

33
Ref



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

MODULACION POR FOSFATO DE LOS EFECTOS DE
POTASIO EN EL METABOLISMO MITOCONDRIAL
DE LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*.

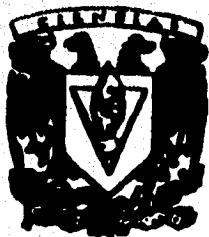
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

VICENTE CASTREJON TELLEZ



MEXICO. D. F.

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



1995

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE 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 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron el pasante(s)

Vicente Castrejón Téllez

con número de cuenta 8506369-1 con el Título:

Modulación por fosfato de los efectos de potasio sobre

el metabolismo mitocondrial de la levadura

Saccharomyces cerevisiae.

Otorgamos nuestro **Voto Aprobatorio** y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de Biólogo

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
Dr.	Antonio	Peña Díaz	
Director de Tests M. en IBB	Giselle	Rosas Solares	
Biol.	Carlos Alberto	Castillo Pompeyo	
Dr. Suplente	Salvador	Uribe Carvajal	
M. en IBB Suplente	Manuel	Miranda Arango	

A mis padres

porque a ellos me debo.

A mis hermanos

por el apoyo que me brindaron.

A mis amigos y hermanos

**Carolina, Elsa, Tere, Virginia, Humberto,
Ricardo, Juan Mauricio, Igancio y Javier,
que nunca me han fallado.**

A mis grandes amigos

**Susana, Laura y Juan Carlos, que siempre
están conmigo.**

A mis nuevos amigos y compañeros

que se han preocupado por mí.

Este trabajo se realizó en el departamento de Microbiología del Instituto de Fisiología Celular bajo la dirección del Dr. Salvador Uribe Carvajal y del Dr. Antonio Peña Díaz, a quienes agradezco el interés y apoyo que me brindaron.

Al Dr. Antonio Peña por atender mis dudas cuando lo requería, por sus enseñanzas, paciencia, consejos y tiempo que me brindó.

Al Dr. Salvador Uribe por ser el que me ha inculcado el espíritu de seguir adelante. Gracias.

Al M. en I.B.B. Manuel Miranda Arango por el apoyo que me ha brindado.

Al Dr. Pablo Rangel por sus enseñanzas y ayuda que me brindó en el inicio de mi formación.

A la M. en I.B.B. Giselle Rosas Solares y al Biol. Carlos Castillo Pompeyo por haberme ayudado en la revisión de este trabajo.

**Hay hombres que luchan un día
y son buenos
hay hombres que luchan un año
y son mejores
hay quienes luchan muchos años
y son muy buenos
pero hay quienes luchan toda la vida
esos son los imprecindibles.**

Bertrand Russ

INDICE

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	2
1. INTRODUCCION	3
1.1. Características generales de la levadura	3
1.1.2. Importancia de las levaduras	3
1.2. Estructura de la mitocondria	4
1.3. Principales funciones metabolicas mitocondriales	7
1.4. Estructura de la cadena respiratoria	9
1.5. Mecanismos de transporte de iones	14
1.6. Importancia e interacción de diversos iones en la mitocondria	15
1.7. Requerimiento de potasio (K ⁺) en la mitocondria	17
1.8. Importancia y mecanismos de transporte de fosfato (Pi) en la mitocondria	19
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIALES Y METODOS	23
3.1. Materiales	23
3.1.1. Material Biológico	23
3.1.2. Materiales Químicos	23
3.2. Métodos	23
3.2.1. Medio de cultivo	23
3.2.2. Preparación de las levaduras	23
3.3. Aislamiento de mitocondrias de levadura	24
3.4. Determinación de proteína	26
3.4.1. Formula para preparar reactivo de Biuret	26

3.5.	Consumo de oxígeno	27
3.6.	Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$)	27
3.7.	Hinchamiento mitocondrial (Swelling)	28
3.8.	Determinación de potasio extramitocondrial	28
4.	RESULTADOS	29
5.	DISCUSION	45
6.	CONCLUSIONES	49
7.	PERSPECTIVAS	50
8.	BIBLIOGRAFIA	51

RESUMEN.

En el presente trabajo se estudió la modulación por fosfato sobre los efectos que tiene el potasio en el metabolismo de mitocondrias aisladas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se utilizaron diferentes concentraciones de fosfato para cada uno de los ensayos. Se observó que cuando no hay fosfato en el medio de incubación, el potasio aumenta el consumo de oxígeno en el estado cuatro de la respiración, disminuye el control respiratorio y abate el potencial transmembranal ($\Delta\Psi$). A concentraciones bajas de fosfato, el potasio continúa disminuyendo el control respiratorio y el potencial transmembranal, pero aumenta la síntesis de ATP. Cuando las concentraciones de fosfato son altas, el potasio incrementa el control respiratorio, no abate el potencial de membrana y aumenta la síntesis de ATP. El fosfato no parece modificar los movimientos de potasio en la mitocondria.

ABREVIATURAS

BSA	Albúmina sérica bovina
Ca⁺⁺	Ión calcio
CCCP	Carbonilcianin m-clorofenilhidrazona
CoA	Coenzima A
C.R.	Control respiratorio
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
DCCD	1,3-Dicicloexilcarbodimida
DNP	2,4-Dinitrofenilhidrazona
DOC	Deoxicolato
EGTA	Etilen glicol-bis(β-aminoetil eter) N,N,N',N'-ácido tetracético
FCCP	Carbonil cianin p-trifluorometilfenil hidrazona
K⁺	Ión potasio
Mg⁺⁺	Magnesio
MES	(2-[N-Morfolino]ácido etanosulfónico)
Na⁺	Ión sodio
NEM	N - etilmaleimida
PBFI	Potassium binding benzofuran isoptalate
⁸⁶Rb	⁸⁶Rubidio
TEA	Trietanol amina

1. INTRODUCCION.

1.1. Características generales de la levadura.

Las levaduras son eucariotes aeróbicos facultativos, unicelulares; cuando usan glucosa como fuente de carbono las levaduras crecen en condiciones aeróbicas o anaeróbicas; son organismos microscópicos que difieren de las plantas porque carecen de clorofila y no llevan a cabo la fotosíntesis. Taxonómicamente son difíciles de ubicar, dadas sus diferentes características; por ejemplo, se reproducen por yemas o por fisión, pero también existen otras que tienen un micelio verdadero o tienen pseudohifas (pseudomicelio) (Kocková-Kratochvílová, 1990).

Las levaduras tienen como una de sus principales características metabólicas a la fermentación, proceso anaeróbico de degradación de la glucosa, cuyos productos finales son etanol y CO_2 . La fermentación es el mecanismo biológico más antiguo por el que se obtiene energía a partir de moléculas orgánicas (Lehninger, 1991).

1.1.2. Importancia de las levaduras.

Las levaduras pueden ser cultivadas y empleadas para procesar alimentos y bebidas. Son importantes en la industria de la panadería, la fabricación de vino y cerveza y en la producción de quesos. Recientemente se han usado para la manufactura de productos químicos, combustibles y una gran variedad de proteínas (Rose y Harrison, 1987). La facilidad de transferencia de un medio a otro, su ciclo celular uniforme, la regulación del volumen celular, el fácil manejo de su DNA y RNA, así como de la síntesis de proteínas, proporcionan a la levadura una gran versatilidad para ser empleada en el laboratorio (Rose y Harrison, 1987).

Las levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae* son microorganismos eucarióticos ideales para estudios de biología molecular. Genéticamente estos organismos son más complejos que las bacterias, pero comparten muchas de las ventajas que han permitido el progreso de la genética molecular de procariontes y

virus. Algunas de esas ventajas incluyen el que sean organismos unicelulares con crecimiento rápido, su tipo de reproducción, la alta estabilidad que presentan tanto en estado diploide como en estado haploide, su alta eficiencia de replicación y la facilidad para aislar mutantes, un sistema genético bien definido y la alta facilidad para manipular su DNA (Stevens, 1981).

1.2. Estructura de la mitocondria.

Las levaduras se estudian como un representante y modelo de las células eucariontes. Poseen núcleo, retículo endoplásmico, vacuola, aparato de Golgi y mitocondrias. Las levaduras tienen una pared celular que cubre a la membrana plasmática (Figura 1.1).

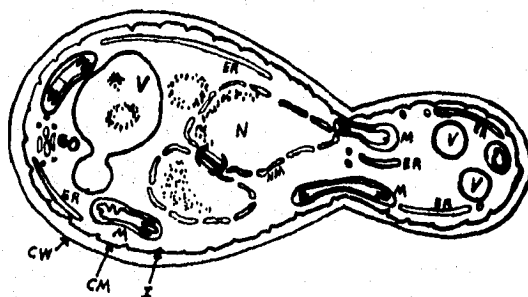


Figura 1.1 Estructura de la levadura. N=núcleo, NM=membrana nuclear, ER=retículo endoplásmico, V=vacuola, GO=aparato de Golgi, M=mitocondria, CW=pared celular, CM=membrana plasmática, I=Invaginación (Kockova-Kratochvílová, 1990)

En 1957 el término condrisomas de Guilliermond, se utilizó para denominar diversos gránulos localizados en el interior celular (Kockova-Kratochvílová, 1990). Las mitocondrias son organelos membranosos ovales y de diferentes tamaños: de 0.1 a 0.5 μm por 1 a 2 μm , que se encuentran dispersas en el citoplasma celular. Las mitocondrias se encuentran en todas las células eucarióticas y su estructura es

similar en plantas, animales y levaduras.

La mitocondria de *Saccharomyces cerevisiae* es extremadamente variable en forma (de esférica a filamentosa) y tamaño (Stevens, 1981) (Figura 1.2). El número de mitocondrias en una célula depende de la fase del ciclo celular estudiada, de la fuente de carbono suministrada y de la concentración de oxígeno. Aproximadamente el 12 % del volumen total de las células está ocupado por las mitocondrias (Stevens, 1981). Cuando la levadura se cultiva aeróbicamente en presencia de altas concentraciones de glucosa, el volumen mitocondrial disminuye a 3-4 % del volumen celular (Wheals, 1987).

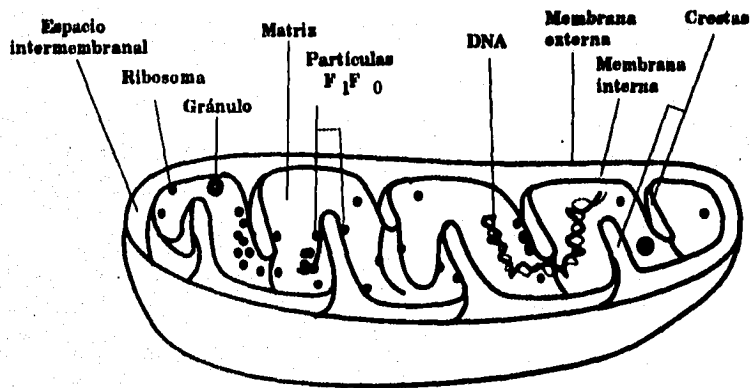


Figura 1.2 Esquema de la estructura de la mitocondria. Se observan cada uno de sus componentes.

La mitocondria está formada por una membrana externa y una membrana interna. La membrana interna tiene una superficie granular y forma pliegues que penetran al interior mitocondrial; estos plegamientos son llamados crestas. La membrana externa envuelve a la membrana interna y es permeable a moléculas de hasta 6000 Da (Munn, 1974; Werkheiser y Bartley, 1957; De Pierre y Ernster, 1977). La alta permeabilidad de la membrana externa es causada por la presencia de porinas, proteínas que forman un canal a través del cual pasan las moléculas (Benz,

1985; Zalman y cols., 1980). En contraste con la membrana externa, la permeabilidad de la membrana interna está limitada a sólo algunas moléculas y iones para los cuales existen procesos de transporte específicos (Chappell y Haarhoff, 1967; La Noue y Schoolwerth, 1984).

Tabla 1.1 Algunas de las funciones metabólicas que se llevan a cabo en cada uno de los compartimentos de la mitocondria de la levadura

Funciones	Enzimas y macromoléculas asociadas
Membrana externa -Oxidación de aminas aromáticas -Biosíntesis de cardiolipinas	Membrana externa -Monoamino oxidasa -Ej. Glicerol fosfato acil transferasa
Espacio intermembranal -Mantenimiento del balance de adenín nucleótidos	Espacio intermembranal -Adenilato cinasa -Nucleósido difosfoquinas -Nucleósido monofosfoquinas
Membrana interna -Fosforilación oxidativa -Transporte de piridín nucleótidos -Transporte de iones -Transporte de metabolitos	Membrana interna -La bicapa de fosfolípidos es esencial para mantener el gradiente de H ⁺ . Cuatro complejos transfieren e ⁻ , tres de los cuales acoplan el paso de e ⁻ con la formación de un gradiente de H ⁺ y la síntesis de ATP -ADP/ATP translocasa -Uniportador de Ca ²⁺ o de K ⁺ -Acarreador de piruvato, antiportador H ₂ PO ₄ /OH ⁻ , antiportador citrato/malato, etc.
Matriz -Oxidación del piruvato a acetyl CoA -Oxidación de cuerpos cetónicos y de ácidos grasos a Acetyl CoA. -Oxidación de amino ácidos -Parte del ciclo de la urea -Procesamiento de proteínas importadas del citosol -Síntesis de genes que codifican para el RNA mitocondrial y algunas proteínas	Matriz -El complejo piruvato deshidrogenasa -Ej. 3-cetoácido CoA transferasa -Ej. glutaminasa, glutamato deshidrogenasa, aspartato aminotransferasa, α-cetoglutarato transaminasa -Carbamilfosfato sintetasa y ornitina transcarbamilasa -Proteasas para peptidos señal específicos -DNA mitocondrial, DNA polimerasa y primasa. Ribosomas y aparatos para la transcripción y traducción

Como se muestra en la Figura 1.2, en las mitocondrias se forman dos espacios: un espacio intermembranal y un espacio contenido por la membrana interna. El espacio contenido por la membrana interna se denomina matriz mitocondrial. El sistema de membranas contiene a la gran mayoría de las proteínas mitocondriales, al grado que la membrana interna contiene un 65 % de proteínas y un 35 % de

lípidos. En la matriz mitocondrial se encuentra el DNA mitocondrial, los ribosomas, las enzimas del ciclo de Krebs y de la β -oxidación (Kockova-Kratochvílová, 1990). En cada compartimento de la mitocondria se llevan a cabo diferentes funciones metabólicas específicas necesarias para el crecimiento de la levadura (Netter y cols., 1974) (Tabla 1.1).

1.3. Principales funciones metabólicas mitocondriales.

En la mitocondria se efectúa el metabolismo aeróbico de la célula, incluyendo el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, que es la vía metabólica que produce la mayor cantidad de energía en la célula al oxidar al $\text{NADH} + \text{H}^+$ y al FADH_2 , producidos por la glucólisis y el ciclo de Krebs. En la cadena respiratoria, el aceptor final de electrones es el oxígeno y se forma H_2O . La fosforilación oxidativa produce una cantidad de energía veinte veces mayor que la que se produce en cualquier proceso anaeróbico. En la Tabla 1.2 se enumeran los principales procesos metabólicos que se efectúan en la mitocondria.

Tabla 1.2 Principales pasos y vías metabólicas mitocondriales para la producción de energía (tomada de Prebble, 1981):

N°.	Función
1	La descarboxilación oxidativa del piruvato a acetil CoA.
2	La oxidación de los ácidos grasos a acetil CoA
3	El ciclo de los ácidos tricarbóxicos, que convierte cada molécula de acetil CoA en CO_2 , reduce tres $\text{NADH} + \text{H}^+$ y un FADH_2 y produce un GTP en cada ciclo.
4	La cadena respiratoria, que cataliza la oxidación de los cofactores reducidos, $\text{NADH} + \text{H}^+$ y FADH_2 , formando H_2O al combinar los electrones con el oxígeno formando un gradiente de H^+ a través de la membrana interna mitocondrial.
5	La producción de ATP acoplada al gradiente de H^+ producido por la cadena respiratoria, que se lleva a cabo en la F ₁ -F ₀ ATPasa.

Como se observa en la Figura 1.3, estos procesos se encuentran ligados; la mitocondria también tiene un papel importante en otros procesos como el metabolismo del nitrógeno y otros sistemas biosintéticos (Prebble, 1981).

El ciclo de Krebs es la vía final común para la oxidación de diversos sustratos que en su mayoría entran como acetil CoA; todas las reacciones de esta vía se llevan a cabo en la matriz mitocondrial. En el ciclo de Krebs se sintetiza un GTP y hay cuatro reacciones de óxido-reducción en las que tres pares de electrones son transferidos al NAD^+ y un par al FAD^+ para dar $3 \text{NADH} + \text{H}^+$ y 1FADH_2 , que entran a la cadena de transporte de electrones, donde transfieren sus electrones al O_2 , reoxidándose y generando tres moléculas de ATP por cada $\text{NADH} + \text{H}^+$ y dos moléculas de ATP por cada FADH_2 . De esta forma, un total de doce fosfatos de alta energía son ligados en el ciclo por cada acetil CoA que ingresa a la cadena para ser oxidado a $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$ (Stryer, 1988).

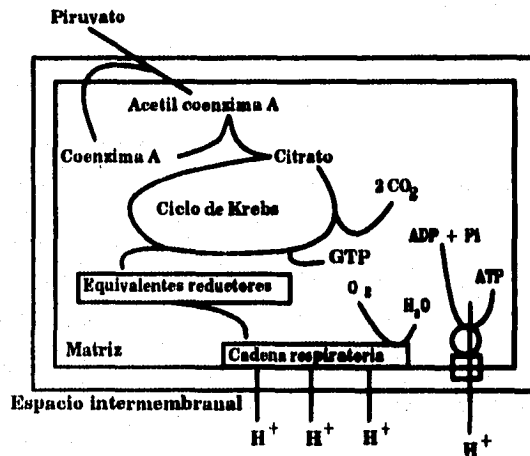


Figura 1.3 El esquema muestra la relación que guardan entre sí las vías metabólicas efectuadas en la mitocondria. El cual incluye el ciclo de Krebs en el que se producen equivalentes reductores ($\text{NADH} + \text{H}^+$ y FADH_2) que entran en la cadena respiratoria donde se traslocan protones (H^+) al exterior y se genera agua. Este gradiente de protones es aprovechado por la $\text{F}_1\text{-F}_0$ ATP sintetasa.

La limitada permeabilidad de la membrana interna es importante para dos aspectos relacionados con la función mitocondrial. El primero permite la existencia de un compartimento metabólico interno distinto al del citosol, aunque conectado por

mecanismos de transporte (La Noue y Schoolwerth, 1984). El segundo es que la limitada permeabilidad de la membrana interna es esencial para generar un potencial de membrana y un gradiente de pH (Mitchell, 1979; Slater, 1987). Estos gradientes no solo participan en la producción de ATP (de acuerdo con la hipótesis quimiosmótica), sino también dan la energía para los sistemas de transporte específicos para los iones y los metabolitos (La Noue y Schoolwerth, 1984; Williamson, 1976), dando como resultado una diferente composición de estos en la mitocondria con respecto a la del citosol. En el caso del potasio (K^+), su concentración está regulada por sistemas de transporte que lo mueven hacia adentro o fuera de la mitocondria de acuerdo con las necesidades metabólicas de la célula (Figura 1.4) (Halestrap, 1989).

1.4. Estructura de la cadena respiratoria

La cadena transportadora de electrones está constituida por los siguientes componentes oxido-reductores: grupos hemo (a, b, c, y c), grupos fierro-azufre (Fe-S), mononucleótidos de flavina (FMN), flavín adenín dinucleótidos (FAD) y átomos de cobre (Cu_1 , Cu_2), los cuales se encuentran asociados a complejos oligoméricos de las proteínas. Estos últimos están formados por un diferente número de polipéptidos y se encuentran parcialmente embebidos en la bicapa lipídica de la membrana mitocondrial interna (González-Halphen y Vázquez Acevedo, 1990).

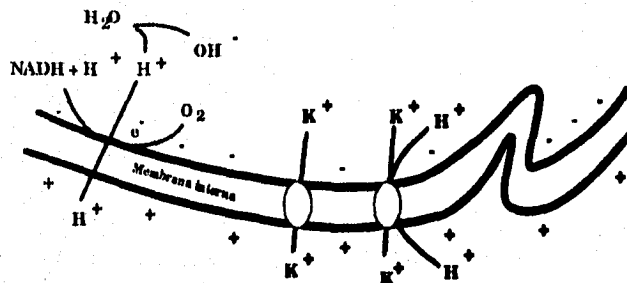
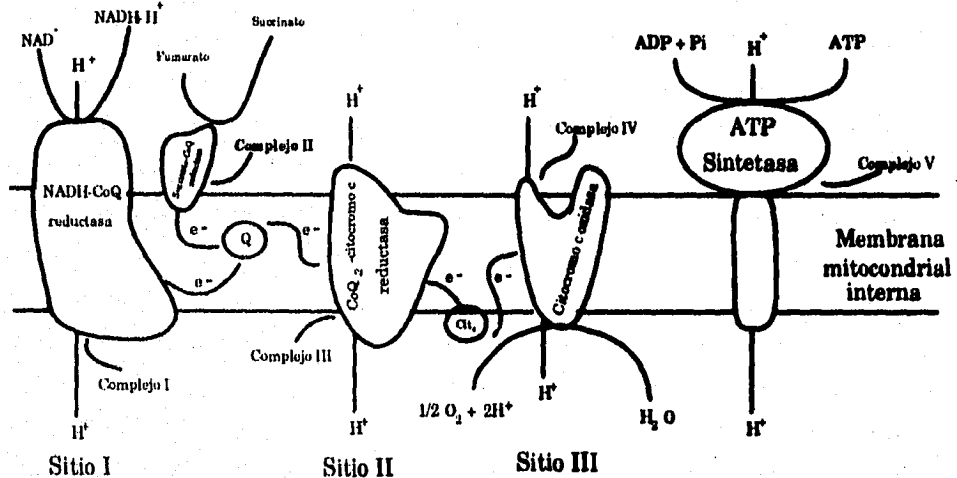


Figura 1.4 Interpretación quimiosmótica del flujo de K^+ a la mitocondrial. Dependiente de un gradiente de H^+ (ΔpH) por el antiportador, y dependiente del potencial transmembranal ($\Delta \psi$) por el uniportador (Tomado de Diwan, 1987).

En la fosforilación oxidativa, la síntesis de ATP está acoplada al gradiente de protones formado a través de la membrana interna mitocondrial. De acuerdo con Hatefi (1985), el proceso en conjunto es catalizado por cinco complejos. cuatro son complejos respiratorios: el complejo I (NADH-CoQ reductasa), el complejo II (succinato-CoQ reductasa), el complejo III (CoQH₂-citocromo c reductasa) y el complejo IV (citocromo c oxidasa). Estos complejos están funcionalmente unidos por dos acarreadores de electrones móviles, la ubiquinona y el citocromo c, los cuales transfieren equivalentes reductores del complejo I o II al complejo III y del complejo III al complejo IV secuencialmente. El complejo V cataliza la síntesis de ATP y se denomina F₁-F₀ ATP sintetasa (Figura 1.5).

Matriz mitocondrial



Espacio intermembranal

Figura 1.5 Arreglo de los cuatro complejos respiratorios en la membrana interna mitocondrial de mamíferos. Complejo I (NADH-CoQ reductasa), Complejo II (Succinato-CoQ reductasa), Complejo III (CoQ-citocromo c reductasa o complejo bc₁), Complejo IV (Citocromo c oxidasa) y la ATP sintetasa o complejo V. Los complejos están unidos funcionalmente por la ubiquinona (Q) y por el citocromo c (Cit). También se muestran los sitios de traslocación de protones Sitio I (NADH-CoQ reductasa), Sitio II (CoQ-citocromo c reductasa) y Sitio III (Citocromo c oxidasa).

En las mitocondrias de levadura, los complejos II a V se encuentran presentes y son semejantes a los descritos para los mamíferos; por otro lado, el complejo I no se expresa en *Saccharomyces cerevisiae* y en su lugar existen dos NADH deshidrogenasas, una externa y una interna (Hatefi, 1985). Ninguna de ellas está acoplada a la fosforilación oxidativa; es decir, no bombean protones; los anticuerpos preparados contra el complejo I de bovino no reaccionan contra la mitocondria de levadura (Schagger y cols., 1985) y además las NADH deshidrogenasas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* no son sensibles al inhibidor rotenona (Marres y cols., 1990). El complejo I de los mamíferos tiene un peso molecular de 830 kDa y posee 41 polipéptidos diferentes de los cuales 7 son codificados por el DNA mitocondrial y los restantes por el DNA nuclear (Figura 1.5) (Runswick y cols., 1991).

El complejo II tiene un peso molecular de 140 kDa y está formado por cuatro o cinco polipéptidos diferentes, codificados por el DNA nuclear; es un componente del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y de la cadena respiratoria de procariontes y eucariontes. Es el único componente del ciclo de Krebs que se encuentra asociado a la membrana interna mitocondrial y su función consiste en donar equivalentes reductores a la cadena respiratoria a través de la poza de quinonas (Hatefi, 1985) (Figura 1.5).

El complejo III (o complejo bc_1) fue aislado de mitocondrias de mamífero por Hatefi y cols. (1962); cataliza la transferencia de electrones de la CoQ al citocromo c acoplada a la translocación de H^+ ; el proceso es sensible a antimicina-A (Beattie y Villalobo, 1982). El complejo III contiene tres diferentes proteínas con grupos redox: el citocromo b , el citocromo c_1 y la ferro sulfoproteína de Rieske (Figura 1.5) (Siedow y cols., 1978). La transferencia de electrones a través del complejo III está acoplada a la translocación de protones. La hipótesis formulada por Mitchell (1961) requería de electrones y proteínas para atravesar la membrana vía un circuito redox, en el cual el transporte vectorial de protones se acopla a las reacciones redox en el citocromo bc_1 de la cadena respiratoria. Se han propuesto varios mecanismos para la translocación de los protones; el más aceptado es el ciclo Q propuesto por Mitchell (1976).

Como resultado neto de la oxidación de una molécula de QH_2 , se reducen dos citocromos c y se traslocan 4 H^+ al lado positivo de la membrana (Trumpower, 1990a; Trumpower, 1990b).

El complejo IV o citocromo c -oxidasa (Figura 1.5) cataliza la oxidación de cuatro citocromos c para reducir una molécula de oxígeno, que además recibe cuatro H^+ produciéndose dos moléculas de agua. Esta reacción irreversible es el paso final de las series de reacciones redox involucradas en la respiración. (Wikström, 1977). El complejo IV tiene un peso molecular de 225 kDa, y está compuesto por 14 subunidades. Las subunidades I, II y III son codificadas por el DNA mitocondrial y las restantes son codificadas por el DNA nuclear (Power y cols., 1984a).

En la cadena respiratoria, el transporte de electrones se lleva a cabo, probablemente por las múltiples colisiones de los componentes redox: los cuatro complejos respiratorios, la ubiquinona y el citocromo c soluble (Hackenbrock y cols., 1986). De esta forma, la energía química de la respiración se transforma en un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna mitocondrial. Esta energía es capturada por el complejo V (ATP sintasa ó ATPasa sensible a oligomicina) que la utiliza para promover la unión entre el fosfato (P_i) y el ADP para formar ATP (Mitchell, 1961).

El complejo V ó $\text{F}_1\text{-F}_0$ ATPasa, se encarga de sintetizar ATP; esta es una reacción reversible, que utiliza el gradiente de protones para sintetizar ATP, o bien hidrolizar ATP para generar un gradiente de protones, (Figura 1.5) (Nichols, 1982). La ATPasa consta de un segmento hidrofóbico membranal (F_0) que conduce protones a través de la bicapa hasta el segmento catalítico (F_1) que lleva a cabo la unión del P_i al ADP para formar ATP. Cada uno de estos segmentos se puede estudiar por separado, una vez disociados, la síntesis de ATP ya no puede llevarse a cabo, sin embargo, la F_1 retiene la capacidad para hidrolizar ATP y la F_0 aún puede transportar H^+ . En algunas circunstancias la enzima hidroliza al ATP para generar un gradiente de H^+ .

La porción F_1 tiene una estructura globular de unos 9 nm de diámetro que sobresale de la membrana (Gogol y cols., 1989); está formada por tres subunidades

α y tres subunidades β dispuestas alternadamente, más una zona central a la que se adosan asimétricamente las subunidades γ , δ y ϵ (Dreyfus, 1990).

El estudio de la función de cada uno de los complejos que participan en la fosforilación oxidativa se facilitó por el uso de inhibidores específicos de cada complejo (Figura 1.6). La rotenona es un producto vegetal usado para matar peces (en Japón) que inhibe el paso de electrones en el complejo I. La antimicina A es un antibiótico que inhibe el paso de electrones a nivel del centro N (negativo) del complejo III. El mixotiazol inhibe el sitio P del complejo bc₁. El cianuro, el monóxido de carbono y las azidas son inhibidores del paso de electrones por el complejo IV. La oligomicina es un antibiótico que inhibe a la F₁-F₀ ATPasa uniéndose a un sitio específico del segmento transmembranal de la enzima (Hackenbrock y cols., 1986).

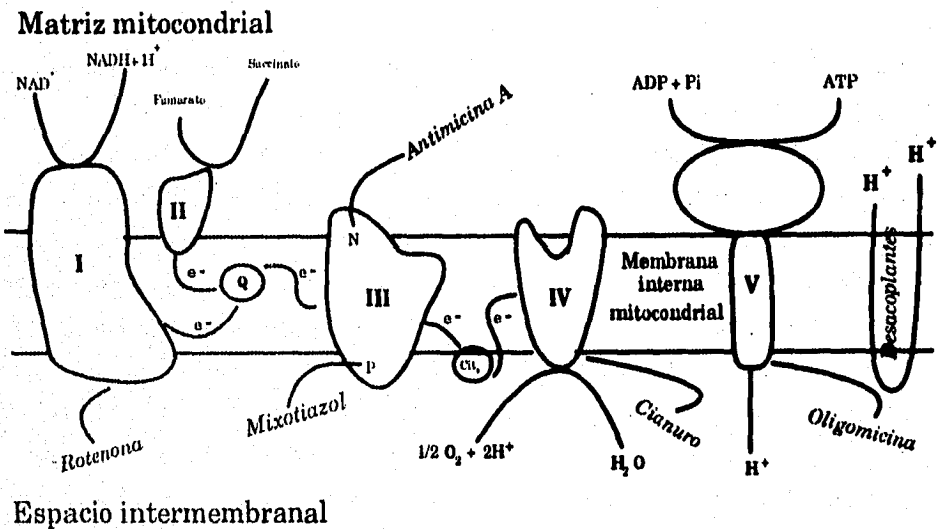


Figura 1.6 Representación esquemática de los sitios de acción de algunos inhibidores de la fosforilación oxidativa. Con números romanos se muestran los complejos respiratorios y en letras itálicas se muestran algunos inhibidores específicos de cada uno de los complejos. También se ilustra el efecto de los desacoplantes en la traslocación de protones.

También se han empleado compuestos denominados desacoplantes, que tienen efectos sobre la fosforilación oxidativa a través de sus acciones sobre la diferencia de cargas que se forma a través de la membrana; reciben este nombre porque eliminan la diferencia de potencial existente entre un lado y otro de la membrana interna de la mitocondria; entre los más importantes se encuentran el DNP, el CCCP, el FCCP, el 1799, etc. Algunos ionóforos también sirven como desacoplantes; por ejemplo se ha visto que la valinomicina (ionoforo de K^+) induce la respiración inhibida por oligomicina, también la antimicina A a altas concentraciones es desacoplante. Estas sustancias cumplen con uno de los principios básicos de la hipótesis quimiosmótica, el cual implica que la fosforilación oxidativa puede ser desacoplada cuando la diferencia eléctrica y la concentración de protones a través de la membrana tienden al equilibrio (Mitchel, 1961).

1.5. Mecanismos del transporte de iones.

La aparición de la hipótesis quimiosmótica produjo un gran cambio en la forma de interpretar los mecanismos del transporte de los iones. Para que un ión sea transportado a través de una membrana se necesita un sistema de transporte y una fuerza impulsora. Esta fuerza puede ser un gradiente de concentración, un potencial eléctrico, energía metabólica, o una combinación de éstos. Los transportadores de la membrana son proteínas que funcionan por diferentes mecanismos: a) uniportadores (implica el transporte de un solo ión), b) simportadores (donde se acopla el transporte de dos o más iones en la misma dirección o de un ion con una molécula neutra) y, c) antiportadores (donde el transporte de un ion está acoplado al transporte de una o varias especies en dirección opuesta) (Figura 1.7) (Nichols, 1982).

A partir de estos mecanismos se puede realizar otro tipo de nomenclatura del transporte, según la diferencia de cargas que pueda generarse a través de la membrana. Cuando no hay transferencia neta de cargas a través de la membrana como consecuencia del movimiento de los iones se habla de un transporte electroneutro; este tipo de mecanismo se presenta cuando se transportan un anión y

un catión por un simportador o cuando se transportan dos iones con la misma carga a través de un antiportador. Por otro lado, si hay una diferencia de cargas a través de la membrana provocada por el movimiento de iones, se habla entonces de transporte electrogénico; es decir, puede generar un potencial de membrana, o los iones transportados abaten un potencial preexistente (Nichols, 1982).

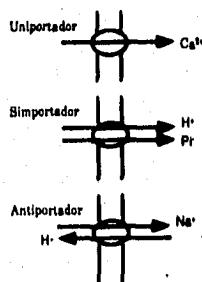


Figura 1.6 Clasificación del transporte iónico. Como ejemplos se muestra el uniportador de Ca^{++} , el simportador Pi/H^+ y el antiportador Na^+/H^+ .

El acoplamiento que existe entre los transportadores de iones con el metabolismo es muy alto, el transporte activo, implica el transporte dependiente de procesos metabólicos, pero no incluye todos los tipos de transporte de iones a través de membrana. La entrada de iones no requiere necesariamente la existencia de una bomba; puede también estar impulsada por una diferencia de potencial en la membrana, o por la diferencia de concentración de iones existente de uno y otro lado de la membrana, que puedan provocar su entrada a favor de ese gradiente (Nichols, 1982).

1.6. Importancia e interacción de diversos iones en la mitocondria.

Algunos compuestos orgánicos e inorgánicos difunden a través de la membrana interna mitocondrial sin necesidad de la existencia de un acarreador específico; entre

ellas se encuentra el oxígeno, el agua, la urea, el etanol y el amoníaco. Los metabolitos con carga difunden lentamente a través de la membrana, pero otros compuestos requieren acarreadores (Guérin, 1991).

Lehninger (1949) reportó que los iones Ca^{2+} desacoplan la fosforilación oxidativa (estimulan la respiración e inhiben la síntesis de ATP). Posteriormente se demostró que la mitocondria aislada contiene K^+ y Mg^{++} , y que la depleción de esos iones inhibe la respiración (Prebble, 1981). El papel del K^+ en la mitocondria se ha estudiado usando ionóforos de potasio como la valinomicina y la nigericina. La mitocondria también contiene aniones tales como los fosfolípidos de la membrana, ortofosfato, difosfato y adenín nucleótidos (Prebble, 1981). Este gradiente de iones es indispensable para ciertas actividades enzimáticas, la regulación del volumen y la generación de potenciales de membrana (Kasner y Ganz, 1992).

La mitocondria puede regular su metabolismo mediante el movimiento de iones. Hay iones como el Ca^{++} , que regulan las funciones mitocondriales (Urbe y cols. 1991). Entre los iones más importantes se encuentran el K^+ , el Ca^{++} , el Na^+ y el Pi . Generalmente estos iones son transportados por acarreadores específicos localizados en la membrana interna mitocondrial. Los cationes monovalentes regulan la fosforilación oxidativa de mitocondrias aisladas de diferentes fuentes (Peña y cols., 1964).

La utilización de moléculas que catalizan el transporte de iones a través de membranas biológicas ha proporcionado una herramienta para estudiar el movimiento de iones en diferentes organelos celulares. De acuerdo al mecanismo de acción de estas moléculas, éstas pueden ser divididas en: a) ionóforos, aquellos compuestos que incrementan la permeabilidad de la membrana a los iones porque los acarrearán a través de la membrana; mueven cationes como el K^+ , el Na^+ , el Ca^{++} y el Mg^{++} ; b) formadores de canales, los cuales alteran la estructura de la membrana formando canales por donde pasan los iones por difusión. Los ionóforos pueden ser clasificados a su vez en neutros y carboxílicos. Dentro de los ionóforos neutros se encuentran la valinomicina, la enantina, etc.; y en los ionóforos carboxílicos se encuentran la nigericina, el A-23187, la monensina, etc.

Los ionóforos traslocan iones de un lado a otro de la membrana electroneutra ó electrogénicamente. Por ejemplo, la traslocación de un catión por un ionóforo neutro, como la valinomicina, puede generar un gradiente eléctrico porque se trasloca una especie iónica cargada como el potasio (K^+) de un sitio en el que la concentración del catión es mayor a otro de menor concentración sin que se mueva un anión en sentido opuesto (Moore y Pressman, 1964). Por esto se genera una diferencia en el potencial. Los ionóforos carboxílicos no inducen una diferencia en el potencial a través de la membrana porque intercambian un catión por un protón de un a otro lado de la membrana (Gómez Puyou y Gómez Lojero, 1977).

1.7 Requerimiento del Potasio (K^+) en la mitocondria

El potasio es uno de los cationes más abundantes en la mitocondria. En las mitocondrias de mamífero alcanza una concentración de 100 a 120 mM (Diwan, 1988).

Este catión parece ser necesario para la actividad del complejo I de la cadena respiratoria y la de la ATPasa de la mitocondria (Uribe y cols., 1991). Se ha visto que el K^+ estimula la hidrólisis y la síntesis de ATP por la F_1-F_0 ATP sintetasa en mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae* (Uribe y cols., 1991). El efecto observado sobre la cadena respiratoria puede ser provocado por otros cationes monovalentes (Peña y cols, 1964).

En las mitocondrias de mamífero se ha descrito un antiportador K^+H^+ , que cataliza la entrada del potasio al citosol, y un uniportador que transporta K^+ a la matriz mitocondrial (Brierley y cols., 1984). Estos dos, en conjunto con el movimiento paralelo de aniones permeantes; como el fosfato, parecen ser responsables de la regulación del contenido y la acumulación del K^+ intramitocondrial, *in vitro* (Garlid, 1979). El significado de estos resultados para la célula *in vivo*, no ha sido definido.

Garlid (1980) propuso que el Mg^{2+} inhibe al antiportador K^+H^+ . El flujo de K^+ hace que aumente o disminuya el volumen de la matriz mitocondrial por la estimulación del antiportador. Se ha demostrado que al agregar quelantes para Mg^{2+} , como EDTA y A23187, se provoca un flujo de potasio que estimula al antiportador

(K^+/H^+) y al uniportador de K^+ (Jung y Brierley, 1986). Sin embargo, Brierley y cols. (1984), encontraron que depletar a la mitocondria de Mg^{++} puede tener efectos inespecíficos en la permeabilidad de la membrana, ya que ésta se desestabiliza en ausencia de Mg^{++} .

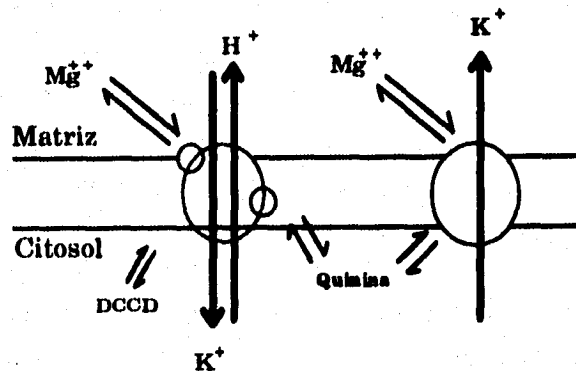


Fig. 1.7. Sistemas de transporte de potasio descritos para las mitocondrias de mamífero. Un antiportador que funciona sacando K^+ a cambio de un H^+ , el cual es bloqueado por Mg^{++} , DCCD y Quinina. Un uniportador que funciona cuando se genera un potencial de membrana ($\Delta\psi$) metiendo K^+ , es inhibido por Mg^{++} y quinina.

La acumulación del potasio en la mitocondria depende de energía (Brierley y cols., 1971); al bloquear la respiración mitocondrial disminuye la entrada y la salida de potasio y otros cationes (Chávez y cols., 1977).

De acuerdo con la teoría quimiósmotica, el uniportador de K^+ funciona mediante la generación de un potencial de membrana (Jung y cols., 1977) y el antiportador funciona mediante la generación de un gradiente de pH (Chávez y cols., 1977). El flujo unidireccional de K^+ cuando la mitocondria está respirando es saturable con respecto al K^+ externo. Para mitocondrias de hígado la K_m aparente del K^+ es de 5 mM y en corazón la K_m aparente es de 12 mM (Diwan, 1987). Este flujo de potasio se inhibe competitivamente por el Tl^+ (similar en tamaño al K^+) (Diwan, 1987). El flujo del potasio por el uniportador se inhibe por Mg^{++} y se activa por la adición de EGTA. La quinina (catión orgánico) inhibe parcialmente el transporte de

potasio por el uniportador (Diwan, 1986). Diwan y cols. (1988) purificaron una proteína de 53 kDa que funciona como uniportador. Martin y cols. (1984), aislaron una proteína de 82 kDa que corresponde al antiportador, al cual se le han adjudicado varios efectos, como el hinchamiento de mitocondrias no energizadas cuando están un medio con acetato (Villalobo y cols., 1981). Al eliminar el Mg^{++} de las mitocondrias se estimula el flujo no electrogénico de K^+ ; la quinina bloquea totalmente la salida de potasio a través del antiportador (Diwan, 1986).

Existen varios métodos para determinar el K^+ en diferentes modelos, como los microelectrodos sensibles a K^+ , el empleo de $^{86}Rb^+$ y la resonancia magnética nuclear los cuales tienen poca aplicación en algunos modelos celulares. Recientemente se desarrolló un indicador fluorescente sensible a K^+ denominado PBFI (Minta y Tsien, 1989), que permite determinar concentraciones de potasio internas en cualquier modelo, con una excelente resolución. El PBFI aumenta su fluorescencia proporcionalmente a la concentración de potasio y se afecta poco en presencia de otro tipo de iones como el Na^+ y el H^+ (Kasner y Ganz, 1992).

1.8 Importancia y mecanismos de transporte de Fosfato (Pi) en la Mitocondria.

El fosfato inorgánico (Pi) es un anión esencial para el crecimiento y la división celular. Es parte del ATP y del DNA (Westheimer, 1987); es transportado por acarreadores específicos localizados en la membrana plasmática y en las membranas de otros organelos incluyendo la mitocondria (Ferreira y Pedersen, 1993).

En las bacterias, la ATP sintetasa produce el ATP en el mismo compartimento donde va a utilizarse. En los eucariotes las mitocondrias producen el ATP en la matriz y tienen que exportarlo al citosol, donde se hidroliza a ADP y Pi. Existen dos transportadores implicados en el recambio de ATP, ADP y Pi a través de la membrana interna mitocondrial: el transportador de fosfato, para la captura del Pi, y la translocasa de adenín nucleótidos que cataliza la entrada del ADP a la matriz mitocondrial y la salida del ATP al espacio intermembranal.

Existen dos sistemas de transporte de Pi en la membrana interna mitocondrial; el principal es un simportador Pi/H^+ , que a su vez sirve como intercambiador Pi/OH^- (Wohlrab, 1986; Wehrle y Pedersen, 1989). El otro sistema es el acarreador $\text{Pi}/\text{dicarboxilato}$, que es un antiportador electroneutro (Kramer y Palmieri, 1992). El antiportador puede ser inhibido con reactivos mercuriales, como el p-mercuribenzoato y el mersalil, y también con N-etilmaleimida (NEM); este transportador de Pi/H^+ es extraordinariamente activo y la distribución de Pi, a través de la membrana, depende del ΔpH (Nichols, 1987).

Recientemente se purificó el simportador de Pi/H^+ o antiportador Pi/OH^- mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* en forma activa. Este aparece como una banda de 35 KDa. En contraste con el simportador Pi/H^+ o Pi/OH^- de mamífero, éste es insensible a NEM y sensible a compuestos mercuriales. Ambos acarreadores presentan estructuras sustancialmente diferentes (Guérin y cols., 1990).

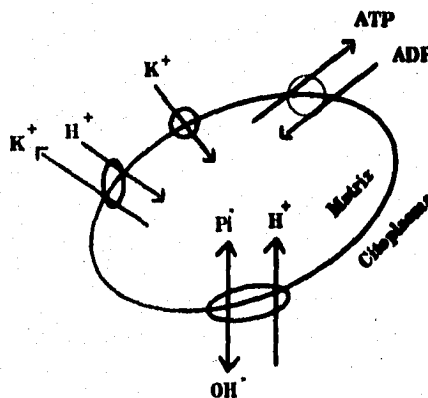


Fig. 1.8. Mecanismo de transporte de Pi por la membrana interna mitocondrial, el cual es llevado a cabo por el simportador Pi/H^+ (Pi/OH^-).

Se ha descrito que el Pi tiene efectos sobre el transporte de Ca^{++} en las mitocondrias de hígado y corazón. Al entrar el Pi a la mitocondria provoca que el Ca^{++} entre (Nicholls y Åkerman, 1982). El Ca^{++} forma un complejo con el Pi en la matriz

mitocondrial (Zoccarato y Nicholls, 1982), acidificando el medio exterior, debido a la salida de protones generada por la cadena respiratoria. Esos protones se generan en la matriz como consecuencia de la formación del complejo Pi-Ca²⁺. La acidificación del medio presenta una estequiometría de 1 H⁺/Ca²⁺. Conforme aumenta la concentración de fosfato en el medio, se observa que disminuye la salida de calcio, cuando esta salida es provocada por la adición de rojo de rutenio (Zoccarato y Nichols, 1982).

En las mitocondrias de mamífero se ha visto que el Pi estimula la entrada de K⁺ a la mitocondria energizada; a causa de que la entrada de fosfato provoca una disminución en el pH de la matriz mitocondrial esto trae como consecuencia que se mantenga constante el bombeo de protones por la respiración y que se mantenga el gradiente eléctrico; este fenómeno se atribuye al transporte de H⁺ por el Pi⁻ (o intercambiador Pi/OH⁻) (Jung y cols, 1977). En ausencia de Pi, la entrada de K⁺ se incrementa al aumentar el pH externo (Beavis y cols, 1985); al inhibir el intercambiador Pi/OH⁻ con N-etilmaleimida, se incrementa la entrada de K⁺ dependiente de pH. Si se activa la fosforilación oxidativa, al adicionar ADP en presencia de Pi, se inhibe la entrada de K⁺, debido probablemente a la reducción del potencial de membrana (Jung y cols, 1977).

El fosfato no sólo es uno de los sustratos en la síntesis del ATP, sino que parece participar en los movimientos y en la acumulación de algunos cationes (Ca²⁺ y K⁺) (Zoccarato y Nichols, 1982; Diwan, 1987). Esta sola razón hace interesante estudiar el papel del fosfato en el funcionamiento mitocondrial; fue por ello que se decidió hacer un estudio sobre el tema en las mitocondrias de levadura.

2. OBJETIVOS.

2.1. Objetivo General.

Caracterizar la interacción del fosfato (Pi) y del potasio (K⁺) y sus efectos sobre la mitocondria de *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2. Objetivos Particulares.

Determinar el efecto del fosfato (Pi), por sí solo, o sobre los efectos del potasio (K⁺) en la mitocondria de *Saccharomyces cerevisiae*.

Determinar el efecto del fosfato (Pi) sobre los movimientos de potasio (K⁺) en la mitocondria de *Saccharomyces cerevisiae*.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materiales:

3.1.1. Material Biológico.

Como material biológico se utilizó la levadura comercial de panadero *Saccharomyces cerevisiae* de la Azteca S. A. de México.

3.1.2. Materiales Químicos.

El manitol, el ácido etanosulfónico (MES), la albúmina sérica bovina, el magnesio, el ADP, el 1799, el carbonilcianin m-clorofenilhidrazona (CCCP), la emulsión antiespumante, la safranina-O, la antimicina-A y el NADH se adquirieron de Sigma Chemical Company, St Louis Mo. EUA El succinato, el ácido fosfórico y el cloruro de potasio, se adquirieron de J. T. Baker ; S. A. de C. V. Xalostoc, México.

3.2. Métodos:

3.2.1. Medio de Cultivo.

Para llevar a cabo el cultivo de las levaduras se utilizó el medio completo de Klöet y cols. (1961); se preparó según la Tabla 3.1. El medio se esterilizó en la autoclave a 15 libras por pulgada cuadrada durante 20 min. a 120 °C.

3.2.2. Preparación de las levaduras.

Se pesaron 80 gr de levadura (peso húmedo) y se colocaron en un vaso de licuadora junto con aprox. 250 ml de medio de Kloet. Se adicionaron de 8 a 10 gotas de antiespumante y se homogenizó durante 10 seg. a máxima velocidad. El cultivo se incubó durante 8 horas aplicándole una aereación de 3 litros/min en un cuarto a temperatura constante (30 °C). Posteriormente se centrifugaron las levaduras a 3500

rpm. durante 5 min., el botón se resuspendió en agua destilada y se centrifugaron nuevamente a la misma velocidad y tiempo; al terminar se resuspendieron en un litro de agua destilada para ayunarlas y se continuaron incubando a 30 °C durante 15 horas.

Tabla 3.1 Reactivos utilizados para preparar el medio de cultivo.

Reactivo	Cantidad para 1 litro
Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)	2 g
Sulfato de Amonio [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]	6 g
Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.513 g
Cloruro de Calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.382 g
Bactopeptona	5 g
Extracto de levadura	2.5 g
Lactato de sodio al 50%	7.12 ml
Glucosa	40 g

3.3. Aislamiento de mitocondrias de levadura.

Después de la incubación las levaduras se centrifugaron a 3500 rpm/ 5 min. y se lavaron con agua destilada y se resuspendieron en un volumen final de 250 ml de medio de Manitol 0.6 M, MES 5 mM, BSA 0.1%, pH 6.8 (TEA) a 4 °C. El rompimiento celular se realizó por agitación en un fraccionador de células Braun utilizando un vaso fraccionador de 80 ml, al cual se adicionaron perlas de vidrio de 0.45 mm de diámetro hasta la mitad y se completó con la suspensión de levaduras. El pulso de agitación fue de 10 seg. bajo flujo continuo de CO_2 .

Posteriormente la suspensión se decantó y el homogenado se sometió a centrifugación diferencial para aislar las mitocondrias de acuerdo al esquema de la figura 3.1 (Peña y cols., 1977).

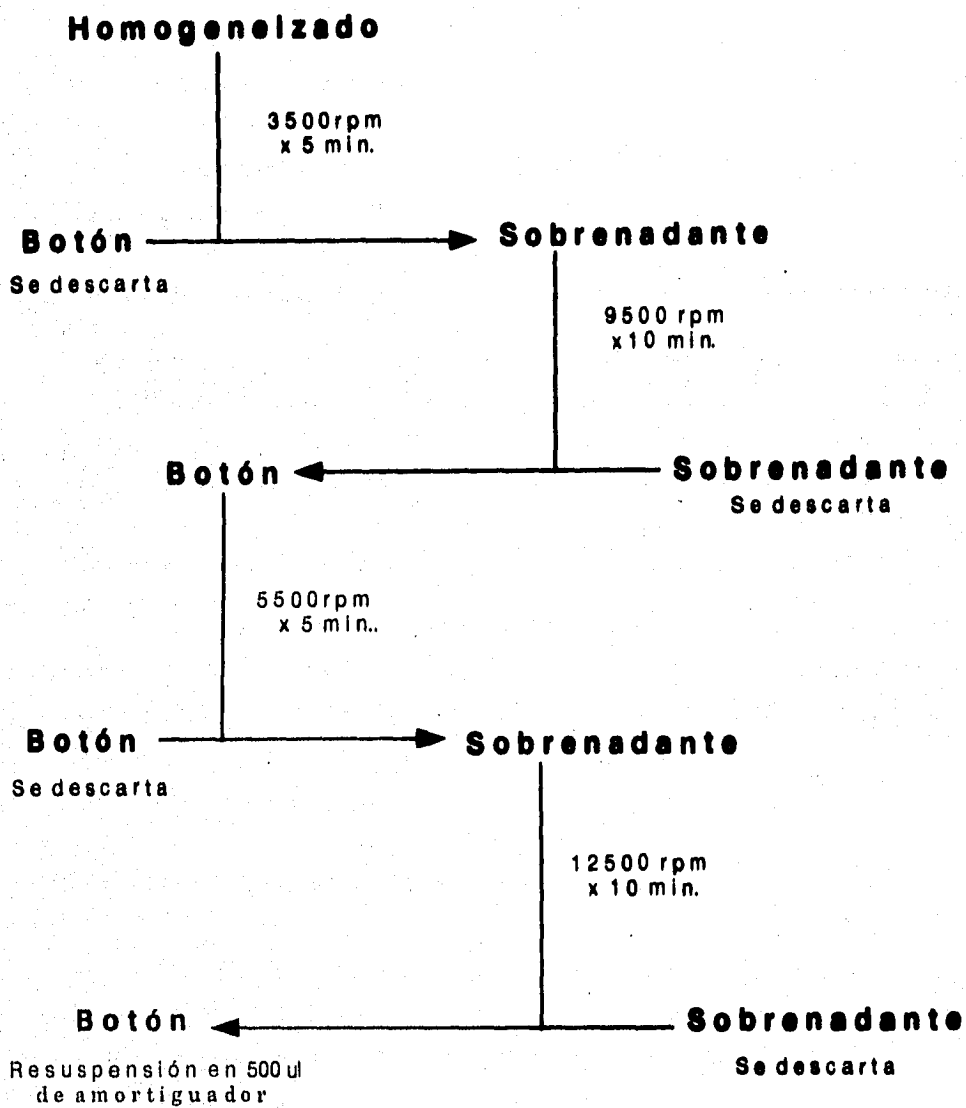


Figura 3.1 Protocolo de centrifugación para la obtención de mitocondrias de levadura. En todos los casos se usó un rotor ss34 de Sorvall. El homogenizado se obtuvo como se describe en métodos. El amortiguador de aislamiento fue, Manitol 0.6M, MES 5mM y BSA 0.1%, pH 6.8 (ajustado con TEA).

3.4. Determinación de proteína.

La concentración de proteína se determinó utilizando el método de Biuret (Tabla 3.2) (Gornal y cols., 1949).

Tabla 3.3 Reactivos utilizados para determinar la concentración de proteína por el método de Biuret.

Reactivos	Tubo blanco	Tubo A	Tubo B
Agua desionizada	375 μ l	350 μ l	350 μ l
DOC 5%	125 μ l	125 μ l	125 μ l
Proteína	-----	25 μ l	25 μ l
Biuret	2 ml	2 ml	2 ml

Una vez preparados los tubos, se agitaron en el "vortex" y se dejaron incubando a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se leyeron en un espectrofotómetro Beckman DU-50 a 540 nm utilizando el tubo blanco para calibrar el aparato. La absorbencia se interpoló con la obtenida por una curva de concentración de albúmina para obtener la concentración de proteína total.

3.4.1. Fórmula para preparar reactivo de Biuret:

Solución I. En un vaso de precipitado se adicionaron 100 ml de agua desionizada; 0,375 gr de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y 1.5 gr de tartrato de sodio potasio (Na-K tartrato); se mezclaron por agitación hasta disolver.

Solución II. En un vaso de precipitado se agregaron lentamente 7.5 gr de hidróxido de sodio (NaOH) y 25 ml de agua desionizada; se mezclaron por agitación hasta disolver.

Cuando ambas soluciones quedaron disueltas, la solución II se adicionó

lentamente a la solución I, obteniendo una coloración azul. posteriormente se aforó a un volumen final de 250 ml.

3.5. Consumo de oxígeno.

El consumo de oxígeno se midió con un electrodo tipo Clark conectado a un oxímetro (YSI 5300) y a un graficador Kipp and Zonen Delft BV. La sensibilidad del electrodo se ajustó al 100% de la escala del oxímetro como sigue: En una cámara de vidrio se adicionó amortiguador de manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH. 6.8 (TEA); 10 μ l/ml de Pi 1 M pH. 6.8 (TEA); 1 μ l/ml de $MgCl_2$ 1 M. El volumen final fué de 3 ml; se eliminó todo el aire de la cámara y como sustrato se utilizó 1 μ l de ETOH por ml o succinato 0.3 M 10 μ l/ml. El trazo se inició para obtener una basal y se adicionaron las mitocondrias a una concentración final de 0.5 mg de prot/ml; se registró durante 3 min. el consumo de oxígeno (Edo. 4) y se adicionaron 2 μ l/ml de ADP 80 mM para generar el estado 3 de la respiración incubando hasta que el trazo regresa al estado 4; después se adicionó el desacoplante 1799 5 mM 1 μ l/ml (5 μ M) para obtener el estado desacoplado.

3.6. Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$).

La determinación del potencial se llevó a cabo mediante el método de Akerman y Wikström (1976), empleando el colorante catiónico safranina-O como indicador. Las determinaciones de los cambios de absorbencia se hicieron con ayuda de un espectrofotómetro de doble rayo (SLM AMINCO DW2000) en modo dual. Las longitudes de onda a las que se ajustaron los monocromadores fueron 511 y 533 nm. Se utilizaron celdas de cuarzo de 3 ml con 1 cm de paso de luz. Los experimentos se realizaron en un amortiguador de Manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH.6.8 (TEA). Como sustrato se adicionó 1 μ l/ml de etanol (96 %); 1 μ l/ml de $MgCl_2$ 1M; 1 μ l/ml de safranina 10 mM; mitocondrias 0.5mg/ml. Se variaron las concentraciones de Pi (0 a 8 mM); manteniendo una concentración fija de KCl 20 mM; volumen final 2 ml.

3.7. Hinchamiento mitocondrial (Swelling).

El hinchamiento mitocondrial se midió por un cambio en la absorbencia de luz a 540 nm. El cambio en absorbencia se determinó en un espectrofotometro de doble rayo (SLM AMINCO DW2000) en modo split. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente. En una celda de cuarzo de 3 ml, con 1 cm de paso de luz; se adicionó buffer de manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 (TEA). Como sustrato se adicionó etanol (96 %) 1µl/ml. Como anión permeante se utilizaron Pi a diferentes concentraciones (0 a 4 mM) y acetato a las mismas concentraciones. Adicionando o no KCl 20 mM; volumen final 2 ml.

3.8. Determinación del potasio extramitocondrial.

Esta determinación se realizó utilizando un electrodo para cationes monovalentes (Corning) conectado a un potenciómetro tipo Schlumberger modelo EU-200-30 y un graficador (Honeywell Electronic, 196). El experimento se realizó en una cámara de volumen variable, manteniendo una temperatura constante de 30 °C con un baño circulante (Haake FE2). El amortiguador utilizado fue Manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH. 6.8 (TEA). Como sustrato se utilizó etanol (96 %) 2 µl/ml, Pi 2 mM, mitocondria 0.5 mg de prot./ml. Volumen final 10 ml. Se incubó a 30 °C por tres minutos, midiendo el K⁺ extracelular y después se adicionó CTAB 0.3 mM para provocar la salida de la totalidad del potasio intramitocondrial. Antes de los experimentos se realizaron curvas de calibración agregando concentraciones conocidas de KCl.

4. RESULTADOS

Se analizaron los efectos de diferentes concentraciones de Pi sobre la fosforilación oxidativa en mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando etanol como sustrato de la NADH deshidrogenasa en presencia y ausencia de KCl 20 mM. Se observaron valores para el control respiratorio entre 1.7 y 2.1.

Sin fosfato la velocidad de consumo de oxígeno en el estado cuatro de la respiración fue de 67 $\text{natg O}_2/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (Figura 4.1, Tabla 4.1). Cuando se adicionó potasio (20 mM) al medio de incubación en ausencia de fosfato, se observó un aumento en el consumo de oxígeno en el estado cuatro de la respiración (aproximadamente cinco veces), (Figura 4.2, Tabla 4.1). El efecto producido al adicionar 20 mM de potasio se vió disminuido al aumentar poco a poco la concentración de fosfato en el medio, es decir, al parecer el fosfato tiene un efecto acoplante sobre la fosforilación oxidativa evitando que el potasio acelere mucho la respiración. Esto provocó que el cociente respiratorio se incrementara conforme aumentaba la concentración de fosfato, hasta alcanzar un valor del control respiratorio semejante al que se obtuvo en el control (C.R.=1.7).

Al variar la concentración de Pi de 0 a 800 μM en presencia de 20 mM de KCl se observó un aumento del consumo de oxígeno de (276 a 362 $\text{natg O}_2/\text{min}/\text{mg}$ de prot.), sin que variara el control respiratorio. Al adicionar desacoplante 1799 (5 μM), a estas concentraciones de fosfato, no se observó un aumento en la respiración. En ausencia de K^+ se observó el estado desacoplado; aunque no hubo diferencia entre el estado tres y cuatro (Tabla 4.1).

Al variar la concentración de Pi de 1 mM a 8 mM en presencia de 20 mM de KCl se observó que disminuye la velocidad de consumo de oxígeno en el estado cuatro y aparece una diferencia entre el estado tres, cuatro y el desacoplado. El fosfato acopla la respiración y disminuye el efecto del potasio sobre el consumo de oxígeno. A mayor concentración de Pi, el control respiratorio es mayor (Tabla 4.1).

El efecto del K^+ en presencia de 8 mM de Pi concuerda con los resultados obtenidos por Uribe y cols. (1991) quienes encontraron que el K^+ acelera el consumo

de oxígeno en presencia de un sustrato para el sitio I de la cadena respiratoria.

Tabla 4.1. Efectos de diferentes concentraciones de fosfato, en presencia y ausencia de potasio, sobre el consumo de oxígeno por mitocondrias de levadura en presencia de etanol. Estos datos fueron utilizados para obtener las figuras 4.1 y 4.2.

Condiciones	EDO 3	EDO 4	E. Desac.	C.R.
Pi 0 mM	-----	67 ± 6	129 ± 31	1
Pi 0 mM + K ⁺ 20 mM	-----	362 ± 26	362 ± 26	1
Pi 200 μM	97 ± 0	97 ± 0	185 ± 6	1
Pi 200 μM + K ⁺ 20 mM	311 ± 25	311 ± 25	311 ± 25	1
Pi 400 μM	131 ± 3	84 ± 6	147 ± 19	1.5 ± 15
Pi 400 μM + K ⁺ 20 mM	276 ± 26	276 ± 26	276 ± 26	1
Pi 600 μM	135 ± 9	97 ± 14	159 ± 12	1.4 ± 0.3
Pi 600 μM + K ⁺ 20 mM	235 ± 6	173 ± 6	240 ± 19	1.3 ± 0.01
Pi 1 mM	149 ± 9	105 ± 26	177 ± 12	1.3 ± 0.02
Pi 1 mM + K ⁺ 20 mM	246 ± 22	169 ± 25	244 ± 31	1.6 ± 0.1
Pi 2 mM	169 ± 12	113 ± 9	167 ± 6	1.5 ± 0.01
Pi 2 mM + K ⁺ 20 mM	262 ± 6	155 ± 6	269 ± 9	1.7 ± 0.02
Pi 4 mM	175 ± 16	126 ± 22	160 ± 26	1.4 ± 0.1
Pi 4 mM + K ⁺ 20 mM	302 ± 25	173 ± 6	284 ± 12	1.7 ± 0.08
Pi 8 mM	224 ± 3	144 ± 16	209 ± 6	1.6 ± 0.2
Pi 8 mM + K ⁺ 20 mM	293 ± 13	169 ± 12	282 ± 26	1.7 ± 0.2

Medio de reacción: Manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 (TEA). Se utilizó etanol como sustrato de la cadena respiratoria. El fosfato se adicionó a las concentraciones finales indicadas a partir de una solución de ácido fosfórico 1 M pH 6.8 (TEA). Se adicionaron mitocondrias a una concentración final de 0.5 mg prot/ml. Para obtener el estado tres de la respiración, se adicionaron 480 nmolas de ADP. Para generar el estado desacoplado de la respiración se adicionaron 5 μM de 1799. El control respiratorio (C.R.) es el resultado de dividir la velocidad de consumo de oxígeno en el estado tres sobre el estado cuatro. Los datos son el resultado de tres experimentos diferentes.

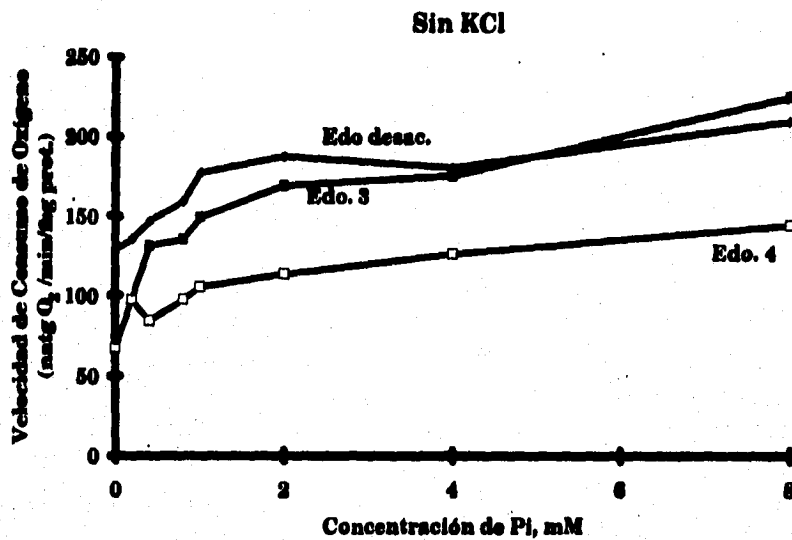


Figura 4.1 Efecto de concentraciones crecientes de fosfato sobre el consumo de oxígeno por mitocondrias de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de etanol. Condiciones experimentales como en la tabla 4.1.

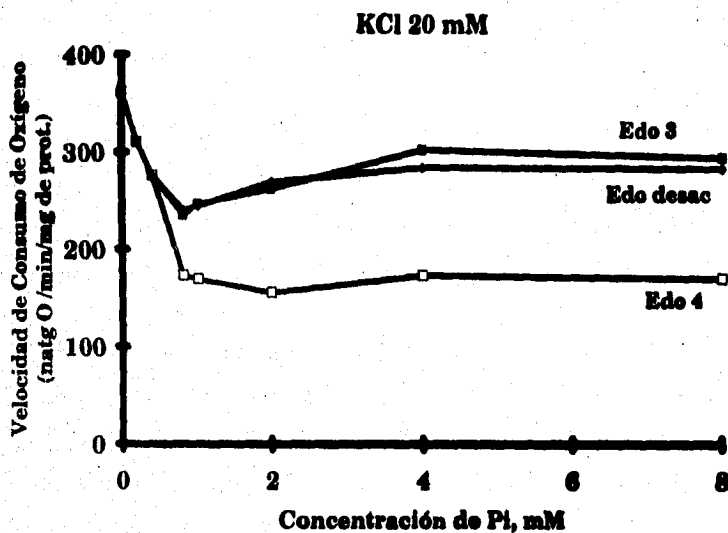


Figura 4.2 Efecto de concentraciones crecientes de fosfato, en presencia de una concentración fija de K⁺, sobre el consumo de oxígeno por mitocondrias de levadura con etanol como sustrato. La concentración de KCl empleada fue de 20 mM. Las condiciones de reacción se describen en la Tabla 4.1.

También se analizaron los efectos del fosfato sobre la respiración mitocondrial cuando se utilizó succinato, que cede sus electrones a nivel del complejo II de la cadena respiratoria, se analizaron los efectos del fosfato sobre el consumo de oxígeno en presencia de succinato como sustrato.

Los efectos que ocasionaron las adiciones de diferentes concentraciones de fosfato sobre la fosforilación oxidativa cuando se utilizó al succinato como sustrato, para reducir la Succinato deshidrogenasa, en presencia y ausencia de potasio se observan en la Tabla 4.2. En ausencia de fosfato se observó que la velocidad de consumo de oxígeno obtenida en el estado tres y cuatro fue de 71.5 $\text{natg O}_2/\text{min}/\text{mg}$ de prot., presentando un control respiratorio de 1 (Figura 4.3, Tabla 4.2). Al adicionar 20 mM de potasio al medio de incubación en ausencia de fosfato se observó un pequeño incremento en el consumo de oxígeno a 86.6 $\text{natg O}_2/\text{min}/\text{mg}$ de prot. durante el estado cuatro de la respiración, y al adicionar el desacoplante no se observó el estado desacoplado de la respiración (Figura 4.4, Tabla 4.2).

A bajas concentraciones de fosfato (0 a 800 μM), la velocidad de consumo de oxígeno en presencia de K^+ se estimuló más que en ausencia de potasio (Figura 4.3, Figura 4.4). Cuando se determinó el cociente respiratorio se obtuvo un control respiratorio cercano a 1; es decir que el estado 3 de la respiración no fue evidente a estas concentraciones de Pi. A diferencia de lo que se observó al adicionar un sustrato para el sitio 1 de la cadena, en presencia de succinato y bajas concentraciones de fosfato, se observó estado desacoplado al adicionar el 1799. Cuando no había potasio en el medio de incubación también se observó el estado desacoplado, aunque el consumo de oxígeno fue menor que en presencia de potasio (Figura 4.4) adicionando las mismas concentraciones de fosfato en los dos casos.

Al aumentar la concentración de Pi (1 a 8 mM) en el medio de incubación se observó que el control respiratorio aumentó hasta valores de 1.4 - 1.5 cuando la concentración de fosfato que se empleó fue de 8 mM. Este incremento en el control respiratorio se observó tanto en mitocondrias incubadas con potasio como en ausencia de potasio. También se observó que en presencia de potasio, el consumo de oxígeno en el estado 4 y 3 de la respiración es un poco mayor que en su ausencia; este mismo

efecto se observó para todas las concentraciones de Pi que fueron utilizadas (Figura 4.3, Figura 4.4).

Tabla 4.2. Efectos de diferentes concentraciones de fosfato, en presencia y ausencia de potasio, sobre el consumo de oxígeno por mitocondrias de levadura en presencia de succinato. Estos datos fueron tomados para obtener la figura 4.3 y 4.4.

Condiciones	Edo. 3	Edo 4	Edo Des	C. R.
Pi 0 mM	-----	71.5±10	88.8±28	1
Pi 0 mM + KCl 20 mM	-----	86.6±12	86.6±12	1
Pi 200 µM	118.7±17	109.3±25	120±20	1.1±0.13
Pi 200 µM + KCl 20 mM	193.2±15	193.2±15	196.5±17	1
Pi 400µ	134.8±24	118.7±28	145.4±27	1.15±0.1
Pi 400µ + KCl 20 mM	198.5±21.4	117.1±45	190±25	1.2±0.22
Pi 800µ	151.5±13	129.2±27	140±17.2	1.2±0.2
Pi 800µ + KCl 20 mM	224.1±36	157.4±36.7	185±27	1.46±0.22
Pi 1 mM	138.6±12	117.6±32	132.4±23	1.24±0.26
Pi 1 mM + KCl 20 mM	232.2±42	154.62±31	175±11.4	1.53±0.23
Pi 2 mM	154±31	124±34	142±28	1.3±0.2
Pi 2 mM + KCl 20 mM	243±41	160±39	192±27	1.6±0.2
Pi 4 mM	158±16	112±32	122±27	1.5±0.33
Pi 4 mM + KCl 20 mM	229±43	145±37	175±36	1.54±0.08
Pi 8 mM	162±24	118±35	132±25	1.4±0.22
Pi 8 mM + KCl 20 mM	218±27	152±30	162±23	1.45±0.1

Medio de reacción: Manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 (TEA). Se utilizó succinato 30 mM como sustrato de la cadena respiratoria. Las demás condiciones experimentales son semejantes a las descritas en la tabla 4.1.

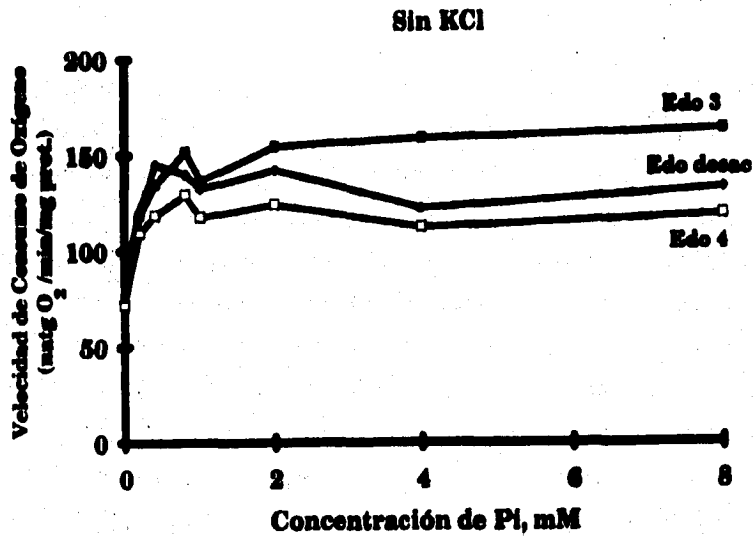


Figura 4.3 Efecto de diferentes concentraciones fosfato sobre el consumo de oxígeno por mitocondrias de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de succinato. Las condiciones experimentales se describen en la Tabla 4.2.

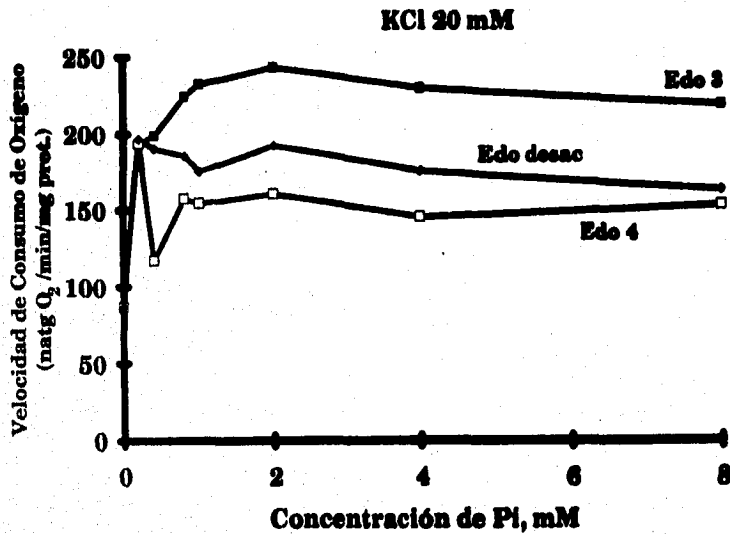


Figura 4.4 Efecto de diferentes concentraciones de fosfato sobre el consumo de oxígeno, en presencia de una concentración fija de K⁺, por mitocondrias de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de succinato. La concentración de potasio empleada fue de 20 mM. Las condiciones experimentales se describen en la Tabla 4.2.

Debido a los cambios producidos por el fosfato sobre la respiración mitocondrial y los efectos del K^+ , se decidió medir el potencial transmembranal en presencia de diferentes concentraciones de Pi y una concentración fija de K^+ . Las concentraciones de Pi y K^+ empleadas fueron las mismas que se utilizaron para la respiración.

En ausencia de fosfato en el medio de incubación y al adicionar el sustrato para generar el potencial de membrana (etanol) sólo se generó un potencial de membrana transitorio, seguido de un decremento a 27 mV del potencial. Al adicionar K^+ el potencial transmembranal se abatió completamente, y al adicionar el desacoplante 1799 ya no se observó respuesta (Figura 4.5). Por el contrario, al incubar las mitocondrias con 10 mM de Pi, se generó potencial de membrana de 180 mV al adicionar sustrato para activar la cadena respiratoria. Cuando se adicionó K^+ al medio sólo se observó, un pequeño abatimiento de 10 mV en el potencial a esta concentración de Pi. El potencial se abatió completamente con el desacoplante, 1799 (Figura 4.5).

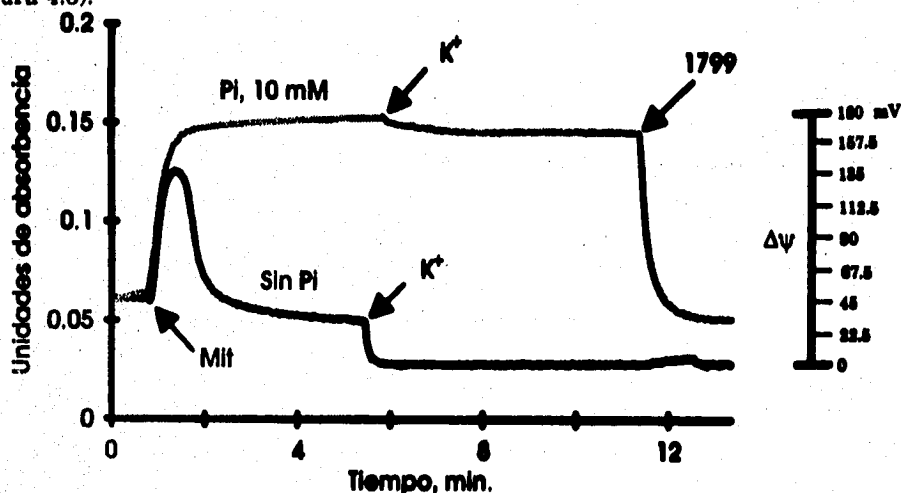


Figura 4.5 Efecto del Pi sobre el potencial transmembranal en mitocondrias de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, con etanol como sustrato. Se utilizaron concentraciones stock de 1 M de ácido fosfórico, pH 6.8 (TEA), 1 M de KCl y 5 mM de 1799. Se adicionaron como se indica a las concentraciones finales de: Pi 10 mM, KCl 20 mM y 1799 5 μ M. La concentración final de mitocondria fué de 0.5 mg de prot./ml. Safranina-O 10 μ M. Las longitudes de onda a los que se midió fueron 511 y 533 nm en un espectrofotómetro de doble rayo Aminco DW2000 en modo dual.

Al adicionar Pi a las mitocondrias no incubadas previamente con Pi se apreció un potencial transmembranal de 180 mV, que se abatió con el desacoplante 1799, hasta 67.5 mV (Figura 4.6). Esto nos indicó que el fosfato es un anión indispensable para que se pueda generar el potencial de membrana y para modular el efecto que realiza el potasio sobre la mitocondria; porque cuando se midió el potencial a mitocondrias a las que no se les adicionó fosfato se observó que no se puede mantener el potencial si no hay fosfato en el medio (Figura 4.6).

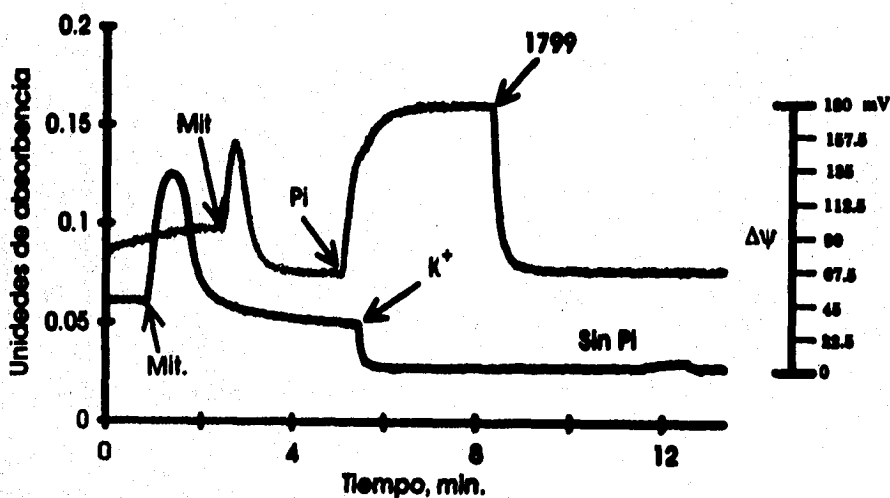


Figura 4.6 Efecto de la adición tardía de Pi sobre el potencial transmembranal en mitocondrias de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, con etanol como sustrato. Las condiciones de reacción son semejantes a las descritas en la figura 4.5 excepto que 10 mM de fosfato se adicionaron después de iniciado el trazo.

Debido a que con 10 mM de fosfato no se abatió el potencial transmembranal al adicionar potasio 20 mM, se decidió medir el potencial de membrana variando las concentraciones de fosfato y adicionando una concentración fija de potasio (20 mM) durante el experimento.

Al aumentar la concentración de Pi en el medio de incubación, de 200 μM a 800 μM , se observó el potencial transmembranal que se mantiene en 180 mV, el cual puede ser abatido a 0 mV al adicionar K^+ al medio, debido a la entrada de potasio a la mitocondria. Como ya se había mencionado, el potasio entra a la mitocondria gracias a la generación de un potencial de membrana, esta entrada de potasio provoca el abatimiento del potencial (Figura 4.7).

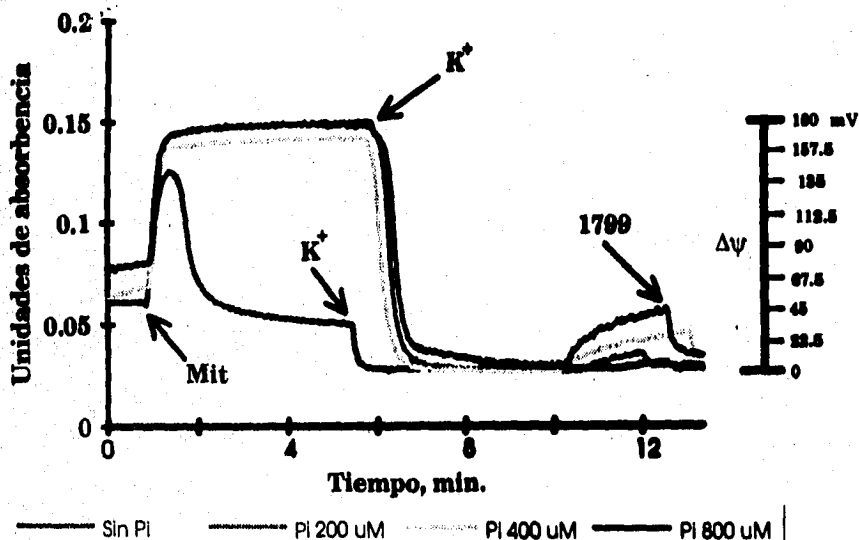


Figura 4.7 Efecto de concentraciones bajas de fosfato sobre el potencial transmembranal de mitocondrias de la levadura *Saccharomyces cerevisias*, con etanol como sustrato. Se adicionarán a las concentraciones finales: Pi 200 μM , 400 μM y 800 μM , KCl 20 mM, 1799 μM . Las condiciones experimentales son semejantes a las descritas en la figura 4.5.

El abatimiento del potencial transmembranal provocado por el potasio disminuyó conforme se incrementó la concentración de fosfato. Como se muestra en la Figura 4.8, a concentraciones de Pi que van de 1 mM a 2 mM, el potencial no se abatió completamente por la presencia de K^+ sino que permaneció en un rango de 23 a 99 mV. A 4 y 8 mM Pi el efecto del potasio fue mínimo pues el potencial se conservó a 150 mV (Figura 4.8).

A 2 y 4 mM de fosfato se observó una regeneración parcial del potencial transmembranal posterior a la adición de potasio. Los potenciales obtenidos a estas concentraciones fuerón de 99 y 148 mV.

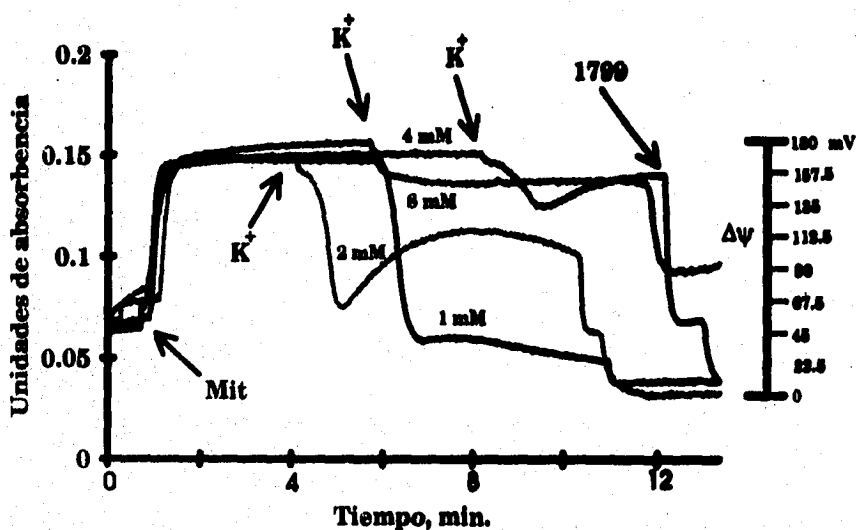


Figura 4.8 Efecto de concentraciones altas de fosfato sobre el potencial transmembranal de mitocondrias de la levadura *Saccharomyces cerevisias*, con etanol como sustrato. Se adicionaron a las concentraciones finales: P_i 1 mM, 2 mM, 4 mM y 8 mM, KCl 20 mM, 1799.5 μM . Las condiciones de reacción son semejantes a las descritas en la figura 4.5.

Estos resultados nos sugirieron que el fosfato actúa ya sea como anión permeante en la mitocondria o forma un complejo con el K^+ , como sucede para el Ca^{2+} (Zoccarato y Nicholls, 1982).

Para determinar si actúa como un anión permeante, se utilizó Acetato como anión permeante; en las mismas concentraciones que se utilizó el Pi, y se determinó el potencial transmembranal. Los resultados indicaron que en presencia de acetato sólo se generó un potencial transmembranal pequeño a todas las concentraciones utilizadas, que se abatió con K^+ (Figura 4.9).

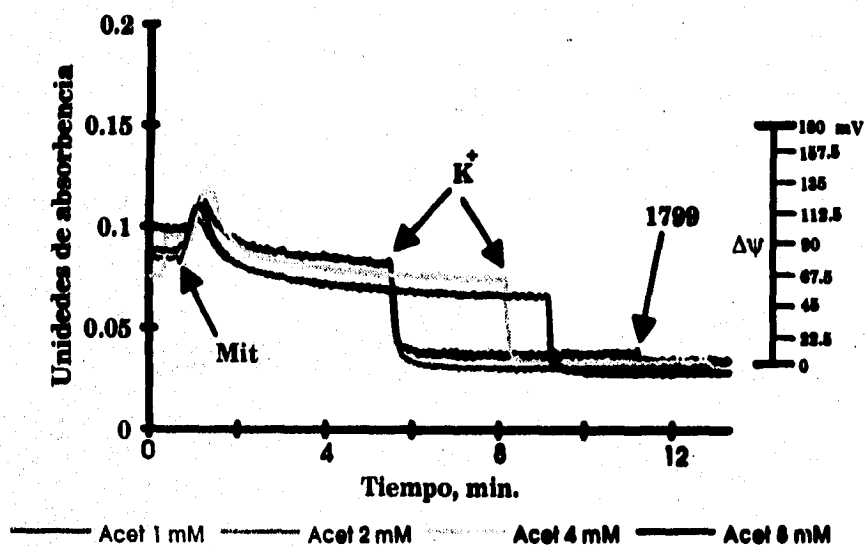


Figura 4.9 Efecto de diferentes concentraciones de acetato sobre el potencial transmembranal de mitocondrias de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, con etanol como sustrato. Se adicionaron a las concentraciones finales: Acetato 1 mM, 2 mM, 4 mM y 8 mM, KCl 20 mM, 1799 5 μ M. La concentración final de mitocondrias fue de 0.5 mg de prot/ml. Las condiciones de reacción son semejantes a las descritas en la figura 4.5, excepto la adición de acetato.

Otro parámetro que se vio afectado por la presencia o ausencia de fosfato en el medio es el incremento en el volumen mitocondrial (swelling). Se estudió el efecto del potasio sobre el volumen mitocondrial al agregar fosfato al medio de incubación. Con 0.4, 2 y 4 mM de fosfato no se observaron cambios en el volumen mitocondrial; además el potasio no produjo cambios importantes en el volumen mitocondrial al agregarlo al medio y a esas concentraciones de Pi (Figura 4.10).

Este mismo parámetro se midió utilizando al acetato como anión en lugar de utilizar al fosfato, a concentraciones semejantes a las que se utilizó el fosfato. A todas las concentraciones de acetato empleadas hubo hinchamiento mitocondrial provocado por la entrada de potasio a la mitocondria (Figura 4.11); lo cual indicó que el fosfato, y no el acetato, produce efectos importantes sobre el volumen mitocondrial provocado por la entrada de potasio a la mitocondria.

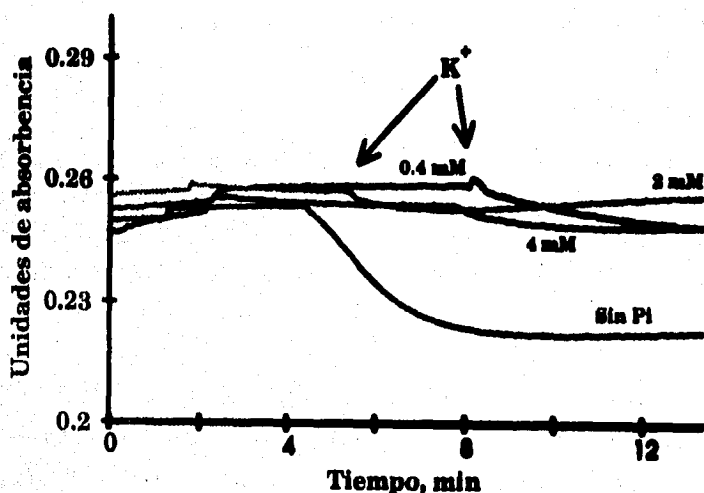


Figura 4.10 Efecto de diferentes concentraciones de fosfato sobre el cambio de volumen (Swelling) en mitocondrias de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Mezcla de reacción manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 TEA; más Pi 400 μ M, 2 mM y 4 mM, KCl 20 mM, etanol como sustrato. La concentración final de proteína fue de 0.5 mg de prot./ml. Las longitudes de onda en la que se midió fue a 540 nm, en un espectrofotómetro de doble rayo Aminco DW2000 en modo split, volumen final 2 ml.

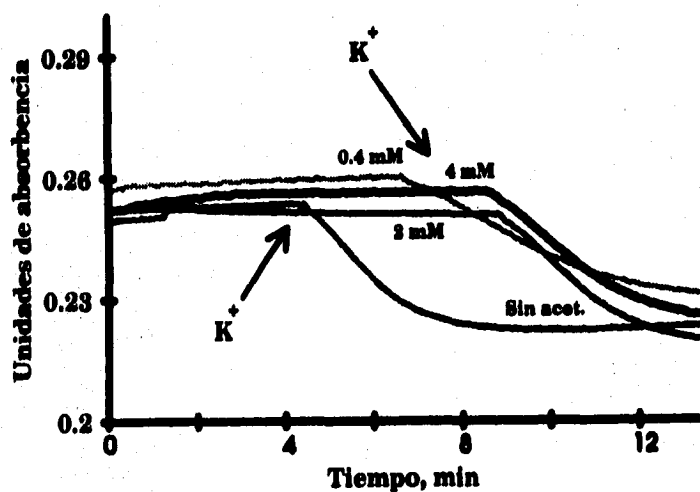


Figura 4.11 Efecto de diferentes concentraciones de acetato sobre el cambio de volumen (Swelling) en mitocondrias de la levadura *Saccharomyces cerevisias*. Las concentraciones empleadas fueron: Acetato 400 μ M, 2 mM y 4 mM, KCl 20 mM. La concentración final de proteína fue de 0.5 mg de prot./ml. Las condiciones de reacción son semejantes a las descritas en la figura 4.10.

Se decidió medir también la síntesis de ATP, utilizando diferentes concentraciones de fosfato. La síntesis de ATP se incrementó conforme se aumentó la concentración de Pi. La figura 4.12 muestra que la síntesis de ATP se saturó a 8 mM de fosfato, se obtuvo una K_m de 1.32 ± 0.063 nmolas y una velocidad máxima de 45.3 ± 0.77 nmolas⁻¹·min·mg prot. en ausencia de potasio. Al adicionar etanol y 20 mM K^+ , la síntesis de ATP aumentó corroborando los resultados obtenidos por Uribe y cols. (1991) (Figura 4.13). La velocidad máxima que se obtuvo fue de 53.8 ± 2.4

nmoles⁻¹minmg prot. y la Km fue de 1.04 ± 0.13 mmoles cuando el potasio estaba presente(Figura 4.12).

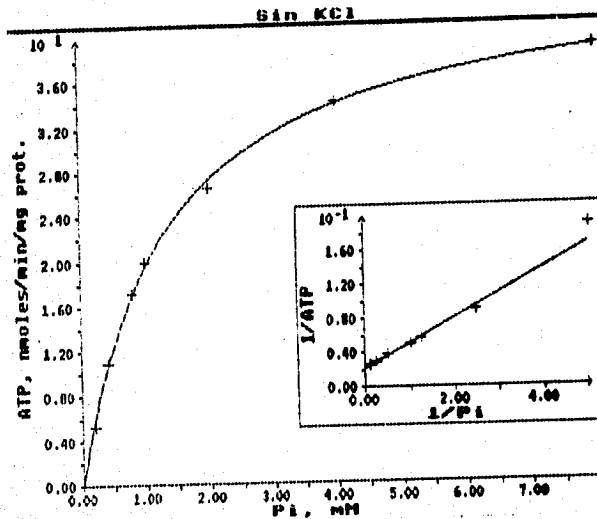


Figura 4.12 Efectos del fosfato en la actividad fosforilante de la mitocondria de levadura. Mezcla de reacción: 0.6 M manitol, 5 mM MES, pH 6.8 (TEA), Pi, pH 6.8 TEA 200 μ M, 400 μ M, 800 μ M, 1 mM, 2 mM, 4 mM y 8 mM, 2 mM MgCl, 20 mM glucosa, 140 μ M NADP⁺, hexocinasa 13 mg/ml, glucosa 6-Pi deshidrogenasa 4 unidades, 2 mM ADP, volumen final 2 ml. Substrato etanol 5 mM.

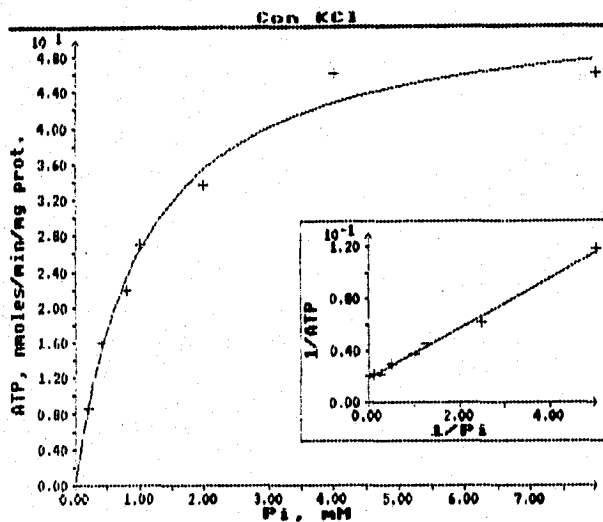


Figura 4.13 Efectos del fosfato y potasio en la actividad fosforilante de la mitocondria de levadura. Mezcla de reacción: manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 (TEA), Pi, pH 6.8 TEA 200 μ M, 400 μ M, 800 μ M, 1 mM, 2 mM, 4 mM y 8 mM, MgCl 2 mM, glucosa 30 mM, NADP⁺ 140 μ M, hexocinasa 13 mg/ml, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa 4 unidades, ADP 2 mM, volumen final 2 ml. Substrato etanol 5 mM. Se adicionó KCl 20 mM.

A causa de la modulación del fosfato sobre algunos de los efectos del potasio en las mitocondrias y viceversa, se decidió determinar si la concentración de potasio en la matriz mitocondrial variaba en presencia y ausencia de fosfato; se utilizó un electrodo catiónico de potasio, con el cual se determinó el potasio que sale de la mitocondria. En la figura 4.14, se muestra que la salida de potasio no se ve afectada al adicionar fosfato al medio de incubación.

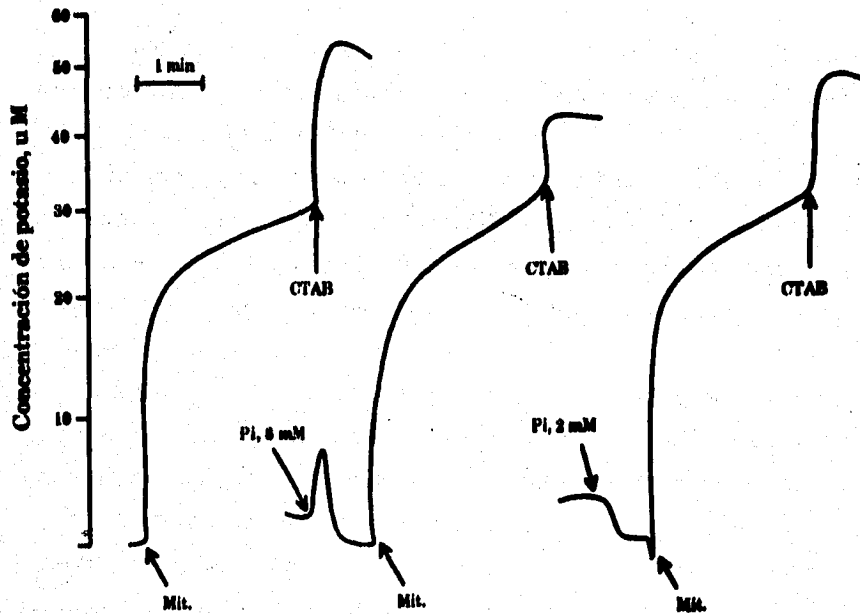


Figura 4.14 Efecto del fosfato sobre la salida de potasio en mitocondrias de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Medio de reacción: Manitol 0.8 M, MES 5 mM, pH 6.8 (TEA). Sustrato EtOH 96 %. Volumen final 5 ml. Se incubó a 30 °C por 3 minutos midiendo el potasio extracelular y se adicionó CTAB 0.3 mM para provocar la salida de potasio. Se utilizaron dos concentraciones de fosfato 2 y 8 mM desde el inicio del trazo siguiendo el procedimiento anterior. Se comparó con una curva de calibración realizada con concentraciones conocidas de KCl.

5. DISCUSION

Los cationes monovalentes, en especial el potasio, son esenciales para diversas funciones en la mitocondria. El potasio es uno de los cationes más abundantes en las células de los seres vivos (Diwan, 1988).

El transporte de fosfato inorgánico es también esencial para mantener la fosforilación oxidativa que se realiza en la mitocondria; la proteína responsable de este proceso es el acarreador de fosfato (Simportador P_i/H^+) (Wohlrab, 1986). Se ha descrito que la presencia del fosfato puede modular la entrada de potasio a la mitocondria (Diwan, 1987).

Beavis y cols. (1985), demostraron que en ausencia de fosfato aumenta la entrada de potasio a las mitocondrias de hígado de rata, debido a que aumenta el pH externo; estos autores no midieron el efecto sobre el potencial transmembranal.

El efecto más interesante del fosfato en este trabajo, fue el del acoplamiento, que se observó tanto con el etanol, como con el succinato como sustratos de la cadena respiratoria. Sin embargo, hay que mencionar que aún en ausencia de fosfato, tanto con etanol como con succinato y en ausencia de potasio, sí parece haber un potencial que, aunque pequeño, permite observar una estimulación de la respiración por los desacoplantes, que no se ve con ADP, cuando no hay fosfato, o si su concentración es baja (0.2 mM P_i).

Este efecto "acoplante" del fosfato es claro y se demuestra, por la relación entre los estados tres y cuatro, por el efecto de los desacoplantes, por la capacidad de las mitocondrias de establecer un potencial, medido con safranina, y por la capacidad para la síntesis del ATP. Debe señalarse que la medida del potencial y la de la síntesis del ATP se hizo sólo con etanol como sustrato; se esperaba que los resultados fueran semejantes, en ambos parámetros con succinato.

El casi inexistente potencial en ausencia de fosfato no es irreversible; se puede producir si el anión se añade después de iniciar la incubación.

Con los datos obtenidos no es posible aún postular algún mecanismo, pero es sumamente interesante que el fosfato se requiera, no sólo para la fosforilación, sino

para que se genere el potencial. Un experimento interesante es comparar estos resultados con lo que sucedería en las mitocondrias de hígado, o de corazón de mamífero.

Otro de los efectos interesantes del fosfato solo, es la capacidad que muestra para acelerar la respiración, en el estado 3, que es lógico, pues se requiere para fosforilar al ADP en la síntesis del ATP; el mecanismo no es tan claro en el estado desacoplado, o en el estado 4, tanto con etanol, como con succinato como sustratos. Aunque la aceleración del consumo de oxígeno puede ser efecto específico del fosfato, pudiera serlo también la fuerza iónica, y valdría la pena estudiarlo con otras sales. Podría también tratarse de un efecto directo del Pi o de la fuerza iónica sobre alguno (s) de los componentes de la cadena respiratoria. Para explorar esta posibilidad, se podrían hacer experimentos con mitocondrias rotas o en soluciones hipotónicas.

Hay un dato que pareciera no concordar: con etanol como sustrato, en ausencia de fosfato y potasio, en donde casi no se genera potencial, el desacoplante estimula la respiración. El experimento sugiere que el pequeño potencial que se produce es suficiente para que la mitocondria muestre algo de acoplamiento; este valor parece ser suficiente para que el desacoplante, pero no el ADP (porque no hay fosfato), estimule la respiración. Además, probablemente por la necesidad de energía para la entrada del potasio, que al ser agregado, entra y colapsa el potencial, es que se estimula la respiración, dando por una parte la aceleración de la respiración, en parte porque abate el potencial, y por la otra, por la estimulación ya conocida del sitio I (Uribe y cols., 1991).

El otro efecto importante es el de la aceleración de la respiración por el potasio, que en el caso del etanol como sustrato es complicado; nuevamente se afecta por la presencia del fosfato; es relativamente grande en ausencia del anión, pero disminuye a medida que éste aumenta y las mitocondrias se acoplan. El potasio estimula el funcionamiento del sitio I de la mitocondria (Uribe y cols., 1991), pero los datos también muestran, aunque no de la misma magnitud, efectos sobre el sitio II. Este dato, por otra parte, si se logra confirmar, es muy interesante, pues en las mitocondrias animales, no se ha reportado ningún efecto sobre la oxidación del

succinato.

Son interesantes también los efectos del potasio sobre la síntesis del ATP, en especial sobre la K_m aparente para el fosfato. Además, a medida que las concentraciones de fosfato aumentan, se vuelve también menor el efecto del potasio, en el sentido de abatir el potencial; una de las posibilidades es un efecto de facilitación del transporte del fosfato por el potasio, esto ocurriría si en el interior de la mitocondria se formara un complejo entre el fosfato y el potasio, lo cual traería como consecuencia una mayor entrada de potasio a la mitocondria; algo semejante ocurre en mitocondria de mamífero donde Zoccarato y Nicholls (1992) describen la formación de un complejo entre el fosfato y el calcio; por otra parte, las constantes de disociación de las sales de fosfato de potasio deben ser mucho mayores que las del calcio. Otra posibilidad es que los dos compuestos entren juntos a la mitocondria, y que el potasio favoreciera la entrada del fosfato, lo cual explicaría que el potasio disminuya la K_m aparente del fosfato, por el simple hecho de que en presencia de potasio, haya una mayor entrada de fosfato; finalmente, puede haber una interrelación de los sistemas de transporte, pues no sería de extrañar que la entrada de un catión (potasio) favoreciera la de un anión (fosfato). El experimento, por otra parte, se puede hacer, midiendo la velocidad del transporte del fosfato en presencia y en ausencia de distintas concentraciones de potasio.

Los datos parecen congruentes con la idea de que a concentraciones bajas de fosfato, el potasio entra a favor del potencial, abatiéndolo; y a altas concentraciones de fosfato, entrara junto con él, y el transporte fuera electroneutro, sin efecto sobre el potencial. En estas condiciones, lo que se estaría observando sería sólo el efecto de la acumulación de cantidades grandes del catión monovalente sobre el sitio I de la cadena respiratoria (Uribe y cols., 1991).

Estos datos, muestran un efecto interesante del fosfato sobre el funcionamiento mitocondrial, que puede ser exclusivo de las mitocondrias de la levadura y otros organismos similares. Hay que señalar que sería bueno hacer una comparación con las mitocondrias de hígado o corazón. Por otra parte, los datos arrojan mas luz sobre las modificaciones que el potasio produce sobre el funcionamiento mitocondrial, que

en el caso de las levaduras, parecen tener lugar tanto a nivel del sitio I, como del sitio II de la cadena respiratoria.

Además, los datos sobre la interrelación de los efectos del fosfato con los del potasio, pudieran indicar que ésta se produce a través de los mecanismos de su transporte. Esto abre un camino amplio de estudio. Aunque los resultados de las medidas del contenido de potasio de las mitocondrias no mostraron cambios importantes, es posible que adaptando a nuestro sistema la metodología del indicador fluorescente PBFI, sensible a potasio, se puedan estudiar con mayor detalle los cambios de concentración interna del catión, sólo o con fosfato en distintas concentraciones, así como los del fosfato, tal vez con ^{32}P , como uno de los caminos para conocer los mecanismos.

En cuanto al mecanismo del acoplamiento que produce el fosfato solo, una de las posibilidades que valdría la pena explorar, es que se trate simplemente de un efecto por fuerza iónica o la TEA, sobre alguno de los componentes de la cadena respiratoria.

Por ahora estos resultados nos sugieren que el fosfato además de ser un anión importante tanto para el crecimiento como para la división celular (Westheimer, 1987), es un modulador de los efectos de los cationes monovalentes como el potasio, que son importantes para diversas funciones mitocondriales y celulares. Esta modulación se ha observado para el calcio, aunque los mecanismos parecen ser diferentes (Zoccarato y Nicholls, 1992).

6. CONCLUSIONES

- La presencia de fosfato (Pi) provoca un alto grado de acoplamiento en las mitocondrias cuando están en presencia de etanol o succinato como sustratos de la cadena respiratoria.
- Conforme la concentración de fosfato aumenta, el efecto del potasio es menor en cuanto al abatimiento del potencial, posiblemente porque facilita el transporte de potasio.
- Se sugiere, que cuando las concentraciones de fosfato son bajas, el potasio puede entrar a favor del potencial de membrana y lo abate (vía el uniportador) mientras que a altas concentraciones de fosfato, tanto el potasio como el fosfato entran juntos, en un transporte electroneutro (tal vez vía un simportador), sin que este transporte repercute sobre el potencial. Esta posibilidad requiere de mayor estudio.
- El fosfato no parece modificar el flujo de potasio en la mitocondria.
- Se confirma el efecto del potasio sobre el sitio I de la cadena respiratoria, pero, también se encontró un efecto importante sobre el sitio II.

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

7. PERSPECTIVAS

La levadura, por la posibilidad que tiene de modificar su contenido iónico, puede ser un modelo excelente para estudiar modelos de transporte membranar y control metabólico. Es posible continuar estudiando los flujos de fosfato y potasio, así como sus interacciones en la mitocondria; analizando los mecanismos por los que ocurren los efectos del fosfato y del potasio en la mitocondria. Se deben determinar los efectos del fosfato sobre el contenido de potasio en la mitocondria y los efectos del potasio sobre la concentración de fosfato mitocondrial.

Los fines a largo plazo de este estudio incluyen el conocimiento de los mecanismos por los que la célula y la mitocondria mueven iones y controlan ese movimiento. Una segunda meta es analizar como, la concentración de cada ión regula diferentes actividades metabólicas de la célula.

8. REFERENCIAS

- Åkerman, K. E. O. y Wikström, K. F. (1976) Safranin as a Probe of Mitochondrial membrane Potential. *FEBS Lett.* **68**, 191 - 197.
- Beattie, D. S. y Villalobo, A. (1982) Energy Transduction by the Reconstituted bc₁ Complex from Yeast Mitochondria. *J. Biol. Chem.* **257**, 14745.
- Beavis, A. D., Brannan, R. D. y Garlid, K. D. (1985) Swelling and Contraction of the Mitochondrial Matrix. *J. Biol. Chem.* **260**, 13424 - 13433.
- Benz, R., (1985) *CRC Crit. Rev. Biochem.* **19**, 145 - 190.
- Brierley, G. P., Jurkowitz, M. Scott, K. M. y Merola, A. J. (1971) Ion transport by Heart Mitochondria XXII. Spontaneous, Energy-Linked Accumulation of acetate and Phosphate salts of Monovalent Cations. *Arch. Biochem. Biophys.* **147**, 545 - 556.
- Brierley, G. P., Jurkowitz, M. S., Farooqui, T., y Jung, D. W. (1984). K⁺/H⁺ Antiport in Heart Mitochondria. *J. Biol. Chem.* **259**, 14672 - 14678.
- Chappell, J. B. y Haarhoff, K. N. (1967) in *Biochemistry of Mitochondria* (Slater, E. C., Kanaiga, Z. and Wojtczak, L. eds.) pp. 75 - 91, Academic Press, London and New York.
- Chávez, E., Jung, D. W. y Brierley, G. P. (1977) Energy-Dependent Exchange of K⁺ in Heart Mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **183**, 460 - 470.
- De Pierre, J. W. y Ernster, L., (1977). Enzyme topology of intracellular *Ann. Rev. Biochem.* **46**, 201 - 262.
- Diwan, J. J. (1986) Effect of Quinine on Mitochondrial K⁺ and Mg²⁺ Flux. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **135**, 830 - 836.
- Diwan, J. J. (1987) Mitochondrial Transport of K⁺ and Mg²⁺. *Biochim. et Biophys. Acta.* **895**, 155 - 165.
- Diwan, J. J., Haley, T., y Sanadi, D. R. (1988). Reconstitution of Transmembrane K⁺ Transport with a 53 Kilodaltons Mitochondrial Protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**, 224 - 230.
- Dreyfus, G. (1990) Respiración Intracelular. *Información Científica y Tecnológica.* **12**,

39 - 43.

- Ferreira, G. C. y Pedersen, P. L. (1993) Phosphate Transport in Mitochondria: Past Accomplishments, Present Problems, and Future Challenges. *Bioenerg. Biomemb.* **25**, 5, 483 - 492.
- Garlid, K. D. (1979). Unmasking the mitochondrial K^+/H^+ exchange tetraethylammonium - induced K^+ - loss. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **87**, 28 - 847.
- Garlid, K. D. (1980) On the Mechanism of Regulation of the Mitochondrial K^+/H^+ Exchanger. *J. Biol. Chem.* **255**, 11273 - 11279.
- Gogol, E. P., Aggeler, R., Sangerman, M. y Capaldi, R. A. (1989) Cryoelectron Microscopy of *Escherichia coli* F1 Adenosinetriphosphatase Decorated with Monoclonal Antibodies to Individual Subunits of the Complex. *Biochemistry.* **28**, 4717 - 4724.
- Gómez Puyou, A y Gómez Lojero, C. (1977). The Use of Ionophores an Channel Formers in the Study of the Function of Biological Membranes. *Curr. Topics Bioenerg.* **6**, 221 - 257.
- Gonzalez-Halphen, D. y Vázquez Acevedo, M. (1990). Mitochondrias sanas Mitochondrias enfermas. *Información Científica y Tecnológica.* **12**, 27 - 31.
- Gornal, G. A., Bardavill, J. C., y David, M. M. (1949) Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction. *J. Biol. Chem.* **177**, 751 - 766.
- Guerin, B., Bukusoglu, C., Rakotomanana, F. y Wohlrab, H. (1990) Mitochondria Transport Phosphate. *J. Biol. Chem.* **265**, 19736 - 19741.
- Guerin, B. (1991) in *Mitochondria*. (Rose, A. H. y Harrison, J. S., Eds.) Vol. 4. pp. 541 - 600. Academic Press Inc., London.
- Hackenbrock, R. C., Brad, Ch., y Grupte, S. S. (1986) The Random Collision Model an a Critical Assessment of Diffusion and Collision in Mitochondrial Electron Transport. *J. Bioenerg. Biomemb.* **18**, 331 - 368.
- Halestrap, A. P. (1989). The Regulation of the Matrix Volume of Mammalian Mitochondria *in vivo* and *in vitro* and its Role in the Control of Mitochondrial Metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, **973**, 355 - 382.

- Hatefi, Y., Haavik, A. G. y Griffiths, D. E. (1962) Studies on the Electron Transfer System: Reduced coenzyme Q (QH₂)-cytochrome c reductase. *J. Biol. Chem.* **237**, 1681 - 1685.
- Hatefi, Y. (1985). The Mitochondria Electron Transport and Oxidate Phosphorilation System. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 1015 - 1069.
- Jung, D. W., Chávez, E. y Brierley, G. P. (1977) *Biochem. J.* **106**, 759 - 766.
- Jung, D. W., y Brierley, G. P. (1986) Matrix Magnesium and the Permeability of Heart Mitochondria to Potassium Ion. *J. Biol. Chem.* **261**, 6408 - 6415.
- Kasner, S. E. y Ganz, M. B. (1992). Regulation of Intracellular Potassium in Messangial Cells: a Fluorescence Analysis using the dye PBFI. *Am. J. Physiol.* **262** (Renal Fluid Electrolyte Physiol.. 31). F462 - F467.
- Kløet y Lots. (1961) Studies on protein syntesis by protoplasts of *Sacchsromyces carlbergensis*. I. The effect of ribonuclease on protein syntesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **47**, 138 - 143.
- Kocková-Kratochvřlová, A., (1990) Propieties of Yeast Population, in *Yeast and yeast-like organisms*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (Federal Republic of Germany) VCH publishers, New York, NY. (USA). pp 1 - 6.
- Kramer, R. y Palmieri, F. (1992) Metabolite Carriers in Mitochondria, in *Molecular Mechanisms in Bioenergetics* (Ernster, L. ed.). Elsevier, New York. pp. 359 - 420.
- La Noue, K. y Schoolwerth, A. C. (1984). in *New Comprehensive Biochemistry* Vol. **9** (Ernster, L. ed.) pp. 221 - 268, Elsevier, Amsterdam.
- Lehinnger, A. L. (1991). Glycolysis, in *Biochemistry*. Worth publishers, Inc. Spain. pp 417-418 y 437 - 438.
- Martin, W. H., Beavis, A. D. y Garlid, K. D. (1984) Identification of an 82,000 -dalton Protein Responsible for K⁺/H⁺ Antiport in Rat Liver Mitochondria. *J. Biol. Chem.* **259**, 2062 - 2065.
- McMurray, W. C. y Begg, R. W. (1959). Effect of Valinomycin on Oxidative Phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys. Res. Comm.* **84**, 546 - 548.
- Marres, M. A. C., De Vries, S., y Grivell, A. L. (1990). Isolation and Inactivation of

- the Nuclear gene Encoding the Rotenone-insensitive Internal NADH: Ubiquinone Oxidoreductase of Mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **195**, 857-862.
- Minta, A. y Tsien, R. Y. (1989) Fluorescent Indicators for Cytosolic Sodium. *J. Biol. Chem.* **264**, 19449 - 19457.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism *Nature.* **191**, 144 - 148.
- Mitchell, P. (1976). Vectorial Chemistry and the Mechanisms of Chemiosmotic Coupling: Power Transmission by Proticity. *Trans. Biochem. Soc.* **4**, 399 - 433.
- Mitchell, P., (1979). Compartmentation and Communication in Living Systems Ligand Conduction: a General Catalytic Principle in Chemical, Osmotic and Chemiosmotic Reaction System. *Eur. J. Biochem.* **95**, 1 - 20.
- Moore, C. L. y Pressman, B. C. (1964). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **15**, 562 - 567.
- Munn, E. A. (1974) in *The Structure of Mitochondria*, pp. 1 - 138, Academic Press London.
- Negulescu, P. A. y Machen, T. E. (1990) Intracellular Ion Activities and Membrane Transport in Parietal Cells Measured with Fluorescent Dyes. *Methods in Enzymology.* **192**, 38 - 81.
- Netter, P., Petrochilo, E., Slonimski, P. P., Bolotin-Fukuhara, M., Coen, D., Deutsch, J. y Dujon, B., (1974). Mitochondrial genetics. VII.-Allelism and mapping studies of ribosomal mutants resistant to chloramphenicol, erythromycin and spiramycin in *S. cerevisiae*. *Genetics*, **78**, 1063 - 1100.
- Nicholls, D. G. (1982) Chemiosmotic energy transduction, Ion transport across energy-transducing membranes, in *An Introduction to the Chemiosmotic Theory. Bioenergetics.* Academic Press, New York. pp. 1 - 22.
- Nicholls, D. G. (1987). La ATP sintetasa, en *Bioenergetica: Introducción a la Teoría Quimiósomática.* Reverté, Ed. pp. 170 - 175.
- Nicholls, D. G. y Åkerman, K. E. O. (1982) Mitochondrial calcium transport. *Biochim. Biophys. Acta.* **683**, 57 - 88. Elsevier Biomedical Press.
- Peña, A., Campillo, S. C., Tuena de Gómez Puyou, M. y Gómez Puyou, A. (1964).

- Effect of Sodium and Potassium on Mitochondrial Adenosinetriphosphatase Activity.** *Arch. Biochem. Biophys.* **106**, 461 - 466.
- Peña, A., Piña, M. Z., Escamilla, E. y Piña, E. (1977) A Novel Method for the Rapid Preparation of Coupled Yeast Mitochondria.** *FEBS Lett.* **80**, 1, 209 - 213.
- Power, S. D., Lochrie, M. A., Sevarina, K. A., Patterson, T. E. y Poyton, R. O. (1984) The Nuclear-coded Subunits of Yeast Cytochrome c Oxidase.** *J. Biol. Chem.* **259**, 6564.
- Prebble, J. N. , (1981) Mitochondria and chloroplasts: basic concepts, Mitochondrial watermovement and substrate transport, Mitochondrial cation transport, in Mitochondria Chloroplasts and Bacterial Membranes.** Longman House Burnt Mill, Harlow, Essex, U. K. pp 1 - 5 y 137 - 160.
- Presman, C. B. (1976). Biological Applications of Ionophores.** *Ann. Rev. Biochem.* **45**, 501 - 533.
- Rose, A. H. y Harrison, J. S. (1987) Introduction, in The Yeast (Rose, A. H. y Harrison, J. S., Eds.) Vol 1. pp. 1 - 4.** Academic Press Inc., London.
- Runswick, M., Fearnley, I. M., Shekel, M., y Walker, J. E. (1991). Presence of an Acyl Carrier Protein in NADH: Ubiquinone Oxidoreductase from Bovine Heart Mitochondria.** *FEBS Lett.* **286**, 121-124.
- Schägger, H., Borchart, U., Aquila, H., Link, A. T. y Von-Jagow, G. (1985). Isolation and Amino Acid Secuence of the Smallest Subunit of Beef Heart bc₁ Complex.** *FEBS Lett.* **190**, 1. 89 - 94.
- Sherman, F., Fink, G. R., and Hicks, J. B. (1986) in Methods in Yeast Genetics,** Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Siedow, J. N., Power, S., Francisco, F., De la Rosa, F. F. y Palmer, G. (1978) The Preparation and Characterization of Highly Purified Enzimically Active Complex III from Baker's Yeast.** *J. Biol. Chem.* **253**, 2392.
- Slater, E. C., (1987). The Mechanism of the Conservation of Energy of Biological Oxidations.** *Eur. J. Biochem.* **166**, 489 - 504.
- Stevens, B. (1981). in The molecular biology of the yeast, Saccharomyces (J. Strathern, E. Jones and J. Broach, eds.). vol. 1, pp. 471 - 504.** Cold Springs

Harbor Press, Cold Springs Harbor.

- Stryer, L., (1988). Glycolysis, in *Biochemistry*. 3a. Ed. W. H. Freeman and Company, New York USA. pp 362 - 363.**
- Trumpower, B. L. (1990a) Cytochrome bc₁ Complexes of Microorganisms. *Microbiol. Rev.* 54, 58 - 63.**
- Trumpower, B. L. (1990b). The Protonmotive Q Cycle Energy Transduction by Coupling of Proton Traslocation to Electron Transfer by Cytochrome bc₁ Complex. *J. Biol. Chem.* 265, 11409-11412.**
- Uribe, S., Sánchez, N., y Peña, A. (1991). Effects of K⁺ and other Monovalent Cations on Yeast Mitochondria. *Biochem. Int.* 24, 615 - 624.**
- Villalobo, A. Briquet, M. y Goffeau, A. (1981) *Biochem. Biophys. Acta.* 637, 124-129.**
- Wheals, A. E. (1987). Biology of the Cell Cycle in Yeast, in *The Yeasts* (Rose, A. H. y Harrison, J. S., Eds.) Vol. 1 pp. 238 - 390. Academic Press Inc., London.**
- Wehrle, J. P. y Pedersen, P. L. (1989) Phosphate Transport Processes in Eukaryotic Cells. *J. Memb. Biol.* 111, 199 - 213.**
- Werkheiser, W. C. y Bartley, W. (1957). The Study of Steady-State Concentrations of Internal Solutes of Mitochondria by Rapid Centrifugal Transfer to a Fixation Medium. *Biochem. J.* 66, 79 - 91.**
- Westheimer, F. H. (1987) Why Nature Chose Phosphates. *Science.* 235, 1173 - 1178.**
- Wikström, M. (1977) Proton Pump Coupled to Cytochrome c oxidase in mitochondria. *Nature.* 266, 271 - 273.**
- Williamson, J. R. (1976) *Gluconeogenesis; its Regulation in Mammalian Species* (Hanson, R. W. and Mehlman, M. A., eds.) pp. 165 - 220, Wiley-Interscience, New York.**
- Wohlrab, H. (1986) Molecular Aspects of Inorganic Phosphate Transport in Mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 853, 115 - 134.**
- Zalman, L. S., Nikaido, H. y Kagawa, Y., (1980) Mitochondrial Outer Membrane Countains a Protein Producing Nonspecific Diffusion Channels. *J. Biol. Chem.* 255, 1771 - 1774.**
- Zoccarato, F. y Nichols, D. (1982) The Role of Phosphate in the Regulation of the**

Independent Calcium-Efflux Pathway of Liver Mitochondria. *FEBS Lett.* 127, 333 - 338.