

00562
5
24

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

**Facultad de Química
División de estudios de posgrado**

**Desacoplamiento de la fotofosforilación
en relación con la hipótesis quimiosmótica**

**Tesis que para obtener el grado de
maestro en Ciencias Químicas (Bioquímica)
Presenta EFREN GIRALDO RINCON**

1989

**TESIS CON
FALLA EN EL ORIGEN**



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.

CONTENIDO

	Página
ABREVIATURAS	4
SUMMARY	6
RESUMEN	7
INTRODUCCION.....	8
TRANSDUCCION DE ENERGIA A TRAVES DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS..	11
POSTULADOS BASICOS DE LA HIPOTESIS QUIMIOSMOTICA	12
-Gradiente electroquímico transmembranal de iones hidrógeno	14
-Formación de un campo eléctrico.....	15
-Formación de la diferencia de pH	15
-Fotofosforilación.....	16
EVIDENCIAS EXPERIMENTALES QUE APOYAN LA HIPOTESIS QUIMIOSMOTICA.....	18
RESULTADOS EXPERIMENTALES INCONGRUENTES CON LA HIPOTESIS QUIMIOSMOTICA.....	19
OTRAS HIPOTESIS DE ACOPLAMIENTO.....	20
-Modelo de acoplamiento en dos fases: Hipótesis de Williams	21
-Modelo de acoplamiento en cinco fases: Hipótesis de Kell.	21
-Hipótesis de acoplamiento por mosaico protónico	22
-Hipótesis de acoplamiento directo	23
TRANSPORTE DE ELECTRONES EN LA FOTOSINTESIS	24
-El cloroplasto.....	24
-Cadena transportadora de electrones	26
-Fotosistema II y liberación de oxígeno	29
-Fotosistema I	30
ESTEQUIOMETRIAS DE LA CONVERSION DE ENERGIA FOTOSINTETICA	31
-Relación ATP/2e ⁻	31

-Relación H^+/e^-	32
-Relación H^+/ATP	33
INHIBICIÓN DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES Y DE LA FOSFORILACION EN CLOROPLASTOS AISLADOS	34
-Inhibición del transporte de electrones	34
-Inhibidores de la transferencia de energía en cloroplastos	40
RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD	43
-Parámetros hidrofóbicos	44
-Parámetros electrónicos	45
DESACOPLAMIENTO ENTRE EL TRANSPORTE DE ELECTRONES Y LA SINTESIS DE ATP	46
-Desacoplantes protonóforos	47
-Desacoplantes no protonóforos	51
-Interacción de desacoplantes con componentes de la membrana interna mitocondrial	52
-Desacoplamiento por picrato	54
-Desacoplantes de la fotofosforilación	55
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	63
MATERIALES Y METODOS	63
-Compuestos químicos usados	63
-Obtención de valores de pK_b , Sigma y coeficientes de partición	63
-Aislamiento de cloroplastos clase II	63
-Determinación de clorofila	65
-Determinación de la velocidad de transporte de electrones fosforilantes	66
-Medición de la síntesis de ATP	72
-Medición de la bomba de protones	75
-Obtención de liposomas unilamelares con pigmento piranina atrapado	77

-Flujo de protones a través de la membrana y relación con la fluorescencia de la piranina atrapada	79
RESULTADOS Y DISCUSION	82
-Transporte de electrones fotofosforilante	82
-Biosíntesis de ATP	88
-Captación de protones	94
-Conducción de protones en liposomas	109
DISCUSION	119
-Desacoplamiento por aminas	119
-Desacoplamiento por amidas	129
-Desacoplamiento por 2,6 dibromofenoles	132
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	140
REFERENCIAS	143

Abreviaturas

MV =	metilviológeno
e ⁻ =	electrones
Te =	transporte de electrones
Tef =	transporte de electrones fosforilante
ueq =	microequivalentes
Fecy =	Ferricianuro
PSI =	Fotosistema I
PSII =	Fotosistema II
PQ =	Plastoquinona
PC =	Plastocianina
P680 =	Pigmento que absorbe luz de 680 nanómetros (nm)
P700 =	Pigmento que absorbe luz de 700 nanómetros (nm)
PQH ₂ =	Plastohidroquinona
Fd =	ferredoxina
DPC =	difenilcarbazido
DCPIP =	diclorofenolindofenol
TMPD =	N-tetrametil-p-fenilendiamina
DAD =	diaminodurool
PD =	fenilendiamina
DCMU =	Diclorofenildimetilurea
DBMIB =	Dibromometil-isopropil-p-benzoquinona
DSPD =	Disaliciliden propanodiamina
DCCD =	N,N' Diciclohexilcarbodiimida
mV =	milivoltio
DNP =	2,4 dinitrofenol
CCCP =	Carbonilcianuro m-clorofenilhidrazona
FCCP =	Carbonilcianuro p-trifluorometoxifenilhidrazona

PMS = fenazina metosulfato

$\Delta\Psi$ = potencial de membrana

$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ = gradiente electroquímico de protones

CF_0, CF_1 = porciones intrínseca y extrínseca respectivamente del complejo ATP sintetasa.

NADP = fosfato de nicotinamida adenin dinucleótido

$h\nu$ = cuantos de luz

SUMMARY

Thirteen compounds among amines, amides, and 2,6 dibromophenols were tested as uncouplers of photophosphorylation in chloroplasts. The uncoupling activities were measured and the relationships between them were compared with the uncoupling potency, which is predicted by the chemiosmotic hypothesis, according to which the uncoupling potency increases with the capacity of protonation and deprotonation of compounds and of their penetration on the hydrophobic membrane.

In the case of each compound, the activities between the phosphorylating electron transport, ATP biosynthesis, and the proton uptake in chloroplasts, as well as proton conductivity through liposomes, were compared. Moreover, studies were conducted by lineal regression of the relationship between each uncoupling activity and the physical-chemical properties of basicity and hydrophobicity for amines and amides.

The results are in agreement with the chemiosmotic hypothesis with respect to phosphorylant electron transport. No correlations were found between the uncoupling potency or protonophoric potency with basicity and/or hydrophobicity for other activities; nor was a clear dependency observed between the degree of phosphorylation inhibition and in the proton uptake collapse.

The results are not in agreement with the protonophoric uncoupling mechanisms through the aqueous phases and they fit better with the proposal of the existence of two proton (H^+) pools: One localized in the membrane and the other delocalized through the bulk aqueous phases.

RESUMEN

Trece compuestos entre aminas, amidas y 2,6 dibromofenoles fueron ensayados como desacoplantes de la fotofosforilación en cloroplastos. Las actividades desacopladas medidas y la relación entre ellas se compararon con la potencia desacoplante predicha por la hipótesis quimiosmótica según la cual la potencia desacoplante se incrementa con la capacidad de protonación y desprotonación de los compuestos y su facilidad de penetrar a través de la membrana hidrofóbica.

Para cada compuesto se compararon entre si las actividades de transporte de electrones fosforilante, síntesis de ATP, y captación de protones en cloroplastos, así como la conducción de protones en liposomas; además se hicieron estudios por regresión lineal de las relaciones entre cada actividad desacoplante y las propiedades fisicoquímicas de basicidad e hidrofobicidad para aminas y amidas.

Los resultados concuerdan con la hipótesis quimiosmótica respecto al transporte de electrones fosforilante. Para las otras actividades no se encontró correlación entre la potencia desacoplante o protonófora con la basicidad v/c hidrofobicidad. No se observó tampoco dependencia clara entre el grado de abatimiento en la síntesis de ATP y el colapso en la captación de protones.

Los resultados no concuerdan con un mecanismo protonóforo de desacoplamiento a través de fases acuosas y se ajustan más a la existencia de dos "pools" de protones: uno localizado en la membrana y otro deslocalizado en las fases acuosas.

INTRODUCCION

Los últimos años han sido de amplio debate en el campo de la Bioenergética, respecto al mecanismo mediante el cual el flujo de electrones a través de cadenas de transporte localizadas en membranas transductoras de energía se acopla a la síntesis de ATP. El Trifosfato de Adenosina (ATP) es la "moneda energética" utilizada universalmente por organismos eucarióticos y procarióticos en los procesos de movilización y utilización de combustible metabólico.

Varias hipótesis se han desarrollado para explicar el interesante y necesario fenómeno que permite hacer el uso más eficiente de la energía que fluye a través de complejos sistemas enzimáticos y así mismo para dar respuesta a los mecanismos de disipación de la energía útil, mediante el desacoplamiento entre el movimiento de electrones que libera energía libre y el consumo de ésta en la biosíntesis de ATP.

En la economía de la célula, los diferentes procesos metabólicos están regulados de tal forma que se obtiene la máxima eficiencia en la utilización de materiales y energía para el funcionamiento óptimo de la misma, independientemente de los mecanismos que se propongan para explicar alguna reacción o ruta metabólica.

Qué importancia tiene entonces que el proceso de acoplamiento o desacoplamiento se lleve a cabo por uno u otro mecanismo?

Evidentemente la eficiencia del proceso no se modifica por ello. Sin embargo, el conocimiento adecuado de como ocurre la

conexión o desconexión entre el transporte de electrones y la síntesis de ATP, permite entender otros fenómenos asociados con estos sistemas enzimáticos, por ejemplo el transporte de iones, naturaleza y conexión entre sistema enzimático de síntesis e hidrólisis de ATP en relación a cadenas de transporte electrónico y los efectos que distintas sustancias (inhibidores, desacoplantes) que afectan un sistema, tienen sobre el otro.

Un enfoque utilizado con frecuencia en la búsqueda de una mejor comprensión de los procesos de acoplamiento y desacoplamiento entre el transporte electrónico y la síntesis de ATP, es mediante el uso de moléculas desacoplantes, y es ésta la estrategia y el objetivo principal que se busca con el presente trabajo.

En la primera parte de esta tesis, se hace una breve revisión de la hipótesis **quimiosmótica** por ser ésta la que mayor aceptación ha tenido desde su formulación en 1961 por el Doctor Peter Mitchell, en la explicación de los procesos de acoplamiento-desacoplamiento y porque los objetivos del presente estudio con desacoplantes están planteados en base a los postulados de la hipótesis quimiosmótica.

Se revisan luego algunas de las evidencias experimentales encontradas en la literatura que favorecen la hipótesis y otras que están en desacuerdo con la misma. Posteriormente, se tratan con brevedad otras hipótesis alternas que han surgido para tratar de explicar los resultados incongruentes con la hipótesis quimiosmótica.

Debido a que se escogió el cloroplasto como sistema para estudiar el desacoplamiento, aparece descrita la cadena de transporte electrónica fotosintética en la membrana tilacoidal del

cloroplasto y algunas sustancias químicas que afectan el flujo de electrones y la fotofosforilación a diferentes niveles. La relación entre parámetros fisicoquímicos de las moléculas desacoplantes y su actividad biológica, es un enfoque que se ha utilizado en el estudio de la potencia y mecanismos de acción de medicamentos, herbicidas y otras sustancias químicas con actividad biológica. Se ha utilizado este enfoque para correlacionar las propiedades de los compuestos en relación a las actividades de desacoplamiento y por ello hay una sección de "Relaciones estructura-actividad".

Por ser de relevancia fundamental, en este trabajo se describe con algún detalle el fenómeno de desacoplamiento tanto de la fosforilación oxidativa como de la fotofosforilación. El mecanismo de desacoplamiento protonóforo más aceptado de acuerdo a la hipótesis quimiosmótica es comparado con el mecanismo no protonóforo. En esta sección se hace una breve descripción de los principales desacoplantes conocidos de la fotofosforilación. Por último, se plantean los objetivos y expectativas de la investigación que se efectuó con aminas, amidas y fenoles en relación con la hipótesis quimiosmótica.

Espero con esta tesis haber logrado una formación adecuada en el campo de la Investigación Bioquímica, que me permita continuar desarrollando trabajos en esta interesante área.

· TRANSDUCCION DE ENERGIA A TRAVES DE MEMBRANAS BIOLOGICAS.

El tema central en Bioenergética durante los últimos años, ha sido tratar de entender los mecanismos por los cuales la energía hecha disponible por la oxidación de sustratos o por absorción de luz, puede ser usada para impulsar reacciones endergónicas como la síntesis de ATP y la acumulación de iones.

Los sistemas transductores de energía están asociados a complejos enzimáticos localizados en membranas específicas: membranas plasmáticas de células procariotas tales como bacterias y algas azul verdosas, membrana interna mitocondrial y la membrana tilacoidal de cloroplastos. El mecanismo de transporte de e^- por estas diversas membranas y la síntesis de ATP están bien relacionados a pesar de la naturaleza diferente de sus fuentes de energía. Las mitocondrias o bacterias respirantes contienen una cadena respiratoria que cataliza la transferencia de e^- cuesta abajo de sustratos a aceptores electrónicos finales tales como el O_2 . En cloroplastos y bacterias fotosintéticas, el complejo del transporte electrónico utiliza la energía disponible de luz visible.

Todas las membranas transductoras de energía contienen ATP sintetasas, complejo enzimático que cataliza la formación de ATP a partir de ADP y P_i incorporando en su estructura gran parte de la energía obtenida durante el transporte electrónico. No obstante aún permanece incierto el mecanismo por el cual el flujo electrónico puede dar lugar a la formación de moléculas de alto nivel energético.

La energía liberada durante el transporte electrónico está

acoplada a la síntesis de ATP a través de un intermediario de alta energía representado usualmente por el símbolo (\sim). Es la naturaleza de este intermediario la que ha estado sujeta a abundante experimentación y discusión en los últimos años. Aunque en la década de 1950 prevaleció la hipótesis química de Slater (1) el fracaso en encontrar un intermediario químico de alta energía hizo que esta hipótesis fuese abandonada.

Posteriormente surgió la hipótesis conformacional formulada por Boyer (2) que postula la existencia del intermediario de alta energía en una o varias proteínas de la cadena de transporte de e^- en una conformación de mayor contenido energético que la original.

En 1961 tanto el Profesor Mitchell como el Profesor Williams, propusieron a los iones hidrógeno como la conexión esencial entre las reacciones redox y la síntesis de ATP. Sin embargo, las dos hipótesis difieren profundamente en la forma de acoplamiento a través de protones.

Me referiré más ampliamente a la hipótesis quimiosmótica de Mitchell (3) debido a que ha ganado considerable apoyo experimental y es ahora la principal herramienta de trabajo para la interpretación de resultados experimentales relacionados con la síntesis fotosintética y oxidativa de ATP.

POSTULADOS BASICOS DE LA HIPOTESIS QUIMIOSMOTICA.

(4, 5, 6)

1) Las reacciones redox del Transporte electrónico (T.e.) están acopladas a la translocación activa de protones a través de la membrana que forma una vesícula cerrada. Hay una estequiometría

definida entre H^+ translocados y e^- transferidos. El postulado requiere que los componentes de la cadena de transferencia de e^- estén dispuestos asimétricamente en la membrana en tal forma que sus mecanismos de reacción puedan operar vectorialmente en dirección definida a través de la membrana.

2) La translocación de H^+ puede ocurrir también por una reversión de las reacciones que sintetizan ATP, catalizado por una ATPasa, en este caso, la dirección del transporte de H^+ mediado por ATPasa, es la misma que la del flujo de H^+ mediado por transferencia de e^- .

3) Tanto la ATPasa como las bombas de H^+ dependientes de las reacciones redox, son procesos electrogénicos que operan paralela pero independientemente a través de la misma membrana. En consecuencia, pueden generar una diferencia en actividad química de H^+ así como de carga eléctrica a través de la membrana. La diferencia en potencial electroquímico de H^+ , $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ puede separarse en un componente osmótico (ΔpH) y uno eléctrico ($\Delta\psi$) que pueden relacionarse por la ecuación

$$\Delta\bar{\mu}_{H^+} = \Delta\psi - 2.3 \frac{RT}{F} \Delta pH = \Delta\psi - 60 \Delta pH \text{ (a } 30^\circ\text{C)}$$

En esta ecuación $\Delta\psi$ y H^+/\bar{r} están en mv (milivoltios), pH en unidades de pH , R , T y F tienen sus significado termodinámicos usuales y el factor $2.3 \frac{RT}{F}$ es aproximadamente igual a 60 mv a 30°C .

4) La biomembrana a través de la cual opera el sistema translocador de H^+ , se considera como una capa dieléctrica inerte con una conductividad reducida para iones en general y para protones en particular. Las reacciones redox para translocación

de H^+ y las reacciones translocadoras de H^+ para la síntesis de ATP, comparten dos fases acuosas comunes separadas por la membrana, la cual es la membrana de acoplamiento. Cualquier desorganización en la estructura de la membrana resulta en una pérdida de la eficiencia acoplante y puede llegar a un desacoplamiento parcial o total entre las reacciones redox y la síntesis de ATP.

En la hipótesis quimiosmótica, por consiguiente, el intermediario de alta energía (\sim) entre T.e. y síntesis de ATP es el gradiente electroquímico de H^+ o $\Delta\bar{\mu}H^+$ a través de 2 fases acuosas que se supone son homogéneas. Los intermediarios en las reacciones redox no están relacionados "directamente" con el complejo enzimático de síntesis de ATP debido a la independencia estructural de las dos diferentes bombas translocadoras de H^+ que operan a través de la membrana y cuya interacción se postula que ocurre solo a través del gradiente de H^+ . Así, la eficiencia del sistema quimiosmótico resulta de la combinación de estequiometrías parciales y grados parciales de acoplamiento de los transductores de energía independientes. Este es un punto crítico en la validez de la hipótesis de Mitchell para la síntesis fotosintética de ATP.

Gradiente electroquímico transmembranal de iones hidrógeno.

Claramente uno de las formas más apropiadas de asegurar la validez de la hipótesis quimiosmótica es medir la magnitud y propiedades de la fuerza protomotriz en función de sus componentes $\Delta\psi$ y ΔpH , para lo cual se han utilizado una gran variedad de métodos y condiciones experimentales.

Formación de un campo eléctrico.

La generación rápida de un potencial eléctrico a través de membranas biológicas de cromatóforos o tilacoides, después de breves destellos de luz se ha detectado en el orden de nanosegundos, y la magnitud de este potencial eléctrico se ha relacionado con el desplazamiento electrocrómico de la absorción de carotenoides a 523 nm (7) este cambio en la absorción inducido por luz, es revertido en la obscuridad.

Un pequeño número de cargas translocadas a través de la membrana es suficiente para generar grandes potenciales en pequeñas fracciones de segundo, pero este potencial rápidamente formado, es transitorio, pues también disminuye rápidamente, debido a flujos electroforéticos secundarios de iones. Entre tanto el ΔpH se genera más lentamente como resultado del flujo de estos iones. El resultado es que el componente $\Delta \Psi$ del $\Delta \bar{\mu}H^+$ es reemplazado gradualmente por una diferencia de pH, de modo que el estado estacionario para protones, solo se alcanza después de un transporte de e^- relativamente prolongado dado que muchos de los H^+ deben ser tomados en intercambio por otros cationes, principalmente Mg^{++} y K^+ o junto con contraiones como el Cl^- (8).

Formación de la diferencia de pH.

La velocidad de entrada de H^+ es lenta debido a que está controlada por el transporte secundario de iones. La rápida formación del $\Delta \Psi$ y la lenta formación del ΔpH , tienen un profundo efecto en la composición del $\Delta \bar{\mu}H^+$, el cual durante los primeros recambios del flujo fotosintético de e^- es un $\Delta \Psi(0)$ eléctrico, pero cada vez viene a ser más dependiente del ΔpH

a medida que pasa el tiempo de iluminación. Esta conducta es particularmente importante en cloroplastos en donde, de acuerdo a muchas observaciones, el componente casi desaparece con luz continua.

Fotofosforilación.

De acuerdo a la hipótesis quimiosmótica, la iniciación de la síntesis de ATP después de iluminación, debe ser estrictamente dependiente de la velocidad de formación del $\Delta\bar{\mu}H^+$.

Ort y Dilley (9) examinaron el grado de fosforilación inducido por flashes cortos de duración variable; los experimentos indicaban un ligero retardo (lag) en la iniciación de la fotofosforilación el cual se prolonga tras la adición de valinomicina y K^+ . Estos resultados están cualitativamente de acuerdo al concepto discutido antes en el sentido de la rápida formación del componente eléctrico del $\Delta\bar{\mu}H^+$ de modo que la síntesis de ATP durante esta fase inicial es muy sensible al flujo de K^+ facilitado por valinomicina que destruye el potencial eléctrico. Schröder y otros (10), han postulado que el lag podría deberse a las dos vías existentes para disipar H^+ , una a través de la ATP sintetasa y la otra mediante fuga de H^+ a través de la membrana. Otra posibilidad (11) es que este lag pueda deberse a un proceso regulatorio controlado por la pequeña subunidad regulatoria presente en la ATPasa de cloroplastos, en tal forma que si se retarda el desplazamiento de esta proteína, al disminuir el ingreso de energía, la fosforilación disminuye simultáneamente, lo cual implicaría el desplazamiento de esta proteína inhibitoria (subunidad ϵ) como un paso inicial necesario

para el inicio de la fosforilación. El desplazamiento de esta proteína a su vez podría depender del $\Delta\Psi$ generado en la 1ª fase de la fotofosforilación. En el estado estacionario entonces, es el ΔpH , el componente de $\Delta\bar{\mu}\text{H}^+$, el que debe impulsar la síntesis de ATP. El número de protones necesario para establecer un suficiente ΔpH entre el interior y el exterior del cloroplasto, depende de la capacidad amortiguadora del compartimento interno; un aumento en esta capacidad amortiguadora, retardará la formación de un ΔpH suficiente para impulsar la fosforilación.

Ort y Dilley (12) midieron la cantidad de tampón permeante con tris o bicarbonato presente en el interior del compartimento interno del tilacoide y a pesar de los incrementos en la capacidad amortiguadora interna que debería requerir una mayor acumulación de H^+ y por tanto un mayor transporte electrónico, no se observó ningún incremento en el lag para la fotofosforilación. Por otra parte, aminas básicas tales como metilamina que desacoplan pero no amortiguan apreciablemente en el rango fisiológico de pH, incrementan el lag de la fotofosforilación apreciablemente. Estos datos condujeron a la conclusión de que el pH de la fase acuosa interna de tilacoides era probablemente de importancia secundaria para la energización de la fotofosforilación. Ort propuso una vía embebida en la membrana y que favorece cinéticamente al flujo de H^+ , desde las reacciones productoras de H^+ , hasta el factor de acoplamiento y que no incluye a la fase acuosa interna como intermediario obligatorio. Por otra parte el grupo de Dilley (13) aporta evidencias que sugieren la participación de H^+ localizados en dominios de proteínas en membranas en

el proceso de síntesis de ATP.

EVIDENCIAS EXPERIMENTALES QUE APOYAN LA HIPOTESIS QUIMIOSMOTICA.

Se han descrito en los últimos años gran cantidad de reportes experimentales que apoyan la hipótesis de Mitchell. Mencionaré algunos de ellos:

1) La translocación de protones dependiente de energía, fue reportada en preparaciones de cloroplastos (14) a pH 6.2 midiendo los cambios de pH después de iluminación de una suspensión de cloroplastos.

2) Jagendorf y Uribe (15) demostraron que el ATP es sintetizado mediante una transición ácido base, cuando un gradiente de pH formado colocando cloroplastos en la obscuridad en un medio a bajo pH, y después alcalinizando para tener un $\Delta \text{pH} = 3.0$ es disipado abruptamente.

3) La inyección de una pequeña cantidad de ATP a una suspensión anaeróbica de mitocondrias, conduce a una expulsión de H^+ seguida de una lenta caída que puede ser acelerada por desacoplantes (16).

4) En Halobacterium halobium (18) se dividió la membrana celular en 3 fracciones: amarilla, roja y púrpura. La región roja contiene la cadena respiratoria y la maquinaria enzimática para la fosforilación oxidativa. En la región púrpura, separada de la roja, está la bacteriorodopsina encargada de bombear H^+ desde el interior de la célula hasta el exterior cuando se ilumina. La fuerza protomotriz generada de este modo, se utiliza por el complejo F_0-F_1 para sintetizar ATP en la región roja.

5) Racker y Stockenius (17), mostraron que un $\Delta \bar{\mu}\text{H}^+$ originado

mediante iluminación de la bacteriorodopsina incorporada junto con la ATP sintasa en liposomas, podía impulsar la síntesis de ATP.

6) Thayer y Hinkley (19) reportaron que la síntesis de ATP por el $\Delta\bar{\mu}H^+$ impuesto artificialmente a través de partículas submitocondriales es tan rápida o más que la velocidad de síntesis de ATP por respiración.

RESULTADOS EXPERIMENTALES INCONGRUENTES CON LA HIPOTESIS QUIMIOSMOTICA.

En los últimos 10 años han venido acumulándose evidencias experimentales que están en conflicto con la hipótesis quimiosmótica, presentaremos brevemente algunas de ellas.

1) In vitro, no hay una relación única entre la velocidad de oxidación y el $\Delta\bar{\mu}H^+$, sino que esta relación depende de la manera en que se modifica el $\Delta\bar{\mu}H^+$. Experimentos de Padan y Rottemberg (20) sugieren que la reacción de fosforilación controla la velocidad respiratoria directamente y no a través de su efecto sobre el $\Delta\bar{\mu}H^+$.

2) Tampoco se ha encontrado in vitro una relación única entre la eficiencia de la fosforilación y el $\Delta\bar{\mu}H^+$ como debería esperarse si este último fuere el intermediario entre T.e. y síntesis de ATP. En este caso 3 tipos de inconsistencia con la hipótesis de Mitchell, se han presentado:

a) La adición de un desacoplante a cromatóforos bacterianos, disminuye el $\Delta\bar{\mu}H^+$, pero con un efecto relativamente mayor sobre la velocidad de fosforilación (21).

b) La adición de valinomicina y K^+ a mitocondrias de hígado de

rata, puede causar una caída de ~ 25% en el $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ sin afectar la fosforilación (22).

c) Los desacoplantes pueden evitar completamente la síntesis de ATP y acelerar el transporte de electrones sin disminución de $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ (23).

3) In vivo también se encuentran casos en donde no parece haber conexión entre el $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ y la fosforilación de ADP. Por ejemplo, mutantes de Bacillus megaterium resistentes a desacoplantes, sintetizan ATP cuando el $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ es abolido por desacoplantes (24). Similarmente el $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ puede ser muy bajo en bacterias alcofílicas y halofílicas bajo condiciones en las cuales pueden sintetizar ATP (25).

4) La máxima relación obtenible entre el potencial de fosfato ΔG_p y el potencial electroquímico $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$, aumenta cuando $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ es disminuido por un incremento en la permeabilidad a H^+ , pero esta relación debería permanecer constante de acuerdo a la hipótesis de Mitchell (5,26).

5) Witt (27) demuestra que una diferencia de potencial eléctrico sola, es suficiente para generar fosforilación. El campo eléctrico está basado en polarización y no está ligado a gradientes de pH ni la formación de ATP requiere H^+ en la fase acuosa.

OTRAS HIPOTESIS DE ACOPLAMIENTO.

Estas y otras discrepancias entre los hallazgos experimentales y los predichos por la hipótesis de Mitchell, han llevado a varios autores a proponer otros modelos de acoplamiento entre T.e.-Síntesis de ATP. Estos modelos se mencionan brevemente a continuación:

Modelo de Acoplamiento en 2 fases.

Hipótesis de Williams (28,29).

En este modelo de transducción de energía en dos fases, la membrana misma constituye un reservorio de H^+ de alta energía los cuales se conectan a través de proteínas enzimáticas intramembranales. El modelo requiere que los H^+ intramembranales no estén en equilibrio con la fase acuosa. Williams propone que el dispositivo conductor de H^+ en la membrana puede ser proporcionado por el H_2O altamente ordenada que rodea a las proteínas de la región hidrofílica de la membrana. La movilidad de H^+ entre moléculas de H_2O ordenadas puede ser mucho más rápida que en fase acuosa y ofrecer así una vía preferencial para el flujo de H^+ .

Modelo de acoplamiento en 5 fases

Hipótesis de Kell.

En este modelo Kell (5) define 5 fases en el proceso de acoplamiento entre el transporte de electrones y síntesis de ATP. la fase M (membrana) 2 fases acuosas L y R y dos interfases SL y SR que conectan las fases acuosas interna y externa con la membrana respectivamente.

La hipótesis está basada en la aplicación de teorías electrónicas a procesos de transducción de energía en membranas biológicas. Kell propone que un gradiente electroquímico de H^+ conecta el transporte de electrones y la síntesis de ATP, pero no a través de las dos fases acuosas, sino más bien a través de las interfases transmembranales. Una parte integral del proceso de acoplamiento es la generación de cargas de superficie debido a

cambios en ionización, pK y conformación de los acarreadores de electrones y de la ATP sintasa, por lo cual el potencial eléctrico y protónico en la superficie de la membrana, sería mayor que en las fases acuosas. Debido a esto, la fase membranal no debe considerarse como barrera inerte a la difusión de H^+ , tanto estructural como energéticamente constituye el sistema de acoplamiento en virtud de la barrera al paso de H^+ a través de las interfases membrana-solución.

Como puede verse, esta hipótesis es quimiosmótica en el sentido de que se postula un gradiente electroquímico interfásico de H^+ , pero no lo es en el sentido de que la corriente funcional de H^+ no es acarreada a través de las dos fases acuosas.

Haines (30) reporta que el pH de una superficie polianiónica puede ser hasta 3 unidades menor que el de la fase acuosa, debido a la capacidad de superficies polianiónicas para secuestrar cationes. Esto puede ser importante en el bombeo de H^+ a través de la membrana, de hecho, Mitchell y Oesterhelt (31), muestran que las células intactas de Halobacterium halobium bombean H^+ sobre la superficie de la membrana; tales H^+ aparentemente no alteran el pH de la fase acuosa, pero si pueden ser usados para síntesis de ATP.

Hipótesis de acoplamiento por mosaico protónico (26,32).

En esta hipótesis las organelas transductoras de energía están organizadas sobre la base de unidades de acoplamiento, pero la energía libre está contenida aún en un gradiente electroquímico de H^+ operando independientemente a través de estas pequeñas unidades de acoplamiento.

La hipótesis retiene los postulados básicos de la hipótesis quimiosmótica, pero su postulado fundamental establece lo siguiente:

En organelas nativas, las bombas de H^+ primarias (impulsadas por luz u oxidación de sustratos) no comparten con otras bombas primarias, el espacio o dominio dentro del cual son bombeados los H^+ , pero si comparten estos dominios con otras bombas secundarias de H^+ impulsadas por ATP.

De aquí se infiere que hay una interacción más directa entre bombas primarias y secundarias, y no solo a través de $\Delta\bar{\mu}H^+$. La implicación fundamental es que los espacios protónicos de las unidades de acoplamiento no contienen el mismo potencial electroquímico de H^+ , esto sugiere que hay una barrera a la difusión de H^+ entre los espacios protónicos de las unidades de acoplamiento y la fase acuosa de la organela.

Hipótesis de acoplamiento directo entre proteínas redox y ATP sintasa (hip. de colisión).

Esta hipótesis fue propuesta por Slater, Berden y Herwerjer en 1985 (33). En esta hipótesis no se involucra al potencial electroquímico de H^+ como un intermediario obligado en el acoplamiento.

En base a evidencias de que la membrana interna mitocondrial es fluida y que los componentes redox están físicamente dispersos al azar con libre movimiento por difusión, Hackenbrock y col (34) calcularon los coeficientes de difusión para varias proteínas de membrana y la frecuencia de colisión entre estas proteínas de acuerdo a su tamaño y número de moléculas por unidad de área; es

de esperar entonces que haya choques entre proteínas redox y la ATP sintasa y sería cuestión de afinidad si la colisión es seguida o no por una reacción química.

El postulado básico de la hipótesis, es que los choques entre enzimas redox y la ATP sintasa no son abortivos sino que conducen a una transferencia de energía.

Un argumento importante que se dá sobre esta hipótesis, es el hallazgo de que la velocidad de transducción de energía es directamente proporcional a la concentración de enzimas redox y ATP sintasas (33).

Esta hipótesis de colisión requiere que las proteínas participantes en el proceso de transducción de energía sean difusibles, pero esto no ocurre en el caso de ciertas células como en Halobacterium halobium, en la cual la bomba primaria de H⁺, bacteriorodopsina, se concentra en una región y la bomba secundaria, la ATPsintasa, se concentra en otra región junto con las enzimas redox. En este caso, no se podrían esperar colisiones suficientemente rápidas entre las bombas primarias y secundarias. Algo similar ocurre en plantas con la segregación de las proteínas de membrana en cloroplastos. El fotosistema II está asociado al complejo cosechador de luz en la porción apilada (grana) del cloroplasto y el PSI y la ATP sintasa están sobre los márgenes del grana y la membrana del estroma.

TRANSPORTE DE ELECTRONES EN LA FOTOSINTESIS

El cloroplasto:

En células eucarióticas, los procesos fotosintéticos se llevan a cabo en organelos especializados llamados plastidios,

los cuales en algas verdes y plantas superiores se conocen como cloroplastos. El cloroplasto de plantas superiores tiene por lo general forma de lente y un tamaño entre 3 y 10 μm de largo y 1-5 μm de diámetro. Sin embargo, el cloroplasto es un órgano flexible capaz de cambiar de volumen, forma y posición en respuesta a un estímulo como la luz. El pigmento predominante en cloroplastos es la clorofila verde (a y b).

El cloroplasto está limitado por 2 membranas que son topológica y funcionalmente distintas, separadas por un surco de 10 a 20nm libremente permeable a algunos solutos como sorbitol. Las dos membranas limitantes únicas, forman la envoltura del cloroplasto.

Dentro del cloroplasto hay una elaborada red de membranas plegadas llamadas lamelas, las cuales forman a su vez estructuras denominadas grana. El grana está separado por un material conocido como estroma formado por granos de almidón, lípidos, ribosomas, DNA, una gran cantidad de proteínas y numerosas enzimas incluyendo las del ciclo de Calvin.

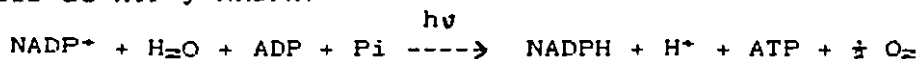
Los grana parecen estar constituidos por diversos sacos membranosos llamados tilacoides que forman por lo general una red de membranas apiladas y estrechamente apretadas; las laminillas de los grana se conectan entre si por membranas no apiladas, las laminillas del estroma.

En la membrana de los tilacoides se encuentran localizados los pigmentos fotosintéticos y el sistema transportador de e^- . Pueden distinguirse dos tipos de cloroplastos cuando se aíslan: de clase I con doble membrana externa y clase II sin la doble membrana externa. Estos últimos fueron utilizados en nuestros experimentos.

En el mecanismo general de la fotosíntesis se distinguen dos fases fundamentales: una oscura que consiste básicamente en las reacciones de asimilación del CO_2 mediante el ciclo de Calvin y la fase luminosa cuya discusión es más relevante en el presente trabajo.

Cadena transportadora de electrones.

La reacción fotoquímica global característica de la fotosíntesis oxigénica, es un proceso no cíclico que lleva a la síntesis de ATP y NADPH:



La reducción del NADP^+ (potencial redox $E^{\circ}_{\text{pH } 7.0} = 0.34\text{V}$) por el H_2O ($E^{\circ}_{\text{pH } 7.0} = + 0.8\text{V}$) como reacción en la oscuridad es muy desfavorable desde el punto de vista termodinámico. Las plantas y las algas requieren de 4 cuantos de luz por cada NADP reducido ($2e^-$) y necesitan de 8 a 10 cuantos para liberar una molécula de O_2 . Estas condiciones son satisfechas por la presencia de dos centros de reacción fotoquímica distintos que actúan en serie, de tal manera que dos cuantos de luz cooperan en el transporte de cada electrón hacia el NADP^+ . Cada Centro de Reacción contiene de 300 a 400 moléculas de clorofila integradas en complejos cosechadores de luz asociados con los Centros de Reacción.

Emerson y sus colaboradores (35) fueron los primeros en identificar la presencia de dos reacciones diferentes para la reducción del NADP por el H_2O ; estas dos reacciones fotoquímicas no fotoactúan en forma suficiente por sí mismas, pero la eficiencia de la conversión de energía se incrementa notoriamente

mediante la integración de los dos fotosistemas I y II. La figura 1 muestra un esquema del transporte de e^- en la fotosíntesis.

Los fotosistemas (PSI y PSII) están mutuamente en comunicación mediante una serie de acarreadores de e^- , los cuales se representan con frecuencia mediante un modelo o esquema zeta, propuesto por Hill y Bendall (36).

Los acarreadores que transportan e^- están organizados en un arreglo asimétrico a través de la membrana a lo largo de una amplia gama de potenciales redox. Los fotosistemas no se presentan en una proporción estricta 1:1, y las medidas de su actividad fotoquímica ponen de manifiesto que están separados en el plano lateral de la membrana (37). Hay una distribución desigual en los complejos proteína-clorofila en las regiones apiladas y no apiladas de la membrana. Las laminillas del estroma y las regiones no apiladas contienen cerca del 30% de la clorofila y tienen la mayor parte del PSI y del complejo de ATP sintasa (Cf_o-CF_1) y solo de un 10% - 20% de PSII. En contraste, las regiones apiladas de grana están enriquecidas con PSII y complejos cosechadores de luz y carecen sustancialmente de PSI. El complejo $citb_{6f}$ parece estar distribuido en forma indistinta entre los grana y las laminillas del estroma.

Al estar separados físicamente los dos fotosistemas, se requieren acarreadores de e^- móviles para llevar equivalentes reductores desde el PSII de las membranas apiladas de los grana hasta el PSI localizado en las membranas no apiladas. Dos de los componentes de esta cadena: PQ y PC pueden cumplir esta función, pues pueden difundirse libremente a través de la membrana. El

POTENCIALES REDOX

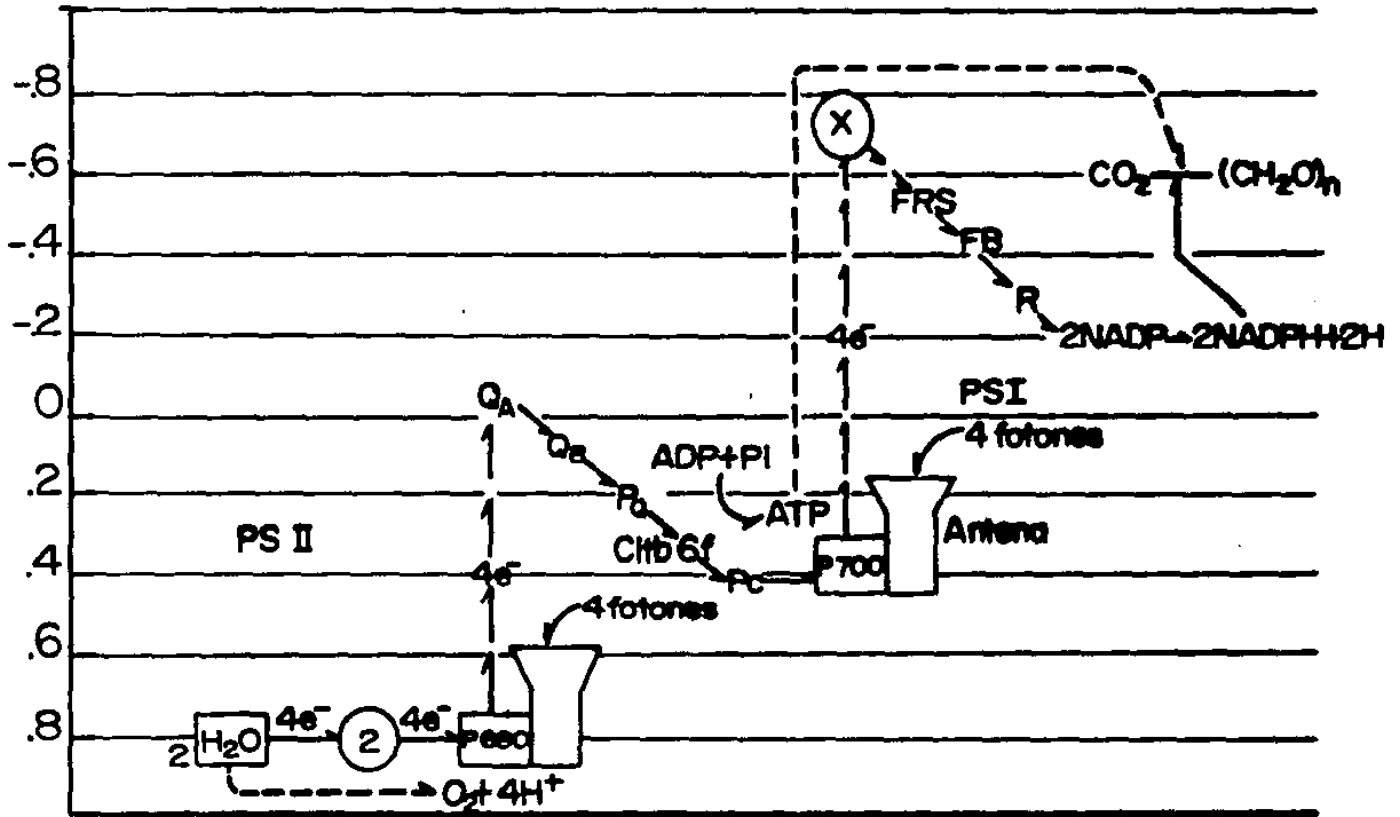


Fig.1. Esquema del flujo electrónico en la fotosíntesis. (tomado de Photosynthesis pag.21. Edit. Govindjee. Academic Press. 1982).

POTENCIALES REDOX

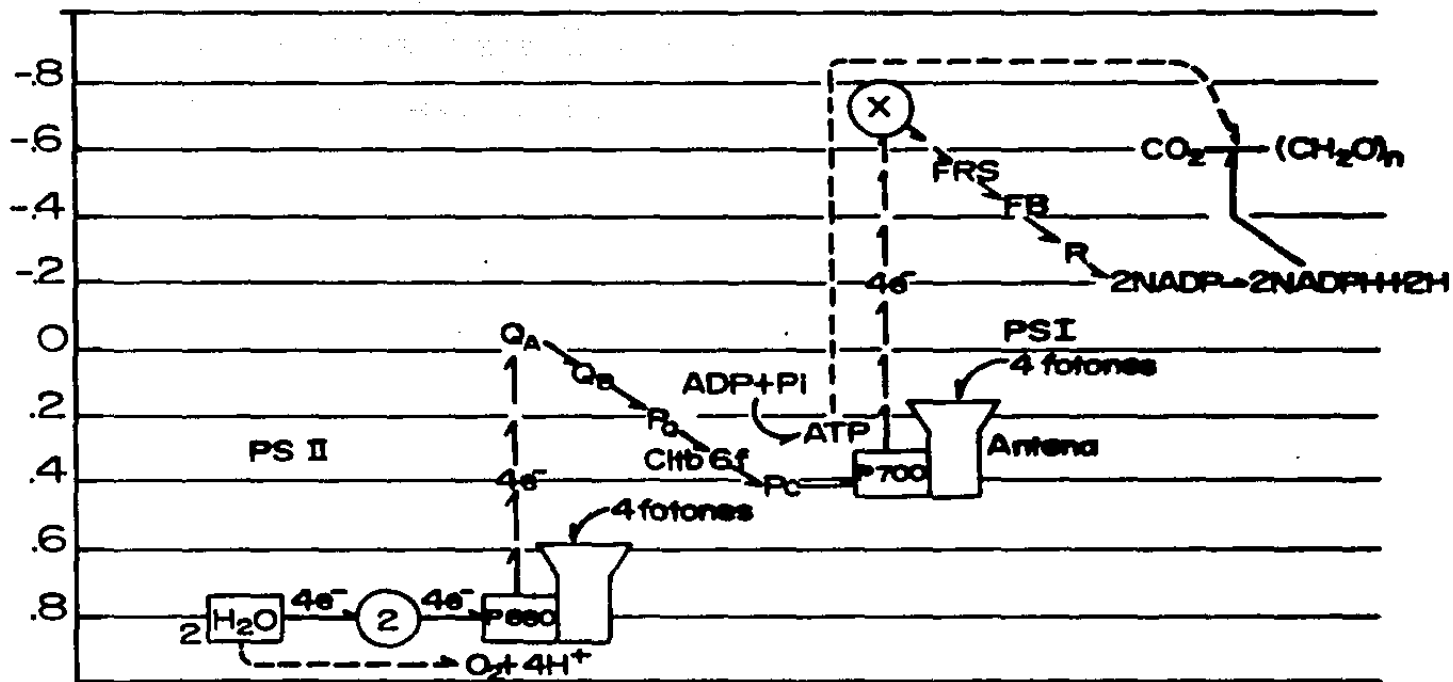


Fig.1. Esquema del flujo electrónico en la fotosíntesis. (tomado de Photosynthesis pag.21. Edit. Govindjee. Academic Press. 1982).

"pool" total de plastoquinona (compuesto por aproximadamente 50% de PQ oxidada y 50% de PQ reducida), se extiende en la membrana y puede transferir e^- desde el aceptor de e^- primario del PSII hasta el centro Fe-S que es parte del complejo $cyt_{b_6/f}$. Las moléculas de PQ son liposolubles y se encuentran en mayor concentración que otros acarreadores electrónicos (38). La plastocianina soluble en el H_2O , reside en la superficie interna de la membrana y puede atravesar libremente el espacio intratila-coidal y por tanto conectar las membranas apiladas y no apiladas (39).

Fotosistema II (PSII) y liberación de oxígeno.

La reacción fotoquímica primaria del PSII reduce la feofitina, un aceptor de e^- de gran potencial por medio de la transferencia de un e^- desde un donador con alto potencial, por lo cual se genera una pareja: reductor fuerte - oxidante fuerte. El producto de la reacción es el par de radicales $P680^+ - Feofitina^-$. La feofitina transfiere inmediatamente el e^- al primer aceptor estable del PSII, el llamado QA una semiquinona. el $P680^+$ vuelve a ser reducido por un donador secundario Z, el cual procede del sistema de liberación de O_2 . A pesar de grandes avances, todavía no es claro el mecanismo de oxidación de H_2O a O_2 : $2H_2O \xrightarrow{4e^-} 4e^- + 4H^+ + O_2$.

El modelo más aceptado es el de Joliot y Kok (40) quienes han mostrado que se desprende una molécula de O_2 después de que Z ha donado $4e^-$ y acumulado así 4 cargas positivas en 4 estados sucesivos de oxidación. Z restablece su neutralidad por la recuperación de $4e^-$ provenientes de 2 moléculas de H_2O , los

átomos de Oxígeno del H_2O forman el O_2 y los $4H^+$ entran posiblemente en solución.

Desde QA^- el e^- es llevado hacia QB la cual es una quinona unida a un polipéptido de 32 KD y es en este lugar que cierto grupo de herbicidas (tipo DCMU) parecen funcionar compitiendo con QB por el sitio de unión a la proteína y evitando de esta forma la reoxidación de QA^- (41). De QB, los e^- y H^+ van a formar parte del "pool" de PQH_2 que transfiere luego e^- al complejo $citb_{ef}$ y de aquí a plastocianina la cual es una proteína que contiene cobre. De plastocianina los e^- van al PSI a través del P700.

Fotosistema I (PSI).

El PSI reduce un aceptor de e^- de bajo potencial a expensas de un donador de e^- de potencial moderado. Se considera que el Centro de Reacción del PSI consiste de un donador de e^- primario el P700, y 4 aceptores de e^- (42); es muy probable que el aceptor 1º de e^- sea también una molécula de clorofila probablemente un dímero. Este aceptor transfiere e^- a un aceptor que contiene Fe y que se denota como X ($E_0 = -730$ mu). Los siguientes componentes de la cadena son dos centros FeS llamados A ($E_0 = -550$ mv) y B (-590 mv). el centro A (FeS) transfiere e^- a la Ferredoxina. Se considera que se lleva a cabo una secuencia lineal en la transferencia de e^- (X --- B --- A). Aunque se ha sugerido que A y B funcionan como aceptores de e^- equivalentes de X, las ferredoxinas (también son centros FeS), son pequeñas proteínas solubles en H_2O que funcionan como acarreadores de e^- hacia el NADP a través de la enzima Ferredoxina NADP reductasa. El NADPH es un producto

primario en estas reacciones. Además, durante la transferencia de 2 electrones, se genera ATP a partir de ADP y P_i . Un sitio para la generación de ATP entre PQ y cit f. El otro está asociado al PSII aunque no está clara su localización. El NADPH y el ATP, los productos de las reacciones luminosas, pueden ser usados ahora en los procesos de incorporación de CO_2 en carbohidratos.

ESTEQUIOMETRIAS DE LA CONVERSION DE ENERGIA FOTOSINTETICA

El modelo quimiosmótico define una relación entre las estequiometrias básicas: H^+/ATP , H^+/e^- y ATP/ze^- ; con el conocimiento de 2 de ellas se puede conocer la tercera. Para estas 3 relaciones se han obtenido valores muy diversos en cloroplastos medidos en diferentes laboratorios.

Relación $ATP/2e^-$.

El transporte de e^- libera energía para la síntesis de ATP. Sin embargo, un nivel apreciable de T.e. se presenta en cloroplastos aislados en ausencia de fosforilación llamado FLUJO BASAL DE ELECTRONES. El hecho de que pueda ocurrir transporte de electrones en ausencia de fosforilación, indica que los dos procesos no están enteramente acoplados, ya que el primero es un proceso disipativo de energía.

El flujo de e^- a través de la cadena de T.e. es notoriamente estimulado en condiciones que permiten la síntesis de ATP, es decir, la velocidad del transporte electrónico basal (t_{eb}) es menor que la del transporte electrónico fosforilante (t_{ef}). Izawa y Good (43) han mostrado que mientras el flujo de electrones esté saturado tanto por luz como por el nivel de aceptores electrónicos, hay una relación mol a mol entre el ATP formado y el flujo

de e^- adicional que ocurre en respuesta a la formación de ATP. Los autores sugieren que en estas condiciones de saturación los dos procesos T_{eb} y T_{ef} no compiten entre si. Esto podría significar que hay dos sistemas de transporte físicamente separados y solo uno de ellos estaría acoplado a la fosforilación (10); en este caso la estequiometría sería de 2 ATP/ e^- .

Sin embargo, Portis y McCarty (44) reportan datos que sugieren que el proceso de fosforilación altera el flujo basal de e^- , por lo cual T_{eb} y T_{ef} serían dos procesos en competencia. Los autores concluyen que la velocidad de fuga de H^+ y de ahí el transporte de e^- no fosforilante, depende de la concentración de H^+ en el espacio acuoso interno, es decir, el T_{eb} es una consecuencia directa de la salida de H^+ del tilacoide.

Para estimar la verdadera relación $P/2e^-$, el valor basal debe ser sustraído del transporte electrónico total. Así, estimando la velocidad del T_{eb} , al medir la concentración interna de H^+ durante la fosforilación, Portis y McCarty llegaron a una estequiometría de 1.33 para la relación $ATP/2e^-$. La salida fosforilante de H^+ , reduce el tamaño del "pool" de H^+ y consecuentemente reduce la salida basal de H^+ . Este valor de 1.33 (relación $ATP/2e^-$) es ampliamente aceptado en la literatura a pesar de que aún no hay pruebas concluyentes sobre su valor exacto.

Relación $\frac{H^+}{e^-}$.

La mayor parte de los reportes respecto a la estequiometría H^+/e^- apoyan la idea de que las reacciones de fotooxidación del H_2O por el PSII que ocurren cerca a la superficie interna de la

membrana lamelar y la oxidación de la plastohidroquinona directa o indirectamente por el cit f, son las reacciones involucradas con el flujo de H⁺. (Sin embargo, bajo algunas circunstancias, el flujo de e⁻ a través del cit b6f puede estar asociado a la translocación de 2H⁺/e⁻) (45). Así el modelo predice una relación H⁺/e⁻ de 2 en el transporte de electrones del H₂O a aceptores tales como Ferredoxina o Ferricianuro y hay un apoyo general para la aceptación de este valor.

Relación $\frac{H^+}{ATP}$.

La determinación de esta relación podría hacerse indirectamente de las relaciones anteriores: $H^+/ATP = H^+/e^-/ATP/2e^- = 2 \times \frac{2}{1.33} = 3$.

Partis y McCarty (46) estudiaron la relación entre velocidad de síntesis de ATP y pH medido por distribución de la Hexilamina. Al variar el T.e., un gráfico semilogarítmico de la velocidad de fosforilación vs pH produce una relación lineal con una pendiente que va de 3.0 a 3.5.

Ellos interpretaron estos datos para mostrar una dependencia de 3^{er} orden de la fotofosforilación respecto a la concentración interna de H⁺, lo cual implicaba una relación H⁺/ATP de 3.

A pesar de todo esto, no ha habido un consenso en los resultados de las determinaciones experimentales de la relación H⁺/ATP para cloroplastos.

INHIBICION DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES Y LA FOSFORILACION EN CLOROPLASTOS AISLADOS.

Diferentes procesos físicos o químicos naturales o impuestos artificialmente, pueden modificar en distintos grados y niveles la conversión eficiente de energía luminosa en moléculas de ATP y NADPH.

Muchos compuestos pueden modificar la velocidad del transporte de electrones (inhibidores del complejo ATP sintasa). Debido a la conexión entre T.e. y síntesis de ATP la inhibición de cualquiera de los dos sistemas afecta al otro. Por otro lado, un 3^{er} grupo de compuestos, los desacoplantes, colapsan la energía libre generada durante el transporte de electrones evitando de esta manera la síntesis de ATP. Todo este grupo de compuestos inhibitorios, algunos de ellos herbicidas, juegan un papel importante en el entendimiento de la fisiología, bioquímica y biofísica de los procesos fotosintéticos.

Me referiré brevemente en esta sección a los dos primeros procesos inhibitorios y discutiré con mayor amplitud el desacoplamiento por ser el objeto principal del presente trabajo.

Inhibición del transporte de electrones.

Sustancias que inhiben el transporte de e^- sin importar su naturaleza, se piensa que actúan directamente sobre alguna enzima de reacción redox de la cadena de T.e. (47). El T.e. basal, Tef desacoplado, y la fosforilación son inhibidos en forma similar como puede observarse en la Fig. 2.

Los inhibidores del transporte de electrones también se conocen como inhibidores de la reacción de Hill, es decir, la

reacción en la cual se libera O_2 por una suspensión de cloroplastos aislados cuando se iluminan en presencia de un aceptor artificial de e^- (48).

De acuerdo a los sitios probables de acción de los inhibidores (ver Fig. 3), éstos podrían clasificarse en la siguiente forma:

A) Inhibición en la región de oxidación del H_2O : Estos inhibidores son efectivos en bloquear o destruir selectivamente el paso de oxidación del H_2O pero es posible continuar el T.e. en cloroplastos mediante la adición de un donador y aceptor artificiales de e^- :

Amonio - metilamina - hidroxilamina.

La base no protonada parece ser la forma inhibitoria a pHs básicos pero a pHs menores de 8 predomina un efecto desacoplante. El efecto inhibitorio ocurre a concentraciones entre 0.1 y 0.01 M (49). A concentraciones mayores de 0.01 M, la hidroxilamina también funciona como un donador artificial de e^- (49). También se ha reportado la acción de Indofenoles y Nitrofenoles en la inhibición del sistema de oxidación de H_2O (50).

Fenilureas:

El DCMU y el CMU se desarrollaron como potentes herbicidas y se han descrito como inhibidores excepcionalmente potentes y efectivos de la reacción de Hill (51). Concentraciones que promueven un 50% de inhibición del T.e. en cloroplastos aislados son, para DCMU 50 a 100 nM y para CMU 0.5 a 1 μ M. Se cree que el sitio de acción de estos inhibidores es a nivel del polipéptido de 32 KD, evitando en esta forma la unión de la quinona QB que transfiere e^- al "pool" de plastoquinonas (41). Otros compuestos

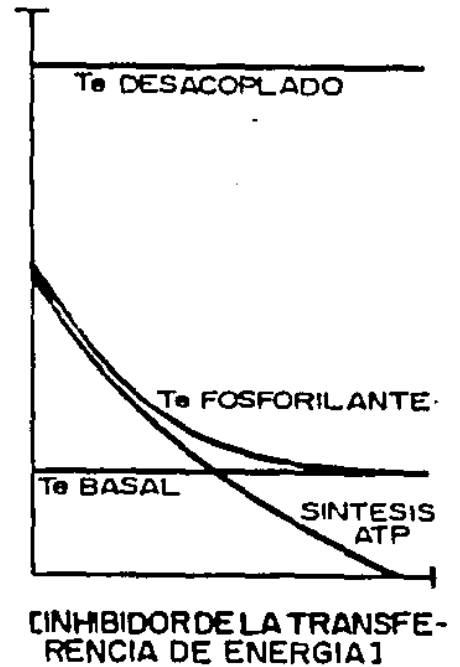
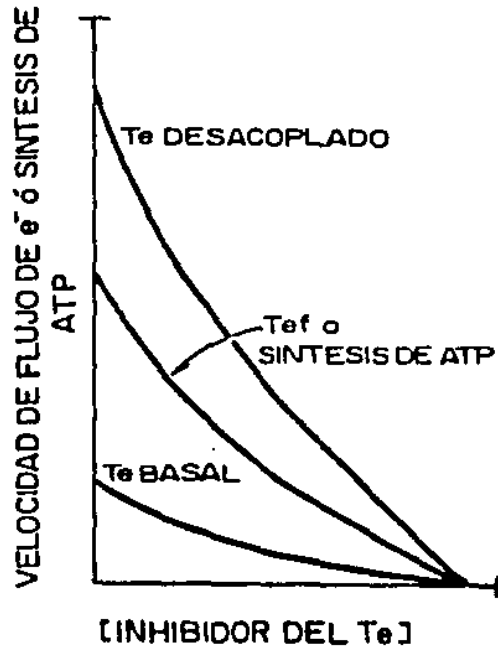


Fig.2. Efecto de inhibidores sobre el flujo electrónico y la fosforilación. TE=transporte electrónico. TEF=transporte electrónico fosforilante. (de R.E.MacCarty. Encyclopedya of plant phisiol. Edit. Por A. Trebs y M. Avron (1977) pag. 437.

SISTEMA DE FLUJO DE e⁻

espacio de la matriz
(pH 8.0)

SISTEMA DE ACOPLAMIENTO

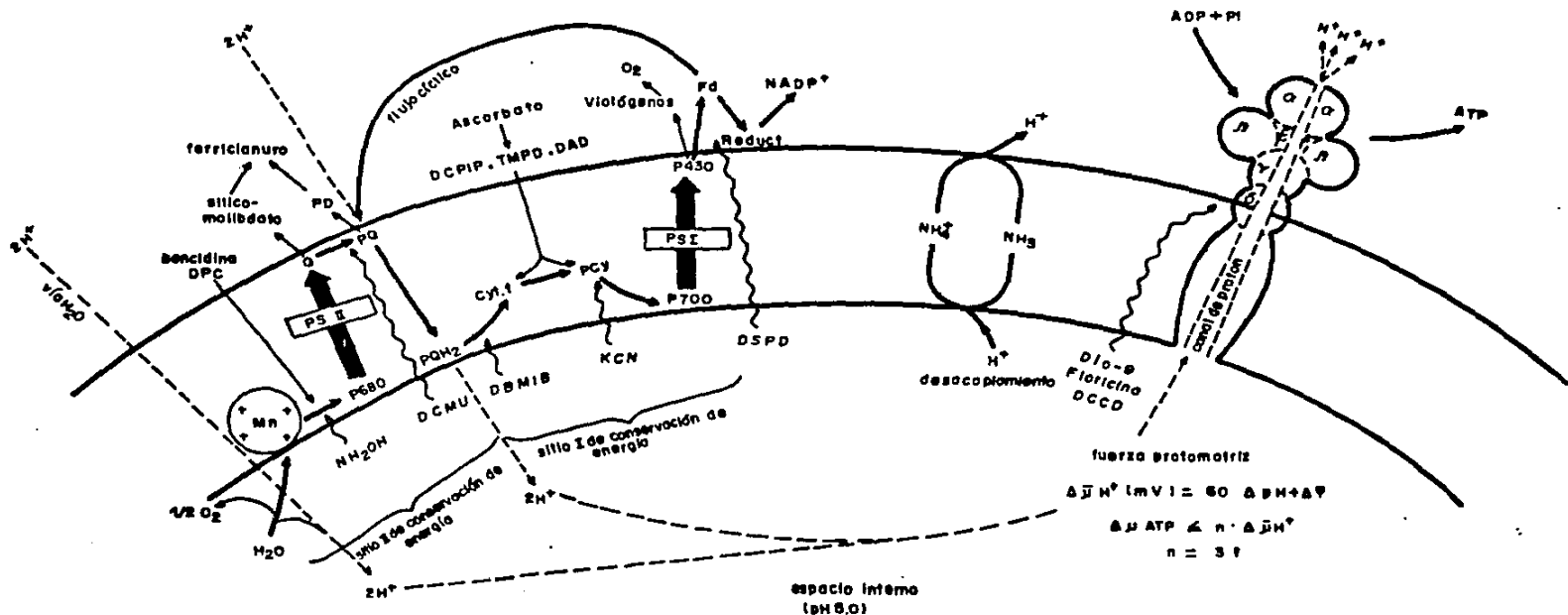


FIG. 3. ESQUEMA DEL FLUJO DE ELECTRONES Y DE LA FOSFORILACIÓN EN TILACOIDES DE ACUERDO A LA HIPÓTESIS QUIMIOSMÓTICA. SE MUESTRAN LOS SITIOS PROBABLES DE ACCIÓN DE ACEPTORES Y DONADORES DE ELECTRONES ASÍ COMO DE INHIBIDORES Y DESACOPLANTES DE ACUERDO AL MECANISMO PROTONMÓTICO (PARA LOS NOMBRES DE LOS COMPUESTOS VER -- SECCIÓN SOBRE ABBREVIATURAS). TOMADO DE LA REF. # 38 PÁG. 3.

relacionados estructuralmente entre sí, tales como clorofenil-carbamatos y acilcloroanilidas, son también inhibidores potentes (52) que actúan probablemente en el mismo sitio.

Aminotriazinas:

También inhiben reversiblemente el transporte de e^- cerca de Q. Estudios de unión con herbicidas marcados radiactivamente han sugerido que las triazinas, trizinonas, piridazinonas, bicarbonatos, fenilurea, uracilos y acetanilidas, interfieren con el mismo acarreador de e^- de la cadena de transporte electrónico a través de mecanismos similares (53).

Oxidos de 2-alkil-4 hidroxiquinolína:

Inhiben tanto la transferencia de e^- en la respiración, como en cloroplastos. Las características de inhibición son similares al DCMU, aunque el sitio de inhibición puede ser diferente (54).

1,10 Fenantrolina:

Esta sustancia forma un fuerte complejo con el Fe^{+2} y su uso como inhibidor puede complicarse por la presencia de metales pesados.

Muchos de los inhibidores anteriores y que están relacionados a sitios comunes de unión, comparten una característica estructural común: La presencia del grupo $-N-C=X$ (donde $X = N, u O$), unido a un grupo alquilo o arilo (55). La potencia biológica depende de parámetros fisicoquímicos especialmente lipofiliidad (una contribución π) y sustituyentes electrónicos (contribución sigma) ver más adelante.

Fenoles:

Se han reconocido una gran variedad de derivados fenólicos como potentes inhibidores del flujo de e^- en el PSII. Entre

estos podemos citar:

2-halógeno-4 nitrofenoles ó 2,4 denitrofenoles como DNOC ó Dinoseb (56).

2,6 dibromofenoles - 4 sustituidos (57).

Hay evidencias para creer que el sitio de unión de los fenoles es diferente al sitio de unión de los herbicidas tipo Diurón. Así, un derivado azido fenólico se une preferentemente a una proteína de ~ 41KD, mientras que una atrazina marcada con un grupo azido, se une a una proteína de 32 a 34 KD. La característica estructural mínima para la inhibición por los fenoles todavía se desconoce.

b) Inhibición sobre el lado reductor del Fotosistema I. DSPD:

A una concentración de 1 mM no inhibe la reacción de Hill con p-benzoquinona o ferriciamiro como aceptores de e^- , pero si inhibe la reacción de Hill cuando el aceptor es el NADP. La reducción enzimática de NADP a través del sistema ferredoxina-NADP oxido reductasa no es inhibida, por lo que se ha sugerido que la inhibición bloquea la transferencia de e^- del aceptor primario de P700 (P430, X) a ferredoxina.

Aceptores electrónicos.

Compuestos de esta clase compiten con algunos componentes de la cadena de T.e., pero sin sufrir una reducción subsecuente. Ejemplos: Ferricianuro, PMS y FMN. Ciertas sales de biperidilio, pueden aceptar e^- en competencia con el aceptor del PSI y tienen actividad herbicida (58).

Diquat y Paraquat (metilviologeno), las cuales son sales cuaternarias de 2,2' y 4,4' biperidilio respectivamente, son dos

de los herbicidas más importantes que se han introducido. Estas sales forman radicales estables debido a que el e^- agregado al anillo neutraliza la carga (+) sobre uno de los nitrógenos.

Desacoplantes inhibitorios

El término "desacoplante inhibitorio" es usado por Moreland (48) para indicar compuestos que interfieren el transporte electrónico, como inhibidores y como desacoplantes. Ellos inhiben Teb, Tef y Te desacoplado, aunque las concentraciones efectivas son diferentes para cada efecto. La fotofosforilación no cíclica es también inhibida. Los desacoplantes inhibitorios (pero no los inhibidores del T.e.), inhiben fuertemente la síntesis de ATP inducida por luz y mediada por ditiotreitól y PMS. Algunos compuestos como dinitrofenoles y alkildenitrofenoles, se clasifican con frecuencia como desacoplantes; la acción desacoplante se observa a valores de pH alrededor de 6.0 y se atribuye a la forma protonada del compuesto. Sin embargo, a pH 8.0, los compuestos inhiben el T.e., de ahí que sean considerados como desacoplantes inhibitorios.

Generalmente estos compuestos presentan acción desacoplante a bajas concentraciones y acción inhibitoria a concentraciones altas. ejemplos: acilanilidas, benzoimidazoles, dinitroanilinas, dinitrofenoles, imidazoles, N-fenilcarbamatos, piridinoles, thiazidoles.

INHIBIDORES DE LA TRANSFERENCIA DE ENERGIA EN CLOROPLASTOS

Definición:

Durante la respiración y el transporte electrónico fotosintético, una porción de la energía libre de las reacciones

redox se transfiera a través del mecanismo de acoplamiento para la fosforilación de ADP. Las sustancias que impiden una alta captura de energía en forma de ATP por inhibición de cualquiera de los pasos en la reacción de fosforilación, se conocen como inhibidores de la transferencia de energía. Tales inhibidores evitan tanto la fosforilación, como el transporte de electrones fosforilante, pero no afectan el transporte electrónico basal (Fig. 2). Así, cualquier inhibición del T.e. causado por un inhibidor de la fosforilación, es liberado por desacoplantes, debido a que estos proporcionan una ruta alternativa para disipar la energía libre (Fig 2.).

Dio 9:

Este es un antibiótico que inhibe la fosforilación y el Tef en cloroplastos. Inhibe también las ATPasa dependiente de Mg y Ca y la reacción de intercambio ATP-Pi (59) ver Fig. 3.

Floricina:

Es un glucósido que inhibe reversiblemente la fotofosforilación en cloroplastos a 0.4 mM en un 50%; pero a bajas concentraciones de fosfato la inhibición es apreciablemente mayor.

Los análogos sintéticos 4'-deoxifloricina y 4'-deoxiflore-tina-2'galactosido, son inhibidores altamente específicos de la fotofosforilación, pero 10 veces más potentes que la floricina (60).

Syntalina:

Decametilendiguánidina, inhibe la fotofosforilación en cloroplastos a concentraciones de 0.1 a 1.0 mM.

Mercuriales:

P-cloromercurobenzoato (PCMB) efectivo a concentraciones entre 10 y 300 μM . Otro mercurial como P-mercurobencenosulfonato y acetatofenilmercúrico, exhiben características de inhibición similares, pero muestran cierta actividad desacoplante.

Oligomicina:

Este inhibidor de la fosforilación oxidativa, no tiene efecto sobre la fotofosforilación a concentraciones de hasta 10 $\mu\text{g/ml}$. Concentraciones mayores, desacoplan levemente.

N-N' dicitclohexilcarbodimida (DCCD):

Inhibe la fosforilación oxidativa en forma similar a la oligomicina, en cloroplastos inhibe la fotofosforilación (Fig 3) y el Tef a concentraciones de 10 μM . La inhibición del T.e. es solamente liberada parcialmente por atebrina y NH_4Cl , lo cual sugiere que el inhibidor puede tener otros efectos secundarios sobre la cadena de transporte electrónico. En cloroplastos parcialmente desacoplados con EDTA, concentraciones bajas de DCCD, pueden estimular la fosforilación residual e incrementar el pH del medio. Lo cual sugiere, que concentraciones bajas de DCCD evitan de alguna manera la disipación de energía por el desacoplante, mientras que concentraciones altas inhiben la formación de ATP (61).

RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

Un método para investigar el mecanismo de acción de moléculas químicas a nivel biológico, es relacionar sus propiedades fisicoquímicas con la actividad biológica. Los efectos de varios parámetros electrónicos, estéricos e hidrofóbicos sobre una reacción bioquímica, pueden ser estudiados por análisis de regresión. Este enfoque de estudio de los efectos de sustituyentes en reacciones biológicas in vitro o in vivo, se conoce como el estudio de relaciones estructura - actividad: QSAR (de Quantitative Structure-Activity Relationships).

El tratamiento de Hansch (62) de la actividad biológica de sustancias químicas, está basado en el postulado de que para que una sustancia tenga actividad biológica debe primero llegar a un sitio de acción en la célula y luego interaccionar con un receptor para producir el efecto biológico. Son los factores fisicoquímicos de una molécula, los que gobiernan el transporte y la interacción droga-receptor; estos factores fisicoquímicos, se ven modificados al cambiar la estructura química de una molécula en estudio; de modo que la actividad de un compuesto podría representarse como:

$$\text{Actividad biológica} = a \left[\begin{array}{c} \text{Parámetros} \\ \text{electrónicos} \end{array} \right] + b \left[\begin{array}{c} \text{Parámetros} \\ \text{hidrofóbicos} \end{array} \right] + c \left[\begin{array}{c} \text{Parámetros} \\ \text{estéricos} \end{array} \right]$$

Los objetivos de los estudios estructura actividad han sido:

- Identificar los sustituyentes requeridos para una mayor actividad biológica;
- relacionar las propiedades físicas y químicas de los compuestos de una misma familia con su actividad biológica;

- c) determinar el mejor ambiente en que estos compuestos actúan y
 d) identificar interacciones entre distintos sustituyentes y los receptores postulados en la célula (48).

Para poder aplicar este método a los datos biológicos son necesarios tres requisitos básicos:

- a) Las moléculas de una misma serie deberán ser similares para incrementar la probabilidad de que tengan el mismo mecanismo de acción; b) los datos de actividad biológica deben ser precisos, cuantitativos y medidos bajo las mismas condiciones para toda la serie y c) las contribuciones del grupo deberán ser intrínsecamente aditivas para elegir adecuadamente los parámetros.

Parámetros Hidrofóbicos:

La respuesta biológica altamente específica de los compuestos orgánicos, muestra generalmente una dependencia de la hidrofobicidad relativa de dichos compuestos, la cual se determina midiendo el coeficiente de partición en H₂O y un solvente orgánico, siendo el más utilizado el octanol. El coeficiente de partición (π) se obtiene de la siguiente ecuación:

$$\pi_x = \log P_x - \log P_H$$

en donde P_H es el coeficiente de partición de la molécula patrón sin sustituyente, P_x es el coeficiente de partición del derivado (con sustituyente). De aquí que π viene a ser el logaritmo del coeficiente de partición del sustituyente x .

Los coeficientes de partición ($\log P_x$) pueden ser calculados de acuerdo al método de Hansch y Leo (63) por medio del principio de aditividad de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\log P = \sum_1^n a_n f_n + \sum_1^n b_m F_m$$

en donde a es el número de veces en que se presenta el fragmento f de la estructura tipo p de una determinada molécula; b es el número de ocurrencias del factor estructural p ; los fragmentos estructurales pueden ser CH_3 , CH_2 , N etc. El otro factor mencionado puede consistir de grupos o cadenas ramificadas, número de enlaces en la cadena, halogenación múltiple, etc.

Parámetros electrónicos:

Los efectos electrónicos de sustituyentes sobre la ionización del ácido benzoico son usados como modelo para el efecto de sustituyentes sobre otros Centros de Reacción unidos a sistemas aromáticos. Los efectos electrónicos usualmente se representan mediante el parámetro sigma " σ " definida por Hammett de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\sigma = \log K_x - K_H$$

en donde K_H es la constante de ionización para el ácido benzoico en H_2O a $25^\circ C$ y K_x es la constante de ionización del derivado bajo las mismas condiciones experimentales. " ρ ", es una constante característica de la reacción y el valor " σ ", depende del sustituyente dado y de su posición en el anillo. Valores positivos de Sigma indican que el sustituyente atrae e^- del anillo aromático y valores negativos de σ indican una liberación de e^- del sustituyente hacia el anillo aromático.

Los estudios de relación estructura actividad, se llevan a cabo con frecuencia en el análisis de herbicidas, desacoplantes e inhibidores con el objeto principal de encontrar aquellos sustituyentes que producen la máxima actividad biológica y los parámetros fisicoquímicos de los cuales depende esta actividad.

DESACOPLAMIENTO ENTRE EL TRANSPORTE DE ELECTRONES Y LA SINTESIS DE ATP.

En forma general puede definirse un desacoplante como todo compuesto que promueva la disipación de energía generada por el transporte de electrones en cualquier dirección diferente a la síntesis de ATP. El transporte de e^- libre de la restricción impuesta por el mecanismo de acoplamiento es ampliamente acelerado, mientras que la velocidad de fosforilación disminuye (47). Se supone que los desacoplantes catalizan la destrucción de intermediarios de alta energía (gradiente electroquímico de H^+ en el caso de la hipótesis quimiosmótica) al actuar como protonóforos, acarreando protones a través de la membrana de una fase acuosa a otra (64).

La mayor parte de la información que se tiene sobre desacoplamiento, proviene del estudio de este fenómeno a nivel de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Sin embargo, siendo el desacoplamiento la destrucción del "estado energizado" del sistema acoplado de transducción de energía (65), cada una de las diferentes hipótesis desarrolladas para explicar el acoplamiento, debe implicar también un mecanismo de desacoplamiento si se supone que el desacoplante interactúa con el producto primario de acoplamiento y si este producto es el mismo en todas las membranas transductoras de energía, el desacoplamiento debería ocurrir también por un proceso similar en todas las membranas.

Las hipótesis propuestas para explicar desacoplamiento incluyen: a) hidrólisis inducida por desacoplante de un intermediario de alta energía; b) cambios conformacionales y funciones alteradas de proteínas de acoplamiento luego de

interacción con desacoplantes; c) transporte ligado a energía de un anión desacoplante de una fase acuosa a otra a través de la membrana y difusión pasiva de la especie protonada en sentido contrario y d) incremento en la conductancia de la membrana y variaciones de lo anterior (48).

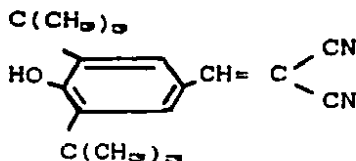
Como puede verse, el mecanismo molecular detallado de la acción desacoplante permanece incierto. Sin embargo, de una manera general podríamos clasificar los desacoplantes como protonóforos y no protonóforos.

Desacoplantes Protonóforos:

Mitchell (64) postula que el efecto de un desacoplante débilmente ácido, está basado en un efecto de cortocircuito de H^+ a través de la membrana transductora de energía. Los desacoplantes de este tipo aumentan la transferencia de H^+ a través de membranas fosfolipídicas modelo tales como liposomas y membranas lipídicas negras y de membranas naturales como las de mitocondrias y cloroplastos. Estos desacoplantes son llamados protonóforos y su actividad protonofórica es considerada en general como un fuerte apoyo para el mecanismo de acoplamiento basado en la hipótesis quimiosmótica.

Los desacoplantes de este tipo deben tener un grupo ácido disociable (propiedades ácido-base) que les permite la protonación en una fase acuosa de la membrana y la desprotonación en la otra fase. Por tanto, para ser acarreadores de H^+ , deben tener también grupos hidrofóbicos voluminosos que les permitan moverse de un lado a otro de la membrana.

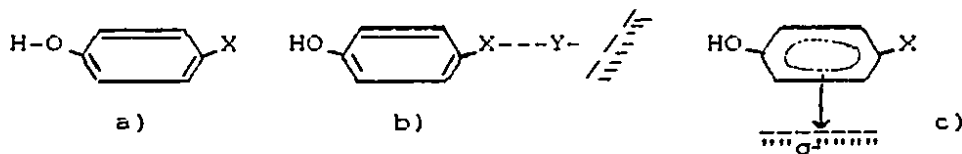
Por ejemplo para el caso del SF 6847.



Este desacoplante tiene un grupo OH ionizable cuya disociación aumenta por el grupo malonitrilo en posición para, que atrae e^- y deslocaliza los $e^- \pi$ del anillo. Los grupos terbutil que rodean al OH confieren a la molécula la gran lipofilicidad que le permite penetrar la membrana hidrofóbica.

Mitchell propone que para asegurar que la forma aniónica del desacoplante sea soluble en una membrana no polar, la carga iónica en un sistema de orbitales π debe estar deslocalizada para minimizar la fuerza eléctrica del anión desacoplante.

El hecho de que un desacoplante posea grupos ácido disociables, no implica necesariamente que funcione como protonóforo en el desacoplamiento. Terada (66) propone por ejemplo, tres posibles modos de acción para un desacoplante fenólico como se ilustra esquemáticamente enseguida:



El grupo x atractor de e^- podría regular la liberación o la unión de H^+ al grupo ácido disociable a); alternativamente x podría interactuar directamente con algún sitio relacionado con

la transducción de energía en forma de un ataque nucleofílico b); o con formación de un complejo transferidor de carga c). En el caso de ataque nucleofílico, la densidad de carga (-) será suministrada por el par solitario de e^- del átomo de N ó Oxígeno del grupo ácido dissociable. El grupo ácido dissociable libera e^- en lugar de actuar como donador de H^+ . La participación directa de la forma ionizada con algun(os) sitio(s) también es posible.

La actividad protonofórica de algunos desacoplantes fenólicos con sustituyentes 2,6 alquílicos, se ha correlacionado con algunos parámetros fisicoquímicos: pKa y permeabilidad en mitocondrias y cloroplastos (67,68,69). Los autores encontraron que la actividad de cada uno de los compuesto ensayados en tilacoides, era más baja que la obtenida en mitocondrias de hígado de rata. En cada uno de los casos, la actividad desacoplante estaba relacionada linealmente a la potencia protonofórica y al logaritmo de la constante de disociación en la membrana liposomal. Estos hallazgos fueron tomados como evidencia de un mecanismo de desacoplamiento protonóforo que permite la disipación del gradiente electroquímico de H^+ . Sin embargo, la correlación entre pKa y actividad desacoplante no es buena con algunos de los sustituyentes fenólicos usados. Además, estos criterios no definen completamente la efectividad desacoplante. El 3,5 dibromo 4 cianofenol por ejemplo, es 7 veces más efectivo que el 2,4 DNP aunque su acidez y lipoficidad son casi idénticas (70).

Gran parte de la evidencia sobre comportamiento protonóforo de desacoplantes, proviene de estudios en membranas fosfolípidicas artificiales. La conducta de un desacoplante en la región

fosfolipídica de la membrana, se considera de primordial importancia, mientras que la interacción de desacoplantes con proteínas es de importancia secundaria de acuerdo a los postulados de Mitchell.

La conductancia eléctrica de una bicapa fosfolipídica artificial es muy baja, pero aumenta paralelamente con la adición de concentraciones crecientes de desacoplantes, incremento que es dependiente del pH, del pKa del desacoplante y de la carga fosfolipídica de la membrana (71,72). Este cambio en las propiedades eléctricas se interpreta como el resultado de una transferencia de H^+ a través de la membrana mediada por desacoplantes.

Una buena correlación entre incremento inducido por desacoplantes de la conductancia eléctrica y la actividad desacoplante en mitocondrias, fue observado para algunos desacoplantes por Lieberman y otros (73). Aunque este no siempre es el caso cuando se ensayan una mayor variedad de desacoplantes (74). Por ejemplo, estos autores no observan una buena correlación entre la conductancia de bicapas lipídicas vs la concentración del ácido tiosalicílico. En contraste a los resultados con membranas lipídicas negras en las cuales no se observa buena correlación entre la conductividad de H^+ y desacoplamiento, esta correlación es mejor cuando se usan liposomas (74). Los liposomas parecen reflejar mejor las propiedades de las bicapas lipídicas de membranas naturales que las bicapas negras.

Kessler y otros (75) proponen que los desacoplantes funcionan como acarreadores de H^+ y cationes como K^+ y Na^+ . Esta proposición forma la base de su hipótesis de transporte cíclico

de cationes, basada en el hecho del desacoplamiento producido por la combinación de 2 ionóforos: valinomicina que acarrea K^+ y Nigericina que acarrea H^+ y K^+ , siendo el resultado neto el acarreo de H^+ como un desacoplante protonóforo.

De acuerdo al modelo de Kessler, un catión tal como K^+ simplemente se cicla a través de la membrana en asociación al acarreo de H^+ mediado por desacoplante. Esta hipótesis implicaría que el desacoplamiento no estaría asociado a la disipación del potencial de membrana por el desacoplante.

Desacoplantes no protonóforos:

Varios reportes en la literatura describen compuestos no disociables con actividad desacoplante, por ejemplo tiocianatos hidrofóbicos como p-bromofenolisotiocinato (BPIT) fueron reportados por Miko y Chance (76) como desacoplantes de la fosforilación oxidativa en mitocondrias de hígado de rata. Debido a que los tiocinatos reaccionan fácilmente en forma covalente con grupos $-SH$ y $-NH_2$ en proteínas, parece ser que la interacción de estos desacoplantes con proteínas es esencial para el desacoplamiento. Experimentos con BPIT y otros isotiocinatos aromáticos marcados con ^{35}S indican que la parte principal de estos compuestos está unida a la mitocondria aislada.

Sesquiterpenos acíclicos tales como la hormona juvenil JH-1 (la hormona juvenil es un mensajero químico que regula el crecimiento en insectos, químicamente es el éster metílico de un ácido carboxílico) no muestran actividad protonófora y actúan como agentes alquilantes. Estos compuestos fueron reportados por Chefurka (77) como desacoplantes de la fosforilación oxidativa en

mitocondrias, probablemente por modificación de grupos SH de la membrana.

El potente desacoplante SF6847 cuyo grupo fenólico OH ha sido cuidadosamente metilado para dar lugar al compuesto no disociable MeO-SF6847 muestra actividad desacoplante a concentraciones mayores a 20 μM (78). Estos experimentos muestran que los desacoplantes no requieren protonarse para ejercer su acción.

En mitocondrias, el desacoplamiento con CCCP y 1,1,3-triciano-2 aminopropano, es evitado pero no revertido por aminotioles. Sin embargo, en membranas bacterianas y cloroplastos, el desacoplamiento por CCCP es bloqueado y revertido por ditiotreititol, cisteína y otros tioles (78,80); incluso concentraciones altas de CCCP disminuyen la reactividad de tales vesículas hacia N-etilmaleimida, un fuerte reactivo de grupos SH. En contraste, el efecto desacoplante del DNP no fue influenciado por tioles, lo cual podría indicar que el modo de acción del CCCP puede ser diferente al de los desacoplantes tipo fenólicos.

Interacción de desacoplantes con componentes de la membrana interna mitocondrial.

Estudios iniciales de la unión de desacoplantes a mitocondrias y proteínas mitocondriales, han conducido a Weinbach y Garbus (81) a concluir que los cambios conformacionales en proteínas mitocondriales son la base del desacoplamiento.

Con el uso de un nuevo desacoplante altamente hidrofílico con marcaje de fotoafinidad, el 2-azido-4 nitrofenol, Hanstein y Hateffi (82) demostraron la existencia de un sitio específico de

unión de alta afinidad de desacoplante en mitocondria. Este sitio de unión tiene las siguientes características: a) es independiente del estado de energía de la mitocondria; b) la unión del del 2 azido 4 nitrofenol es reversible y competitiva con la de otro desacoplantes tales como S-13, CCCP, Y 2,4DNP; c) los efectos competitivos de otros desacoplantes se correlacionan bien con sus efectos desacoplantes; d) el número aparente de sitios de unión, es del mismo orden de magnitud que la cantidad de complejos F_1 -ATPasa o de acarreadores electrónicos.

Hanstein y Hateffi demostraron que cerca del 60% del 2-azido-4 nitrofenol se une covalentemente a la subunidad 1 de 56 Kd de la F_1 ATPasa y a un polipéptido hidrofóbico de 31 Kd, el cual puede ser un componente del sector F_0 del complejo ATPasa sensible a oligomicina. Esta última proteína se designó como la proteína de unión del desacoplante relacionada directamente con los efectos desacoplantes.

Con un diferente compuesto de fotoafinidad, el 2-Nitro-4 azido-carbonilcianofenilhidrazona, N_3 CCP; Katre y Wilson (83) encontraron que este potente desacoplante hidrosoluble, se une a varios polipéptidos de la mitocondria. El S13 que se une con mayor fuerza a la mitocondria, desplaza al N_3 CCCP de su sitio de unión. Otros desacoplantes como pentaclorofenol y dicumarol, compiten también con N_3 CCCP por su sitio de unión.

Es posible que todos los desacoplantes se unan al mismo sitio de alta afinidad a pesar de las amplias diferencias químicas y estructurales. Este sitio de alta afinidad está localizado en el complejo de la enzima que sintetiza ATP. para el caso del 2-azido-4 nitrofenol, la constante de disociación con

el sitio de alta afinidad es de $6 \pm 3\mu\text{M}$ y un número de sitios de unión de 0.56 ± 0.13 nmol por mg de proteína. La mitocondria contiene también otros sitios de unión no específicos de baja afinidad para desacoplantes. En conclusión, estos trabajos estarían apoyando más un mecanismo de desacoplamiento basado en intermediarios químicos o en cambios conformacionales de las proteínas relacionados con la transferencia de energía, y están en desacuerdo con el mecanismo protonóforo de desacoplamiento propuesto por Mitchell.

Desacoplamiento por picrato.

El 2,4,6, trinitrofenol (Picrato), tiene una estructura similar al DNP y al 2 azido-4 nitrofenol. Sin embargo, es sabido que el Picrato no desacopla la fosforilación oxidativa en concentraciones de hasta 2 mM. Hanstein y Hateffi (82) han mostrado que el Picrato no se une al sitio de unión de otros nitrofenoles en mitocondria intacta, a pesar de la semejanza estructural con ellos. Con la utilización de partículas submitocondriales, se ha demostrado que la ausencia de efecto desacoplante de Picrato y capacidad de unión a la mitocondrias, se debe a su incapacidad para penetrar a través de la membrana interna mitocondrial. En contraste a la mitocondria, las partículas submitocondriales unen Picrato en forma específica y desacoplan procesos dependientes de energía tales como fosforilación oxidativa, flujo inverso de e^- impulsado por ATP, control respiratorio sensible o oligomicina y transhidrogenación. Es importante anotar que la unión del Picrato representa un verdadero equilibrio de unión y no resulta de la acumulación de

Picrato dependiente de energía, impulsada por un potencial de membrana como podría pensarse. Esto es debido a que la unión específica de Picrato por partículas submitocondriales se ha determinado por experimentos de competencia en presencia de 1 azido-4 nitrofenol.

Otro hallazgo importante es que el Picrato a diferencia de otros desacoplantes, no aumenta la permeabilidad a protones sino muy ligeramente en partículas submitocondriales.

Estos resultados sugieren que el sitio de unión de desacoplantes está localizado en el interior de la membrana mitocondrial interna y demuestran de nuevo la relación directa entre desacoplamiento y unión específica de desacoplante. Igualmente importante de acuerdo a estos resultados, ni la permeabilidad de la membrana ni la propiedad protonófera parecen ser esenciales para la habilidad de un compuesto en funcionar como desacoplante.

Desacoplantes de la fotofosforilación.

CCCP y FCCP.

Estas sustancias son poderosos desacoplantes de la fosforilación oxidativa y la fotofosforilación (84). En cloroplastos, el desacoplamiento por CCCP puede evitarse en presencia de cisteína pero no en mitocondrias (80), lo cual puede indicar diferencias en solubilidad y permeabilidad en los dos sistemas. Las concentraciones efectivas son de 1 a 10 μM para CCCP y 0.1 a 1.0 μM para FCCP en cloroplastos. Concentraciones mayores son inhibitorias.

Amonio y aminos alifáticas sencillas:

Las sales de amonio desacoplan la fotofosforilación a concentraciones entre 1 y 10 mM a pH 8.0, pero son inhibitorias a pHs más altos o concentraciones mayores. El efecto desacoplante es proporcional a la cantidad de amina no protonada, por lo cual aumenta al aumentar el pH (85,86). El desacoplamiento por algunas aminas está asociado con la entrada de amina junto con aniones y cationes, de acuerdo a esto, la lamela del cloroplasto se hincha aunque el grado de hinchamiento no es paralelo al efecto desacoplante.

Aminas complejas:

Atebrina y clorpromazina son desacoplantes tanto de la fosforilación oxidativa como de la fotofosforilación. La atebrina desacopla a concentraciones de 1 a 10 μ M. Brucina y cloroquina son efectivas a concentraciones ente 4 y 10 mM. El desacoplamiento por cualquiera de estas aminas complejas provoca contracción de las vesiculas del tilacoide debido a la salida de sales (87).

Fenoles:

Dinitrofenol, dicumarol y pentaclorofenol son desacoplantes clásicos de la fosforilación oxidativa. Sin embargo, el DNP aún a 1 mM tiene solo efectos desacoplantes leves en cloroplastos a pH 6.0 (14); dinitrofenoles alquilados más lipofilicos muestran un efecto desacoplante mayor a pHs 6-8 y a concentraciones entre 1 y 10 μ M, pero son potentes inhibidores a pHs mayores (88).

Desaspidina:

Esta es una florobutirofenona y desacopla la fotofosforilación ciclica mediada por PMS a 0.1 μ M, mientras que la fotofosforilación no ciclica no se afecta hasta

concentraciones de $1\mu\text{M}$. Esta diferencia en sensibilidad a la desaspidina se interpretó originalmente como una diferencia en actividad sobre dos sitios diferentes de fosforilación, pero se sabe que la desaspidina es fotooxidada rápidamente en los sistemas no cíclicos (89). Sin embargo de acuerdo a la hipótesis de Mitchell, debería esperarse un efecto desacoplante similar en ambos sistemas cíclico y no cíclico.

Análogos de fosfato:

Arsenato desacopla los cloroplastos pero en presencia de ADP. El arsenato y el tiofosfato compiten con el fosfato al inhibir la fotofosforilación.

EDTA:

El lavado de cloroplastos con EDTA (0.5 mM pH 7.8) en un medio de baja salinidad causa desacoplamiento. El desacoplamiento resulta de la remoción del factor de acoplamiento CF_1 . Los cloroplastos desacoplados pueden reacoplarse al incubarse con factor de acoplamiento concentrado en presencia de Mg^{++} (47).

Poli-Lisina:

Esta poliamina desacopla el T.e. en cloroplastos, pero tiene poco efecto sobre la elevación del pH del medio (90) lo cual no concuerda con la hipótesis quimiosmótica asociada al transporte de electrones. Polímeros de Lisina muestran fuerte acción desacoplante, pero el monómero lisina tiene poco efecto desacoplante. Probablemente el polímero altere la interacción entre proteínas evitando el acoplamiento entre ellas.

Salicilanilidas:

5-cloro-3-(3 clorofenil)-2',4',5' triclorosalicilanilida desacopla los cloroplastos a concentraciones entre 0.1 y 1 μM .

Como la polilisina tales anilidas prácticamente no afectan el pH del medio (91), mientras que un desacoplante debería disminuir el pH de la fase acuosa externa de acuerdo a la hipótesis protonóforica de desacoplamiento.

Indofenoles:

2,6 diclorofenolindofenol y 2,6,3' triclorofenolindofenol (TCIP) son útiles como aceptores electrónicos en cloroplastos aislados, pero en sus formas oxidadas son desacoplantes. Es probable que estos compuestos tengan una acción dual, funcionando independientemente como aceptores electrónicos y como desacoplantes (47).

Ionóforos:

Solo aquellos antibióticos que acarrean tanto cationes álcali y H^+ , son fuertes desacoplantes en cloroplastos como la Nigericina y la Gramicidina D. Sin embargo, en presencia de valinomicina y K^+ el DNP puede producir desacoplamiento en cloroplastos (92).

Alcaloides:

Alcaloides derivados de la benzofenantridina, Sanguinazina, Queleritrina y Quelidonina; muestran actividad desacoplante de la fotofosforilación. La actividad máxima ocurre a 30 μM (93), una característica de estos compuestos es que no afectan la velocidad del T.e. fosforilante, pero si incrementan notoriamente el transporte basal de electrones en presencia de ADP.

Algunos compuestos desacoplantes han sido diseñados para actuar como herbicidas derivados de aminas lipofílicas, ariloxialkilaminas de estructura general $ArOCH_2CH_2NR_2$ son reportadas por Wright y otros (94) como herbicidas in vitro;

usualmente el desacoplamiento de la fotofosforilación está asociado a otros efectos herbicidas.

Herbicidas con actividad desacoplante también han sido reportados para derivados de N-fenilcarbonatos (95). El Barbano, un compuesto de esta serie desacopla completamente la fotofosforilación a 50 μ M y es un herbicida ampliamente comercializado, otros potentes desacoplantes de esta serie como SW14, SW18, utilizados como herbicidas poseen actividades mayores que las del pentaclorofenol y similares a las del FCCP.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.

Aunque los desacoplantes han sido extensamente usados para bloquear la síntesis de ATP y disipar el gradiente de H^+ a través de membranas, su mecanismo molecular de acción aún permanece incierto como se desprende de lo expuesto aquí. Los estudios sobre la acción molecular de desacoplantes en membranas conservadoras de energía, pueden contribuir a un mejor entendimiento de los mecanismos del desacoplamiento mismo y de la transducción de energía.

En vista de la incertidumbre existente sobre los mecanismos de desacoplamiento y debido a la poca información sobre el proceso desacoplante en cloroplastos, nos hemos propuesto tratar de entender mejor el proceso en estas organelas.

La hipótesis quimiosmótica de Mitchell sobre mecanismos de desacoplamiento, predice la acción protonófora de estos compuestos en virtud de la cual, como requisito para desacoplar la sustancia debe protonarse sobre una fase acuosa, acarrear H^+ a través de la fase hidrofóbica de la membrana y desprotonarse sobre la otra fase acuosa liberando allí los protones. Es decir, un desacoplante debe poseer características ácido-básicas y tener cierto carácter hidrofóbico que le permita moverse a través de la membrana. Además, de acuerdo a la hipótesis de Mitchell (64), el efecto desacoplante está relacionado con la fracción fosfolipídica de la membrana, mientras la interacción con proteínas es de importancia secundaria en el desacoplamiento.

Un desacoplante de la fotofosforilación de acuerdo a la hipótesis quimiosmótica, debe incrementar el T.e. basal y

fosforilante en cloroplastos y abatir el potencial electroquímico de H^+ , en forma paralela al abatimiento de la fosforilación.

En nuestro laboratorio fueron ensayados 25 compuestos nitrogenados con respecto a su habilidad para incrementar el transporte electrónico basal en cloroplastos aislados (96). El aumento en el flujo electrónico de agua a metilviológeno no presentó correlación con la basicidad de los compuestos ni con la hidrofobicidad de los mismos, lo cual sugiere que los desacoplantes no están funcionando como protonóforos a través de la membrana durante el proceso de desacoplamiento.

Un enfoque útil para un mejor entendimiento del desacoplamiento en cloroplastos, es mediante el análisis de algunas actividades que pueden ser afectadas durante el proceso y el estudio de las relaciones entre la estructura química y la actividad biológica de los compuestos, evaluando los resultados a la luz de la hipótesis quimiosmótica.

HIPOTESIS DE TRABAJO.

De acuerdo a la hipótesis quimiosmótica, podríamos predecir que debe existir una clara correlación entre desacoplamiento y pK_b , es decir, a mayor basicidad mayor efecto desacoplante; y entre desacoplamiento y $\log P$. Así, aminas o fenoles muy hidrofílicos, tendrían muy poco efecto desacoplante y compuestos carentes de propiedades ácido base (amidas), tampoco deberían desacoplar la fotofosforilación aún con creciente hidrofobicidad.

Por otra parte, si la disipación del gradiente de pH es la función primordial del desacoplante, debe esperarse un abatimiento paralelo en la captación de protones y de la síntesis

de ATP al incrementarse la concentración del desacoplante e incrementarse el transporte de electrones basal y fosforilante.

OBJETIVOS.

En este trabajo, se han utilizado aminas hidrofílicas e hidrofóbicas alifáticas y cíclicas con diferentes valores de pK_b (propiedades ácido-base) amidas (no protonables $pK_b=14.5$) y 2,6 dibromofenoles 4 sustituidos con los siguientes objetivos:

a) Medir para cada uno de los compuestos el transporte de electrones fosforilante, abatimiento en la captación de protones y a la síntesis de ATP en cloroplastos así como la conducción de H^+ en liposomas, con el objeto de hacer una correlación entre cada uno de estos efectos desacoplantes y las propiedades fisicoquímicas de los compuestos: acidez-basidad e hidrofobicidad.

b) Caracterizar algunas amidas, sustancias no protonables, con diferente longitud de cadena hidrocarbonada como desacoplantes de la fotofosforilación. ¿Funcionan estos compuestos como acarreadores de H^+ a través de una membrana transductora de energía?

c) Determinar la capacidad protonófora de estos compuestos (aminas, amidas y fenoles) en relación a sus propiedades de pK_b y coeficiente de partición: $\log P$. comparar dicha actividad en un sistema fosfolipídico artificial de membrana (Liposoma) con uno natural: tilacoides de cloroplastos.

MATERIALES Y METODOS.

Compuestos químicos usados

Como desacoplantes se utilizaron aminas, amidas y 2,6 dibromofenoles, cuyos nombres y estructuras aparecen en la Tabla 1 y como controles: el cloruro de amonio para las mediciones en cloroplastos y para conductividad en liposomas se utilizaron además el FCCP y el DNP.

El metilviológeno fue utilizado como aceptor electrónico. Amidas y fenoles fueron sintetizados en el departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química. Las aminas se obtuvieron de fuentes comerciales. La piranina, pigmento atrapado en liposomas para medir flujo de H^+ , fue suministrado amablemente por el doctor George Dreyfus del Instituto de Fisiología Celular.

Obtención de valores de pK_b , sigma y coeficientes de partición.

Los valores de pK_b de los compuestos estudiados, se obtuvieron de la literatura (96,97,98).

Los valores de la Sigma de Hammet (σ) y coeficientes de partición (π) para los sustituyentes en posición para de los 2,6 dibromofenoles se obtuvieron de la referencia 63.

El logaritmo del coeficiente de reparto de los compuestos nitrogenados fue calculado para cada uno de ellos según el método descrito en la sección: Relaciones Estructura-Actividad-Parámetros Hidrofóbicos.

Aislamiento de cloroplastos clase II

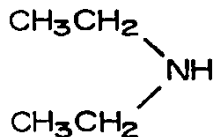
En esta preparación, la membrana externa del cloroplasto no tiene continuidad, lo cual permite la libre difusión de

TABLA 1. NOMBRES Y ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS ENSAYADOS COMO DESACOPLANTES.

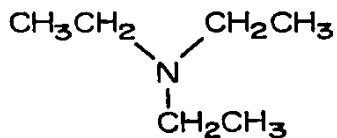
ETILAMINA



DIETILAMINA



TRIEFILAMINA



HEXILAMINA



ETILENDIAMINA



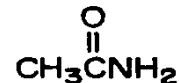
PIRIDINA



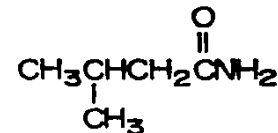
QUINUCLIDINA



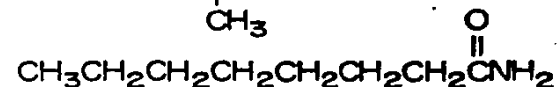
ACETAMIDA



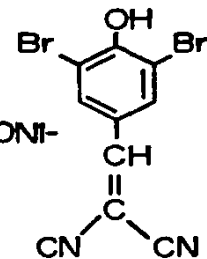
3-METILBUTANAMIDA



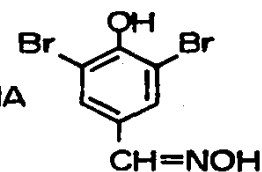
OCTANAMIDA



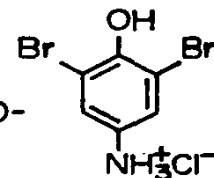
2,6DIBROMOFENOL-4MALONI-
TRILO



2,6DIBROMOFENOL-4OXIMA



CLORURO DE 2,6 DIBROMO-
FENOL 4AMONIO



nucleótidos. El método (99), con algunas modificaciones es el siguiente: Hojas de espinaca (*Spinacea oleracea*) obtenidas en el mercado frescas, en buen estado y turgentes, se lavan perfectamente y se enjuagan con agua destilada, se les corta el tallo a la altura del peciolo y se les recortan la nervadura central y el ápice para eliminar los cloroplastos viejos y jóvenes; después se cortan en pedazos de 1 cm² aproximadamente. 50 gramos de las hojas así recortadas se colocan en un vaso de licuadora (enfriado previamente durante 30 minutos a 4°C). Se agregan 300 ml de medio de aislamiento a 4°C que contiene: Sacarosa 400 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 5,0 mM y Tricina-KOH 20 mM a pH 7.6 y se homogenizan en una licuadora Osterizer Custom Mod. L-21 por 5 segundos a máxima velocidad. El homogenizado se filtra a través de 4 capas de gasa y dos de tela nylon a malla controlada. El filtrado resultante se centrifuga a 3500 r.p.m. durante 4 minutos a 4°C en una centrifuga M.S.E., Modelo LR-6 con cabezal de columpio. Se desecha el sobrenadante y la pastilla que contiene los cloroplastos se resuspende en un volumen de 3 ml de medio que contiene: KCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Tricina-KOH 0,5 mM pH 7.6. Esta suspensión se conserva a 4°C en la obscuridad.

Determinación de clorofila.

Debido a que cada tipo de clorofila presenta un espectro de absorción diferente y a que el cloroplasto presenta dos tipos de clorofila cuando se aíslan, la a y la b, el cálculo de la cantidad de clorofila presente en los cloroplastos debe reflejar la suma de ambas fracciones.

Se siguió el método espectrofotométrico de Strain (100): Se toman 5 ml de solución de acetona al 80% (a temperatura ambiente)

en 3 tubos: A dos de ellos (duplicado) se les agregó 50 µl de la suspensión de cloroplastos, se tapan los tubos y se agitan vigorosamente en un Vortex Modelo K-550-6, se incuban en obscuridad ambos tubos por 10 minutos para permitir que la clorofila sea extraída y no sea dañada por la luz en este lapso.

Se centrifuga por 5 minutos en la centrifuga clinica a máxima velocidad para sedimentar residuos de los cloroplastos extraídos. La clorofila se calcula midiendo la absorción del sobrenadante a 649 y 665 nm en un espectrofotómetro Pye Unicam Mod. SP6-550, contra la solución de acetona al 80% como blanco. Los valores se calculan mediante las siguiente ecuaciones:

$$Cl\ a\ (\mu\text{g/ml}) = 11.63 A_{665} - 2.39 A_{649}$$

$$Cl\ b\ (\mu\text{g/ml}) = 20.11 A_{649} - 5.18 A_{665}$$

$$Cl\ \text{total}\ (\mu\text{g/ml}) = 6.45 A_{665} + 17.72 A_{649}$$

Estas ecuaciones se derivan de los correspondientes coeficientes de extinción específicos, donde A = significa absorban-
cia.

Determinación de la velocidad del transporte de electrones fosforilante.

En la cadena fotosintética de organismos oxigénicos, el donador primario de electrones es el H₂O y el aceptor final el NADP. Por cada mol de H₂O que cede 2 moles de electrones al sistema oxidoreductor de la cadena fotosintética, se liberan dos moles de protones del agua y 0.5 moles de oxígeno molecular que se difunden al medio de reacción.

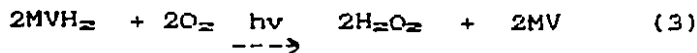
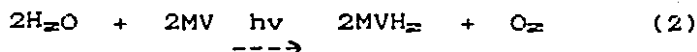
En las preparaciones de partículas membranales fotosintéticas, se pierde la continuidad de la cadena oxidorreductora.

debido a que la ferredoxina (proteína extrínseca de la membrana) y el NADP se solubilizan en el medio. Por ello es necesario adicionarle a la preparación, un aceptor artificial de electrones, si se requiere que el aceptor reciba electrones a nivel del fotosistema II, se agrega $K_3Fe(CN)_6$ y si se desea que reciba electrones a nivel del PSI, se agrega metilviológeno (MV).

Para el caso del Ferricianuro de potasio como aceptor de electrones, se observa una producción neta de O_2 , por la donación de electrones del agua a la cadena fotosintética.



Para el caso del metilviológeno como aceptor, se observa un consumo neto de O_2 . Esto se debe a que por cada 0.5 mol de O_2 producido al lisar el H_2O , se reduce una mol de MV, la cual reacciona con el O_2 produciendo H_2O_2 de acuerdo a las siguientes reacciones.



Se observa que en la reacción (2) se produce 1 mol de O_2 y en la reacción (3) se consumen 2 moles de O_2 por cada 2 moles de H_2O oxidada. Es decir, que se consume media mol de O_2 por mol de H_2O oxidada y se transfieren $2e^-$ y liberan 2 protones por esta misma mol de H_2O .

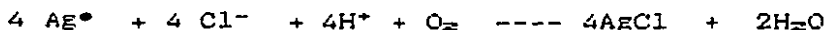
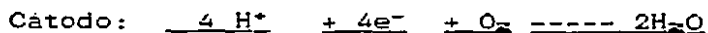
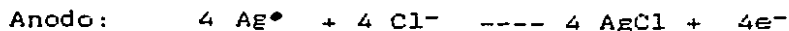
El metilviológeno acepta electrones a nivel del aceptor que viene del P700.

Principio:

El transporte de electrones en el sistema, se determinó midiendo la liberación de O_2 por la reacción de fotólisis del H_2O en función del tiempo, con un monitor de oxígeno YSI Modelo 5300 prestado amablemente por el Dr. Salvador Uribe del Instituto de Fisiología Celular. Este monitor con sistema de electrodos de Clark. El sistema de Clark está formado por dos electrodos (Yellow Springs Instruments, 1973): Uno es el cátodo de platino, el otro un ánodo de plata, ambos electrodos están sumergidos en la misma solución de KCl concentrados (electrolito soporte). Los electrodos están cubiertos por una membrana de teflón (politetrafluoroetileno) permeable al O_2 .

La membrana evita que el electrodo se contamine por las sustancias químicas presentes en la mezcla de reacción y además, ofrece selectividad al paso de oxígeno y otros gases en contra de los iones.

El flujo de corriente resultante de las celdas electrolíticas es proporcional a la concentración de O_2 en el medio cuando se aplica un voltaje de 0.5 a 0.8 voltios a través de los electrodos. Las reacciones que ocurren en los electrodos son:



Aparato:

El monitor de O_2 se conecta a un graficador (Heath-servo-recorder). Como fuente de iluminación se utiliza un proyector Sawyer 550A con una lámpara de 500 watts que suministra luz a

saturación. El haz luminoso se hace pasar a través de una lente de Izawa (un matraz con trazas de sulfato de cobre) la cual sirve como filtro y elimina el calor además de concentrar el rayo de luz. Se emplea una base de agitación magnética para tener iluminación constante al mantener homogénea la suspensión de cloroplastos.

Mezcla de reacción:

La mezcla de reacción para medir el transporte de electrones fosforilante en la cadena fotosintética del cloroplasto es la siguiente en 3ml de medio: Sacarosa 100 mM, KCl 10 mM, $MgCl_2$ 5mM, Tricina 10 mM, MV 50 μ M, ADP 1,0 mM y KH_2PO_4 3,0 mM, pH 7.6, cloroplastos equivalentes a 60 μ g de clorofila. Para calibración se emplearon 8 μ l de ferricianuro de potasio 0.3 M, en lugar de MV. La reacción se efectúa a 20°C

Análisis del trazo:

El tipo de consumo de oxígeno obtenido durante la fotólisis del agua, se observa en la figura 4. La velocidad de consumo (con MV) o producción de O_2 (con ferricianuro), se puede determinar comparando la deflexión que sufre el trazo de la pluma, después de adicionar una cantidad conocida de ferricianuro.

Cuando no hay cambio en la concentración de O_2 , se registra un trazo con pendiente nula (fig. 4).

La disminución en la concentración de O_2 del medio, es proporcional a la pendiente obtenida. Se observa en la figura 4, como esta pendiente varía en función del tipo de transporte de electrones que se tenga, así la pendiente se incrementa en el sentido de menor a mayor: transporte de electron basal < transporte de electrón fosforilante < transporte de electrón

desacoplado.

Para obtener una relación cuantitativa de estas pendientes con la velocidad de transporte de electrones, se compara el sistema a uno ya conocido, por ejemplo el que incluye al ferricianuro de potasio como aceptor de electrones.

En la figura 5 se observa el incremento en el oxígeno del medio cuando se agrega un pulso de ferricianuro. Cuando todo el ferricianuro se ha reducido, esta pendiente se anula, pues ya no hay transporte de electrones e inclusive se revierte, ya que el ferrocianuro formado es un donador de e^- en vez del agua. De acuerdo a la estequiometría de la reacción mostrada en la ecuación 1, se observa que la reducción de 1 mol de ferricianuro por el agua, requiere de 1mol de e^- y libera 0.25 moles de O_2 . Así, el número de μeq de ferricianuro reducidos, será igual al número de μeq de e^- transportados y equivalentes a la amplitud del trazo desde que se enciende la luz, hasta que se consume todo el ferricianuro.

En la figura 5, se ilustra el tipo de cálculo que debe hacerse: La calibración con 0.24 μeq de ferricianuro (0.24 μeq de e^- ver fig. 5B) desplaza una distancia de 2.1 cm en un minuto. Esta distancia entonces se relaciona con la obtenida en el trazo de la muestra problema (4-6 cm en este caso para el MV ver Fig. 5A), para obtener el número de μeq de e^- transportados en función del tiempo (horas) y de la cantidad de clorofila (mg), en condiciones similares. Así tendremos utilizando los datos dados de este ejemplo:

$$\frac{0.24 \mu eq e^-}{2.1 \text{ cm} \times \text{min}} \times \frac{4.6 \text{ cm} \times 60 \text{ min}}{0.060 \text{ mgcl} \times \text{hora}} = 525.7 \mu eq e^- \cdot h^{-1} \cdot \text{mgcl}^{-1}$$

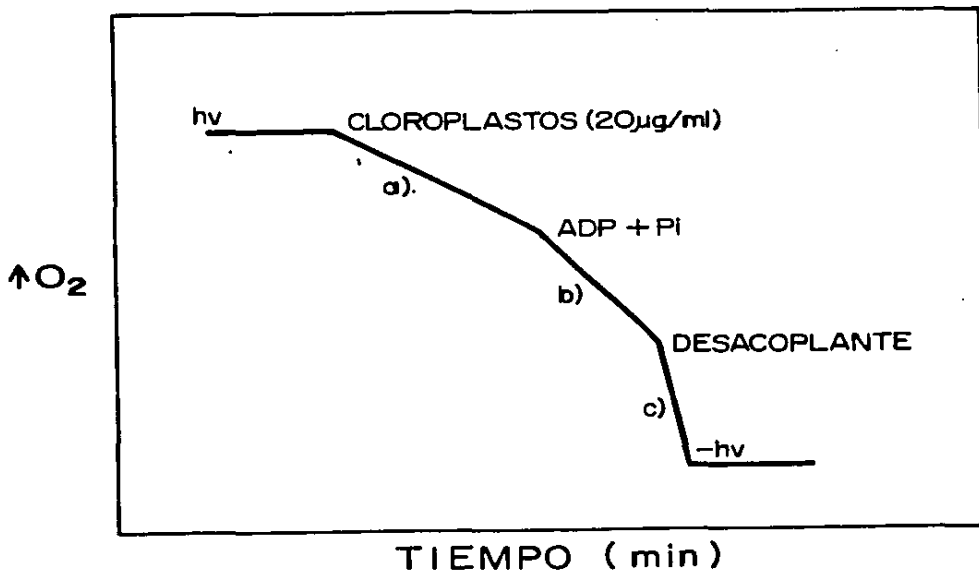


Fig.4. Esquema para el transporte electrónico en cloroplastos en condiciones basales a). Fosforilante b) y fosforilante desacoplado c). Condiciones descritas en el texto. $h\nu$ -luz encendida, $-h\nu$ -luz apagada. Los trazos con pendiente nula corresponden al medio de reacción en ausencia de cloroplastos y/o de luz.

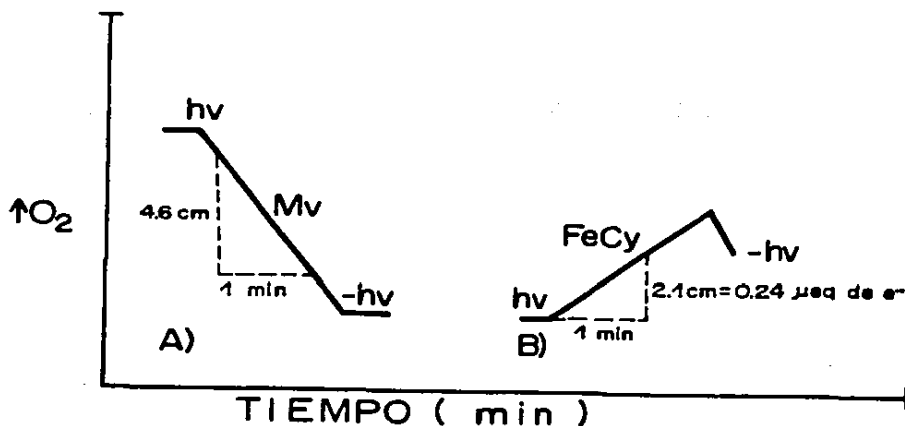


Fig.5. Trazos para el transporte de electrones de agua a metilviológeno para el problema A) y de agua a ferricianuro para calibración B). Los cálculos se describen en el texto.

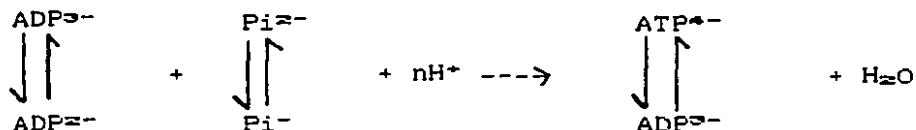
Medición de la síntesis de ATP.

El método para determinar la fotofosforilación, se basa en el registro de los cambios de pH en la mezcla de reacción, que contiene los cloroplastos iluminados en las condiciones adecuadas para la síntesis de ATP (101).

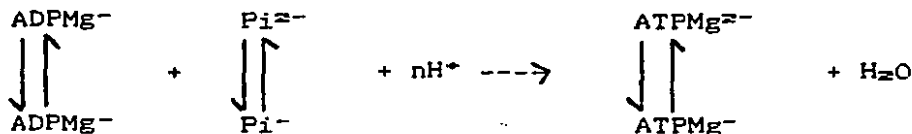
Principio:

Los nucleótidos 5'-difosfórico y 5'-trifosfórico, son ácidos relativamente fuertes y disocian 3 y 4 protones respectivamente de sus grupos fosfórico concentrados. El pK_a correspondiente al complejo ADP-Mg es de 5.13 y para el complejo ATP-Mg de 4.97, con estos valores y las constantes de disociación ácida del fosfato, se puede calcular la carga neta para el ATP, ADP y fosfato y sus complejos metálicos en función del pH.

La reacción de síntesis de ATP puede expresarse como sigue:



o cuando se asume la formación del complejo de Mg:



Se observa que durante la síntesis de ATP se consume un número de protones $n\text{H}^{+}$, el cual va a depender de la carga que presenten el ATP, ADP y fosfato; así como los complejos de estas

especies químicas con iones divalentes. El valor nH^+ ha sido calculado a varios pHs y concentraciones de Mg^{++} por Alberty (102) a concentraciones constantes de K^+ . Así, para $pMg^{++} = 2.0$ $nH^+ = 0.6$ a pH 7.0; 0.8 para pH 7.5 y para pH 8.0 $nH^+ = 1$ en su rango de pMg^{++} de 2.0 a 7.0.

El número de protones consumido por ATP sintetizado es aproximadamente igual para el caso de complejos metálicos en un medio de fuerza iónica de 0.2 y pH mayor que 7.0.

Método:

Las mediciones del cambio de concentración de protones en el medio debido a la fotofosforilación en membranas tilacoides se hace con un electrodo de respuesta rápida; conectado a un potenciómetro Corning Modelo 12 de escala expandida. Este pH-metro se conecta a un graficador Beckman a 10 mV.

El par pH-metro-registrador suministra una escala donde la deflexión total de la pluma significa 0.5 unidades de pH. La iluminación está dada por un proyector con una lámpara de 300 watts, la cual produce luz de intensidad saturante para el sistema empleado. Se emplea una lente de Izawa como filtro (solución diluida de sulfato de cobre) para evitar la mayoría de los efectos calóricos del rayo. La suspensión se mantiene homogénea por agitación constante mediante un agitador magnético Mag-Mix Modelo 65904.

Mezcla de reacción:

La mezcla de reacción estándar contiene en un volumen de 3ml (concentración final) a pH 8.0: KCl 100 mM, $MgCl_2$ 5.0 mM, ADP 1.0 mM, KH_2PO_4 3.0 mM, metilviológeno 50 μ M, Tricina 0.5 mM y cloroplastos equivalentes a 20 μ g/ml.

Una vez completo el medio de reacción se ilumina la muestra y se registra el cambio de pH en función del tiempo. Se apaga la luz y después de 1 minuto de estabilización del pH, se agregan cantidades conocidas de HCl 0.01N, para titular el cambio de pH observado y evaluar la capacidad de amortiguamiento ($= H^+$ añadidos/ Δ pH).

Análisis del trazo:

El tipo de trazo obtenido es el que se muestra en la Fig. 6.

La velocidad de síntesis de ATP puede ser determinada comparando el cambio de pH obtenido después de la adición de una cantidad conocida de ácido estándar, con el que se presenta debido a la alcalinización de la muestra al sintetizarse ATP. En base a esto puede calcularse $\Delta [H^+]/\Delta t$. Este valor dependiendo de nH^+ ($= 1$ para pH 8.0), se convierte a $\Delta [ATP]/\Delta t$ lo cual se expresa en $\mu\text{molATP} \cdot \text{mgcl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Por ejemplo, con los siguientes datos experimentales, calculemos la cantidad de ATP/h.mgcl: 3ml de la mezcla de reacción ya descrita, 60.5 μg totales de clorofila, velocidad de la carta 1 pulgada/minuto. HCl para titular: 5 μl , 0.01N (0.05 $\mu\text{eq H}^+$).

0.05 μeqH^+ desplazan la aguja 5.5 cm (ver Fig. 6).

La muestra desplaza la aguja en sentido contrario 12.3 cm en un minuto, al hacer la siguiente relación tendremos:

$$\frac{0.05 \mu\text{moles H}^+}{5.5 \text{ cm} \times \text{min}} \times \frac{12.3 \text{ cm} \times 60 \text{ min.}}{0.0605 \text{ mgcl.} \times \text{hora}} = 110.89 \mu\text{moles ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mgcl}^{-1}$$

Medición de la bomba de protones.

El transporte de iones y particularmente de H^+ , ha estado asociado al flujo de electrones y a la conservación de la energía en los cloroplastos. Este flujo de e^- inducido por la luz, resulta en un incremento externo del pH (103) presumiblemente debido a la captación de H^+ en el interior de la membrana tilacoidal.

Para medir la bomba de H^+ es conveniente ajustar el pH a 6.0 (103), dependiendo de la capacidad amortiguadora de la mezcla de reacción, el cambio de pH inducido por la luz puede ser tan grande como 0.4 unidades de pH, es decir de un pH inicial de 6.0 a 6.3 ó 6.4 en la luz.

Aunque la elevación en el pH puede observarse en mezclas de reacción que contienen solamente cloroplastos, éste se incrementa notablemente en presencia de aceptores de electrones como el metilviológeno. Las condiciones de reacción son similares a las descritas en el numeral anterior para la síntesis de ATP.

El medio de reacción para la bomba de H^+ a pH 6,0 es también el mismo exceptuando desde luego, el ADP y el fosfato. Una curva típica para los cambios de pH inducidos por luz en una mezcla de reacción de 3 ml que contiene cloroplastos equivalentes a 63 μ g de clorofila, se puede observar en la Figura 7.

La velocidad y el cambio de pH, se puede estimar debido a la deflexión del pH, ocasionado por la adición de una cantidad conocida de ácido estándar, la cual se compara con la basificación del medio luego de la iluminación de la muestra de cloroplastos. El tipo de cálculo es el mismo que el mencionado para el caso de la fotofosforilación.

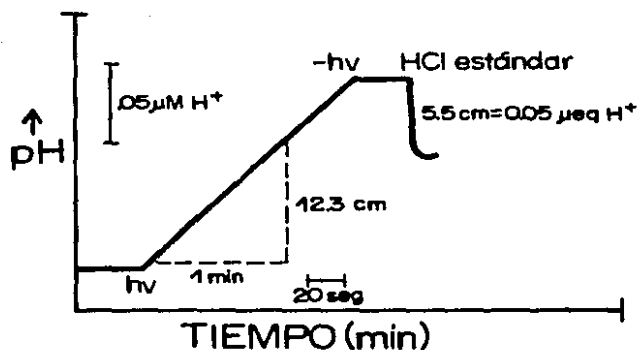


Fig.6. Curva obtenida al registrarse el cambio de pH en el medio durante la síntesis de ATP. $h\nu$ -luz encendida. $h\nu$ -luz apagada.

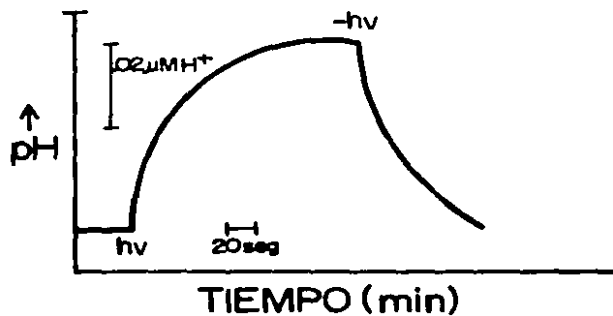


Fig.7. Cambios de pH observados durante la iluminación de una suspensión de cloroplastos. Las condiciones se describen en el texto.

Obtención de liposomas unilamelares con pigmento agrapado.

Los liposomas como un sistema modelo de membrana, constituyen una bicapa lipídica relativamente impermeable, que encierra completamente un espacio acuoso y tienen la propiedad de encapsular varios solutos presentes en la fase acuosa durante su formación.

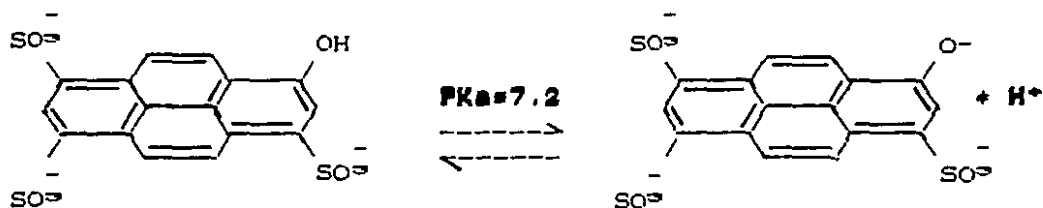
En organelas aisladas y vesículas tales como cloroplastos, mitocondrias y liposomas, las diferencias en concentración de iones hidrógeno a través de membranas pueden cuantificarse:

- a) Utilizando técnicas basadas en la distribución de aminas fluorescentes o radiactivas.
- b) Midiendo el flujo de H^+ mediante el cambio en la concentración externa del pH por medio de un microelectrodo combinado de pH.
- c) Utilizando indicadores internos de pH, tales como azul de bromotimol y rojo neutro; sin embargo, estos indicadores y aminas fluorescentes usualmente se unen a la membrana u otros compartimentos distribuyéndose de acuerdo al estado metabólico o las condiciones experimentales (104).

El enfoque que ha proporcionado resultados más satisfactorios al menos con vesículas sonicadas, es el uso de indicadores de alto peso molecular que son atrapados en el interior de las vesículas durante su preparación.

Una de estas moléculas es la piranina: 8 hidroxí 1,3,6 pirenotrisulfonato trisódico. Una molécula fluorescente muy sensible a modificaciones en el pH, la cual atrapada en el interior de vesículas liposomales, sirve como un método confiable para la medición de cambios en la concentración de

iones hidrógeno. Esta molécula contiene 3 grupos sulfonato ionizados en todos los rangos de pH. La piranina es completamente repelida de superficies cargadas negativamente y es atraída por grupos catiónicos (105)



La piranina tiene un PKa de 7.2 para el grupo 8 hidroxilo de modo que a pH básico predomina la especie ionizada. La intensidad de la fluorescencia a 520 nm, depende de la concentración de esta especie ionizada, de tal forma que es posible determinar el grado de protonación de la molécula por la disminución en la intensidad de la fluorescencia.

Método:

Se utilizan en la preparación de liposomas, fosfolípidos extraídos de frijol de soya: 20 mg de fosfolípidos se resuspenden en 1ml de una solución tampón pH 8.2, que contiene KCl 0.1M, sacarosa 0.2M, tricina-KOH 5.0mM, mes-KOH 5.0 mM; la mezcla es agitada en vortex y luego sonicada en presencia de 1.0 mM de piranina durante 20 seg a 4°C en un sonicador Sonifier B-12 (Branson Sonic Power Company), prestado por el Dr. Armando Gómez-Puyou del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM).

Las vesículas que contienen piranina atrapada, se separan de la piranina acuosa externa por filtración en gel sobre una

columna de sephadex G-50 (0.6 x 19 cm) previamente equilibrada con la solución tampón. La mayor parte de la piranina queda en la columna y una mínima cantidad sale atrapada en la pequeña fracción turbia de liposomas.

Las vesículas formadas en presencia de piranina incorporan niveles significativos del compuesto en la fracción vesicular después de la filtración por gel. Estudios de polarización de la fluorescencia y de unión de la piranina a vesículas fosfolipídicas de diferente carga (106) sugieren que las moléculas de piranina asociadas a la fracción vesicular están libres en solución en la fase acuosa interna y no unidas a la bicapa fosfolipídica. Además, el polianión piranina es muy hidrofílico y prácticamente no se une a membranas vesiculares con una carga aniónica neta.

Flujo de protones a través de la membrana y relación con la fluorescencia de la piranina atrapada.

La fluorescencia de la piranina se midió en un espectrofluorómetro Mark I (facilitada por el Dr. Antonio Peña Díaz del Instituto de Fisiología Celular, UNAM), utilizando una cubeta de 1 cm que contiene en 3 ml del medio de reacción: KCl 0.1 M, sacarosa 0.2M, tricina-KOH 5.0 mM, MES-KOH 5.0 mM pH 8.2, 20µl de la dispersión de liposomas conteniendo 400µg de fosfolípidos y el pigmento piranina atrapado. La luz de excitación utilizada fue filtrada para obtener una de 460 nm. La luz de emisión fue de 520 nm. Los cambios en la intensidad de fluorescencia fueron registrados sobre un graficador: "Strip-Shart-Recorder" a una velocidad del papel de 0.5pg/min.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

La intensidad de la fluorescencia de la piranina es fuertemente dependiente del pH, como se observa en la figura 8. La figura muestra como la máxima fluorescencia se presenta a pHs básicos. A pH 4.0, la intensidad relativa del pico es despreciable a 450nm, inversamente a pH 10 hay un fuerte máximo de esta fluorescencia; lo que implica la ionización del grupo 8 hidroxilo a altos valores de pH.

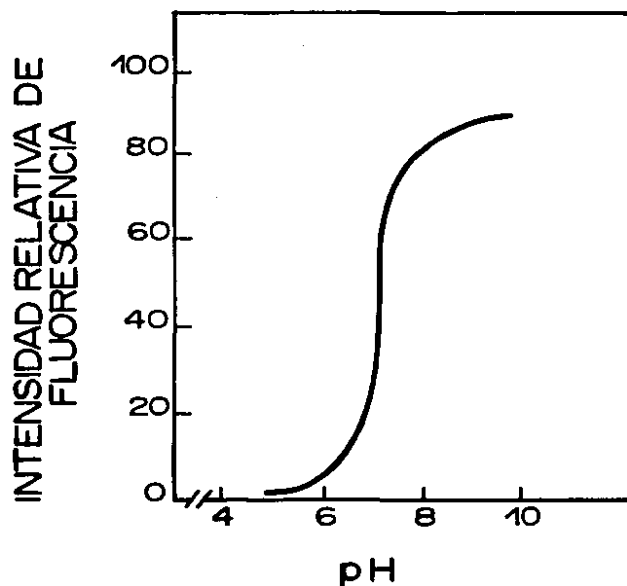


Fig.8. Cambios en la fluorescencia en función del pH de la piranina atrapada dentro de vesículas fosfolipídicas unilamelares. (Excitación-460nm, Emisión-520nm.). Condiciones: 150 μ g de fosfolípidos en 3 ml. de solución tampón pH 8.2. (Según ref.106.)

Método:

Los medios interno y externo de los liposomas, se encuentran a pH 8.2. El pH externo de la suspensión de vesículas se disminuye luego rápidamente mediante la adición de 10 μ l de HCl 1.0N (0.01 μ eq de H⁺), con lo cual el pH externo baja de 8.2 a 6.76. El flujo de protones al interior del liposoma es seguido por el cambio simultáneo en la fluorescencia de la piranina.

Los desacoplantes son ensayados a diferentes concentraciones. Se utilizan como controles al FCCP, NH₄Cl y DNP. La eficiencia del desacoplante en la conducción de protones a través de la vesícula, se determina en la siguiente forma: Se agrega el compuesto al medio de reacción en un volumen mínimo, se espera 2 minutos y luego, se añaden 10 μ eq de H⁺. Se registra la disminución en la fluorescencia producida por este compuesto y se relaciona a la producida en ausencia del desacoplante.

Debido a que la cinética de entrada de H⁺ es bifásica, una fase rápida y una lenta (ver resultados); se determina también el efecto del desacoplante sobre esta última fase, agregándolo a ella después de la adición de 10 μ eq de HCl.

RESULTADOS Y DISCUSION

Transporte electrónico fotofosforilante: (TEF)

El TEF desde el agua hasta el metilviológeno como aceptor final de e^- está graficado en función de la concentración de desacoplante para las aminas en la figura 9 y para las amidas en la figura 10. Es claro que todos estos compuestos a excepción de la piridina promueven un incremento en el TEF hasta llegar a un máximo pero luego se presenta una disminución en esta actividad, la cual ha sido interpretada por otros autores como debida a la inhibición de la enzima liberadora de O_2 por la amina libre (107). Los efectos de estimulación del TEF inducido por estos compuestos, sugieren que tienen acción desacoplante.

La potencia de la actividad desacoplante está calculada como el porcentaje de incremento en la velocidad al adicionarse el compuesto que se está ensayando comparado al control sin desacoplante.

Con el objeto de comparar el TEF con otras actividades como la captación de protones y la síntesis de ATP en cloroplastos y la conducción de H^+ en liposomas, se ha escogido la velocidad obtenida a una concentración de 1 mM, debido a que la mayor parte de las aminas presentan una actividad máxima cercana a esta concentración. Los valores de V_1 son obtenidos de las gráficas de actividad (% control) contra concentración del compuesto y los valores obtenidos se muestran en la tabla 2.

Tanto la figuras 9 y 10 como la tabla 2, muestran el siguiente orden decreciente de actividad de TEF, expresada como V_1 : hexilamina > trietilamina > dietilamina > etilamina >

Tabla 2. Actividades en % del control de transporte electrónico fosforilante, Bomba de H⁺ y Síntesis ATP en cloroplastos y conducción de protones en liposomas, de aminas y amidas en relación a los valores de logP y pKb (V₁= actividad a una concentración de 1.0 mM).

#	Nombre	Transporte e ⁻ fosforilante		Bomba de H ⁺		Síntesis ATP		Conducción H ⁺		logP.	pKb
		V ₁ mM	log $\frac{1000}{V_1}$	V ₁ mM	log $\frac{1000}{V_1}$	V ₁ mM	log $\frac{1000}{V_1}$	V ₁ mM	log $\frac{1000}{V_1}$		
1	HEXILAMINA	320	0.49	48.0	1.32	15.5	1.81	178	0.75	2.05	3.36
2	TRIEFILAMINA	259	0.59	71.0	1.15	75.5	1.12	117	0.93	1.44	3.35
3	DIETILAMINA	197	0.71	68.2	1.17	80.5	1.09	109	0.96	0.57	3.06
4	ETILAMINA	194	0.71	72.0	1.14	85.0	1.07	118	0.93	-0.11	3.36
5	QUINUCLIDINA	178	0.75	77.0	1.11	72.0	1.14	124	0.91	0.15	3.50
6	ETILENDIAMINA	165	0.78	39.5	1.40	70.0	1.15	128	0.89	-2.0	4.07
7	OCTANAMIDA	141	0.85	92.2	1.04	53.5	1.27	109	0.96	1.71	14.50
8	3 METILBUTANAMIDA	112	0.95	104.5	0.98	74.0	1.13	104	0.98	-0.11	14.50
9	ACETAMIDA	106.8	0.97	103.2	0.99	82.0	1.09	106	0.97	-1.53	14.50
10	PIRIDINA	80.0	1.10	86.5	1.06	95.6	1.02	105	0.98	0.62	8.80

[ETILAMINA ó CLORURO DE AMONIO] mM

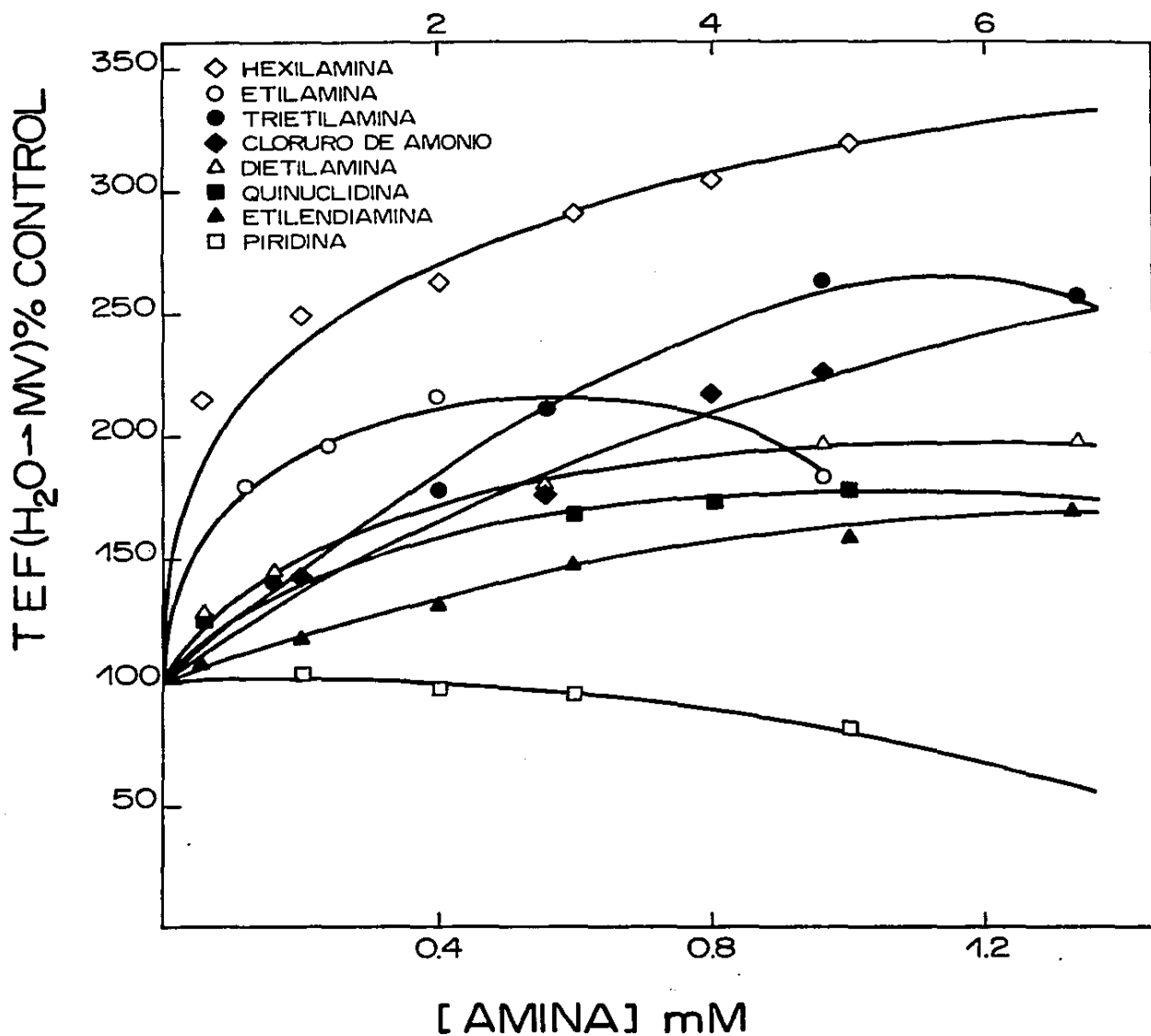


Fig. 9 Efecto del incremento en la concentración de aminas sobre la activación del transporte electrónico fosforilante de agua a metilviológeno. El valor del control para esta reacción fue de 170.03 ueq de -- electrones por hora y por miligramo de clorofila. Las condiciones de reacción están indicadas en materiales y métodos. La escala horizontal de concentración (mM) superior son para el cloruro de amonio y la etilamina. Los símbolos están definidos en el recuadro de la gráfica.

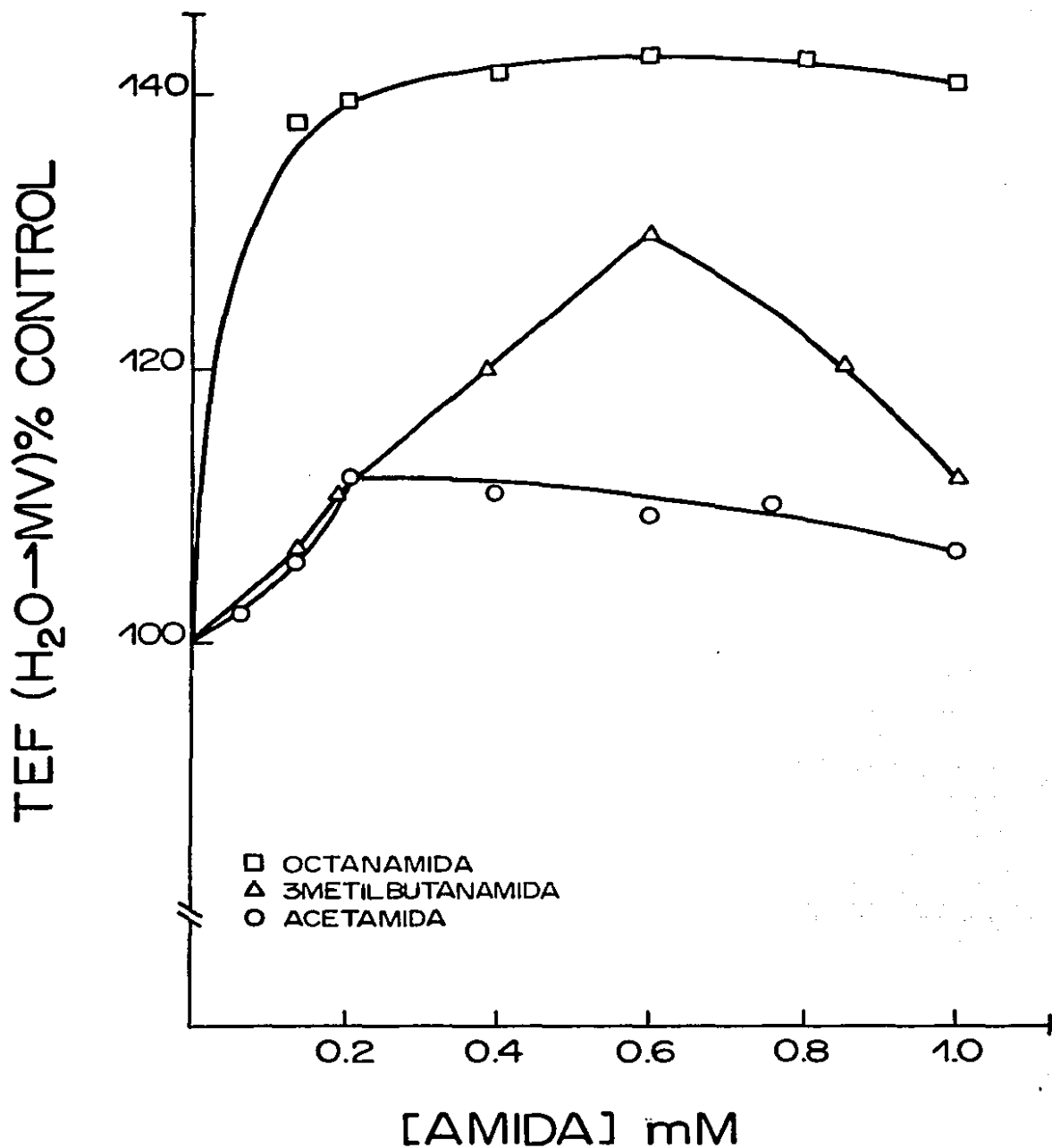


Fig.10.Efecto del incremento en la concentración de amidas sobre la activación del transporte electrónico fosforilante (TEF). Los símbolos están identificados en la parte inferior de la figura. Condiciones de reacción como en la fig.9.

quinuclidina > etilendiamina > octanamida > 3 metilbutanamida > acetamida > piridina. El orden de basicidad de los mismos compuestos es: dietilamina > trietilamina > etilamina = hexilamina > quinuclidina > etilendiamina > piridina > acetamida, 3 metilbutanamida, octanamida.

Los datos indican que el orden de potencia desacoplante no sigue el orden de basicidad. De la figura 11 puede verse, que no hay una correlación entre la fuerza básica (pK_b) y la efectividad del desacoplamiento $\log \frac{1000}{V_1}$. Las aminas hexilamina, trietilamina, etilamina y quinuclidina con valores de pK_b muy similares, presentan actividades desacoplantes muy diferentes. La trietilamina y hexilamina estimulan más el transporte electrónico fosforilante, que la dietilamina a pesar de que esta última tiene mayor afinidad por protones. Tal vez el resultado más notorio se presenta con las 3 amidas ensayadas, las cuales a pesar de poseer valores muy altos de pK_b lo cual indica que no se protonan, incrementan el flujo de electrón fosforilante; mientras que la piridina con una mayor basicidad que las amidas inhiben este transporte.

Así, tomando en cuenta solo este parámetro pK_b podríamos concluir que el efecto de protonación de un compuesto no es requisito indispensable para activar el transporte electrónico fosforilante.

Al analizar el logaritmo del coeficiente de partición ($\log P$) de los compuestos en relación a sus efectos sobre el TEF, se puede observar una mejor correlación lineal (fig. 12) sobre todo si se exceptúan las amidas y la piridina.

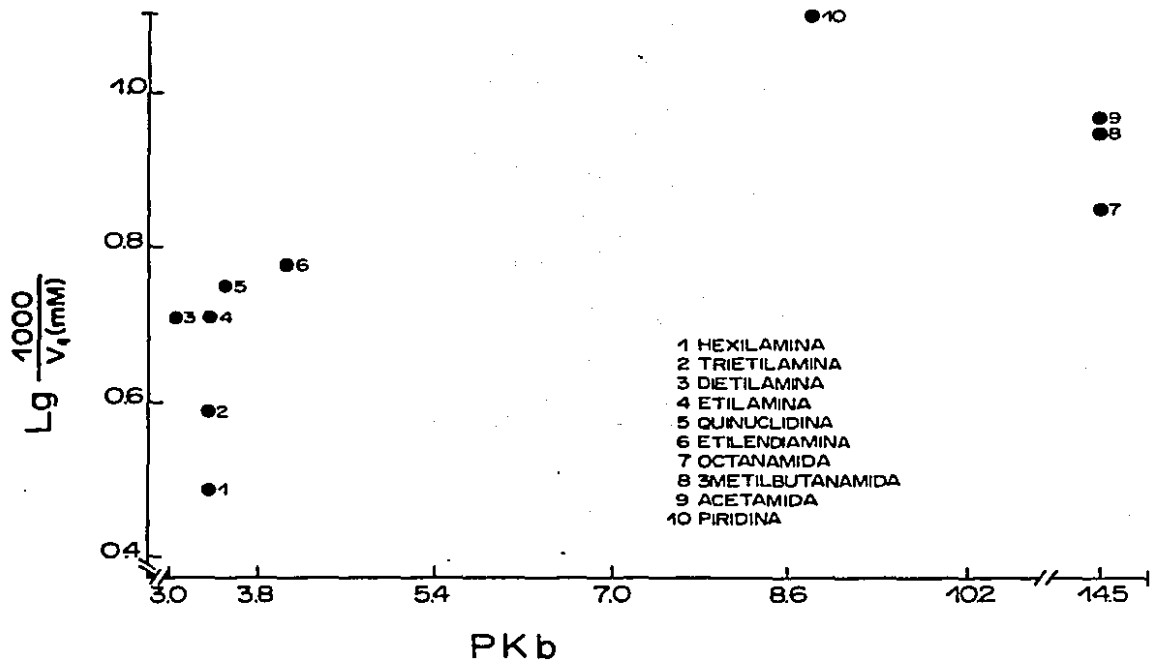
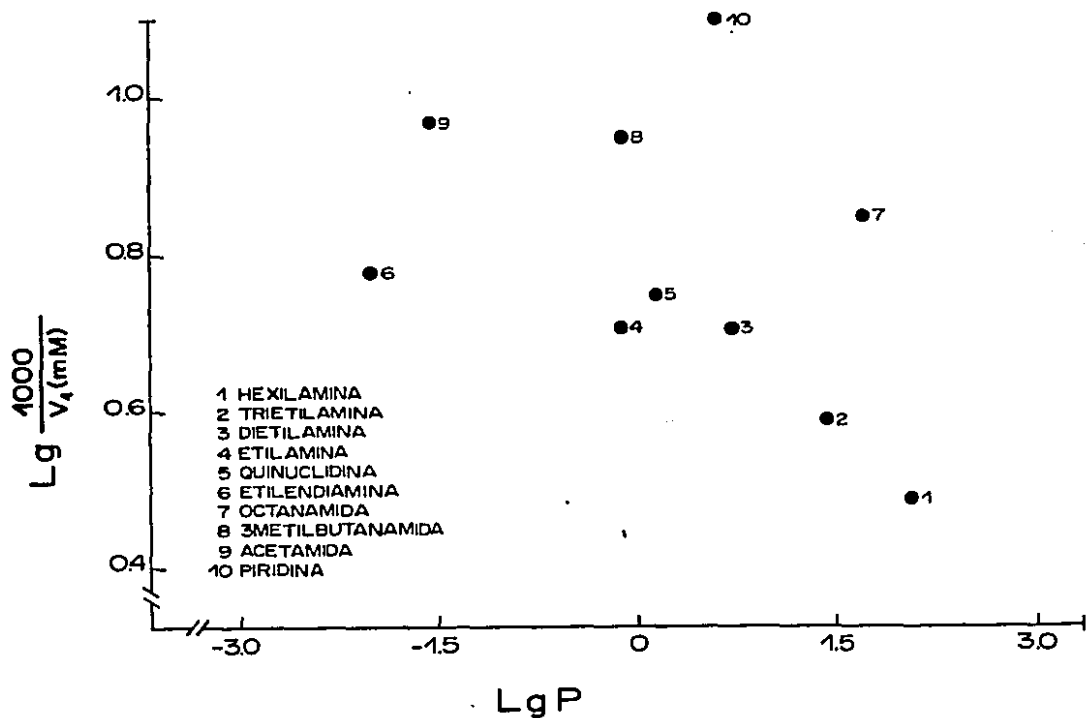


Fig. 11. Valores observados de $\log.1000/V_1$ contra pK_b para el transporte electrónico fosforilantes por aminas y amidas. V_1 es la velocidad de la reacción a una concentración de $1mM$. del compuesto. Los datos y el número que identifica a cada compuesto son los que aparecen en la tabla 2.

Fig. 12. Valores observados de $\log.1000/V_1$ contra el logaritmo del coeficiente de partición para el transporte electrónico fosforilante por aminas y amidas. Los datos y la enumeración de los compuestos son como aparecen en la tabla 2.



Para relacionar los 3 parámetros: logP, pKb y actividad de TEF, se llevó a cabo un análisis de regresión lineal, el cual proporciona la ecuación:

$$\log \frac{1000}{V_1} = 0.024 \text{ pKb} - 0.047 \log P + 0.628 \quad (1)$$

n = 10 r = 0.80

Sin embargo al excluir las amidas de la regresión, se obtuvo un mejor coeficiente de correlación de 0.96 y la ecuación lineal correspondiente es:

$$\log \frac{1000}{V_1} = 0.083 \text{ pKb} - 0.056 \log P + 0.40 \quad (2)$$

ambas ecuaciones nos muestran, como un incremento en la basicidad (menor pKb) o un aumento en la solubilidad en la membrana (mayor logP) de los compuestos, aumentan la velocidad del TEF (menor valor de $\log \frac{1000}{V_1}$). Estos datos apoyan el mecanismo de

desacoplamiento quimiosmótico, según el cual, la potencia desacoplante se incrementa al aumentar la hidrofobicidad y basicidad del compuesto.

Es conveniente señalar la importancia de analizar conjuntamente los parámetros fisicoquímicos que afectan la actividad biológica. El tomar en cuenta solo un parámetro puede conducir a conclusiones erróneas.

Biosíntesis de ATP en tilacoides o fotofosforilación.

El efecto de las aminas y amidas ensayadas sobre la síntesis de ATP, se muestra en las figuras 13 para las aminas, 14 quinuclidina y 15 para amidas. Se utilizó NH₄Cl como control.

Tanto la dietilamina (fig. 13) como la quinuclidina (fig. 14) promueven un ligero incremento en la síntesis de ATP a

[CLORURO DE AMONIO ó ETILAMINA] mM

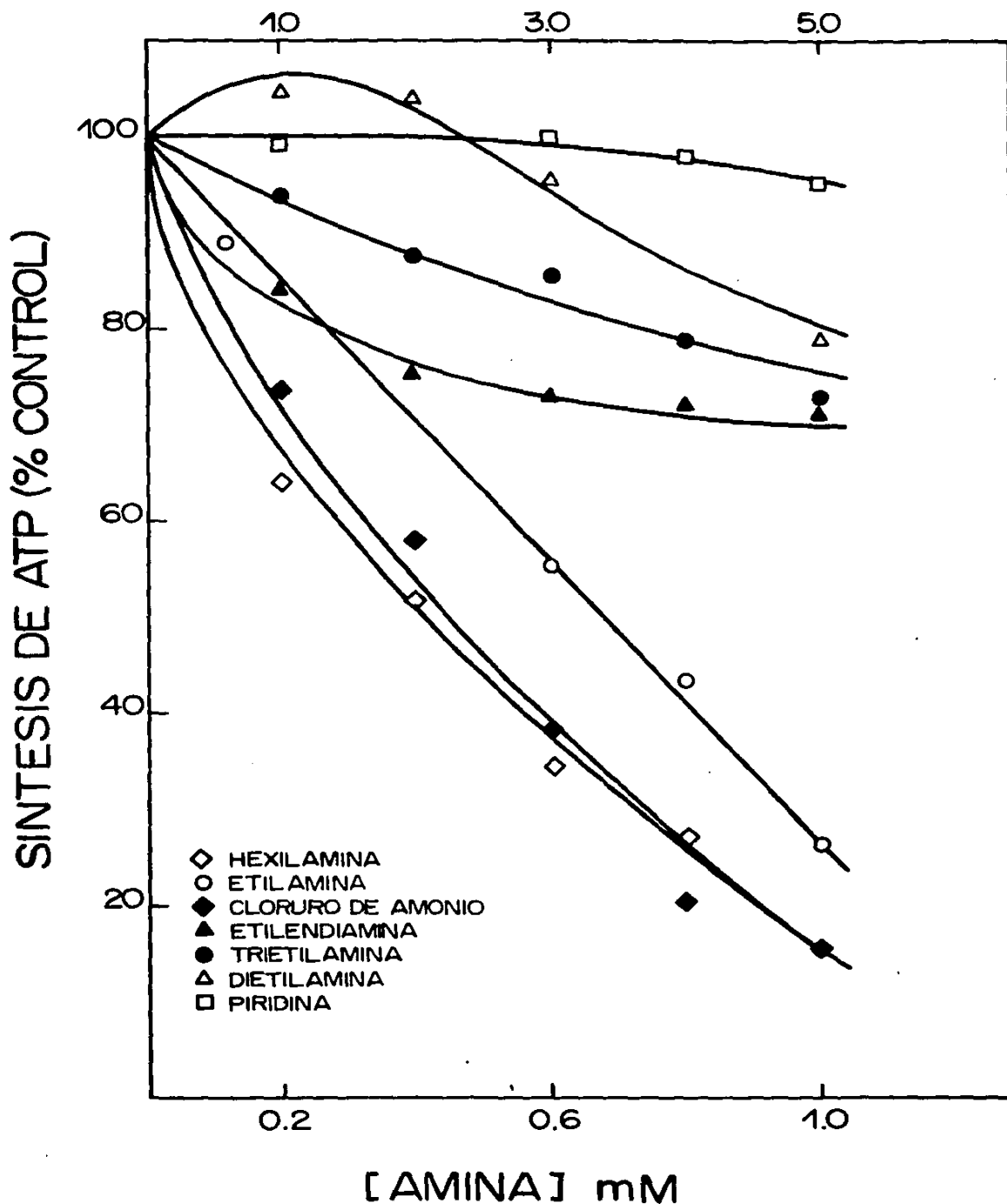


Fig.13. Síntesis de ATP en función de la concentración de aminas. La síntesis fue ensayada a pH 8 según lo describe en materiales y métodos. La escala horizontal de concentración es para la etilamina y el cloruro de amonio. El valor del control para el ATP formado fue de 128.14 μ moles de ATP por miligramo de clorofila y por hora.

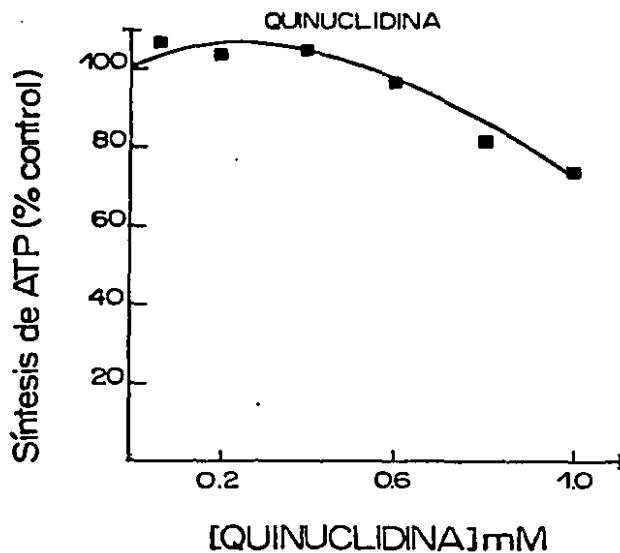


Fig. 14. Síntesis de ATP en función de la concentración de quinuclidina. Condiciones de reacción como en la fig. 13.

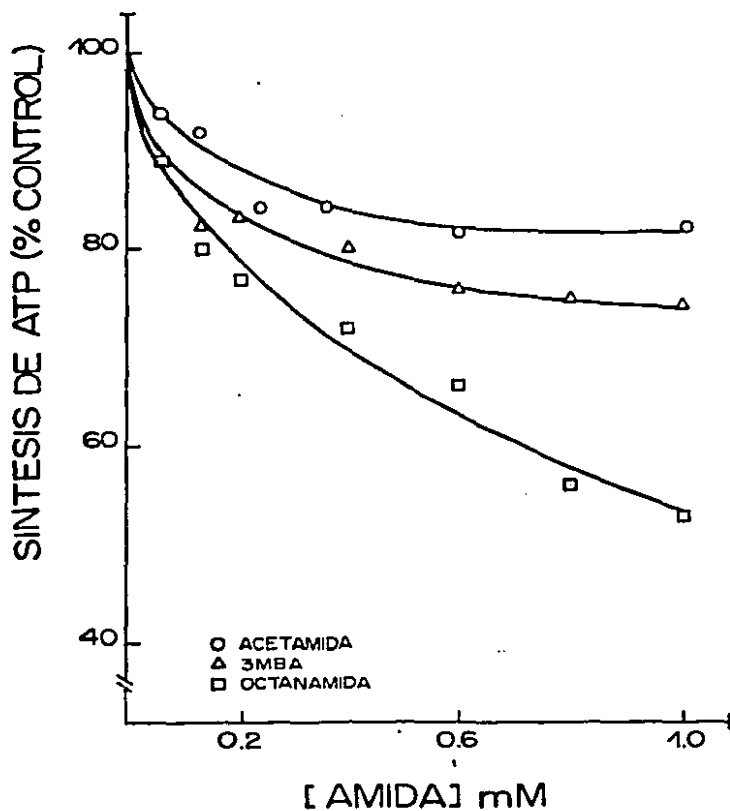


Fig. 15. Síntesis de ATP en función de la concentración de amidas. Los símbolos se identifican en la parte inferior de la figura. Condiciones de ensayo como en la fig. 13.

concentraciones bajas de hasta 0.45 mM, incremento que debería ser consistente con la captación de H^+ por la bomba de acuerdo a la hipótesis quimiosmótica (ver más adelante). Incrementos semejantes en la síntesis de ATP, fueron reportados para concentraciones bajas de cloruro de amonio y metilamina por Giersch en cloroplastos (113) a medida que el ΔpH disminuye y aumenta el transporte electrónico fosforilante.

El abatimiento de la fotofosforilación por las aminas desacoplantes, alcanza valores inferiores al 30% con excepción de la hexilamina y etilamina que promueven una caída más completa (fig. 13). Es importante anotar que la actividad desacoplante de la etilamina ocurre a concentraciones mayores que las otras aminas y similares a las del cloruro de amonio.

Las amidas acetamida y 3 metilbutanamida (fig. 15) ocasionan también un abatimiento en la síntesis de ATP comparable a las aminas de la parte superior de la figura 13, pero la octanamida (fig. 15) bloquea la fotofosforilación con mayor potencia que las otras 2 amidas y que la mayoría de las aminas (ver tabla 2). La inhibición en la síntesis de ATP aumenta con el incremento en la cadena hidrocarbonada de las amidas, lo cual indica que la hidrofobicidad de estos compuestos es un factor importante para su actividad, ya que el pK_b permanece constante (tabla 2).

Por su efecto en el incremento del transporte de electrones fosforilante y el abatimiento en la síntesis de ATP, las 3 amidas ensayadas pueden clasificarse como desacoplantes de la fotofosforilación.

De las figura 13, 14 y 15 se obtienen los valores de V_1 que se presentan en la tabla 2. Puede observarse de esta tabla 2 un

orden decreciente de abatimiento de la fotofosforilación: hexilamina > octanamida > etilendiamina > quinuclidina > 3 metilbutanamida > trietilamina > dietilamina > acetamida > etilamina > piridina.

De los datos de la tabla 2 y de la figura 16, puede establecerse que hay una correlación pobre entre la actividad ($\log \frac{1000}{V_1}$) y el pKb, ya que presentan prácticamente la misma potencia inhibitoria de la síntesis de ATP con excepción del compuesto 1 (hexilamina), teniendo un pKb variable.

La actividad de la mayor parte de aminas ensayadas es comparable a la actividad de las amidas acetamida y 3 metilbutanamida, a pesar de la gran diferencia en valores de pKb (3.4 a 14.5). La octanamida (Nº.7) presenta también un efecto notablemente alto en comparación a su valor de pKb.

La figura 17 muestra también una pobre correlación entre el abatimiento de la fotofosforilación ($\log \frac{1000}{V_1}$) y el logaritmo del coeficiente de partición. Compuestos muy hidrosolubles como etilamina (Nº.4), etilendiamina (Nº.6) y acetamida (Nº.9); muestran actividades semejantes a compuestos hidrofóbicos como trietilamina (Nº.2) y dietilamina (Nº.3). La hexilamina (Nº.1) y la octanamida (Nº. 7) presentan actividades altas correspondientes a su altos valores de hidrofobicidad (tabla 2).

El análisis conjunto de las 3 variables: actividad, logP, pKb por regresión lineal para los datos de la tabla 2 correspondientes a la síntesis de ATP, muestran una correlación pobre. Para los 10 compuestos, el coeficiente de correlación encontrado es de 0.52, la exclusión de las amidas solo mejora ligeramente la

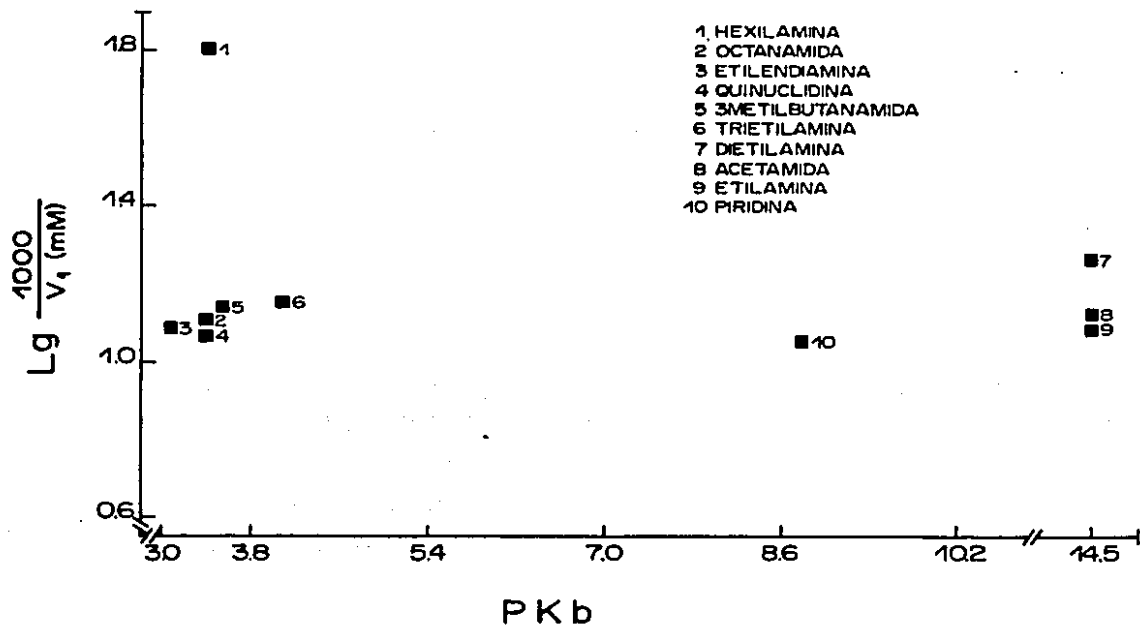
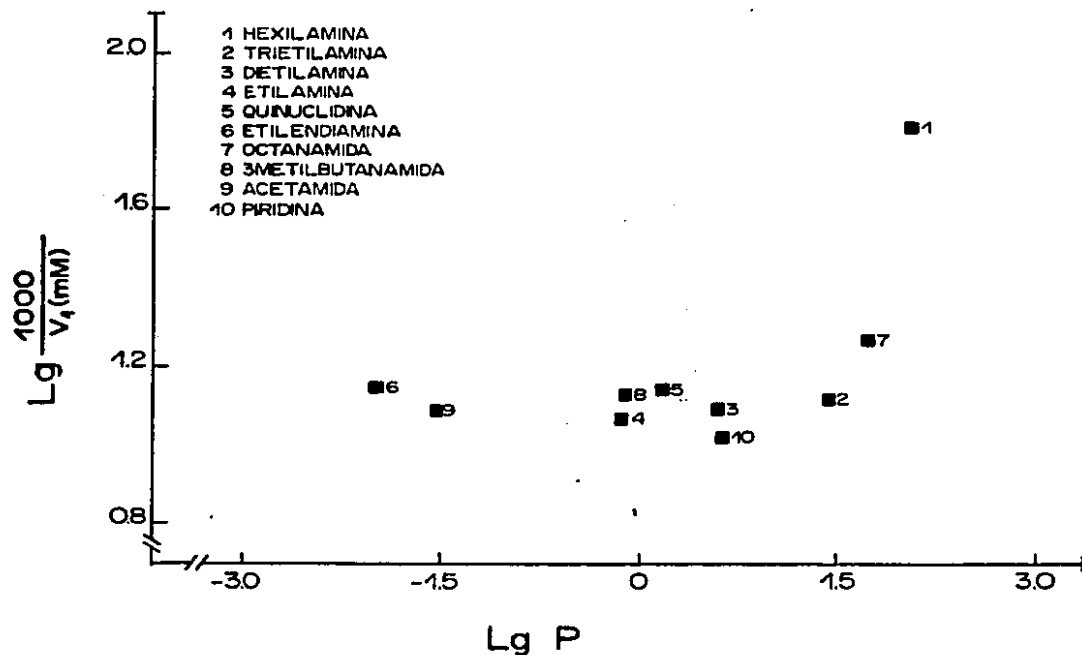


Fig. 16. Valores observados de $\text{log.}1000/V_1$ contra pKb para la síntesis de ATP en presencia de aminas y amidas. Los datos y el número que identifica a cada compuesto son tomados de la tabla 2.

Fig. 17. Valores observados de $\text{log.}1000/V_1$ contra el log. del coeficiente de partición para la síntesis de ATP en presencia de aminas y amidas. Los datos y el número que identifica a cada compuesto son tomados de la tabla 2.



correlación a 0.56, estableciéndose una ecuación de regresión:

$$\log \frac{1000}{V_1} = 0.10 \log P - 0.034 \text{ pKb} + 1.30 \quad (3)$$

$$n = 7 \quad r = 0.56$$

al considerar las constantes de la ecuación que multiplican a las variables termodinámicas, podría deducirse que la actividad foto-fosforilante depende principalmente de la penetración del compuesto a través de la membrana y poco del incremento en la basicidad, ya que a mayor valor de la constante, mayor dependencia de la actividad sobre el parámetro hidrofóbico.

Captación de protones.

De acuerdo a la hipótesis quimiosmótica de desacoplamiento, un desacoplante abate la síntesis de ATP y el pH en forma similar a través de las 2 fases acuosas del tilacoide.

Se ensaya el efecto de los compuestos cuya actividad desacoplante ha quedado establecida por los resultados descritos arriba (ver también referencia 96) sobre la bomba de H⁺, con el objeto de observar si estos compuestos funcionan disminuyendo la entrada de H⁺ a la vesícula tilacoide, si esta disminución es paralela al decremento en la fotofosforilación y si existe correlación entre la disminución de la bomba de H⁺ con las propiedades fisicoquímicas pKb y logP.

Todas las aminas abaten la captación de protones al incrementarse su concentración. (fig. 18) a excepción de la quinuclidina (fig. 19) que la aumenta ligeramente a bajas concentraciones. En este último caso, hay también un incremento en la síntesis de ATP (fig. 14) aunque este incremento se mantiene

entre 0.15 y 0.5 mM, lapso en el cual la captación de H^+ se encuentra disminuida.

Las aminas que abaten la captación de H^+ cumplen cualitativamente un requisito de la hipótesis quimiosmótica.

La dietilamina presenta disminución en la captación de protones en todo el rango de concentraciones ensayadas (fig. 18), sin embargo a concentraciones bajas se presenta incremento en la síntesis de ATP (fig. 14) como se anotó antes.

Una característica notable de las amidas como la acetamida y la 3 metilbutanamida es que incrementan la captación de H^+ , en vez de disminuirla sobre todo a concentraciones bajas, obteniéndose el máximo de actividad a 0.2 mM (fig. 20). La octanamida por otra parte con propiedades ácido básicas similares ($pK_b=14.5$) se comporta como una amina abatiendo ligeramente (aprox. 9%) la captación de protones por un mecanismo desconocido ya que el acarreo de protones por un mecanismo ácido base está descartado.

En la literatura están reportados desacoplantes no protonóforos (ver sección sobre desacoplantes) algunos de ellos no modifican el ΔpH (90,91,108). Sin embargo las amidas de cadena corta, de alguna forma estimulan la entrada de H^+ al cloroplasto, ninguno de estos resultados es compatible con la hipótesis quimiosmótica sobre desacoplamiento.

El orden de actividad en la disminución de la bomba de H^+ en cloroplastos a una concentración 1 mM es: etilendiamina > hexilamina > dietilamina > trietilamina > etilamina > quinuclidina > piridina > Octamida > acetamida > 3 metilbutanamida.

Al compararse este orden de actividad con el valor de pK_b

[CLORURO DE AMONIO Ó ETILAMINA]mM

CAPTACION DE PROTONES (% DEL CONTROL)

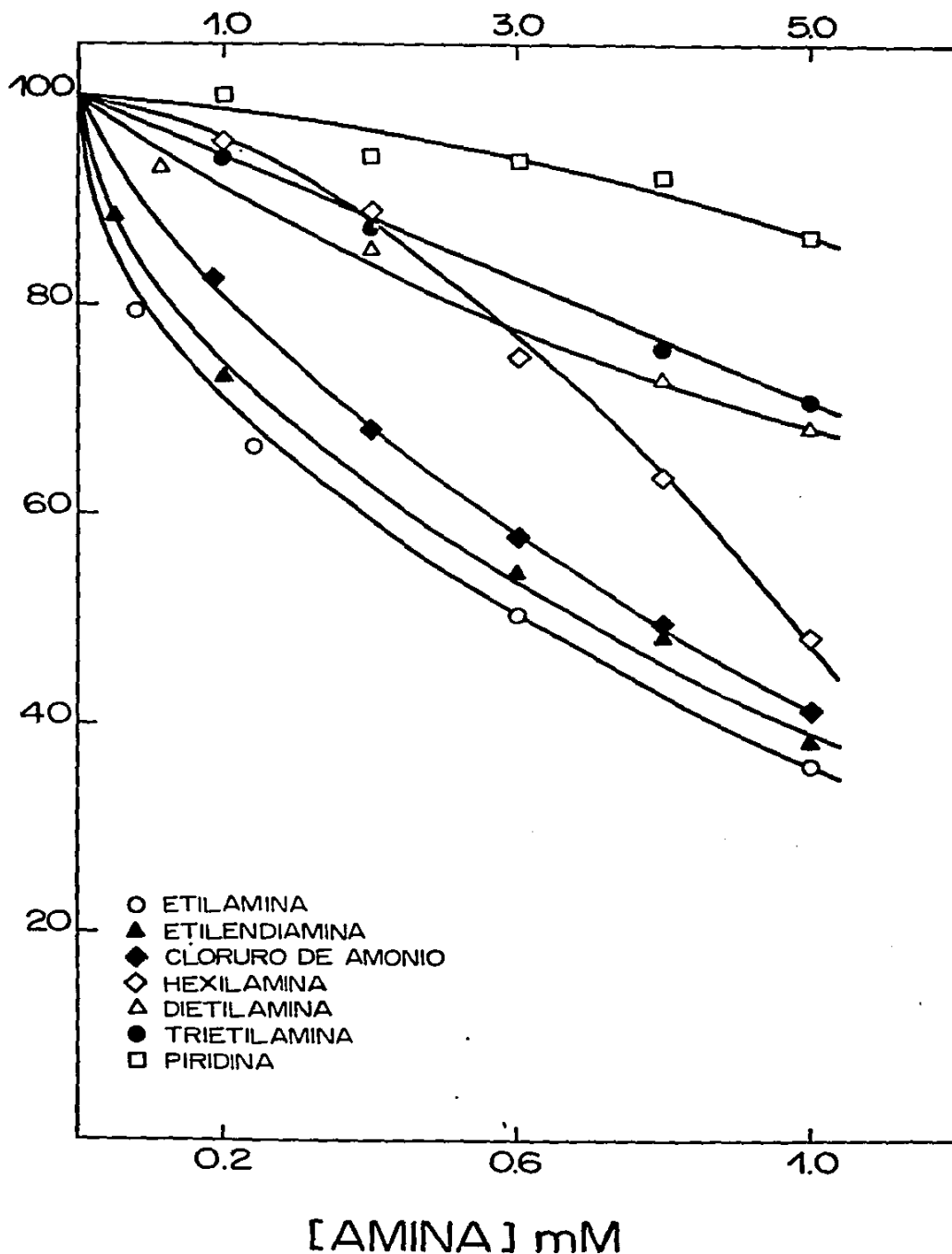


Fig. 18. Captación de protones en función de la concentración de aminas. La elevación del pH fue ensayada entre 6.0 y 6.1 (ver materiales y métodos). El valor del control para la captación de protones fue de 32.99 microequivalentes de protones por hora y por miligramo de clorofila.

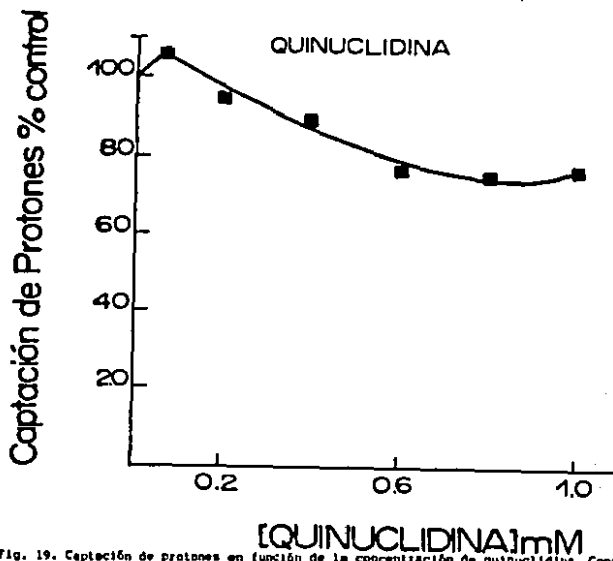


Fig. 19. Captación de protones en función de la concentración de quinclidina. Condiciones: Fig.18

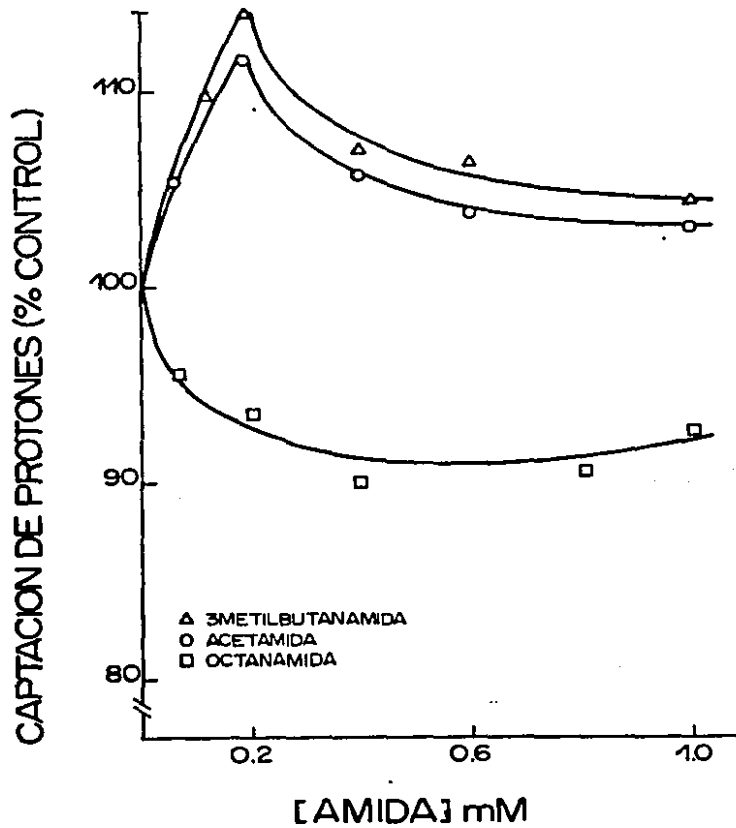


Fig.20. Captación de protones en función de la concentración de amidas. Los símbolos están definidos al lado inferior de la gráfica. Condiciones de la reacción como en la fig.18.

(tabla 2, fig. 21) se observa que la etilendiamina (Nº.6) que es cerca de 10 veces menos básico que las otras aminas alifáticas, presenta el mayor efecto disipador de la captación de H⁺. La piridina (Nº.10) y la octanamida (Nº.7) muestran efectos similares a pesar de que la diferencia en basicidad de los dos compuestos es del orden de 10^e(pKb de 8.8 y 14.5 respectivamente). La acetamida y 3 metilbutanamida, compuestos no protonables, estimulan la captación de H⁺. Así que no se observa una correlación entre pKb y actividad acarreadora de H⁺.

Con respecto a la relación entre la hidrofobicidad y la actividad disipadora de la captación de H⁺ (tabla 2 y fig. 22), se puede notar que el compuesto muy hidrofílico: la etilendiamina tiene una actividad relativamente mayor que otros compuestos más hidrofóbicos y más básicos. Las aminas 2,3,4,5 (tabla 2) presentan una actividad similar a pesar de sus amplias diferencias en sus coeficientes de partición. La hexilamina muy hidrofóbica tiene también gran actividad pero inferior a la etilendiamina más hidrofílica.

Al relacionar las 3 variables: actividad, pKb y logP por regresión lineal se encuentra una correlación de 0.76 y una ecuación:

$$\log \frac{1000}{V_1} = 1.29 - 0.017 \log P - 0.02 \text{ pKb} \quad (4)$$

$$n = 10 \quad r = 0.76$$

la cual sugiere una ligera dependencia de la fuerza básica de los compuestos en el incremento de la actividad y una menor dependencia de la hidrofobicidad, lo que indica que los

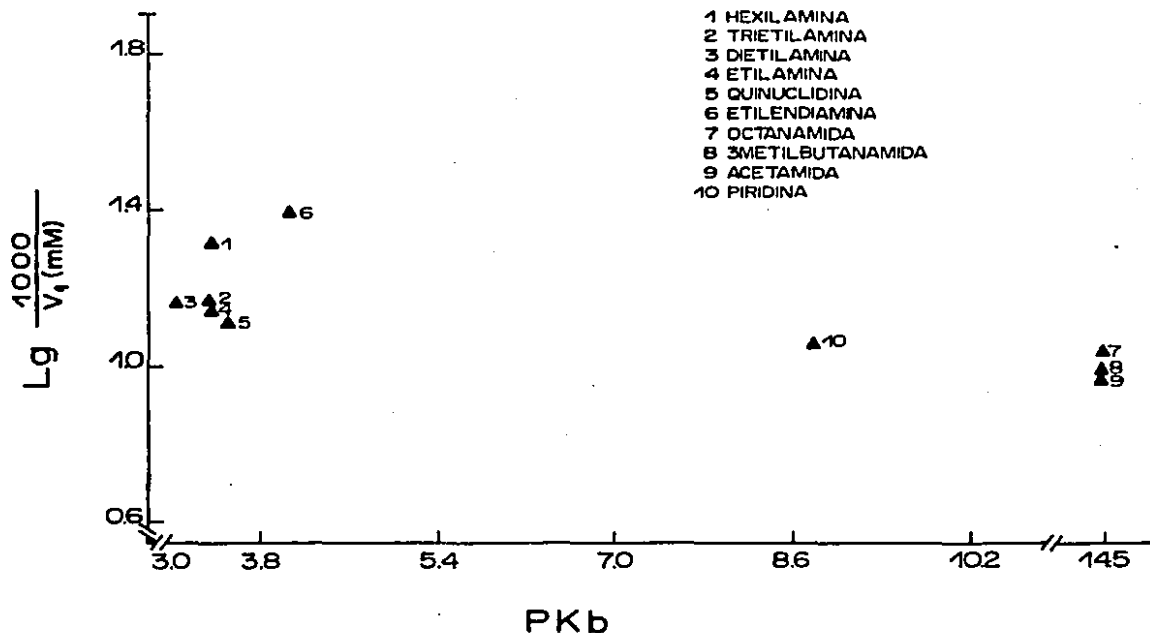
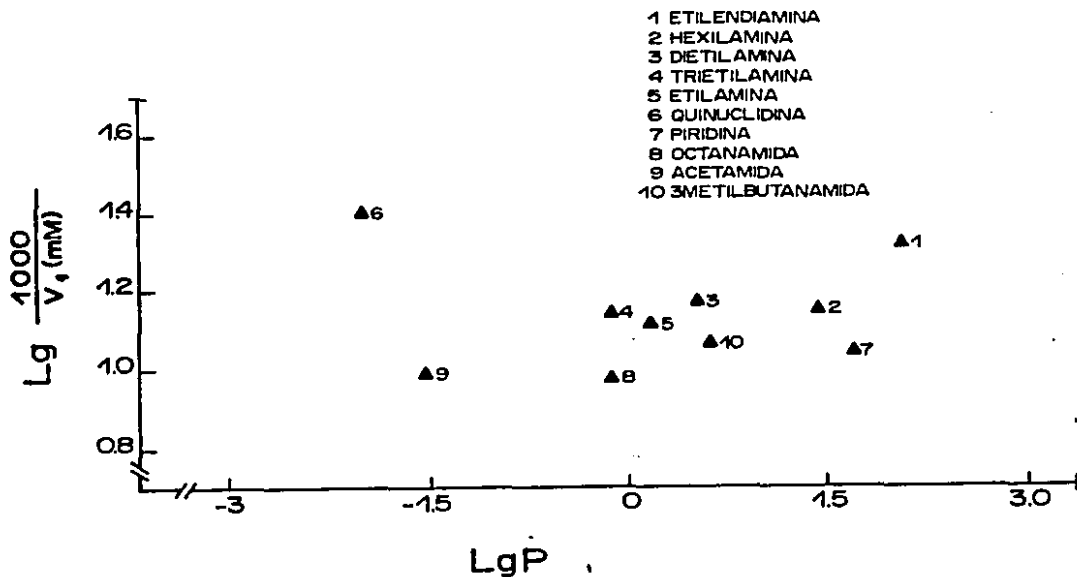


Fig. 21. Valores observados de $\log.1000/V_1$ contra pK_b para la captación de protones en presencia de aminas y amidas. Los datos y la enumeración de los compuestos son como -- aparecen en la tabla 2.

Fig. 22. Valores observados de $\log.1000/V_1$ contra el $\log.$ del coeficiente de partición para la captación de protones en presencia de aminas y amidas. Los datos y la enumeración de los compuestos son como aparecen en la Tabla 2.



compuestos no requieren penetrar en la membrana para bloquear la bomba de H^+ . La exclusión de las amidas del análisis, no mejora la correlación.

Vemos entonces que no existe una adecuada correlación entre las propiedades fisicoquímicas: incremento en basicidad e incremento en hidrofobicidad y la disminución en la síntesis de ATP o en la captación de protones. Correlación que se debería presentar de acuerdo a la hipótesis quimiosmótica. El transporte electrónico basal, tampoco mostró correlación con estos mismos parámetros (96).

Al comparar la disminución en la bomba de H^+ respecto a la disminución en la biosíntesis de ATP (tabla 2) a concentración de 1 mM, puede observarse que el orden de actividad es diferente en cada caso. Al analizar los compuestos individualmente encontramos:

- a) Mayor inhibición en la captación de H^+ que en la síntesis de ATP: etilamina, trietilamina, piridina, etilendiamina, dietilamina y quinuclidina (estas 2 últimos a concentraciones inferiores a 1 mM).
- b) Mayor inhibición en la síntesis de ATP que en la captación de H^+ : hexilamina, octanamida, 3 metilbutanamida y acetamida; los dos últimos compuestos estimulan la captación de protones, pero inhiben la fotofosforilación a las mismas concentraciones.

Así, estos resultados no apoyan la hipótesis quimiosmótica sobre acoplamiento-desacoplamiento, en la misma forma que no la apoyan resultados experimentales descritos por otros autores (ver sección sobre la hipótesis quimiosmótica y referencias

20,21,22,23,24,25 y 77).

Si se relacionan las 3 actividades que se han descrito: transporte electrónico fosforilante, captación de protones y síntesis de ATP por regresión lineal, se obtiene:

$$\log \frac{1000}{V_1} \text{ (TEF)} = 1.84 - 0.614 \log \frac{1000}{V_1} \text{ (Bomba H}^+) - 0.30 \log \frac{1000}{V_1} \text{ (Síntesis ATP)} \quad (5)$$

$$N = 10 \quad r = 0.73$$

esta ecuación indica un incremento en el transporte electrónico fosforilante (menor valor de $\log \frac{1000}{V_1}$) al aumentar la disipación de la bomba de H^+ y la síntesis de ATP.

Otro aspecto de nuestro trabajo fue el de caracterizar compuestos derivados del 2,6 dibromofenol con sustitución en para, como desacoplantes de la fotofosforilación. En un trabajo previo (57), se estudió el efecto sobre el transporte electrónico basal de 13 compuestos derivados del 2,6 dibromofenol. Los resultados mostraron un efecto inhibitorio de la cadena electrónica fotosintética promovida por estos compuestos pero 3 de ellos: el 2,6 dibromofenol 4-malonitrilo, 2,6 dibromofenol-4-oxima y cloruro de 2,6 dibromofenolamonio, estimulaban el transporte electrónico basal por lo cual era de presumir que se comportaran como desacoplantes.

En el presente trabajo, se estudia el efecto producido por estos 3 compuestos sobre el transporte electrónico fosforilante, bomba de protones y fotofosforilación, además de la capacidad de acarrear protones a través de vesículas fosfolipídicas, con el objeto de determinar su acción sobre el sistema de transducción

de energía en cloroplastos y relacionar la actividad con propiedades fisicoquímicos dependientes de los sustituyentes en posición para: Π (π) una constante que denota el efecto del grupo sustituyentes sobre la hidrofobicidad y Σ (σ) que describe características electrónicas de grupos sustituyentes en la molécula y cuya magnitud determina, en parte, el grado de acidez del fenol.

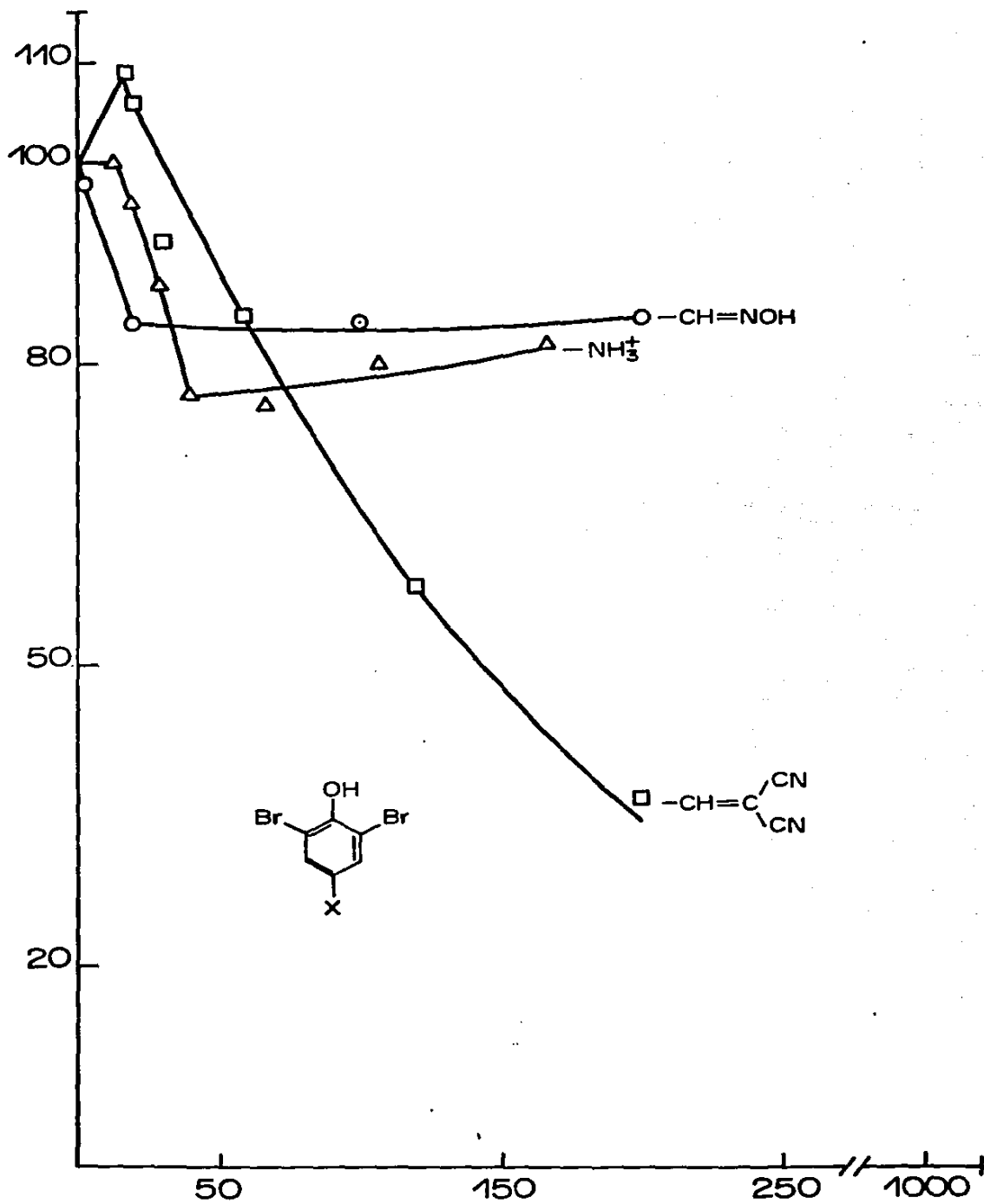
Transporte de electrones fotofosforilante.

La figura 23 muestra el efecto del incremento en la concentración de los 2,6 dibromofenoles (concentraciones micromolares) sobre el flujo de electrones fosforilante. De los tres compuestos, solo el derivado malonitrilo estimula ligeramente este flujo a $20\mu\text{M}$, pero a concentraciones mayores se presenta inhibición. Con los otros dos compuestos, no se presenta estimulación del transporte electrónico fosforilante en ninguna de las concentraciones ensayadas, más bien, ocurre una inhibición que llega hasta aproximadamente un 20% (fig. 23).

Otros autores han reportado este mismo fenómeno: activación del transporte electrónico basal pero inhibición del transporte electrónico fosforilante en cloroplastos (93, 108).

En la Tabla 3, se comparan las actividades de los tres compuestos a una concentración de $20\mu\text{M}$ en función de σ y π . Los derivados -oxima y $-\text{NH}_3^+\text{Cl}^-$ tienen actividades semejantes. Aunque el efecto de σ sobre la acidez es mayor para el derivado $-\text{NH}_3^+\text{Cl}^-$, también es muy hidrosoluble. Lo opuesto ocurre para el derivado oxima (tabla 3). Es decir, los efectos de acidez e hidrofobicidad pueden compensarse mutuamente. El derivado Malonitrilo más ácido e hidrofóbico, produce un incremento

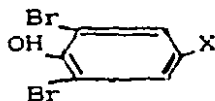
TEF (H₂O → MV) % CONTROL



[DERIVADO DIBROMOFENOL] μM

Fig. 23. Efecto del incremento en la concentración de derivados del 2,6 dibromofenol sobre el transporte electrónico fosforilante. Condiciones de reacción como en la figura 9. La estructura del sustituyente en posición para, aparece sobre su gráfica correspondiente.

Tabla 3. Actividades en el control de Transporte electrónico fosforilante (TEF), Transporte electrónico fosforilante desacoplado (TEFD), Bomba de H⁺ y Síntesis de ATP en cloroplastos; así como la Conducción de H⁺ en liposomas de 2,6 dibromofenoles 4 sustituidos [las actividades están dadas a 20μM (V20)] en función de α_p y π.



#	X	TEF		TEFD		Bomba de H ⁺		Síntesis ATP		Conducción H ⁺		α _p	π
		V20	log $\frac{1000}{V20}$	V1	log $\frac{1000}{V20}$	V1	log $\frac{1000}{V20}$	V1	log $\frac{1000}{V20}$	V1	log $\frac{1000}{V20}$		
1	-CH=NOH	83.5	1.08	101	1.0	68	1.17	92	1.04	106	0.97	0.10	-0.38
2	-NH ₃ ⁺ Cl ⁻	89.5	1.05	113.5	0.95	76	1.12	81.2	1.09	106	0.97	0.82	-5.96
3	-CH=C CN	105	0.98	128.5	0.89	3.2	2.50	16.7	1.78	164	0.79	0.84	0.05

insignificante en el TEF por debajo de $20\mu\text{M}$. Los datos indican que probablemente los compuestos estén actuando sobre la cadena de transporte de electrones o sobre la ATP sintetasa. De hecho, varios derivados del 2,6 dibromofenol funcionan como inhibidores del transporte electrónico (57) lo mismo que 2,4 dinitrofenoles (56).

Síntesis de ATP

El efecto sobre la síntesis de ATP es mucho mayor que sobre el TEF. La figura 24 muestra un abatimiento total de la fotofosforilación con $37\mu\text{M}$ del derivado malonitrilo. Los otros dos derivados del 2,6 dibromofenol ensayados, promueven también una inhibición importante aunque a concentraciones mucho más altas que las del derivado malonitrilo. A $20\mu\text{M}$, la inhibición es solamente de 10 y 20% para los derivados -oxima y $-\text{NH}_3^+\text{Cl}^-$ respectivamente, mientras que es de un 83% para el derivado malonitrilo (tabla 3).

Captación de protones.

Los derivados malonitrilo y NH_3^+Cl^- bloquean completamente la entrada de H^+ al tilacoide a 21 y $40\mu\text{M}$ respectivamente. La oxima tiene un efecto mucho menor (fig. 25). Es importante observar que a estas concentraciones en las que se ha disipado la captación de protones completamente, todavía la síntesis de ATP es muy alta: 70% de actividad de la síntesis con el $-\text{NH}_3^+\text{Cl}^-$ y 16% con el -malonitrilo. en el caso del derivado oxima también se observa un mayor efecto inhibitorio sobre la captación de protones que sobre la síntesis de ATP, figuras 24,25 y tabla 3.

Observando las figuras 23,24 y 25; es claro que la mayor

SINTESIS DE ATP % CONTROL

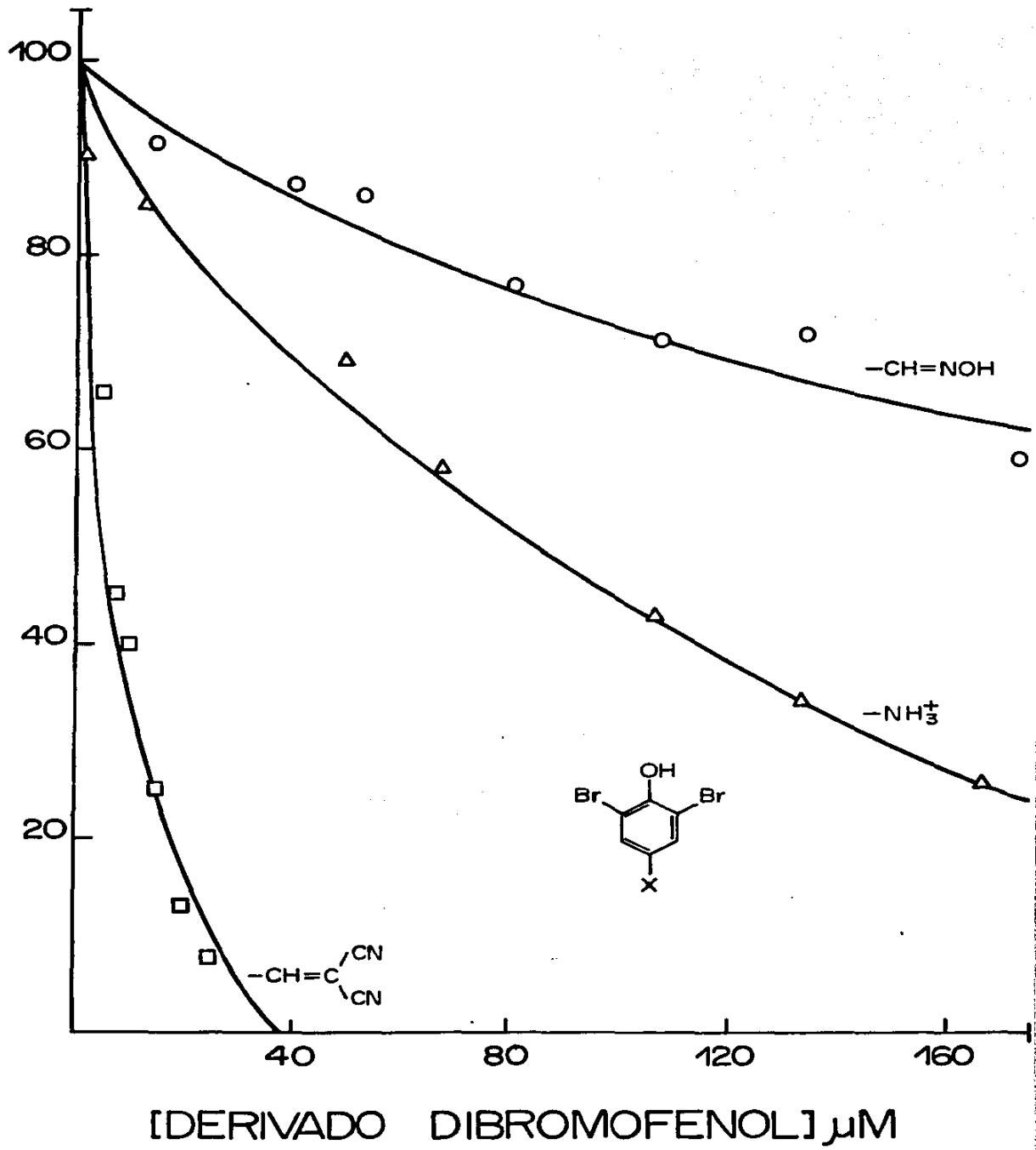


Fig.24.Síntesis de ATP en función de la concentración de 2,6 dibromofenoles.Condiciones de reacción como en la fig.13.

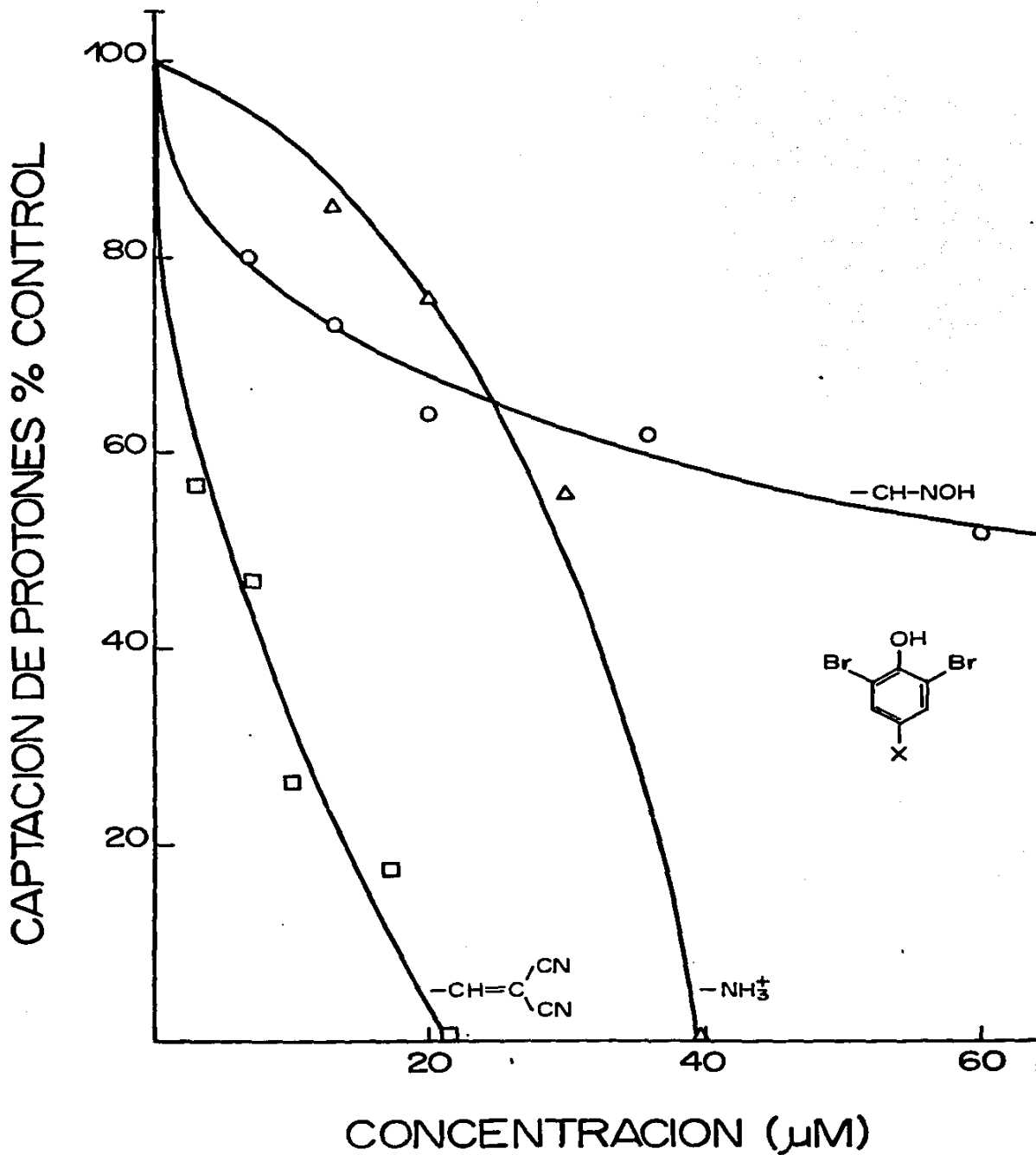


Fig.25. Captacion de protones en función de la concentración de 2,6 dibromofenoles. Condiciones como en la fig.18.

inhibición se presenta a nivel de la captación de protones y que la inhibición en la fotofosforilación difiere ampliamente de la disminución en el transporte electrónico y en la bomba de protones.

El hecho de que se presente una mayor inhibición sobre la síntesis de ATP que sobre el flujo de electrones fosforilante, podría sugerir un efecto múltiple de los fenoles como inhibidores de la ATP sintasa y como desacoplantes; en esta forma habría un efecto aditivo de inhibición en la síntesis, mientras que el efecto inhibitorio sobre el transporte electrónico fosforilante observado en la figura 23, podría ser el resultado de la diferencia entre el efecto estimulante promovido durante el desacoplamiento y el efecto de inhibición sobre la ATP sintasa.

La síntesis de ATP en ausencia de captación de protones por la bomba, sugiere la existencia de alguna otra forma de energía libre en la membrana diferente al gradiente electroquímico de protones que impulse la reacción, otros autores han observado síntesis de ATP cuando el H^+ es muy bajo o en su ausencia (22,24,25). Estos resultados y los nuestros son incongruentes con la hipótesis quimiosmótica.

La medición del transporte electrónico basal para los 3 derivados 2,6 dibromofenólicos mostró una estimulación apreciable de esta actividad, lo que sugiere la participación de los compuestos como desacoplantes de la fotofosforilación (57).

El transporte electrónico fosforilante parcialmente desacoplado con NH_4Cl 2mM, es incrementado con los derivados $NH_3^+Cl^-$ y melonitrilo, mientras que el derivado oxima no tiene mayor efecto sobre esta actividad (fig. 26, tabla 3). Esto

muestra de nuevo, que estos compuestos actúan como desacoplantes.

Conducción de protones en liposomas inducida por aminas amidas y 2,6 dibromofenoles.

Los resultados de los experimentos con la bomba de H^+ en tilacoides, muestran que los compuestos ensayados bloquean la captación de H^+ en relación con su concentración a excepción de las amidas que estimulan el flujo de H^+ . Como se describió, estas actividades no están bien relacionadas con las propiedades ácido-básicas de los compuestos.

Con el objeto de determinar si los compuestos ensayados acarrean protones (son protonóforos) a través de una membrana fosfolipídica y si este acarreo está relacionado con las propiedades fisicoquímicas ácido-básicas e hidrofocidad, se estudio el efecto de los compuestos sobre la conducción de H^+ en liposomas con el pigmento piranina atrapado (ver materiales y métodos).

La entrada de protones y protonación de la piranina en el interior del liposoma conduce a una disminución en la intensidad de la fluorescencia en forma bifásica. Inicialmente hay una fase cinética rápida, limitada en estos estudios por el tiempo de mezclado ($t_{\frac{1}{2}} \sim 1$ seg. ver ref. 106) seguida por una fase más lenta de disminución de la fluorescencia que se mantiene prácticamente constante.

La figura 27 muestra los cambios en la fluorescencia de la piranina atrapada en liposomas después de una disminución en el pH externo de 8.2 a 6.76 (fig. 27a) con 10 μ eg de HCl.

Al lisar las vesículas con Tritón X100 antes de agregar HCl,

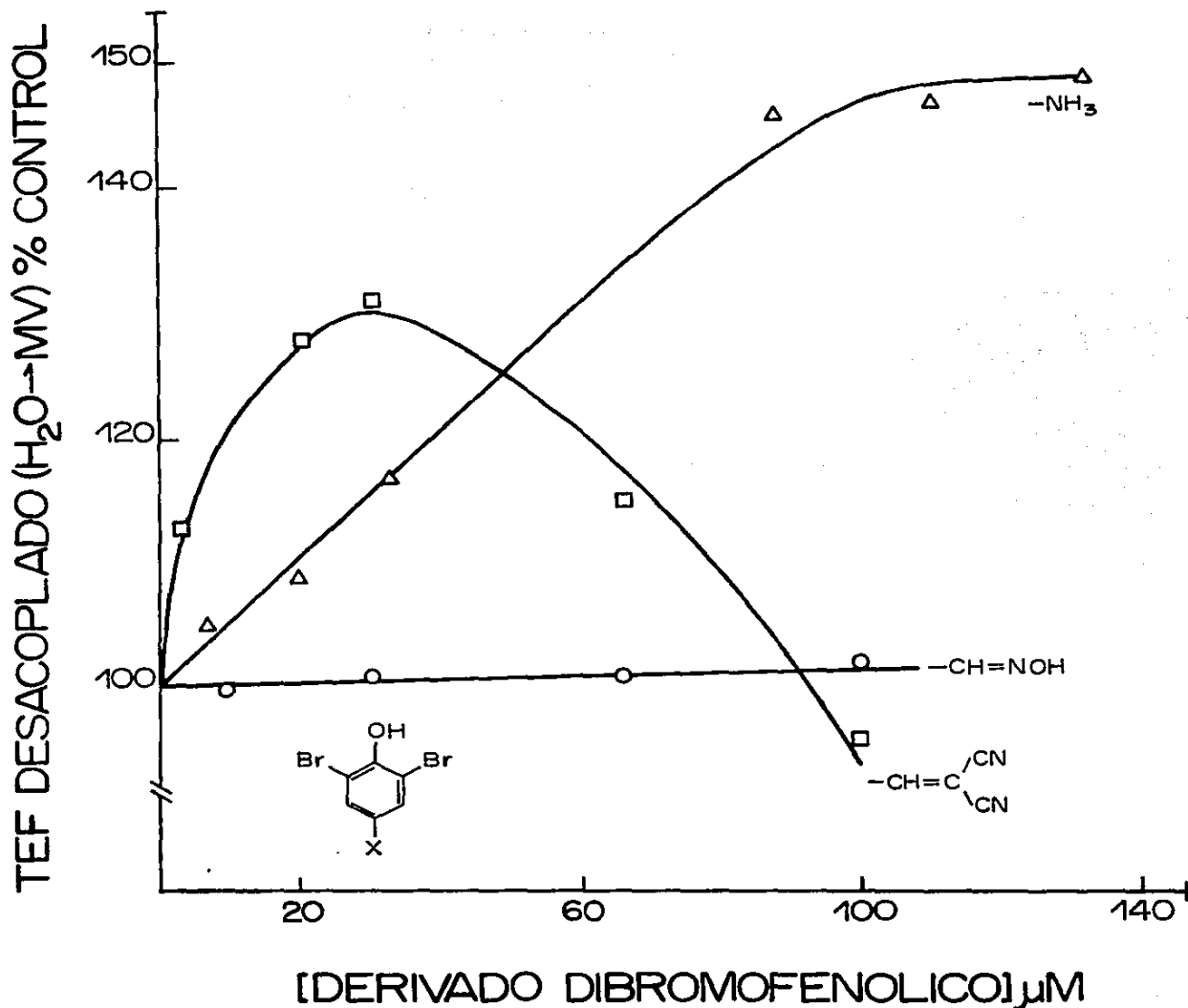


Fig. 26. Transporte electrónico fosforilante desacoplado en función de la concentración de 2,6 dibromofenoles. El ensayo se hizo en condiciones similares a las descritas en la fig. 9, pero en este caso se añadió cloruro de amonio 2 mM. final para cada punto. El valor del control fue de 405.5 microequivalentes de electrones por hora y por miligramo de clorofila.

se presenta un cambio monofásico rápido en la disminución de la fluorescencia 27b) indicando que el componente cinético bajo, observado en ausencia del detergente puede ser atribuido a la difusión pasiva de H^+ a través de la bicapa al interior del liposoma.

El componente cinético bajo, es también acelerado por valinomicina en presencia de K^+ , lo cual sugiere que la limitante para la difusión de H^+ dentro de la vesícula es probablemente la redistribución de contraiones para compensar la carga eléctrica en el interior del liposoma (fig. 27c).

De acuerdo al mecanismo protonóforo de acción de los desacoplantes, se espera que al agregar concentraciones crecientes de desacoplante se incremente el apagamiento de la fluorescencia de la piranina como resultado de una conducción mayor de H^+ por el desacoplante al interior del liposoma. La figura 28, muestra lo que sucede para 3 desacoplantes clásicos como el a) FCCP, b) NH_4Cl y c) DNP. Se observa que los 3 compuestos abaten la fluorescencia, siendo mayor el efecto del FCCP y menor el del DNP. El bajo efecto en la conducción de H^+ promovido por el 2,4 Dinitrofenol (DNP), se debe probablemente a que el pH óptimo para la acción de este desacoplante es de 3.9 a 4.2 (71). Sin embargo, la intensidad de la fluorescencia a este pH es muy baja (fig. 8). Por lo cual no se puede medir apropiadamente el flujo de H^+ con DNP en este sistema.

En condiciones similares fueron ensayados los compuestos de la tabla 1: aminas, amidas y 2,6'dibromofenoles. Los efectos sobre el apagamiento de la fluorescencia (entrada de H^+) inducida por estas sustancias se muestran para el 2,6 dibromofenol-4

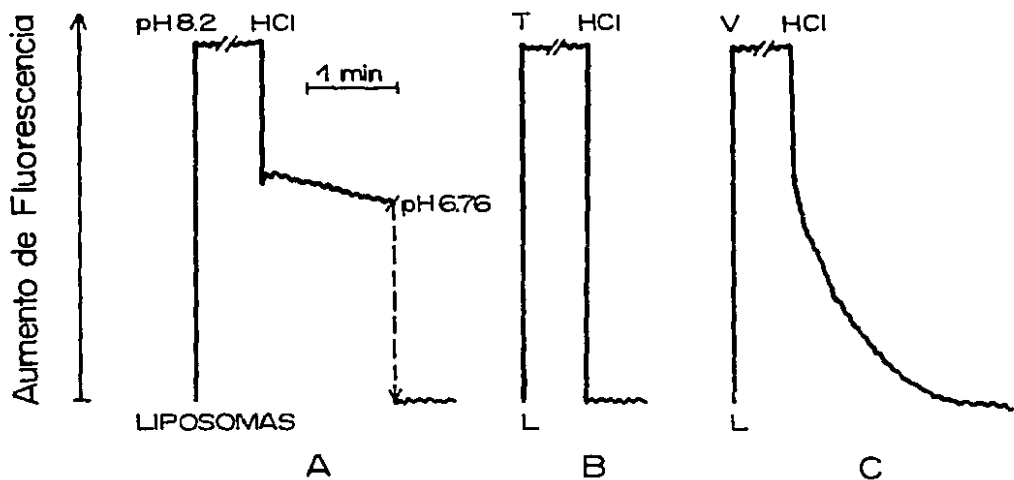


Fig.27. Cambios en la fluorescencia de la piranina atrapada en liposomas después de una disminución rápida en el pH de 8.2 a 6.76. La muestra de 3 ml. contiene 0.2M de sacarosa, 0.1M de KCl, 5.0mM de tricina-KOH, 5.0 mM de Mes-KOH y piranina 1.0 mM. Vesículas con 400 microgramos de fosfolípidos. A) adición de 10 μ l. de HCl 1.0 N. B) adición de triton (T) X100 0.03% final, agregados 2 minutos antes del pulso de HCl. C) valinomicina (V) 1.6 μ g.

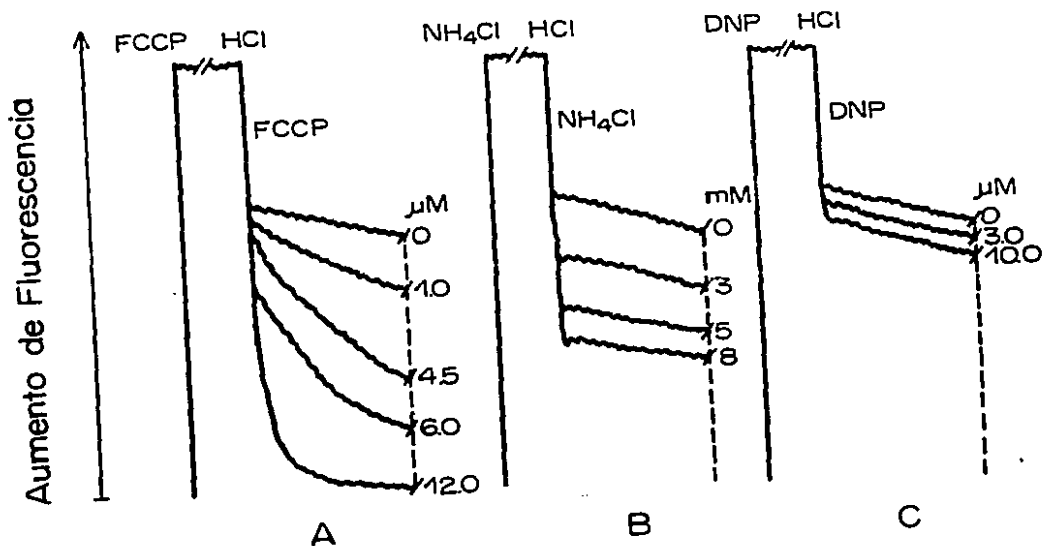


Fig.28. Incremento en el apagamiento de la fluorescencia de la piranina en función de la concentración de: A) FCCP, B) Cloruro de amonio y C) DNP. Condiciones como en la fig. 27.

Tabla 4 Porcentaje de incremento en la entrada de protones al interior del liposoma en relación al control, medido como incremento en el apagamiento de la fluorescencia de la piranina atrapada en relación a la concentración agregada de aminas, amidas y 2,6 dibromofenoles. Se muestran también los resultados con 3 desacoplantes clásicos (controles): FCCP, DNP y NH_4Cl .

Compuesto	Concentración	Actividad (% control)	Compuesto	Concentración	Actividad (% control)
Hexilamina	0.27 mM	155	3 Metilbutanamida	0.20 mM	107
	0.80 mM	178		0.40 mM	104
	1.00 mM	178		1.00 mM	104
Trietilamina	0.40 mM	103	Octanamida	0.20 mM	111
	0.80 mM	111		0.40 mM	109
	1.00 mM	117		1.00 mM	109
Dietilamina	0.40 mM	97	2,6 dibromofenol-4 Malonitrilo	3.5 μM	146
	0.80 mM	106		7.0 μM	157
	1.00 mM	109		20.0 μM	164
Etilamina	1.00 mM	118	2,6 dibromofenol-4 - NH_3^+Cl^-	10.0 μM	105
	3.00 mM	125		20.0 μM	106
	6.00 mM	146		40.0 μM	114
Quinuclidina	0.10 mM	99	2,6 dibromofenol-4 -oxima	10 μM	104
	0.3 mM	114		20 μM	106
	1.0 mM	124		40 μM	115
Etilendiamina	0.30 mM	109	- FCCP	1.00 μM	129
	0.60 mM	125		3.00 μM	147
	1.00 mM	128		6.70 μM	215
Piridina	0.30 mM	100	- DNP	1.00 μM	100
	0.80 mM	105		3.00 μM	104
	1.00	105		10.00 μM	117
Acetamida	0.133 mM	97	NH_4Cl	1.0 mM	110
	0.40-1.00 mM	106		3.00 mM	130
	0.175 mM	110		5.00 mM	145

malonitrilo, hexilamina y acetamida en la figura 29. Con los demás compuestos se obtuvieron los resultados dados en la tabla 4, en la cual se muestra el apagamiento de la fluorescencia en relación a las diferentes concentraciones y los valores en % del control, indican la eficiencia en la conducción de H^+ . Los resultados se muestran a una concentración 1mM para aminas y amidas en la tabla 2 y a 20 μ M para 2,6 dibromofenoles en la tabla 3.

Para las aminas y amidas, los resultados encontrados muestran que estos compuestos funcionan promoviendo una mayor entrada de H^+ al interior de las vesículas liposomales, siendo particularmente alta la actividad de la hexilamina, las otras aminas alifáticas tienen efectos leves. Se observa también que las amidas presentan un ligero incremento en la entrada de H^+ . El orden de actividad a 1mM es el siguiente: hexilamina > etilendiamina > quinuclidina > etilamina > trietilamina > octanamida > dietilamina > acetamida > piridina > 3-metilbutanamida.

No se observa una relación clara entre la habilidad de los compuestos para aumentar la entrada de protones y su basicidad (fig. 30). La hexilamina difiere ampliamente con las otras aminas alifáticas en la actividad a pesar de tener pKbs similares. La octanamida difiere de uno a otro extremo con la dietilamina en sus valores de pKb (3.06 a 14.5) y presentan igual actividad (baja) de apagamiento de la fluorescencia (conductividad de H^+).

En cuanto al coeficiente de partición (fig. 31), compuestos muy hidrofílicos como la etilendiamina y etilamina, muestran mayor actividad que otras aminas más hidrofóbicas como Dietil y

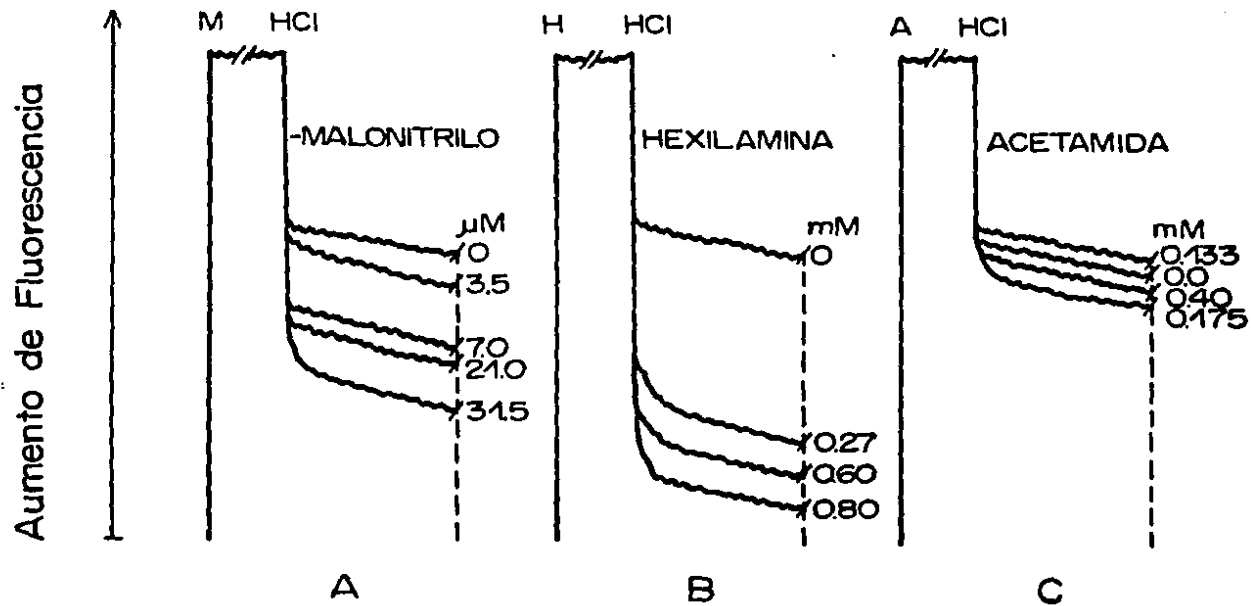


Fig.29. Efecto de A) 2,6 dibromofenol-4-malonitrilo. B) Hexilamina. C) Acetamida, sobre el flujo de protones medido por el grado de apagamiento de la piranina. Condiciones como en la fig.27. M, H, A, corresponden a malonitrilo, hexilamina y acetamida respectivamente.

trietilamina. La hexilamina tiene una actividad alta comparable a su hidrofobicidad, la octanamida muy hidrofóbica tiene una actividad conductora de protones muy baja, que se mantiene prácticamente constante al aumentar la concentración (tabla 4). La acetamida y 3-metilbutanamida, posee también efectos muy leves sobre el incremento en la entrada de H⁺ de liposomas, el cual tiene poca variación con la concentración de la amida (Tabla 4). Un análisis de regresión lineal para los datos, muestra una correlación pobre entre la actividad de incremento de H⁺ y la lipoficidad y basicidad. La ecuación que relaciona estas 3 variables es:

$$\log \frac{1000}{V_1} = 0.074 \text{ pKb} - 0.013 \log P + 0.84 \quad (6)$$

$$n = 10 \quad r = 0.53$$

esta ecuación indica que el efecto más importante aunque muy bajo, de los dos parámetros, es la solubilidad del compuesto en la membrana (a mayor partición en la membrana, mayor conducción de H⁺). La basicidad de los compuestos parece tener un efecto insignificante sobre la conducción de H⁺, debido al pequeño valor numérico de la constante que multiplica a pKb.

Si se compara el flujo de protones en tilacoides y liposomas, puede observarse un mayor flujo a través de las vesículas tilacoides (del interior al exterior de la vesícula), inducido por desacoplantes que a través de liposomas (del exterior al interior de la vesícula) (tabla 2). Tanto en tilacoides como en liposomas, se tiene una correlación muy pobre entre la conducción de H⁺ con la capacidad de protonación de los compuestos y su solubilidad en la membrana.

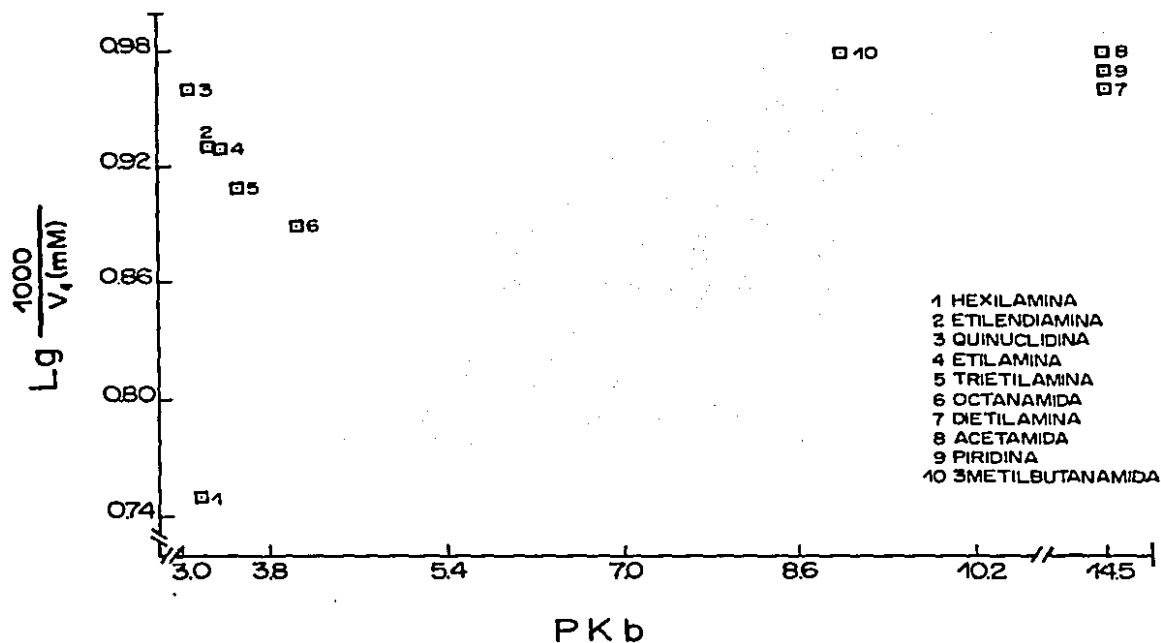


Fig. 30. Valores observados de $\log.1000/V_1$ contra PK_b para la conducción de protones en liposomas en presencia de aminas y amidas. Datos tomados de la tabla 2.

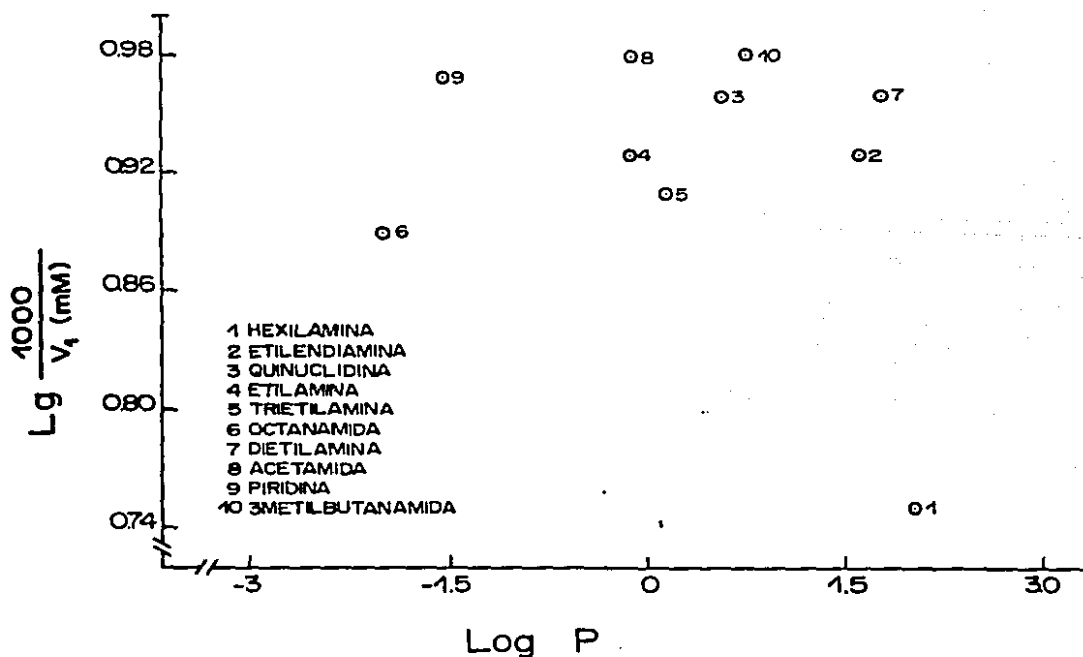


Fig. 31. Valores observados de $\log.1000/V_1$ contra $\log.$ del coeficiente de partición para la conducción de protones en liposomas en presencia de aminas y amidas. Datos tomados de la tabla 2.

Al comparar la actividad de captación de H^+ en tilacoides con el flujo de H^+ en liposomas por regresión lineal, se obtuvo una correlación de 0.83 para las aminas. La ecuación obtenida es:

$$Y = 0.7X + 12.15 \quad (7)$$

siendo $X =$ % de incremento en la conducción de H^+ en liposomas respecto al control promovido por el desacoplante.

$Y =$ % de disminución en la conducción de H^+ en tilacoides respecto al control promovido por el desacoplante.

Esta ecuación nos muestra una mayor conducción de H^+ a través de vesículas tilacoides que a través de liposomas promovida por aminas, según los datos de la tabla 2.

Otros autores reportan también, una mayor capacidad protonófora de desacoplantes sobre membranas naturales como mitocondrias y cloroplastos que sobre bicapas fosfolipídicas (67,68,109). En cuanto a los 2,6 dibromofenoles ensayados, solo el derivado malonitrilo incrementa notoriamente el flujo de H^+ , siendo muy pobre la actividad de los otros dos compuestos (tablas 3 y 4). También estos fenoles poseen una mayor capacidad protonófora sobre la vesícula tilacoide que sobre los liposomas (fig. 25, tabla 4), y aparentemente las características de mayor acidez (σ) e hidrofobicidad (π) se relacionan directamente con la potencia protonofórica (ver sección de discusión). La capacidad de disociación de compuestos fenólicos, parece ser la propiedad más importante que influencia sus propiedades inhibitorias (67,69,110).

DISCUSION

Desacoplamiento por aminas.

El mecanismo de desacoplamiento de la fotofosforilación por aminas más aceptado hasta el momento, puede describirse como sigue (111,112). La especie no protonada (RNH_2) de la amina puede penetrar a través de la membrana hasta el lumen del tilacoide, pero no así la especie protonada (RNH_3^+). Bajo condiciones no energizadas, las concentraciones de la amina neutra dentro y fuera del tilacoide podrian ser iguales. La iluminación energiza a la vesícula tilacoide y el pH del interior disminuye, esto permite que la amina presente en el interior se protone. La disminución de la especie libre en el interior hace que penetre una nueva porción de la base débil desde el exterior que continua hasta que la forma protonada se difunda fuera a la misma velocidad que los H^+ se difunden al interior. Tal mecanismo resulta en una inhibición del cambio de pH asociado a la toma neta de la especie protonada: RNH_3^+ .

Este mecanismo molecular de translocación de H^+ es análogo al propuesto para ácidos débiles desacoplantes en mitocondria y sistemas artificiales de membrana y está basado en el esquema original de desacoplamiento protonóforo propuesto por Mitchell (64). Es claro que el esquema predice una potencia desacoplante creciente, con la capacidad de protonación y la hidrofobicidad para una serie homóloga de compuestos. Además, el abatimiento en el potencial electroquímico de H^+ por el desacoplante en tilacoides, debe ser consistente con cambios proporcionales en el

incremento de transporte de electrones basal y fosforilante y la disminución en la síntesis de ATP, de acuerdo a los postulados de la hipótesis quimiosmótica.

Nuestros resultados respecto al incremento en flujo de e-fosforilante promovido por aminas de diferente basicidad y lipofilicidad, parecen estar de acuerdo cualitativamente con las predicciones de la hipótesis quimiosmótica, puesto que hay una buena correlación (0.96) entre la actividad de transporte electrónico fosforilante (TEF) y los valores de pKb y LogP de las aminas. La ecuación 2, predice además un incremento en la potencia desacoplante al aumentar la basicidad e hidrofobicidad de los compuestos. Es de anotar que la comparación de la actividad desacoplante con una sola variable (pKb) proporciona una pobre correlación (figura 11). En el estudio de procesos de desacoplamiento en cloroplastos, muchos reportes se refieren solo al efecto que producen los compuestos desacoplantes sobre el transporte electrónico basal. Sin embargo para un mejor entendimiento del fenómeno, es necesario evaluar los efectos sobre otras propiedades desacopladas como la captación de protones y la fotofosforilación en tilacoides.

Si la capacidad de protonación de los desacoplantes incrementa su potencia de acuerdo a los postulados de la hipótesis quimiosmótica, deberíamos observar un mayor efecto desacoplante de los compuestos más básicos sobre la captación de protones y sobre la síntesis de ATP, pero nuestros estudios de correlación de basicidad contra actividad (figuras 16 y 21, tabla 2) no confirman las predicciones de la hipótesis de Mitchell sobre desacoplamiento. Tampoco se ha encontrado una correlación entre

el incremento en el flujo basal de electrones y la basicidad para aminas desacoplantes en cloroplastos (96). En mitocondrias, Parker (70) observó un aumento en actividad desacoplante para una serie homóloga de fenoles al disminuir los valores de pK_a (aumento de acidez). Así que estos resultados sugieren que la capacidad de protonación-desprotonación de los desacoplantes no es requisito esencial para el desacoplamiento.

La capacidad de penetración de los compuestos a través de la membrana hidrofóbica, tampoco parece ser esencial para el desacoplamiento por aminas en vista de la pobre correlación que existe entre hidrofobicidad de los compuestos y el abatimiento en la captación de protones o en la síntesis de ATP (fig. 17,22 y Tabla 2). Notablemente el compuesto etilendiamina muy hidrofóbico abate la captación de H^+ con una mayor potencia que otras aminas más básicas e hidrofóbicas (Tabla 2). Los análisis de regresión lineal entre bomba de H^+ , pK_b y $\log P$ muestran un coeficiente de correlación de 0.76 entre las 3 variables e indican (ecuación 4) que hay una dependencia negativa de la bomba de H^+ respecto a la hidrofobicidad de los compuestos, lo cual sugiere que estas sustancias no requieren penetrar en la membrana para abatir la captación de H^+ . Un análisis similar para la síntesis de ATP, muestra un coeficiente de correlación entre las 3 variables de únicamente 0.56 y de la ecuación 3 se puede notar una ligera dependencia positiva de la síntesis de ATP respecto a la hidrofobicidad en contraste a la dependencia negativa de la misma para la bomba de H^+ . Aunque las correlaciones ciertamente son pobres, estos datos sugieren que los 2 procesos de disminución en la síntesis de ATP y en la captación de H^+ , están

ocurriendo por diferentes mecanismos o que las aminas tienen un efecto adicional sobre la ATP sintasa, además de desacoplar.

Puesto que las aminas hidrofílicas pueden abatir la captación de H^+ sin relación con su capacidad de protonación, es probable que estas aminas interactúen con grupos electrofílicos de la membrana como proponen Hind y Wittingham (86) alterando así la permeabilidad a H^+ a través de la membrana y evitando que estos sean tomados por la vesícula tilacoide. Utilizando rojo de cresol, un indicador hidrofílico, Junge y Auslander (113) reportan sitios de unión a H^+ en el lado externo de la membrana, los cuales pueden representar una barrera para la difusión de protones al interior. La absorción de moléculas desacoplantes en la superficie de la membrana podría evitar la unión de estos H^+ a proteínas de membrana y en esta forma estos protones podrían difundirse al medio acuoso externo.

Nuestros resultados con aminas desacoplantes, muestran también que el efecto inhibitorio sobre la captación de H^+ es mayor que sobre la síntesis de ATP, con excepción de la hexilamina (Tabla 2), lo cual sugiere que la fotofosforilación se está llevando a cabo en ausencia de un ΔpH suficiente. Por ejemplo con la etilendiamina, la síntesis de ATP se presenta en un 70% respecto al control, mientras que la captación de H^+ es solo de un 40%. Se infiere de estos resultados, que la energía libre para la síntesis de ATP no reside completamente en el ΔpH que se tiene a través de las dos fases acuosas de la membrana.

En nuestros experimentos encontramos también, que concentraciones inferiores a 0.5 mM de dietilamina y quinuclidina incrementan la síntesis de ATP; mientras que la captación de

protones está abatida a estas mismas concentraciones. Giersh (114) reporta incrementos similares para metilamina y cloruro de amonio a concentraciones inferiores a 0.4 mM cuando el ΔpH ha sido parcialmente abatido. Estos resultados son difícil de explicar con la hipótesis quimiosmótica que prevee una variación paralela entre captación de protones y fosforilación del ADP.

Un análisis de las relaciones entre dos propiedades termodinámicas: el potencial de fosfato para la síntesis de ATP: ΔG_p , y la diferencia de potencial electroquímico $\Delta \bar{\mu} H^+$, en presencia de varios desacoplantes de la fosforilación oxidativa y de la fotofosforilación, ha sido llevado a cabo por varios autores (25,115). Se ha encontrado que en general, una reducción en $\Delta \bar{\mu} H^+$ no produce una reducción similar en ΔG_p , como debería esperarse de acuerdo a la hipótesis quimiosmótica.

Deccker y Lang (24) reportaron mutantes de Bacillus megaterium, que crecen bien en presencia del desacoplante CCCP, aunque estos compuestos colapsan $\Delta \Psi$ y ΔpH igual en ambas células: la mutante y la silvestre, la conclusión de este trabajo fue que la fosforilación oxidativa estaba ocurriendo en presencia de CCCP con un potencial electroquímico despreciable y que esto no es compatible quimiosmóticamente.

En células de Halobacterium halobium, Michell y Osterhelt (31), encontraron una pobre correlación entre $\Delta \bar{\mu} H^+$ y la síntesis de ATP en células iluminadas en presencia de protonóforos; concluyeron que el gradiente electroquímico de H^+ no podría ser la fuerza impulsora para la fosforilación.

Tanto en mitocondria como en cromatóforos de Rps. capsulata,

se ha reportado (21) que una velocidad dada de síntesis de ATP está asociado con un $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ inferior en presencia de un desacoplante que en presencia de un inhibidor del Transporte electrónico y Zoratti y otros (22) reportan que, concentraciones bajas de valinomicina en presencia de concentraciones milimolares de K^+ , causan reducción de $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ de la mitocondria sin ningún cambio en la velocidad de síntesis de ATP.

Con excepción de la hexilamina, los resultados muestran una mayor inhibición en la captación de H^+ que en la síntesis de ATP, en concordancia con los reportes mencionados (21,22,24,25, 31,115). Una posible razón para estas discrepancias, es que otras reacciones estén generando ATP, por ejemplo la reacción de la adenilato cinasa. Sin embargo, en cloroplastos aislados esta reacción no puede llevarse a cabo desde luego.

En consecuencia, estos estudios no favorecen a la diferencia de potencial electroquímico de protones a través de las 2 fases acuosas de la membrana, como único intermediario entre el transporte de electrones y la síntesis de ATP.

Mitchell (64) propone que para asegurar que la forma iónica de un desacoplante sea soluble en una membrana no polar, la carga iónica en un sistema orbital (π) debería estar deslocalizada para minimizar la fuerza eléctrica del ión desacoplante. Sin embargo, los cationes de las aminas alifáticas de cadena corta no tienen forma de deslocalizar la carga positiva, por lo cual difícilmente podrían ser estabilizadas en el medio hidrofóbico de la membrana. De modo que, si la amina libre toma los H^+ del lumen del tilacoide durante iluminación continua, habría acumulación interminable de la especie protonada (RNH_3^+) en el interior provocando un

hinchamiento y destrucción del cloroplasto, lo cual no sucede.

La aplicación de amortiguadores permeantes a tilacoides en combinación con tiempos cortos de iluminación, proporciona un sistema para ensayar el principio de la hipótesis quimiosmótica, de que amortiguando los H^+ del lumen se podría retardar la formación de ATP en proporción a la cantidad de tampón agregado (12). Pero no se encontró variación en la sensibilidad de la síntesis de ATP a desacoplantes como metilamina o FCCP en presencia de tampones permeantes, el autor (Ort) concluye que la región de alta actividad del ión hidrógeno responsable de la fotofosforilación, no debe ser el espacio acuoso interno de la vesícula lamelar, y propone que el gradiente de H^+ responsable directamente de la fotofosforilación puede existir dentro de la membrana lipoproteica o al menos en alguna capa conductora de H^+ en la membrana.

Los experimentos sobre conducción de H^+ en liposomas con aminas, muestran incrementos pobres en la entrada de H^+ al lumen de solo un 15% en promedio con excepción de la hexilamina que muestra incremento del 78% a 1 mM (Tabla 2). Sin embargo, la disminución en la captación de H^+ promovida por estos compuestos en la membrana tilacoidal, es mayor que el incremento correspondiente en liposomas (tabla 2), posiblemente debido al gran contenido de proteínas de la membrana tilacoide que aumentan la constante dieléctrica y hacen más estables las formas ionizadas de los desacoplantes (109) en la membrana.

El grupo de Dilley (13) ha demostrado la protonación de grupos amino de proteínas de membrana después de iluminación de cloroplastos. El grado de protonación-desprotonación de estos

grupos es titulado con anhídrido acético, que reacciona solamente con el grupo $-NH_2$ pero no con el $-NH_3^+$. La salida de H^+ y la acetilación acompañante aumentan debido al desacoplamiento. Uno de estos grupos acetilables está en la reacción de oxidación del H_2O por el PSII. La mayor reactividad con anhídrido va acompañada de una inhibición apreciable de la liberación de O_2 por el PSII, pero las reacciones redox o la bomba de H^+ de la ATPasa restauran el estado aminado protonado no reactivo con anhídrido. Dilley propone, que estos dominios localizados de protones hacen conexión entre el PSII y el PSI, debido a que agentes inhibidores de canales de H^+ como DCCD bloquean esta conexión. El material proteico de la membrana evitaría el equilibrio de los H^+ de la membrana con los del interior acuoso del tilacoide.

Nishizaki (116) ha demostrado que una transición ácido-base en cloroplastos (en la oscuridad) en presencia de succinato, conduce a una cinética de dos fases de formación de ATP y salida de H^+ , la fase más rápida se asocia con la salida de protones liberados por grupos protonados de la membrana y la fase lenta a la disociación del succinato presente dentro del espacio vesicular. La idea es que los iones H^+ que entran a la fase acuosa interna no pertenecen cinéticamente al "pool" de protones que participan en la síntesis de ATP durante la iluminación. Rottemberg (20) ha propuesto una vía paralela e independiente de H^+ entre el transporte de electrones y síntesis de ATP, con el objeto de explicar resultados no concordantes con la hipótesis quimiosmótica. El modelo paralelo de acoplamiento establece que tanto el "pool" intramembranal de H^+ como el de la fase acuosa, contribuyen a la conversión de energía; ya sea por acoplamiento

directo entre las reacciones redox y la ATP sintetasa o por acoplamiento indirecto de acuerdo a la hipótesis quimiosmótica.

Los resultados con aminos desacoplantes, pueden explicarse mejor asumiendo la existencia de una vía directa de transferencia de protones entre las bombas redox y la ATP sintetasa y el acoplamiento indirecto de acuerdo a la hipótesis quimiosmótica. Las aminos hidrofílicas podrían bloquear la protonación de diferentes grupos básicos presentes en proteínas adyacentes a la superficie externa de la membrana, evitando la transferencia de H^+ hacia el complejo CF_0 - CF_1 y de esta manera la síntesis de ATP.

Debido a que no se encontró correlación entre la capacidad de protonación de las aminos y su potencia para abatir la captación de H^+ o la síntesis de ATP, es probable que el efecto producido por este grupo de aminos se deba a su unión a proteínas, en lugar de funcionar como acarreadores de protones. La unión de aminos a proteínas involucradas en la transducción de energía, evita que éstas se protonen durante la iluminación de los cloroplastos, por lo cual se colapsa la captación de protones y la síntesis de ATP.

El bajo efecto estimulante de las aminos sobre la conducción de H^+ en liposomas (tablas 2 y 4) indica también que sus efectos desacoplantes no se deben principalmente a la habilidad protonófora de las aminos a través de las dos fases acuosas de la membrana.

El hecho de que las aminos abatan la captación de H^+ en una proporción mayor que la síntesis de ATP, sugiere que pueden existir formas de energía libre además de la contenida en

gradientes protónicos, que impulsen la síntesis de ATP en ausencia de un suficiente pH. Slater y otros (33) proponen, que las colisiones entre moléculas transductoras de energía, pueden conducir a la transferencia de energía entre ellas y la ATP sintasa. Así, es probable que la unión de la amina a proteínas del transporte electrónico aunque evite la captación de protones, todavía permita las colisiones entre ellas y la ATP sintasa, permitiendo en esta forma la transferencia de la energía redox a la forma de enlaces de alta energía en el ATP.

Las aminas hidrofóbicas por otra parte, parecen tener un mecanismo diferente de acción. La hexilamina tiene un efecto desacoplante superior a las demás aminas ensayadas. Este compuesto incrementa la conductancia a protones en liposomas comparable al protonóforo FCCP (figuras 25 y 26) abate la síntesis de ATP y estimula el transporte de electrones fosforilante en una mayor proporción que las otras aminas (tabla 2) y la inhibición en la captación de H^+ es solo ligeramente menor que la etilendiamina. Debido a que el valor del pK_b es similar al de las otras aminas, su mayor efecto se debe posiblemente a una hidrofobicidad elevada que le permite moverse a través de la membrana funcionando como protonóforo.

Una longitud hidrocarbonada mayor, le permitiría deslocalizar mejor la carga positiva en la membrana y así la hexilamina sirve no solo como un desacoplante aminado, sino también como un catión permeante. Además la hexilamina, podría colapsar también el gradiente protónico entre la fase acuosa externa y la membrana y por esta razón tiene una potencia desacoplante mayor que las otras aminas ensayadas.

La trietilamina, una amina terciaria con 6 átomos de carbono y con una hidrofobicidad comparable a la hexilamina, tiene sin embargo, efectos muy inferiores sobre captación de protones, síntesis de ATP y conductividad de protones; mientras que la actividad sobre incremento en transporte de electrones fosforilante sí es más congruente con su valor de logP (tabla 2). Es probable por lo tanto, que los efectos estéricos sean también importantes en el desacoplamiento de la fotofosforilación por aminas (aunque no por otros compuestos ver ref. 68,69,110) debido a que el átomo de nitrógeno en la trietilamina está menos expuesto a la interacción con protones u otros grupos electrofílicos de la membrana.

Desacoplamiento por amidas

La presencia de grupos ácido-base dissociables en una molécula, es requisito indispensable para que funcione como desacoplante de acuerdo a la hipótesis quimiosmótica. Las amidas con un pKb de 14.5 no se protonan en medio acuoso y de esta manera no se espera que desacoplen la fotofosforilación. Nuestros resultados muestran sin embargo, que estos compuestos son desacoplantes, aunque no según el mecanismo protonóforo; puesto que, por algún proceso desconocido, la acetamida y 3-metilbutanamida incrementan en vez de disminuir la captación de protones por tilacoides a concentraciones inferiores a 0.5 mM. En liposomas, la acetamida produce un incremento en captación de H⁺ idéntico que en tilacoides a 0.18mM (tablas 2 y 4). Estos datos son contrarios a los esperados por un desacoplante clásico de acuerdo a la hipótesis quimiosmótica. A concentraciones entre 0.6 mM y 1 mM, la captación de protones por el tilacoide y el

liposoma en presencia de acetamida y 3-metilbutanamida permanece básicamente igual al control. Es de notarse no obstante que en estas condiciones, la fosforilación está inhibida y el transporte de electrones incrementado (figuras 11 y 16). Las amidas por otro lado, no incrementan la fase lenta de entrada de H^+ en liposomas (fig. 32). Lo cual sugiere, que los compuestos no están acarreando protones al interior de liposomas, por lo que no están funcionando como protonóforos. De hecho, la acetamida y 3 metilbutanamida además de no ser protonables, son muy hidrosolubles (tabla 2); por lo que difícilmente podrían funcionar moviendo H^+ de un lado a otro de la membrana.

La octanamida por otro lado, estimula levemente el flujo de H^+ en liposomas y en una proporción similar bloquea la captación de H^+ en el tilacoide. No es claro cómo este compuesto no protonable pueda incrementar el flujo de H^+ a través de la membrana e inducir desacoplamiento, aunque posiblemente este compuesto más soluble que las amidas anteriores en el medio hidrofóbico de la membrana pueda presentar allí características ácido-básicas diferentes que en el medio acuoso.

La octanamida presenta una potencia inhibitoria sobre la síntesis de ATP muy superior a las aminas ensayadas (con excepción de hexilamina) y a las otras 2 amidas (tabla 2), aunque estimula menos el TEF que las aminas. Esto sugiere que la octanamida además de desacoplar tiene un efecto inhibitorio adicional sobre la ATP sintetasa, posiblemente por unión mediante puentes de H a grupos carbonilo o amino del complejo CF_1-CF_0 en el interior de la membrana, alterando en esta forma las propiedades cinéticas de la enzima. La unión de la amida a estos

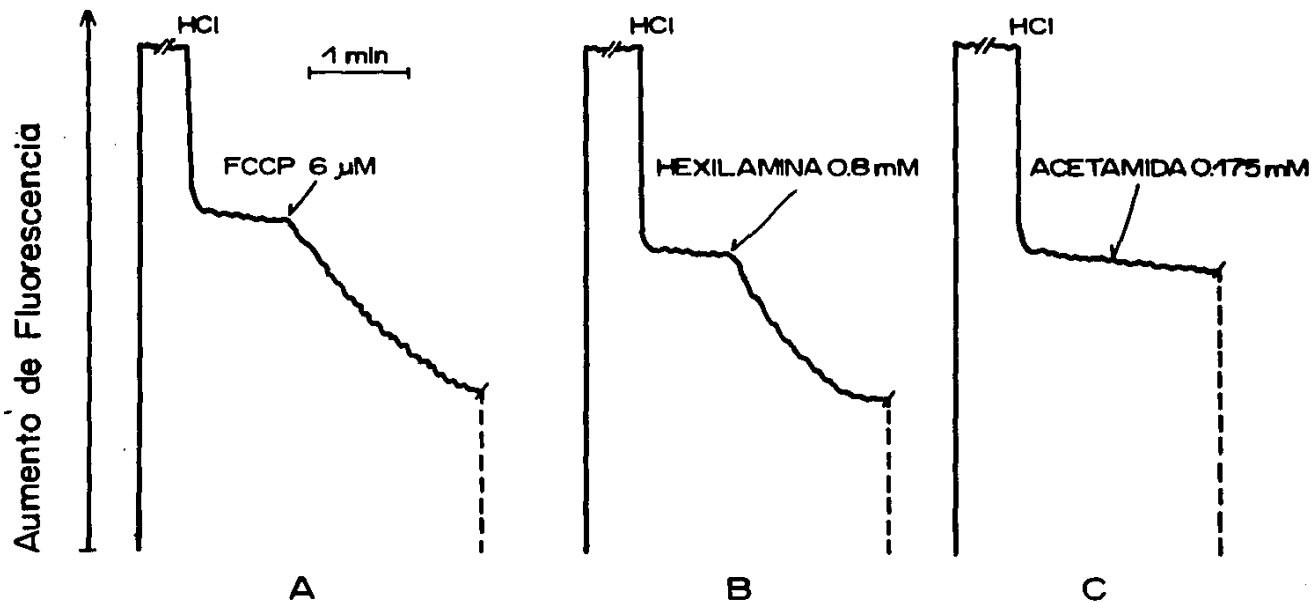


Fig.32.Efecto de: A) FCCP, B) Hexilamina, C) Acetamida sobre la fase lenta de entrada de protones al interior del liposoma. El desacoplante se añade un minuto después de iniciación de la fase lenta. Otras condiciones como en la fig.27.

grupos, podría estar también en competencia con la unión de H^+ a los mismos, por lo cual durante la iluminación, estos relativamente pocos protones, no son captados por el tilacoide y aparecen un el medio acuoso externo.

Una explicación similar podría darse para la acetamida y 3 metilbutanamida que también abaten la síntesis de ATP e incrementan el TEF, provocando pocos cambios en el flujo de protones. Aunque la interacción de estas amidas por su naturaleza hidrofílica, sería con grupos amino o carbonilo presentes en polipéptidos expuestos al medio acuoso externo en forma semejante a como lo hacen las aminas hidrofílicas. Es interesante anotar que el grupo amido- $C-NH_2$ de las amidas es similar al encontrado en las cadenas de residuos de aminoácidos y que los enlaces de hidrógeno proporcionan una gran fuerza estabilizadora de la estructura proteica. Las amidas estarían distorsionando este tipo de enlaces interfiriendo con la interacción proteína-lípido y proteína-proteína.

Hay algunos otros reportes en la literatura sobre compuestos que no abaten el H^+ pero desacoplan la fosforilación oxidativa o la fotofosforilación:

El ácido palmítico y la gramicidina estimulan el transporte electrónico basal, inhiben la síntesis de ATP, estimulan la actividad ATPasa, pero no disipan el gradiente de pH ni estimulan el transporte electrónico fosforilante en cloroplastos (108).

La salicilanilida I (91) no disipa el gradiente de pH pero acelera el transporte basal de electrones y disminuye la formación de ATP en cloroplastos.

Los anestésicos cloroformo y halotano aumentan la respiración de mitocondrias de hígado de rata y bajan la relación P/O pero no abaten el H^+ (117).

Estos trabajos y los nuestros con amidas no se explican adecuadamente con la hipótesis la explicación quimiosmótica de desacoplamiento, pues existe desacoplamiento entre el transporte de electrones y la síntesis de ATP sin colapsarse el gradiente electroquímico de H^+ .

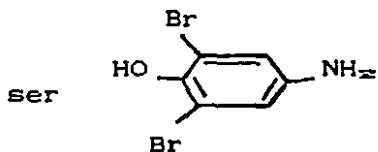
Estos resultados sugieren la existencia de una vía de acoplamiento directa entre las proteínas redox y la ATP sintasa que es independiente de la vía deslocalizada de H^+ de Mitchell. Debido a la carencia de propiedades ácido básicas de las amidas, su efecto desacoplante puede deberse a que éstos reactivos se unen preferencialmente a proteínas de membrana interfiriendo con la interacción proteína-lípido y proteína-proteína.

Desacoplamiento por 2,6 dibromofenoles:

Los tres derivados en posición 4 del 2,6 dibromofenol ensayados promueven un incremento en el transporte electrónico basal ($H_2O \rightarrow MV$) (57) y un abatimiento en la captación de protones y en la síntesis de ATP (Fig. 24 y 25 Tabla 3). Sin embargo, los resultados tan divergentes entre la inhibición de la captación de H^+ y la síntesis de ATP además de que inhiben el transporte electrónico fosforilante (Fig. 23) pero estimulan el basal (57) y el fosforilante desacoplado (Fig. 26), hacen difícil su interpretación dentro del esquema de la hipótesis quimiosmótica sobre desacoplamiento.

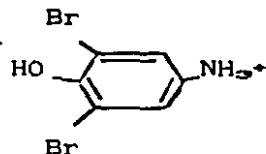
El compuesto cloruro de 2,6 dibromofenol-4 amonio bloquea

completamente aún a concentración de 200µM (Fig. 24). El radical $-NH_3^+$ en posición para pH 8.0 en el cual se midió la síntesis de ATP, podría ser transformado en el grupo $-NH_2$ ($-NH_3^+ + OH^- \rightarrow NH_2 + H_2O$). Por tanto a pH 8,0 la especie predominante puede



mientras que a pH 6.0 en el cual se midió la

la captación de H^+ , la especie que predomina es:



podría argumentarse que el 2,6 dibromofenol con el grupo amino en posición para tuviese un efecto desacoplante debido a la basicidad del grupo amino; sin embargo, las aminas aromáticas no incrementan el flujo electrónico en cloroplastos (86). Los grupos sustituyentes $-NH_3^+$ y $-NH_2$ confieren propiedades diferentes a las moléculas respecto a las capacidades de atraer electrones del anillo e influenciar así la ionización del grupo OH. El grupo $-NH_3^+$ con un valor sigma de 0.82 atrae fuertemente electrones y aumenta la acidez del grupo fenólico. El grupo $-NH_2$ con un valor σ de - 0.66 introduce electrones al anillo y disminuye la acidez del grupo fenólico (63). Las propiedades hidrofóbicas son también modificadas en forma diferente siendo los valores de π de -5.96 y 1.23 para los sustituyentes $-NH_3^+$ y $-NH_2$ respectivamente. Esto nos sugiere, que el efecto predominante del sustituyente en posición, para sobre la potencia desacoplante del compuesto se debe a su capacidad de atraer electrones y aumentar la acidez del grupo fenólico; por ello, los

desacoplante del compuesto se debe a su capacidad de atraer electrones y aumentar la acidez del grupo fenólico; por ello, los compuestos con sustituyentes $-\text{NH}_3^+$ y malonitrilo tienen un gran efecto inhibitorio sobre la captación de H^+ a pH 6.0 (Fig. 25), mientras que el derivado oxima con un valor σ de 0.10 únicamente tiene un efecto bajo, a concentraciones superiores a $20\mu\text{M}$.

El incremento en conductividad de H^+ en liposomas a pH 8.2 es también insignificante con los derivados $-\text{NH}_3^+$ (posiblemente por la misma razón expuesta: transformación del grupo $-\text{NH}_3^+$ al NH_2 a pHs básicos), y con el grupo oxima debido al bajo efecto sobre la acidez del fenol de estos dos grupos.

La actividad desacoplante de la forma neutra de desacoplantes fenólicos parece ser aproximadamente la misma que la de la forma ionizada según se desprende del estudio del desacoplamiento producido por 9 derivados fenólicos a pHs entre 6.4 y 8.4 en mitocondrias de hígado de rata (68); por lo cual la potencia desacoplante medida para los 2,6 dibromofenoles con sustituyentes - malonitrilo y oxima es de esperar que no se modifique apreciablemente entre pHs 6,0 y 8,0.

La potencia desacoplante del derivado - malonitrilo puede depender también de otros factores además de σ y π que determinan una mayor atracción de electrones del anillo y deslocalización de la carga negativa producida por la disociación del $-\text{OH}$ fenólico. El grupo malonitrilo: $-\text{CH}=\text{C}(\text{CN})_2$ hace parte de uno de los más potentes desacoplantes conocidos: el SF6847 (2,6-diterbutil-fenol-4 malonitrilo) cuyas propiedades fisicoquímicas especiales han sido analizados cuidadosamente por el grupo de Terada (66,118). Estudios por resonancia magnética nuclear de

derivados del SF6847 en los cuales se modifica la longitud y ramificación de grupos hidrocarbonados en las posiciones 2 y 6 del anillo fenólico con el grupo malonitrilo en posición 4, indican que los protones en posición orto al malonitrilo tienen un comportamiento diferente cuando la molécula está ionizada (SF6847), posiblemente debido al grado de rotación del grupo malonitrilo respecto al anillo aromático. Se calcularon las energías de activación para estos movimientos restringidos para la forma neutra y molecular del SF6847 y derivados y se encontró que la energía de activación se incrementa al aumentar el tamaño del grupo hidrocarbonado R en la especie aniónica. Este aumento de energía implica una mayor dificultad para el movimiento intramolecular y por tanto mayor coplanaridad del grupo malonitrilo respecto al anillo al incrementarse el tamaño de los grupos R. El mayor tamaño en el grupo R, a su vez está relacionado con una mayor potencia desacoplante y así los grupos terbutilo en relación a otros grupos de menor tamaño proporcionan: un menor movimiento del grupo malonitrilo, un aumento en la coplanaridad del desacoplante, un aumento en el efecto de atracción de e^- y en la disociación del OH fenólico y una mayor estabilidad en la membrana de la forma aniónica SF^- debido también a un incremento en la hidrofobicidad en posición orto con relación al OH fenólico.

Para el caso del 2,6 dibromofenol-4 malonitrilo, la diferencia estructural con SF6847, es la presencia de 2 grupos Bromuro en lugar de 2 terbutilo en posición orto del fenol.

Los grupos Bromuro tienen aproximadamente la mitad del tamaño de los grupos trbutilo (coeficiente de refractividad molar

de 8.8 y 19.6 respectivamente) (63). Es decir que el dibromuro produciría una mayor rotación del grupo malonitrilo en la forma ionizada y tal vez sea esta una razón para la menor eficiencia desacoplante y protonófora comparada al SF6847. El 2,6 dibromofenol-4 malonitrilo desacopla la fotofosforilación a concentraciones de 4 a 40 μ M mientras que el SF6847 lo hace a concentraciones de 3 a 15 nM (66). Además la hidrofobicidad proporcionada por grupos t-butilo es también aproximadamente el doble de la aportada por los grupos Bromuro (valores π de 1.98 y 0.86 respectivamente) (63). Lo cual hace más estable al anión SF6847 que al anión del 2,6 dibromofenol-4 malonitrilo en la membrana lipídica, permitiendo así un mejor desacoplamiento del SF6847. La menor potencia protonófora promovida en liposomas por los otros 2 sustituyentes - oxima y $-\text{NH}_3^+$ ($o\text{-NH}_2$ a pHs básicos) se debe posiblemente a que son más hidrofílicos comparados con el SF6847 y probablemente presenten una mayor rotación respecto al anillo aromático, disminuyendo la coplanaridad y de esta manera la disociación del grupo fenólico, además el mayor carácter hidrofílico y la poca deslocalización de la carga hacen a las formas ionizadas de estos 2,6 dibromofenoles menos estables en la bicapa lipídica.

Nuestros resultados sobre actividad protonófora en liposomas de los 3 compuestos fenólicos estudiados, apoyan cualitativamente el mecanismo quimiosmótico de conducción de H^+ de una fase acuosa a otra a través de una bicapa lipídica, pues la potencia en la conducción de H^+ está relacionada directamente con la acidez del compuesto, la hidrofobicidad y la estabilidad de la forma aniónica en la membrana.

Las actividades desacoplantes relacionandos con la captación de protones síntesis de ATP y flujo electrónico fosforilante, son más difíciles de entender mediante la hipótesis quimiosmótica, hay mayor inhibición en la captación de H^+ que en la síntesis de ATP, el transporte basal de electrones es estimulado, pero el fosforilante está inhibido, con excepción de una, ligera estimulación a concentraciones superiores a $20\mu M$ para el derivado malonitrilo (Fig. 23), concentraciones superiores a $20\mu M$ provocan una inhibición más acelerada del transporte de electrones fosforilante con el malonitrilo, mientras que con los otros dos compuestos, la inhibición se mantiene aproximadamente en un 20%. La mayor inhibición de los 3 compuestos sobre la captación de H^+ que sobre otras actividades, sugiere que además del desacoplamiento, se presenta un efecto inhibitorio de las sustancias sobre las bombas de H^+ lo cual explicaría la inhibición que se produce en el transporte electrónico fosforilante.

Se ha postulado también la existencia de 2 vías de transporte electrónico independientes en cloroplastos (10). La basal en la cual existe flujo de electrones en ausencia de fosforilación y el transporte de electrones fosforilante en presencia de ADP y fosfato. Esto explicaría en parte, el diferente modo de acción de los 2,6 dibromofenoles sobre las dos actividades de transporte electrónico, asumiendo que estos 3 fenoles estudiados inhiben solo el transporte de electrones fosforilante pero no al basal.

Otros reportes en la literatura muestran también activación del transporte de electrones basal pero inhibición en el fosforilante: Pick y Rottemberg (108) con ácido palmítico y gramicidina

y Vallejos (93) con alcaloides desacoplantes derivados de la benzofenantridina.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

1) Estudios de correlación por regresión lineal entre las propiedades: La comparación del Logaritmo del coeficiente de partición y basicidad de aminas y amidas contra las actividades de transporte electrónico fosforilante, captación de H^+ , síntesis de ATP en cloroplastos y conducción de H^+ en liposomas mostró solamente una buena correlación (0.96), con el transporte electrónico fosforilante. Para las otras actividades la correlación fue pobre, lo cual indica que la potencia desacoplante y protonófora de estos compuestos no depende fundamentalmente de su habilidad para captar protones ni de su hidrofobicidad. Los resultados de estos experimentos sugieren la existencia de algún mecanismo alternativo a la hipótesis quimiosmótica.

2) En este trabajo se han caracterizado a las amidas, (compuestos que no presentan características ácido-básicas en medio acuoso), como desacoplantes de la fotofosforilación en cloroplastos. Los efectos sobre captación de protones en cloroplastos y conducción de protones en liposomas muestran que el efecto desacoplante no se debe a la capacidad de acarrear protones de una fase acuosa a otra a través de la membrana. El abatimiento en la síntesis de ATP sin que se colapse la entrada de H^+ al tilacoide y el aceleramiento del transporte de electrones basal, sugieren que estos compuestos están desacoplando la fotofosforilación mediante un mecanismo no protonóforo.

3) La notable divergencia encontrada entre la disipación de H^+ medido por la Bomba de H^+ y la síntesis de ATP para aminas, amidas y fenoles; indica que otras formas de energía además de

una diferencia electroquímica de protones a través de 2 fases acuosas funcionan como intermediarias del acoplamiento entre el flujo de electrones y la síntesis de ATP.

4) Los resultados de este trabajo apoyan la existencia de una vía de acoplamiento intramembranal protónica directa entre las enzimas redox y la ATP sintetasa propuesta por varios autores (13,115,119), además de la vía deslocalizada propuesta por Mitchell (3).

Un enfoque que permitiría elucidar la importancia de los grupos ácido-base dissociables en el desacoplamiento para el caso de los fenoles, sería el de modificar químicamente el grupo OH fenólico (por ejemplo reemplazando el Hidrógeno por un metilo) de tal forma que perdiese sus propiedades ácidas y compararlo con la potencia desacoplante del compuesto fenólico original.

Para las aminas podría introducirse un grupo (por ejemplo cloruro) que, por efectos inductivos atraiese electrones del N aminico, disminuyendo la basicidad de la amina y relacionar en esta forma la disminución en la basicidad con la diferente potencia desacoplante respecto a la amina original.

Es necesario en estos casos asegurarse de que la muestra modificada no esté contaminada con el desacoplante original y que el desacoplante modificado no sea reconvertido al compuesto original debido a algún ataque químico.

Debido a las diferencias encontradas en este trabajo entre la captación de H^+ y la síntesis de ATP, es posible que los compuestos ensayados estén interactuando directamente con la enzima CF_3-CF_3 . Es conveniente entonces medir la actividad ATPasa en presencia de un inhibidor del flujo electrónico (como

el DCMU) con cada uno de los compuestos para evaluar esta posibilidad.

Para que los estudios de correlación realizados en este trabajo sean más significativos, podrían utilizarse un mayor número de aminas con una variación más amplia en su basicidad e hidrofobicidad, también sería útil evaluar la importancia de parámetros estéricos en las actividades desacoplantes.

El enfoque metodológico que se empleó es también conveniente mejorarlo: la medición del gradiente de pH a través de las dos fases acuosas proporcionaría una buena información sobre el efecto protonóforo de las moléculas desacoplantes. La determinación directa de la reacción de síntesis de ATP, también puede hacer más confiables los resultados. Las diferentes mediciones que se van a comparar deben hacerse en las mismas condiciones de temperatura, pH, osmolaridad y fuerza iónica.

REFERENCIAS

- 1) Slater, E.C. (1953) *Nature* 172, 975-978.
- 2) Boyer, P.D. (1965) in *Oxidases and Related Redox Systems* (King, T.E., Mason, H.S. and Morrison, M., Eds.), Vol 2 pp. 994-1008 New York.
- 3) Mitchell, P. (1961) *Nature* 191, 144-148.
- 4) Ort, D.R., and Melandry, B.A. (1982) in *Photosynthesis Vol. 1 Energy conversion by plants and bacteria*. Edited by Gobindjee Chap 12.
- 5) Kell, D.B. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 569, 55-99.
- 6) Jagendorf, A.T., and Uribe, E. (1967) *Brookhaven Symp. Biol.* 19, 215-260.
- 7) Jackson, J.B., and Crofts, A.R. (1971) *Europ. J. Biochem.* 18, 120-130.
- 8) Dilley, R., and Vernon, L. (1965) *Arch. Biochem. Biophys.* 111, 365-375.
- 9) Ort, D.R., and Dilley, R. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 449, 95-107.
- 10) Schröder, H., Siegel, U., and Rumberg, B. (1975) *Proc. 3rd. Int. Congr. Photosynth.* (Avron, M. ed). pp 1031-1039, Elsevier, Amsterdam.
- 11) Harris, D.A., Crofts, A.R. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 502, 87-102.
- 12) Ort, D.R., Dilley, R., and Good, N. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 449, 108-124.
- 13) Dilley, A., Theg, S.M., and Beard, W.A. (1987) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 348-381.

- 14) Newman, J., and Jagendorf, A.T. (1964) Arch. Biochim. Biophys. 167, 109-119.
- 15) Jagendorf, A.T., and Uribe, E. (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 55, 170-177.
- 16) Mitchell, P., and Moyle, J. (1968) Europ. J. Biochem. 4, 530-539.
- 17) Racker, E., and Stoeckenius, W. (1974) J. Biol. Chem. 249, 662-663.
- 18) Stoeckenius, W. (1976) Scientific American 234, 16, 38-46.
- 19) Thayer, W.S., and Hinckle, P.C. (1975) J. Biol. Chem. 250 5336-5342.
- 20) Padam, E., and Rottemberg, H. (1973) Europ. J. Biochem. 40, 431-437.
- 21) Baccarini, A.M., Casadio, R., and Melandry, B.A. (1977) Europ. J. Biochem. 78, 389-402.
- 22) Zoratti, M., Pietrobon, D., and Azzone, G.F. (1982) Europ. J. Biochem. 126, 443-451.
- 23) Sorgato, M.c., Branca, D., and Ferguson, S.J. (1980) Biochem. J. 188, 945-948.
- 24) Decker, S.J., and Lang, D.R. (1978) J. Biol. Chem. 253, 6738-6743.
- 25) Ferguson, S.J. (1985) Biochim. Biophys. Acta 811, 47-95.
- 26) Westerhoff, H.V. et al (1984) FEBS Lett. 165, 1-5.
- 27) Witt, H.T., Schröder, H., and Vrederber, J. (1977) Biochim. Biophys. Acta 162, 613-621.
- 28) Williams, R.J.P. (1978) Biochim. Biophys. Acta 505, 1-44.
- 29) Williams, R.J.P. (1979) FEBS Lett. 102, 1, 126-132.
- 30) Haynes, T.H. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 160-164.

- 31) Michell, H., and Oesterhelt, D. (1980) *Biochemistry* 19, 4615-4619.
- 32) Westerhoff, H.V., Melandry, F.A., Venturoli, G., Azzone, G.F., and Kell, D.G. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 768, 257-291.
- 33) Slater, E.C., Berden, J.A., and Herweijer, M.A. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 811, 217-231.
- 34) Hackembrock, C.R. (1981) *Trends. Bioch. Sci.* 6, 151-154.
- 35) Emerson, R., and Lewis, C.M. (1943) *Am. J. Bot.* 30, 165-178.
- 36) Hill, R., and Bardall, D.S. (1960) *Nature* 186, 136-137.
- 37) Anderson, B., and Anderson, J.M. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 546, 426-439.
- 38) Ames, J. (1977) in *Encyclopedia of Plant Physiology* (Edited by A. Trebs., and M. Avron) Vol 8, 238-245.
- 39) Katoh, S. (1977) in *Encyclopedia of Plant Physiology* (Edited by A. Trebs, and M. Avron) Vol 5, 247-252.
- 40) Joliot, P., and Kok, B. (1975) in *Bioenergetic of Photosynthesis* (edited by GobindJee) 387-412 Academic Press New York.
- 41) Velthuis, B.K. (1981) *FEBS Lett* 126, 277-281.
- 42) Malkin, R. (1982) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33, 455-479.
- 43) Izawa, S., and Good, N. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 162, 380-391.
- 44) Portis, A., and McCarty, R.E. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 1610-1617.
- 45) Davenport, J.W., and McCarty, R.E. (1984) *Biochem. Biophys. Acta* 766, 366-374.
- 46) Portis, A., and McCarty, R.E. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 1610-1617.

6250-6254.

- 47) Izawa, S., and Good, N.E. (1972) in *Methods in Enzimol.* (San Pietro, A. Ed.) Vol 24, Academic Pres 355-377.
- 48) Moreland, D.E. (1980) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31, 597-638.
- 49) Izawa, S., Heath, R.L. and Hind, G. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 180, 388-398.
- 50) Vater, J. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 292, 786-795.
- 51) Wessels, J.S.C., and Vanderveen, R. (1956) *Biochim. Biophys. Acta* 19, 548-554.
- 52) Good, N.E. (1961) *Plant Physiol.* 36, 788-803.
- 53) Tischer, W., and Strotmann, H. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 460, 113-125.
- 54) Cornforth, J.W., and James, A.T. (1956) *Biochem. J.* 63, 124-130.
- 55) Trebs, A. (1979) *Z. Naturforsch* 34, 986-991.
- 56) Trebs, A., and Draber, W. (1979) in *Advances in Pesticid Sci.* 2, (Geissbüter, H. ed) Pergamon Press. Oxf. pp. 223-234
- 57) Albores, M., Lotina, B., Zapien, A., González, G. and Migueles, L. (1986) *Pest. Sci.* 396-402.
- 58) Zweigh, G., Shavit, N., and Avron, M. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 109, 332-346.
- 59) McCarty, R.E., Guillory, R.J., and Racker, E. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 4822-4823.
- 60) Winget, G.D., Izawa, S., and Good, N.E. (1969) *Biochemistry* 8, 2067-2074.
- 61) McCarty, R.e., and Racker, E. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 3435-3439.
- 62) Hansch, C.E., Deutsch, E.W. and Smith, N.R. (1965) *J. Am.*

Chem. Soc. 87, 2738-2742.

- 63) Hansch, C.E., and Leo, A. (1979) Sustituent Constants for correlation analysis in chemistry and Biology. Wiley interscience. New York.
- 64) Mitchell, P. (1966) Biol. Rev. 41, 445-502.
- 65) Good, N.E. (1977) Encyclopedia of Plant Physiology (Edited by Trebs, A. and Avron M.) pp 429-436.
- 66) Terada, H. (1981) Biochim. Biophys. Acta 639, 225-242.
- 67) Miyoshy, H., and Fujita, T. (1987) Biochim. Biophys. Acta 894, 339-345.
- 68) Miyoshy, H., and Fujita, T. (1987) Biochim. Biophys. Acta 891, 194-204.
- 69) Miyoshy, H., and Fujita, T. (1987) Biochim. Biophys. Acta 891, 293-299.
- 70) Parker, V.H. (1965) Biochem. J. 97, 658-662.
- 71) Hopfer, U., Lenhinger, A.L. and Thomson, T.E. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 59, 484-490.
- 72) Hopfer, U., Lenhinger, A.L., and Lennarz, W.S. (1970) J. Membr. Biol. 3, 142-155.
- 73) Lieberman, E.A., Topalty, V.P., Tsofina, L.M., Jasaitis, A.A., and Skulachev, V.P. (1969) Nature 222, 1076-1078.
- 74) Backer, E.P., Van den Henvel, E.J., Wiechmann, A.H., and Van Dam, K. (1973) Biochim. Biophys. Acta 292, 78-87.
- 75) Kessler, R.J., Tyson, C.A., and Green, D.E. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 3141-3145.
- 76) Miko, M., and Chance, B. (1975) Biochim. Biophys. Acta 396, 165-174.
- 77) Chefurka, W. (1978) Biochemical Biophysical Research. Comm.

- 83, 571-578.
- 78) Terada, H., and Kubota, S. (1979) FEBS Lett. 100, 37-40.
- 79) Kaback, H.R., Reeves, J.P., Short, S.A., and Lombardi, F.J. (1974) Arch. Bioch. Biophys. 160, 215-222.
- 80) Kiewlet, D.Y., Hall, D.O., and Senner, E.L. (1965) Biochim. Biophys. Acta 109, 284-292.
- 81) Weinback, E.C., and Garbus, Y. (1969) Nature 221, 1016-1018.
- 82) Hanstein, W.G., and Hatefi, Y. (1974) J. Biol. Chem. 249, 1356-1362.
- 82a) Hanstein, W.G., and Hatefi, Y. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 288-292.
- 83) Katre, N.V., and Wilson, D.F. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 191, 647-656.
- 84) Heytler, P.G. (1963) Biochemistry 2, 357-358.
- 85) Good, N.E. (1960) Biochem. Biophys. Acta 40, 502-517.
- 86) Hind, G., and Whittingham, C.P. (1963) Biochim. Biophys. Acta 75, 194-202.
- 87) Dilley, R.A., and Vernon, L.P. (1965) Arch. Bioch. Biophys. 111, 365-375.
- 88) Siow, K.S., and Unrav, A.M. (1968) Biochemistry 7, 3507-3512
- 89) Gromet, E.Z., and Avron, M. (1966) Plant Physiology 41, 1231-1236.
- 90) Dilley, R.A., and Platt, J.S. (1968) Biochemistry 7, 338-346
- 91) Black, C.C. (1968) Biochem. Biophys. Acta 162, 294-296.
- 92) Karlsh, S.J.D., Shavit, N., and Avron M. (1969) Europ. J. Biochem. 9, 291-298.
- 93) Vallejos, H.R. (1973) Biochim. Biophys. Acta 292, 193-196
- 94) Wright., et al (1980) Biochemistry 19, 61-65

- 95) Mona, S., et al (1987) Pesticid. Biochim. and Physiol. 27, 261-266.
- 96) Lotina, H.B., King, B., Albores, M., and Pozas, R. (1987) Photochem. and Photobiol. 46, 2, 287-293.
- 97) Merck Index. (1968) Merk and Company 8th. edition.
- 98) Lange's Handbook of Chemistry (1985) (Edited by "J. A. Deau) 13th. Edition. Tables 5-8 Sections 5; pp 41 and 46 McGraw Hill, New York.
- 99) Takaokis T., Torres, J., and Packer, Lester. (1974) Biochim. Biophys. Acta 352, 260-267.
- 100) Strain, H.H.Cope, B.T., and Svec, W.A. (1965) Meth. Enzymol. 23, 452-476.
- 101) Nishimura, M. (1962) Biochim. Biophys. Acta 57, 96-103
- 102) Alberty, R., Smith, R. and Bock, R. (1951) J. Biol. Chem. 193, 425-434.
- 103) Newman, J., and Jagendorf, A.T. (1964) Biochem. Biophys. Res. Commun. 16, 562-567.
- 104) Rottemberg, H. (1975) Methods in Enzimology 55F, 561-567.
- 105) Kano, K., and Fendler, J.H. (1978) Biochim. Biophys. Acta 509, 289-299.
- 106) Clement, N.R., and Gould, J.M. (1981) Biochemistry 20, 1534-1538.
- 107) Cohen, W.S., Cohn, D.E., and Berlich, W. (1975) FEBS Lett. 49, 350-355
- 108) Pick, U., Weiss, M., and Rottemberg, H. (1987) Biochemistry 26, 8295-8302.
- 109) Mac Langhlin, S.G.A., and Dilger, J.P. (1980) Physiol. Rev. 60, 825-863.

- 110) Stockale, M., and Selwyn, M.J. (1971) *Europ. J. Biochem.* Vol 21, 4, 565-574.
- 111) McCarty, R.E., and Coleman, C.H. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.* 141, 198-206
- 112) Crofts, A.R. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24, 1, 127-134.
- 113) Junge, W., and Ausländer, W. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 333, 59-70.
- 114) Giersch, C. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100, 2, 666-674.
- 115) Rottemberg, H. (1985) *Modern Cell Biology* 4, 47-83.
- 116) Nishizaki, Y. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 314, 312-319.
- 117) Rottemberg, H. (1983) *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 80, 3313-3317
- 118) Terada, H., Kumazawa, N., and Yoshikawa, K. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 767, 192-199.
- 119) Laasch, H., and Weis, E. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 936, 99-107.

Agradecimientos:

Al doctor Blas Lotina por su valiosa dirección y enseñanzas durante la elaboración de este trabajo.

A los doctores Armando Gómez-Puyou, Dr. Antonio Peña y en especial al doctor Salvador Uribe por las facilidades suministradas para la realización de varios experimentos.

A Martha Calahorra por su eficiente ayuda en el trabajo con liposomas.

A todos mis profesores. Muchas Gracias!