

69

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA



TRANSPORTE DE CATIONES DIVALENTES EN  
LEVADURA SACCHAROMYCES CEREVISIAE

T E S I S

Que Para Obtener el Título de

Q U I M I C O

P r e s e n t a

MIGUEL BORBOLLA GONZALEZ

México, D. F.

1978



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 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.

TESIS 1978

N. ~~60~~ 64

FECHA \_\_\_\_\_

PROG. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



JURADO ASIGNADO ORIGINAL-  
MENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE: GUADALUPE VELEZ P.  
VOCAL: GUILLERMO RENDON P.  
SECRETARIO: ANTONIO PEÑA D.  
1er. SUPLENTE: ALBA E. JOFRE G.  
2do. SUPLENTE: ESTELA CHAVEZ S.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

INSTITUTO DE BIOLOGIA

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL SUSTENTANTE:

MIGUEL BORBOLLA GONZALEZ

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL ASESOR DEL TEMA:

ANTONIO PEÑA DIAZ

Para mis padres

Para mis hermanos y familiares

Para mis amigos

Para Rocío con agradecimiento

## I N D I C E

	Pág.
Introducción	1
Materiales y Métodos	11
Resultados	13
Discusión	20
Referencias	38

## INTRODUCCION

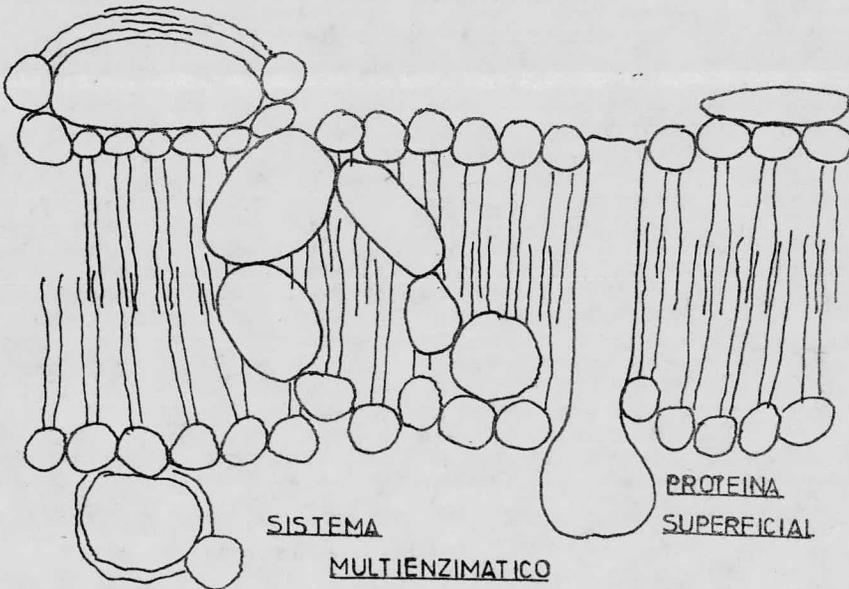
Uno de los fenómenos biológicos que más han acaparado la atención de los bioquímicos últimamente, es el paso de diversas sustancias a través de la membrana plasmática y en general de todo tipo de membranas.

En promedio, las membranas biológicas están -- constituidas por un 40% de lípidos y un 60% de proteínas conteniendo además, en algunos casos, azúcares, ya sea -- como glicoproteínas o glicolípidos (generalmente fosfo-- glicolípidos).

De acuerdo con la composición anterior, las -- membranas biológicas tienen un elevado carácter hidrófo-- bo y presentan una alta resistencia eléctrica, teniendo -- en promedio un espesor de  $90 \overset{\circ}{\text{A}}$ . Estas características -- han contribuido enormemente para la postulación, en to-- dos los modelos existentes de la estructura membranal, -- de una bicapa lipídica formada esencialmente por fosfolí-- pidos, y la distribución proteica en estos modelos es la principal diferencia entre ellos. En el modelo de "Mem-- brana Unitaria" las proteínas se encuentran distribuidas en ambas superficies de la bicapa de lípidos en estructu-- ra plegada (estructura  $\beta$  ), a diferencia del modelo pro-- puesto por Singer y Nicolson, el cual representa esen-- cialmente una solución de proteínas globulares en una ma-- triz de lípidos.

Estos dos modelos son los más importantes; existen sin embargo infinidad de ellos. Por ejemplo, Racker (36) propone un modelo en el cual trata de explicar el hecho de que en la membrana mitocondrial, una gran porción de los fosfolípidos puede ser digerida por fosfolipasas - sin perder la capacidad de fosforilación, siendo que son esenciales para dicha función. Este modelo incluye componentes periféricos o extrínsecos, los cuales pueden ser removidos sin afectar la estructura membranaral, y componentes intrínsecos o integrales los cuales no pueden ser removidos sin romper la membrana:

FOSFOLIPIDOS Y  
PROTEINAS SUPERFICIALES



Para todos estos modelos, sin embargo, se postula como regla general que los componentes hidrófobos se localizan en la parte central de las membranas y los componentes hidrofílicos en la periferia o superficie.

Los componentes proteicos de la membrana, son funcionales o estructurales. Las proteínas estructurales, como su nombre lo indica, están manteniendo la estructura-membranal. Las proteínas funcionales pueden ser acarreadores, enzimas, sistemas contráctiles, etc.

Ahora bien, la existencia de mutantes indica que uno o más componentes de los sistemas de transporte son de naturaleza proteica (25). La existencia de acarreadores proteicos también puede deducirse de estudios cinéticos del transporte de diferentes sustancias, los cuales presentan curvas de saturación exactamente iguales a las presentadas por componentes enzimáticos no membranales de origen proteico, inclusive se habla de  $V_{max}$  de transporte y de  $K_m$  para un determinado sustrato. Este origen proteico permite también una gran especificidad hacia el sustrato correspondiente y a la vez, como en los mecanismos enzimáticos, un transporte constituido por varios pasos bien definidos.

En cuanto a función se refiere, las membranas biológicas tienen tres funciones esenciales:

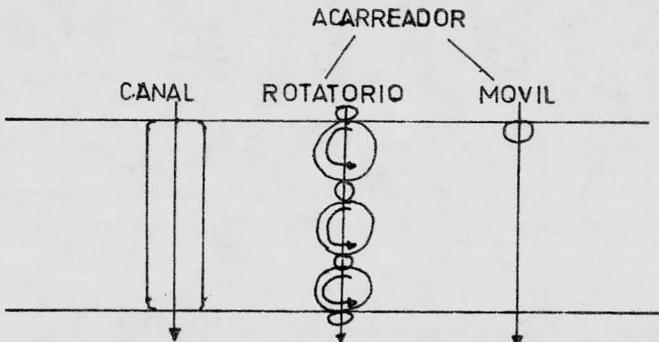
a) La función primera es, sin lugar a dudas, la formación de un compartimento, ya sea éste la célula entera o bien organelos dentro de ella. Esta separación no es sólo con el objeto de proteger a la célula del me-

dio externo sino también como medio de retención de ---  
iones, co-enzimas, enzimas, y otras sustancias necesa---  
rias para la vida.

b) La segunda función de la membrana puede --  
considerarse como la de comunicación con el medio exter-  
no, representada por el transporte de sustancias por me-  
dio de canales o transportadores con una especificidad -  
casi absoluta para con cada sustancia transportada por,-  
o a través de ellos.

c) La tercera función de las membranas impli-  
ca un nivel multimolecular e incluye los procesos de fa-  
gocitosis y pinocitosis, además de las estructuras acce-  
sorias necesarias para la movilidad celular, fosforila-  
ción oxidativa, fotosíntesis, etc.

Para nuestros fines la función más importante-  
de la membrana, es la segunda, o sea la de transporte. -  
Esta función se efectúa por medio de canales o transpor-  
tadores "rotacionales" o bien transportadores "móviles":



A diferencia del canal (o "poro") el transporte por medio de transportadores es lento y depende en gran medida de la fluidez de la membrana.

El canal puede seguir operando aún cuando la temperatura disminuya por abajo de la temperatura de transición de los fosfolípidos membranales.

En cualquiera de los sistemas anteriores el transporte está constituido por varios pasos bien definidos. El primero de estos pasos es la unión del sustrato con el acarreador correspondiente. El segundo paso es el proceso de "translocación" de ese sustrato a través de la membrana, lo cual se propone sea efectuado por medio de un cambio rotacional o estructural del transportador implicado. De hecho se han podido detectar, por medio de estudios de Rayos X cambios conformacionales de estos transportadores causados por la unión del sustrato. El tercer paso puede considerarse aquél en el cual el sustrato se disocia del transportador en el lado interno (o externo) de la membrana. Debe tomarse en cuenta un elemento adicional en el mecanismo de transporte (29), representado por el mecanismo de utilización o acoplamiento de la energía a dicho transporte para el cual existen varios mecanismos.

Para el estudio de los fenómenos de transporte se ha utilizado gran variedad de sistemas, con diferentes características. Las células de los organismos superiores tienen un medio constante y por lo tanto sus fun-

ciones están perfectamente definidas y especializadas, - encontrándose por ejemplo, células secretoras, musculares, nerviosas, etc., que tienen una función específica. En un microorganismo se encuentran manifiestas todas las funciones celulares, y ello nos permite el estudio de -- numerosos fenómenos de interés; sin embargo, como existe una gran variedad de microorganismos, muchos tienen requerimientos totalmente diferentes para un determinado sustrato; ello ha originado cierta confusión en cuanto al estudio de transporte, pero por otra parte, si se tipifican claramente, los microorganismos ofrecen una gran variedad de sistemas, que permiten estudiar diversos tipos y mecanismos para un solo fenómeno.

Para el presente trabajo se utilizó levadura del género Saccharomyces especie cerevisiae conocida comúnmente como levadura de panadería o de cerveza; su preparación se describe en la sección de Métodos.

El transporte de cationes divalentes así como el de los monovalentes han recibido últimamente mucha importancia en cuanto a su estudio. Una pregunta importante con relación al transporte de cationes divalentes en levadura es si todos ellos se transportan utilizando el mismo sistema, o si tienen transportadores específicos diferentes. A primera vista resulta difícil imaginar -- para un organismo tan simple como la levadura la existencia de varios sistemas transportadores, uno para cada cación divalente. En los sistemas de organismos superio--

res, principalmente en hepatocitos de rata y retículo -- sarcoplásmico se ha efectuado gran número de estudios -- del transporte de estos cationes divalentes (13 - 15, - 21, 27) encontrándose por ejemplo que en mitocondria de hepatocito de rata  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Sr}^{+2}$  y  $\text{Mn}^{+2}$  producen una activación reversible de la respiración. El calcio por ejemplo produce hinchamiento de la mitocondria y daña seriamente la estructura mitocondrial. Tanto la aceleración de la respiración como el hinchamiento, parecen estar -- relacionados con la captación del  $\text{Ca}^{+2}$  por la mitocondria. Todos estos fenómenos y muchos más han sido estudiados en células superiores; sin embargo, es importante estudiarlos en organismos más sencillos, como la levadura, en donde muchos efectos colaterales derivados simplemente del aislamiento se minimizan y además, es mucho -- más sencilla y rápida su obtención. Por otro lado, los mecanismos de transporte en sí, pueden tener importancia no sólo desde el punto de vista académico, sino hasta -- por la utilidad que algunos microorganismos, incluyendo a la levadura, tienen para el hombre.

Sin embargo el transporte de calcio (y de manganeso) es bastante lento en el caso de la levadura, por lo que se emplearon diversos colorantes catiónicos que -- de antemano se sabía (6) aceleraban enormemente la captación de calcio por la levadura (Tabla 1).

TABLA 1

Efecto de diversos colorantes catiónicos a dos concentraciones diferentes en la captación de  $^{45}\text{Ca}^{+2}$  en levadura.

	nmoles captados en 2 minutos/100 mg	
	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
Controles	4.40 3.96	
Azul de Metileno	5.95	22.3
Azul de Nilo	40.99	40.0
Azul Brillante de Cresilo	7.54	19.6
Violeta de Metilo	8.46	14.6
Acriflavina	29.2	52.6
Bromuro de Etid--dio	33.0	47.5
Rojo Neutro	30.5	43.5
Verde Brillante	11.1	12.1
Verde de Metilo	5.71	4.1
Safranina	26.6	47.5

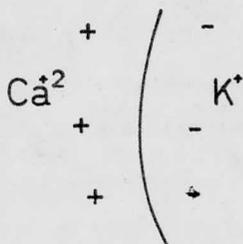
Mezcla de Incubación: Buffer maleato-TEA, - 20 mM, pH6; glucosa 100 mM; levaduras 100mg en peso seco. Volumen final 2 ml; temperatura 30°C.  $^{45}\text{Ca Cl}_2$  50  $\mu\text{M}$ .

Como se puede ver en la Tabla 1 hay un marcado incremento en la captación de calcio en presencia de algunos colorantes y en especial con acriflavina, azul de metileno, bromuro de etidio, safranina y rojo neutro.

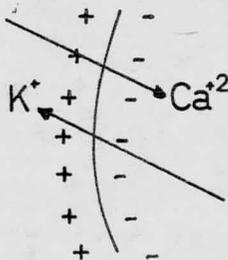
De todos estos se prefirió trabajar con el Bromuro de Etidio por ser el más estudiado de ellos (6, 7, -8) en cuanto a transporte se refiere; además sus efectos biológicos y estructurales en diferentes células también están bien estudiados (9-12).

El efecto del Bromuro de Etidio parece ser causado por una interacción del colorante con el sistema de transporte del  $K^+$ , lo que provoca una salida importante de este catión, salida que está perfectamente cuantificada (8). Una posibilidad interesante es que, de esta salida se generara un potencial negativo dentro de la levadura, que originara una entrada importante y rápida de calcio:

SIN ETIDIO



CON ETIDIO



Efectos similares han sido reportados en la literatura (28) para otros compuestos.

Este efecto acelerador se utilizó en este trabajo como una ayuda en el estudio del transporte de cationes divalentes a través de la membrana plasmática en levadura; permite aumentar el transporte del  $\text{Ca}^{+2}$ , y decidimos utilizarlo como arma para facilitar el estudio del fenómeno.

## MATERIALES Y METODOS

Levadura y Medio. La levadura utilizada se obtuvo comercialmente (*Saccharomyces Cerevisiae* marca La Azteca, S.A.). Antes de usarse, 30 gramos de levadura se suspendían en 1 litro de medio de De Kloet, al cual se le agregaban aproximadamente 3ml de un agente antiespumante (Dow Corning FG10). El matraz se mantuvo a temperatura constante (30°C) y aereó por medio de una pieza de vidrio poroso durante 8 hrs. Posteriormente la levadura se centrifugaba, lavaba una vez con agua y se resuspendía en 400ml de agua destilada. La suspensión se colocaba en una probeta y se aireaba durante 15 hrs. Las células entonces se centrifugaban, lavaban dos veces con agua, se pesaban y resuspendían para tener una concentración final de 500mg. de levadura por mililitro de suspensión.

Transporte de Calcio. El transporte de calcio se midió por medio de la incorporación de  $^{45}\text{Ca}^{+2}$ . La Levadura se adiciona a la mezcla de incubación previamente equilibrada a la temperatura de un baño de agua. Después de dos o tres minutos, según el experimento, en que el metabolismo de las células se ha iniciado, se agrega el isótopo a la concentración deseada. Después de exactamente dos o tres minutos más de incubación se toma una alícuota de la suspensión y se filtra a través de un filtro de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Las células se lavaban una vez con agua, dos más con  $\text{Ca Cl}_2$  10 mM y nuevamente con agua. Después de esto, las células se resuspendían en agua, se tomaba una alícuota en -

- planchetas y, después de secar con calor, se contaban en un contador de flujo de gas. El transporte de  $^{54}\text{Mn}^{+2}$  se determinó exactamente igual, pero los lavados posteriores se efectuaron con  $\text{Mn Cl}_2$  10 mM y una lavada extra con -- buffer tartrato-TEA 5mM pH4.5; después de la resuspensión de las muestras, el  $^{54}\text{Mn}^{+2}$  tomado por las células se determinó midiendo la radiactividad de un contador de centelleo.

Los movimientos de calcio se determinaron también en un espectrofotómetro Aminco-Chance modelo DW-2, - utilizando celdillas de cuarzo de 3ml de capacidad y Murexida 50  $\mu\text{M}$  como indicador y midiendo la diferencia en absorbencias a 507-540 nm.

Concentración de Potasio. La concentración de potasio fué determinada con un electrodo catiónico (Beckman 39047) y - un sistema graficador adecuado.

Los reactivos utilizados fueron todos de grado - analítico.

---

## RESULTADOS

Como se mencionó anteriormente el Bromuro de Etidio (EB)\* - ha sido utilizado para el estudio del transporte de cationes en levadura (6-8). En la Figura 1 se muestra el efecto de diferentes concentraciones de EB en la captación de calcio por la levadura. Como puede verse en la gráfica, el efecto acelerador del EB se manifiesta totalmente a una concentración de  $100 \mu\text{M}$ , en presencia de glucosa. En ausencia de esta última, se observa también una ligera estimulación de la captación de calcio debida al EB, o sea, que éste en ausencia de sustrato es capaz de acelerar la entrada de calcio a la levadura.

Ahora bien, el efecto primario del EB parece ser una interacción con el sistema de transporte de potasio (6) que además requiere de energía. Esta última puede ser proporcionada, por ejemplo, por Et OH+O<sub>2</sub> o Glucosa. En la Figura 2 se muestran las curvas obtenidas para la salida de potasio en levadura inducida por EB y aplicando FCCP ( $6 \mu\text{M}$ ) a diferentes tiempos. Utilizando Etanol como sustrato, cuya función como fuente de energía depende de la fosforilación oxidativa de las mitocondrias, al aplicar el FCCP a -- tiempo cero o un minuto se observa una inhibición del efecto del EB, y no así añadiendo el inhibidor a tiempos posteriores en que la inhibición es menor o nula. Esto se expli

\* Abreviaturas usadas: EB Bromuro de Etidio, FCCP, fenilhidrazona del p-trifluoro metoxi carbonil cianuro.

-caría por nulificación o bloqueo de las fuentes de energía y las propiedades desacoplantes sobre las mitocondrias que posee el FCCP.

En gran cantidad de tiempos celulares el transporte de calcio es mucho más elevado que el correspondiente de manganeso (5,15); sin embargo, en la levadura el fenómeno se invierte; inclusive las mitocondrias de levadura son incapaces de transportar y acumular calcio (15). En la Figura 3 se muestran las diferencias de entrada de calcio y manganeso, variando las concentraciones de ambos en el medio desde 50  $\mu\text{M}$  hasta 200  $\mu\text{M}$ . Como puede apreciarse en la gráfica, la entrada de manganeso es marcadamente mayor y más rápida que la entrada respectiva para el calcio; sin embargo, ambas presentan cinética de saturación, lo que está de acuerdo con la existencia de un transportador para estos iones. Para una concentración exterior del ion ( $\text{Ca}^{+2}$  o  $\text{Mn}^{+2}$ ) de 50  $\mu\text{M}$  la entrada de calcio es de 25.3 nmoles/100 mg. 3 min. Esto significa casi diez veces más entrada de manganeso que calcio. Para 200  $\mu\text{M}$  de concentración exterior de los iones la asimilación para el calcio es de 6.3 nmoles y para el manganeso es de 43 nmoles/100 mg. lev. 3 min.

En la Figura 4 se muestra la asimilación de calcio y manganeso en presencia de EB; como en el caso anterior, la entrada de calcio es menor que la de manganeso, lo que implica que, o bien existe un acarreador mucho más eficiente para este último, o que el mismo es capaz de funcionar con mayor eficacia con  $\text{Mn}^{+2}$  que con  $\text{Ca}^{+2}$ .

La mayor asimilación de manganeso se refleja también en las constantes cinéticas de entrada de los cationes. Las Figuras 5 y 6 muestran las curvas en dobles recíprocas para el calcio y manganeso respectivamente. De la Figura 5 se determina para el calcio una  $K_m$  de  $148.3 \mu M$  y una velocidad máxima de  $10.9 \text{ nmoles de } Ca^{+2}/100 \text{ mg. lev. } - 3 \text{ min.}$  en contraste con la Figura 6 en que, para el manganeso se tiene una  $K_m$  de  $51.3 \mu M$  y el valor de  $V_{max}$  es de  $50.2 \text{ nmoles } Mn^{+2}/100 \text{ mg. lev. } 3 \text{ min.}$

La entrada de estos iones en presencia de EB presenta también una cinética de saturación lo que indicaría que el mecanismo de entrada de estos iones no se modifica en presencia de EB. Sin embargo suponiendo que el sitio de entrada sea el mismo, hay cambios grandes en sus constantes cinéticas, para las cuales, los valores determinados, fueron los siguientes (Figuras 5 y 6). Para el calcio la  $K_m$  aumenta hasta  $365 \mu M$  lo mismo que la  $V_{max}$  ( $250 \text{ nmoles } Ca/100 \text{ mg. lev. } 3 \text{ min.}$ ), y para el manganeso la  $K_m$  es de  $283.5 \mu M$  y  $V_{max}$  es  $322.6 \text{ nmoles } Mn^{+2}/100 \text{ mg. lev. } 3 \text{ min.}$

En mitocondrias de hígado de rata, la acumulación de calcio es un fenómeno muy veloz (15), en comparación en levadura es bastante lento. En las Figuras 7 y 8 se muestran las curvas de entrada de calcio y manganeso, respectivamente, contra tiempo. Para obtener la entrada máxima del ion a tiempo infinito y el tiempo medio necesario para ello se graficaron las dobles inversas de entrada de calcio, y transporte (Figura 9 y 10). De la Figura 9,-

- para el calcio, puede determinarse una entrada máxima de 32 nmoles/100 mg. lev. sin EB y en presencia de éste - la entrada aumenta hasta 143 nmoles mientras que para el manganeso (Figura 10) la entrada es de 119 nmoles sin EB- y de 416 nmoles/100 mg. lev. en presencia de éste. En - ambas gráficas se muestran los tiempos medios de acumulación para las curvas con y sin EB. Considerando los tiem - pos medios anteriores (1.83 min. para el calcio y 2.9 - min. para el manganeso, ambos en presencia de EB), su sig - nificado sería el del tiempo necesario para la acumula - ción de la mitad del ion acumulado a tiempo infinito por - la levadura. Para el manganeso, por ejemplo, para 2.9 - minutos de acumulación teórica máxima sería de 208 nmoles /100 mg. levadura, mientras que para el calcio sería de - 71 nmoles y según las gráficas de las Figuras 7 y 8 las - entradas son de precisamente 203 nmoles para el manganeso y de 71 nmoles para el calcio, lo que confirma la justifi - cación del empleo de este tipo de gráficas.

Reynafarje y Lehninger (21) describen para la - mitocondria de hepatocito de rata varios sitios de fija - ción para el calcio en la membrana, entre los cuales men - cionan unos de baja afinidad, que son únicamente fosfolí - pidos de la membrana sin presentar ningún tipo de trans - porte al interior de la mitocondria. A pesar de que se - efectuaron pruebas de lavado para asegurar una total remo - ción del calcio y manganeso radioactivo fijados a la mem - brana era importante el cerciorarse si el transporte ob - servado no era una mera adsorción membranal. La Figura -

11 muestra una curva obtenida al medir la desaparición de calcio del medio, con murexida como indicador a 507-540 nm de longitud de onda. Puede verse que, en ausencia de glucosa, los trazos no se modifican. Esto indica por un lado, el que el transporte (desaparición del medio) de calcio es dependiente de energía, y en segundo lugar que el fenómeno observado no es una mera adsorción. En el momento de aplicar la glucosa al medio la variación de absorbencia en presencia de EB indica una desaparición de calcio del medio en tanto que sin EB no se observa efecto importante. La Figura 12 presenta las gráficas de un experimento similar utilizando etanol como sustrato.

En el siguiente experimento se determinó la inhibición del transporte de calcio causada por el manganeso. En la Figura 13 se muestran las gráficas de inhibición de la entrada de calcio por manganeso a dos concentraciones diferentes. En todos los experimentos efectuados se manifiesta una inhibición de la entrada de calcio por manganeso perfectamente visible, sin embargo, esta inhibición es variable; la gráfica presentada es de un solo experimento. A pesar de la variabilidad del efecto mencionado, éste es perfectamente detectable en todos los experimentos efectuados.

Dado que parece haber una relación entre la salida de  $K^+$  y la entrada de  $Ca^{+2}$ , se hizo un experimento en el cual se puede variar la relación que hay entre el  $Ca^{+2}$  interno y el externo. Utilizando FCCP y EB solos o combinados, se pueden lograr distintos valores para esa -

- relación "Figura 14). En la Tabla 2 se presentan los -  
datos de entrada de calcio en presencia y ausencia de EB-  
y FCCP en donde se observa que, como anteriormente el EB-  
estimula la entrada de calcio y que el FCCP inhibe este -  
efecto en concordancia con los resultados observados en -  
la salida de potasio. Un dato curioso es que el FCCP, so  
lo, en presencia de glucosa, estimula la entrada de cal--  
cio; sin embargo, existe concordancia entre los niveles -  
de  $K^+$  externo medido (Figura 14) y la cantidad de  $Ca^{+2}$  --  
que se captó.

---

TABLA 2

Efecto de EB (100  $\mu\text{M}$ ) y FCCP (60  $\mu\text{M}$ ) en la entrada de ---  
 $^{45}\text{Ca}^{+2}$  a la levadura.

nmoles captados/100 mg lev. · 2 min.

	sin sustrato	glucosa
Control	0.13	1.46
FCCP	0.19	2.83
EB	2.73	35.7
FCCP + EB	0.12	6.30

Mezcla de Incubación: Buffer Maleato-TEA 20mM, pH6; glu-  
 cosa 100mM; 100 mg de levadura, peso seco. Volumen final  
 2 ml y temperatura de 30°C.

La mezcla de incubación, sin la levadura se ---  
 equilibró previamente a la temperatura indicada y poste-  
 riormente se le agregaron los 100 mg de levadura. Des---  
 pués de dos minutos de agregada la levadura se adiciona -  
 el  $^{45}\text{Ca}^{+2}$  y la cantidad señalada de EB o FCCP. El tiempo  
 de incubación es nuevamente de dos minutos al término de-  
 los cuales se toma una alícuota de la mezcla, se filtra a  
 través de un filtro Millipore y se lava con agua primera-  
 mente, después dos lavados con calcio frío y por último -  
 otros dos lavados con agua. La levadura es entonces re-  
 suspendida y se lee en planchetas en un contador de flujo  
 de gas.

## DISCUSION

Se ha estudiado ya anteriormente, el efecto del EB en la entrada y salida de cationes en levadura (6-8, 23). Parece que la acción primaria del EB es una interacción, en alguna forma no definida aún con el transportador para el potasio, lo que origina una salida importante de este catión. En la levadura sin EB cuando cuenta con un sustrato, lo que se observa es una entrada de potasio y una salida de protones, por lo que una salida de potasio causada por el EB, implicaría la formación de un potencial electroquímico muy marcado a través de la membrana plasmática sin modificación de la salida concomitante de protones ( 6 ). Esta salida de  $K^+$ , electrogénica, sería la responsable de la entrada del calcio y manganeso a la levadura.

Ahora bien, si el sitio de acción del EB es el sitio de transporte del potasio, la entrada del calcio o manganeso se debe únicamente a un potencial eléctrico, y entonces, en la cinética del transporte de los cationes divalentes, el único factor que deberá aumentar sería la velocidad de entrada de los cationes divalentes. Se encuentra, sin embargo un aumento de  $K_m$ , lo que no concuerda con la existencia de un punto específico de transporte y sugiere un proceso de difusión, además del antes mencionado. La curva, sin embargo, de entrada de los cationes divalentes es, o concuerda con la existencia de un transporte activo sin difusión, pues se sigue observando un proceso saturable, y no sería este el caso de tratarse de



en efecto, como anteriormente se mencionó.

Las diferencias de entrada de calcio y manganeso son cinéticamente importantes; sin embargo, desde el punto de vista fisiológico estas cantidades son prácticamente del mismo orden de magnitud y las diferencias observadas parecen deberse únicamente a las afinidades relativas de estos cationes por el transportador. Inclusive -- desde un punto de vista fisiológico, es desconocida la importancia que estos cationes puedan tener para la levadura; el efecto observado debe ser tomado o considerado con precaución, sobre todo porque en gran cantidad de microorganismos (37, 38) lo que se ha encontrado es una bomba-expulsadora de calcio, para librarse del  $\text{Ca}^{+2}$  que puede penetrar del medio. Considerando lo anteriormente dicho y conscientes de que el problema en estudio pudiera ser un proceso artificial es posible que este sistema nos ayude a resolver preguntas con respecto al transporte de levadura, pensamos que ésta, siendo un microorganismo tan simple, es poco probable que tenga un sistema de transporte para cada catión divalente. Se han efectuado, de hecho, experimentos con una amplísima gama de cationes -- divalentes (1-4) y todos se comportan en forma semejante al calcio y manganeso; ésto nos hablaría de un solo sistema de transporte para cationes divalentes en levadura.

En este mismo sistema, debemos considerar la -- inhibición del transporte del calcio producida por el manganeso. Según modelo propuesto para el transporte de cationes, de un transportador único, debería esperarse una-

inhibición de tipo competitivo; todas las curvas debían tener una  $V_{max}$  similar (Figura 13). Lo encontrado sin embargo, fué una  $V_{max}$  variable y la constante de inhibición que teóricamente debería ser semejante a la  $K_m$  para el manganeso ( $51 \mu M$ ), también varía en un rango muy amplio. Hay que considerar, que el manganeso es un ión difícil de trabajar por la gran afinidad que tiene por muchas estructuras químicas e inclusive su comportamiento puede variar entre el del magnesio y el del calcio haciendo su manejo aún más difícil. Además, en todos los experimentos efectuados, la inhibición del transporte, aunque no constante es perfectamente clara; se piensa que la imposibilidad de sacar datos concordantes absolutos se debe a las dificultades antes señaladas, y probablemente no a otros factores.

Otro hecho que debe tomarse en cuenta (Figura 2 y Tabla 2) es que tanto la salida de potasio como la entrada de calcio, de manganeso dependen de energía y un acarreador, y no son una mera difusión, dato que se confirma con los estudios cinéticos de dichos procesos.

Ahora bien, podría pensarse en un intercambio de calcio o manganeso por potasio en presencia de EB, sin embargo (6), se ha demostrado que en presencia de calcio y EB la salida de potasio en lugar de estimularse se inhibe, lo que implicaría un transporte de potasio separado del transporte de cationes divalentes.

En resumen, el transporte de cationes divalentes en levadura es un sistema dependiente de energía, y -

saturable; se trata de un transportador específico y no -  
de simple difusión. Este sistema es independiente del --  
sistema de transporte de potasio y además parece ser un -  
sistema común para todos los cationes divalentes.

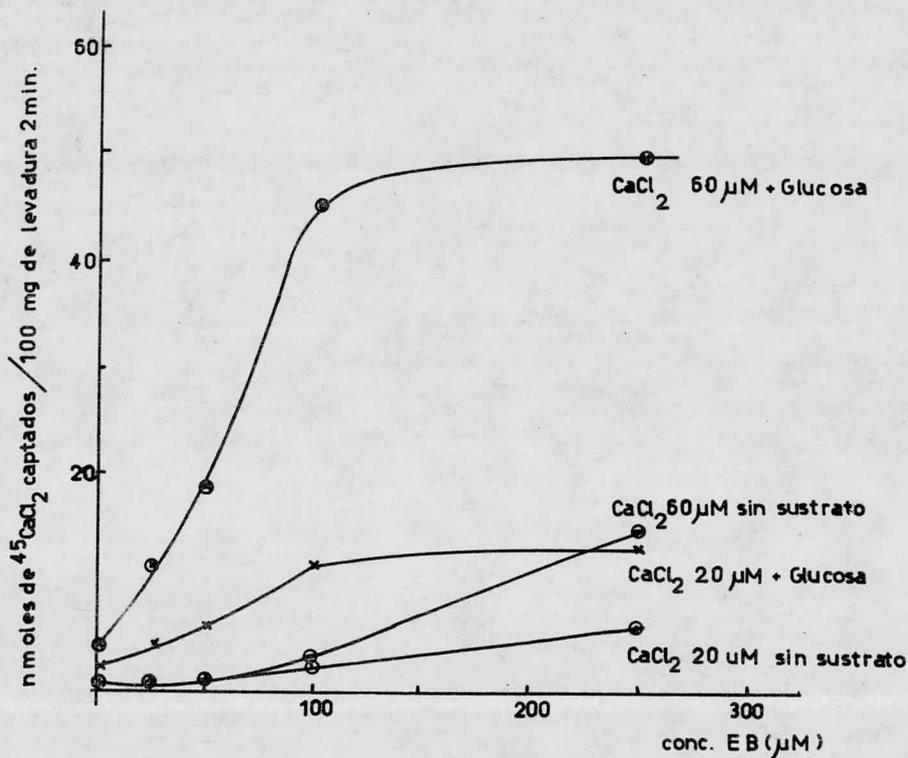


Fig. 1 Efecto del EB en la captación inicial (2 min.)- de  $\text{Ca}^{+2}$  por la levadura en presencia o ausencia- de sustrato.

Mezcla de Incubación: Buffer Maleato-TEA, ---- pH6.0; glucosa 100 mM, 100 mg. de levadura en - peso seco. Volumen final 2.0 ml 30°C.

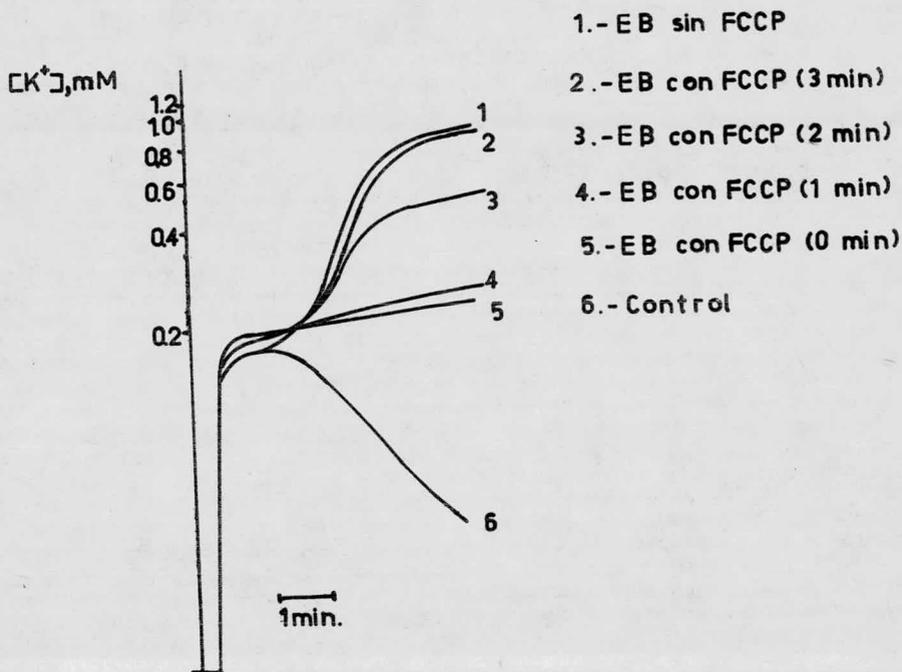


Fig. 2 Variación de potasio en el medio, aplicando FCCP a diferentes tiempos en presencia de EB.

Mezcla de Incubación: Buffer MES-TEA 20mM pH6.0; 40  $\mu$ L EtOH; 40  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 250 mg. de levadura en peso seco. Volumen final 5.0 ml 30°C; EB 480  $\mu$ M y FCCP 6 $\mu$ M aplicado a los tiempos indicados en el diagrama, Volumen final 5 ml.

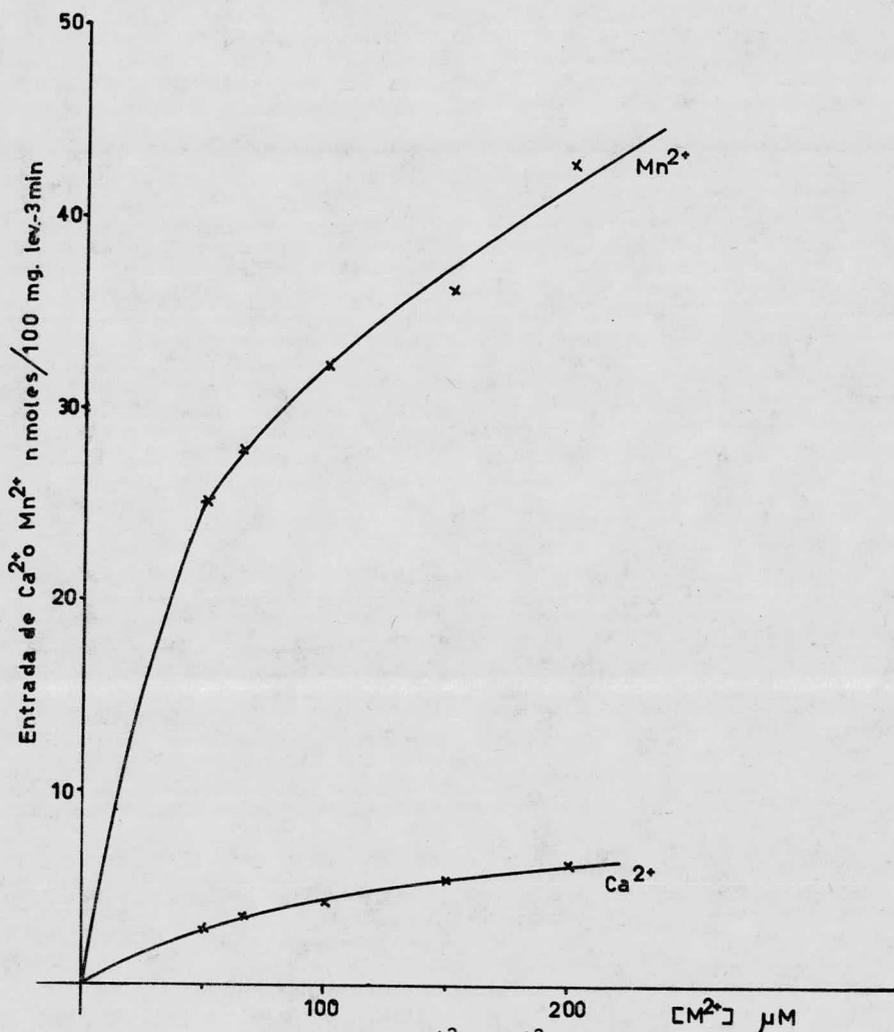


Fig. 3 Entrada de Ca<sup>+2</sup> o Mn<sup>+2</sup> a la levadura.

Mezcla de Incubación: Buffer MES-TEA 10mM; glucosa 50mM, 100 mg. de levadura en peso seco y H<sub>2</sub>O-suficiente para completar 2 ml de volumen final- (30°), Ca<sup>+2</sup> o Mn<sup>+2</sup>, las concentraciones, señaladas en la gráfica.

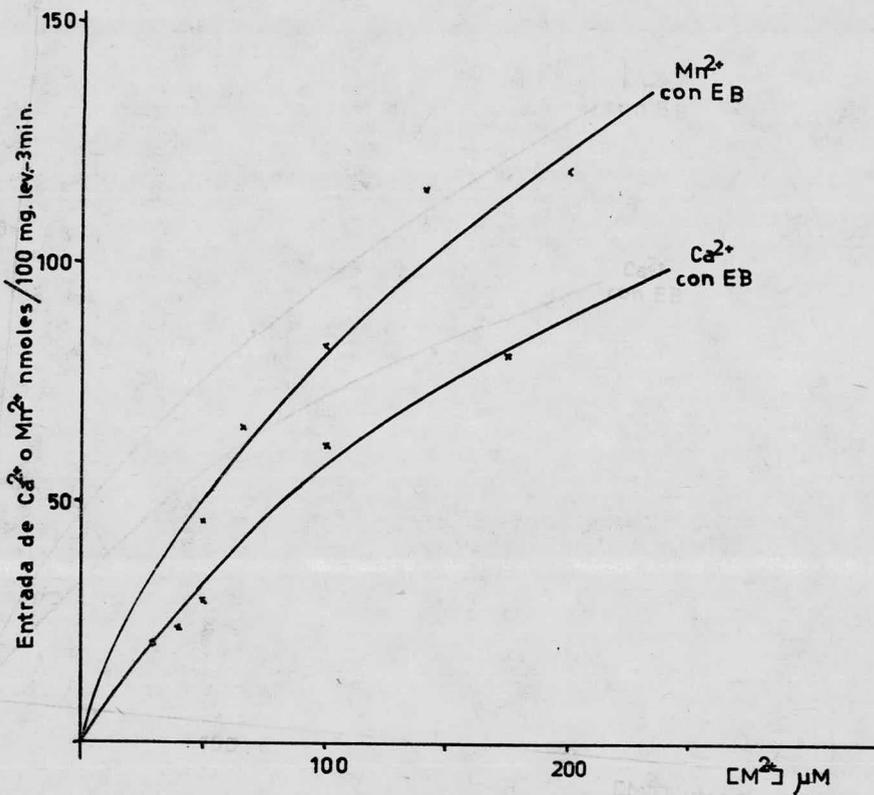


Fig. 4 Entrada de Ca<sup>+2</sup> o Mn<sup>+2</sup> a la levadura en presencia de EB (100 μM).  
 Condiciones experimentales como en la Fig. 3.

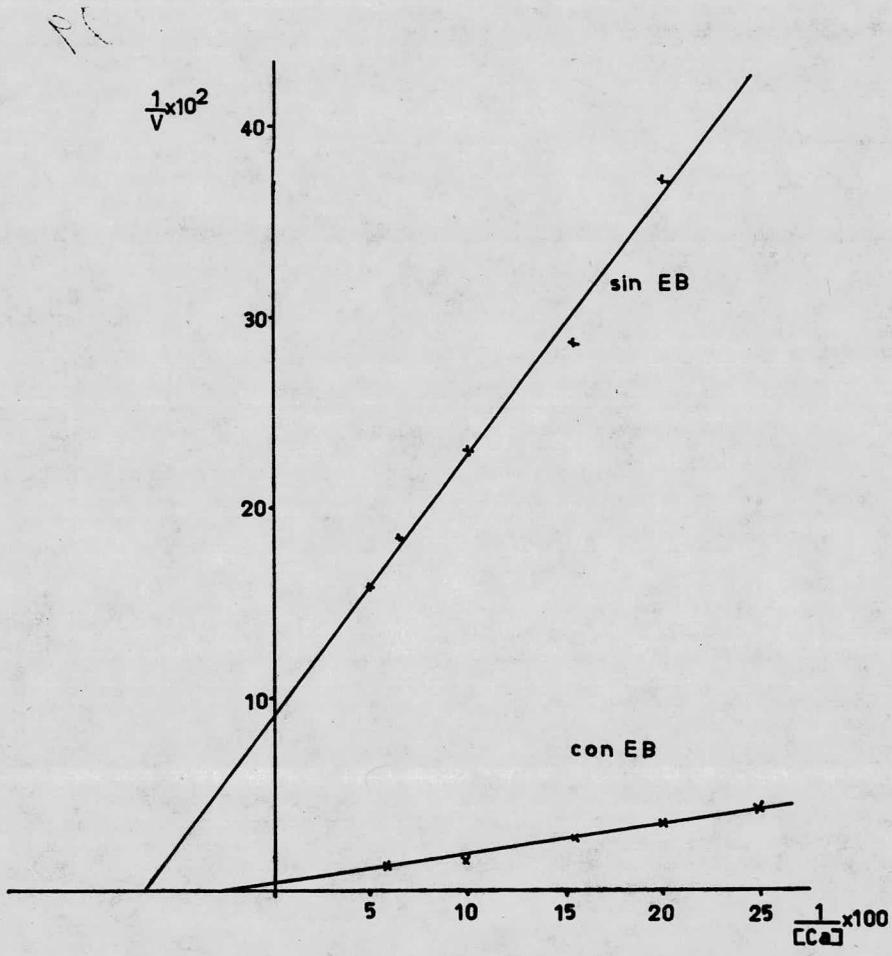


Fig. 5 Curvas en dobles recíprocas para la entrada de  $Ca^{+2}$  a la levadura.

DE

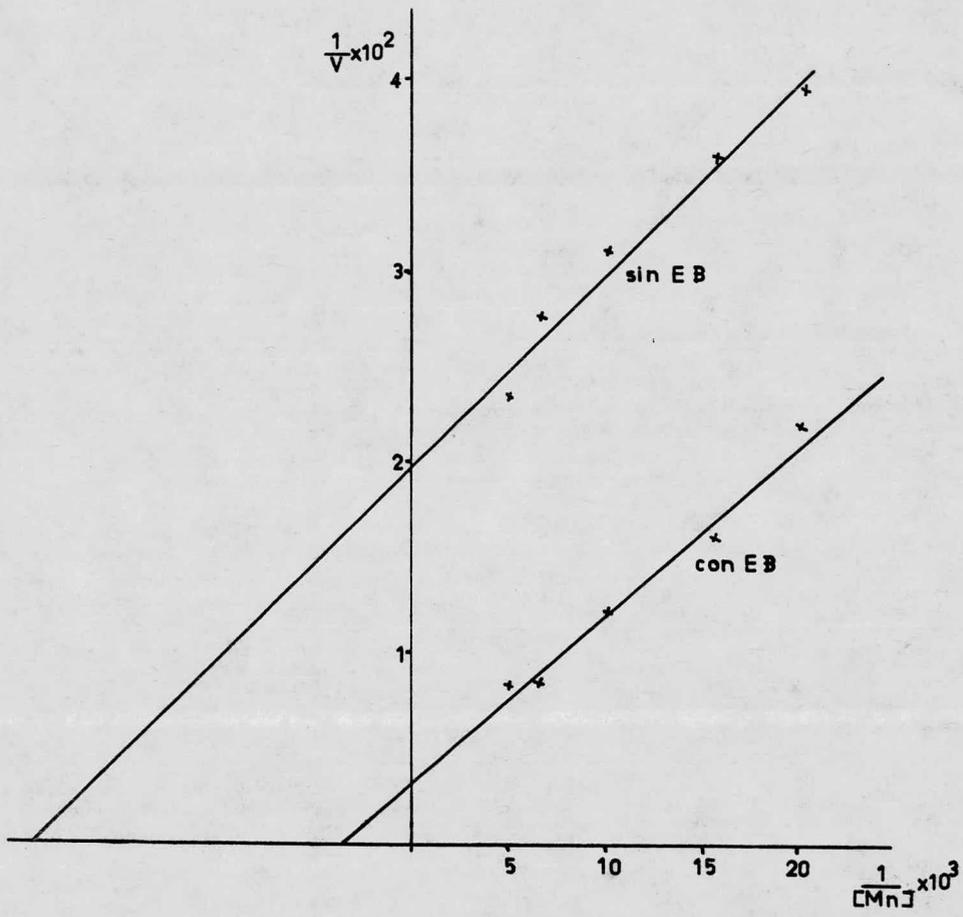


Fig. 6 Curvas en dobles recíprocas para la entrada de  $Mn^{+2}$  a la levadura.

Entrada  
n moles  $\text{Ca}^{2+}$ /100 mg. lev.

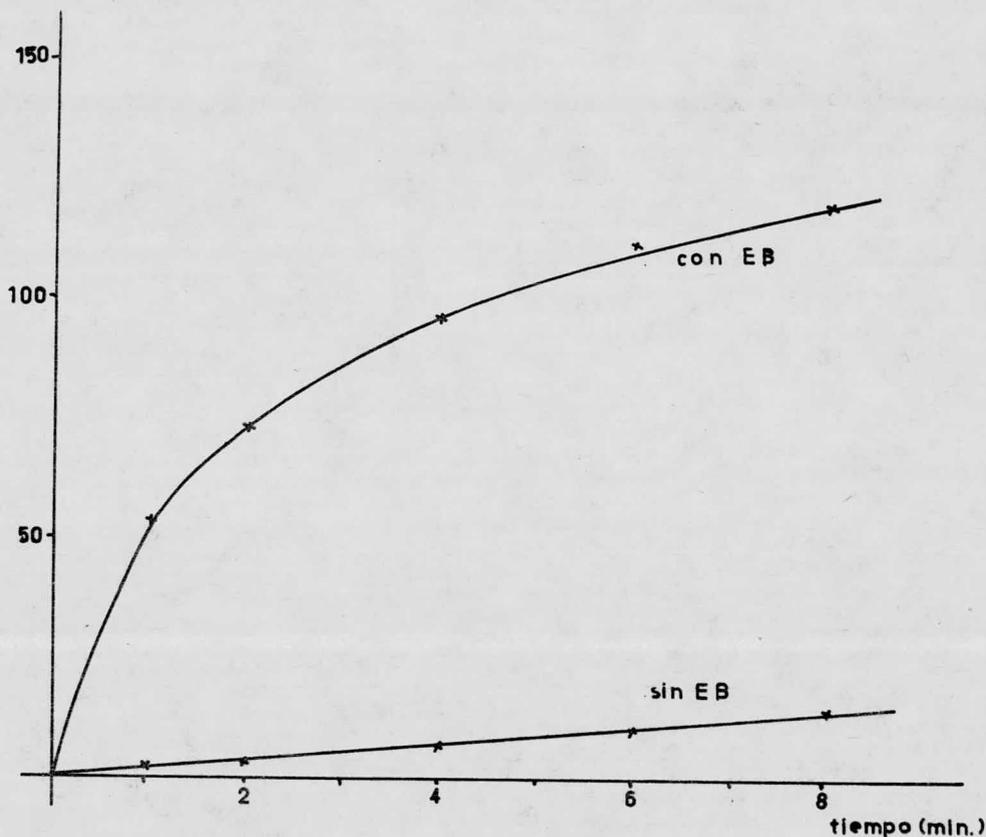


Fig. 7 Curvas vs. tiempo para la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  a la levadura.  
Condiciones experimentales como en la Figura 3 - a excepción del Buffer que en este caso es Buffer Maleato-TEA 20 mM.

98

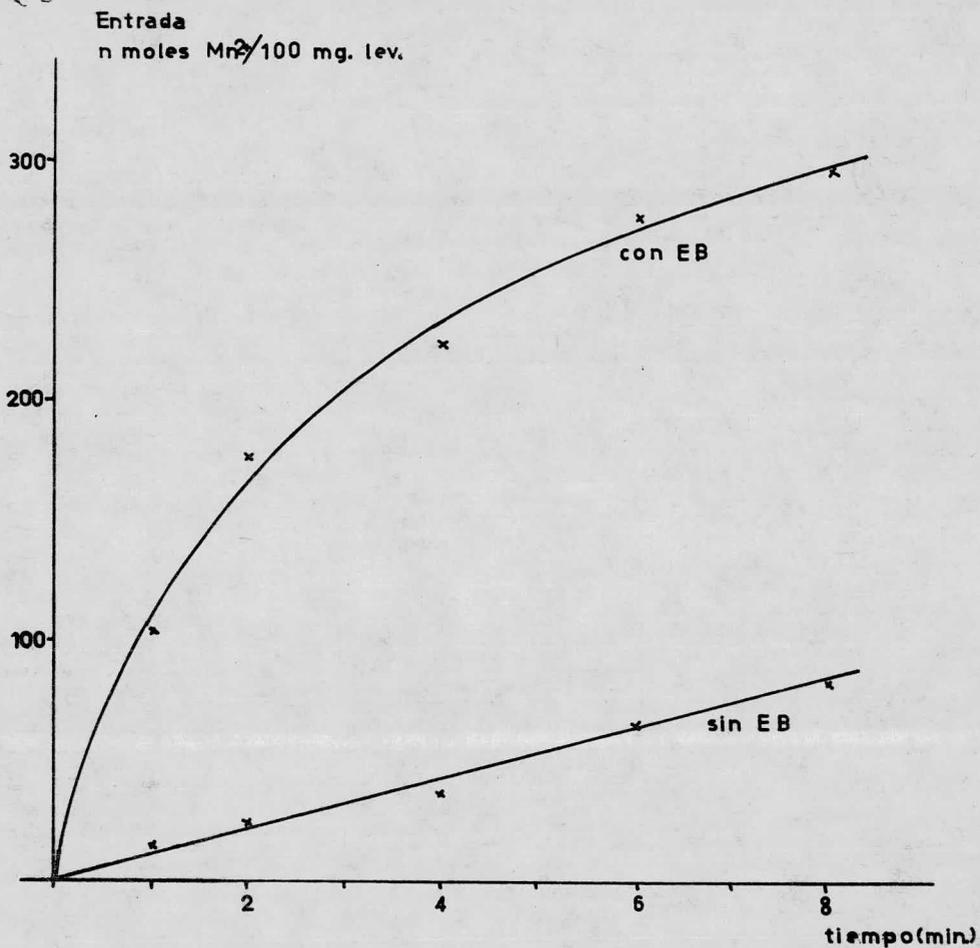


Fig. 8 Curva vs. tiempo para la entrada de  $Mn^{+2}$  a la le vadura.  
Condiciones experimentales como en la Fig. 7.

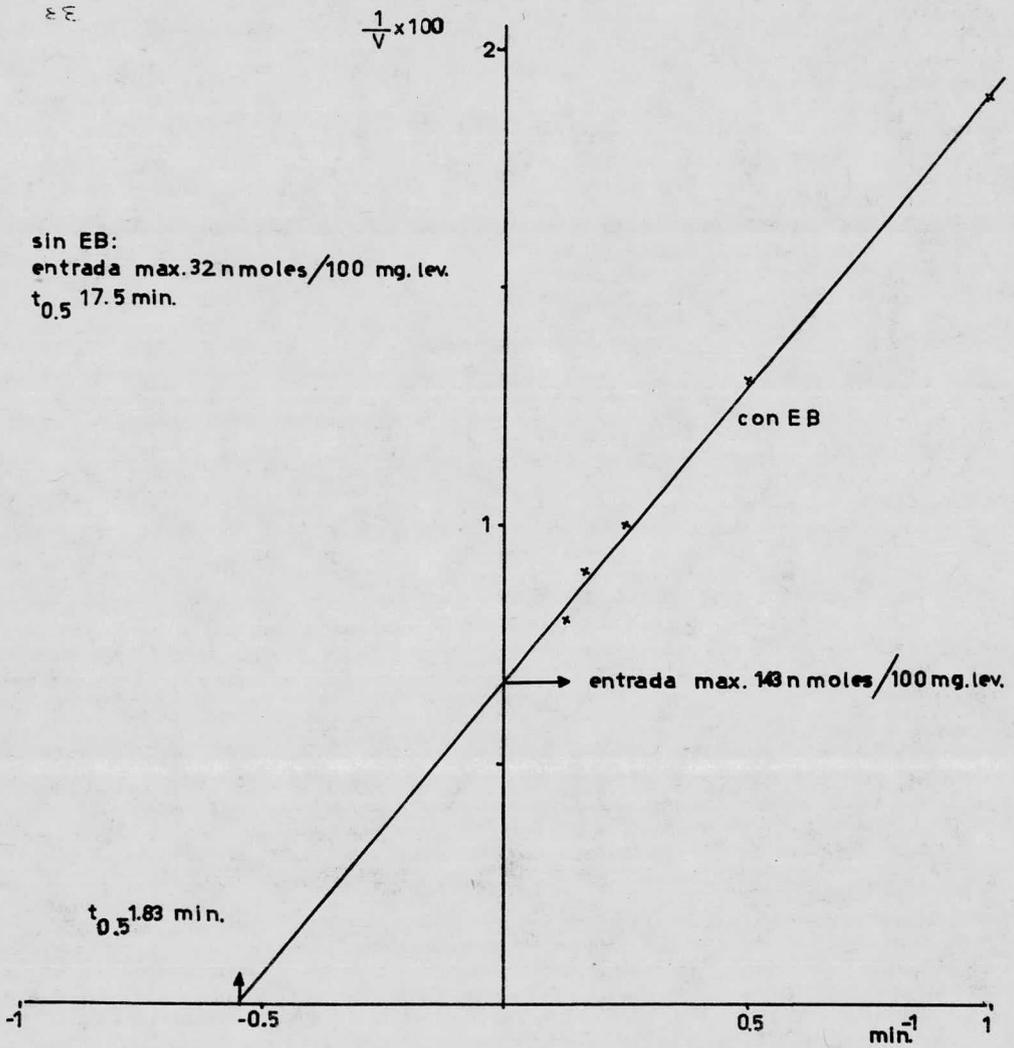


Fig. 9 Curva en dobles recíprocas para la captación de  $\text{Ca}^{+2}$  por la levadura a un tiempo infinito.

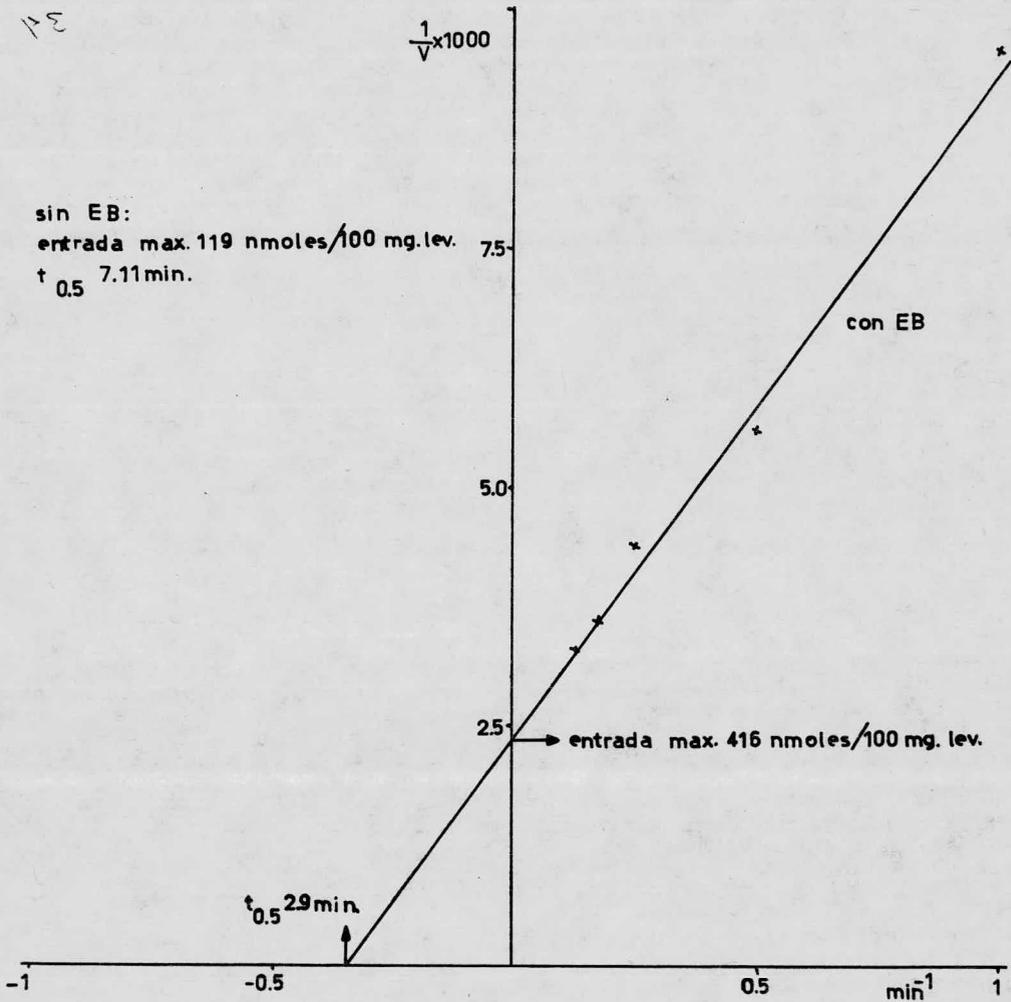


Fig. 10 Curva en dobles recíprocas para la captación de  $Mn^{+2}$  por la levadura a un tiempo infinito.

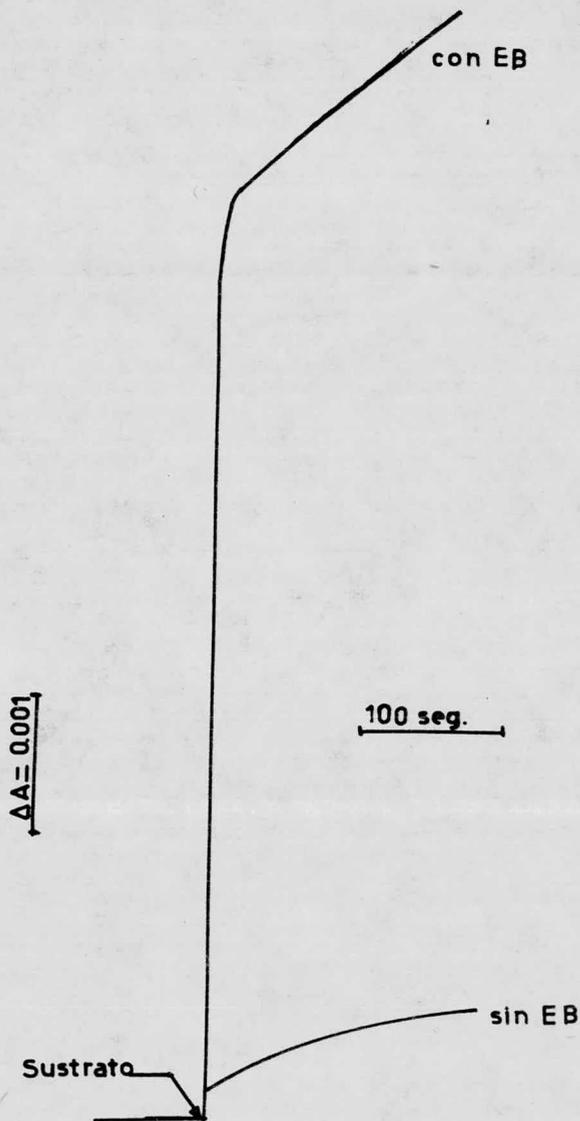


Fig. 11 Entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  a la levadura utilizando Murexida como indicador. Buffer MES-TEA  $30 \text{ mM}$ , pH6.0; 50 mg. de levadura en peso seco; Murexida  $50 \mu\text{M}$ , EB  $100 \mu\text{M}$  y Glucosa  $16.6 \text{ mM}$ . Volumen final 3ml.

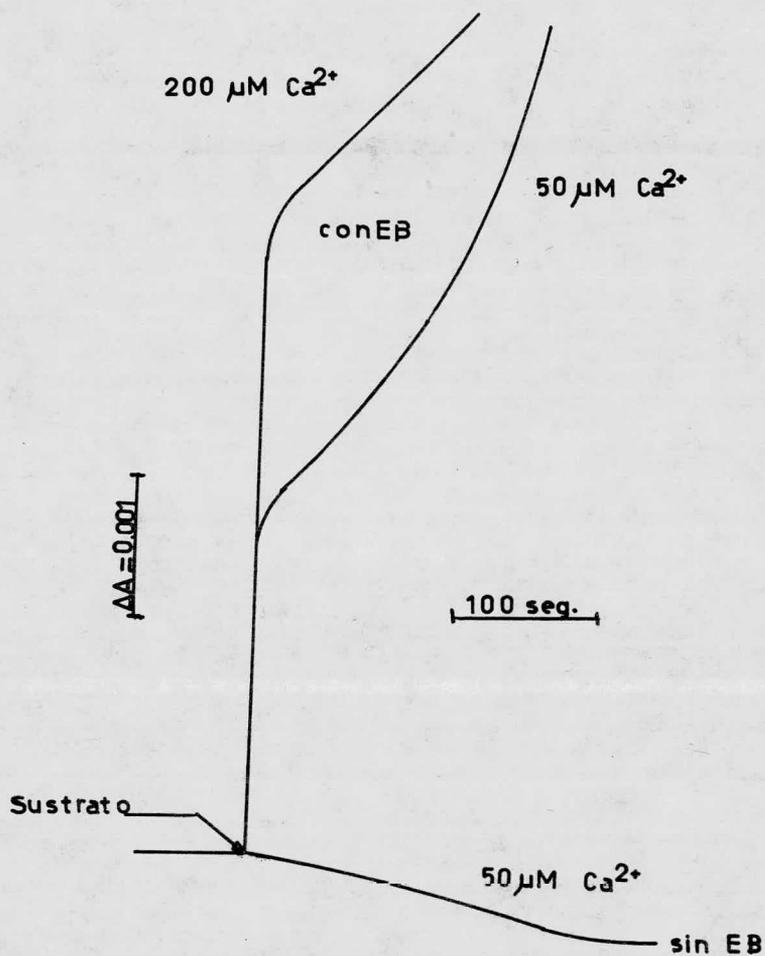


Fig. 12 Entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  a la levadura utilizando Murexida como indicador.  
 Buffer MES-TEA 30 mM pH6.0; 50 mg. de levadura -  
 en peso seco; Murexida  $50 \mu\text{M}$ ; EB  $100 \mu\text{M}$ ;  $40 \mu\text{L}$  -  
 EtOH y  $5 \mu\text{L H}_2\text{O}_2$  para un volumen final de 3 ml.

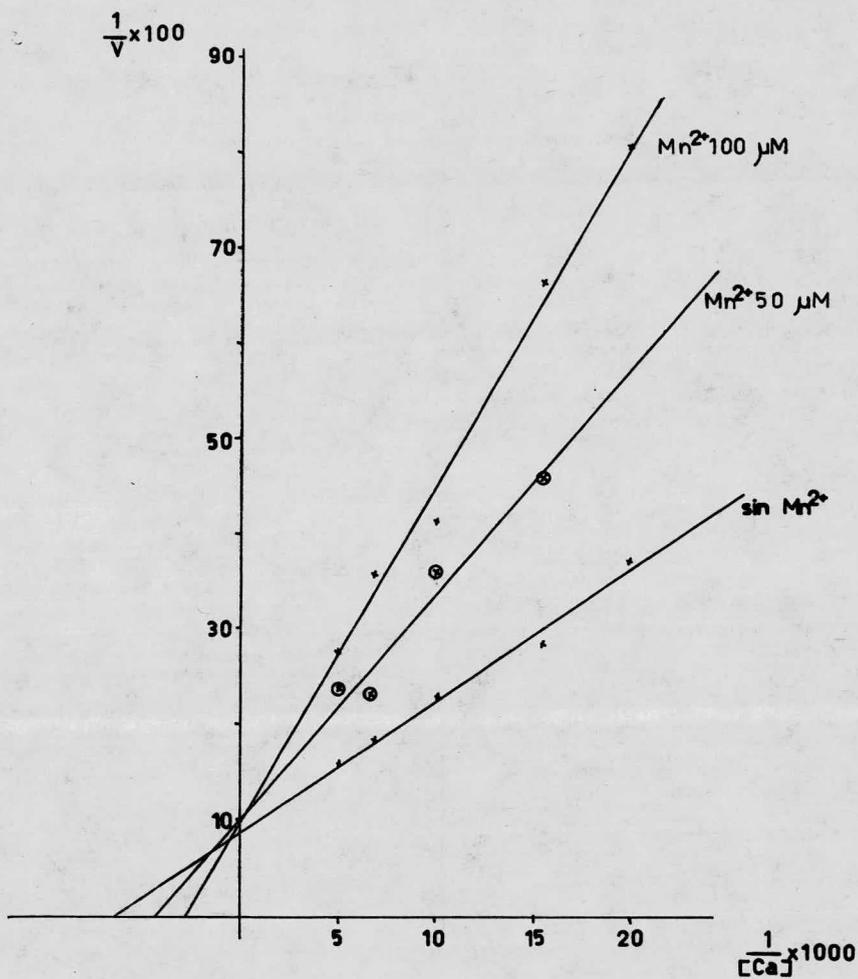


Fig. 13 Inhibición de la entrada de Ca<sup>2+</sup> por Mn<sup>2+</sup>.  
Condiciones experimentales como en la Figura 3.

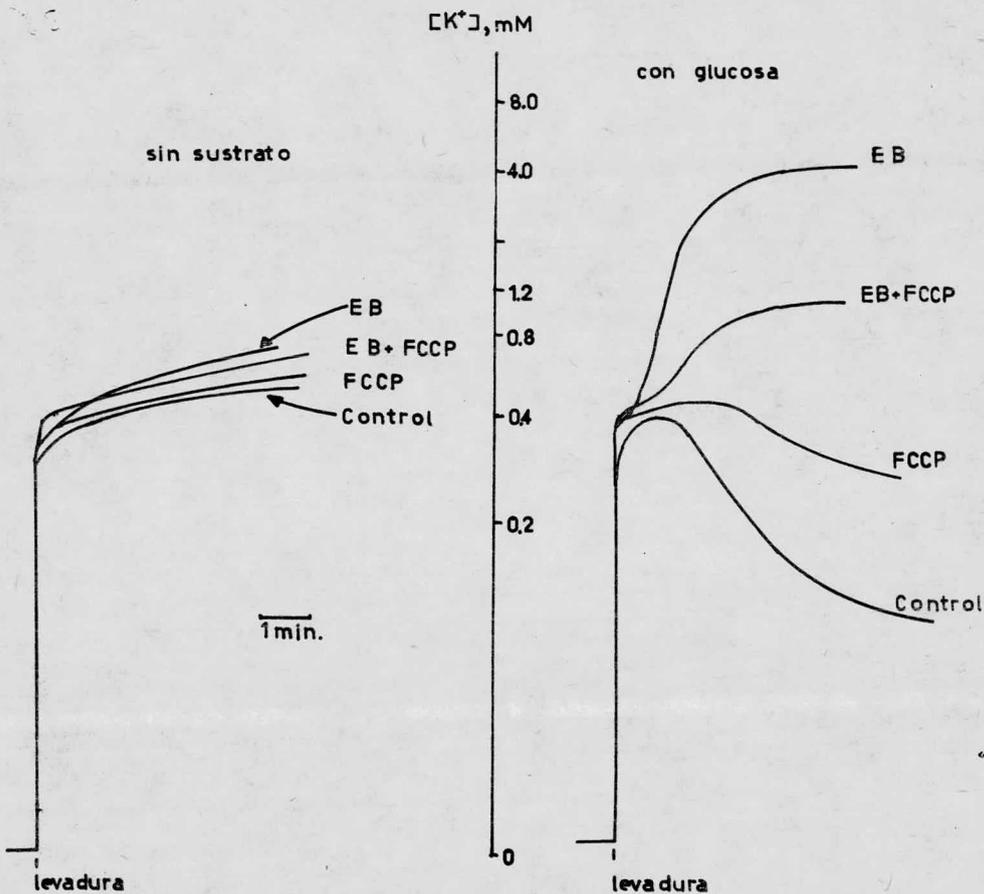


Fig. 14 Efecto del FCCP en los movimientos de  $K^+$  en levadura.  
 Condiciones experimentales como en la Figura 2, - a excepción de EB que en este caso es  $100 \mu M$ .

## REFERENCIAS

- 1) Jennings, D.H., Hooper, D.C. and Rothstein, A.  
J. Gen. Physiol. 41, [5], 1019-26, (1958)
- 2) Rothstein, A., Hayes, A., Jennings, D. and Hooper, D.  
J. Gen. Physiol. 41, [3], 585-94, (1958)
- 3) Fuhrman, G.F. and Rothstein, A.  
Biochim. Biophys. Acta 163, 325-30, (1968)
- 4) Fuhrman, G.F. and Rothstein, A.  
Biochim. Biophys. Acta 163, 331-8, (1968)
- 5) Fuhrman, G.F.  
Proceedings of the Fourth International Symposium on  
Yeast.  
Viena, Austria. Part. I, p. 283, (1974).
- 6) Peña, A.  
"Effect of Ethidium Bromide on  $Ca^{+2}$  Uptake by Yeast".  
J. Membrane Biol. (En prensa)
- 7) Peña, A. y Mora, M.A.  
"Uptake and Effects of Several Cationic Dyes on  
Yeast".  
Datos no publicados.
- 8) Peña, A. y Ramírez, G.  
J. Membrane Biol. 22, 369-84, (1975)
- 9) Peña, A., Chávez, E., Cáramez, A. and Tuena de Gómez  
Poyou, M.  
Archives of Biochemistry and Biophysics 180,  
522-9, (1977)

- 10) McGill, M., HSU, T.C. and Brinkley, B.R.  
The Journal of Cell Biology 59, 260-5, (1973)
- 11) Grimwood, B.G. and Wagner, R.P.  
Archives of Biochemistry and Biophysics 176, 43-52,  
(1976)
- 12) McGill, M., Baur, P.S. and HSU, T.C.  
Experimental Cell Research 99, 7-14, (1976)
- 13) Drahota, Z., Gazzotti, P., Carafoli, E. and Rossi, C.S.  
Archives of Biochemistry and Biophysics 130, 267-73,  
(1969)
- 14) Mela, L. and Chance, B.  
Biochemistry 7, [ ] , 4059-63, (1968)
- 15) Lehninger, A.  
Biochem. J. 119, 129-38, (1970)
- 16) Lehninger, A. and Carafoli, E.  
Archives of Biochemistry and Biophysics 143, 505-15,  
(1971)
- 17) Cilladino, A., Scarpa, A. and Chance, B.  
FEBS Letters 18, [ ] , 98-102, (1971)
- 18) Vasington, F.D., Gazzotti, P., Tiozzo, R. and  
Carafoli, E.  
Biochimica et Biophysica Acta 256, 43-54, (1972)
- 19) Reeves, J.P.  
The Journal of Biological Abstracts 252, [4] ,  
4876-81, (1977)
- 20) Carafoli, E.  
Biochem. Soc. Sym. 39, 89-109, (1974)

- 21) Reynafarje, B. and Lehninger, A.  
The Journal of Biological Chemistry 244, [3] ,  
584-93, (1969)
- 22) Nass, M.M.K.  
Experimental Cell Research 72, 211-22, (1972)
- 23) Peña, A.  
"Effects of Divalent Cations on  $K^+$  Transport in  
Yeast".  
Datos no publicados.
- 24) Hauser, H. and Dawson, R.M.C.  
Biochem. J. 109, 909-16, (1968)
- 25) Oxender, D.F.  
Annu. Rev. Biochemistry 41, 777-814, (1972)
- 26) Pardee, E.  
Science. 162, 632-7 (1968)
- 27) Racker, E.  
The Journal of Biological Chemistry 247, 8198-200,  
(1972)
- 28) Foury, F., Boutry, M. and Goffeau, A.  
The Journal of Biological Chemistry 252, [13] ,  
4577-83, (1977)
- 29) Boos, W.  
Annu. Rev. Biochem. 43, 123-46, (1974)
- 30) Guelfroy, D.E. (ed)  
"Buffers"  
Calbiochem. 10933 N. Torrey Pines Road.  
La Jolla (1975)

31) Borst Pauwels, G.W.F.H., Derks, W.J.G., Theuvenet, A.P.R. and Roomans, C.  
 Proceedings of the Fourth International Symposium on Yeast.  
 Viena, Austria. Part II, p. 89-90, (1974)

32) Bauer, W. and Vinograd, J.  
 J. Molecular Biology 54, 281-98, (1970)

33) Warning, M.J.  
 J. Molecular Biology 13, 269-82, (1965)

34) Angerer, M.L. and Mondrianakis, E.N.  
 J. Molecular Biology 63, 505-21, (1972)

35) Meyer, R.R. and Simpson, M.V.  
 Biochemical and Biophysical Research Communication 34, [2] , 238, (1969)

36) Racker, E.  
 "A New Look at Mechanisms in Bioenergetics"  
 Academic Press, N.Y. (1976)

37) Bronner, F., Nash, W.C., and Golub, E.E.  
 Spores VI. Sixth International Conference  
 East Lansing, Mich. USA [Oct.] 10-13, (1974)

38) Kobayashi H. Van Brunt, J. and Hardold, F.M.  
 The Journal of Biological Chemistry 253, [7] , 2085-92, (1978)

39) Racker, E.  
 The Tenth Hopkins Memorial Lecture 3, 785-802 (1975)