le agregó directamente 5 ml de tritosol y se llevó a contar, para conocer la radiactividad total u tilizada en cada tubo incubado.

Cálculos.-

La captación de leucina por las levaduras se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Captación} = \left(\frac{F}{T} \right) (C \cdot D)$$

Donde,

F = Cuentas por minuto en el filtrado obtenido de la muestra f.

T = Cuentas por minuto totales obtenidas de la muestra t.

C = nmolas leucina/ml.

D = Factor de dilución (D = 20 en la mayoría de los experimentos).

Expresión de los resultados.-

A menos que otra cosa se indique, la entrada de leucina a las levaduras está expresada como:

$$V = \frac{\text{nmolas leucina}}{\text{g} \times 3 \text{ min}}$$

RESULTADOS

Con objeto de determinar el efecto del estado metabólico de la levadura sobre la captación de leucina, se procedió a ensayar el transporte de este aminoácido con glucosa ó etanol como sustrato, tanto en presencia como en ausencia de inhibidores de la respiración. Los resultados que se muestran en la tabla I, indican que el transporte de leucina, es un proceso dependiente de energía.

En la figura 1, se muestra la dependencia del transporte con la concentración de glucosa, como puede observarse, tanto a pH 6.0, como a pH 4.5, v aumenta a medida que se incrementa la concentración de glucosa en el medio, hasta alcanzarse una concentración de 150 mM de glucosa, en la que v tiende a hacerse aproximadamente constante, este resultado, está en contradicción con lo reportado por Stoppani (36), quien trabajando con levaduras S.cerevisiae, encontró que a pH 4.5, con concentraciones de glucosa por encima de 5 mM, producían captaciones menores a las obtenidas con 5 mM de glucosa. Por otra parte, este mismo autor, estudiando el transporte de leucina en S. cerevisiae (36) y en S.ellipsoideus (37), así como Eddy estudiando el transporte de glicina en S. carlsbergensis (33), han reportado que la captación de aminoácidos, aumenta si se preincuba a las células con glucosa; sin embargo, ninguno señala cual es la dependencia exacta del transporte, con respecto al tiempo de preincubación, por esta razón decidimos indagar este aspecto del proceso; los resultados aparecen en la figura 2. Como puede verse, no basta con la presencia de glucosa en el medio para que se obtengan captaciones significantes de leucina, sino que además, se

TABLA I. Efecto del estado metabólico de la levadura sobre la captación de leucina. Las células fueron preincubadas en un buffer MRS-TEA 40mM pH 6.0, con glucosa o etanol durante 60 y 15 min respectivamente; al término de este tiempo, se agregó 100 μ M de L-(3 H)-Leucina, tres minutos después se extrajeron muestras y se determinó la captación de leucina de acuerdo con lo señalado en la sección de materiales y métodos; en todos los casos, los inhibidores se agregaron 10 min antes que el aminoácido.

Adiciones	Captación \pm S (nmolas leu/g.3min) (n=2)	Captación como % del control.
glucosa	238.4 \pm 54.2	100.0
glucosa + H ₂ O ₂	146.0 \pm 6.1	61.0
glucosa + NaN ₃	42.8 \pm 5.0	18.0
glucosa + CCCP	112.9 \pm 23.9	47.0
glucosa + Ant.	210.4 \pm 50.0	88.0
<hr/>		
etanol + H ₂ O ₂	325.2 \pm 74.1	100.0
etanol	38.4 \pm 17.7	12.0
etanol + H ₂ O ₂ + NaN ₃	23.9 \pm 12.6	7.0
etanol + H ₂ O ₂ + CCCP	38.0 \pm 9.7	12.0
etanol + H ₂ O ₂ + Ant.	55.2 \pm 19.9	17.0

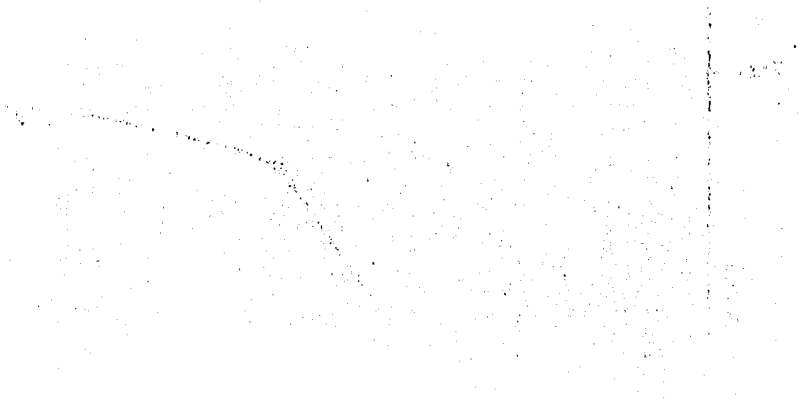


FIGURA 1.

Efecto de la concentración de glucosa sobre el transporte de leucina. Se pusieron células de levadura a pH 6.0 en un buffer Mes-TEA 20mM (●), o a pH 4.5 en un buffer Citrato-TEA 20mM (▲), con las concentraciones de glucosa que se indican en el eje de las abcisas, a temperatura ambiente; una hora después, se agregó 100 μ M de L-(³H)-Leucina. A los 3 min se tomaron muestras y se determinó la captación de leucina de acuerdo a lo señalado en materiales y métodos.

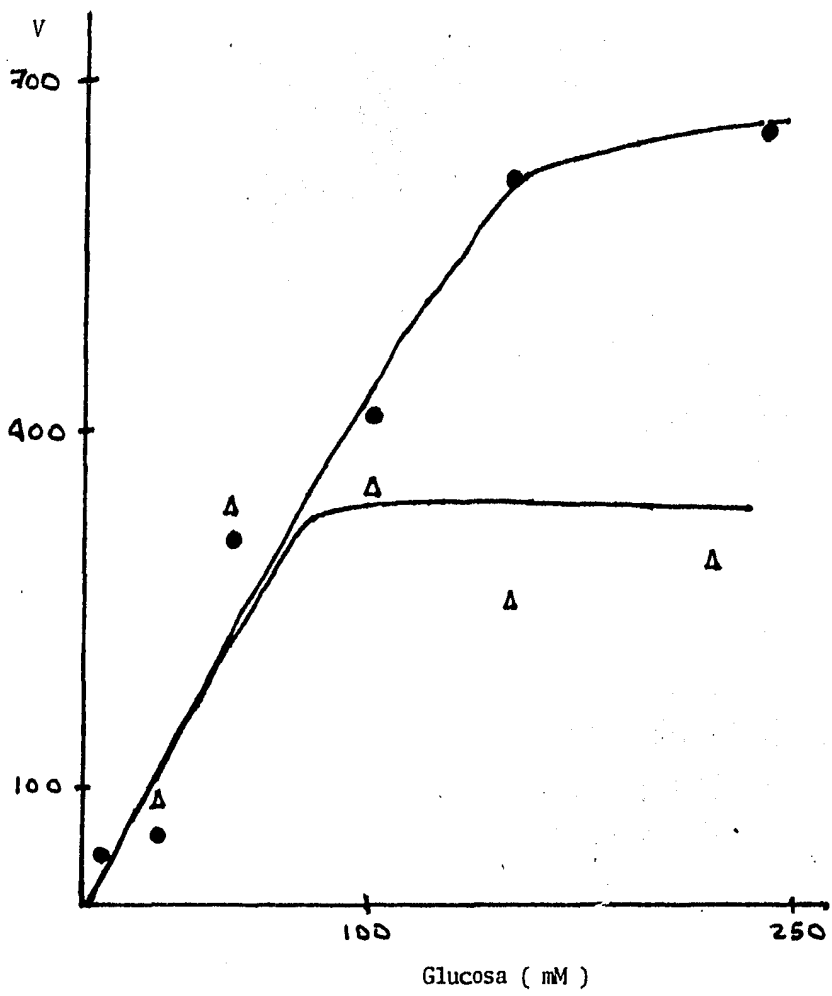
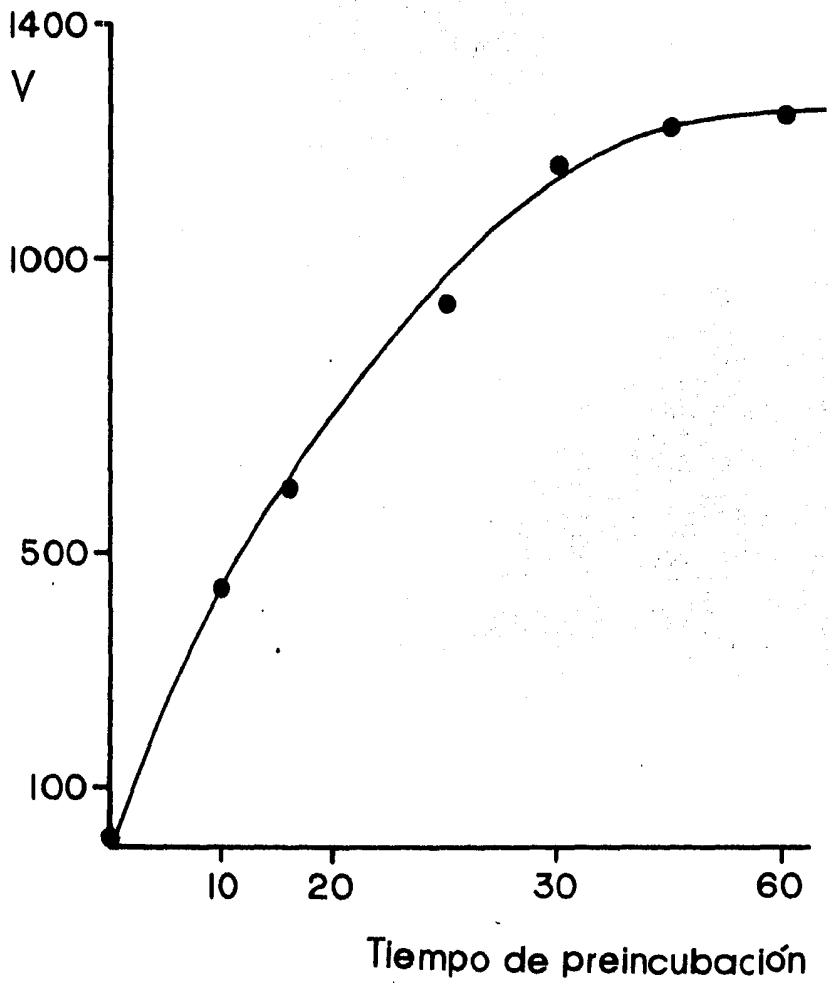


FIGURA 2.

Captación de leucina en función del tiempo de preincubación con glucosa. Las células fueron puestas en un medio con buffer Mes-TEA 20mM, pH 6.0 y 150mM de glucosa; a los tiempos indicados en el eje de las abcisas, se agregó 100 μ M de L-(³H)-Leucina y 3 min después, se determinó la captación de leucina.



requieren de tiempos de preincubación grandes.

Como se mencionó en la introducción, uno de los aspectos más importantes dentro de un estudio de transporte es la determinación de las características cinéticas del mismo; a este respecto es necesario señalar que en 1980 Stoppani (36), reportó que el transporte de leucina en células *S. cerevisiae*, se lleva a cabo por medio de dos sistemas de transporte, cuyos valores de K_m y v_{max} , dependen del estado metabólico de las células, y que en el caso de células ayunadas, llegan a tener valores negativos. Este último punto nos hizo pensar que era conveniente volver a estudiar la cinética del transporte en nuestro sistema; para ello lo primero que se hizo, fue determinar el intervalo de tiempo de incubación con leucina, dentro del cual es aplicable el formalismo de Michelis-Menten. Los resultados mostrados en la figura 3 indican que aproximadamente hasta los 4 minutos, la captación de leucina aumenta linealmente con el tiempo de incubación, por lo que cualquier tiempo de incubación menor a 4 min, es adecuado para realizar estudios cinéticos. Así, con base en este resultado y en los presentado en las figuras 1 y 2, se decidió, a menos que se indique otra condición, preincubar a las células, en todos los experimentos con 150 μ M de glucosa, en un Buffer MES-TEA 20 mM, pH 6.0 y al término de este tiempo, agregar 100 μ M de L- (3 H)- Leucina, tomándose la muestra para determinar su captación 3 minutos después de iniciada la incubación con el aminoácido.

En la figura 4, se muestra que el transporte de leucina sigue una cinética de saturación de tipo Michaelis-Menten. Con objeto de determinar, el valor de los parámetros cinéticos K_m y v_{max} que definen al

FIGURA 3.

Captación a distintos tiempos de incubación con leucina.

Las células fueron puestas en un buffer Mes-TEA 20mM pH 6.0, con 150mM de glucosa, a temperatura ambiente, al cabo de una hora, se agregó 100 μ M de L-(3 H)-Leucina, y a los tiempos indicados en el eje de las abcisas, se tomaron muestras y se determinó la captación.

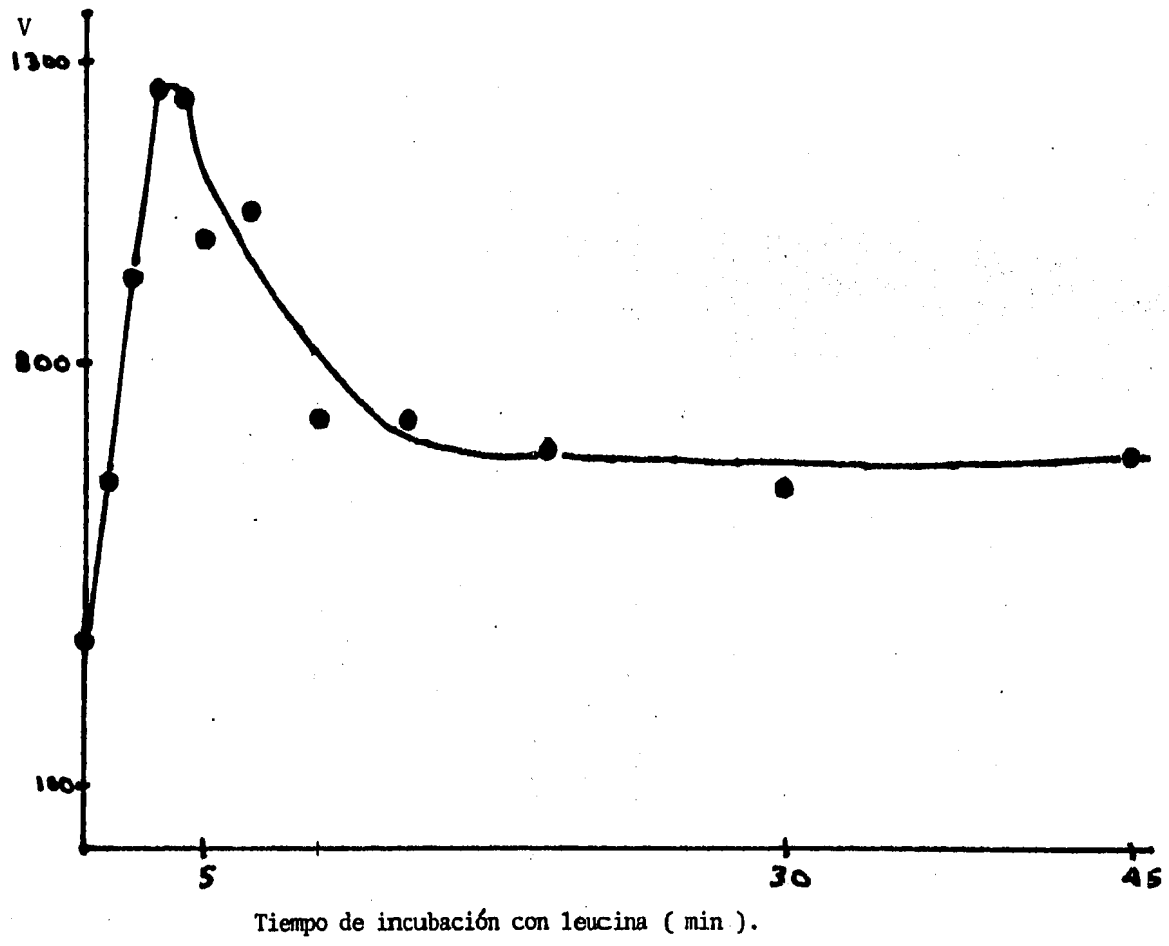
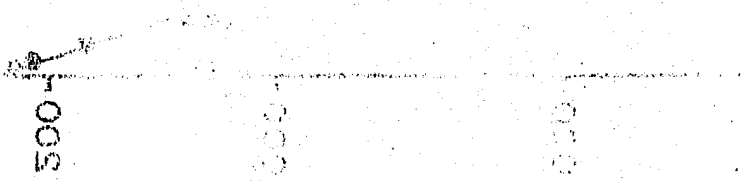
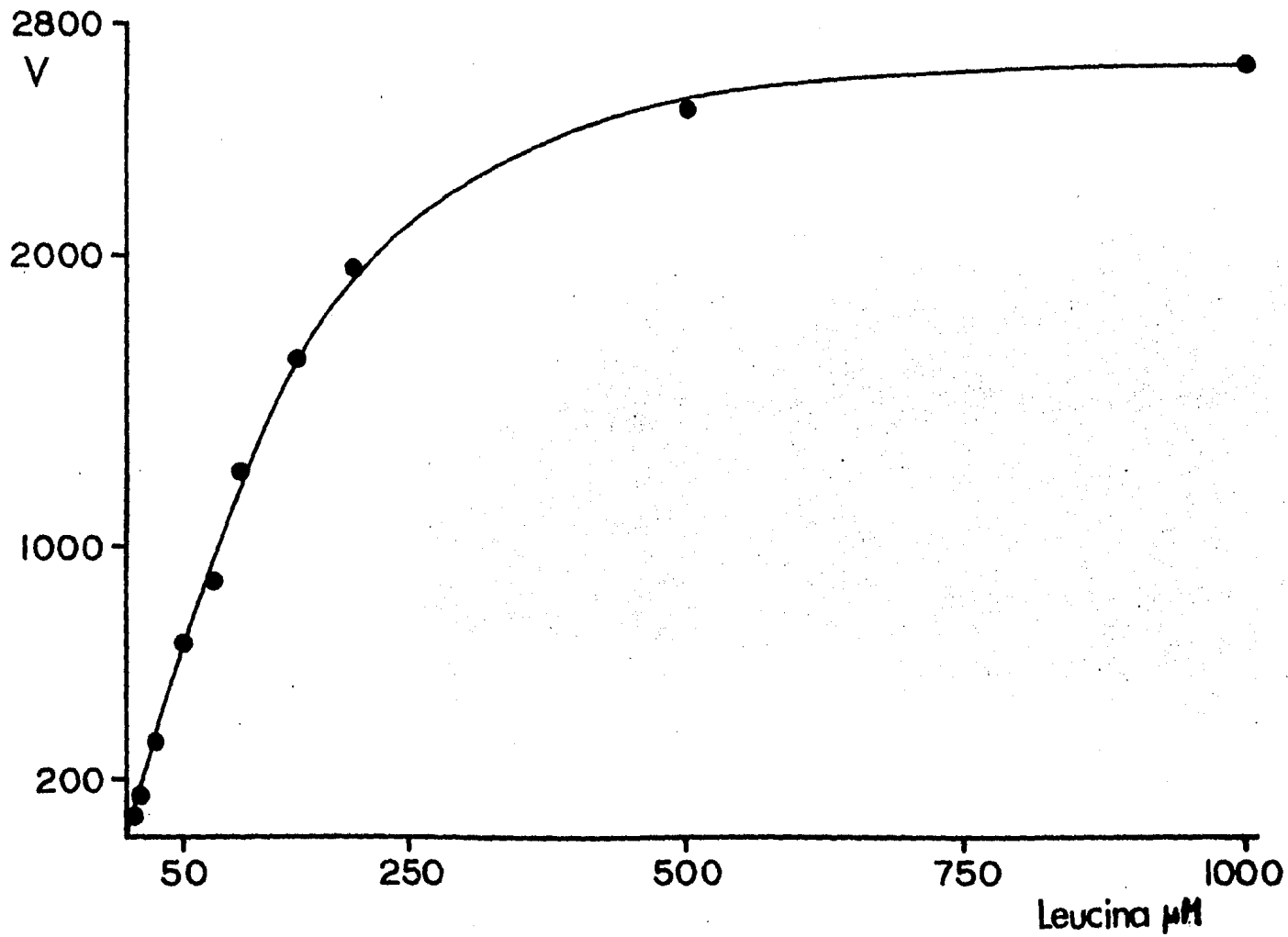


FIGURA 4.

Relación entre la concentración de leucina y su transporte. Las condiciones experimentales son como las señaladas en el texto, excepto que la concentración de L-(^3H)-Leucina agregada al medio, es la señalada en el eje de las abcisas.





transporte, se realizó la rectificación de esta curva con el método de Woolf-Augustinsson-Hofstee (6) y se muestra en la figura 5. Según puede apreciarse, el transporte de leucina en nuestras condiciones de trabajo, se da a través de un sólo sistema de transporte, cuyos parámetros cinéticos son $K_m = 215 \mu M$ y $V_{max} = 3433 \text{ nmolas leucina/g X 3 min}$, (es importante señalar en este momento, que los valores totales de captación de leucina, varían de un paquete a otro de levadura, pero la respuesta cualitativa es siempre la misma). Para determinar la especificidad de este sistema, se procedió a estudiar el efecto de un representante de cada grupo de aminoácidos de distinto comportamiento ácido-básico, es decir ácidos, básicos y neutros, sobre los parámetros cinéticos del transportador de leucina. En los resultados que se muestran en las figuras 6, 7, 8, 9 y 10, puede apreciarse que el ácido glutámico no afecta al transporte de leucina, mientras que tanto la lisina, como la alanina, ejercieron un efecto inhibitor que no es de tipo competitivo.

Como se señaló en la introducción, el grupo de Eddy ha reportado que en levaduras del género Saccharomyces, cuyo metabolismo (glucólisis y respiración), ha sido inhibido, es el gradiente electroquímico de H^+ , la fuerza empleada para transportar aminoácidos al interior de estas células (30, 32); con objeto de explorar esta posibilidad en nuestro sistema, estudiamos la captación de leucina a distintos valores de pH en el medio en células ayunadas, a las que además se agregó antimicina, un conocido inhibidor de la respiración, con el objeto de prevenir cualquier posibilidad de obtención de energía metabólica por parte de las células. Los resultados se muestran en la tabla II.

FIGURA 5.

Captación de leucina vs. captación/concentración de leucina, las condiciones experimentales, son las mismas que las de la figura 4; $K_m = 215 \mu M$; $V_{max} = 3433$ nmolas leucina/g.3min., $r = -0.94$

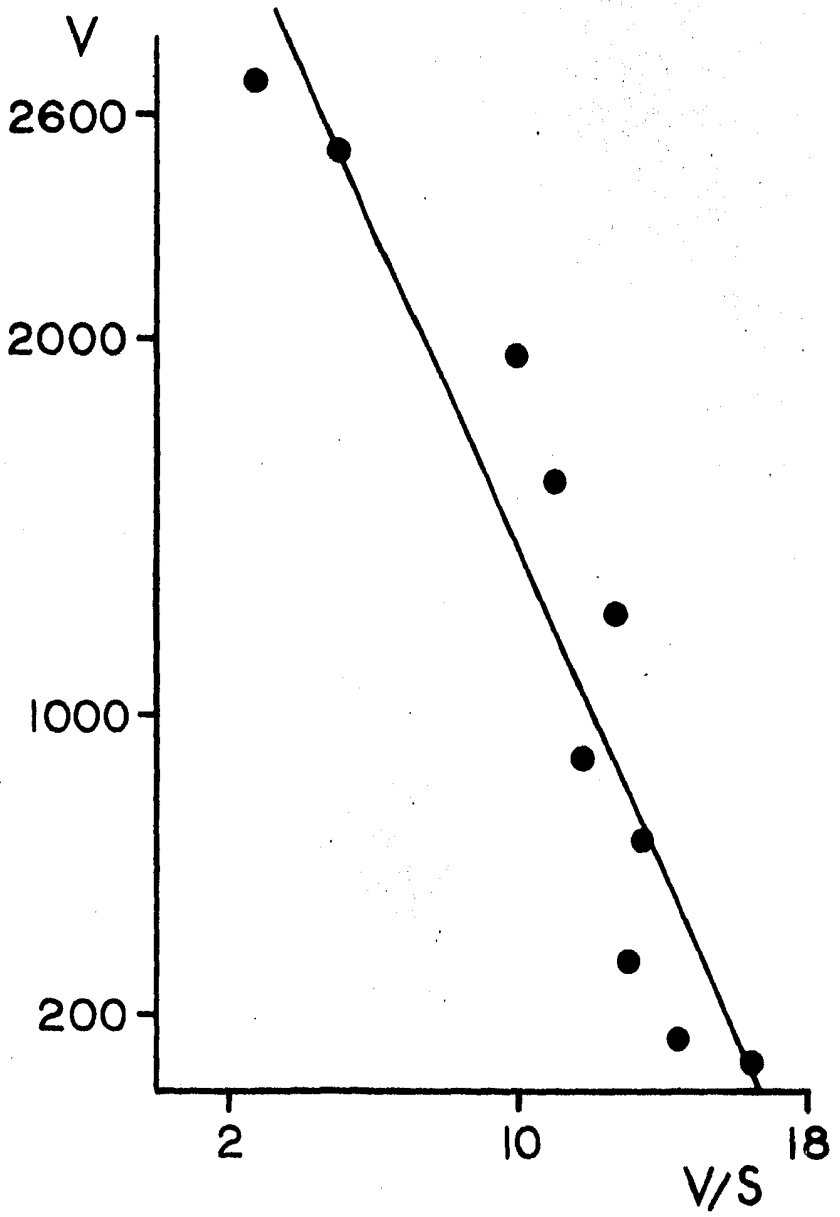


FIGURA 6.

Efecto de la lisina sobre la cinética del transporte de leucina. Las condiciones experimentales, son las mismas que las de la figura 4 (control), sólo que ahora se agregó 50 μ M de lisina, junto con la leucina, a las concentraciones indicadas en el eje de las abcisas.

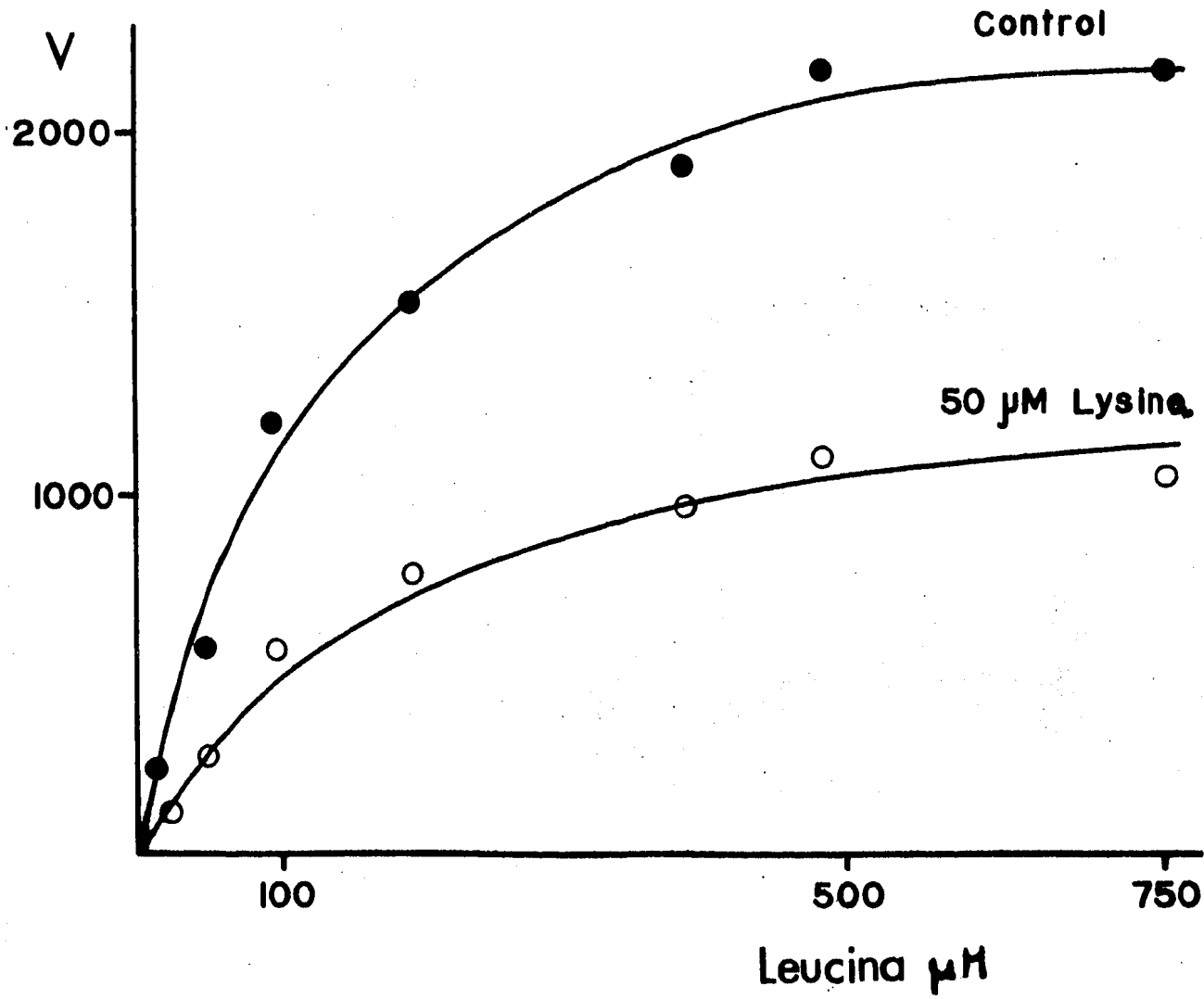
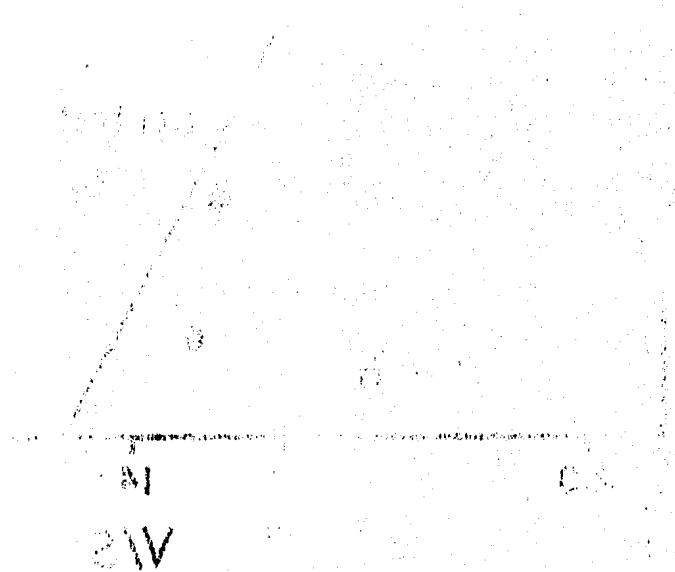


FIGURA 7.

La curva muestra el ajuste de Hofstee de los datos que aparecen en la figura 6. control : $K_m = 181 \mu M$; $V_{max} = 2890$ nmolas leucina/g. 3min.; control + lisina : $K_m = 159 \mu M$; $V_{max} = 1392$ nmolas leucina/g. 3min.



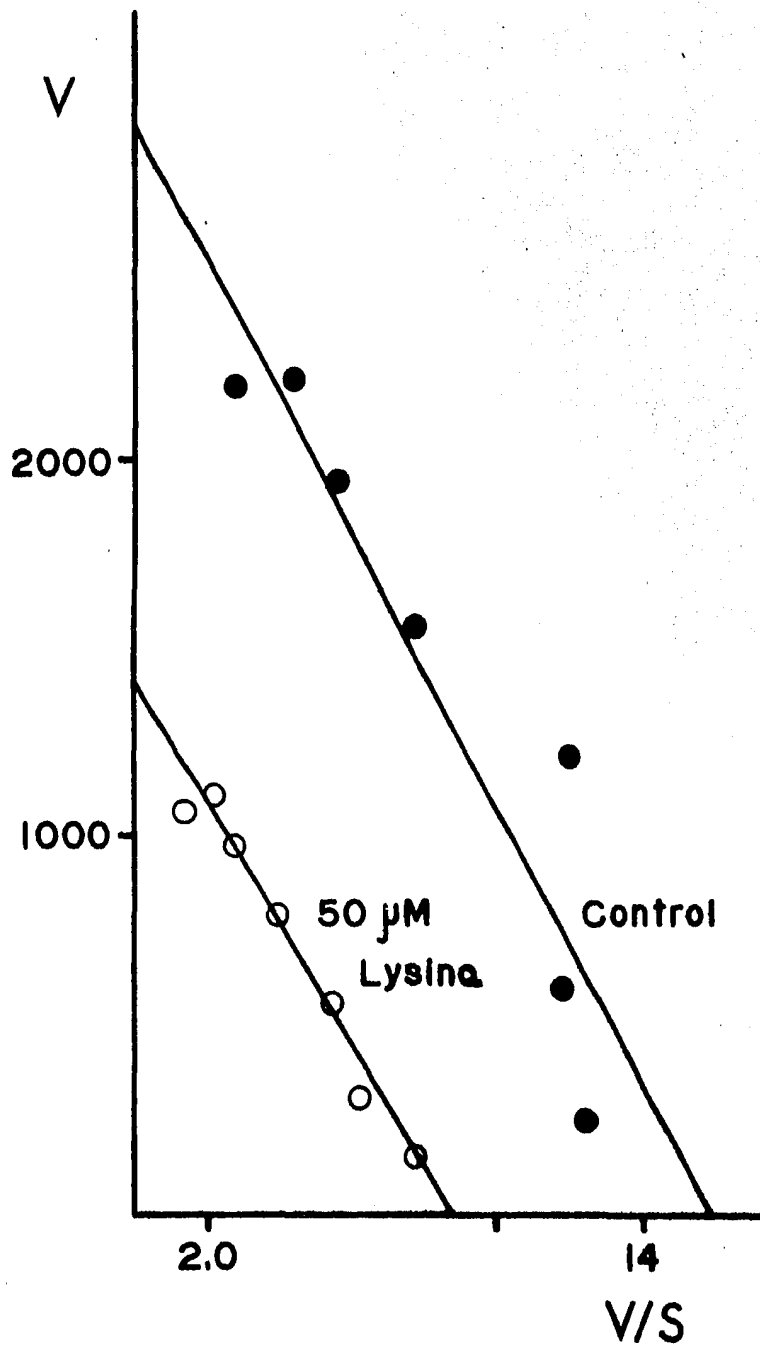


FIGURA 8.

Efecto de la alanina sobre la cinética del transporte de leucina. Las condiciones experimentales son las mismas que las de la figura 6 (control), solo que ahora se agregó 250 μ M de alanina junto con la leucina.

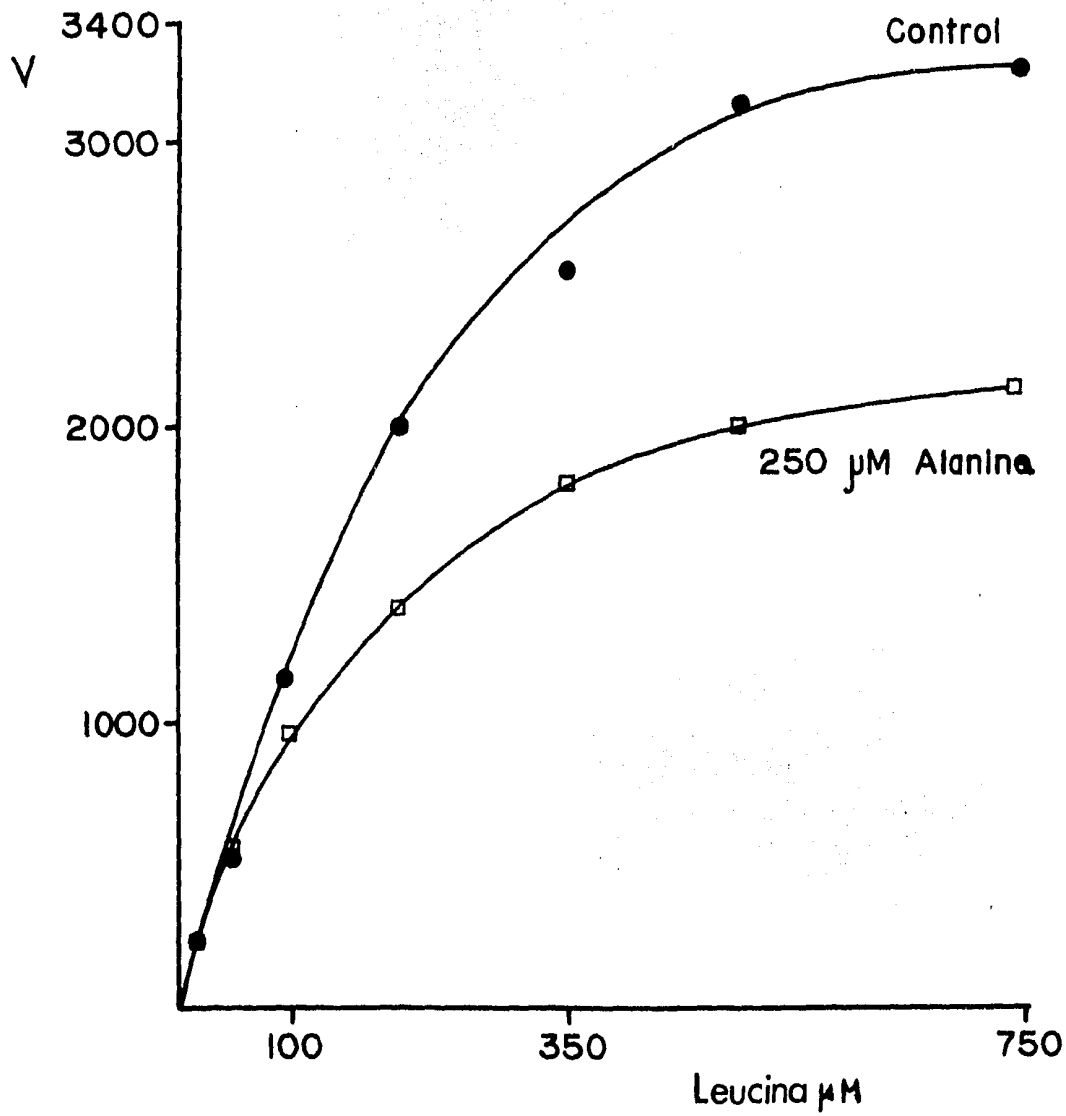


FIGURA 9.

La curva muestra el Hofstee de los datos que aparecen en la figura 8; control : $K_m = 390 \mu M$; $V_{max} = 5232$ nmolas leucina/g.3min ; control + alanina : $K_m = 203 \mu M$; $V_{max} = 2794$ nmolas leucina/g.3min.

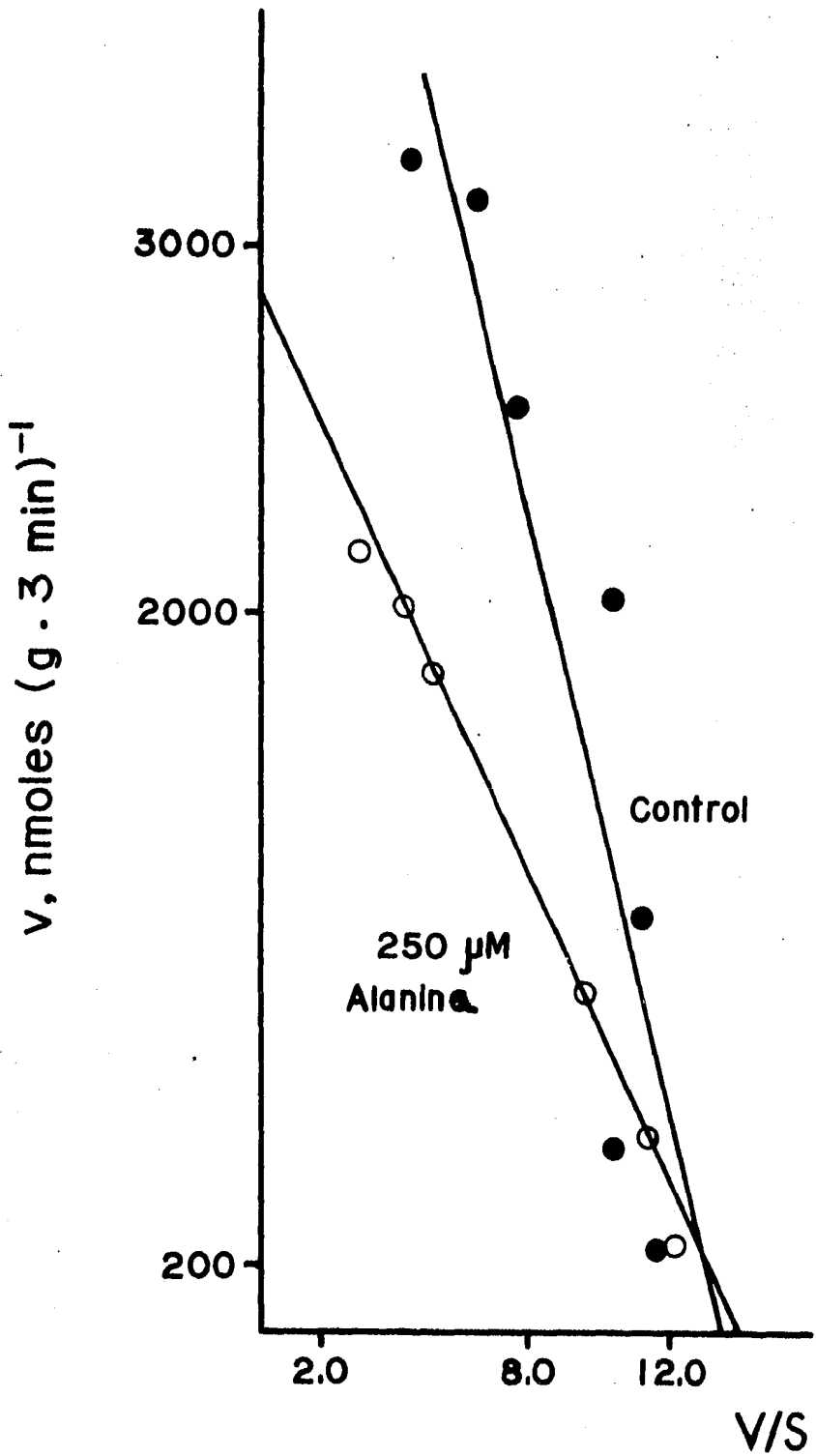


FIGURA 10.

Efecto del ácido glutámico sobre la cinética del transporte de leucina. Las condiciones experimentales son las mismas que las de la figura 8 (control), solo que ahora se agregó $250\mu\text{M}$ de ácido glutámico junto con la leucina.

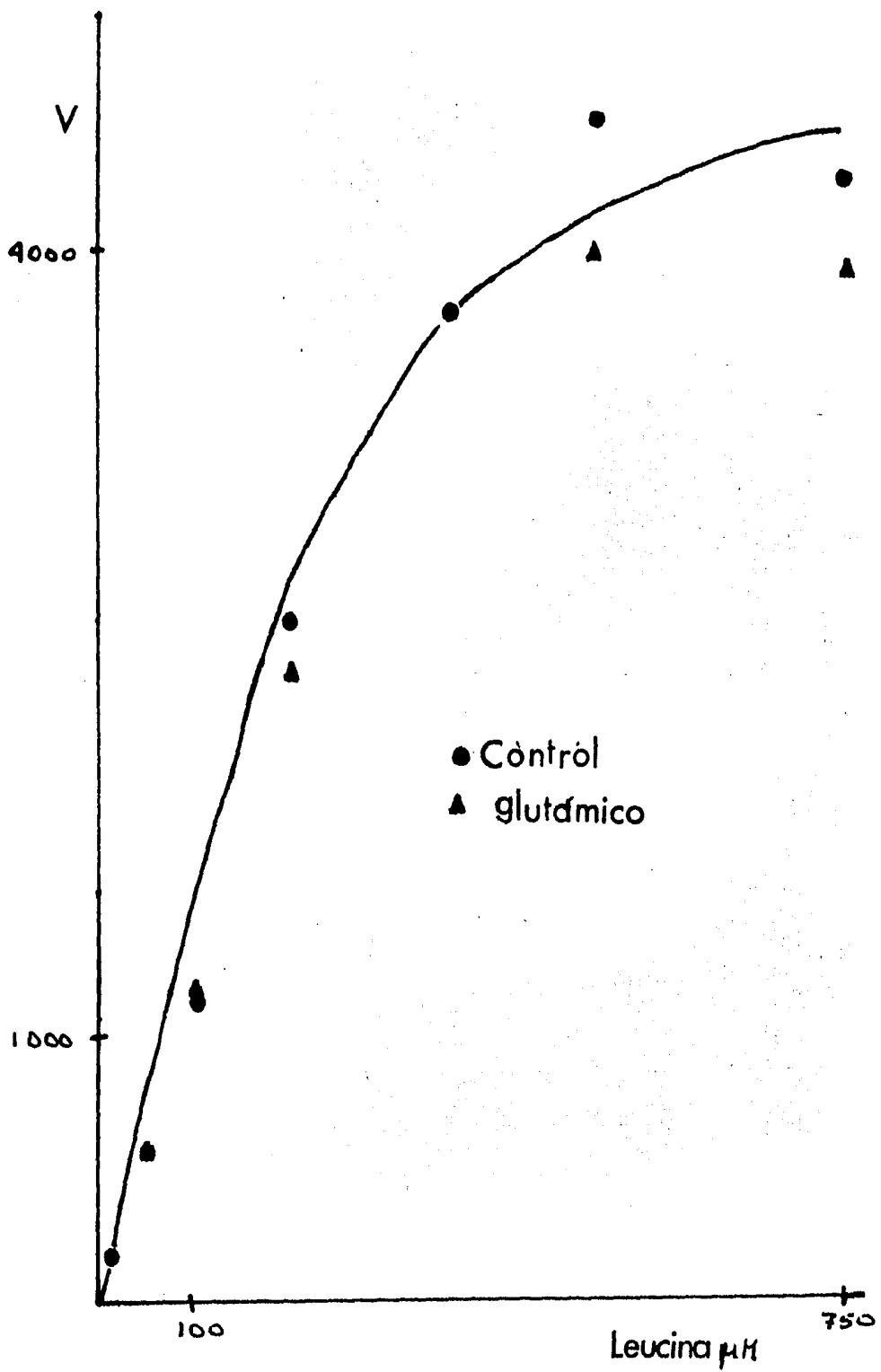


TABLA II. Efecto del pH del medio sobre la captación de leucina, en células sin energía metabólica, Las levaduras fueron puestas en distintos amortiguadores 40 mM a los valores de pH indicados, durante 5 min en presencia de 15 μ M de antimicina, transcurrido este tiempo, se agregó 100 μ M de L- (3 H)- Leucina; 3 min después se tomaron muestras y se determinó la captación, de acuerdo con lo señalado en la sección de materiales y métodos, (n = 2).

AMORTIGUADOR	$\bar{v} \pm s$
Citrato - TEA ... pH 4.0	4.6 \pm 0.0
Malato - TEA pH 5.0	3.5 \pm 0.4
MES - TEA pH 6.0	4.2 \pm 0.4
HEPES - TEA pH 7.5	9.0 \pm 1.7
Tris - HCl pH 8.5	10.1 \pm 0.3

En la tabla II, se puede observar que en las células cuyo metabolismo ha sido limitado, mediante la ausencia de sustratos metabólicos y con el empleo de un inhibidor de la respiración:

1. A todos los valores probados de pH del medio, la captación de leucina es insignificante, comparada con los valores obtenidos en células cuyas condiciones metabólicas son favorables.
2. A diferencia de lo reportado por Eddy en relación con el transporte de glicina en *S. carlsbergensis* (33), las captaciones de leucina obtenidas con un pH del medio bajo, no son mayores que las obtenidas a pH alto.

Así, en vista de que no fue posible detectar ningún efecto notorio del pH en células sin reservas energéticas, y considerando que Eddy ha señalado que los sistemas de transporte de aminoácidos pueden ser afectados por el pH del medio de manera distinta, dependiendo del estado metabólico de las levaduras (33), procedimos a estudiar, el efecto del pH en células cuyo metabolismo se encontrara en las condiciones normales de cada experimento, mediante la preincubación con glucosa anteriormente señalada. Los resultados mostrados en las figuras 11 y 12 indican que:

1. En levaduras cuyo metabolismo se halla en condiciones "energizadas", el transporte de leucina es dependiente del pH externo.
2. La captación de leucina es máxima, cuando el pH del medio en que se encuentran las células al momento de agregar el aminoácido es de 6.0, independientemente de cual haya sido el pH del medio durante el tiempo de preincubación con glucosa.

FIGURA 11.

Efecto del pH sobre la captación de leucina en células cuyo metabolismo se halla en condiciones favorables. Las levaduras fueron preincubadas durante una hora con 150mM de glucosa en un buffer citrato-TEA 20mM pH 3.5; al término de este tiempo las células fueron lavadas dos veces por centrifugación durante 5 min, después de lo cual fueron resuspendidas en un medio con 150mM de glucosa, 100 μ M de L-(3 H)-Leucina y un buffer variable según el valor de pH indicado en el eje de las abcisas, a saber: citrato-TEA pH 3.5 20mM, MES-TEA pH 6.0 20mM, o HEPES-TEA pH 7.5 20mM; 3 minutos después se extrajeron muestras y se determinó la captación.

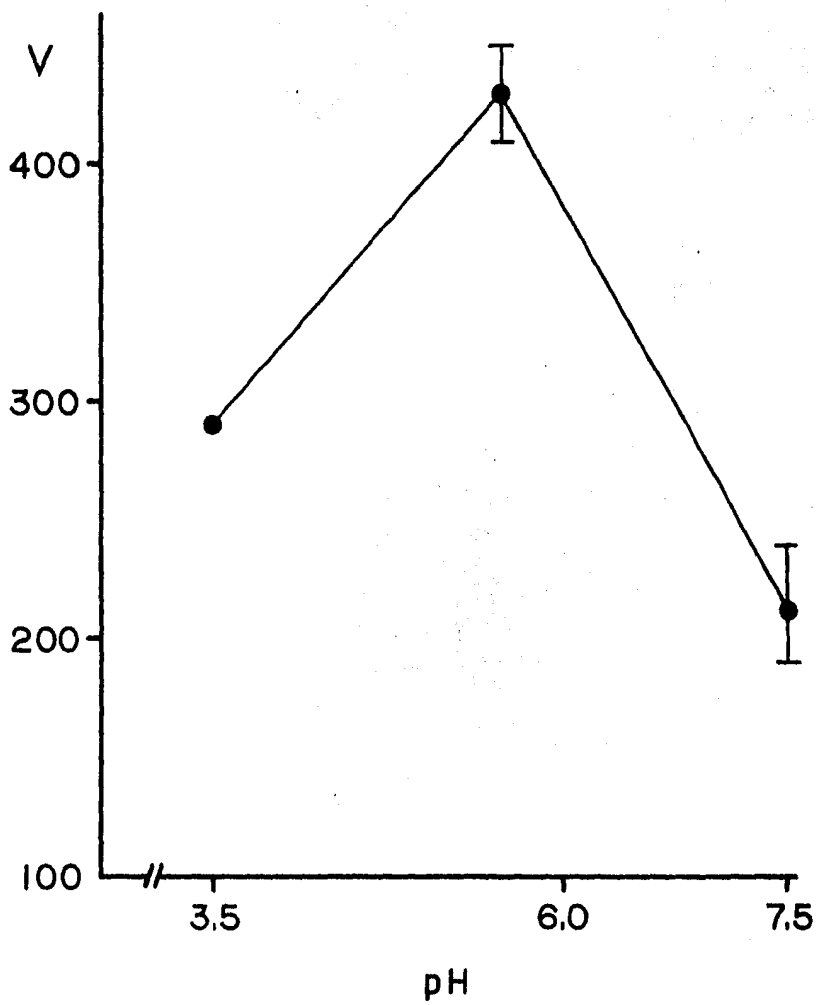
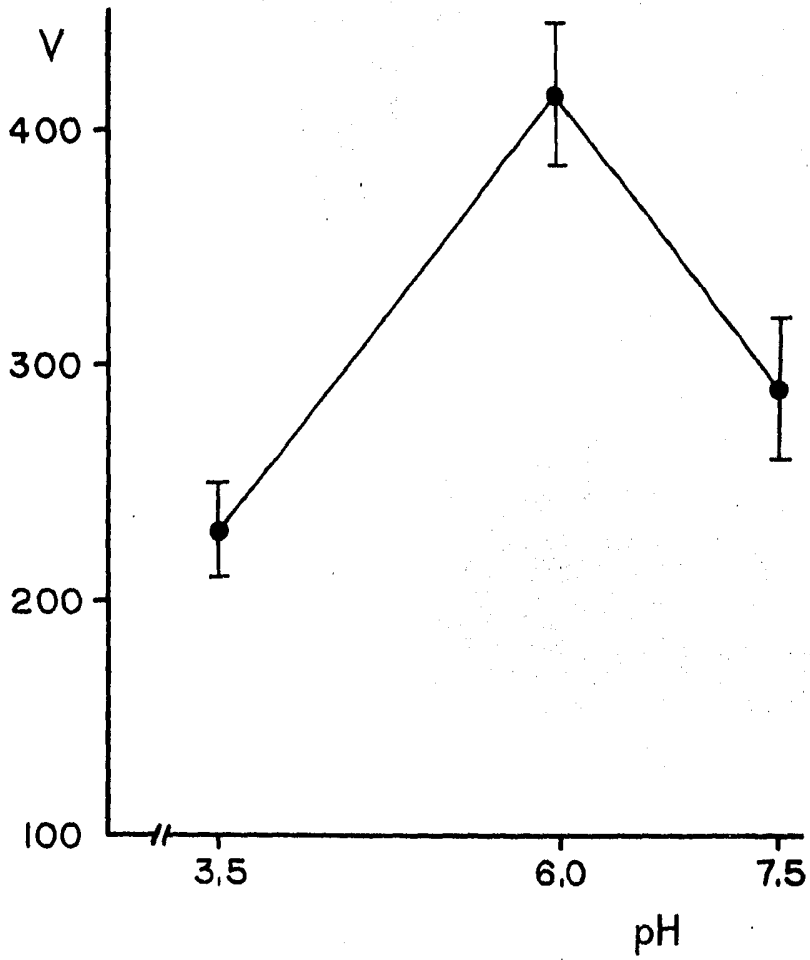


FIGURA 12.

Efecto del pH sobre la captación de leucina en células cuyo metabolismo se halla en condiciones favorables. Las condiciones experimentales, son iguales a las indicadas en la figura 11, excepto que el buffer en el que se preincubó a las levaduras en presencia de glucosa, fué HEPES-TEA pH 7.5 20mM.



Como se señaló en la introducción, los flujos de H^+ y K^+ , a través de la membrana plasmática de levaduras del género Saccharomyces, aunque se llevan a cabo por sistemas de transporte distintos, se encuentran estrechamente relacionados, probablemente a través del elemento común al H^+ y al K^+ a saber, el potencial de membrana (23, 24), tendiendo las levaduras a mantener un pH interno constante e igual a 6.0 (24). Dada la dependencia del transporte de leucina, respecto al pH del medio en células energizadas con glucosa, nos pareció interesante explorar el efecto del K^+ sobre el transporte a distintos valores de pH externo, y compararlos con el efecto que pudiera tener el Na^+ , dado el conocido papel que este último catión juega en los sistemas de transporte de eucariotes superiores (7, 11) y de algunas bacterias (16), los resultados que aparecen en la figura 13, muestran que:

1. Independientemente de cual sea el pH del medio, el K^+ (5 mM) agregado a las levaduras junto con la glucosa, una hora antes que la leucina, estimula notablemente la captación de este aminoácido.
2. A diferencia del K^+ , el Na^+ no presentó ningún efecto notorio sobre el transporte, (ver también la figura 17).

Como puede verse en la figura 14, a pH 6.0 el efecto estimulante del K^+ , es dependiente de la concentración de este catión en el medio, siendo mayor cuando la concentración de K^+ , se encuentra por encima de su K_m el cual según Rothstein, es de 0.5 mM (41). Estos resultados y en particular los concernientes al K^+ , nos parecieron muy interesantes, dado que Eddy ha señalado que al menos por lo que toca al transporte de glicina, el K^+ tiene un efecto inhibitor sobre el transporte, pero que este efecto puede variar de una manera difícil de interpretar en función

FIGURA 13.

Efecto del KCl y del NaCl agregados durante la preincubación, sobre la captación de leucina en función del pH del medio. Las células fueron puestas en presencia de 150mM de glucosa con 5mM de KCl o 5mM de NaCl, en amortiguadores 20mM a los valores de pH indicados en el eje de las abcisas; se preincubaron por una hora, y al finalizar este tiempo, se agregó 100 μ M de L-(³H)-Leucina, tomándose muestras a los 3 min para determinar la captación.

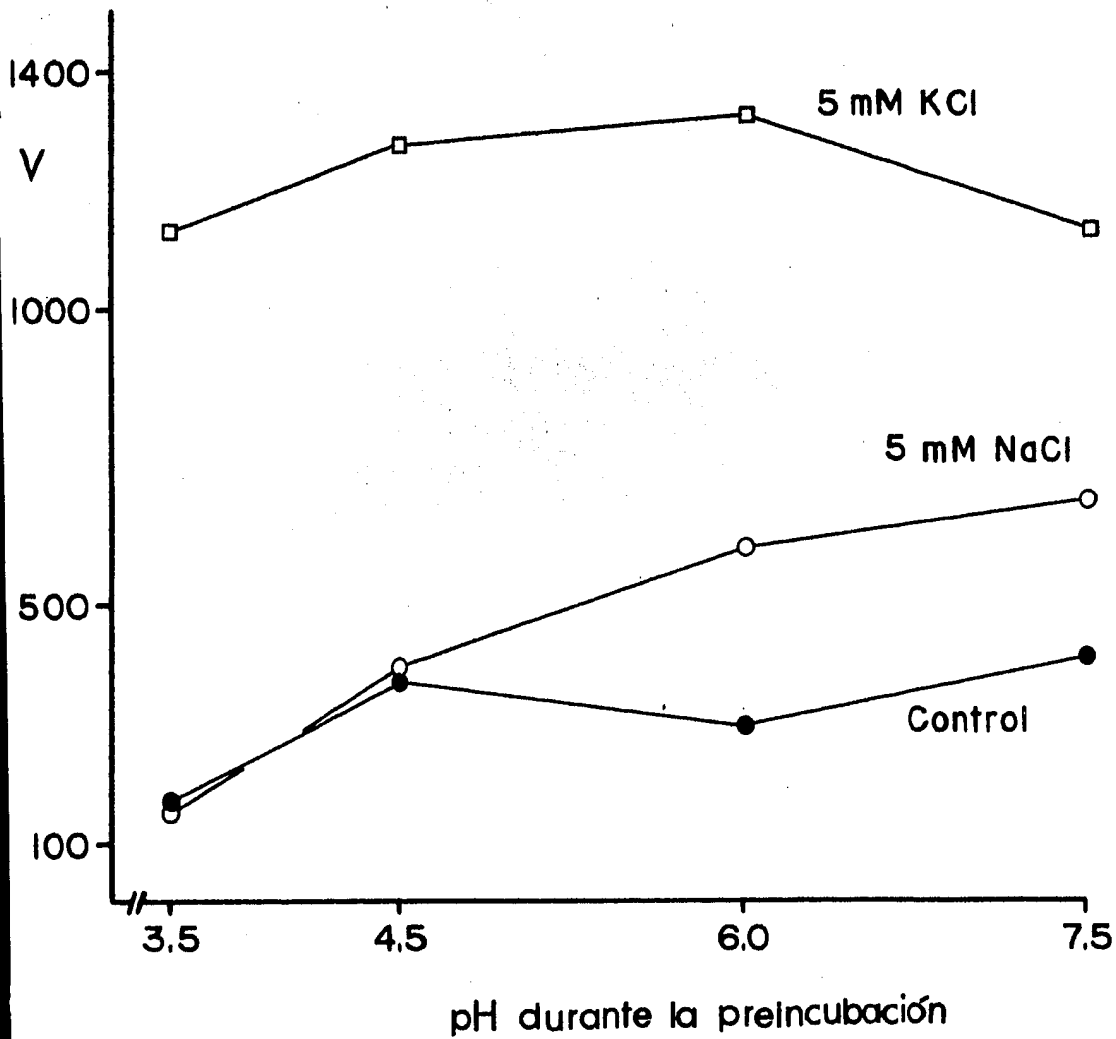
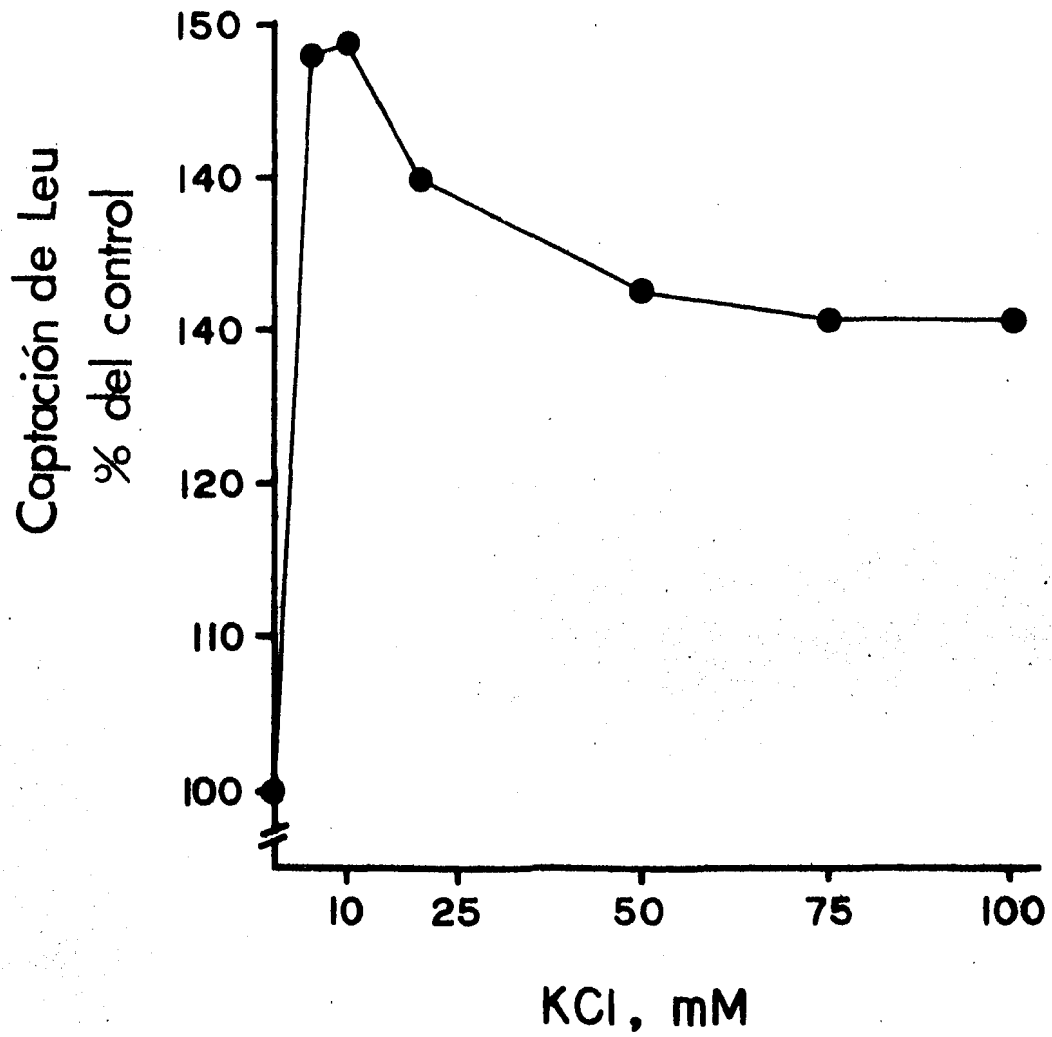


FIGURA 14.

Efecto de la concentración externa de K^+ durante el tiempo de preincubación, sobre el transporte de leucina. Las levaduras fueron preincubadas durante una hora a pH 6.0, con 150mM de glucosa y las concentraciones de K^+ indicadas en el eje de las abcisas; transcurrido este tiempo, se agregó 100 μ M de L-(3H)-leucina y 3 minutos después se determinó la captación.



del estado metabólico de las levaduras (33). Por esta razón, decidimos explorar el efecto del K^+ , bajo otras condiciones experimentales y compararlo con el del Na^+ ; la figura 15 muestra que a pH 6.0 en células energizadas, el Na^+ agregado al mismo tiempo que la leucina, tiene un ligero efecto inhibitorio sobre el transporte, solo a concentraciones altas. En la figura 17 se puede observar que 50 mM de Na^+ agregado al mismo tiempo que la leucina, no altera la cinética del transporte; por otro lado, a diferencia de lo mostrado en la figura 13, cuando el K^+ se agrega a las levaduras al mismo tiempo que la leucina, produce una inhibición en el transporte; aún a concentraciones bajas, según se puede ver en la figura 16. Las figuras 18 y 19, muestran el efecto de agregar 50 mM de K^+ al mismo tiempo que la leucina sobre la cinética del transporte.

En conclusión, parece ser que el Na^+ no tiene ninguna relación con el transporte de leucina, en tanto que el K^+ juega un papel que parece depender del tiempo que las células pasan en presencia de este catión, antes de agregar la leucina (comparar las figuras 13, 14 y 16); los resultados que aparecen en la figura 20, lo muestran claramente.

FIGURA 15.

Efecto de la concentración externa de Na^+ sobre el transporte de leucina. Las condiciones experimentales, son las mismas que las de la figura 14; excepto que el Na^+ , se agregó a las células al mismo tiempo que la leucina, a las concentraciones indicadas en el eje de las abcisas.

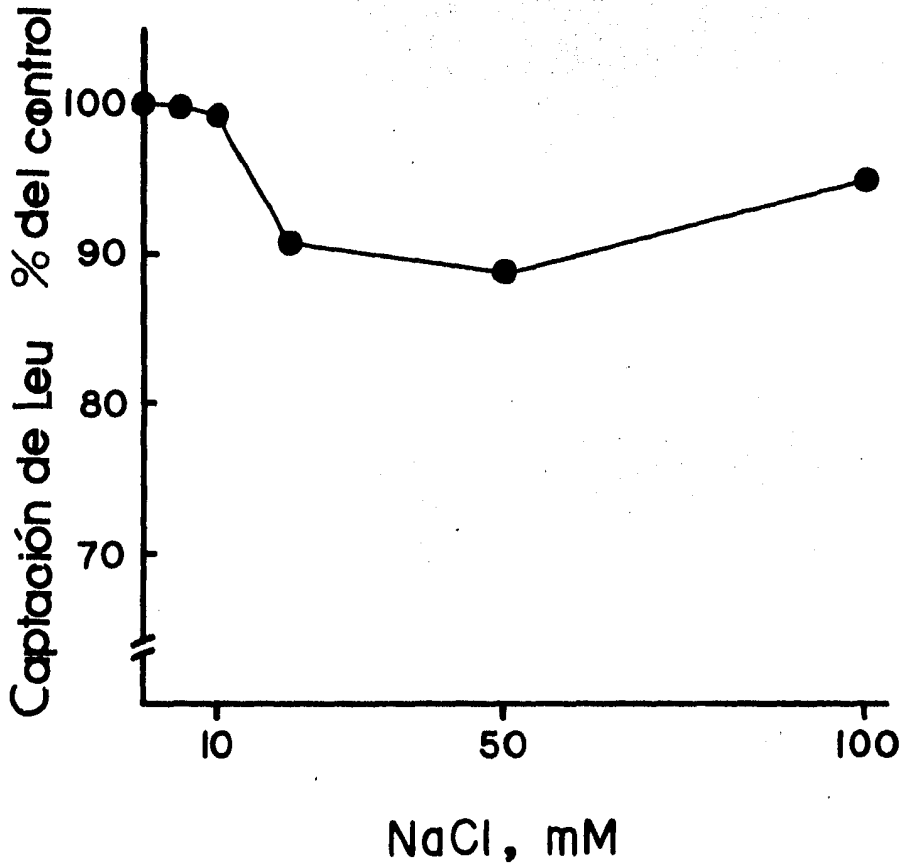


FIGURA 16.

Efecto de la concentración externa de K^+ , sobre el transporte de leucina. Las condiciones experimentales, son las mismas que las de la figura 15, excepto que en vez de NaCl se agregó KCl.

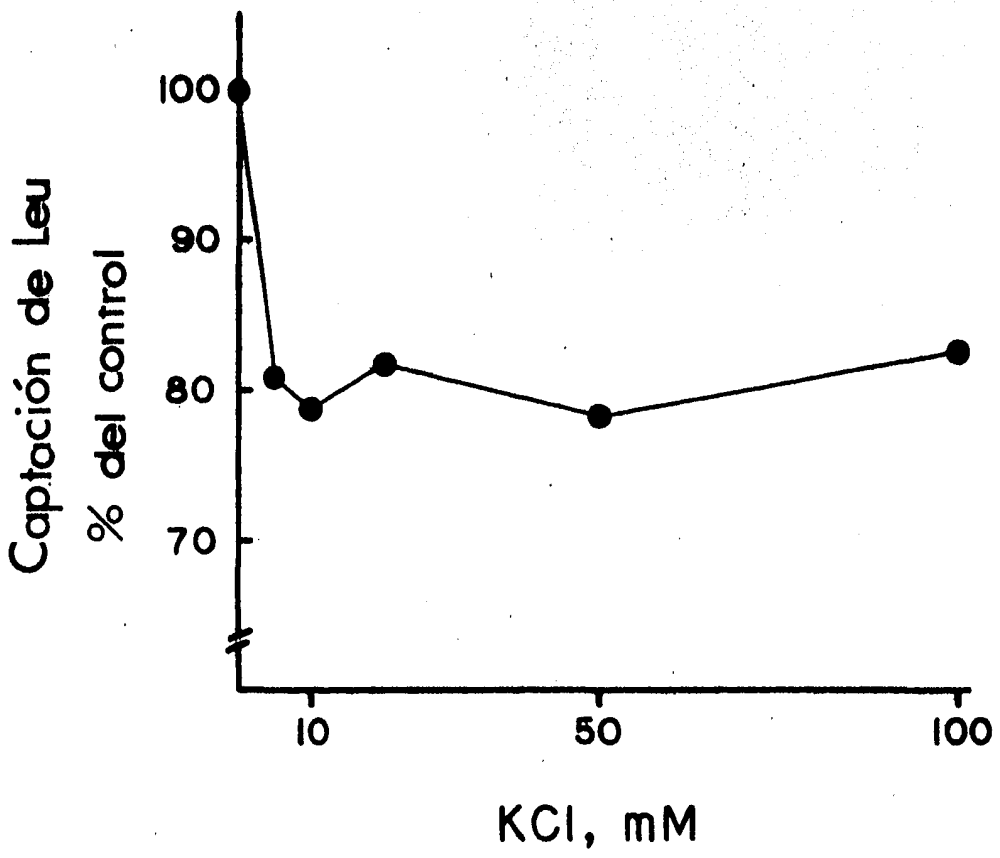


FIGURA 17.

Efecto de 50mM de NaCl sobre la cinética del transporte de leucina. Las condiciones experimentales, son las mismas que las de la figura 6; excepto que se agregó 50mM de NaCl como inhibidor.

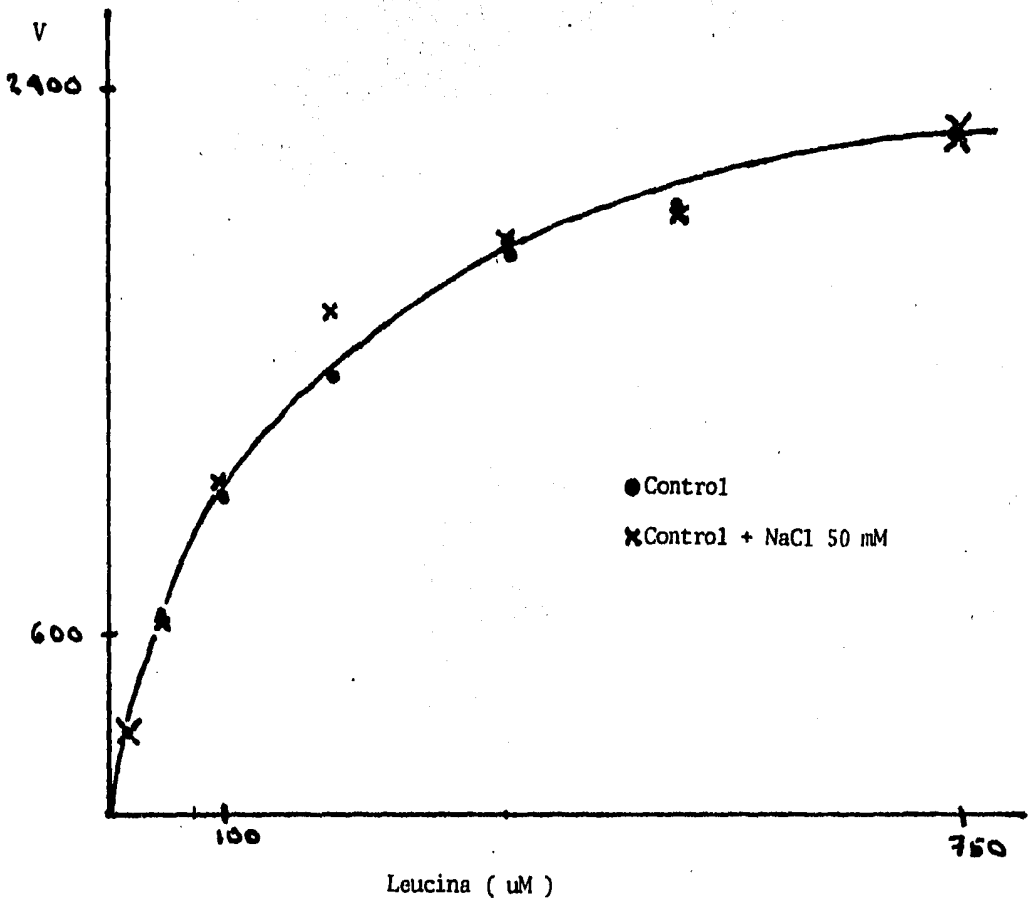


FIGURA 18.

Efecto de 50mM de KCl sobre la cinética del transporte de leucina. Las condiciones experimentales, son las mismas que las de la figura 17, excepto que aquí se agregó 50mM de KCl como inhibidor.

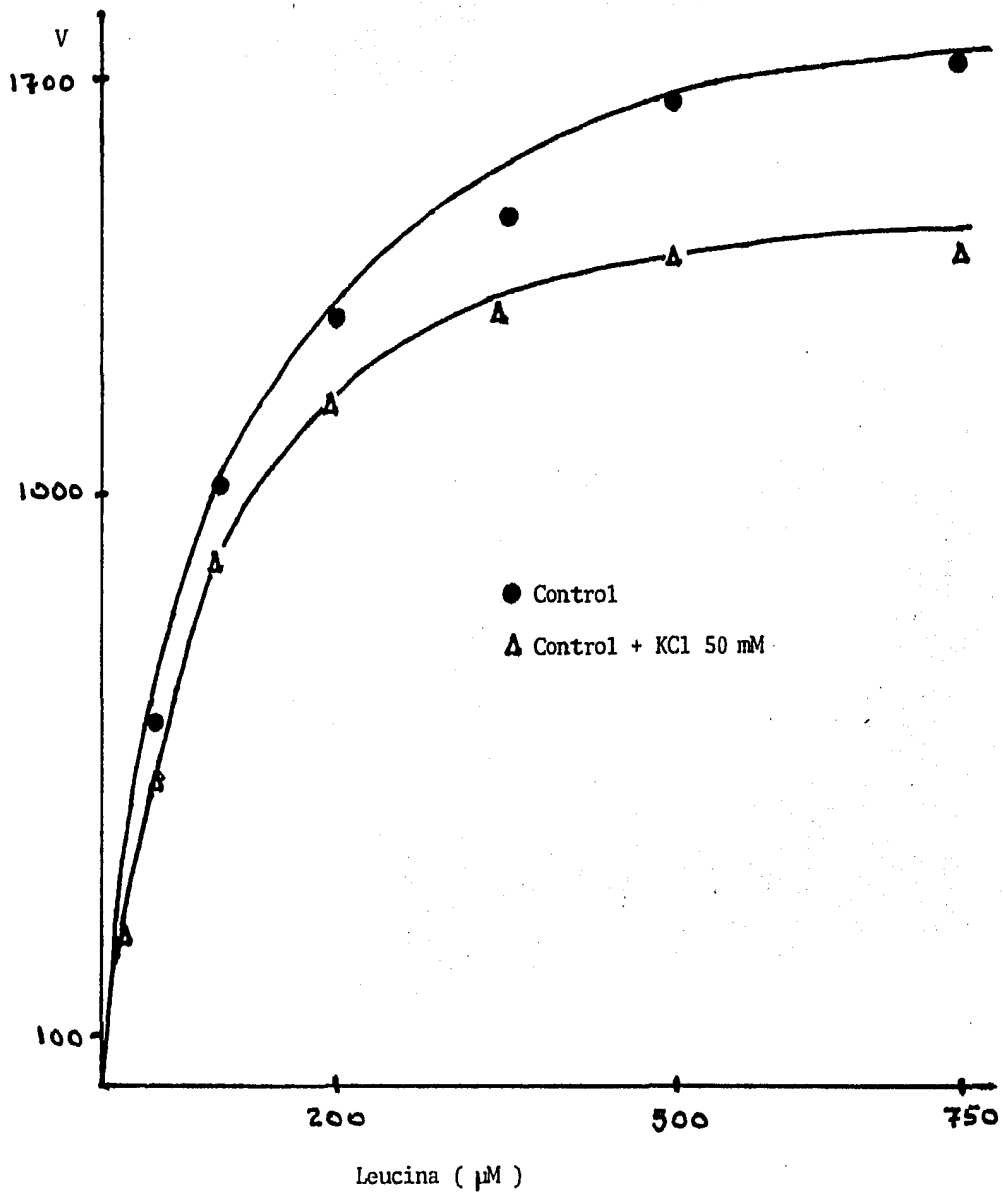


FIGURA 19.

Gráfica de Hofstee de los datos presentados en la figura 18.

Control : $K_m = 120\mu\text{M}$; $V_{\text{max}} = 2040$ nmolas leucina/g.3min

Control + 50mM KCl : $K_m = 103\mu\text{M}$; $V_{\text{max}} = 1667$ nmolas leucina/g.3min.

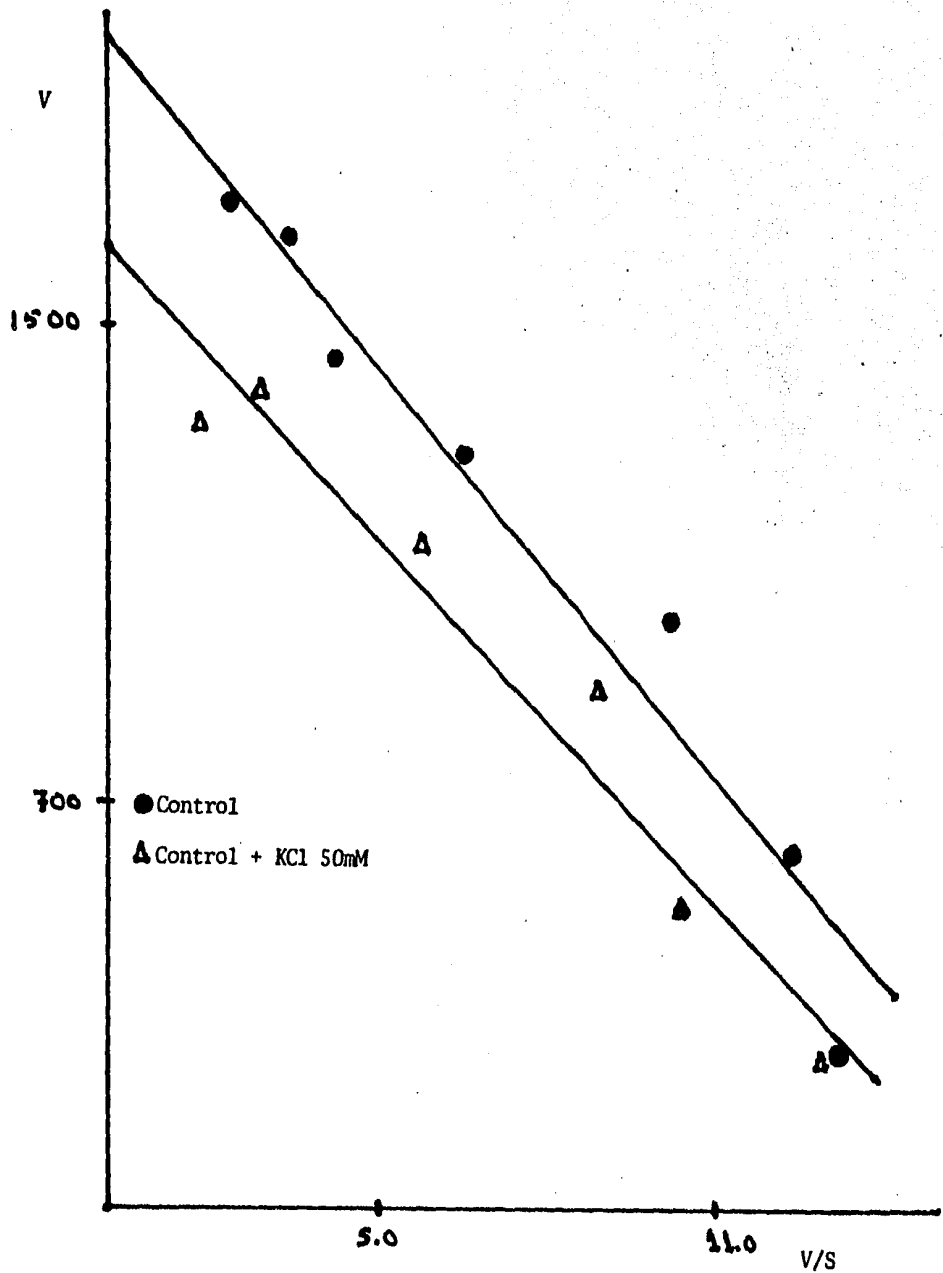
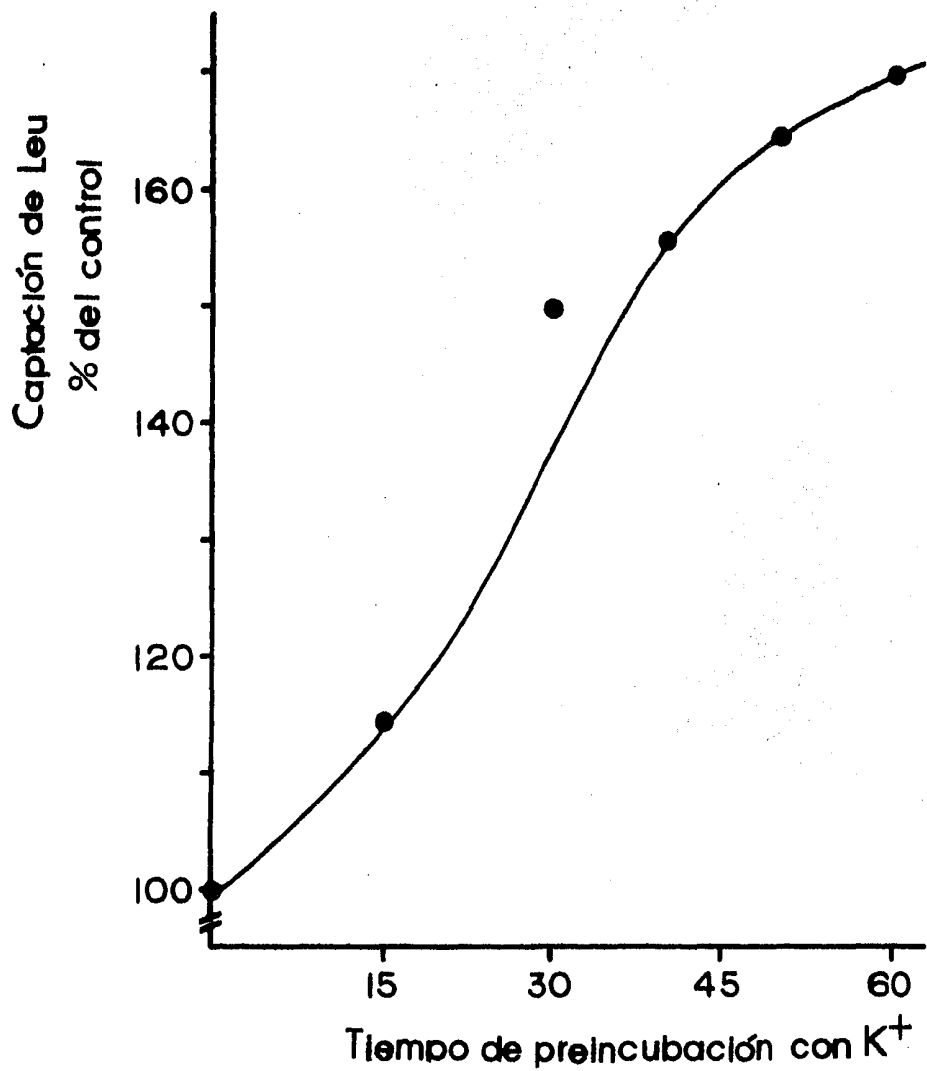


FIGURA 20.

Efecto del tiempo de preincubación en presencia de K^+ , sobre el transporte de leucina. Todas las células fueron preincubadas a pH 6.0, con 150mM de glucosa durante 60 min; en el transcurso de este tiempo se les fué agregando 5mM de KCl, de tal forma que el tiempo de preincubación en presencia de este cation es el indicado en el eje de las abcisas. Al transcurrir los 60 min de preincubación, se agregó 100 μ M de L-(3H)-Leucina y 3 min después se determinó la captación.



DISCUSION Y CONCLUSIONES

El transporte de leucina en *S. cerevisiae*, es un proceso dependiente de energía en el que se requieren tiempos largos de preincubación con glucosa (una hora), con objeto de obtener buenas captaciones. Este requisito pudiera deberse a que durante este tiempo se efectúa la síntesis del acarreador, o bien a que algún producto del metabolismo, que se acumula durante todo este tiempo, guarda relación con el transporte de leucina; para poder esclarecer este punto es necesario realizar más estudios. A diferencia de lo reportado por Stoppani (36), en nuestras condiciones de trabajo, el transporte de leucina se da a través de un solo sistema saturable; a este respecto cabe recordar que Grenson (27) ha reportado que para el transporte de aminoácidos, en adición a permeasas específicas, existe una permeasa general, capaz de mediar la entrada de aminoácidos neutros y básicos, con excepción de la prolina. Los estudios de inhibición que realizamos, muestran que en nuestras condiciones experimentales, la leucina no está siendo transportada por medio de esta permeasa general, pues si así fuera, la lisina y la alanina hubiesen producido una inhibición de tipo competitivo sobre el transporte (27). Es posible que en nuestras condiciones de trabajo, la actividad de la permeasa general, se encuentre inhibida.

La salida de marca que se observa en la figura 3, para tiempos de incubación mayores a 5 min. con leucina radiactiva, se produjo en todos los experimentos que de este tipo realizamos (n = 3). La explicación de este fenómeno no fue investigada dentro del presente trabajo por caer fuera de nuestros objetivos principales.

Los resultados presentados en la tabla II, muestran que en células sin reservas energéticas, el establecimiento artificial de un Δ pH a través de la membrana plasmática, no es capaz de producir una captación significativa de leucina. Este resultado, está en desacuerdo con la hipótesis de Eddy, según la cual en células sin reservas energéticas el gradiente electroquímico de H^+ es la fuerza impulsora del transporte exergónico de aminoácidos, manteniéndose el balance de carga eléctrica mediante un eflujo equivalente de K^+ . No obstante, antes de poder descartar esta hipótesis, necesitamos estudiar los cambios en la concentración de K^+ y H^+ , que ocurran en el medio en que se encuentran las levaduras al adicionar la leucina.

A diferencia de lo encontrado con células sin energía, cuando las condiciones metabólicas de las levaduras son favorables, el transporte de leucina es dependiente del pH del medio al momento de agregar el aminoácido, produciéndose una captación máxima a pH 6.0 (dentro de los valores de pH que se estudiaron); tal vez éste es el pH óptimo para el funcionamiento del transportador de leucina. Este resultado es el mismo encontrado por Tang, en relación con el transporte de ácido glutámico en el hongo Cryptococcus albidus (42).

Respecto al papel del K^+ en el transporte de leucina, se obtuvieron los siguientes resultados:

I) El efecto del K^+ depende del tiempo de preincubación de las levaduras con este catión, yendo desde un ligero efecto inhibitorio cuando es agregado al mismo tiempo que la leucina, hasta claramente estimulante, cuando las células se preincuban con éste antes de adicionar el aminoácido.

II) Tanto el efecto inhibitorio, como el efecto estimulante que puede presentar el K^+ en función del tiempo de preincubación de las levaduras con este catión, son dependientes de la concentración de K^+ . Esta dependencia es más notoria a concentraciones de K^+ cercanas a su K_m (ver figuras 14, 15, 16 y 18).

De acuerdo con lo anterior, caben varias posibilidades para explicar el fenómeno, así, la dependencia que guarda el efecto del K^+ con su concentración, parece indicar que el transporte mismo del K^+ está involucrado directamente en el transporte de leucina; por otro lado pudiera ser que el K^+ , simplemente esté ocasionando cambios en el potencial de membrana, que necesariamente alterarían el gradiente electroquímico de otros iones, como por ejemplo el del H^+ mismo, los cuales entonces influirían sobre el transporte de leucina; por último pudiera ser que el K^+ , esté provocando cambios dentro de la propia membrana, que afectan entre otras cosas al transporte de aminoácidos; todas estas posibilidades, requieren ser estudiadas, para poder explicar los resultados encontrados en este trabajo. Finalmente, se encontró que el Na^+ no tiene ningún papel dentro del transporte de leucina.

En conclusión, los resultados presentados indican que al menos en condiciones metabólicas favorables, el mecanismo de transporte de leucina, no está dado por un mecanismo simple de cotransporte con H^+ , quedando como un aspecto interesante a investigar, el papel que el K^+ tiene dentro de este proceso.

BIBLIOGRAFIA

- 1 . Harold, F.M. (1981). Pumps and Currents: A Biological Perspective. Curr. Topics of Membranes and Transport.
- 2 . Kotyk A., and Janacek, K. (1980). Energy-Dependent Processes in Biological Membranes. *Studia Biophysica*. Berlin. 81: 27-33.
- 3 . Kotyk A., Strazinsky, R., and Slavik, J. (1982). Electrochemical potential of protons and active transport in several yeast species. *Studia Biophysica*. Berlin. 90: 17-18.
- 4 . Neame, D.K., y Richards, G.T. (1976). Cinética del transporte a través de membranas. H. Blume Ediciones. Madrid.
- 5 . Nobel, P.S. (1974). *Biophysical Plant Physiology*. W.H. Freeman and Company. San Francisco.
- 6 . Segel, I.H. (1976). *Biochemical Calculations*. John Wiley and Sons. New York.
- 7 . Lehninger, A.L. (1979). *Biochemistry*. Worth Publishers Ins. New York.
- 8 . Wilson, B.D. (1978). Cellular transport mechanisms. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 933-965.
- 9 . Theuvenet, A.P.R., and Borst-Pauwels, G.W.F.H. (1976). The influence of surface charge on the kinetics of ion-translocation across biological membranes. *J. Theor. Biol.* 57: 313-329.
- 10 . Borbolla, M., and Peña, A. (1980). Some characteristics of Ca^{2+} uptake by yeast cells. *J. Membrane Biol.* 54: 149-156.
- 11 . Eddy, A.A. (1981). The aminoacid pumps of living cells. *Sci. Prog. Oxf.*

12. Eddy, A.A. (1978). Proton dependent solute transport in microorganisms. *Curr. Topics In Membranes and Transport*, 10:279-360.
13. Harold, F.M. (1972). Conservation and transformation of energy by bacterial membranes. *Bacteriol. Rev.* 36:172-230.
14. Gunn, B.R. (1980). Co-and-Counter-Transport mechanisms in cell membranes. *Ann. Rev. Physiol.* 42:249-259.
15. Poole, J.R. (1978). Energy coupling for membrane transport in plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 29:437-460.
16. Langi, K.J. (1979). The role of Na^+ in transport processes of bacterial membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 559:337-397.
17. Ring, K., Ehle, H., and Foit, B. (1976). Effect of alkali ions on the active transport of neutral aminoacids into Streptomyces hydrogenans. *Biochim. Biophys. Acta.* 433:615-629.
18. Dobzhansky, T., Ayala, F.J., Stebbins, G.L., Valentine, J.W. (1980). *Evolución*. Ediciones Omega.
19. Peña, A. (1976). The proton pump in the yeast cell membrane in mitochondria (Packer, L., and Gómez-Poyou, A. eds.) pp:21-30, Academic Press, New York.
20. Peña, A. (1981). The transport of cations in yeast: Characteristics and postulated mechanisms. *Proceedings of the Vth International Symposium on Yeast*. Pergamon Press. pp: 305-309.
21. Peña, A. (1973). Studies with guanidines on the mechanism of K^+ transport in yeast. *FEBS Letters*. 34:117-119.
22. Peña, A., and Ramirez, G. (1975). Interaction of Ethidium Bromide with the transport system for monovalent cations in yeast. *Arch. Biochim. Biophys.* 167:397-409.

23. Peña, A. (1975). Studies on the mechanism of K^+ transport in yeast. Arch. Biochim. Biophys. 167:397-409.
24. De la Peña, P., Barros, F., Gascon, S., and Lazo, S.P. (1982). The electrochemical proton gradient of Saccharomyces. Eur. J. Biochem. 123:447-453.
25. Sigler, K., Knorkova, A., and Koty, K. A. (1981). Factors governing substrate induced generation and extrusion of protons in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Biochim. Biophys. Acta. 643:572-582.
26. Goffeau, A., and Slayman, W.C. (1981). The proton translocating ATP-ase of the fungal plasma membrane. Biochim. Biophys. Acta. 693:197-223.
27. Grenson, M., Hou, C., and Crabeel, M. (1970). Multiplicity of the amino acid permease in Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol. 103:770-777.
28. Shukla, H., Viswanathan, L., and Sing, M. (1982). A specific inducible serine transport system in distillers yeast Saccharomyces cerevisiae. Biochim. Internat. 5:253-262.
29. Eddy, A.A., Backen, K., and Watson, G. (1970). The concentration of amino acids by yeast cells depleted of adenosine triphosphate. Biochem. J. 120:835-858.
30. Seaston, A., Inkson, C., and Eddy, A.A. (1973). The absorption of protons with specific amino acids and carbohydrates by yeast. Biochem. J. 134:1031-1043.
31. Cockburn, M., Ernshaw, P., and Eddy, A.A. (1975). The stoichiometry of the absorption of protons with phosphate and L-glutamate by yeast of the genus Saccharomyces. Biochem. J. 146:705-712.
32. Eddy, A.A., and Nowaki, J.A. (1971). Stoichiometrical proton and potassium ion movements accompanying the absorption of amino acids by the yeast Saccharomyces carlsbergensis. Biochem. J. 122:701-711.

33. Eddy, A., Indge, K. J., Backen, K., and Nowaki, J. A. (1970). Interaction between potassium ions and glycine transport in the yeast Saccharomyces carlsbergensis. Biochem. J. 120:845-852.
34. Kotyk, A., Rihova, L., and Ponec, M. (1971). Uptake of aminoacids by actidione treated yeast cells. III. Effect of sodium and potassium ions. Fol. Microbiol. 16:451-453.
35. Ramos, E. H., De Bongioanni, L. C., Claisee, M. L., and Stoppani, A. O. M. (1975). Energy requirements for the uptake of L-leucine by Saccharomyces cerevisiae. Biochim. Biophys. Acta. 399:470-481.
36. Ramos, E. H., De Bongioanni, L. C., and Stoppani, A. O. M. (1980). Kinetics of L-(¹⁴C) Leucine transport in Saccharomyces cerevisiae. Biochim. Biophys. Acta. 599:214-231.
37. Ramos, E. H., De Bongioanni, L. C., Guesta Casado, M. C., and Stoppani, A. O. M. (1977). Some properties of L-(¹⁴C) Leucine transport in Saccharomyces ellipsoideus. Biochim. Biophys. Acta. 467:220-237.
38. Peña, A., Piña, M., Escamilla, E., and Piña, E. (1977). A novel method for the rapid preparation of coupled yeast mitochondria. FEBS. Letters. 80:209-213.
39. DE Kloet, S., Van Wermerskerken, R., and Konins Berger, V. (1961). Studies on protein synthesis by protoplasts of Saccharomyces carlsbergensis I. The effect of ribonuclease on protein synthesis. Biochim. Biophys. Acta. 47:138-143.
40. Fricke, V. (1975). Tritosol: A new scintillation cocktail based on Triton X-100. Anal. Biochem. 63:555-558.

41. Armstrong, W. McD., and Rothstein, A. (1967). Discrimination between alkali metal ions by yeast. II. Cations interactions in transport. *J. Gen. Physiol.* 50:967-987.
42. Tang, S. L., and Howard, D. H. (1973). Uptake and utilization of glutamic acid by Cryptococcus albidus. *J. Bacteriol.* 115:98-106.