

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina

LOS ANTIBIOTICOS TRANSPORTADORES DE IONES.  
MODELOS DE ACARREADORES IONICOS EN MEMBRANAS  
TRANSDUCTORAS DE ENERGIA.

Sergio Estrada-O.

Tesis presentada al profesorado de la Escuela de Graduados  
en Bioquímica, U.N.A.M., para obtener el Grado de Doctor  
en Ciencias especialidad de Bioquímica.

1972  
MEXICO



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Sección II: Los antibióticos carboxílicos como instrumentos en el estudio de los mecanismos de translocación concertada de cationes divalentes y fosfato a través de la membrana mitocondrial.

Introducción . . . . .	
Resultados . . . . .	
Discusión y Conclusiones . . . . .	

Sección III. Regulación por nucleótidos de la selectividad iónica de antibióticos ionoforéticos en la membrana mitocondrial.

Introducción . . . . .	
Resultados: Efectos del ATP y los substratos	
Oxidables en la selectividad iónica de la nigericina . . . . .	
Efecto del fosfato inorgánico en la selectividad iónica de la nigericina . . . . .	
Efecto del fosfato y el succinato en la selectividad iónica de la dianemicina . . . . .	
Efecto de nucleósidos mono-, di- y trifosfato en la selectividad iónica de nigericina dependiente de ATP . . . . .	
Efecto del ITP y el UTP en la actividad de ATPasa y en la translocación de fosfato energizada por ATP . . . . .	
Efecto de nucleótidos en la fluorescencia de bromuro de etidio en membranas mitocondriales . . . . .	
Discusión y conclusiones.	
Los flujos de aniones y protones regulan la selectividad catiónica de antibióticos carboxílicos . . . . .	
Papel regulador de los nucleótidos en la translocación selectiva de cationes a través de la membrana mitocondrial . . . . .	
Efectos de nucleótidos en la fluorescencia de bromuro de etidio y en la selectividad iónica de la membrana mitocondrial. . . . .	

Sección II: Los antibióticos carboxílicos como instrumentos en el estudio de los mecanismos de translocación concertada de cationes divalentes y fosfato a través de la membrana mitocondrial.

Introducción . . . . .	
Resultados . . . . .	
Discusión y Conclusiones . . . . .	

Sección III. Regulación por nucleótidos de la selectividad iónica de antibióticos ionoforéticos en la membrana mitocondrial.

Introducción . . . . .	
Resultados: Efectos del ATP y los substratos Oxidables en la selectividad iónica de la nigericina . . . . .	
Efecto del fosfato inorgánico en la selectividad iónica de la nigericina . . . . .	
Efecto del fosfato y el succinato en la selectividad iónica de la dianemicina . . . . .	
Efecto de nucleósidos mono-, di- y trifosfato en la selectividad iónica de nigericina dependiente de ATP . . . . .	
Efecto del ITP y el UTP en la actividad de ATPasa y en la translocación de fosfato energizada por ATP . . . . .	
Efecto de nucleótidos en la fluorescencia de bromuro de etidio en membranas mitocondriales . . . . .	
Discusión y conclusiones.	
Los flujos de aniones y protones regulan la selectividad catiónica de antibióticos carboxílicos . . . . .	
Papel regulador de los nucleótidos en la translocación selectiva de cationes a través de la membrana mitocondrial . . . . .	
Efectos de nucleótidos en la fluorescencia de bromuro de etidio y en la selectividad iónica de la membrana mitocondrial. . . . .	

## RESUMEN

Se presentan evidencias experimentales sobre la utilidad de los antibióticos transportadores de iones (algunos de ellos denominados ionóforos) en el reconocimiento y comprensión de los mecanismos a través de los cuales se lleva a cabo la translocación de iones mono y divalentes, así como de metabolitos polares a través de la membrana mitocondrial. Dichos experimentos se hicieron con el propósito adicional de reconocer la relación existente entre el transporte de iones inducido o modulado por los antibióticos antes mencionados y el mecanismo de la fosforilación oxidativa mitocondrial.

Posterior a relatar en la sección de Introducción de la presente tesis, las propiedades de los antibióticos transportadores de iones en membranas transductoras de energía y con el propósito de facilitar su evaluación y discusión individual, la información experimental se presenta en cuatro secciones o capítulos, a saber: I. Los antibióticos carboxílicos como instrumentos en el estudio de los mecanismos de translocación de aniones (ácidos dicarboxílicos y fosfato) a través de la membrana mitocondrial; II. Los antibióticos carboxílicos, como instrumentos en el estudio de los mecanismos de translocación concertada de cationes divalentes y fosfato a través de la membrana mitocondrial; III. La regulación por nucleótidos de la selectividad iónica de antibióticos ionoforéticos en la membrana mitocondrial y IV. La translocación de --

iones catalizada por metabolitos microbianos, como modelo de transporte de iones en membranas biológicas.

Respecto al capítulo I de la presente disertación, se estudian diversas condiciones experimentales en las cuales el transporte de  $K^+$  y protones catalizados por el antibiótico carboxílico monensina A, perturba e inhibe la translocación y oxidación de los iones dicarboxílicos - glutamato, malato,  $\alpha$ -cetoglutarato y piruvato sin afectar la del succinato o el  $\beta$ -hidroxibutirato. Dichos efectos se estudiaron a concentraciones de aniones denominadas "a saturación", en los cuales la concentración del anión no es un factor limitante a la penetración de los mismos al interior de la mitocondria. En las mismas condiciones experimentales se estudian los efectos del transporte de potasio y protones, así como los de los aniones dicarboxílicos antes mencionados con respecto a la translocación de fosfato denominada "activa" o dependiente de energía. Se establece que, en contra de corrientes de pensamiento previas a estos hallazgos, la translocación de aniones ácido dicarboxílicos y fosfato es independiente de los potenciales generados por el transporte de  $K^+$  en la membrana mitocondrial. Se considera probable que la translocación de aniones sea consecuencia de mecanismos específicos disparados por los potenciales transmurales asociados a la distribución asimétrica de protones a ambos lados de la membrana. También se intenta racionalizar una posible participación de procesos de intercambio anión-anión en la regulación

del transporte de  $K^+$ , de los movimientos de fosfato y de la incorporación de Pi en ATP.

En el capítulo II del presente manuscrito se demuestra un proceso novel descrito por primera vez en la literatura de fenómenos de transporte en membranas biológicas y artificiales. Esto es, se hace evidente que los antibióticos carboxílicos del tipo de la nigericina, la dianemicina, la monensina y los compuestos Lilly-A217 y X-537A estimulan el transporte de calcio a través de la membrana mitocondrial en un proceso que requiere energía de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Este fenómeno requiere de una previa limitación en la acumulación de  $Ca^{2+}$  causada por fosfato inorgánico en presencia de un substrato oxidable. Asociado a la penetración de  $Ca^{2+}$  existe un aumento paralelo en la translocación de fosfato inorgánico. El  $\beta$ -hidroxibutirato es el único substrato capaz de donar energía para el fenómeno de transporte de  $Ca^{2+}$  inducido por antibióticos. Además, el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa asociado a la acumulación de  $Ca^{2+}$  es transformado por los antibióticos inductores de transporte en bien definidas transiciones de estado III a estado IV que reflejan el acoplamiento de la transferencia con la conservación de energía causado por los antibióticos. Se propone que los antibióticos carboxílicos estimulan transporte electroforético de  $Ca^{2+}$  al interior de la mitocondria al facilitar el flujo de protones en presencia del catión divalente, lo cual genera un potencial intramembrau

nal negativo que estimula el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en favor del potencial eléctrico. Asimismo, se considera que el "acoplamiento energético" inducido por los antibióticos ionóforos en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , se debe a la prevención del influjo neto de protones al interior de la mitocondria causado por estos compuestos junto con el  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual aumenta la duración y el valor negativo del potencial intramembranal.

La sección III de la tesis señala que el transporte de iones inducido por pares de antibióticos ionóforos, uno de ellos que mueve iones en contra (valinomicina o monazomicina) y otro en favor del gradiente químico de concentración de iones (nigericina o dianemicina) es un modelo experimental de gran interés para comprender la regulación de un proceso de transporte por nucleótidos. En este capítulo se describe el requerimiento de ATP para inducir una especificidad para el  $\text{K}^+$  al eflujo de catión monovalente catalizado por la nigericina en la mitocondria. La dianemicina requiere de ATP + succinato para inducir eflujo de  $\text{K}^+$  y no de  $\text{Li}^+$ . Se concluye que los movimientos de protones que acompañan a la translocación del fosfato liberado del ATP, pero no directamente el nucleótido, son el factor que hace aparente la selectividad por  $\text{K}^+$  de la nigericina o la dianemicina. Por otro lado, se demuestra que el ADP, un análogo fosfónico del ATP y diferentes nucleósidos mono-, di- y trifosfatos de uridina, guanosina, citosina, timidina e inosina revierten la acción del ATP



para facilitar la selectividad por  $K^+$  de la nigericina. Estas observaciones permiten proponer un modelo del control de la selectividad iónica de un acarreador móvil por medio de los nucleótidos, en donde estas últimas estructuras participan a través de un mecanismo regulador independiente de su clásica acción de aceptores de fosfato en la fosforilación oxidativa.

Finalmente, la sección IV de la presente disertación describe las propiedades del transporte de iones inducido independientemente por los antibióticos monazomicina y H-537A, así como la relación que guarda la fenomenología de transporte con la fosforilación oxidativa mitocondrial. Respecto al antibiótico monazomicina, se propone que la estimulación del movimiento de iones así como el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa por él causados, es consecuencia de transiciones cooperativas en las cuales el ensamble de varios monómeros de monazomicina constituye un oligómero conductor con características de túnel conductor y no de acarreador móvil. El ensamble de los monómeros estaría controlado por las variaciones del potencial de membrana así como por cationes, aniones y protones. Esta es la primera evidencia experimental en la literatura de un proceso cooperativo de transporte inducido en membranas biológicas. Con respecto al acarreador móvil compuesto X-537A, se hace evidente su capacidad para inhibir la oxidación de substratos pero no la hidrólisis de ATP asociadas al flujo de cationes estimulado por

una amplia variedad de conductores de iones en la membrana mitocondrial. Esta demostración experimental conduce a proponer que la translocación de protones o la formación de complejos con cationes divalentes por parte del compuesto X537-A hace evidente que la ATPasa membranal o bien el transporte de nucleótidos (ATP, ADP, AMP) están regulados discriminativamente por el  $\text{Ca}^{++}$  o por los flujos de protones con respecto a los de cationes monovalentes.

## INTRODUCCION

En años recientes el investigador en Biología Experimental ha adquirido conciencia de la participación central de numerosas barreras membranales lipoprotéicas, en la regulación del metabolismo celular. Una de varias funciones importantes de las membranas de la célula y sus partículas subcelulares es el control del paso de metabolitos polares a través de los microcompartimientos funcionales de la misma. La translocación selectiva de iones y metabolitos polares, constituye no sólo un medio de favorecer la penetración discriminativa de nutrientes al interior de la célula, sino que permite la distribución asimétrica de cargas eléctricas a ambos lados de las membranas y por tanto favorece la generación rápida de potenciales eléctricos. Numerosas comunicaciones recientes sugieren que la presencia de potenciales eléctricos microscópicos de membrana, está estrechamente asociada al mecanismo íntimo de la conducción nerviosa (Hodgkin & Huxley, 1952) la fotofosforilación y la

fosforilación oxidativa (Mitchell, 1966, 1968) la conducción del impulso visual (Brindley, 1960; Wald, 1968) etc. Es entonces conveniente tener un conocimiento adecuado de la naturaleza molecular de los fenómenos de transporte de iones en membranas biológicas o artificiales, con el propósito de entender su participación en el control de los procesos antes citados.

El descubrimiento de los antibióticos ionofóricos y de sus efectos en el transporte de iones en membranas biológicas (Pressman 1965, Lardy, 1965, -- Estrada-O., 1967) abrió una nueva etapa en el estudio de los fenómenos de transporte a nivel molecular. -- Inicialmente el grupo de B. Pressman en la Universidad de Pennsylvania demostró que el antibiótico valinomicina, conocido hasta entonces como desacoplante de la fosforilación oxidativa (McMurray y Regg, 1959), transportaba potasio a través de la membrana mitocondrial y en contra de un gradiente de concentración (Pressman, 1963, 1965; Moore & Pressman, 1964; Hoffer & Pressman, 1966; Harris, Hoffer & Pressman, 1967 a; Harris Cautlin & Pressman, 1967b). Poco tiempo después

de la introducción del antibiótico valinomicina se demostró que otros antibióticos como la gramicina - (Chappell & Crofts, 1965, 1966; Harris y Col., 1967a) así como los macrotetrálicos análogos de la nonactina (Graven, Lardy, Johnson & Rutter, 1966; Graven, Lardy & Rutter, 1966c; Graven, Lardy & Estrada-O., 1967; Harris et al., 1967a) y las eniatinas (Lardy, Graven & Estrada-O., 1967) tenían esencialmente los mismos efectos de la valinomina aunque diferían en su selectividad iónica. Estos antibióticos, inicialmente estudiados en membranas mitocondriales, fueron posteriormente estudiados en el transporte de iones de -- membrana de Streptococcus faecalis (Harold & Baarda, 1967), de células intactas de tumor de ascitis (Levinson, 1967) de cloroplastos (Shavit, Dilley & San Pietro, 1967; Packer, 1967) de bacterias fotosensibles como el Rhodospirillum rubrum (Thore, Keister, Shavit & San Pietro, 1968; Jackson, Crofts & Von Stedingk, -- 1960), de eritrocitos (Chappell y Crofts, 1966) y de modelos de membranas lipídicas artificiales como las mesofases sméticas (Chappell & Haarhoff, 1967;

Henderson, McGivan & Chappell, 1969) o las membranas bimoleculares lipídicas (Mueller & Rudin, 1967; Lev & Buzhinsky, 1967; Andreoli, Tiefferberg & Tosteson, 1967; Eisenman, 1967). Se han propuesto dos teorías principales para racionalizar el posible modo de acción de estos compuestos en los procesos de transporte de iones de membranas transductoras de energía. La una, defendida por Pressman, Harris, Jagger y Johnson (1967), considera que los antibióticos anteriores inducen un aumento de la permeabilidad a cationes en las membranas lipídicas en general, pero que en la membrana mitocondrial los compuestos del tipo de la valinomicina interactúan de modo preferente con una bomba de cationes natural de membrana. La otra teoría, propuesta por Mitchell (1966) sugiere que los antibióticos del tipo de la valinomicina transportan iones a través de membranas lipídicas, incluyendo a la mitocondrial, actuando como acarreadores móviles sensibles al gradiente electroquímico de iones, sin interactuar con bombas o translocadores naturales de membrana. En otras palabras se ha propuesto la interacción del acarreador

con los lípidos de membrana y estando orientado en serie con otros intercambiadores de iones (Pressman 1967) o bien su ensamble en la membrana con orientación en paralelo respecto a otros posibles translocadores de iones de superficie (Mitchell 1966, 1968).

A mediados de 1966, en estudios encabezados por el autor del presente trabajo y con la colaboración de S. Craven y Henry A. Lardy, se observó que el anti-biótico nigericina descrito en 1958 por Lardy, Johnson & McMurray como inhibidor de la fosforilación oxidativa con algunos substratos y no con otros, estimulaba ATPasa mitocondrial sólo en presencia de  $K^+$  (Estrada O., Craven y Lardy, 1967 a,b). Paralelamente a estas observaciones, se pudo también demostrar que el anti-biótico nigericina transportaba cationes monovalentes y protones a través de la membrana mitocondrial, contrarrestando o revirtiendo los efectos mediados por antibióticos del grupo de la valinomicina. (Craven, Estrada-O. & Lardy, 1966). Al descubrimiento de los interesantes efectos de este antibiótico, siguieron los de otros antibióticos monocarboxílicos similares

a él en algunos aspectos, tales como las monensinas A, B y C (Estrada-O., Rightmire & Lardy, 1967), la dianemicina, y los compuestos HLR-206 y HLR-537 (Lardy, Graven y Estrada-O., 1967; Lardy, Estrada-O., & Graven, 1967). Observaciones posteriores de Pressman, Jagger y Johnson (1967) indicaron que la nigericina transporta<sup>\*</sup>  $K^+$  en recambio por protones no sólo en membranas mitocondriales, sino también en las de eritrocito y en vesículas sinápticas. Estas observaciones plantearon la interesante posibilidad, posteriormente sugerida por Pressman (1968) y por Mitchell (1968) de que estos compuestos se comportaban como acarreadores móviles, en paralelo con translocadores, o intercambiadores  $Na^+/H^+$  o  $K^+/H^+$  de membrana. Originalmente y ante la ausencia de otras observaciones que posteriormente nos hicieron cambiar del todo nuestro punto de vista original, propusimos que los antibióticos del tipo de la nigericina estimulaban la hidrólisis de ATP en presencia de  $K^+$  (Estrada-O., Graven & Lardy, 1967E) al interaccionar selectivamente con un componente de la membrana mitocondrial que participaba en el probable



acoplamiento entre síntesis de ATP y transporte de  $K^+$ . Para explicar nuestros hallazgos, Pressman y Col. (1967) sugerían la alternativa de que la nigericina pudiera estimular ATPasa-dependiente de  $K^+$ , al interaccionar con la hipotética bomba de  $K^+$ , por medio de un mecanismo similar al de la valinomicina. Posteriormente a nuestras observaciones, el grupo de Shavit, Dilley y San Pietro (1967a,b) demostró que los efectos descritos por nuestro grupo en membranas mitocondriales, eran reproducidos por el antibiótico nigericina en membranas de cloroplastos. La nigericina resultó ser uno de los desacoplantes más potentes de la fotofosforilación en cloroplastos, con un muy elevado requerimiento de  $K^+$  para ejercer su acción. Resultados similares a los encontrados en cloroplastos, fueron observados con la nigericina en el mecanismo de fotofosforilación de bacterias fotosensibles como los fragmentos de membrana de cromatóforos de Rhodospirillum rubrum (Jackson y Col., 1968; Thore y Col., 1968). Packer (1967) realizó además la observación de que en las membranas de cloroplastos la nigericina

facilitaba el transporte de  $K^+$  en presencia de flashes luminosos. Shavit y San Pietro (1967) apoyan nuestra sugestión inicial, (Estrada-D., y Col. 1967b) de que el antibiótico interactuaba con un componente específico de membrana que estaba emparentado con la síntesis de ATP y el transporte de  $K^+$  en cloroplastos.

A las observaciones anteriores siguieron otras sobre los efectos de antibióticos del tipo de la nigericina en sistemas modelo de membranas (Henderson, McGiven & Chappell, 1968; Mueller & Rudin, 1969; Steinrauf 1970) que aparentemente reforzaron la sugestión (Mitchell, 1968) de que algunos antibióticos monocarboxílicos se comportaban como acarreadores móviles, eléctricamente silenciosos, en fases hidrófobas.

Con los datos antes expuestos se sugirió que existen dos grupos de acarreadores móviles de iones: uno de ciles, representado por el dipéptido neutro valinomina, (a este grupo pertenecen los análogos de la nonactina y las enia-

tinias) transportaría cationes monovalentes a través de fases lipídicas en forma de complejo con carga neta positiva, mientras que el otro grupo estaría representado por antibióticos aniónicos del tipo de la nigericina (a este grupo pertenecen la dianemicina, las monensinas y los compuestos HLR-206 y HLR-537) que transportaría  $K^+$  o protones a través de membranas en forma de complejo eléctricamente neutro. Los acarreadores sintéticos del tipo de los poliéteres macrocíclicos (Pedersen, 1968) pertenecerían al grupo de la valinomicina, ya que las observaciones de Lardy (1968) que sugerían un efecto de estos compuestos que aparentemente los clasificaba en el grupo de la nigericina, parecen explicarse por un mecanismo peculiar de estos compuestos diferente a lo propuesto por Lardy, (Estrada-O. y Cárabez, 1971) que será discutido en líneas posteriores. Un tercer grupo de acarreadores estaría representado por la alameticina (Mueller & Rudin, 1968) y la monazomicina (Mueller & Rudin, 1969; Estrada-O., y Gómez-Lojero, 1971), que identificaría a acarreadores biológicos que forman oligómeros conductores de iones que se ensamblan

membranas biológicas que al perturbar selectivamente la distribución de iones de modelos de membrana como la mitocondrial, secundariamente alteran sus mecanismos naturales de translocación de cationes, aniones y protones y consecuentemente sus valores de potencial electroquímico de membrana así como la operación de sus procesos de transducción energética. El presente trabajo tiene el propósito de demostrar: a) la utilidad de los antibióticos monocarboxílicos como instrumentos que nos permiten reconocer los mecanismos que regulan la translocación de aniones y cationes mono y divalentes a través de membranas biológicas como la mitocondrial; b) Algunos factores que regulan la selectividad iónica para el transporte de cationes monovalentes a través de membranas transductoras de energía y c) La probable asociación existente entre las propiedades de acarreadores iónicos del tipo de algunos metabolitos microbianos y poliéteres sintéticos con respecto a las de probables modelos de translocadores de iones ensamblados en membranas biológicas. Con la idea anterior dividiremos el presente trabajo en 4 secciones, a sa-

ber: I.- Los antibióticos carboxílicos como instrumentos en el estudio de los mecanismos de translocación de aniones en la membrana mitocondrial. II. Los Antibióticos carboxílicos como Instrumentos en el Estudio del Mecanismo de la Translocación concentrada de Cationes Divalentes y Fosfato en la membrana mitocondrial; III. La Regulación por Nucleótidos de la Selectividad Iónica de Acarreadores Móviles de cationes Monovalentes en Membrana Mitocondrial, y IV. Tránslocación de Iones catalizada por Metabolitos Microbianos como modelo de transporte de iones en Membranas Biológicas.

## MATERIALES Y METODOS

## MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO.

Aislamiento de mitocondrias. Se utilizaron mitocondrias aisladas de hígado de rata macho con peso aproximado de 150 g. separadas por el procedimiento descrito por Johnson y Lardy (1967). La única variante a este método fué el homogenizado inicial del tejido hepático en manitol 0.25 M-Sacarosa 0.08M y EDTA 1mM. Todos los pasos posteriores del método de separación de mitocondrias, de rutina se llevaron a cabo en medio libre de EDTA.

Preparación de Mitocondrias parcialmente depletadas de fosfato inorgánico endógeno. Se utilizó el procedimiento descrito por Estrada-O., y Calderón -- 1970 a) que consiste en incubar las mitocondrias -- provenientes de 1 gr. de tejido hepático húmedo en 5ml de un medio que contiene: 2mM Na-ADP, 2mM  $\beta$ -hidroxibutirato, 1mM Na EDTA, 10mM trietanolamina ( $\text{Cl}^-$ ) pH 7.4

y 0.25 M sacarosa a 30° por 10 minutos. Posteriormente las mitocondrias se sedimentan a 19,000 x g 10 minutos en 0.25 m. sacarosa + 0.08 m manitol. Por este tratamiento la mitocondria pierde aproximadamente 30% de su contenido original de fosfato (de 14.5 a 10  $\mu$ moles Pi/gr. de proteína).

Aislamiento de partículas submitocondriales so-  
picadas. Los fragmentos fosforilantes de membrana mitocondrial se obtuvieron por el método de Graven, - Lardy y Estrada-O., (1967). El procedimiento consiste en resuspender las mitocondrias en un volúmen de 2ml de agua bidestilada helada por volúmen de mitocondrias equivalentes a 1 gr de tejido hepático húmedo. La suspensión (12ml) se coloca en un vaso de precipitado de 30 ml y se somete a las vibraciones ultrasónicas emitidas por un sonicador Branson Modelo LS-75 en la intensidad (6) - aproximadamente 2 amperios- por 30 segundos. La suspensión obtenida se centrifuga a 25,000 x g por 10 minutos. La fracción sobrenadante a su vez se recentrifuga a 100,000xg por 45 minutos. La pastilla gelatinosa recuperada en el fondo del tubo se resuspende en agua bidestilada en un volúmen de 1ml/gr de hígado original.

PARAMETROS EXPERIMENTALES MEDIDOS.

Cuantificación de movimientos rápidos de cationes monovalentes y protones, de consumo de oxígeno y de cambios de dispersión de la luz en suspensiones mitocondriales.

Estos experimentos se llevaron a cabo por medio de un aparato diseñado y construido por Chance, Mayer, Pressman y Graham (Pressman, 1965, 1967; Graven, Estrada O., y Lardy, 1966; Estrada-O., y Col. 1970 a, b. 1971a) que simultáneamente detecta y registra cambios rápidos en la concentración de  $O_2$ ,  $H^+$ ,  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Rb^+$  o  $Cs^+$  así como variaciones en la absorción de luz del medio. Las variaciones en la dispersión lumínica de suspensiones mitocondriales fueron registradas a 520 m $\mu$  y a un ángulo de 120°. Los cambios en la concentración de  $H^+$  se midieron con un electrodo de cristal único de combinación Beckman Modelo 39030. Los de  $Na^+$  y  $Li^+$  con un electrodo Beckman de cristal modelo 39046 y los de  $K^+$ ,  $Rb^+$  y  $Cs^+$  con un electrodo también Beckman modelo 39047. Los electrodos se acoplaron a potenciómetros Radiometer modelo 22 pH meter y estos a amplifica-



dores contruídos ad hoc. La concentración de oxígeno se cuantificó por medio de un electrodo vibrátil de platino cubierto de colodión con electrodo de referencia de calomel. Después de una amplificación conveniente, lograda por medio de amplificadores independientes, los datos experimentales fueron registrados por medio de un graficador Honeywell-Visicorder 1508 de 6 canales. La cubeta de incubación (5 ml) se mantuvo a 28° por medio de una camisa metálica acoplada a un baño a temperatura constante.

Quantificación de la Incorporación de  $^{32}\text{P}_i$  en/ATP.

El ortofosfato marcado con  $^{32}\text{P}$  Pi fué aislado de otros compuestos orgánicos que contienen fosfato por el método de Martin & Doty (1947) modificado por Falcone y Witonsky (1964). En los experimentos en los que se midió el recambio de ( $^{32}\text{P}$ ) Pi entre el fosfato inorgánico y el ATP en ausencia de substratos oxidables, las velocidades de recambio se corrigieron de la existencia de probable reciclaje (Boyer, y Col., 1956) bajo la suposición de que sólo el fosfato terminal del ATP se recambia libremente con el ortofosfato del medio.

Cuantificación de la acumulación total de  $Ca^{2+}$  y  
Ortofosfato en la mitocondria.

En las condiciones descritas por Estrada-O., y Calderón (1970a), se incubaron mitocondrias en 2ml. de mezcla de reacción. Después de 5 minutos de incubación a  $30^{\circ}$  se extrajo 1 ml. del medio y se depositó con cuidado en la superficie de una solución 0.83M de sacarosa helada contenida en tubos de centrífuga Beckman L-2 (cabezal No. 30) separándose las mitocondrias como ha sido descrito por Pressman, (1958) y Brierley y Col. (1963). Después de la adición de ácido tricloroacético al 5%, el ortofosfato se extrajo del medio por el procedimiento de Falcone y Witonsky (1964) y se midió en la fase orgánica por su radiactividad cuando se utilizó ( $^{32}P$ ) Pi o bien químicamente por el método de --- Martin y Doty (1947) modificado por Lindberg y Ernster (1965). El ( $^{45}Ca$ )- $Ca^{2+}$  acumulado en la mitocondria se cuantificó por medio de su radiactividad en la fase -- acuosa del medio de extracción de Falcone y Witonsky (1964).

Cuantificación de la fosforilación oxidativa y de la actividad de Adenosintrifosfatasa mitocondrial.

La fosforilación oxidativa mitocondrial se midió manométricamente por el procedimiento original de Lardy y Wellman (1952). La actividad de ATPasa se midió por el método de Lardy y Wellman (1953). El fosfato inorgánico se midió por el método de Sumner (1944).

Medida de reacciones de fluorescencia.

Los cambios de fluorescencia del bromuro de etidio se midieron como indican Estrada-O., Rubalcava y Gitler (1971) utilizando un espectrofotofluorómetro Farrand modificado con una fotocelda RCA-1-P21 cuya señal fué amplificada con un micro-microamperímetro Keithley y registrada con un graficador Honeywell.

Otros procedimientos Analíticos.

Las medidas de radiactividad se llevaron a cabo

por medio de un contador de flujo gaseoso Nuclear -- Chicago de fondo bajo equipado con ventana micromil. La proteína mitocondrial se cuantificó por el método de Lowry ( ).

Reactivos Utilizados.

El ( $^{32}\text{P}$ ) Pi utilizado se obtuvo de los laboratorios Volk Radiochemical Co. (Burbank, Calif.) o de Tracerlab (Waltham, Mass.). El ( $^{45}\text{Ca}$ )  $\text{Ca}^{2+}$  se obtuvo de Amersham-Searle Co. Las sales de tris o de  $\text{Na}^+$  de los nucleótidos utilizados se obtuvieron de Sigma Co., o de los Laboratorios F-L. Los antibióticos nigericina, dianemicina, monensinas A, B, C, valinomicina y compuestos HLR-206 y HLR 537 fueron un gentil donativo de los Dres. Henry A. Lardy (University of Wisconsin) y Dr. Marvin Gorman (The Eli Lilly Laboratories). El políeter macrocíclico XXVIII fué proporcionado por el Dr. E.J. Pedersen (Dupont de nemours, Delaware): el antibiótico monazomicina, idéntico al compuesto LLA-491 fué gentilmente proporcionado por los Dres. Henry A. Lardy y E.L.

Patterson (Lederle Laboratories). Todos los reactivos utilizados en el presente trabajo fueron de elevada calidad analítica, utilizándose agua tridestilada en vidrio para preparar todas las soluciones.

I

LOS ANTIBIOTICOS CARBOXILICOS COMO INSTRUMENTOS  
EN EL ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE TRANSLOCACION  
DE ANIONES A TRAVES DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL.

## INTRODUCCION

### A. MECANISMOS DE TRANSLOCACION DE ANIONES.

A la fecha se han llevado a cabo diferentes estudios para esclarecer el mecanismo a través del cual -- tanto los substratos oxidables como el fosfato inorgánico y otros aniones penetran a través de la membrana mitocondrial. Harris y Col. (1967 a,b) adelantaron la hipótesis de que la translocación aeróbica de aniones dependía de la estimulación del influjo de cationes y de la subsecuente neutralización de carga debida al influjo secundario de aniones. Mitchell (1966, 1968) propuso que la captación de un substrato aniónico se lleva a cabo en la membrana mitocondrial a través de un mecanismo de simport protón-anión donde la protonación de un ácido no-ionizado podría explicar su translocación a través de la membrana. En aparente apoyo a la hipótesis anterior, Palmieri & Quagliariello (1969) observaron que la expulsión de protones de la mitocondria se asociaba a la estimulación en la entrada de aniones y viceversa, que la inhibición del influjo de aniones, así

asociaba a la estimulación en la entrada de aniones y viceversa, que la inhibición del influjo de aniones, así como el eflujo de aniones endógenos, aparentemente era la consecuencia del influjo neto de protones. Harris y Manger (1968a,b) han sugerido que los substratos oxidables pueden transportarse a través de la membrana por medio de un proceso dependiente de energía que no es consumido por la translocación de cationes monovalentes. Es más, Mansford y Chappell (1968) han descrito condiciones donde la translocación de fosfato dependiente de energía ocurre en ausencia de acumulación neta de  $K^+$ .

Los resultados obtenidos previamente con antibióticos ionóforos neutros o carboxílicos sugirieron que la penetración primaria de cationes (Harris y Col., 1967 a,b) o bien la expulsión de protones (Palmieri & Quagliariello, 1969) podrían ser eventos primarios, seguidos en forma subsecuente por la entrada pasiva de aniones al interior de la mitocondria.

La información descrita en la presente sección de este manuscrito, obtenida a través de estudios realizados con el antibiótico monocarboxílico monensina A -- (Estrada-O., y Col., 1967 c) indica que la translocación



de concentraciones saturantes de algunos substratos -- oxidables y de fosfato inorgánico no es la consecuencia de un influjo inducido de cationes o un eflujo de protones. A la inversa, se hace aparente que en ciertas circunstancias, la penetración de fosfato dependiente de energía puede ser necesaria para la acumulación de cationes monovalentes. Estos datos experimentales sólo se hacen evidentes cuando el antibiótico ionóforo que transporta cationes monovalentes y protones es la monensina A. Observaciones adicionales de esta sección sugieren que la velocidad de incorporación de ( $^{32}\text{P}$ ) Pi en ATP depende en la mitocondria no sólo del transporte de fosfato inorgánico (Estrada-O., y Col. 1967 a,b; Lardy y Col., 1967) sino de la permeación o el recambio de substratos oxidables a través de un mecanismo independiente a movimientos previamente postulados de la poza móvil de cationes monovalentes o protones.

## RESULTADOS

Los experimentos siguientes, llevados a cabo con mitocondrias parcialmente depletadas de fosfato endógeno por ADP (ver métodos) proporcionan los siguientes resultados. La Figura 1 (A,B,C) demuestra que la oxidación de substratos como el glutamato + malato, así como el transporte acoplado de  $K^+$  inducido por monazomicina, depende absolutamente en dichas preparaciones de la presencia de fosfato inorgánico. Este requerimiento de fosfato, hecho evidente por la presencia del par monensina-monazomicina, no se había demostrado con anterioridad por la elevada concentración de fosfato mitocondrial endógeno y por haberse utilizado antibióticos ionóforos de  $K_D$  para el  $K^+$  muy baja, como es el caso de la nigericina (Pressman, 1968). Es aparente que sólo en el panel C de la Figura 1 (en donde existe glutamato + malato + fosfato) la monazomicina revierte por completo el eflujo de cationes en recambio por protón que induce la monensina. Como también se deduce de los resultados presentados en los paneles A y B de la Fig. 1, no parece existir un requerimiento de fosfato para el transporte de iones energizado por piruvato, citrato,  $\alpha$ -Ketogluta-

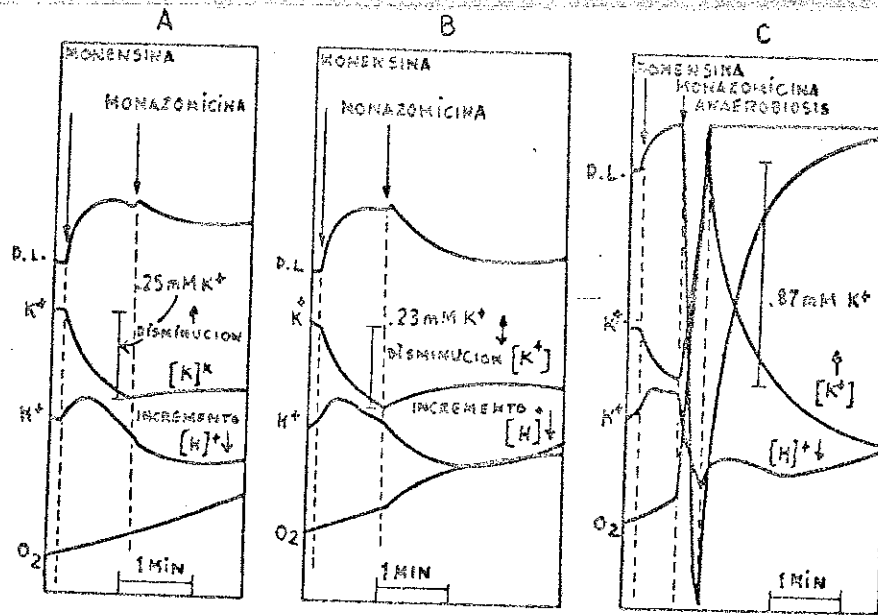


FIG. 1. Los efectos de la monensina, la monazomicina, y el fosfato o el acetato en la velocidad de oxidación del par glutamato + malato, los cambios de dispersión de la luz y el transporte de  $K^+$  y  $H^+$  en mitocondrias de hígado de rata. Una deflección del trazo de absorbancia de la luz (L.S.) hacia abajo, indica aumento de volumen de la mitocondria. La deflección hacia arriba del trazo de  $K^+$  o  $H^+$  indica entrada de estos iones al interior de la mitocondria. El medio contiene 10mM KCl, 1mM  $MgCl_2$ , 10 mM trietanolamina (HCl) pH 7.4, 180 mM sacarosa y mitocondrias equivalentes a 1.4mg N en 5 ml volumen a  $25^\circ$ . La concentración de monazomicina y monensina fué  $1.3 \times 10^{-7}$  y  $2 \times 10^{-7}$  respectivamente. Otras adiciones fueron: Panel A 10mM acetato y 10mM glutamato; Panel B, 4mM glutamato + 5mM L-malato y 10mM acetato; Panel C, 5mM glutamato + 5mM L-malato y 5mM fosfato (TEA). Mitocondrias parcialmente depletadas de Pi endógeno como se señala en métodos.

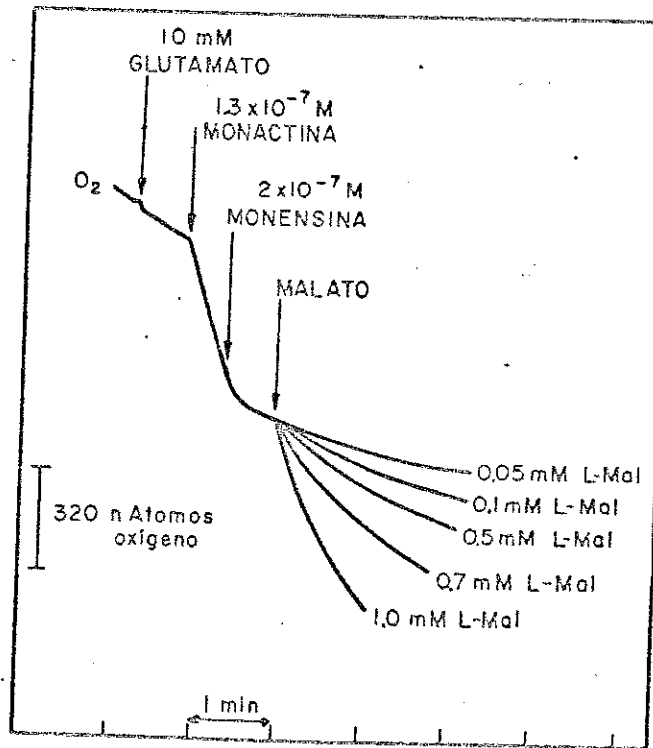


FIG. 2. Los requerimientos cuantitativos de L-malato para revertir la inhibición causada por la monensina en la oxidación de glutamato, previamente estimulada por la nonactina. La mezcla de reacción contiene 15mM KCl, 10mM glutamato (TEA), 1mM  $MgCl_2$ , 10mM trietanolamina (HCl) pH 7.4, 180mM sacarosa  $1.3 \times 10^{-7}$  M nonactina,  $2 \times 10^{-7}$  M nonactina,  $2 \times 10^{-7}$  M monensina y 2mg N mitocondrial en 5ml volumen a  $25^\circ$ . El L-malato se añadió a las concentraciones indicadas. Mitocondrias parcialmente depletadas de Pi endógeno como se señala en métodos.

rato, glutamato o malato, cuando dichos substratos fueron valorados independientemente. El requerimiento de fosfato para el transporte inducido de  $K^+$  debe realizarse en la penetración u oxidación de glutamato, de malato o de los dos juntos. La Figura 2 muestra los requerimientos cuantitativos de L-malato para revertir la inhibición en la oxidación de glutamato causada por monensina en presencia de fosfato y nonactina. La mitad de la estimulación máxima en el consumo de oxígeno se obtiene con 0.5 mM L-malato. En condiciones donde hay un exceso de glutamato y L-malato, (10mM de cada substrato) la mitad de la estimulación máxima del consumo de oxígeno se lleva a cabo con 0.3 mM de fosfato inorgánico. El D-malato no reemplaza al L-malato en los experimentos anteriores.

El fosfato inorgánico, también es requerido para que la nonactina estimule la acumulación de  $K^+$  en presencia de succinato y monensina A. En presencia de propionato, acetato, formato o butirato, como aniones que reemplazan al fosfato (Fig. 3A), la nonactina estimula la oxidación de succinato pero no la acumulación de  $K^+$  en presencia de monensina. Sólo cuando se añade al medio

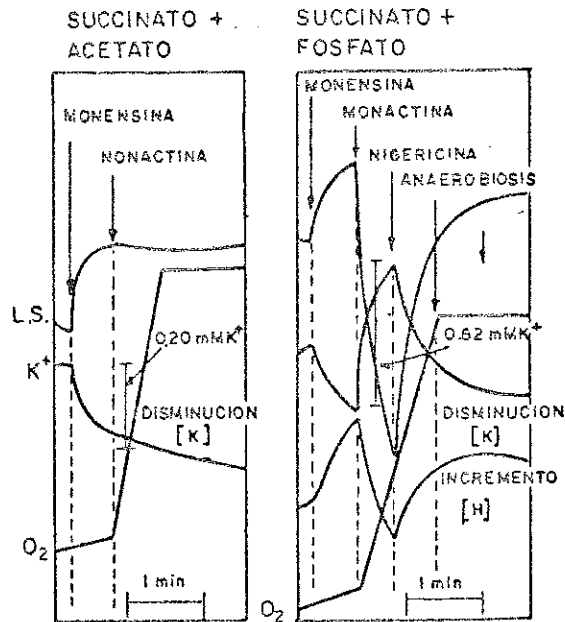


FIG. 3. Los efectos del acetato o el fosfato en la velocidad de oxidación de succinato, los cambios de dispersión de la luz, y los movimientos de  $K^+$  y  $H^+$  inducidos en membranas mitocondriales por los antibióticos, monensina, nonactina y nigericina. El medio contiene 15mM KCl, 1mM  $MgCl_2$ , 10mM trietanolamina (HCl) 10mM succinato (TEA), 10 mM acetato (panel izquierdo) o fosfato (panel derecho), 180 mM sacarosa y 1.8mg N mitocondrial en 5ml volumen a 25°. Las concentraciones respectivas de monensina, nonactina y nigericina fueron:  $2 \times 10^{-7}$ ,  $1.3 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-7}$  M. Mitocondrias parcialmente depletadas de Pi endógeno.

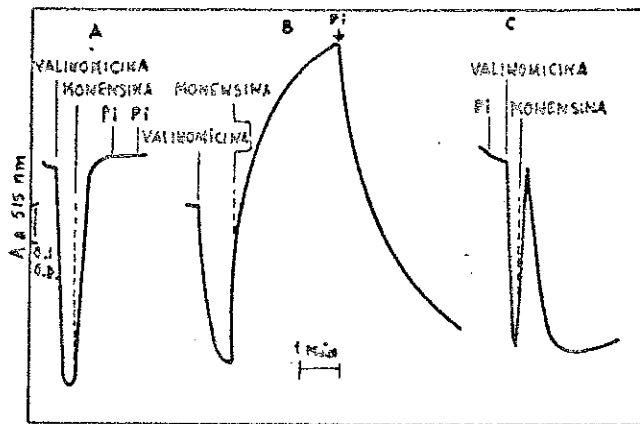


FIG. 4. Los efectos de la monensina y el fosfato o el acetato en los cambios de dispersión de la luz inducidos por la valinomicina en presencia de glutamato o  $\beta$ -hidroxibutirato. La mezcla de reacción contiene: 15mM KCl, 1mM  $MgCl_2$ , 10mM trietanolamina (HCl) pH 7.4, 180 mM sacarosa y 0.5mg nitrógeno mitocondrial en 3ml volumen a 25°. Los medios también contienen: Fig. A, 10mM glutamato + 10mM acetato; Fig. B 10mM  $\beta$ -hidroxibutirato + 10mM acetato y Fig. C, 10mM  $\beta$ -hidroxibutirato + 5 mM fosfato. Concentraciones de valinomicina y monensina  $1.3 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-7}$ . Mitocondrias depletadas de fosfato endógeno.

fosfato inorgánico la nonactina estimula el transporte de  $K^+$  (Fig. 3B). Se obtienen resultados idénticos a los descritos en los panels A y B de la figura 3, con respecto a requerimientos de fosfato inorgánico, cuando el succinato es substituído por  $\beta$ -hidroxibutirato como sustrato.

La figura 4 muestra que el fosfato inorgánico regula los cambios volumétricos de membrana acoplados al transporte de  $K^+$  en mitocondrias parcialmente depletadas de fosfato endógeno. El trazo A de la Figura 4 indica que en presencia de aniones como el acetato o el formato así como de sustratos independientemente estudiados como el piruvato, el malato, el citrato o el  $\alpha$ -cetogluaratos, la monensina revierte por completo y hasta la línea basal, el aumento de dispersión de luz de membranas causado por valinomicina. En otros experimentos independientes se demostró que el aumento en la transmisión de luz de las membranas era paralelo al influjo de  $K^+$  inducido por la valinomicina, mientras que la reversión del fenómeno óptico anterior (mediado por la monensina) era equivalente a salida rápida del  $K^+$  acumulado en el interior de la mitocondria. Estos cambios son insensibles

a la adición de fosfato. Cuando los substratos anteriores son substituídos por succinato,  $\beta$ -hidroxibutirato o glutamato+malato en presencia de acetato o formato, la monensina no sólo revierte hasta la línea basal el trazo inducido por valinomicina, sino que produce un marcado decremento (paralelo al eflujo de  $K^+$ ) en la absorción de luz (trazo B, Fig. 4). Este cambio a su vez es completamente revertido por fosfato inorgánico a través de que el anión induce aumento de volúmen de las partículas paralelo a facilitar la translocación de  $K^+$  al interior de la mitocondria. Es entonces aparente que el fosfato inorgánico, en presencia de ciertos substratos oxidables, regula el movimiento neto de cationes monovalentes y agua dentro de la mitocondria.

De acuerdo con los datos anteriores se consideró que la acumulación de fosfato dentro de la mitocondria, pero no la de otros aniones "penetrantes" como el acetato, el formato, el propionato o el butirato (Chappel y Haarhoff, 1967) estaba acoplada a la oxidación o translocación de succinato,  $\beta$ -hidroxibutirato o glutamato + malto en presencia de monensina. Si esta relación era reversible, se pensó entonces que la inhibición en la

penetración de fosfato causado por antibióticos carboxílicos al interior de la mitocondria (Estrada-O., y Col. 1967 a; Lardy y Col., 1967) podría revertirse por la oxidación de los substratos antes mencionados. En relación a este concepto, también hemos sugerido (Estrada-O., y Col. 1967a; Lardy y Col., 1967) que los antibióticos carboxílicos inhiben la reacción de intercambio  $(^{32}\text{P})\text{Pi} \rightleftharpoons \text{ATP}$  como consecuencia de su capacidad para prevenir la acumulación de fosfato dentro de la mitocondria. Se estudió entonces el efecto de diferentes substratos oxidables en revertir la inhibición de la reacción de intercambio  $(^{32}\text{P})\text{Pi} \rightleftharpoons \text{ATP}$  causada por antibióticos carboxílicos. Esta reacción se midió bajo condiciones que permiten observar tanto la suma de la penetración del  $(^{32}\text{P})\text{Pi}$  y del ATP como la reacción de intercambio isotópico propiamente dicha. Bajo estas circunstancias, consideramos la cinética de la misma como un monitor de la capacidad de los substratos oxidables para facilitar la entrada de fosfato inorgánico durante el eflujo de  $\text{K}^+$  causado por los antibióticos carboxílicos. Como se sospechaba, la Figura 5 indica que aquéllos substratos que en presencia de fosfato



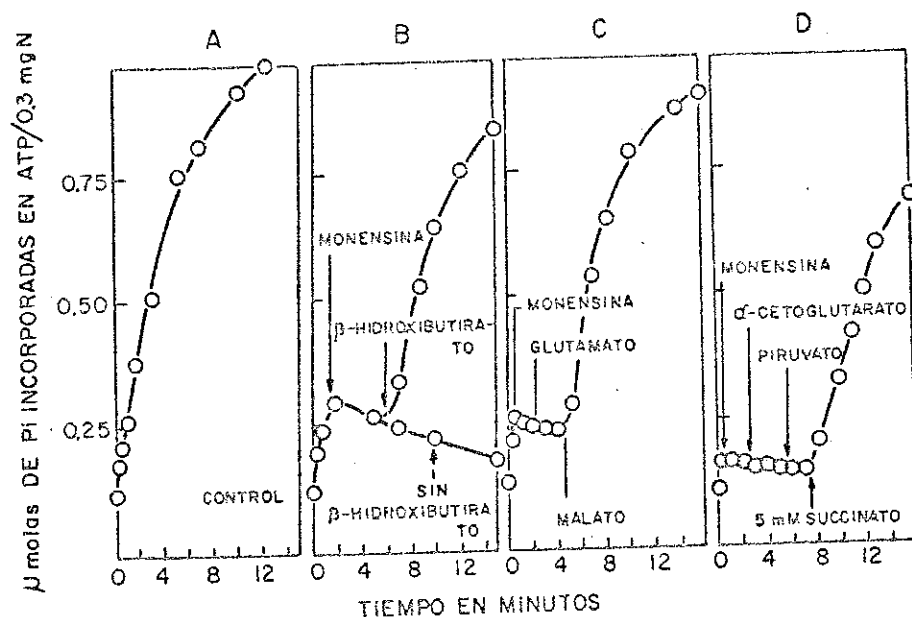


FIG. 5. Los efectos de la monensina y los substratos oxidables en la velocidad de incorporación del  $(^{32}\text{p})$  Pi en ATP en mitocondrias de hígado de rata. El medio contiene 6mM tris ATP pH 7.4, 5mM fosfato (TEA) conteniendo 15,000 cpm de  $(^{32}\text{p})$  Pi, 15mM KCl, 180mM sacarosa, 10mM trietanolamina (HCl) y mitocondrias equivalente a 0.3mg N en 1 ml volumen a  $30^\circ$ . La reacción se inició por la adición de ortofosfato marcado con  $(^{32}\text{p})$  Pi; fué detenida a los tiempos indicados por la adición de ácido tricloroacético al 6%. El trazo A muestra la velocidad de incorporación de  $(^{32}\text{p})$  Pi en ATP en ausencia de substratos oxidables.

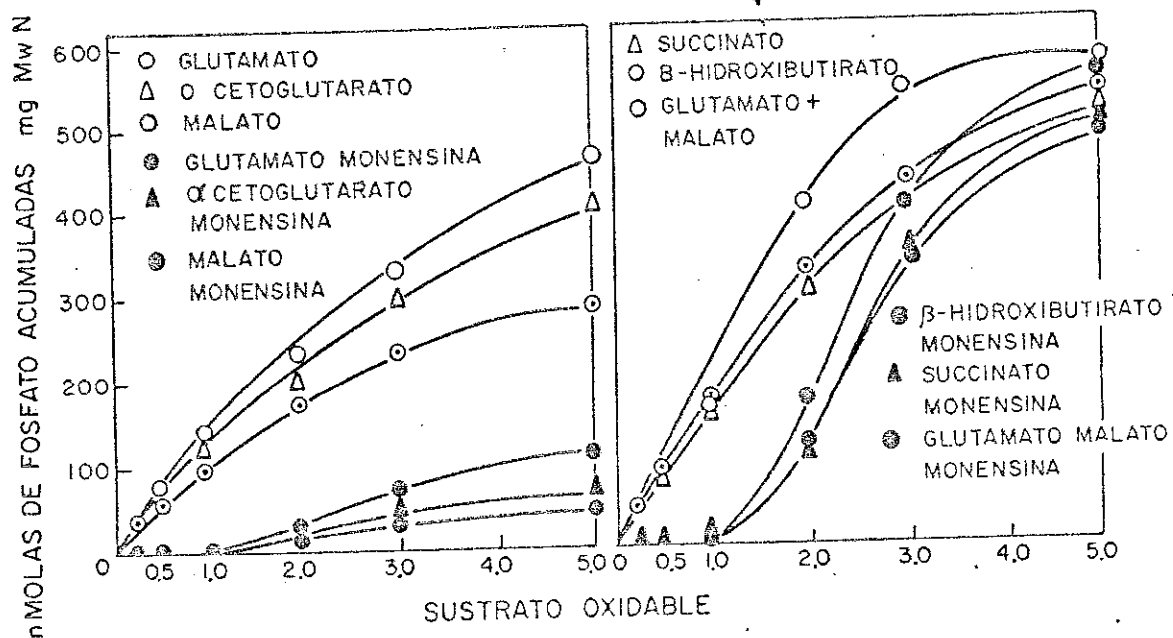


FIG. 6. Los efectos de la monensina y concentraciones crecientes de substratos oxidables en la acumulación neta de fosfato en el interior de la mitocondria. La mezcla de reacción contiene: 15mM KCl, 5mM fosfato (TEA) contienen de 10,000 cpm de  $(^{32}\text{p})$  Pi, 7.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10mM trietanolamina, las concentraciones señaladas de los substratos oxidables indicados, 180mM sacarosa,  $2 \times 10^{-7}\text{M}$  monensina y mitocondrias equivalentes a 2.0 mg N en 2ml de volumen. Después de 10 min. incubación a  $30^\circ$ , las mitocondrias se aillarán, separándose y determinándose el fosfato radiactivo libre en ellas. El tiempo zero, sustraído de los valores experimentales contiene  $1 \times 10^{-6}\text{M}$ , 2-4 dinitrofenol y  $2\mu/\text{ml}$  antimicina.

inorgánico facilitan la penetración de  $K^+$  al interior de la mitocondria en presencia de valinomicina o nonactina, son los mismos substratos que permiten que la reacción de recambio ( $^{32}P$ ) Pi  $\rightarrow$  ATP se lleve a cabo en presencia de monensina. Esta última observación sugirió también que la oxidación de dichos substratos podría estimular la penetración de fosfato-dependiente de energía, aún en contra del efecto opuesto mediado por la monensina. La exacta demostración de esta última proposición se observa en la Fig. 6. Indica que sólo el succinato el glutamato + malato o el  $\beta$ -hidroxibutirato pero no el glutamato, el  $\alpha$ -ceto glutarato o el glutamato, independientes, son capaces de estimular la penetración de ortofosfato a la mitocondria en la presencia de monensina.

La eficiencia de los primeros substratos para acoplarse al mecanismo de translocación de fosfato no sólo se observa con antibióticos ionóforos como la monensina. También se observa que el efecto inhibitor de la hiperosmolaridad en el transporte de fosfato (Tabla I) como en la reacción de recambio ( $^{32}P$ ) Pi  $\rightarrow$  ATP (Fig. 7) son completamente prevenidos por la oxidación o la penetración concertada de succinato, glutamato + malato o  $\beta$ -hidroxibutirato.

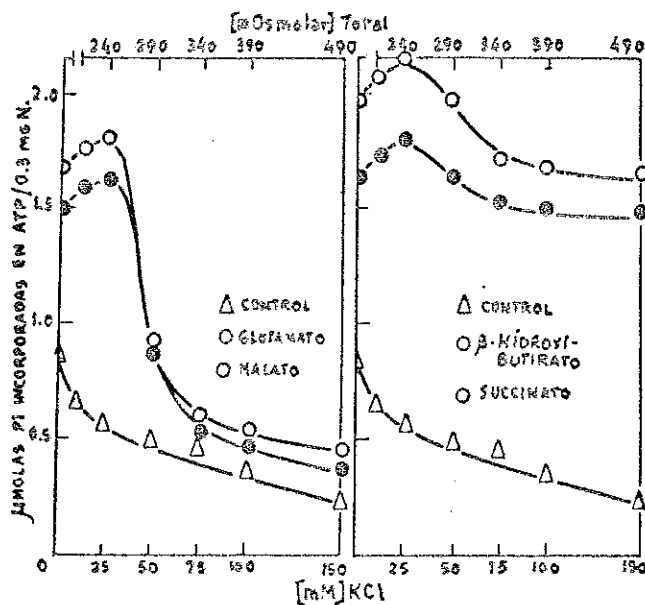


FIG. 7. Los efectos de los substratos oxidables y el incremento en la concentración de KCl en la incorporación de  $(^{32}\text{p})$  Pi en ATP en mitocondrias de hígado de rata. Las condiciones experimentales son idénticas a las de la Fig. 5, excepto por la omisión de los antibióticos carboxílicos y por la evaluación del incremento en la concentración de KCl en la reacción. Los valores de miliosmolaridad mostrados en la porción superior de cada panel, representan la osmolaridad total del medio.

## DISCUSION

El problema de determinar la prioridad de la translocación de cationes sobre la de los aniones en la membrana mitocondrial, o viceversa, ha sido tema de controversias importantes en la literatura. Algunas publicaciones han sugerido que los ácidos carboxílicos oxidables o el fosfato inorgánico penetran al interior de la mitocondria impulsados: a) Por un influjo de cationes dependiente de energía (Harris y Col., 1967 a, b); b) por el eflujo de protones (Mitchell, 1968; Palmieri & Quagliariello, 1969), o bien, c) por un mecanismo no primariamente relacionado a movimientos energizados de cationes (Harris y Manger, 1968 a,b.).

La información descrita en la actual sección del presente manuscrito consideramos que ha demostrado convincentemente que cuando la acumulación de cationes monovalentes es inhibida en la mitocondria por el antibiótico monensina A, la penetración dependiente de energía de fosfato inorgánico permite la entrada subsecuente de  $K^+$  inducida por la valinomicina, la nonactina o la monazomicina. Estas observaciones obligan a considerar que la

acumulación intramitocondrial de fosfato inorgánico no necesariamente debe estar impulsada o ser la consecuencia de movimientos primarios de la poza móvil de  $K^+$ . - Entonces, podemos concluir que existen condiciones en las cuales la translocación de cationes monovalentes es secundaria al transporte primario de fosfato dependiente de energía. Esta proposición difiere de sugerencias previas de Harris y Col., (1967 a, b.), las cuales predijeron que la entrada de fosfato en la mitocondria era la consecuencia del transporte de cationes. También -- nuestra sugerencia parece diferir de Palmieri y Quagliariello (1969), quienes encontraron una aparente correlación entre influjo de protones e inhibición en la penetración de fosfato en mitocondrias intactas.

Consideramos muy probable que en ciertas circunstancias, la penetración de fosfato, primariamente derivada de su intercambio por otro anión endógeno como el -- L-malato, (Papa y Col., 1969; de Jong y Col., 1969) pudiera facilitar la translocación de cationes monovalentes en intercambio por protones. Esta sugerencia no contradice la posibilidad (Mitchell, 1968) de que los protones generados en la cadena respiratoria durante la --

oxidación de substratos, pudieran ser utilizados en un mecanismo de tipo simport para la protonación y subsecuente translocación de fosfato o algunos substratos oxidables dentro de la mitocondria.

Los datos del presente trabajo que señalan que la oxidación de concentraciones a saturación (10mM) de succinato o  $\beta$ -hidroxibutirato son independientes tanto de la adición de fosfato como de los movimientos de  $K^+$  y  $H^+$  (Fig. 3), aparentemente colocan la penetración de estos dos aniones en la categoría del mecanismo de intercambio anión-anión sugerido en este trabajo. El anión endógeno recambiable por succinato o  $\beta$ -hidroxibutirato exógenos podría ser  $OH^-$ , o bien fosfato, malato u otro ácido dicarboxílico. Por otro lado, es claro que la oxidación de concentraciones elevadas de glutamato, malato, piruvato, citrato,  $\alpha$ -cetoglutarato o el par glutamato \* malato (Figuras 1 y 2), requiere no sólo de los movimientos de  $K^+$  y  $H^+$  (Graven, Estrada-O., & Lardy, 1966), sino también de la presencia de fosfato inorgánico. La explicación de este requerimiento de fosfato puede residir en el hecho de que la oxidación de glutamato que tiene lugar a través de la oxidación de -

$\alpha$ -ketoglutarato (Azzone y Ernster, 1961), del mismo modo que la entrada de  $\alpha$ -cetoglutarato y el L-malato en mitocondria dependen de la penetración de fosfato (Chappell y Col., 1967). Es entonces aparente que nuestras observaciones sugieren que la pérdida de fosfato endógeno causada por antibióticos carboxílicos (Estrada O., y Col., 1967., Lardy y Col., 1967) es la responsable de la especificidad de substratos aniónicos que muestran los antibióticos para inhibir el consumo de oxígeno.

Es también importante que la oxidación de succinato,  $\beta$ -hidroxibutirato o glutamato + malato, restituye no sólo la translocación de fosfato, sino también la síntesis de ATP radiactivo inhibida por antibióticos carboxílicos (Figura 5). Es probable entonces que los substratos aniónicos anteriores penetren a la mitocondria, facilitando al oxidarse, la entrada del fosfato en intercambio por un anión endógeno que bien podría ser un producto de la oxidación del substrato lo cual restituye la incorporación de  $^{32}\text{Pi}$  en ATP.

Esta sugestión se encuentra además apoyada por el hecho de que la hiperosmolaridad bloquea la oxidación del glutamato, el malato, el piruvato o el  $\alpha$ -cetogluta-

rato pero no la del succinato o la del  $\beta$ -hidroxibutirato (Johnson & Lardy, 1968; Astman & Daives, 1967), tal como lo demostramos en este trabajo para la reacción de intercambio  $^{32}\text{Pi} \rightleftharpoons \text{ATP}$  (Figura 7).

Lehninger (1957) trató de explicar la inhibición de la reacción  $(^{32}\text{P}) \text{Pi} \rightleftharpoons \text{ATP}$  causado por la hiperosmolaridad, al postular la interacción de concentraciones altas de  $\text{K}^+$  o sacarosa con un componente enzimático que supuestamente participaba en el proceso de síntesis de ATP en la mitocondria. Los resultados del presente manuscrito indican que dicha inhibición se produce al bloquearse la penetración de  $(^{32}\text{P}) \text{Pi}$  dentro de la mitocondria. Esta conclusión, así como los resultados obtenidos con la monensina A, nos permiten concluir que las velocidades de incorporación de  $(^{32}\text{P}) \text{Pi}$  en ATP son no sólo función de la translocación de fosfato (Estrada-O., y Col., 1967a; Lardy y Col., 1967), sino también de la -- permeación o intercambio de substratos aniónicos. Esto último parece llevarse a cabo a través de un mecanismo no dependiente de los movimientos de  $\text{K}^+$  y  $\text{H}^+$  previamente postulados por otros autores.



II

LOS ANTIBIOTICOS CARBOXILICOS COMO INSTRUMENTOS  
EN EL ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE TRANSLOCACION  
CONCERTADA DE CATIONES DIVALENTES Y FOSFATO  
A TRAVES DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL.

## INTRODUCCION

La translocación de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de la oxidación de substratos o de la hidrólisis de ATP está asociada al eflujo de protones en membranas mitocondriales intactas (Vasington y Murphy, 1962; Saris, 1963; Rossi & Lehninger, 1964; Chance, 1965; Mitchell, 1966, 1968). El eflujo de  $\text{K}^+$  inducido en condiciones anaeróbicas por la valinomicina en mitocondrias también estimula la translocación de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de estas partículas (Rossi, Azzi & Azzone, 1967; Azzone, Rossi & Scarpa, 1968; Scarpa & Azzone, 1970).

La pregunta central de las observaciones anteriores radica en aclarar la naturaleza de la asociación entre los movimientos de  $\text{K}^+$  y protones con respecto al proceso de la translocación de  $\text{Ca}^{2+}$  en membranas mitocondriales. De acuerdo con la denominada hipótesis química del mecanismo de acoplamiento energético, se ha sugerido que los flujos concertados de cationes mono y divalentes así como protones, están ligados a través de un intermediario químico común que energizaría el transporte de dichas especies iónicas a través de la membrana.

(Lehninger y Col., 1963; Chance, 1965; Slater, 1969). Por otro lado, la hipótesis quimiosmótica predice que el eflujo de  $H^+$  dependiente del metabolismo o el  $K^+$  inducido por valinomicina en condiciones anaeróbicas, daría lugar a la generación de un potencial negativo de membrana que estimularía la acumulación de  $Ca^{2+}$  dentro de la mitocondria (Mitchell, 1968, 1969).

La participación del fosfato inorgánico en el mecanismo de translocación de  $Ca^{2+}$  es controversial. En presencia de  $\beta$ -hidroxibutirato el fosfato inhibe no sólo la acumulación de  $Ca^{2+}$  dentro de la mitocondria sino -- también las transiciones de estado III a estado IV causadas por el  $Ca^{2+}$  en medio libre de fosfato (Rossi & Lehninger, 1964). Dichos efectos inhibidores del fosfato son prevenidos por la adición al medio de ATP, de oligomicina o de  $Mg^{2+}$  (Drahota, Rossi y Lehninger, 1964). Por otro lado, los efectos anteriores no se observan cuando el  $\beta$ -hidroxibutirato es substituído como fuente de energía por el succinato o el glutamato (Céspedes, Calderón & Estrada-O., 1971 en preparación). Esta última observación destaca la inconveniencia de interpretar

los efectos inhibidores del fosfato en la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de una competencia entre el  $\text{Ca}^{2+}$  y el fosfato por un intermediario químico de alta energía (Rossi y Lehninger, 1964).

En la presente sección de nuestro manuscrito, se demuestra que antibióticos carboxílicos que primariamente transportan  $\text{K}^+$  y protones, como son la nigericina, la dianemicina, la monensina y los compuestos Lilly A-217 o Hoffman La Roche 537, estimulan la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfato sólo bajo condiciones en las cuales el fosfato inhibe la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  con  $\beta$ -hidroxibutirato como fuente de energía. Sugerimos que los movimientos de cationes divalentes y aniones descritos pueden explicarse por la inducción simultánea de movimientos de  $\text{K}^+$  y  $\text{H}^+$  -- así como de la translocación concertada de algunos substratos oxidables con el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfato a través de la membrana mitocondrial.

## RESULTADOS

La figura 1 señala que en presencia de  $\beta$ -hidroxibutirato y fosfato inorgánico, el incremento en la concentración del antibiótico monocarboxílico nigericina estimula la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la mitocondria. Dicho fenómeno es inhibido cuando se omite el  $\beta$ -hidroxibutirato o cuando se añade al medio  $5 \times 10^{-7}$  M antimicina o  $2 \times 10^{-7}$  M rotenona.

La Figura 2 (Panel A) muestra una gráfica de la magnitud de  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado dentro de la mitocondria -- contra concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  añadido al medio en presencia de  $3 \times 10^{-7}$  M nigericina,  $\beta$ -hidroxibutirato y fosfato. El antibiótico no solo previene el efecto inhibidor de ortofosfato en la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$ , sino que también estimula la translocación del catión divalente dentro de la mitocondria. El Panel B de la Figura 2 señala que la nigericina también estimula en forma significativa la acumulación de fosfato del medio en presencia de concentraciones crecientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . La nigericina no afecta la translocación de  $\text{Ca}^{2+}$  o fosfato en au-

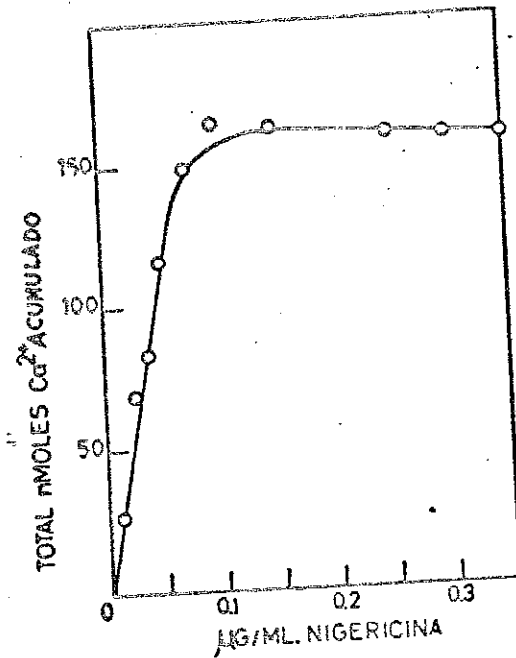


FIG. 1. El efecto de la concentración de la nigericina en la acumulación de  $Ca^{2+}$  en mitocondrias de hígado de rata. La mezcla de reacción contiene: 10mM trietanolamina (HCl) pH 7.4, 15mM KCl, 2.5 mM fosfato (TEA), 200  $\mu$ M  $CaCl_2$ , 20,000 cpm ( $^{45}Ca$ ) -  $Ca^{2+}$ , 10mM  $\beta$ -hidroxibutirato, las concentraciones indicadas de nigericina, y aproximadamente 9mg N protéico mitocondrial en 2ml de volumen a 28°. Después de 10 min. de incubación, las mitocondrias se aislarán rápidamente cuantificadas en el pellet la radiactividad del ( $^{45}Ca$ )  $Ca^{2+}$ .

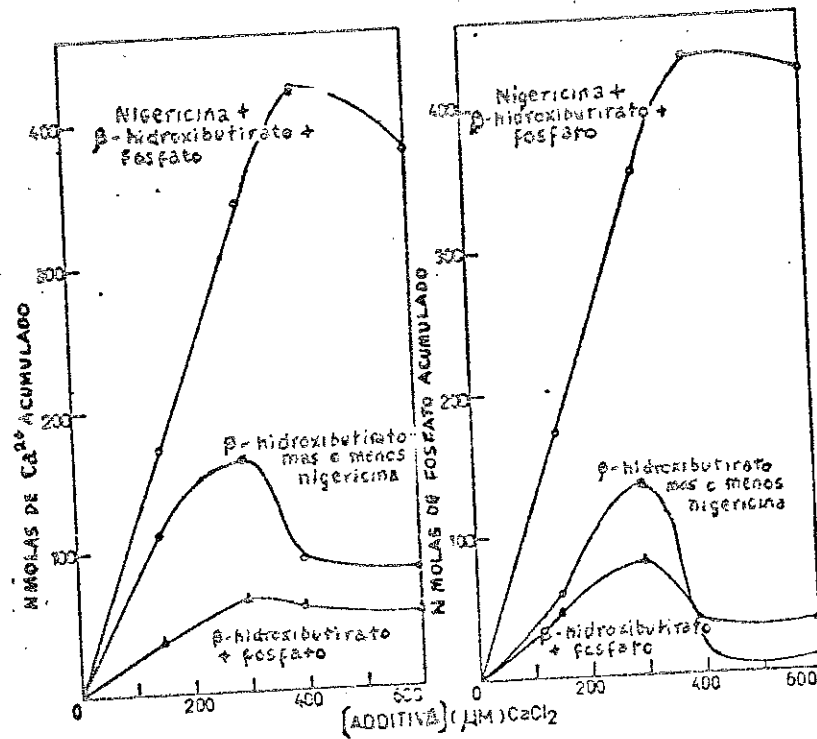


FIG. 2. El efecto de la concentración de calcio en la acumulación de  $Ca^{2+}$  y fosfato inorgánico estimulada por la nigericina en mitocondrias de hígado de rata. Las condiciones experimentales son iguales a la de la Fig. 1, excepto por las concentraciones indicadas de  $Ca^{2+}$  y por la adición de 0.1  $\mu$ g/ml nigericina.

sencia de fosfato inorgánico añadido, independientemente de la fuente energética utilizada para el transporte.

La acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada por la nigericina es sensible a la concentración de protones del medio (Figura 3). El cambio de pH de 6.0 a 6.5 resulta en un incremento en la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada por el antibiótico mientras que por arriba de pH 7.0 se observa un decremento de este fenómeno. El antibiótico no estimula la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  por arriba de pH 8.0. Resultados idénticos a los anteriores se obtienen cuando se estudia la acumulación de fosfato inorgánico en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\beta$ -hidroxibutirato y nigericina.

La nigericina es reemplazada por diferentes antibióticos carboxílicos para estimular la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfato en la mitocondria. Como se muestra en la Tabla I, la nigericina, la dianemicina, las monensinas A y B y los compuestos Lilly A-217 y HLR-537 estimulan de modo similar la acumulación de fosfato y cationes divalentes en mitocondria.

Observaciones previas de Lardy, Johnson y McMurray (1958) demostraron que concentraciones bajas de nigeri-

TABLA I

El efecto de diferentes antibióticos carboxílicos en la acumulación de  $Ca^{2+}$  y fosfato dentro de la mitocondria.

El medio contiene 10mM trietanolamina (Cl<sup>-</sup>) pH 7.4 15mM KCl, 2.5 mM fosfato (TEA), 200  $\mu$ M  $CaCl_2$ , 20,000 cpm (<sup>45</sup>Ca)  $Ca^{2+}$ , 10mM  $\beta$ -hidroxibutirato, 200mM sacarosa 0.6 $\mu$ g/ml de los antibióticos carboxílicos señalados y 4 mg de nitrógeno protéico de mitocondrias.

Adiciones	nmolas totales de $Ca^{2+}$ acumulado	nmolas totales de Pi acumulado
Ninguna	50.93	69.00
Nigericina	221.90	275.00
Monensina	192.80 ,	280.00
Dianemicina	217.00	275.00
X-537A	219.00	279.00
Lilly A-217	188.00 .	280.00



## DISCUSION

Los datos anteriormente presentados indican que antibióticos carboxílicos como la nigericina, la dianemicina, las monensinas y los compuestos Lilly A-217 o HLR-537 estimulan la acumulación aeróbica de ortofosfato y  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de energía en la mitocondria -- (Figs. 1,2; Tabla I). Tal acumulación de iones es estimulada solamente bajo condiciones en las que el fosfato impone una inhibición en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfato en presencia de  $\beta$ -hidroxibutirato. Por otro lado, cuando el  $\beta$ -hidroxibutirato es reemplazado por el ATP como fuente de energía para el transporte de iones, los antibióticos bloquean la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 4) y ortofosfato. Es más, los antibióticos carboxílicos no afectan la translocación de  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfato energizada por la oxidación de succinato en presencia de fosfato inorgánico. Entonces, es aparente que la capacidad de los antibióticos carboxílicos para estimular la acumulación de fosfato y  $\text{Ca}^{2+}$  sólo está acoplada a la oxidación o translocación de ciertos substratos.

Observaciones previas de Rossi y Col. (1964) han mostrado que en presencia de  $\beta$ -hidroxibutirato, 1 a 2mm de fosfato inorgánico causan una prolongación indefinida de la respiración inducida por el  $\text{Ca}^{2+}$  en el estado III sin el retorno estequiométrico a nivel del estado IV. En estas circunstancias, el fosfato produce una inhibición de más del 90% en la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial. Los resultados del presente trabajo confirman estas observaciones. Es más, hemos observado (Céspedes, Calderón y Estrada-O., en preparación) que el fosfato inorgánico previene la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  promovida por el  $\beta$ -hidroxibutirato, el piruvato, el L-malato o el  $\alpha$ -cetoglutarato pero no la energizada por el succinato o el glutamato. Entonces, el efecto inhibitor del fosfato en el proceso de acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  es también selectivo para ciertos substratos. Dicha selectividad de substratos, aparentemente asociada al proceso de translocación de  $\text{Ca}^{2+}$ , es por completo diferente al patrón de substratos, que, como se demostró en el capítulo anterior de esta Tesis, aparentemente está asociada a la translocación de  $\text{K}^+$ .

La selectividad de antibióticos carboxílicos para estimular la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfato sólo con ciertos substratos, puede explicarse de la selectividad de estos ionóforos para impedir la acumulación y subsecuente oxidación de ciertos ácidos carboxílicos, asociado ésto a la acidificación intramitocondrial o al eflujo de  $\text{K}^+$  promovido por los antibióticos mencionados. En otras palabras, la incapacidad de los antibióticos para estimular la acumulación de cationes divalentes y fosfato con piruvato, L-malato  $\alpha$ -cetoglutamato o glutamato, se debe a la elevada eficiencia con la que inhiben la acumulación y oxidación de concentraciones "a saturación" de los substratos anteriores (Lardy y Col., 1958; Graven y Col., 1966; Estrada-o., y Col. 1967a, 1970a).

Es más difícil explicarse la naturaleza de la selectividad de substratos mostrada por el fosfato para inhibir la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la mitocondria. Debe sin embargo hacerse notar que el fosfato inorgánico no inhibe la retención o translocación de  $\text{Ca}^{2+}$  o fosfato con aquellos substratos que como el succinato o el glutamato (Chappell & Robinson, 1967;

Chappell & Haarhoff, 1967) aparentemente requieren de fosfato inorgánico para su translocación o intercambio aniónico en la membrana mitocondrial. Esta asociación de hechos sugiere que los efectos inhibidores descritos para el fosfato se llevan a cabo a nivel del acoplamiento entre la translocación de aniones ligada a los movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  con  $\text{K}^+$  y  $\text{H}^+$  a través de la membrana mitocondrial.

Observaciones previas de la literatura han señalado que el mecanismo de translocación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria puede estar asociado al eflujo de, ya sea el  $\text{K}^+$  o de protones del interior de la partícula (Saris, 1963, Rossi & Lehninger, 1964, Chance 1965; Mitchell -- 1966; Scarpa y Azzone, 1970). Entonces, es probable que la alcalinización intramitocondrial causada por la expulsión de protones inducida por el  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 6) pudiera facilitar la penetración de ortofosfato al interior de la mitocondria (Mitchell, 1966, 1968, Quagliariello y Col., 1969) y que además, el eflujo de  $\text{H}^+$  dependiente de energía mediado por el  $\text{Ca}^{2+}$  (Figuras 6 y 7) junto con el escape de  $\text{K}^+$  intramitocondrial catalizado por antibióticos carboxílicos (Fig. 6) pudiera conducir a la formación

de un potencial negativo de membrana que estimularía la acumulación electrogénica de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la mitocondria. La incapacidad de la nigericina para transportar  $\text{Ca}^{2+}$  a través de interfases hidro-lipídicas (Calderón & Estrada-O., datos no publicados) descarta la posibilidad de que el antibiótico funcione como un acarreador móvil para  $\text{Ca}^{2+}$ .

Independiente a la proposición anterior, parece requerirse de una explicación adicional para entender el porqué los efectos anteriores se observan cuando la energía para el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfato proviene de la oxidación del  $\beta$ -hidroxibutirato pero no cuando proviene de la del succinato, y esto a pesar de que la nigericina no afecta la fosforilación oxidativa de ambos substratos (Lardy y Col., 1958, Henderson & Chappell, 1967).

Es probable que los resultados anteriores reflejen diferencias en el acoplamiento entre el intercambio de substratos aniónicos y fosfato con respecto a los movimientos de  $\text{K}^+$  y protones. Kimmich y Rasmussen (1965) encontraron que cuando las mitocondrias de hígado de

rata acumulan  $\text{Ca}^{2+}$ , solamente el  $\beta$ -hidroxibutirato, el glutamato, el  $\text{HCO}_3^-$  y el lactato, sirven como contra -- iones para el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que todos los intermediarios del ciclo de Krebs son impermeables para este propósito. Por otro lado, cuando se indujo transporte de  $\text{K}^+$ , se observó un perfil diferente de permeabilidad de aniones al anterior. Estos últimos resultados refuerzan nuestra posición en el sentido de que diferencias en el mecanismo de translocación de substratos carboxílicos en procesos de recambio anión anión, así como una probable compartimentación desigual de los Loci de permeación de substrato con respecto a los procesos de translocación de cationes o protones, o bien diferencias en la constante de disociación de los substratos oxidables que afecten tanto su protonación como la subsecuente translocación de  $\text{Ca}^{2+}$  o fosfato en recambio o paralelo a la penetración de protones, puede imponer propiedades diferentes al mecanismo de transporte de iones -- energizado por substratos oxidables. Esta sugestión también puede aplicarse al transporte de iones energizado por ATP, ya que la inhibición por la nigericina tanto

de la hidrólisis de ATP estimulada por el  $\text{Ca}^{2+}$  (Lardy, Johnson y McMurray, 1958; Figura 4A) como del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  energizado por ATP (Figura 4B) pueden ambas ser el resultado del bloqueo para antibióticos carboxílicos de la acumulación de nucleótidos, como resultado de cambios primariamente inducidos en la translocación de protones o metales monovalentes. Una alternativa para explicar estos últimos resultados sería la inhibición de la actividad de ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  como consecuencia de una inhibición en la transferencia neta de carga ( $\text{Ca}^{2+}$ ) por los antibióticos carboxílicos hacia el interior de la mitocondria. Esta proposición asumiría un acoplamiento electrogénico entre la transferencia de una especie iónica a través de la membrana y la actividad de ATPasa.

III

REGULACION POR NUCLEOTIDOS DE LA SELECTIVIDAD  
IONICA DE ANTIBIOTICOS IONOFORETICOS EN  
LA MEMBRANA MITOCONDRIAL.



## INTRODUCCION

El capítulo anterior señaló algunos factores que regulan la translocación de un metabolito polar o especie iónica determinada a través de una membrana lipídica. Sin embargo, se requieren evidencias adicionales para entender la naturaleza del mecanismo a través del cual un sistema de transporte prefiere translocar una especie iónica determinada, en exclusión de otra que es muy parecida o casi idéntica, pero desigual a ella. En otras palabras, el entender el mecanismo que conduce a la selectividad iónica de superficies biológicas es un problema central en el estudio de la función de la membrana.

Los antibióticos ionoforéticos se consideran los modelos de acarreadores de iones que mimetizan con mayor eficacia las propiedades de un sistema biológico -- membranar de transporte. En este sentido se ha sugerido, sin evidencias experimentales (Ling, 19 ), que los nucleótidos pudieran participar no sólo como fuente energética para el transporte asimétrico de  $\text{Na}^+$  por  $\text{K}^+$  en membranas celulares, sino como factores de control en el

proceso de selectividad iónica del mismo. Por las circunstancias anteriores consideramos de interés el determinar los factores que regulan la selectividad de los flujos de iones catalizados por antibióticos ionofóricos en membrana mitocondrial, considerándolos como modelos de acarreadores de iones en membranas biológicas. En concreto, el presente estudio se llevó a cabo con el propósito de explorar los efectos del ATP y toda una familia adicional de nucleótidos en la selectividad iónica de la nigericina y la dianemicina (Estrada-O., y Col., 1967a; Graven y Col., 1966; Lardy y Col., 1967) como inhibidores de la acumulación de cationes monovalentes inducida por monazomicina (Estrada-O., y Gómez-Lojero, 1970) o análogos de la nonactina (Graven, Lardy y Estrada-O., 1967). Dichas observaciones indican que la elevada selectividad natural de la nigericina por  $K^+$  (Pressman y Col., 1967) es más aparente en membranas mitocondriales cuando el transporte de iones es energizado por ATP. Cuando dicho proceso es energizado por la oxidación de substratos, la penetración de  $K^+$  catalizada por ionóforos del tipo de la valinomicina es revertida por ionóforos carboxílicos sin aparente selectividad iónica.

Los resultados del enfoque anterior señalan que el fosfato inorgánico liberado del ATP es responsable de las diferencias en la selectividad iónica del transporte de cationes promovido por antibióticos carboxílicos en presencia del nucleótido. Nuestros datos también indican que el ADP y un análogo fosfónico sintético del ATP (metilen,  $\beta$ - $\gamma$ ,ATP) así como otros nucleosido mono-, di- y trifosfatos antagonizan o compiten con el transporte de iones energizado por ATP a través de un mecanismo no relacionado con su posible papel como aceptores o donadores de grupos fosfato en la fosforilación oxidativa. Este mecanismo parece estar relacionado con la probable contribución de los nucleótidos en la carga eléctrica neta de la superficie membranal.

## RESULTADOS

### Efectos del ATP y los substratos oxidables en la selectividad iónica de la Nigericina.

La especificidad por  $K^+$  de  $1.4 \times 10^{-6} M$  nigericina para revertir los cambios de dispersión de luz de mitocondrias asociadas al influjo de cationes monovalentes inducidos por  $1.2 \times 10^{-7} M$  monazomicina, dependen de la presencia de ATP. La nigericina es incapáz de revertir el decremento de absorción óptica asociado a la acumulación de  $Cs^+$  estimulado por la monazomicina en presencia de 10 mM acetato y 6 mM tris ATP (Panel A de la Fig. 1). La adición subsecuente de 40 mM de diferentes cationes monovalentes, después de la nigericina, induce un inmediato incremento del trazo de dispersión luminosa con la secuencia de selectividad iónica:  $K^+ > Rb^+ > Na^+ > Li^+ > Cs^+$ . La adición de los cationes mencionados no produce cambios detectables en el parámetro medido en ausencia de nigericina. Esto indica que en presencia de ATP, acetato y monazomicina, sólo el  $K^+$  y el  $Rb^+$  pero no el  $Li^+$  o el  $Cs^+$

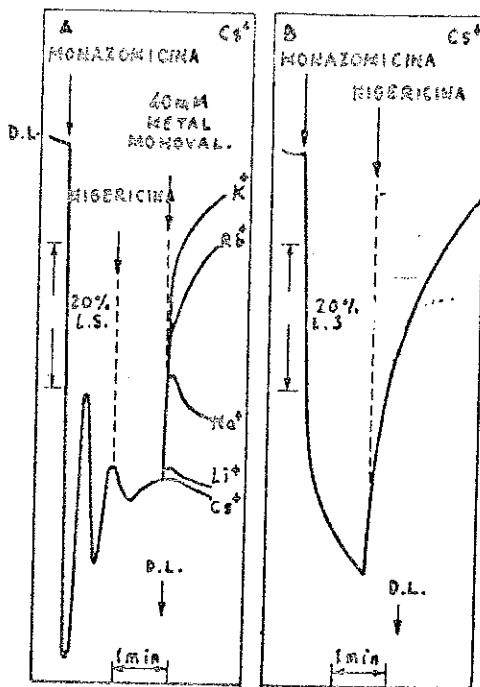


FIG. 1. El efecto del ATP, el glutamato y los cationes monovalentes en la reversión por la nigericina del decremento en la absorción de luz causada por la monazomicina y el Cs<sup>+</sup> en mitocondrias de hígado de rata. El medio contiene: 10mM trietanolamina (Cl<sup>-</sup>) pH 7.4, 10mM acetato (TEA), 15mM CsCl 125 mM sacarosa y 1.0 a 1.2 mg nitrógeno mitocondrial. La monazomicina y la nigericina le añadieron a concentraciones de  $1.2 \times 10^{-7}$  y  $1.4 \times 10^{-6}$ M -- respectivamente. El panel A contiene 6mM tris-ATP y el B 10 mM glutamato (TEA). Donde se indica se añadieron 40mM de los diferentes cationes monovalentes en 50 $\mu$ l. de volumen.

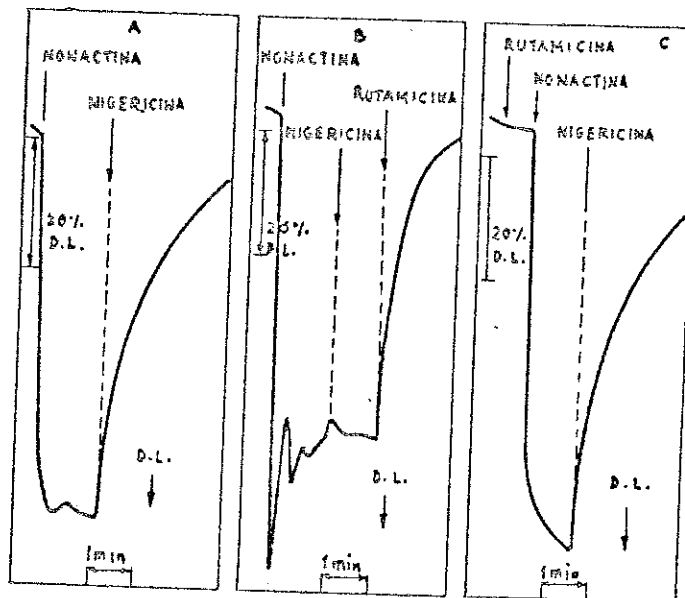


FIG. 2. El efecto de la rutamicina en la reversión por la nigericina, del decremento en la absorción de luz inducido por la nonactina en mitocondrias en presencia de Cs<sup>+</sup>, ATP y substratos oxidables. Las condiciones experimentales son iguales a las descritas en la Fig. 1 excepto por el uso de 15mM LiCl en lugar de CsCl y la adición de  $7 \times 10^{-7}$ M nonactina y  $3 \times 10^{-7}$ M rutamicina y  $3 \times 10^{-7}$ M rutamicina, así como 10mM succinato (TEA).

asequibles al antibiótico carboxílico. Por otro lado, cuando en vez de ATP se utiliza 10 mM de succinato como fuente de energía para el transporte de los cationes monovalentes inducido por monazomicina en presencia de acetato, la nigericina revierte por completo los cambios de dispersión luminosa asociados a la translocación de  $\text{Cs}^+$  (Panel B, Fig. 1). Se observan resultados similares cuando la sal de  $\text{Cl}^-$  del  $\text{Cs}^+$  es substituída por  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  o  $\text{Rb}^+$ . En otras palabras la selectividad aparente por  $\text{K}^+$  de la nigericina desaparece en ausencia de ATP. Como se observa en la Tabla I, el efecto del ATP para revertir movimientos de iones con una casi exclusiva especificidad para  $\text{K}^+$  es específico de este nucleótido. Otros nucleótido mono-, di- o trifosfatos no reemplaza al ATP en el efecto anterior.

Efecto del fosfato inorgánico en la  
Selectividad Iónica de la Nigericina.

Se requiere de la hidrólisis del ATP para que el nucleótido incremente la selectividad iónica de la nigericina por  $\text{K}^+$  en la membrana mitocondrial. Esto se deduce

TABLA I

El efecto de diferentes nucleótidos en la reversión causada por la nigericina de la disminución en la absorción de luz inducida por la monazomicina en una suspensión mitocondrial que contiene  $\text{Li}^+$  y succinato

El medio contiene 10mM trietanolamina ( $\text{Cl}^-$ ) pH 7.4, 10mM acetato (TEA), 7.5mM  $\text{LiCl}$ , 10mM succinato (TEA), 150mM sacarosa, y mitocondrias quivalentes a 1.2mg N en 5ml volumen a  $28^\circ$ . La monazomicina y la nigericina se añadieron a una concentración de  $2.3 \times 10^{-7}\text{M}$  y  $1.4 \times 10^{-6}\text{M}$  respectivamente. Las sales de tris de ATP, UTP y ADP, así como las sales de  $\text{Na}^+$  de IPT, TTP o GTP se añadieron a una concentración de 6mM. Aproximadamente 1 minuto después de que la monazomicina causó un ciclo de "swelling" y el trazo de dispersión de la luz se estabilizó a un valor relativo de 30, se añadió la nigericina a la mezcla de reacción. El incremento relativo en la absorción de luz, después de la nigericina, se tomó a los tiempos indicados. La adición de 10mM  $\text{NaCl}$  al medio que contenía la sal de tris del UTP causó un incremento promedio de 5% en la absorbancia lumínica. Este valor fué restado a los datos obtenidos con sales de  $\text{Na}^+$  de nucleótidos.

Succinato más	Cambio en la absorción de luz después de añadir la nigericina		
	15 seg	30 seg	60 seg
		% cambió de A	
Succinato sin adiciones -----	16	11	5
ATP -----	39	42	42
ITP -----	21	14	7
TTP -----	21	13	7
UTP -----	18	12	8
GTP -----	17	12	9
ADP -----	18	13	10

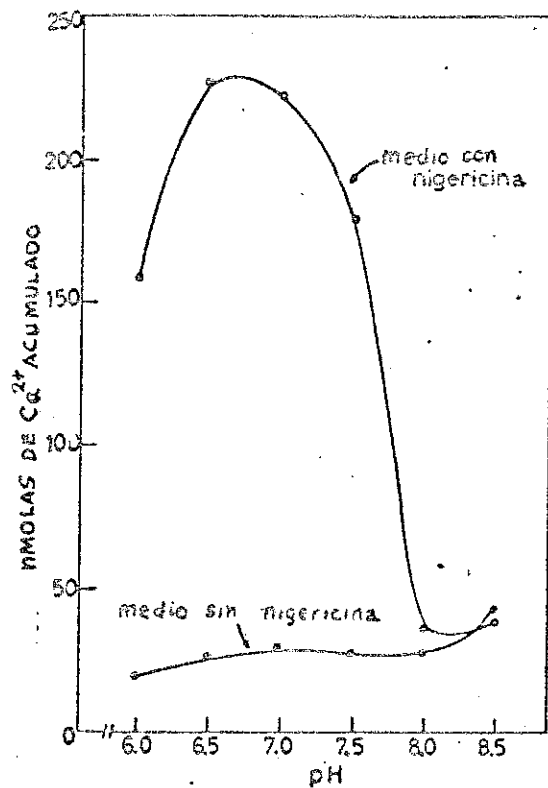


FIG. 3. El efecto del cambio de pH en la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  que sucede en presencia de x-nigericina,  $\beta$ -hidroxibutirato y fosfato en mitocondrias. La mezcla de reacción es similar a la de la Fig. 1, excepto por la adición de 6mM histidina y las concentraciones variables de HCl para obtener los valores indicados de pH. La concentración de nigericina utilizada fué 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$

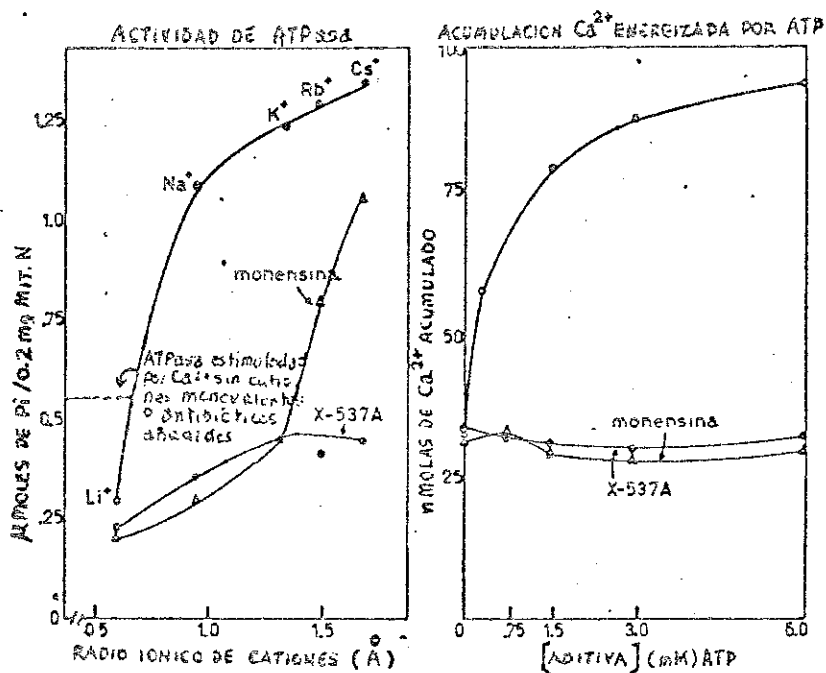


FIG. 4. El efecto de la monensina A y el compuesto X-537A en la actividad de ATPasa estimulada por el  $\text{Ca}^{2+}$  (panel A) y en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  energizado por ATP en la mitocondria (panel B). El medio experimental en el panel A contiene: 6mM tris ATP, pH 7.4, 50mM de la sal de cloruro, ya sea de  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  o  $\text{Cs}^+$ , 400 $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , 180 mM sacarosa, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de monensina A o X-537A y 2.6 mg proteína mitocondrial en 1 ml volumen a 30°. La mezcla de reacción del panel B es igual a la Fig. 1, excepto por la adición de las concentraciones indicadas de ATP, de 400 $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  y de 4.6 mg proteína mitocondrial/ml.



cina bloquean la ATPasa estimulada por  $\text{Ca}^{2+}$  en mitocondrias de hígado de rata. La figura 4 del presente manuscrito indica que la inhibición de la hidrólisis de ATP, dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  causada por los antibióticos monensina o HLR-537 (Panel A de la figura 4) está asociada a una inhibición paralela de la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  energizada por ATP en la mitocondria (Panel B de la figura 4). Entonces, los antibióticos carboxílicos estimulan la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  energizada por  $\beta$ -hidroxi-butirato en presencia de fosfato mientras que inhiben aquélla promovida por el ATP. La oxidación del  $\beta$ -hidroxibutirato no es desacoplada por concentraciones bajas de  $\text{Ca}^{2+}$  (200  $\mu\text{M}$ ) y nigericina.

La Tabla II indica que los inhibidores de transporte de electrones, así como los conductores neutros de cationes ó protones bloquean la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada por nigericina. La antimicina y la rotenona, así como el 2,4-dinitrofenol o el FCCP (Tabla II) o bien la valinomicina +  $\text{K}^+$  (Figuras 5A y B), la nonactina o el políeter macrocíclico XXXIV, cada uno de ellos actúa como inhibidor de la translocación inducida de  $\text{Ca}^{2+}$ .

TABLA II

El efecto de inhibidores de la transferencia y la conservación de la energía. Así como conductores de cationes y de protones en la acumulación de Ca<sup>2+</sup> estimulada por la nigericina en la mitocondria.

La mezcla de reacción es idéntica a la de la Tabla I. La concentración de nigericina es 0.25µg/ml. Otras adiciones son: 2,4-dinitrofenol, 5x10<sup>-6</sup>M; antimicina, 3x10<sup>-7</sup>M; rutamicina, 1x10<sup>-6</sup>M; rotenona, 5x10<sup>-7</sup>M; valinomicina 1x10<sup>-6</sup>M. polietter macrocíclico XXXIV, 5x10<sup>-5</sup>M.

Nigericina más	nmolas totales de Ca <sup>2+</sup> acumulado en el interior de la mitocondria.
(Control) sin nigericina	48.2
Nigericina, sin adiciones	225.4
2,4-dinitrofenol	32.2
Antimicina	31.1
Rutamicina	216.8
Rotenona	67.4
Valinomicina	28.6
Polietter macrocíclico XXXIV	38.2

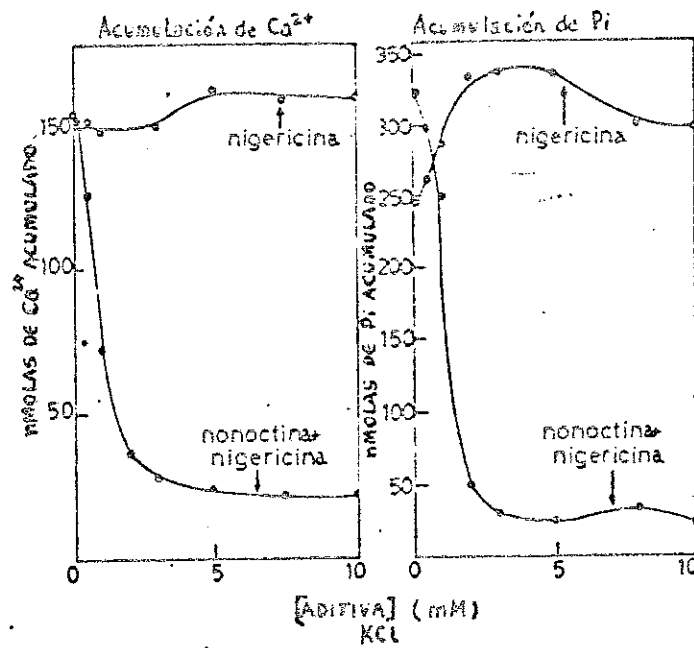


FIG. 5. El efecto de la concentración de KCl en la inhibición por la nonoetina de la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  (panel A) o fosfato (panel B) estimulada por la nigericina en la mitocondria. La mezcla de reacción es similar a la de la Fig. 1, excepto por la adición de  $2 \times 10^{-7} \text{M}$  nonoetina y las concentraciones señaladas de KCl.

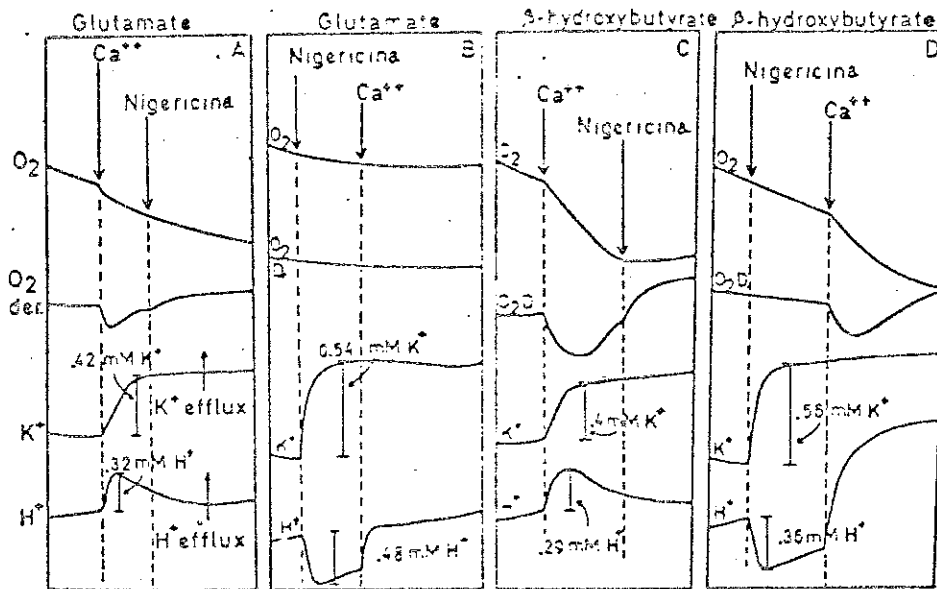


FIG. 6. El efecto del orden de la adición, de nigericina y  $\text{Ca}^{2+}$ , en los movimientos de  $\text{K}^+$  y  $\text{H}^+$  de mitocondrias que oxidan al glutamato o al  $\beta$ -hidroxibutirato. Una deflección hacia arriba del trazo de  $\text{K}^+$  o protones indica incremento de estos iones en el medio o eflujo de los mismos del interior de mitocondria. La mezcla de reacción contiene: 2mM trietanolamina ( $\text{Cl}^-$ ) pH 7.3mM glutamato o  $\beta$ -hidroxibutirato (sales de TEA), 2mM fosfato (TEA), y mM KCl, 180mM sacarosa y 1.4 mg N mitocondrial en 5 ml de volumen a  $28^\circ$ . Donde le indica se añadieron 400 $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  y 0.4 $\mu\text{g/ml}$  nigericina.

La figura 6 muestra los efectos del orden de adición del  $\text{Ca}^{2+}$  y la nigericina en los movimientos de  $\text{K}^+$  y  $\text{H}^+$  así como en el consumo de oxígeno mitocondrial con dos substratos oxidables diferentes y en presencia de fosfato inorgánico. En presencia de glutamato,  $200 \mu\text{M Ca}^{2+}$  causa de un discreto salto de oxígeno consumido, un eflujo cíclico de  $\text{H}^+$  y una lenta liberación de  $\text{K}^+$  endógeno -- (Panel A, Fig. 6). La adición subsecuente de nigericina no afecta los trazos de  $\text{K}^+$  y  $\text{H}^+$ . Resultados similares, con excepción de un mayor consumo de oxígeno se obtienen en los movimientos de  $\text{K}^+$  y  $\text{H}^+$  con  $\beta$ -hidroxibutirato como subtrato (Panel C, Fig. 6). Cuando el antibiótico se añade antes del  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de glutamato (Panel B, Fig. 6), induce un rápido eflujo de  $\text{K}^+$  en recambio por protones. La adición subsecuente de  $\text{Ca}^{2+}$  sólo equilibra a la línea basal el eflujo de  $\text{H}^+$  mediados por la nigericina, sin -- afectar el trazo de  $\text{K}^+$ . Por otro lado, cuando este experimento se lleva a cabo con  $\beta$ -hidroxibutirato como subtrato (Panel D de la Fig. 6). La adición de  $\text{Ca}^{2+}$  posterior a la nigericina, cataliza un muy significativo y no-cíclico eflujo de protones subsecuente a la liberación de  $\text{K}^+$  inducida por el antibiótico. Es únicamente con este último

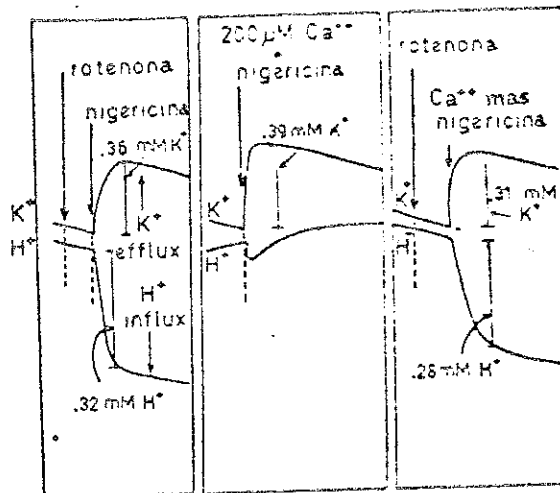


FIG. 7. El efecto de la adición simultanea de Ca<sup>2+</sup> y nigericina en los movimientos de K<sup>+</sup> y H<sup>+</sup> en mitocondrias, tanto en condiciones aeróbicas como con respiración inhibida. Las condiciones experimentales son similares a las de la Fig. 6, excepto por la adición de 1 μg/ml rotenona donde se indica.

substrato que la nigericina estimula la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de fosfato. La Figura 7 proporciona evidencias adicionales en el sentido de la posible participación de los movimientos de  $\text{K}^+$  y  $\text{H}^+$  en el mecanismo de translocación de  $\text{Ca}^{2+}$  promovido por antibióticos carboxílicos. Muestra que la nigericina cataliza un recambio  $\text{K}^+/\text{H}^+$ , 1:1 en mitocondrias en un medio que -- contiene  $\beta$ -hidroxibutirato + rotenona sin  $\text{Ca}^{2+}$  añadido (Panel A, Fig. 7). En ausencia de inhibidores respiratorios añadidos y con  $\beta$ -hidroxibutirato como sustrato -- (Panel B, Fig. 7), la adición simultánea de  $\text{Ca}^{2+}$  y nigericina induce liberación de  $\text{K}^+$  mitocondrial, mientras -- que el  $\text{Ca}^{2+}$  previene por completo la acidificación intramitocondrial producida por el iónoforo. Finalmente, el Panel C de la figura 7 señala que en presencia de sustrato y rotenona, el  $\text{Ca}^{2+}$  no afecta los movimientos de  $\text{H}^+$  catalizados por la nigericina. Entonces, el acoplamiento entre el eflujo de  $\text{K}^+$  producido por nigericina y el  $\text{Ca}^{2+}$ , más el eflujo de protones mediado por el  $\text{Ca}^{2+}$  (Panel D, Fig. 9) puede ser parte del mecanismo de translocación de fosfato inorgánico y  $\text{Ca}^{2+}$  descrito en la presente sección.

de que la rutamicina, un inhibidor de reacciones de transfosforilación de membrana (Lardy y Col., 1965) -- bloquea por completo los efectos del ATP en la selectividad iónica de la nigericina (Figura 2). Cuando el glutamato es la única fuente de energía del sistema, la nigericina revierte por completo la acumulación de  $Cs^+$  estimulada por nonactina (Panel A, Fig. 2). Cuando en el medio existen ATP + glutamato añadidos, la nigericina no revierte el movimiento de  $Cs^+$ , y la adición de rutamicina, posterior a la nigericina sí lo hace (Panel B, Fig. 2). Cuando la rutamicina se añade al medio anterior en ausencia de nigericina prácticamente no posee ningún -- efecto. Es más, la adición de rutamicina previa a la nonactina y nigericina, no afecta la penetración de  $Cs^+$  al interior de la mitocondria (Panel C, Fig. 2) en presencia del glutamato + ATP. Sin embargo, vuelve otra vez inespecífica la selectividad de la nigericina, puesto que el antibiótico vuelve a causar eflujo de  $Cs^+$ .

Como además de los datos anteriores, el ADP no -- reemplaza al ATP se consideró que el ortofosfato liberado en el proceso de hidrólisis del ATP podría ser el responsable de los efectos adscritos al nucleótido. La Fig.

3 muestra que dichas suposiciones por completo correcta. Cuando la oxidación de glutamato es estimulada por valinomicina  $9 \times 10^{-7} M$  en presencia de 10mM acetato (trazos superior e inferior izquierdo, Fig. 3) la nigericina -  $1.4 \times 10^{-6} M$  - inhibe por completo la oxidación del -- substrato tanto con  $K^+$  como en  $Cs^+$ . Sin embargo cuando el acetato es reemplazado por 10mM de fosfato inorgánico (trazo del lado derecho, Fig. 3), la nigericina - muestra una especificidad casi absoluta por  $K^+$  para inhibir el consumo de oxígeno. Sugerimos que la nigericina causa un eflujo de  $K^+$  relativamente igual al de  $Cs^+$ , así como de cantidades equivalentes de substratos oxidables en presencia de acetato, mientras que en la presencia de fosfato el eflujo de  $K^+/Cs^+$  junto con substratos aniónicos es proporcionalmente mayor.

Efecto del Fosfato y el Succinato en la  
Selectividad Iónica de la Dianomicina.

El fosfato inorgánico formado durante la hidrólisis de ATP, a diferencia de la nigericina, aparentemente -- requiere de la oxidación de succinato para modificar



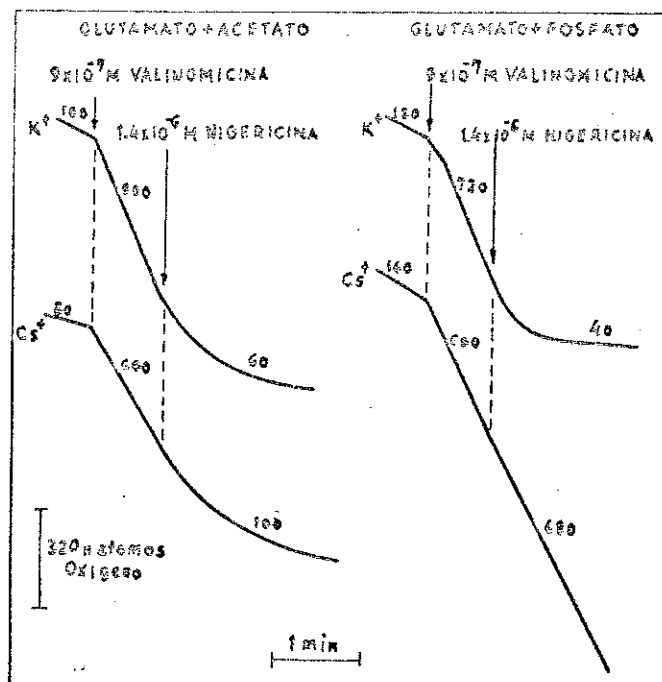


FIG. 3. El efecto del acetato y el fosfato en la inhibición por la nigericina de la oxidación de glutamato estimulada por valinomicina en presencia de  $K^+$  o  $Cs^+$  en mitocondrias de hígado de rata. La mezcla de reacción contiene: 6mM KCl o CsCl, 6mM glutamato (TEA), 10mM TEA (HCl) pH 7.4, 200mM sacarosa, 1.3mg N mitocondrial, y donde se indica, 2.4 o 10mM de fosfato o acetato (TEA) respectivamente. La valinomicina y la nigericina se añadieron a concentraciones de  $9 \times 10^{-7}$  y  $1.4 \times 10^{-6}$  M respectivamente. Volumen final 5.0 ml. temperatura  $25^\circ$ .

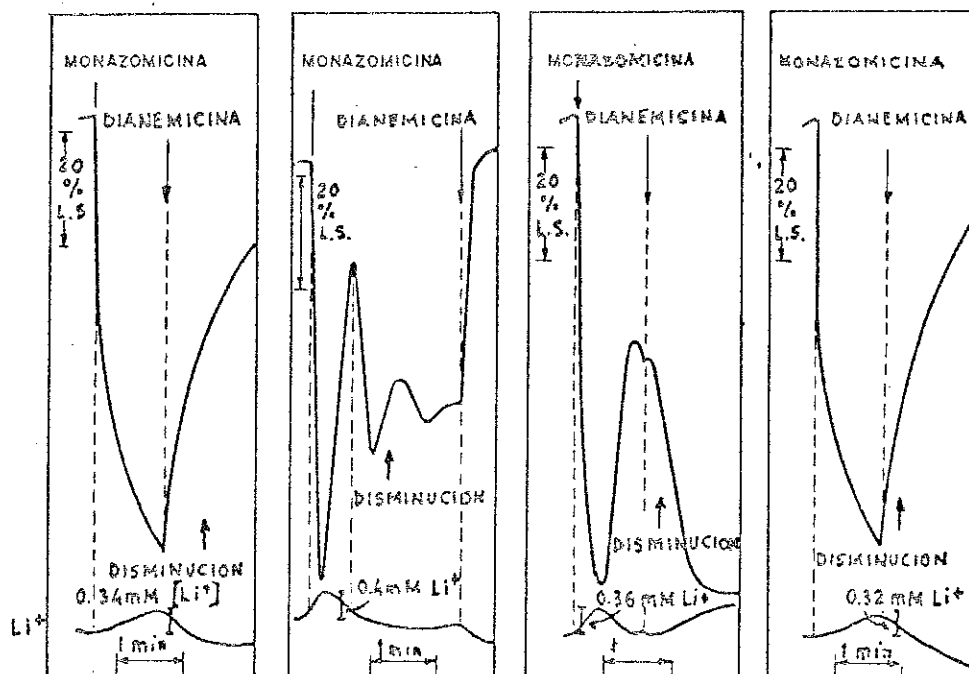


FIG. 4. El efecto del succinato y el ATP en los movimientos de  $Li^+$  y las variaciones en la dispersión de la luz inducidas por la monazomicina y la dianemicina en la mitocondria. La mezcla de reacción contiene: 15mM LiCl, 10mM trietanolamina ( $Cl^-$ ) pH 7.4, 10mM acetato trietanolamina, 125mM sacarosa y 1.0 a 12mg nitrógeno mitocondrial. La monazomicina, la nigericina y la dianemicina se añadieron a las concentraciones de  $1.2 \times 10^{-7}$  M,  $1.4 \times 10^{-6}$  M y  $1.2 \times 10^{-6}$  M respectivamente. Panel A: 10 mM succinato (TEA); panel B, 6 mM tris-ATP; paneles C y D 6mM tris-ATP + 10mM succinato.

la selectividad iónica de la dianemicina. La evidencia experimental de este hecho se encuentra en la figura 4. Cuando la oxidación del succinato (Panel A, Fig. 4) o la hidrólisis de ATP (Panel B, Fig. 4) energizan la entrada de  $\text{Li}^+$  inducida por monazomicina, la dianemicina causa una muy rápida salida del catión acumulado en ambas condiciones. Por otro lado, cuando tanto el ATP como el succinato están presentes en el medio de reacción (Panel C, Fig. 4) la dianemicina es incapáz en lo absoluto de causar eflujo de  $\text{Li}^+$  acumulado. Es más, el antibiótico sobre-estimula la penetración o acumulación del catión dentro de la mitocondria. La adición subsecuente de 40 mM KCl (no se muestra en la gráfica) causa una inmediata reversión del trazo de dispersión de la luz. Esto indica que en presencia de succinato y ATP el  $\text{K}^+$  y no el  $\text{Li}^+$  es asequible a la dianemicina. La rutamicina cambia por completo el patrón de respuesta al  $\text{Li}^+$  de la dianemicina en presencia de succinato y ATP (Panel D, Fig. 4). Entonces, es aparente que el fosfato liberado del ATP, así como el succinato, son responsables de los efectos aparentemente adscritos al ATP y al substrato en presencia de dianemicina.

Efecto de Nucleósido Mono-, di- y trifosfatos  
en la selectividad iónica de Nigericina  
dependiente del ATP.

Tanto el ADP como los inosin, timidin, uridin y guanosin mono-, di- y trifosfatos no substituyen al ATP (Tabla I). Por el contrario, dichos nucleótidos antagonizan o previenen la posibilidad de que el ATP ejerza su acción en los experimentos anteriores. La figura 5 indica que el número de residuos fosforilados en los uridin-nucleótidos determina la magnitud de su antagonismo con el ATP, mediado a través de la competencia por el transporte de  $\text{Li}^+$ , tanto en la fase de influjo neto (mediado por la monazomicina), como en la de eflujo neto (catalizado por la nigericina). El orden de efectividad de los uridin nucleótidos para competir con el ATP es: UTP > UDP > UMP. Los inosin-nucleótidos reemplazan a los uridin nucleótidos para competir con el ATP por el transporte de cationes monovalentes. El requerimiento cuantitativo del ITP para competir con el ATP se muestra en la Figura 6.

La tabla II señala un estudio comparativo de la

TABLA II

El efecto de nucleótidos, nucleósidos y un análogo fosfónico del ATP en los cambios de absorbancia lumínica causados por la monazomicina y la nigericina en mitocondrias en un medio que contiene Li+ y ATP

Las condiciones experimentales son esencialmente iguales a las de la Fig. 1. Los datos experimentales se obtuvieron a los 15, 30 y 60 segundos posteriores a la adición de la monazomicina. La nigericina se añadió 1 minuto después de la monazomicina.

ATP mas	Cambios de la dispersión de la luz					
	Después de la monazomicina			Después de la nigericina		
	15	30	60	15	30	60
	<u>% de cambio en la absorbancia</u>			<u>% de cambio en la absorbancia</u>		
ATP (sin adiciones)	63	48	37	48	56	52
TTP	40	32	22	6	5	4
TDP	47	37	24	12	16	22
TMP	54	50	26	24	33	49
Timidina	68	65	34	52	56	60
ITP	46	38	31	12	10	8
IDP	54	52	34	17	19	21
IMP	60	47	36	27	37	60
Inosina	68	49	37	49	59	69
GTP	49	41	34	20	19	18
GDP	54	46	34	21	22	26
GMP	57	52	35	25	29	38
CTP	56	50	34	24	29	38
CDP	57	52	34	25	30	41
CMP	58	54	34	27	33	45
ADP	34	36	36	19	16	12
Análogo fosfórico del ATP	37	39	39	19	17	13

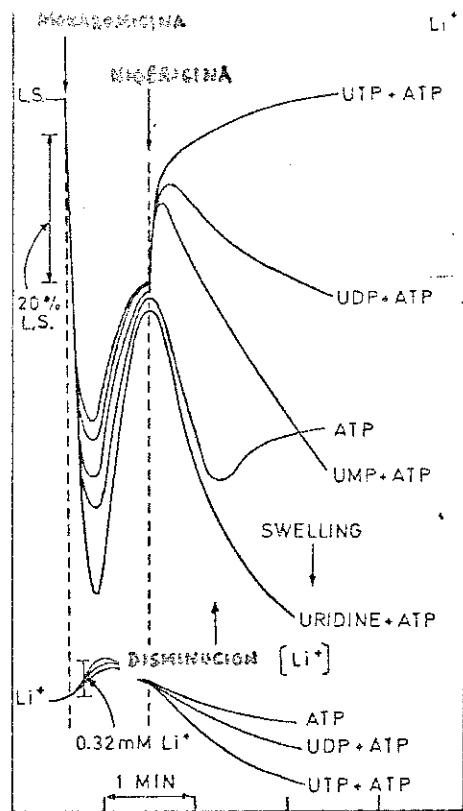


FIG. 5. El efecto de los nucleósidos mono-di- y trifosfatos de uridina y de la uridina libre en los movimientos de  $\text{Li}^+$  y los cambios de dispersión de la luz inducidos por la nigericina y la monazomicina en presencia de ATP en mitocondrias de hígado de rata. El medio experimental contiene 10mM trietanolamina ( $\text{Cl}^-$ ) pH 7.4, 10mM acetato-TEA, 6mM tris-ATP, 15mM  $\text{LiCl}$ , 150mM sacarosa y 1.2 mg de nitrógeno mitocondrial. Las sales de tris de UTP, ADP y UMP se añadieron a la concentración de 6mM.

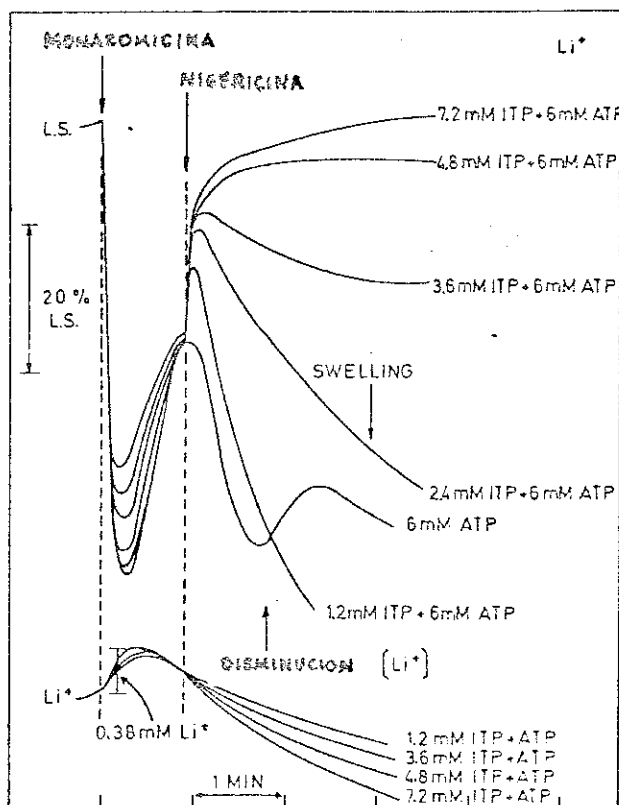


FIG. 6. El efecto de concentraciones crecientes de ITP en los movimientos de  $\text{Li}^+$  y en los cambios de dispersión de la luz inducidos por la monazomicina y la nigericina en presencia de ATP en mitocondrias de hígado de rata. Las condiciones experimentales son básicamente iguales a las señaladas en la Fig. 5 excepto por la adición de las concentraciones indicadas

especificidad relativa de diferentes nucleosidos mono-, di- y trifosfatos para interferir con los efectos del ATP en la selectividad del transporte  $\text{Li}^+ / \text{K}^+$  catalizado por antibióticos ionoforéticos. Los nucleótidos de uridina, inosina y timidina muestran una eficiencia similar para competir con el ATP en función del número de residuos fosforilados que poseen. Los guanosin nucleótidos son proporcionalmente menos activos que los nucleótidos anteriores, mientras que los citidin- nucleótidos son los menos eficientes de todos los nucleótidos estudiados para competir con el ATP. Entonces, no sólo la carga negativa neta del nucleótido, dependiente de los fosfatos que posee, sino también su estructura química general afecta su capacidad de interferir con los efectos de ATP. El ADP es el más eficiente de todos los nucleótidos para competir con el ATP (Tabla II).

Efecto del ITP y el UTP en la actividad de ATPasa y en la Translocación de Fosfato energizada por ATP.

Los efectos inhibidores de los nucleótidos en el transporte de iones arriba señalados, sólo se observan

cuando dicho proceso es energizado por el ATP, pero no cuando lo es por sustratos oxidables. Por esta observación se consideró que en presencia de nigericina, los nucleótidos podrían indirecta o tangencialmente influir sobre la translocación de cationes monovalentes, al -- inhibir la actividad de ATPasa mitocondrial o bien el - transporte de contra-ión fosfato a su vez energizado por ATP. Las Tablas III y IV indican que los nucleótidos -- compiten con el ATP sin interferir en lo absoluto con los dos parámetros antes mencionados. Estos datos negativos sugirieron que el efecto de nucleótidos pudiera ser implementado sobre el antibiótico o sobre la estructura o carga eléctrica neta de la membrana. Esta última posibilidad se valoró al estudiar la influencia de diversos nucleósidos mono-, di y trifosfatos en la fluorescencia de bromuro de etidio (Gitler, Rubalcava y Caswell, 1969), un monitor de membrana que aparentemente detecta no sólo cambios microscópicos en la hidrofobicidad de membranas, sino variaciones de campo eléctrico de superficie (Estrada O., Rubalcava y Gitler, 1971).

TABLA III

El efecto del ITP y la nigericina en la ATPasa mitocondrial estimulada por la nonactina en un medio que contiene Cs+.

El medio para el ensayo de la ATPasa contiene 6mM tris-ATP, (pH 7.4), 10mM trietanolamina (Cl-), 10mM acetato (TEA), 15mM CsCl, 150mM sacarosa y mitocondrias equivalentes a 0.06 g hígado en 0.3ml de 0.25M sacarosa. La nigericina y la nonactina se añadieron a una concentración de  $1.4 \times 10^{-6}$  y  $10^{-7}$ M respectivamente. La sal de tris del ITP se añadió a 6mM final. Se tomó un ml del medio a los tiempos señalados, haciéndose la determinación de fosfato inorgánico.

Adición	Pi liberado después de				
	1 min	2 min	3 min	4 min	5 min
	umoles Pi/0.2 mg N.				
Ninguna	0.06	0.12	0.14	0.18	0.21
Nonactina + ITP (sin ATP).	0.06	0.10	0.12	0.17	0.19
Nonactina	0.42	0.78	1.03	1.26	1.45
Nonactina + nigericina	0.40	0.72	0.98	1.14	1.38
Nonactina + ITP	0.68	1.03	1.39	1.48	1.61
Nonactina + ITP + Nigericina	0.72	1.06	1.42	1.53	1.68



TABLA IV

El efecto de los nucleótidos y los cationes monovalentes en la acumulación de fosfato inorgánico en mitocondrias de hígado de rata.

Se incubaron mitocondrias equivalentes a 2.3mg N por 10 min a 30° en 2 ml de un medio que contenía: 5mM fosfato (TEA) pH 7.4, conteniendo 15,000 cpm de (<sup>32</sup>P) Pi, 7.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM trietanolamina (Cl<sup>-</sup>), 160 mM sacarosa y 15mM de los cationes monovalentes indicados. Los nucleótidos (sales de tris) se añadieron a una concentración de 6mM. Se presentan los valores promedio de 3 experimentos independientes que proporcionaron valores muy similares.

Adiciones	Pi acumulado en la mitocondria		
	LiCl	KCl	CsCl
	<u>nmolas Pi acumulado /mg N</u>		
Ninguna	201	203	192
ATP	543	513	546
ITP	295	320	381
UTP	282	343	364
ATP + ITP	524	581	662
ATP + UTP	606	581	669

Efecto de Nucleótidos en la Fluorescencia de  
Bromuro de Etidio en Membranas Mitocondriales.

La adición de 5  $\mu\text{M}$  de etidio a una suspensión de mitocondrias intactas resulta en un aumento aproximado de fluorescencia 21 ordenes de magnitud superior al de etidio en ausencia de partículas. La adición subsecuente de antimicina A o valinomicina más  $\text{K}^+$  resulta en un decremento de la fluorescencia de aproximadamente 25% (Fig. 7A). Después de que el trazo de fluorescencia -- adquirió un valor constante, 1 mM ATP causa un aumento inmediato en la fluorescencia del etidio aproximadamente 40% superior a la fluorescencia del monitor con las membranas en ausencia de antimicina. La adición de 1.5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  abate el efecto de ATP en fluorescencia, pero no al nivel observado con antimicina A. Como se observa en la Figura 7B, el ATP es capaz de inducir un aumento significativo de la fluorescencia del etidio en ausencia de la adición previa de antimicina. La titulación contra pH de la fluorescencia de bromuro de etidio en un sistema micelar neutro (Brij 36T) con respecto a uno aniónico (dodecil

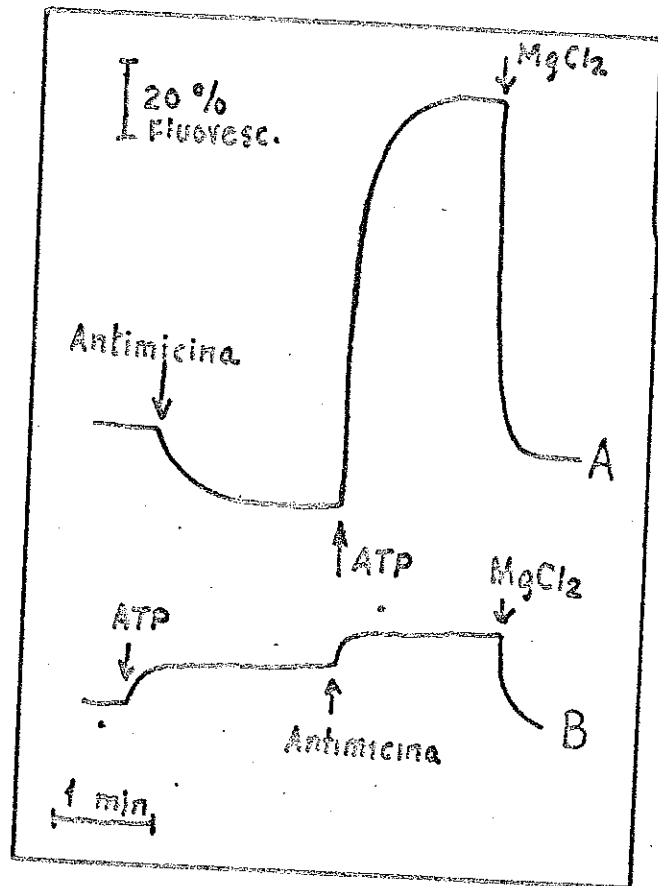


FIG. 7. El efecto del ATP y la antimicina en la fluorescencia del bromuro de etidio en mitocondrias intactas de hígado de rata. La mezcla de reactivos contiene 10mM trietanolamina (Cl<sup>-</sup>) pH 7.4, 15mM KCl, 2mM tris-ATP,  $2 \times 10^{-6}$ M antimicina, 180mM sacarosa, 5 $\mu$ M de bromuro de etidio y 1.5mg de nitrógeno mitocondrial en 3.0ml volumen.

fosfato de sodio) y a una dispersión liposomal de lípidos totales de mitocondrias, se observa en la figura 8A. Es en el sistema aniónico, o sea donde existe un predominio de superficie de carga negativa (dodecil fosfato) que la fluorescencia del etidio es mayor. En el Panel B de la Figura 8 se observa el efecto del cambio de pH en la fluorescencia de etidio en membranas mitocondriales intactas así como con antimicina o antimicina + ATP. En los tres casos, la fluorescencia del etidio, que a valores bajos de pH es similar a la fluorescencia de etidio no unido a membranas, aumenta con el incremento de carga negativa de las membranas hasta pH 10, donde se abate la fluorescencia con rapidez. Las membranas intactas muestran una inflexión inicial a pH 4.5 seguida por una segunda a pH 9. En presencia de antimicina (o valinomicina +  $K^+$ ) la principal diferencia parece ser un decremento en el número de grupos ionizables con un  $pK'_{app}$  aparente de 4.5. Por otro lado, estos aparecen en el punto de inflexión a pH 7.5, seguidos de otros grupos - que ionizan con sus  $pK'_{app}$  cercano a 9.5. El trazo de ATP + antimicina se caracteriza por la aparición de un número elevado de grupos ionizables con un  $pK'_{app}$  de

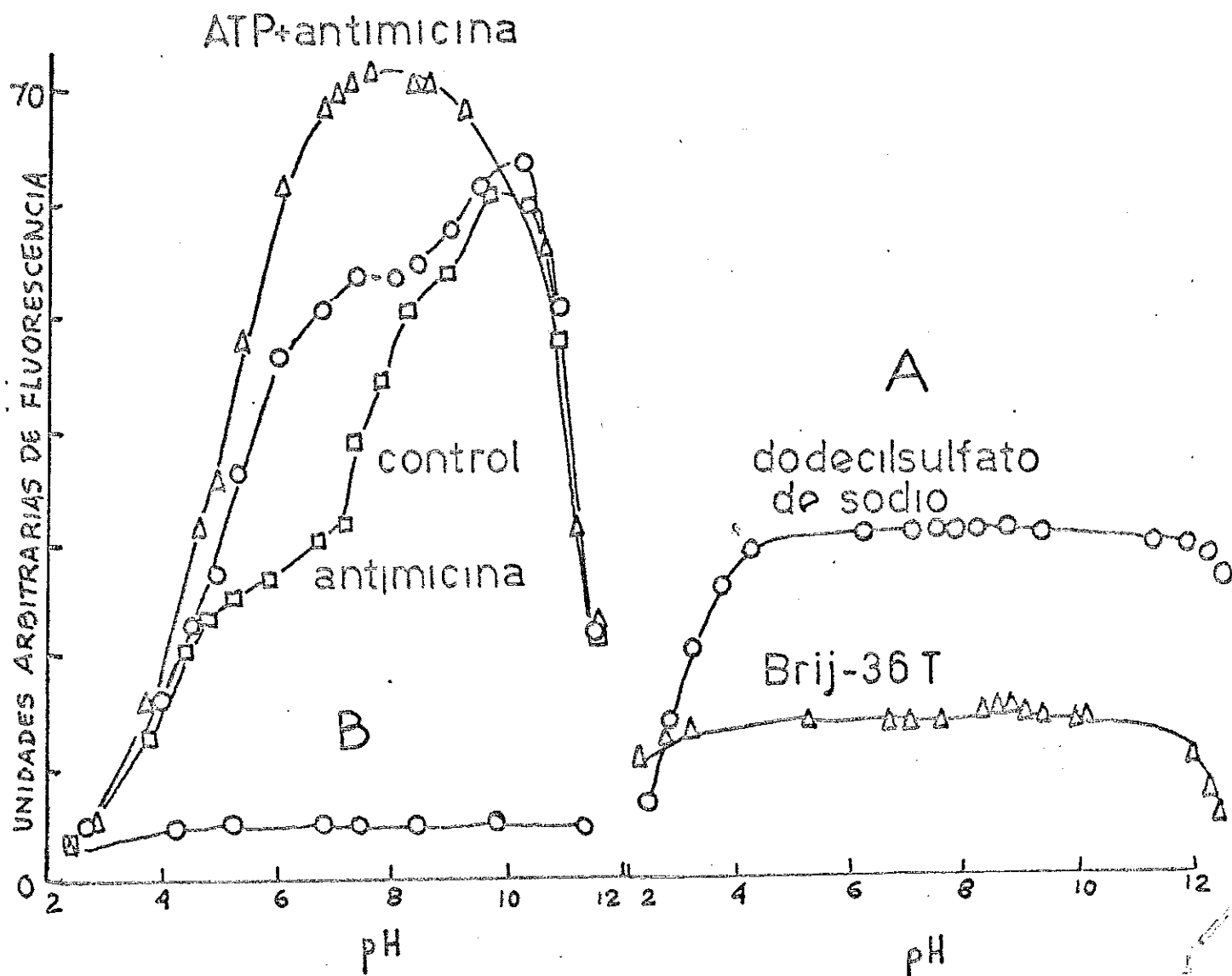


FIG. 8. El efecto del cambio de pH en la fluorescencia de bromuro de etidio unido a micelas de detergente y a membranas mitocondriales de hígado de rata. El medio es igual al de la Fig. 7. (excepto por la omisión de ATP y antimicina. Otras adiciones son; Panel A: 50mM Brij-36T y 20mM lauril sulfato de sodio. Panel B, mitocondrias equivalentes a 1.5mg N, 1mM tris-ATP y 3 $\mu$ g/ml antimicina.

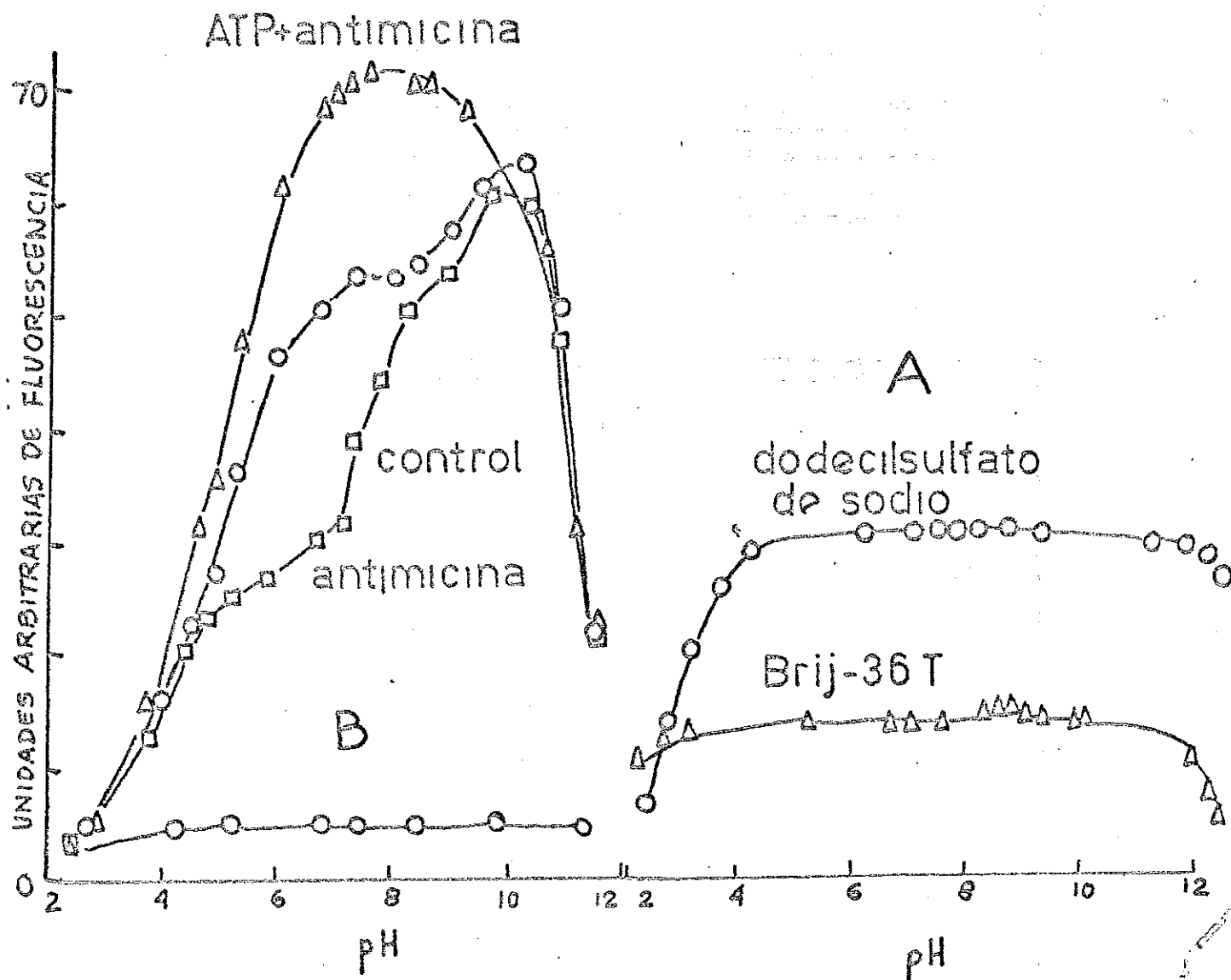


FIG. 8. El efecto del cambio de pH en la fluorescencia de bromuro de etidio unido a micelas de detergente y a membranas mitocondriales de h. gado de rata. El medio es igual al de la Fig. 7. (excepto por la omisión de ATP y antimicina. Otras adiciones son; Panel A: 50mM Brij-36T y 20mM lauril sulfato de sodio. Panel B, mitocondrias equivalentes a 1.5mg N, 1mM tris-ATP y 3µg/ml antimicina.

aproximadamente 5. Como destaca en la Tabla V, los efectos de ATP y antimicina descritos no son debidos a inducir un cambio en el número de sitios de interacción de etidio con la membrana sino a un incremento neto en la eficiencia cuántica de la fluorescencia del monitor.

Diferentes nucleótidos substituyen al ATP para incrementar la fluorescencia del etidio en mitocondrias intactas así como en fragmentos de membranas mitocondriales obtenidas por sonicado. La Tabla V señala que el aumento relativo de fluorescencia causado por nucleótidos de adenina, uridina, citidina o inosina depende sólo del número de residuos fosforilados que poseen (tal como el factor que regula la competencia entre nucleótidos por transporte de iones - véase la Tabla III\_).

T A B L A V

EL EFECTO DE LOS NUCLEOTIDOS EN LA FLUORESCENCIA DEL BROMURO DE ETIDIO UNIDO A MEMBRANAS MITOCONDRIALES INTACTAS Y A PARTICULAS SUBMITOCONDRIALES.

El Medio Experimental es igual al de la Figura 7. Se añadieron las sales de Na<sup>+</sup> de los nucleótidos a concentración de 1mM. En mitocondrias intactas los nucleótidos se añadieron después de la antimicina. El EDTA y el EGTA estuvieron presentes a la concentración de 2mM.

Adición	Fluorescencia Máxima en Unidades Arbitrarias	
	Mitocondrias intactas	partículas submitocondriales
ATP . . . . .	38	48
UTP . . . . .	39	46
CTP . . . . .	38	46
ITP . . . . .	36	47
ADP . . . . .	7	18
UDP . . . . .	5	16
IDP . . . . .	8	--
UMP . . . . .	1	0
IMP . . . . .	0	0
EDTA . . . . .	36	--
EGTA . . . . .	3	--



T A B L A I

El efecto del antibiótico X-537A en la ATPasa mitocondrial estimulada por conductores de cationes y de protones. El medio de incubación es sensible mente igual al de la Fig. 2 excepto por las adiciones señaladas.

Adiciones	ATPasa estimulada en un medio que contiene					
	Li <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Rg <sup>+</sup>	Cs <sup>+</sup>	Cloruro de colina
	<u>μmolas de Pi/0.2 mg N.</u>					
Monazomicina	1.5	1.7	1.9	2.2	2.0	0.75
Monazomicina + X-537A	0.74	1.6	1.9	2.0	2.1	0.03
Valinomicina	---	---	1.9	2.4	1.3	----
Valinomicina + X-537A	---	---	1.9	2.3	1.2	----
Nonactina	---	0.9	1.6	1.9	1.7	----
Nonactina + X-537A	---	0.9	1.5	1.9	1.6	----
2,4-dinitrofenol	---	---	2.2	2.1	---	1.8
2,4-dinitrofenol + X-537A	---	---	0.4	0.6	---	0.6

## DISCUSION

Las observaciones descritas en esta sección de la presente tesis indican que existe un requerimiento de ATP para que se lleve a cabo eflujo catiónico selectivo para  $K^+$  inducido por nigericina, después de que la monazomicina o la nonactina acumularon diferentes cationes monovalentes dentro de la mitocondria. En un medio que contiene acetato, es sólo con la adición de ATP y no de substratos oxidables, que la nigericina causa un eflujo de  $K^+$  mayor que de  $Rb^+$  o  $Na^+$  sin sensiblemente afectar los movimientos de  $Li^+$  o  $Cs^+$  (Fig. 1). Es también después de la adición simultánea de ATP y succinato que la dianemicina se hace selectiva para inducir el eflujo de  $K^+$  y no de  $Li^+$  (Figura 4).

### Los flujos de Aniones y Protones Regulan la Selectividad Catiónica de Antibióticos Carboxílicos en la Mitocondria.

Es obvio que los efectos aparentemente adscritos al ATP son debidos al ortofosfato liberado de este nucleótido (Figs. 2 y 3). La incapacidad de otros nucleótidos

para substituir al ATP en este parámetro (ADP, análogo fosfónico de ATP y diferentes nucleósidos mono-, di- y trifosfatos (véase Tabla I) puede explicarse por esta sugestión.

El acetato no substituye al fosfato inorgánico en los experimentos anteriores, como tampoco lo hace en -- otros fenómenos de membrana mitocondrial (Estrada-O., y Col., 1967a , Ferguson y Williams, 1967). Nuestras presentes observaciones pueden explicarse si se asume que la capacidad del antibiótico para producir el eflujo de determinados cationes de la mitocondria, depende tanto de la diferencia intra/extramitocondrial de pH como de la afinidad relativa del ionóforo por el catión monovalente. En el caso del eflujo de  $\text{Li}^+$  o  $\text{Cs}^+$  causados por la nigericina en presencia de acetato, cationes por los cuales el antibiótico muestra muy baja afinidad (Estrada-O., y Col., 1967a), la concentración extramitocondrial de -- protones parece tener una gran importancia para facilitar el intercambio catión/protón catalizado por el antibiótico. Por otro lado, en condiciones similares, la capacidad de la nigericina + acetato para inducir eflujo de  $\text{K}^+$  intramitocondrial, un catión que es muy efi-

cientemente clatrado por el antibiótico (Pressman 1968), puede ser menos dependiente de la concentración extramitocondrial de protones. Mitchell y Moyle (1969) y -- Chappell & Haarhoff (1967) han sugerido que la translocación de acetato se lleva a cabo a través de membranas por un mecanismo de tipo uniport con protones, mientras que el fosfato se lleva a efecto a través de un simport simport protón-anión (Mitchell y Moyle, 1969). La protonación de ambos ácidos ionizados explicaría su translocación a través de la membrana lipídica. Como el acetato tiene una constante de ionización más baja que la del fosfato (Chappell y Haarhoff, 1967), requiere una concentración extramitocondrial de  $H^+$  más baja que el fosfato para su protonación y subsecuente translocación. Entonces, es muy factible que, después de que la nigericina causó la eyección de acetato acumulado previamente, el anión se ioniza fácilmente fuera de la mitocondria, proveyendo una eficiente poza móvil de protones para intercambiarla por  $Li^+$  o  $Cs^+$  intramitocondriales. El ortofosfato no facilita el aflujo de  $Li^+$  por la nigericina porque requiere de una alta concentración intramitocondrial de protones para ser eficien

temente translocado hacia el exterior de la mitocondria. Una alta concentración intramitocondrial de protones es favorecido por la nigericina sólo cuando esta induce un eficiente eflujo de cationes fuera de la mitocondria, lo cual obviamente no ocurre cuando el  $\text{Li}^+$  es el catión acumulado. En apoyo a nuestra proposición, Palmieri y Quagliariello (1969) encontraron que la nigericina induce un eflujo de acetato más eficiente que el de fosfato de mitocondrias suspendidas en un medio libre de cationes monovalentes.

Los conceptos anteriores establecen experimentalmente por primera vez en la literatura, que la translocación de protones y aniones, concomitantes con los movimientos de cationes monovalentes, determina en forma importante la selectividad catiónica de ionóforos carboxílicos como la nigericina. El requerimiento de succinato para que el ortofosfato proveniente del ATP modifique la selectividad a  $\text{Li}^+$  de la dianemicina (Panel C de la Figura 4) puede también explicarse al postular una importante participación de la translocación de aniones en la regulación de la velocidad del flujo

de cationes a través de una membrana. Se ha demostrado que el L-malato formado durante la oxidación del succinato, estimula la translocación de fosfato a través de la membrana mitocondrial (Papa, Lofrumento, Loglisci & Quagliariello, 1969). Es probable que la acumulación de L-malato durante la oxidación del succinato facilite la translocación de fosfato liberado del ATP (Figura 4). Entonces, los movimientos netos de cationes mostrados en la Figura 4, podrían ser determinados por los movimientos de protones que acompañan al transporte de fosfato y por la afinidad relativa de la dianemicina y la monazomicina por los cationes monovalentes.

Papel Regulador de los Nucleótidos en la  
Translocación Selectiva de Cationes a Través  
de la Membrana Mitocondrial.

El ADP, un análogo fosfónico del ATP y varios nucleósidos mono-, di- y trifosfatos diferentes al ATP inhibieron la capacidad de este último nucleótido para energizar la acumulación de  $\text{Li}^+$  medida por la monazo-

micina. También bloquearon la inhibición causada por ATP del eflujo de cationes mitocondriales catalizado por la nigericina. El efecto inhibitor de los nucleótidos diferentes al ATP no puede ser debida a ortofosfato libre, ya que este último radical no es liberado de los nucleótidos en membranas mitocondriales.

La efectividad de los nucleótidos como inhibidores depende sin embargo del número de sustituyentes fosfato que poseen en el orden: NTP>NDP>NMP. Los nucleósidos y las bases nitrogenadas libres son inactivos. Una pregunta central de los resultados anteriores es si el mecanismo por el cual los nucleótidos inhiben el efecto del ATP se debe a: a) Inhibición de la hidrólisis de ATP en el sitio activo de la ATPasa; b) Interferencia con la translocación de fosfato liberado del ATP o, c) Un efecto de nucleótidos independientes a a) o b). Los argumentos en contra de a) incluyen el hecho conocido de que sólo el ATP y ningún otro nucleósido trifosfato es hidrolizado por la

ATPasa de membrana mitocondrial (Pullman y Coll., -- 1960; Low, Vallin y Alm, 1963). También es claro que el ADP y el ATP pero no el ITP penetran a través de la membrana mitocondrial intacta. (Ducé y Vignais, 1969). Es más, como ha sido demostrado por Pullman y Col., (1960) la hidrólisis de ATP catalizada por la ATPasa  $F_1$  extraída de la membrana mitocondrial, es inhibida por ADP pero no por GDP, UDP, IDP y otros nucleósidos fosforilados. Sin embargo, en nuestros experimentos, los efectos del ATP en transporte de iones son inhibidos de modo significativo por IEP, GDP, ADP, TDP o -- UDP. (Tabla II). La Tabla III también muestra que ni el ITP o el UTP causan inhibición en el curso temporal de la ATPasa inducida por monazomicina en presencia de nigericina y  $Li^+$ . El postulado b) puede eliminarse por el hecho de que ni el ITP o el UTP inhiben la acumulación mitocondrial de fosfato energizado por ATP (Tabla IV). Entonces, la alternativa que se plantea en lugar central es un papel regulador de los nucleótidos en el control estructural o de carga eléctrica de superficie de la membrana (ambos efectos po-



drían ser interdependientes) que sea primario a alteraciones secundarias en los movimientos de protones y cationes a través de la membrana mitocondrial. Esta posibilidad se discute en las siguientes líneas.

Efectos de nucleótidos en la Fluorescencia de Bromuro de Etidio y en la Selectividad iónica de la membrana mitocondrial.

Los resultados de la figura 8 claramente señalan las interesantes características del bromuro de etidio como monitor de membrana. La intensidad de fluorescencia del etidio incrementa al doble cuando este compuesto interacciona con una micela neutra (Brij 36-T). Por otro lado, la fluorescencia aumenta 6 órdenes de magnitud cuando el monitor se solubiliza en una micela aniónica de dicetilfosfato de sodio. Entonces, el monitor no sólo muestra sensibilidad para reconocer sitios hidrofóbicos en la membrana sino para detectar la presencia de carga negativa en la vecindad del sitio hidrofóbico. El efecto del cambio de pH en las -

váridaciones de la fluorescencia del etidio unido a membranas mitocondriales (Fig. 8) es de gran interés. La determinación del número de sitios de membrana con los que interacciona el etidio a pH 7.2 (Gitler y col. 1970; Estrada-O, Rubalcava y Gitler, 1971), han indicado que la antimicina o la antimicina + el ATP no afectan el número de sitios con los que interacciona el etidio sino su eficiencia cuántica neta. Con este dato en mente, los datos presentados pueden interpretarse de la siguiente manera. Los sitios de membrana con los cuales interacciona el etidio, contienen grupos carboxilo y dos tipos de grupos catiónicos. Uno con un  $pK'_{(app)}$  cercano a 7.5 y otros con un  $pK'_{(app)}$  aproximado de 9.2. En las membranas sin ditiones, el aumento de fluorescencia paralelo al aumento de pH es debido a la ionización de los grupos carboxilo seguida de la de residuos catiónicos fuertemente básicos. Ambos incrementarían el carácter negativo del sitio de interacción del etidio. La antimicina condiciona la desaparición de la

señal de grupos catiónicos (imidazoles ?) con  $pK_{(app)}$  de 7.5. Por otro lado, en las membranas mitocondriales que contienen ATP u otros compuestos fuertemente aniónicos, es posible considerar que los grupos catiónicos con  $pK_{(app)}$  de 7.5 son neutralizados por el nucleótido añadido y que el sitio de interacción del etidio muestra la carga negativa de los carboxilos además de la aniónica de nucleótido.

El efecto de nucleótidos en la selectividad iónica inducida por el ATP (Tabla II), así como en la fluorescencia del bromuro de etidio (Tabla V) depende de la carga negativa neta de los nucleótidos. Ambos parámetros son paralelamente afectados por los nucleótidos en función del número de substituyentes fosfato que poseen. Entonces, es razonable proponer que los efectos de los nucleótidos en la carga eléctrica microscópica de la superficie membranal pueden afectar la selectividad iónica de antibióticos ionoforéticos. Al modificar el potencial de campo eléctrico de superficie de sitios discretos de la membrana, los nucleótidos pueden indirectamente modificar la eficiencia de los recambios catión/protón que catalizan los

antibióticos ionoforéticos del tipo de la monazomicina. Los cambios en la selectividad iónica aparente de antibióticos del tipo de la nigericina o dianemicina podrían entonces ser consecuencia de los cambios primariamente implementados por los nucleótidos a nivel del modo de acción de la monazomicina o la nonactina.

IV

TRANSLOCACION DE IONES CATALIZADA POR  
METABOLITOS MICROBIANOS COMO MODELO DE TRANSPORTE  
DE IONES EN MEMBRANAS BIOLÓGICAS.

## INTRODUCCION

El o los mecanismos moleculares a través de los cuales es probable que un catión monovalente cruce una barrera lipídica impermeable a iones, constituye un problema central en la comprensión de las funciones de una membrana. Sin embargo, la dificultad inherente a aislar de las membranas los sistemas naturales que participan en la translocación de cationes monovalentes o bien en reconocer la topología que guardan en el mosaico de la membrana, ha limitado la comprensión sobre la naturaleza del fenómeno de transporte iónico a nivel molecular. A su vez, la relación estructural y funcional que guardan los loci de transporte de iones con respecto a las macromoléculas de membrana que participan en mecanismos de acoplamiento energético (Vgr. ATP asas, acarreadores

de electrones, factores protéicos de acoplamiento etc.) constituye un aspecto de gran importancia para ser definido a nivel molecular.

La introducción de los antibióticos ionoforéticos del tipo de la valinomicina por el grupo de Pressman (1964) así como la de los antibióticos del tipo de la nigericina por parte nuestra (Estrada-O., y Col., 1967; Lardy y Col., 1967) permitió demostrar la existencia de acarreadores móviles en membranas lipídicas. La valinomicina y compuestos análogos no poseen grupos cargados eléctricamente pero contienen un arreglo de oxígenos en anillo, energéticamente favorable para reemplazar la capa de hidratación que rodea a los cationes monovalentes (a través de interacciones ión-dipolo). Estas moléculas son capaces de solubilizar a los cationes en el interior hidrofóbico de la membrana, formando complejos cargados que transportan al catión por un mecanismo de "acarreador móvil cargado" que inducen cambios notables en las propiedades eléctricas de membrana (Lev y Busninzky 1967; Mueller y Rudin, 1967; Eisenman, Ciani y Szabo, 1968). (Véase figura).

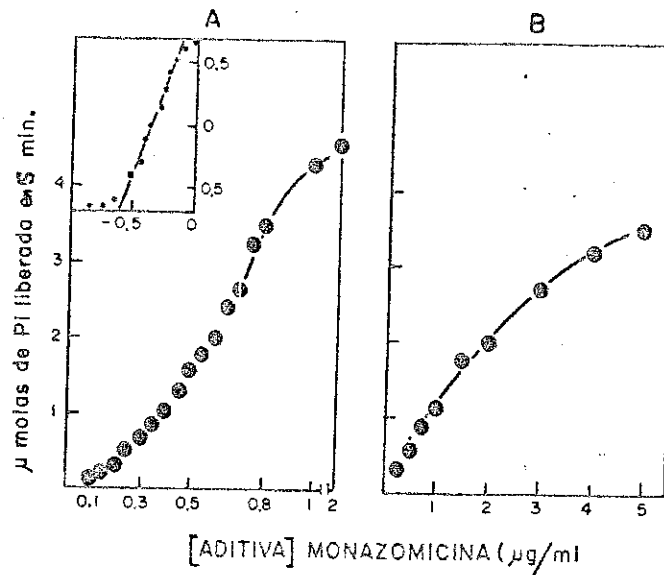


FIG. 3. El efecto de la concentración de la monazomicina en la actividad de ATPasa mitocondrial en presencia (Panel A) y ausencia (panel B) de KCl exógeno. El medio contiene 12mM tris-ATP, 10mM trietanolamina (Cl-) pH 7.4, 180mM sacarosa, mitocondrias provenientes de 0.06 g de hígado en 0.3ml de 0.25M sacarosa y las concentraciones señaladas de monazomicina en un volumen final de 1.0 ml a pH 7.4. El experimento del panel A contiene 24mM KCl. La gráfica insertada en el extremo superior izquierdo del panel A es una gráfica Log-Log de concentración de antibiótico contra Pi liberado. El experimento del panel B no contiene cationes monovalentes.

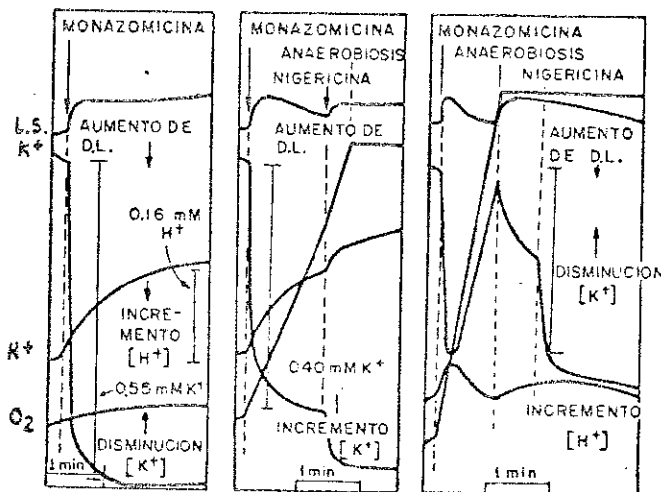


FIG. 4. El efecto de la monazomicina y diferentes substratos oxidables en los movimientos de K<sup>+</sup> y H<sup>+</sup>, cambios de dispersión de luz y consumo de oxígeno en mitocondrias suspendidas en un medio libre de cationes monovalentes. El medio contiene 10mM trietanolamina (Cl-) pH 7.4, 5mM Pi-TEA, 190 mM sacarosa, 2.3 x 10<sup>-7</sup>M monazomicina y 1.3mg N mitocondrial. El panel A contiene 10mM de ya sea glutamato, α-cetoglutarato, piruvato, L-malato o citrato; panel B 10mM succinato y 2.3x10<sup>-7</sup>M nigericina y panel C, 5mM glutamato+ 5mM L-malato.



que posee un orden de molecularidad superior a la unidad para inducir transporte de iones en membranas biológicas.

El antibiótico monazomicina no sólo estimula la translocación de cationes monovalentes cuando el ATP se utiliza como fuente de energía (Fig. 1) sino también -- cuando la energía proviene de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Figura 4). El antibiótico induce influjo de  $K^+$  al interior de la mitocondria, -- aparentemente en función de la concentración intra/ex-tramitocondrial de protones y no de la velocidad de -- oxidación de glutamato + malato. El transporte de iones catalizado por la monazomicina parece depender de la polaridad o "lateralidad" de la membrana mitocondrial. Como señalan el panel A y B de la figura 5, en las condiciones en las que la nigericina +  $K^+$  tetrafenilboro o la valinomicina + nigericina desacoplan la fosforilación oxidativa en partículas submitocondriales (Montal y Col., 1969; Cockrell y Racker, 1969), la monazomicina no afecta el control respiratorio inducido por la rutamicina. Estos últimos resultados también indican que el transporte de iones inducido por la monazomicina en membranas mitocondriales procede a través de un mecanismo

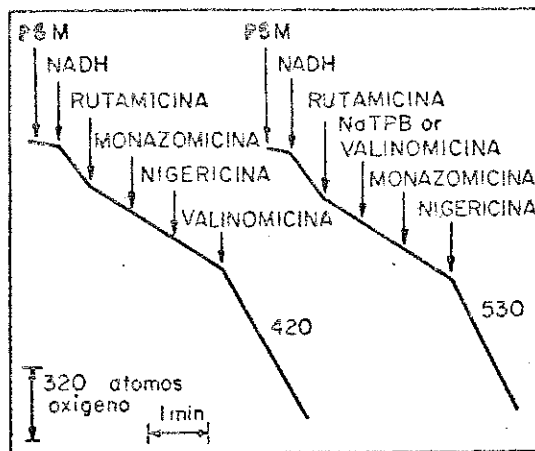


FIG. 5. El efecto de la monazomicina, la nigericina, la valinomicina y el tetrafenilboro ( $\text{Na}^+$ ) en el control respiratorio inducido por la rutamicina (oligomicina) en las partículas submitocondriales. El medio básico contiene: 200mM sacarosa, 50mM acetato-tris, 15mM KCl, 1.5mM DPNH, 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  rutamicina y, donde se indica,  $1 \times 10^{-6}\text{M}$  monazomicina,  $2.3 \times 10^{-7}\text{M}$  nigericina,  $1.3 \times 10^{-7}\text{M}$  valinomicina, 10 $\mu\text{M}$  tetrafenilboro y 1.5mg N de partículas submitocondriales.

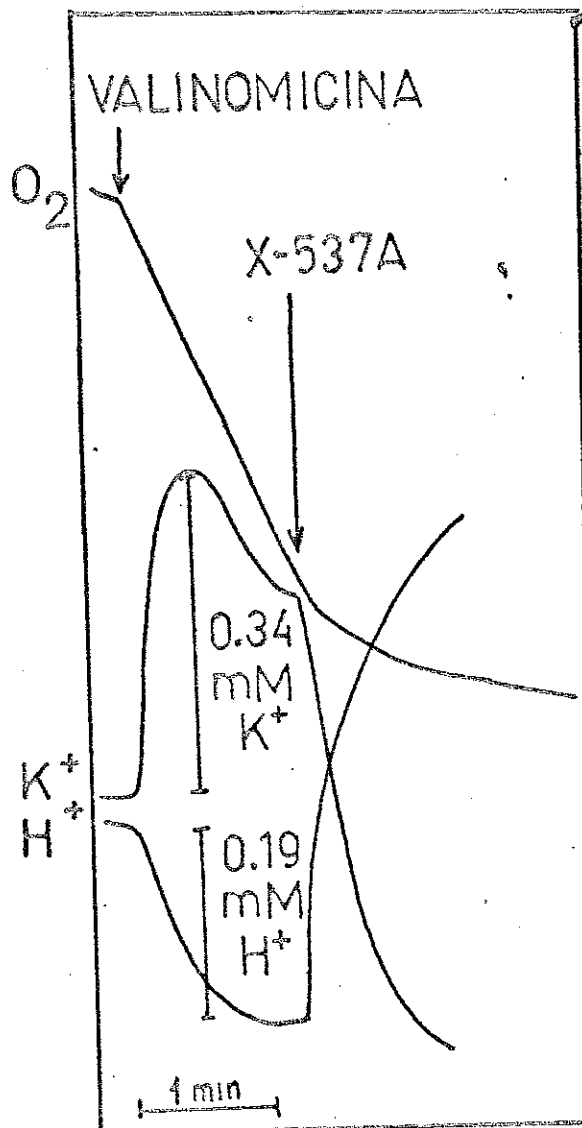


FIG. 6. El efecto del antibiótico X-537A y la valinomicina en los movimientos de  $\text{K}^+$  y  $\text{H}^+$  energizados por la oxidación del glutamato en mitocondrias de hígado de rata. El medio contiene 10mM trietanolamina ( $\text{Cl}^-$ ) pH 7.4, 7.5mM KCl, 10mM acetato-TEA, 2000 mM sacarosa 10mM glutamato,  $2.3 \times 10^{-7}\text{M}$  valinomicina,  $1 \times 10^{-7}\text{M}$  X-537Z y 1.4 mg N mitocondrial en 5ml de volumen.

diferente al seguido por ionóforos neutros como la --  
valinomicina o aniónicos como la nigericina.

Transporte de Iones Catalizado por el  
antibiótico HLR-537 en Membranas mitocondriales

Como indica la figura 6, el antibiótico carboxílico HLR-537, al igual que otros antibióticos aniónicos como la nigericina, recambia  $K^+$  por protones en membranas mitocondriales intactas. La translocación de cationes monovalentes inducida por el compuesto HLR-537 en membranas mitocondriales intactas es aparentemente en favor del gradiente de concentración de cationes. (Figura 6). Dicha circunstancia facilita una inhibición, por el antibiótico, de la acumulación y subsecuente -- oxidación de substratos oxidables del tipo del glutamato, tal como acontece con el transporte de substratos en presencia de otros antibióticos carboxílicos del tipo de la nigericina o la monensina (Graven, Estrada-O., y Lardy, 1966; Van-Dam, Harris, y Pressman, 1967; Estrada-O., y Calderón 1970). La selectividad del antibiótico HLR-537 para transportar cationes monovalentes

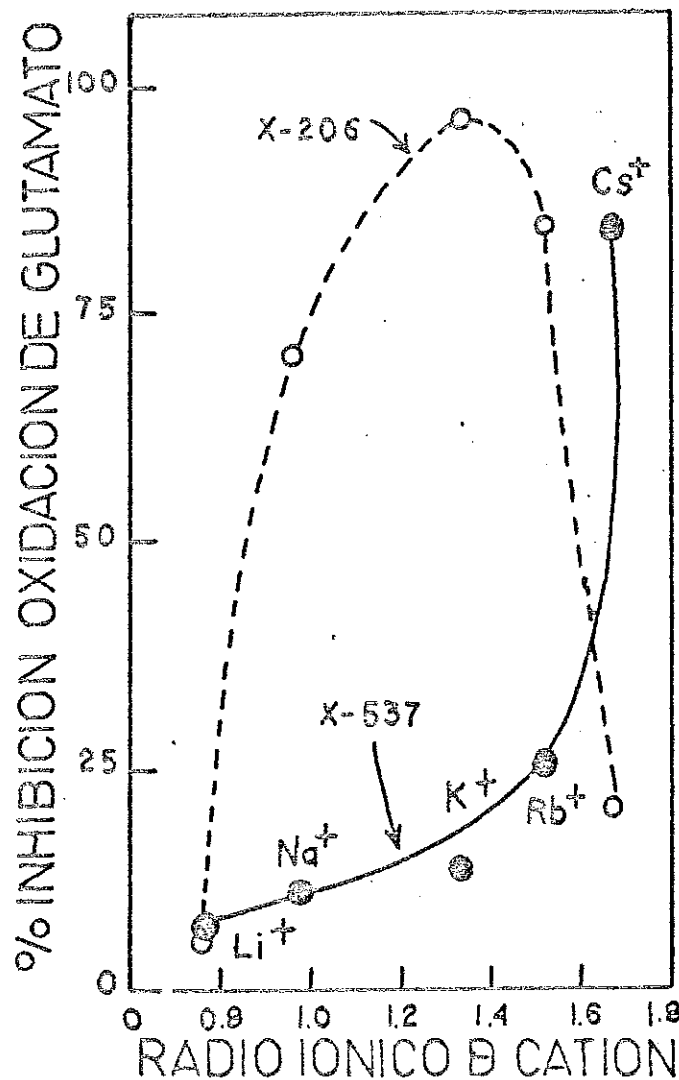


FIG. 7. La selectividad iónica de los antibióticos H-537 A y Lilly-A217 para inhibir la oxidación de glutamato estimulada por monazomicina en mitocondrias en presencia de diferentes cationes monovalentes. El medio es igual al de la Fig. 6 excepto por la adición de 7.5 mM Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, o Cs<sup>+</sup> en lugar de K<sup>+</sup> donde corresponde. La concentración de X-537A o Lilly A-217 estudiada fué 1.0 µg/ml, la de monazomicina 1.5x10<sup>-7</sup>M.

a través de la membrana mitocondrial, cuando la energía se obtiene de la cadena de transporte de electrones, se indica en la figura 7. Dicha selectividad iónica se obtuvo indirectamente al determinar la capacidad de HLR-537 para inhibir la oxidación (acumulación) de glutamato estimulada por la monazomicina en presencia de diferentes cationes monovalentes. Dicho patrón, donde se aprecia la elevada selectividad del antibiótico por  $\text{Cs}^+$  -- también observada en liposomas y sistemas de recambio butanol-agua (Henderson, McGivan y Chappell, 1967; Pressman, 1968), contrasta con la elevada selectividad del antibiótico Lilly A-217 por  $\text{K}^+$  (Figura 7). El antibiótico carboxílico Lilly A-217 se introdujo en este experimento para fines comparativos con la selectividad iónica del también ionóforo carboxílico HLR 537.

Sin embargo, al estudiarse la selectividad iónica del HLR 537 cuando la energía para el transporte proviene no de la cadena respiratoria, sino de la hidrólisis de ATP, o sea, que la selectividad iónica es función de su capacidad para inhibir la actividad de ATPasa mitocondrial acoplada al eflujo de cationes en la mitocondria

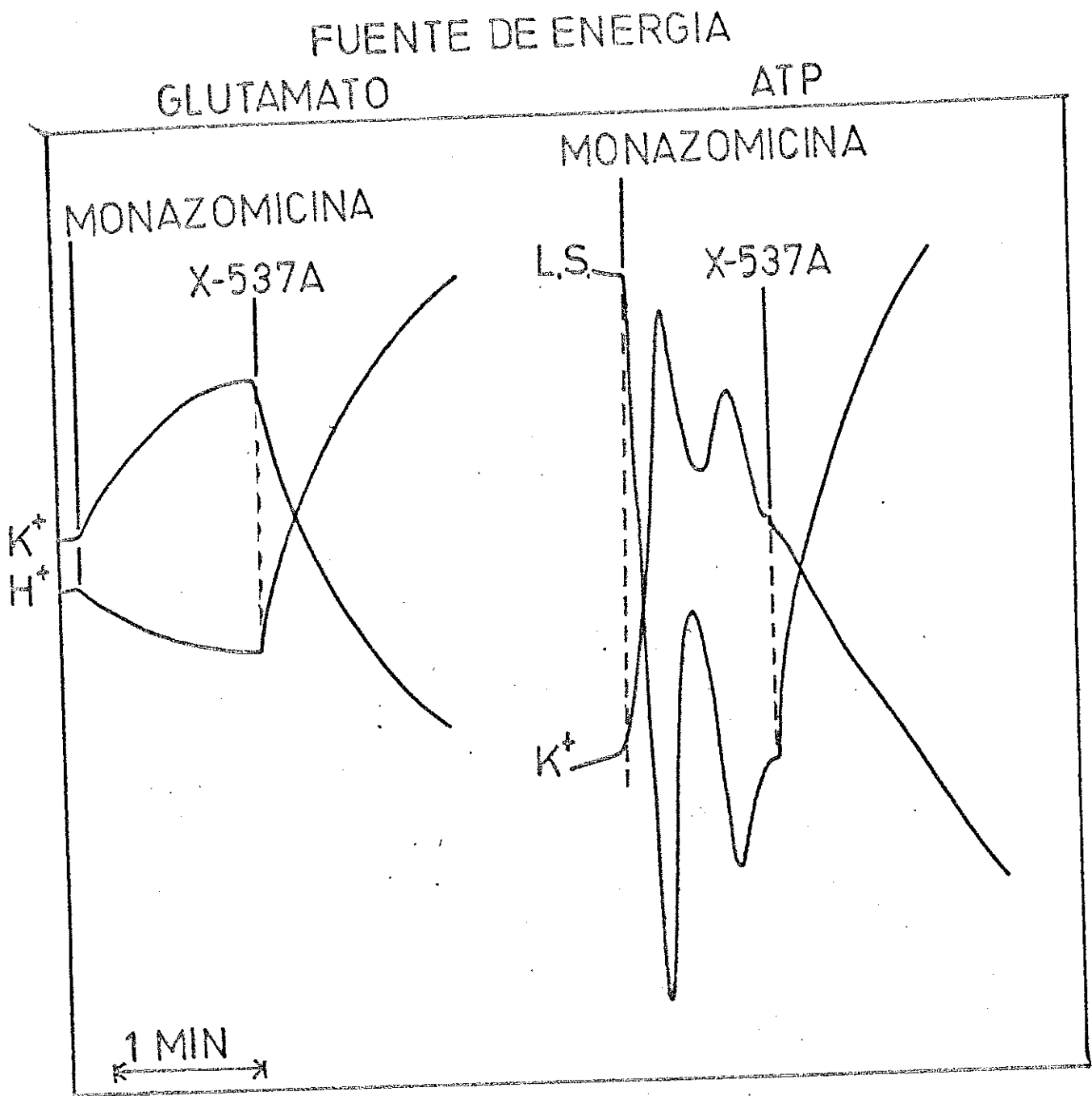


FIG. 8. El efecto del antibiótico X-537A en los movimientos de  $K^+$  y  $H^+$  energizados por glutamato o por ATP en mitocondrias de hígado de rata. El medio es igual al de la Fig. 6; donde corresponde se añadieron 6mM tris-ATP.

(véase Estrada-O., Graven y Lardy, 1967; Estrada-O., Rightmire y Lardy, 1967). Se obtuvieron resultados tanto sorpresivos como inesperados. El compuesto 537, no obstante que inhibe la acumulación de  $K^+$  inducida por valinomicina, nonactina y gramicidina o monazomicina en presencia tanto de sustratos oxidables, como de ATP (Fig. 8) no inhibe la actividad de ATPasa acoplada al transporte de  $K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cs^+$  o  $Li^+$  inducida por los antibióticos antes mencionados (Tabla I). Sin embargo, el compuesto HLR-537 sí inhibe la ATPasa estimulada por el 2,4-dinitrofenol, el FCCP o la monazomicina en ausencia de cationes monovalentes (Tabla I). En otras palabras, el compuesto 537 inhibe la hidrólisis de ATP estimulada por conductores de protones, pero no aquella estimulada por conductores de cationes monovalentes.

De los datos anteriores destaca el hecho de que el paralelismo existente entre la selectividad iónica de los antibióticos carboxílicos para formar clatratos con cationes monovalentes en solución (Pressman, 1968), idéntica a la de los antibióticos para inhibir la actividad de ATPasa estimulada por el transporte de ca-

tiones, de ninguna manera se mantiene para el compuesto HLR-537. La elevada afinidad del antibiótico por  $Cs^+$  en sistemas de isobutanol-benceno-agua no sólo no se observa en actividad de ATPasa, sino que es aparentemente reemplazada en este parámetro por una alta selectividad del antibiótico por protones.



## DISCUSION

La presente sección señala las propiedades de dos antibióticos diferentes, como son la monazomicina y el compuesto HLR-537, que ilustran por un lado, y en cuanto a la monazomicina, que el transporte iónico no necesariamente está catalizado por acarreadores móviles, sino -- también por conductores cooperativos u oligoméricos y; por otro, y en lo que respecta al HLR-537, que la ATPasa membranal de la mitocondria posiblemente está regulada por los flujos de iones transmurales.

### El Modo de Acción de la Monazomicina.

Es aparente que la monazomicina cataliza el influjo o eflujo de cationes en la mitocondria, en función de la relación de concentración intra/extramitocondrial de protones y cationes, así como de la presencia de -- aniones y una fuente energética adecuada para facilitar los movimientos de iones. Estos datos tienen sentido, si se aclara una pregunta central ¿transporta

iones la monazomicina por comportarse como un acarreador monomérico móvil, en constante oscilación a ambos extremos de la membrana, y apareado en serie (Pressman, 1968, Mazzari & Azzone, 1970) o en paralelo con acarreadores de  $K^+$  o  $Na^+$  que existan en la membrana interna de la mitocondria Mitchell, 1966a,b; Mitchell & Moyle, 1967)? o bien ¿transporta iones el antibiótico a través del ensamble cooperativo de varios monómeros del mismo, que constituyendo un oligomero tubular, a modo de poro polar, cruce la membrana para comunicar el exterior de la misma con un sistema de transporte interior, en serie con el oligómero, o bien que el oligómero esté relacionado en paralelo con sistemas naturales de transporte? Las observaciones de Mueller y Rudin sobre el efecto de la monazomicina en las propiedades eléctricas de membranas biomoleculares de lípidos son ilustrativas para decidir sobre la alternativa anterior. Estos autores demostraron -- (1969) que la conductancia eléctrica de las bicapas lipídicas muestra una conducta exponencial dependiente de la sexta potencia de concentración del antibiótico. Estas observaciones sugirieron que en presencia de un poten-

cial eléctrico aplicado, varios monómeros del antibiótico, ensamblados en el interior de la membrana, podrían formar un oligómero conductor. Nuestras observaciones sobre el efecto de la monazomicina en el transporte de iones de membranas mitocondriales, no sólo refuerzan la posibilidad anterior sino que la extienden. Por un lado, es factible que el antibiótico transporte iones en la membrana mitocondrial a través de que varios protómeros del mismo (número promedio de 3) adquieran una conformación oligomérica estable. Esta sugestión se deriva de la Fig. 3 , la cual indica que la estimulación de la hidrólisis de ATP en presencia de  $K^+$  depende de la 3a. potencia de la concentración del antibiótico. No hemos encontrado ninguna evidencia de cooperatividad en la actividad de la monazomicina cuando se omiten del medio cationes monovalentes. Entonces, consideramos factible que una mayor afinidad del antibiótico por cationes monovalentes con respecto a los protones determina una conformación más estable del acarreador oligomérico. De hecho, la selectividad del antibiótico  $Cs^+ > Rb^+ > K^+ > Na^+ > Li^+$  para estimular la hidrólisis de ATP

podría indicar la efectividad relativa de los cationes para estabilizar el hipotético acarreador.

En modelos de membranas bimoleculares de lípidos (Mueller y Rudin, 1969; Gómez-Lojero, 1971) la monazomicina no transporta iones sino es después de aplicar un potencial negativo contralateral al lado de la cámara donde se adiciona el antibiótico. Esto implicaría que el potencial negativo transmural induce e atrae a la membrana al antibiótico + el catión para adquirir la conformación oligomérica activa que "abre" la permeabilidad de la membrana a través de la formación de canales polares. Esta suposición es atractiva para considerar la presencia de potenciales de membrana en la mitocondria, que controlen tanto la formación de los oligómeros de la monazomicina, como su actividad de acarreador. Mitchell (1966, 1968) ha sugerido que asociada a la actividad de la cadena respiratoria y la ATPasa de mitocondrias intactas está la formación de potenciales eléctricos negativos (transmurales) que serían el evento primario en la síntesis de ATP. La energía electroquímica de estos potenciales también facilitaría el transporte de catio-

invierte en partículas submitocondriales con respecto a las mitocondrias intactas (Fig. 5) como se observó originalmente por Montal y Col. (1969) y Cockrell y Col. (1969).

El transporte de iones mediado por el antibiótico H537A. Evidencia de un modelo de acoplamiento diferencial entre ATPasa y transporte de electrones con los movimientos de aniones, cationes monovalentes y protones en la membrana mitocondrial.

Desde hace aproximadamente 25 años se reconoció que la ATPasa de la membrana celular estaba asociada con los movimientos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a través de esta última interfase. Sin embargo, hasta el momento actual no se conoce el mecanismo físico y químico de dicha interrelación. Por otro lado, la ATPasa antes mencionada, aunque se ha involucrado en los mecanismos de control de la glucólisis, tiene una participación mínima en los procesos acoplados de transformaciones energéticas en células animales. En contrapunto con la ATPasa anterior

hibición del consumo de oxígeno tanto como el bloqueo en la acumulación de glutamato- $^{14}\text{C}$  causado por la nigericina en la mitocondria, son revertidos por incrementar la concentración de sustratos oxidables (glutamato frío)  $\text{K}^+$  o fosfato en el exterior de la mitocondria (Estrada-O., y col., 1967a). No obstante la inhibición de la ATPasa mediada por el antibiótico no es revertida por el incremento en la concentración exógena de ATP o  $\text{K}^+$  S. Estrada-O., (observaciones no publicadas).

La duda avanzada en estos últimos experimentos, se refuerza notablemente con las observaciones experimentales relatadas en ésta última sección de la presente tesis. Es aparente que el antibiótico X-537A inhibe el consumo de oxígeno estimulado por la monazomicina (Fig. ) con la misma selectividad iónica con la cual forma complejos liposolubles con cationes monovalentes en sistemas de fase isobutanol-tolueno-agua (Pressman, 1968). O sea, que el intercambio de cationes monovalentes por protones (con la selectividad  $\text{Cs}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ ) mediado por H537-A en la membrana mitocondrial, indu-

ce eflujo del catión monovalente previamente acumulado por la monazomicina así como influjo de protones. Entonces, el cambio en el  $\Delta pH$  paralelo a la acidificación mitocondrial causa un impedimento en la penetración de sustratos oxidables con la consecuente inhibición en el consumo de oxígeno. La selectividad iónica de dicha inhibición (Fig. ) señala la eficiencia del recambio catión/protón asociada al bloqueo en la entrada de glutamato al interior de las partículas subcelulares. La cadena de transporte de electrones mitocondrial responde entonces predeciblemente a la selectividad iónica y al transporte neto de protones mediado por el compuesto H537 A, al igual que ocurre con cualquier ionóforo monocarboxílico de la familia de la nigericina. Sin embargo, y en un tipo de secuencia tanto inesperada como sorprendente, el antibiótico H537 A no afecta ninguna actividad de ATPasa ligada al transporte de cationes monovalentes. El antibiótico inhibe consumo de oxígeno por completo pero no inhibe o afecta de algún modo la hidrólisis de ATP paralela al consumo de oxígeno que acompaña el influjo de cationes monovalentes al interior de la mitocondria. Inhibe algunas ATPasas estimuladas por la translocación de protones mediada por desacoplantes, como es el caso de la hidrólisis de ATP estimulada por FCCP pero no la inducida por conductores de cationes como la valinomicina, la nonactina, la gramicidina o la monazomicina.

Las observaciones anteriores tienen alternativas de las cuales, las más obvias y factibles, dos son de carácter igualmente fundamental. En la posibilidad (a) el compuesto H537 A constituye un instrumento único y de gran interés para estudiar diferencias en el acoplamiento en el transporte de aniones (substratos oxidables aniónicos con respecto a nucleótidos) y el de protones o cationes monovalentes. Es posible que el antibiótico, a través de inhibir en forma diferencial el consumo de oxígeno con respecto a la ATPasa, esté haciendo evidente que la translocación de ATP o ADP a través de la nucleótido translocasa esté asociada a flujos de  $K^+$  o protones, en un tipo de secuencia que cuantitativa o cualitativamente es diferente al transporte de ácidos carboxílicos del ciclo de Krebs. Diferencias primarias en las constantes de disociación de los aniones con respecto al  $\Delta pH$  mediado por el 537, o bien variaciones en la  $K_m$  del translocador de substratos o nucleótidos sensibles al  $K^+$  o a los protones acumulados de un lado de la membrana con respecto al otro, serían las causas más probables de la fenomenología observada. En esta alternativa se demostraría que ATPasa o transporte de electrones están regulados en forma diferente por el transporte de sus substratos respectivos y que este es consecuencia, también como punto de



control primario, de los flujos de protones, yosiblemente mediados a través de acarreadores naturales de tipo anti-port (Mitchell, 1966, 1968, Estrada-O., Gomez-Lojero y Montal, 1972) para recambios  $K^+/H^+$  ó  $Na^+/H^+$  existentes en la membrana mitocondrial.

En la alternativa (b) el antibiótico H537A, aparte de poseer la actividad de un acarreador móvil eléctricamente silencioso del tipo de la nigericina, razón por la cual predeciblemente inhibiría el consumo de oxígeno, también tendría capacidad para selectivamente interaccionar con la ATPasa membranar (interacción tipo oligomicina) inhibiendo su actividad cuando la enzima cataliza la translocación de protones pero no cuando se activa asociada al transporte de  $K^+$ . Esta suposición requiere de que se demuestre permeación normal de nucleótidos de adenina en condiciones en las cuales la reducción de DPN iniciada por succinato en presencia de ATP, la reacción de transhidrogenasa mitocondrial, la reacción de intercambio ( $ATP \leftarrow \rightarrow Pi$ ) con  $\beta$ - $\gamma$  ATP marcado con  $^{32}P$ -Pi, y la ATPasa in situ, sean inhibidas por X537-A en función del cambio de pH. El hecho de que el antibiótico no inhiba in vitro la enzima  $F_1$  (ATPasa) purificada (S. Estrada-O., y Chien-Ho-Chiu, datos no publicados) no contraindica esta posibilidad, ya que esta enzima per se, purificada y fuera de la membrana no es fá-

cil que catalice un transporte asimétrico de protones. Un estudio sistemático del efecto del antibiótico H537-A sobre la conductancia de protones y cationes catalizadas por desacoplantes y acarreadores neutros de  $K^+$ , llevado a cabo en modelos de membranas bimoleculares de lípidos formados con mezclas de fosfolípidos mitocondriales debe proporcionar interesante información para evaluar esta posibilidad.

REFERENCIAS

- Andreoli, T.E. Tieffemberg, M., y Tosteson, D.C. (1967) J. Gen. Physiol. 50: 2527.
- Ashton, R. y Steinrauf, L.K. (1970) J. Mol. Biol. 49: 457.
- Astmon, A., y Davies, R.P. (1967) Biochim. Biophys. Acta. 131: 221.
- Atgarap, A., Chamberlin, J.W., Pinkerton, M., y Steinrauf, J. (1967) J. Amer. Chem. Soc. 89: 5737.
- Azzone, G.F., y Ernster, L. (1961) J. Biol. Chem. 236: 1501.
- Azzone, G. F., Rossi, E., y Scarpa, A. (1968) en: Regulatory functions of Biological Membranes. (Ed) J. Jarnefelt. Elsevier Publ. Co., Amsterdam.
- Poyer, P.D. Luchsinger, W.W., y Falcone, A.B. (1956) J. Biol. Chem. 223: 405.
- Brierley, G., Murer, E., Bachman, E., y Green, D.E. (1963) J. Biol. Chem. 238: 3482.
- Brindley, G.S. y Gardner-Medwin, A.R. (1966) J. Physiol. (London) 182: 185.
- Cockrell, R.S., y Racker, E. (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun. 35: 414.
- Chance, B. (1965) J. Biol. Chem. 240: 2729.
- Chandley, W.K., Hodgkin, A.L., y Meves, H. (1965) J. Physiol. (London) 120: 541.

- Chappell, J.B., y Crofts, A.R. (1965) Biochem. J. 95: 393.
- Chappell, J.B. y Crofts, A.R. (1966) en: Regulation of Metabolic Processes of Mitochondria. J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello, y E.C. Slater. Amsterdam. Elsevier, p. 293.
- Chappell, J.B., y Haarhoff, K.N. (1967a) en: Biochemistry of Mitochondria, (Eds.). E.C. Slater, Z. Kaniuga y L. Wojtczak, Academic Press, P. 75.
- Chappell, J.B., y Robinson, A. (1967b) Biochem. Biophys. Res. Commun. 28: 49.
- Danielli, J.F. (1964) Collston Papers, 7: 8.
- de Jong, J.W., Hulsman, W.C., and Leijer, A. J. (1969) Biochem. Biophys. Acta. 184: 664.
- DeFolter, E.D. y Vignais, P.V. (1969) J. Biol. Chem. 244: 3920.
- Eisenman, G. (1962) Biophys. J. 2 pt 2, 259.
- Eisenman, G., Sandblom, J.P., y Wlaker, L.J. (1967) Science, 155: 965.
- Eisenman, G., Ciani, S.M., y Szabo, G. (1968) Fed. Proc. 27: 1284.
- Estrada-O., S., Rightmire, B., y Lardy, H.A. (1967) Antimicrob. Ag. & Chemother. 279.
- Estrada-O., S., Graven, S.N., y Lardy, H.A. (1967a) Fed. Proc. 26: 610.
- Estrada-O., S., Graven, S.N., y Lardy, H.A. (1967b) J. Biol. Chem. 242: 2925.
- Estrada-O., S., y Calderón, E. (1970) Biochemistry. 9: 2092.
- Estrada-O., S., y Gómez-Lojero, C. (1971a) Biochemistry 245: 5606.
- Estrada-O., S., y Gómez-Lojero C. (1971b) Biochemistry 10: 1598.

- Estrada-O., S., Rubalcava, B. y Gitler, C. (1972a) J. Bioenergetics. (en prensa).
- Estrada-O., S., y Carabez, A. (1972b) J. Bioenergetics, en prensa.
- Falcone, A. B., y Witenisky, P. (1964) J. Biol. Chem. 239: 1964.
- Ferguson, S.M.F., y Williams, G.R. (1966) J. Biol. Chem. 241: 3696.
- Gitler, C., Rubalcava, B., y Caswell, A. (1969) Biochim. Biophys. Acta. 193: 479.
- Graven, S.N., Estrada-O., S., y Lardy, H.A. (1966a) Proc. Natl. Acad. Sci. 56: 654.
- Graven, S., Lardy, H.A., Johnson, D., y Rutter, A. (1966b) Biochemistry 5: 1729.
- Graven, S., Lardy, H.A., y Rutter, A. (1966c) Biochemistry 5: 1735.
- Graven, S.N., Lardy, H.A., y Estrada-O., S. (1967) Biochemistry 6: 365.
- Hansford, R.G., y Chappell, J.B. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun. 30: 643.
- Harold, F.M., y Baarda, H. (1967) J. Cell. Biol. 35: 54A.
- Harris, E.J., Catlin, G. y Pressman, B.C. (1967a) Biochemistry. 6: 1360
- Harris, E.J. Hoffer, M.P., y Pressman, B.C. (1967b) Biochemistry. 6: 1348.
- Harris, E.J., van Dam. K., y Pressman, B.C. (1967c) Nature 213: 1126.
- Harris, E.J., y Manger, J.R. (1968a) Biochem. J. 106: 53.

- Harris, E.J., y Manger, J.R. (1968b) Biochem. J. 109: 239.
- Henderson, P.J.F., McGivan J.D., y Chappell, J.E. (1969)  
Biochem. J. 111: 251.
- Hodgkin, A.L., y Huxley, A.F. (1952) J. Physiol. (London).
- Hoffer, M.P., y Pressman, E.C. (1966) Biochemistry. 5: 3919.
- Jackson, J.R., Crofts, A.R., y Von Stedingk, L.V. (1968)  
Eur. J. Biochem. 6: 41.
- Jacobs, E.E., Jacob, M., Sanadi, D.R., y Bradley, L.E. (1956)  
J. Biol. Chem. 223: 147.
- Johnson, D., y Lardy, H.A. (1958) Nature 185: 701.
- Johnson, D., y Lardy, H.A. (1967) en: Methods in Enzymology,  
Vol. X, (Ed.). R.W. Estabrook y M.E. Pullman (Eds.),  
Academic Press, New York, p. 94.
- Kavanau, J.L. (1964) Estructure and Function in Biological  
Membranes. San Francisco, Holden-Day.
- Kimmich, G., y Rasmussen, H. (1968) Fed. Proc. 27: 1748.
- Lardy, H.A., y Wellman, H. (1952) J. Biol. Chem. 195: 215.
- Lardy, H.A., y Wellman, H. (1953) J. Biol. Chem. 201: 357.
- Lardy, H.A., Johnson, D., y McMurray, W.C. (1958) Arch.  
Biochem. Biophys. 78: 587.
- Lardy, H.A. (1961) Abstracts, 140th Natl. Meeting of the Amer.  
Chem. Soc. Spet. p. 29c.
- Lardy, H.A., Witonsky, P., y Johnson, D. (1965) Biochemistry.  
4: 552.
- Lardy, H.A., Estrada-O., y Graven S.N. (1967a) Abstr. Int.  
Congr. Biochem. 7th, Tokyo, 906.

- Harris, E.J., y Manger, J.R. (1968b) Biochem. J. 106: 239.
- Henderson, P.J.F., McGivan J.D., y Chappell, J.B. (1969)  
Biochem. J. 111: 251.
- Hodgkin, A.L., y Huxley, A.F. (1952) J. Physiol. (London).
- Hoffer, M.P., y Pressman, E.C. (1966) Biochemistry. 5: 3919.
- Jackson, J.B., Crefts, A.R., y Von Stedingk, L.V. (1968)  
Eur. J. Biochem. 6: 41.
- Jacobs, E.E., Jacob, M., Sanadi, D.R., y Bradley, L.B. (1956)  
J. Biol. Chem. 223: 147.
- Johnson, D., y Lardy, H.A. (1958) Nature 185: 701.
- Johnson, D., y Lardy, H.A. (1967) en: Methods in Enzymology,  
Vol. X, (Ed.). R.W. Estabrook y M.E. Pullman (Eds.),  
Academic Press, New York, p. 94.
- Kavanau, J.L. (1964) Estructure and Function in Biological  
Membranes. San Francisco, Holden-Day.
- Kimmich, G., y Rasmussen, H. (1968) Fed. Proc. 27: 1748.
- Lardy, H.A., y Wellman, H. (1952) J. Biol. Chem. 195: 215.
- Lardy, H.A., y Wellman, H. (1955) J. Biol. Chem. 201: 357.
- Lardy, H.A., Johnson, D., y McMurray, W.C. (1958) Arch.  
Biochem. Biophys. 78: 587.
- Lardy, H.A. (1961) Abstracts, 140th Natl. Meeting of the Amer.  
Chem. Soc. Spet. p. 29c.
- Lardy, H.A., Witonsky, P., y Johnson, D. (1965) Biochemistry.  
4: 552.
- Lardy, H.A., Estrada-O., y Graven S.N. (1967a) Abstr. Int.  
Congr. Biochem. 7th, Tokyo, 906.

- Lardy, H.A., Graven, S.N. y Estrada-O., S. (1967b) Fed. Proc.  
26: 1355.
- Lehninger, A.L. (1953) en: The Harvey Lectures Ser. New York,  
Academic Press 49: 176.
- Lehninger, A.L. Wadkins, C.L., y Remmert, C.F. (1957)  
Ciba Foundation Symp. p. 130.
- Lev, A.A., y Lushinskii, E.P. (1967) Cytology (USSR) 9: 102.
- Levinson.
- Lindberg, O., y Ernster, L. (1956) Methods Biochem. Anal. 3: 6.
- Ling, G.N. (1962) A Physical theory of the Living state.  
Haisdell Publishing, Co., New York, p. 253.
- Low, H., Vallin, E., y Alm, E. (1963) en: Energy Linked  
Functions of Mitochondria (Ed.). E. Chance, Academic  
Press, New York, p. 5.
- Martin, J.E., y Doty, D.M. (1947) Anal. Chem. 21: 946.
- Massari, S., y Azzone, G.F. (1970) Eur. J. Biochem. 12: 301.
- McMurray, W.S., y Tegg, R.W. (1969) Arch. Biochem. Biophys.  
84: 546.
- Mitchell, P. (1966) Oxidative and photosynthetic phosphorylation.  
Edmin, Glynn Research, Ltd. 192 pp.
- Mitchell, P. (1968) Chemiosmotic coupling and Energy Transduction  
Edmin, Glynn Research, Ltd. 111 pp.
- Mitchell, P., y Moyle, J. (1969) Eur. J. Biochem.
- Mental, M. Chance, E., Lee, C.P., y Azzi, A. (1969) Biochem.  
Biophys. Res. Commun. 34: 104.



- Pressman, D.C. (1968) Fed. Proc. 27: 1283.
- Pressman, D.C., y Haynes, D.H. (1969) en: The molecular Basis of Membrane Function (Ed.). D.C. Testeson Prentice-Hall, New Jersey, p. 221.
- Pullman, M.E. Penefsky, H.S., Datta, A., y Racker, E. (1960) J. Biol. Chem. 235: 3322.
- Rossi, C.S. y Lehninger, A.L. (1964) J. Biol. Chem. 239: 3971.
- Rossi, C.S., Carafoli, E., Drahota, Z., and Lehninger, A. (1966) en: Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria (Ed.). J.E. Tager, S. Papa, E. Quagliariello, y E.C. Slater, Elsevier, Amsterdam, 7: 317.
- Rossi, C.S., Azzi, A., y Azzone, G.F. (1967) J. Biol. Chem. 242: 951.
- Saris, L. (1963) Acta Chem. Scan. 17: 882.
- Scarpa, A., y Azzone, G.F. (1970) Eur. J. Biochem. 12: 328.
- Shavit, N., Dilley, R.A., y San Pietro, A. (1967a) Biochemistry 7: 2356.
- Shavit, N., y San Pietro, A. (1967b) Biochem. Biophys. Res. Commun. 28: 277.
- Shavit, N., Dilley, R.A., y San Pietro, A. en: Comparative Biochemistry and Biophysics of Photosynthesis (Eds.). K. Shibata, A. Takamiya, A.T. Jagendorf, y R.C. Fuller, Pennsylvania University Park Press, pp. 445.
- Slater, E.C. (1953) Nature (London) 172: 975.
- Sumner, J.E. (1944) Science. 100: 413.

- There, A., Keister, D.L., Shavit, N., y San Pietro A. (1968)  
Biochemistry. 7: 3499.
- Testeson, D.C. (1968) Fed. Proc. 27: 1269.
- Van Deenen, L.L. M. (1965) Progr. Chem. Fats. Lipids. 8: Part I, 1.
- Vasington, F.D., y Murphy, J.V. (1962) J. Biol. Chem. 237: 2670.
- Wald, G. (1965) en: Enzymes: Units of Biological Structure and Function (O. Gaebler, Ed.).
- Williams, R.C., Yphatis, D.A., y Craig, L.C. (1968)  
Biophys. J. Soc. Abstr. 8: A99.