

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

SE REQUIERE UN ACARREADOR CON ALTA AFINIDAD EN EL  
TRANSPORTE DE ADENIN - NUCLEOTIDOS.

178

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

Q U I M I C O

presenta

ARTURO JANOVITZ KLAPP.

MEXICO, D.F.

1975



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

CLAS. Tesis  
ADQ. 1975  
FECHA 1975  
PROC. Mt: 172

5252 v. Titulo y cerr.  
se requiere un autorizador con alta afinidad a el  
transporte de Adenin- nucleotidos  
25 p. 6.

PRESIDENTE: Estela Sánchez de Jiménez  
VOCAL: Guadalupe Vélez Pratt  
SECRETARIO: Edmundo Chávez Cosío  
1er. Suplente: Alfredo Echegaray Alemán  
2o. Suplente: Enrique Sánchez Saloma

Sitio donde se desarrolló el tema:

Instituto de Biología, Departamento de Biología Experimental.

Nombre completo y firma del sustentante:



Arturo Janovitz Klapp

Nombre completo y firma del asesor del tema;



Edmundo Chávez Cosío

CON PROFUNDA ADMIRACION Y  
RESPECTO A TODA MI FAMILIA,  
LA DE HOY Y LA DE MAÑANA.

Y A TODAS LAS PERSONAS QUE  
TRABAJAN CANTANDO.

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN  
LOS LABORATORIOS DEL DEPARTAMENTO DE  
BIOLOGIA EXPERIMENTAL DEL INSTITUTO DE  
BIOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO, BAJO LA DIRECCION  
DEL DR. EDMUNDO CHAVEZ COSIO, Y  
GRACIAS A LA VALIOSA AYUDA DE LA DRA.  
MARIETA TUENA DE GOMEZ POYOU Y DEL  
DR. ARMANDO GOMEZ POYOU, A QUIENES  
EXPRESO MI GRATITUD.

## INDICE

	<u>Página</u>
INTRODUCCION	3
MATERIALES Y METODOS	13
RESULTADOS Y CONCLUSIONES	16
DISCUSION	22
BIBLIOGRAFIA	24

## INTRODUCCION

Las membranas biológicas son quizás las estructuras supramoleculares más complejas, desde el punto de vista de su ensamble, y juegan un papel crucial en casi todos los fenómenos celulares, algunos de los cuales son tan importantes como la fosforilación oxidativa en las mitocondrias.

Existe ahora cuantiosa información concierne a la composición y estructura de las membranas. Un dato reciente es que las membranas internas y citoplásmicas son esencialmente iguales. Ambas están compuestas de proteínas y sustancias grasas (lípidos). En las membranas de las células de los mamíferos están también presentes pequeñas cantidades de carbohidratos asociados con proteínas o con lípidos. Los lípidos tienen aproximadamente la mitad de la masa de la mayoría de las membranas y en las membranas internas los lípidos son exclusivamente fosfolípidos. Las membranas citoplásmicas contienen, además de fosfolípidos, glicolípidos y lípidos neutros, como el caso del colesterol en los eritrocitos (1).

Con los trabajos de Davson y Danielli en 1935 (2) y posteriormente de Robertson (3), se llegó a postular una estructura para las membranas celulares, en la que se supone una doble capa de fosfolípidos, con sus grupos hidrofílicos orientados hacia afuera y los hidrofóbicos hacia el interior, formando una estructura bidimensional rodeada por sus partes



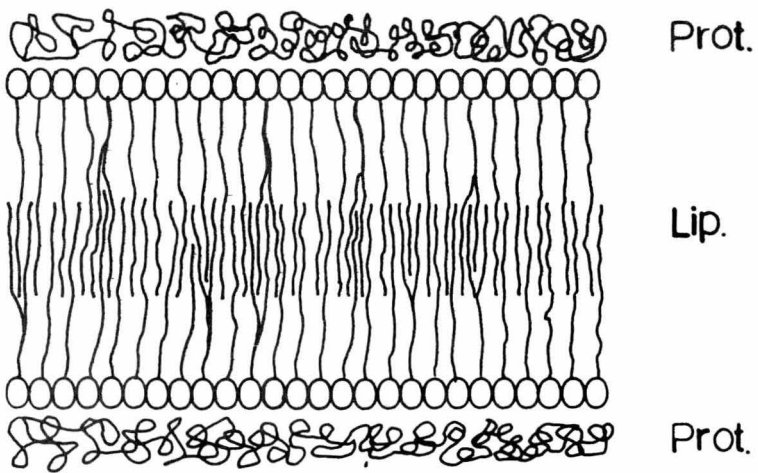


Figura 1

internas y externas de proteínas extendidas en su configuración beta (fig. 1) . Esta configuración representa una capa total de  $90 \text{ \AA}$  de grosor, con  $60$  a  $70 \text{ \AA}$  formados por la doble capa de fosfolípidos.

Este modelo no es consistente con algunas de las propiedades de las membranas, por lo que se han postulado nuevos modelos en los que se toman en cuenta las restricciones termodinámicas involucradas, tanto en el arreglo estructural como en el funcional de las membranas. Uno de ellos es la postulación de un mosaico fluido, dinámico, en el que las proteínas se encuentran en dos arreglos diferentes: extrínsecas e intrínsecas (4). Esto es, que se pueden encontrar tanto sumergidas dentro de la doble capa de lípidos como en la superficie de ésta. Algunas de las proteínas se encuentran atravesando la membrana y están ancladas a ella por una serie de aminoácidos neutros, que se fijan a la parte hidrofóbica de la doble capa, conteniendo algunos otros aminoácidos de tipo polar hacia el exterior (5) (fig. 2). Todo este mosaico tiene fluidez, lo que confiere a las proteínas la propiedad de tener movilidad de un lado a otro de la membrana. Estas proteínas se encuentran, según los últimos reportes, en su forma globular (1).

Se ha visto por microscopía electrónica que las membranas celulares tienen una asimetría estructural que se forma por las diferencias químicas de las proteínas y lípidos que constituyen las capas. Esta asimetría es muy notoria, por el método antes citado, en la membra

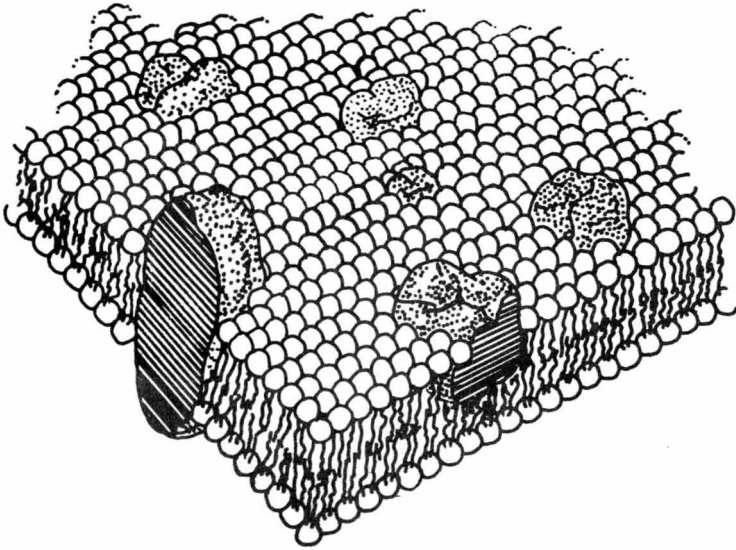


Figura 2

na interna de la mitocondria y es un elemento importante en el mecanismo direccional y vectorial de transporte a través de las membranas. (6)

La función de la membrana es por tanto doble: por un lado, sirve como una barrera general y por el otro, permite cierta permeabilidad. Ambas funciones se pueden observar dada la estructura de las membranas. El papel de proporcionar una pared impermeable es relativamente su función primaria y se lleva a cabo, en principio, por la doble capa lipídica. La función de permitir el intercambio específico de substratos es mucho más sutil y se realiza gracias a las propiedades especiales de las membranas biológicas, que las diferencian de las preparadas artificialmente.

La mitocondria es un ejemplo particularmente interesante, de un sistema selectivamente cerrado, formado por dos membranas, una sola de las cuales, la membrana interna, retiene suficientes sustancias (suficiente poca permeabilidad) como para formar un espacio cerrado, el cual contiene los elementos que no pueden ser permeados. A este espacio en particular se le ha llamado matriz, por tanto, la membrana interna ha sido definida como una barrera entre dos espacios.

Es muy usual para un análisis más detallado de las funciones de las membranas y en particular, del mecanismo del transporte, diferenciar bien entre las diferentes partes de la mitocondria (7) (fig. 3).

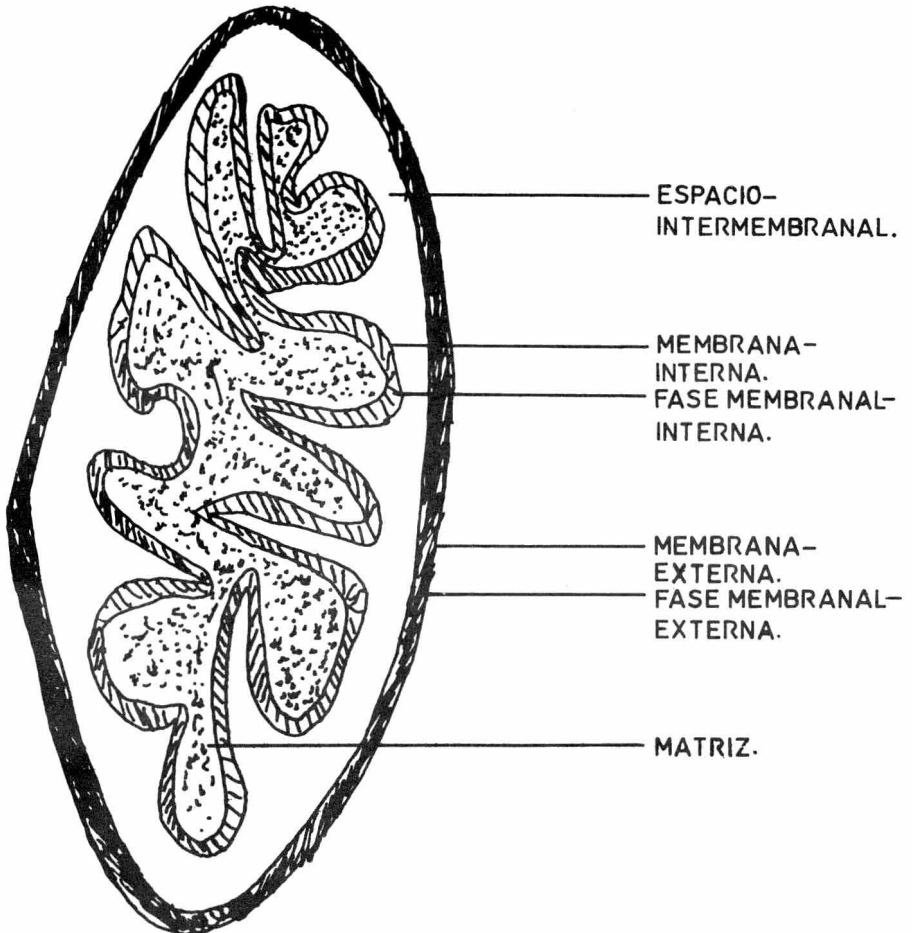


Figura 3

Una fracción considerable de las reacciones mitocondriales se llevan a cabo dentro de la membrana. Se puede postular que la localización en la fase membranal de cualquier reacción, está ligada a una función vectorial, como es el transporte acoplado de algún metabolito o ion. Sólo en estas circunstancias la separación de espacios se convierte en la propiedad más importante de la membrana y es explotada con mucha eficacia por los sistemas de catálisis, que están fijados a ella.

Los sistemas metabólicos más importantes de las mitocondrias, son los que están representados por la degradación oxidativa de substratos, unido a la fosforilación oxidativa. Las reacciones de degradación de substratos están en su mayoría localizadas en la matriz, mientras que la cadena respiratoria, que comprende la transferencia de electrones, un gran número de deshidrogenasas y el sistema de fosforilación oxidativa están unidos a la membrana. Esta relación, relativamente alta de funciones llevadas a cabo en esta parte celular, se refleja en el ratio tan alto de superficie de membrana mitocondrial por unidad de volumen ( $50 \text{ m}^2/\text{ml}$ ) en mitocondrias de corazón o músculo de mosca.

Por tanto, se pueden diferenciar tres tipos de reacciones membranales de transporte.

1. Transporte a través de la membrana, sin modificación química.
2. Transporte de grupos a través de la membrana y acoplado a un rompimiento o formación de enlaces químicos.

3. Transporte de iones al través de la membrana y que podría o no, estar acoplado al transporte de electrones.

El estudio del transporte de metabolitos a través de la membrana mitocondrial, fue iniciado relativamente tarde comparado con los estudios del transporte en eritrocitos, bacterias u otros sistemas celulares. La iniciativa de su estudio en mitocondrias fue determinada por la gran actividad metabólica de estos organelos.

Las reacciones de transporte en mitocondrias son con frecuencia de uno a dos órdenes de magnitud más rápidas que aquéllas de la célula entera, y los intercambios de metabolitos en el transporte, son más fáciles de medir, razón por la cual los resultados obtenidos son principalmente cualitativos.

El transporte en mitocondrias es, sin embargo, un adelanto en la elucidación de los sistemas de acarreadores, y la velocidad y multiplicidad de intercambio de metabolitos, indica que los acarreadores se encuentran en concentraciones muy altas dentro de las membranas, lo que facilita su identificación y posible caracterización molecular.

Este transporte mitocondrial de metabolitos puede ser considerado desde el punto de vista funcional, como un sistema fundamental que explica el transporte de algunas sustancias para cualquier tipo de mitocondria, independientemente de su origen. El transporte fundamental incluye la

penetración de oxígeno, agua, bióxido de carbono, fósforo inorgánico, adenin-nucleótidos y substratos esenciales como el piruvato y los ácidos grasos.

Algunos de estos metabolitos se difunden en forma no específica a través de la membrana, sin necesidad de un acarreador, mientras que otros sólo pueden hacerlo por medio de su acarreador específico, que se encuentra en la mitocondria (8).

Cabe abrir un pequeño paréntesis, en estos momentos, para profundizar un poco en la idea del transporte por medio de acarreadores. Este puede ser descrito en tres grupos generales: difusión facilitada, transporte activo y translocación de grupos.

Los tres fenómenos generales tienen varias propiedades en común, que los diferencian del transporte pasivo o difusión a través de la membrana.

1. La presencia de un componente membranal activo, que permite un intercambio más rápido del que se puede deber a la naturaleza química del soluto.
2. La entrada del soluto llega a un valor límite, con concentraciones crecientes del mismo, lo que con frecuencia nos da una cinética enzimática de Michaelis-Menten.



3. El acarreador es usualmente estereoespecífico, lo que implica la existencia de diferentes acarreadores para diferentes solutos.
4. El proceso es dependiente de la temperatura (9).

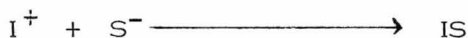
Cada uno de los sistemas de transporte difiere de los demás en varios puntos importantes, a saber: la difusión facilitada es el más simple y común de todos los procesos de acarreadores; este sistema permite el movimiento del soluto bajo un gradiente de concentración, hasta que la concentración en el exterior sea igual a la del interior de la membrana. La energía para el fenómeno está dada por el gradiente de concentración del soluto y la energía metabólica no es utilizada. El acarreador sólo afecta la velocidad del movimiento y no el equilibrio final.

Si la energía metabólica se encuentra involucrada en el mecanismo de difusión, de tal manera que haya una acumulación del soluto, el sistema se llama de transporte activo.

La translocación de grupos, en contraste con estos dos, involucra una modificación del soluto durante el proceso de transporte. Este mecanismo, propuesto inicialmente por Mitchell y Moyle (10), sugiere que las moléculas del acarreador se comporten como enzimas al catalizar reacciones de transferencia de grupos. Aunque en este caso el soluto es alterado, es aparente que da como resultado la acumulación del mismo, como sucede en el transporte activo.

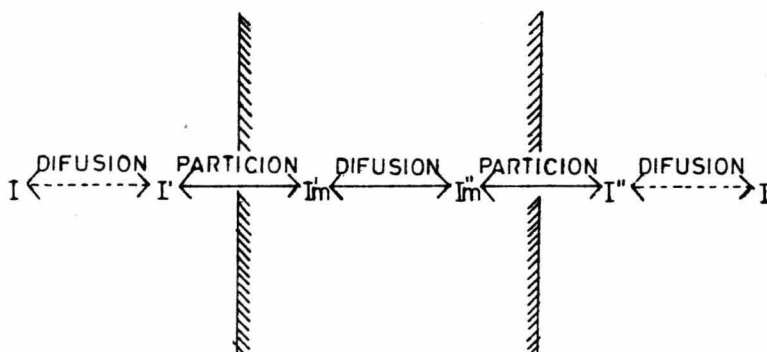
Una representación esquemática de dos de los procesos antes descritos, la podemos ver en la figura 4. Como puede observarse, el mecanismo de difusión a través de la membrana, está dividido en cinco partes como sigue: para el caso de la difusión o transporte pasivo, que se debe a la solubilidad del soluto en la fase lipídica, la primera parte del fenómeno es una difusión del soluto, a través del solvente que se encuentra fuera del sistema membranal ( $I \rightarrow I'$ ). Un segundo paso del fenómeno es la partición o solubilización del soluto en la fase lipídica ( $I' \rightarrow I'm$ ); siguiendo esta partición, las moléculas del soluto se difunden dentro de la fase lipídica ( $I'm \rightarrow I''m$ ), para por último realizar una segunda partición del medio lipídico hacia el interior del espacio rodeado por la membrana ( $I''m \rightarrow I''$ ), y una difusión en este espacio ( $I'' \rightarrow I$ ).

Ahora bien, en el caso de una difusión por medio de un acarreador, los pasos intermedios del fenómeno son básicamente iguales, sólo que esta vez la partición y la difusión dentro de la fase lipídica, se lleva a cabo gracias a la intervención de una molécula acarreadora, que al reaccionar con el soluto en una reacción enzimática del tipo:



donde I = soluto, y S = enzima, crea un compuesto enzima-substrato

## DIFUSION



## DIFUSION MEDIADA POR ACARREADOR

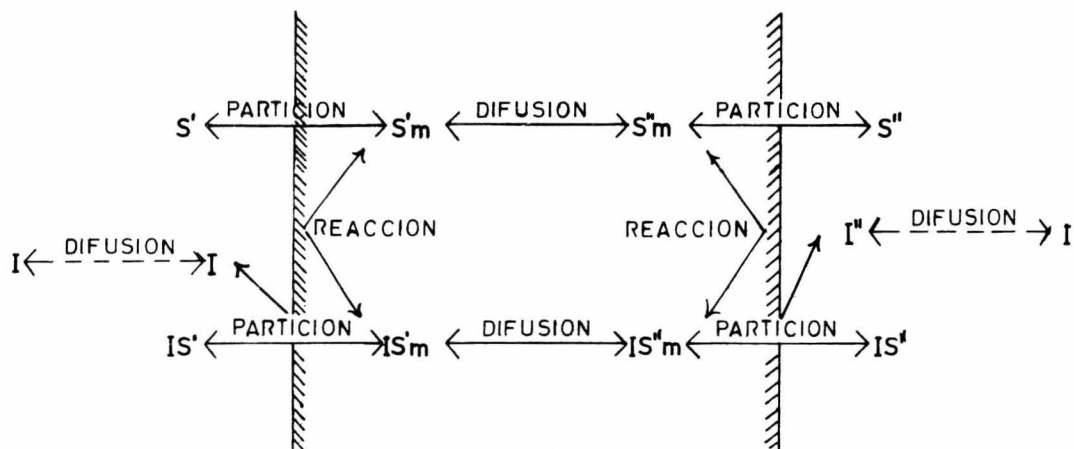


Figura 4

capaz de llevar al cabo el proceso de la difusión en el medio lipídico (9).

El acarreador de adenin-nucleótidos ha sido el primer acarreador aniónico de la membrana interna de la mitocondria estudiado. Este estudio se ha hecho posible gracias a la existencia de un inhibidor específico, el atractilósido o atractilato de potasio (ATR). Este compuesto está formado molecularmente por un glucósido diterpénico que contiene tres grupos ácidos. El ATR fue estudiado primeramente por su alta toxicidad en mamíferos (11) y más tarde Bruni demostró que es un inhibidor en el proceso de la fosforilación oxidativa (12). Estudios posteriores de Vignais (13) y el mismo Bruni (14 y 15) llevaron a la conclusión de que el compuesto afecta de esta manera, compitiendo por la entrada de ADP a la mitocondria y por ende, la fosforilación del ADP en el interior de la mitocondria. Dado que el ATR evita la entrada de ADP, se le ha considerado como un inhibidor del sistema acarreador de ADP en la mitocondria (Klingenberg, Pfaff) (16). Algunos derivados del ATR, como el carboxiatractilósido, que también inhibe el transporte de ADP, han servido como pruebas de la existencia del acarreador del nucleótido de adenina en mitocondrias.

En base a las propiedades de los compuestos antes descritos, se han llegado a estudiar las características cinéticas del sistema en mitocondrias de mamíferos y levaduras, las que están resumidas en la tabla 1 (17).

T A B L A I

Propiedades del acarreo de adenin-nucleótidos. Proceso de intercambio por difusión.

- Estequiometría 1:1

Cantidades micromoleculares de ADP externo realizan un intercambio contra 10 mM del ADP + ATP interno.

- Hay una entrada positiva, en la presencia de  $Ca^{+2}$  y  $Fe^{+2}$ .
- Ausencia de compartimentación de los adenin-nucleótidos intramitocondriales.
- Localización del acarreador de adenin-nucleótidos en la membrana interna.

Cinética de Michaelis-Menten con una curva de saturación.

- Km para el ADP externo de 1 a 10  $\mu M$
- V max para el ADP externo de 3 a 7 nanomolas/min/mg prot. (2° C).
- Km para el ATP externo de 2.5 a 11  $\mu M$
- La velocidad máxima para el ATP es de 2 a 4 veces menor que la del ADP.

Especificidad para ADP y ATP

- El APCH<sub>2</sub>P \*, APHP \*\* y desoxiADP son también transportados.
- El AMP no es transportado ni tampoco algunos otros nucleótidos como UDP, CDP, GDP, IDP excepto GDP, en tejido adiposo café y UDP en levadura.

Dependencia por la temperatura de la velocidad del transporte.

- Punto de transición en mitocondrias de hígado de rata: 8° C
- Abajo de 8° C la energía de activación es de 50 Kcal/mol.
- Arriba de 8°C la energía de activación es de 12 Kcal/mol .

Dependencia al pH

- No hay efecto de pH entre 5 y 8.

Inhibición específica

- Por Atractilósido, Carboxiatractilósido y Acido Bongkreiko.

Determinación genética

- Pérdida de afinidad por ADP o Atractilósido en mitocondrias mutantes de S. cerevisiae.

Asimetría del transporte

Está favorecido el antiporte electrogénico  $ADP^{-3} \longrightarrow ATP^{-4}$  .

\* Análogo metilénico de ADP

\*\* Análogo hidrofosfatado de ADP

La especificidad para ADP y ATP, la cinética de saturación, la alta dependencia por la temperatura, la existencia de inhibidores específicos y la posibilidad de un control genético, nos indican que el transporte de ADP y ATP es un proceso de difusión facilitada, por medio de un acarreador (18).

Sin embargo, en datos recientes de Hanson (19) y Pasam (20), quienes trabajan en mitocondrias de plantas (coliflor y alcachofa), han reportado ausencia o diferencias marcadas en el efecto del ATR en la respiración estimulada por ADP y la ATPasa. Estos reportes han creado algunas controversias con respecto al efecto del ATR en el transporte, y en sus posibles implicaciones metabólicas, lo que nos motivó a estudiar las propiedades cinéticas del acarreo del ADP y ATP, a través de la membrana de mitocondrias de coliflor (Brassica oleracea).

## MATERIALES Y METODOS

Las coliflores fueron obtenidas del mercado local. Partiendo del tejido que se encuentra en los extremos de las flores (3 mm) se procedió a extraer y purificar las mitocondrias, por el método descrito por Jung y Hanson (21), al que se hicieron ligeras modificaciones, quedando el sistema como lo podemos ver en el siguiente cuadro sinóptico (fig. 5):

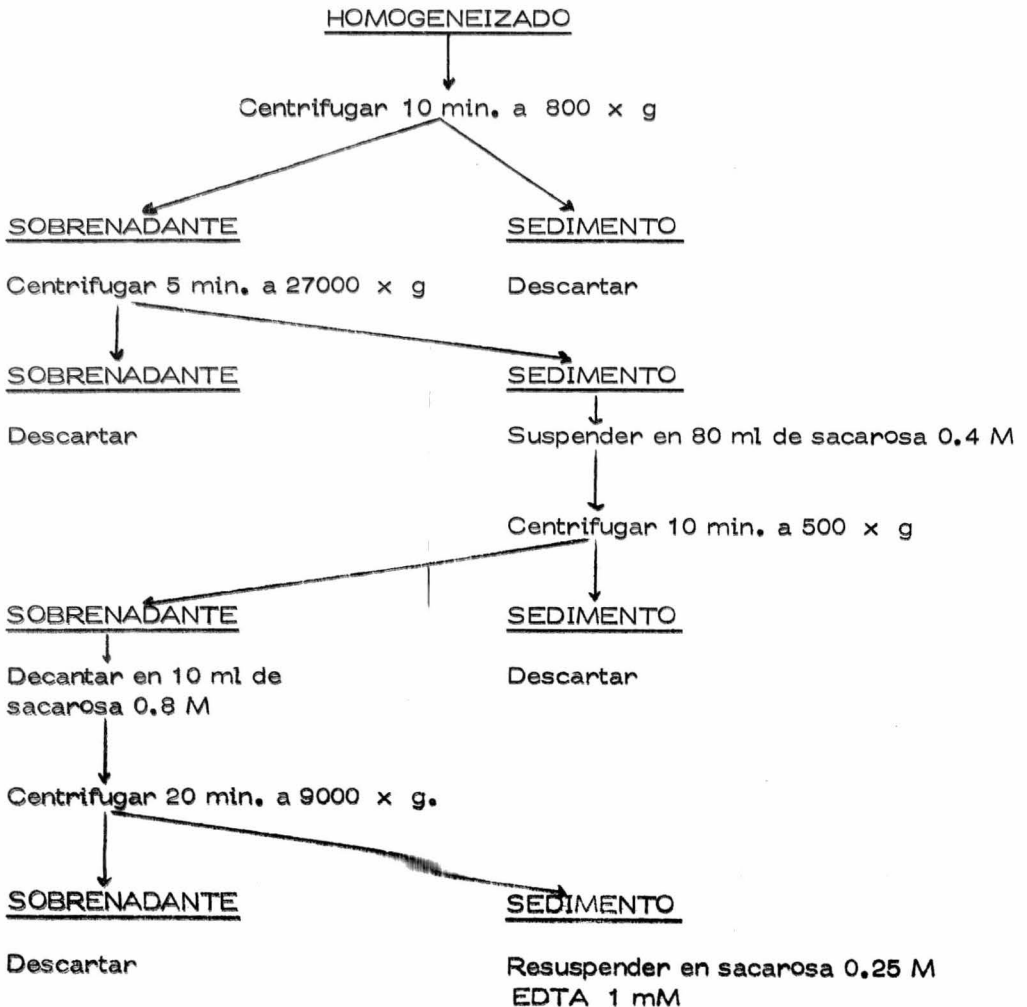


Figura 5



Se utilizó sacarosa 0,25 M con EDTA 1 mM pH 7,3 para hacer el homogeneizado. Las mitocondrias obtenidas fueron resuspendidas en este mismo reactivo.

Las mediciones de la respiración se hicieron utilizando el método polarográfico, con un electrodo de oxígeno (Yellow Springs Instrument Co.), y graficando los cambios en concentración de oxígeno del medio respecto al tiempo, en una mezcla que contenía: 5 mg de proteína mitocondrial, sacarosa 125 mM, fosfato-Tris pH 7,3 10 mM, succinato-Tris pH 7,3 3 mM, Tris-HCl 20 mM y  $MgCl_2$  2 mM, en un volumen final de 3 ml.

La actividad de ATPasa fue medida en un medio similar al descrito por Hanson (21), determinando la concentración de fósforo inorgánico liberado en el medio, según el método reportado por Sumner (22).

Las cuantificaciones de fijación de  $^{14}C$  ADP y  $^{14}C$  ATP a la membrana mitocondrial fueron hechas en un contador de centelleo (Nuclear Chicago), siguiendo las indicaciones reportadas por Winkler, Bigram y Lehninger (22). En estos experimentos se utilizó un medio que contenía: Tris-HCl 20 mM, sacarosa 125 mM, y 3 mg de proteína, siendo la mezcla final de 1 ml, del cual se tomó después de incubar un minuto, una alícuota de 0,3 ml y se filtró a través de un filtro Millipore tipo HA.

Para constatar la integridad de las mitocondrias, se llevó al cabo un experimento de hinchamiento mitocondrial, para el cual se usó

un espectrofotómetro marca Zeiss, midiendo los cambios en densidad óptica a 520 nm en un medio que contenía los mismos compuestos que la respiración.

La proteína fue determinada por el método de Murphy y Kies (24).

Todos los reactivos utilizados fueron de la máxima pureza comercial posible, a saber:

El ADP y ATP, de Sigma

El ATR, de Calbiochem

Los nucleótidos marcados, de Amersham Searle, con una actividad de 72 mc/mmola para el ATP y 55 mc/mmola para el ADP.

Los reactivos restantes de uso común, se obtuvieron de los Laboratorios Merck.

Todos los experimentos fueron hechos cuando menos tres veces, obteniéndose en todos resultados similares.

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Para iniciar la investigación hicimos algunos experimentos de control respiratorio; esto es, medimos los cambios en el consumo de oxígeno, según el método descrito en "Materiales y Métodos" (M.M.), y probamos, en primer lugar, el efecto del ADP sobre las mitocondrias que se encontraban en un medio carente de este sustrato (estado 4), encontrando, como es notorio en la figura 6, que las mitocondrias responden a este metabolito aumentando considerablemente su consumo de oxígeno (estado 3), lo que habla de un estado acoplado de las mitocondrias. Como pruebas de la integridad de nuestras mitocondrias realizamos, por un lado, una respiración en la que los sustratos oxidables agregados fueron malato - glutamato, en las mismas concentraciones que el succinato, ya que estos compuestos son oxidados en la matriz mitocondrial y en caso de haber poros o fracturas no habría respuesta al ADP, como podemos ver en la figura No. 6, la respuesta de nuestra preparación al adenin-nucleótido en el medio antes descrito es franca, lo que constata en cierta medida la integridad de nuestra preparación mitocondrial. Una segunda prueba de esta integridad (fig. 7) son los resultados de hinchamiento, ya que en caso de los nombrados poros o fracturas, este efecto sería insignificante.

Se observa también claramente en la figura 6, que el ATR no causa ningún efecto en el estado 3 de nuestras mitocondrias, aun a concentraciones mucho mayores de las que actúan en mitocondrias de mamíferos

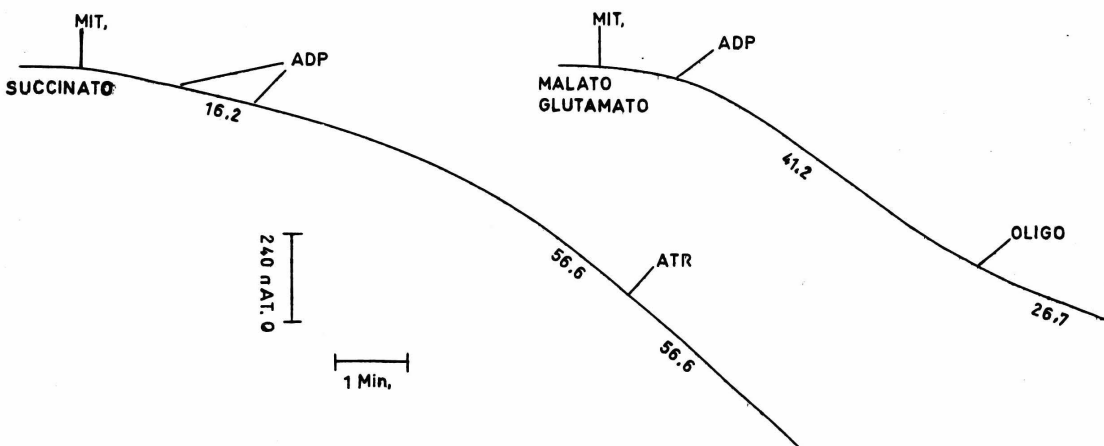
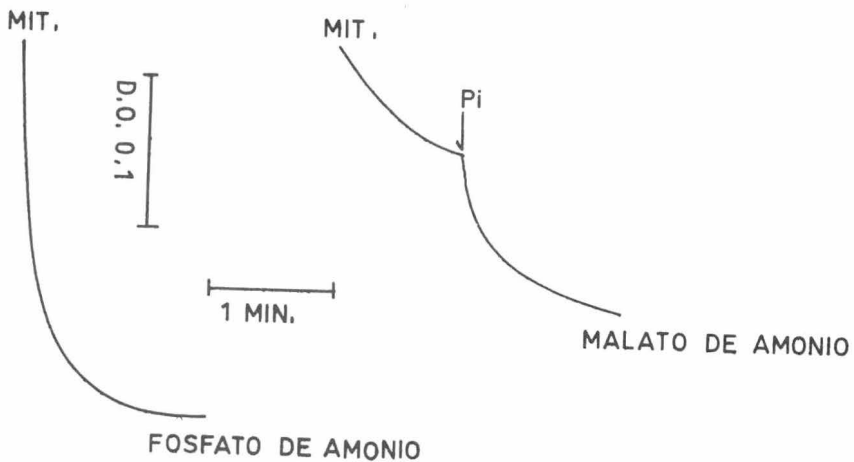


Figura 6

Figura 7



(200  $\mu\text{M}$  en nuestro caso, siendo que con 40  $\mu\text{M}$  inhibe casi completamente este parámetro en mitocondrias de hígado).

Sin embargo, podría argüirse que la falta de efecto del glucósido en nuestras partículas subcelulares, puede deberse a la gran cantidad de ADP presente (2.3 mM), en comparación de 200  $\mu\text{M}$  del ATR, ya que como ha reportado Klingenberg (25), la inhibición ocasionada por este compuesto tiene una cinética de competencia, que puede ser revertida por estas concentraciones de ADP. Consideramos, por tanto, probar el efecto en concentraciones inclusive más altas que las del metabolito (fig. 8). En esta misma figura presentamos un control de mitocondrias de hígado de rata, en el que se ve sin lugar a dudas la diferencia en sensibilidad. Para poder utilizar este medio, que tiene concentraciones bajas de ADP, se creó un sistema regenerador del metabolito, utilizando glucosa 16 mM y hexoquinasa 3.6 u./ml, obteniendo, como se puede ver, una inhibición muy pobre en comparación con la que se produce en hígado de rata en concentraciones mucho mayores de ADP.

Es también muy notorio que en nuestras mitocondrias (fig. 8) el ATP tiene un efecto directo sobre la deshidrogenasa succínica, activando la respiración como ocurre en mitocondrias de mamífero (26), y que es, además, sensible en cierta medida, mucho mayor que el ADP al ATR. Este efecto será estudiado por el grupo de trabajo del Instituto de

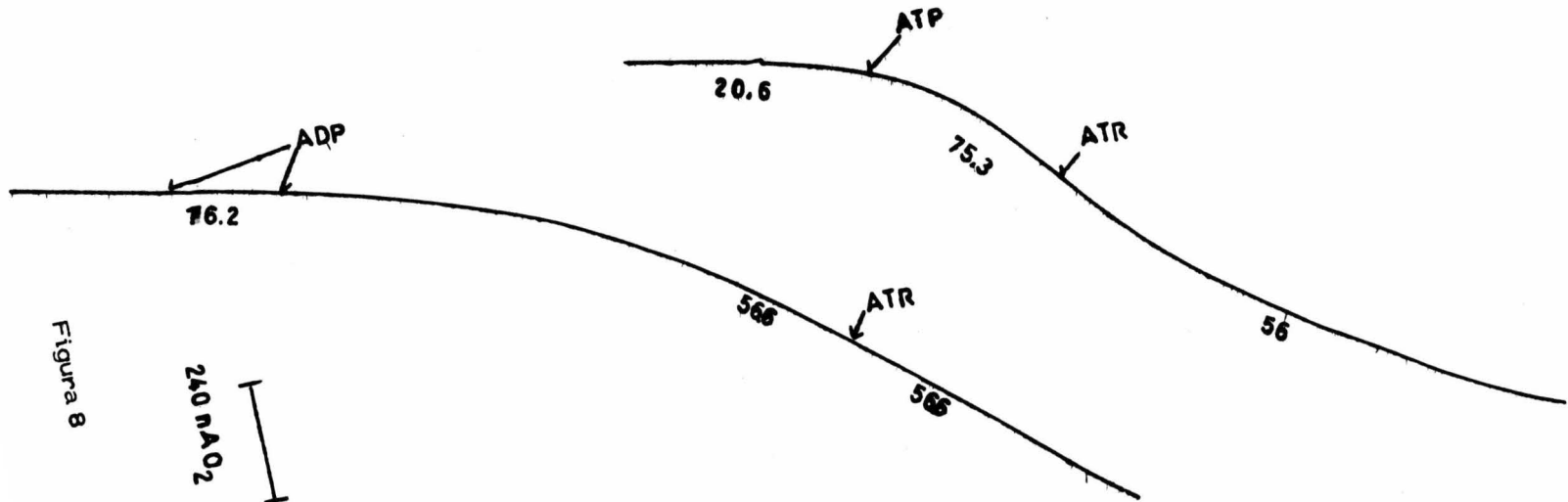


Figura 8

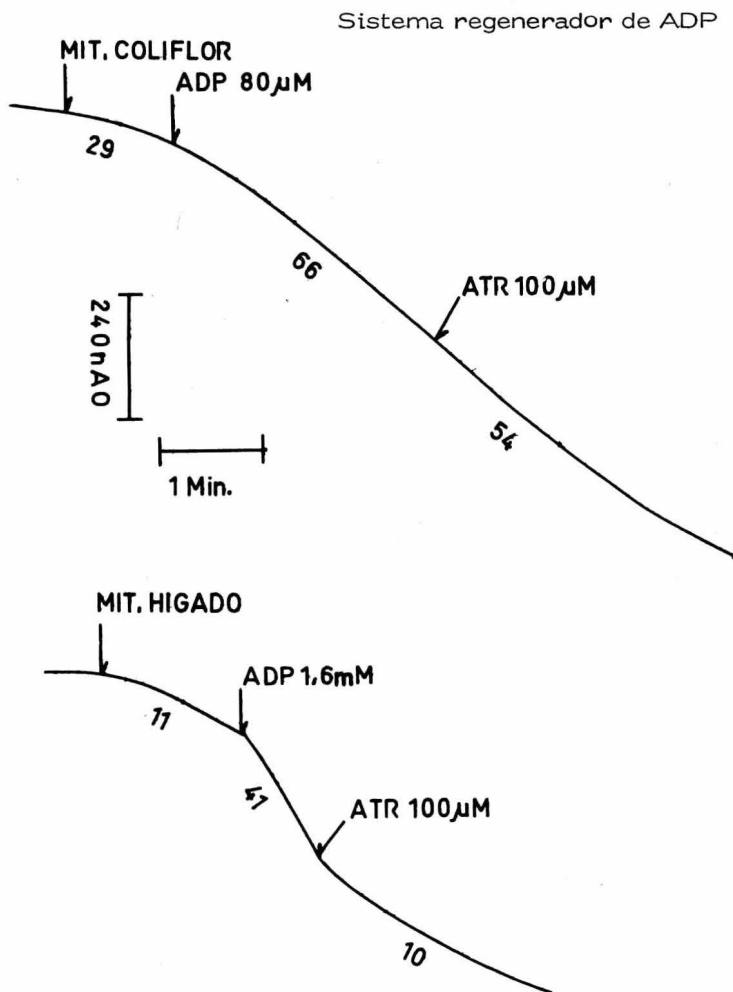


Figura 8



Biología (sobre la deshidrogenasa succínica) posteriormente.

Dados estos resultados, que son contradictorios con los resultados experimentales en mamíferos, pero que tienen un apoyo bibliográfico en los reportes de Passam y Hanson (19, 20, 21) en mitocondrias de plantas, quisimos profundizar en el efecto de este compuesto en cuestión y probamos la sensibilidad de la ATPasa (tabla 2) al ATR. Como se aprecia en esta tabla, la sensibilidad del transporte de ATP al ATR, es incuestionable, y la inhibición de la ATPasa de dinitrofenol (DNP) por el ATR, nos habla de una posible interacción del glucósido con el sistema de transporte del ATP.

Estos datos contradictorios de, en primer lugar, una falta de sensibilidad en la respiración estimulada por ADP al ATR, y una franca inhibición en el caso de la ATPasa o transporte de ATP, nos llevaron a hacer estudios más profundos del fenómeno del transporte de estos meta**bolitos**, en base a las propiedades del acarreador, con relación al efecto del supuesto inhibidor específico de ellos, el ATR. Me he referido al fenómeno como contradictorio, pues el acarreador ha sido reportado por Klingenberg (25) como el mismo para ambas sustancias.

Para empezar con esta segunda parte de nuestro trabajo, hicimos un estudio comparativo de la fijación de  $^{14}\text{C}$  ADP a las membranas de hígado y de coliflor. Para esto utilizamos el método de Winkler y co-

TABLA II

---

<u>Adiciones</u>	<u>μmolas de Pi Liberado /mg Proteína</u>
Mg <sup>2+</sup> 2 mM	0.38
Mg <sup>2+</sup> 2 mM + ATR 200 μM	0.27
DNP	1.33
DNP + ATR 200 μM	0.38

---

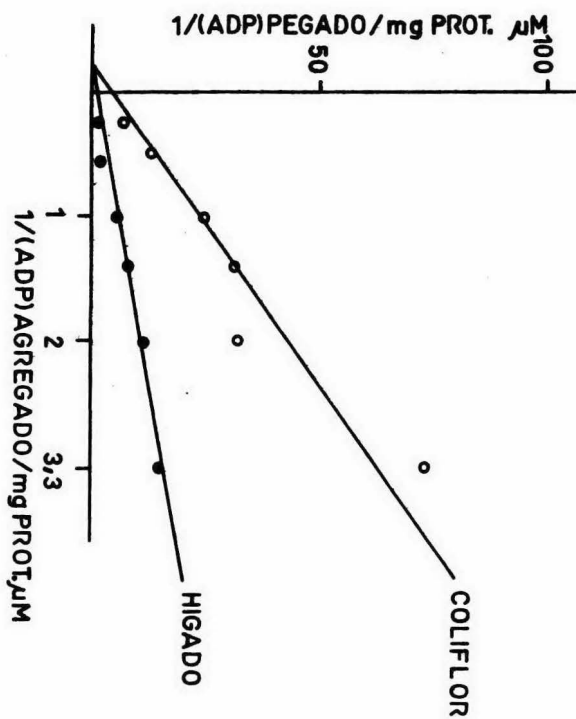


Figura 9

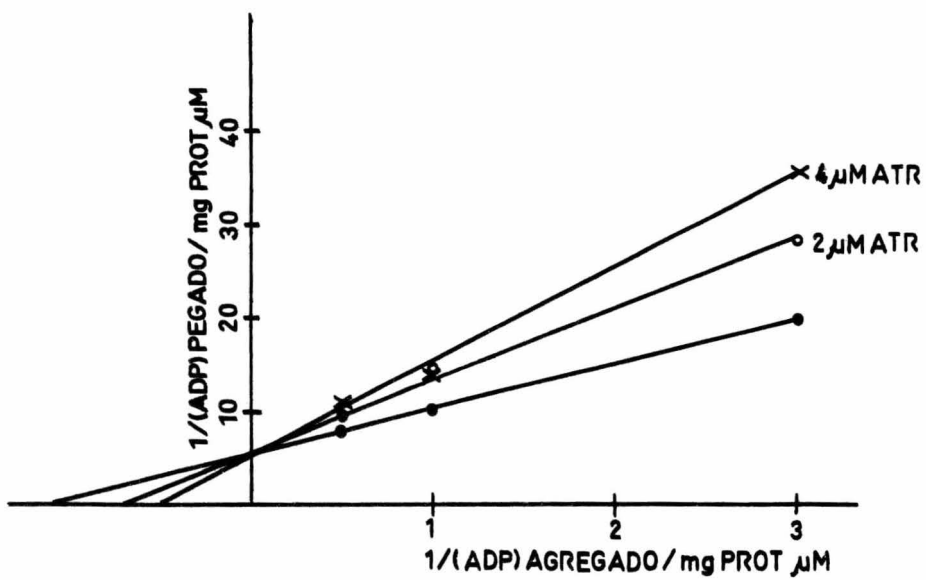


Figura 10

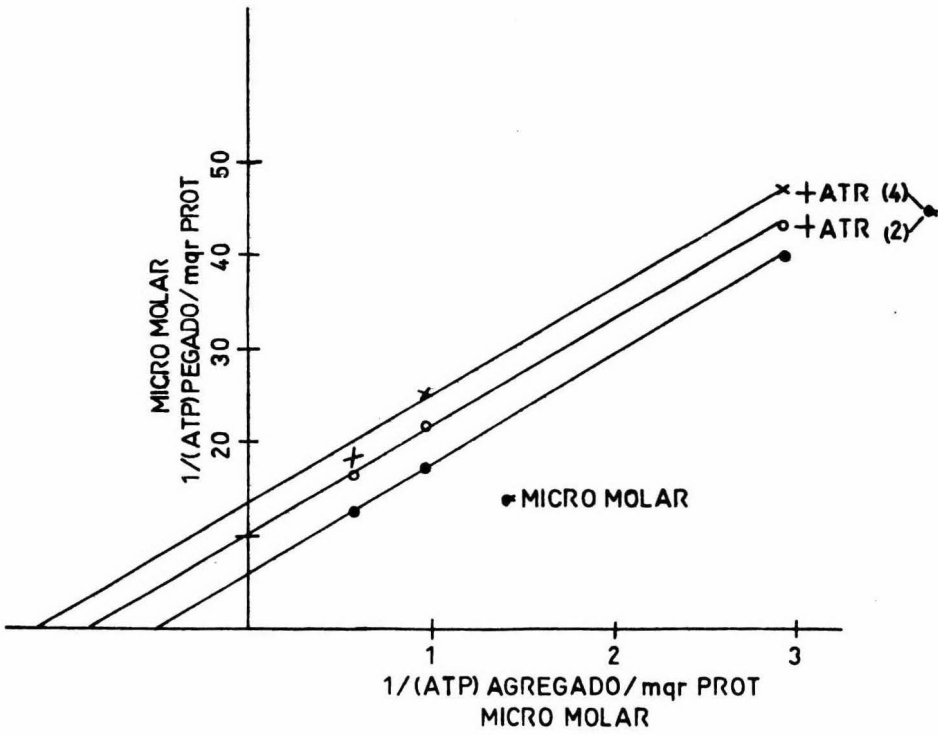


Figura 11

laboradores descrito en M. M.

Como resultado de este primer estudio comparativo, nos encontramos con que hay mucha menos fijación de ADP a la membrana de mitocondrias de coliflor que a la de hígado (10 veces menos), no obstante la  $K_m$  para ambos es la misma ( $5 \mu M$ , fig. 9), lo que posiblemente hable de un menor número de sitios de fijación de ADP a las mitocondrias de coliflor que a las de hígado. Este dato experimental nos motivó a explorar la acción del ATR en la fijación de ADP y ATP a nuestras mitocondrias, encontrándonos con que tanto la fijación de ADP (fig. 10), como la de ATP (fig. 11) son sensibles a este compuesto. Como se ve, no obstante, los dos tienen sensibilidad al ATR, las cinéticas de reacción entre el ATR, con ADP y ATP son distintas, siendo respectivamente competitiva la de la primera e incompetitiva la segunda, lo que habla, cuando menos, de dos sitios de fijación diferentes para ambos nucleótidos.

Aunque los resultados en sensibilidad al ATR de la fijación sí nos hablan de una diferencia entre las cinéticas del ATP y ADP, no explican la falta de sensibilidad del segundo al ATR en la respiración. Por tanto, investigamos los efectos del ATR en la fijación de ADP y ATP, a las concentraciones que se usaron en la respiración (la concentración del ATR es en todos estos experimentos de  $200 \mu M$ ). En esta parte experimental (fig. 12 y 13) encontramos, como se puede ver en la fi-

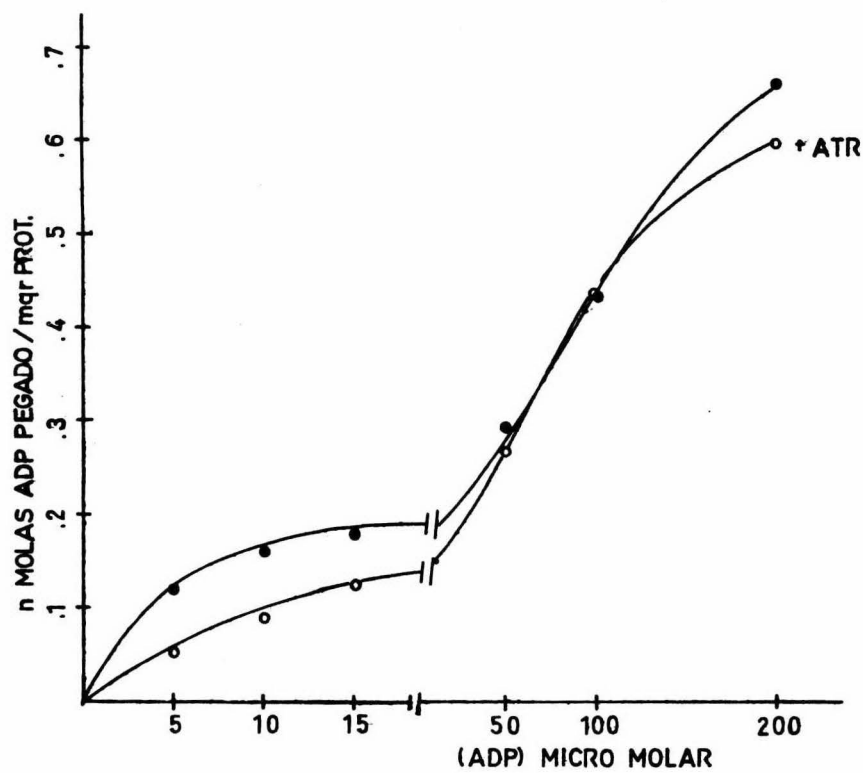


Figura 12

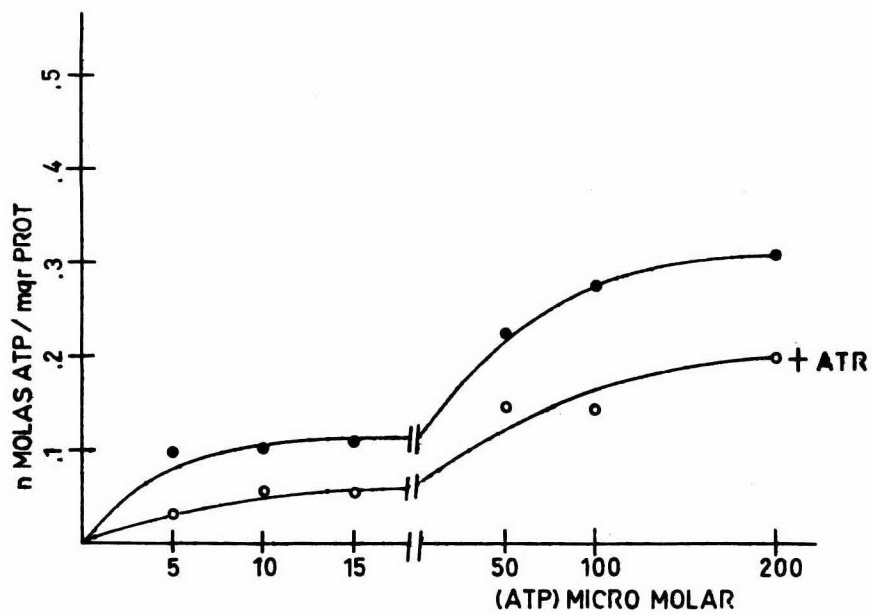


Figura 13



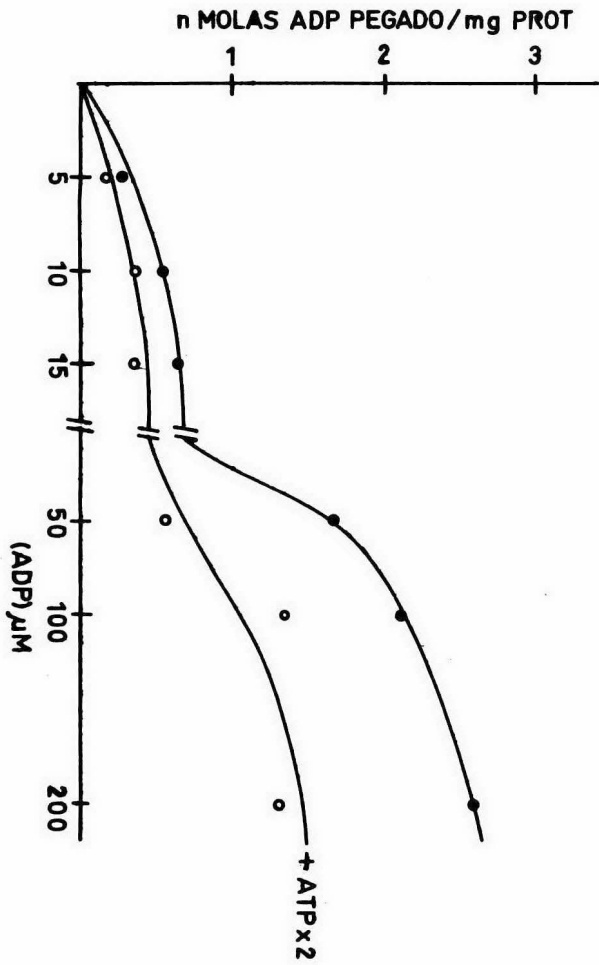


Figura 14

gura 12, un sitio de fijación no específico para el ADP, el cual es insensible al ATR, en tanto que el ATP conserva a estas concentraciones su sensibilidad (fig. 13). Es de hacer notar además, que se fija aproximadamente el doble de ADP que de ATP a la membrana. Todos estos datos coinciden con los de respiración y ATPasa, si suponemos que el sitio no específico de ADP transporta al mismo. Este sitio ha sido reportado por Pfaff y Klingenberg (27), aunque estos autores no proponen que se transporte adenin-nucleótidos a través del mismo. Encontramos también en un experimento posterior, que el ATP inhibe la fijación de ADP en ambos sitios de este segundo, efecto que habla de una interacción del ATP con los dos sitios (fig. 14).

Para explicar estos fenómenos hemos propuesto un modelo de transporte a través de nuestras mitocondrias de coliflor (fig. 15), en el que hay un sitio del acarreador (parte A) de fijación de ADP y ATP, que transporta estos compuestos, y un sitio no especificado para el ADP, que también lo hace. La parte B nos muestra la interacción del ATR con los sitios de ATP y ADP, observándose en esta ilustración que el ATR interactúa con los sitios específicos de los dos adenin-nucleótidos, mientras que no lo hace por el sitio no especificado para el ADP, lugar por donde se transporta a este último. Por último, en la parte C, se muestran las interacciones del ATP con los sitios específicos y no especificados del ADP. Esta interacción es de tipo alostérica en el sitio no especificado.

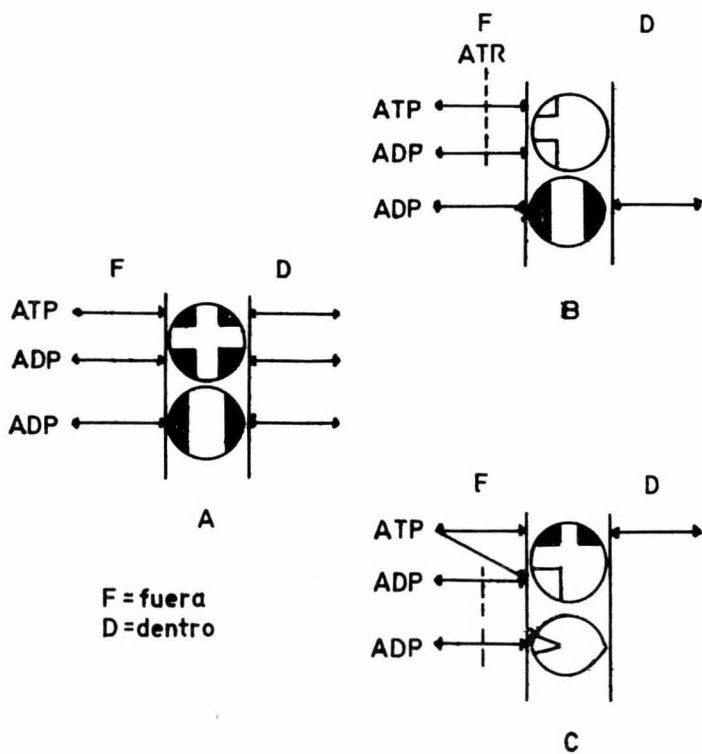


Figura 15

Un dato que apoya esta conclusión es el hecho de que la inhibición producida por el ATP se revierte en el sitio no especificado al agregar ATR (fig. 16). Este mismo efecto lo podemos ver con mucha claridad en la tabla 3, observándose que al agregar el ATR y por ende, al competir con el ATP por los sitios específicos del acarreador, la inhibición antes producida por este compuesto, desaparece completamente. Podemos concluir, dados todos estos datos experimentales, que el sitio no específico de pegada de ADP posiblemente transporte a este metabolito en nuestras mitocondrias de coliflor, lo que hace a la respiración estimulada por ADP insensible al ATR. También podemos pensar que este sitio tiene alguna relación con el acarreo de ADP y ATP, esto es, por medio del acarreador, ya que existe una interacción alostérica entre el ATP y el sitio antes mencionado.

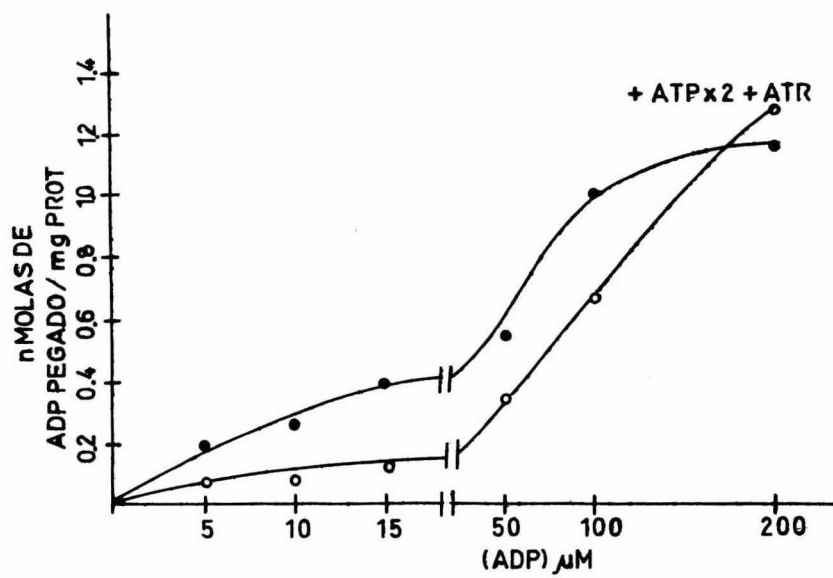


Figura 16

TABLA III

---

% de Inhibición de la Pegada de ADP- (<sup>14</sup>C)

<u>ADP (<sup>14</sup>C)Añadido <math>\mu</math>M</u>	<u>+ATP</u>	<u>+ATP + ATR</u>
50	65	22
100	38	16
200	50	-

---

## DISCUSION

Como ya he dicho en esta tesis, el acarreador del ADP fue uno de los primeros acarreadores estudiados y es probablemente de los más conocidos, existiendo un buen número de reportes bibliográficos que se refieren a él (12 - 18, 23, 27 y 28). No obstante esto, no se ha llegado a una solución final que explique su comportamiento. Esto se debe quizás, a que no se ha podido aislar la proteína acarreadora. Es difícil pensar, recordando una de las primeras premisas de la introducción, que se puedan generalizar las propiedades del acarreador para cualquier mitocondria, independientemente de su origen, ya que no podemos menospreciar las leyes de la evolución y hay que tener en cuenta que las plantas nos llevan mucha ventaja en tiempo a los mamíferos.

Además, recientemente, Shrago y colaboradores (29) han demostrado que el ATR no solamente tiene influencia en el acarreador de ADP, sino que también interactúa con el de los ácidos tricarboxílicos, lo que habla en contra de la tan nombrada especificidad del ATR por el acarreador de los adenin-nucleótidos.

Nuestro trabajo muestra primeramente, que hay marcadas diferencias entre los sistemas de acarreo de algunas plantas y los de anima-

les mamíferos, lo que creo puede ser importante en el descubrimiento de la evolución de los sistemas de transporte, y llevarnos al mejor entendimiento del fenómeno.

Además, pienso que el sistema de acarreo de estos compuestos es más complicado que una sola molécula acarreadora, pensamiento que se encuentra en cierta manera implícito en los últimos reportes de Vignais (18), quién encuentra en sus cromatografías por afinidad, no sólo una molécula, sino un grupo de ellas.

Considero que en este trabajo queda patente la grandiosidad y complejidad de los fenómenos naturales y sólo me resta decir que todavía queda un largo trecho por recorrer, en el terreno del estudio de las bases moleculares de la vida.

SI DIOS FUERA TAN SENCILLO COMO LO IMAGINAMOS,  
LAS COSAS NO SERIAN TAN COMPLICADAS.



## BIBLIOGRAFIA

1. R.A. Capaldi and D.E. Green, *FEBS letters*, 25, 205 (1972)
2. J. F. Danielli and H. J. Davson, *Cell. Comp. Physiol.*, 5, 495 (1935)
3. J.D. Robertson, *Progr. Biophys. Biochem. Chem.* 10, 344 (1960)
4. S. J. Singer, In *Structure and Fonction of Biological Membranes*, L.I. Rothfield Ed. (Academic Press, New York, 1971).
5. S. J. Singer & Garth L. Nicolson, *Science* (1972), p. 175: 720 .
6. A. L. Lehninger, *Biochemistry*, Worth Publishers Inc., N.Y. (1970)
7. M. Klingenberg, *Essays of Biochemistry*, Vol. 6 (1970) p. 119-159.
8. M. Klingenberg, *FEBS Lett.* 6, (1970), p. 145 - 154.
9. C. Fred Fox & Alec Kleith, Eds. *Membrane Molecular Biology*, Sinaver Associates, Inc., Stanford, U.S.A. (1972)
10. P. Mitchell & J. P. Moyle, *Eur. J. Biochem.*, 7, 471 (1969)
11. M. Lefranc, *C.R. Acad. Sc. Paris* 67 (1968), p. 954 - 956
12. A. Bruni y A. R. Contessa, *Biochem. and Biophys. Acta*, 60 (1962), p. 301 - 316.
13. P. V. Vignais & P.M. Vignais, *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 14 (1964), p. 559 - 564.
14. A. Bruni, S. Luciani & A.R. Contessa, *Nature* 201 (1964) p. 1219 - 1220.
15. A. Bruni, S. Luciani & C. Bortigno, *Biochem. and Biophys. Acta* 97 (1965), p. 434 - 441.

16. M. Klingenberg & E. Pfaff, Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria (J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello & Slater), vol. 7, BBA Laboratory Publishing Co., Amsterdam (1966), p. 180 - 201.
17. P. V. Vignais, M.P. Vignais, G. Lauguin & F. Morel, *Biochem.* 55 (1973), p. 763 - 778.
18. P. V. Vignais, G. Brandolin, G. Lauguin, F. Morel, *Biomembranes, Lipids, Proteins and Receptors*, R. M. Burton & Packer, en prensa. (1974).
19. D. W. Jung & J. B. Hanson, *Biochemica et Biophysica Acta*, 325 (1973), p. 189 - 192.
20. H. C. Passam, J. H. Souverjn & A. Kemp Jr., *Biochim. Biophys. Acta* 305 (1973), p. 88 - 89.
21. D. W. Jung, J. B. Hanson, *Arch. Biochem., Biophys.* 158 (1973), p. 139.
22. J. B. Sumner, *Science* 100, 413 (1944).
23. H. H. Winkler, F. L. Bygrave and Albert L. Lehninger, *The Journal of Biol. Chem.*, 243 (1968), p. 20 - 28.
24. D. B. Murphy & M.W. Kies, *B.B.A.* 45 (1962), p. 382.
25. M. Klingenberg, *Essays in Biochemistry*, 119 (1970)
26. M. Tuena, A. Gómez-Puyou, A. Peña, E. Chávez and F. Sandoval, *European J. Biochem.* 11 (1969), p. 283.
27. M. Klingenberg, G. Falkner, H. K. Grebe, *FEBBS Letters* 16, 4 (1971), p. 296 - 300.
28. E. Pfaff & M. Klingenberg, *European J. Biochem.* 6 (1968), p. 66 - 79.
29. E. Shrago, A. Shug, C. Elson, T. Spennetta and C. Crosby, *The Journal of Biol. Chem.*, 249, 16 (1974), p. 5269 - 5274.