

**LOS ACARREADORES ANTIPARALELOS
(ANTIPORTERS) EN LA TEORIA QUIMIOSMOTICA
DEL METABOLISMO VECTORIAL
ESTUDIO SOBRE LA FORMACION DE
COMPLEJOS IONICOS DE POLIETERES
CARBOXILICOS Y SU SELECTIVIDAD IONICA***

por el

M. en B. E. Raúl Alva García

Tesis para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

México, D. F., agosto de 1995

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA División de Ciencias Básicas e Ingeniería

*Financiado parcialmente por la UAM y la DGICSA-SEP (C89-01-0216, C90-01-0287 y C91-01-09-002-771)

La presente Tesis se realizó bajo la asesoría del Dr. Andrés Hernández Arana, Profesor Titular del Departamento de Química de la División de Ciencias Básicas e Ingeniería, y del Dr. Sergio Estrada Orihuela, exprofesor Titular del Departamento de Ciencias de la Salud de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, ambas Divisiones, pertenecientes a la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

El trabajo experimental se llevó a cabo, en su mayor parte, dentro del Laboratorio de Bioquímica y Biofísica de la D.C.B.S., y del Laboratorio de Biofísicoquímica de la D.C.B.I., con el apoyo del personal de ambos laboratorios.

También se contó con la asistencia del Dr. Jorge Cerbón, del Departamento de Bioquímica del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, para algunos estudios por espectroscopía de $^1\text{H-NMR}$, y del Dr. Ignacio Regla y la Quím. Lourdes Castillo, de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México, para las determinaciones por absorción atómica.

AGRADECIMIENTOS

Por la gran ayuda especializada, así como por la discusión de partes importantes, antes, durante y al término de esta investigación, estoy agradecido con un buen número de amigos y colegas, entre los que se cuentan el Ing. Gaspar Mayor, el M. en B. E. Juan Antonio Lugo Ríos, el M. en Q. Miguel Velázquez Manzanares, el M. en B. E. Fausto Yáñez Soria y la M. en C. Mireya Toro Calzada.

Mi más sincero agradecimiento hacia el Dr. Andrés Hernández Arana y el Dr. Sergio Estrada Orihuela, por su encomiable estímulo, persistente guía y compromiso moral durante esta última etapa de mi formación como investigador.

Deseo expresar mi especial gratitud al Dr. Peter Mitchell (Q.E.P.D.), quien sin reserva alguna puso a disposición de este autor una gran cantidad de material de inigualable valor para sustentar las bases conceptuales sobre las que ha descansado el desarrollo de las ideas expresadas a lo largo de este trabajo.

Finalmente, considero justo agradecer a la administración de la Rectoría General de la Universidad Autónoma Metropolitana por facilitarme el tiempo para alcanzar las metas logradas.

R.A.G.

A Gisela, por su tenacidad
(que raya en la terquedad)
para llevarme a cerrar este
capítulo de mi vida
profesional.

A mis padres, a varios
cientos de kilómetros de
distancia.

A mis hermanos y, en
especial, a los dos enanos.

Y, por supuesto, a Lupita.

A tí, C.A., mi inspiración
última.

CONTENIDO

PROLOGO	9
CAPITULO I	11
LA NATURALEZA POLIFASICA DE LOS SISTEMAS QUE TRANSFORMAN LA ENERGIA BIOLOGICA. Una introducción.	
Los seres vivos como sistemas termodinámicos	11
Orden, interacción, energía y cambio en la materia viviente	13
Teoría general de los sistemas	13
Papel de los acarreadores en el orden de los sistemas vivos	16
La translocación en los sistemas biológicos	17
Principios temáticos del metabolismo vectorial	19
Desarrollo de las ideas quimiosmóticas	20
De la Hipótesis a la Teoría Quimiosmótica	20
CAPITULO II	23
LA TRANSLOCACION DE IONES Y LA TRANSFORMACION DE ENERGIA EN LA MITOCONDRIA.	
Los antecedentes	23
Primeras evidencias del acoplamiento entre la translocación de iones y la transformación de energía en la mitocondria	26
Los translocadores de iones de la membrana mitocondrial	31
CAPITULO III	35
LA FORMACION DE COMPLEJOS IONICOS DE POLIETERES Y SU SELECTIVIDAD IONICA. Un resumen de los Resultados.	
Los objetivos	35
Los antibióticos poliéteres como acarreadores modelo	37
Las propiedades fisicoquímicas y el transporte	39
La flexibilidad molecular de la nigericina	41
Los resultados	42

CAPITULO IV	57
HACIA UN MODELO PREDICTIVO DEL COMPORTAMIENTO DE LOS ACARREADORES ANTIPARALELOS. <i>Una interpretación.</i>	
Se amplía el perfil de interacción iónica de los poliéteres carboxílicos	57
Características espectroscópicas de los complejos poliéter-cación	63
La selectividad iónica de los poliéteres y su relación con el transporte	67
Conclusiones	69
CAPITULO V	71
LOS ACARREADORES ANTIPARALELOS PROTEICOS DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL. <i>Las perspectivas.</i>	
Los acarreadores electroneutros proteínicos	71
El funcionamiento de los acarreadores biológicos	72
Acarreadores, cationes y metabolismo vectorial	72
REFERENCIAS	75
APENDICE	
Publicaciones producidas	83

PROLOGO

En los poco más de cinco años que han transcurrido desde que se inició el desarrollo de este trabajo, se han dado grandes adelantos en el estudio de los acarreadores móviles existentes en los organismos vivos. Así pues, a partir de tales hallazgos se presenta la inigualable oportunidad de discutir algunas ideas desde el punto sobre el que nos encontramos en este momento.

Hace unas tres décadas Peter Mitchell postuló y nombró la Hipótesis Quimiosmótica. A partir de entonces, esta Hipótesis ha evolucionado en Teoría; se ha transformado en una disciplina sólida, objeto de cursos de licenciatura y posgrado, de libros, revistas, compilaciones y reuniones; ha originado un campo de enseñanza, así como grupos de trabajo; constituye -según Thomas Kuhn- un nuevo "paradigma" o, parafraseando a von Bertalanffy, una "nueva filosofía de la naturaleza".

El fundamento principal de la Teoría Quimiosmótica es el hecho de que las membranas biológicas poseen diferentes componentes que translocan iones, a veces sin alterar el potencial eléctrico transmembranal, como en el intercambio de Na^+/H^+ . Fue en los años de la década de 1960 cuando Berton Charles Pressman y Sergio Estrada Orihuela descubrieron, de forma simultánea e independiente, los primeros ionóforos neutros y carboxílicos, estimulando el estudio del transporte en membranas. Durante los dos lustros siguientes se demostró que la translocación iónica en la mitocondria y en otros organelos energéticos, tiene un comportamiento electroforético y se hizo patente la anisotropía o asimetría de las membranas biológicas.

Así, los estudios sobre translocación iónica facilitada por ionóforos modelo, realizados en mitocondrias, cloroplastos, bacterias fotosintéticas y membranas de estreptococos, entre otros sistemas, demostraron que el potencial de membrana es la fuerza motriz necesaria para realizar el transporte de iones. En palabras de Efraim Racker, "el problema central de la fosforilación acoplada a la oxidación y el transporte de iones [...] había sido, al fin, resuelto."

Finalmente, las investigaciones realizadas en los últimos diez años por Juillard y Pointud, Antonenko y Yaguzhinsky, Cox y colaboradores y por el grupo de colaboradores de quien esto escribe, entre otros, sobre los complejos que forman los acarreadores móviles modelo -como los poliéteres carboxílicos tipo nigericina- con diversas especies iónicas, han contribuido a establecer las bases de la relación que guardan las variaciones físicas y químicas de dichos ionóforos con su actividad quimiosmótica. Al mismo tiempo, y gracias al desarrollo alcanzado por la cromatografía de alta resolución (HPLC) y las técnicas de ingeniería genética, laboratorios como los de Garlid y Pouyssègur han logrado por fin aislar, reconstituir y verificar la función de algunos acarreadores proteicos del tipo antiparalelo predicho por la Teoría Quimiosmótica.

Así las cosas, es claro que la visión analítica, mecanicista y unidireccionalmente causal del metabolismo vectorial ha llegado a su límite. En un principio, este trabajo se había propuesto determinar los factores fisicoquímicos ambientales y de estructura molecular que regulan la mecánica de

interacción poliéter-cación para correlacionarlos con su capacidad de transporte iónico y con sus efectos en la transferencia y conservación de energía en el metabolismo; sin embargo, durante su desarrollo, los resultados obtenidos así como los hallazgos publicados por otros autores, fueron obligando a replantear tanto su objetivo general como los particulares. En general, ha sido posible indicar algunos aspectos principales que constituyen y regulan la translocación iónica catalizada. Se ha identificado la formación de complejos de acarreadores móviles con cationes monovalentes, divalentes y trivalentes; se han distinguido las características de flexibilidad estructural de dichos complejos; se han determinado las variaciones de afinidad iónica por diversos cationes; y se han discriminado algunos de los eventos fisicoquímicos que constituyen y regulan a la translocación iónica catalizada. Todo esto guarda correlaciones variadas con su capacidad para atrapar y liberar cationes en procesos metabólicos. En suma, se muestran las características sistémicas estructurales y energéticas que proveen a las osmoenzimas su capacidad para regular al metabolismo vectorial.

Raúl Alva García.

Iztapalapa, D. F.
Agosto de 1995.

CAPITULO I.

"In the exact sciences, cause and effect are no more than events linked in sequence. . . if the processes that we call metabolism and transport represent events in a sequence, not only can metabolism be the cause of transport, but also transport can be the cause of metabolism."

Peter Mitchell.

LA NATURALEZA POLIFASICA DE LOS SISTEMAS QUE TRANSFORMAN LA ENERGIA BIOLOGICA. **Una introducción.**

El presente trabajo trata sobre el papel que juegan los acarreadores móviles -en particular los acarreadores antiparalelos o antiporte- en los sistemas quimiosmóticos que conservan y transforman la energía en los seres vivos. El objetivo que se ha planteado -mediante una revisión selectiva de la literatura sobre la translocación iónica en el metabolismo vectorial, así como la aportación de información original específica- es contribuir a establecer las bases de la relación que guardan las variaciones físicas y químicas de los complejos iónicos de los acarreadores móviles modelo -del tipo nigericina-, para correlacionarla con su actividad quimiosmótica. Estas variaciones tienen características que son de gran interés biológico para la definición estructural y la reconstitución funcional de las propiedades *osmocatalíticas* de los acarreadores antiparalelos proteicos. De este modo, se ayuda a consolidar las bases de una visión *sistémica* integral de la participación de los metabolitos iónicos y sus acarreadores vectoriales en la regulación del metabolismo celular.

Los seres vivos como sistemas termodinámicos.

Todo lo que existe en el universo está formado por materia y energía, y una de las formas en las que se manifiesta la materia en este universo es la vida. Aunque toda la materia está formada por moléculas inanimadas, la materia viviente difiere notablemente de la materia no viva (Lehninger, 1982). Pero, ¿qué es lo que marca esta diferencia entre lo vivo y lo no vivo?

Un ser vivo es un sistema que continuamente está intercambiando materia y energía con el medio circundante, manteniéndose en un estado más o menos constante de equilibrio dinámico -llamado metastable o estacionario (Bertalanffy, 1968)- por lo que, desde el punto de vista de un termodinámico, se trata de un sistema abierto. Mas no sólo eso; dentro de sí mismo, en todas y cada una de las reacciones químicas que se llevan a cabo dentro del microuniverso que es un ser vivo, todos los componentes están en continuo recambio (Carrel, 1936).

La esencia de un organismo viviente reside en el hecho de que selecciona elementos particulares de su entorno y los introduce a su entidad por cierto tiempo, organizándolos en patrones característicos. Es, por lo tanto, esta

"actividad" de organización selectiva la que distingue a la vida (Young, 1971). La materia viviente presenta, además, la propiedad de mantener constante este patrón de actividades, pues esto representa su perpetuación. Por ello, todas las actividades realizadas por un organismo vivo están dirigidas a mantener la constancia de esta organización. Esto ocurre a pesar de los continuos cambios que se suceden en el medio que lo rodea. Dicha cualidad, conocida como homeostasis, se conserva a todos los niveles de organización del ser vivo (Miller, 1978) -desde el organelo más simple hasta el planeta entero como organismo- y, por supuesto, requiere de un justificado uso de energía.

Sin embargo, se debe establecer que la vida no puede ser definida por una estructura determinada ni por la serie de componentes que la conforman en un momento dado, sino por la intrincada relación dinámica que guardan estos elementos entre sí (Sagan, 1980) y, a su vez, con el entorno. De hecho, los elementos constituyentes de la materia viviente se encuentran en constante movimiento y, por lo tanto, no es posible decir que un sistema viviente esté constituido por las mismas sustancias en dos momentos diferentes.

Por otro lado, es evidente que cualquier organismo vivo difiere notablemente de su medio externo, pues concentra y excluye -dentro de sus límites- ciertos componentes en una organización determinada (Danielli, 1975). Por ejemplo, las funciones celulares dependen de las interacciones que se llevan a cabo entre sus partes. Además, existe una interacción de la célula con el medio externo a través de sus fronteras, incluyendo el transporte de iones, de agua y de masas moleculares de dimensiones mayores.

El conjunto de características enunciadas hasta aquí, aunque incompleto, muestra que, desde un punto de vista físico, los seres vivos son sistemas heterogéneos en composición química y fase con reacciones químicas y físicas complejas, con fronteras dinámicas (membranas), diatérmicos y abiertos, esto es, en constante intercambio de masa y energía con el exterior (Ruiz Azuara y García Colín, 1977). Por lo tanto, el recambio continuo define al ser vivo como un sistema que se encuentra en un estado de equilibrio dinámico, en el que una organización determinada permanece constante gracias a -y a pesar de- la entrada y salida continua de materia y energía. Este estado estacionario se mantiene por un constante flujo de energía y, para tolerar esto, el organismo dirige otras actividades apropiadas para movilizar más materia y energía.

Como se ha hecho patente, los sistemas vivos, para mantenerse en sus estados semiconstantes, deben gastar energía y, por lo tanto, desde el punto de vista de la termodinámica, eso ya no es equilibrio. Cuando los sistemas se alejan del equilibrio, cuando aparecen diferencias o gradientes -de presión, de actividad o de concentración, por ejemplo- aparecen los flujos, como consecuencia de la tendencia termodinámica del sistema de regresar al equilibrio. Y esa tendencia aumenta conforme el sistema se aleja aún más, del equilibrio (Cereijido, 1983).

Hasta el momento podemos observar que la vida es la expresión de la energía contenida en un sistema y de la manera en que se regula su transformación y transferencia entre fases diferentes.

Orden, interacción, energía y cambio en la materia viviente.

De una u otra forma, cuando nos interesamos en adentrarnos en los seres vivientes, nos vemos forzados a enfrentarnos con complejidades, con "totalidades" o "sistemas". A pesar del discernimiento ahondado que alcanza la biología "molecular" -o acaso en virtud de él-, se manifiesta la necesidad de una biología "organísmica". La biología no sólo tiene que ocuparse del nivel fisicoquímico o molecular, sino de los niveles superiores de organización viva también.

Una visión organísmica en biología hace hincapié en la consideración del organismo como un todo o sistema y ve el objetivo principal de las ciencias biológicas en el descubrimiento de los principios de organización a sus diversos niveles. Los primeros enunciados de este tipo, aplicables a la biología fueron los de Bertalanffy y la filosofía del "mecanicismo orgánico" de Whitehead, que datan de 1925. Las labores de Cannon sobre homeostasia aparecieron en 1929 y 1932. La concepción organísmica tuvo un precursor en Claude Bernard, pero la obra de éste aún sigue esperando ser cabalmente apreciada. En la década de 1960 se volvió a insistir en la "biología organísmica" (Bertalanffy, 1968) requerida por los sistemas abiertos, no lineales, lejanos del equilibrio y al borde de la crisis, que son los seres vivos (Prigogine, 1969; Prigogine, 1971).

En conexión con trabajos experimentales acerca del metabolismo, por una parte, y con un esfuerzo por concretar el programa organísmico, por otra, se adelantó la teoría de los sistemas abiertos, fundada en el hecho bastante trivial de que el organismo resulta ser uno de ellos. La primera presentación, luego de uno que otro intento, fue protagonizada por Bertalanffy (1968), de suerte que la biofísica parecía requerir una expansión de la teoría física acostumbrada, por el rumbo de la generalización de los principios cinéticos y de la teoría termodinámica, la cual ahora es conocida como termodinámica irreversible.

En muchos fenómenos biológicos resultan aplicables expresiones y modelos matemáticos. La similitud estructural entre semejantes modelos y su isomorfismo en diferentes campos se torna ostensible, y en el centro quedan precisamente problemas de orden, organización, totalidad, teleología, etc., excluidos programáticamente de la visión mecanicista. Tal idea reposa en la "Teoría General de los Sistemas" (Bertalanffy, 1968) a la que el presente trabajo toma, junto con algunos de sus antecedentes más útiles, como referencia inicial para generar un camino de evolución particular.

Teoría general de los sistemas.

El problema de los sistemas es esencialmente la limitación de los procedimientos analíticos. Esto suele expresarse en enunciados casi metafísicos, como "el todo es más que la suma de sus partes", aunque tiene un sentido operacional claro. "Proceder analítico" quiere decir que una entidad que se investiga se resuelve en partes unidas, a partir de las cuales puede reconstituirse, entendiéndose estos

procederes en sus sentidos tanto material como conceptual. Es éste el principio clásico que puede circunscribirse de diferentes modos.

La aplicación del procedimiento analítico depende de dos condiciones. La primera es que no existan interacciones de "partes", o que sean tan débiles que puedan dejarse a un lado en ciertas situaciones. Sólo así es posible "deslindar" las partes -real, lógica y matemáticamente- y luego volverlas a "juntar". La segunda condición es que las relaciones que describan el comportamiento de partes sean lineales; sólo entonces queda satisfecha la condición de aditividad, o sea que una ecuación que describa la conducta del total tiene la misma forma que las ecuaciones que describen la conducta de las partes; los procesos parciales pueden superponerse para obtener el proceso total, etc.

Semejantes condiciones no las cumplen las entidades llamadas sistemas, o sea consistentes en partes "en interacción". El prototipo de su descripción es un conjunto de ecuaciones diferenciales simultáneas, que son no lineales en el caso general. Un sistema o "complejidad organizada" puede circunscribirse merced a la existencia de "interacciones fuertes" (Rapoport, 1966) o interacciones "no triviales" (Simon, 1965), es decir, no lineales. El problema metodológico de la teoría de los sistemas es, pues, vérselas con cuestiones que, comparadas con las analítico-aditivas, son de naturaleza más general.

Como se ha dicho, hay varios enfoques para enfrentarse a tales problemas. Esto de los "enfoques" es intencionalmente vago, pues son lógicamente no homogéneos, representan distintos modelos conceptuales, técnicas matemáticas, puntos de vista generales, etc.; concuerdan, sin embargo, en ser "teorías de sistemas".

Por ejemplo, la teoría "clásica" de los sistemas aplica el cálculo infinitesimal. Aspira a enunciar principios aplicables a sistemas en general o a subclases definidas (p.ej. sistemas cerrados y abiertos), a proporcionar técnicas para su investigación y descripción, y aplicar éstas a casos concretos. Entre estos casos se encuentran la aplicación de los principios de la difusión y de los modelos de estado uniforme o equilibrio dinámico al análisis de sistemas biológicos.

La teoría de la información, en el sentido de Shannon y Weaver (1949), se basa en el concepto de información, definido por una expresión isomorfa con la entropía negativa de la termodinámica. De ahí la esperanza de que la información sirva de medida de la organización (Quastler, 1955). Sin embargo, mientras que la teoría de la información ganó importancia en ingeniería de comunicaciones, sus aplicaciones a la ciencia no han sido muy convincentes (Gilbert, 1966). La relación entre información y organización, teoría de la información y termodinámica, sigue siendo un problema.

La teoría de los juegos (von Neumann y Morgenstern, 1947) representa un enfoque diferente pero puede agregarse a las ciencias de los sistemas por ocuparse del comportamiento de jugadores supuestamente "racionales" a fin de obtener ganancias máximas y pérdidas mínimas gracias a estrategias apropiadas contra el otro jugador (o la naturaleza). Tiene así que ver esencialmente con un "sistema" de "fuerzas" antagónicas con especificaciones.

No homogénea e incompleta como es, mezclando modelos (p. ej. sistema abierto, circuito de retroalimentación), semejante enumeración ayuda a mostrar que hay una serie de enfoques para investigar sistemas. El punto que debe reiterarse es que problemas no considerados antes, no abordables, o tenidos por puramente filosóficos, pueden explorarse progresivamente.

Las ventajas de los modelos matemáticos -no ambigüedad, posibilidad de deducción estricta, verificable por datos observados- son bien conocidas. No quiere esto decir que los modelos formulados en lenguaje ordinario hayan de ser desdeñados o rechazados. Un modelo verbal es preferible a ninguno o a un modelo que, por ser formulado matemáticamente, se impone por la fuerza a la realidad y, por lo tanto, la falsifica.

Las matemáticas significan esencialmente la existencia de un algoritmo mucho más preciso que el del lenguaje ordinario. Quizá valga más tener primero algún modelo no matemático, con sus limitaciones, pero que exprese algún aspecto previamente inadvertido, en espera del surgimiento venidero de algún algoritmo apropiado, que partir de modelos matemáticos prematuros que calquen algoritmos conocidos y con ello acaso restrinjan el campo visual. Muchos adelantos en biología molecular exhibieron los efectos cegadores de lo que Kuhn (1962) llama ciencia "normal" -esquemas conceptuales monolíticamente aceptados.

La física ordinariamente sólo se ha ocupado de sistemas cerrados, sistemas que se consideran aislados del medio circundante. La fisicoquímica habla de las reacciones, de sus velocidades y de los equilibrios químicos que acaban por establecerse en un recipiente cerrado donde se mezclan cierto número de sustancias reaccionantes. La termodinámica clásica declara expresamente que sus leyes fundamentales sólo se aplican a sistemas cerrados. La segunda ley, en particular, afirma que en un sistema cerrado, la entropía debe aumentar hasta el máximo y el proceso acabará por detenerse en un estado de equilibrio. Puede formularse la segunda ley de diferentes modos, según uno de los cuales la entropía es medida de probabilidad, y así un sistema cerrado tiende al estado de distribución más probable. Según esto, la distribución más probable de una mezcla es la tendencia al máximo desorden o hacia la máxima entropía.

Sin embargo, encontramos sistemas que, por su misma naturaleza y definición, no son sistemas cerrados. Todo organismo viviente es ante todo un sistema abierto. Es obvio que las formulaciones habituales de la física no son en principio aplicables al organismo vivo *qua* sistema abierto y en estado uniforme, y bien podemos sospechar que muchas características de los sistemas vivos que han resultado paradójicas vistas según las leyes de la física, son consecuencia de este hecho.

Se menciona a menudo que la energía es la moneda de la física; el ATP es la moneda energética en biología. No obstante, existen algunos campos donde esta moneda no es muy aceptable. Tal ocurre en el campo de la comunicación. La noción general en teoría de la comunicación es la de información. En muchos casos la corriente de información corresponde a una corriente de energía, pero existen muchos fenómenos en los que la información, en general, no es expresable en términos de energía.

Sin embargo, hay otra manera de medir la información en términos de decisiones, como el juego de las veinte preguntas, en el que hay que averiguar de qué objeto se trata respondiendo sólo "sí" o "no". La cantidad de información transmitida en una respuesta representa una decisión entre dos posibilidades. Con dos preguntas es posible decidir entre cuatro posibilidades. Con tres respuestas se trata de una decisión entre ocho. Por lo tanto, el logaritmo de base 2 de las decisiones posibles puede usarse como medida de información, llamada unidad de información binaria o *bit* (Sagan, 1977). Esta medida de la información resulta similar a la de la entropía, o más a la de la entropía negativa, puesto que la entropía se define como logaritmo de la probabilidad. Pero la entropía es una medida de desorden; entonces la entropía negativa o información es una medida del orden o de la organización, ya que la última, en comparación con la distribución al azar, es un estado improbable.

Otro concepto en la teoría de la comunicación y el control es el de retroalimentación. En ésta, el sistema comprende un receptor, un centro que recombina los mensajes que llegan y los transmite a un efector; finalmente, el funcionamiento del efector está empalmado al receptor, lo que hace que el sistema se autorregule, garantice la estabilización y la dirección de la acción.

Existe un gran número de fenómenos biológicos que corresponden al modelo de retroalimentación. Sin embargo, este esquema es de naturaleza muy especial. Presupone disposiciones estructurales como las mencionadas arriba. En los seres vivos funcionan muchas regulaciones que tienen naturaleza distinta, como en las que se alcanza el orden por interacción dinámica de procesos (Bertalanffy, 1968). Puede demostrarse que las regulaciones primarias (más fundamentales o primitivas) en los sistemas biológicos residen en la interacción dinámica. Se basan en el hecho de que el organismo vivo es un sistema abierto que se mantiene en estado uniforme o, más bien, se acerca a él. Por encima se encuentran las regulaciones secundarias que son controladas por disposiciones fijas, del tipo de la retroalimentación. Esta situación es consecuencia del principio general de organización de mecanización progresiva. En un principio los sistemas están gobernados por interacción dinámica entre sus componentes; luego se establecen disposiciones fijas y condiciones de restricción que hacen más eficiente al sistema y a sus partes, pero consecuentemente disminuyen su equipotencialidad de forma gradual hasta acabar por eliminarla. Así, la dinámica es el aspecto más amplio, ya que siempre es posible llegar, mediante leyes generales de sistemas, hasta la función como máquina, imponiendo condiciones adecuadas de restricción, pero no es posible lo contrario.

Papel de los acarreadores en el orden de los sistemas vivos.

Los estudios iniciales sobre la regulación de la energía y el cambio de la materia en los seres vivientes parecían tener sólo una meta analítica. Sin embargo, el esquema tradicional de unidades aislables actuantes según causalidad unidireccional resulta definitivamente insuficiente. Es evidente que se debe pensar en términos de sistemas de elementos en interacción mutua dentro de una totalidad o un holismo. Así, no puede concebirse un organismo vivo sin tener

en cuenta lo que llamamos adaptabilidad, intencionalidad, persecución de metas, etc. De este modo estamos en condiciones de elaborar modelos que simulen dicho comportamiento en sistemas biológicos.

Se puede afirmar que el comportamiento teleológico dirigido hacia un estado final o meta característicos no es una errada concepción antropomorfa de procesos que, dentro de sí mismos, no tienen dirección y son accidentales. Es, por lo tanto, una forma de comportamiento que se puede definir y cuyas condiciones necesarias y mecanismos posibles pueden indicarse.

Lo mismo puede decirse del concepto de organización, ajeno a la concepción mecanicista. Los organismos son, por definición, entes organizados. Pero aunque se disponga de gran cantidad de datos sobre organización biológica, bioquímica, biofísica, etc., es necesaria una teoría de la organización biológica para explicar algunos hechos empíricos.

Existen muchos aspectos de organizaciones que no se prestan fácilmente a la interpretación cuantitativa y, por lo tanto, debemos comenzar con una "explicación en principio" o argumentación cualitativa que siempre conduce a consecuencias interesantes.

Si bien se ha intentado unificar el conocimiento generado por la ciencia en la física, aún en este momento tal unificación no es realista. No se pueden reducir los niveles biológicos exclusivamente a las construcciones y leyes de la física. Por el contrario, se pueden encontrar construcciones y leyes en los distintos niveles de escala biológica. El principio unificador se encuentra en la organización misma de todos los niveles.

Dentro de este marco conceptual, los acarreadores existentes en los seres vivos son piezas fundamentales en el patrón de orden, interacción, energía y cambio en la materia viviente. Desde diversas perspectivas teóricas, funcionan como servomecanismos de transducción de energía o de información; constituyen los selectores de entrada y salida. En resumen, son los medios de interacción del organismo con su entorno, regulan el flujo de materia y energía y conducen, por lo tanto, al orden y organización del ser vivo.

Es de esperarse que para cumplir con estas funciones, los acarreadores posean propiedades intrínsecas similares o idénticas a las mencionadas en el párrafo anterior.

La translocación en sistemas biológicos.

Ya que los seres vivos difieren de su entorno, es evidente el hecho de que poseen fronteras físicas o estructuras que mantienen la independencia e integridad del organismo. Simplemente no existen organismos vivientes, sin importar su simpleza o complejidad, que no posean una frontera física -o membrana- que los individualice del entorno (Oparin, 1936).

La importancia que reviste la existencia de sistemas con fases separadas radica en su facultad para impedir la formación de una solución homogénea en la que se diluyan los componentes de cada una de ellas. Estos sistemas tienen la capacidad de llevar a cabo reacciones químicas con direccionalidad y a

velocidades que no se logran en sistemas de soluciones homogéneas (Fox, 1976). Aun en los modelos experimentales más simples -de sistemas de fases separadas por fronteras coloidales- se ha observado este flujo vectorial de compuestos, activado por corrientes osmóticas, desde una fase a otra (Herrera, 1942; Oparin, 1974). Cuando se acoplan a reacciones químicas localizadas en las fronteras entre fases, estos flujos vectoriales son los responsables de las transformaciones de energía dentro de los seres vivos (Mitchell, 1982a; Jencks, 1983).

Así, un sistema celular puede sufrir variaciones en su energía interna debidas al intercambio de calor con el exterior o a cambios energéticos producto del flujo neto de materia. Dichas variaciones en la energía interna celular se realizan a expensas de los cambios en el medio externo, de acuerdo con el Principio de Conservación de Energía (Ruiz Azuara y García Colín, 1977).

De este modo, se puede considerar que las reacciones más importantes que realizan los organismos son las transferencias de especies químicas de una fase a otra (Tinoco y cols., 1978). La transferencia o translocación de especies iónicas a través de las membranas biológicas genera gradientes microscópicos de potencial eléctrico (Estrada O., 1983) que son componentes vitales para la formación de la fuerza quimicomotriz responsable de la producción de energía biológica en forma de trifosfato de adenosina -ATP- (Mitchell, 1961).

La mayoría de las membranas biológicas está formada por una gran variedad de moléculas, que son comunes en casi todos los seres vivientes sobre la Tierra. Los principales constituyentes son diferentes tipos de lípidos, esteroides y proteínas (Starzak, 1984) que se encuentran arreglados en una estructura de bicapa (Figura 1.1) -de matriz lipídica- con la consistencia de un mosaico líquido asimétrico (Singer, 1975). La superficie de la membrana que está en contacto con las fases acuosas es polar e hidrofílica, mientras que la matriz lipídica hidrofóbica es eléctricamente aislante o dieléctrica (Michel, 1983).

Tal naturaleza de las membranas biológicas representa una barrera para el libre paso de especies polares o iónicas, por lo que las células de los organismos deben contener -en sus membranas- mecanismos de translocación de iones o acarreadores que facilitan la transferencia iónica a través de los lípidos membranales (Racker, 1979; Schultz, 1980).

La translocación vectorial de iones la realizan las proteínas inmersas en las membranas biológicas (Kotyk, 1983). La direccionalidad del transporte respecto a la membrana es sumamente importante (Mitchell, 1961) ya que, al separar componentes permeables e impermeables entre compartimentos, permite la formación de los gradientes químicos o eléctricos y es capaz de regular algunos procesos metabólicos (Sauer, 1983).

Por lo tanto, uno de los temas de estudio de mayor interés en la bioquímica es la caracterización de los factores fisicoquímicos que regulan estas transferencias iónicas que son, en última instancia, causa y efecto del metabolismo vectorial (Mitchell, 1961).

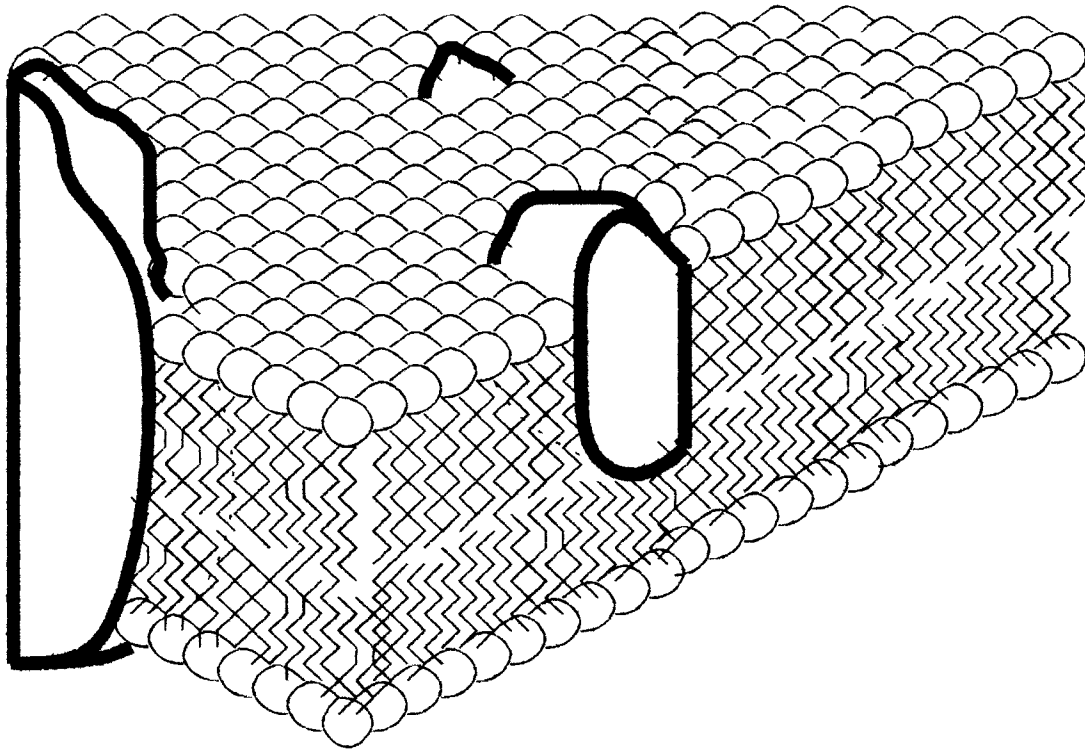


Figura 1.1. Modelo de mosaico líquido de Singer y Nicolson (1972) de las membranas biológicas. La membrana consiste de una bicapa de fosfolípidos con proteínas incorporadas a diferentes niveles. Las pequeñas esferas representan a los grupos fosfato asociados al agua; las hebras delgadas son las cadenas hidrofóbicas que constituyen la matriz o seno de la membrana.

Principios temáticos del metabolismo vectorial.

Habiendo aceptado que los seres vivos característicamente son cosas que fluyen, y que su integridad continua depende de las fuerzas estáticas y dinámicas entre sus partes componentes de las dimensiones moleculares hacia arriba, es natural querer reemplazar el concepto de energía en biología por el concepto más informativo y realista de las fuerzas vectoriales y los flujos, con los que las energías (no radiantes) están relacionadas de manera implícita por medio de sus productos escalares, con la pérdida (literal) de información vital. La existencia de fuerzas vectoriales estáticas o dinámicas y desplazamientos o flujos colineales resulta un planteamiento más informativo para la biología en general, y para la bioquímica y fisiología en particular, que pensar en términos de energías y transformaciones escalares (Mitchell, comunicación personal).

Se puede considerar a los procesos bioquímicos y fisiológicos como máquinas en miniatura, en las que la continuidad de la actividad vital depende de

la articulación apropiada de las partes componentes, restringidas a moverse en sus formas designadas por fuerzas estáticas y dinámicas apropiadas. Mitchell realizó la descripción cuantitativa de esta idea, y del concepto relacionado de irreversibilidad microscópica, hace poco más de diez años (Mitchell, 1982b). Sin embargo, el concepto de irreversibilidad microscópica, definido de forma simple, aún se considera generalmente inaceptable. Por ejemplo, Prigogine ha partido del caos en sus propias consideraciones de reversibilidad a nivel microscópico. Sin embargo, tal parece que se necesita comenzar con un sistema que esté particularmente ordenado para facilitar la observación de cómo se puede atenuar el vector componente hacia adelante de un proceso de flujo a lo largo de una trayectoria diseñada. En un sistema quimiosmótico de tipo microscópico, las osmoenzimas que catalizan transformaciones consecutivas en un sustrato dado estarían apareadas de tal modo que la forma intermediaria del sustrato estaría ocluida en un compartimiento osmótico microscópico entre las dos osmoenzimas (Mitchell, comunicación personal).

Desarrollo de las ideas quimiosmóticas.

Es interesante que a principios del siglo XIX los químicos hablaran de fuerzas químicas (tal vez de forma imprecisa, y no necesariamente con un conocimiento de mecánica Newtoniana). Se puede entender a Humphry Davy y a William Grove, en los primeros días de la electroquímica, pensando sobre fuerzas químicas como los impulsores de la acción química. Pero la introducción de los principios de energías químicas que siguieron al trabajo de Helmholtz en la década del 1840, y el hecho de que había poco conocimiento para hacer uso de una teoría de fuerzas químicas y desplazamientos colineales en lugar de una teoría de las energías que resultan de sus productos escalares, llevó a la concepción escalar común de la termodinámica química, donde aun las constantes de velocidad son números de ciclos escalares y no velocidades (Mitchell, 1981).

Por el contrario, las ideas del metabolismo vectorial y los sistemas quimiosmóticos parecen haber evolucionado de la substitución del principio del balance de fuerzas vectoriales orientadas a lo largo de las vías colineales de flujo de partículas metabólicas interactuantes, por el principio de la conservación de energías (Mitchell, comunicación personal).

De la Hipótesis a la Teoría Quimiosmótica.

Las primeras evidencias experimentales independientes que contribuyeron a confirmar la veracidad de los postulados del metabolismo vectorial enunciado por Mitchell en su "Hipótesis Quimiosmótica" fueron descritos inicialmente a mediados de la década del 1960. En 1967, Estrada O. y cols. y Pressman y cols., por separado descubrieron que el modo de acción antiporte del antibiótico nigericina y unidireccional (uniporte) de la valinomicina, respectivamente, está asociado a su capacidad para catalizar el recambio de cationes y/o protones a través de las membranas lipídicas de los sistemas biológicos (Figura 1.2).

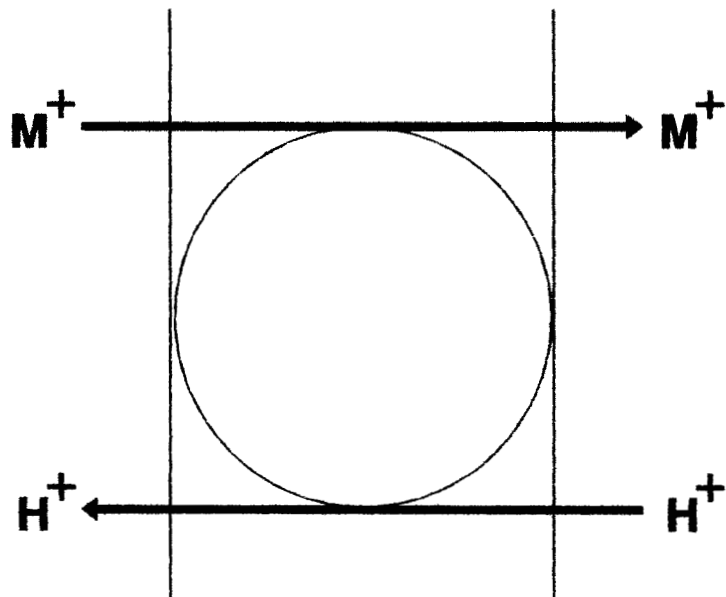
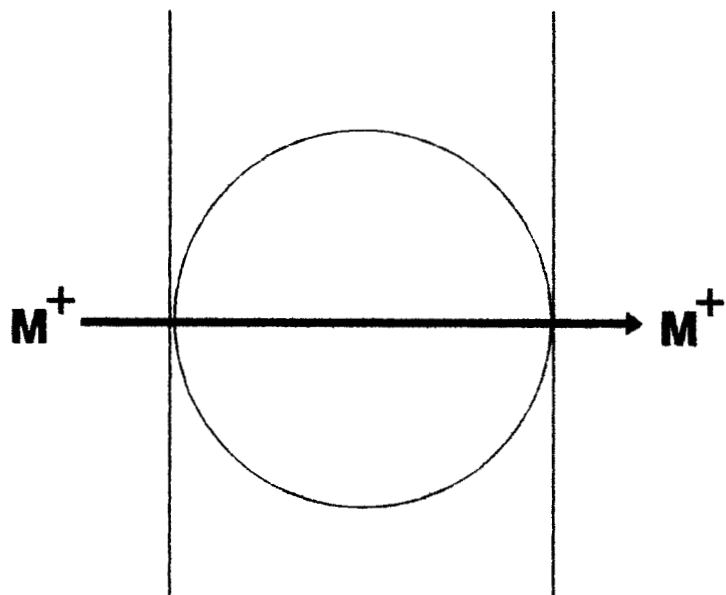
a)**b)**

Figura 1.2. Mecanismos de translocación antiporte (a) y uniporte (b).

Por esta capacidad para transportar iones a través de membranas lipídicas, tanto biológicas como artificiales, estos antibióticos fueron bautizados, por Pressman y cols. (1967), como "ionóforos". Tales hallazgos fueron expuestos y discutidos en una histórica reunión a la que el mismo Mitchell luego se refirió textualmente: "... es de interés señalar que durante la presentación que hizo S. Estrada O. en Chicago, el autor [P. Mitchell] fue el primero en plantear la existencia del antiporte..." (Mitchell, 1968).

A partir del descubrimiento de las moléculas neutras y aniónicas que fueron identificadas como ionóforos (Pressman, 1967; Estrada O. y cols., 1967) ha sido importante la expansión del conocimiento sobre el mecanismo molecular del transporte de iones a través de membranas.

Al respecto, el campo del transporte en membranas ha sido notablemente estimulado por la introducción de más de un centenar de poliéteres carboxílicos que, a partir del descubrimiento de Estrada O. y cols. (cf. Westley, 1982), muestran que el transporte promovido por estas moléculas induce cambios importantes en diversos fenómenos biológicos fundamentales, como lo son: la conservación de energía en membranas mitocondriales, de cloroplastos y bacterias fotosintéticas; el mecanismo inotrópico de la contracción muscular; la modificación de la respuesta inmune; la motilidad celular; la síntesis de proteoglicanos de pared bacteriana; las etapas tempranas de la diferenciación celular, etc. En otras palabras, los postulados quimiosmóticos del metabolismo vectorial propuesto por Mitchell han sido, definitivamente, confirmados.

Pero, ¿cómo se logró tal avance?

A continuación se reseña la historia de los últimos veinticinco años de investigación sobre el metabolismo vectorial y sus mecanismos de regulación, sobre los cuales se sustenta el desarrollo de los postulados originales que se presentan en los Capítulos III y IV de este volumen.

"Come, it's pleased so far," thought Alice, and she went on. "Would you tell me, please, which way I ought to go from here?"

"That depends a good deal on where you want to get to," said the Cat.

"I don't much care where-" said Alice.

"Then it doesn't matter which way you go, said the Cat.

"-so long as I get *somewhere*," Alice added as an explanation.

"Oh, you're sure to do that," said the Cat, "if you only walk long enough."

Lewis Carroll, *Alice's adventures in Wonderland*.

CAPITULO II

It was twenty years ago today,
Sgt. Pepper taught the band to play
They've been going in and out of style
But they're guaranteed to raise a smile.
So may I introduce to you
The act you've known for all these years,
Sgt. Pepper's Lonely Hearts Club Band,
Sit back and let the evening go.

John Lennon & Paul McCartney

LA TRANSLOCACION DE IONES Y LA TRANSFORMACION DE ENERGIA EN LA MITOCONDRIA.

La década que transcurrió de 1965 a 1975 fue testigo de los estudios que sacaron a la luz los principios fundamentales de la generación de energía en células de organismos eucariotes y procariotes. Gracias a la convergencia de herramientas y estrategias experimentales novedosas fue posible empezar a comprender los mecanismos físicos y químicos de los procesos de la transformación de energía y del transporte de iones en los seres vivos, así como las características moleculares de la composición y estructura de los constituyentes de las membranas transductoras.

El primer sistema biológico en el que se dilucidaron los cimientos en que se sustentan los procesos arriba señalados fue la membrana bacteriana (Mitchell y Moyle, 1967). A partir de entonces, los trabajos realizados en otras membranas biológicas transductoras de energía demuestran que la translocación de iones se encuentra acoplada de manera indisoluble a la transformación de energía. Además, han confirmado que el transporte iónico y la transformación de energía son dos componentes interconvertibles de un mismo proceso en todas las membranas biológicas que poseen la capacidad para conservarla.

Los antecedentes

Los trabajos realizados por Kalckar (1969) y Belitzer y Tsybakova (1939) -junto con los llevados a cabo previamente por Engelhardt, Meyerhoff, Wieland, Warburg y Lundsgaard (cf. Kalckar, 1969)- mostraron que:

1. Las enzimas del ciclo de Krebs, del transporte de electrones (e^-) y de la fosforilación oxidativa se localizan en las mitocondrias.
2. El proceso de acoplamiento energético se relaciona con dominios específicos del sistema multienzimático de transferencia de hidrógenos y e^- -cadena oxidativa- de la membrana.
3. La fosforilación oxidativa se puede llevar a cabo en partículas de mitocondrias (PSM) fragmentadas por digitonina o energía ultrasónica.

Con la asociación integral de estos hallazgos se hizo evidente que la energía también se puede utilizar en la cadena oxidativa mitocondrial, tanto para la síntesis de ATP, como para la realización de múltiples procesos que requieren energía, tales como la translocación de iones, la transhidrogenación y la transferencia reversa de e^- (Skulachev, 1971). Dicho de otro modo: la producción de ATP en las células es sólo uno de muchos procesos metabólicos en los que se puede emplear la energía que proviene de la respiración en los organismos quimiótrofos.

Una de las primeras hipótesis propuestas para explicar el mecanismo de acoplamiento entre la oxidación de los alimentos y la conservación de la energía biológica sugería que este proceso se realizaba por la acción de intermediarios químicos de "alta energía" (Slater, 1953). Estos debían ser generados por la transferencia de e^- , para luego utilizarse como precursores directos en la síntesis de ATP o en el transporte de iones. Esta hipótesis surgió del conocimiento existente sobre reacciones biológicas de oxidorreducción acopladas a reacciones de fosforilación, como la del gliceraldehido-3-fosfato, que son catalizadas por enzimas citoplásmicas de la vía de la glucólisis.

Sin embargo, a pesar de la aparición de algunas publicaciones que sugerían la existencia de intermediarios de "alta energía" (cf. Chance y cols., 1967; Racker, 1977), la búsqueda de tales moléculas altamente reactivas en la mitocondria "pronto tuvo que enfrentarse al fracaso y a la desilusión" (Estrada O., 1975). Esta crisis se originó con el anuncio de un enfoque conceptual totalmente diferente, conocido como hipótesis quimiosmótica (Mitchell, 1961). El planteamiento de dicha hipótesis (Mitchell, 1966; Mitchell, 1967; Mitchell, 1968) marcó -como reconocería posteriormente el mismo Mitchell (comunicación personal)- el descubrimiento del "Mundo Quimiosmótico" en la biología (Nicholls, 1982), así como el nacimiento de la bioenergética, como una rama altamente especializada de la bioquímica (Boyer, 1977), tal como la conocemos actualmente (Königsberg, 1991). Por otra parte, la ahora "Teoría Quimiosmótica" sentó las bases de la relevancia que, en la biología, tienen los fenómenos de superficies y la naturaleza vectorial de las reacciones bioquímicas que en ellas se llevan a cabo. La hipótesis postula:

1. No se pueden identificar ni aislar intermediarios químicos generados en la transferencia de e^- "simplemente porque dichos intermediarios no existen".
2. La matriz lipídica de la membrana proporciona una barrera impermeable a la translocación de iones, así como una organización topológica a los catalizadores en la matriz membranal que les permite transportar tanto e^- como iones dentro y a través de la membrana en forma vectorial.
3. La transformación de energía oxidativa en otras formas de energía se realiza, inicialmente, mediante la generación de una diferencia de potencial electroquímico transmembranal de iones hidrógeno (fuerza protomotriz). Esta fuerza es producto de la distribución asimétrica de

protones (H^+) a ambos lados de la membrana, al ser aquéllos translocados a través de ésta por los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria.

La fuerza protomotriz está formada por dos componentes íntimamente relacionados: uno, función de la diferencia de concentración química de hidrógenos a través de la membrana (un gradiente de pH) y otro, dependiente de la diferencia de carga eléctrica de iones H^+ a ambos lados de la misma (un gradiente de potencial eléctrico). Esta relación se expresa

$$\Delta p = \Delta \Psi - Z \Delta pH$$

donde Δp es la fuerza protomotriz, medida en unidades eléctricas, producida por el potencial electroquímico de H^+ , Ψ ; Z es igual a $2.3 RT/F$, donde R , F y T son las constantes de los gases, de Faraday y la temperatura absoluta del sistema, respectivamente. En los sistemas biológicos, en general, Z tiene un valor numérico cercano a los 60 mV.

4. Los gradientes de carga eléctrica y de potencial químico producen un campo en el que se ejerce una fuerza que tiende a atraer hacia el interior de la mitocondria a los protones previamente expelidos. Es el complejo enzimático de la ATPasa, el medio por el cual se cataliza la translocación termodinámicamente reversible de iones H^+ . Al mismo tiempo, la actividad química de los H^+ a ambos lados de la membrana causa un cambio en la constante de equilibrio de la enzima, induciéndola a catalizar la síntesis de ATP o también, a crear las condiciones electroquímicas favorables para producir la translocación de otros iones diferentes a los H^+ .

En conclusión, mientras que en la antigua hipótesis química el transporte de iones (entre ellos los H^+) era considerado sólo como una de múltiples consecuencias secundarias de la transducción de energía, en la hipótesis quimiosmótica la translocación de H^+ es la causa, el evento primario, que al crear un puente termodinámico entre el sistema de transferencia de e^- y la ATPasa reversible, conduce a la transformación de energía en todos los seres vivos (Estrada O., 1975; Estrada O., 1983). Y no sólo eso, sino que en las membranas acoplantes, la energía de las oxidaciones o de la ruptura del ATP puede transducirse de forma reversible a la migración de H^+ y otros grupos iónicos (Boyer, 1977).

Aunque de entrada la hipótesis quimiosmótica no tuvo una acogida muy positiva, la realización de profundos estudios experimentales a lo largo de más de una década, logró demostrar la veracidad de sus principios fundamentales. El mismo Racker (1974) llegó a considerar, seguro de que los postulados básicos de la hipótesis quimiosmótica son correctos, que el problema central de la fosforilación acoplada a la oxidación y el transporte de iones en la mitocondria había sido, al fin, resuelto.

Primeras evidencias del acoplamiento entre la translocación de iones y la transformación de energía en la mitocondria.

El postulado inicial de la hipótesis quimiosmótica señala que la fase lipídica de la membrana mitocondrial interna, posee una elevada capacidad dieléctrica, por lo que presenta una baja conductividad eléctrica y, por tanto, es impermeable al paso de iones, como H^+ , OH^- , Na^+ , K^+ y Ca^{2+} .

En efecto, Mitchell y Moyle (1967) demostraron, mediante experimentos de transición de pulsos ácido-básicos que la fase lipídica de la membrana interna mitocondrial presenta una alta capacidad aislante. Esta misma propiedad se ha observado en membranas artificiales de fosfolípidos, así como en toda la gama de membranas conservadoras de energía, desde las de microorganismos fotótrofos y quimiótrofos hasta en las membranas fotosintéticas de los tilacoides de cloroplastos de plantas vasculares (Mitchell, 1967). Además se presenta tanto para los iones H^+ como para K^+ y Ca^{2+} .

Ya que la membrana interna mitocondrial -en la que se localizan la cadena oxidativa y la ATPasa- es impermeable al paso de especies iónicas, resulta necesaria la existencia de dispositivos transportadores, embebidos en la matriz lipídica de la membrana, para catalizar tanto el movimiento específico de los iones H^+ , K^+ y Na^+ , así como el paso de los diferentes aniones que participan en el metabolismo energético. Al respecto, la hipótesis quimiosmótica plantea:

1. La transferencia vectorial de H^+ a través de la membrana lipídica es catalizada por una cadena oxidativa y por una ATPasa con distribuciones asimétricas.
2. El transporte de los iones Na^+ y K^+ a través de la membrana es facilitado por un acarreador que intercambia un H^+ por cada catión metálico alcalino, sin alterar el potencial eléctrico mitocondrial.
3. Deben existir, además, otros sistemas independientes en la membrana, para llevar a cabo la catálisis de la transposición específica de iones como el Ca^{2+} , el $(PO_4)^{3-}$, los nucleótidos y aniones carboxílicos que se requieren como metabolitos para el buen funcionamiento del ciclo de Krebs.

A pesar de que ya existían ciertos indicios, aunque escasos, que sugerían algún tipo de conexión del transporte de cationes monovalentes, divalentes y aniones con la oxidación de sustratos y la hidrólisis de ATP (Harris y cols., 1966), resultaba complicado concebir la expulsión de H^+ por parte de la mitocondria. Esta debía llevarse a cabo por medio de una secuencia alternada de enzimas membranales acarreadoras de hidrógenos $-H^+$ y e^- distribuidas asimétricamente a lo ancho de la bicapa lipídica.

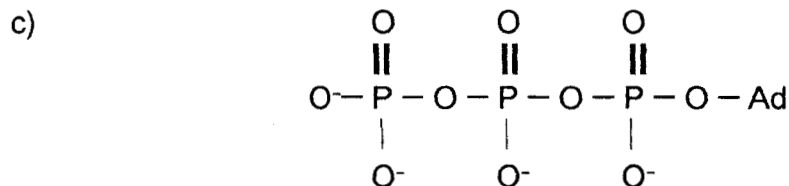
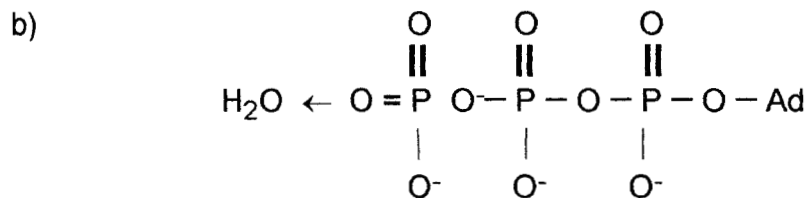
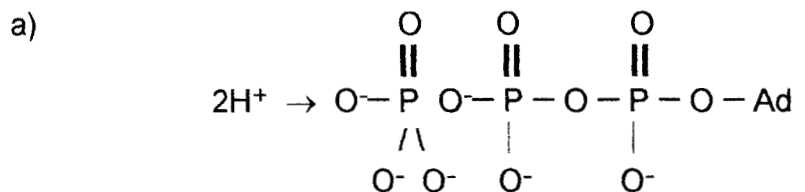
Del mismo modo, no se entendía cómo un gradiente transmembranal de H^+ -producto de la oxidación de sustratos del ciclo de Krebs- podía provocar el

influjo de dichos iones de nuevo hacia el interior mitocondrial a través de una ATPasa asimétrica. Ni tampoco, cómo puede tal influjo de iones H^+ utilizarse para catalizar la síntesis de ATP.

Por un lado, y en este orden de ideas, las investigaciones realizadas, tanto en mitocondrias intactas como en PSM, demostraron que la transducción de un par de e^- en la respiración produce el flujo transmembranal de dos H^+ , así como la hidrólisis de una molécula de ATP (Mitchell y Moyle, 1967; Mitchell y Moyle, 1968; Hinkle y Hortsman, 1971). Además, se encontró la existencia de una relación de dos iones H^+ por cada átomo de oxígeno (Hinkle, 1973). Estos procesos efectivamente son catalizados por un conjunto de cinco complejos multienzimáticos, formados por conglomerados de metaloproteínas liposolubles (Hatefi, 1985). Los cinco complejos proteicos están localizados en la membrana interna mitocondrial y se distribuyen en una topología asimétrica específica a la función que cada uno de ellos desempeña en la transferencia de iones H^+ y e^- (González Halphen, 1990) (Figura 2.1).

Por otro lado, se han propuesto dos mecanismos por los cuales la ATPasa reversible sería capaz de utilizar el flujo de H^+ para catalizar la síntesis de ATP:

1. El acoplamiento directo sugiere que los iones H^+ que pasan a través del canal para H^+ de la fracción liposoluble de la ATPasa se unen al $(PO_4)^{3-}$ inorgánico (Pi); forman una especie activa que reacciona directamente con el ADP, dando como resultado el ATP (Vázquez Laslop y Dreyfus, 1989):



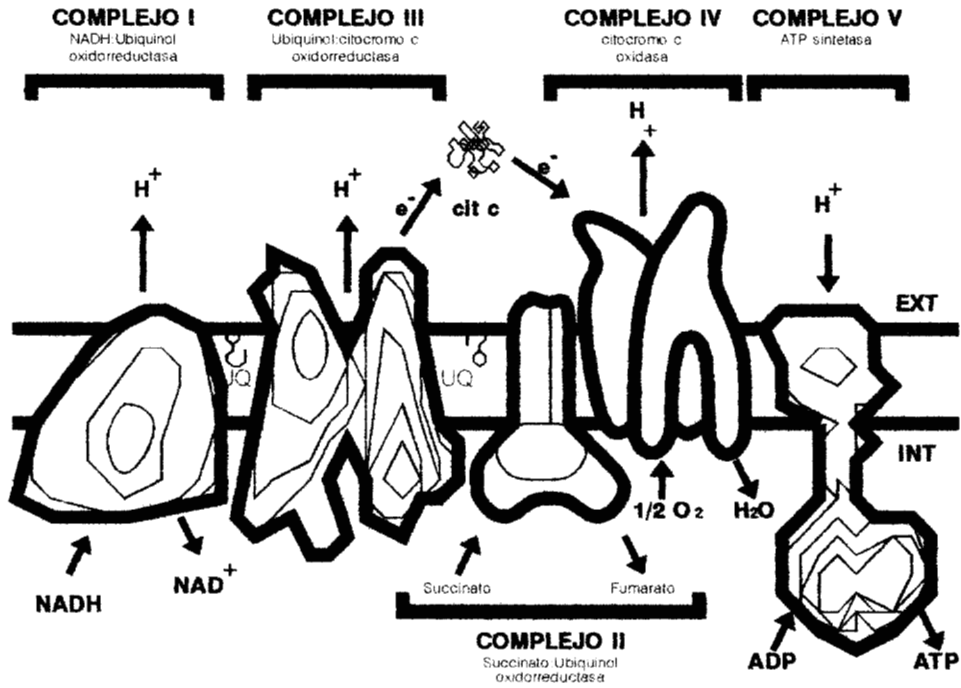


Figura 2.1. Estructura y función de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.

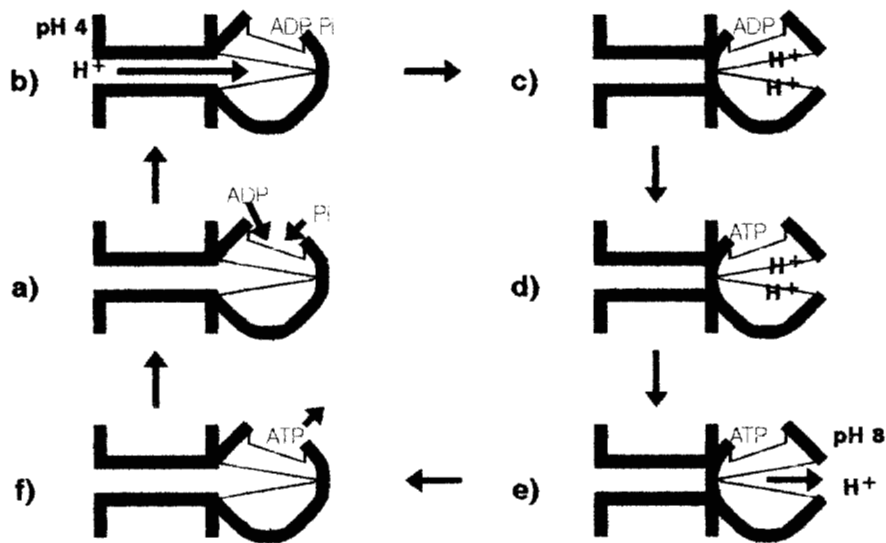


Figura 2.2. Mecanismo de acoplamiento indirecto por cambios conformacionales y de afinidad en la ATPasa.

2. El acoplamiento indirecto (Figura 2.2) supone que el potencial electroquímico del H^+ produce cambios conformacionales y de afinidad en los sitios de unión y catalíticos de la ATPasa (Vázquez Laslop y Dreyfus, 1989). Los primeros indicios sobre cambios conformacionales de proteínas relacionados con transducciones de energía biológica aparecieron publicados por Lumry desde 1963 (cf. Königsberg, M. 1991); se sugería que "las energías libres para la fosforilación son pequeñas y pueden ser fácilmente compaginadas por distorsiones menores de proteínas sin procesos mayores de desdoble." Posteriormente, en 1965 Boyer (cf. Estrada O., 1975) observó que la energía del transporte de e^- puede estar ligada a la formación de grupos tioéster por medio de cambios conformacionales de proteínas. Estos y otros hallazgos subsecuentes apuntaron hacia la existencia de un patrón universal en la función de los cambios conformacionales de proteínas vinculadas en las transducciones de energía biológica (Boyer, 1977).

Con estos resultados se pueden confirmar dos postulados fundamentales para sustentar los planteamientos básicos de la hipótesis quimiosmótica:

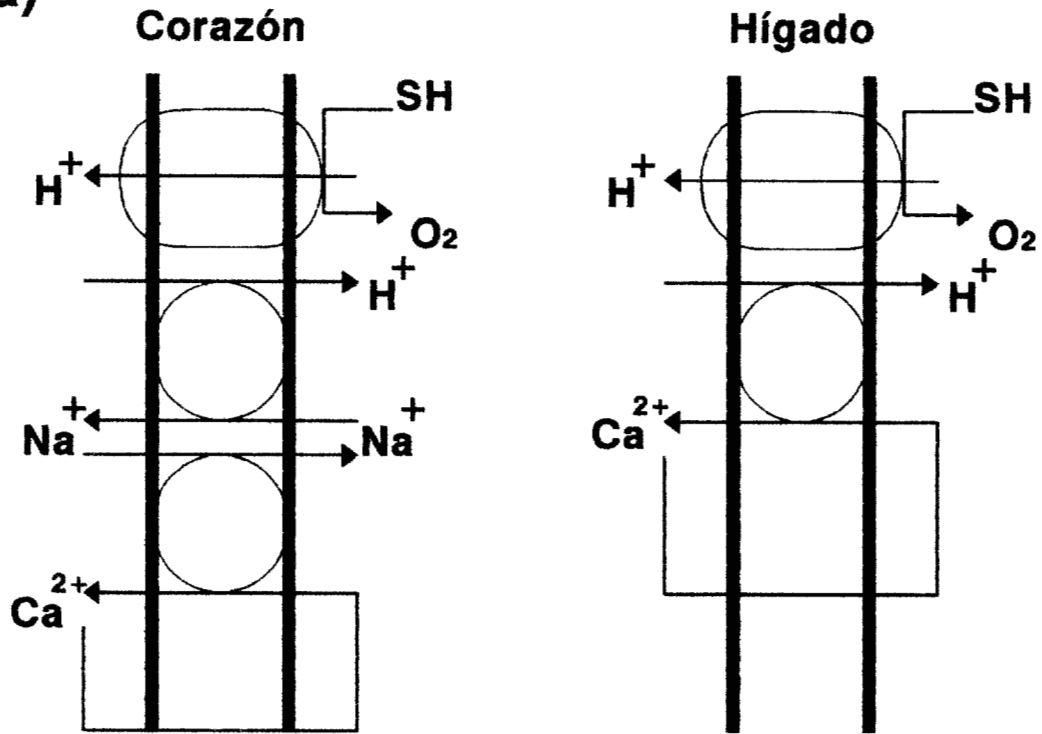
1. Los H^+ son transferidos a través de la membrana mitocondrial, tanto por la actividad respiratoria como de ATPasa, en estequiometrías que están en completo acuerdo con el modelo de circuito de H^+ (Mitchell, 1967).
2. La dirección de los flujos de H^+ es controlada por el signo del potencial eléctrico de la membrana, que depende de la orientación topológica de los acarreadores respiratorios en la fase lipídica (cf. Mitchell, 1967).

En este momento surge la necesidad de hacer una acotación importante: la topología asimétrica de las enzimas de la cadena respiratoria y la ATPasa reversible es esencial para la operación del proceso de fosforilación y de translocación de iones. Sin embargo, la oxidación es independiente de la topología de los complejos enzimáticos membranales (Estrada O., 1975).

Los estudios realizados en la década del 1970, a partir del descubrimiento de los antibióticos acarreadores de iones -de tipo acarreador móvil o ionóforo o de tipo túnel o canal- (Mueller y Rudin, 1969), demostraron fehacientemente que la translocación iónica que se lleva a cabo en la mitocondria tiene un comportamiento electroforético.

De este modo, los antibióticos acarreadores de iones aparecieron en la escena como la herramienta experimental más poderosa utilizada para hacer evidente tanto la naturaleza electroforética del transporte de iones, como la relativa independencia de los gradientes químico y de carga eléctrica transmembranal. Asimismo, los antibióticos ionóforos hicieron patente que la fuerza protomotriz depende de forma íntima de la anisotropía o lateralidad de la membrana en un sistema vesicular cerrado (Chance y Montal, 1971).

a)



b)

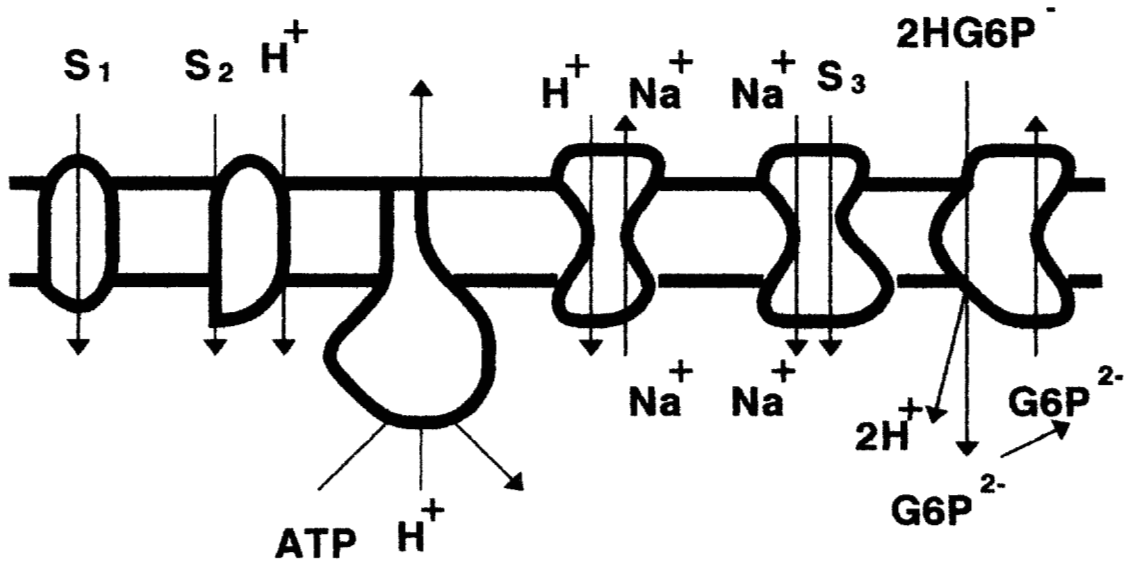


Figura 2.3. Intercambios iónicos en la membrana, asociados a la translocación catión/ H^+ a) mitocondrial; b) bacteriana.

Los estudios realizados mediante la translocación de cationes monovalentes facilitada por antibióticos ionóforos, tanto en mitocondrias, cloroplastos y bacterias fotosintéticas (Greville, 1969) como en membrana celular de estreptococos sin fosforilación oxidativa (Harold y cols., 1970), mostraron que el potencial de membrana puede ser la fuerza motriz para realizar el trabajo del transporte de iones. Concluyendo: queda fuera de toda duda la existencia de un metabolismo vectorial en membranas que conservan energía, como un ejemplo fundamental en la biología de reacciones químicas espacialmente orientadas (Chance y Montal, 1971).

Los translocadores de iones de la membrana mitocondrial.

El empleo de los antibióticos ionóforos, así como la cuantificación isotópica, electroquímica y espectroscópica del flujo y recambio de iones en diversos sistemas experimentales, demostraron que la mitocondria realiza un bien definido proceso de transferencia de Ca^{2+} . Este flujo iónico es catalizado por un acarreador específico (Vasington y Murphy, 1962; Carafoli y Sottocasa, 1974) que manifiesta un mecanismo electroforético de tipo uniporte para el Ca^{2+} . El movimiento de Ca^{2+} es impulsado por el gradiente de potencial eléctrico producido, inicialmente, por la salida de H^+ (Greville, 1969; Mitchell, 1967). Por otro lado, el uso de ionóforos de Ca^{2+} en membranas mitocondriales evertidas puso al descubierto la existencia de un mecanismo de transporte de tipo antiparalelo $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$, diferente al observado en membranas intactas (Estrada O. y cols., 1974a)

En este orden de ideas, es indispensable hacer mención del mecanismo de transporte de Na^+ y K^+ que experimentan las membranas mitocondriales.

Las evidencias previas sobre el funcionamiento de sistemas de bombas para cationes en diversas membranas celulares, hicieron natural sugerir la existencia de bombas de K^+ o acarreadores en la mitocondria, dependientes de alguna forma de energía para su operación (Lardy y cols., 1967; Pressman, 1968).

Efectivamente, los estudios realizados en PSM, mediante la medición directa de flujos de cationes y H^+ (Douglas y Cockrell, 1974), confirmaron la existencia de un translocador $\text{Na}^+, \text{K}^+/\text{H}^+$, de tipo antiparalelo, eléctricamente silencioso, predicho previamente por Mitchell y Moyle (Mitchell, 1966). Al mismo tiempo, el ensayo de antibióticos altamente selectivos, como la monazomicina (Estrada O. y Gómez Lojero, 1971) y la bovericina (Estrada O. y cols., 1972), en mitocondrias intactas sugirió también la presencia de un intercambiador natural que cataliza el recambio electroneutro $\text{Na}^+ > \text{K}^+/\text{H}^+$ (Estrada O., 1974).

Con base en lo anterior, también se ha sugerido que el gradiente de pH existente a través de la membrana es la causa principal de la distribución y el flujo de metabolitos aniónicos entre la mitocondria y el citoplasma (Palmieri y Quagliariello, 1969), concebidos, éstos, como fases de un sistema termodinámico abierto. En tal sistema, la función principal que desempeñaría un

acarreador antiparalelo catión/ H^+ activo sería generar gradientes transmembranales electroneutros de pH, regulados por su selectividad relativa para Na^+ o K^+ (Figura 2.3). Por lo tanto, el principal regulador de la velocidad y magnitud de la distribución de los metabolitos aniónicos entre la mitocondria y el citoplasma estaría representado por el mecanismo de translocador membranal de intercambio $Na^+ > K^+ / H^+$ (Estrada O., 1974; Dubinsky y Cockrell, 1974). La función fisiológica que se ha asociado a este último acarreador es la de mantener el volumen homeostático de las mitocondrias y sus propiedades se han descrito sólo en mitocondrias intactas (Jezek y cols., 1990; Kakar y cols., 1989), además de operar como un autorregulador del pH interno de las células de los vertebrados mediante el intercambio de H^+ intracelular por Na^+ intramitocondrial (Figura 2.3), análogo al circuito quimiosmótico observado en membranas bacterianas (Maloney, 1992).

Luego de todo lo expuesto hasta este momento, hace ya mucho que no existe otra alternativa que aceptar la antigua sugerencia de Racker (1974) de que el problema básico de la fosforilación oxidativa ya ha sido resuelto. La comparación de las propiedades de los translocadores modelo, como los antibióticos poliéteres carboxílicos, con las que se observan en translocadores proteicos por medio de técnicas de membranas modelo (Montal y Mueller, 1972) y de manipulación química (Montal, 1974) y genética (Martin y cols., 1984; Karpel y cols., 1988; Kakar y cols., 1989; Sardet y cols., 1989; Jezek y cols., 1990), han sido esenciales para comprender la naturaleza electroquímica del metabolismo energético.

Como se ha podido observar, los estudios existentes hasta el momento alcanzan a resolver el funcionamiento de los antiportes desde un punto de vista bioquímico. En el caso específico del antiporte Na^+ / H^+ mitocondrial (Pouysségur, 1985), el factor de crecimiento se une a un receptor específico que con ayuda de la proteína G activa a la fosfolipasa C, convierte al fosfatidilinositol-4,5-bifosfato a inositol-1,4,5-trifosfato; esto induce la unión de 1,2-diacilglicerol a la cinasa C, que a su vez aumenta el pH y dispara el antiporte Na^+ / H^+ (Pouysségur, 1985). Por otro lado, cuando aumenta la concentración de H^+ en el citoplasma, se inicia una serie de reacciones para amortiguarlo. Entre éstas destaca el intercambio de H^+ intracelular por Na^+ externo, mediado por el antiporte Na^+ / H^+ , además de los sistemas amortiguadores tradicionales. Se cuenta también con información del comportamiento cinético de varias de las isoformas de la proteína acarreadora Na^+ / H^+ (Levine y cols., 1993; Orłowski, 1993).

Aunque se ha dilucidado la secuencia de aminoácidos de algunas isoformas del antiporte Na^+ / H^+ , a través de estudios realizados con técnicas bioquímicas, de biología molecular y de simulación por medio de computadoras (Sardet y cols., 1989; Fliegel y cols., 1993; Orłowski, 1993), el mecanismo molecular preciso no se ha definido. Por ello, resulta de la mayor relevancia el identificar las bases moleculares de la dinámica de clatración y translocación de iones metálicos promovidas por acarreadores modelo, como los poliéteres neutros y carboxílicos. Todo esto, con la perspectiva de conocer los factores comunes a los eventos críticos del transporte o interacción iónica, los cuales

puedan ser homólogos a los llevados a cabo por translocadores naturales en membranas biológicas, siempre dentro del principio de universalidad de las estructuras y los procesos.

Para explicar los procesos de transporte catalizado por poliéteres carboxílicos y su selectividad iónica, así como las interacciones que guardan con la membrana (tomada ésta como un todo, no fraccionaria), se ha considerado como aspecto importante, el análisis de modelos teóricos a partir de datos experimentales.

La visualización de estos fenómenos desde una perspectiva sistémica puede contribuir a explicar los procesos causales dentro del marco fenomenológico de las transformaciones de la energía biológica.

La correlación de modelos, tanto teóricos como experimentales, con observaciones biológicas de campo -en sistemas idóneos- tiene como objetivo último, el de ampliar el marco conceptual para llegar a plantear un modelo predictivo de la regulación de la translocación iónica dentro del metabolismo energético de los seres vivos.

CAPITULO III

"Filete de culebra palustre,
 Hervido en la paila y cocido al horno;
 Ojo de lagartija y dedo de rana,
 Pelos de murciélago y lengua de perro,
 Lengüeta de víbora y aguijón de salamandra,
 Pata de lagarto y ala de lechuza,
 Para un encantamiento de efecto poderoso,
 Como un caldo infernal hirviendo y burbujeante."

William Shakespeare, *Macbeth*.

LA FORMACION DE COMPLEJOS IONICOS DE POLIETERES CARBOXILICOS Y SU SELECTIVIDAD IONICA. **Un resumen de Resultados.**

Los resultados que a continuación se presentan constituyen una aportación original a la literatura del campo del transporte iónico mediado por acarreadores modelo, sobre las propiedades fisicoquímicas de la formación de complejos individuales que, por sí solos, atestiguan la capacidad de los antibióticos poliéteres carboxílicos para interactuar de manera íntima y diferencial con una gran diversidad de cationes metálicos, independientemente de su capacidad para translocarlos.

Los objetivos.

En el presente trabajo se ha buscado identificar los factores termodinámicos y estructurales que, para los poliéteres carboxílicos de la familia de la nigericina, permiten reconocer su capacidad para formar ligandos iónicos móviles o fijos en membranas lipídicas. Al respecto, se estudiaron los patrones de selectividad y las propiedades de interacción iónica de los poliéteres nigericina, monensina y lasalócido A (Figura 3.1). Estas moléculas fueron proporcionadas por los Laboratorios Hoffman-La Roche, de Nutley, New Jersey, los Laboratorios Ely-Lilly, de Indianapolis, Indiana y los Laboratorios Sigma, de Saint Louis, Missouri.

El objetivo general del presente proyecto ha sido determinar los factores fisicoquímicos ambientales y de estructura molecular que regulan la interacción poliéter carboxílico-catión para correlacionarlos con su capacidad para catalizar el transporte iónico a través de membranas lipídicas y con sus efectos en la transferencia y conservación de energía en el metabolismo de los seres vivos. Se ha intentado alcanzar este objetivo general mediante los siguientes objetivos particulares:

- A. Discernir las bases de organización molecular de los poliéteres mencionados en la formación de complejos con los cationes de metales alcalinos, alcalinotérreos (Ca^{2+}) y lantánidos (Pr^{3+}) para determinar sus perfiles de interacción iónica.

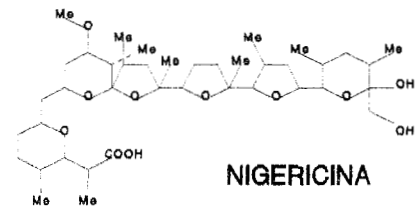
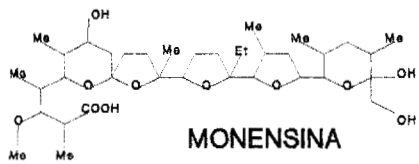
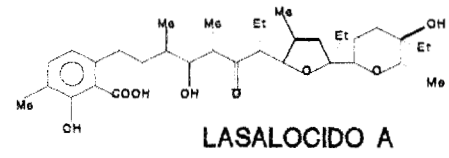
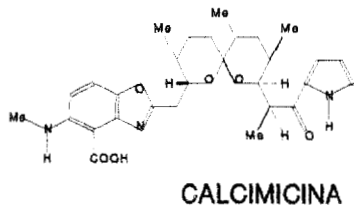


Figura 3.1. Estructura química de los poliéteres carboxílicos calcimicina, lasalócido A, monensina y nigericina.

- B. Distinguir las bases de organización molecular en la agregación para relacionarla con la capacidad de transporte de los ionóforos.
- C. Identificar los perfiles de interacción de los poliéteres en medios de hidrofobicidad y polaridad variable para correlacionarla con su capacidad de transporte a través de membranas lipídicas.
- D. Determinar las características del transporte o quelación de los poliéteres para presentar un modelo predictivo de la regulación de la translocación iónica.

Los antibióticos poliéteres como acarreadores modelo.

Los antibióticos poliéteres son una familia de productos naturales que se aislaron, inicialmente, de varias cepas de bacterias filamentosas o actinomicetos (Prosser y Palleroni, 1982; Liu, 1982) y poseen una potente actividad como agentes antimicrobianos, anticoccidiales (Ruff, 1982) y cardioactivos (Sutko y cols., 1977; Gachon y Moins, 1982; Moins y cols., 1982; Osborne y cols., 1982a; Hanley y Slack, 1982; Reed y Bokoch, 1982; Osborne y cols., 1982b) (Tabla 3.1). El mecanismo de la acción antimicrobiana de estos antibióticos fue descrito por primera ocasión hace ya más de un cuarto de siglo. En 1967, Estrada O. y cols. descubrieron que el modo de acción de uno de estos antibióticos, la nigericina, está asociado a su capacidad para catalizar el intercambio de K^+ por H^+ a través de membranas lipídicas.

Tabla 3.1. Características generales de algunos poliéteres carboxílicos.^a

Poliéter	Especie productora ^b	Efectos biológicos ^c
Nigericina	<i>S. hygrosopicus</i> , <i>S. albus</i> <i>S. violaeoniger</i> .	Aumenta Em; abate el transporte de serotonina; aumenta la síntesis de lactato
Monensina	<i>S. cinnamomensis</i>	Aumenta el Em; abate el transporte de serotonina; aumenta [GPMc]
Lasalócido A	<i>S. lasaliensis</i>	Produce flujo de aminas; abate el Em; inhibe la síntesis de ADN y ARN
Calcimicina	<i>S. chartreusis</i>	Regula flujos de Mg^{2+} y Sr^{2+} ; abate Em; altera [AMPc] y [GMPc]

^aTomadas de Liu (1982) y Reed (1982).

^bTodas pertenecen al género *Streptomyces*.

^cLos símbolos significan: Em, potencial de membrana; [AMPc], concentración de AMP cíclico; [GMPc], concentración de GMP cíclico.

Por esta capacidad para transportar iones a través de membranas lipídicas, tanto biológicas como artificiales, estos antibióticos fueron bautizados, por Pressman y cols. (1967), como "ionóforos carboxílicos".

En la actualidad se cuenta con alrededor de un centenar de antibióticos poliéteres carboxílicos, muchos de los cuales han sido aislados de diferentes cepas de actinomicetos, mientras que algunos han sido el producto de síntesis química (Westley, 1982). Todos ellos tienen un peso molecular que se encuentra entre 500 y 1,000 daltones (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Poliéteres carboxílicos más estudiados desde 1951.^a

Poliéter	Fórmula mínima	Peso molecular (daltones)
Nigericina	C ₄₀ H ₆₈ O ₁₁	724.9
Monensina A	C ₃₆ H ₆₂ O ₁₄ H ₂ O	688.9
Lasalócido A	C ₃₄ H ₅₄ O ₈ ·C ₂ H ₅ OH	636.9
Calcimicina	C ₂₉ H ₃₇ N ₃ O ₆	523.6

^aTomado de Westley (1982) y Taylor y cols. (1982).

La propiedad que caracteriza a cada uno de los antibióticos poliéteres es su diferente selectividad para complejar iones de metales alcalinos o alcalinotérreos y transportarlos a través de membranas lipídicas (Pressman y cols., 1967; Reed, 1979; Szabo, 1981; Taylor y cols., 1982; Gad y cols., 1985). Estas selectividades han sido determinadas en diferentes sistemas, tanto de membranas biológicas como artificiales (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Perfiles de selectividad iónica de algunos poliéteres carboxílicos, obtenidos en diferentes sistemas experimentales.

Poliéter	Sistema	Perfil
Nigericina ^a	Extracción en dos fases	K ⁺ > Rb ⁺ > Na ⁺ > Cs ⁺ > Li ⁺
Monensina ^b	Membranas lipídicas	Na ⁺ > K ⁺ > Li ⁺ > Rb ⁺ ≈ Cs ⁺
Lasalócido A ^c	Mitocondrias	Cs ⁺ > Rb ⁺ > K ⁺ > Na ⁺ > Li ⁺

^aPressman (1968).

^bHenderson y cols. (1969).

^cEstrada O. y cols. (1974)

Por lo anterior, estos ionóforos han servido como valiosos modelos para ilustrar las características dinámicas de acarreadores en membranas (Eisenman, 1968; Pressman, 1968; Pressman, 1973), así como un enfoque para dilucidar las

bases moleculares de la discriminación iónica en diversos sistemas biológicos (Reed, 1982).

También han sido ampliamente usados como herramientas para estudiar el papel que los gradientes iónicos de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} desempeñan en el metabolismo (Feinstein y cols., 1977; Shamo y Murphy, 1979; Malaisse y cols., 1980; Breitbart, 1981; Reed, 1982; Lombardini, 1985; Nuñez y Glass, 1985; Soltoff y Mandel, 1986), así como en sistemas naturales que transforman energía, como mitocondrias intactas (Graven y cols., 1966; Graven y cols., 1967; Estrada- O. y cols., 1967; Pressman, 1969; Wipf y Simon, 1970; Chapel y cols., 1979; Hatefi y cols., 1982), partículas submitocondriales (Montal y cols., 1970), bacterias (Guffanti y cols., 1979; Ahmed y Booth, 1983), bacterias fotosintéticas (Rott y Avi-Dor, 1977), partículas subbacteriales (Garty y cols., 1979), algas (Doughty y Diehn, 1982), cloroplastos (Packer, 1967; Larkum y Boardman, 1974; Walker, 1975; Telfer y cols., 1975; Ben-Hayyim y Krause, 1980), tilacoides (Bulychev y Vredenberg, 1976) y microsomas vegetales (Sze, 1980).

Las propiedades fisicoquímicas y el transporte.

Todos los ionóforos carboxílicos contienen dentro de su estructura química una variedad de átomos de oxígeno (O) en anillos tetrahidrofuranos y tetrahidropiranos que participan como donadores de e^- para coordinar con cationes metálicos (Westley, 1982). Además poseen, por lo general, un grupo carboxilo (R-COOH) terminal que es el que les confiere el apellido de "carboxílicos" (Figura 3.1). Al otro extremo de la molécula se encuentran uno o más grupos hidroxilo (R-OH). Son estos grupos los que pueden establecer puentes de hidrógeno (puentes H) con el R-COOH terminal (Duesler y Paul, 1982; Anteunis, 1982), por lo que la molécula se cierra formando una estructura de poliéter macrocíclico.

En 1968, Steinrauf y cols. determinaron, por difracción de rayos-X, la estructura macrocíclica cristalina de la sal de plata del ionóforo monocarboxílico nigericina. En la Figura 3.2 se puede observar que al formarse un complejo, la esfera de hidratación del metal es sustituida por su coordinación con los oxígenos 1, 2, 5, 6 y 7 de la molécula. Posteriormente, estudios de espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H-NMR}$) en solución en CDCl_3 , realizados por Rodios y Anteunis (1977), muestran que en el complejo con Na^+ también el O8 participa en la clatración del metal. Las diferencias entre ambas condiciones experimentales sugieren que la nigericina puede sufrir variaciones en la geometría de coordinación con el metal unido y, por lo tanto, que podría atrapar cationes con diferente estructura electrónica y número de coordinación.

Desde que lo manifestó Pressman (1968), se ha considerado que los ionóforos tipo nigericina transportan a los cationes de metales alcalinos como dipolos eléctricamente neutros. Se ha propuesto el siguiente modelo para explicar el mecanismo de transporte tipo antiporte (K^+/H^+) mediado por la nigericina (Figura 3.3):

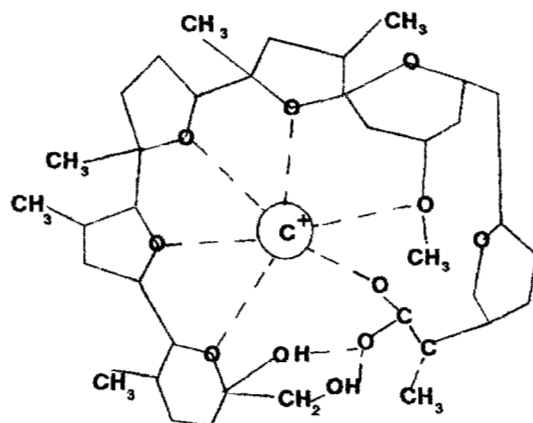


Figura 3.2. Estructura química del complejo nigericina-catión.

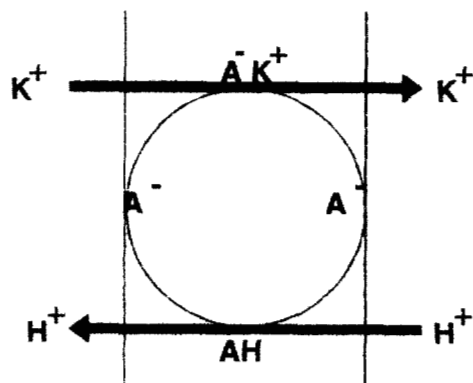


Figura 3.3. Modelo del mecanismo de transporte antiporte (K^+/H^+) catalizado por la nigericina.

La carga negativa del anión carboxilato ($R-COO^-$) anula la carga positiva del catión complejoado, de tal manera que el complejo formado es un *zwitterion* eléctricamente neutro. Este se mueve o difunde a través de la matriz lipídica membranal, hasta el lado en el que la concentración del catión es menor, donde se disocia el complejo. En este caso, no es la carga de los iones (H^+ y alcalinos), sino sus actividades químicas o concentraciones las que mueven al ionóforo.

Una vez disociado el complejo, la nigericina adquiere de nuevo la carga negativa del $R-COO^-$; la presencia de cationes hidrógeno o protones provoca que el $R-COO^-$ se protone a $R-COOH$ y que el ionóforo regrese al lado de donde tomó al catión K^+ para sustituirlo por el H^+ , con lo que se completa un ciclo de transporte catiónico eléctricamente neutro.

Este modelo explica claramente los resultados obtenidos en membranas mitocondriales intactas por Estrada O. y cols. en 1967, así como los observados en membranas mitocondriales, de eritrocitos y artificiales de fosfolípidos (Henderson y cols., 1969), que muestran un intercambio equitativo de K^+/H^+ mediado por nigericina.

La flexibilidad molecular de la nigericina.

Sin embargo, ya en 1967, Estrada O. y cols. encontraron que, si bien a concentraciones bajas -menores de $0.1 \mu M$ - se promueve un intercambio antiporte 1:1, a concentraciones mayores del poliéter, la nigericina estimula la hidrólisis de ATP en mitocondrias intactas en presencia de K^+ , lo que -de acuerdo con la hipótesis quimiosmótica de Mitchell (1961)- sugiere que, además de actuar como intercambiador electroneutro, este ionóforo podría transportar carga neta a través de la membrana, a favor del gradiente de potencial eléctrico.

Por otra parte, Taylor y cols. (1982) mencionan que existe evidencia de que otros poliéteres carboxílicos, como la grisorexina, la alborixina y el lasalócido A, comparten este mecanismo de transporte de carga eléctrica, aunque consideran que "este modo de acción parece ser de menor importancia comparado con la actividad electroneutra".

Posteriormente, con estos antecedentes, Markin y cols. (1975) y Toro y cols. (1976) demostraron por separado -en experimentos de conductimetría en membranas de bicapas lipídicas (BLM)- que, efectivamente, la nigericina transporta carga neta y que, además, forma aglomerados moleculares de proporción o estequiometría (poliéter:catión) de 2:1.

Más recientemente, en colaboración con Toro (1987) encontramos que la nigericina también cataliza la transferencia de carga neta a través de BLM, a pH 4, en presencia de K^+ con una estequiometría poliéter:metal de 3:1.

Todos estos resultados demuestran de manera definitiva la gran plasticidad de la nigericina para formar oligómeros móviles, en función del pH del medio y la concentración del poliéter, a partir de la agregación de monómeros en presencia de K^+ . Por otro lado, estos cambios en la molecularidad afectan, si

bien levemente, el orden de selectividad iónica para el transporte mediado por la nigericina.

Los resultados.

A la luz de la flexibilidad mostrada por la nigericina, durante el desarrollo del presente trabajo se encontró que este poliéter sí puede formar complejos de requerimientos energéticos equivalentes con los cationes Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ y Cs^+ , aunque a la fecha no existe evidencia -en los sistemas experimentales tradicionales- de que todos estos cationes sean translocados. Los estudios espectroscópicos en $^1\text{H-NMR}$ de la nigericina muestran modificaciones notables en presencia de Li^+ y Cs^+ . Los ensanchamientos de algunas señales escogidas de acuerdo con los datos publicados por Rodios y Anteunis (1977) y Toro y cols. (1987), sugieren un cambio importante en la movilidad de estas regiones dentro de la estructura de la molécula. Estos efectos deben adjudicarse a la influencia de cada catión dentro de la corona de coordinación del poliéter.

Son estos hallazgos -la flexibilidad molecular mostrada por la nigericina y su aparente capacidad para interactuar con Li^+ y Cs^+ , que son cationes monovalentes a los que no transporta- los que conducen a considerar que los ionóforos monocarboxílicos puedan tener un perfil de interacción iónica mucho más amplio que el supuesto hasta ahora.

Con el fin de comprender la relación entre estructura y actividad ionoforética, se buscaron datos que hicieran evidentes los cambios conformacionales que debieran ocurrir en otros poliéteres -monensina y lasalócido A- cuando interactúan con cationes metálicos alcalinos y de transición.

Así, se buscó establecer la forma en que se asocian dichos poliéteres con los cationes alcalinos, con Ca^{2+} y con Pr^{3+} .

Para determinar la influencia del solvente en la conformación de los poliéteres estudiados, se utilizaron dos solventes: uno polar, etanol absoluto, y otro no polar, n-hexano. Los resultados permiten establecer la flexibilidad molecular de ambos poliéteres.

Con estas evidencias se busca contribuir a determinar las bases fisicoquímicas de la formación de complejos iónicos de los poliéteres carboxílicos nigericina, monensina y lasalócido A, para correlacionarlas con su actividad ionoforética. Esto se logró mediante la siguiente estrategia experimental:

La formación de los ácidos libres

Los poliéteres, monensina y lasalócido A, se obtuvieron de los laboratorios Sigma, en forma de la sal de sodio. Se formaron los ácidos libres para eliminar posibles influencias del ion Na^+ en la formación de los complejos (Gertenbach y Popov, 1975; Cox y cols., 1984). Se disolvió la sal de sodio del poliéter en CHCl_3 . Se agregó HCl 0.1 N; se agitó durante 15 minutos. Se dejó reposar de

90 a 120 minutos; se extrajo la fase acuosa, quedando sólo la fase orgánica. Esto se repitió tres veces a partir del punto donde se agrega el ácido 0.1 N.

Posteriormente, se evaporó la fase orgánica a sequedad a baño María bajo corriente de $N_2(g)$ y se liofilizó durante 3 horas. Finalmente, se cuantificó el contenido de Na(I) de las fases acuosas por espectrofotometría de absorción atómica o por fotometría de emisión de flama. El contenido de Na^+ en 10 mg de la sal comercial de monensina es, por ejemplo, de 33.2 ppm. La extracción en este sistema desplaza 99.09% del Na^+ .

Las sales de sodio de los poliéteres son insolubles en CCl_4 , mientras que son solubles en etanol absoluto y en $CHCl_3$. En cambio, las formas protonadas de los poliéteres son solubles en los tres solventes mencionados.

Estabilidad en la formación de los complejos poliéter-cación.

Los valores de pK_a de los poliéteres nigericina, monensina y lasalócido A se determinaron en un medio homogéneo de permitividad relativa (ϵ_r) de 38.48, para conocer la facilidad de disociación ácida de estas moléculas, así como para observar el efecto que la capacidad dieléctrica del medio produce en ella. El pK_a es un parámetro que indica la capacidad de una molécula para disociarse de sus protones. Este parámetro se relaciona con el tamaño de la molécula y los grupos substituyentes que ésta posea. El pK_a de los ácidos libres de la nigericina, de la monensina y del lasalócido A, se obtuvo por titulación potenciométrica con hidróxido de tetrametil amonio (TMAOH) 1.0 M, estandarizado, en una solución de 1,4-dioxano/ H_2O 45 % (v/v) (Tabla 3.4). La titulación se realizó con agitación continua y a temperatura constante de 25 °C.

Tabla 3.4. Valores de pK_a para los poliéteres nigericina, monensina y lasalócido en un medio de $\epsilon_r = 38.48^a$.

Poliéter	pK_a
Nigericina	7.76 ± 0.11
Monensina	6.44 ± 0.02
Lasalócido A	4.41 ± 0.07

^aEl ácido libre de cada poliéter (0.1 mM) se disolvió en 1,4-dioxano/ H_2O 45 % (v/v).

La factibilidad termodinámica de la interacción poliéter-cación se verificó mediante de la determinación de las constantes de estabilidad (K_s) de la reacción de formación de los complejos en solución, en una sola fase homogénea a temperatura constante (25 °C), por técnicas potenciométricas con electrodos ionselectivos para los cationes monovalentes, y colorimétricas con indicadores metalocrómicos para los polivalentes -antipirilazo III (APIII) 50 μM para el ion Ca^{2+} (Scarpa y cols., 1978a) y muréxido 40 μM para el Pr^{3+} (Scarpa y cols.,

1978b). Las determinaciones se hicieron al equilibrio, teniendo 100 μM del poliéter y concentraciones equimolares de cloruro del catión en cuestión. Los experimentos se hicieron en la solución homogénea de ϵ_r 38.48 a $\text{pH} = \text{pK}_a$, como se publicó previamente para el complejo de nigericina- K^+ (Toro y cols., 1987).

Por las propiedades electrolíticas de los metales alcalinos en solución, la determinación potenciométrica en una sola fase homogénea es una técnica apropiada para confirmar la interacción de los poliéteres con los cationes Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ y Cs^+ . Los valores de RT/ZF de las curvas de calibración con los cationes metálicos sugieren que la baja ϵ_r del medio (38.48) -comparada con la del agua pura ($\epsilon_r = 78.54$)- afecta la respuesta de los electrodos. Sin embargo, las lecturas de ΔE° , en función de $-\log [\text{M}^+]$, son estadísticamente significativas, por lo que los valores obtenidos son confiables. La diferencia más importante en el poder de resolución de la técnica potenciométrica la representa la selectividad intrínseca de los electrodos usados; en particular la del Beckman 39047, que puede verse influida por la movilidad de los cationes hidratados en la solución empleada.

La Tabla 3.5 muestra los valores de $\log K_s$ obtenidos para los complejos de los poliéteres nigericina, monensina y lasalócido A con los cationes Li^+ , Na^+ , Cs^+ , Ca^{2+} y Pr^{3+} en solución homogénea.

Los valores de $\log K_s$ sugieren que la nigericina forma complejos tres órdenes de magnitud más estables con los cationes Li^+ y Na^+ que la monensina; mientras que su estabilidad con Cs^+ es cuatro órdenes de magnitud más alta. Por otro lado, si bien la secuencia de estabilidad del lasalócido A con los cationes alcalinos, similar a la de la nigericina, los valores de $\log K_s$ son de cuatro a cinco órdenes más pequeños que para la nigericina. Por su parte, la monensina muestra un comportamiento diferente a los otros dos poliéteres; los valores de $\log K_s$ con los tres cationes alcalinos muestran que este poliéter forma los complejos más estables con Na^+ que con Li^+ y mucho más que con Cs^+ .

Tabla 3.5. Valores de $\log K_s$ para los complejos poliéter-catión^a.

Poliéter	$\log K_s$				
	Li^+	Na^+	Cs^+	Ca^{2+}	Pr^{3+}
Nigericina	4.16 ± 0.34	3.91 ± 0.22	3.82 ± 0.34	-3.37 ± 0.72	-6.25 ± 0.32
Monensina	1.55 ± 0.40	1.94 ± 0.52	0.48 ± 0.32	n. r.	-5.88 ± 0.52
Lasalócido A	0.81 ± 0.38	0.79 ± 0.36	0.71 ± 0.25	-3.57 ± 0.24	-5.82 ± 0.72

^aEn el mismo medio de la Tabla 3.4 ($\epsilon_r = 38.48$) a $\text{pH} = \text{pK}_a$ con HCl. Se consideran estequiometrías de 1:1 para los cationes alcalinos, 2:1 para el Ca^{2+} y 3:1 para el Pr^{3+} .

Tocante a la interacción de los ionóforos estudiados con los cationes polivalentes, es notable que los valores de $\log K_s$ sean muy pequeños -más de cuatro órdenes menores que con los cationes alcalinos- y, segundo, similares entre los tres antibióticos. Los resultados sugieren que en solución, los complejos poliéter-cación son tres órdenes menos estables con Pr^{3+} que con Ca^{2+} .

La estimación de los valores de ΔG° (Tabla 3.6), a partir de los datos de $\log K_s$, muestran que la nigericina y el lasalócido A pueden interactuar, cada uno por su lado, de manera equivalente con los tres cationes alcalinos probados en solución, aunque el lasalócido se muestra más inestable con tales iones metálicos. El caso de la monensina es diferente, ya que su interacción es termodinámicamente más factible con Na^+ y Li^+ que con Cs^+ .

Por su parte, las estimaciones de ΔG° sugieren que la formación de los complejos poliéter-cación polivalente, Ca^{2+} o Pr^{3+} , no está termodinámicamente favorecida en solución.

Tabla 3.6. Valores de ΔG° para los complejos poliéter-cación^a.

Poliéter	ΔG° (Kcal/mol)				
	Li^+	Na^+	Cs^+	Ca^{2+}	Pr^{3+}
Nigericina	-5,681	-5,339	-5,271	4,591	8,505
Monensina	-2,117	-2,646	- 658	n. r.	8,000
Lasalócido A	-1,099	-1,072	- 966	4,859	7,933

^aEl experimento se realizó como se especifica en la Tabla 3.5.

Tasas de unión.

Las tasas de unión nigericina-cación se obtuvieron por titulación potenciométrica en el mismo medio utilizado para la determinación de las K_s . Los experimentos se hicieron a concentración constante de los ácidos libres de los poliéteres, añadiendo el catión metálico y graficando su tasa de unión como una función de $[\text{METAL UNIDO}]/[\text{METAL TOTAL}]$, según describe Smith (1981). Durante la titulación se midió el desplazamiento de ion H^+ como cambio en el pH del medio experimental.

El comportamiento de la unión del poliéter con los cationes alcalinos se siguió con electrodos ionselectivos en solución homogénea. La Figura 3.4 muestra las isotermas de unión nigericina-metal en función de la concentración de metal total a concentración constante de poliéter. Con cada catión alcalino ensayado se observa una aparente reacción de primer orden. Sin embargo, existen diferencias en la tasa de unión del poliéter con los distintos metales. Los cationes Li^+ y Cs^+ muestran tasas de unión más rápidas que los iones Na^+ , K^+ y Rb^+ ; no obstante, los pequeños iones Li^+ y Na^+ presentan valores de saturación más altos que los cationes alcalinos más grandes.

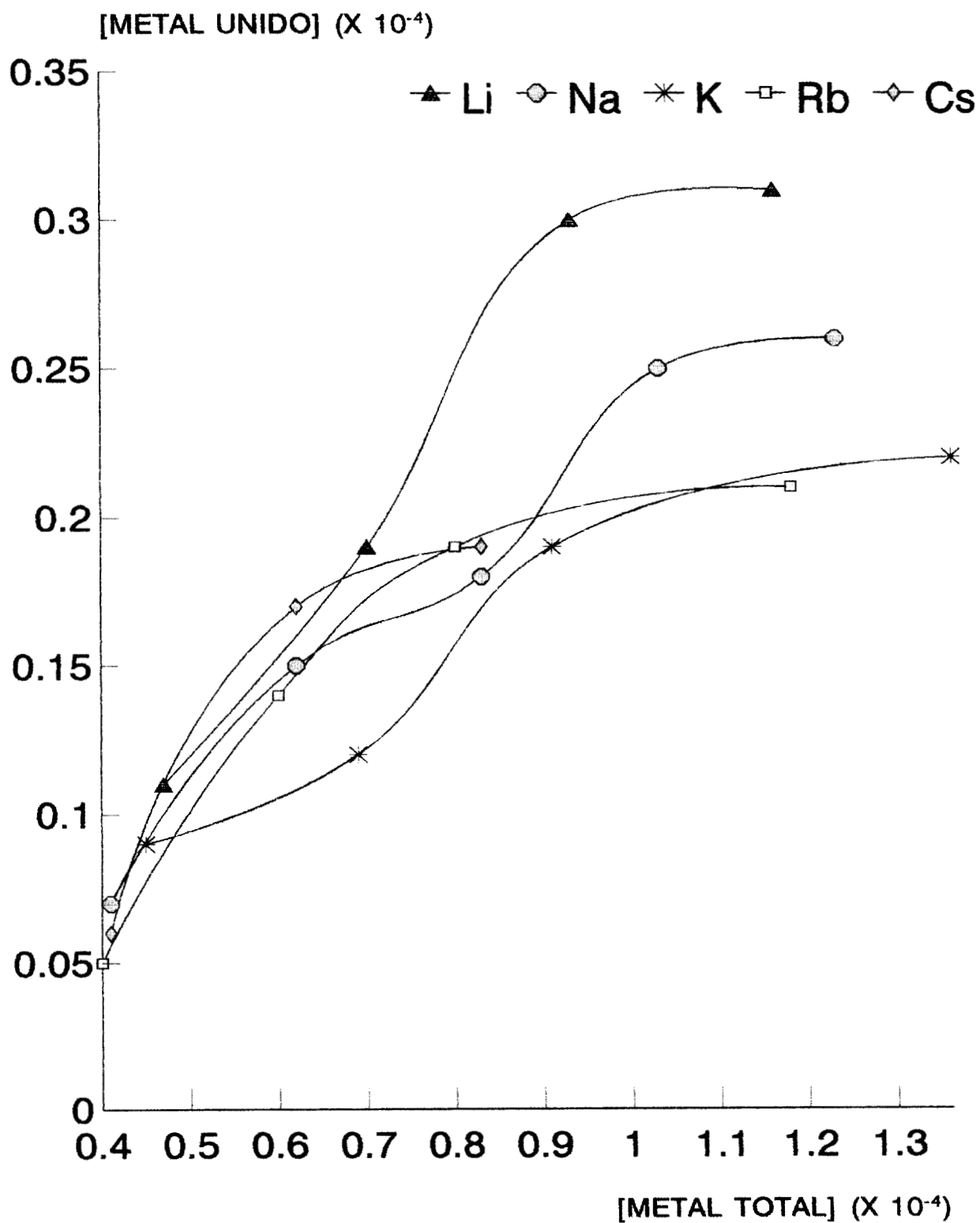


Figura 3.4. Isotermas de unión nigericina-cación en solución homogénea en una sola fase a pH 7.76 y ϵ_r 38.48, como en la Tabla 3.5. La concentración inicial de poliéter fue de $112 \pm 6 \mu\text{M}$.

Formación de complejos por saturación.

Los complejos de los poliéteres monensina y lasalócido A se formaron por saturación del ácido libre del poliéter con sales inorgánicas de los cationes Na^+ , Li^+ , Ca^{2+} y Pr^{3+} ; se utilizaron sales no solubles en CHCl_3 , siguiendo la técnica propuesta por Toro y cols., (1987).

Para cada complejo se tomaron 10 mg de ácido libre de poliéter y se disolvieron en CHCl_3 . Se agregaron 100 equivalentes de sal inorgánica del catión en turno, divididos en tres partes. En cada agregado se agitó vigorosamente durante 3 minutos. La sal inorgánica se sedimentó por centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se pasó a otro tubo y el precipitado del primero se lavó con 2 ml de CHCl_3 , agitando manualmente y se dejó sedimentar por gravedad; el sobrenadante se pasó al segundo tubo y el contenido (complejo poliéter-catión) se concentró a baño María bajo corriente de $\text{N}_2(\text{g})$ hasta un volumen de 2 ml. Esto se repitió cinco veces, hasta completar 500 equivalentes de catión por poliéter. Se pasó el sobrenadante por un filtro resistente a solventes orgánicos con diámetro de poro de $0.45 \mu\text{m}$; se evaporó a sequedad a baño María bajo corriente de $\text{N}_2(\text{g})$.

Para incrementar el rendimiento, los precipitados formados en los cinco tubos cónicos se lavaron cada uno con 2 ml de CHCl_3 ; se agitaron y se centrifugaron. Los sobrenadantes se filtraron y liofilizaron.

Las sales inorgánicas empleadas fueron Na_2CO_3 (Merck) grado analítico; Li_2CO_3 (Merck) grado analítico; CaCO_3 (J.T. Baker) grado reactivo y PrCl_3 (ICN) grado reactivo.

La interacción del ácido libre de monensina con la sal inorgánica de Na^+ , dio como resultado la formación de un sólido cristalino opaco soluble en etanol absoluto y en CHCl_3 . La saturación del mismo ácido libre con Li_2CO_3 formó un sólido cristalino transparente, soluble en CHCl_3 y en etanol.

La interacción de la monensina con CaCO_3 produjo un sólido en forma de polvo blanco muy fino que también fue soluble en CHCl_3 y en etanol absoluto. Finalmente, la interacción del ácido libre de monensina con PrCl_3 dio un sólido transparente soluble en CHCl_3 y en etanol absoluto.

La interacción del ácido libre del poliéter lasalócido A con la sal Na_2CO_3 formó un sólido cristalino soluble en CHCl_3 , en etanol absoluto y en n-hexano; en este último solvente, se tuvo que dar una ligera agitación en mezcladora a temperatura ambiente. La interacción con Li_2CO_3 proporcionó un sólido cristalino muy soluble en CHCl_3 , soluble en etanol absoluto y en n-hexano. La saturación con CaCO_3 dio un sólido blanco, soluble en CHCl_3 , en etanol y en n-hexano. Finalmente, la interacción con PrCl_3 formó un sólido cristalino con una ligera tonalidad verde que pone de manifiesto la interacción del lasalócido A con el

cación Pr^{3+} . Este complejo es soluble en CHCl_3 , en etanol absoluto y es ligeramente soluble en n-hexano.

Estequiometría poliéter-cación.

La proporción de los cationes Na^+ y Li^+ en los complejos formados con cada uno de los poliéteres se cuantificó por flamofotometría. Para el poliéter monensina, se cuantificaron su sal de sodio (5.0 mg en 10 ml de etanol/agua al 90%); el complejo con Na^+ (3.4 mg en 5 ml de etanol/agua al 90%) y el complejo con Li^+ (2.8 mg en 5 ml de etanol/agua al 90%). Para el lasalócido A, se cuantificó el catión Na^+ del anterior complejo formado (4.7 mg en 10 ml de etanol/agua al 90%) y el complejo formado con Li^+ (3.0 mg en 5 ml de etanol/agua al 90%).

Para calcular las estequiometrías poliéter:cación se empleó la relación $[I]/[C]$, donde $[I]$ es la concentración molar del poliéter y $[C]$ es la concentración molar del catión.

La formación de complejos de los poliéteres con Ca^{2+} , se detectó por espectrofotometría en presencia de 0.05 mM de la sal de sodio del indicador metalocrómico AP-III (ICN) (Scarpa y cols., 1978a). Las muestras de cada complejo de poliéter- Ca^{2+} (1.5 mg) y los controles (ácidos libres), se digirieron con HNO_3 concentrado; se evaporó a sequedad en baño de aceite mineral; se diluyeron con agua desionizada y se agitaron. Cada solución se pasó a una cámara de vidrio con refrigeración empleando agitación continua y se midió el pH. El pH se ajustó a 4.0 empleando TMAOH. Finalmente, se agregó un volumen igual de solución de AP III 0.1 mM.

Para cuantificar el catión Pr^{3+} se utilizó el indicador metalocrómico muréxido (Merck) 0.035 mM para valoración (Scarpa y cols., 1978b) a pH 5.0. Las muestras de cada complejo se procesaron como se hizo con las de los complejos poliéter- Ca^{2+} . Las curvas y las muestras se leyeron a 471 nm.

Las relaciones estequiométricas resultantes de los complejos de monensina y lasalócido A con los cationes metálicos ensayados se muestran en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7. Proporciones estequiométricas de los complejos de monensina y lasalócido A con Li^+ , Na^+ , Ca^{2+} y Pr^{3+} .^a

Cación	Proporción poliéter/cación	
	Monensina	Lasalócido A
Li^+	1.22 ± 0.01	3.04 ± 0.00
Na^+	0.87 ± 0.03	1.30 ± 0.01
Ca^{2+}	2.32 ± 0.02	2.33 ± 0.04
Pr^{3+}	17.08 ± 0.03	3.00 ± 0.07
^a Monensina-sal de Na^+ :	0.97 ± 0.02.	

Los valores muestran que la estequiometría de la monensina con ambos cationes alcalinos, Li^+ y Na^+ , es 1:1 y con el alcalinotérreo Ca^{2+} , divalente, es de 2:1, mientras que tiene una unión muy inespecífica con el lantánido Pr^{3+} , trivalente, siendo su estequiometría de 17:1. Mientras se desarrollaba el presente trabajo experimental, apareció un reporte independiente sobre la formación de dímeros de monensina con cationes divalentes (Hebrant y cols., 1992).

Por su parte, en los datos para el poliéter lasalócido A los valores muestran que la estequiometría con Na^+ es 1:1, con Ca^{2+} es 2:1 y se aprecia que tanto para el Pr^{3+} como para el Li^+ , la proporción resulta ser 3:1, mientras que las pruebas con K^+ y Rb^+ sugieren relaciones con valores de 3:2 en ambos casos.

Identificación de los complejos poliéter-cación.

La interacción de los poliéteres monensina y lasalócido A en su forma de ácido libre o protonado, con cationes alcalinos, con Ca^{2+} y con Pr^{3+} , se hizo evidente por las diferencias en el espectro de absorción ultravioleta-visible (UV/VIS) del ácido libre y las sales correspondientes de ambos poliéteres. Los espectros en UV se leyeron en el intervalo de 200-300 nm de longitud de onda (λ) para la monensina y de 200-350 nm para el lasalócido A; se emplearon celdas cuadradas de cuarzo de 3 ml y de 1 cm de paso de luz.

Los espectros en UV de los complejos de monensina en etanol absoluto, del ácido libre y la sal de sodio muestran marcadas diferencias entre sí que sugieren cambios conformacionales en todas las formas (Figura 3.5).

Los valores de coeficiente de extinción (ϵ) para la sal de sodio de la monensina revelan una respuesta muy pobre comparada con las demás formas del poliéter; aunque se puede apreciar un pico de absorción máxima a 208 nm. El ácido libre muestra un pico de absorción máxima a 227 nm y un pico más pequeño a 277 nm. Los aspectos más importantes en el espectro del complejo con Na^+ , revelan un pico de absorción máxima a 206 nm y la extinción del pico de absorción máxima observado a 227 nm en el ácido libre, mientras que la señal a 277 nm que se observa en el ácido libre, en el complejo con Na^+ disminuye en intensidad. Se debe hacer notar que las absorbencias máximas en ambos espectros son similares, con ϵ mayores de $2500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

La interacción del ácido libre de monensina con los cationes polivalentes, produce un notable efecto hipercrómico, con un marcado incremento en el ϵ de la molécula, principalmente en la región del UV lejano (200-250 nm).

En el complejo de la monensina con Ca^{2+} se muestra el pico de absorbencia máxima a 206 nm que se observa en el ácido libre. También, aparece un pico a 220 nm que no se encuentra en las formas anteriores. En el complejo con Pr^{3+} se observa un gran ensanchamiento con absorbencia máxima a 215 nm, además de mostrar el mayor efecto hipercrómico a casi todo lo largo del espectro del ácido libre.

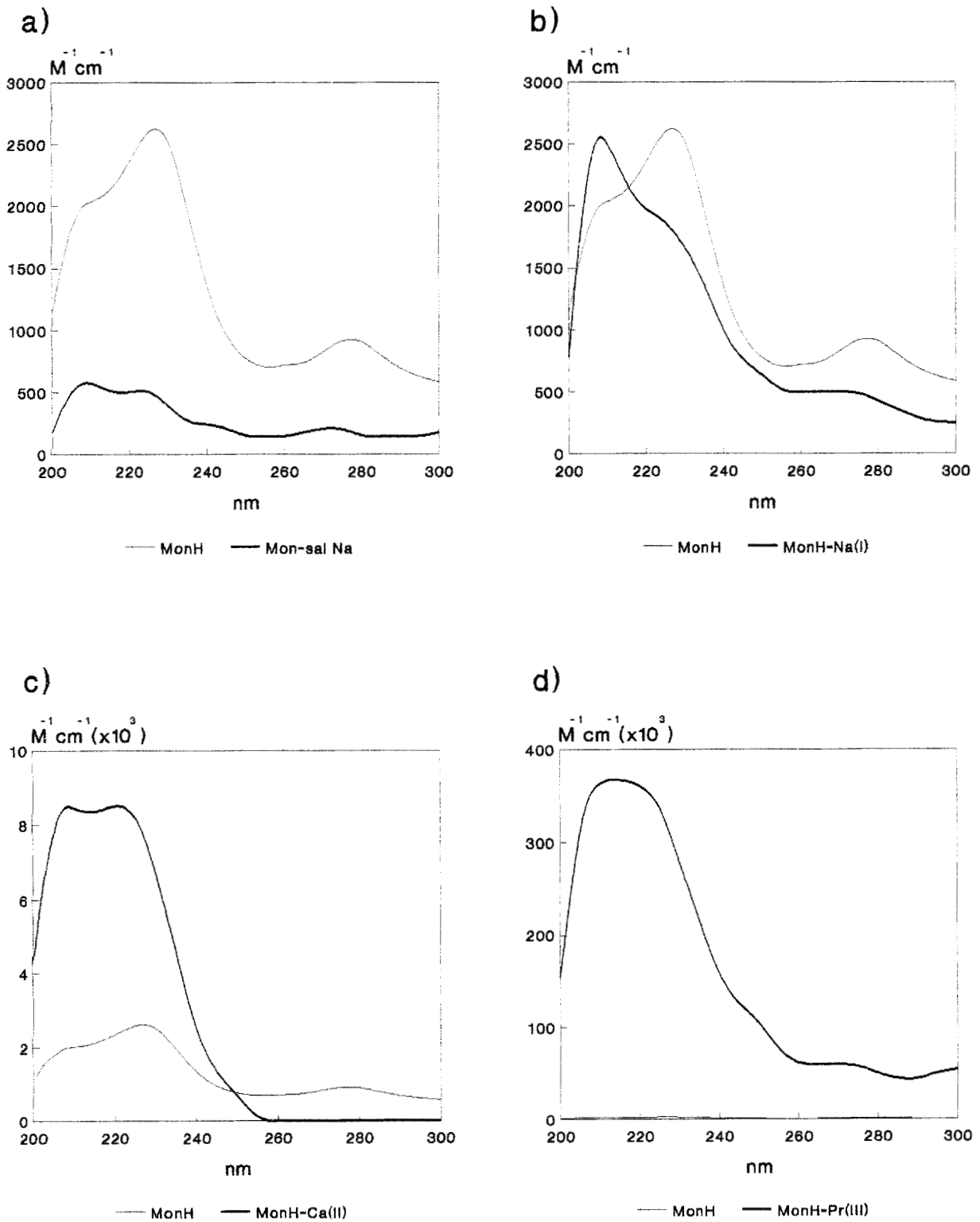


Figura 3.5. Espectros de absorción UV de diversas formas del poliéter monensina en etanol absoluto.

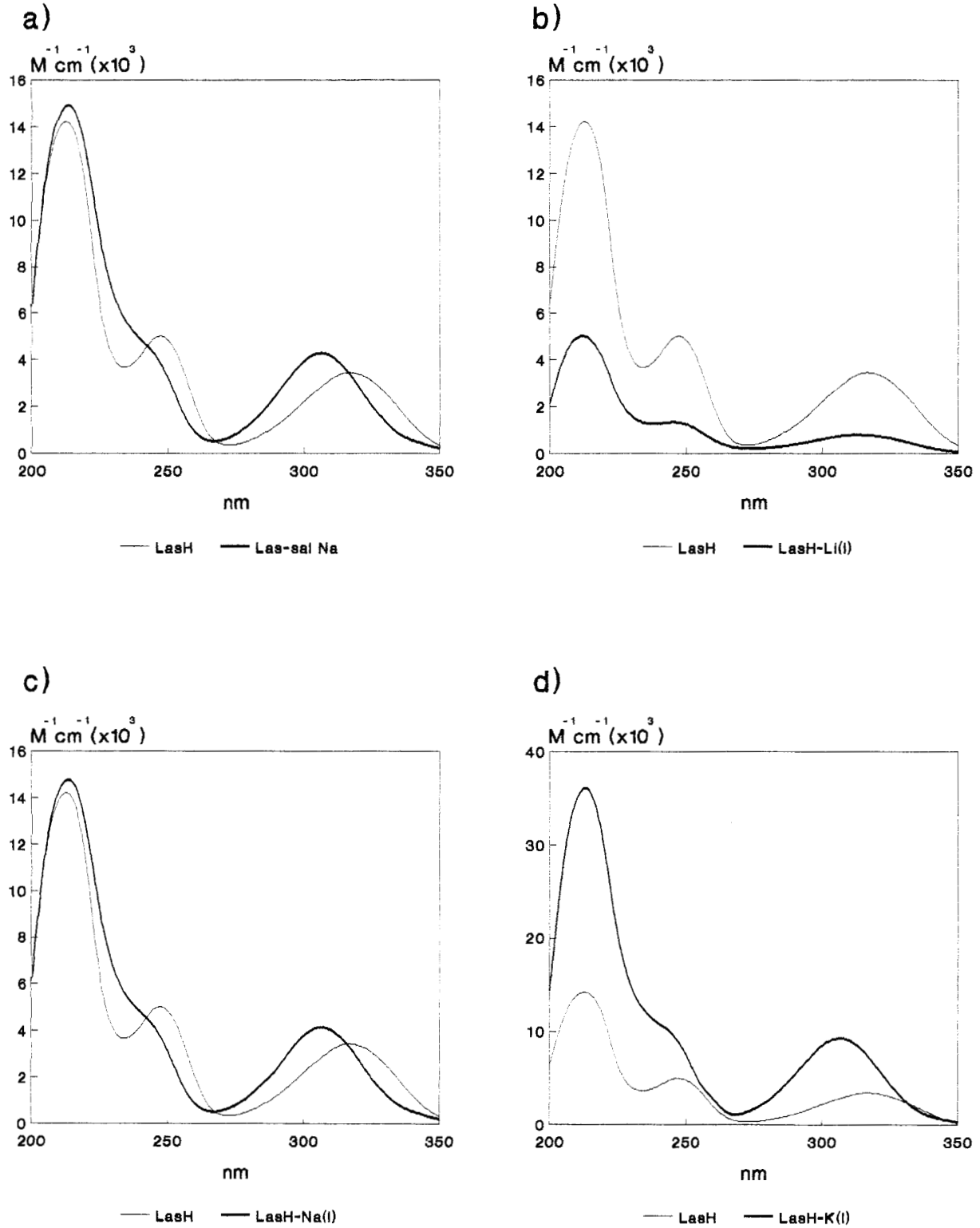


Figura 3.6. Espectros de absorción UV de diversas formas del poliéter lasalócido A en etanol absoluto.

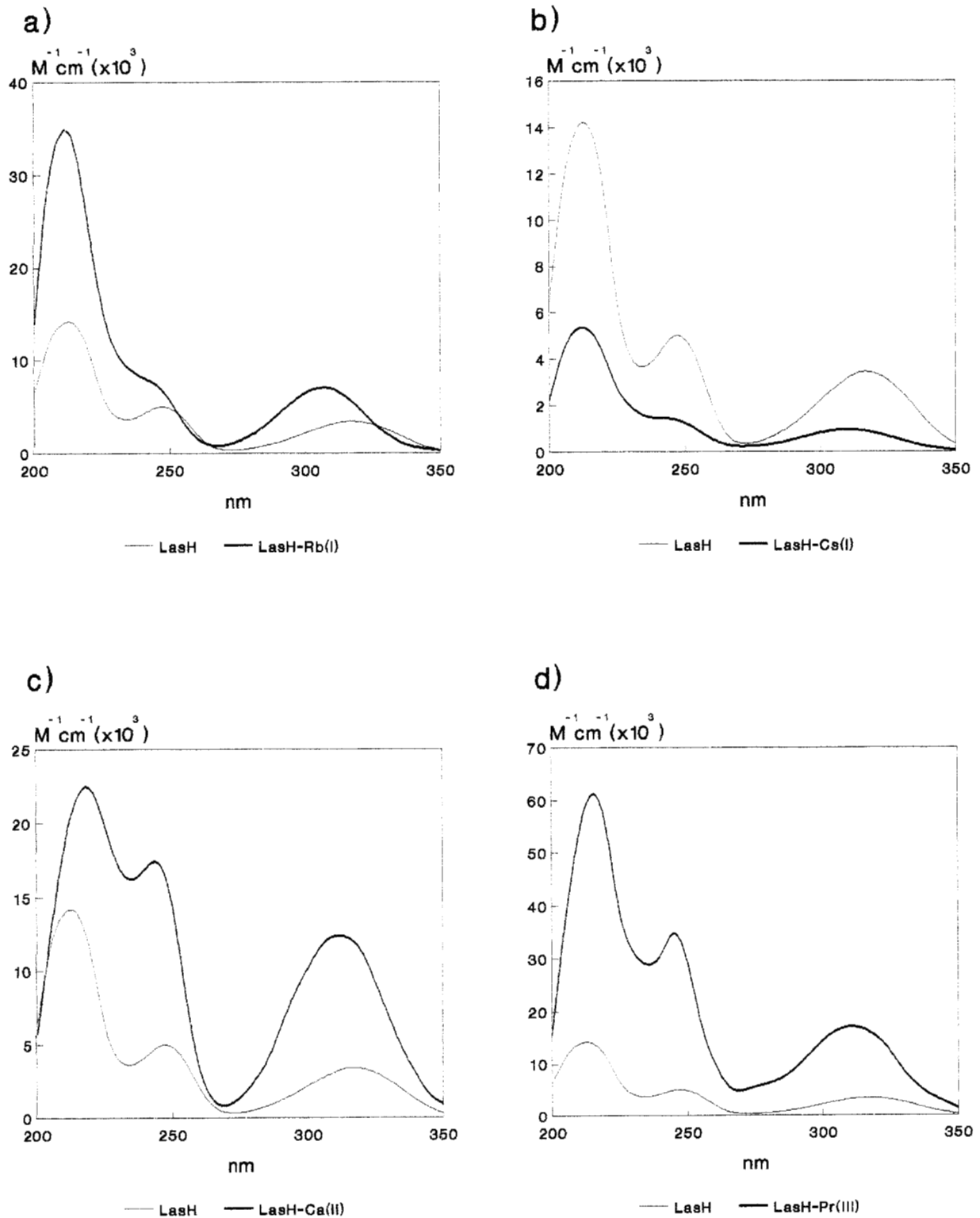


Figura 3.7. Espectros de absorción UV de diversas formas del poliéter lasalócido A en etanol absoluto.

Los corrimientos en la absorción UV del lasalócido A dependientes de catión se estudiaron en etanol. En el intervalo de λ estudiado generalmente se observaron tres bandas principales de absorción: λ_1 cerca de 210 nm, λ_2 cerca de 245 nm y λ_3 cerca de 310 nm; en todos los casos la λ_1 fue la de máxima absorbencia (Figuras 3.6 y 3.7).

Respecto al ácido libre del lasalócido A se pueden notar tres tipos de características: primero, los valores de ϵ sufren un abatimiento cuando el ácido libre se une a los cationes alcalinos Li^+ y Cs^+ , mientras que aumentan con K^+ y Rb^+ . Por otro lado, en las bandas λ_2 y λ_3 aparecen corrimientos al azul cuando hay cationes alcalinos presentes; los hombros en λ_2 se producen por el corrimiento de esta banda de contribución aromática $\pi \rightarrow \pi^*$ y contribuyen al incremento de la extinción de λ_1 . Finalmente, aparecen efectos hipercrómicos y corrimientos al rojo de la banda de absorción λ_1 con los cationes Ca^{2+} y Pr^{3+} (Figura 3.7). Es notable que λ_2 no se corra ni se abata cuando el ácido lasalócido A se une a Ca^{2+} y Pr^{3+} y, por lo tanto, no contribuya a la absorción de λ_1 . Es evidente que la intensidad de la absorción en el UV depende de la conformación del complejo lasalócido-catión formado.

Los espectros de dicroísmo circular (DC) de las diferentes formas de la nigericina, la monensina y el lasalócido A, se corrieron en etanol absoluto en un espectropolarímetro Jasco J-500A, calibrado con ácido (+)-10-canfor-sulfónico (Hennessey y Johnson, 1982), y una celda circular de 1 ml, de 1 mm de paso de luz y en n-hexano en una celda circular de 1 ml de 0.5 mm de paso de luz.

Los espectros en DC de las sales de sodio, ácidos libres y complejos de la nigericina y la monensina en etanol absoluto, no muestran bandas de absorción en el intervalo estudiado. A pesar de poseer múltiples centros quirales, ambas moléculas son ópticamente inactivas en esta región del espectro.

La actividad óptica de la molécula de lasalócido A exhibe tres bandas de dicroísmo circular que se correlacionan con las bandas de absorción electrónica UV, λ_1 , λ_2 y λ_3 mostrados en las Figura 3.6 y 3.7. La solución etanólica del ácido libre del lasalócido A presenta dos bandas de elipticidad molar ($[\theta]$) negativas, λ_2 a 245 nm y λ_3 a 292 nm. También se distingue una banda de $[\theta]$ positiva (λ_1) a 215 nm (Figura 3.8). Este dicroísmo positivo aparentemente continúa por debajo de los 200 nm tanto en solución etanólica como en n-hexano. La $[\theta]$ negativa del lasalócido A en etanol se incrementa en presencia de Na^+ . Este aumento es mayor en la sal de sodio, donde el grupo $-\text{COOH}$ del radical salicílico está disociado; éste se asocia con un pequeño corrimiento al rojo de la banda λ_3 . Además, el catión Na^+ induce un cambio en la banda λ_1 , de positivo a negativo. Cuando se comparan las bandas negativas del complejo de Na^+ protonado y las de la sal de sodio, la $[\theta]$ de λ_1 es proporcionalmente mayor que la $[\theta]$ de λ_2 y λ_3 en el primero que en la segunda.

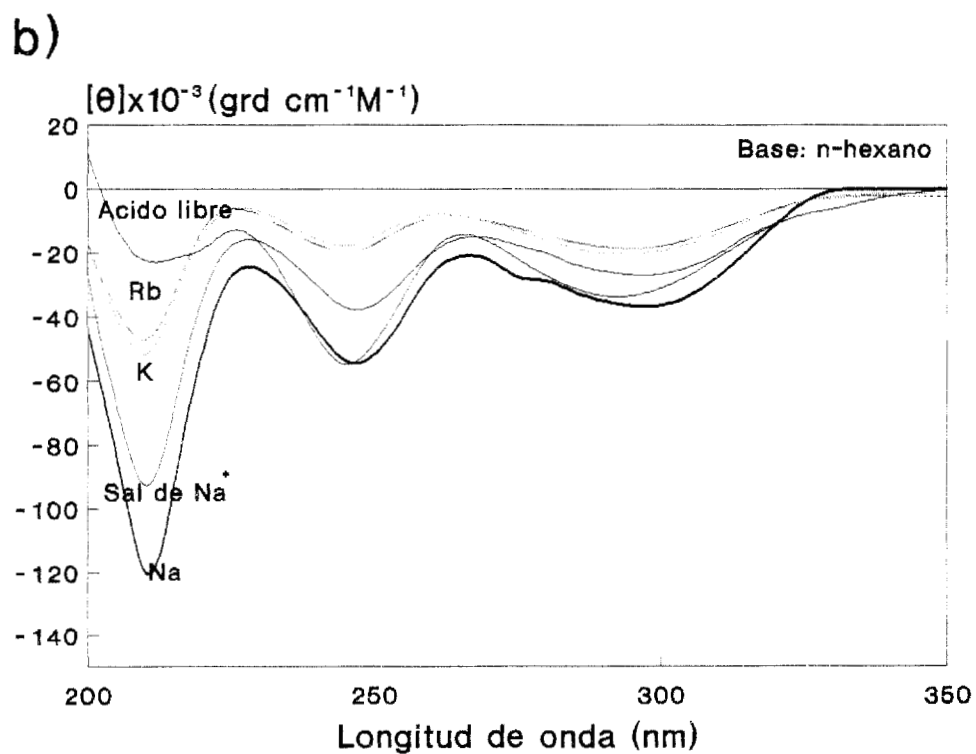
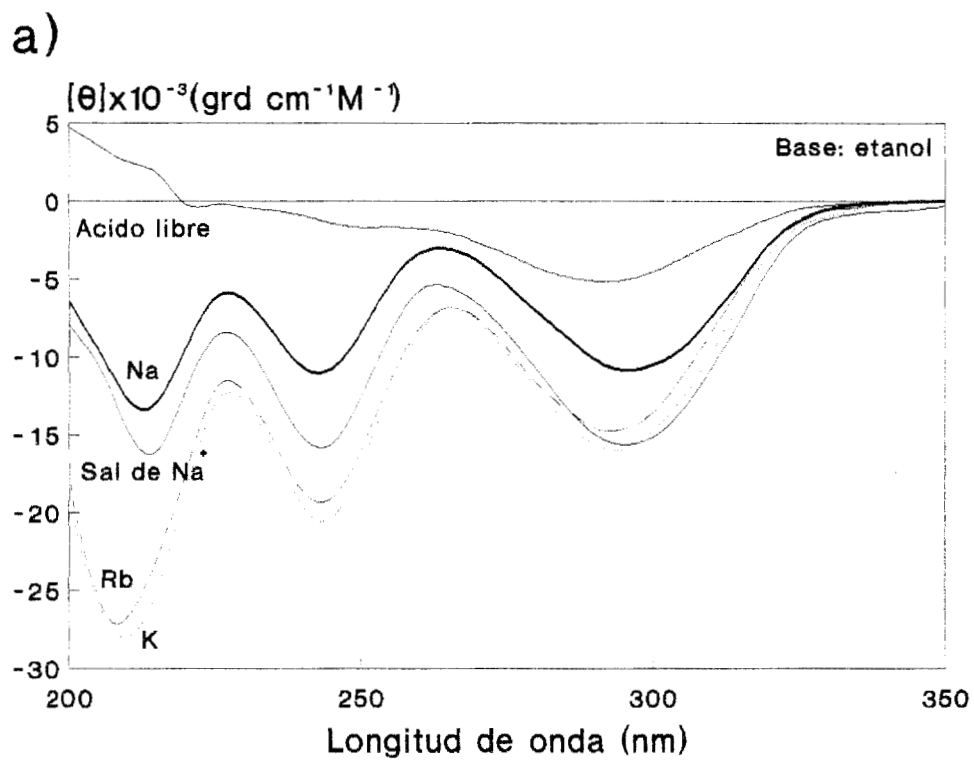


Figura 3.8. Espectros DC del poliéter lasalócido A con cationes alcalinos en etanol (a) y en n-hexano (b).

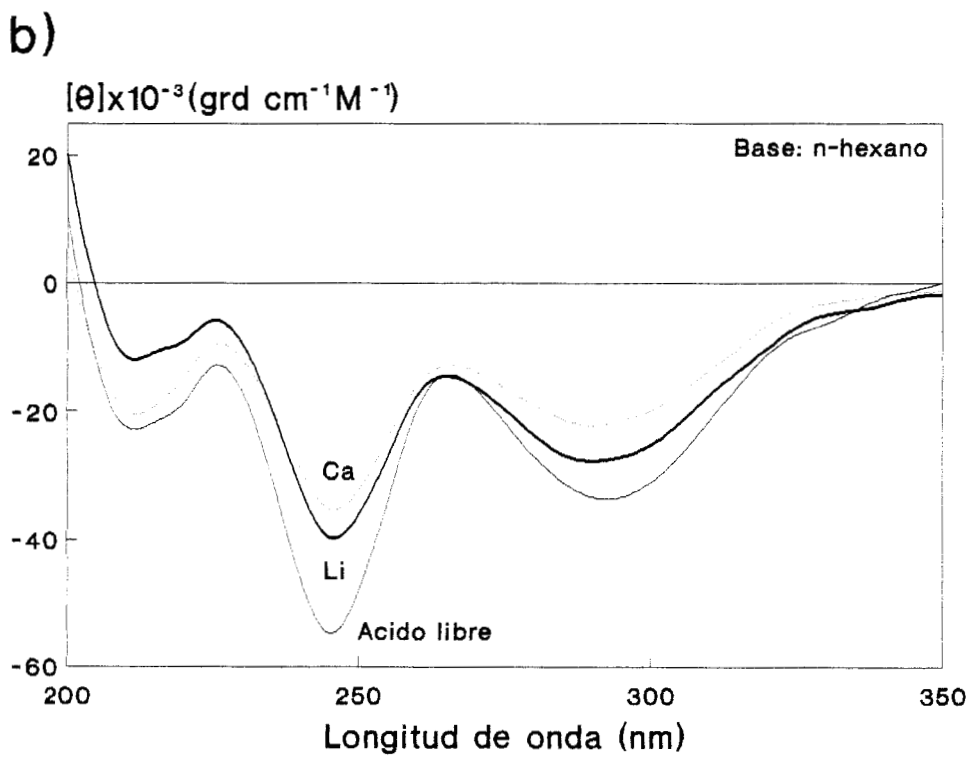
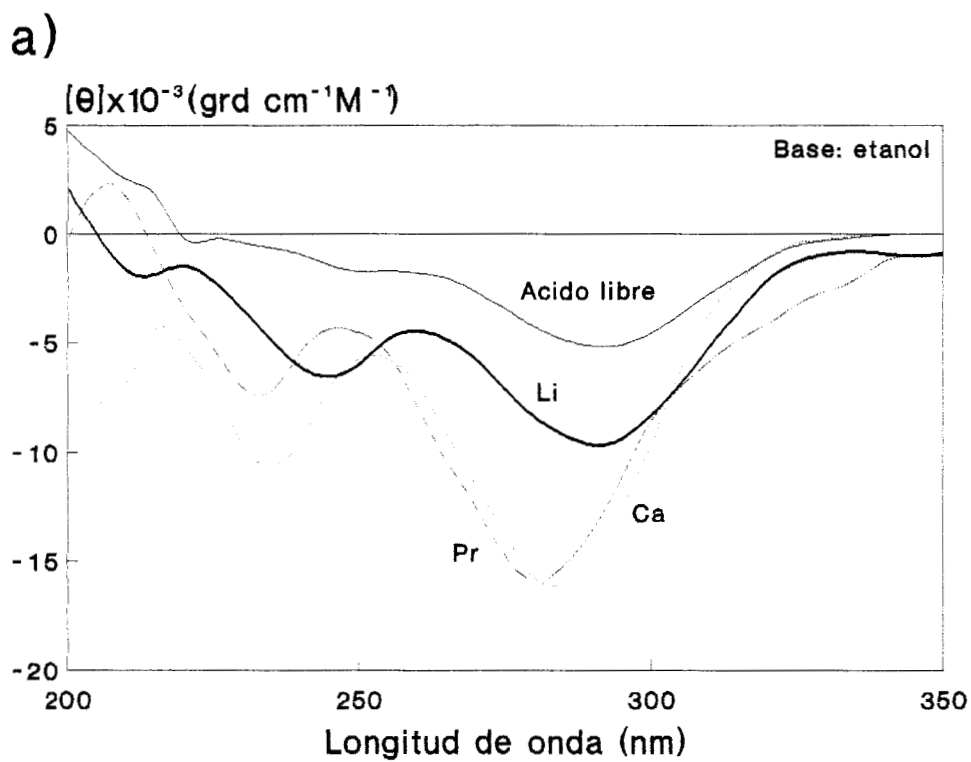


Figura 3.9. Espectros DC de complejos oligoméricos del poliéter lasalócido A con Li^+ , Ca^{2+} y Pr^{3+} en etanol (a) y en n-hexano (b).

La disolución del ácido libre del lasalócido A en n-hexano provoca que la banda λ_1 se corra al azul y se vuelva negativa, junto con un incremento significativo de la banda negativa λ_2 , que se vuelve máxima (Figura 3.8). En las muestras con Na^+ , las magnitudes de los picos λ_2 y λ_3 son aproximadamente dos veces más grandes en n-hexano que en etanol, mientras que la $[\theta]$ de λ_1 se incrementa casi diez veces en solución hidrofóbica. De nuevo, la $[\theta]$ de λ_1 es mayor en el complejo protonado de Na^+ que en la sal de sodio.

Los complejos protonados de lasalócido A- K^+ y lasalócido A- Rb^+ despliegan un comportamiento de las bandas de absorción en DC similar al de las muestras con Na^+ . La Figura 3.8 muestra que el complejo de K^+ produce bandas de DC en las mismas λ que el complejo con Na^+ . En contraste, el complejo con Rb^+ manifiesta un importante corrimiento de λ_1 al rojo. Los valores de $[\theta]$, tanto del complejo con K^+ como del de Rb^+ , en etanol son mayores que los de las muestras de lasalócido A- Na^+ . Estos incrementos parecen correlacionarse con el aumento en la proporción estequiométrica de poliéter:cación. Por otro lado, el n-hexano aumenta los valores de $[\theta]$ de los complejos de K^+ y Rb^+ , pero no modifica las frecuencias de las bandas λ_2 y λ_3 .

Otros casos de agregación de poliéteres despliegan características dependientes del catión y del solvente. El Li^+ , el Ca^{2+} y el Pr^{3+} producen corrimientos al azul de las bandas de DC λ_1 , λ_2 y λ_3 del ácido libre del lasalócido A en etanol, con una secuencia general de $\text{Pr}^{3+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Li}^+$ (Figura 3.9). Los valores absolutos de $[\theta]$ en λ_3 son mayores cuando los cationes polivalentes se unen al lasalócido A. La interacción lasalócido A- Pr^{3+} incrementa la $[\theta]$ positiva de λ_1 a 208 nm, mientras que los cationes Li^+ y Ca^{2+} vuelven negativa a λ_1 a 213 y 207 nm, respectivamente. Sin embargo, el complejo de lasalócido A- Li^+ aún muestra $[\theta]$ positiva a 200 nm.

Cuando estos últimos complejos se disuelven en n-hexano, sus bandas de DC no se corren respecto a las del ácido libre del lasalócido A (Figura 3.9). Además, los valores de $[\theta]$ se abaten. Con Li^+ se obtienen $[\theta]$ mayores en λ_2 y λ_3 . Tanto el espectro del complejo con Li^+ como con Ca^{2+} se asemejan en gran medida al del ácido libre del lasalócido A. Finalmente, ya que el complejo con Pr^{3+} es ligeramente soluble en n-hexano, los datos de DC obtenidos no resultan confiables.

CAPITULO IV.

"... la ciencia rara vez avanza en el sentido recto y lógico que imaginan los profanos. En lugar de ello, sus pasos hacia adelante -y, a veces, hacia atrás- suelen ser sucesos muy humanos en los que las personalidades y las tradiciones culturales desempeñan un importante papel."

James D. Watson.

HACIA UN MODELO PREDICTIVO DEL COMPORTAMIENTO DE LOS ACARREADORES ANTIPARALELOS. **Una interpretación.**

Con base en las evidencias presentadas en colaboración con Toro (1987) que sugerían que el antibiótico poliéter monocarboxílico nigericina posee la capacidad de interactuar con cationes metálicas a los cuales no transporta, aunado al aumento de la estabilidad del complejo cuando el ionóforo está protonado, se decidió emprender un análisis más ambicioso en la búsqueda de los patrones fisicoquímicos que regulan la interacción poliéter-metal, para tratar de correlacionarlos con la actividad ionofórica de esta familia de antibióticos. Por tal motivo, se comenzó por verificar la formación de complejos catiónicos polivalentes con otros poliéteres carboxílicos de la familia de la nigericina.

Se amplía el perfil de interacción iónica de los poliéteres carboxílicos.

Tradicionalmente los antibióticos poliéteres carboxílicos se han clasificado como ionóforos monovalentes y divalentes, dependiendo del número de oxidación de los cationes metálicos que transportan (Taylor y cols., 1982). Así, los poliéteres monensina y nigericina, que translocan Na^+ y K^+ respectivamente, son antibióticos "monovalentes", mientras que los acarreadores de Ca^{2+} , lasalócido A y calcimicina, son "divalentes". No obstante lo anterior, se ha establecido que estos últimos ionóforos también pueden transportar cationes monovalentes como el Na^+ y trivalentes como el Pr^{3+} (Fernández y cols., 1973; Grandjean y Laszlo, 1982; Everett y col, 1983; Grandjean y Laszlo, 1984; Grandjean y Laszlo, 1986; Shastri y cols., 1987a), mientras que ningún antibiótico monovalente se había mostrado capaz de movilizar cationes polivalentes a través de barreras hidrófobas.

Por otra parte, como ya se mencionó antes, se ha considerado que la especie responsable de catalizar la translocación catiónica es el antibiótico ionizado a $-\text{COO}^-$, sin importar si se trata de un ionóforo monovalente o uno divalente (Taylor y cols., 1982). Esta visión enfatiza la naturaleza ácida de estas moléculas. Sin embargo, los valores de pK_a de algunos poliéteres monocarboxílicos, obtenidos en medios de diferente composición (Agtarap y cols., 1967; Westley y cols., 1970; Pressman, 1973; Degani y Friedman, 1974;

Gertenbach y Popov, 1975; Toro y cols., 1987), sugieren que la acidez de cada molécula puede ser un factor que contribuye a determinar si uno de estos antibióticos es o se comporta como ionóforo monovalente o divalente. Este es un aspecto que naturalmente sale a la luz cuando se toma en cuenta la química de coordinación, así como la química de los elementos alcalinos y alcalinotérreos en solución.

Requerimientos de energía para la formación de complejos poliéter-catión.

La Figura 4.1 muestra los valores de pK_a de los antibióticos nigericina, monensina y lasalócido obtenidos en medios de una sola fase homogénea de diferente composición solvente:agua. Como es común en los ácidos orgánicos, la acidez de los poliéteres carboxílicos aumenta de manera inversa al tamaño o peso de la molécula. Este hecho, el bajo pK_a , bien puede ser una explicación para que los pequeños antibióticos lasalócido A y calcimicina, sean altamente selectivos por Ca^{2+} , por lo que son típicamente ionóforos "divalentes". Por otro lado, como es de esperarse, el pK_a de cada poliéter carboxílico disminuye conforme aumenta la proporción de agua en la mezcla, indicando una mayor facilidad de ionización del grupo $R-COOH$ a $R-COO^-$ cuando la hidrofobicidad disminuye. Así, en medios de pH neutro o alcalino, el lasalócido A y la calcimicina estarán disociados como $-COO^-$ y serán altamente selectivos por Ca^{2+} .

Es probable, con estos antecedentes, que los ionóforos carboxílicos "monovalentes" -como la monensina y la nigericina- puedan coordinar, y tal vez translocar, Ca^{2+} u otros cationes alcalinotérreos, en condiciones de pH, polaridad, hidrofobicidad y capacidad dieléctrica ambientales apropiadas.

En la Tabla 3.5 se muestran los valores de las constantes de estabilidad ($\log K_s$) calculados para los complejos de nigericina, monensina y lasalócido A con cationes de metales alcalinos, con Ca^{2+} y con Pr^{3+} , a $pH = pK_a$ y ϵ_r 38.48. En estas condiciones experimentales el 50 % del ácido libre de cada poliéter se encuentra ionizado a $-COO^-$ y la unión de la molécula al catión se ve favorecida por la presencia equivalente de las dos especies que se han descrito para la formación de los complejos poliéter-catión (Pressman, 1968; Toro y cols., 1987). Es importante mencionar el hecho de que el registro del pH en el vaso de reacción no mostró una acidificación significativa del medio cuando la concentración de metal aumenta durante la formación del complejo, lo que confirma que el catión -cualquiera que éste sea- no desplaza al protón, por lo que el poliéter permanece prácticamente sin disociar dentro del complejo de coordinación (Toro y cols., 1987).

Los valores de desviación estándar de los $\log K_s$ obtenidos sugieren que, en el caso de cada poliéter carboxílico, no existe diferencia significativa entre las K_s -en una sola fase homogénea- de los complejos estudiados por medio de técnicas potenciométricas. Esto sugiere que la probabilidad de que cada poliéter forme clatratos con los cationes alcalinos es similar, independientemente de que éstos sean translocados a través de membranas lipídicas.

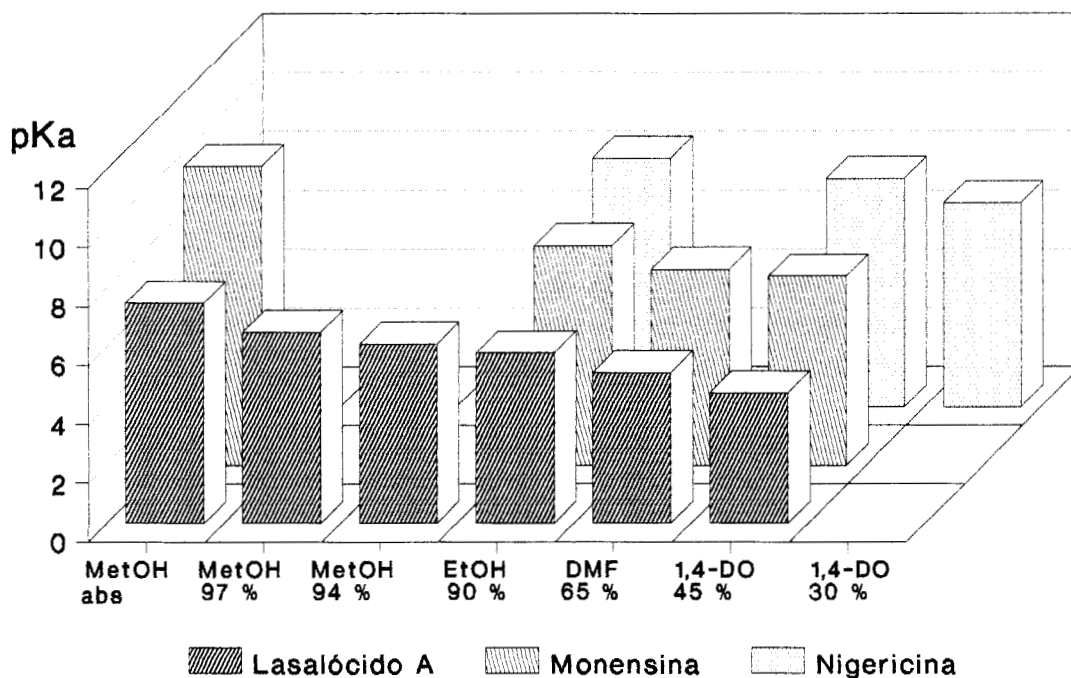


Figura 4.1. Valores de pK_a para los polímeros nigericina, monensina y lasalócido A en medios de diferente composición y proporción de agua. Los datos en metanol (MetOH), etanol (EtOH) y dimetilformamida (DMF) se tomaron de Taylor y cols. (1982).

Los ΔG° de la reacción de formación de los complejos de nigericina y lasalócido A con cationes alcalinos (Tabla 3.6), calculados a partir de los resultados de $\log K_s$, confirman la factibilidad termodinámica de la formación de los complejos antes mencionados; sin embargo, los valores de ΔG° estimados para el lasalócido A, son entre cuatro y cinco veces menores que los obtenidos para nigericina, lo que sugiere una menor afinidad del polímer lasalócido A por dichos cationes en las condiciones experimentales estudiadas. Los resultados de formación de complejos aquí obtenidos no se correlacionan estrechamente con las curvas y secuencias de selectividad de complejación y transporte catiónico publicadas para nigericina y lasalócido A, en diferentes sistemas experimentales (Tabla 3.3), ni con ningún otro parámetro estudiado con anterioridad en la formación de complejos de estos polímeros carboxílicos con cationes metálicos (Taylor y cols., 1982). El hallazgo de que no existen diferencias significativas entre los valores de K_s , claramente indica que cada polímer pueden formar complejos de demandas energéticas equivalentes con los metales alcalinos, sin relación con su capacidad para transportarlos. Así, los requerimientos energéticos de la reacción de complejación parecen no ser el paso limitante del proceso de transporte y, por lo tanto, no son responsables de la selectividad

observada en sistemas multifásicos, tales como tubos en "U" y membranas lipídicas. También parece ser que no existe relación entre la estabilidad del complejo y el tamaño del catión (por ejemplo, los radios iónico, atómico o hidratado) ni con la electronegatividad. Por lo tanto, se plantea la hipótesis de que la nigericina y el lasalócido A son capaces de formar complejos virtualmente con cualquier catión metálico, sin importar el tamaño iónico.

A diferencia de lo que se encontró con los poliéteres nigericina y lasalócido A, la monensina muestra un comportamiento de estabilidad catiónica (Tabla 3.5) similar a los resultados de experimentos de transporte publicados previamente (Tabla 3.3). A partir de sus valores de $\log K_s$ y de las estimaciones de ΔG° con los tres cationes alcalinos estudiados, se observa que forma con el Na^+ los complejos ligeramente más estables, seguidos por los de Li^+ , habiendo una mayor diferencia con respecto a los de Cs^+ .

Por otra parte, cuando se estudió la estabilidad de los tres poliéteres con los cationes polivalentes Ca^{2+} y Pr^{3+} en solución en una sola fase homogénea, se encontró que los valores de K_s correspondientes fueron, generalmente, muy bajos e independientes del antibiótico ligante (Tabla 3.5). Estos hallazgos sugieren que la formación de los complejos, en las condiciones ensayadas, es termodinámicamente poco favorecida. Las pequeñas K_s , junto con el valor del pH del medio experimental y su relación con el pK_a de los ionóforos, parecen indicar que es la química del catión en solución, la que determina la factibilidad de interacción, asociación, coordinación, quelación y, por lo tanto disociación, de los complejos poliéter-catión polivalente. Esta explicación aporta una clara luz sobre el funcionamiento de los ionóforos divalentes y su conocida eficiencia de transporte de Ca^{2+} .

La intensidad de unión determina la rapidez del transporte iónico.

El comportamiento de la unión del poliéter nigericina con los cationes alcalinos se siguió por titulación potenciométrica en solución homogénea. Con cada catión alcalino ensayado se observa una aparente reacción de primer orden. Sin embargo, existen diferencias en la tasa de unión del poliéter con los distintos metales. Parece ser que la intensidad de la unión entre el poliéter y el catión determina la rapidez del transporte iónico. Esto se desprende de las diferentes tasas obtenidas a partir de la razón existente entre la concentración de metal unido -o complejo formado- y la de metal total, donde se observan dos patrones generales de comportamiento. Primero, se muestra una mayor tasa de unión con Li^+ y Cs^+ , lo que sugiere mayores fuerzas de atracción entre estos cationes y el poliéter. Segundo, la menor tasa de unión con los cationes que son transportados sugiere una fácil disociación entre éstos y el acarreador.

La magnitud de la interacción sugiere que el Li^+ y el Cs^+ se unen fuertemente a la nigericina, no se disocian fácilmente y, por lo tanto, el ionóforo es incapaz de transportarlos a través de las barreras lipídicas. Así, la disociación puede ser un paso limitante mayor del transporte mediado por acarreadores móviles.

La mayor afinidad e intensidad de interacción de Li^+ y Cs^+ mostrada por la nigericina parece relacionarse con la mayor afinidad electrónica (ae) y con los valores de potencial de reducción (E°) de ambos cationes, más que con su tamaño y electronegatividad. Esto se desprende de que los valores de E° de Li^+ (-3.02 V) y Cs^+ (-3.02 V) son mayores que los de Na^+ (-2.71 V), así como a partir de datos que muestran que la ae de Li^+ (0.58 eV) es menor que la de Na^+ (ae_{Na^+} 0.78 eV). En consecuencia, las propiedades energéticas intrínsecas de los átomos metálicos pueden jugar un papel central en la selectividad de unión y de transporte iónico. Estos datos complementan evidencias previas que indican que las variaciones en la estructura química de los poliéteres determinan las transiciones de selectividad iónica para el transporte.

Los perfiles de interacción iónica de los poliéteres.

Hasta este punto se puede adelantar que la visión que a la fecha se ha tenido del mecanismo de complejación y transporte iónico catalizado por los antibióticos poliéteres carboxílicos ha sido simplificada en exceso, tal vez por la diversidad e inconexión inmediata de la información existente en la literatura.

La revisión de los datos presentados permite comenzar a estructurar un esquema poco más armónico, aunque aún parcial y limitado, que se espera pueda ser ampliado y arreglado sistémicamente posteriormente.

De modo inicial, es posible sugerir, que la estabilidad de los complejos, medida como K_s , es proporcional a la carga iónica q_i del metal, ya que el $\log K_s$ de los complejos monovalentes suele aumentar, aunque sea ligeramente, con la exposición de la carga eléctrica nuclear; esto bien puede explicar lo pequeño de las K_s determinadas para los cationes polivalentes. Segundo, la estabilidad es varios órdenes de magnitud mayor conforme se incrementa el número de átomos ligantes (Q) en la molécula y, por lo mismo, la fuerza de la atracción electrostática polar entre ligante y ligado. Y, tercero, la estabilidad parece disminuir cuando aumenta el radio iónico (r_i) del metal ligado. Se puede resumir, este modelo verbal de "quelaticidad", en la expresión preliminar

$$K_s \propto f(q_i, Q, r_i)$$

En conclusión, la correlación de los diversos resultados entre sí mostrada en este trabajo difiere apreciablemente respecto a las selectividades de extracción y transporte previamente publicados para los poliéteres nigericina y lasalócido A en sistemas experimentales diversos (Tabla 3.3). Además, ello ilustra que los ionóforos son capaces de interactuar con cationes metálicos que no son translocados a través de fases lipídicas. En consecuencia, los perfiles de interacción iónica mostrados en este trabajo pueden apoyar nuevas líneas de interpretación para explicar la actividad biológica de los ionóforos carboxílicos (Osborne y cols., 1977; Ben-Hayyim y Krause, 1980; Hatefi y cols., 1982; Osborne y cols., 1982a) a través de la unión con metales fijos en las enzimas, dentro de complejos proteicos y en ligandos metálicos de superficie membranal.

Extracción catiónica catalizada por poliéteres carboxílicos.

Otros resultados muestran que la monensina, ionóforo selectivo para Na^+ , funciona como ionóforo para transportar K^+ en condiciones de polaridad y permitividad relativa semejantes a una membrana lipídica. Por su parte, los resultados con Ca^{2+} sugieren que la monensina interactúa con este catión y lo transloca en forma diferencial en función del pH (Hebrant y cols., 1992).

Por otro lado, los resultados de partición de K^+ y Ca^{2+} mediados por lasalócido A demuestran la mayor flexibilidad de este ionóforo para interactuar y transportar cationes monovalentes.

Interacción iónica.

Como se ha mencionado, una de las clasificaciones que se hace para los antibióticos poliéteres carboxílicos, de acuerdo con Taylor y cols. (1982), propone que se pueden dividir en monovalentes y divalentes con base en el número de oxidación de los cationes metálicos que transportan; la monensina se ha clasificado como monovalente y el lasalócido A, como divalente. Sin embargo, el trabajo realizado ha proporcionado evidencias de que esta clasificación no es tan adecuada. En este estudio se encontró que tanto los poliéteres nigericina y monensina (monovalentes), como el lasalócido A (divalente) pueden interactuar con cationes monovalentes y polivalentes, así como transportarlos en condiciones experimentales idóneas.

En el presente trabajo se pone de manifiesto que los antibióticos poliéteres carboxílicos monensina y lasalócido A pueden interactuar con cationes monovalentes, divalentes y trivalentes (Figuras 3.5, 3.6 y 3.7) y translocarlos sin cooperación de otros compuestos (resultados no mostrados), a diferencia de lo publicado en los trabajos previos realizados por Grandjean y Laszlo (1986) sobre transporte de Pr^{3+} en vesículas de fosfatidilcolina. Estos muestran el transporte acelerado del catión Pr^{3+} en presencia del ionóforo lasalócido A y un ácido graso, que por sí solo es incapaz de transportar al lantánido. En otros trabajos realizados por Grandjean y Laszlo (1989) sobre el transporte sinérgico de Pr^{3+} por los ionóforos lasalócido A o monensina, otro ionóforo o un ácido carboxílico está presente en el modelo de membrana (vesículas de fosfatidilcolina). Donis y cols. (1981), mostraron el transporte sinérgico de Pr^{3+} empleando el poliéter eteromicina y un ionóforo sintético, en vesículas de fosfatidilcolina.

Hasta aquí, los hallazgos del presente trabajo aportan nueva luz sobre las variables que regulan el proceso asociación-translocación-disociación del transporte catiónico mediado por poliéteres carboxílicos. Las evidencias experimentales de la interacción de los poliéteres carboxílicos con los cationes alcalinos sugieren que la nigericina, la monensina y el lasalócido A son antibióticos poliéteres que poseen un perfil intrínseco de interacción iónica que se extiende más allá de los metales alcalinos a los que normalmente translocan en los sistemas biológicos tradicionalmente estudiados.

Características espectroscópicas de los complejos poliéter-catión.

Se logró hacer evidentes los cambios conformacionales que ocurren en los poliéteres monensina y lasalócido A, cuando interactúan con cationes metálicos alcalinos y de transición.

Por su configuración electrónica, las moléculas de los poliéteres carboxílicos no tienen bandas de absorción en el espectro visible; en cambio, presentan absorción de radiación en la región del UV lejano, cerca de los 200 nm de longitud de onda. Su espectro electrónico en el UV en solución en etanol suele presentar un pico de absorción máxima a 205 nm, con una disminución pronunciada de ϵ hasta los 220 nm; a partir de esta λ , pocos antibióticos poliéteres presentan absorción electrónica.

Estas características espectroscópicas parecen ser comunes dentro de la familia de los antibióticos poliéteres carboxílicos. Por ejemplo, al obtener el espectro de absorción en el UV de la monensina en etanol, éste presenta un pico máximo de absorbencia alrededor de una λ de 215 nm (Figura 3.5).

Algo notable en la absorción electrónica de esta familia de moléculas es que, al menos en el caso de la monensina y la nigericina, no se encuentra linealidad de la ley de Lambert-Beer en ninguna región del UV en el intervalo de concentraciones de poliéter que van del orden micromolar al milimolar, por lo que no es posible hacer determinaciones directas de la concentración de poliéter por métodos de espectroscopía UV/VIS. Además, los espectros de ambas moléculas presentan corrimientos en la λ de máxima absorbencia, tanto hacia el rojo como hacia el violeta, los cuales no se correlacionan con la concentración del poliéter (resultados no mostrados).

Para determinar la influencia del solvente en la manifestación de los cambios conformacionales, se utilizaron dos solventes: uno polar, que es el etanol absoluto, y otro de menor polaridad, el n-hexano. Con ambos solventes se pudieron obtener resultados que permiten establecer la rigidez o flexibilidad molecular de los poliéteres.

Aspectos Fisicoquímicos.

Las características estructurales de los complejos poliéter-catión están determinadas por los siguientes factores:

- a) *La flexibilidad de los poliéteres.* La monensina no posee una gran flexibilidad, mientras que el lasalócido A es más flexible. La monensina presenta una estructura química con una pequeña región lineal y una gran región con cinco anillos de tetrahydrofurano y de tetrahydropirano, cuyos sustituyentes no permiten la rotación libre, por el impedimento estérico que se manifiesta; mientras, el lasalócido A presenta una gran región lineal y únicamente posee dos anillos de tetrahydrofurano, lo que le permite tener un menor impedimento estérico en sus grupos. Por lo anterior, es posible que el lasalócido A presente una mayor variedad de conformaciones que la monensina.

- b) *El tamaño del catión.* Los radios iónicos de los cationes Li^+ , Na^+ , Ca^{2+} y Pr^{3+} son 0.68 Å, 0.98 Å, 0.94 Å y 1.09 Å, respectivamente. Los radios iónicos de los cationes Na^+ , Ca^{2+} y Pr^{3+} son similares, por lo que es razonable pensar que el tamaño del catión proporcione, para los complejos, espectros de absorción parecidos en un mismo solvente.
- c) *La carga del catión.* Los enlaces ion-dipolo entre los oxígenos de los grupos éter, carboxilo e hidroxilo de las moléculas con los cationes varían de acuerdo a la carga del catión, como lo demuestran los estudios en $^1\text{H-NMR}$ para el poliéter lasalócido A, que une a los iones Ca^{2+} y Pr^{3+} (Everett y cols., 1983; Lyazghi y cols., 1992a). El modelo propuesto para el complejo con Ca^{2+} involucra dos moléculas del poliéter lasalócido A, es decir, existe una estequiometría de 2:1 (Pointud y Juillard, 1990; Lyazghi y cols., 1993). Las moléculas del poliéter se unen al catión por medio de los oxígenos 3 y 8, doblándose ambas moléculas en la región lineal y uniéndose al catión una de las moléculas a través de los oxígenos 4, 6 y 7. Se ha propuesto un modelo similar para el complejo del lasalócido A con La^{3+} , con una estequiometría 3:1, en el cual no participan los oxígenos 4 y 7.
- d) *La polaridad del solvente.* El interés que manifiesta la polaridad del solvente en la interacción de los poliéteres con cationes metálicos es relevante, ya que determina cuál puede ser la interacción de los grupos polares del solvente y la región polar del poliéter o del complejo poliéter-catión. En este sentido, un solvente polar como el etanol, puede competir por los grupos polares de las moléculas, mientras que un solvente no polar o débilmente polar, no compite por los grupos polares del poliéter, dando como resultado rigidez molecular.

Los cambios en la actividad óptica de un poliéter pueden estar relacionados con la presencia de una estructura desordenada en etanol y una conformación cíclica en heptano, en presencia de un catión (Alpha y Brady, 1973).

Análisis Espectroscópico.

Los resultados muestran que la absorción en UV de la monensina en sus diferentes formas, tiene una región de máxima absorbencia entre 206 y 208 nm; esto se puede apreciar en las formas de sal de Na^+ , complejo con Na^+ , Li^+ y Ca^{2+} . Existe la extinción de este pico en el ácido libre y aparece un hombro a 227 nm en esta forma; entonces, hay una marcada influencia en la monensina al estar presente un catión metálico.

Otro aspecto importante que sugieren estos resultados es que, al aumentar el número de orbitales atómicos (ambiente electrónico), existe un ensanchamiento del pico de absorción máxima, hasta definirse como un gran hombro de absorción. Además, algo que puede estar estrechamente relacionado

con lo anterior es la manifestación de un marcado efecto hipercrómico en el complejo Pr^{3+} .

Los resultados obtenidos en los estudios espectroscópicos sugieren fuertemente que el ácido lasalócido A puede experimentar variaciones conformacionales curiosas con características que son de gran interés biológico.

Ha sido ampliamente conocida la capacidad del lasalócido A para agregarse alrededor de cationes metálicos (Célis y cols., 1974; Degani y Friedman, 1974; Fernández y cols., 1973; Chen y Springer, 1978; Richardson y Dasgupta, 1982; Everett y cols., 1983; Shastri y cols., 1987a; Shastri y cols., 1987b). Aunque se ha mencionado que las variaciones conformacionales dependen de la valencia (Taylor y cols., 1982) y del tamaño del catión (Shastri y cols., 1987a; Shastri y cols., 1987b), los valores de estequiometría lasalócido:catión obtenidos en el presente estudio sugieren que la oligomerización del poliéter no está en función directa de este par de propiedades periódicas. El lasalócido A puede formar, tanto complejos 1:1 (Alpha y Brady, 1973), como oligómeros cuando se une a cationes de metales alcalinos.

Las especies monoméricas parecen ser estructuras con forma de gancho cerrado de la cabeza a la cola, estabilizadas por puentes H entre los grupos hidroxilo y carboxilo terminales (Alpha y Brady, 1973; Degani y Friedman, 1973). Tales estructuras conformacionales son congruentes con el aumento de la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ del salicilato a 245 nm (Painter y Pressman, 1980), causada tanto por la unión de Na^+ como por el solvente no polar. La inversión del efecto Cotton del ácido libre del lasalócido A a 215 nm inducida por el n-hexano, que puede atribuirse a la transición $n \rightarrow \pi^*$ del grupo carboxilo (Crabbé, 1972), confirma el ciclado del poliéter a través de un puente H de la cabeza a la cola.

Los confórmeros de gancho cerrado del complejo de Na^+ y de la sal de sodio se refuerzan por el solvente no polar, y disminuyen la longitud del puente H entre los extremos terminales del lasalócido; esta última observación está de acuerdo con el fuerte efecto Cotton negativo que se exhibe a 215 nm. Además, las elipticidades del complejo y de la sal de sodio establecen diferencias pequeñas entre ambas muestras, que dependen de la ionización del carboxilo. Asimismo, el aumento de la $[\theta]$ de λ_3 , que en parte es causada por la transición cetónica $n \rightarrow \pi^*$, sugiere una contribución importante del oxígeno del carbonilo a la estabilización del gancho cerrado en la sal de Na^+ del lasalócido A.

El aumento de λ_1 y λ_2 también se lleva a cabo en la solución etanólica del lasalócido A ácido en presencia de K^+ y Rb^+ , lo que sugiere una fuerte perturbación de los grupos carboxilo y aromático del salicilato, en contraste con los grupos carbonilo. El arreglo estructural que mejor se ajusta, es aquél en el que los ganchos cerrados de ionóforo se apilan alternados con el catión en proporción 3:2, en "emparedados" de tipo "Big Mac". Tal conformación de "emparedado" se ha descrito para complejos de Ca^{2+} con ionóforos ciclopéptidos (Ivanov, 1975) así como con lasalócido A (Célis y cols., 1974), y se valida para éste último, en este trabajo, con una estequiometría poliéter:catión de 2:1.

Es notable que el grupo carboxilo salicílico controla de forma diferencial la unión del catión. Esto se infiere del análisis de la transición $n \rightarrow \pi^*$ del carboxilo,

que también puede surgir de contribuciones de transferencia de carga (Harada y Nakanishi, 1968). El hecho de que la $[\theta]$ de la banda λ_1 del ácido lasalócido A sea severamente invertida por K^+ y Rb^+ , junto con los corrimientos al azul en el UV en etanol, sugiere que estos iones inducen la polarización del grupo carboxilo salicílico. La configuración adquirida por cada complejo no sufre modificaciones importantes por su disolución en n-hexano, no polar.

Por otro lado, en presencia de Li^+ los complejos se pueden agregar en oligómeros de proporción 3:1. El comportamiento del DC en etanol sugiere que el lasalócido A ácido une al Li^+ principalmente por medio del oxígeno del carbonilo, seguido por los oxígenos del grupo salicílico. Se supone que la conformación del complejo lasalócido A- Li^+ difiere de forma significativa de la adquirida con los otros cationes alcalinos.

El pequeño radio iónico del Li^+ proporciona una alta energía de hidratación a este catión alcalino, lo que induce una fuerte interacción con los átomos de oxígeno (Cotton y Wilkinson, 1966). En estos términos, el Li^+ incita a los oxígenos del lasalócido a rodear el perímetro iónico, y da origen a la alta relación molécula:cation observada. El modelo de esta conformación se representa por un arreglo de "criptando" o cesta, en la que el Li^+ estabiliza a dicha estructura.

Por otro lado, esta interacción se modifica ligeramente cuando el complejo se disuelve en n-hexano, donde el grupo fenilo contribuye en mayor parte a la unión del catión, supuestamente a través del grupo hidroxilo. La presión extra que se dirige hacia el interior, ejercida por la disolución del complejo de Li^+ en el n-hexano no polar, parece expulsar al grupo carboxilo salicílico de la parte central del complejo, hacia el solvente.

La conformación del complejo lasalócido A- Pr^{3+} ha sido objeto de varios estudios. Existen reportes de relaciones estequiométricas poliéter:cation de 1:1 (Richardson y Dasgupta, 1982; Shastri y cols., 1987b), 2:1 (Fernández y cols., 1973) y 3:1 (Chen y cols., 1978). Los resultados obtenidos en este estudio apoyan la versión de la forma trimérica. La imagen estructural del lasalócido A- Pr^{3+} en etanol es, en general, similar a aquella del complejo lasalócido A- Li^+ , es decir, una canasta o criptando de tres asas. Sin embargo, existen diferencias en la contribución del anillo fenílico. Los datos de DC en etanol, junto con la poca solubilidad del complejo en n-hexano, sugieren que el grupo carboxilo está expuesto hacia el entorno, y ofrece un exterior ligeramente polar e hidrofílico. De cualquier modo, de acuerdo con la observada capacidad de transporte a través de bicapas lipídicas (Estrada O. y cols., 1974b; Fernández y cols., 1973; Chen y Springer, 1978; Richardson y Dasgupta, 1982; Everett y cols., 1983; Shastri y cols., 1987a), el catión Pr^{3+} está completamente encapsulado.

Finalmente, como se mencionó arriba, el lasalócido A ácido forma complejos de "emparedados sencillos" con Ca^{2+} . Cuando este complejo se disuelve en etanol, el ion Ca^{2+} parece estar unido principalmente por medio del oxígeno cetónico, seguido por los oxígenos del fenilo y del carboxilo. Por otro lado, el Ca^{2+} no modifica en gran medida la conformación de gancho cerrado del ácido lasalócido A en n-hexano.

La selectividad iónica de los poliéteres y su relación con el transporte.

Las membranas biológicas poseen componentes que facilitan la difusión de iones y moléculas necesarios para sus funciones metabólicas. Estos componentes son capaces de interactuar con uno o varios solutos en uno de los lados de la membrana, para movilizarlos y liberarlos al otro extremo de la misma. Es esta característica la que le confiere a las membranas biológicas la propiedad de seleccionar las especies químicas que la atraviesan, por lo que se comportan como barreras semipermeables.

A pesar de la amplitud del conocimiento acumulado sobre el comportamiento de las membranas biológicas, tradicionalmente el transporte iónico ha sido visto como un mecanismo de "caja negra", a la que se sabe lo que entra y lo que sale de ella, pero de la que se desconoce el proceso -más allá de lo físico y lo químico- de funcionamiento integral interno en el seno de la membrana.

El modelo de comportamiento cinético generalmente descrito para el transporte catiónico mediado por antibióticos poliéteres carboxílicos, es el que se muestra en la Figura 3.3 (Taylor y cols., 1982). Sus postulados básicos son: a) que el acarreador se encuentra confinado al interior de la membrana; b) que su cantidad por unidad de área permanece constante; c) que puede existir en forma libre o de complejo; y d) que las reacciones de formación y disociación del último se llevan a cabo en la interfase membrana-agua (Schultz, 1980). En realidad estos postulados definen los diferentes pasos o reacciones que dependen de factores fisicoquímicos independientes y que en su interrelación constituyen al proceso completo del transporte.

Por lo tanto, para describir el proceso integral físico y químico íntimo del transporte iónico mediado por la nigericina es necesario analizar uno por uno los postulados planteados en el párrafo anterior e integrarlos en un sistema total funcional.

El estudio de la reacción de interacción de la nigericina con los cationes metálicos, en solución homogénea de composición y propiedades fisicoquímicas conocidas, brinda información sobre su capacidad para formar complejos estables. Los resultados presentados a lo largo del Capítulo III confirman la hipótesis ya planteada de que los poliéteres carboxílicos forman complejos funcionalmente diferenciales con una gran variedad de cationes metálicos, además de que la estabilidad de los mismos es dependiente del sistema ambiente-poliéter-catión. Se deben considerar, por lo tanto, la importancia que revisten propiedades del medio -como el pH, que altera la afinidad de los grupos ligantes por los cationes metálicos (Tam y Williams, 1986)-, del acarreador y de los cationes participantes en el proceso funcional.

Tales hallazgos no se correlacionan inmediatamente con los resultados obtenidos en los sistemas experimentales tradicionalmente empleados para la determinación de las "secuencias de selectividad iónica" de complejación ni con las curvas de transporte en membranas artificiales y naturales.

Los modelos de unión catiónica ensayados, suelen estar compuestos por sistemas de dos fases, acuosa y orgánica, por lo que realmente constituyen

modelos de extracción en los que participan por lo menos dos reacciones fisicoquímicas: la formación del complejo en la interfase y la solvatación del mismo en la fase orgánica. Por este motivo se han tomado en consideración las características de los solventes empleados para la interpretación específica de los resultados obtenidos en cada modelo experimental (Stiles y cols., 1991; Hebrant y cols., 1991; Lyazghi y cols., 1992b; Lyazghi y cols., 1992c; Mimouni y cols., 1992; Mimouni y cols., 1993).

Por otra parte, los experimentos de transporte, tanto en sistemas naturales como artificiales, se ven complicados por la participación de todas las reacciones individuales que constituyen al fenómeno general. La falta de correlación entre estos modelos experimentales pone en evidencia el hecho de que la formación del complejo es sólo una de toda la serie de reacciones químicas y físicas que constituyen al proceso del transporte catiónico mediado por poliéteres carboxílicos.

Las observaciones anteriores conducen directamente a proponer un modelo general para el flujo o translocación de cationes metálicos mediado por los poliéteres monocarboxílicos tipo nigericina, el cual se puede formular como el producto de varios factores:

$$J_i \propto f(\text{pH}_{1/2}, \text{pK}_a, a_i, ae_i, E^\circ_i, r_i, q_i, [A]_m, F_A, \mu_A, K_s, C_{pL}, D_L, \mu_m, K_d)$$

El valor del pH microambiental adyacente a la membrana ($\text{pH}_{1/2}$) afecta la disociación del grupo carboxilo del poliéter, lo que depende de su constante de acidez (pK_a); la información existente sugiere que la molécula protonada es más afín que la aniónica por el metal (Toro y cols., 1987). La alta concentración química del catión (a_i) induce su unión a la molécula ligante en la interfase membrana-agua; ésta depende de factores intrínsecos del metal, como su afinidad electrónica (ae_i), potencial de reducción (E°_i), radio (r_i) y carga iónicas (q_i). Si, a su vez, la concentración del acarreador en la membrana ($[A]_m$) es suficiente, es posible que varias moléculas se aglomeren (Toro y cols., 1976; Toro y cols., 1987; Ballardini y cols., 1992; Chattopadhyay y cols., 1992; Lyazghi y cols., 1992d), en función de su flexibilidad (F_A) y polaridad (μ_A), alrededor del catión en función del pH interfásial originando un oligómero conductor. Una vez formado el complejo poliéter-metal, lo que depende de su estabilidad (K_s), éste debe solubilizarse (Maxwell y cols., 1992) en la fase orgánica (C_{pL}) para poder difundir (D_L), a favor del gradiente químico del catión, a través de las cadenas lipídicas de la matriz hasta el otro extremo de la membrana; en este caso es importante la polaridad del medio membranal (μ_m). Cuando el complejo se encuentra en la interfase, la molécula se disocia (K_d) del catión que se solubiliza en el medio acuoso. Así, el poliéter libre difunde de vuelta para completar un ciclo de transporte.

La anterior es una primera aproximación que busca llegar a describir de forma integral y sistémica al proceso global de la translocación iónica facilitada, inicialmente, por acarreadores modelo. Así, ha sido el propósito de este trabajo

sentar las bases para luego proceder con la integración de la función de cada una de las variables o parámetros descritos en un sistema holístico que permita alcanzar la descripción y comprensión del funcionamiento de los sistemas de acarreadores antiparalelos membranales proteicos presentes en los seres vivos.

Conclusiones.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta investigación representan sólo una verdad parcial, no una teoría completa, sobre las propiedades de complejación y transporte catiónico mediado por acarreadores móviles modelo. Para llegar a ello es necesaria la realización de estudios con una visión integral sistémica sobre la forma en que se interrelacionan los diferentes eventos de la translocación iónica identificados.

Mientras tanto, a continuación se describen las conclusiones directas que surgen de la discusión de los resultados experimentales vertidos en esta contribución.

Acarreadores móviles polivalentes.

A diferencia del modelo general aceptado sobre la naturaleza de formación de complejos poliéter-cación (Taylor y cols., 1982), se demuestra la amplia capacidad de los ionóforos nigericina, monensina y lasalócido A para formar complejos con los cationes alcalinos, los alcalinotérreos y los lantánidos. De esta manera, se amplía el perfil de selectividad iónica de estos antibióticos en relación con su interacción con metales monovalentes, divalentes y trivalentes.

Además se observa que la reacción de formación de los complejos poliéter-cación sigue una cinética compleja, que no se puede describir por medio de los modelos cuantitativos convencionales. Por lo tanto, es necesario desarrollar modelos integrales -que consideren un mayor número de variables- que faciliten su descripción.

Las diferencias espectrales observadas y las relaciones estequiométricas obtenidas, hacen evidentes los cambios que sufren los poliéteres monensina y lasalócido A en función del catión unido y del ambiente en que se encuentran. Sugieren que la presencia de diferentes cationes inducen cambios estructurales en las moléculas al formar complejos con Na^+ , Li^+ , Ca^{2+} y Pr^{3+} en experimentos en una sola fase líquida.

Los resultados obtenidos permiten sugerir:

1. Que existen diferencias entre la formación de las sales y de los complejos de coordinación con cada uno de los cationes estudiados.
2. Se muestra por primera vez, que el poliéter carboxílico monensina, al igual que la nigericina, es capaz de interactuar por sí solo con los cationes polivalentes, ampliándose el perfil de interacción iónica para éstos poliéteres.

3. Se sugiere que la conformación molecular de los poliéteres carboxílicos es determinante para establecer los patrones de selectividad de transporte iónico.
4. Se establecen diferencias en la agregación molecular del poliéter lasalócido A con respecto a las publicadas previamente en la literatura.
5. En la manifestación de la flexibilidad molecular de los poliéteres, es de interés especial la polaridad del solvente en el que se encuentran disueltos.

Propiedades físicas, químicas y biológicas.

El estudio de las propiedades espectroscópicas de la interacción de los antibióticos poliéteres carboxílicos con los cationes alcalinos, alcalinotérreos y lantánidos, puso en evidencia las características generales más notables de los complejos poliéter-metal formados, además de que mostró sus diferencias. Estas diferencias pueden correlacionarse con algunas de las propiedades biológicas observadas para varios de estos complejos; también permiten predecir el comportamiento que tendrán dichos ligandos al ensayarse en sistemas biológicos modelo.

Modelo predictivo del comportamiento de los acarreadores antiparalelos.

La determinación de las constantes de estabilidad de los complejos de poliéteres carboxílicos con los cationes ensayados, demostró que no existen diferencias significativas en la afinidad de los ligantes para interactuar con cationes de diferente tamaño y estado de oxidación.

Además, la correlación de estos resultados con datos publicados previamente -obtenidos en otros sistemas y modelos experimentales- permitió hacer la clara discriminación de la clatración, la solvatación, la estabilidad, la disociación, la polaridad del medio y del ligante, etc. como factores individuales que, con independencia, forman parte y contribuyen a la secuencia de acontecimientos que ocurren dentro del proceso general de la translocación catiónica mediada por poliéteres carboxílicos. La definición cualitativa y cuantitativa del papel que juegan los factores descifrados, en el proceso de transporte catalizado por acarreadores modelo, permitirá descubrir los procesos regulatorios del funcionamiento de los sistemas antiporte, uniporte y simporte (paralelo unidireccional) proteicos confinados en las membranas biológicas de todos los seres vivos.

"Luego esperó, poniendo en orden sus pensamientos y cavilando sobre sus poderes aún no probados. Pues aunque era el amo del mundo, no estaba muy seguro de qué hacer a continuación. Mas ya pensaría en algo."

Arthur C. Clarke, 2001, *A space odyssey*

CAPITULO V.

"Y al principio, todo fue curiosidad."

Isaac Asimov.

LOS ACARREADORES ANTIPARALELOS PROTEICOS DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL. *Las perspectivas.*

Como se describe detalladamente en el Capítulo II, el fundamento principal de la Hipótesis Quimiosmótica es que la fase lipídica de las membranas biológicas posee una elevada capacidad aislante y una baja conductividad eléctrica y permeabilidad al paso de especies químicas cargadas como Na^+ , K^+ , H^+ , Ca^{2+} y HO^- . Esta hipótesis parte del punto de que las membranas biológicas tienen inmersos los componentes de las diferentes cadenas de transporte de iones y e^- .

Los acarreadores electroneutros proteínicos.

Los primeros reportes, un tanto inciertos, sobre el aislamiento de acarreadores antiparalelos electroneutros de naturaleza proteica, se remontan a finales de la década de 1970 (Garlid, 1984). Desde entonces se ha logrado detectar a dos proteínas con actividad antiporte Na^+/H^+ en mitocondrias, una de ellas altamente específica por Na^+ , mientras que la otra puede intercambiar tanto Na^+ como K^+ por H^+ (Jezek y cols., 1990; Kakar y cols., 1989). Al respecto, en la membrana interna mitocondrial se ha identificado a una proteína de 82,000 daltones como la responsable de esta actividad (Martin y cols., 1984).

En adición a estos hallazgos, hay reportes recientes sobre la presencia de una proteína similar que se encarga de cumplir con la actividad ionoforética antiporte en los fibroblastos, así como de otra proteína isoforma que cumple con las funciones de intercambiador electroneutro en las células del borde en cepillo del ileón, y que es sensible a glucocorticoides (Levine y cols., 1993; Yun y cols., 1993). Incluso se ha encontrado una diversidad de isoformas del antiporte Na^+/H^+ (NHE-1 a NHE-4) en colon, riñón, neuronas del hipocampo (Orlowski, 1993) y corazón (Fliegel y cols., 1993), así como en *Escherichia coli*, que se presenta en dos variedades diferentes, la NHA-a y la NHA-b (Pinner y cols., 1992; Pinner y cols., 1993), por lo que se consideran como proteínas integrales de membrana de distribución universal.

Por otra parte, se han podido aislar otros sistemas proteínicos antiporte responsables de la translocación de otras especies de cationes metálicos. Algunos ejemplos son, el antiporte $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ dependiente de H^+ -que equilibra las concentraciones transmembranales de Ca^{2+} - encontrado en la mitocondria y un complemento funcional al NHA-a en el gene OF4 de *Bacillus firmus* (Mack Ivey y cols., 1991), así como el antiporte $\text{Mg}^{2+}/2\text{H}^+$ de eritrocitos, el cual ha demostrado homología con el hallado en *Hevea brasiliensis* (Amalou y cols., 1992).

El funcionamiento de los acarreadores biológicos.

Como se puede apreciar, es notable el avance que se ha logrado en los últimos cinco años sobre el aislamiento, reconstitución funcional y caracterización estructural de los acarreadores antiporte biológicos de naturaleza proteica.

Las respuestas existentes hasta el momento alcanzan a resolver el problema desde un punto de vista bioquímico (Pouyssègur, 1985). Se cuenta, además, con información del comportamiento cinético de varias de las isoformas del antiporte Na^+/H^+ (Levine y cols., 1993; Orłowski, 1993).

En cuanto a la estructura, se ha dilucidado la secuencia de aminoácidos de algunas isoformas de la proteína acarreadora Na^+/H^+ , a través de estudios realizados con técnicas bioquímicas y de biología molecular, además de métodos de simulación por medio de computadoras (Sardet y cols., 1989; Fliegel y cols., 1993; Orłowski, 1993).

Si bien se conocen los mecanismos de regulación, negativo ante la presencia de amiloruro y positivo con diversos factores de crecimiento, a la fecha no se ha establecido el mecanismo físico y químico de translocación iónica promovida por el antiporte Na^+/H^+ . Tampoco se puede afirmar si se trata realmente de un acarreador móvil Na^+/H^+ o de un doble canal. Se desconoce, incluso la estructura y localización de los sitios activos para cada evento, como el catalítico o el sitio de unión al catión. ¿Podría, de alguna manera, moverse a través de la membrana? y, si es así, ¿cómo lo hace?

Es necesario el estudio de este antiporte Na^+/H^+ para entender aquellos fenómenos que ocurren durante los procesos de formación, mantenimiento y uso del potencial electroquímico, así como su relación con la asociación y transporte de especies químicas cargadas, además de reconocer algunos de los fenómenos que se presentan durante el equilibrio homeostático.

Acarreadores, cationes y metabolismo vectorial.

Al llegar al epílogo de esta historia surge una imagen general del papel que juegan los acarreadores y los cationes en el metabolismo vectorial de los organismos.

Por un lado, los acarreadores son los servomecanismos que llevan a cabo la función de transducir la energía proveniente de los gradientes químicos y eléctricos hacia la producción de otras formas de energía metabólicamente útil. Por otro, los cationes son, tanto las fuentes de energía biológica, como los dispositivos que regulan el funcionamiento de los sistemas que conservan y transforman dicha energía.

Los resultados obtenidos en los modelos ensayados durante el desarrollo de este trabajo experimental, así como en otros sistemas modelo muestran que la relación que las propiedades físicas y químicas de los cationes en solución guardan con las cualidades del medio y de los servomecanismos transductores, como sugiere la ecuación planteada en el Capítulo IV, modulan el comportamiento de los dispositivos translocadores de iones en las membranas biológicas (Rauch y cols., 1990; Lainers y cols., 1992; Szabó y cols., 1992).

Por su parte, los estudios realizados directamente sobre la ATPasa F_0F_1 o la ATPasa E_1-E_2 sugieren que el mecanismo molecular de la operación de estas osmoenzimas depende, en gran medida, del efecto que los cationes translocados producen en la conformación de las proteínas (Anzenbacher y cols., 1992; Labahn y Gräber, 1992). Así, se sigue acumulando evidencia experimental que, tanto de forma indirecta como directa, contribuye a nutrir el conocimiento sobre la forma en que se conduce el metabolismo vectorial en el mundo viviente.

Finalmente, el complemento de los datos obtenidos mediante el estudio de los acarreadores antiparalelos proteicos, tanto de cationes metálicos como orgánicos y no metálicos (Maloney, 1992), con la información generada a lo largo del trabajo experimental descrito en este volumen, así como en otros similares (Pointud y Juillard, 1990; Hebrant y cols., 1991; Lyazghi y cols., 1992a; Lyazghi y cols., 1992b; Lyazghi y cols., 1992c; Lyazghi y cols., 1992d; Mimouni y cols., 1992; Mimouni y cols., 1993; Lyazghi y cols., 1993), sobre los poliéteres carboxílicos al formar complejos con cationes metálicos, podrá contribuir a dar luz sobre los procesos de translocación iónica facilitada que son causa y origen del metabolismo en todos los seres vivos.

Picture yourself in a boat on a river,
With tangerine trees and marmalade skies
Somebody calls you, you answer quite slowly,
A girl with kaleidoscope eyes.
Cellophane flowers of yellow and green,
Towering over your head.
Look for the girl with the sun in her eyes,
And she's gone.
Lucy in the sky with diamonds.

John Lennon & Paul McCartney

REFERENCIAS.

- Agtarap, A., Chamberlin, J.W., Pinkerton, M. y Steinrauf, L.K. 1967. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 5737-5739.
- Ahmed, S. y Booth, I.R. 1983. *Biochem. J.* **212**, 105-112.
- Alpha, R.S. y Brady, H.A. 1973. *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 7043-7049.
- Amalou, Z., Gibart, R., Brugidu, C., Touslot, P. y d'Auzac, J. 1992. *Plant Physiol.* **100**, 255-260.
- Anteunis, M.J.O. 1982. En *Polyether Antibiotics* **2**, 245-334. J.W. Westley, ed. Marcel Dekker, Inc., New York, New York.
- Anzenbacher, P., Mojzes, P., Baumruk, V. y Amler, E. 1992. *FEBS Lett.* **312**, 80-82.
- Ballardini, R., Gandolfi, M.T., Moya, M.L., Prodi, L. y Balzani, V. 1992. *Israel J. Chem.* **32**, 47-51.
- Ben-Hayyim, G. y Krause, G.H. 1980. *Arch. Biochem. Biophys.* **202**, 546-557.
- Belitzer, V.A. y Tsybakova, E.T. 1939. En *Biological Phosphorylations*. H.M. Kalkar, ed. Prentice-Hall, New York. 1969. pp. 211-227.
- Bertalanffy, L. von. 1968. *General System Theory. Foundations, Development, Applications*. George Brazillier, New York, New York.
- Boyer, D.P. 1977. *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 1006-1014.
- Breitbart, H. 1981. *Biochim. Biophys. Acta* **656**, 160-166.
- Bulychev, A.A. y Vredenberg, W.J. 1976. *Biochim. Biophys. Acta* **449**, 48-58.
- Cannon, W.B. 1929. *Physiol. Rev.* **9**, 397.
- Cannon, W.B. 1932. *The Wisdom of the Body*. W.W. Norton, New York.
- Carafoli, E. y Sottocasa, L. 1974. En *Dynamics of Energy Transducing Membranes*. L. Ernster, R. Estabrook y E.C. Slater, eds. pp. 455-469, Elsevier, Amsterdam.
- Carrel, A. 1936. *La Incógnita del Hombre*. Ed. Diana, México, D.F., 1969.
- Célis, H., Estrada O., S. y Montal, M. 1974. *J. Membr. Biol.* **18**, 187-199.
- Cerejido, M. 1983. En *Homenaje a Oparin*. pp. 91-105. M. Artís, M. Casanueva y N. Chávez, Comp., Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D.F.
- Chance, B., Lee, C.P. y Mela, L. 1967. *Fed. Proc.* **26**, 1341.
- Chance, B. y Montal, M. 1971. En *Current Topics in Membrane Transport*. F. Bronner y A. Kleinzeller, eds., Vol. 2, pp. 99-156, Academic Press, New York.
- Chapel, M., Jeminet, G., Gachon, P., Debise, R. y Durand, R. 1979. *J. Antibiot.* **32**, 740-745.
- Chattopadhyay, A., Komath, S.S. y Raman, B. 1992. *Biochim. Biophys. Acta* **1104**, 147-150.
- Chen, S.T. y Springer Jr., C.S. 1978. *Bioinorg. Chem.* **9**, 101.
- Cox, G.B., Van Truong, N., Rzesztarska, J. y Schneider, H. 1984. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 5965-5969.
- Crabbé, P. 1972. *ORD and CD in Chemistry and Biochemistry*. Academic Press, New York.

- Danielli, J.F. 1975. En *Cell Membranes. Biochemistry, Cell Biology and Pathology*. pp. 3-11. G. Weissmann y R. Claiborne, eds., HP Publishing Co., Inc., New York, New York.
- Degani, H. y Friedman, H.L. 1974. *Biochemistry* **13**, 5022-5032.
- Donis, J., Grandjean, J., Grosjean, A. y Laszlo, P. 1981. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **102**, 690-696.
- Doughty, M.J. y Diehn, B. 1982. *Biochim. Biophys. Acta* **682**, 32-43.
- Douglas, M.G. y Cockrell, R.S. 1974. *J. Biol. Chem.* **249**, 5464.
- Dubinsky, W.P. y Cockrell, R.S. 1974. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **56**, 415.
- Duesler, E.N. y Paul, I.C. 1982. En *Polyether Antibiotics* **2**, 87-195. J.W. Westley, Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York.
- Eisenman, G. 1968. *Fed. Proc.* **27**, 1249-1251.
- Estrada O., S. 1974. En *Perpectives in Membrane Biology*. S. Estrada O. y C. Gitler, eds., pp. 281-302, Academic Press, New York.
- Estrada O., S. 1975. *PAABS Revista* **4** (3), 407-414.
- Estrada O., S. 1983. *Ciencia* **34**, 183-192.
- Estrada O., S., Célis, H., Calderón, E., Gallo, G. y Montal, M. 1974a. *J. Membr. Biol.* **18**, 201.
- Estrada O., S., Célis, H., Fernández, M.S. y Montal, M. 1974b. En *Calcium Binding Proteins*. W. Dravidowski, H. Strzelecka-Golaszewska y E. Carafoli, eds., pp. 895-919, PWN Polish Sci. Publ., Waraszawa y Elsevier Sci. Publ. Co., Amsterdam.
- Estrada O., S. y Gómez Lojero, C. 1971. *Biochemistry* **10**, 1548.
- Estrada O., S., Gómez Lojero, C. y Montal, M. 1972. *Bioenergetics* **3**, 417.
- Estrada O., S., Graven, S.N. y Lardy, H.A. 1967. *J. Biol. Chem.* **242**, 2925-2932.
- Everett, G.W., Parker, S.B. y Williams, R.J.P. 1983. *Biochemistry* **22**, 6149-6155.
- Feinstein, M.B., Henderson, E.G. y Shaáfi, R.I. 1977. *Biochim. Biophys. Acta* **468**, 284- 295.
- Fernández, M.S., Célis, H. y Montal, M. 1973. *Biochim. Biophys. Acta* **323**, 600-605.
- Fliegel, L., Dyck, J.R.B., Wang, H., Fong, C. y Haworth, R.S. 1993. *Mol. Cell. Biochem.* **125**, 137-143.
- Fox, S.W. 1976. *Origins of Life* **7**, 49-68.
- Gachon, P. y Moins, N. 1982. *IRCS Med. Sci.* **10**, 209- 210.
- Gad, S.C., Reilly, C., Siino, K., Gavigan, F.A. y Witz, G. 1985. *Drug Chem. Toxicols.* **8**, 451-468.
- Garty, H., Eisenbach, M., Shuldman, R. y Caplan, S.R. 1979. *Biochim. Biophys. Acta* **545**, 365-375.
- Gertenbach, G.P. y Popov, I.A. 1975. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 4738-4744.
- Gilbert, E.N. 1966. *Science* **152**, 320-326.
- González Halphen, D. 1990. *Ciencia* **41**, 133-152.
- Grandjean, J. y Laszlo, P. 1982. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**, 1293-1297.
- Grandjean, J. y Laszlo, P. 1984. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 1472-1476.
- Grandjean, J. y Laszlo, P. 1986. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 3483-3487.

- Grandjean, J. y Laszlo, P. 1989. *Biochimie* **71**, 183-186.
- Graven, S.N., Estrada O., S. y Lardy, H.A. 1966. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **56**, 654-658.
- Graven, S.N., Lardy, H.A. y Estrada O., S. 1967. *Biochemistry* **6**, 365-371.
- Greville, G.D. 1969. En *Current Topics in Bioenergetics*. D.R. Sanadi, ed., Vol. 3, pp. 1-78, Academic Press. New York.
- Guffanti, A.A., Davidson, L.F., Mann, T.M. y Krulwich, T.A. 1979. *J. Gen. Microbiol.* **114**, 201-206.
- Hanley, H.G. y Slack, J.D. 1982. En *Polyether Antibiotics*. **1**, 341-367. J.W. Westley, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York.
- Harada, N. y Nakanishi, K. 1968. *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 7351-7352.
- Harold, F.M., Pavlasova, E. y Baarda, J.R. 1970. *Biochim. Biophys. Acta.* **196**, 235
- Harris, E.J., Judah, J.D. y Ahmed, K. 1966. En *Current Topics in Bioenergetics*. D.R. Sanadi, ed., Vol. 1, pp. 255-277, Academic Press, New York.
- Hatefi, Y. 1985. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 1015-1069
- Hatefi, Y., Yagi, T., Phelps, D.C., Wong, S.Y., Vik, S.B. y Galante, Y.M. 1982. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 1756-1760.
- Hebrant, M., Mimouni, M., Tissier, M., Pointud, Y. y Juillard, J. 1992. *New J. Chem.* **16**, 999-1008.
- Hebrant, M., Pointud, Y. y Juillard, J. 1991. *J. Phys. Chem.* **95**, 3653-3662.
- Henderson, P.J.F., McGivan, J.D. y Chappell, J.B. 1969. *Biochem. J.* **111**, 521-535.
- Hennessey, J.P. y Johnson Jr., W.C. 1982. *Anal. Biochem.* **125**, 177.
- Herrera, A.L. 1942. *Science* **96**, 14.
- Hinkle, P.C. y Hortsman, L.L. 1971. *J. Biol. Chem.* **246**, 6024.
- Hinkle, P.C. 1973. *Fed. Proc.* **32**, 1988.
- Ivanov, V.T. 1975. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **264**, 221-243.
- Jezek, P., Mahdi, F. y Garlid, K.D. 1990. *J. Biol. Chem.* **265**, 10522-10526.
- Kakar, S.S., Mahdi, F., Li, Xq., Garlid, K.D. 1989. *J. Biol. Chem.* **264**, 5846-5851.
- Kalckar, H.M. 1969. En *Biological Phosphorylations*. H.M. Kalckar, ed. Prentice-Hall, New York. pp 208-210.
- Königsberg, M. 1991. *Bienergética de la Cadena Respiratoria*, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México, 113 pp.
- Kotyk, A. 1983. *J. Bioenerg. Biomembr.* **15**, 307-319.
- Labahn, A. y Gräber, P. 1992. *FEBS Lett.* **313**, 177-180.
- Lardy, H.A., Graven, S.N. y Estrada O., S. 1967. *Fed. Proc.* **26**, 1355.
- Larkum, A.W.D. y Boardman, N.K. 1974. *FEBS Lett.* **40**, 229- 232.
- Lehninger, A.L. 1982. *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, Inc., New York, New York.
- Leinders, T., Kleef, R.G.D.M. van, Vijverberg, H.P.M. 1992. *Biochim. Biophys. Acta.* **1112**, 75-82.
- Levine, S.A., Montrose, M.H., Tse, C.M. y Donowitz, M. 1993. *J. Biol. Chem.* **268**, 25527-25535.

- Liu, C.M. 1982. En *Polyether Antibiotics* **1**, 43-102. J.W. Westley, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York.
- Lombardini, J.B. 1985. *Neurochem. Res.* **10**, 77-88.
- Lyazghi, R., Cuer, A., Dauphin, G. y Juillard, J. 1992a. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2**, 35-42.
- Lyazghi, R., Hebrant, M., Tissier, M., Pointud, Y. y Juillard, J. 1992b. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **88**, 1009-1015.
- Lyazghi, R., Pointud, Y. y Juillard, J. 1992c. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **88**, 1017-1021.
- Lyazghi, R., Pointud, Y., Dauphin, G. y Juillard, J. 1992d. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **6**, 468-470.
- Lyazghi, R., Pointud, Y., Dauphin, G. y Juillard, J. 1993. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2**, 1681-1686.
- Mack Ivey, D., Guffanti, A.A., Bossewitch, J., Padan, E. y Krulwitch, T.A. 1991. *J. Biol. Chem.* **266**, 23483-23489.
- Malaisse, W.J., Anjaneyulu, K., Anjaneyulu, R. y Couturier, E. 1980. *Mol. Cell. Biochem.* **30**, 67-70.
- Maloney, P.C. 1992. *BioEssays* **14**, 757-762.
- Markin, V.S., Sokolov, V.S., Boguslavsky, L.I. y Jaguzhinsky, L.S. 1975. *J. Membrane Biol.* **25**, 23-45.
- Martin, W.H., Beavis, A.D., Garlid, K.D. 1984. *J. Biol. Chem.* **259**, 2062-2065.
- Maxwell, R.J., Hampson, J.W. y Cygnarowicz-Provost, M.L. 1992. *J. Supercrit. Fluids* **5**, 31-37.
- Michel, H. 1983. *Trends Biochem. Sci.* Febrero, 56-59.
- Miller, G.J. 1978. *Living Systems*. McGraw-Hill, Inc., New York, New York.
- Mimouni, M., Perrier, S., Frihmat, R., Hebrant, M., Jeminet, G., Pointud, Y. y Juillard, J. 1992. *J. Chim. Phys.* **89**, 2169-2186.
- Mimouni, M., Perrier, S., Pointud, Y. y Juillard, J. 1993. *J. Sol. Chem.* **22**, 769-785.
- Mitchell, P. 1961. *Nature* **191**, 144-148.
- Mitchell, P. 1966. En *Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation*. Glynn Research Ltd., Bodmin, Cornwall, England.
- Mitchell, P. 1967. *Fed. Proc.* **26**, 1370.
- Mitchell, P. 1968. En *Chemiosmotic Coupling and Energy Transduction*. Glynn Research Ltd., Bodmin, Cornwall, England.
- Mitchell, P. 1981. *Chem. Britain* **17**, 14-23.
- Mitchell, P. 1982a. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 584-601.
- Mitchell, P. 1982b. En *Cell Function and Differentiation*, Parte B, pp. 399-408. G. Akoyunoglu y cols., eds. Alan R. Liss Inc., New York.
- Mitchell, P. y Moyle, J. 1967. *Biochem. J.* **105**, 1147.
- Mitchell, P. y Moyle, J. 1968. *Eur. J. Biochem.* **4**, 530.
- Moins, N., Gachon, P., Maublant, J. y Duchene-Marullaz, P. 1982. *Arch. Int. Pharmacodynamie Ther.* **260**, 104-114.
- Montal, M. 1974. En *Perspectives in Membrane Biology*. S. Estrada O. y C. Gitler, eds., pp. 591-622, Academic Press, New York.

- Montal, M., Chance, B. y Lee, C.P. 1970. *J. Membrane Biol.* **2**, 201-234.
- Montal, M. y Mueller, P. 1972. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 3561.
- Mueller, P. y Rudin, D.O. 1969. En *Current Topics in Bioenergetics*. D.R. Sanadi, ed., Vol. 3, pp. 157-249, Academic Press, New York.
- Neumann, J. von y Morgenstern, O. 1947. *Theory of Games and Economic Behavior*, Princeton Univ. Press, Princeton.
- Nicholls, D.G. 1982. *Bioenergetics*, Academic Press, New York, 191 pp.
- Núñez, M.T. y Glass, J. 1985. *J. Biol. Chem.* **260**, 14707-14711.
- Oparin, A.I. 1936. *The Origins of Life*. Mc Millan & Co., New York, New York.
- Oparin, A.I. 1974. *Origins of Life* **5**, 223-226.
- Orlowski, J. 1993. *J. Biol. Chem.* **268**, 16369-16377.
- Osborne, M.W., Wegner, J.J. y Zanko, M.T. 1977. *J. Pharmacols. Exp. Ther.* **200**, 195-205.
- Osborne, M.W., Wegner, J.J., Kovzelove, F., Boyd, R. y Zanko, M.T. 1982a. En *Polyether Antibiotics* **1**, 333-340. J.W. Westley, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York.
- Osborne, M.W., Wenger, J., Zanko, M., Kovzelov, F. y Cohen, M.R. 1982b. En *Polyether Antibiotics* **1**, 397-427. J.W. Westley, ed., Marcell Dekker, Inc., New York, New York.
- Packer, L. 1967. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **137**, 624-640.
- Painter, G. y Pressman, B.C. 1980. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **97**, 1268-1275.
- Palmieri, F. y Quagliariello, E. 1969. *J. Biol. Chem.* **8**, 473.
- Pinner, E., Padan, E. y Schuldiner, S. 1992. *J. Biol. Chem.* **267**, 11064-11068.
- Pinner, E., Kotler, Y., Padan, E. y Schuldiner, S. 1993. *J. Biol. Chem.* **268**, 1729-1734.
- Pointud, Y. y Juillard, J. 1990. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **86**, 3395-3398.
- Pouysségur, J. 1985. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 453-455.
- Pressman, B.C. 1967. *Ann. Rev. Biochem.* **45**, 501.
- Pressman, B.C. 1968. *Fed. Proc.* **27**, 1283-1288.
- Pressman, B.C. 1969. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **147**, 829-841.
- Pressman, B.C. 1973. *Fed. Proc.* **32**, 1698-1703.
- Pressman, B.C., Harris, E.J., Jagger, W.S. y Johnson, J.H. 1967. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **58**, 1949-1956.
- Prigogine, I. Lefever, R., Goldbetter, A. y Herschkowitz-Kaufman, M. 1969. *Nature* **223**, 913.
- Prigogine, I. y Nicolis, G. 1971. *Quat. Rev. Biophys.* **4**, 107.
- Prosser, B. y Palleroni, N.J. 1982. En *Polyether Antibiotics* **1**, 21-41. J.W. Westley, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York.
- Quastler, H. red. 1955 *Information Theory in Biology*. Univ. Illinois Press., Urbana, Ill.
- Racker, E. 1974. En *Perpectives in Membrane Biology*. S. Estrada O. y C. Gitler, eds., pp. 623-644, Academic Press, New York.
- Racker, E. 1977. *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 1006-1014.
- Racker, E. 1979. *Acc. Chem. Res.* **12**, 338-344.

- Rapoport, A. 1966. *General Systems* **11**, 3-11.
- Rauch, G., Gambale, F. y Montal, M. 1990. *Eur. Biophys. J.* **18**, 79-83.
- Reed, P.W. 1979. *Methods Enzymol.* **4**, 435-454.
- Reed, P.W. 1982. En *Polyether Antibiotics* **1**, 185-302. J.W. Westley, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York.
- Reed, P.W. y Bokoch, G.M. 1982. En *Polyether Antibiotics* **1**, 369-395. J.W. Westley, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York.
- Richardson, F.S. y Dasgupta, A. 1982. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 5716.
- Rodios, N.A. y Anteunis, M.J.O. 1977. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **86**, 917-929.
- Rott, R. y Avi-Dor, Y. 1977. *FEBS Lett.* **81**, 267-270.
- Ruff, M.D. 1982. En *Polyether Antibiotics* **1**, 303-332. J.W. Westley, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York.
- Ruiz Azuara, P. y García Colín, L. 1977. *Lab. Interdisciplinario. Secc. Inv.*(1), UNAM.
- Sagan, C. 1977. *The Dragons of Eden*. Random House, New York, New York.
- Sagan, C. 1980. *Cosmos*. Random House, New York, New York.
- Sardet, C., Franchi, A. y Pouysségur, J. 1989. *CELL* **56**, 271-280.
- Sauer, F.A. 1983. *Curr. Top. Membr. Transport* **19**, 21-51.
- Scarpa, A., Brinley, F.J. y Dubyak, G. 1978a. *Biochemistry* **17**, 1378-1386.
- Scarpa, A., Brinley, F.J., Tiffert, T. y Dubyak, G.R. 1978b. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **307**, 86-112.
- Schultz, S.G. 1980. *Basic Principles of Membrane Transport*. Cambridge University Press, Cambridge, New York.
- Shamoo, A.E. y Murphy, T.J. 1979. *Curr. Top. Bioenerg.* **9**, 147-177.
- Shannon, C. y Weaver, W. 1949. *The Mathematical Theory of Communication*. Univ. Illinois Press, Urbana, Ill.
- Shastri, B.P., Sankaram, M.B. y Easwaran, K.R.K. 1987a. *Biochemistry* **26**, 4925-4930.
- Shastri, B.P., Sankaram, M.B. y Easwaran, K.R.K. 1987b. *Biochemistry* **26**, 4930-4936.
- Simon, H.A. 1965. *General Systems* **10**, 63-76.
- Singer, S.J. 1975. En *Functional Linkage in Biomolecular Systems*. pp. 103-121. F.O. Schmitt, D.M. Schneider, D.M. Crothers, eds., Raven Press, New York, New York.
- Skulachev, V.P. 1971. En *Curr. Top. Bioenerg.* D.R. Sanadi, ed. Acad. Press, New York. **4**, 127-190.
- Slater, E.C. 1953. *Nature (London)* **172**, 975.
- Smith, J.M. 1981. *Chemical Engineering Kinetics*, 3a ed. Mc Graw-Hill Book, Co., New York, New York.
- Soltoff, S.P. y Mandel, L.J. 1986. *J. Membrane Biol.* **94**, 153-161.
- Starzak, M.E. 1984. *The Physical Chemistry of Membranes*. Academic Press, Inc., Orlando, Florida.
- Steinrauf, L.K., Pinkerton, M. y Chamberlin, J.W. 1968. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **33**, 29-31.

- Stiles, M.K., Craig, M.E., Gunnell, S.L.N., Pfeiffer, D.R. y Taylor, R.W. 1991. *J. Biol. Chem.* **266**, 8336-8342.
- Sutko, J.L., Besch, H.R., Jr., Bailey, J.C., Zimmerman, G. y Watanabe, A. 1977. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **203**, 685-700.
- Szabo, G. 1981. *Fed. Proc.* **40**, 92-97.
- Szabó, I., Bernardi, P. y Zoratti, M. 1992. *J. Biol. Chem.* **267**, 2940-2946.
- Sze, H. 1980. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 5904-5908.
- Tam, S.C. y Williams, R.J.P. 1986. *J. Inorg. Biochem.* **26**, 35-44.
- Tanford, C. 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 3701- 3705.
- Taylor, R.W., Kauffman, R.F. y Pfeiffer, D.R. 1982. En *Polyether Antibiotics 1*, 103-184. J.W. Westley, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York.
- Telfer, A., Barber, J. y Nicolson, J. 1975. *Biochim. Biophys. Acta* **396**, 301-309.
- Tinoco, I., Sauer, K. y Wang, J.C. 1978. *Physical Chemistry. Principles and Applications in Biological Sciences*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
- Toro, M., Arzt, E., Cerbón, J., Alegría, G., Alva, R., Meas, Y. y Estrada O., S. 1987. *J. Membrane Biol.* **95**, 1-8.
- Toro, M., Gómez Lojero, C., Montal, M. y Estrada O., S. 1976. *J. Bioenerg.* **8**, 19-26.
- Vasington, F.D. y Murphy, J.V. 1962. *J. Biol. Chem.* **237**, 2670.
- Vázquez Laslop, N. y Dreyfus, G. 1989. *Ciencia* **40**, 147-155.
- Walker, N.A. 1975. *FEBS Lett.* **50**, 98-101.
- Westley, J.W., Evans, R.H., Williams, T. y Stempel, A. 1970. *Chem. Commun.* **1970**, 71-72.
- Westley, J.W. 1982. En *Polyether Antibiotics 1*, 1-20. J.W. Westley, ed. Marcel Dekker, Inc., New York, New York.
- Whitehead, A.N. 1925. *Science and the Modern World. Lowell Lectures*, New York, Mc Millan Co., 1953.
- Wipf, H.K. y Simon, W. 1970. *Helv. Chim. Acta* **53**, 1732-1740.
- Young, J.Z. 1971. *An Introduction to the Study of Man*. Oxford University Press, New York, New York.
- Yun, C.H.C., Gurubhagavatula, S., Levine, S.A., Montgomery, J.L.M., Brant, S.R., Cohen, M.E., Cragoe Jr., E.J., Pouysségur, J., Tse, C.M. y Donowitz, M. 1993. *J. Biol. Chem.* **268**, 206-211.

APENDICE

Publicaciones producidas:

1. Alva, R., Lugo-R., J.A., Arzt, E., Cerbón, J., Rivera, B.E., Toro, M. and Estrada O., S. 1992. Nigericin forms highly stable complexes with lithium and caesium. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 125-129.
2. Alva, R., Yañez, F., Hernández-Arana, A., Velázquez-Manzanares, M. and Estrada O., S. Conformational changes of lasalocid depend on cation valence and environmental hydrophobicity. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*

Original Article

Nigericin Forms Highly Stable Complexes with Lithium and Cesium¹Raúl Alva,² J. Antonio Lugo-R.,² Eduardo Arzt,³ Jorge Cerbón,⁴ Blanca E. Rivera,² Mireya Toro,² and Sergio Estrada-O.²

Received June 26, 1991

Nigericin is a monocarboxylic polyether molecule described as a mobile K⁺ ionophore unable to transport Li⁺ and Cs⁺ across natural or artificial membranes. This paper shows that the ion carrier molecule forms complexes of equivalent energy demands with Li⁺, Cs⁺, Na⁺, Rb⁺, and K⁺. This is in accordance with the similar values of the complex stability constants obtained from nigericin with the five alkali metal cations assayed. On the other hand, nigericin-alkali metal cation binding isotherms show faster rates for Li⁺ and Cs⁺ than for Na⁺, K⁺, and Rb⁺, in conditions where the carboxylic proton does not dissociate. Furthermore, proton NMR spectra of nigericin-Li⁺ and nigericin-Cs⁺ complexes show wide broadenings, suggesting strong cation interaction with the ionophore; in contrast, the complexes with Na⁺, K⁺, and Rb⁺ show only clear-cut chemical shifts. These latter results support the view that nigericin forms highly stable complexes with Li⁺ and Cs⁺ and contribute to the explanation for the inability of this ionophore to transport the former cations in conditions where it catalyzes a fast transport of K⁺ > Rb⁺ > Na⁺.

KEY WORDS: Nigericin; carboxylic polyether; carboxylic ionophore; ion transport; ionic complexes.

INTRODUCTION

Nigericin is a monocarboxylic polyether molecule (Fig. 1) first described in its ion translocating capability in mitochondrial membranes by Estrada-O. *et al.* (1967a). Two different ion transfer mechanisms have been demonstrated for this ionophore: at concentrations below 1.0 μM, an electrically silent potassium/

proton exchange mechanism was shown by Pressman (1968) and Tosteson *et al.* (1968), this after Mitchell suggested the occurrence of such a model during a Federation Meeting discussion (1968). On the other hand, at concentrations above 1.0 μM, nigericin catalyzes a pH- and concentration-dependent electrogenic potassium transport occurring through mobile dimers (Estrada-O. *et al.*, 1967b; Markin *et al.*, 1975; Toro *et al.*, 1976).

This paper shows that nigericin forms complexes of equivalent energy requirements with lithium, cesium, sodium, rubidium, and potassium, and that the translocator forms highly stable complexes with Li⁺ and Cs⁺.

These results provide an explanation for the inability of nigericin to transport lithium and cesium in conditions where it catalyzes a fast transport of K⁺ > Rb⁺ > Na⁺.

¹Part of the results of this paper were presented at the 14th International Congress of Biochemistry in Prague, Czechoslovakia.

²Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, A.P. 55-535, 09340 México 13, D.F., México.

³Present address: Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

⁴Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados de I.P.N., México, D.F., México.

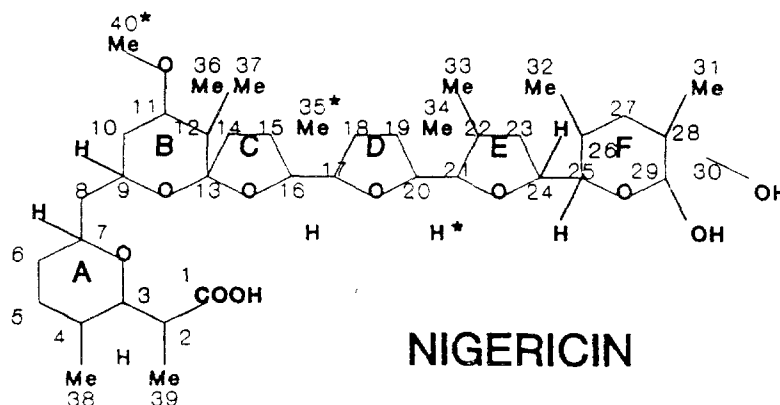


Fig. 1. Chemical formula of nigericin free acid. The numbering system follows that in Rodios and Anteunis (1977). Those atoms marked by an asterisk correspond to the signals studied by $^1\text{H-NMR}$ as published by Toro *et al.* (1987).

MATERIALS AND METHODS

Potentiometric Measurements

Stability Constants for Complex Formation

Nigericin free acid was a kind gift from Dr. P. A. Miller, Dr. L. H. Sello, and Dr. J. W. Westley (Hoffman-La Roche, Inc., Nutley, New Jersey).

Stability constants (K_f) for nigericin-alkali metal cation complex formation reactions, in solution, were determined at room temperature by potentiometric techniques. Measurements were made, at equilibrium, having nigericin at $112 \pm 6 \mu\text{M}$ and equivalent concentrations of alkali metal cation chlorides. The experiments were carried out in a single-phase homogeneous solution of 1,4-dioxane/ H_2O 45% (vol/vol) at pH 7.76, as previously reported for the nigericin-potassium complex (Toro *et al.*, 1987). Ion-selective electrodes (Beckman 39046 for sodium and Beckman 39047 for lithium, potassium, rubidium, and cesium cations) were equilibrated with each alkali metal chloride for a week; their Nernstian response was corroborated before use. All chemicals were analytical grade (Merck).

Binding Isotherms

Binding rates were obtained by potentiometric titration in the same medium used for the determination of K_f . The experiments were carried out with nigericin acid at constant concentration, adding the metal cation and plotting their binding rate as a function of $[\text{Bound metal}]/[\text{Total metal}]$, following the "isolation" technique described by Smith (1981).

Simultaneous to the titration, pH measurements were carried out with a glass electrode (Beckman 39505).

Proton NMR Spectra

The $^1\text{H-NMR}$ spectra were taken in deuterated chloroform (CDCl_3) in a Varian EM-390, 90 MHz NMR Spectrometer. Tetramethylsilane (TMS) was used as internal standard.

Nigericin free acid spectrum was obtained directly from the sample provided by Hoffman-La Roche. Nigericin-alkali metal cation complexes were prepared from the free acid and an excess of alkali metal carbonate salts as previously described (Toro *et al.*, 1987). After solvent evaporation, each sample was freeze-dried (Labconco Freeze-Dryer 3) during 3 hours and dissolved in CDCl_3 . The signal assignments of the spectra were taken from previous reports (Rodios and Anteunis, 1977; Toro *et al.*, 1987).

RESULTS

Feasibility for the Formation of Nigericin-Cation Complexes

Table I shows no statistical difference among K_f values of nigericin bound to lithium, sodium, potassium, rubidium, and cesium cations in homogeneous solution. In fact, the estimation of the corresponding ΔG° values from the K_f data shows similar feasibility for the formation of nigericin complexes with the five alkali metal cations.

Binding Rates

Nigericin-alkali metal cation binding behavior

Table I. Log K , and ΔG° Values of Nigericin-Alkali Metal Cation Complexes^a

Nigericin complex	log K ,	ΔG° (kcal/mol)
Lithium	4.16 ± 0.34	-5.681
Sodium	3.91 ± 0.22	-5.339
Potassium	3.70 ± 0.08	-5.053
Rubidium	3.70 ± 0.25	-5.053
Cesium	3.82 ± 0.34	-5.271

^aNigericin-free acid ($112 \pm 6 \mu\text{M}$) was dissolved in a 1,4-dioxane/ H_2O 45% (vol/vol) homogeneous solution (ϵ 38.48). pH (7.76) was adjusted with triethanolamine and HCl. (ϵ = dielectric constant.)

was followed by potentiometric titration in homogeneous solution. Figure 2 depicts nigericin-alkali metal cation binding isotherms as a function of total metal at constant nigericin concentration. An apparent first-order reaction is produced with each alkali metal cation tested. However, faster binding rates are obtained for lithium and cesium (Fig. 2a) than for sodium, potassium, and rubidium (Fig. 2b).

Effect of Alkali Metal Cations on $^1\text{H-NMR}$ Signals of Nigericin Free Acid

Table II shows a comparison of the proton shift values (δ), in ppm from TMS internal, of H 21, Me 35, and Me 40 (Fig. 1) for the complexes of nigericin with all the alkali metal cations in CDCl_3 . It can be seen that wider broadenings of H 21, Me 35, and Me 40 signals, with respect to the free acid, are caused by lithium and cesium; these results suggest an important reduction in the flexibility of the molecule near those loci. On the other hand, only significant $\Delta\delta$ are caused by sodium (H 21 > Me 40 > Me 35), potassium (Me 40 > H 21 > Me 35), and rubidium (Me 40 > Me 35 > H 21) as compared with lithium and cesium.

DISCUSSION

Energy Requirements for Complex Formation

In contrast to previous results on cation binding

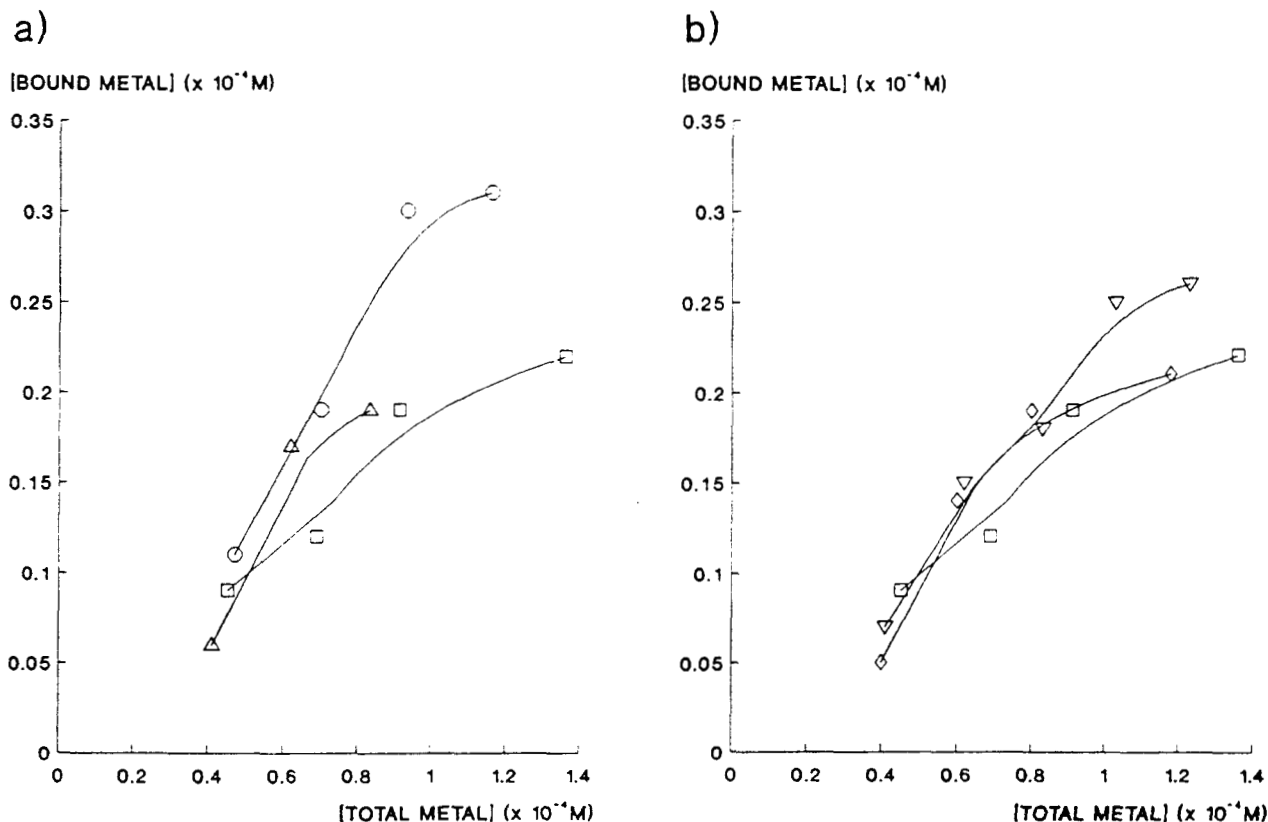


Fig. 2. Nigericin-Alkali metal cation binding isotherms in one single-phase homogeneous solution at ϵ 38.48 and pH 7.76. Initial nigericin concentration was $112 \pm 6 \mu\text{M}$. Homogeneous solution was prepared as in Table I. (a) Comparison of Li^+ (O) and Cs^+ (Δ) vs. K^+ (\square). (b) Comparison of Na^+ (∇) and Rb^+ (\diamond) vs. K^+ (\square).

Table II. Proton Shift Values (δ) for Nigericin-Alkali Metal Cation Complexes in CDCl_3 ^a

Sample	δ signals (ppm) ^a		
	H21	Me35	Me40
Free acid ^c	4.024	1.419	3.353
Nigericin-Li	4.24 (vb)	1.54 (vb)	3.42, 3.44 (b)
Nigericin-Na	4.345	1.591	3.368
Nigericin-K ^c	4.25	1.6	3.62 /
Nigericin-Rb	4.0	1.46	3.4
Nigericin-Cs	3.9	1.5, 1.48 (b)	3.44, 3.36, 3.33

^a90 MHz ¹H-NMR spectra. TMS was used as internal.

^bb: broad; vb: very broad.

^cToro *et al.* (1987).

carried out in bulk-phase partition experiments (Pressman, 1968), where a clear ion selectivity profile for nigericin was observed ($\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Na}^+ > \text{Cs}^- > \text{Li}^-$), this paper shows that the ionophore interacts with almost identical affinity values with the above-mentioned alkali metal cations in homogeneous solutions (Table I).

The finding that no significant differences exist among the K_f values clearly indicates that nigericin may form complexes of equivalent energy demands with the five alkali metal cations tested, irrespective of its translocating capability. Thus, the energy requirements of the complexation reaction seem not to be a limiting step for the transport process and, therefore, they are not responsible for the ionic selectivity observed in multiple phase systems (Taylor *et al.*, 1982), such as bulk phases and lipid membranes.

It is also apparent, from the above results, that there is no correlation between complex stability and cation size (vgr.: ionic, atomic, or hydrated radii) nor electronegativity. Therefore, one may hypothesize that nigericin should be able to complex virtually any metal cation, despite its actual volume.

Binding Intensities Determine the Rate of Ion Transport

The cation-to-polyether binding intensities apparently determine the rate of ion transport. This is derived from the different rates obtained in the ratio existing between bound metal, or formed complex, and total metal concentration shown in Fig. 2, where two general patterns of behavior are observed. First, faster binding rates shown with lithium and cesium (Fig. 2a) suggest greater attraction forces between these cations and the polyether. Second, slower rates

depicted with the cations which are commonly transported, sodium, potassium, and rubidium, indicate an easier dissociation between these ions and the carrier.

In fact, the observed ¹H-NMR broadenings of signals (Table II) and, accordingly, smaller relaxation times, are an indirect reflection of polyether-cation interaction intensity, and suggest that lithium and cesium are strongly tied, not easily dissociated and, therefore, unable to be transported across lipid barriers. Thus, dissociation could be a major limiting step for mobile carrier-mediated transport, as has been recently suggested for potassium and rubidium (Riddell *et al.*, 1988).

The higher affinity and intensity of interaction of lithium and cesium shown for nigericin appear to be related with the higher electron affinity (ea) and reduction potential (E°) values of both cations, rather than with their size and electronegativity. This is derived from the fact that E° of Li^+ (-3.02 V) and Cs^+ (-3.02 V) are higher than those of Na^+ (-2.71 V), K^+ (-2.92 V), and Rb^+ (-2.99 V) as indicated by Cotton and Wilkinson (1966), and also by data (Day and Selbin, 1969) showing that the ea of lithium (0.58 eV) is lower than those of rubidium, sodium, and potassium (ea_{Rb^+} 0.6 eV, ea_{Na^+} 0.78 eV and ea_{K^+} 0.92 eV). Consequently, the intrinsic energetic properties of the metal atoms could play a central role in the selectivity of binding and ion transport. These data complement previous evidence indicating that variations on the chemical structure of polyether molecules also determine the transitions of ionic selectivity for transport (Eisenman *et al.*, 1968).

Ionic Interaction Profiles of Nigericin

In conclusion, the correlation of results shown in this paper differs with respect to solvent extraction and transport selectivities previously published for nigericin in several experimental systems (Table III). In addition, they illustrate that the ionophore is capable of interacting with metal cations which are not translocated across lipid phases. Consequently, it is very likely that the profiles of ionic interaction demonstrated in this paper for nigericin could sustain new lines of interpretation to explain the biological activity of carboxylic ionophores (Osborne *et al.*, 1977; Ben-Hayyim and Krause, 1980; Hatefi *et al.*, 1982; Osborne *et al.*, 1982) through the binding with fixed metal ions in enzymes, protein complexes, and surface membrane ligands.

Table III. Nigericin-Alkali Metal Cation Selectivities as Obtained in Different Experimental Systems

Experimental system	Ion selectivity sequence
Mitochondria O ₂ consumption ^a	K > Rb > Na > Cs > Li
Toluene- <i>n</i> -butanol extraction ^b	
Transport in mitochondria ^{c,d}	
BLM at pH ~ 7 ^d	
Three-phase transport ^e	K ~ Rb > Na > Cs > Li
BLM at pH 4 ^f	K > Rb > Cs > Na > Li
This work:	
K,	Li ~ Na ~ K ~ Rb ~ Cs
¹ H-NMR broadenings	Li ~ Cs > Na ~ K ~ Rb
Cation binding rates	Li ~ Cs > Na ~ K ~ Rb

^aGraven *et al.* (1966).^bPressman (1968).^cHenderson *et al.* (1969).^dToro *et al.* (1976).^eAshton and Steinrauf (1970).^fToro *et al.* (1987).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by Fondo R.J. Zevada 44/86 and 169/87, CONACyT P228CCOX891754, DGICSA C89-01-0216 and C90-01-0287. The authors wish to thank Ing. Gaspar Mayor for his advise and comments on this work.

REFERENCES

Ashton, R., and Steinrauf, L. K. (1970). *J. Mol. Biol.* **49**, 547-556.
 Ben-Hayyim, G., and Krause, G. H. (1980). *Arch. Biochem. Biophys.* **202**, 546-557.

Cotton, F. A., and Wilkinson, G. (1966). *Advanced Inorganic Chemistry*, 2nd edn., Interscience (Wiley), New York.
 Day, M. C., and Seibin, J. (1969). *Theoretical Inorganic Chemistry*, 2nd edn. Van Nostrand Reinhold, New York.
 Eisenman, G. (1967). In *Glass Electrodes for Hydrogen and Other Cations* Eisenman, G., ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 268-283.
 Eisenman, G., Ciani, S. M., and Szabo, G. (1968). *Fed. Proc.* **27**, 1289-1304.
 Estrada-O., S., Graven, S. N., and Lardy, H. A. (1967a). *Fed. Proc.* **26**, 610-614.
 Estrada-O., S., Graven, S. N., and Lardy, H. A. (1967b). *J. Biol. Chem.* **242**, 2925-2932.
 Graven, S. N., Estrada-O., S., and Lardy, H. A. (1966). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **56**, 654-658.
 Hatefi, Y., and Yagi, T., Phelps, D. C., Wong, S. Y., Vik, S. B., and Galante, Y. M. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 1756-1760.
 Henderson, P. J. F., McGivan, J. D., and Chappell, J. B. (1969). *Biochem. J.* **111**, 521-535.
 Markin, V. S., Sokolov, V. S., Boguslavsky, L. I., and Jaguzhinsky, L. S. (1975). *J. Membr. Biol.* **25**, 23-45.
 Mitchell, P. (1968). In *Chemiosmotic Coupling and Energy Transduction*, Glynn Research, Bodmin, Cornwall, England.
 Osborne, M. W., Wegner, J. J., and Zanko, M. T. (1977). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **200**, 195-205.
 Osborne, M. W., Wegner, J. J., Kovzelove, F., Boyd, R., and Zanko, M. T. (1982). In *Polyether Antibiotics* (Westley, J. W., ed.), Vol. 1, Marcel Dekker, New York, pp. 333-340.
 Pressman, B. C. (1968). *Fed. Proc.* **27**, 1283-1288.
 Riddell, F. G., Arumugam, S., Brophy, P. J., Cox, B. G., Payne, M. C. H., and Southon, T. E. (1988). *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 734-738.
 Rodios, N. A., and Anteunis, M. (1977). *Bull. Soc. Chim. Belg.* **86**, 917-929.
 Smith, J. M. (1981). *Chemical Engineering Kinetics*, 3rd edn. McGraw-Hill, New York.
 Taylor, R. W., Kauffman, R. F., and Pfeiffer, D. R. (1982). In *Polyether Antibiotics* (Westley, J. W., ed.), Vol. 1, Marcel Dekker, New York, pp. 103-184.
 Toro, M., Gómez-Lojero, C., Montal, M., and Estrada-O., S. (1976). *J. Bioenerg.* **8**, 19-26.
 Toro, M., Arzt, E., Carbón, J., Algeria, G., Alva, R., Meas, Y., and Estrada-O., S. (1987). *J. Membr. Biol.* **95**, 1-8.
 Tosteson, D. C., Andreoli, T. E., Tieffenberg, M., and Cook, P. (1968). *J. Gen. Physiol.* **51**, 373s-.

CONFORMATIONAL CHANGES OF LASALOCID DEPEND ON CATION VALENCE
AND ENVIRONMENTAL HYDROPHOBICITY

Raúl Alva¹, Fausto Yáñez², Andrés Hernández-Arana³, Miguel Velázquez-Manzanares¹ and Sergio Estrada-O.¹

Running title: X-537A moiety depends on cation and medium

¹Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, A.P. 55-535, 09340 México 13, D.F., México

²Present address: Departamento de Patología Experimental, CIEA-IPN

³Departamento de Química, División de Ciencias Básicas e Ingeniería, UAM-I

Abstract

Lasalocid A (X-537A) is a monocarboxylic Ca^{2+} ionophore, also able to translocate mono- and trivalent cations across lipid membranes. This paper shows circular dichroism (CD) data indicating that polyether conformation is modified by cation valence and size, depending upon solvent hydrophobicity. Lasalocid acid forms either 1:1 complexes or oligomers with alkali metal cations. Na^+ complex and salt CD pose slight differences between them, dependent on carboxyl ionization. Lasalocid acid/cation ratios show bound-cation valence to polyether:cation stoichiometry correlation only with Na^+ (closed-loop monomer), Ca^{2+} ("sandwich" dimer) and Pr^{3+} (cryptand basket trimer). Results suggest oligomers with Li^+ (3:1 cryptand baskets), K^+ and Rb^+ (3:2 "Big Mac" "sandwiches"). In summary, flexibility of lasalocid A acid allows it to bind as required by each available cation. So, cation properties drive conformational changes along individual polyether functional moieties (*i.e.*, carboxyl polarization). This behavior is also influenced by environmental hydrophobicity and polarity.

Key words: lasalocid A . carboxylic polyether . carboxylic ionophore . ion complexes . circular dichroism

Introduction

Lasalocid A (X-537A) is a monocarboxylic polyether molecule (Figure 1) described as a Ca^{2+} mobile carrier in bilayer lipid membranes and water-lipid bulk-phase systems (1-6). Accordingly, this ionophore has been classified as a member of the divalent polyether antibiotics group (7).

Besides, lasalocid A polyether has been shown to bind and translocate alkali metal cations (1,2,6,8-10) and lanthanide trivalent cations (2,11-15). This former activity is synergistically enhanced when lasalocid A is associated to other carboxylic ionophores or fatty acids (16-19).

Upon this knowledge, ion transport and spectroscopic studies on lasalocid A-cation interaction have suggested the existence of some basic principles governing carrier catalyzed ion translocation: carboxylic ionophores complex cations predominantly in their anionic form (20); alkali metal cations form ionophore inclusion complexes (21); cations bind mainly to the carboxylic acid moiety of the ionophore (12,14,21); polyether:cation stoichiometries are a direct function of cation valence (7), and polyether-cation complex conformation depends on polyether ionization, metal ionic radius and solvent environment (8,22).

However, we have shown that carboxylic ionophores which form oligomers of variable stoichiometry when binding to alkali metal ions (23) may interact with metal cations regardless of ionic size or electronegativity (24). Furthermore, lasalocid A forms either monomers or oligomers

when binding lanthanide ions (11-13), despite their trivalent oxidation number and dependent, apparently, on cation size (15,22).

Hence, in this paper we describe conformational variations of lasalocid A acid as a function of cation size and valence, as well as environmental hydrophobicity and polarity, as reflected by circular dichroism (CD) and ultraviolet absorption (UV) spectral changes. Attention is focused on salicylic moiety $\pi \rightarrow \pi^*$ and $n \rightarrow \pi^*$ transitions.

Materials and Methods

Lasalocid A:cation stoichiometry

Lasalocid A sodium salt was purchased from Sigma Chem., Co. (Saint Louis, Mo.). Polyether-free acid was prepared as described by Yáñez, Alva, Hernández-Arana & Estrada-O. (to be published elsewhere). Ionophore-cation (alkali ions and Ca^{2+}) complexes were formed from the free acid and an excess of cation carbonate salts (Merck, analytical grade) as previously described (23,24). Praseodymium complex was formed by saturation with PrCl_3 (ICN, reagent).

Lasalocid A:cation stoichiometries were determined as polyether/metal ratios. Lithium and sodium cations were measured by flame spectrophotometry (Corning 410). Complex samples were directly dissolved in reagent grade absolute ethanol/deionized H_2O (Millipore Milli-Q) 90 % (v/v). Potassium and rubidium were also quantitated by flame

emission spectroscopy (PYE UNICAM SP192), but in ethanol/H₂O 80 % (v/v).

Prior to cation determination, lasalocid A-Ca²⁺ and lasalocid A-Pr³⁺ samples were microwave acid digested (25) with HNO₃ (Baker). Calcium measurements were carried out with the metallochromic indicator antipyrylazo III (ICN reagent) at pH 4.0 as described by Velázquez-Manzanares, Alva & Estrada-O. (to be published elsewhere). Praseodymium was quantitated with murexide, from Merck, (26) at pH 5.0. Samples were measured at 647 nm in a Carl Zeiss PM 6 spectrophotometer.

UV and circular dichroism spectra

After complex formation, lasalocid A acid-cation samples were dissolved in absolute ethanol (Merck, UVASOL) or n-hexane (Merck, UVASOL).

Electronic absorption UV spectra were taken in a Shimadzu 160 U spectrophotometer. Circular dichroism spectra, between 200 and 350 nm, were obtained in a Jasco J-500A spectropolarimeter calibrated with (+)-10-camphor sulphonic acid (27). Cells of 0.1 cm path length were used. CD data were expressed as molar ellipticity [θ] of lasalocid moiety. All these experiments were carried out at room temperature (25°C).

Results

Polyether/cation ratios

Table I shows lasalocid A acid/cation ratios as determined for complexes formed by chemical saturation. It can be seen that correlation between bound-cation valence and polyether:cation stoichiometry is a feature following the sequence Na^+ (monomer), Ca^{2+} (dimer) and Pr^{3+} (trimer).

Nevertheless, our current results suggest the aggregation of oligomers when lasalocid A acid binds monovalent alkali metal cations. A trimeric form of polyether per Li^+ ion is inferred from present experimental data. Meanwhile, K^+ and Rb^+ -which are the largest cations essayed- polyether/metal ratios express 3:2 stoichiometries.

Lasalocid A-cation complex electronic spectroscopy

Cation dependent UV absorption shifts were studied in absolute ethanol. Three main absorption bands were generally observed in the wavelength range studied: l_1 ca. 210 nm, l_2 ca. 245 nm and l_3 ca. 310 nm; l_1 was maxima for all cases (Table II). Three kinds of issues, with respect to lasalocid A-free acid, can be seen: First, extinction coefficient (ϵ) values suffer an abatement when lasalocid acid binds alkali cations, but sodium. Second, blue shifts of l_2 and l_3 absorption bands appear when alkali cations are present - l_2 shoulders are produced by shift of this $\pi \rightarrow \pi^*$ aromatic contribution band-; l_2 shifting contributes to increase l_1 extinction. Finally, red shifts of l_1 absorption band occur

with Ca^{2+} and Pr^{3+} cations. It is noteworthy that l_2 is neither shifted nor abated when lasalocid acid binds Ca^{2+} and Pr^{3+} and, therefore, does not contribute to l_1 absorptivity. From these results, it is clear that UV absorption intensity depends on lasalocid A-complex conformation.

Circular dichroic characteristics of lasalocid complexes

Optical activity of lasalocid A molecules exhibits three circular dichroism bands which correlate with l_1 , l_2 and l_3 UV electronic absorptions shown in Table II. Ethanolic solution of lasalocid A acid presents two negative bands, l_2 at 245 and l_3 at 292 nm. A positive ellipticity band (l_1) was resolved at 215 nm (Figure 2a). This positive dichroism apparently continues under 200 nm in both, ethanol and hexane solutions. Negative ellipticity of ethanolic lasalocid A is increased in presence of sodium. This enlargement is greater in Na^+ salt, where carboxylic moiety is dissociated; it is associated with a small red shift of l_3 . In addition, sodium cation causes l_1 positive band to reverse sign and become negative. When negative bands are compared, l_1 $[\theta]$ is proportionally larger than l_2 and l_3 in protonated sodium complex than in Na^+ salt.

Dissolution of lasalocid A acid in n-hexane provokes l_1 to blue shift and turn negative, together with a significant increase of negative l_2 , which becomes maximum (Figure 2b). On sodium samples, l_2 and l_3 peak magnitudes are

approximately twice greater in n-hexane than in ethanol, while $l_1 [\theta]$ is almost tenfolded in hydrophobic solution. Again, $l_1 [\theta]$ is larger in protonated Na^+ complex.

Lasalocid A- K^+ and lasalocid A- Rb^+ protonated complexes display CD wavelength behavior similar to that of Na^+ samples. Figure 2a shows that potassium complex produces circular dichroism bands at the same wavelengths than sodium complex. Likening, rubidium complex manifests an important blue shift of l_1 . Both, K^+ and Rb^+ complexes $[\theta]$ values in ethanol are greater than for lasalocid-sodium samples. These enlargements seem to be correlated with the raise in polyether:cation stoichiometric ratio. On the other hand, n-hexane enlarges $l_1 [\theta]$ values of potassium and rubidium lasalocid complexes, but does not modify l_2 and l_3 (Figure 2b).

Other cases of polyether agglomeration display cation and solvent dependent features. Lithium, calcium and praseodymium cations build up blue shifts at l_1 , l_2 and l_3 ethanolic lasalocid acid CD bands in a general sequence $\text{Pr}^{3+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Li}^+$ (Figure 3a). Absolute values of $[\theta]$ at l_3 are larger when polyvalent cations bind lasalocid acid. Lasalocid acid- Pr^{3+} interaction also increases l_1 positive ellipticity at 208 nm, while Li^+ and Ca^{2+} cations turn l_1 negative at 213 and 207 nm, respectively. However, lasalocid acid- Li^+ complex still shows positive ellipticity at 200 nm.

When these latter complexes are dissolved in n-hexane, their circular dichroism bands do not shift with respect to

lasalocid free acid (Figure 3b). Furthermore, $[\theta]$ values are abated. Larger ellipticities at l_2 and l_3 are obtained with Li^+ . Both, Li^+ and Ca^{2+} complexes spectra closely resemble that of lasalocid free acid. Pr^{3+} complex is slightly soluble in n-hexane, so CD data are not reliable.

Discussion

Variable oligomerism of lasalocid A-alkali cation complexes

The above results strongly suggest that lasalocid A acid may undergo conformational odd variations with features which are of great biological interest.

It has been widely known that lasalocid A is able to aggregate around metal cations (1,10-15,22). Although conformational variations have been blamed on cation valence (7) and size (15,22), lasalocid acid:cation stoichiometric values shown in Table I suggest that polyether oligomerization is not a direct function of this pair of periodic properties. Lasalocid A acid may form either 1:1 complexes (8) or oligomers when binding alkali metal cations.

Monomeric species appear to be head-to-tail closed-loops formations, stabilized by hydrogen bonds between hydroxyl and carboxyl terminal groups (8,10). Such conformational structures are consistent with rising of 245 nm $\pi \rightarrow \pi^*$ salicylate transition (21), caused either by sodium binding or non-polar solvent. The n-hexane induced reversion of free lasalocid A acid 215 nm Cotton effect,

which may be attributed to $n \rightarrow \pi^*$ transition of carboxyl group (28), confirms the polyether cyclization throughout head-to-tail H-bonding.

Sodium complex and Na^+ salt conformers closed-loops are tightened by non-polar solvent, and bring closer H-bonding distance between lasalocid termini; this late observation is in accordance with the strong negative Cotton effect exhibited at ca. 215 nm. Moreover, sodium complex and salt ellipticities pose slight differences between both specimens, dependent on carboxyl ionization. Besides, magnification of $l_3 [\theta]$, which is in part accounted for by $n \rightarrow \pi^*$ ketone transition, suggests a major contribution of carbonyl oxygen to closed-loop stabilization in lasalocid Na^+ salt.

Rise on l_1 and l_2 is also engendered on ethanolic lasalocid A acid solution by K^+ and Rb^+ , suggesting strong perturbation of carboxyl and aromatic salicylate groups in contrast to carbonyl moieties. The structural arrangement which best fits, is that in which ionophore closed-loops stack into 3:2 "Big Mac" like "sandwiches". This latter stoichiometric ratio vision seems to depend on the large ionic radii of the former complexed cations. The so called "sandwich" conformation has been previously described for Ca^{2+} complexes with cyclopeptide ionophores (29) as well as with lasalocid A (1), and it is validated for the latter, in this paper, as a 2:1 polyether:cation stoichiometry.

It is noteworthy that salicylic -COOH moiety differentially sways cation binding. This is inferred from analysis of $l_1 n \rightarrow \pi^*$ carboxyl transition, which also may arise from charge transfer contributions (30). The fact that $[\theta]$ of lasalocid acid l_1 band is severely reversed by K^+ and Rb^+ , together with UV blue shifts in ethanol, suggest that these ions induce polarization of the salicylic carboxyl group. The acquired configuration of each complex suffers no important modification by dissolution in non-polar hexane.

Lasalocid-lithium complex: an odd case

On the other hand, oligomers may aggregate into 3:1 complexes with Li^+ . CD behavior in ethanol suggests that lasalocid acid mainly binds lithium through carbonyl oxygen, being followed by oxygens from the salicylic moiety. It is assumed that conformation of lasalocid acid- Li^+ complex is significantly divergent from its alkali partners.

The small ionic radius of Li^+ effects a high hydration energy for this alkali cation, which induces a strong interaction with several oxygen atoms (31). In these terms, Li^+ impels lasalocid acid oxygens to surround the ionic perimeter, and gives rise to the high molecule:cation ratio observed. The model of this conformation depicts a cryptand basket arrangement, in which lithium itself stabilizes the former structure.

On the other hand, this interaction is slightly modified when the complex is dissolved in n-hexane, where

phenyl moiety concurs in a major part to cation binding, presumably through hydroxyl group. The extra inward pressure exerted by dissolution of lithium complex in non-polar hexane, seems to extrude the salicylic carboxyl moiety toward the solvent, and from the central bulk of the complex body.

Interaction of polyvalent cations with lasalocid A acid

The conformation of lasalocid A-Pr³⁺ complex has been subject of several studies. Polyether:cation stoichiometric ratios of 1:1 (13,22), 2:1 (11) and 3:1 (12) have been reported. Results shown in Table I support the trimeric form version. The structural image of lasalocid A-Pr³⁺ in ethanol is, in general, similar to that of lasalocid A-Li⁺ complex, say triarmed cryptand basket. Nevertheless, differences arise at the phenyl ring contribution. CD data in ethanol, together with complex unsolubility in n-hexane, broach that carboxyl moiety is exposed to the surroundings, and offers a slightly polar and hydrophilic exterior. Anyway, Pr³⁺ cation is wholly encapsulated, accounting for the noticed cation transport across lipid bilayers (2,11-15).

Finally, as mentioned above, lasalocid acid forms "single sandwich" complexes with Ca²⁺. When this latter complex is dissolved in ethanol, calcium ion appear to be mainly bound through ketone oxygen, followed by phenylic and carboxylic oxygens. On the other hand, Ca²⁺ does not modify in much lasalocid A closed-loop conformation in n-hexane.

Conclusion

In summary, it can be pointed out that structural flexibility of lasalocid A acid allows it to bind as required by each available cation. In this sense, cation properties drive conformational changes along individual polyether functional fractions (*i.e.*, carboxyl polarization). Further, this behavior is also influenced, in part, by environmental hydrophobicity and polarity.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. Ignacio Regla and Dr. Lourdes Castillo for technical assistance.

This work received financial support from DGICSA grants C89-01-0216, C90-01-0287 and C91-01-09-002-771.

References

1. H. Célis, S. Estrada-O. and M. Montal *J. Membr. Biol.* 18 (1974) 187.
2. S. Estrada-O., H. Célis, M.S. Fernández and M. Montal, in: *Calcium Binding Proteins*, eds. W. Drabikowski, H. Strzelecka-Golaszewska, E. Carafoli (PWN Polish Sci. Publ., Waraszawa and Elsevier Sci. Publ. Co., Amsterdam, 1974) p. 895.
3. D.H. Haynes and B.C. Pressman, *J. Membr. Biol.* 16 (1974) 195.

4. D.J. Patel and C. Shen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73 (1976) 1786.
5. C. Shen and D.J. Patel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73 (1976) 4277.
6. Y.N. Antonenko and L.S. Yaguzhinsky, *Biochim. Biophys. Acta* 938 (1988) 125.
7. R.W. Taylor, R.F. Kauffman and D.R. Pfeiffer, in: *Polyether Antibiotics*, ed. J.W. Westley (Marcel Dekker, Inc., New York, 1982) Vol. 1, p. 103.
8. S.R. Alpha and A.H. Brady, *J. Am. Chem. Soc.* 95 (1973) 7043.
9. H. Degani, H.L. Friedman, G. Navon and E.M. Kosower, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 431 (1973).
10. H. Degani and H.L. Friedman, *Biochemistry* 13 (1974) 5022.
11. M.S. Fernández, H. Célis and M. Montal, *Biochim. Biophys. Acta* 323 (1973) 600.
12. S.T. Chen and C.S. Springer, Jr. *Bioinorg. Chem.* 9 (1978) 101.
13. F.S. Richardson and A. Dasgupta, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1982) 5716.
14. G.W. Everett, S.B. Parker and R.J.P. Williams, *Biochemistry* 22 (1983) 6149.
15. B.P. Shastri, M.B. Sankaram and K.R.K. Easwaran, *Biochemistry* 26 (1987) 4925.
16. J. Grandjean and P. Laszlo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104 (1982) 1293.

17. J. Grandjean and P. Laszlo, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 1472.
18. J. Grandjean and P. Laszlo, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 3483.
19. J. Grandjean and P. Laszlo, *Biochimie* 71 (1989) 183.
20. B.C. Pressman and N.T. de Guzman, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 227 (1974) 380.
21. G. Painter and B.C. Pressman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97 (1980) 1268.
22. B.P. Shastri, M.B. Sankaram and K.R.K. Easwaran, *Biochemistry* 26 (1987) 4930.
23. M. Toro, E. Arzt, J. Cerbón, G. Alegría, R. Alva, Y. Meas and S. Estrada-O., *J. Membr. Biol.* 95 (1987) 1.
24. R. Alva, J.A. Lugo-R., E. Arzt, J. Cerbón, B.E. Rivera, M. Toro and S. Estrada-O., *J. Bioenerg. Biomembr.* 24 (1992) 125.
25. J. Alvarado, M. Márquez and L.E. León, *Anal. Lett.* 21 (1988) 357.
26. A. Scarpa, in: *Methods Enzymol.* ed. A. San Pietro (Academic Press, New York, 1972) vol. 24, p. 343.
27. J.P. Hennessey and W.C. Johnson, Jr., *Anal. Biochem.* 125 (1982) 177.
28. P. Crabbé, *ORD and CD in Chemistry and Biochemistry.* (Academic Press, New York, 1972).
29. V.T. Ivanov, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 264 (1975) 221.
30. . Harada and . Nakanishi, *J. Am. Chem. Soc.* 90 (1968) 7351.

31. F.A. Cotton and G. Wilkinson, *Advanced Inorganic Chemistry*, 2nd ed. (Interscience Publ., John Wiley & Sons, Inc., New York, 1966).
32. M.C. Day and J. Selbin, *Theoretical Inorganic Chemistry*, 2nd ed. (Van Norstrand Reinhold Co., New York, 1969).

Table I. Stoichiometric ratios of Lasalocid A acid-cation complexes formed by chemical saturation.

Complex	r_i (Å) ^a	polyether/cation ratio	stoichiometry
Li ⁺	0.60	3.049 ± 0.005	3:1
Na ⁺	0.95	1.304 ± 0.018	1:1
K ⁺	1.33	1.578 ± 0.217	3:2
Rb ⁺	1.48	1.431 ± 0.020	3:2
Ca ²⁺	0.99	2.330 ± 0.044	2:1
Pr ³⁺	1.18 ^b	3.000 ± 0.070	3:1

^aDay and Selbin, 1969 (32).

^bShannon, 1976 (cf. 22).

Table II. UV absorption values of lasalocid A acid-cation complexes in absolute ethanol, as compared with free acid and sodium salt^a.

Sample	λ_1	ϵ	λ_2	ϵ^b	λ_3	ϵ
Free acid	212	14534	247	5258	317	3486
Na ⁺ salt	213	15136	sh	4351	307	4351
Complexes						
Lithium	207	2610	sh	415	311	356
Sodium	214	15040	sh	4297	307	4297
Potassium	213	12337	sh	3341	305	3136
Rubidium	210	11984	sh	2537	308	2429
Calcium	219	11484	243	9102	311	6230
Praseodymium	215	21174	245	12373	311	5740

^aWavelength in nm; extinction coefficient (ϵ) in $M^{-1}cm^{-1}$.

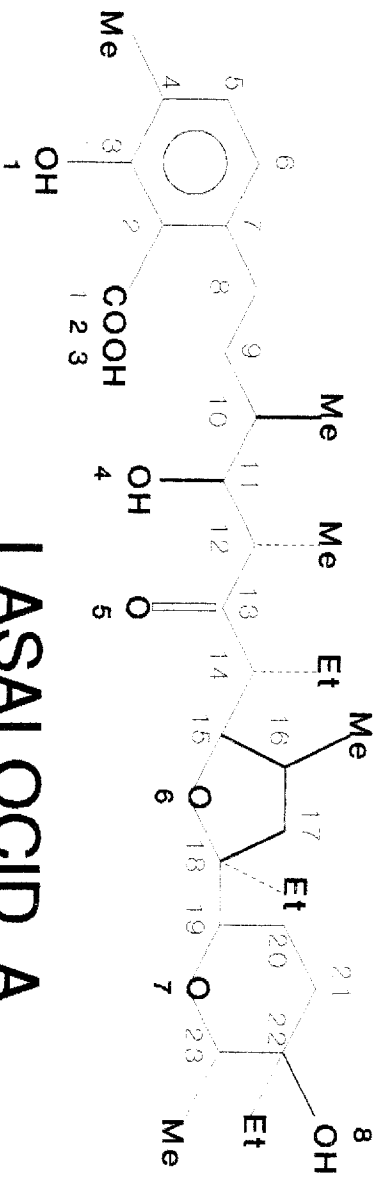
^bsh: shoulder extinction measured at 245 nm.

Figure Captions

Figure 1. Chemical formula of lasalocid A free acid. The numbering system follows that in Everett, Parker and Williams, 1983 (14).

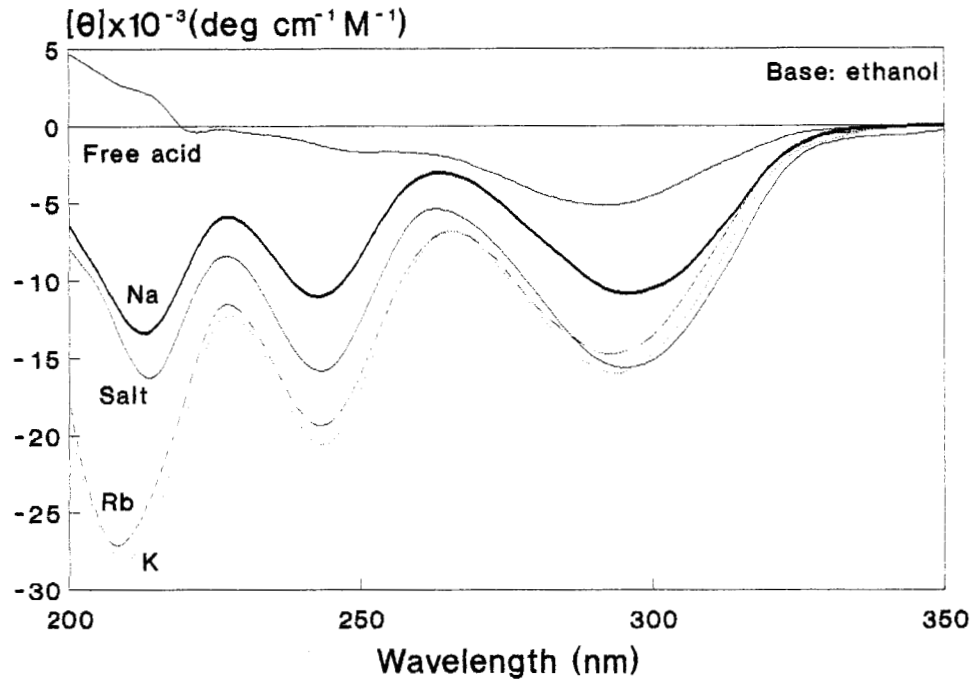
Figure 2. Lasalocid A-alkali cation samples CD spectra in ethanol (a) and n-hexane (b).

Figure 3. Lasalocid A oligomeric complexes (Li^+ , Ca^{2+} and Pr^{3+}) CD spectra in ethanol (a) and n-hexane (b).

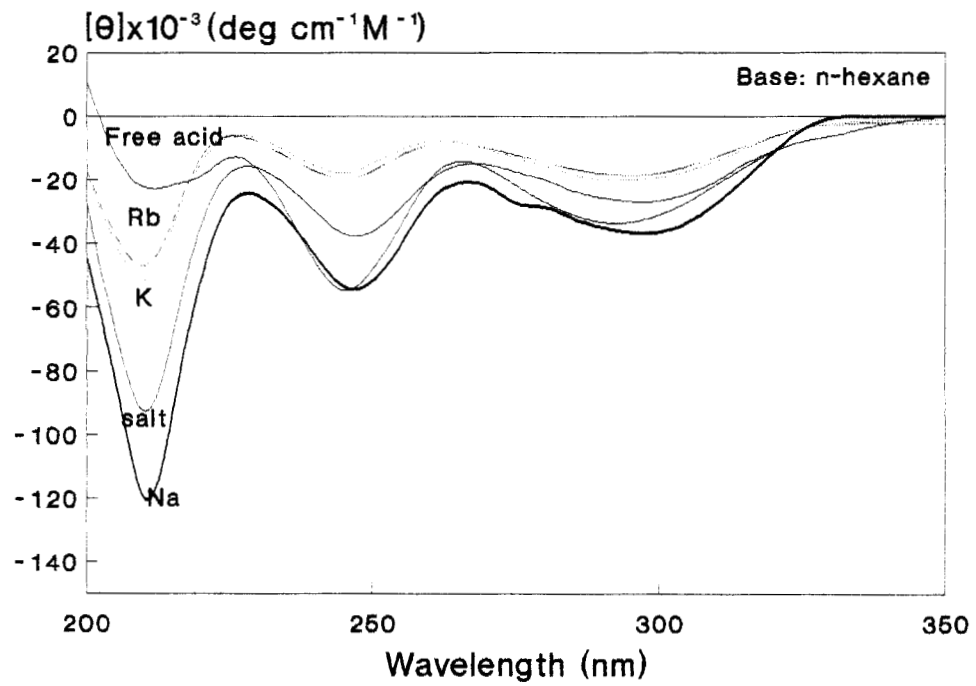


LASALOCID A

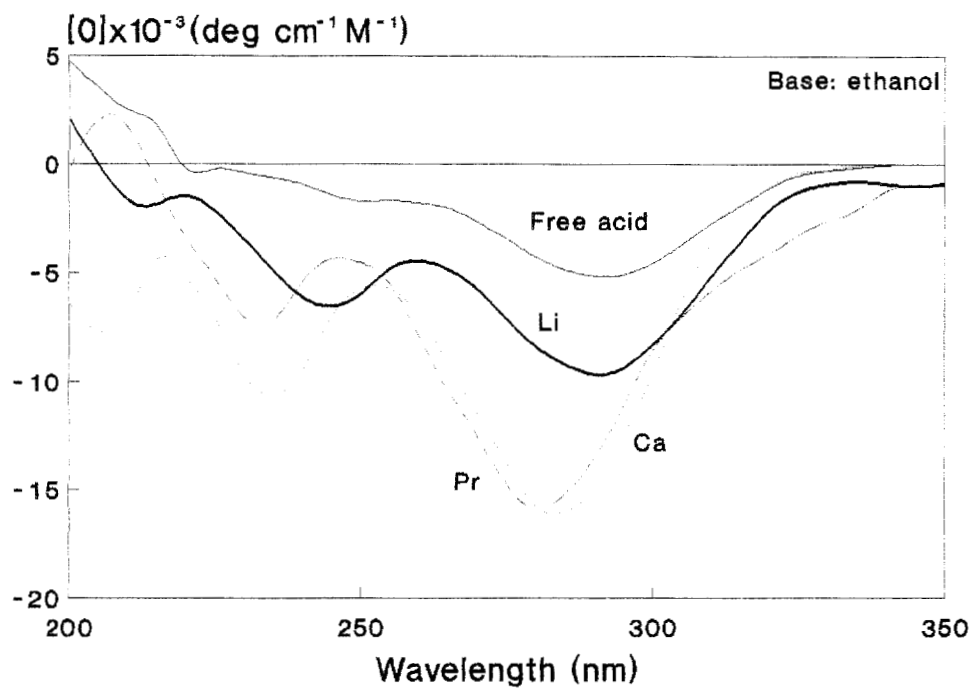
a)



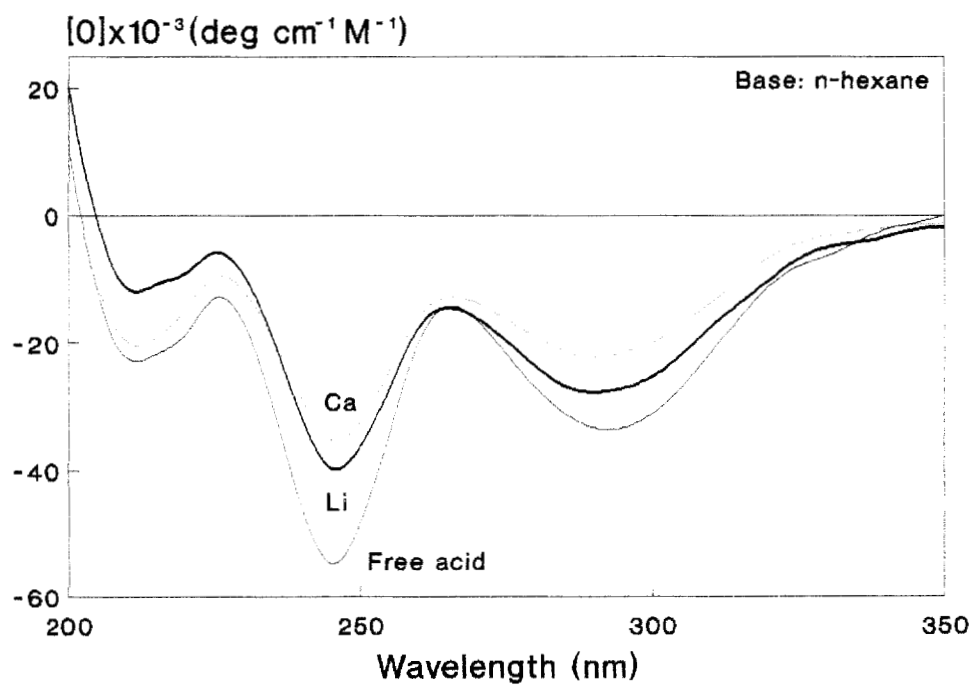
b)



a)



b)



El jurado designado por la División de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, aprobó esta Tesis a los tres días del mes agosto de mil novecientos noventa y cinco, en la Ciudad de México, Distrito Federal.

Dr. Andrés Hernández Arana.

Dr. Sergio Estrada Orihuela.

Dr. Antonio Campero Célis.

Dr. Antonio Peña Díaz.

Dr. Jose Manuel Francisco Lara Ochoa.