

00562

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

6
2Fj



FACULTAD DE QUIMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

El pH CITOPLÁSMICO Y
VACUOLAR EN LA LEVADURA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
P R E S E N T A :
QFB. GLORIA ANGÉLICA MARTÍNEZ MUÑOZ

273251



MÉXICO, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1999



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Dra. Estela Sánchez de Jiménez
VOCAL	Dra. Victoria Chagoya de Sánchez
SECRETARIO	Dra. Rosario A. Muñoz Clares
SUPLENTE	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
SUPLENTE	Dr. Rolando E. Hernández Muñoz

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio del Dr. Antonio Peña Díaz en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Agradezco al CONACYT el otorgamiento de la beca que me permitió realizar mis estudios de Maestría.

A mis padres

Gracias al Dr. Antonio Peña

RESUMEN

Los objetivos de la presente investigación fueron: a) encontrar las condiciones adecuadas para concentrar a la piranina en la vacuola o en el citoplasma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y b) observar la respuesta del pH vacuolar a la adición de glucosa y KCl a la levadura y compararlo con la respuesta del pH citoplásmico.

Se encontró que la piranina se concentra en la vacuola de la levadura si estas se electroporan con el colorante y después son incubadas 1 h con glucosa sola o con KCl. En cambio, la piranina se concentra únicamente en el citoplasma si las levaduras ayunadas son inmediatamente electroporadas o también si las levaduras primero son incubadas con glucosa y KCl o únicamente con glucosa y posteriormente son electroporadas.

Con respecto al pH vacuolar se observó lo siguiente:

1.- El pH vacuolar mínimo que alcanzan las levaduras si se incuban 1 h con glucosa 2.5 mM es de 6.3 pero éste disminuye a 6.1 si se incuban también con KCl 2.5 mM. Puesto que el ion potasio acelera el metabolismo energético en la levadura, se sugiere que es el incremento en la disponibilidad de sustratos para la H^+ -ATPasa vacuolar lo que, a su vez, provoca un incremento en la actividad de esta enzima dando lugar a una mayor acidificación vacuolar. Por otra parte, también se propone que la acidificación vacuolar se incrementa en presencia del ion K^+ gracias a la retención del CO_2 , producto del metabolismo de la glucosa, en el interior de la vacuola y que dicho fenómeno se acentúa gracias a la presencia del ion K^+ en el interior de la misma.

2.- El CO_2 juega un papel importante en el amortiguamiento del pH interno de la levadura *S. cerevisiae*. Se sugiere que la eliminación del CO_2 externo de la levadura provoca la alcalinización citoplásmica y vacuolar de la misma debido al desplazamiento del equilibrio interno del CO_2 , según el Principio de LeChatelier. Sin embargo, puesto que es posible retornar al valor de pH vacuolar inicial tras la adición de glucosa a las levaduras, se sugiere que el CO_2 , producto del metabolismo de este sustrato, difunde nuevamente al interior de la vacuola, acidificándola.

3.- Se observan claras evidencias del papel de la vacuola en la regulación del pH interno de la levadura:

a) La primera se deduce del hecho de que el pH citoplásmico alcanza un pH de 6.6 en las levaduras ayunadas a las que se les adiciona glucosa, el pH vacuolar se acidifica solamente hasta un valor de 6.3 en las levaduras preincubadas con glucosa; es decir, el establecimiento de un pH citoplásmico óptimo pareciera tener prioridad por sobre el pH vacuolar.

b) La segunda consiste en que la eliminación del CO_2 externo de la levadura, provoca una alcalinización citoplásmica y vacuolar en levaduras preincubadas con glucosa, pero en el caso del citoplasma el pH que alcanza este compartimento se encuentra muy cerca del pH citoplásmico óptimo (6.53) mientras que la vacuola alcanza un pH mayor aún que el del citoplasma (6.7) y que no se revierte aún tras el pulso de glucosa a los 50 seg., lo que pareciera ser reflejo de un papel regulatorio del pH vacuolar sobre el pH citoplásmico.

ÍNDICE

TEMA	PÁGINA
Lista de abreviaturas	1
1. Introducción	2
1.1. El transporte del potasio en la levadura	2
1.1.1. La familia TRK de los transportadores del potasio en la levadura	5
1.1.2. Los canales de potasio en <i>S. cerevisiae</i>	5
1.1.3. Un antiportador K^+/H^+ en <i>S. cerevisiae</i>	5
1.2. La vacuola	6
1.2.1 La morfología de la vacuola	6
1.3. Las H^+ -ATPasas plasmática y vacuolar	7
1.3.1. La H^+ -ATPasa plasmática	8
1.3.2. La H^+ -ATPasa vacuolar	9
1.4. Métodos utilizados para la medición de pH	10
1.4.1. Uso de la fluorescencia para la medición de pH	10
1.4.2. La piranina como indicador de pH	11
1.4.3. La cuantificación del pH vacuolar	11
1.5. Interés particular en este trabajo	13
1.5.1. Antecedentes inmediatos	13
1.5.2 Hipótesis	14
1.5.3 Objetivos	14
1.5.3.1 Objetivo general	14
1.5.3.2 Objetivos particulares	14
2. Materiales y Métodos	
2.1. Cepa y condiciones de cultivo	15
2.2. Electroporación	15
2.3. Tratamiento de las levaduras previo a la medida del pH citoplásmico	15
2.4. La medida del pH vacuolar	17
2.5. Medio de incubación de las levaduras	17
a) Incubación de las levaduras previa a la medición del pH	17
b) Incubación de las levaduras en la celda del fluorómetro durante la obtención de los trazos de pH	17

2.6. Medida de la fluorescencia y cálculo del pH interno	19
a) Fluorescencia total	19
b) Fluorescencia externa	20
2.7. Observaciones al microscopio	21
2.8. Microscopía electrónica	21
2.9. Medida del consumo de oxígeno	22
2.10. Medida del transporte de potasio y protones	22
3. Resultados	
3.1. Distribución celular de la piranina	23
3.2. La fluorescencia de la piranina	31
3.2.1. Curvas de concentración contra fluorescencia	31
3.2.2. Espectros de la piranina	36
3.3. Valores y cambios del pH citoplásmico y vacuolar	39
3.3.1. pH vacuolar de levaduras incubadas con glucosa	39
3.3.2. pH citoplásmico de levaduras incubadas con glucosa	39
3.3.3. La H^+ -ATPasa plasmática	42
3.3.4. El ácido carbónico y el pH interno de la levadura	49
3.3.5. El equilibrio del CO_2 y el lavado de las levaduras	50
3.3.6. El ion potasio y el pH citoplásmico	52
3.3.7. pH vacuolar en levaduras incubadas con glucosa y lavadas	54
3.3.8. pH vacuolar de levaduras incubadas con glucosa y KCl y lavadas	59
3.3.9. pH citoplásmico de levaduras incubadas con glucosa y KCl y lavadas	69
3.3.10. Respuesta del pH citoplásmico a la adición de KCl	72
3.3.11. Respuesta del pH vacuolar a la adición de KCl	76
4. Discusión	
4.1. Distribución celular de la piranina y validación de la técnica	82
4.1.1. Introducción del colorante a la levadura	82
4.1.2. Metabolismo y transporte celular	82
4.1.3. Permanencia del colorante en el interior de la levadura	83
4.1.4. Distribución intracelular de la piranina	83
4.1.5. Concentración de la piranina	84
4.1.6. La forma fluorescente	84
4.1.7. Intensidad de la fluorescencia	85
4.1.8. Espectros de la piranina en estado libre y en el interior de la levadura	85
4.1.9. Curvas de piranina total y de pH citoplásmico y vacuolar	85

4.2. El pH citoplásmico y vacuolar en la levadura	86
4.2.1. Modelo de la regulación del pH citoplásmico y vacuolar	87
4.2.2. pH citoplásmico	88
4.2.3. pH vacuolar	90
5. Conclusiones	94
6. Perspectivas	95
7. Referencias Bibliográficas	96

ABREVIATURAS

6-CFDA	Diacetato de 6-carboxifluoresceína
DCCD	Diciclohexilcarbodiimida
EPR	Resonancia electroparamagnética
MES	Acido- 2-(morfolino)-etanosulfónico
¹⁵ N-NMR	Resonancia Magnética Nuclear para ¹⁵ N
³¹ P-NMR	Resonancia Magnética Nuclear para ³¹ P
TEA	Trietanolamina
YPD	De las siglas en inglés: glucosa-peptona y extracto de levadura
$\Delta\psi$	Potencial de membrana
ΔpH	Gradiente de pH

1. INTRODUCCIÓN

Las levaduras han sido cultivadas por el hombre desde la antigüedad para la producción de alimentos y bebidas. Se han utilizado para esponjar el pan, para la producción de alcohol, bebidas y recientemente para la manufactura de productos químicos, combustible y producción de proteína celular (Griffin, 1994).

Theodor Schwann, en la primera mitad del siglo XIX, fue el primero en describir el papel esencial de las levaduras vivas en el proceso de la fermentación. Posteriormente, a partir de 1866 Pasteur estudió con más detalle dicho fenómeno. Desde esa fecha se ha producido un pequeño número de especies de *Saccharomyces* en millones de toneladas anualmente. El hecho de que las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* sean capaces de reproducirse tanto sexualmente como asexualmente en un medio simple y que no sea tóxica la han convertido no sólo en comerciable sino también en fuente disponible de biomasa útil para la investigación de la fisiología celular (Griffin, 1994).

Gracias a la enorme similitud existente entre los mecanismos que operan entre las células de muchos organismos vivientes, la investigación en las levaduras ha tenido una enorme aplicación. En los pasados 15 años ha habido un notable incremento en el uso de las levaduras como modelo de organismos eucariotes para el estudio de los fenómenos celulares. Mucho se sabe gracias al conocimiento del genoma de esta levadura. También se conocen al detalle muchas de las principales vías metabólicas de este tipo de células. A su vez, se han desarrollado técnicas de aislamiento de organelos de la levadura con el resultado de un gran avance en el conocimiento de la composición y estructura de estos organismos (Griffin, 1994).

1.1. EL TRANSPORTE DEL POTASIO EN LA LEVADURA

Aunque el tema central de nuestro trabajo se refiere a los cambios del pH citoplásmico y vacuolar en la levadura, como se verá enseguida, el transporte del K^+ es un fenómeno estrechamente ligado al movimiento de los protones, tanto en la membrana plasmática como en la vacuolar (Figs. 1 y 2). El transporte de cationes a través de la membrana plasmática, tanto monovalentes como divalentes, responde a patrones de selectividad, los cuales resultan en diferentes velocidades de toma y acumulación (Armstrong y Rothstein, 1964; Nieuwenhuis *et al.*, 1981; Roomans *et al.*, 1979). El sistema de transporte para cationes monovalentes parece estar mediado por un uniportador que opera en una sola dirección (Peña, 1975) y que parece estar duplicado en *S. cerevisiae* (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984; Ramos *et al.*, 1994).

EXTERIOR

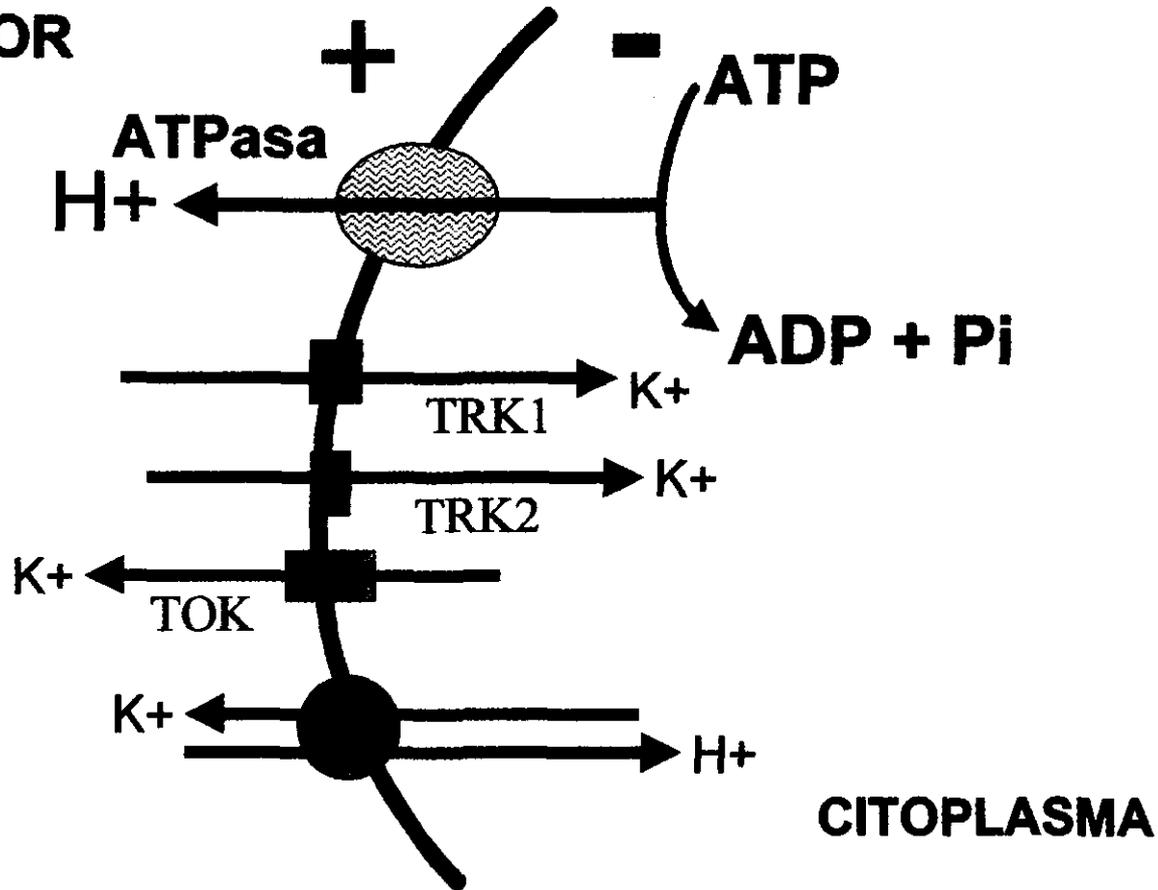


Figura 1. Mecanismos de transporte de protones y iones potasio a través de la membrana plasmática de la levadura (Peña *et al.*, 1972; Ko y Gaber, 1991; Ketchum *et al.*, 1995; Ramírez *et al.*, 1998).

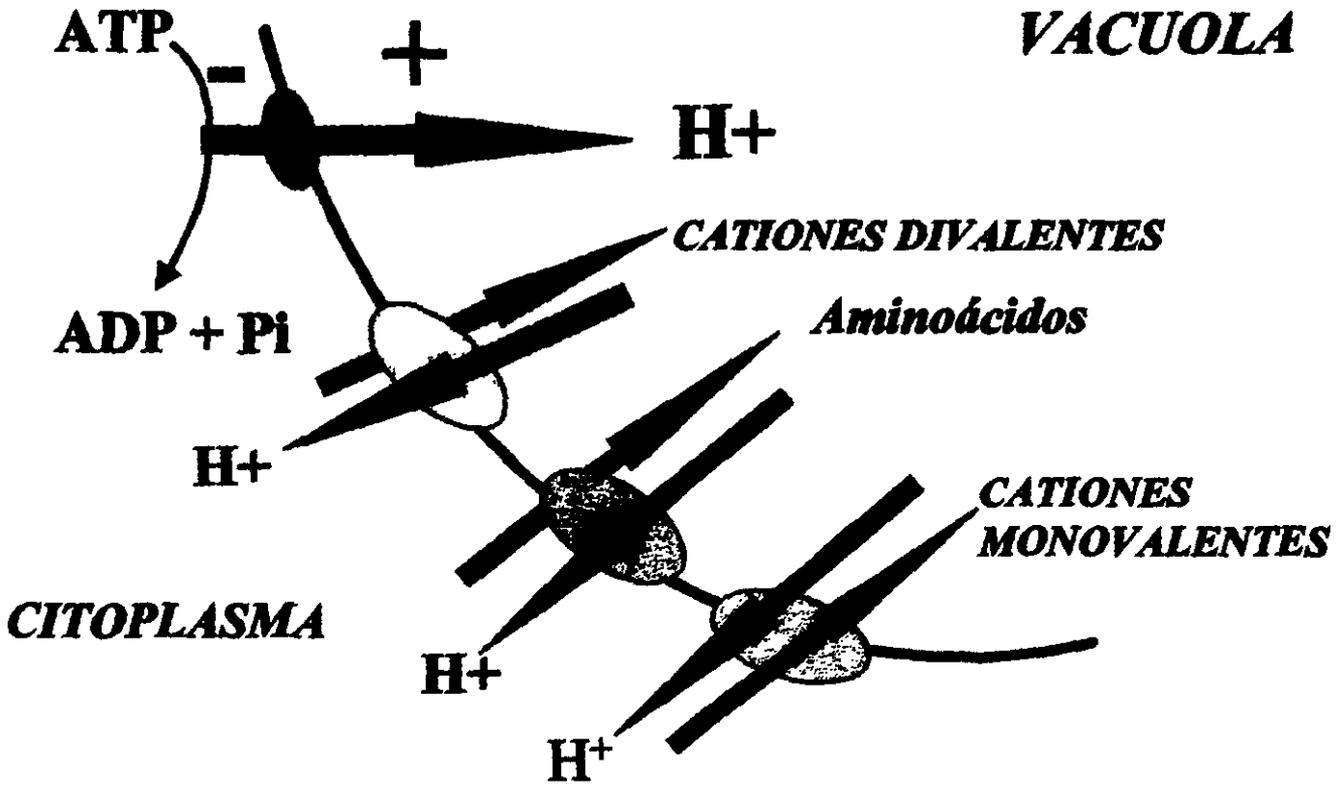


Figura 2. Mecanismos de transporte de protones, cationes divalentes, aminoácidos y cationes monovalentes a través de la membrana vacuolar en la levadura (Lichko y Okorokov, 1985; Anraku 1992 a y b; Nass y Rao, 1998).

1.1.1. La familia TRK de los transportadores del potasio en la levadura

Las levaduras mantienen una alta concentración de potasio intracelular (150 mM o más) gracias a diversos sistemas de transporte de potasio (Fig. 1). La energía para la acumulación de potasio es provista por el gradiente electroquímico mantenido a través de la membrana plasmática por la H^+ -ATPasa. Rodríguez-Navarro y Ramos (1984) detectaron un componente para el transporte de potasio de alta afinidad ($K_m = 20 \mu M$) con una alta capacidad (V_{max} de $30 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) que presentaba una actividad máxima al crecer las levaduras en ausencia de potasio. Las mutaciones en el gene *TRK1* abolían este sistema de alta afinidad y resultaba en la incapacidad para crecer en un medio pobre en potasio (0.2 mM) (Ramos *et al.*, 1985).

El gene *TRK1* ha sido clonado; codifica para una proteína con características topológicas de un transportador (Gaber *et al.*, 1988). La secuencia de Trk1p muestra una significativa similitud con el transportador de potasio de alta afinidad (HKT1) recientemente aislado (Schachtman y Schroeder, 1994) de raíces de trigo (23% de identidad y 50% de similitud con una sobreposición de 550 aminoácidos). La proteína de las raíces de trigo funciona como un simportador K^+/H^+ .

El grupo de Gaber utilizó la cepa mutante *trk1Δ* para identificar genéticamente un segundo sistema de transporte de baja afinidad para el potasio (TRK2) (Ko *et al.*, 1993; Vidal *et al.*, 1990). El producto del gene *TRK2* es 55% idéntico al de Trk1p (Ko y Gaber, 1991) y parece ser el responsable del transporte del potasio detectado en las células *trk1Δ* (Ramos *et al.*, 1994). Se ha especulado que el componente residual de baja afinidad presentado por la cepa doble mutante *trk1Δ trk2Δ* puede ser un antiportador K^+/H^+ , un simportador soluto-catión o un canal de potasio. De acuerdo con la última suposición, las células *trk1Δ trk2Δ* son hipersensibles al compuesto 4-aminopiridina, un bloqueador de canales (André, 1995).

1.1.2. Los canales para el potasio en *S. cerevisiae*

En *S. cerevisiae* se ha descrito la presencia de un nuevo canal de potasio (TOK1) (Ketchum *et al.*, 1995) (Fig. 1). El canal funciona permitiendo la salida de iones a potenciales de membrana por debajo del potencial de equilibrio para el potasio; su relación conductancia-voltaje es sensible a la concentración de iones K^+ .

1.1.3. Un antiportador K^+/H^+ en *S. cerevisiae*

Se ha demostrado la existencia de un sistema de transporte K^+/H^+ en *S. cerevisiae* (Camarasa *et al.*, 1996; Ramírez *et al.*, 1996, Ramírez *et al.*, 1998) (Fig. 1). La máxima velocidad se observa a pH 6.8. Este sistema de transporte reversible y no electrogénico presenta una alta selectividad para K^+ entre los cationes monovalentes y una alta afinidad para la entrada del mismo ion.

1.2. LA VACUOLA

Las vacuolas son organelos celulares de las plantas superiores, algas y hongos. Estos organelos no se tiñen con eosina por lo que dan la imagen de una estructura vacía. El tonoplasto o membrana vacuolar está compuesta de una bicapa simple de fosfolípidos y colesterol y presenta la propiedad de ser una estructura extensible. El volumen de la vacuola es de 20-30% del volumen total de la levadura y de 80-90% en las algas.

A pesar de que el lisosoma y la vacuola sean compartimentos ácidos y contengan una gran variedad de enzimas hidrolíticas, no es absolutamente cierto que la vacuola sea análoga al lisosoma de las células de los mamíferos. El mecanismo de degradación macromolecular es solamente una de las varias funciones de la vacuola ya que también está involucrada en otros procesos celulares entre los que se encuentra el almacenamiento de metabolitos, la homeostasis iónica y del pH citosólico (Schwencke, 1991, Kliensky, 1990). En este sentido la vacuola de hongos tiene gran similitud con la vacuola de las células vegetales (Sanders *et al.*, 1992).

Las características de las vacuolas de las levaduras como compartimento digestivo vacuo-lisosomal quedaron demostradas en el trabajo de Matile (1978). El compartimento vacuolar se ha descrito como ácido (pH 5.5) y contiene numerosas proteasas, nucleasas, glicosidasas y fosfatasas en un estado críptico. La vacuola también almacena aminoácidos básicos e iones Ca^{2+} , los cuales son secuestrados del citosol por sistemas antiporte nH^+ /solutos (Anraku, 1992 a ,b).

La vacuola también almacena polifosfato y en la correspondiente a *Neurospora* también se almacenan metabolitos básicos tales como la arginina. Los polifosfatos forman glóbulos que presentan una respuesta compleja a las variaciones de concentración de sustancias catiónicas por lo que se ha propuesto que éstos juegan algún papel importante en la acumulación de cationes en la vacuola (Miller, 1989).

1.2.1. La morfología de la vacuola.

Wiemken y col. (1970) realizaron un interesante trabajo en el que demostraron mediante fotografías y análisis bioquímicos la relación que existe entre la vesiculación vacuolar y la división celular; observaron que durante la gemación de la levadura *S. cerevisiae*, la vacuola se fragmenta y se hereda a la célula hija, por lo que una vez que la célula hija iguala en tamaño a la célula madre, la vesiculación vacuolar disminuye.

En estudios más recientes se ha demostrado que la herencia de la vacuola está coordinada con el ciclo de división celular. El organelo de la célula madre forma una estructura tubo-vesicular denominada "estructura de segregación", la cual se elonga hacia la yema en emergencia y libera material vacuolar con el fin de dar formación a la vacuola en la célula hija; este paso es seguido por el ensamble de este material vacuolar, proceso que involucra la fusión vacuolar y la mezcla del contenido del mismo organelo (Weisman and Wickner, 1988).

Se ha encontrado que la actina funciona directamente en la herencia de la vacuola presumiblemente como "carril" que hace posible la liberación precisa de la vacuola hacia el sitio de emergencia de la gema y después de la célula madre hacia la gema (Hill *et al.*, 1996).

1.3. LAS H⁺-ATPASAS PLASMÁTICA Y VACUOLAR

La razón por la cual las levaduras acidifican el exterior se debe a que contienen una H⁺-ATPasa en la membrana plasmática; además contienen otra en la membrana vacuolar (Figs. 1 y 2). Ambas actúan como bombas primarias o sistemas quimiosmóticos (Mitchell, 1968) y son importantes pues son las responsables de la acidificación del medio externo y del compartimento vacuolar respectivamente. Estas enzimas convierten la energía libre de la hidrólisis del ATP en la energía fisicoquímica del gradiente transmembranal de protones. Este gradiente estimula el movimiento de otras moléculas catalizado por sistemas de transporte activos secundarios.

Por otra parte, la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática es del tipo "P" el cual presenta un intermediario E-P covalente en su mecanismo de catálisis y está encargada de la generación de una diferencia de potencial electroquímico, negativo y alcalino en el interior de la célula (Peña *et al.*, 1969, 1972; Peña, 1975). La H⁺-ATPasa de la membrana vacuolar es del tipo "V" que presenta un mecanismo de catálisis sin intermediario E-P covalente y se ha propuesto como una enzima involucrada en el mecanismo de control del pH celular. Esta enzima lleva a cabo el bombeo de protones desde el citoplasma al interior de la vacuola generando un interior positivo y ácido (Anraku *et al.*, 1989, 1992 a, b).

La Tabla 1 muestra algunas de las propiedades bioquímicas de las H⁺-ATPasas plasmática y vacuolar y la Tabla 2 muestra el pH óptimo y la Km para ATP de las mismas.

Tabla 1. Propiedades Bioquímicas de las H⁺-ATPasas tipo P y V

	H⁺-ATPasa(P)	H⁺-ATPasa(V)
Localización	membrana plasmática de hongos, plantas y protozoarios	membrana vacuolar (plantas y levaduras), lisosomal (ani- males), cuerpos de Golgi, gránulos cromafínicos, vesículas sinápticas.
Composición de Subunidades	Un solo polipéptido de 100 KDa	8-9 subunidades con un PM total de 500 KDa
Inhibidores	Vanadato (10 ⁻³ M)	Bafilomicina, DCCD*

*Diciclohexilcarbodiimida.

(Serrano, 1991)

Tabla 2. pH óptimo y Km para ATP de las H⁺-ATPasas vacuolar y de membrana plasmática

Características	Vacuolar	Membrana Plasmática
pH óptimo	7.0	5.5 - 6.5
Km para ATP (mM)	0.2	0.8

(Serrano, 1991)

1.3.1. La H⁺-ATPasa plasmática

La ATPasa de protones de la membrana plasmática (H⁺-ATPasa) es una P-ATPasa que ha sido descrita en varios tipos de hongos: *Neurospora crassa* (Bowman y Slayman, 1977; Scarborough, 1977), *Schizosaccharomyces pombe* (Delhez *et al.*, 1977), *S. cerevisiae* (Peña *et al.*, 1972) *Candida tropicalis*, *Candida albicans* (Hubbard *et al.*, 1986), *Distyostelium discoideum* (McDonald y Weeks, 1984; Pogge-von Strandmann *et al.*, 1984) y *Klyveromyces lactis* (Miranda *et al.*, 1995).

La H⁺-ATPasa plasmática, cuya existencia fue postulada por Peña y col. (1972) es un translocador primario de protones que utiliza directamente la energía del ATP para realizar su función. Su papel central ha sido demostrado en muchas plantas y levaduras (Goffeau y Slayman, 1981) y se le ha implicado en el mantenimiento del pH intracelular (Serrano, 1984; Brandao *et al.*, 1994) y en el transporte activo de nutrientes (Cockburn *et al.*, 1975; Dufour *et al.*, 1980; Eddy, 1982; Gutknecht y Tosteson, 1973).

Una característica importante de la H⁺-ATPasa plasmática es su alta Km para el sustrato (Mg-ATP), un pH óptimo ácido (5-6.7) y una relativa insensibilidad a las sales monovalentes. Los valores de la Km para MgATP de las H⁺-ATPasas oscilan entre 0.8 y 4.8 mM (Borst-Pawels y Peters, 1981; Hubbard *et al.*, 1985; Bowman y Slayman, 1977).

La H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de los hongos y levaduras posee una porción hidrofóbica insertada en la membrana plasmática y una gran porción hidrofílica citoplásmica (Nakamoto y Slayman, 1989). En *N. crassa* y *S. cerevisiae* el polipéptido atraviesa la membrana plasmática ocho o diez veces, con pocos residuos expuestos en la superficie externa. La mayor parte de la cadena polipeptídica se encuentra en el citosol y contiene varios fragmentos importantes: el extremo amino terminal (formado por 115 residuos) y dos asas, una de 130 aminoácidos y otra de 300 residuos (Ghislain *et al.*, 1987). Se piensa que el asa de 300 residuos está involucrada en la unión e hidrólisis del ATP. Este segmento corresponde a la región más conservada entre las P-ATPasas.

La topología transmembranal predicha para esta enzima es muy similar a la de la Na⁺/K⁺-ATPasa y la Ca²⁺-ATPasa; sin embargo, la mayor homología existente entre las distintas ATPasas está confinada al dominio catalítico central citoplásmico (Serrano y Portillo, 1990).

El gene que codifica a la H⁺-ATPasa de *S. cerevisiae* es el *PMAI*; es esencial para el crecimiento y se observa un alto grado de similitud en la secuencia de aminoácidos entre las distintas ATPasas de muchos hongos (Serrano *et al.*, 1986; Monk *et al.*, 1991; Hager *et al.*, 1986; Addison, 1986; Miranda *et al.*, 1995).

1.3.2. La H^+ -ATPasa-vacuolar

Los estudios bioquímicos de las V-ATPasas se iniciaron con membranas vacuolares de hongos y plantas, así como con vesículas cubiertas de clatrina y otros componentes del sistema endomembranoso (Sze, 1985; Mellman, 1986; Nelson, 1988, Forgac, 1989; Stone *et al.*, 1989). Sin embargo, más tarde se descubrieron las V-ATPasas en las vesículas y en la membrana plasmática del epitelio renal (Gluck, 1992; Gluck *et al.*, 1992). Esta bomba protónica ha sido descubierta como un residente permanente de la membrana plasmática de células fagocíticas (Grinstein, *et al.*, 1992) y de piel de sapo (Harvey, 1992).

Se ha purificado la H^+ -ATPasa vacuolar de *S. cerevisiae* (Lichko y Okorokov, 1985; Uchida *et al.*, 1988a; Kane *et al.*, 1989), *N. crassa* (Bowman y Bowman, 1988) y plantas superiores (Bennet *et al.*, 1988). Las ATPasas de los sistemas vacuo-lisomales están altamente conservadas estructural y funcionalmente en su composición de subunidades, especificidad de sustrato y sensibilidad a varios inhibidores (Al-Awqati, 1986; Schaneider, 1987; Anraku *et al.*, 1992a; Sze *et al.*, 1992). Esta enzima se presenta como un complejo multimérico que comprende al menos 9 subunidades en las células animales, vegetales y fúngicas (Bowman *et al.*, 1985; Mandara y Taiz, 1985). Cada una de las subunidades de diferentes fuentes muestra un alto grado de homología (50-80%) en la secuencia primaria de aminoácidos (Anraku *et al.*, 1992 a, b; Stevens, 1992). Debido a estas similitudes en estructura y función, se clasifican como H^+ -ATPasas tipo V, las cuales son distintas de las de otras clases de ATPasas de protones, como las de tipo F_0F_1 de las mitocondrias, bacterias y cloroplastos, o las de tipo P en la membrana plasmática y retículo endoplásmico.

Las V-ATPasas son complejos multiméricos con un dominio citoplásmico V_1 y otro dominio V_0 unido a membrana, de forma análoga a los dominios F_1 y F_0 de las F-ATPasas (Nelson, 1992 a; Gluck *et al.*, 1992). El ATP citoplásmico es hidrolizado en el dominio V_1 , forzando a los protones desde el citoplasma a través del dominio V_0 que cruza la membrana. El largo dominio hidrofílico V_1 protruye como una partícula hacia el citoplasma tanto de la membrana plasmática como de la vacuola.

La porción V_0 de la V-ATPasa de levaduras contiene polipéptidos de 100, 36, 17 y 16 Kd y en el sector V_1 se encuentran polipéptidos de 69, 60, 54, 42, 32 y 27 Kd (Kane y Stevens, 1992).

La Tabla 3 muestra el porcentaje de actividad de las distintas H^+ -ATPasas frente algunos de los inhibidores utilizados con más frecuencia.

Tabla 3. Efecto de inhibidores sobre la actividad de las H^+ -ATPasas vacuolar, mitocondrial y de membrana plasmática

PORCENTAJE DE ACTIVIDAD			
INHIBIDOR	VACUOLAR	MITOCONDRIA	MEMBRANA PLASMATICA
Ninguno	100	100	100
Vanadato	98	101	11
Diciclohexilcarbodiimida	21	27	98
Oligomicina	65	18	15
Azida	102	23	90
Cloruro de cobre	18	103	DESCONOCIDO

(Schwencke, 1991)

1.4. MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA MEDICIÓN DE pH

Existen diversas técnicas para llevar a cabo la medición del pH interno. El más comúnmente utilizado consiste en la medición de la distribución de bases débiles permeantes que se acumulan en compartimentos ácidos. En organelos aislados la acumulación puede medirse espectrofotométricamente o fluorométricamente con colorantes indicadores o con el uso de compuestos marcados radiactivamente. Recientemente, se han desarrollado elegantes técnicas inmunocitoquímicas para la identificación morfológica de compartimentos ácidos en células. También se puede emplear la resonancia magnética nuclear de ^{31}P (Kotyk y Slavik, 1989).

1.4.1. Uso de la fluorescencia para la medición de pH

El uso de las técnicas de fluorescencia se ha extendido tanto en las áreas de la biología como de la medicina, debido básicamente a su alta sensibilidad y al avance de las técnicas de fluorometría, que han abierto nuevos horizontes en la investigación biológica (Kotyk y Slavik, 1989).

Mediante la fluorescencia se pueden estudiar las células *in vitro* e *in vivo*. Las mediciones no son destructivas y prácticamente no invasivas, pues se utilizan muy bajas concentraciones de indicadores no tóxicos. Esto es posible gracias a la alta sensibilidad de las técnicas fluorescentes, las cuales pueden trabajar con concentraciones de colorante tan pequeñas como 10^{-12} y 10^{-11} M, mientras que la espectrofotometría de absorción requiere 10^{-8} M y la espectroscopia de resonancia paramagnética del electrón (EPR) requiere al menos 10^{-3} M (Kotyk y Slavik, 1989).

Las imágenes de fluorescencia pueden proveer una gran cantidad de información como el mapeo *in vivo* del pH ó del Ca^{2+} intracelular. A su vez, la integración de las técnicas de fluorescencia con sistemas de video ha hecho posible obtener más información a través de fotografías impresas, imágenes en video o digitales (Kotyk y Slavik, 1989).

La fluorescencia presenta ventajas sobre la espectrometría de absorción debido a que tiene mayor sensibilidad y provee dos espectros, el de emisión y el de excitación, en lugar de uno solo, que son útiles como criterio para la identificación de los compuestos. En ciertos casos, debido a que algunos factores modifican el rendimiento cuántico de la fluorescencia, la cuantificación por fluorometría requiere de estandarización (Slavik, 1994).

1.4.2. La piranina como indicador de pH

La piranina (8-hidroxi-1,3,6-pirenotrisulfonato) (Figura 3) es una molécula fluorescente derivada del pireno, altamente cargada e impermeante a través de las membranas biológicas. Ha sido utilizada como indicador del pH intravesicular en vesículas unilamelares para intervalos de pH entre 6 y 8.5 ($pK_a = 7.2$) (Clement y Gould, 1981; Kano and Fendler, 1978).

Puesto que los tres grupos sulfonato de la piranina se encuentran completamente ionizados a través de todo el intervalo de pH desde 4 hasta 10, las superficies cargadas negativamente repelen al colorante, en cambio, es atraído hacia las cargas positivas.

La piranina fluoresce en sus formas trianiónica y tetraiónica las cuales son excitadas a una longitud de onda diferente gracias a lo cual cada una de las formas ácido-base mencionadas puede ser cuantificada por separado. Con la cuantificación anterior y el pK_a de la piranina es posible calcular el pH del compartimento que contenga dicho colorante.

Ambas formas de la piranina presentan la misma forma del espectro de emisión de la fluorescencia, con un máximo a 510 nm. En cambio, el espectro de excitación es dependiente del pH con un máximo de fluorescencia a 400 nm (atribuido a la forma trianiónica) y a 450 nm (atribuido a la forma tetraiónica) en el intervalo de pH de 4 a 10 (Fig. 3) (Slavik, 1994).

La observación de que la piranina se introduce a la vacuola fue realizada por Calahorra *et al.*, (1998) durante los experimentos encaminados a la utilización de este colorante como indicador fluorescente del pH citoplásmico en *S. cerevisiae*. Esta importante observación, aunada al interés de conocer más acerca de los mecanismos subyacentes a la regulación del pH interno de la levadura, llevó al diseño del presente trabajo.

1.4.3. La cuantificación del pH vacuolar

El estudio del pH vacuolar es de gran interés, ya que se supone que la vacuola puede tener un papel importante en la regulación del pH interno de la célula. Se han realizado estudios en los cuales la inhibición de la actividad de la H^+ -ATPasa vacuolar o lisosomal provoca cambios notables en el pH citoplásmico, como en el caso de los hepatocitos (Wadsworth y van Rossum, 1994). La cuantificación del pH vacuolar se ha llevado a cabo mediante la utilización de diversas técnicas (Tabla 4), y en general se sabe que el pH vacuolar es menor al pH citoplásmico pero que, a su vez, el pH vacuolar es mayor al pH lisosomal.

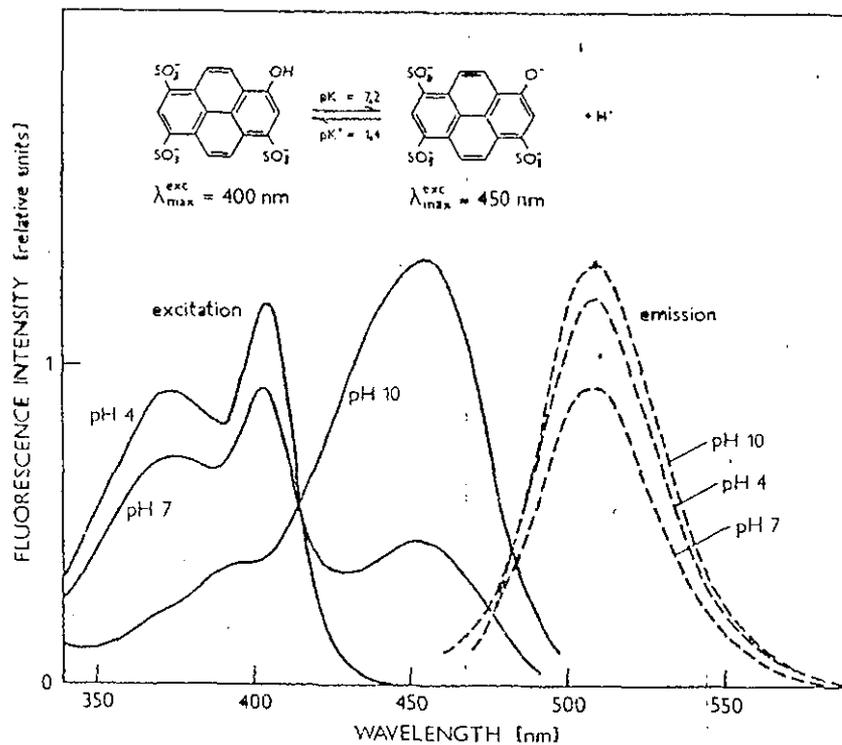


Figura 3. Espectro de excitación y emisión de fluorescencia para la piranina y fórmula molecular (Slavik, 1994)

Tabla 4. Técnicas utilizadas para la medición del pH vacuolar y lisosomal

TÉCNICA	ORGANISMO	pH VACUOLAR	REFERENCIA
¹⁵ N-NMR	<i>N. crassa</i>	6.1	Legerton <i>et al.</i> , 1983
6-CFDA	<i>S. cerevisiae</i>	6.2	Preston <i>et al.</i> , 1989
6-CFDA	<i>S. cerevisiae</i>	6.05	Abe y Hovikoshi, 1995
		pH LISOSOMAL	
Isotiocianato de fluoresceína	Ratón (macrófagos)	4.7	Ohkuma y Poole, 1978
³¹ P-NMR	<i>Catharantus roseus</i>	5.5	Mathieu <i>et al.</i> , 1989

1.5. INTERÉS PARTICULAR DE ESTE TRABAJO

Estamos interesados en comparar la respuesta del pH vacuolar y citoplásmico a la adición de glucosa y KCl. Investigaciones anteriores (Peña *et al.*, 1995; Calahorra *et al.*, 1998) han demostrado que la piranina es sensible a los cambios que presenta el pH citoplásmico tras la adición de glucosa y K⁺, gracias a lo cual ha sido posible llevar a cabo estudios acerca del transporte de iones monovalentes a través de la membrana plasmática de *S. cerevisiae*.

Por otra parte, se sabe que la vacuola es un compartimento ácido gracias a la actividad de la H⁺-ATPasa vacuolar (Bowman *et al.*, 1992; Anraku *et al.*, 1992 a y b). Si la piranina presenta la cualidad de concentrarse selectivamente ya sea en citoplasma o en la vacuola es posible conocer, con la ayuda de esta técnica, la relación que existe entre estos dos compartimentos y su respectivo movimiento de protones. Falta aún mucho por conocer, sobre todo con respecto a la regulación concertada que se espera exista entre el pH citoplásmico, el pH vacuolar y el metabolismo celular.

1.5.1. Antecedentes inmediatos

Se sabe que la H⁺-ATPasa plasmática es capaz de bombear los protones del interior de la levadura al exterior, mismos que pueden producirse por el metabolismo energético; es decir, la glucólisis y la respiración (Sanders y Slayman, 1982; Goffeau y Slayman, 1981). También se sabe que la membrana vacuolar contiene una H⁺-ATPasa encargada de bombear protones al interior de este organelo y producir el pH ácido que la caracteriza (Anraku *et al.*, 1989) (Fig. 2).

Por otra parte, se sabe que la membrana de la vacuola contiene antiportadores acoplados a un protón que llevan a cabo el transporte de aminoácidos e iones de calcio (Klionsky *et al.*, 1990) (Fig. 2). La vacuola es un organelo de almacenamiento de iones potasio (Okorokov *et al.*, 1980). El tonoplasto de las vacuolas vegetales presenta un intercambiador Na⁺/H⁺ (Mathieu *et al.*, 1989) y recientemente se clonó y secuenció un gen responsable de un intercambio H⁺/catión monovalente, cuya localización fue propuesta en compartimentos prevacuolares (Nass y Rao, 1998) y en la mitocondria de *S. cerevisiae* (Numata *et al.*, 1998).

1.5.2. Hipótesis

Se espera que la adición de la glucosa a la levadura provoque la disminución del pH vacuolar gracias a la entrada de los protones que, producidos por el metabolismo de dicho sustrato, son bombeados al interior de la vacuola a través de la H^+ -ATPasa vacuolar.

Por otra parte, se espera que la adición de K^+ a las levaduras provoque la alcalinización de la vacuola, debido a la entrada de dicho ion a este organelo a través de un probable antiportador acoplado con protón presente en la membrana vacuolar.

1.5.3. Objetivos

1.5.3.1 Objetivo general

Medir el pH vacuolar y el citoplásmico y sus cambios en *S. cerevisiae* ante la adición de glucosa y K^+ a la levadura.

1.5.3.2. Objetivos particulares

Definir las condiciones bajo las cuales la piranina se concentra en el citoplasma o en la vacuola con el fin de llevar a cabo la medición del pH citoplásmico y vacuolar en la levadura.

Caracterizar el espectro de la piranina concentrada en el interior de la vacuola o en citoplasma y la linealidad de la técnica fluorométrica.

Describir la respuesta del pH vacuolar de *S. cerevisiae* a la adición de glucosa y KCl y compararlo con la respuesta del pH citoplásmico en las mismas condiciones.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cepa y condiciones de cultivo

Las células se obtuvieron de una colonia aislada de la levadura comercial (La Azteca, SA) y se cultivaron en 500 ml de medio YPD (glucosa 2%, extracto de levadura 1%, bactopectona 1%). Las levaduras se crecieron durante 24 h a 30°C. Se colectaron por centrifugación y se lavaron con agua destilada también por centrifugación. Se resuspendieron en 250 ml de agua destilada y se agitaron durante 14 h a 30°C, al cabo de las cuales las células se colectaron y se lavaron nuevamente. Finalmente, se resuspendieron en agua en una relación de 0.5 g de levaduras por ml y se almacenaron en hielo hasta ser utilizadas el mismo día. Las células fueron utilizadas inclusive 24 h después de esta última resuspensión sin que se observaran cambios en los resultados.

2.2. Electroporación

La electroporación se llevó a cabo como se reportó previamente por Peña *et al.* (1995). Se utilizó un electroporador BioRad Gene Pulser. Se colocó la suspensión de levaduras (0.7 ml) y 20 µl de piranina 100 mM en una celda de electroporación de 3 mm de espacio entre las placas de aluminio. Se sometieron a un pulso de 1500V, 25 µF y 200 Ω con una duración de aproximadamente 3 mS. Las células se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron y lavaron tres veces con agua destilada en una Microfuga Beckman por 10 seg. Finalmente, las levaduras se resuspendieron en la relación original de 0.5 g por ml de agua, se mantuvieron en hielo y se utilizaron para los experimentos correspondientes.

2.3. Tratamiento de las levaduras previo a la medida del pH citoplásmico

El pH citoplásmico se midió en levaduras sometidas a los siguientes tratamientos:

- a) Ayunadas (Fig. 4).
- b) Levaduras incubadas con glucosa 2.5 mM y lavadas (Fig. 5).
- c) Levaduras incubadas con glucosa 2.5 mM y KCl 2.5 mM y lavadas (Fig. 5).

En el caso de las levaduras ayunadas (inciso a), la piranina se introdujo por electroporación inmediatamente después de terminado el período de ayuno tal y como se describe en el punto 2.2 y se muestra en la Fig. 4. Finalmente, se resuspendieron las levaduras y se midió la fluorescencia (apartados 2.5b y 2.6).

En el caso de las levaduras mencionadas en los incisos b y c, las células ayunadas se incubaron en las condiciones descritas en el apartado 2.5a. Posteriormente, las levaduras se colectaron por centrifugación con el fin de eliminar del medio de incubación el o los sustratos restantes (Fig. 5).

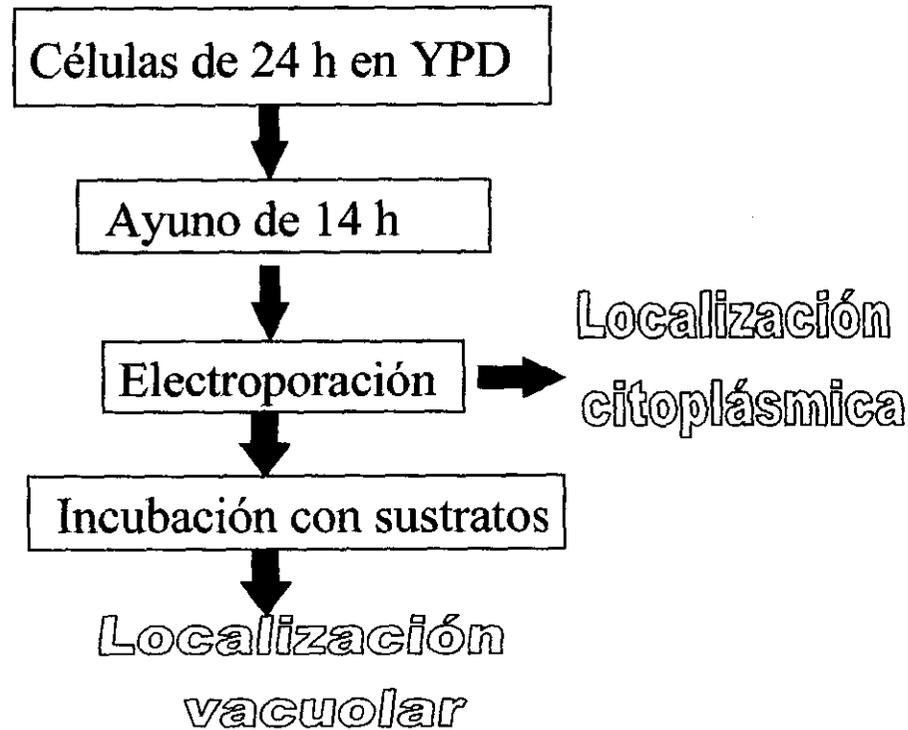


Figura 4. Técnica llevada a cabo para internalizar a la piranina al interior del citoplasma (inmediatamente después de concluído el ayuno), o al interior de la vacuola. La lectura de pH interno se realiza sin previo lavado de las levaduras.

En todos los casos, dicha centrifugación se realizó en una microfuga Beckman y consistió en tres series de centrifugación a 12,000 rpm durante 10 seg cada una, seguidas de la eliminación del sobrenadante y la adición de agua destilada para resuspender las levaduras. A esta secuencia de centrifugación-resuspensión de las levaduras se le denomina "lavado". En el caso de las levaduras de los incisos b y c, se prosigue con la técnica según los apartados 2.2, 2.5b y 2.6.

2.4. La medida del pH vacuolar.

El pH vacuolar se midió en levaduras tratadas como se describe a continuación:

- a) Levaduras incubadas con glucosa 2.5 mM y no lavadas (Fig. 4).
- b) Levaduras incubadas con glucosa 2.5 mM y lavadas (Fig. 5).
- c) Levaduras incubadas con glucosa y KCl 2.5 mM y lavadas (Fig.5).

Tal y como se mencionó anteriormente, la entrada de la piranina a la vacuola requiere de la incubación de las levaduras electroporadas en presencia de glucosa sola o con KCl, por lo que la preparación de las levaduras inicia con la electroporación de las levaduras ayunadas tal y como se describe en los apartados 2.1 y 2.2. En el caso del inciso a, las levaduras electroporadas se incuban tal y como se describe en el apartado 2.5a y se cuantifica el pH vacuolar inmediatamente después de la incubación sin llevar a cabo ningún procedimiento de lavado (Fig. 4).

En el caso de las levaduras mencionadas en los incisos b y c, éstas son incubadas en las condiciones que se describen en el apartado 2.5a y posteriormente son lavadas tal y como se describe en el apartado 2.3 y se presenta en la Fig. 5. Finalmente, las levaduras son resuspendidas y utilizadas para la medición del pH vacuolar (apartados 2.5b y 2.6).

Únicamente en un caso se realiza la incubación de las levaduras con glucosa 10 y 20 mM; estas levaduras se preparan en las mismas condiciones que las levaduras incubadas con glucosa 2.5 mM y lavadas (inciso b) con la única diferencia que se incrementa la concentración de glucosa.

2.5. Medio de incubación de las levaduras

a) Incubación de las levaduras previa a la medición del pH

Se utilizaron 50 μ l de la suspensión de levaduras al 0.5g/ml con amortiguador MES (Acido 2-[N-morfolino]-etanosulfónico) 10 mM ajustado a pH 6.0 con trietanolamina (TEA) en presencia de glucosa 2.5, 10 o 20 mM con o sin KCl 2.5 mM, según el experimento correspondiente, a un volumen final de 2.0 ml. El tiempo de incubación fue de 1h a 30 °C y en agitación continua.

b) Incubación de levaduras en la celda del fluorómetro durante la obtención de los trazos de pH

Se incubaron 50 μ l de levaduras al 0.5 g/ml en 2 ml de MES-TEA 10 mM a pH 6 o pH 8 o ácido tartárico 10 mM a pH 4, según el experimento correspondiente, a 30 °C y con agitador magnético. Se adicionó glucosa 10 mM y KCl 10 mM según se muestra en cada trazo de pH, siendo el tiempo de duración de los mismos de 950-1000 seg.

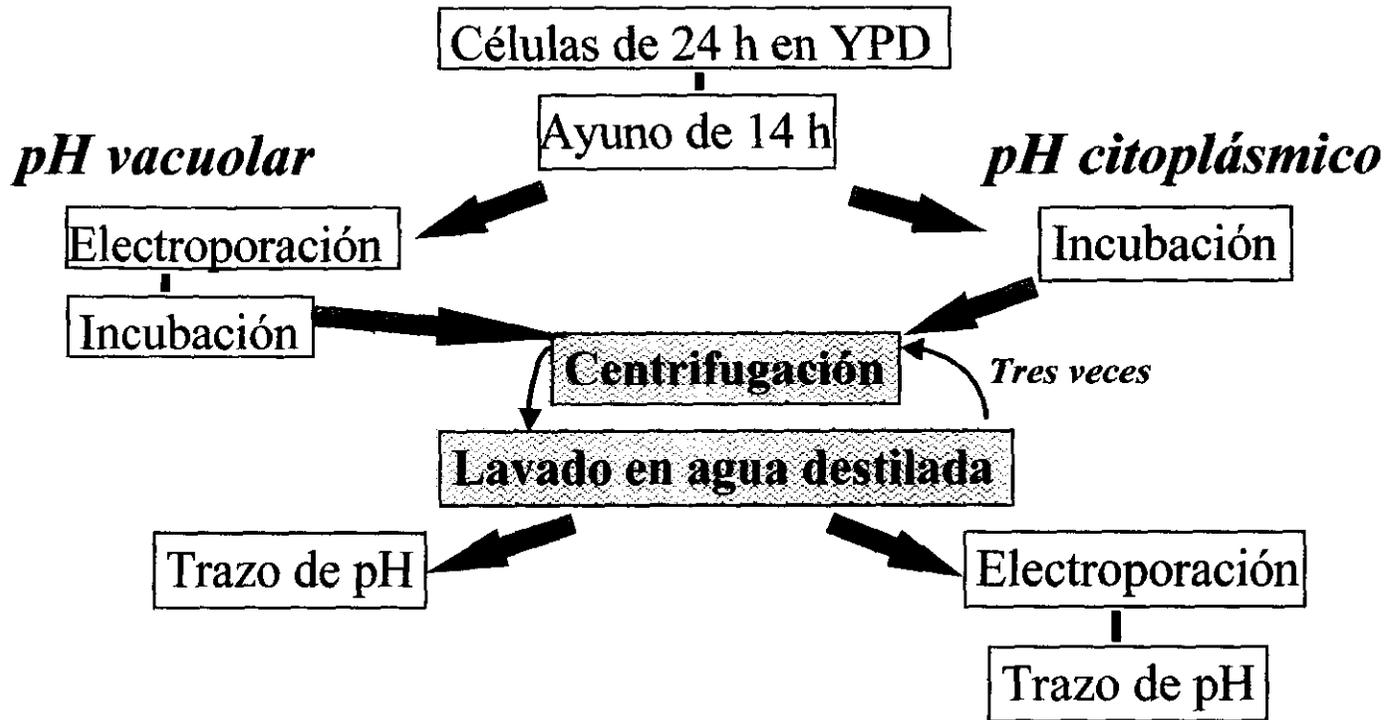


Figura 5. Proceso de preparación de levaduras con piranina en vacuola o en citoplasma y sometidas a incubación y lavado.

2.6. Medida de la fluorescencia y cálculo del pH interno.

Los valores de fluorescencia que se obtienen directamente de la incubación de las levaduras corresponden a la forma básica de la piranina para lo cual los cambios de fluorescencia de la piranina se siguieron a una longitud de onda de 460 nm de excitación y de 520 nm de emisión con una rendija de 4 nm (para ambas longitudes de onda) en un espectrofluorómetro DMX-1000 equipado con una cámara con temperatura regulada a 30 °C y un agitador magnético, conectado a un sistema de adquisición de datos (SLM Instruments; Urbana, IL, USA).

La aplicación de la ecuación de Henderson-Hasselbalch (ecuación 1) requiere del cálculo previo de los valores de fluorescencia correspondientes a las formas protonada o ácida y de la forma disociada o básica de la piranina. El valor de fluorescencia de la forma básica es la que se obtiene directamente del fluorómetro con el uso de las longitudes de onda de 460 nm de excitación y 520 nm de emisión.

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \text{base/ácido} \dots \dots \dots \text{ecuación 1}$$

Por su parte, el cálculo de la fluorescencia de la forma ácida se basa en el siguiente razonamiento:

- A) La fluorescencia de la forma ácida será la fluorescencia resultante de sustraer a la fluorescencia interna el valor de fluorescencia de la forma básica, tanto en el caso de que la piranina se encuentre localizada en el citoplasma o en la vacuola.
- B) La fluorescencia interna se calcula a partir de la fluorescencia total restando la fluorescencia externa.

Por lo tanto, para el cálculo de la fluorescencia de la forma ácida se necesitan los valores de fluorescencia siguientes:

- a) Fluorescencia total
- b) Fluorescencia externa
- c) Fluorescencia interna
- d) Fluorescencia de la forma básica

La forma de obtener los valores de fluorescencia arriba citados es la siguiente:

a) Fluorescencia total

Consiste en medir en primer lugar la fluorescencia de la forma básica de la piranina existente tanto en el interior como en el exterior de la levadura; esto se logra tras la adición del NH_4OH el cual alcaliniza tanto el exterior como el interior de la levadura.

La medición se lleva a cabo en una preparación de levaduras como la mencionada en el apartado 2.5b, a la que se adiciona NH_4OH a una concentración final de 100 mM (Höfer *et al.*, 1996; Calahorra *et al.*, 1998).

Sin embargo, es necesario restar a este valor de fluorescencia total una pequeña cantidad de fluorescencia basal que presenta la forma ácida de la piranina aún a la longitud de onda de excitación de la forma básica de la piranina (460 nm).

Para detectar dicho valor de fluorescencia de la forma ácida de la piranina se adiciona ácido propiónico al 265 mM final a una suspensión de levaduras preparadas tal y como se describe en el apartado 2.5b. En este caso, el ácido propiónico acidifica tanto el interior de la levadura como el exterior de la misma.

Finalmente, se le denomina fluorescencia total a la diferencia entre ambas fluorescencias observadas con NH_4OH y ácido propiónico.

b) Fluorescencia externa

El cálculo de la fluorescencia externa consiste a su vez en la resta de dos valores de fluorescencia:

El primer valor de fluorescencia que se obtiene es la que presenta la forma básica de la piranina en el exterior de la levadura. Para esto se utiliza el amortiguador MES-TEA a una concentración final de 10 mM a pH 8. La medición consiste en la adición de 50 μl de levaduras a 2 ml del mencionado amortiguador. El primer valor de fluorescencia obtenido después de la adición de las levaduras a dicho amortiguador corresponde al de la forma básica de la piranina en el exterior de la levadura, ya que dicho compuesto es incapaz de atravesar la membrana plasmática.

Al valor de fluorescencia anterior es necesario restarle el correspondiente a la fluorescencia de la forma ácida de la piranina la cual presenta una pequeña excitación a la longitud de onda utilizada. Para llevar a cabo dicha medición se utiliza un amortiguador de ácido tartárico a una concentración de 10 mM y pH 4. Este compuesto tampoco atraviesa la membrana plasmática por lo que la fluorescencia observada corresponde a la de la forma ácida de la piranina en el exterior. La medición se realiza adicionando 50 μl de levaduras a 2 ml del mencionado amortiguador tal y como se describe en el apartado 2.5b y se toma el primer valor de fluorescencia obtenido en el fluorómetro.

Sin embargo, se requiere de la aplicación de un valor de corrección para el cálculo de la fluorescencia externa lo cual debe llevarse a cabo por las razones que a continuación se explican:

Como se explicó anteriormente, es necesario restar al valor de fluorescencia total, obtenida con la adición de NH_4OH (pH cercano a 14), el correspondiente a la forma básica de la piranina presente en el exterior de la levadura. Sin embargo, dicho valor de fluorescencia externa se obtiene alcalinizando el exterior de la levadura con un amortiguador a pH 8. El problema que surge con el valor de fluorescencia externa, obtenido a un pH menor al utilizado en el cálculo de la fluorescencia total, es que la relación ácido/base de la piranina es diferente en cada caso, por lo que no es posible llevar a cabo dicha resta de valores. Puesto que el pKa de la piranina es de 7.2, al valor de pH del NH_4OH prácticamente la totalidad de la piranina se encuentra en su forma básica, mientras que a pH 8 la relación ácido/base es de 6.31; esto significa que existe un 13.67% de la forma ácida y un 86.33% de la forma alcalina (de acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbach (ec. 1). Dado lo anterior, es necesario convertir el porcentaje de la forma básica de 86.33% existente a pH 8 al 100% y esto se logra multiplicando el primer valor por un factor de 1.16. Después de dicho cálculo ya es

posible restar ambos valores de fluorescencia y obtener el valor de fluorescencia externa.

Finalmente, con los valores de fluorescencia de las formas ácidas y básicas de la piranina y con el valor de pKa de la piranina en la levadura (7.2 según Kano y Fendler, 1978), es posible aplicar a continuación la ecuación de Henderson-Hasselbach (ec. 1). El valor de pH resultante corresponderá al del compartimento en el que se encuentre la piranina en la preparación de levaduras utilizada en cada caso.

2.7. Observaciones al microscopio

Las fotografías de fluorescencia de las levaduras se obtuvieron con un microscopio Nikon Diaphot, con luz UV y a 100X con un objetivo de inmersión en glicerol o a 40X con un objetivo normal.

Las observaciones de la fluorescencia y de los cambios morfológicos de una simple célula se llevaron a cabo de la siguiente forma: las células electroporadas y no incubadas se fijaron a un portaobjetos cubierto con polilisina (Cell-Track, Becton Dickinson, Bedford, MA), para lo cual las células en el portaobjetos se incubaron durante 20 min. El portaobjetos con las células unidas a él se colocó en una cámara de perfusión llena con amortiguador (10 mM MES-TEA) a pH 6. A continuación se continuó la perfusión, pero esta vez con amortiguador conteniendo glucosa 10 mM. Para la epi-iluminación se utilizó una lámpara de mercurio que iluminaba directamente las células a través de un filtro de excitación de 485-505 nm (XF23, Omega Optical, Brattleboro, VT). Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron con una cámara digital CCD (MCD-1000, SpectraSource Inst., CA), unida a un microscopio. Se utilizó un disparador electrónico (Uniblitz, Vincent Associates, Rochester, NY) para iluminar a las células solamente durante el tiempo requerido para la colección de imagen (0.2-2 seg) y evitar el fotoblanqueamiento. La exposición de la cámara, la operación del disparador y la digitización de la imagen se controlaron mediante un software SpectraSource's HPC-1 y de una computadora PC/AT 486/66 MHz, la cual almacena las imágenes en discos ópticos reusables para análisis posteriores con la ayuda de un software de procesamiento de imagen (Imagen-Pro Plus).

2.8. Microscopía electrónica

Para la obtención de las fotografías al microscopio electrónico, se obtuvieron secciones celulares de la siguiente forma: las células se fijaron en medio de Karnowski (1965): glutaraldehído 2%, formaldehído 2% en amortiguador de cacodilato 0.05 M, pH 7.2. 200 µl de la mezcla de levaduras suspendidas en amortiguador MES-TEA conteniendo 50 mg de levaduras se mezclaron con 2 ml de amortiguador de fijación y se mantuvieron inmóviles durante 4-5 días. Posteriormente, las células se centrifugaron y lavaron una vez con el mismo amortiguador pero sin los compuestos de fijación. La post-fijación se llevó a cabo con tetróxido de osmio 1% en amortiguador de cacodilato 0.05 M, pH 7.2. Las células se deshidrataron por incubaciones sucesivas de 30 min con dos cambios de etanol al 30% y dos cambios con etanol absoluto. Las células se infiltraron colocándolas en cápsulas de gelatina con LR White Resin (London Resin Co., Berkshire, UK) durante 24 h a 60 °C. Se obtuvieron secciones de aproximadamente

800 Amstrongs y se colocaron en un plato de vidrio excavado con acetato de uranio durante 30 min. Posteriormente, se lavaron con agua y se incubaron en citrato durante 10 min en presencia de perlas de NaOH. Finalmente, las secciones se lavaron con agua y se observaron en el microscopio electrónico.

2.9. Medida del consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno se determinó en un Monitor de Oxígeno Modelo 53, Yellow Springs Instrument Co; Yellow Springs, Ohio, USA. El Monitor se calibró a cero con ditionita. A continuación se adicionaron 300 μ l de levaduras al 50% a un amortiguador de MES-TEA 10 mM, pH 6.0 a un volumen total de 5 ml. Se adicionó glucosa 10 mM sola o seguida de KCl 10 mM, según el experimento por realizar.

2.10. Medida del transporte de potasio y protones

La concentración de potasio y protones se siguió con un electrodo catiónico Beckman (39047). Se adicionaron 200 μ l de levaduras a 5 ml de amortiguador MES-TEA 1 mM, pH 6.0. Se adicionó glucosa 10 mM sola o seguida de KCl 10 mM según el experimento.

3. RESULTADOS

3.1. DISTRIBUCIÓN CELULAR DE LA PIRANINA

La cuantificación del pH citoplásmico y vacuolar en las levaduras requirió del desarrollo de una técnica que favoreciera una clara distribución de la piranina entre los dos compartimentos de interés. Mediante la electroporación de la piranina en las levaduras crecidas durante 24 h en YPD, ayunadas por 14 h, el colorante se distribuyó sólo en el área citoplásmica. Esta distribución, como lo muestra la Figura 6, permite cuantificar el pH citoplásmico sin que se detecte ninguna interferencia de la vacuola ya que el indicador está en el citoplasma y no en la vacuola.

Puesto que la fluorescencia de la piranina a las longitudes de onda utilizadas aumenta a pH alcalino y disminuye a pH ácido, se quiso comprobar si la ausencia de fluorescencia en la vacuola se debía en realidad a la falta de piranina en este organelo o a un efecto del pH ácido vacuolar sobre la fluorescencia del colorante. La Figura 7 muestra la imagen de levaduras tratadas en las mismas condiciones que las levaduras de la Figura 6 pero con la diferencia de haber sido alcalinizadas con hidróxido de amonio el cual se distribuye a través de toda la levadura. A pesar del alto pH del medio, las vacuolas se observan sin fluorescencia, lo cual permite concluir que la piranina se encuentra exclusivamente concentrada en el citoplasma de estas levaduras.

Un hallazgo importante de nuestro trabajo fue que inmediatamente después de electroporada la piranina, aparece sólo en el citoplasma. Inclusive, si las células se mantienen en hielo, el indicador mantiene esta localización. Sin embargo, si las células se incuban con glucosa 10 mM o 2.5 mM, este indicador se internaliza en la vacuola (Fig. 8), quedando el citoplasma prácticamente exento del colorante. Dado lo anterior se pensó que en estas levaduras sería posible cuantificar el pH vacuolar sin la interferencia de la fluorescencia del indicador presente en el citoplasma.

Inclusive, si las levaduras electroporadas en presencia de piranina se incuban durante 1 hora a 30 °C sin ningún sustrato, el resultado es una distribución heterogénea de la piranina. Esto puede indicar que la internalización vacuolar de la piranina se debe a la existencia de un proceso activo que depende de la presencia de sustratos endógenos; pero que ocurre lentamente. La Figura 9 muestra cómo en muchas levaduras la piranina permanece en citoplasma pero también en parte de la población se introduce a la vacuola. Esta preparación, desde luego no es útil para cuantificar el pH de la vacuola sin interferencia del citoplasma. Es entonces indispensable la incubación con glucosa para lograr que la piranina se concentre en la vacuola en casi la totalidad de las células de la levadura.

El proceso de entrada de la piranina a la vacuola durante su incubación con glucosa puede visualizarse más claramente en la Figura 10, que es en realidad una serie de fotografías del proceso de entrada de la piranina desde el citoplasma hasta la vacuola en una levadura electroporada en presencia de piranina e incubada 1 h con glucosa 10 mM. La levadura de la primera fotografía contiene al colorante en el citoplasma y no ha recibido la inyección de glucosa. El espacio ovalado inferior y sin fluorescencia es la vacuola exenta de piranina. Después de esta primera fotografía la levadura recibió la inyección de glucosa y a partir de ese momento se fotografía cada 6 min a lo largo de



Figura 6. Imagen de microscopía de fluorescencia de células de *S. cerevisiae* crecidas 24 h en YPD, seguidas por 14 h de ayuno y electroporadas con piranina.



Figura 7. Imagen de microscopía de fluorescencia de células de *S. cerevisiae* crecidas 24 h en YPD, seguidas por 14 h de ayuno y electroporadas con piranina. La fotografía se llevó a cabo en presencia de NH_4OH 100 mM.

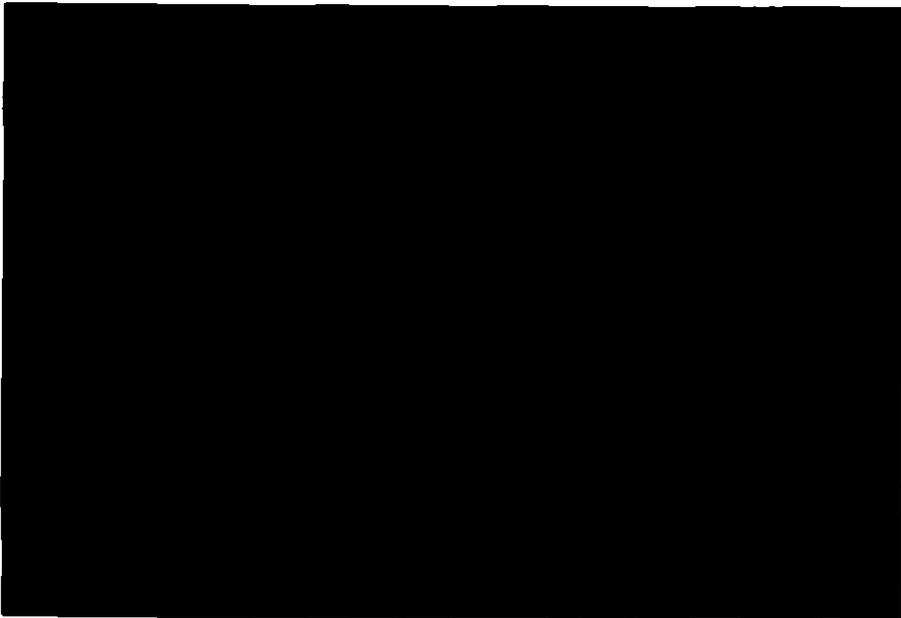


Figura 8. Imagen de microscopía de fluorescencia de células de *S. cerevisiae* crecidas 24 h en YPD, seguidas por 14 h de ayuno, electroporadas con piranina e incubadas 1 h con glucosa 10 mM.



Figura 9. Imagen de microscopía de fluorescencia de células de *S. cerevisiae* crecidas 24 h en YPD, seguidas por 14 h de ayuno, electroporadas con piranina e incubadas 1 h sin glucosa.

una hora de incubación.

Durante el período de 6 a 18 min de incubación la piranina se encuentra distribuida en toda la levadura; es a partir de los 24 min que se empieza a visualizar el área vacuolar como un óvalo inferior brillante. A partir de ese momento la piranina se concentra aún más en la vacuola hasta dejar al citoplasma prácticamente exento de fluorescencia.

Hasta el momento desconocemos la causa de la aparición de un punto fluorescente en el citoplasma ni tampoco sabemos si se trata de algún compartimento ácido en la levadura, pero puede considerarse como una interferencia menor, dada su pequeña área en comparación con la correspondiente a la vacuola.

Las levaduras electroporadas en presencia de piranina e incubadas con glucosa y KCl también introducen la piranina a la vacuola, pero en este caso la vacuola presenta una morfología diferente a la de las vacuolas de levaduras incubadas solamente con glucosa. La Figura 11 muestra que la enorme mayoría de estas levaduras han concentrado a la piranina en su vacuola pero ésta muestra una morfología más dispersa y vesiculada.

Con el fin de saber si la presencia de la piranina en la vacuola jugaba algún papel en este cambio morfológico vacuolar, se observaron al microscopio electrónico levaduras tratadas bajo distintas condiciones de incubación. La Figura 12 muestra una levadura ayunada y no electroporada. Su vacuola es muy grande y con poca vesiculación; sin embargo, si estas levaduras se incuban con glucosa (Fig.13), la vacuola disminuye de tamaño y comienza a vesicularse. El efecto es más notable aún si la incubación se realiza con glucosa y KCl (Fig. 14), en la cual se observan casi todas las células de levadura con la vacuola profusamente vesiculada.

Dado que este último experimento se realizó sin electroporar a las levaduras y en ausencia de la piranina, se concluyó que el fenómeno de vesiculación vacuolar es independiente de la presencia de piranina y que éste depende completamente de las condiciones de incubación. Sin embargo, no se profundizó más en el estudio de este fenómeno, ya que los objetivos de la presente investigación se abocaron al estudio del pH vacuolar y a la respuesta del mismo a factores que modifican el pH interno de la levadura.

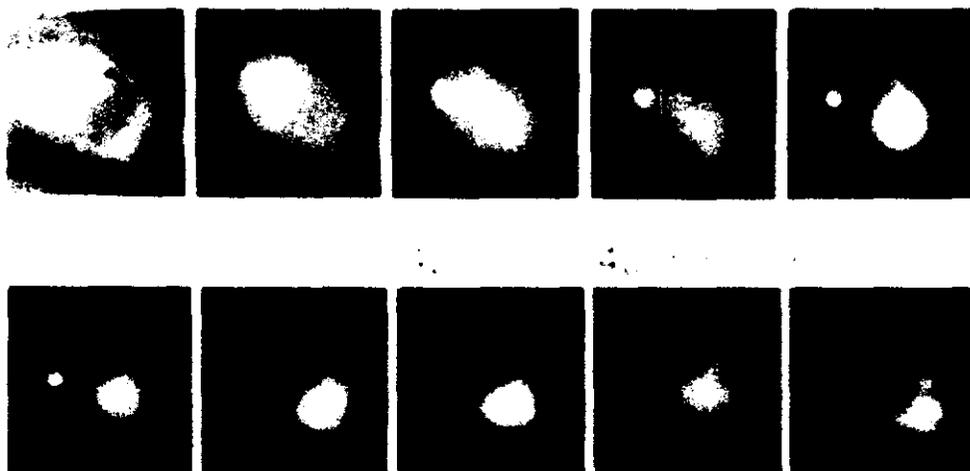


Figura 10. Serie de fotografías al microscopio de fluorescencia por epi-iluminación que muestra el proceso de entrada de la piranina a una sola célula de levadura, crecida 24 h en YPD, seguida de 14 h de ayuno y electroporada con piranina. Después de tomada la primera fotografía se añade glucosa 10 mM al medio de incubación.

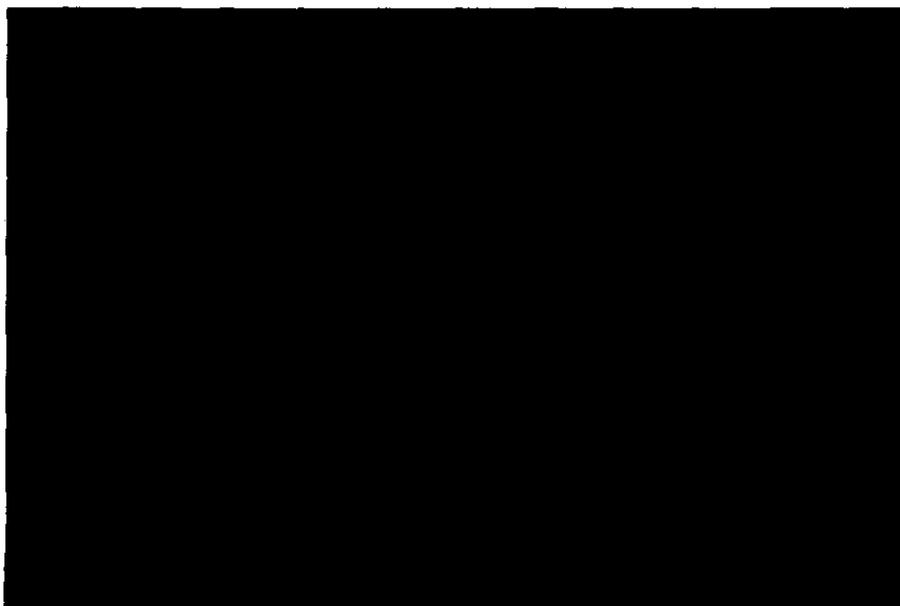


Figura 11. Imagen de microscopía de fluorescencia de células de *S. cerevisiae* crecidas 24 h en YPD, seguidas por 14 h de ayuno, electroporadas con piranina e incubadas 1 h con glucosa 10 mM y KCl 10 mM.



Figura 12. Foto al microscopio electrónico de una célula de levadura crecida 24 h en YPD y ayunada 14 h, no electroporada.

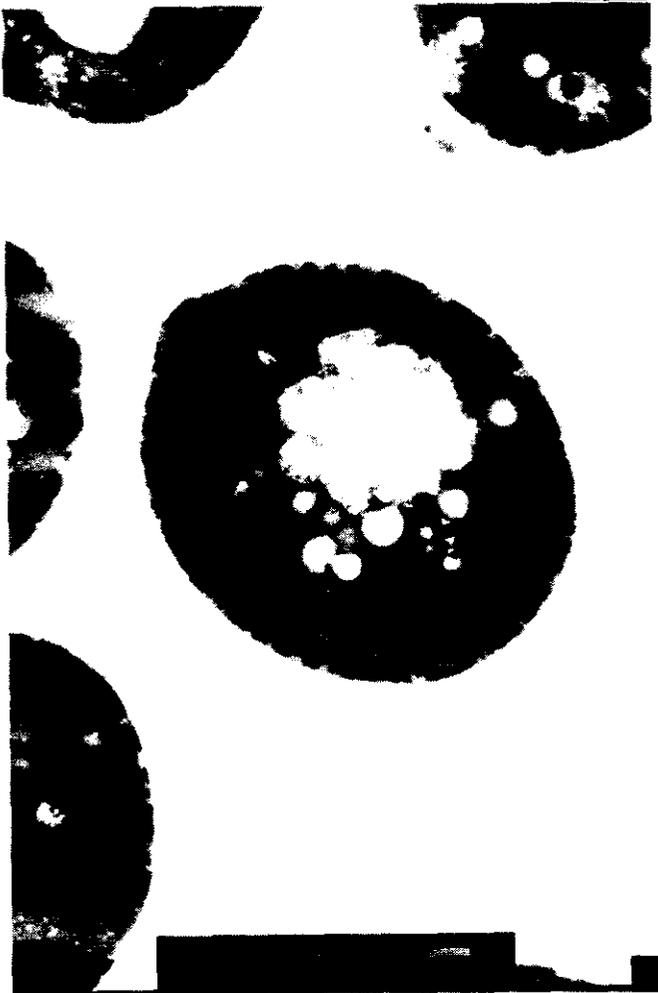


Figura 13. Foto al microscopio electrónico de una célula de levadura crecida 24 h en YPD, ayunada 14 h, no electroporada e incubada 1 h con glucosa 10 mM.



Figura 14. Foto al microscopio electrónico de una célula de levadura crecida 24 h en YPD y ayunada 14 h, no electroporada e incubada 1 h con glucosa 10 mM y KCl 10 mM.

3.2. LA FLUORESCENCIA DE LA PIRANINA

3.2.1. Curvas de concentración contra fluorescencia

Con el objeto de definir la confiabilidad de la cuantificación del pH interno de la levadura a través de la fluorescencia de la piranina, fue necesario realizar algunas pruebas sobre la linealidad de la fluorescencia así como de las características espectroscópicas del colorante.

El valor de fluorescencia total es muy importante ya que a partir de éste se calculan los otros valores de fluorescencia que son necesarios para el cálculo de pH. Por ello se realizaron curvas de fluorescencia total vs microlitros de la suspensión de levaduras con piranina en el citoplasma (Fig.15) o en vacuola (Fig.16).

Ambas figuras muestran una linealidad razonable de la curva en el intervalo de 5 hasta 70 microlitros; se indica con una flecha el valor de fluorescencia total que se obtiene con los 50 microlitros de la suspensión celular que se utilizó en las mediciones regulares.

Es interesante hacer notar que la fluorescencia total es mayor en las preparaciones de levaduras que contienen a la piranina en el citoplasma (79,795 unidades); las preparaciones de levaduras con piranina en vacuola presentaron un valor de fluorescencia total inferior (21,512 unidades), probablemente porque la centrifugación posterior a la incubación de las levaduras eliminó buena parte de la piranina que se encontraba inicialmente en el medio externo.

Además, las curvas de pH citoplásmico y vacuolar vs microlitros de suspensión de levaduras mostraron prácticamente el mismo valor desde 5 hasta 70 microlitros de levaduras en ambos casos (Figs. 17 y 18). Es importante hacer notar que el pH citoplásmico es de 6.0 (Fig.17), mientras que el pH vacuolar es de 6.6 (Fig.18), ya que las levaduras utilizadas para la medición del pH vacuolar fueron centrifugadas después de su incubación con glucosa, lo cual provoca la alcalinización vacuolar. Lo anterior se debe a que la centrifugación y lavado de las levaduras provoca la eliminación del CO₂ y del H₂CO₃ externo a la levadura, fenómeno que a su vez provoca la alcalinización del citoplasma y de la vacuola como efecto de la salida del CO₂ interno de la levadura; la explicación de dicho mecanismo será ampliado en el apartado de Resultados (Fig. 26). En el caso de la curva de pH citoplásmico se utilizaron levaduras ayunadas, a las cuales no se ha añadido glucosa y como se verá en resultados posteriores, las levaduras ayunadas presentan un pH más ácido (6.0) que las levaduras a las que se les ha añadido glucosa (6.6).

El pH citoplásmico que se obtiene en el intervalo de 5 a 70 µl de levaduras electroporadas es el mismo en cada caso (Fig. 17) y lo mismo sucede con el valor de pH vacuolar (Fig. 18), es decir, la determinación del pH citoplásmico y vacuolar se realizó dentro de un intervalo lineal de fluorescencia.

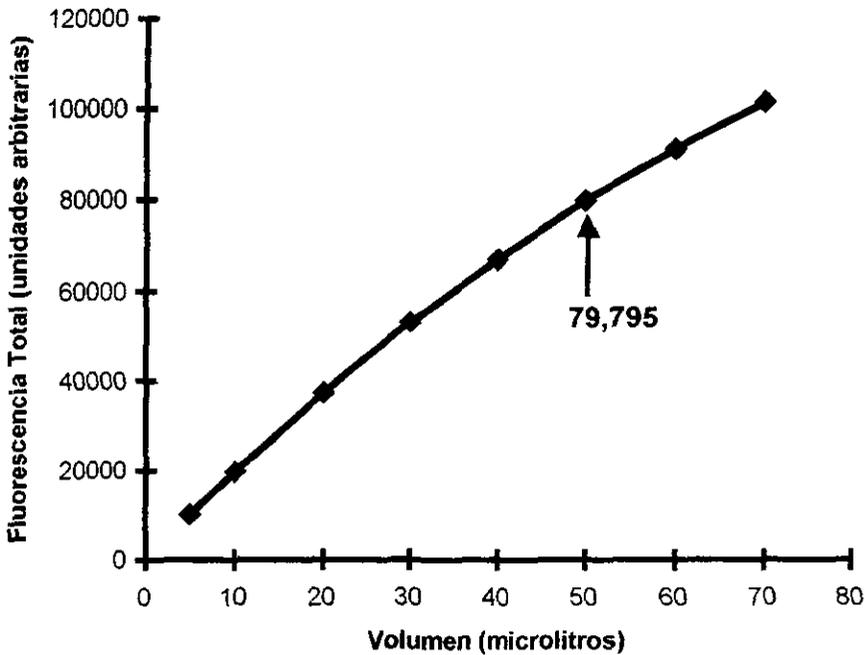


Fig. 15. Curva de fluorescencia total de piranina en citoplasma. Las levaduras ayunadas, según el apartado 2.1, se electroporan según se describe en el apartado 2.2 de Materiales y Métodos. Se toman alícuotas de distinto volumen de la suspensión de levaduras al 0.5 g/ml (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 μ l) y se adicionen a la celda del fluorómetro, la cual contiene 2 ml de amortiguador MES-TEA 10 mM a pH 6. Posteriormente se adiciona NH_4OH 100 mM y se toma la lectura de fluorescencia a las longitudes de onda de 460-520 nm de excitación y emisión respectivamente para cada una de las diluciones de levaduras mencionadas y en las condiciones descritas en el apartado 2.6 de Materiales y Métodos. La flecha indica el valor de fluorescencia obtenido con 50 μ l de la suspensión de levaduras, volumen comúnmente utilizado para la elaboración de los trazos de pH citoplásmico y vacuolar.

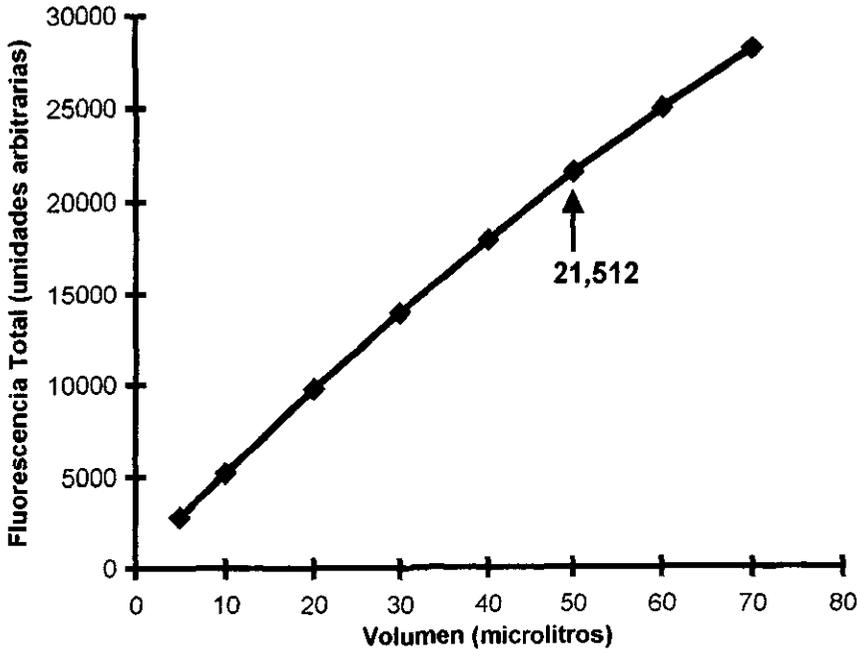


Fig. 16. Curva de fluorescencia total de piranina en vacuola. Las levaduras ayunadas según el apartado 2.1, se electroporan con piranina según se describe en el apartado 2.2 de Materiales y Métodos. Posteriormente se incuban con glucosa 2.5 mM según se describe en el apartado 2.3b. Se toman alícuotas de distinto volumen (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 μ l) de la suspensión de levaduras al 0.5 g/ml y se adicionan a la celda del fluorómetro, la cual contiene 2 ml de amortiguador MES-TEA 10 mM pH 6. Posteriormente se adiciona NH_4OH 100 mM y se toma la lectura de fluorescencia según se describe en el apartado 2.6 de Materiales y Métodos. La flecha indica el valor de fluorescencia obtenido con 50 μ l de la suspensión de levaduras, volumen comúnmente utilizado para la elaboración de los trazos de pH citoplásmico y vacuolar.

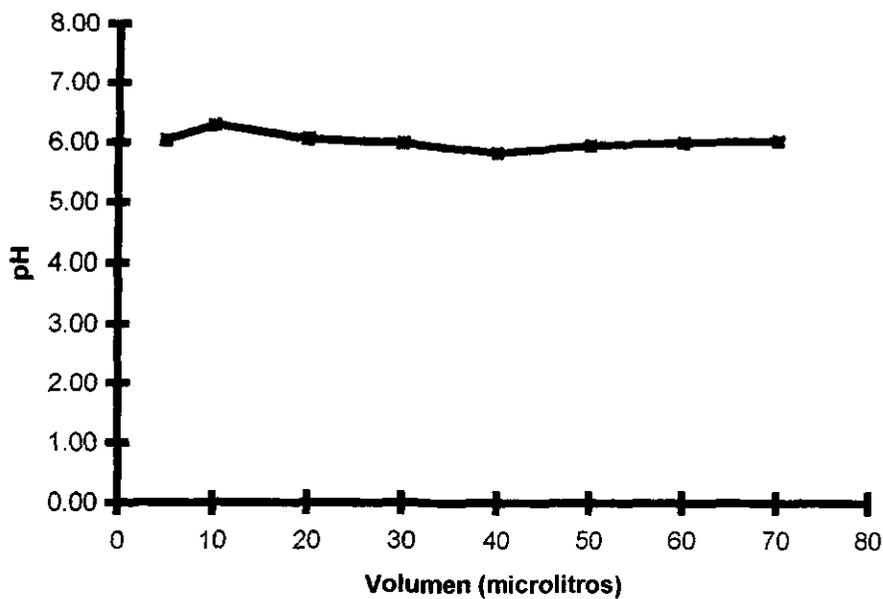


Fig. 17. Curva de pH citoplásmico vs volumen de levaduras electroporadas con piranina 100 mM. La técnica de preparación de levaduras se realizó como se describe en la Fig. 15, con la diferencia de que en este caso se lleva a cabo el cálculo final del pH citoplásmico, tal y como se describe en el apartado 2.6 de Materiales y Métodos.

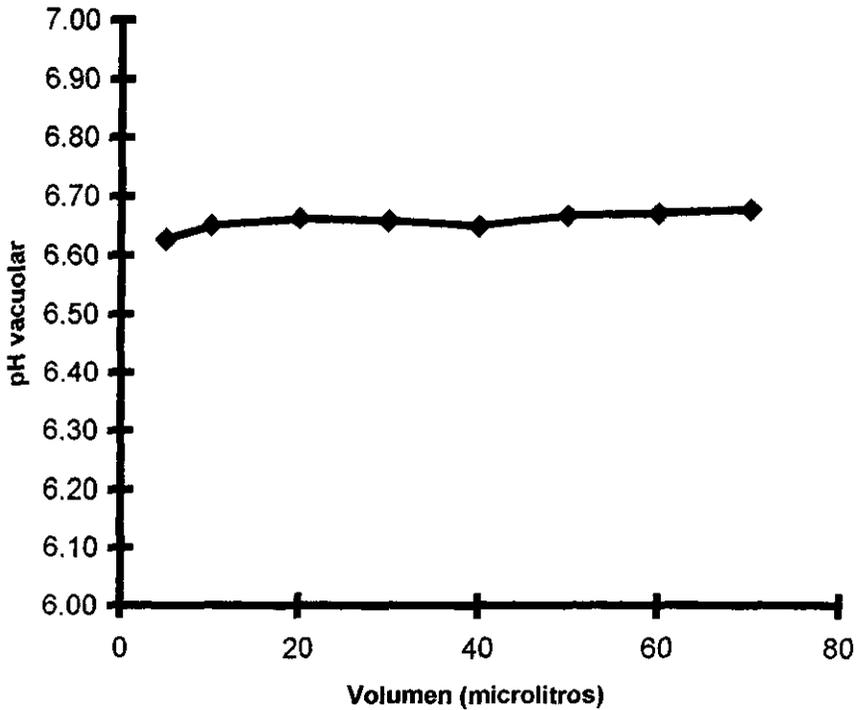


Fig. 18. Curva de pH vacuolar vs volumen de levaduras incubadas 1 h con glucosa 2.5 mM y lavadas. La técnica de preparación de levaduras se realizó tal y como se describe en la Fig. 16. Con la diferencia de que en este caso se lleva a cabo el cálculo final de pH vacuolar, como se describe en el apartado 2.6 de Materiales y Métodos.

3.2.2. Espectros de la piranina

También se obtuvieron los espectros de emisión y excitación en medio ácido y alcalino de la piranina libre o contenida en la vacuola o el citoplasma de las levaduras. La Figura 19 muestra los tres espectros de excitación y emisión en medio ácido de la piranina libre o dentro del citoplasma y la vacuola.

Dos de los tres espectros de excitación muestran un pico de fluorescencia máxima en una longitud de onda de 406 nm (piranina en la vacuola o el citoplasma) mientras que el de la piranina libre es de 404 nm. Estos resultados concuerdan con lo esperado (Fig. 3) en el sentido de que la piranina presenta una longitud de máxima fluorescencia de excitación en medio ácido muy cercano al esperado según lo reportado en la bibliografía (400 nm) (Slavik, 1994). Dada la cercanía de los valores de longitud de onda de máxima fluorescencia entre los tres espectros, éstos pueden considerarse prácticamente iguales y se concluye que la piranina se está comportando prácticamente de la misma manera en estado libre o contenida en el citoplasma o la vacuola. En el caso del espectro de emisión en medio ácido, se observa que es idéntico en los tres casos y que presentan una longitud de onda de máxima fluorescencia de 513 nm.

En el caso de los espectros de excitación en medio alcalino, la longitud de onda de máxima excitación de la fluorescencia para la piranina pura o dentro de la levadura es exactamente el mismo en los tres casos (468 nm).

En los espectros de emisión en medio alcalino (Fig. 20), se observa que los espectros correspondientes a la piranina contenida en el citoplasma o la vacuola presentan una longitud de onda de máxima fluorescencia en 513 nm; este valor es muy cercano al de la piranina libre cuya longitud de máxima fluorescencia es 511 nm. Esta mínima diferencia en los valores de longitud de onda cae dentro del error estadístico de la determinación, ya que el trazo del espectro se realizó cada 2 nm, por lo que dichos datos se consideran prácticamente iguales.

Los espectros de la piranina confirman que las propiedades fluorescentes de dicho colorante son prácticamente iguales para el caso en que la piranina se encuentre libre o en el interior del citoplasma o de la vacuola de la levadura.

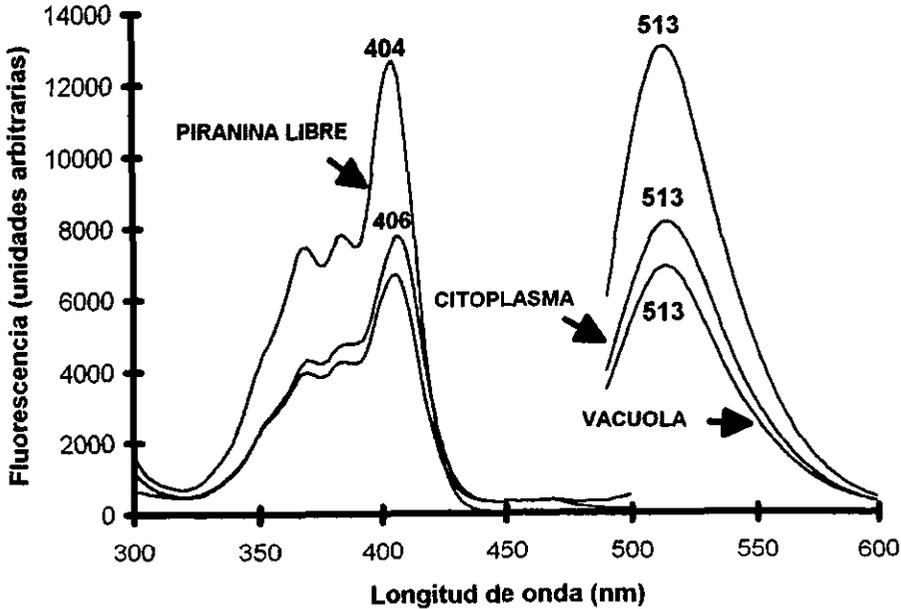


Fig. 19. Espectro de excitación y emisión en ácido de piranina libre, en citoplasma y vacuola. La realización de los espectros de la piranina en forma libre y contenida en citoplasma o vacuola se lleva a cabo de la siguiente manera: a) *Piranina libre*: Se utiliza una solución de piranina al 2.5 μM . b) *Piranina en citoplasma*: Se utilizan levaduras ayunadas y electroporadas de acuerdo a los apartados 2.1 y 2.2 de Materiales y Métodos. c) *Piranina en vacuola*: Se utilizan levaduras incubadas con glucosa 2.5 mM tal y como se describe en el apartado 2.4 b de Materiales y Métodos. La medición de la fluorescencia se lleva a cabo en el medio de incubación descrito en el apartado 2.5b y en presencia de ácido propiónico 265 mM. El espectro de excitación se realiza en el intervalo de 300-500 nm con una longitud de onda de emisión de 520 nm. El espectro de emisión se realiza en un intervalo de 480-600 nm con una longitud de onda de excitación de 400 nm.

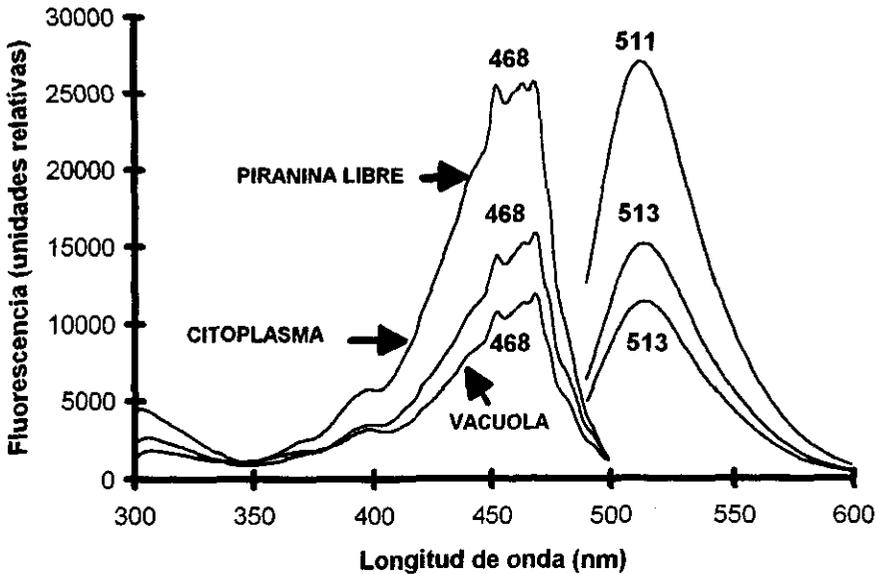


Fig. 20. Espectro de excitación y emisión en álcali de piranina libre, en citoplasma y vacuola. La realización de los espectros de la piranina en forma libre y contenida en citoplasma o vacuola se lleva a cabo de la siguiente manera: a) *Piranina libre*: Se utiliza una solución de piranina al 2.5 μM . b) *Piranina en citoplasma*: Se utilizan levaduras ayunadas y electroporadas de acuerdo a los apartados 2.1 y 2.2 de Materiales y Métodos. c) *Piranina en vacuola*: Se utilizan levaduras incubadas con glucosa 2.5 mM tal y como se describe en el apartado 2.4 b de Materiales y Métodos. La medición de la fluorescencia se lleva a cabo en el medio de incubación descrito en el apartado 2.5b y en presencia de hidróxido de amonio 100 mM. El espectro de excitación se realiza en el intervalo de 300-500 nm con una longitud de onda de emisión de 520 nm. El espectro de emisión se realiza en un intervalo de 480-600 nm con una longitud de onda de excitación de 460 nm.

3.3. VALORES Y CAMBIOS DEL pH CITOPLÁSMICO Y VACUOLAR

3.3.1. pH vacuolar de levaduras incubadas con glucosa

De acuerdo con la hipótesis del presente trabajo, la adición de glucosa a las levaduras provocaría la disminución del pH vacuolar gracias a la actividad de la H^+ -ATPasa vacuolar enzima encargada de bombear protones al interior de la vacuola (Anraku *et al.*, 1989). Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que la adición de glucosa a las levaduras incubadas 1 h con glucosa y NO lavadas provoca una mínima respuesta del pH vacuolar (0.09 unidades de pH) (Fig. 21).

La concentración de glucosa utilizada durante la incubación de dichas levaduras es muy pequeña (2.5 mM), por lo que suponemos al final de la incubación la concentración de glucosa es mínima. *S. cerevisiae* es una levadura anaerobia facultativa por lo que es capaz de metabolizar la glucosa a través de la fermentación o la respiración. La velocidad de ambas vías metabólicas es muy alta por lo que la glucosa utilizada en la incubación debe agotarse rápidamente (Gancedo y Serrano, 1989).

La baja respuesta del pH vacuolar tras la adición de glucosa, mostró que aún cuando las levaduras contienen una baja concentración de este sustrato, la sola adición de glucosa no es suficiente para lograr la acidificación vacuolar (Fig. 21). Además de lo anterior, el pH vacuolar inicial es más alto de lo que se esperaba (6.3) ya que la vacuola es un organelo que se caracteriza por su acidez. En el caso de *S. cerevisiae* se han reportado valores de pH vacuolar de 6.05 y 6.2 (Abe y Hovikoshi, 1995; Preston *et al.*, 1989) (ver Tabla 4).

En vista de lo anterior se decidió cuantificar la acidez vacuolar en levaduras incubadas con una mayor concentración de glucosa (10 y 20 mM) suponiendo que la acidificación vacuolar es un proceso más lento que el del citoplasma y por lo tanto requiere de un mayor tiempo de incubación o de una mayor concentración de glucosa. Sin embargo, se observó que tanto el pH vacuolar como la respuesta del mismo a la adición de glucosa 10 y 20 mM (Fig. 22) es prácticamente la misma en ambas preparaciones. Se concluyó que en este tipo de preparaciones no es posible observar una respuesta significativa del pH vacuolar a la incubación o adición de glucosa.

3.3.2. pH citoplásmico de levaduras incubadas con glucosa

Con el fin de conocer el comportamiento del pH citoplásmico en estas mismas levaduras incubadas 1 h con glucosa 2.5 mM, se diseñó el esquema presentado en la Fig. 5. Dicho esquema consiste en incubar a las levaduras con glucosa y posteriormente electroporarlas con piranina. Este tratamiento asegura que la piranina se concentre únicamente en el citoplasma sin embargo, son levaduras incubadas de la misma forma que las levaduras en las que se mide el pH vacuolar, por lo que la respuesta del pH de ambas preparaciones es

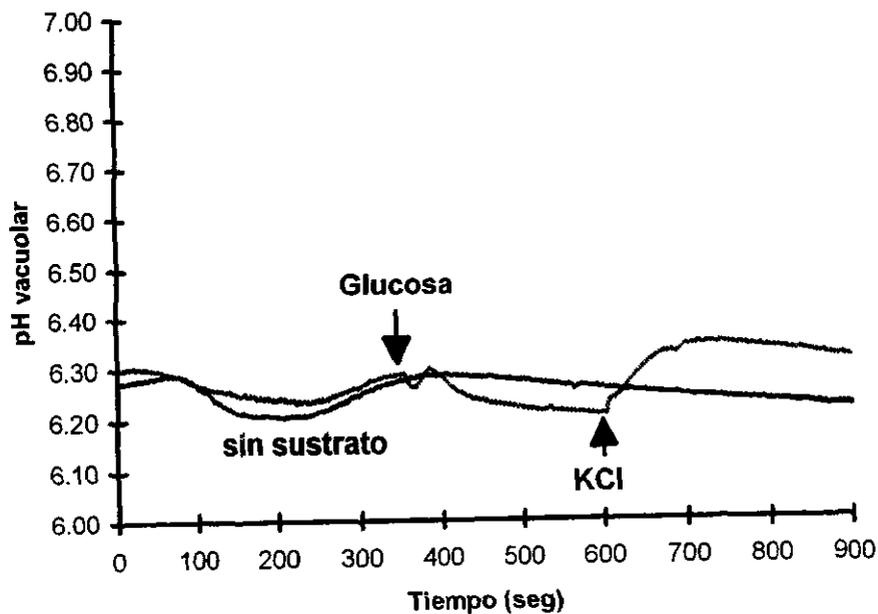


Fig. 21. pH vacuolar de levaduras incubadas 1 h con glucosa 2.5 mM y no lavadas. Las levaduras se preparan de acuerdo a los apartados 2.1, 2.2 y 2.4a de Materiales y Métodos. La medición de fluorescencia y el cálculo de pH se llevan a cabo de acuerdo a los apartados 2.5b y 2.6. Las adiciones de glucosa 10 mM y KCl 10 mM se llevan a cabo a los 390 y 600 seg. respectivamente.

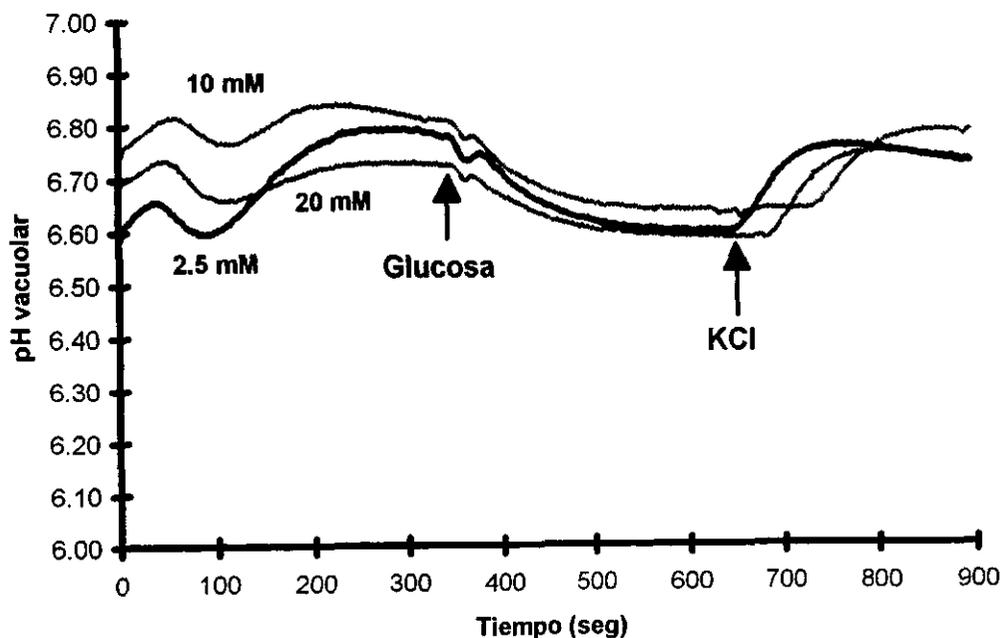


Fig. 22. pH vacuolar de levaduras incubadas 1 h con glucosa 2.5, 10 y 20 mM y lavadas. Las levaduras incubadas con glucosa 2.5 mM se preparan de acuerdo a los apartados 2.1, 2.2 y 2.4b de Materiales y Métodos. La preparación de las levaduras incubadas con glucosa 10 y 20 mM varía únicamente en la concentración de la glucosa utilizada en la incubación. Posteriormente, se lleva a cabo la incubación de las levaduras en la celda del fluorómetro, la medición de la fluorescencia y el cálculo de pH tal y como se describe en los apartados 2.5b y 2.6 de Materiales y Métodos. Las adiciones de glucosa 10 mM se llevan a cabo a los 350 seg.; la adición de KCl 10 mM se realiza a los 650, 700 o 750 seg. según muestra cada trazo.

comparable.

Finalmente, las levaduras se someten a un proceso de lavado con el fin de eliminar el exceso de piranina; la estandarización del método incluye tres lavados con agua destilada. Sin embargo, la investigación tomó otro cauce al observar las consecuencias del lavado de las levaduras sobre el pH interno de la misma y sobre su respuesta a la adición de glucosa.

Una de las características más sobresalientes del trazo de la Fig. 23 es el proceso de alcalinización citoplásmica. A diferencia de lo que se observa en las levaduras ayunadas (Fig. 25) en las cuales el incremento del pH citoplásmico se da en respuesta a la adición de glucosa, las levaduras incubadas con este mismo sustrato y lavadas muestran un proceso inicial de alcalinización (Fig. 23); el pH inicial (6.22) se incrementa en 0.33 unidades en los primeros 100 seg. de incubación.

En la Fig. 24 se observa el incremento en el consumo de oxígeno que provoca la adición de glucosa a las levaduras ayunadas; este fenómeno coincide con el incremento del pH citoplásmico de estas mismas levaduras (Fig. 25) el cual responde a la actividad de la H^+ -ATPasa plasmática (Calahorra *et al.*, 1998). Las levaduras ayunadas consumieron, en 350 seg. de incubación, 25% del oxígeno inicialmente disuelto en el medio (Fig. 24); el pulso de glucosa a estas mismas levaduras aumentó claramente la tasa de consumo de oxígeno, dejando menos del 10% de oxígeno en el medio a los 350 seg. de incubación. En términos de velocidad de consumo, las levaduras ayunadas consumieron 0.4 nátomos O_2 /mg. min. en comparación con las levaduras que recibieron glucosa cuyo consumo fue de 4 nátomos O_2 /mg. min.

En el caso de las levaduras incubadas y lavadas (Fig. 23), al principio se consideró que la alcalinización inicial podría responder a la actividad de la H^+ -ATPasa plasmática, sin embargo, existen varias características del trazo que muestran que la actividad de esta enzima es muy baja por lo que dicha alcalinización citoplásmica debe responder, mayoritariamente, a la participación de otro fenómeno.

3.3.3. La H^+ -ATPasa plasmática

La actividad de la H^+ -ATPasa plasmática es fundamental para la vida de la levadura ya que establece el potencial electroquímico indispensable para el transporte y acumulación de iones y metabolitos necesarios para el desarrollo y proliferación de este microorganismo (Peña *et al.*, 1969, 1972, Peña, 1975). Se ha observado que la cantidad de esta enzima se incrementa en levaduras en desarrollo y que constituye una de las proteínas de membrana más abundantes en la levadura además de que consume una alta proporción del ATP de la levadura (Gancedo y Serrano, 1989).

La H^+ -ATPasa plasmática es una bomba primaria cuya actividad depende directamente del estado metabólico de la levadura ya que el transporte de protones desde el citoplasma de la levadura al exterior de la misma, en contra de su gradiente de concentración, se realiza gracias a la utilización de la energía libre obtenida de la hidrólisis del ATP en ADP y P

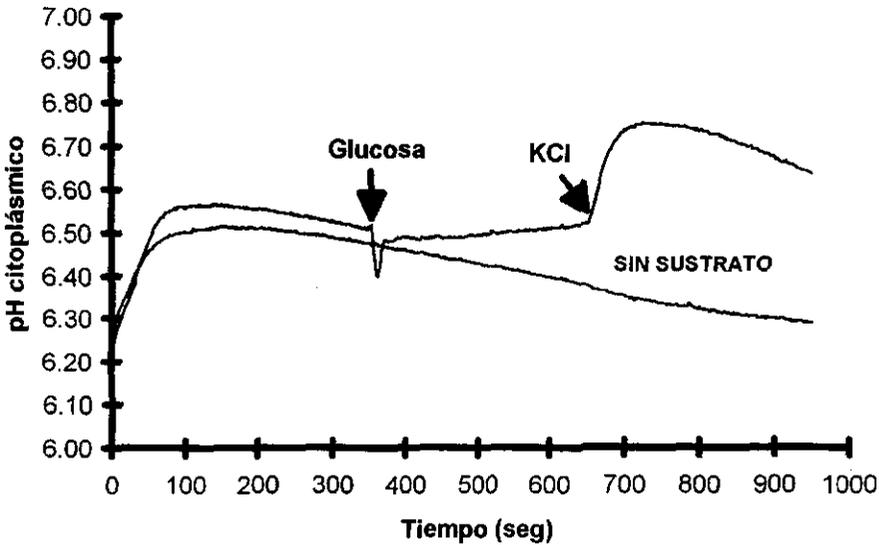


Fig. 23. pH citoplásmico de levaduras incubadas 1 h con glucosa 2.5 mM y lavadas. Las levaduras se preparan de acuerdo a los apartados 2.1 y 2.2. Las condiciones de preincubación son las que corresponden al apartado 2.3b. Las levaduras se preincubaban con glucosa 2.5 mM, tal y como se describe en el apartado 2.5a. Posteriormente se realiza el trazo de pH tal y como lo describe el apartado 2.5b y finalmente se calcula el pH citoplásmico de acuerdo al apartado 2.6. Las adiciones de glucosa 10 mM y KCl 10 mM se realizan a los 350 y 650 seg. de incubación respectivamente.

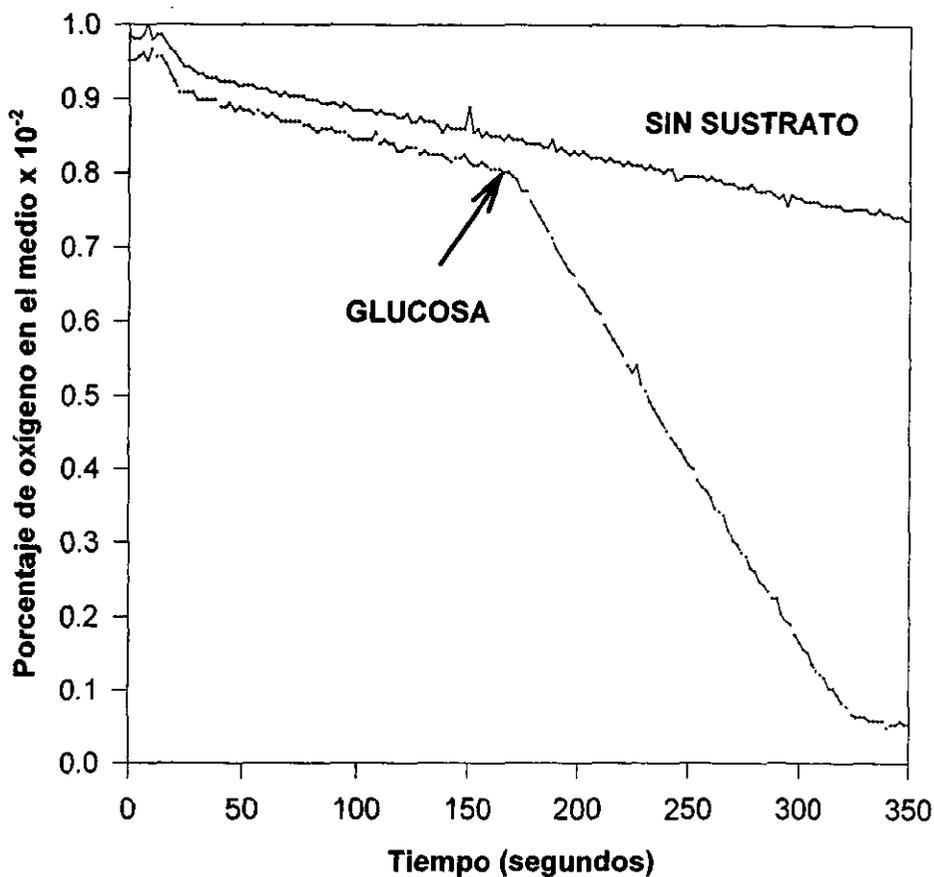


Fig. 24. Consumo de oxígeno en células de 24 h en YPD y 14 h de ayuno. Trazo sin sustrato y efecto de glucosa. Las levaduras se preparan como se describe en el apartado 2.1 de Materiales y Métodos. Se utilizan levaduras ayunadas y se lleva a cabo la medición del consumo de oxígeno tal y como se describe en el apartado 2.9 de Materiales y Métodos. La flecha indica el momento en que se adiciona glucosa 10 mM.

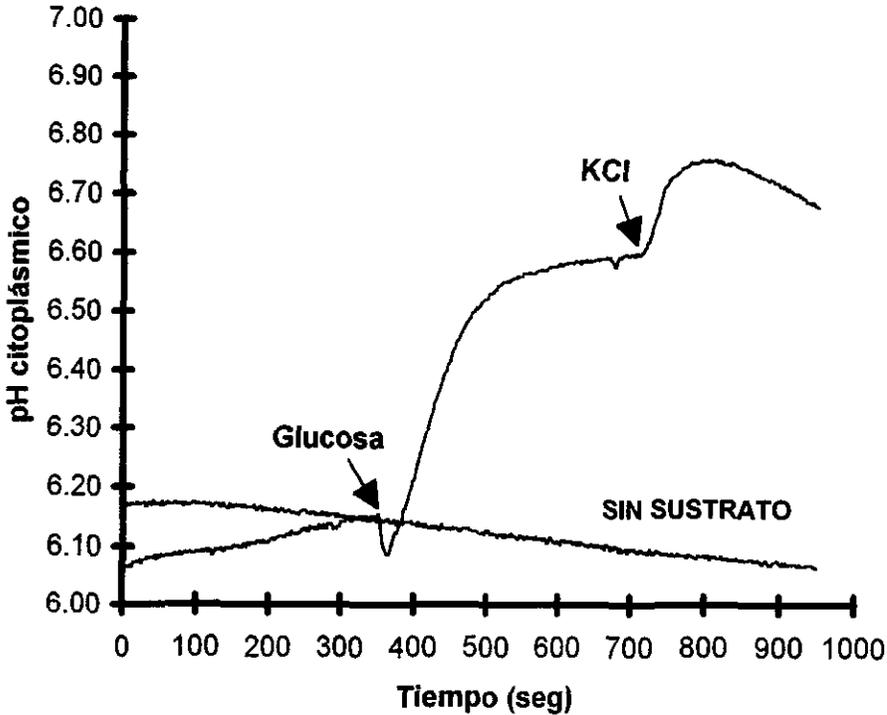


Fig. 25. pH citoplásmico de levaduras ayunadas. Las levaduras se preparan de acuerdo a los apartados 2.1, 2.2 y 2.3a de Materiales y Métodos. Las levaduras se incuban en la celda del fluorómetro y se lleva a cabo el cálculo de pH según los apartados 2.5b y 2.6. Las flechas muestran los momentos en que se adicionan glucosa 10 mM o KCl 10 mM a la celda del fluorómetro que corresponden a los 350 y 700 seg. de incubación respectivamente.

(Mitchell, 1968; Peña, 1975) (Fig. 26). Los protones que esta enzima transporta hacia el exterior de la levadura provienen del CO_2 el cual, hidratado presenta un equilibrio ácido-base entre el ácido carbónico y el bicarbonato y protón (López *et al.*, 1999) (Fig. 26).

Puesto que la síntesis del ATP se realiza a partir de la oxidación de moléculas carbonadas como la glucosa a través de las vías del metabolismo energético como son la fermentación y la respiración (Lehninger, 1985), la velocidad de síntesis de ATP afecta directamente la actividad de la H^+ -ATPasa plasmática.

La glucosa también estimula la activación de la H^+ -ATPasa plasmática. El mecanismo de activación de la H^+ -ATPasa plasmática se presenta gracias a la fosforilación de esta enzima tras la adición de glucosa a las levaduras ayunadas (Serrano, 1983; Chang y Slayman, 1991). La región C-terminal de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática contiene sitios probables de fosforilación para cinasas dependientes de Ca^{2+} -calmodulina y/o proteína-kinasa C (Estrada *et al.*, 1996). Su activación consiste en la modificación de algunos de sus parámetros cinéticos: la K_m para ATP disminuye de 1.5-2 a 0.3-0.6 mM y la V_{max} se incrementa tres veces, además, el pH óptimo se modifica de 5.6 a 6-7; estas características la convierten en una enzima más efectiva para llevar a cabo el bombeo de protones al exterior de la levadura (Serrano, 1991).

Un dato muy importante lo constituye el pH inicial de las levaduras incubadas con glucosa y lavadas (6.22) (Fig. 23), el cual es prácticamente el mismo que el pH inicial de las levaduras ayunadas (6.18) (Fig. 25). Este dato está de acuerdo con la baja concentración de glucosa que debe existir en el medio y dado que tanto el metabolismo energético como la actividad de la H^+ -ATPasa plasmática son altamente dependientes de este sustrato, es posible que a pesar de que la levadura puede utilizar fuentes de carbono alternas a la glucosa como por ejemplo el etanol, lo cierto es que la actividad de bombeo de protones a través de la H^+ -ATPasa plasmática disminuye si la concentración de glucosa en la levadura es muy baja (López *et al.*, 1999). Esto provoca que el pH citoplásmico sea más ácido y el ΔpH y el $\Delta\psi$ (potencial de membrana) sean menores en las levaduras con baja concentración de glucosa en comparación con el pH citoplásmico que alcanzan las levaduras ayunadas tras el pulso de glucosa (Fig. 25).

La disminución en la concentración de glucosa en la levadura promueve la activación de vías como la gluconeogénesis y la respiración (Gancedo y Serrano, 1989); la disminución en la concentración de glucosa disminuye la velocidad del metabolismo (Fig. 26). La producción de CO_2 y H_2CO_3 continúa pero existen varias razones por las cuales el bombeo de protones a través de la H^+ -ATPasa plasmática disminuye, a saber: la actividad de esta enzima depende directamente de la provisión de ATP el cual, si la concentración de sustrato como la glucosa es menor, también su metabolismo disminuye y por lo tanto la velocidad de producción de ATP es menor.

Tal y como se ha mencionado, la H^+ -ATPasa plasmática depende de la glucosa no solo gracias a la provisión de ATP, sino además la glucosa estimula vías de transducción de señales que provocan la fosforilación de esta enzima, incrementando su actividad (Serrano,

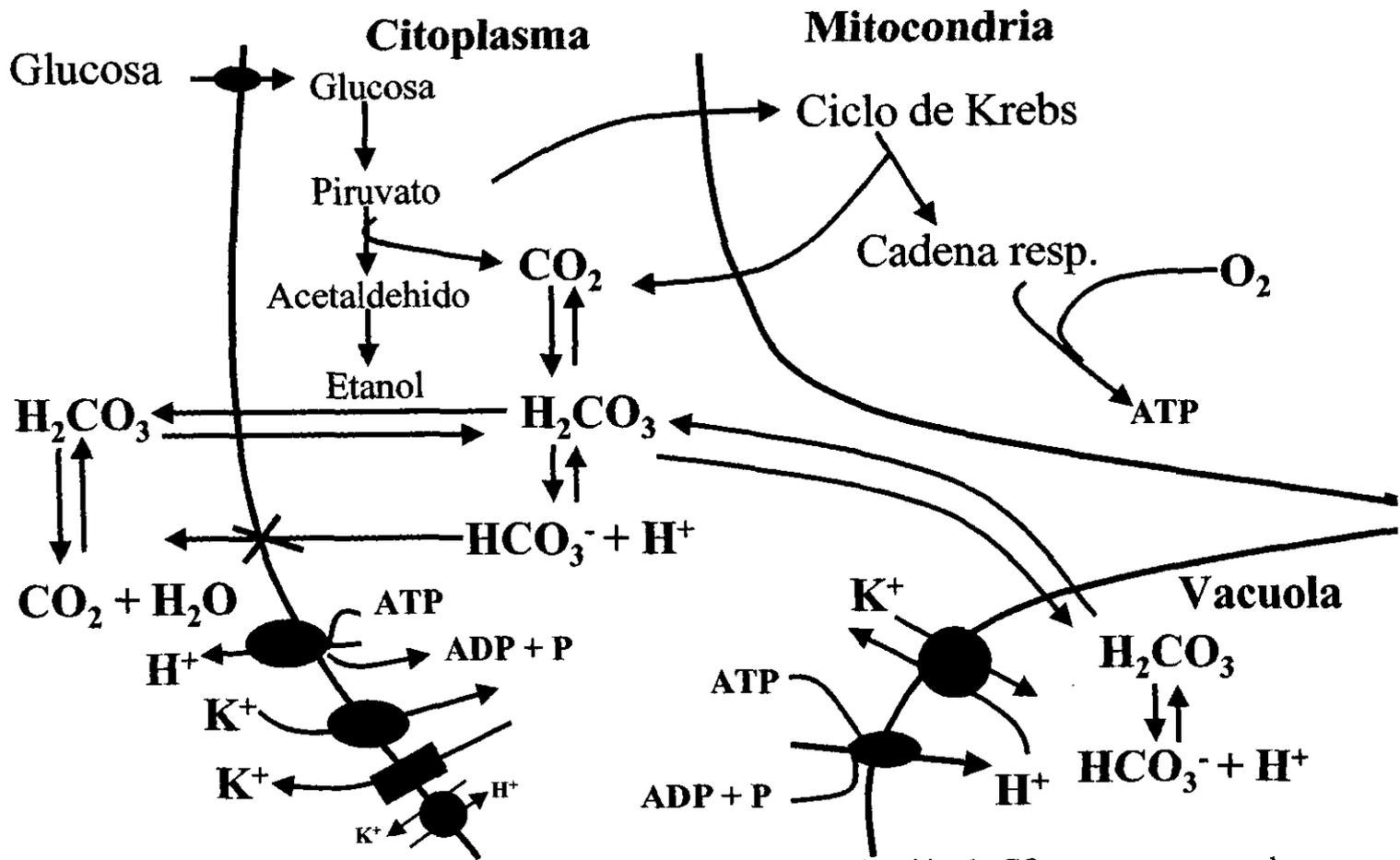


Figura 26. Relaciones entre el metabolismo energético, la producción de CO₂ y protones, con la actividad de las H⁺-ATPasas plasmática y vacuolar y el transporte de K⁺ a citoplasma y vacuola en la levadura *S. cerevisiae*. (Referencias como en las Figs. 1 y 2 y Gancedo y Serrano, 1989).

1983; Thevelein, 1994). Estas vías de transducción de señales son sensibles a la concentración de glucosa por lo que si ésta disminuye, también la activación de las vías se ve afectada, provocando el retorno a la actividad basal de la H^+ -ATPasa plasmática.

En estas condiciones metabólicas no solamente la producción de H_2CO_3 disminuirá sino también la capacidad de la H^+ -ATPasa plasmática para bombear protones. Esto trae como consecuencia una disminución en el grado de ionización del ácido carbónico en bicarbonato y protón lo que a su vez provoca una disminución en la disponibilidad de protones para la H^+ -ATPasa plasmática (Fig. 26) (López *et al.*, 1999).

Este proceso es el que se presenta en las levaduras ayunadas o en las que han sido incubadas con baja concentración de glucosa cuyo pH citoplásmico inicial es prácticamente el mismo en ambas preparaciones (6.22 y 6.18 respectivamente) (Figs. 23 y 25). Sin embargo, a pesar de presentar el mismo pH citoplásmico, el estado metabólico de ambas preparaciones no es exactamente el mismo ya que tanto la velocidad de consumo de oxígeno y como del bombeo de protones es mayor en las levaduras incubadas con glucosa que en las levaduras ayunadas (no se muestra). Es probable que en la preparación de levaduras incubadas con glucosa exista etanol que proviene precisamente de la fermentación de la glucosa lo cual mantiene más activo el metabolismo (Gancedo y Serrano, 1989; López *et al.*, 1999), además de que la incubación con glucosa le permite a las levaduras retomar parte de los nutrientes del exterior que durante el ayuno se pierden lo cual también favorece la activación de su metabolismo.

En levaduras incubadas con glucosa y lavadas se observa que una vez que el proceso de alcalinización alcanza el equilibrio (aproximadamente a los 200 seg), el pH citoplásmico tiende a disminuir nuevamente hasta un valor de 6.3 al final del trazo (Fig. 23). Sin embargo, si a estas levaduras se les añade glucosa, el pH citoplásmico se mantiene en el mismo valor que habían alcanzado antes de la adición de este sustrato (6.52); la baja actividad de la H^+ -ATPasa plasmática no es capaz de mantener el pH citoplásmico constante por lo que éste tiende a disminuir desde los 350 seg. del trazo.

Si la alcalinización del citoplasma observado en estas levaduras fuera producto únicamente de la actividad de la H^+ -ATPasa plasmática, dicha respuesta podría explicarse por el desplazamiento del equilibrio de esta bomba hacia una mayor eliminación de protones del exterior de la levadura. Como cualquier equilibrio químico, la H^+ -ATPasa plasmática desplaza el equilibrio hacia la dirección en el cual se está eliminando algún componente del mismo (Principio de LeChatelier; Ramette, 1983). Y si en este caso se observa una pérdida de protones desde el interior del citoplasma, la explicación radica en que inicialmente la levadura ha sufrido una remoción de protones en su exterior.

Esto se explicaría por el lavado de las levaduras el cual elimina los compuestos del exterior de la misma entre los que se encuentran los protones bombeados por la levadura. Sin embargo, el requisito indispensable para que la H^+ -ATPasa plasmática pueda responder al desplazamiento es la cantidad de ATP que la levadura sea capaz de otorgarle, pero en este caso la capacidad metabólica de este organismo es muy bajo. De hecho, las levaduras

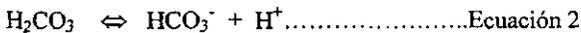
ayunadas también son sometidas a un proceso de lavado exhaustivo al final de la incubación, y sin embargo, el pH citoplásmico de la misma no muestra una alcalinización considerable al inicio del trazo de pH (Fig. 25). En todo caso, si este mecanismo fuera el único responsable se esperaría que el cambio final de pH fuera menor al observado y que además se desarrollara a una velocidad más baja.

Por lo tanto, se consideró que otro mecanismo alterno podría estar funcionando durante el proceso de alcalinización citoplásmica el cual, necesariamente, tendría que estar respondiendo a la eliminación de la acidez externa de la levadura provocada por el lavado de las mismas.

3.3.4. El ácido carbónico y el pH interno de la levadura

La difusión de CO₂ y del ácido carbónico al exterior de las levaduras constituye un importante mecanismo de acidificación del entorno de este microorganismo (Conway y Brady, 1950). En levaduras cuyo metabolismo se encuentra muy activo, este sistema funciona de manera paralela al bombeo de protones a través de la H⁺-ATPasa plasmática provocando una significativa acidificación externa que puede alcanzar valores de pH de 3 o 4 (López *et al.*, 1999).

El CO₂ se hidrata a H₂CO₃ (Peña, 1975; Goffeau y Slayman, 1981) y éste se ioniza para formar bicarbonato y protón (ecuación 2). Y gracias a su alta concentración dentro de la levadura, el ácido carbónico constituye la fuente principal de protones en el citoplasma cuya distribución y transporte al exterior de la levadura por medio de la H⁺-ATPasa plasmática, juega un papel fundamental en el establecimiento del pH interno de la levadura (Fig. 26). Además de lo anterior, tanto el CO₂ como el H₂CO₃ son moléculas sin carga capaces de difundir libremente a través de las membranas biológicas (Henry, 1996).



El CO₂ es producto de reacciones de descarboxilación como la que sufre el piruvato para convertirse en acetaldehído durante la fermentación alcohólica de la levadura y puesto que *S. cerevisiae* es una levadura fermentativa (Gancedo y Serrano, 1989) este microorganismo es capaz de producir altas concentraciones de CO₂. Se han reportado concentraciones de CO₂ hasta de 200 mM (López *et al.*, 1999) cuya producción sobrepasa con mucho a la de otros ácidos orgánicos provenientes también del metabolismo energético de la levadura. El ácido succínico también difunde al exterior de la levadura pero alcanza una concentración menor que la del CO₂; seguramente porque es producto de la respiración, la cual en las levaduras fermentativas no es muy activa (Gancedo y Serrano, 1989).

Puesto que en las levaduras incubadas con glucosa y lavadas la actividad de la H⁺-ATPasa plasmática debe ser muy baja debido a la baja concentración de glucosa, consideramos al CO₂ como el responsable del proceso inicial de alcalinización citoplásmica de estas levaduras (Fig. 23). Suponemos que es la pérdida del CO₂ y el H₂CO₃ internos los que, tras

el lavado de las levaduras, difunden hacia el exterior de las mismas en respuesta a la diferencia de concentración que ha provocado el lavado de las mismas.

3.3.5. El equilibrio del CO₂ y el lavado de las levaduras

López *et al* (1999) ha descrito la importancia del equilibrio del CO₂ en la regulación del pH de la levadura.

El CO₂ constituye la fuente de protones primordial para este microorganismo; su concentración en el citoplasma es fundamental para el establecimiento del pH de este compartimento. La concentración final de protones en el citoplasma depende en gran medida de la velocidad de su producción y de su distribución entre el citoplasma y el exterior de la levadura. En el primer punto, la actividad metabólica juega un papel primordial, mientras que la H⁺-ATPasa plasmática funciona en la distribución de los protones entre el interior y el exterior de la levadura.

El grado de ionización del ácido carbónico depende de la actividad de la H⁺-ATPasa plasmática la cual establece el pH citoplásmico y por lo tanto modifica el equilibrio ácido-base de dicho ácido. El bicarbonato se acumula en el interior de la levadura, mientras que los protones se distribuyen entre el citoplasma y el exterior de la levadura gracias a la actividad de la H⁺-ATPasa plasmática, la cual establece finalmente el pH citoplásmico, el ΔpH y el Δψ a través de la membrana plasmática de la levadura (Peña, 1975). El mantenimiento de la concentración de protones necesaria para cubrir dichas funciones depende directamente de la capacidad metabólica de la levadura y del aporte de ácido carbónico, así como de una actividad óptima de la H⁺-ATPasa plasmática.

La disponibilidad de protones libres respresenta un aspecto fundamental para el funcionamiento de la H⁺-ATPasa plasmática, la cual es finalmente establecido por el pH citoplásmico. Entre más cerca se encuentre el pH citoplásmico de su óptimo valor (6.6-6.8) (Calahorra *et al.*, 1998) mayor disponibilidad de protones habrá para la H⁺-ATPasa plasmática. A su vez, el pH óptimo del citoplasma se alcanza si la H⁺-ATPasa plasmática está activa, lo cual depende directamente de la naturaleza del sustrato presente en la levadura. En el caso de la glucosa se sabe que produce mayor concentración de ATP y CO₂ que el etanol (López *et al.*, 1999), además de que la glucosa estimula la actividad de esta enzima (Thevelein, 1994).

Existe además un factor adicional que favorece la actividad de la H⁺-ATPasa plasmática y es el hecho de que la levadura sea capaz de neutralizar las cargas negativas provenientes de la retención del bicarbonato. Es decir, una vez que los protones son bombeados al exterior de la levadura, el ion bicarbonato se acumula y entre mayor capacidad tenga la levadura para poder contener su retención, más favorecida estará la actividad de la H⁺-ATPasa plasmática. En este punto el ion potasio juega un papel fundamental debido a su capacidad de retención del bicarbonato; más adelante se abundará más al respecto (Conway y Brady, 1950; López *et al.*, 1999) (Fig. 26).

La mutua relación que existe entre el sistema del CO_2 y la H^+ -ATPasa plasmática es clara debido a la relación de ambos con el metabolismo celular y a su vez porque la actividad de la bomba es capaz de alterar el equilibrio ácido-base del CO_2 . En una levadura completamente activa, tanto la difusión del CO_2 como el bombeo de protones se encuentran funcionando normalmente y la levadura será capaz de establecer el ΔpH , el $\Delta\psi$ y el pH citoplásmico óptimos. El problema de la regulación del pH en la levadura surge en el momento en que la concentración de glucosa disminuye y la levadura necesita recurrir a la utilización de sustratos alternos y la degradación sus propias reservas. Sin embargo, de cualquier forma la disminución en la concentración de glucosa provoca el decremento de la velocidad del metabolismo energético (Gancedo y Serrano, 1991). En una levadura menos activa se observa una menor producción de ácido carbónico así como una disminución en el bombeo de protones con la consecuente disminución del pH interno de la levadura. A menor pH interno, la ionización del ácido carbónico disminuye provocando a su vez un decremento en la concentración de protones libres, este hecho dificulta la actividad de la H^+ -ATPasa plasmática.

La cuestión fundamental gira alrededor de aquellos protones que no son bombeados al exterior de la levadura sino que permanecen en el interior de la misma y que en gran medida son los responsables del pH citoplásmico. El mantenimiento de la concentración de protones adecuada dentro de la levadura depende de su producción y de su distribución entre el interior y el exterior de la levadura. Si ahora pensamos en la disminución de la concentración de sustrato y en el decremento del pH citoplásmico y además en una alteración en el equilibrio del CO_2 debido a su eliminación del medio externo, como sucede en el caso de las levaduras lavadas (Fig. 23), las consecuencias son el incremento del pH citoplásmico de la levadura.

Dado que la difusión del CO_2 o del ácido carbónico provocan los mismos efectos sobre el pH interno de la levadura, de aquí en adelante éstos se mencionan de manera indistinta. En este caso, la eliminación del ácido carbónico del exterior provoca la difusión del mismo desde el interior de la levadura. Si el metabolismo de la levadura está activo, la recuperación del ácido carbónico se realizará sin problema gracias a la difusión del ácido carbónico proveniente directamente del metabolismo energético. Sin embargo, si la producción de ácido carbónico ha decaído por una disminución en la concentración de sustrato, el restablecimiento del equilibrio del CO_2 requerirá de la difusión del ácido carbónico que se encuentra en el citoplasma y que forma parte del mantenimiento del pH citoplásmico en la levadura.

La difusión del ácido carbónico interno provoca a su vez la remoción de bicarbonato y protón, ya que, de acuerdo al principio de LeChatelier (Ramette, 1983), la pérdida de cualquiera de los componentes del equilibrio químico tiende a desplazar la direccionalidad del mismo hacia la producción del componente que ha sido removido. En este caso, la eliminación de ácido carbónico externo tiende a desplazar su equilibrio ácido-base hacia una mayor formación de dicho ácido a partir de bicarbonato y protón provocando finalmente el incremento del pH citoplásmico (Fig. 26).

Por otra parte, de acuerdo a la Ley de Fick (Berne y Levy, 1988) la magnitud y la velocidad de difusión de un metabolito al exterior de la levadura dependerá directamente de la magnitud del gradiente de concentración existente entre el interior y el exterior de la levadura, por lo tanto, entre mayor sea la diferencia de concentración del ácido carbónico entre el exterior y el interior de la levadura, la velocidad de difusión y la magnitud del cambio de pH será también mayor (Fig. 26).

Esta es la razón por la cual el citoplasma se alcaliniza en las levaduras incubadas con glucosa 2.5 mM y lavadas. El CO₂ difunde eliminando protones involucrado en el mantenimiento del pH interno de la levadura (Fig. 23).

3.3.6. El ion potasio y el pH citoplásmico

A pesar de que la actividad de la H⁺-ATPasa plasmática es baja es las levaduras incubadas con glucosa y lavadas, estas levaduras son capaces de transportar K⁺ a su interior. Esto se observa por el incremento del pH citoplásmico que provoca la adición de KCl a los 350 seg. de incubación (Fig. 27).

El K⁺ es un catión que se transporta a través de los uniportadores Trk1 o Trk2 (Gaber *et al.*, 1988) y cuyas características ya han sido descritas en el apartado 1.1.1. La característica más sobresaliente del transporte del K⁺ al interior de la levadura es que, debido a la carga positiva del mismo, su entrada a la levadura provoca la despolarización de la membrana plasmática (Peña *et al.*, 1975). La H⁺-ATPasa plasmática es la enzima encargada del establecimiento del potencial electroquímico en la membrana plasmática de la levadura (Peña *et al.*, 1969, 1972; Peña, 1975). Esta enzima es sensible a la alteración en el potencial de membrana provocada por la entrada del K⁺ (Seto-Young *et al.*, 1991). Su respuesta a dicha despolarización de la membrana es la estimulación de su actividad que se refleja en el incremento del pH citoplásmico provocado por un mayor bombeo de protones al exterior de la levadura (Fig. 27). Es decir, la magnitud del cambio de pH citoplásmico tras la adición de KCl es proporcional a la magnitud del $\Delta\psi$ en la membrana plasmática el cual se da gracias a la actividad de la H⁺-ATPasa plasmática.

En la Fig. 27 se observa que de cualquier forma la magnitud en el Δ pH tras la adición de KCl es menor si esta adición se realiza antes de la adición de glucosa en comparación con el trazo cuyas adiciones se realizan en sentido inverso: el Δ pH provocado por el KCl posterior a la adición de glucosa (0.22) es prácticamente dos veces mayor que en el caso inverso (0.1) (Fig. 27).

Puesto que la alcalinización citoplásmica inicial responde a la salida de CO₂ y ácido carbónico de las levaduras, el exterior sufre una acidificación el cual promueve el incremento del $\Delta\psi$ a través de la membrana plasmática promoviendo la entrada del ion potasio (Peña, 1975). El mismo efecto se ha observado en las levaduras incubadas en amortiguador a pH 4, en las cuales la entrada del ion potasio es mayor que en las levaduras incubadas en amortiguador a pH 6 (Peña, 1975).

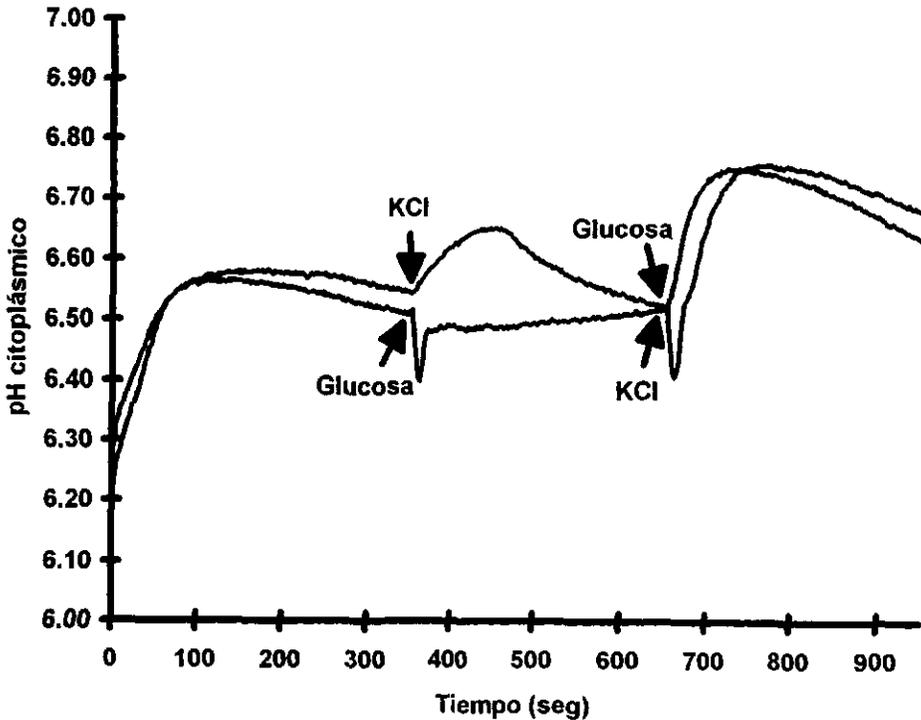


Fig. 27. pH citoplásmico de levaduras incubadas 1 h con glucosa 2.5 mM y lavadas. Las levaduras se preparan de acuerdo a los apartados 2.1 y 2.2. Las condiciones de preincubación son las que corresponden al apartado 2.3b. Las levaduras se preincuban con glucosa 2.5 mM, tal y como se describe en el apartado 2.5a. Posteriormente se realiza el trazo de pH tal y como lo describe el apartado 2.5b y finalmente se calcula el pH citoplásmico de acuerdo al apartado 2.6. En un trazo las adiciones de glucosa 10 mM y KCl 10 mM se realizan a los 350 y 650 seg. de incubación respectivamente; en el otro trazo las adiciones se realizan en el orden inverso.

3.3.7. pH vacuolar en levaduras incubadas con glucosa y lavadas

En vista de los cambios del pH citoplásmico y de su comportamiento frente a la adición de sustrato en las levaduras incubadas y lavadas, se decidió llevar a cabo la medición del pH vacuolar en levaduras preparadas de la misma forma con el fin de comparar el comportamiento del pH vacuolar y citoplásmico en este organismo.

La Fig. 28 muestra que, efectivamente, el pH vacuolar también sufre alteraciones después del lavado de las levaduras. El lavado de las levaduras provoca cambios tanto en el valor de pH como en su comportamiento durante el trazo que, al compararse con el de las levaduras NO lavadas (Fig. 21), muestran diferencias significativas. A pesar de que el pH inicial de las levaduras incubadas y lavadas es de 6.22, después de 100 seg. el pH es de 6.58, en comparación con el pH inicial de las levaduras incubadas y NO lavadas que es más ácido (6.3) y que se mantiene dentro de un pequeño intervalo de variación.

Tal y como se ha explicado, las levaduras con bajo metabolismo no son capaces de regular su pH interno. El lavado de las levaduras remueve el ácido carbónico del exterior a lo cual el pH citoplásmico responde con una alcalinización. La misma respuesta se observa con el pH vacuolar. Puesto que el equilibrio del CO_2 en la levadura se extiende desde el exterior de la misma hasta el citoplasma y la vacuola (Fig. 26), la alteración de su equilibrio exterior provoca la difusión del ácido carbónico desde la vacuola.

Se observa que en las levaduras incubadas con glucosa el trazo de pH comienza con una pequeña disminución la cual a los 100 seg. es superada por una fase de alcalinización. Puesto que la H^+ -ATPasa vacuolar es la encargada de bombear protones al interior de la vacuola (Anraku *et al.*, 1989), es posible que el pequeño pico de acidificación inicial se deba a la actividad de esta enzima. Es posible que dadas las propiedades amortiguadoras del CO_2 y a que en las levaduras incubadas con glucosa y lavadas la producción de este metabolito debe ser muy baja al final de dicha incubación, la capacidad amortiguadora de la vacuola disminuya favoreciendo la acidificación del interior de este organelo gracias a los protones bombeados a través de la H^+ -ATPasa vacuolar. Este puede ser uno de los motivos por el que únicamente bajo estas condiciones, y en ausencia de ion potasio (ver sección 3.3.8), es posible observar la acidificación vacuolar. Otro hecho que puede ser importante en el fenómeno de acidificación vacuolar es la estimulación de la H^+ -ATPasa gracias al bajo ΔpH existente entre la vacuola y el citoplasma (Fig. 28). Como en cualquier equilibrio químico, la eliminación de los productos tiende a desplazar el equilibrio hacia una mayor producción de los mismos (Principio de Lechatelier; Ramette, 1983), por lo que si el pH vacuolar es mayor al pH citoplásmico, la H^+ -ATPasa vacuolar tenderá a bombear más protones hacia el interior de la vacuola provocando la acidificación de la misma.

La acidificación inicial es seguida por un proceso de alcalinización el cual cambia de manera significativa el pH vacuolar de estas levaduras (Fig. 28) lo que muestra el importante papel del CO_2 en la regulación del pH de este organelo. A continuación se describe el proceso que suponemos provoca el fenómeno de alcalinización vacuolar tras el

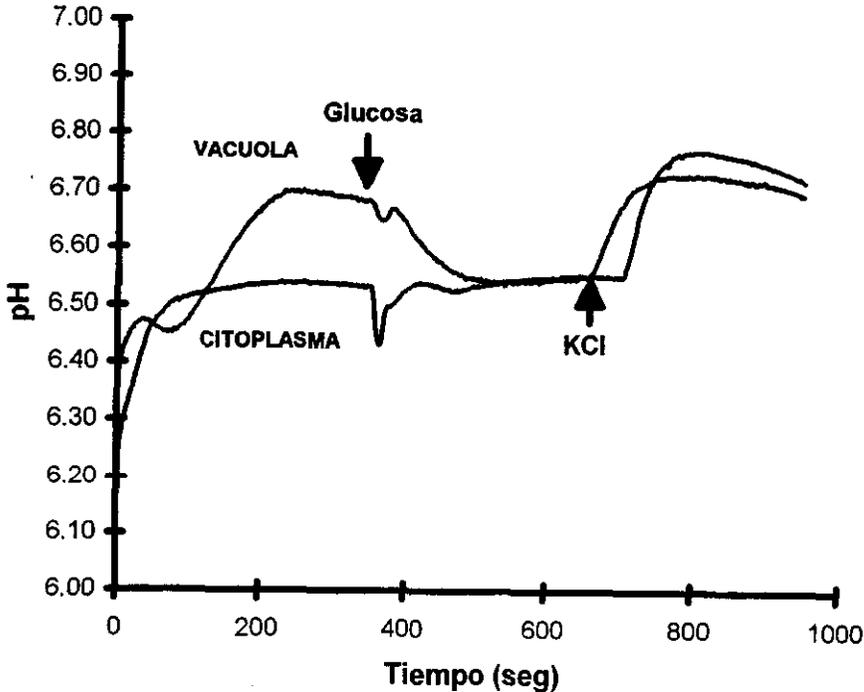


Fig. 28. pH vacuolar y citoplásmico de levaduras incubadas 1 h con glucosa 2.5 mM y lavadas. Para la medición del pH vacuolar las levaduras se preparan de acuerdo a los apartados 2.1, 2.2 y 2.4b de Materiales y Métodos. Para la medición del pH citoplásmico, las levaduras se preparan según los apartados 2.1, 2.2 y 2.3b. Posteriormente, se lleva a cabo la incubación de las levaduras en la celda del fluorómetro, la medición de la fluorescencia y el cálculo de pH tal y como se describe en los apartados 2.5b y 2.6 de Materiales y Métodos. Las adiciones de glucosa 10 mM se llevan a cabo a los 350 seg. en ambos trazos; la adición de KCl 10 mM se realiza a los 650 y 700 seg. para levaduras con piranina en vacuola o citoplasma respectivamente.

lavado de las levaduras y las consecuencias que provoca sobre el pH interno de las levaduras incubadas y lavadas (Fig. 27) y su contraste con el pH de las levaduras incubadas y NO lavadas (Fig. 21).

El proceso de lavado remueve el ácido carbónico del exterior de la levadura provocando el desplazamiento de su equilibrio ácido-base y por lo tanto el incremento del pH (ver sección 3.3.5). Puesto que en estas levaduras la concentración de glucosa debe ser muy baja, el metabolismo energético no es capaz de recuperar el CO₂ eliminado del citoplasma por lo que el ácido carbónico también tiende a desplazarse desde el interior de la vacuola (Fig. 26).

La baja capacidad metabólica de las levaduras incubadas con glucosa y lavadas (Fig. 23) se refleja en el hecho de que su pH vacuolar es mayor (6.57 a los 100 seg) que el de las levaduras incubadas con glucosa y NO lavadas (6.3) (Fig. 21). En cada proceso de lavado la levadura pierde parte de su CO₂ interno el cual el metabolismo energético de la levadura es incapaz de recuperar, por lo tanto el pH vacuolar se incrementa. Además de esto, la cantidad de CO₂ total en la levadura es vez menor (López *et al.*, 1999) por lo que su capacidad amortiguadora disminuye y por lo tanto cualquier alteración en la concentración del CO₂ externo de la levadura provoca cambios en su pH interno; es por ello que el pH vacuolar se incrementa aún frente a la dilución de las levaduras en un nuevo amortiguador.

La Fig. 29 muestra que a pesar de que la adición de glucosa a las levaduras se realice antes del inicio de la fase de alcalinización (50 seg.), este proceso no se revierte. La única diferencia que se observa en las levaduras a las que se les añade la glucosa a los 50 seg., es que la magnitud de la alcalinización es menor ($\Delta\text{pH} = 0.15$) con respecto al cambio que se observa en las levaduras en las que dicha adición se realiza al final del proceso de alcalinización ($\Delta\text{pH} = 0.3$). El gradiente de CO₂ es tal que el metabolismo de la glucosa en estas levaduras no es capaz de revertirlo sino que solamente recupera parte del CO₂ el cual, de cualquier forma, difunde al medio externo provocando el incremento del pH vacuolar.

La Fig. 22 muestra que si las levaduras se incuban con una mayor concentración de glucosa (10 o 20 mM) y posteriormente son lavadas, la magnitud de la alcalinización inicial es menor ($\Delta\text{pH} = 0.05$ aprox.) que en las levaduras incubadas con glucosa 2.5 mM ($\Delta\text{pH} = 0.2$). A pesar de que en las tres preparaciones de levaduras el pH vacuolar inicial es muy similar (6.6-6.75) las levaduras que fueron incubadas con una mayor concentración de glucosa presentan una mayor capacidad de recuperación del mismo frente a pequeñas diluciones; es posible que estas últimas contengan una mayor cantidad de CO₂ interno el cual les otorga una mayor capacidad amortiguadora y por lo tanto, después del proceso de lavado, son capaces de recuperar más rápidamente el equilibrio del CO₂.

Experimentos realizados en nuestro laboratorio mostraron que el pH vacuolar de levaduras crecidas en YPD y sin ayunar es menor que el pH vacuolar de las levaduras ayunadas e incubadas con glucosa. Las levaduras crecidas durante 15 h y 24 h en YPD y sin ayunar presentan un pH vacuolar de 5.9 y 6.1 respectivamente (no se muestran). Por lo tanto, se deduce que durante el ayuno la vacuola se alcaliniza debido a la falta de glucosa, tanto por

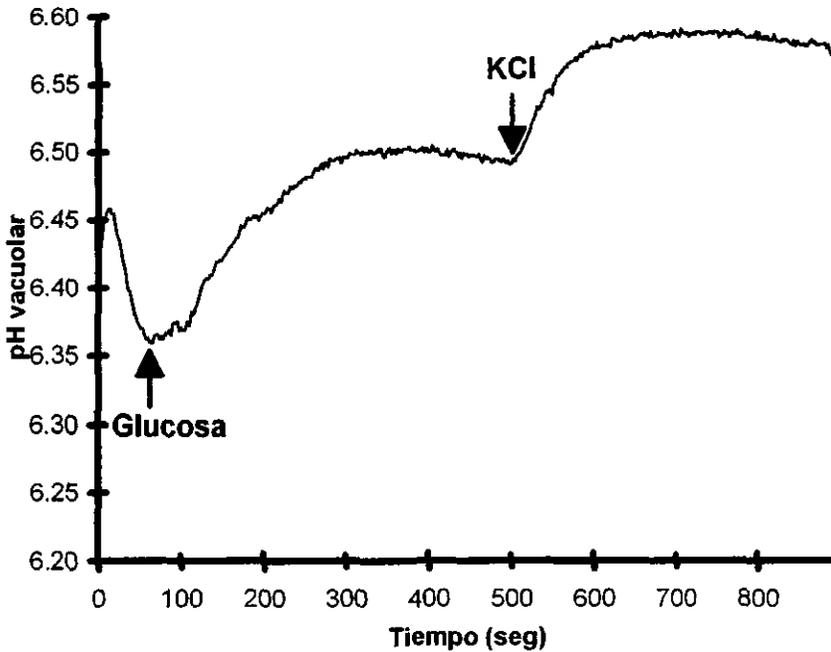


Fig. 29. pH vacuolar de levaduras incubadas 1 h con glucosa 2.5 mM y lavadas. Las levaduras se preparan según los apartados 2.1, 2.2 y 2.4b. Se incuban para la medición de fluorescencia y cálculo de pH de acuerdo a los apartados 2.5b y 2.6. La adición de glucosa 10 mM y KCl 10 mM se realiza a los 50 y 450 seg. respectivamente.

la disminución en la producción de ATP -lo cual disminuye la actividad de la H^+ -ATPasa vacuolar- como por la disminución en el contenido de ácido carbónico de la levadura. Debido a la baja concentración de glucosa utilizada durante la incubación, el estado metabólico de las levaduras es muy bajo; la vacuola pierde su capacidad amortiguadora y por lo tanto se alcaliniza tras el lavado y dilución de las levaduras.

A pesar de que tanto el pH vacuolar como el citoplásmico se incrementan tras el lavado de las levaduras, el efecto es mayor sobre el pH vacuolar; el pH que alcanza este organelo a los 250 seg. (6.70) se encuentra muy alejado del que se ha observado en la vacuola de *S. cerevisiae* (6.05 y 6.2; Abe y Hovikoshi, 1978; Preston *et al.*, 1989). Desde un principio el pH citoplásmico es menor al pH vacuolar pero la máxima diferencia se observa a los 250 seg. de incubación a los cuales el pH es de 6.53 y 6.7 para el citoplasma y la vacuola respectivamente; posteriormente, hasta antes de la adición del KCl, el pH en ambos compartimentos es el mismo (6.59) (Fig. 25).

La vacuola es considerada como un organelo de almacenamiento y de regulación iónica por lo que es posible que también almacene CO_2 , sobretodo por la alta concentración de CO_2 presente en el interior de la levadura (López *et al.*, 1999); por lo tanto, es posible que la salida del CO_2 vacuolar ayude a mantener el pH citoplásmico de la levadura.

Tras el proceso de alcalinización y una vez alcanzado el equilibrio del CO_2 (aprox. 350 seg.), tanto el pH citoplásmico (Fig. 23) como el vacuolar tienden a disminuir nuevamente hasta alcanzar su pH inicial. El bajo metabolismo en la levadura provoca la acumulación de ácido en su interior, sin embargo, el citoplasma presenta un grado de acidificación mayor que la vacuola.

Estos experimentos mostraron que tanto la actividad de la H^+ -ATPasa vacuolar como el CO_2 están involucrados en la regulación del pH vacuolar. Lo interesante es que en la vacuola la respuesta a la adición de glucosa es muy pequeña en las levaduras incubadas con glucosa y NO lavadas ($\Delta pH = 0.09$) (Fig. 21) en comparación con la respuesta de las levaduras incubadas con glucosa y lavadas ($\Delta pH = 0.15$) (Fig. 28). Puesto que la única diferencia entre estas dos preparaciones de levaduras es el lavado, consideramos que las consecuencias de dicho tratamiento sobre el pH y el contenido de ácido carbónico vacuolar pueden ser los responsables de la respuesta diferencial del pH vacuolar en ambas preparaciones de levaduras.

Es posible que dadas las propiedades amortiguadoras del CO_2 y la alta concentración en que parece existir en el interior de la vacuola, esta molécula sea la responsable del retardo en la respuesta del pH vacuolar tras la adición de glucosa a la levadura. El efecto amortiguador del CO_2 es más significativo en las levaduras cuyo contenido en CO_2 es mayor, por ejemplo en las levaduras incubadas con glucosa y NO lavadas (Fig. 21). En las levaduras NO lavadas la actividad metabólica es muy baja y por lo tanto la concentración de CO_2 debe ser baja también (López *et al.*, 1999) pero al no haber sido sometidas al proceso de lavado, el sistema del CO_2 se encuentra en equilibrio entre el exterior y el interior de la levadura. En contraste con lo anterior, el lavado de las levaduras y por lo tanto la salida de CO_2 , provoca

tres fenómenos importantes: el incremento del pH vacuolar, la disminución en la concentración del CO_2 vacuolar y la disminución en la capacidad amortiguadora de la vacuola. Estos tres fenómenos pueden explicar el comportamiento del pH vacuolar tras la adición de glucosa a las levaduras incubadas con glucosa y lavadas (Fig. 28).

Puesto que el metabolismo de la glucosa en las levaduras produce tanto ATP como CO_2 , se espera que la adición de este sustrato estimule tanto la actividad de la H^+ -ATPasa vacuolar como la difusión del CO_2 al interior de la vacuola. Sin embargo, en el caso de la H^+ -ATPasa vacuolar también es importante considerar que al momento en que se realiza la adición de glucosa (350 seg), el pH vacuolar es mayor que el citoplásmico lo cual favorece el desplazamiento del equilibrio de la H^+ -ATPasa vacuolar hacia un mayor bombeo de protones al interior de la vacuola (Principio de Lechatelier; Ramette, 1983). Aunado a lo anterior, la baja capacidad amortiguadora de la vacuola, provocada por la pérdida de CO_2 , hace posible que la actividad de la H^+ -ATPasa vacuolar sea mayor y por lo tanto su participación sea importante durante el proceso de acidificación vacuolar tras el pulso de glucosa. Sin embargo, también es muy importante el hecho de que, al existir un déficit de CO_2 en el interior de la vacuola, éste difunda al interior de la vacuola y restablezca su equilibrio.

Por lo tanto, durante el proceso de acidificación vacuolar participan tanto el equilibrio del CO_2 como la actividad de la H^+ -ATPasa vacuolar; a pesar de que no conocemos el grado en el que cada uno de estos factores participa en la acidificación vacuolar, es posible que la difusión del CO_2 sea el componente mayoritariamente responsable de dicho fenómeno; más aún si se observa que en las levaduras cuyo sistema de CO_2 se encuentra en equilibrio (Fig. 21). La respuesta del pH vacuolar a la adición de glucosa es muy pequeña; a pesar de que en las levaduras NO lavadas no se ha provocado un incremento del gradiente de difusión de CO_2 , la respuesta del pH vacuolar a la adición de glucosa no es significativa ($\Delta\text{pH} = 0.09$) lo cual se interpreta como una baja actividad de la H^+ -ATPasa vacuolar.

Por lo tanto, se concluye que la adición de glucosa a la levadura revierte los efectos que el ayuno y el lavado de las mismas provoca sobre el pH vacuolar de este organismo y que el CO_2 juega un papel preponderante en la regulación del pH de este organelo.

3.3.8. pH vacuolar de levaduras incubadas con glucosa y KCl y lavadas

La Fig. 30 muestra que el pH vacuolar inicial en las levaduras incubadas con glucosa y KCl y lavadas es menor (6.10) que el correspondiente a las levaduras incubadas únicamente con glucosa (6.22 y se incrementa rápidamente) (Fig. 30). Además en las primeras, tanto el pico de acidificación inicial como el proceso de alcalinización presentan cambios más pronunciados que en las levaduras incubadas únicamente con glucosa.

Se sabe que la producción de CO_2 es mayor en las levaduras incubadas con glucosa y KCl (López *et al.*, 1999) por lo que probablemente la capacidad amortiguadora de la vacuola en estas levaduras sea mayor que en las levaduras incubadas únicamente con glucosa. Sin

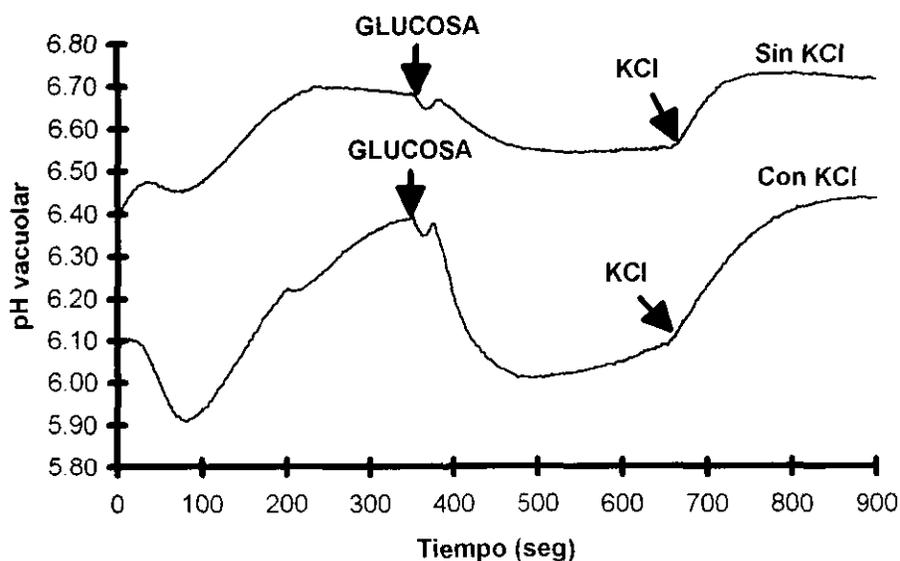


Fig. 30. pH vacuolar de levaduras incubadas 1 h con glucosa 2.5 mM con o sin KCl 2.5mM y lavadas. Las levaduras se preparan según los puntos 2.1 y 2.2, posteriormente se incuban tal y como se describe en los apartados 2.4b y 2.4c para las levaduras incubadas con glucosa sola o con KCl respectivamente. La incubación en la celda del fluorómetro y el cálculo de pH se realiza tal y como se describe en los apartados 2.5b y 2.6. Las adiciones de glucosa 10 mM y KCl 10 mM se realizan a los 350 y 700 seg. respectivamente.

embargo, se observa que el pico de acidificación inicial en la vacuola de estas levaduras es mayor ($\Delta\text{pH} = 0.2$) que en las que fueron incubadas únicamente con glucosa ($\Delta\text{pH} = 0.07$) (Fig. 30). En este caso, la capacidad amortiguadora de la vacuola parece ser superada gracias a la presencia del ion potasio en el medio de incubación.

Se ha reportado que el ion potasio presenta la cualidad de retener al ion bicarbonato en el interior de la levadura (Conway y Brady, 1950; López *et al.*, 1999). Este hecho presenta consecuencias muy importantes no solo sobre el pH vacuolar y citoplásmico, sino sobre el proceso general de regulación del pH interno de la levadura. Tal y como se explicará a continuación, las notables diferencias que existen entre el comportamiento del pH vacuolar de las levaduras incubadas con glucosa y KCl en comparación con el de las levaduras incubadas únicamente con glucosa, responden finalmente a la relación del ion potasio con el ion bicarbonato.

Tal y como se ha explicado, el proceso de lavado elimina el CO_2 interno de la levadura provocando además el desplazamiento del equilibrio del CO_2 hacia la remoción de los protones citoplásmicos y vacuolares, dando por resultado el incremento del pH de ambos compartimentos. Además de lo anterior, también se ha expuesto acerca de la importancia del estado metabólico de la levadura en el sentido de que las levaduras con un estado energético más activado deben ser capaces de regular su pH interno y de recuperar el CO_2 perdido al exterior evitando la alcalinización del citoplasma y la vacuola.

En el caso de las levaduras incubadas con glucosa y KCl se observa que a pesar del lavado y de las consecuencias que éste tiene sobre el equilibrio del CO_2 , el pH vacuolar de estas levaduras es más ácido que el de las levaduras incubadas únicamente con glucosa (Fig. 30); este fenómeno encuentra su explicación en la capacidad del ion potasio para retener bicarbonato. Las consecuencias de dicha propiedad no solamente se reflejan en la mayor capacidad de almacenamiento de ácido carbónico en el interior de las levaduras, sino que además, la presencia de este catión estimula la actividad de las H^+ -ATPasas plasmática y vacuolar así como el metabolismo energético de la levadura.

En vista de que el ácido carbónico es la fuente principal de protones en la levadura (López *et al.*, 1999) el bombeo de los mismos a través de la H^+ -ATPasa plasmática favorece la acumulación de bicarbonato en el citoplasma de la levadura (Fig. 26). Sin embargo, la acumulación de bicarbonato se incrementa en presencia de contraiones que neutralicen su carga negativa. El ion potasio es el catión que lleva a cabo dicha función de neutralización de las cargas del bicarbonato (Conway y Brady, 1950; López *et al.*, 1999) lo cual, además, favorece el bombeo de protones a través de la H^+ -ATPasa plasmática. Al igual que en el caso de la H^+ -ATPasa plasmática, la H^+ -ATPasa vacuolar bombea los protones provenientes del equilibrio ácido-base del ácido carbónico (Fig. 26), por lo que la actividad de la bomba vacuolar también debe provocar la acumulación de bicarbonato en el citoplasma; a su vez, los iones potasio deben favorecer la actividad de la bomba vacuolar, dando lugar a un incremento en el bombeo de protones al interior de la vacuola.

Tanto la H^+ -ATPasa plasmática como la H^+ -ATPasa-vacuolar son bombas primarias que

dependen directamente del aporte de ATP celular; por otra parte, si la presencia de iones potasio favorece la actividad de estas enzimas, la presencia de este catión estimulará la actividad metabólica. En general, el metabolismo energético de la célula se regula en función del requerimiento de ATP (Lehninger, 1985); conforme la célula necesita ATP para llevar a cabo funciones anabólicas, de transporte, etc., es decir, de funciones celulares que requieren de un aporte directo de ATP, la velocidad de síntesis de esta molécula se incrementa. Este mismo mecanismo se presenta en la levadura; tomando en cuenta únicamente la actividad de la H^+ -ATPasa plasmática, ésta es una enzima que utiliza un gran porcentaje del ATP celular (Serrano, 1991), por lo que si su actividad se encuentra estimulada, deberá provocar consecuencias significativas sobre la actividad metabólica de la levadura.

Lo anterior puede explicar en parte el efecto estimulador el ion potasio sobre el metabolismo de la levadura. Además del efecto que la entrada del ion potasio a la levadura provoca sobre el metabolismo de este organismo debido a la estimulación de la actividad de la H^+ -ATPasa plasmática (Peña *et al.*, 1975; Seto-Young y Perlin, 1991), se sabe que el estado metabólico de este organismo sigue activado aún después de que este catión se haya internalizado (Ramírez *et al.*, 1996).

Por lo tanto, el pH vacuolar más ácido de las levaduras incubadas con glucosa y KCl se debe, en parte, a que la actividad de la H^+ -ATPasa vacuolar se encuentra favorecida en presencia de iones potasio. Sin embargo, hay otro factor importante por considerar y es el papel del CO_2 en la acidificación vacuolar.

A pesar de que el lavado de las levaduras provoca la salida de ácido carbónico del interior de las mismas dando lugar al incremento del pH citoplásmico y vacuolar, la presencia de iones potasio y su relación con el bicarbonato, debe favorecer la retención de ácido carbónico no solamente en el citoplasma sino también en el interior de la vacuola favoreciendo la acidificación de este organelo.

El CO_2 y el ácido carbónico, productos del metabolismo energético, difunden libremente al interior de la vacuola a favor de su gradiente de difusión. Puesto que se ha observado que después del ayuno el pH vacuolar es mayor al pH citoplásmico, el grado de disociación del ácido carbónico tenderá a ser mayor en el interior de la vacuola; en estas condiciones el bicarbonato, producto de la ionización del ácido carbónico y el cual no se transporta a través de la membrana de la levadura, puede ser almacenado en el interior de este organelo. Puesto que la acumulación del ácido carbónico se incrementa en levaduras incubadas con KCl (López *et al.*, 1999) se espera que el ion potasio favorezca la retención de ácido carbónico en el interior de la vacuola y por lo tanto la acidificación de este organelo.

El fenómeno descrito explica la razón por la que el pH vacuolar de las levaduras incubadas con glucosa y KCl es menor al de las levaduras incubadas únicamente con glucosa (Fig. 30). Es decir, la acidificación vacuolar involucra básicamente la participación de dos fenómenos: el bombeo de protones a través de la H^+ -ATPasa vacuolar y la acumulación de ácido carbónico en la vacuola.

Por lo tanto, si bien el lavado de las levaduras incubadas con glucosa y KCl provoca la remoción del ácido carbónico externo y el desplazamiento del ácido carbónico interno de la levadura, el pH vacuolar de estas levaduras se mantiene más ácido que el de las levaduras incubadas únicamente con glucosa. Dado que la acidificación vacuolar obedece a la participación de dos fenómenos, ambos deben estar involucrados en la capacidad de estas levaduras en mantener la vacuola más ácida.

Por una parte, la capacidad amortiguadora de la vacuola de las levaduras incubadas con glucosa y KCl es mayor y por lo tanto, a pesar del desplazamiento del equilibrio del CO_2 vacuolar, estas levaduras son capaces de retener en mayor grado el CO_2 interno. Por otra parte, la presencia del ion potasio en la vacuola debe favorecer el bombeo de protones al interior de la vacuola. Además, el ion potasio en el citoplasma mantendrá más acelerado el metabolismo energético gracias a su capacidad de retención del bicarbonato lo cual proveerá de una mayor cantidad de ATP -que mantiene la actividad de la H^+ -ATPasa vacuolar- así como de CO_2 que difunde al interior de la vacuola. Ambos mecanismos resultan en una mayor acidificación vacuolar en las levaduras incubadas en presencia de iones potasio.

Tal y como se ha explicado anteriormente, suponemos que la fase inicial de acidificación responde a la actividad de la H^+ -ATPasa vacuolar la cual en estas levaduras debe estar más activada gracias a la presencia de iones potasio y por lo tanto el grado de acidificación que provoca es mayor que en las levaduras incubadas sin K^+ , además de que puesto que de cualquier forma la vacuola ha perdido CO_2 , la capacidad amortiguadora de este organelo ha disminuido lo cual también favorece la acidificación de su interior (Fig. 30). Sin embargo, de cualquier forma la actividad de la H^+ -ATPasa vacuolar no es mayor que el proceso de difusión del CO_2 debido a la baja concentración de glucosa lo cual no favorece la actividad de la bomba de protones vacuolares, por lo tanto, la acidificación vacuolar es superada rápidamente por la alcalinización llevando el pH vacuolar de 5.9 a 6.4 (Fig. 30).

La Fig. 36 muestra que la magnitud de la acidificación inicial en las levaduras incubadas con glucosa y KCl y lavadas depende del pH del amortiguador utilizado en la incubación de las levaduras. El pH citoplásmico de la levadura se modifica de acuerdo al grado de acidez del amortiguador utilizado en la incubación de las mismas. A pH 4 el pH citoplásmico es menor por lo que a este pH la concentración de protones en el citoplasma es mayor; este hecho estimula el equilibrio de la H^+ -ATPasa vacuolar provocando que el bombeo de protones al interior de la vacuola se incremente con respecto al observado a pH 6 ($\Delta\text{pH}=0.3$ y 0.14 respectivamente) (Fig. 36). Lo contrario se observa a pH 8; a este pH externo el citoplasma se alcaliniza provocando que la acidificación vacuolar sea menor ($\Delta\text{pH}=0.05$).

De acuerdo a la Ley de Fick (Berne y Levy, 1988) la magnitud y la velocidad de difusión de una molécula presentan una relación directamente proporcional al gradiente de difusión de dicha molécula, es decir, a la diferencia de concentración de la misma a través de ambos compartimentos. Si las levaduras incubadas con glucosa y KCl producen una mayor cantidad de CO_2 (López *et al.*, 1999) la remoción del CO_2 externo debe provocar un mayor

gradiente de difusión de dicha molécula provocando a su vez que la magnitud y la velocidad de difusión del ácido carbónico sean mayores que en el caso de las levaduras incubadas únicamente con glucosa (Fig. 30).

A su vez, la magnitud de la alcalinización de estas levaduras se modifica de acuerdo al pH del amortiguador externo (Fig. 36). A mayor gradiente de difusión del ácido carbónico entre el interior y el exterior de la levadura, mayor será el grado de alcalinización vacuolar en la levadura. El gradiente de difusión del ácido carbónico se incrementa a pH 8 ($\Delta\text{pH} = 0.53$) debido a que la concentración de ácido carbónico externo disminuye ya que a pH 8 el grado de ionización de este ácido se incrementa. En contraste con lo anterior, a pH 4 externo, el gradiente de difusión del ácido carbónico alcanza más rápidamente su equilibrio ($\Delta\text{pH} = 0.31$) en comparación con el de las levaduras incubadas a pH 6 ($\Delta\text{pH} = 0.4$); a pH 4 el grado de ionización del ácido carbónico es mucho menor resultando en una rápida acumulación de ácido carbónico en el exterior de la levadura.

La adición de glucosa a las levaduras provoca el retorno del pH vacuolar a un valor muy cercano al pH inicial, en contraste con lo que se observa en las levaduras que no reciben ninguna adición de glucosa y cuyo pH vacuolar sólo retorna levemente (Fig. 31). La respuesta de la vacuola a la adición de la glucosa puede deberse a la suma de dos equilibrios; la actividad de la H^+ -ATPasa plasmática y la difusión del CO_2 a la vacuola. La adición de glucosa a las levaduras provoca un incremento en el consumo de oxígeno (Fig. 32) así como de la concentración de protones en el exterior de la levadura (Fig. 33), la cual es mayor que en las levaduras ayunadas (Fig. 34).

En las levaduras preincubadas con glucosa y KCl la respiración fue mayor que en las levaduras ayunadas, dejando menos del 10% de oxígeno a los 300 seg. de incubación (Fig. 32); el pulso de glucosa incrementó la tasa de consumo de oxígeno permitiendo que quedara menos del 10% del oxígeno inicial a los 100 seg. de incubación. Las levaduras preincubadas con glucosa y KCl y que no recibieron ningún sustrato durante el trazo, consumieron 4 nátomos $\text{O}_2/\text{mg. min.}$, es decir, mostraron una velocidad idéntica a la de las levaduras ayunadas que recibieron glucosa durante el trazo (Fig. 24). Sin embargo, las levaduras preincubadas con glucosa y KCl y que recibieron glucosa durante la realización del trazo, incrementaron su consumo de oxígeno hasta 12 nátomos $\text{O}_2/\text{mg. min.}$ (Fig. 32).

La adición de glucosa produjo un incremento en el bombeo de protones tanto en las levaduras preincubadas con glucosa como con glucosa y KCl (Fig. 33). Las primeras alcanzaron una producción de 2.1 mM de protones en el medio externo a los 1000 seg. de incubación, mientras que las segundas produjeron hasta 2.5 mM de protones en el mismo lapso de tiempo.

Como era de esperarse, las levaduras preincubadas con glucosa 2.5 mM y KCl 2.5 mM bombearon más protones que las levaduras ayunadas (Fig. 34); las primeras provocaron una concentración de protones externa de 1.8 mM a los 600 seg. de incubación, en contraste con las levaduras ayunadas cuya producción de protones fue de 1 mM en el mismo lapso de tiempo.

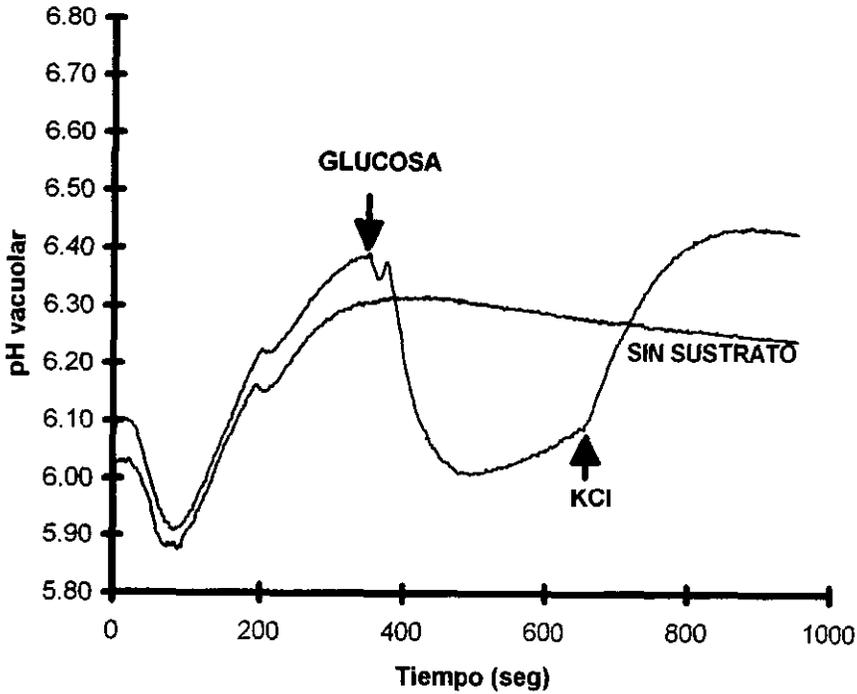


Fig. 31. pH vacuolar de levaduras incubadas 1 h con glucosa 2.5 mM y KCl 2.5 mM y lavadas. Las levaduras se preparan según los apartados 2.1, 2.2 y 2.4c. Se incuban para la medición de fluorescencia y cálculo de pH de acuerdo a los apartados 2.5 y 2.6. La adición de glucosa 10 mM y KCl 10 mM se realiza a los 350 seg. y 650 seg. respectivamente.

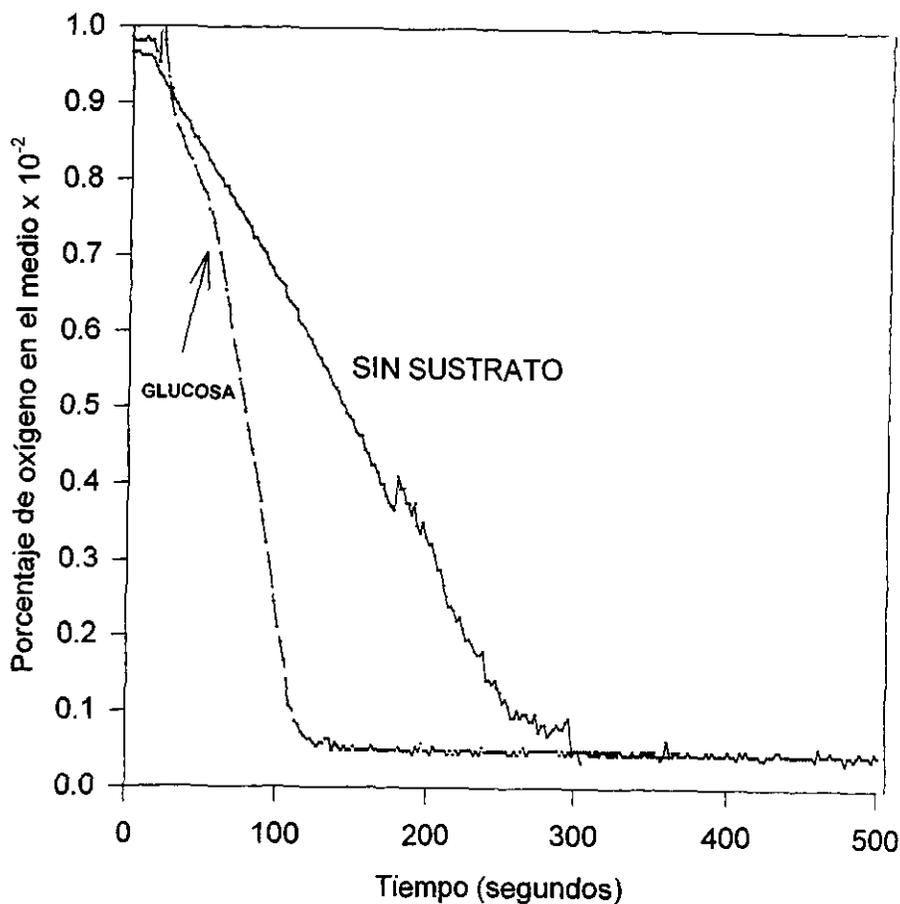


Fig. 32. Consumo de oxígeno en células de 24 h en YPD y 14 h de ayuno, incubadas 1 h con glucosa 2.5 mM y KCl 2.5 mM. Trazo sin sustrato y efecto de glucosa. Las levaduras se preparan como se describe en el apartado 2.1 de Materiales y Métodos. A continuación se incuban con glucosa 2.5 mM y KCl 2.5 mM según el apartado 2.5 a. Se centrifugan tres veces a 12,000 rpm 10 seg. y se mide el consumo de oxígeno según al apartado 2.9. La flecha indica la adición de glucosa 10 mM.

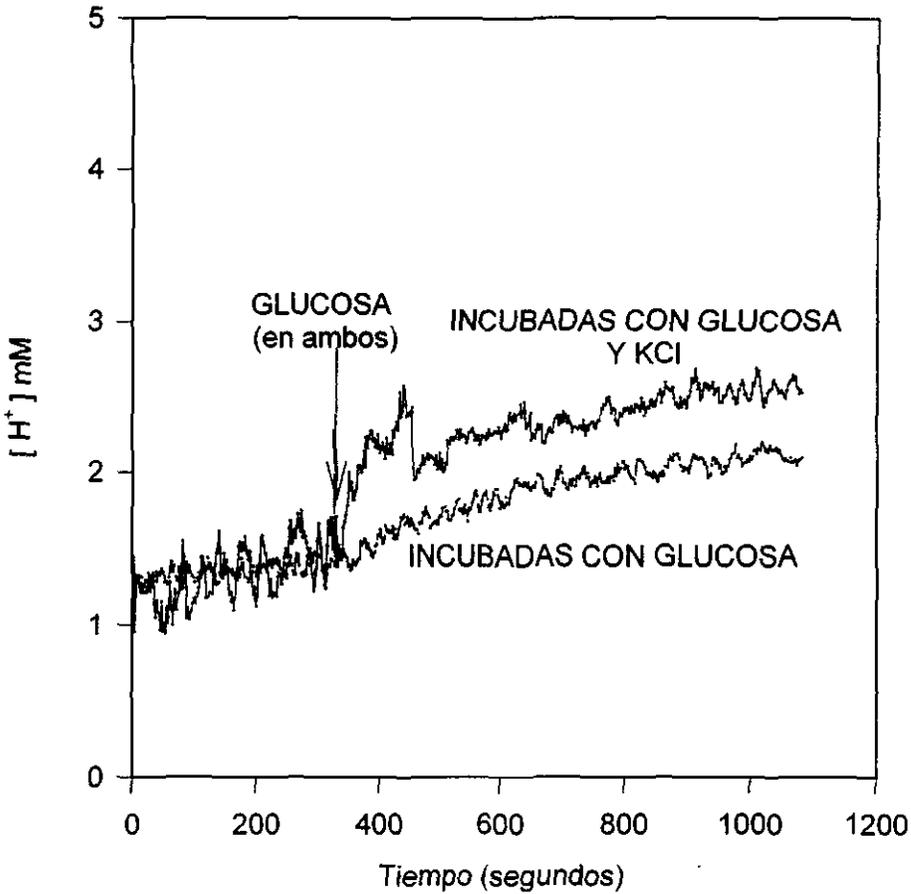


Fig. 33. Bombeo de protones en células de 24 h en YPD y 14 h de ayuno, incubadas 1 h con glucosa 2.5 mM sola o con KCl 2.5 mM. Efecto de pulso de glucosa. Las levaduras se preparan como se describe en la Fig. 32. La flecha indica la adición de glucosa 10 mM. El bombeo de protones se realiza como se describe en el apartado 2.10 de Materiales y Métodos.

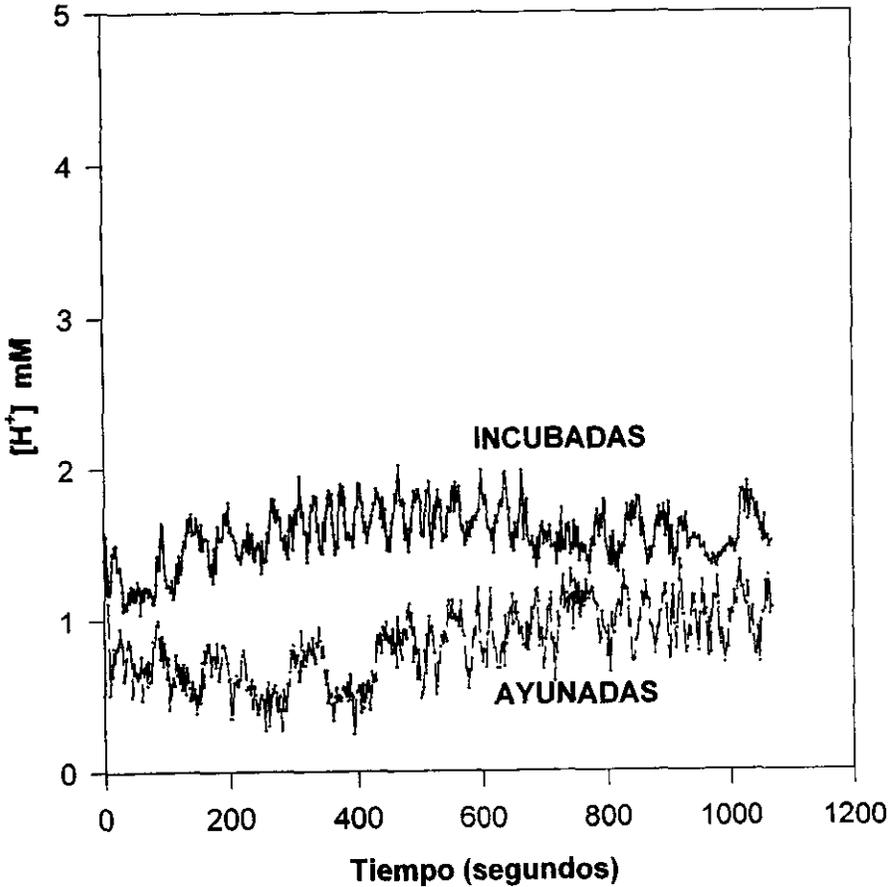


Fig. 34. Bombeo de protones en células de 24 h en YPD y 14 h de ayuno. Trazo en células ayunadas y en células incubadas 1 h con glucosa 2.5 mM y KCl 2.5 mM. Las levaduras incubadas con glucosa y KCl se preparan de la misma forma que se describe en la Fig. 32. Por su parte, las levaduras ayunadas se preparan como se describe en la Fig. 24. El bombeo de protones se realiza como se describe en el apartado 2.10 de Materiales y Métodos.

Tanto en las levaduras incubadas con glucosa y KCl como en las incubadas únicamente con glucosa, los dos mecanismos involucrados en la acidificación vacuolar (difusión del CO_2 y actividad de la H^+ -ATPasa vacuolar), se favorecen tras el metabolismo de la glucosa.

En el caso del CO_2 , el grado de difusión dependerá de la magnitud del gradiente, el cual es mayor en las levaduras incubadas con glucosa y KCl, por lo que en éstas tanto la velocidad como la magnitud de la difusión del CO_2 será mayor que en el caso de las levaduras incubadas únicamente con glucosa.

Por otra parte, en el caso de las levaduras incubadas con glucosa y KCl, el ΔpH existente entre el citoplasma y la vacuola es mayor que en el caso de las levaduras incubadas únicamente con glucosa. La Fig. 35 muestra que el pH citoplásmico de estas levaduras antes del pulso de glucosa es de 6.56 mientras que el pH vacuolar es de 6.39. Por lo tanto, la activación de la H^+ -ATPasa vacuolar en estas levaduras no será provocada por un bajo ΔpH entre el citoplasma y la vacuola, sino por el incremento en la producción de ATP y por la presencia de iones potasio el cual, tal y como ya se ha explicado, también deben estimular la actividad de esta enzima. El resultado final es una significativa acidificación vacuolar tras la adición de glucosa a estas levaduras.

Al igual que con los otros equilibrios, la acidificación de la vacuola tras el pulso de glucosa se modifica con un amortiguador externo a pH 4 y 8 (Fig. 36). Puesto que a pH 4 la difusión del CO_2 vacuolar es menor que en las levaduras incubadas a pH 6, también el grado de difusión del CO_2 producido por el metabolismo de la glucosa es menor; sin embargo, el pH final de la vacuola es menor en las levaduras incubadas a pH 4 (5.73) que en las incubadas a pH 6 (5.86). A pesar de que el grado de alcalinización vacuolar es mayor en las levaduras incubadas a pH 8, la magnitud de la acidificación provocada por la adición de glucosa a las levaduras es menor (0.29) que en las levaduras incubadas a pH 4 y 6; esto es debido a que a pH 8 el pH citoplásmico se incrementa de tal forma que altera el equilibrio de la H^+ -ATPasa vacuolar retardando el bombeo de protones al interior de la vacuola, además, la cantidad de CO_2 y ácido carbónico citoplásmico debe disminuir debido a que su equilibrio ácido-base se encuentra desplazado hacia la formación de bicarbonato y protón por lo que la difusión de ácido carbónico hacia la vacuola es menor.

3.3.9. pH citoplásmico de levaduras incubadas con glucosa y KCl y lavadas

En el caso del pH citoplásmico de las levaduras incubadas con glucosa y KCl (Fig. 35), también se observa una fase de alcalinización inicial, pero en este caso tanto la magnitud como la duración de dicho proceso es mayor que en las levaduras incubadas únicamente con glucosa (Fig. 23).

Con respecto a la magnitud de dicho proceso, éste también tiene relación con la magnitud del gradiente de difusión del CO_2 provocada en estas levaduras, el cual es mayor si la concentración de CO_2 interna es mayor y el CO_2 externo es removido durante el lavado.

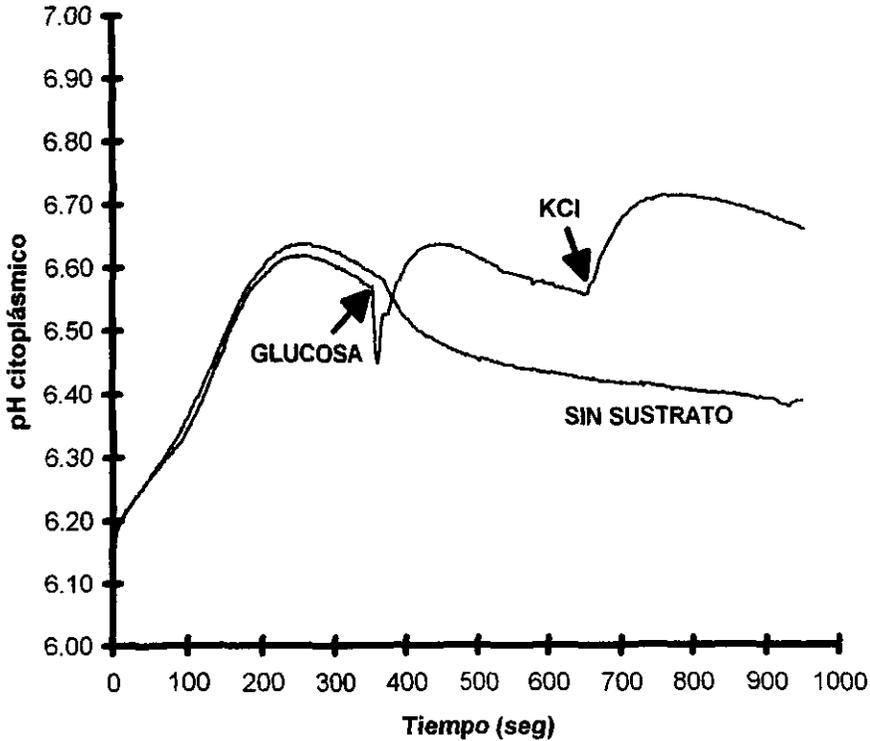


Fig. 35. pH citoplásmico de levaduras incubadas 1 h con glucosa 2.5 mM y KCl 2.5 mM y lavadas. Las levaduras se preparan de acuerdo a los apartados 2.1 y 2.2. Las condiciones de preincubación son las que corresponden al apartado 2.3c. Las levaduras se preincubaban con glucosa 2.5 mM y KCl 2.5 mM, tal y como se describe en el apartado 2.5a. Posteriormente se realiza el trazo de pH tal y como lo describe al apartado 2.5b y finalmente se calcula el pH citoplásmico de acuerdo al apartado 2.6. Las adiciones de glucosa 10 mM y KCl 10 mM se realizan a los 350 y 650 seg. de incubación respectivamente.

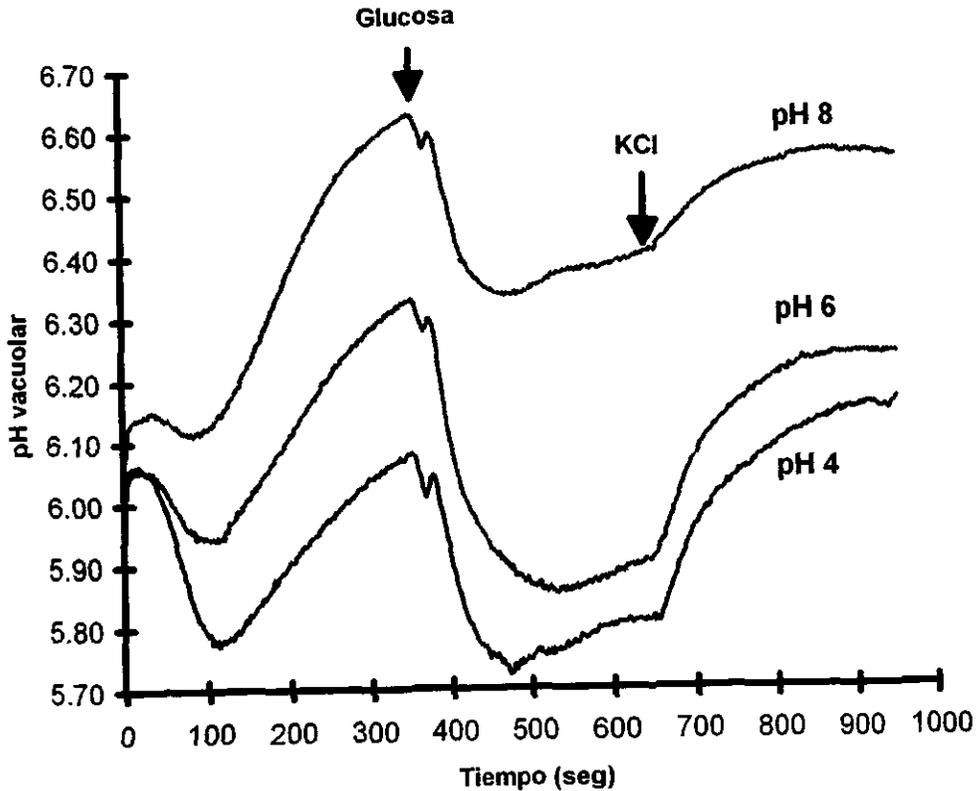


Fig. 36. pH vacuolar de levaduras incubadas 1 h con glucosa 2.5 mM y KCl 2.5mM y lavadas y resuspendidas en amortiguadores a pH 4, 6 y 8. Las levaduras se preparan según los puntos 2.1 y 2.2, posteriormente se incuban tal y como se describe en los apartados 2.4c. La incubación en la celda del fluorómetro y el cálculo de pH se realiza tal y como se describe en los apartados 2.5b y 2.6. Las adiciones de glucosa 10 mM y KCl 10 mM se realizan a los 350 y 700 seg. respectivamente.

Con respecto a la velocidad de difusión, se observa claramente un fenómeno de retardamiento en la alcalinización citoplásmica ya que, en este caso, se esperaría que dada la mayor magnitud del gradiente de concentración del ácido carbónico la velocidad de su difusión fuera mayor.

Existen dos posibles razones involucradas en el retardamiento de la difusión del ácido carbónico al exterior de la levadura. La primera es la capacidad del ion potasio para retener al ion bicarbonato en el interior de la levadura; a su vez, este proceso favorece la retención del ácido carbónico lo cual retarda la alcalinización citoplásmica. La segunda razón se refiere al probable papel del CO_2 vacuolar en la regulación del pH citoplásmico de la levadura. Al igual que en las levaduras incubadas únicamente con glucosa (Fig. 23), el citoplasma se alcaliniza inicialmente pero el pH final es prácticamente el mismo que el las levaduras ayunadas después del pulso de glucosa (Fig. 25); es decir, a pesar de que el citoplasma pierde CO_2 , aparentemente existe un mecanismo que evita la alcalinización excesiva de este compartimento y el cual ayuda a mantener el pH citoplásmico dentro de un valor óptimo. En este sentido es probable que el CO_2 que difunde desde la vacuola ayude a reestablecer el CO_2 citoplásmico que ha difundido al exterior de la levadura, resultando en el mantenimiento del pH citoplásmico en un nivel óptimo.

3.3.10. Respuesta del pH citoplásmico a la adición de KCl

El ion potasio entra a la levadura gracias a la diferencia de potencial en la membrana plasmática ($\Delta\psi$); esta diferencia de potencial es producido por el bombeo de protones a través de la H^+ -ATPasa plasmática (Peña *et al.*, 1969, 1972; Peña, 1975). También se sabe que la acidificación del medio externo de la levadura provoca el incremento de dicho potencial de membrana favoreciendo la entrada del ion potasio a la levadura; es por ello que en las levaduras incubadas en un amortiguador a pH 4 la entrada de K^+ es mayor que en las levaduras incubadas a pH 6 (Peña, 1975).

En las levaduras ayunadas la baja concentración de glucosa provoca no solamente que la actividad de la H^+ -ATPasa plasmática sea muy baja sino que el metabolismo en general se se encuentre deprimido (Figs. 24 y 25); por lo tanto el $\Delta\psi$ es muy bajo en estas levaduras por lo que la entrada del ion potasio es posible únicamente después de a adición de glucosa a estas levaduras (Fig. 25). Tal y como se ha mencionado, la entrada del ion potasio a la levadura provoca la despolarización de la membrana plasmática (Seto-Young y Perlin, 1991) a lo cual la H^+ -ATPasa plasmática responde con un incremento en su actividad lo cual resulta en la alcalinización del citoplasma. En las levaduras ayunadas el ΔpH provocado por la adición de KCl es de 0.18 (Fig 25).

Este mismo fenómeno se observa en las levaduras incubadas con glucosa y KCl o únicamente con glucosa en las cuales el pulso de KCl posterior a la adición de glucosa provoca el incremento del pH citoplásmico (Figs. 23 y 35). El ΔpH provocado por la adición de KCl es de 0.23 y 0.26 en las levaduras incubadas con glucosa y KCl o únicamente con glucosa, respectivamente.

Tal y como se ha explicado en otro apartado, debido a la baja concentración de glucosa utilizada durante la incubación de estas levaduras, la actividad de la H^+ -ATPasa plasmática es muy baja; de hecho, una vez rebasado el periodo inicial de alcalinización, el pH citoplásmico tiende a acidificarse nuevamente (Fig. 23), lo que es prueba de que a pesar de el consumo de oxígeno en estas levaduras es mayor que en las levaduras ayunadas (no se muestra), si el pH citoplásmico es ácido, la actividad de la H^+ -ATPasa plasmática se encuentra deprimida y por lo tanto, el $\Delta\psi$ debe ser también muy bajo.

Sin embargo, estas levaduras son capaces de transportar al ion potasio a su interior aún sin un pulso anterior de glucosa. La Fig. 27 muestra que la adición de KCl a estas levaduras provoca el incremento del pH citoplásmico. Esta respuesta se observa únicamente si el KCl se añade a los 350 seg. de incubación y no en momentos posteriores (no se muestra). La fase inicial de alcalinización alcanza su equilibrio entre los 100 y 350 seg. de incubación por lo que existe una relación directa entre la entrada del ion potasio a la levadura y la difusión del CO_2 al exterior de la misma. Por lo anterior, es probable que la entrada del ion potasio esté favorecida gracias a la acidificación del medio externo provocado por la difusión de CO_2 y ácido carbónico del interior de la levadura.

La Fig. 25 muestra el incremento del pH citoplásmico de las levaduras ayunadas tras la adición de KCl posterior a la adición de glucosa, el cual responde a la estimulación de la actividad de la H^+ -ATPasa plasmática debido a la despolarización de la membrana plasmática producida por la entrada del ion potasio a la levadura (Seto-Young y Perlin, 1991).

Esta misma respuesta se observa en las levaduras incubadas con glucosa y KCl o únicamente con glucosa (Figs. 23, 27 y 35) en las cuales el pH citoplásmico se incrementa tras la adición de KCl. Sin embargo, la Fig. 27 muestra que aún antes de la adición de glucosa, las levaduras incubadas únicamente con glucosa, son capaces de internalizar al ion potasio. Es posible que en estas levaduras el $\Delta\psi$ sea producto no solamente de la actividad de la H^+ -ATPasa plasmática sino, sobretudo, del ácido carbónico que difunde al exterior de la levadura el cual al acidificar el exterior de la levadura también es capaz de incrementar el $\Delta\psi$. Esta es un prueba más de la baja la actividad de la H^+ -ATPasa plasmática y de la difusión del CO_2 al exterior de las levaduras incubadas con glucosa y lavadas las cuales, sin glucosa, no son capaces de mantener constante el pH citoplásmico pero sí de internalizar al ion potasio aún sin ningún pulso anterior de glucosa.

Por otra parte, la Fig. 37 muestra el transporte del ion potasio en las levaduras incubadas con glucosa y KCl y su comparación con el de las levaduras ayunadas. El ion potasio es expulsado de la levadura en respuesta a la dilución de las mismas (Ketchum *et al.*, 1995), sin embargo, las levaduras ayunadas eliminan una cantidad menor de este ion debido a que durante el ayuno han eliminado una gran cantidad del mismo pero muestran aún la capacidad de retomar aproximadamente la mitad del ion potasio eliminado inicialmente. En el caso de las levaduras incubadas con glucosa y KCl, el ion potasio es transportado en mayor cantidad hacia el exterior de la levadura y después de un corto proceso de entrada, el

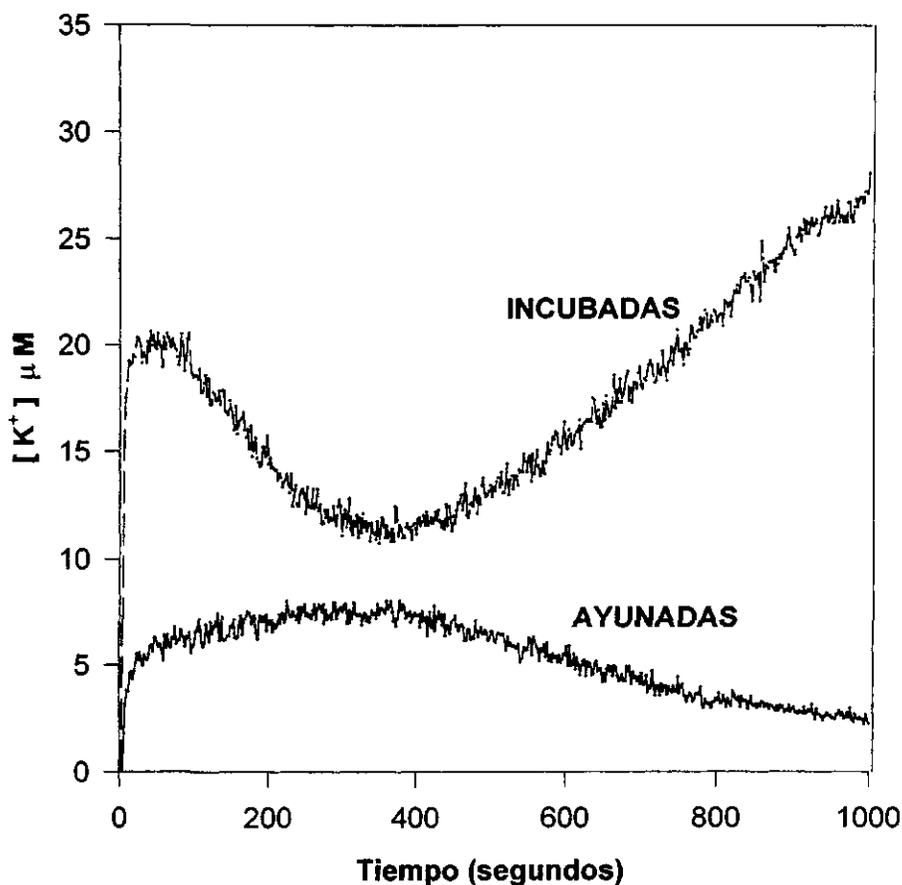


Fig. 37. Transporte de potasio en células ayunadas y en células incubadas 1 h con glucosa 2.5 mM y KCl 2.5 mM. Trazo sin sustrato. Las levaduras incubadas con glucosa y KCl se preparan de la misma forma que se describe en la Fig. 32. Por su parte, las levaduras ayunadas se preparan como se describe en la Fig. 24. El transporte de potasio se realiza como se describe en el apartado 2.10 de Materiales y Métodos.

ion potasio es eliminado nuevamente al exterior de la levadura.

Tanto la entrada del ion potasio como su almacenamiento en el interior de la levadura, requiere de la existencia del potencial a través de la membrana plasmática. En las levaduras con baja concentración de glucosa o en las que han sido sometidas a un prolongado periodo de ayuno, la actividad de la H^+ -ATPasa plasmática disminuye considerablemente provocando con ello una disminución en el ΔpH y el $\Delta \psi$ resultando en una pérdida del ion potasio. Aunado a lo anterior, una levadura con bajo metabolismo energético, produce menos CO_2 lo cual, aunado a la baja actividad de la H^+ -ATPasa plasmática, resulta en una disminución de la retención de bicarbonato en su interior. Dada la relación entre el bicarbonato y el ion potasio, la pérdida de uno de estos iones provoca a su vez la remoción del otro, provocando que el almacén de iones potasio y bicarbonato sea muy pequeña en la levadura ayunada.

Durante el ayuno prolongado el $\Delta \psi$ disminuye no solamente porque la actividad de la H^+ -ATPasa plasmática se abate significativamente, sino porque, al encontrarse disminuido el metabolismo energético de la levadura, la cantidad de CO_2 que produce la levadura disminuye (López *et al.*, 1999). Si bien, el bombeo de protones a través de la H^+ -ATPasa plasmática establece el $\Delta \psi$, la retención del bicarbonato que resulta de dicha actividad enzimática, ayuda a mantener el mismo potencial de membrana y favorece el almacenamiento de iones potasio en el interior de la levadura (López *et al.*, 1999). Y puesto que la entrada y retención del ion potasio dependen del $\Delta \psi$ y de la presencia de bicarbonato en el interior de la levadura, la disminución de ambos factores provoca la pérdida de este catión hacia el exterior de la levadura.

El fenómeno anterior se presenta en las levaduras ayunadas por lo que la concentración de potasio interno en las levaduras ayunadas es mucho menor que en las levaduras incubadas con glucosa y KCl (Fig. 37). La dilución de las levaduras provoca la salida de iones potasio al exterior de las mismas a través de un canal iónico que ha sido descrito por Ketchum *et al* (1995). Puesto que la salida inicial del ion potasio se da en respuesta a la dilución de las levaduras, entre mayor sea el contenido inicial de iones potasio en la levadura, mayor será la cantidad de iones potasio que respondan a la dilución de las mismas. El contenido de iones potasio en las levaduras ayunadas es menor con respecto al contenido de las levaduras incubadas con glucosa y KCl; la dilución de las levaduras ayunadas provoca que el ion potasio alcance una concentración de $7 \mu M$ en el exterior de la levadura, mientras que la dilución de las levaduras incubadas con glucosa y KCl provoca la salida de iones potasio hasta una concentración externa de $20 \mu M$ (Fig. 37).

Posteriormente, las levaduras incubadas con glucosa y KCl muestran cierta capacidad para recuperar el potasio del exterior logrando reincorporar a los 400 seg. de incubación la mitad del potasio eliminado inicialmente. Sin embargo, finalmente el ion potasio es eliminado de la levadura en mayor cantidad hasta una concentración de $27 \mu M$ en el exterior de las levaduras. Los primeros 400 seg. de incubación del este trazo (Fig. 37) coincide con el incremento del pH citoplásmico tras la adición de KCl a estas levaduras (no se muestra) por lo que seguramente durante este lapso de tiempo la acidez externa provocada por la difusión

del CO_2 interno de la levadura sea la responsable del incremento en el $\Delta\psi$ a través de la membrana plasmática y haga posible la entrada del ion potasio a la levadura. Sin embargo, el bajo estado metabólico de estas levaduras provoca que, una vez alcanzado el equilibrio del CO_2 entre el exterior y el interior de la levadura, el citoplasma se acidifique nuevamente (Fig. 35) lo que provoca la disminución del $\Delta\psi$ a través de la membrana plasmática con la consecuente pérdida del ion potasio del interior de la levadura. Es por ello que a partir de los 400 seg. de incubación, las levaduras incubadas con glucosa y KCl tienden a eliminar nuevamente al ion potasio y esta vez la concentración final es de $27 \mu\text{M}$, es decir, la levadura elimina una mayor cantidad de ion potasio debido a que el $\Delta\psi$ disminuye paulatinamente. La adición de glucosa a estas levaduras tiende a incrementar el $\Delta\psi$ (Calhorra *et al.*, 1998) y por lo tanto el ion potasio es rápidamente reincorporado al interior de la levadura disminuyendo la concentración externa de potasio de $13 \mu\text{M}$ a $2.5 \mu\text{M}$ en un lapso de 50 seg. aproximadamente (Fig. 38). La entrada del ion potasio a estas levaduras también se observa en la Fig. 35 en la cual la adición de KCl, posterior a la adición de glucosa, provoca el incremento del pH citoplásmico.

Las levaduras ayunadas presentan la capacidad de reincorporar nuevamente dos terceras partes del potasio eliminado inicialmente (Fig. 37) y a pesar de que el $\Delta\psi$ a través de la membrana plasmática es muy bajo, es probable que estas levaduras no eliminen más potasio al exterior debido a la baja concentración interna de dicho catión.

3.3.11. Respuesta del pH vacuolar a la adición de KCl

Se ha descrito la existencia de un antiportador K^+/H^+ en la membrana de compartimentos prevacuolares de *S. cerevisiae* (Nass y Rao, 1998); por lo tanto, si la entrada del ion potasio a la vacuola se lleva a cabo a través de este antiportador, debe provocar la salida de protones de este organelo y por lo tanto el incremento del pH del mismo. Por otra parte, nuestros resultados muestran que en todos los casos en los que la adición de KCl se realiza después de la adición de glucosa, el pH vacuolar se incrementa; esta observación concuerda con la respuesta que se espera del transporte del ion potasio a través del antiportador K^+/H^+ (Nass y Rao, 1998). La magnitud de la respuesta del pH vacuolar a la adición de KCl depende en primer lugar de la capacidad de la levadura para transportar K^+ a través de la membrana plasmática y posteriormente de la capacidad de la membrana vacuolar para hacer lo mismo.

En las levaduras incubadas y NO lavadas (Fig. 39), el bajo metabolismo provoca una disminución en el $\Delta\psi$ a través de la membrana plasmática por lo que el ion potasio no es capaz de internalizarse a estas levaduras; por lo tanto, en estas levaduras el ion potasio es capaz de entrar a la vacuola únicamente después de la adición de glucosa. Al comparar la respuesta del pH vacuolar entre el trazo sin sustrato (Fig. 21) y en el que primeramente se adiciona KCl (Fig. 39), se observa que el KCl no provoca ningún cambio significativo en el pH vacuolar de las levaduras. Sin embargo, si antes de la adición de KCl se añade glucosa a las levaduras, el pH vacuolar se incrementa en 0.17 unidades (Fig. 39); de hecho, la adición de glucosa posterior al KCl no provoca la disminución del pH que se observa en el trazo

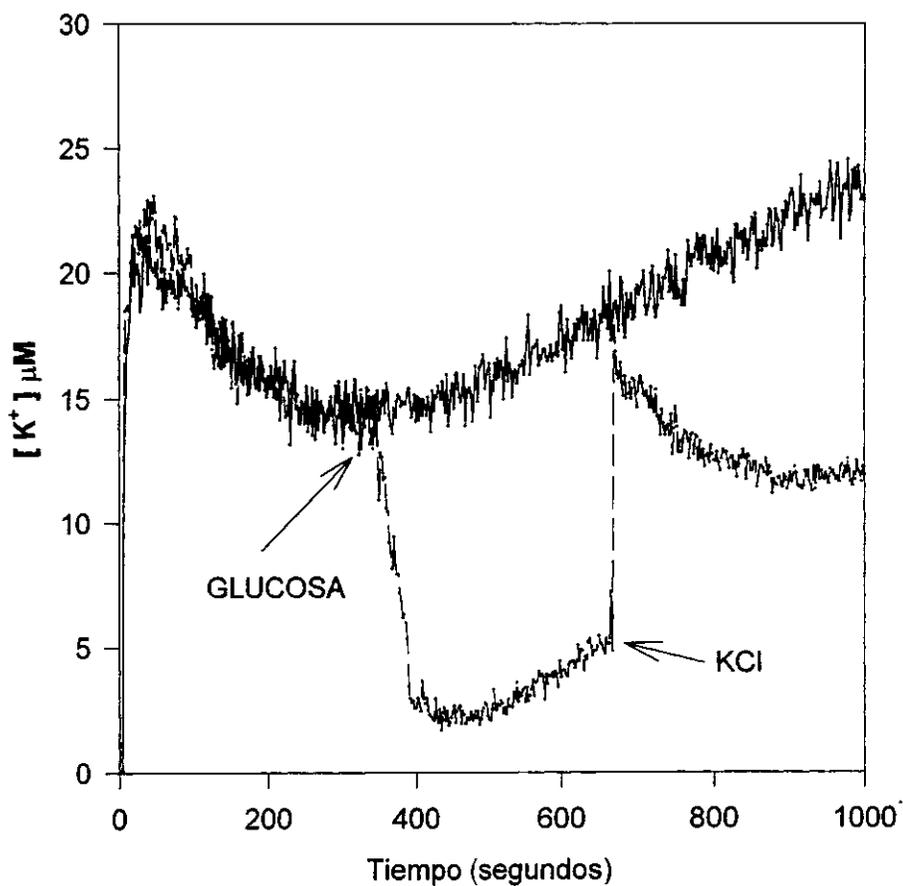


Fig. 38. Transporte de potasio en células incubadas 1 h con glucosa 2.5 mM y KCl 2.5 mM. Trazo sin sustrato y con adición de glucosa seguido por KCl. Las levaduras se preparan como se describe en la Fig. 32. La flecha indica la adición de glucosa 10 mM y KCl 10 mM. El transporte de potasio se realiza como se describe en el apartado 2.10 de Materiales y Métodos.

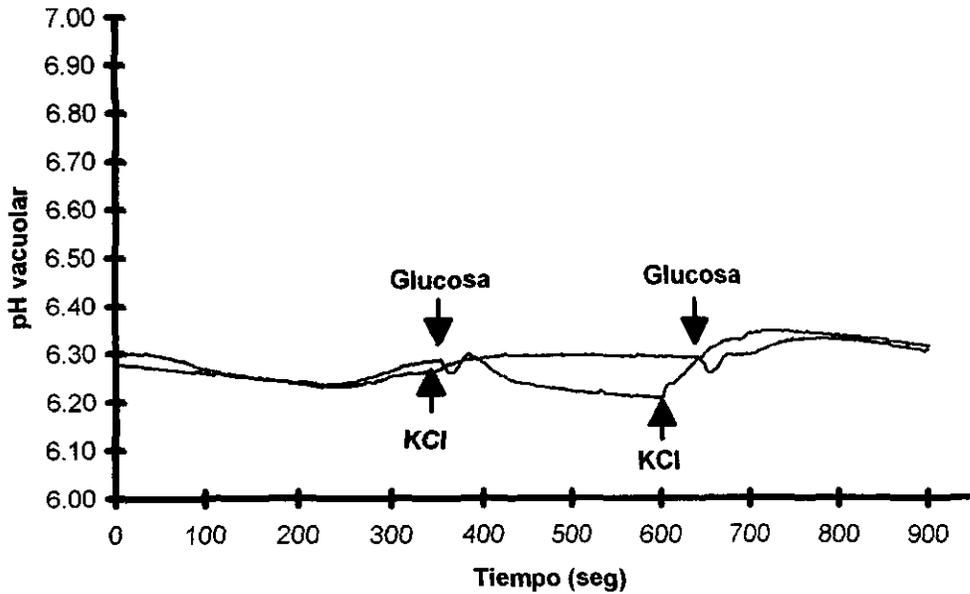


Fig. 39. pH vacuolar de levaduras incubadas 1 h con glucosa 2.5 mM y no lavadas. Las levaduras se preparan de acuerdo a los apartados 2.1, 2.2 y 2.4a de Materiales y Métodos. La medición de fluorescencia, el cálculo de pH se lleva a cabo de acuerdo a los apartados 2.5b y 2.6. En un trazo las adiciones de glucosa 10 mM y KCl 10 mM se llevan a cabo a los 350 y 600 seg. respectivamente; en el otro trazo se adiciona KCl y después glucosa a los 350 y 640 seg. respectivamente.

inverso, esto es debido a que la respuesta final del pH vacuolar es la suma de lo que la adición de glucosa y KCl provocan conjuntamente sobre el pH vacuolar (Fig. 39).

La Fig. 30 muestra que la magnitud de la respuesta del pH vacuolar a la adición de KCl es mayor en las levaduras incubadas con glucosa y KCl ($\Delta\text{pH} = 0.35$) que en las levaduras incubadas únicamente con glucosa ($\Delta\text{pH} = 0.2$). Es probable que la entrada del ion potasio a las levaduras incubadas con glucosa y KCl se encuentre más favorecido gracias a que en estas levaduras la difusión del CO_2 es mayor que en las levaduras incubadas únicamente con glucosa; la acidificación del entorno las levaduras provoca el incremento del $\Delta\psi$ a través de la membrana plasmática favoreciendo la entrada del ion potasio a la levadura. Lo anterior, aunado al hecho de que el pH vacuolar es menor al pH citoplásmico (Fig. 35) provoca que la direccionalidad del gradiente de protones favorezca la entrada del ion potasio que de cualquier forma lo más probable es que se internalice a la vacuola a favor de su gradiente de concentración, lo cual provoca finalmente el incremento del pH vacuolar en estas levaduras.

La Fig. 36 muestra que en las levaduras incubadas con glucosa y KCl y lavadas la magnitud de la respuesta del pH vacuolar a la adición de KCl es mayor en las levaduras incubadas en un amortiguador a pH 4 y 6 que a pH 8. A pesar de que el pH vacuolar antes de la adición de KCl es similar entre las levaduras incubadas a pH 4 y 6 (5.8 y 5.9 respectivamente), el ΔpH provocado por el KCl en las levaduras incubadas a pH 4 es mayor (0.38) que en las levaduras a pH 6 (0.34). En este caso, la acidificación del medio externo de las levaduras es el factor primordial que provoca que el $\Delta\psi$ a través de la membrana plasmática sea mayor y por lo tanto la entrada del ion potasio a la vacuola sea mayor; es decir, la acidificación del medio externo con un amortiguador a pH 4 favorece la entrada de K^+ a la levadura (Peña, 1975). Tanto en las levaduras incubadas a pH 4 como a pH 6, el pH vacuolar es menor al pH citoplásmico por lo que la direccionalidad del gradiente de protones desde la vacuola al citoplasma constituye un factor adicional que favorece la entrada de K^+ a la vacuola.

En el caso de las levaduras incubadas a pH 8 (Fig. 36), la alcalinidad del medio externo de las levaduras disminuye el $\Delta\psi$ a través de la membrana plasmática lo cual provoca que la entrada del ion potasio a la levadura sea menor; este hecho, aunado a que el ΔpH existente entre el citoplasma y la vacuola es menor que en los otros dos casos (pH 4 y 6), provoca que la entrada de dicho catión a la vacuola sea menor y por lo tanto el ΔpH vacuolar tras el pulso de KCl sea de solo 0.18 unidades.

Con respecto a las levaduras incubadas únicamente con glucosa (Fig. 30), la entrada del ion potasio a las levaduras debe ser menor que en las incubadas con glucosa y KCl ya que en las primeras la difusión del CO_2 al exterior de las levaduras es menor. Esto provoca que el $\Delta\psi$ a través de la membrana plasmática sea menor y por lo tanto la entrada del ion potasio está menos favorecida. Por otra parte, puesto que la direccionalidad del gradiente de protones existente entre el citoplasma y la vacuola es contraria a la que favorece la entrada del ion potasio a la vacuola, provoca que la internalización de dicho catión a la vacuola responda únicamente al gradiente de concentración de dicho catión. Por lo tanto, la respuesta del pH vacuolar a la adición de KCl es menor en las levaduras incubadas

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

únicamente con glucosa.

A su vez, las levaduras incubadas con glucosa y lavadas el ion potasio puede internalizarse a la levadura aún antes de la adición de la glucosa (Fig. 27). Tal y como se describió en el apartado anterior (ver sección 3.3.10) las levaduras incubadas con glucosa y lavadas son capaces de captar el potasio externo aún sin la adición de glucosa debido a que el $\Delta\psi$ existente a través de la membrana plasmática se incrementa gracias a la acidificación externa que provoca la difusión del CO_2 interno de la levadura (Fig. 27). Por lo tanto, en estas levaduras el ion potasio se encuentra disponible en el citoplasma para ser *internalizado* a la vacuola (Fig. 40).

De acuerdo al mecanismo de transporte del ion potasio a través del antiportador K^+/H^+ , el transporte del ion potasio al interior de la vacuola en contra de su gradiente de concentración debe estar *acoplado* a la salida de protones desde la vacuola al citoplasma. Sin embargo, la Fig. 28 muestra que a los 350 seg. del trazo el pH vacuolar es aproximadamente 0.17 unidades mayor que el pH citoplásmico; este ΔpH entre ambos compartimentos debe provocar un gradiente de protones desde el citoplasma hacia la vacuola, es decir, en sentido inverso al requerido para el transporte del ion potasio en contra de su gradiente de concentración.

En dichas condiciones, la entrada del ion potasio a la vacuola debe responder al gradiente de concentración del propio catión; es decir, a la mayor concentración del ion potasio en el citoplasma que en la vacuola. De esta forma, a pesar de que el pH vacuolar sea mayor que el pH citoplásmico, la entrada del ion potasio a través del antiportador K^+/H^+ provocará el *desplazamiento de protones al exterior de este organelo* resultando en el incremento del pH vacuolar.

Las levaduras con bajo metabolismo tienden a eliminar iones potasio al exterior (Figs. 37 y 38) provocando que la concentración final de dicho catión sea muy baja. Por lo tanto, si a estas levaduras se les añade KCl, se producirá un gradiente de concentración de este catión favoreciendo su *internalización* a la vacuola. Es por ello que en las levaduras incubadas con glucosa y lavadas el ion potasio se internaliza a la vacuola aún sin la adición anterior de glucosa (Fig. 40). Una vez que el gradiente de concentración del ion potasio alcanza el equilibrio, la adición de glucosa favorece un mayor almacenamiento del mismo debido probablemente a que tras la adición de glucosa la levadura internaliza una mayor cantidad de iones potasio (Fig. 38); la respuesta final del pH vacuolar tras la adición de glucosa posterior al KCl, representa la suma de los cambios que cada uno de los sustratos añadidos a la levadura provoca, de manera individual, sobre el pH vacuolar.

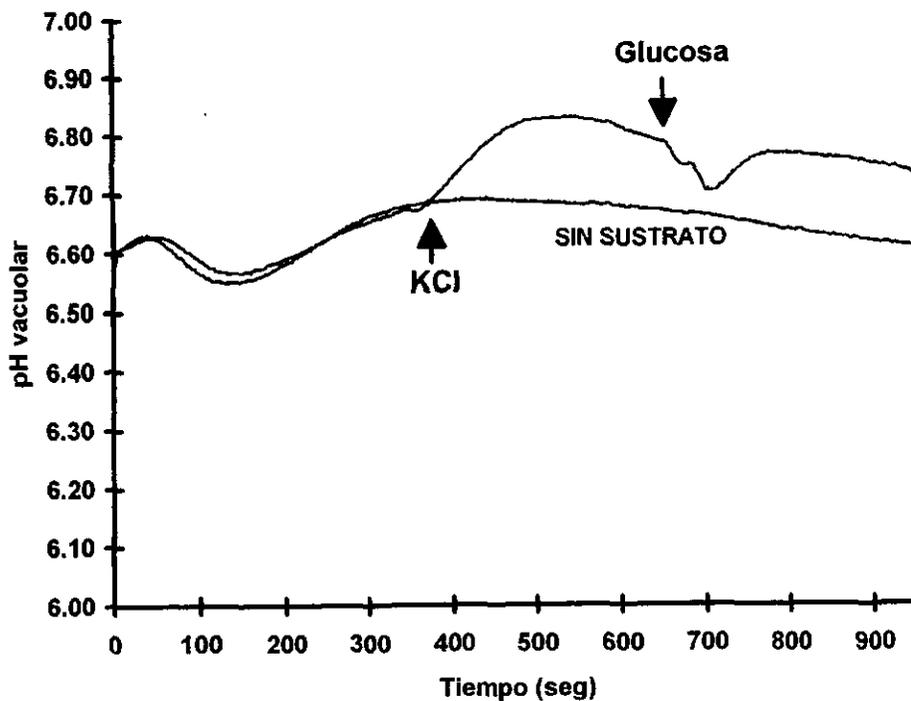


Fig. 40. pH vacuolar de levaduras incubadas 1 h con glucosa 2.5 mM y lavadas. Las levaduras se preparan de acuerdo a los apartados 2.1, 2.2 y 2.4b de Materiales y Métodos. Posteriormente, se lleva a cabo la incubación de las levaduras en la celda del fluorómetro, la medición de la fluorescencia y el cálculo de pH tal y como se describe en los apartados 2.5b y 2.6 de Materiales y Métodos. Las adiciones de KCl 10 mM y glucosa 10 mM se llevan a cabo a los 350 y 650 seg. respectivamente.

4. DISCUSIÓN

4.1. DISTRIBUCIÓN CELULAR DE LA PIRANINA Y VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA

En el presente trabajo se utilizó una técnica fluorescente para la medición del pH interno en la levadura *S. cerevisiae*. Como se demostró a lo largo de la primera parte de los resultados, las fotografías realizadas en el microscopio de fluorescencia (Figs. 6-9 y 11) aportaron una gran cantidad de información acerca de la localización intracelular del colorante, así como del proceso de entrada de la piranina a la vacuola (Fig.10). Por su parte, las fotografías al microscopio electrónico aportaron más información acerca de la morfología vacuolar (Figs. 12-14).

La técnica de la piranina presenta numerosas ventajas en relación con otras técnicas y colorantes utilizados en la cuantificación del pH intracelular; dentro de las más importantes se encuentran las siguientes:

4.1.1. Introducción del colorante a la levadura.

La piranina es un colorante de baja permeabilidad, pero es posible introducirlo a la levadura por medio de la electroporación. La piranina es un colorante que permite cuantificar el pH intracelular de la levadura y seguirlo en el tiempo, ya que la técnica es de respuesta rápida y sensible.

Existen otros colorantes que se introducen a las levaduras tras una sencilla incubación de unas cuantas horas (Haworth y Fliegel, 1993), sin embargo, éstos mismos tienden a perderse hacia el exterior de la levadura con la misma facilidad con la que se introdujeron.

En el caso de *S. cerevisiae*, la salida de la piranina del interior de la misma, se hace evidente hasta 24 h después de realizada la electroporación (ver sección 4.1.3).

4.1.2. Metabolismo y transporte celular.

Los resultados muestran que, ni la técnica de introducción de la piranina a la levadura, ni su presencia en el interior de la misma, altera el metabolismo de este microorganismo. Las levaduras electroporadas en presencia de piranina presentan una respiración normal y una respuesta a la glucosa y al ion potasio que se ajustan aceptablemente a los mecanismos moleculares conocidos; la levadura no presenta ninguna clase de disturbio metabólico ni alteración en su capacidad de transporte, por lo que en este sentido, la técnica de la piranina es aceptable (Peña *et al.*, 1995).

4.1.3. Permanencia del colorante en el interior de la levadura.

La cantidad de piranina total, interna y externa de la levadura, se mantiene prácticamente constante hasta 8 h después de realizada la electroporación, siendo la única condición para esto, que las levaduras se mantengan a 4 °C durante todo este tiempo.

Sin embargo, 24 h después de realizada la electroporación, se hace evidente la salida de la piranina, aún en las levaduras que han sido refrigeradas (Peña *et al.*, 1995).

4.1.4. Distribución intracelular de la piranina.

La piranina presenta la peculiaridad de concentrarse diferencialmente, ya sea en el citoplasma o en la vacuola de la levadura; la localización intracelular de este colorante depende del tratamiento al que se sometan las levaduras electroporadas.

En nuestro trabajo, llevamos a cabo la cuantificación del pH citoplásmico en levaduras electroporadas inmediatamente después del periodo de ayuno (Fig. 4) o en levaduras electroporadas posteriormente a la preincubación con glucosa sola o con KCl (Fig. 5).

Por otra parte, se cuantificó el pH vacuolar en levaduras electroporadas e incubadas con glucosa sola o con KCl (Fig. 4). La cuantificación del pH vacuolar puede llevarse a cabo inmediatamente después de terminado el periodo de preincubación (Fig. 4) o en levaduras que han sido sometidas a un lavado posterior al mismo (Fig. 5).

La piranina es una molécula cargada negativamente y por lo mismo no es capaz de atravesar directamente la membrana vacuolar (Clement y Gould, 1981; Kano y Fendler, 1978); sin embargo, nuestros resultados muestran que la piranina es capaz de concentrarse en el interior de la vacuola en las levaduras electroporadas e incubadas con glucosa sola o con KCl.

El hecho de que la entrada de la piranina a la vacuola sea un fenómeno dependiente de la presencia de sustrato (glucosa con o sin KCl), sugiere que la piranina se introduce al interior de dicho organelo gracias a un transporte activo. Puesto que la piranina presenta carga negativa, es probable que este colorante sea atraído al interior de la vacuola gracias al ambiente ácido y positivo que existe en el interior de la misma. La incubación de las levaduras electroporadas con glucosa sola o con KCl, provoca una disminución en el pH vacuolar (Fig. 26). Es muy probable que en presencia de dichos sustratos la actividad de la H⁺-ATPasa vacuolar sea estimulada y por lo tanto imponga el potencial electroquímico a través de la membrana vacuolar, ácido y positivo en el interior de la vacuola (Anraku *et al.*, 1992 a). Es posible que la entrada de la piranina a la vacuola responda a dicha diferencia de potencial y tal vez se introduzca a dicho organelo a través de un acarreador inespecífico.

4.1.5. Concentración de la piranina.

Según la curva patrón de piranina y los datos de Peña *et al.*, (1995), la concentración de piranina utilizada es de 15 μM aproximadamente, en una alícuota de 50 μl de levaduras electroporadas; a estas levaduras se les elimina el exceso de piranina con varios lavados posteriores a la electroporación y finalmente se diluyen en una relación igual a la inicial de 0.5 g/ml. Kotyk y Slavik (1989) recomiendan el uso de colorantes en un intervalo de concentración entre 10 μM y 1 mM, por lo que la concentración de 15 μM , presente en la alícuota de 50 μl , se encuentra dentro del intervalo recomendado.

Si la concentración de piranina es muy baja, se corre el riesgo de que el colorante se una a ciertas moléculas intracelulares. Lo anterior se ha observado que sucede con algunos colorantes que son introducidos a las células bajo estudio a una concentración muy baja, lo que provoca que finalmente el colorante se pierda en el interior de la misma al unirse a algunas proteínas (Kotyk y Slavik, 1989); por lo anterior, la concentración del colorante utilizado debe encontrarse en un intervalo tal que su pérdida por unión a otras moléculas no sea significativo; si en cambio, la concentración utilizada es muy alta, es posible que el indicador cambie el pH intracelular o afectar el metabolismo de la levadura (Kotyk y Slavik, 1989).

4.1.6. La forma fluorescente.

La piranina es una molécula que mantiene su fluorescencia en el interior de la levadura y que presenta un espectro de fluorescencia tal que permite distinguir su forma ionizada de la protonada, sin interferencias importantes.

Con otros colorantes fluorescentes utilizados en la medición del pH intracelular, se torna necesaria la aplicación de enzimas intracelulares que liberen al grupo fluorescente. Tal es el caso del diacetato de 6-carboxi-fluoresceína (6-CFDA); en este caso, la molécula fluorescente (fluoresceína) se encuentra como grupo acilo (Haworth and Fliegel, 1993). Por lo tanto, el uso de este tipo de moléculas conjugadas requiere la actividad de la enzima correspondiente capaz de convertir en su forma libre a la molécula fluorescente en el interior de la célula; sin embargo, como es de esperarse, algunas veces este hecho representa una importante limitación al uso de dichas moléculas para la medición del pH interno de la levadura.

Por otra parte, una característica relevante de la técnica de la piranina, es el hecho de que el único seguimiento que se realiza es el de la fluorescencia de la forma básica del colorante y que el cálculo final del pH intracelular no requiere de la construcción de una curva patrón sino únicamente de la aplicación de los cálculos ya descritos en Materiales y Métodos.

Con respecto a lo anterior, Kotyk y Slavik (1989) mencionan que el seguimiento de una sola forma del equilibrio ácido-base para el cálculo del pH interno, es válido siempre y cuando la cantidad de colorante total se mantenga constante a lo largo de toda la medición

del mismo. En este caso, es posible aplicar el criterio anterior ya que se observan dos fenómenos importantes: a) el valor de fluorescencia total es el mismo a lo largo de cada trazo de pH y, b) los valores de fluorescencia total son prácticamente los mismos entre los distintos trazos de pH. Es decir, en este caso, es posible aplicar el criterio que Kotyk y Slavík (1989) mencionan ya que la cantidad total de colorante se mantiene constante en cada una de las mediciones y entre cada una de ellas, por lo tanto, es posible llevar a cabo únicamente el seguimiento de la forma básica de la piranina.

4.1.7. Intensidad de la fluorescencia.

Otra cuestión fundamental observada durante el establecimiento de la técnica de la piranina, fue la aparente ausencia de fenómenos de *quenching* de la fluorescencia, tanto para la forma ácida y básica de la piranina, en su estado libre o en el interior de la levadura. Lo anterior se deduce del hecho de que la magnitud de la fluorescencia de emisión es igual a la de excitación en cada uno de los espectros; es decir, en este aspecto no es evidente la existencia de ningún fenómeno capaz de provocar una respuesta diferencial entre la fluorescencia de excitación y la fluorescencia de emisión.

4.1.8. Espectros de la piranina en estado libre y en el interior de la levadura.

Es importante que las características espectroscópicas de la piranina sean las mismas, tanto en su estado libre como en el interior del citoplasma o de la vacuola ya que ésto hace posible aplicar la misma técnica de detección, así como de cuantificación del pH en ambos compartimentos.

La forma libre de la piranina o la interna en la levadura, presentan las mismas longitudes de onda de máxima emisión y excitación para la base y el ácido, además de que la forma general de los espectros es prácticamente igual.

4.1.9. Curvas de piranina total y de pH citoplásmico y vacuolar.

Finalmente, las curvas de piranina total vs volumen de levaduras electroporadas son lineales, es decir, siguen un patrón de proporcionalidad directa con respecto a la concentración de piranina presente en la celda del fluorómetro. Esto quiere decir al menos dos cosas: a) que la magnitud de la fluorescencia no sobrepasa la capacidad de detección del aparato y, b) que no existe ningún fenómeno de apagamiento que disminuya la intensidad de la fluorescencia, y esto es aplicable en el intervalo de concentración de piranina estudiada (10 a 70 μ l de suspensión de levaduras). Por lo anterior se tiene la certeza de que los valores de fluorescencia obtenidos durante los trazos de pH, no están subestimados.

El mismo fenómeno se observó en las curvas de pH vacuolar y citoplásmico, las cuales

también mostraron un valor constante en el intervalo de 10 a 70 μl de la suspensión de levaduras, y ello significa que en todo este intervalo los valores de fluorescencia utilizados para el cálculo de pH son proporcionales al incremento en la concentración de piranina.

Todas las características de la piranina anteriormente descritas hacen de esta técnica una forma confiable de medir el pH intracelular.

4.2. EL pH CITOPLÁSMICO Y VACUOLAR EN LA LEVADURA

El objetivo inicial de la presente investigación fue conocer la respuesta del pH vacuolar a la adición de glucosa. La hipótesis plantea la suposición de que el pH vacuolar disminuye tras la adición de glucosa. El metabolismo de la glucosa produce ATP el cual incrementa la actividad tanto de la H^+ -ATPasa plasmática como de la H^+ -ATPasa vacuolar favoreciendo el bombeo de protones al exterior de la levadura y al interior glucosa respectivamente. Por lo tanto se sugirió que el solo bombeo de protones a través de la H^+ -ATPasa vacuolar provocaría la acidificación de la vacuola.

Sin embargo, gracias al modelo empleado de levaduras incubadas con glucosa y posteriormente lavadas, fue posible observar la importancia del equilibrio del CO_2 y del estado energético en la regulación del pH interno de la levadura.

En principio el establecimiento de la técnica de incubación de las levaduras con glucosa y su posterior lavado tuvo como origen la necesidad de comparar el comportamiento del pH citoplásmico con el vacuolar. Puesto que la introducción de la piranina a la vacuola de las levaduras requiere de una incubación previa con glucosa, fue necesario llevar a cabo el mismo procedimiento para la medición del pH citoplásmico, con la única diferencia que la electroporación se realiza después de la incubación. Por este motivo es necesario lavar las levaduras para eliminar el exceso de piranina.

Se observó que el lavado de las levaduras altera profundamente el pH interno de las mismas debido a su bajo estado energético. Durante la incubación con glucosa, las levaduras almacenan CO_2 el cual tiende a eliminarse al exterior en respuesta al gradiente de difusión provocada por la remoción del ácido carbónico del exterior. Por lo tanto, en vista de los cambios profundos del pH citoplásmico después del lavado de las levaduras, también se llevó a cabo la medición del pH vacuolar en levaduras tratadas de la misma forma.

López *et al* (1999) presenta un modelo que muestra la relación entre los equilibrios del CO_2 y la H^+ -ATPasa plasmática con el pH citoplásmico. Tras el estudio e interpretación de los resultados obtenidos en este trabajo, fue posible extender dicho modelo hacia la membrana vacuolar y el interior de este organelo (Fig. 26). Además, la observación de que el ion potasio favorece la acidificación de la vacuola complementó dicho modelo acerca del papel de este catión en la regulación del pH de la levadura.

Dicho modelo muestra la íntima relación que existe entre la glucosa, el metabolismo energético y el CO_2 con la actividad de las H^+ -ATPasas plasmática y vacuolar de la levadura así como el efecto del ion potasio sobre dichos equilibrios.

4.2.1. Modelo de la regulación del pH citoplásmico y vacuolar

Las características de la glucosa tales como su abundancia y estabilidad, ha tenido una enorme repercusión sobre el desarrollo de las vías metabólicas de los organismos, ya que éstos han establecido como vías principales de obtención de energía, la utilización de este sustrato (Lehninger, 1985).

La glucosa es la fuente de carbono por excelencia de la levadura. Este sustrato es fundamental para el óptimo funcionamiento del metabolismo energético de este microorganismo ya que además de ser rápidamente metabolizado a través de la fermentación (Gancedo y Serrano, 1989) la glucosa juega un papel primordial en la regulación de las vías metabólicas la levadura y en la activación de vías de transducción de señales (Thevelein, 1994).

El metabolismo de los microorganismos depende en gran manera de la presencia y concentración de sustratos tales como la glucosa (Thevelein, 1994). Tal y como se mencionó, la glucosa activa vías metabólicas de importancia crucial para la levadura ya que su concentración es capaz de regular el cambio de fermentativo a respiratorio/gluconeogénico lo que significa la capacidad de la levadura para utilizar otras fuentes de carbono diferentes a la glucosa (Gancedo y Serrano, 1989).

La vía de transducción de señales que activa la glucosa estimula la actividad de protein cinasas (Thevelein, 1994) y estas son las que aparentemente fosforilan a la H^+ -ATPasa plasmática (Serrano, 1983; Chang y Slayman, 1991; Brandao *et al.*, 1994; Estrada *et al.*, 1996). La fosforilación de la H^+ -ATPasa plasmática estimula su actividad (Serrano, 1991) provocando un mayor bombeo de protones al exterior de la levadura. Por lo tanto, la actividad de esta enzima depende de manera doble de la presencia de glucosa ya que no solamente es fosforilada a través de las vías activadas con glucosa, sino que también depende del ATP que el metabolismo de la glucosa produce.

Por lo anterior, se deduce que la H^+ -ATPasa plasmática representa un blanco clave en la regulación del metabolismo de la levadura ya que los productos de su actividad, tales como el pH citoplásmico y el ΔpH y el $\Delta\psi$, tienen consecuencias muy importantes en la actividad de la levadura.

La levadura también contiene vías metabólicas que son activadas a través del pH intracelular de la levadura entre las cuales se encuentran algunas relacionadas con la proliferación celular (Thevelein, 1994). Y puesto que el pH citoplásmico de las levaduras cambia notablemente tras la adición de glucosa, es posible que dichos cambios estén relacionados precisamente con la activación de los mecanismos involucrados con la

proliferación celular; más aún si los cambios de pH citoplásmico responden a la actividad de la H^+ -ATPasa plasmática, enzima cuya función depende directamente del estado energético de la levadura.

Por otra parte, los resultados muestran la importancia del equilibrio del CO_2 en el interior de la levadura. El CO_2 representa no solamente la fuente primordial de protones en la levadura, sino el sistema amortiguador del pH interno por excelencia. Además, el ácido carbónico es la fuente de bicarbonato el cual es de vital importancia para la levadura ya que éste favorece el mantenimiento del $\Delta\psi$ a través de la membrana plasmática (López *et al.*, 1999).

Sin embargo, la producción de CO_2 depende directamente del metabolismo energético de la levadura y por lo tanto de la naturaleza y concentración del sustrato al cual tenga acceso la levadura (López *et al.*, 1999).

4.2.2. pH citoplásmico

Cualquier disminución en la capacidad de la levadura para mantener activa a la H^+ -ATPasa plasmática tal como la disminución en la concentración de glucosa, provocará no solamente una disminución en el bombeo de protones al exterior de la levadura, sino una disminución del ΔpH y el $\Delta\psi$. Esto provoca una disminución en la capacidad de transporte de nutrientes a su interior y por lo tanto un retardamiento en la capacidad de desarrollo y proliferación de la levadura. Además, si la concentración de glucosa disminuye, la concentración de CO_2 producido y en la capacidad de amortiguadora de la levadura también viene a menos.

Por lo tanto, una levadura ayunada presentará una disminución en su ΔpH y $\Delta\psi$ pero además tenderá a perder CO_2 interno. Este es un fenómeno que la levadura debe evitar ya que una cuestión fundamental es que mantenga en concordancia el pH citoplásmico con el ΔpH y $\Delta\psi$. El primero puede representar una señal importante de activación de vías metabólicas y de proliferación celular, mientras que los otros dos, capacitan a la membrana plasmática de la levadura para transportar nutrientes a su interior lo que a su vez activa su metabolismo y desarrollo.

Por lo tanto, tanto el incremento del pH citoplásmico como el establecimiento del ΔpH y $\Delta\psi$ en la membrana plasmática, deben responder al mismo hecho: la presencia de glucosa en el medio o de alguna otra fuente de carbono que sea capaz de otorgar suficiente ATP a la H^+ -ATPasa plasmática y estimular su actividad.

Si la levadura pierde su capacidad de regular coordinadamente el pH citoplásmico y el ΔpH y $\Delta\psi$ en la membrana plasmática, la regulación entre la entrada de nutrientes a su interior y la activación de las vías metabólicas estarán desfasadas y este hecho podría provocar la muerte de la levadura.

En este punto el ion potasio juega un papel fundamental en la regulación del pH interno de la levadura, ya que no solamente favorece el mantenimiento del $\Delta\psi$ gracias a su capacidad

de retención del bicarbonato, sino que también favorece el bombeo de protones a través de las H^+ -ATPasas plasmática y vacuolar.

Por lo tanto, el mantenimiento del pH citoplásmico, el ΔpH y el $\Delta \psi$ en la membrana plasmática dependen directamente de la presencia de glucosa y KCl en el medio; es decir, la regulación del pH interno de la levadura depende directamente del estado energético y de la presencia de iones potasio en este organismo.

Los cambios del pH citoplásmico pueden ser rápidamente establecidos en las levaduras ayunadas gracias a la actividad de la H^+ -ATPasa plasmática y a que ésta es activada por glucosa; además, la capacidad amortiguadora del citoplasma de las levaduras ayunadas debe ser menor dada la baja en la producción de ácido carbónico. Además, la actividad de la H^+ -ATPasa plasmática se favorece con la acidificación citoplásmica de las levaduras ayunadas debido a que la concentración de protones en el citoplasma debe desplazar su equilibrio.

En este punto es importante considerar el papel del K^+ . El mantenimiento del $\Delta \psi$ a través de la membrana plasmática de la levadura depende de la capacidad de la levadura para bombear protones al exterior de la misma y de retener bicarbonato en su interior. Sin embargo, una levadura ayunada no solamente disminuye la producción de CO_2 sino que además disminuye la actividad de la H^+ -ATPasa plasmática por lo que el $\Delta \psi$ disminuye en estas levaduras. Esto provoca que el ion potasio se elimine ya que su almacén, al igual que su entrada a la levadura, depende del $\Delta \psi$ existente a través de la membrana plasmática (Peña *et al.*, 1975; López *et al.*, 1999). Por lo tanto, una levadura ayunada tenderá a perder K^+ . Sin embargo, en este punto surgen varias preguntas importantes:

¿Juega algún papel importante el antiportador K^+/H^+ presente en la membrana plasmática en la regulación del pH interno de la levadura? (Ramírez *et al.*, 1996, 1998). ¿Por qué a pesar de que una levadura ayunada produce menos cantidad de CO_2 presenta un citoplasma ácido?. ¿Por qué en cambio, la vacuola de las levaduras ayunadas presentan un pH alcalino?.

Puesto que el metabolismo de la levadura se regula también a través del pH citoplásmico, su acidificación puede representar una señal importante de disminución en la capacidad energética de la levadura; y precisamente la pérdida del ion potasio al exterior de la levadura es reflejo de la disminución en la actividad de la H^+ -ATPasa plasmática, la cual depende de la presencia y metabolismo de la glucosa. Por lo tanto, es posible que esta señalización se lleve a cabo a través del antiportador K^+/H^+ presente en la membrana plasmática (Ramírez *et al.*, 1996, 1998) el cual acidificaría el citoplasma de manera coordinada a la pérdida de iones potasio. Posiblemente a través de la actividad de este antiportador, la levadura coordina la disminución en la actividad de la H^+ -ATPasa plasmática con la acidificación citoplásmica.

Se sabe que los mecanismos que son regulados a través del pH interno de la levadura son los involucrados en la estimulación o apagamiento de la fermentación y de la

respiración/gluconeogénesis (Thevelein, 1994). Por lo tanto, el cambio de pH interno en la levadura es capaz de regular la síntesis *de novo* de la glucosa o la utilización de otras fuentes de carbono diferentes a la glucosa. Por ejemplo el etanol, que es producto de la fermentación, es metabolizado a través de la respiración en la levadura (Gancedo y Serrano, 1989).

4.2.3. pH vacuolar

Los resultados obtenidos con el pH vacuolar, muestran que la acidificación vacuolar depende tanto del bombeo de protones a través de la H^+ -ATPasa vacuolar como de la concentración de ácido carbónico en el interior de la vacuola. Ambos mecanismos son activados por el ion potasio y de hecho en su ausencia, la acidificación de la vacuola es mucho menor que en presencia de este catión.

Los resultados también muestran que el CO_2 no solamente es fuente de protones para la vacuola sino que además juega un papel de amortiguador del pH vacuolar muy importante. Por su parte, la actividad de la H^+ -ATPasa vacuolar también es fundamental no solamente en la acidificación vacuolar sino en el establecimiento del ΔpH y $\Delta \psi$ en la membrana vacuolar (Anraku *et al.*, 1989).

Los resultados muestran que el proceso de acidificación vacuolar es más lento que la alcalinización del citoplasma. Esto puede responder al hecho de que en el caso de la acidificación vacuolar están involucrados los dos mecanismos: la actividad de la H^+ -ATPasa vacuolar y la concentración de CO_2 .

La capacidad de retención del bicarbonato en presencia de iones potasio es especialmente importante en el caso de la acidificación vacuolar, ya que estimula no solamente la actividad de la H^+ -ATPasa vacuolar sino también la capacidad de concentración de CO_2 en el interior de la vacuola. La alta dependencia de estos mecanismos de la presencia de iones potasio debe responder al hecho de que la acidificación vacuolar requiere de la concentración de una gran cantidad de protones y de CO_2 por lo que ambos mecanismos requieren de iones potasio que los estimule. Lo anterior, aunado al hecho de que la capacidad amortiguadora de la vacuola debe ser mayor conforme se incrementa la concentración de CO_2 en su interior, da lugar a que la acidificación vacuolar requiera del bombeo de una gran cantidad de protones y/o de la concentración de más ácido carbónico en la vacuola.

En el caso de la H^+ -ATPasa vacuolar su actividad debe favorecerse en presencia de iones potasio ya este catión favorece la retención de bicarbonato tras el bombeo de protones a través de la bomba vacuolar. En el caso del CO_2 , su almacenamiento en el interior de la vacuola también debe incrementarse con la presencia de iones potasio ya que al retener bicarbonato disminuye la capacidad del ácido carbónico de difundir nuevamente hacia el citoplasma. Por lo tanto, en el caso de la acidificación vacuolar, el ion potasio actúa no solamente desde el interior de este organelo, sino también desde el citoplasma.

Algunos investigadores proponen que tanto los polifosfatos como los aminoácidos básicos almacenados en el interior de la vacuola juegan un papel primordial en el proceso de acidificación vacuolar (Okorokov *et al.*, 1980; Kliensky *et al.*, 1990). Esto debido al hecho de que estas moléculas son capaces de protonarse y por lo tanto de retener protones en la vacuola. Y puesto que la vacuola es capaz de almacenar polifosfatos y aminoácidos básicos en gran cantidad, es posible que el almacén de protones bombeados por la H^+ -ATPasa vacuolar y los que la difusión del ácido carbónico introduce a la vacuola, sean captados en gran parte por estas moléculas, favoreciendo el almacén de protones y la acidificación vacuolar. De hecho se sabe que la actividad *in vitro* de la H^+ -ATPasa vacuolar se favorece en presencia de iones cloruro (Wada y Anraku, 1994) debido a que dichos aniones disminuyen el $\Delta\psi$ a través de la membrana vacuolar; este mismo papel podrían estar jugando *in vivo*, los polifosfatos que se almacenan en gran cantidad en la vacuola.

Un aspecto muy importante es la entrada del ion potasio a la vacuola. El hecho de que el ion potasio se introduzca a la vacuola a través de un antiportador K^+/H^+ (Nass y Rao, 1998) presenta la ventaja de que aún cuando no exista un ΔpH entre el citoplasma y la vacuola, el ion potasio es capaz de internalizarse a la vacuola gracias a su gradiente de concentración entre el citoplasma y la vacuola.

Por lo tanto, si en un principio no existe un suficiente $\Delta\psi$ a través de la membrana vacuolar tal que haga posible la entrada de este catión a la vacuola, éste de cualquier forma se introduce gracias a su gradiente de concentración lo cual, a su vez, favorece la retención de ácido carbónico en el interior de la vacuola.

La vacuola es un organelo de almacenamiento de iones, proenzimas, aminoácidos entre otros metabolitos (Roomans *et al.*, 1979; Okorokov *et al.*, 1980; Kliensky *et al.*, 1990). El transporte de muchos de ellos se lleva a cabo a través de antiportadores acoplados con protón por lo que su almacenamiento depende en gran medida del ΔpH a través de la membrana vacuolar (Kliensky *et al.*, 1990) y por lo tanto, del grado de acidez de la vacuola. A su vez, la activación de proenzimas como la carboxipeptidasa A, la cual es una proteasa cuya activación y salida de la vacuola, depende del pH vacuolar (Kliensky *et al.*, 1990).

Puesto que la acidificación vacuolar es un mecanismo lento y que depende de un estado metabólico muy activo, es razonable pensar que la velocidad de acidificación vacuolar se encuentre coordinada con el transporte de metabolitos a su interior así como con la activación de ciertas proteasas, más aún si se considera que el requerimiento de iones y de ciertas actividades enzimáticas se presentan siempre bajo ciertas condiciones metabólicas las cuales cambian radicalmente entre una levadura ayunada y otra que contiene una alta concentración de sustratos.

Por lo tanto, la velocidad de los cambios del pH citoplásmico y vacuolar deben responder a la función de cada uno de ellos en el metabolismo celular. En el caso del pH citoplásmico de las levaduras ayunadas se observan cambios muy rápidos en presencia de glucosa lo cual parecería tener una función regulatoria sobre las vías metabólicas que degradan glucosa. Además, dada la importancia fundamental del metabolismo energético y de la dependencia

de muchas otras funciones celulares del aporte de ATP, se explicaría la prioridad en el cambio metabólico de la levadura de un estado respiratorio/gluconeogénico a otro fermentativo.

En comparación con la importancia que presenta la regulación del metabolismo energético en la levadura, el almacenamiento de iones y la activación de proenzimas constituyen mecanismos de regulación más finas y que responden a su vez al estado metabólico de la levadura. Eso explicaría en parte la lenta acidificación vacuolar en comparación con la respuesta del pH citoplásmico a la adición de la glucosa.

El mecanismo de regulación del pH interno en la levadura funciona de manera independiente de la actividad de la anhidrasa carbónica ya que, a pesar de que ésta es una enzima ubicua (Henry, 1996), hasta el momento su actividad no ha sido reportada en hongos (López *et al.*, 1999).

La anhidrasa carbónica es la enzima encargada de catalizar el equilibrio de hidratación/deshidratación del ion bicarbonato (ver ecuación 2). La anhidrasa carbónica se caracteriza por su actividad extraordinariamente alta; de hecho, esta enzima es la que posee la actividad molar más elevada de cualquiera de las enzimas conocidas hasta la fecha. La anhidrasa carbónica cataliza la conversión de 36 millones de moléculas de sustrato/min. x molécula de enzima (Lehninger, 1985).

La levadura se distingue por no contener ningún transportador de bicarbonato en sus membranas a diferencia de lo que se observa por ejemplo en las células animales (Guyton, 1987; Berne y Levy, 1988) por lo tanto, tras el bombeo de protones a través de las H^+ -ATPasas plasmática y vacuolar, el bicarbonato se retiene en el interior de la levadura. Esto se debe a que el bicarbonato es una molécula con carga y por lo tanto no es capaz de difundir libremente a través de las membranas biológicas. Sin embargo, a la levadura le favorece la retención de bicarbonato ya que éste ayuda al mantenimiento del $\Delta\psi$ a través de la membrana plasmática (López *et al.*, 1999) pero la producción y almacenamiento de este anión dependen de otros factores.

La presencia de glucosa es fundamental en este aspecto ya que no solamente incrementa la producción de CO_2 sino que favorece el bombeo de protones por parte de la H^+ -ATPasa plasmática el cual, a su vez, da lugar al almacenamiento de bicarbonato y al incremento del pH citoplásmico; éste último favorece también la ionización del ácido carbónico en bicarbonato y protón (López *et al.*, 1999).

La regulación de todos los factores relacionados en el mecanismo de regulación del pH interno de la levadura responden finalmente al estado energético de la misma y como tales también son utilizados como señales metabólicas (es el caso del pH citoplásmico; Thevelein, 1994). La cantidad de ácido carbónico, bicarbonato y protón son regulados precisamente por el metabolismo energético y la actividad de la H^+ -ATPasa plasmática.

Dentro de este panorama, la actividad de la anhidrasa carbónica alteraría definitivamente el

mecanismo de regulación del pH interno de la levadura ya que la producción de ácido carbónico, bicarbonato y protón no estaría en función de la capacidad metabólica de la levadura y por lo tanto el pH interno no podría llevar a cabo sus funciones de señal regulatoria en la levadura. Por lo anterior, se concluye que la anhidrasa carbónica es una enzima que la levadura no requiere dado el papel del pH interno como señal metabólica del estado nutricional de este organismo.

5. CONCLUSIONES

1.- La glucosa juega un papel fundamental en el mecanismo de regulación del pH interno de la levadura; el metabolismo de la glucosa produce el CO_2 necesario para amortiguar el pH de este microorganismo además de que el CO_2 es la fuente primordial de protones para las H^+ -ATPasas plasmática y vacuolar.

2.- El mantenimiento del equilibrio del CO_2 y de la H^+ -ATPasa plasmática en la levadura requiere de un metabolismo energético alto que mantenga una alta producción de CO_2 y una óptima actividad de la H^+ -ATPasa plasmática; lo anterior resulta en la regulación del pH citoplásmico y en el mantenimiento del ΔpH y el $\Delta\psi$ a través de la membrana plasmática. Además, un metabolismo energético alto favorece la producción del CO_2 el cual amortigua el pH interno de la levadura.

3.- El proceso de acidificación vacuolar depende tanto de la actividad de la H^+ -ATPasa vacuolar como de la difusión del ácido carbónico al interior de este organelo; ambos mecanismos son dependientes del ion potasio por lo que la presencia de este catión es indispensable para que la acidificación vacuolar sea significativa.

4.- El CO_2 juega un papel fundamental tanto en la acidificación vacuolar como en el amortiguamiento del pH de la misma. Aparentemente esta molécula se encuentra en alta concentración en el interior de la vacuola lo cual también le otorga la función de regular el pH citoplásmico sobretodo en aquellas condiciones en las que la levadura es incapaz de retener al CO_2 citoplásmico, por ejemplo en las levaduras incubadas con glucosa con o sin KCl y lavadas.

5.- El ion potasio juega un papel primordial en la regulación del pH interno de la levadura ya que su capacidad de retener al ion bicarbonato favorece tanto la actividad de las H^+ -ATPasa plasmática y vacuolar como la acumulación de CO_2 en la vacuola; esto a su vez, estimula el metabolismo energético de la levadura.

6. PERSPECTIVAS

Dada la importancia del ion potasio en la regulación del pH interno de la levadura, un aspecto interesante por continuar sería el estudio del transporte de dicho catión al interior de la vacuola.

Tal y como se observa en el presente trabajo, la interpretación del comportamiento del pH vacuolar requirieron de la elaboración de los trazos correspondientes al pH citoplásmico ya que, en primer lugar, es necesario saber si el ion potasio se está introduciendo a la levadura para a continuación averiguar la respuesta de la vacuola a la adición de dicho catión.

Por lo tanto, el estudio del transporte del ion potasio a la vacuola requiere del establecimiento de una técnica que permita la medición directa de dicho transporte a través de la membrana vacuolar y que evite la necesidad de conocer lo que sucede primero a través de la membrana plasmática.

En nuestro laboratorio se han realizado estudios acerca de algunos compuestos que son capaces de permeabilizar la membrana plasmática y que por lo tanto hacen posible la medición del transporte a través de la membrana vacuolar. Tal es el caso del DEAE-dextrán (dietilaminoetil-dextrán) y del CTAB (bromuro de cetil-trimetil-amonio) los cuales llevan a cabo dicha función.

Con el establecimiento de la técnica de levaduras permeabilizadas sería posible la aplicación de la técnica de la piranina para la medición directa de la entrada del ion potasio a la vacuola. Puesto que la permeabilización de la levadura eliminaría la capacidad metabólica de la misma, sería necesario la aplicación directa de ATP a las levaduras para la medición de la actividad de la H^+ -ATPasa vacuolar así como de la utilización de inhibidores de esta enzima tales como el ion nitrato y el ion cuproso para conocer los efectos de éstos sobre la acidificación vacuolar. Esto representaría un avance importante ya que dichos inhibidores son incapaces de atravesar la membrana plasmática por lo que en la levadura completa su uso es más complicado.

Además de lo anterior, sería posible llevar a cabo estudios cinéticos del transportador de potasio en la vacuola con el uso de distintas concentraciones de K^+ así como de su selectividad frente a otros cationes monovalentes como el Na^+ , Rb^+ y Cs^+ .

La elaboración de más trazos de pH vacuolar de levaduras incubadas con varias concentraciones de glucosa y de KCl daría más información acerca del proceso de acidificación vacuolar en la levadura. Así como la respuesta del pH vacuolar a la adición de glucosa y KCl durante el trazo de pH también aportaría más información acerca de las características de la entrada del ion potasio a la vacuola.

En general, se requiere llevar a cabo la caracterización bioquímica y cinética del transporte del ion potasio a la vacuola de la levadura.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, F. and Horikoshi, K. 1995. Hydrostatic pressure promotes the acidification of vacuoles in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Letts. 130:307-312

Addison, R. 1986. Primary structure of the *Neurospora* plasma membrane H^+ -ATPase deduced from the gene sequence. Homology to Na^+/K^+ - Ca^{2+} - and K^+ ATPase. J. Biol. Chem. 261:14896-14901.

Al-Awqati, Q. 1986. Proton-translocating ATPases. Annu. Rev. Cell. Biol. 2:179-199.

André, B. 1995. An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 11:1575-1611.

Anraku, Y., Umemoto, N., Hirata, R., and Wada, Y. 1989. Structure and function of the yeast vacuolar membrane proton ATPase. Mini-Review. J. Bioenerg. Biomembr. 21:589-603.

Anraku, Y., Umemoto, N., Hirata, R., and Ohya, Y. 1992 a. Genetic and cell biological aspects of the yeast vacuolar H^+ -ATPase. J. Bioenerg. Biomembr. 24:395-405.

Anraku, Y., Hirata, R., Wada, Y., and Ohya, Y. 1992 b. Molecular genetics of the yeast vacuolar H^+ -ATPase. J. Exp. Biol. 172:67-81.

Armstrong, W.McD. and Rothstein, A. 1964. Discrimination between alkali metal cations by yeast. I. Effect on proton uptake. J. Gen. Physiol. 48:61-71.

Bell, D.H., Paterson, L.K. and Gould, M. 1983. Transmembrane pH gradients and functional heterogeneity in reconstituted vesicle systems. Biochim. Biophys. Acta 725: 368-375.

Bennet, A.B., Leigh, R.A. and Spanswick, R.M. 1988. H^+ -ATPase from vacuolar membranes of higher plants. Methods Enzymol. 157:579-590.

Berne, R.M. and Levy, M. 1988. Physiology. The C.V. Mosby Company. 2nd. Edition. Cap. 39. 1077 pp. USA.

Borst-Pauwels, G.W.F.H. and Peters, P.H.J. 1981. Factors affecting the inhibition of yeast plasma membrane ATPase by vanadate. Biochim. Biophys. Acta 642:173-181.

Bowman, B.J. and Slayman, C.W. 1977. Characterization of plasma membrane adenosine triphosphatase of *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem. 252:3357-3363.

- Bowman, B.J., Berensky, C.J., and Jung, C.Y. 1985. Size of the plasma membrane H^+ -ATPase from *Neurospora crassa* determined by radiation inactivation and comparison with the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase from skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 260:8726-8730.
- Bowman, E.J. and Bowman, B.J. 1988. Purification of vacuolar membranes, mitochondria and plasma membranes from *Neurospora crassa* and modes of discriminating among the different H^+ -ATPases. *Methods Enzymol.* 157:562-573.
- Bowman, B.J., Dschida, W.J., Harris, T., and Bowman, E.J. 1989. The vacuolar ATPase of *Neurospora crassa* contains an F1-like structure. *J. Biol. Chem.* 264:15606-15612.
- Bowman, B.J., Dschida, W.J., and Bowman, E.J. 1992. Vacuolar ATPase of *Neurospora crassa*: electron microscopy, gene characterization and gene inactivation/mutation. *J. Exp. Biol.* 172:57-66
- Brandao, R.L., de Magalhaes-Rocha, N.M., Alijo, R. Ramos, J., Thevelein, M., 1994. Possible involvement of a phosphatidylinositol-type signaling pathway in glucose-induced activation of plasma membrane H^+ -ATPase and cellular proton extrusion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Acta* 1223:70-76.
- Calahorra, M., Martínez, G.A., Hernández-Cruz, A. and Peña, A. 1998. Influence on monovalent cations on yeast cytoplasmic and vacuolar pH. *Yeast* 14:501-515.
- Camarasa, C., Prieto, S., Ros, R., Salmon, J-M. and Barre, P. 1996. Evidence for selective and electroneutral K^+/H^+ -exchange in *Saccharomyces cerevisiae* using plasma membrane vesicles. *Yeast* 12:1301-1313.
- Clement, N.R. and Gould, J.M. 1981. Pyranine (8-Hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonate) as a probe of internal aqueous hydrogen ion concentration in phospholipid vesicles. *Biochemistry* 20:1534-1538.
- Cockburn, M., Earnshaw, P., Eddy, A.A. 1975. Stoichiometry of the absorption of protons with phosphate and L-glutamate by yeast of the genus *Saccharomyces*. *Biochem. J.* 146:505-512.
- Conway, E.J. and Brady, T.G. 1950. Biological production of acid and alkali. I. Quantitative relations of succinic and carbonic acids to the potassium and hydrogen ion exchange in fermenting yeast. *Biochem. J.* 47:360-369.
- Chang, A. and Slayman, C.W. 1991. Maturation of the yeast plasma membrane H^+ -ATPase involves phosphorylation during intracellular transport. *J. Cell Biol.* 155:289- 295

- Delhez, J., Dufour, J.P., Thines, D. and Goffeau, A. 1977. Comparison of the properties of Plasma Membrane-Bound and Mitochondria-Bound ATPases in the Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Eur. J. Biochem. 79:319-328.
- Dufour, J.-P., Boutry, M., Goffeau, A. 1980. Plasma membrane ATPase of yeast. Comparative inhibition studies of the purified and membrane bound enzymes. J. Biol. Chem. 255:5735-5741.
- Eddy, A.A. 1982. Mechanisms of solute transport in selected eukaryotic microorganisms. Adv. Microbiol. Physiol. 23:11-76.
- Estrada, E., Agostinis, P., Vandenheede, J.R., Goris, J., Merlevede, W., Francois, J., Goffeau, A. and Ghislain, M. 1996. Phosphorylation of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by casein kinase I. J. Biol. Chem. 271: 32064-32072.
- Forgac, M. 1989. Structure and function of vacuolar class of ATP-driven proton pumps. Physiol. Rev. 69:165-196.
- Francois, J., Eraso, P. and Gancedo, C. 1987. Changes in the concentration of c-AMP, fructose 2,6-biphosphate and related metabolites and enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* during growth on glucose. Eur. J. Biochem. 164:369-373.
- Gaber, R.F., Styles, C.A. and Fink, G.R. 1988. *TRK1* encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 8:2848-2859
- Gancedo, C. and Serrano, R. 1989. Energy yielding metabolism. In *The yeast*, second edition (de. A.H. Rose and J.S. Harrison), vol. 3, p.205. Academic Press, New York.
- Ghislain, M., Schlessler, A. and Goffeau, A. 1987. Mutation of a conserved glycine residue modifies the vanadate sensitivity of the plasma membrane H⁺-ATPase for *Schizosaccharomyces pombe*. J. Biol. Chem. 262:17549-17555.
- Gluck, S.L. 1992. V-ATPases of the plasma membrane. J. Exp. Biol. 172:29-37.
- Gluck, S.L., Nelson, R.D., Lee, B.S., Wang, Z-Q, Guo, X, Fu, J.Y. and Zhang, K. 1992. Biochemistry of renal V-ATPases. J. Exp. Biol. 172:219-229.
- Guthrie, B.A. and Wickner, W. 1988. Yeast vacuoles fragment when microtubules are disrupted. J. Cell Biol. 107:115-120.
- Guyton, A.C. 1987. Fisiología Humana. Edt. Interamericana. 6a. ed. México.
- Goffeau, A. and Slayman, C.W. 1981. The proton translocating ATPase of the fungal plasma membrane. Biochim. Biophys. Acta 639:197-223

- Griffin, D.H. 1994. Fungal Physiology. 2nd. Wiley-Liss, New York. 458 p.
- Grinstein, S., Nanda, A., Lukacs, G. and Rotstein, O. 1992. V-ATPases in phagocytic cells. *J. Exp. Biol.* 172:179-192
- Gutknecht, J., Tosteson, D.C. 1973. Diffusion of weak acids across lipid bilayer membranes: Effects of chemical reactions in the unstirred layers. *Science* 182:1258-1260.
- Hager, K.M., Mandala, S.M., Davenport, J.W., Speicher, D.W., Benz, E.J. and Slayman, C.W. 1986. Amino acid sequence of the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa* : deduction from genomic and cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 83:7693-7697.
- Harold, F. 1986. The Vital Force: a study of bioenergetics. W.H. Freeman and Company. USA. 577 pp.
- Harvey, B.J. 1992. Energization of sodium absorption by the H⁺-ATPase in mitochondria-rich cells of frog skin. *J. Exp. Biol.* 172:289-309.
- Haworth, R.S. and Fliegel, 1993. Intracellular pH in *Schizosaccharomyces pombe* comparison with *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biochem.* 124:131-140
- Henry, R.P. 1996. Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. *Ann. Rev. Physiol.* 58:523-538
- Hill, K.L., Catlett, N.L. and Weisman, L.S. 1996. Actin and myosin function in directed vacuole movement during cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* 135:1535-1549
- Höfer, M., Calahorra, M., Klein, B. and Peña, A. 1996. Assesment of $\Delta\mu_{H^+}$ in *Schizosaccharomyces pombe*; intracellular inclusion of impermeable agents by electroporation. *Folia Microbiologica* 41:98-100
- Hubbard, M.J., Sullivan, P.A and Sheperd, M.G. 1985. The kinetics and divalent cation inhibition of plasma membrane ATPase in the yeast *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 260:6782-6787.
- Hubbard, M.J., Surarif, R., Sullivan, P.A. and Sheperd, M.G. 1986. The isolation of plasma membrane and characterisation of plasma membrane ATPase from the yeast *Candida albicans*. *Eur. J. Biochem.* 154:375-381
- Kane, P.M., Yamashiro, C.T. and Stevens, T.H. 1989. Biochemical characterization of the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 264: 19236-19244.

- Kane, P.M. and Stevens, T.H. 1992. Subunit composition, biosynthesis and assembly of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24:383-393.
- Kano, K. and Fendler, J.H. 1978. Pyranine as a sensitive pH probe for liposome interiors and surfaces. *Biochim. Biophys. Acta* 509:289-299
- Karnowski, M.J. 1965. Formaldehyde-glutaraldehyde fixative at high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27:137-142
- Ketchum, K.A., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K. and Goldstein, S.A.N. 1995. A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376:690-695.
- Klionsky, D.J., Herman, P.K., and Emr, S.D. 1990. The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* 54:266-292.
- Ko, C.H. and Gaber, R.F. 1991. *TRK1* and *TRK2* encode structurally related K^+ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 125:305-312.
- Ko, C.H., Liang, H, and Gaber, R.F. 1993. Roles of multiple glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 13:638-648
- Kotyk, A. and Slavik, J. 1989. Intracellular pH and its measurement. Boca Raton, Florida, CRC Press. 182 p.
- Lehninger, A.L. 1985. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. Ediciones Omega. 2da. Edición. Barcelona. 1117 pp.
- Legerton, T.L., Kanamori, K., Weiss, R.L. and Roberts, J.D. 1983. Measurement of cytoplasmic and vacuolar pH in *Neurospora* using nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 22:899-903
- Lichko, L.P., Okorokov, L.A. 1985. What family of ATPases does the vacuolar H^+ -ATPase belong to? *FEBS Lett.* 187:349-353.
- López, R., Enríquez, E. and Peña, A. 1999. Effects of weak acids on cation accumulation, ΔpH and $\Delta \psi$ in yeast. *Yeast*, 15:553-562.
- Mandara, S. and Taiz, L. 1985. Partial purification of a Tonoplast ATPase from Corn Coleoptiles. *Plant. Physiol.* 78:327-333.
- Mathieu, Y., Guern, J., Kurkdjian, A., Manigault, P., Manigault, J., Zielinska, T., Gillet, B., Beloeil, J-C. and Lallemand, J-Y. 1989. Regulation of vacuolar pH of plants cells. I. Isolation and properties of vacuoles suitable for ^{31}P NMR studies. *Plant. Physiol.* 89:19-26

- Matile, P. 1978. Biochemistry and function of vacuoles. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 29:193-213.
- McDonald, J.I.S and Weeks, G. 1984. A plasma membrane Mg^{2+} -ATPase intracellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 235:1-7
- Mellman, I., Fuchs, R. and Helenius, A. 1986. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Ann. Rev. Biochem.* 55:663-700
- Miller, J.J. Sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. In *The Yeasts. Metabolism and physiology of yeasts. Second Edition, Vol. 3.* Edit. A.H. Rose and J.S. Harrison. Academic Press, San Diego, 1989, pag. 496.
- Miranda, M., Ramírez, J., Peña, A. and Coria, R. 1995. Molecular cloning of the plasma membrane H^+ -ATPase from *Kluyveromyces lactis*: a single nucleotide substitution in the gene confers ethidium bromide resistance and deficiency in K^+ uptake. *J. Bacteriol.* 177:2360-2367.
- Mitchell, P. 1968. Chemiosmotic coupling and energy transduction. Glynn Research, Bodmin Cornwall, Ltd. UK
- Monk, B.C., Kurtz, M.B., Marrinan, J. and Perlin, D.S. 1991. Cloning and characterization of the plasma membrane H^+ -ATPase from *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 173: 6826-6836.
- Nakamoto, R.K. and Slayman, C.W. 1989. Molecular properties of the fungal plasma-membrane H^+ -ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 21:621-632.
- Nass, R. y Rao, R. 1998. Novel localization of a Na^+/H^+ exchanger in a late endosomal compartment of yeast. Implications for vacuole biogenesis. *J. Biol. Chem.* 273:21054-21060.
- Nelson, N. 1988. Structure, function and evolution of proton-ATPases. *Plant Physiol.* 86:1-3
- Nelson, N. 1992 a. The vacuolar H^+ -ATPase- one of the most fundamental ion pumps in nature. *J. Exp. Biol.* 172:19-27.
- Nieuwenhuis, B.J.W.M, Weijers, C.A.G.M. and Borst-Pauwels, G.W.F.H. 1981. Uptake and accumulation of Mn^{2+} and Sr^{2+} in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 649: 83-88
- Numata, M., Petrecca, K., Lake, N. y Orłowski, J. Identification of a mitochondrial Na^+/H^+ exchanger. 1998. *J. Biol. Chem.* 273:6951-6959.

- Ohkuma, S. and Poole, B. 1978. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 3327-3331
- Okorokov, L.A., Lichko, L.P., and Kulaev, I.S. 1980. Vacuoles: main compartments of potassium, magnesium and phosphate ions in *Saccharomyces carlsbergensis* cells. *J. Bacteriol.* 144:661-665
- Peña, A., Cinco, G., García, A., Gómez Poyou, A. and Tuena, M. 1967. Effects of externally added sodium and potassium ions on the glycolytic sequence of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 148: 673-682.
- Peña, A., Cinco, G., Gómez Poyou A. and Tuena, M. 1969. Studies on the mechanism of the stimulation of glycolysis and respiration by K^+ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 180:1-8
- Peña, A., Cinco, G., Gómez-Poyou, A., and Tuena, M. 1972. Effect of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 153:413-425.
- Peña, A., 1975. Studies on the mechanism of K^+ transport in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 167:397-407.
- Peña, A., Ramírez, J., Rosas, G., and Calahorra, M. 1995. Proton pumping and the internal pH of yeast cells, measured with pyranine introduced by electroporation. *J. Bacteriol.* 177:1017-1022.
- Pogge-von Strandmann, R., Kay, R.R and Dufour, J.P. 1984. An electrogenic proton pump in plasma membranes from the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Lett.* 175:422-428.
- Preston, R.A., Murphy, R.F., and Jones, E.W. 1989. Assay of vacuolar pH in yeast and identification of acidification-defective mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7027-7031
- Ramette, R.W. 1983. *Equilibrio y Análisis Químico*. Edt. Fondo Educativo Interamericano. México, pp.791.
- Ramírez, J., Peña, A and Montero, M. and. 1996. H^+/K^+ exchange in reconstituted yeast plasma membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1285:175-182
- Ramírez, J., Ramírez, O., Saldaña, C., Coria, R., Peña, A. 1998. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a K^+/H^+ exchanger. *J. Bacteriol.* 180:5860-5865

- Ramos, J., Contreras, P. and Rodríguez-Navarro, A. 1985. A potassium transport mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Microbiol. 143:88-93.
- Ramos, S., Balbín, M., Raposo, M., Valle, E. and Pardo, L.A. 1989. The mechanism of intracellular acidification induced by glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gral. Microbiol. 135: 2413-2422
- Ramos, J. Alijo, R., Haro, R. and Rodríguez-Navarro, A. 1994. TRK2 is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 176:249-252.
- Rodríguez-Navarro, A. and Ramos, J. 1984. Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 159:940-945.
- Roomans, G.H., Theuvenet, A.P.R., Van den Berg, Th.P.R., and Borst-Pauwels, G.W.F.H. 1979. Kinetics of Ca^{2+} and Sr^{2+} uptake by yeast. Biochim. Biophys. Acta 551:187-196
- Sanders, D. and Slayman, C.L. 1982. Control of intracellular pH. Predominant role of oxidative metabolism, not proton transport, in the eukariotic microorganism *Neurospora*. J. Gen. Physiol. 80:377-402.
- Sanders, D., Davies, J.M., Rea, P.A., Brosnan, J.M. and Johannes, E. 1992. Transport of H^+ , K^+ and Ca^{2+} at the vacuolar membrane of plants. Society for Experimental Biology Seminar Series 50: Plant Organelles, ed. A.K. Tobin. Cambridge University Press, pp. 169-88.
- Scarborough, G.A. 1977. Properties of the *Neurospora crassa* Plasma membrane ATPase. Arch. Biochem. Biophys. 180:384-393.
- Schachtman, D.P. and Schroeder, J.I. 1994. Structure and transport mechanism of a high affinity potassium uptake transporter from higher plants. Nature 370: 655-658.
- Schneider, D.L. 1987. The proton pump ATPase of lysosomes and related organelles of the vacuolar apparatus. Biochim. Biophys. Acta 895:1-10.
- Schwencke, J. 1991. Vacuoles, Internal Membranous Systems and Vesicles. The Yeast, Rose A.H. and Harrison, J.S. Vol. 4, 2nd. Edition. Academic Press. pp. 347-431.
- Serrano, R. 1980. Effect of ATPase inhibitors on the proton pump of respiratory-deficient yeast. Eur. J. Biochem. 105:419-424.
- Serrano, R. 1983. *In vivo* glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. FEBS Lett. 156:11-14
- Serrano, R. 1984. Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel type of proton pump. Curr. Top. Cell. Reg. 23: 87-126.

Serrano, R., Kielland-Brandt, M.C., and Fink, G.R. 1986. Yeast Plasma Membrane ATPase is essential for growth and has homology with $(\text{Na}^+\text{+K}^+)$, K^+ and Ca^{2+} ATPase. *Nature* 319:689-693

Serrano, R. and Portillo, F. 1990. Catalytic and regulatory sites of yeast plasma membrane H^+ -ATPase studied by directed mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1018: 195-199.

Serrano, R., 1991. Transport across yeast vacuolar and plasma membranes. In *The Molecular and Cellular Biology of the yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis and Energetics*. Vol.1, p.523. Cold Spring Harbor Lab. Press.

Seto-Young, D. and Perlin, D.S. 1991. Effect of membrane voltage on the plasma membrane H^+ -ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 266 1383-1389.

Slavik, J. 1994. *Fluorescent probes in cellular and molecular biology*. Boca Raton, CRC Press, Inc. USA. 295 p.

Stevens, T.H. 1992. The structure and function of the fungal V-ATPase. *J. Exp. Biol.* 172:47-55.

Stone, D.K., Crider, B.P., Südhof, T.C. and Xie, X. 1989. Vacuolar proton pumps. *J. Bioenerg. Biomembr.* 21:605-620.

Sze, H. 1985. H^+ -translocating ATPases: advances using membrane vesicles. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36:175-208.

Sze, H., Ward, J.M. and Lai, S. 1992. Vacuolar H^+ -translocating ATPases from plants: structure, function and isoforms. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24: 371-381.

Theveleín, J.M. 1994. Signal Transduction in Yeast. *Yeast* 10: 1753-1790.

Uchida, E., Ohsumi, Y., and Anraku, Y. 1988a. Purification of yeast vacuolar membrane H^+ -ATPase and enzymological discrimination of three ATP-driven proton pumps in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* 157: 544-562.

Uribe, S., Sánchez, N., and Peña, A. 1991. Effects of K^+ and other monovalent cations on yeast mitochondria. *Biochem. Int.* 24:615-624.

Vidal, M., Buckley, A.M., Hilger, F. and Gaber, R.F. 1990. Direct selection for mutants with increased K^+ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 125:313-320.

Wada, Y. and Anraku, Y. 1994. Chemiosmotic coupling of ion transport in the yeast vacuole: its role in acidification inside organelles. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26:631-637

Wadsworth, S.J. and van Rossum, G.D.V. 1994. Role of vacuolar adenosine triphosphatase in the regulation of cytosolic pH in hepatocytes. *J. Membrane Biol.* 142:21-34

Weisman, L.S. and Wickner, W. 1988. Intervacuole exchange in the yeast zygote: a new pathway in organelle communication. *Science* 241:589-591.

Wiemken, A., Matile, P. and Moor, H. 1970. Vacuolar dynamics in synchronously budding yeast. *Arch. Mikrobiol.* 70:89-103