



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

EL MAGNESIO MODULA EL TRANSPORTE Y LOS EFECTOS
DEL POTASIO SOBRE EL METABOLISMO MITOCONDRIAL
DE LA LEVADURA.

TESIS QUE PRESENTA EL

Q.F.B.: ANDRES ROJAS HERNÁNDEZ

Para optar por el grado en

Maestro en Ciencias en Biología Experimental

Tutor

Dr. SALVADOR URIBE CARVAJAL

COMITÉ TUTORAL

Tutor

Dr. Salvador Uribe Carvajal
Instituto de Fisiología Celular
UNAM
suribe@ifisiol.unam.mx

Asesor Interno (Co-tutor)

M. en C. Mina Königsberg Fainstein
Depto. de Ciencias de la Salud
UAMI
mkf@xanum.uam.mx

Asesor Externo (Co-tutor)

M. en C. Vicente Castrejón Téllez
Instituto de Fisiología Celular
UNAM
vcastrej@ifisiol.unam.mx

CONTENIDO

	Páginas
Resumen	6
I. Introducción.	7
I.1 El potasio.	7
I.2 El magnesio.	12
I.3 Las mitocondrias de levadura.	20
II. Hipótesis.	26
III. Objetivos.	27
III.1 Objetivo General	27
III.2 Objetivos específicos.	27
IV. Materiales y métodos.	28
IV.1 Material biológico.	28
IV.2 Reactivos.	28
IV.3 Cultivo de células.	29
IV.4 Aislamiento de las mitocondrias.	29
IV.5 Cuantificación de las proteínas.	29
IV.6 Oximetría.	30
IV.7 Determinación del potencial de membrana.	30
IV.8 Síntesis de ATP.	30
IV.9 Hinchamiento mitocondrial.	31
IV.10 Captación de $^{86}\text{Rb}^+$	31
V. Resultados.	32
V.1 El Mg^{2+} modula los efectos del K^+ sobre la respiración mitocondrial.	32
V.2 El Mg^{2+} modula los efectos del K^+ sobre el potencial transmembranal de la mitocondria.	36
V.3 El efecto del Mg^{2+} sobre la síntesis de ATP.	38
V.4 El Mg^{2+} evita el hinchamiento mitocondrial provocado por el K^+	41
V.5 El Mg^{2+} inhibe la captación mitocondrial de $^{86}\text{Rb}^+$	43
VI. Discusión.	45
VII. Conclusiones.	51
VIII. Bibliografía.	52
IX. Anexos.	68

El trabajo experimental descrito en esta tesis se llevó a cabo en el departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. A.R.H. recibió una beca del CONACYT (N° 153003). Proyecto parcialmente financiado por el CONACYT: 400346-5-27568N.

Se agradece la asistencia técnica de Ramón Méndez Franco y de todos aquellos que colaboraron para la realización de esta tesis.

ABREVIATURAS

ADP	Adenosín difosfato
AMP _c	Adenosín monofosfato cíclico
ATP	Adenosín trifosfato
DCCD	Diciclohexilcarbodiimida
$\Delta\psi$	Potencial de membrana
DMF	Dimetilformamida
D.O.	Densidad óptica
D.S.	Desviación estándar
EGTA	Ácido etilenglicol.-acetoximetil-eter-tetraacético
FCCP	Carbonilcianuro de <i>p</i> -trifluorometoxifenilhidrazona
HEPES	Ácido N-(2-hidroxiethyl)piperacina-N-(2-etanol sulfónico)
K _m	Constante de Michaelis
K _{ATP}	Canal de potasio de pendiente de ATP
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanolsulfónico
n	Número de datos
NAD ⁺	Nicotinamida adenín dinucleótido
β -NADP	β -nicotinamin-adenín-dinucleótido fosfato
PM	Peso molecular
PTP	Poro de transición de la permeabilidad mitocondrial
Pi	Fosfato inorgánico
TEA	Trietanolamina
YMUC	Canal inespecífico de la mitocondria de levadura

RESUMEN

Se cuantificó la modulación ejercida por diferentes concentraciones de Mg^{2+} sobre los efectos desacoplantes del K^+ así como de su captación por la mitocondria de levadura. En la mitocondria de levadura el K^+ disminuye el potencial de membrana, acelera la respiración mitocondrial e inhibe parcialmente la síntesis de ATP. Esto se debe a su captación por sistemas específicos e inespecíficos. Los estudios se llevaron a cabo en presencia de fosfato (P_i) 0.4 o 4.0 mM para así mantener el canal inespecífico mitocondrial de la levadura (YMUC) en estado abierto o cerrado, respectivamente. En presencia de P_i 4.0 mM y K^+ 40 mM, la mitocondria se mantuvo en estado acoplado y el Mg^{2+} tuvo un efecto ligeramente desacoplante, disminuyendo el control respiratorio y el potencial transmembranal. Por otro lado, no se observaron efectos del Mg^{2+} sobre la síntesis de ATP. En presencia de P_i 0.4 mM y K^+ 40 mM, se observó desacoplamiento, mientras que el Mg^{2+} tuvo un efecto acoplante, elevando el control respiratorio y el potencial de membrana. Con respecto al mecanismo de acción del Mg^{2+} , se observó que en presencia de P_i 0.4 mM, y Mg^{2+} 2.0 mM o mayor, se inhibió el hinchamiento producido por la captación de K^+ y se inhibió la captación de $^{86}Rb^+$. Se sugiere que el Mg^{2+} regula los efectos del K^+ sobre la fosforilación oxidativa mediante la inhibición de su captación.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 EL POTASIO.

En mitocondrias aisladas tanto de hígado como de corazón de mamífero, el K^+ se encuentra en la matriz mitocondrial a una concentración de 100-120 nmolas por mg de proteína, lo que equivale aproximadamente a una concentración de K^+ 100 mM (Sorgo y cols., 1985). Además, se considera que *in situ* la concentración de K^+ en la matriz mitocondrial es de 180 mM (Garlid, 1998), es por esto que el K^+ es el catión más abundante en la mitocondria.

En las mitocondrias la acumulación de K^+ disminuye cuando se inhibe la respiración, por lo que se considera que su transporte y eventual acumulación son dependientes de energía. (Diwan y Tedeschi, 1975; Diwan y cols., 1979; Skulskii y cols., 1983). La principal contribución a la energía necesaria para la acumulación de K^+ es el potencial transmembranal negativo interno, ya que las cargas negativas atraen la carga positiva del K^+ (Garlid, 1998).

Transporte de potasio

El K^+ entra a la mitocondria por medio de un uniportador electroforético, energizado por el potencial de membrana (Jung y cols., 1977). La salida de K^+ de la mitocondria se lleva a cabo por medio de un antiportador K^+/H^+ dependiente del gradiente de pH (Chávez y cols., 1977; Mitchell y Moyle, 1969).

Captación del Potasio

La captación de K^+ en presencia de un potencial transmembranal elevado presenta una cinética michaeliana con respecto a la concentración de K^+ externo. La K_m para la captación de K^+ en mitocondrias aisladas de hígado rata es de 5 mM (Diwan y Lehrer, 1978), mientras que la captación de K^+ en mitocondrias aisladas de corazón, exhibe una K_m de aproximadamente 12 mM (Jung y cols., et al 1977). Dicha captación es inhibida de manera competitiva por Tl^+ (Diwan y Lehrer, 1977), por Mg^{2+} (Jung y cols., 1977; Diwan y cols., 1979), y de manera no competitiva por Ba^{2+} (Diwan, 1985). El Ba^{2+} ejerce su efecto inhibitorio desde el lado de la matriz mitocondrial (Diwan, 1985). La captación de K^+ , es activada por la presencia de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial (Halestrap y cols., 1986), y se inhibe por la presencia de Ca^{2+} en el medio extramitocondrial (Brierley, 1983; Jung y Brierley, 1979). Es decir, en mitocondrias de mamífero existe una interacción importante entre los cationes divalentes y el transporte de K^+ . La quinina, un catión orgánico, también inhibe parcialmente la captación de K^+ (Diwan, 1986).

En mitocondrias de corazón de res y en presencia de un alto potencial de membrana, el Pi fomenta la entrada de K^+ . El K^+ se puede acumular como la sal de fosfato, debido a la acumulación del Pi en la matriz que resulta del intercambio de OH^- por Pi. (Jung y cols., 1977; Diwan y Lehrer, 1978). En ausencia de Pi en el medio, la captación de K^+ aumenta al alcalinizar el medio.

La captación de K^+ se inhibe en presencia de ADP y Pi, probablemente por la disminución del potencial de membrana que se utiliza para sintetizar ATP (Jung y cols., 1977). El movimiento transmembranal de K^+ generado durante el intercambio electrogénico ADP/ATP (LaNoue y cols., 1978), sugiere que el translocador de adenín nucleótidos está involucrado en el transporte de K^+ . Sin embargo, existen datos en contra de

esta idea, ya que se ha reportado que en presencia de atractilósido, que es (un inhibidor del translocador de adenín-nucleótidos), aún se observa captación de K^+ (Diwan y *cols.*, 1983).

*Con respecto a las proteínas que participan en el transporte de K^+ mitocondrial, se ha reportado que en mitocondrias activas; diversos compuestos que reaccionan con grupos sulfhidrilo como el mersalil, estimulan la entrada de K^+ (Brierley y *cols.*, 1971; Brierley y *cols.*, 1968; Sanadi y *cols.*, 1981). En cambio, los compuestos que reaccionan con grupos carboxilo, como el DCCD, inhiben la entrada de K^+ (Gauthier y Diwan, 1979; Jung, 1980). Este efecto sólo se observa a altas concentraciones de DCCD (Jung, 1980). El efecto inhibitorio del DCCD sobre la captación de K^+ es menor cuando la concentración de K^+ externo es alta (Jung, 1980).

Los esfuerzos por identificar un posible uniportador de K^+ llevaron a la purificación de una proteína de 53 kDa proveniente de mitocondrias aisladas de hígado de rata (Diwan, 1987). La reconstitución de la proteína de 53 kDa en vesículas lipídicas resultó en la captación de K^+ (Diwan, 1988).

Salida del potasio

La expulsión de K^+ de la matriz también es dependiente de la respiración mitocondrial. Las mitocondrias expulsan potasio a través de un antiportador K^+/H^+ el cual parece estar regulado por la concentración de Mg^{2+} en la matriz mitocondrial (Martin y *cols.*, 1984, Nakashima y *cols.*, 1982). La salida de K^+ se estimula por compuestos, como mersalil y óxido de fenilarsénico (Singh y Nicholls, 1984; Diwan y *cols.*, 1986; Novogorodov, 1987). La concentración de Mg^{2+} en las mitocondrias tratadas con el ionóforo de cationes divalentes A23187, contrarresta el efecto del antiportador K^+/H^+ (Martin y *cols.*, 1984; Brierley y *cols.*, 1984; Garlid, 1986). La quinina inhibe el

antiportador K^+/H^+ (Diwan, 1986), mientras que el DCCD actúa como inhibidor solamente si la concentración de Mg^{2+} en la matriz mitocondrial se encuentra disminuida (Martin y cols., 1984).

En mitocondrias aisladas de hígado y de corazón de rata, se identificó el antiportador K^+/H^+ como una proteína de 82 kDa (Martin y cols., 1984, Martin y cols., 1986). Esta proteína se reconstituyó en vesículas lipídicas y se observó que cataliza el transporte de $^{86}Rb^+$. De manera similar a lo que ocurre con el antiportador cuando aún se encuentra en la mitocondria, el transporte reconstituido en el liposoma es inhibido por Mg^{2+} , por quinina, y por DCCD (Diwan, 1987).

El ciclo mitocondrial del potasio.

El ciclo mitocondrial del K^+ consiste en 1) la captación electroforética de K^+ a través del uniportador y 2) la salida electroneutra de K^+ a cambio de un protón a través del antiportador (descritos arriba). Ambas proteínas transportadoras están insertas en la membrana interna de la mitocondria, por lo que el ciclo del potasio ocurre entre la matriz y el espacio intermembranal. El transporte de K^+ puede ser acompañado por aniones que son los contra-iones que dotan de electroneutralidad al proceso. Cuando existe un desequilibrio en la entrada y en la salida de K^+ en la matriz se observa un cambio en el volumen mitocondrial. Esto es el resultado del desplazamiento del agua, que también cruza la membrana (Garlid, 1998).

Para mantener la fuerza protón-motriz durante la respiración, la mitocondria, debe regular estrictamente el transporte de K^+ , pues de otra forma la captación de K^+ abate el potencial eléctrico transmembranal, mientras que la salida abatiría el gradiente de pH. Bajo condiciones adecuadas de este ciclo, se ha propuesto que *in vivo* la principal función de la

captación de K^+ es la de regular el volumen de la matriz mitocondrial (Garlid, 1988). En este sentido, el antiportador K^+/H^+ es regulado por los cambios de volumen provocados por el movimiento del K^+ . Los cambios de volumen, a su vez, modulan la unión reversible tanto de Mg^{2+} como de H^+ , a la región del antiportador que está expuesto hacia la matriz mitocondrial.

Actualmente, se ha propuesto que el uniportador de K^+ es un canal que se cierra en presencia de ATP por lo que se le ha denominado canal mitocondrial K_{ATP} . El canal mitocondrial K_{ATP} al igual que el antiportador K^+/H^+ , participa en la regulación del ciclo del potasio y por lo tanto en la regulación del volumen mitocondrial (Garlid, 1998). Se ha propuesto que el canal K_{ATP} mitocondrial juega el papel central en el control de la actividad del transporte de electrones y en la estimulación de la oxidación de los ácidos grasos (Garlid, 1996). Estos efectos ocurren porque, al aumentar el volumen de la matriz mitocondrial, se estimula el transporte de electrones, con un fuerte efecto sobre la oxidación de los ácidos grasos; en contraste, cuando la mitocondria se contrae los sustratos se oxidan lentamente. La activación del transporte de electrones dependiente del volumen de la matriz mitocondrial, esto se ha reportado en mitocondrias aisladas de hígado, de corazón, y de grasa parda de mamífero (Halestrap, 1989).

Se ha sugerido que el canal K_{ATP} mitocondrial se parece a los canales K_{ATP} de la membrana plasmática de las células beta del páncreas que son complejos heteromultiméricos constituidos por un canal rectificador entrante de K^+ y un receptor a sulfonilurea(). Hasta ahora, en las mitocondrias se han identificado dos proteínas, una de 55 kDa y otra de 63 kDa que probablemente son los equivalentes del canal rectificador entrante de K^+ y del receptor de sulfonilurea respectivamente. Se piensa que el canal K_{ATP}

mitocondrial pertenece a la misma familia genética de los canales K_{ATP} de las células beta de páncreas (Garlid, 1998).

*El canal K_{ATP} mitocondrial es inhibido con alta afinidad por ATP, ésteres de acetil-Coenzima-A, y glibenclamida. El canal K_{ATP} mitocondrial inhibido es reactivado con alta afinidad por nucleótidos de guanina y por los inductores de los canales de K^+ como son cromakalina y diazóxido (Garlid, 1998).

Independientemente de su papel como regulador del metabolismo mitocondrial, se ha postulado que el canal K_{ATP} mitocondrial puede actuar como un cardioprotector ya que su activación promueve la supervivencia de los cardiomiocitos en experimentos en que se genera isquemia cardiaca. Los canales cardíacos K_{ATP} mitocondriales se pueden diferenciar de los canales K_{ATP} de membrana plasmática porque los primeros son 2000 veces más sensibles a diazóxido (Garlid y cols., 1996b).

I.2 EL MAGNESIO.

El magnesio es el segundo catión más abundante en las células de mamífero. En la célula, este catión es indispensable para un gran número de reacciones y funciones tales como: 1) la activación de enzimas, sea por interacción directa o mediante formación de complejos con sustratos; 2) el mantenimiento de la conformación de los ácidos nucleicos y de las proteínas; 3) la regulación de canales, receptores, y moléculas de señalamiento intracelular; y 4) la modulación de la fotosíntesis, la fosforilación oxidativa, la contracción muscular y la excitabilidad nerviosa. Se ha demostrado que el Mg^{2+} es indispensable para el crecimiento celular y para el control del ciclo celular (Walker, 1986; Maguire, 1988). A pesar de lo anterior, poco se sabe de la homeostasis celular del Mg^{2+} y su control (Romani y Scarpa, 1992).

La mitocondria es el principal almacén intracelular de Mg^{2+} (Bogucka y Wojtczak, 1971; George y Heaton, 1975; Gunther, 1986). En mitocondrias aisladas de hígado y de corazón de rata hay de 20 a 30 nmolas de Mg^{2+}/mg prot (Polimeni y Page, 1973; Akerman, 1981) y en mitocondria de músculo liso de bovino es de 70 nmolas de Mg^{2+}/mg prot (Sloane y cols, 1978). El Mg^{2+} se encuentra distribuido en los diferentes compartimentos mitocondriales como sigue: 41% en la matriz mitocondrial, 50% en el espacio intermembranal, 4% en la membrana externa y 5% en la membrana interna (Bogucka y Wojtczak, 1971; Gunther, 1986).

La concentración de Mg^{2+} en la célula se mantiene dentro de estrechos límites a pesar de los amplios cambios de concentración de Mg^{2+} en el medio extracelular bajo condiciones experimentales. Esto implica la existencia de un sistema de almacenamiento que está coordinado con el transporte de Mg^{2+} (Flatman, 1984).

Química y transporte del Mg^{2+}

El Mg^{2+} es un ion pequeño que tiene una alta densidad de carga en su superficie, lo que resulta en un gran volumen de hidratación. El Mg^{2+} coordina 6 oxígenos del agua para obtener su forma estable que es $Mg(H_2O)_6^{2+}$, lo que representa un problema para su transporte transmembranal. El Mg^{2+} hidratado posee un volumen que fluctúa de 350 a 400 veces el de los iones hidratados de Ca^{2+} , Na^+ o K^+ (Maguire, 1993). El magnesio hidratado puede moverse rápidamente a través de canales grandes, tales como el PTP cuyo diámetro es de 2-3 nm. Sin embargo, para que pueda pasar a través de un canal pequeño o interactuar con un acarreador móvil, el magnesio necesita reemplazar sus moléculas de agua por los grupos funcionales del transportador. El lento intercambio entre las moléculas de agua del

ion hidratado por los grupos funcionales del transportador, es el factor limitante que controla el transporte del Mg^{2+} a través de la membrana (Williams, 1993). Este proceso puede tener como consecuencia un movimiento lento del Mg^{2+} , que puede inhibir el flujo de otros iones a través de su transportador determinado (Flatman, 1993).

Captación de Mg^{2+} por mitocondrias de diferentes tejidos.

Captación de Mg^{2+} en mitocondrias de corazón

La acumulación de Mg^{2+} ocurre en mitocondrias de corazón incubadas en sacarosa, fosfato, y una alta concentración de Mg^{2+} (Brierley y cols., 1963; Jung y Brierley., 1994). La acumulación requiere de un alto potencial de membrana mitocondrial y es sensible a desacoplantes, pero no a oligomicina. La acumulación de Mg^{2+} disminuye en presencia de ADP, probablemente al disminuir el potencial transmembranal al inicio de la fosforilación oxidativa (Brierley y cols., 1963).

Aún no está claro si existe un sistema uniportador específico para la acumulación de Mg^{2+} , pero su acumulación en mitocondrias de corazón no es inhibida por rojo de rutenio, por lo que el Mg^{2+} probablemente no entra a la mitocondria a través del uniportador de Ca^{2+} (Crompton y cols., 1976).

Es posible que en la mitocondria la acumulación de Mg^{2+} ocurra por difusión, en respuesta al incremento del potencial de membrana. La acumulación de Mg^{2+} es precedida por la unión del catión a sitios de la superficie de la membrana en un medio no iónico (Schuster y Olson, 1974; Brierley y cols., 1987), de tal manera que al aumentar el potencial de membrana, el Mg^{2+} se mueve a través de la membrana. Tanto la unión del Mg^{2+} a la

membrana, como su acumulación en la mitocondria, son inhibidas por K^+ y otros cationes monovalentes (Brierley y cols., 1963; 1987).

La acumulación de Mg^{2+} no se inhibe por diltiazem, se inhibe parcialmente por DCCD o por Ba^{2+} . El Zn^{2+} , el Cd^{2+} y el Hg^{2+} ; activan la captación de Mg^{2+} y al parecer incrementan la permeabilidad inespecífica de la membrana (Brierley y cols., 1967). Los sistemas de transporte mitocondrial, tanto de la captación como de la salida de K^+ y de Mg^{2+} , son muy similares en cuanto a sus perfiles de inhibición y de activación (Diwan, 1987).

Captación de Mg^{2+} en mitocondrias de hígado

En mitocondrias de hígado de rata, la acumulación de Mg^{2+} depende de la respiración mitocondrial, pero es relativamente menor a la observada en mitocondrias de corazón (Diwan, 1987). En mitocondrias de hígado de rata, el transporte de Mg^{2+} se ha medido con el isótopo radiactivo $^{28}Mg^{2+}$ y se ha demostrado que tanto la captación como la salida de Mg^{2+} es dependiente del potencial de membrana (Diwan y cols., 1979). La captación de Mg^{2+} presenta una cinética michaeliana con una K_m de 0.7 mM y una velocidad máxima de 0.9 nmol Mg^{2+} /mg prot/min. La captación de Mg^{2+} es inhibida por Tl^+ (Diwan y cols., 1979) y es estimulada por la hormona paratiroidea (Johnson y Pressman., 1969).

Salida de Mg^{2+} en mitocondrias de corazón.

En mitocondrias aisladas de corazón de rata, la velocidad de la salida de Mg^{2+} es de aproximadamente de 1 a 2 nmolas de Mg^{2+} (mg prot.min)⁻¹ (Crompton y cols., 1976; Akerman, 1981) y se inhibe al aumentar la concentración de Mg^{2+} en el medio. Cuando la concentración de Mg^{2+} en el medio es de 2.5 mM no hay movimiento neto de Mg^{2+} en la

mitocondria. La salida de Mg^{2+} es dependiente de energía y se inhibe en presencia de inhibidores de la cadena respiratoria ó de desacoplantes. (Crompton y cols., 1976). La salida puede ser estimulada por fosfato ó por oligomicina (Crompton y cols., 1976).

Con respecto al papel que juega el ADP en la salida de Mg^{2+} , los datos encontrados en la literatura son contradictorios. Se ha reportado que la salida de Mg^{2+} es inhibida por ADP en presencia o en ausencia de fosfato (Brierley y cols., 1987), mientras que en otros estudios se ha reportado que esta salida de Mg^{2+} es independientemente de fosfato. Se ha demostrado además que la salida de Mg^{2+} provocada por ADP es sensible a inhibidores del translocador de adenín-nucleótidos como el ácido bongcréquico y el atractilosido (Romani y cols., 1991).

El ADP es un potente inhibidor de la salida de Mg^{2+} y su efecto puede ser prevenido por fosfato. Durante la fosforilación oxidativa, la salida de Mg^{2+} puede ocurrir sólo en presencia de fosfato en la matriz mitocondrial (Crompton y cols., 1976). La salida de Mg^{2+} coincide con la transición que sufre la mitocondria al pasar del estado IV al estado III de la respiración mitocondrial, lo cual correlaciona con la disminución de ATP y el aumento de ADP en la matriz (Masini y cols., 1981; 1982; 1983.).

El Mg^{2+} que sale de la mitocondria es un 30-40% del total de Mg^{2+} mitocondrial y se ha observado que existe una mayor salida de Mg^{2+} cuando la concentración de externa de Mg^{2+} es menor a 2.5 mM. Al aumentar la concentración de Mg^{2+} externo se observa una disminución de la salida de Mg^{2+} endógeno y eventualmente se observa captación (Crompton y cols., 1976). La valinomicina estimula la salida de Mg^{2+} mientras que la nigericina, la previene. Estas evidencias sugieren que la salida de Mg^{2+} depende del gradiente de pH (Akerman, 1981) y que esta podría ocurrir a través del antiportador K^+/H^+ (Diwan, 1987; Brierley y cols., 1988).

Salida de Mg^{2+} en mitocondrias de hígado.

En mitocondrias aisladas de hígado de rata, en medio libre de Mg^{2+} y en presencia de fosfato, la velocidad de salida de Mg^{2+} es de 1 a 2 nmol Mg^{2+} /mg prot/min y es bloqueada por antimicina A y por FCCP (Zoccarato y cols., 1981). A diferencia de lo que sucede en las mitocondrias de corazón o de músculo liso (Sloane y cols., 1978), la salida de Mg^{2+} de mitocondrias de hígado de rata es bloqueada por rojo de Rutenio, Lantano ó EGTA, sugiriendo la existencia de una relación con el sistema de transporte de Ca^{2+} (Zoccarato y cols., 1981). Esto puede deberse a los efectos que tiene el Ca^{2+} sobre el poro de transición de la permeabilidad (PTP) (Gunter y Pfeiffer, 1990). Hay evidencias de que el PTP puede operar en mitocondrias *in situ* (Altschuld y cols., 1992), por lo que podría constituir una vía de equilibrio para el Mg^{2+} y el K^+ entre la matriz mitocondrial y el citosol (Gunter y Pfeiffer, 1990).

La salida de Mg^{2+} es inhibida por Mg^{2+} exógeno, por ADP y por ácido bongcréuico. Este último previene la pérdida de ADP de la mitocondria. En mitocondrias aisladas de hígado de rata, la salida de Mg^{2+} y de adenín-nucleótidos ocurre simultáneamente, por lo que se ha propuesto que comparten un mecanismo de transporte común (Zocarato y cols., 1981), cuya actividad puede modificarse por estímulos extramitocondriales (Flatman, 1984; Romani y Scarpa., 1992). La presencia de AMP cíclico tanto en células íntegras como en hepatocitos permeabilizados y en mitocondrias aisladas de hígado de rata induce la salida de Mg^{2+} (Romani y cols., 1991). La salida de Mg^{2+} provocada por AMP cíclico, es muy semejante a la salida de Mg^{2+} provocada por el translocador de adenín-nucleótidos (Romani y cols., 1991).

Se ha propuesto que el antiportador ATP/Pi transporta en realidad $Mg^{2+}ATP^{4-}$ y esto puede constituir una vía alterna para la acumulación de Mg^{2+} (Aprille, 1993). Esta vía de transporte de Mg^{2+} se caracteriza por ser: electroneutra, reversible, energizada por el gradiente de sustratos y activada por Ca^{2+} . El Mg^{2+} puede estar involucrado en la modulación del contenido de adenín nucleótidos en respuesta a estímulos hormonales. Este transporte es específico y se cree que es diferente al transportador de adenín nucleótidos porque no es inhibido por atractilósido, pero sí por trifluoperazina (Aprille, 1993; Nosek y cols., 1990). El antiportador Mg-ATP/Pi puede cambiar la dirección de su funcionamiento dependiendo de las concentraciones tanto de Mg-ATP como de fosfato presentes dentro y fuera de la mitocondria. Así, en presencia de altas concentraciones de Mg-ATP en la matriz mitocondrial y de fosfato en el exterior, se favorece la salida de Mg-ATP (Jung y cols., 1990; Rutter y cols., 1990; Romani y cols., 1991).

Diferencias entre los sistemas de transporte de Mg^{2+} y de Ca^{2+} .

La mitocondria tiene diferentes sistemas de transporte para Ca^{2+} y para Mg^{2+} , ya que el rojo de rutenio y diltiazem, que son inhibidores del transporte de Ca^{2+} , no afectan al transporte de Mg^{2+} (Brierley y cols., 1987). Aún el Lantano, que es otro inhibidor del transporte de Ca^{2+} , tiene poco efecto sobre la entrada de Mg^{2+} (Kun, 1976; Diwan y cols., 1979). La relación entre la cantidad de Mg^{2+} transportado y la velocidad de respiración, la cinética del transporte y los efectos de N-etilmaleimida sobre su transporte sugieren que el Mg^{2+} entra por una ruta diferente al Ca^{2+} (Carafoli y cols., 1964; Diwan y cols., 1979). En hepatocitos y en miocitos cardíacos incubados en un medio con una baja concentración de Mg^{2+} y una alta concentración de Ca^{2+} , la activación de la proteína cinasa C con carbacol induce la captación de Mg^{2+} pero no de Ca^{2+} . Esto sugiere la existencia de un sistema de

transporte de Mg^{2+} de alta afinidad regulado hormonalmente (Romani y cols., 1993ab). En este sentido, se ha observado un incremento en el Mg^{2+} citoplásmico de hepatocitos de ratas inyectadas con glucagón o vasopresina (Bond y cols., 1987). Se ha observado que el AMPc induce la salida de Mg^{2+} de la mitocondria. Se ha propuesto que el AMPc reacciona con el translocador de adenín-nucleótidos, cambiando la especificidad del translocador por sus sustratos, permitiendo la salida del complejo Mg-ATP de la mitocondria (Romani y cols., 1991). El AMPc se une al translocador de adenín-nucleótidos con una Km de 40 nM. En presencia de atractilosido se inhibe la salida de Mg^{2+} sin afectar la unión de AMPc al translocador de adenín-nucleótidos (Romani y cols., 1991).

El Magnesio regula el metabolismo.

En la mayoría de las células, la concentración de Mg^{2+} en el citosol y en la matriz mitocondrial, se encuentra entre 0.5 y 1 mM. Se considera que más de 350 enzimas son reguladas por estas concentraciones de Mg^{2+} (Romani y Scarpa, 2000).

El Mg^{2+} regula el volumen mitocondrial a través de la modulación de los movimientos de K^+ , controlando la actividad tanto del uniportador de K^+ como del antiportador K^+/H^+ (Garlid, 1980). Cuando aumenta el volumen de la matriz mitocondrial, la concentración de Mg^{2+} en la matriz disminuye por efecto de la dilución. Al disminuir el Mg^{2+} , el antiportador se activa sacando al ión K^+ y generando contracción osmótica; así, el volumen disminuye y la concentración de Mg^{2+} se incrementa inhibiendo la salida de K^+ (Jung y cols., 1990).

Hay varios ejemplos de cómo el Mg^{2+} es capaz de regular la actividad de enzimas específicas en diversos compartimentos celulares. La pirofosfatasa mitocondrial es regulada por el Mg^{2+} , que revierte competitivamente la inhibición por Ca^{2+} (Rutter y cols., 1990;

Uribe y cols., 1993). En la matriz mitocondrial, el Mg^{2+} previene la activación por Ca^{2+} de la NAD^+ -isocitrato deshidrogenasa, e inhibe al complejo de la piruvato deshidrogenasa y a la α -cetoglutarato deshidrogenasa (Rutter y cols., 1990).

I.3 LAS MITOCONDRIAS DE LEVADURA

Las mitocondrias de levadura estructuralmente son muy parecidas a las mitocondrias de mamífero, sin embargo existen algunas diferencias. Entre las diferencias más notables, está la ausencia de complejo respiratorio I, que es sustituido por dos NADH deshidrogenasas monoméricas: una orientada hacia la cara externa y otra hacia la cara interna de la misma membrana interna mitocondrial, estas deshidrogenasas no son sensibles a rotenona y no bombean protones. (De Vries y Marres 1987). La NADH deshidrogenasa interna toma electrones de la matriz mitocondrial y es sensible a cationes como K^+ , Na^+ , Rb^+ entre otros (Uribe y cols., 1991). Por otro lado, la NADH deshidrogenasa externa toma electrones a partir del NADH producido en la glicólisis y no es sensible a cationes. El K^+ y el Ca^{2+} afectan el metabolismo mitocondrial de la levadura (Uribe y cols., 1991; Uribe y cols., 1992, Uribe y cols., 1993), de tal forma que en mitocondrias aisladas de *Saccharomyces cerevisiae* y en presencia de etanol ó NADH, el K^+ y el Na^+ incrementan la velocidad de consumo de oxígeno en estado III y en estado desacoplado (Uribe y cols., 1991). Tanto el Na^+ como el K^+ estimulan la síntesis de ATP de manera similar, sin embargo; en la hidrólisis de ATP el K^+ es más efectivo que el Na^+ , esto sugiere que pueden haber diferentes sitios involucrados en el control de cada proceso (Uribe y cols., 1991). La NADH deshidrogenasa interna aislada de levadura aumenta su actividad en presencia de K^+ y Na^+ sin afectar su K_m (Castrejón y cols., Mandado a Consideración). En este caso la

afinidad de la enzima por el Na^+ es mayor que por el K^+ , pero ambos cationes afectan de igual manera la V_{max} (Armas y *Cols.*, 2000). La concentración de Ca^{2+} en el citosol es modificada por varios órdenes de magnitud dependiendo del calcio celular en la levadura, esto resulta en el flujo de diferentes cationes incluyendo de manera importante al K^+ . Se han identificado varias enzimas mitocondriales las cuales responden a estas modificaciones en la concentración de Ca^{2+} , siendo unas de las más importantes la NADH deshidrogenasa interna y la pirofosfatasa (Uribe y *cols.*, 1992; Uribe y *cols.*, 1993). El aumento en la concentración de Ca^{2+} en la mitocondria de levadura, activa a la primera enzima e inhibe a la segunda enzima de tal manera que la pirofosfatasa II (o mitocondrial) de *Saccharomyces cerevisiae*, requiere de Mg^{2+} para su activación, mientras que el Ca^{2+} inhibe su actividad compitiendo con el Mg^{2+} por el pirofosfato siendo la constante de disociación magnesio-pirofosfato de $50 \mu\text{M}$ y la constante de disociación calcio-pirofosfato de $1.9 \mu\text{M}$ (Uribe y *cols.*, 1993). La NADH deshidrogenasa controla el catabolismo celular y la pirofosfatasa controla las reacciones de síntesis. Así, el Ca^{2+} causa una rápida producción de ATP e inhibe aquellas reacciones las cuales consumen ATP en la mitocondria, permitiendo que el ATP pueda ser usado en el citosol (Uribe y *cols.*, 1992; Uribe y *cols.*, 1993).

La existencia del antiportador K^+/H^+ en mitocondrias de levadura ha sido sugerida por Villalobo y *cols.*, en 1981 quienes hicieron experimentos de hinchamiento mitocondrial pasivo e insensible a CCCP que era potenciado en medio de acetato de potasio. Se ha confirmado que la mitocondria de levadura posee un antiportador K^+/H^+ que comparte la mayoría de las propiedades del K^+/H^+ de mamífero (Welihinda y *cols.*, 1993) es decir, es un antiportador catiónico no selectivo, se inhibe por Mg^{2+} , propranolol, DCCD y protones. Al igual que en mitocondrias de hígado de rata, el antiportador K^+/H^+ de mitocondrias de

levadura es inhibido por propranolol, quinina y bajas concentraciones de Zn^{2+} (Welihinda y cols., 1993; Manon y Guérin 1992).

En ausencia de A23187 (que es un ionóforo antiportador electroneutro de $Ca^{2+}/2H^+$), no se observa inhibición del K^+/H^+ de mitocondrias de levadura por cationes divalentes, indicando que el sitio de inhibición está localizado en la matriz mitocondrial. Esta ausencia de inhibición del K^+/H^+ puede ser el reflejo de diferentes requerimientos metabólicos y sugiere que en la levadura, el pH puede ser fisiológicamente importante en la regulación del antiportador (Welihinda y cols., 1993).

Sistema de transporte de Magnesio en la mitocondria de levadura.

La interrogante sobre si hay transportadores específicos para la captación de Mg^{2+} en las membranas mitocondriales de levadura (o de cualquier otra especie) no se ha resuelto hasta el momento (Zsurca y cols., 2001). En la levadura de *Saccharomyces cerevisiae* se han aislado dos genes ALR1 y ALR2 cuyas proteínas de expresión Alr1p y Alr2p son homólogas al transportador de Mg^{2+} de *Salmonella typhimurium* llamado CorA (MacDiarmid y Gardner 1998). Los resultados han sugerido que los genes ALR codifican el sistema de captación de Mg^{2+} y otros cationes divalentes en la levadura. La sobre-expresión de estos genes incrementa la resistencia de *Saccharomyces cerevisiae* al Aluminio y además, la inhibición de la captación de Mg^{2+} es la principal causa de la toxicidad observada del Aluminio (MacDiarmid y Gardner 1998).

En *S. cerevisiae* la proteína Mr2P, producto del gen nuclear MRS2, se inserta en la membrana interna mitocondrial. Esta proteína mitocondrial la cual tiene una estructura similar a CorA, funciona como un transportador de Mg^{2+} esta idea se apoya sobre los

resultados de una disminución ó incremento del contenido de Mg^{2+} en mitocondrias que carecen ó sobre-expresan Mrs2p, respectivamente (Bui y cols., 1999)

El gen LPE10 de levadura codifica una proteína mitocondrial Lpe10p homóloga a Mrs2p. Lpe10p se inserta dentro de la membrana interna mitocondrial. En la mitocondria la concentración de Mg^{2+} se incrementa cuando Lpe10p se sobre-expresa y se reduce cuando Lpe10p está ausente (Gregan y cols., 2001).

Recientemente se reportó que el gen humano MRS2 que está localizado en el cromosoma 6 codifica una proteína hsaMrs2p homóloga a las proteínas previamente descritas en levadura Mrs2p y Lpe10p, hsaMrs2p es una proteína de 50 kDa que se localiza en la mitocondria (Zsurca y cols., 2001). La expresión de hsaMrs2 en levaduras puede restaurar parcialmente los niveles de Mg^{2+} en las mitocondrias de mutantes knock-out de mrs2-1 (Zsurca y cols., 2001).

Poros de transición de la permeabilidad en la mitocondria de levadura.

Tanto las mitocondrias de mamífero como las mitocondrias de levadura contienen un poro de transición de la permeabilidad, de tamaño semejante pero de regulación diferente (Manon y cols., 1998). Mientras el PTP en mitocondrias de mamífero se cierra en presencia de ciclosporina A y rojo de Rutenio y se abre en presencia de Ca^{2+} y Pi, en mitocondrias de levadura tanto el Pi cierra el YMUC y la ciclosporina A no tiene efecto.

Las primeras investigaciones realizadas sobre la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial de levadura demostraron la existencia de un transporte electroneutro de Pi, con requerimiento de Mg^{2+} , el cual es inhibido por mersalil, es decir, un sistema muy parecido al de mitocondrias de otras fuentes (Chateaubodeau y cols., 1976).

En presencia de K^+ 10 mM y en ausencia de Pi las mitocondrias aisladas de levadura presentan hinchamiento mitocondrial, incremento irreversible en la respiración y eventualmente daño estructural tanto de la membrana interna como de la membrana externa (Velours y cols., 1977). Este fenómeno es prevenido por bajas concentraciones de Pi (0.5-1 mM) y/o altas concentraciones de otros aniones permeantes como: arsenato, acetato ó propionato (Velours y cols., 1977).

En una solución isosmótica de gluconato de K^+ ó acetato de K^+ , las mitocondrias de levadura presentan hinchamiento e incremento en la velocidad de consumo de oxígeno, por lo que se propuso la existencia de un canal inespecífico capaz de transportar K^+ y gluconato (Guérin y cols., 1994). El hinchamiento mitocondrial es inhibido por Pi, mientras que la adición de valinomicina acelera el hinchamiento (Roucou y cols., 1997b). Paralelamente a estos resultados, se observó que la adición de K^+ en ausencia de Pi genera un efecto desacoplante entre la fuerza protón-motriz y la respiración mitocondrial. La adición de ATP a mitocondrias de levadura abre el canal inespecífico; este canal presenta algunas características diferentes dependiendo de la cepa de levadura estudiada (Prieto y cols., 1995; 1996; Roucou y cols., 1997a). Un estudio de nuestro grupo, mostró que la velocidad de la síntesis de ATP por estas mitocondrias es sólo parcialmente sensible a la depleción del potencial transmembranal mediada por la adición de potasio en presencia de concentraciones sub-milimolares de Pi; este resultado llevó a sugerir que en mitocondrias de levadura existe un mecanismo alternativo para la transferencia de H^+ desde la cadena respiratoria hasta la F_1F_0 -ATPasa (Castrejón y cols., 1997).

En mitocondrias aisladas de *Saccharomyces cerevisiae*, se descubrió la existencia de un canal capaz de transportar manitol a través de la membrana interna mitocondrial (Jung y

cols., 1997). Utilizando polietilenglicol de diferentes PM, se estimó que el tamaño promedio de las moléculas que pueden pasar a través del canal es de 1100 Da.

Existen diferencias en cuanto a la modulación por Mg^{2+} sobre el hinchamiento mitocondrial provocado por gluconato de K^+ ó acetato de K^+ . Así, el hinchamiento inducido por ATP en mitocondrias suspendidas en gluconato de K^+ es inhibido completamente por Mg^{2+} , mientras que el hinchamiento inducido por ATP en mitocondrias suspendidas en acetato de K^+ no es inhibido por Mg^{2+} ; en ambas condiciones el hinchamiento es sensible a Pi y a vanadato (Roucou y *cols.*, 1997a). Se ha propuesto que el Pi actúa por fuera de la mitocondria para inhibir el hinchamiento inducido por ATP (Guérin y *cols.*, 1994). Sin embargo existen datos contradictorios que indican que el sitio de acción del Pi está de lado de la matriz ya que en presencia de mersalil (que es un inhibidor del transporte de Pi) el Pi no tiene efecto (Cortés y *cols.*, 2000). Además del Pi, recientemente se ha establecido que el sulfato y el arsenato protegen a la mitocondria de levadura en contra de los efectos del K^+ en un proceso sensible a mersalil (Cortés y *cols.*, 2000). Se ha sugerido que estos aniones interactúan por lo menos en dos sitios diferentes de la matriz mitocondrial: ya sea en el YMUC, donde el Pi previene los efectos del K^+ , o sobre la F_1F_0 -ATPasa, donde el sulfato y el arsenato inhiben la síntesis de ATP siguiendo una cinética competitiva contra el Pi y no-competitiva contra el ADP (Cortés y *cols.*, 2000).

II. HIPOTESIS

Si, el Mg^{2+} y el K^+ compiten por el mismo sistema de transporte y por los mismos sitios de interacción en la mitocondria de levadura, entonces el Mg^{2+} debe modular el transporte de K^+ y los efectos del K^+ sobre el metabolismo mitocondrial.

III. OBJETIVOS

III.2 Objetivo General

Estudiar la modulación ejercida por el Mg^{2+} sobre el transporte de K^+ y sobre los efectos del K^+ en el metabolismo mitocondrial de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

III.1 Objetivos Particulares

1.- Evaluar la regulación ejercida por el Mg^{2+} sobre el potencial de membrana, consumo de oxígeno y síntesis de ATP de la mitocondria de levadura en ausencia y presencia de K^+ .

2.- Evaluar la regulación ejercida por el Mg^{2+} sobre el transporte de K^+ .

IV. MATERIALES Y METODOS:

IV.1 Material biológico.

Se utilizó la levadura comercial de panificación *Saccharomyces cerevisiae* de la marca “La Azteca S.A.”

IV.2 Reactivos.

El manitol, el MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), el HEPES (ácido N-(2-hidroxiethyl) piperacina-N-(2-etanosulfónico), la albúmina sérica bovina, el ADP, sal de sodio, el cloruro de magnesio, el FCCP (carbonil p-(trifluorometoxi) fenilhidrazona), el cloruro de calcio, el hidrosulfito de sodio, la TEA (trietanolamina), la glucosa, la emulsión antiespumante, el DOC (ácido deoxicólico sal de sodio), el NADP sal de sodio, la hexocinasa, el ATP sal disódica, la safranina-O, la rodamina 123, y el lactato de sodio fueron adquiridos de Sigma Chem. Co., (St Louis MO. EUA). La glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, fue adquirida de Worthington Biochemical Corporation (NJ, EUA). el cloruro de potasio, el ácido fosfórico, la DMF (dimetilformamida), el sulfato cúprico, el hidróxido de sodio, el fosfato monobásico de potasio, el sulfato de amonio, y el sulfato de magnesio fueron adquiridos de J.T. Baker-México, S.A. El tartrato de sodio y potasio fue comprado en Merck-México, S.A. La bacto peptona, y el extracto de levadura se compraron a DIFCO Laboratorios, (Detroit, MI., EUA). Todos los reactivos fueron de la mejor calidad asequible comercialmente.

IV.3 Cultivo de células.

Se sembraron 80 gramos de levadura en un litro de medio de cultivo rico (DeKloet y *cols.*, 1961), (Véase Anexo 1) incubándose a 30° C bajo aireación (3 litros/minuto) por 8 horas en un cuarto de temperatura constante. El cultivo se cosechó lavándose dos veces por centrifugación a 5000 rpm por 5 minutos en una centrífuga Sorvall R5B en un rotor GSA. La levadura cosechada se resuspendió en 1 l de agua desionizada y se ayunó bajo aireación por 16 horas a 30 °C.

IV.4 Aislamiento de mitocondrias.

Las células se centrifugaron en agua destilada dos veces a 5000 rpm. por 5 minutos en una centrífuga Sorvall R5B en un rotor GSA. Las levaduras se pesaron y se resuspendieron a una relación de 1/3 (peso húmedo/volumen) en medio de extracción de mitocondrias (manitol 0.6 M, albúmina sérica bovina 0.1%, MES 5 mM, pH 6.8 ajustando con TEA). Una vez resuspendidas, las levaduras se homogenizaron empleando perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro en un homogenizador Braun-Cell Melsungen (Alemania) enfriado mediante un flujo de CO₂ (Uribe y *cols.*, 1992). Las levaduras se sometieron a un pulso de agitación de 10 segundos. Finalmente las mitocondrias se aislaron por centrifugación diferencial como se indica en el anexo 2 (Peña y *cols.*, 1977).

IV.5 Determinación de proteína.

La concentración de proteína mitocondrial se determinó por triplicado mediante el método de Biuret (Gornal y *cols.*, 1949) a 540 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-50.

IV.6 Oximetría.

El consumo de oxígeno se midió con un electrodo tipo Clark inmerso en una cámara con agitación y temperatura regulada (Estabrook, 1967). El electrodo se conectó a un oxímetro Ysi-5300 con graficador. La reacción se llevó a cabo a 30 °C en un volumen final de 3 ml, en medio isotónico (manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA). Se utilizó una concentración de mitocondrias de 0.3 mg/ml y se agregaron las concentraciones indicadas en cada experimento de magnesio, fosfato y potasio, empleando etanol (10 µl/ml) como sustrato respiratorio a menos que se indique lo contrario. Las mitocondrias se agregaron a la mezcla de reacción, estableciendo el estado 4 de reposo de la respiración mitocondrial. Después de un minuto de incubación se adicionó 80 mM ADP (sal disódica), generando el estado 3 y se observó el trazo hasta que regresó al estado 4. Finalmente, se adicionó 2 µM CCCP para generar el estado desacoplado.

IV.7 Determinación del potencial de membrana ($\Delta\Psi$).

El potencial de membrana se midió de acuerdo al método de Åkerman y Wikström (1976), siguiendo los cambios de absorbancia de safranina-O a 511-533 nm en un espectrofotómetro de doble longitud de onda SLM DW2000 en modo dual. La reacción se llevó a cabo en medio isotónico (manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA) con 10 µM safranina-O, usando una concentración final de 0.3 mg de proteína mitocondrial por ml a temperatura ambiente en un volumen final de 2 ml.

IV.8 Síntesis de ATP.

Se midió en el mismo medio descrito en el párrafo anterior, pero en ausencia de safranina, mediante un ensayo acoplado a la aparición de NADPH a través de las

reacciones catalizadas por la hexocinasa y la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa. Se usó un espectrofotómetro de doble longitud de onda SLM DW2000 en modo dual a 340-390 nm (Trautschold y *cols.*, 1985). La hexocinasa liofilizada se resuspendió en agua desionizada a una concentración de 13 mg/ml, mientras que la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa liofilizada, se resuspendió en una solución de citrato 5 mM pH 7.4 ajustado con TEA, a una concentración final de 1000 U/ml. Ambas enzimas se adicionaron al medio de reacción en alícuotas de 3 µl/ml. El volumen final fue de 2 ml; los experimentos se hicieron a temperatura ambiente. La velocidad de reducción de NADP⁺ se calculó usando el coeficiente de extinción del NADPH de $6.22 \times 10^4 \text{ (M cm)}^{-1}$.

IV.9 Hinchamiento mitocondrial.

Se determinó midiendo la disminución de absorbancia en un espectrofotómetro de doble longitud de onda SLM DW2000 en modo split a 540 nm equipado con un agitador magnético. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente en un volumen final de 2 ml en medio isotónico (manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA y 20 mM KCl) con una concentración mitocondrial de 0.3 mg/ml. La reacción de hinchamiento se inició con la adición del sustrato respiratorio (normalmente etanol, 2 µl/ml).

IV.10 Captación de ⁸⁶Rb⁺.

En el mismo medio de reacción utilizado en los otros experimentos, con 40 mM RbCl y diferentes concentraciones de MgCl₂ (0 a 8 mM), se midió la captación de ⁸⁶Rb⁺ incubando las mitocondrias por 2 minutos a 30 °C bajo agitación. Para evitar la depleción del oxígeno se adicionaron 2 µl por ml de H₂O₂ al 10%. El contenido mitocondrial de ⁸⁶Rb⁺ se midió filtrando la suspensión de mitocondrias a través de un filtro de nitrocelulosa

(Millipore) de 0.6 μm de diámetro de poro. Cada filtro se lavó con medio isotónico conteniendo 0.2 M de KCl y se colocó en un vial con líquido de centelleo. La radiactividad se determinó en un contador de centelleo Beckman LS 6500 Multi-Purpose (Brown y Cooper 1995) usando la ventana de fosfato. La concentración de $^{86}\text{Rb}^+$ se determinó al comparar las cpm con los datos obtenidos de estándares conteniendo concentraciones conocidas de $^{86}\text{Rb}^+$. Inicialmente, se mezcló $^{86}\text{Rb}^+$ con RbCl_2 para obtener 500 000 cpm por μmol de Rb^+ .

V. RESULTADOS

V.1 El Magnesio modula los efectos del potasio sobre la respiración mitocondrial.

El Mg^{2+} funciona como cofactor de diversas enzimas y regula la actividad de algunos caminos metabólicos (Romani, 1998). En mitocondrias de mamíferos, se ha propuesto que el Mg^{2+} y el K^+ compiten por el mismo mecanismo de transporte y por ello se decidió estudiar el ambos cationes sobre el metabolismo mitocondrial de la levadura.

El primer parámetro que se estudió fue el efecto del Mg^{2+} sobre la respiración mitocondrial estimulada por K^+ . Inicialmente, se midió el consumo de oxígeno mitocondrial a diferentes concentraciones de Mg^{2+} (Fig. 1). Se observó que en presencia de Pi 4.0 mM y K^+ 40 mM, el estado III disminuyó desde 350 $\text{natgO}_2/\text{min}/\text{mg}$ prot. en ausencia de Mg^{2+} hasta 270 $\text{natgO}_2/\text{min}/\text{mg}$ prot. en presencia de Mg^{2+} 8.0 mM, es decir, un 77% del control. El estado IV permaneció estable, con una velocidad de consumo de oxígeno de 170 $\text{natgO}_2/\text{min}/\text{mg}$ prot. en ausencia de Mg^{2+} y de 180 $\text{natgO}_2/\text{min}/\text{mg}$ prot. en presencia de Mg^{2+} 8.0 mM, acelerándose a 106% del control. El estado desacoplado

aumentó desde 400 $\text{natgO}_2/\text{min}/\text{mg}$ prot. en ausencia de Mg^{2+} hasta 600 $\text{natgO}_2/\text{min}/\text{mg}$ prot., o 150% del control, en presencia de Mg^{2+} 8.0 mM.

Los resultados indican que en presencia de Pi 4.0 mM y K^+ 40 mM, el Mg^{2+} tuvo un ligero efecto desacoplante donde el control respiratorio (C.R.) disminuyó como consecuencia de una inhibición del consumo de oxígeno en el estado III y un aumento del estado IV. El CR varió desde 2.06 en el control hasta 1.5 en presencia de 8 mM Mg^{2+} . Por otro lado, la velocidad del consumo de oxígeno en el estado desacoplado aumentó de 400 $\text{natgO}_2/\text{min}/\text{mg}$ prot. en ausencia de Mg^{2+} hasta 550 $\text{natgO}_2/\text{min}/\text{mg}$ prot en presencia de Mg^{2+} 8.0 mM, es decir, la cadena respiratoria fue estimulada por el Mg^{2+} .

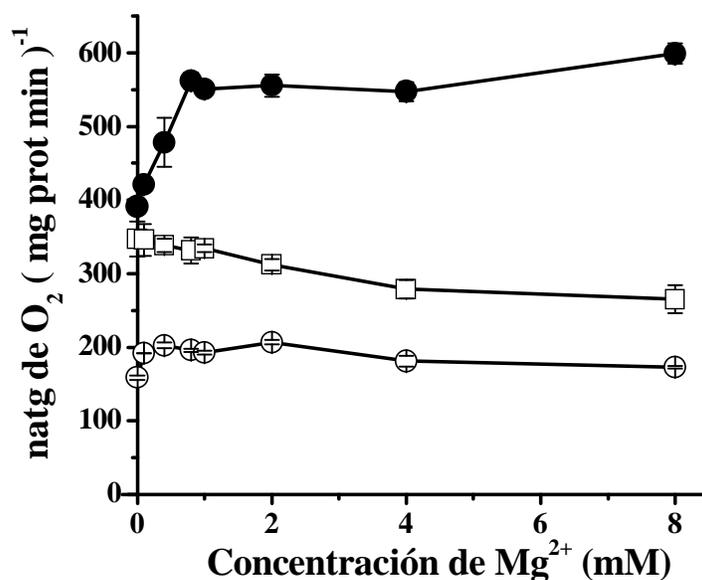


Fig. 1 Efecto de Mg^{2+} sobre el consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de Pi 4.0 mM. La Mezcla de reacción contiene manitol 0.6 M, K^+ 40 mM, MES 5 mM, pH 6.8. Etanol (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$), mitocondrias (0.3 mg/ml), ADP (80 μM) y FCCP (6 μM) a un volumen final de 3 ml, temperatura de 30°C. Estado IV, • ; Estado III, □; Estado Desacoplado ⊕. n = 3 D.S.

Para evaluar la modulación por Mg^{2+} sobre el efecto desacoplante del K^+ en mitocondrias de levadura (Castrejón y cols., 1997; Chateaubodeau y cols., 1976; Velours y cols., 1977), se midió el consumo de oxígeno en presencia de diferentes concentraciones de Mg^{2+} y 0.4 mM Pi (Fig. 2). Inicialmente se utilizó etanol como sustrato. En ausencia de Mg^{2+} , la velocidad de consumo de Oxígeno tanto en estado IV como en estado III fue de 220 $natgO_2/min/mg$ prot. Indicando un desacop[lamiento mediado por el K^+ . Al adicionar concentraciones crecientes de Mg^{2+} , esta velocidad aumentó ligeramente para el edo III, llegando a 240 $natgO_2/min/mg$ prot. en presencia de Mg^{2+} 8.0 mM mientras que el estado IV disminuyó hasta 170 $natgO_2/min/mg$ prot. Con lo que se puede postular que la adición de $MgCl_2$ acopló a las mitocondrias ya que a medida que aumentó la concentración de Mg^{2+} el control respiratorio aumentó. Con respecto al edo desacoplado, este mostró un efecto extraño, pues a las concentraciones bajal de Mg^{2+} hasta 190 $natgO_2/min/mg$ prot. en presencia de Mg^{2+} 2.0 mM y posteriormente aumentó hasta 250 $natgO_2/min/mg$ prot. en presencia de Mg^{2+} 8.0 mM.

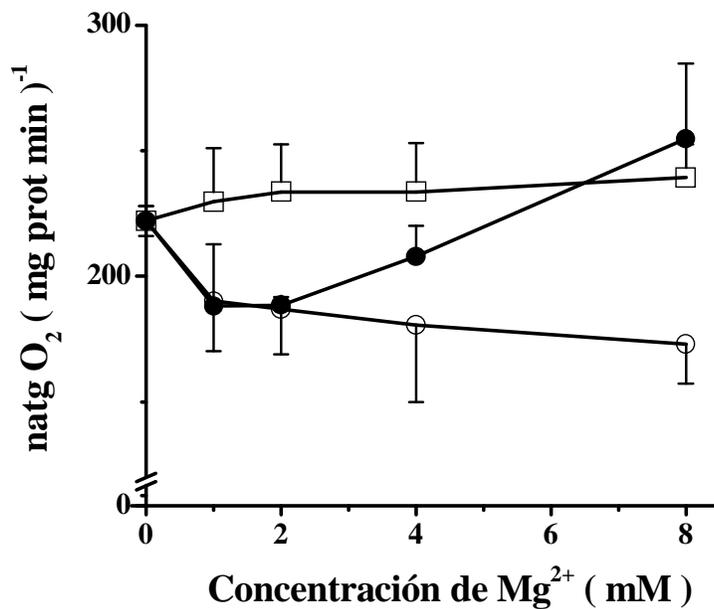


Fig. 2 Efecto de Mg^{2+} sobre el consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de Pi 0.4 mM. Mezcla de reacción: como en la fig. 1 excepto Pi 0.4 mM. Se agregaron las concentraciones de Mg^{2+} indicadas en la figura. Estado IV, •; Estado III, ◻; Estado Desacoplado ◊. $n = 3 \pm D.S.$

Para explicar el efecto bifásico sobre el estado desacoplado, se postuló que en presencia de Pi 0.4 mM probablemente se encuentre abierto el YMUC, y esto resulte en la fuga de coenzimas, entre ellas el NADH. Por ello, se decidió adicionar NADH, y revertir el sentido del flujo de esta coenzima (Figura 3). Se observó que aún cuando el estado desacoplado disminuye en presencia de Mg^{2+} 0 a 2 mM, las velocidades nunca llegan a ser tan bajas como en el estado IV. Adicionalmente, se observó que al aumentar la concentración de Mg^{2+} , disminuye la velocidad de consumo de oxígeno tanto en estado IV como en estado III. El cociente respiratorio aumenta ligeramente entre las concentraciones de Mg^{2+} de 0 a 0.5 mM y luego se mantiene constante.

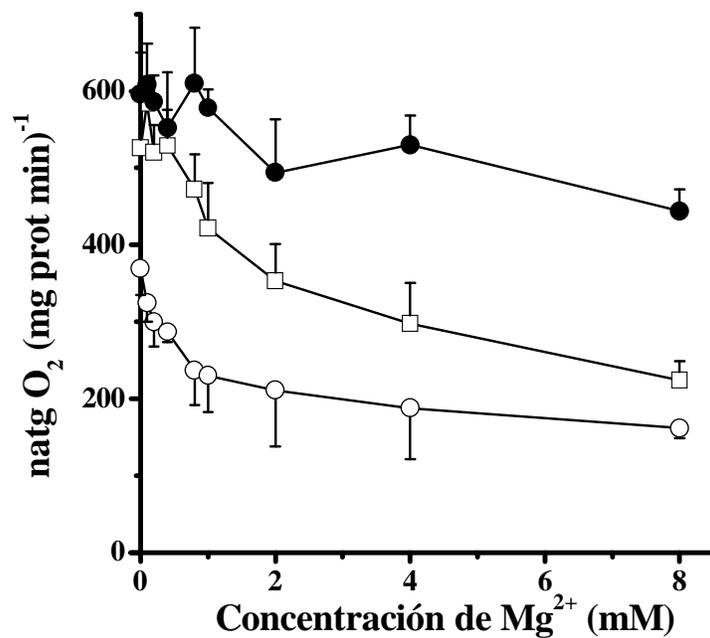


Fig. 3 Efecto de Mg²⁺ sobre el consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de Pi 0.4 mM. Mezcla de reacción como en la figura 2 con la excepción del uso de NADH 1 mM como sustrato respiratorio, en lugar de etanol. Estado IV • , Estado III ◻, Estado Desacoplado. ◊ n = 3 ± D.S.

V.2 El Mg^{2+} modula los efectos del K^+ sobre el potencial transmembranal de la mitocondria.

Los resultados de oximetría sugieren que el Mg^{2+} tiene un ligero efecto desacoplante en presencia de Pi 4.0 mM pero tiene un claro efecto acoplante en presencia de Pi 0.4 mM. Para corroborar estos datos, se decidió evaluar el potencial transmembranal en estas condiciones y en presencia de diferentes concentraciones de Mg^{2+} . En presencia de Pi 4.0 mM y K^+ 40 mM en ausencia de Mg^{2+} (Fig. 4), se obtuvo el máximo potencial de membrana detectado, al que se asignó un valor de 180 mV por ser el más alto valor reportado en mitocondrias (Akerman y Wikstrom, 1976). Al aumentar las concentraciones de Mg^{2+} el potencial de membrana disminuyó muy ligera, pero repetitivamente. En presencia de Mg^{2+} 1mM el potencial de membrana fue de 160 mV mientras que a Mg^{2+} 2 mM el potencial disminuyó hasta 150 mV. A Mg^{2+} 4mM el potencial fue de 130 mV y a Mg^{2+} 8mM el potencial transmembranal alcanzó los 118 mV.

El potencial de membrana en presencia de Pi 0.4 mM y K^+ 40 mM, pero en ausencia de Mg^{2+} , fue de 133 mV (Fig. 5). A las diferentes concentraciones de Mg^{2+} utilizadas, el potencial transmembranal aumentó como sigue: en presencia de Mg^{2+} 1 mM el potencial fue de 140 mV, con Mg^{2+} 2 mM el potencial aumentó hasta 145 mV, en presencia de Mg^{2+} 4 mM el potencial fue de 150 mV y en presencia de Mg^{2+} 8.0 mM el potencial aumentó hasta 163 mV. Es decir, el potencial de membrana se modificó en proporción al aumento de Mg^{2+} . Como se sugirió a partir de los experimentos de oximetría, a una concentración de Pi suficiente para soportar un potencial de membrana elevado, el Mg^{2+} tiene un ligero efecto desacoplante, mientras que a concentraciones de Pi submilimolares, donde la mitocondria está desacoplada, el Mg^{2+} tiene un efecto acoplante.

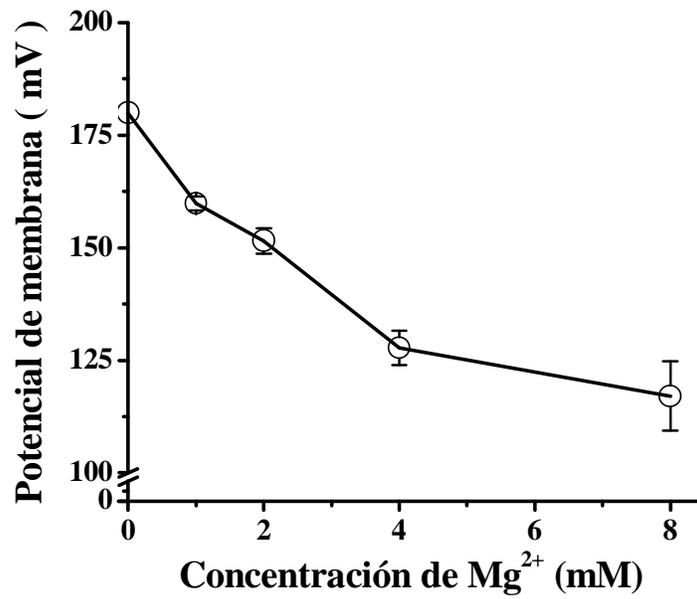


Fig. 4 Efecto de Mg²⁺ sobre el potencial de membrana ($\Delta\Psi$) en mitocondrias aisladas de *Saccharomyces cerevisiae*, en presencia de Pi 4.0 mM. Mezcla de reacción como se indica en la fig. 1, excepto Safranina-O 10 μ M. Volumen final 2 ml. Temperatura ambiente. n = 3 \pm D.S.

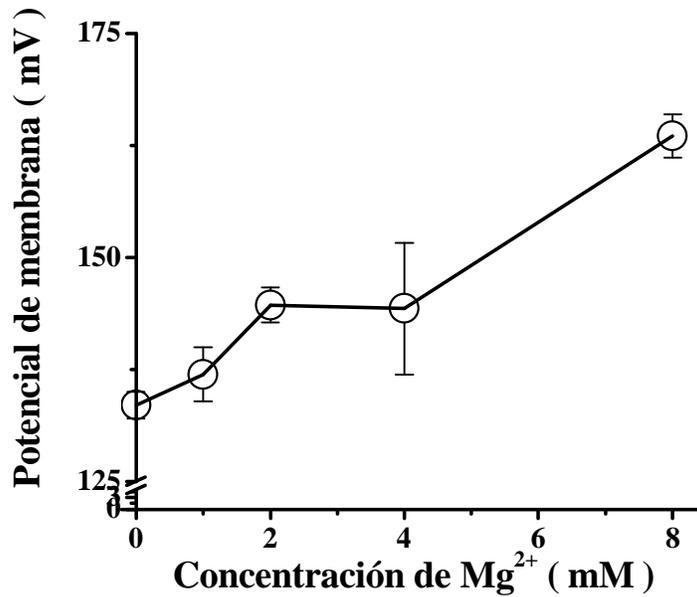


Fig. 5 Efecto de Mg²⁺ sobre el potencial de membrana ($\Delta\Psi$) en mitocondrias aisladas de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de Pi 0.4 mM. Mezcla de reacción como en la figura 4, excepto Pi 0.4 mM. n = 3 \pm D.S.

V.3 Efecto de Mg^{2+} sobre la síntesis de ATP.

En las mitocondrias de levadura incubadas en presencia de Pi 0.4 mM, se ha observado que, aún cuando el K^+ abate el potencial de membrana, se mantiene una importante síntesis de ATP (Castrejón y cols., 1997). Para analizar este fenómeno, se decidió determinar el efecto de Mg^{2+} sobre la síntesis de ATP. Se probaron diferentes concentraciones de Mg^{2+} en presencia de Pi 0.4 mM y K^+ 40 mM (Fig. 6) y se observó que la velocidad de síntesis de ATP aumentó desde 50 nmol ATP/min/mg prot. en ausencia de Mg^{2+} , hasta 117 nmol ATP/min/mg prot. en presencia de Mg^{2+} 8.0 mM. Esto significa que el aumento en la concentración de Mg^{2+} produjo un aumento hasta de 2.34 veces en la velocidad de síntesis de ATP.

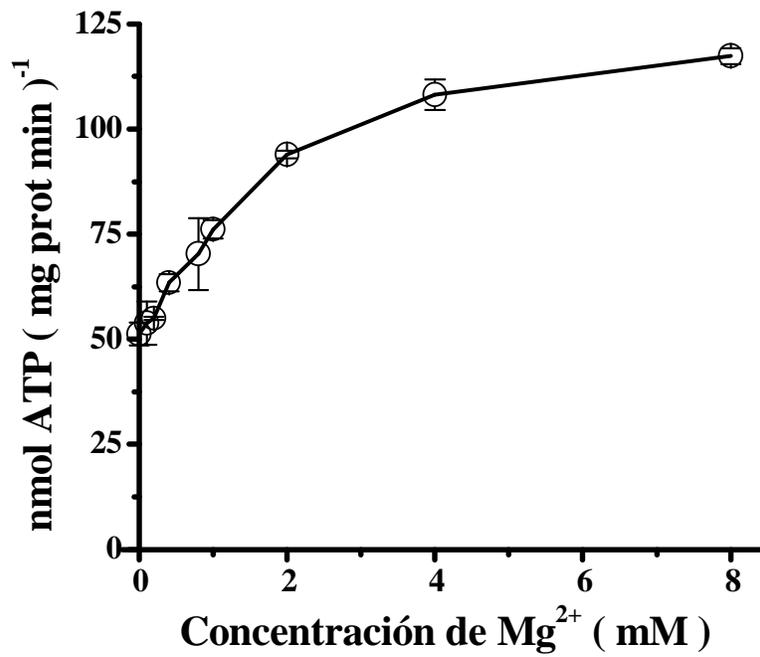


Fig. 6 Efecto de Mg²⁺ sobre la síntesis de ATP en mitocondrias aisladas de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de Pi 0.4 mM. Mezcla de reacción como se indica en la fig. 5 excepto glucosa (20 mM), hexocinasa (162.5µg/ ml), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (2 unidades / ml), NADP (140 µM). La reacción se inició con ADP (1 mM) a temperatura ambiente. n = 3 ± D.S.

En presencia de Pi 4 mM y K^+ 40 mM, se observó que la velocidad de síntesis de ATP aumentó desde 76 nmols ATP (mg prot.min)⁻¹ en ausencia de Mg^{2+} , hasta una velocidad de 244 nmols ATP (mg prot.min)⁻¹ en presencia de Mg^{2+} 0.2 mM y no varió al aumentar la concentración de Mg^{2+} (Fig. 7).

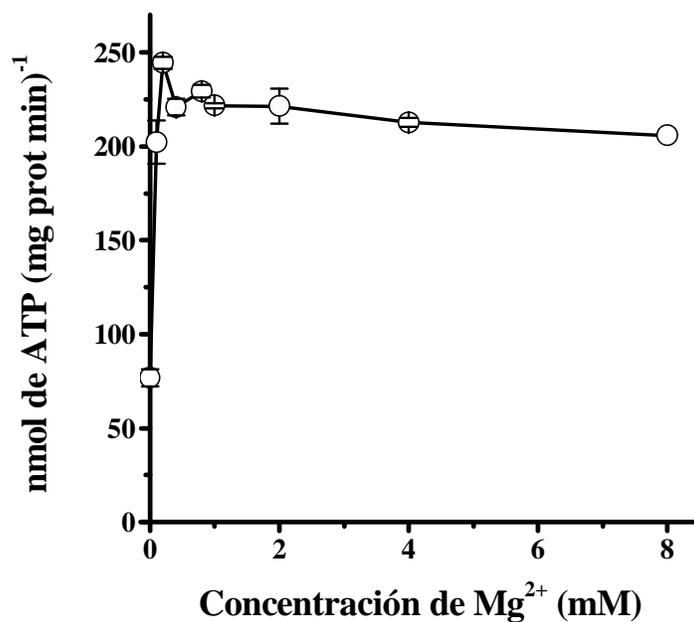


Fig. 7 Efecto de Mg^{2+} sobre la síntesis de ATP en mitocondrias aisladas de *Saccharomyces cerevisiae*, en presencia de Pi 4.0 mM. Condiciones experimentales como en la figura 6, excepto Pi 4.0 mM. $n = 3 \pm \text{D.S.}$

V.4 El Mg^{2+} evita el hinchamiento mitocondrial provocado por K^+ .

El volumen de la matriz mitocondrial varía en proporción a la concentración interna de solutos; por ello, para cuantificar de manera indirecta la captación de iones y otras moléculas se utiliza la determinación del hinchamiento mitocondrial. Se cuantificaron los cambios en absorbancia a 550 nm de una suspensión mitocondrial (Beavis y cols., 1985; Garlid y Beavis 1985). Cuando se midió el hinchamiento mitocondrial en presencia de Pi 0.4 mM, K^+ 40mM, y en ausencia de Mg^{2+} (Fig. 8-A), se observó una disminución en la absorbancia indicando la presencia de hinchamiento mitocondrial. Posteriormente, conforme se incrementó la concentración de Mg^{2+} en el medio, los cambios de absorbancia se hicieron más lentos y de menor magnitud. Como se esperaba a partir de datos previos (Castrejón y cols., 1997), en presencia de Pi 4.0 mM no se observó hinchamiento mitocondrial. En estas condiciones, el Mg^{2+} no tuvo efecto alguno (Fig 8-B).

La inhibición del hinchamiento mitocondrial sugiere que el Mg^{2+} inhibe la captación de K^+ por la mitocondria. De ser así, la inhibición que el Mg^{2+} ejerce sobre el desacoplamiento provocado por el K^+ podría explicarse. Además, estos efectos se observan a concentraciones de Mg^{2+} que podrían considerarse como fisiológicas.

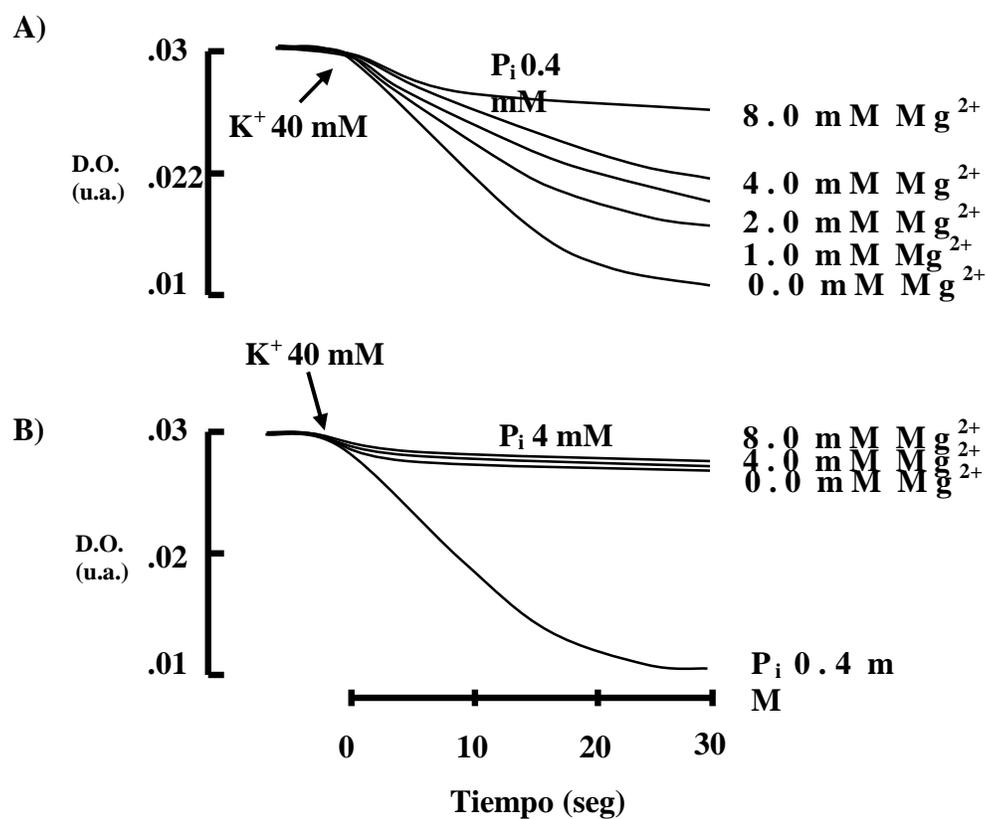


Fig. 8 Efecto de Mg^{2+} sobre el hinchamiento de mitocondrias aisladas de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia tanto de P_i 0.4 mM como de P_i 4.0 mM. Mezcla de reacción como en la fig. 1; sin ADP ó FCCP a temperatura ambiente en un volumen final de 2 ml. A) P_i 0.4 mM, B) P_i 4 mM.

V.5 El magnesio inhibe la captación mitocondrial de $^{86}\text{Rb}^+$. Los efectos del K^+ sobre el metabolismo mitocondrial son modulados por la presencia de Mg^{2+} , el cual además inhibe el hinchamiento mediado por K^+ . Todo esto parece indicar que el Mg^{2+} inhibe la captación mitocondrial de K^+ . En mitocondrias de mamífero, el K^+ ingresa a la mitocondria por un uniportador, lo que abate el potencial transmembranal, y sale a través de un antiportador, lo que depleta el gradiente de pH. Ambos efectos resultan en una baja fuerza protón-motriz y poca o nula síntesis de ATP. Si el mecanismo de transporte mitocondrial de K^+ de la levadura es similar al descrito en mamíferos, entonces se explica que al inhibir el transporte de K^+ , el Mg^{2+} acopla a la mitocondria. Por lo tanto, dada la importancia de definir este parámetro, se decidió evaluar el aumento en la permeabilidad mitocondrial a K^+ , midiendo la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ que es un análogo radiactivo del K^+ . Las mitocondrias se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de Mg^{2+} y se observaron sus efectos sobre la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ a un tiempo fijo. Conforme aumentó la concentración de Mg^{2+} , disminuyó la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ (Fig. 9). Estos resultados concuerdan con los obtenidos al medir hinchamiento mitocondrial bajo las mismas condiciones. En presencia de Pi 0.4 mM el Mg^{2+} inhibió la captación de K^+ . En ausencia de Mg^{2+} se captaron 10 nmol $^{86}\text{Rb}^+$ /mg prot/2 min, mientras que en presencia de Mg^{2+} 2 mM o más, solamente se captaron 4 nmol $^{86}\text{Rb}^+$ /mg prot/2 min. En presencia de Pi 4 mM, los efectos del Mg^{2+} fueron ligeramente más marcados, en ausencia del catión divalente se captaron 8 nmol $^{86}\text{Rb}^+$ /mg prot/2 min, en presencia de Mg^{2+} 2 mM se captaron solamente 2 nmol $^{86}\text{Rb}^+$ /mg prot/2 min.

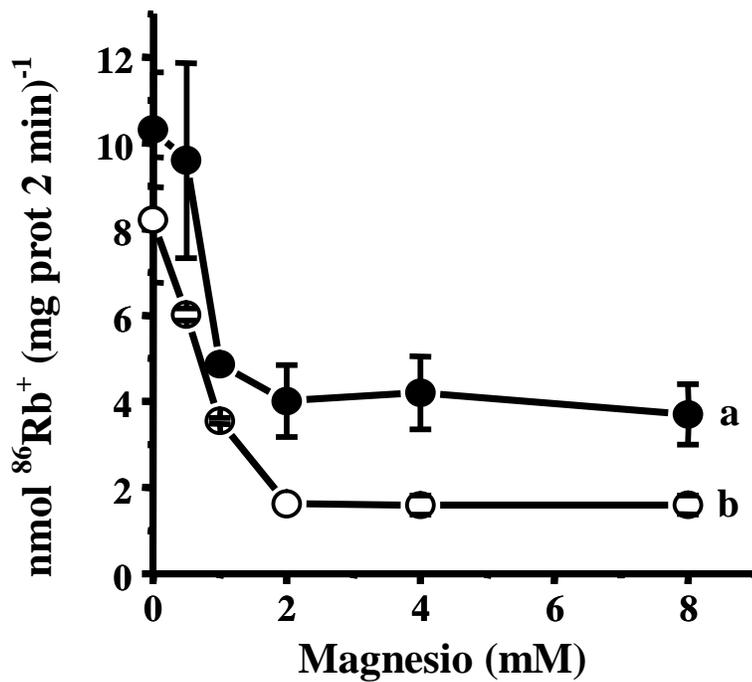


Fig. 9 Efecto de Mg^{2+} sobre la captación mitocondrial de $^{86}Rb^+$ en mitocondrias aisladas de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de Pi 0.4 mM ó 4 mM y $^{86}Rb^+$ 40 mM. Mezcla de reacción manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8. Se agregaron diferentes concentraciones de Mg^{2+} como se indica en la figura, etanol (1 μ l / ml), mitocondrias (3 mg / ml), 2 μ l de H_2O_2 al 10%; a un volumen final de 1 ml, temperatura de 30°C. a) Pi 0.4 mM, b) Pi 4 mM. n = 6 \pm D.S.

VI. DISCUSIÓN

En las mitocondrias aisladas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se observó que el Mg^{2+} moduló los efectos del K^+ sobre la fosforilación oxidativa. Se obtuvieron efectos sobre el control respiratorio, el potencial de membrana y la síntesis de ATP. Esta modulación fue diferente, dependiendo de la concentración de Pi.

A una concentración de Pi 0.4 mM el K^+ tuvo efectos desacoplates, los cuales disminuyeron en proporción a la concentración de Mg^{2+} presente en el medio. Es decir, en presencia de diferentes concentraciones de Mg^{2+} , aumentó el CR, el potencial transmembranal y la síntesis de ATP.

En contraste, al aumentar la concentración de Pi a 4 mM, el K^+ ya no ejerció efectos desacoplates y el Mg^{2+} tuvo muy pocos efectos sobre el control respiratorio y sobre el potencial transmembranal; solamente a las mayores concentraciones utilizadas se observó un ligero efecto desacoplante. Además, la síntesis de ATP aumentó dramáticamente en presencia de una concentración mínima de Mg^{2+} , lo que obviamente se debe a su papel de cofactor en la síntesis de ATP. Estos resultados sugirieron que el Mg^{2+} inhibe el transporte de K^+ , lo que fue corroborado al observar inhibición del hinchamiento mitocondrial y de la captación de $^{86}Rb^+$ en presencia de diferentes concentraciones de Mg^{2+} . El efecto del Pi ya fue descrito en mitocondrias de levadura (Castrejón y cols., 1997, Guérin y cols., 1994), y se propuso que el Pi interactúa con un canal inespecífico de la membrana interna mitocondrial cerrándolo y acoplado a la mitocondria (Manon y cols., 1998, Cortés y cols., 2000).

En apoyo a la existencia de una interacción Pi-Canal inespecífico se ha descrito, mediante técnicas de patch clamp, que en mitoplastos de levadura existe un canal de 400

psiemens que se cierra por Pi y que tiene una preferencia ligeramente aniónica de 3:1 (Ballarin y Sorgato 1995). Los efectos sinérgicos entre el Pi y el Mg^{2+} descritos aquí sugieren que uno de los sitios donde el Mg^{2+} ejerce su modulación sobre los efectos del K^+ es el canal inespecífico conocido como YMUC (Manon y cols., 1998). Al respecto, se sabe que el Pi forma sales de Mg^{2+} , y esta podría ser la sal que cierra al YMUC.

La protección que confiere el Mg^{2+} a la mitocondria de levadura contra los efectos del K^+ es menor que la protección conferida por el Pi. De cualquier manera se puede observar que el potencial de membrana ya no se abate por K^+ en presencia de Mg^{2+} (Fig. 4 y 5). Por lo tanto, además de un posible efecto sobre el poro inespecífico, se sugiere que la interacción entre el Mg^{2+} y el transporte del K^+ ocurre a nivel de canales específicos similares a los propuestos originalmente en las mitocondrias de mamífero (Diwan y cols., 1979).

En presencia de Pi 0.4mM, el YMUC (canal inespecífico de la mitocondria de levadura) se abre, por lo que en este caso se desenmascara el efecto protector del Mg^{2+} . Es probable que la interacción YMUC/ Mg^{2+} resulte en una menor conductancia al K^+ . Por otra parte, se ha postulado que el Mg^{2+} regula la entrada de aniones por el YMUC (Manon y cols., 1998). Por lo tanto, el aumento en el control respiratorio y la recuperación del potencial de membrana (Fig 2 y 5) refleja la regulación ejercida por el Mg^{2+} sobre el YMUC.

Con respecto al ligero desacoplamiento observado cuando el Mg^{2+} se agregó en presencia de Pi 4.0 mM, es posible que la captación de Mg^{2+} resulte en la disminución de la respiración mitocondrial y en la disminución del potencial de membrana (Fig. 1 y 4). Existen otras evidencias implicadas en el desacoplamiento y disminución del potencial de membrana como son: el daño a la estructura de la membrana mitocondrial (Ligeti y

Horvath 1980) y el bloqueo de H^+ por Mg^{2+} (Cadenas y Brand 2000), pero lo más probable es que estos efectos se deban principalmente a la entrada de Mg^{2+} hacia la matriz mitocondrial.

Durante mucho tiempo se ha sabido que el Mg^{2+} es un cofactor importante de diversas reacciones. Sin embargo, su importancia en la regulación del metabolismo mitocondrial ha sido subestimada porque se consideraba que era poco móvil en la célula y entonces su concentración permanecía constante. Por otro lado, las manifestaciones clínicas por hipo-magnesemia son muchas y esto llevó a la búsqueda de las condiciones en que la concentración celular de Mg^{2+} variaba (Romani y cols., 1991; 1993a; 1993b). Se observó que la interacción de células aisladas con diversas hormonas resulta en salida de Mg^{2+} de la célula. Aunque estos movimientos son pequeños, el Mg^{2+} libre es solamente una pequeña fracción de Mg^{2+} total. Como consecuencia, la salida de Mg^{2+} provoca grandes cambios en el Mg^{2+} libre lo cual resulta en importantes efectos sobre el metabolismo energético celular. Entre las enzimas cuya actividad depende de la concentración de Mg^{2+} , están la α -ceto-glutarato deshidrogenasa y la F_1F_0 -ATPasa (Romani y Scarpa, 1992).

En la Figura 10, mostramos un diagrama para ilustrar la posible participación del Mg^{2+} en el metabolismo mitocondrial, apoyados en datos de la literatura y en los que fueron obtenidos aquí. En ausencia de Mg^{2+} , la membrana interna mitocondrial se encuentra en un estado de alta conductancia al K^+ , (Fig 10-A).

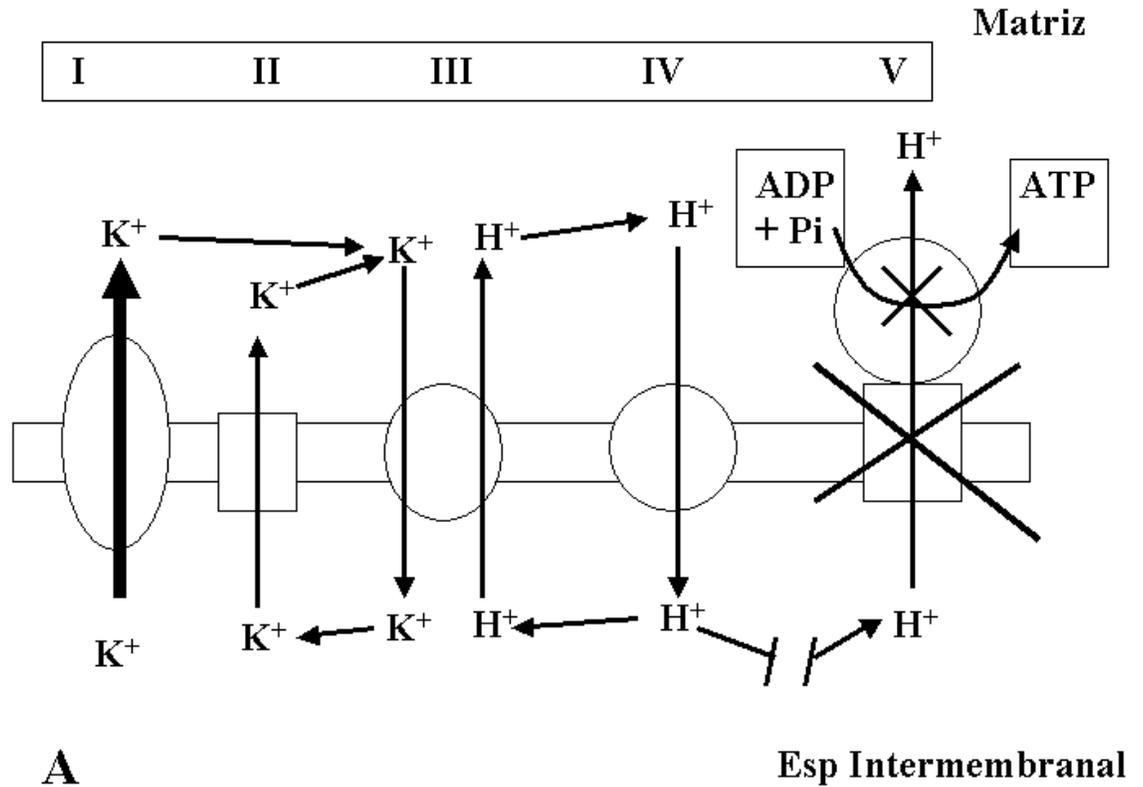


Fig. 10-A Modelo que propone el efecto del potasio sobre el metabolismo oxidativo mitocondrial. En ausencia de Mg^{2+} , el K^+ ingresa a la mitocondria por dos sistemas, el poro inespecífico (I) y el uniportador de potasio (II). Esto abate el componente eléctrico. Una vez acumulado el potasio, sale por el intercambiador K^+/H^+ (III), lo que resulta en abatimiento del otro componente de la fuerza protón-motriz que es el gradiente de pH. Como resultado del abatimiento de la fuerza protón-motriz la síntesis de ATP se inhibe.

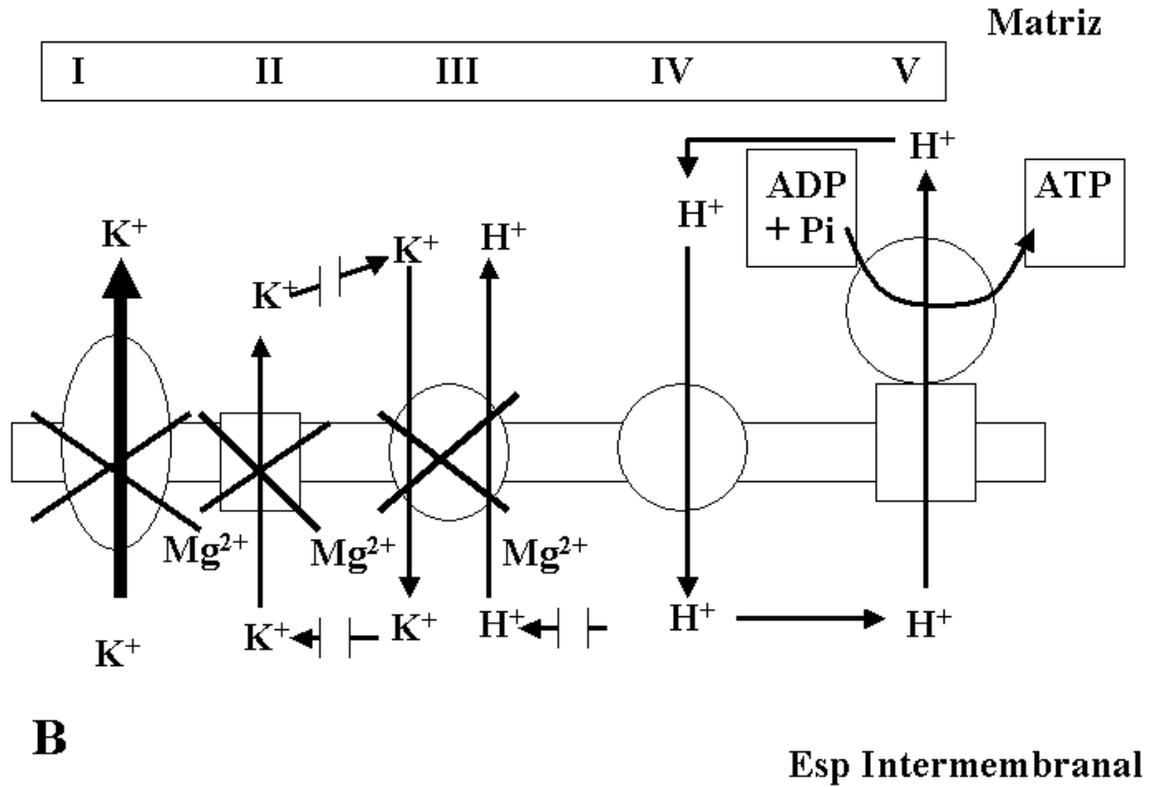


Figura Fig. 10-B Modelo que muestra la modulación ejercida por el Mg^{2+} sobre el efecto del potasio en el metabolismo oxidativo mitocondrial. En presencia de Mg^{2+} , la captación de K^+ por la mitocondria es inhibida tanto a nivel del poro inespecífico (I) como del uniportador de potasio (II). Por lo tanto, el ciclo fútil del K^+ ya no se establece. Aunque el antiportador K^+/H^+ (III) no es inhibido directamente, no tiene K^+ que sacar. En consecuencia, la cadena respiratoria (IV) establece una alta fuerza protón-motriz y la F_1F_0 -ATPasa sintetiza ATP óptimamente. El fosfato también cierra el poro inespecífico (I).

En la mitocondria el K^+ es transportado a través del YMUC (I) un canal para K^+ (II) y el antiportador K^+/H^+ (III). El transporte no regulado de K^+ desacopla a la mitocondria, eliminando el gradiente de protones producido por la cadena respiratoria (IV) y evitando la síntesis de ATP por la F_1F_0 -ATPasa (V). En contraste con la imagen anterior, en presencia de Mg^{2+} (Fig 10-B) la conductancia al K^+ de la membrana interna mitocondrial disminuye. Este es un efecto del magnesio tanto sobre el YMUC (I) como sobre el canal de captación de potasio (II) con lo que el ciclo fútil provocado por el reciclamiento del K^+ se interrumpe. El fosfato actúa cerrando el canal inespecífico (I) (Castrejón y cols, 1997). En consecuencia, la mitocondria es capaz de generar un alto potencial transmembranal, gracias a una cadena respiratoria (IV) estimulada por Mg^{2+} y por K^+ . Adicionalmente, la F_1F_0 -ATPasa (V) es estimulada por la presencia de Mg^{2+} y ahora encuentra el gradiente de protones necesario para llevar a cabo, la síntesis de ATP a velocidades cercanas a la máxima.

En resumen, nuestros datos indican que el Mg^{2+} modula los efectos desacoplates del K^+ sobre la mitocondria de levadura. Los resultados de hinchamiento mitocondrial y de captación de $^{86}Rb^+$ sugieren que el mecanismo de modulación involucrado es la inhibición del transporte de K^+ .

VII. CONCLUSIONES

El Mg^{2+} regula los efectos del K^+ sobre el metabolismo mitocondrial en mitocondrias aisladas de *Saccharomyces cerevisiae*.

En presencia de concentraciones submilimolares de Pi, el Mg^{2+} previene el efecto desacoplante del K^+ .

A concentraciones milimolares de Pi, el Mg^{2+} optimiza la velocidad de síntesis de ATP aunque a mayores concentraciones tiene un ligero efecto desacoplante.

El mecanismo por el que el Mg^{2+} regula los efectos del K^+ , involucra la inhibición de la captación de K^+ por la mitocondria.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Akerman KEO, (1981). Inhibition and stimulation of respiration-linked Mg^{2+} efflux in rat heart mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **13** : 133-139.

Akerman KE, y Wikstrom MK. (1976). Safranin-O as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS. Lett.* **68** : 191-197.

Altschuld RA, Hohl CM, Castillo LC, Garleb AA, Starling RC y Brierley GP. (1992). Cyclosporin inhibits mitochondrial calcium efflux in isolated adult rat ventricular cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* **262** : H1699-1704.

Aprille JR. (1993). Mechanism and regulation of the mitochondrial ATP-Mg/P(i) carrier. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25** : 473-481.

Armas C, Castrejón V y Uribe S. (2000). Efectos de los cationes sobre la actividad de la NADH:Q6 oxidoreductasa interna de la mitocondria de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. XXIII Congreso Nacional de Bioquímica Acapulco, Gro. 19-24 de Noviembre. C-90.

Ballarin C y Sorgato MC. (1995). An electrophysiological study of yeast mitochondria. Evidence for two inner membrane anion channels sensitive to ATP. *J. Biol. Chem.* **270**:19262-19268.

Beavis AD, Brannan RD y Garlid KD. (1985). Swelling and contraction of the mitochondrial matrix. I. A structural interpretation of the relationship between light scattering and matrix volume. *J Biol Chem.* **260** : 13424-13433.

Bogucka K y Wojtczak L. (1971). Intramitochondrial distribution of magnesium. *Biochem Biophys Res Commun.* **44** : 1330-1337.

Bond M, Vadasz G, Somlyo AV y Somlyo AP. (1987). Subcellular calcium and magnesium mobilization in rat liver stimulated in vivo with vasopressin and glucagon. *J. Biol. Chem.* **262** : 15630-15636.

Brierley G.P. (1983). in *Pathobiology of Cell Membranes*. Trump B and Arstila A.V eds. Vol. III Academic Press. New York. pp. 23-61.

Brierley GP, Davis M y Jung DW. (1987). Respiration-dependent uptake and extrusion of Mg^{2+} by isolated heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **253** : 322-332.

Brierley GP, Davis MH y Jung DW. (1988). Intravesicular pH changes in submitochondrial particles induced by monovalent cations: relationship to the Na^+/H^+ and K^+/H^+ antiporters. *Arch. Biochem. Biophys.* **264** : 417-427.

Brierley GP, Jacobus WE y Hunter GR. (1967). Ion transport by heart mitochondria. Activation of the adenosine triphosphate-supported accumulation of Mg^{2+} by Zn^{2+} and by rho-chloromercuriphenylsulfonate. *J. Biol. Chem.* **242** : 2192-2198.

Brierley GP, Jurkowitz MS, Farooqui T y Jung DW. (1984). K^+/H^+ antiport in heart mitochondria. *J Biol Chem.* **259** : 14672-14678.

Brierley GP, Jurkowitz M, Scott KM y Merola AJ. (1971). Ion transport by heart mitochondria. XXII. Spontaneous, energy-linked accumulation of acetate and phosphate salts of monovalent cations. Arch. Biochem. Biophys. **147** : 545-556.

Brierley GP, Knight VA y Settlemire CT. (1968). Ion transport by heart mitochondria. XII. Activation of monovalent cation uptake by sulfhydryl group reagents. J. Biol. Chem. **243**:5035-5043.

Brierley G.P, Murer E, Bachmann E. y Green D. E. (1963). Studies on ion transport. II The accumulation of inorganic phosphate and magnesium ions by heart mitochondria. J. Biol. Chem. **238** : 3482-3489.

Brown GC y Cooper CE. Bioenergetics (1995). A Practical Approach. In Membrane permeability and transport. Published in the United States by Oxford University Press Inc., New York pp. 17-37.

Bui DM, Gregan J, Jarosch E, Ragnini A, Schweyen RJ. (1999). The bacterial magnesium transporter CorA can functionally substitute for its putative homologue Mrs2p in the yeast inner mitochondrial membrane. J. Biol. Chem. **274** : 20438-20443.

Cadenas S y Brand MD. (2000). Effects of magnesium and nucleotides on the proton conductance of rat skeletal-muscle mitochondria. Biochem. J. **348** : 209-213.

Carafoli E, Rossi ST y Lehninger AL (1964). Cation and anion balance during active accumulation of Ca^{2+} and Mg^{2+} by isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* **239** : 3055-3061.

Castrejón V, Parra C, Moreno R, Pena A y Uribe S. (1997). Potassium collapses the r P in yeast mitochondria while the rate of ATP synthesis is inhibited only partially: modulation by phosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* **346** : 37-44.

Chateaubodeau GA, Guerin M y Guerin B. (1976). Permeability of yeast mitochondrial internal membrane: structure-activity relationship *Biochimie.* **58** : 601-610.

Chavez E, Jung DW y Brierley GP. (1977). Energy-dependence exchange of K^+ in heart mitochondria. K^+ efflux. *Arch. Biochem. Biophys.* **183** : 460-470.

Cortés P, Castrejón V, Sampedro JG y Uribe S. (2000). Interactions of arsenate, sulfate and phosphate with yeast mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **1456** : 67-76.

Crompton M, Capano M, Carafoli E. (1976). Respiration-dependent efflux of magnesium ions from heart mitochondria. *Biochem. J.* **154** : 735-742.

De Kloet SR, Wermeskerken Van y Konigsberger VV. (1961). Studies of protein synthesis by protoplasts of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biochim. Biophys. Acta.* **47** : 138.

De Vries S, Marres CA. (1987). The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* **895** : 205-239.

Diwan JJ. (1985). Ba^{2+} uptake and the inhibition by Ba^{2+} of K^+ flux into rat liver mitochondria. *J. Membr. Biol.* **84** : 165-171.

Diwan JJ. (1986). Effect of quinine on mitochondrial K^+ and Mg^{2+} flux. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **135** : 830-836.

Diwan JJ. (1987). Mitochondrial transport of K^+ and Mg^{2+} . *Biochim. Biophys. Acta.* **895**:155-165.

Diwan JJ, Daze M, Richardson R y Aronson D. (1979). Kinetics of Mg^{2+} flux into rat liver mitochondria. *Biochemistry.* **18** : 2590-2595.

Diwan JJ, Delucia A. y Rose PE. (1983). Interacting effects of dibutylchloromethyltin chloride, 2,3-dimercaptopropanol, and other reagents on mitochondrial respiration and K^+ flux. *J. Bioenerg. Biomembr.* **15** : 277-288.

Diwan JJ, Haley T y Sanadi DR. (1988). Reconstitution of transmembrane K^+ transport with a 53 kilodalton mitochondrial protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153** : 224-230.

Diwan JJ y Lehrer PH. (1977). Inhibition of mitochondrial potassium ion flux by thallos ions. *Biochem. Soc. Trans.* **5** : 203-205.

Diwan JJ y Lehrer PH. (1978). Effects on mitochondrial K^+ flux of pH, K^+ concentration, and N-ethyl maleimide. *Membr. Biochem.* **1** : 43-60.

Diwan JJ, Moore C, Haley T, Herbrandson H. y Sanadi D.R. (1987). in *Advances in Membrane Biochemistry and Bioenergetics* (Kim C.H, Tedeschi H, Diwan J.J. and Salerno J.C. eds), Plenum Press, New York. pp. 401-408.

Diwan JJ, Srivastava J, Moore C y Haley T. (1986). Stimulation of K^+ flux into mitochondria by phenylarsine oxide. *J. Bioenerg. Biomembr.* **18** : 123-134.

Diwan JJ y Tedeschi H. (1975). K^+ fluxes and the mitochondrial membrane potential. *FEBS. Lett.* **60** : 176-179.

Estabrook RW. (1967). Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurements of ADP : O ratios. *Methods. Enzymol.* **10** 41-47.

Flatman PW. (1984). Magnesium transport across cell membranes. *J. Membr. Biol.* **80** : 1-14.

Flatman PW. (1993). Magnesium and the cell, (Birch, N. J., ed.), Academic Press, New York., pp. 197-216.

Garlid KD (1980). On the mechanism of regulation of the mitochondrial K^+/H^+ exchanger. *J. Biol. Chem.* **255** : 11273-11279.

Garlid K.D. (1988). Mitochondrial volume control. In Integration of mitochondrial function (Lemaster J.J, Hackenbrock C.R., Thurman R.G. and Westerhoff H.V Eds.). Plenum Publishing, New York. pp. 257-276.

Garlid KD. (1996). Cation transport in mitochondria the potassium cycle. Biochim. Biophys. Acta. **1275** : 123-126.

Garlid K.D. (1998). Physiology of Mitochondria. In Cell Physiology. Source Book. Edited by Nicholas Sperelakis Academic Press. San Diego California United States pp. 111-118.

Garlid KD y Beavis AD. (1985). Swelling and contraction of the mitochondrial matrix. II. Quantitative application of the light scattering technique to solute transport across the inner membrane. J. Biol. Chem. **260** : 13434-13441.

Garlid KD, DiResta DJ, Beavis AD y Martin WH. (1986). On the mechanism by which dicyclohexylcarbodiimide and quinine inhibit K^+ transport in rat liver mitochondria. J. Biol. Chem. **261** : 1529-1535.

Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Sun X y Schindler PA. (1996b). The mitochondrial K_{ATP} channel as a receptor for potassium channel openers. J. Biol. Chem. **271** : 8796-8799.

Gauthier LM y Diwan JJ. (1979). Inhibition of K^+ flux into rat liver mitochondria by dicyclohexylcarbodiimide. Biochem. Biophys. Res. Commun. **87** : 1072-1079.

George GA y Heaton FW. (1975). Changes in cellular composition during magnesium deficiency. *Biochem. J.* **152** : 609-615.

Gornal GA, Bardavill JC y David MM. (1949). Determination of serum protein by means of the biuret reaction *J. Biol. Chem.* **177** : 751-766.

Gregan J, Bui DM, Pillich R, Fink M, Zsurka G, Schweyen RJ. (2001). The mitochondrial inner membrane protein Lpe10p, a homologue of Mrs2p, is essential for magnesium homeostasis and group II intron splicing in yeast. *Mol. Gen. Genet.* **264** : 773-781.

Guerin B, Bunoust O, Rouqueys V y Rigoulet M. (1994). ATP-induced unspecific channel in yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **269** : 25406-25410.

Gunther T. (1986). Functional compartmentation of intracellular magnesium. *Magnesium.* **5**: 53-59.

Gunter TE y Pfeiffer DR. (1990). Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol.* **258** : C755-786.

Halestrap AP, Quinlan PT, Whipps DE y Armston AE. (1986). Regulation of the mitochondrial matrix volume in vivo and in vitro. The role of calcium. *Biochem. J.* **236**:779-787.

Halestrap AP. (1989). The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* **973** : 355-382.

Johnson JH y Pressman BC. (1969). Rates of exchange of mitochondrial Mg^{2+} determined from ^{28}Mg flux measurements. *Arch. Biochem. Biophys.* **132** : 139-145.

Jung DW, Apel L y Brierley GP. (1990). Matrix free Mg^{2+} changes with metabolic state in isolated heart mitochondria. *Biochemistry.* **29** : 4121-4128.

Jung DW, Bradshaw PC y Pfeiffer DR. (1997). Properties of a cyclosporin-insensitive permeability transition pore in yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **272** : 21104-21112.

Jung DW y Brierley GP. (1979). Energy-dependent contraction of swollen heart mitochondria activation by butacaine. *Arch. Biochem. Biophys.* **193** : 76-87.

Jung DW, Brierley GP. (1994). Magnesium transport by mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **30** : 527-535.

Jung DW, Chavez E y Brierley GP. (1977). Energy-dependent exchange of K^+ in heart mitochondria. K^+ influx. *Arch. Biochem. Biophys.* **183** : 452-459.

Jung DW, Shi GY y Brierley GP. (1980). N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide inhibits monovalent cation influx but not cation/proton exchange in heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **255** : 408-412.

Kun E. (1976). Kinetics of ATP-dependent Mg^{2+} flux in mitochondria. *Biochemistry.* **15**:2328-2336.

LaNoue K, Mizani SM y Klingenberg M. (1978). Electrical imbalance of adenine nucleotide transport across the mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **253** : 191-198.

Ligeti E y Horvath LI. (1980). Effect of Mg^{2+} on membrane fluidity and K^+ transport in rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **600** : 150-156.

MacDiarmid CW, Gardner RC. (1998). Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* magnesium transport system confers resistance to aluminum ion. *J. Biol. Chem.* **273** : 1727-1732.

Maguire ME. (1988). Magnesium and cell proliferation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **551** : 201-217.

Maguire ME. (1993). In *Magnesium and the cell*, (Birch, N. J., ed.), Academic Press, New York, pp. 157-176.

Manon S, Guerin M. (1992). K^+/H^+ exchange in yeast mitochondria: sensitivity to inhibitors, solubilization and reconstitution of the activity in proteoliposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1108** : 169-176.

Manon S, Roucou X, Guerin M, Rigoulet M y Guerin B. (1998). Characterization of the yeast mitochondria unselective channel: a counterpart to the mammalian permeability transition pore? J. Bioenerg. Biomembr. **30** : 419-429.

Martin WH, Beavis AD y Garlid KD. (1984). Identification of an 82,000-dalton protein responsible for K^+/H^+ antiport in rat liver mitochondria. J. Biol. Chem. **259** : 2062-2065.

Martin WH, DiResta DJ y Garlid KD. (1986). Kinetics of inhibition and binding of dicyclohexylcarbodiimide to the 82,000-dalton mitochondrial K^+/H^+ antiporter. J. Biol. Chem. **261** : 12300-12305.

Masini A., Ceccarelli-Stanzani D. y Muscatello U. (1981). Effect of the external magnesium ion concentration on functional steady states of isolated rat liver mitochondria. IRCS. Med. Sci. Biochem. **9** : 769-770.

Masini A., Ceccarelli-Stanzani D. y Muscatello U. (1982). Requirement of Mg^{2+} ions for the transition for steady-state 3 to steady-state 4 in insolated rat liver mitochondria. IRCS. Med. Sci. Biochem. **10** : 1038-1039.

Masini A., Ceccarelli-Stanzani D. y Muscatello U. (1983). The role of Mg^{2+} ions in controlling the configurational changes in isolation rat liver mitochondria. IRCS. Med. Sci. Biochem. **11** : 166-167.

Mitchell P y Moyle J. (1969). Translocation of some anions cations and acids in rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **9** : 149-155.

Nakashima RA, Dordick RS y Garlid KD. (1982). On the relative roles of Ca^{2+} and Mg^{2+} in regulating the endogenous K^+/H^+ exchanger of rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **257**:12540-12545.

Nosek MT, Dransfield DT y Aprille JR. (1990). Calcium stimulates ATP-Mg/Pi carrier activity in rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **265** : 8444-8450.

Novgorodov SA, Kultayeva EV, Yaguzhinsky LS y Lemeshko VV. (1987). Ion permeability induction by the SH cross-linking reagents in rat liver mitochondria is inhibited by the free radical scavenger, butylhydroxytoluene. *J. Bioenerg. Biomembr.* **19**:191-202.

Peña A, Pina MZ, Escamilla E y Pina E. (1977). A novel method for the rapid preparation of coupled yeast mitochondria. *FEBS. Lett.* **80** : 209-213.

Polimeni PI y Page E. (1973). Magnesium in heart muscle. *Circ. Res.* **33** : 367-374.

Prieto S, Bouillaud F y Rial E. (1995). The mechanism for the ATP-induced uncoupling of respiration in mitochondria of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **307** : 657-661.

Prieto S, Bouillaud F y Rial E. (1996). The nature and regulation of the ATP-induced anion permeability in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **334** : 43-49.

Romani A, Dowell E y Scarpa A. (1991). Cyclic AMP-induced Mg^{2+} release from rat liver hepatocytes, permeabilized hepatocytes, and isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* **266**:24376-24384.

Romani A, Marfella C y Scarpa A. (1993a). Regulation of magnesium uptake and release in the heart and in isolated ventricular myocytes. *Circ. Res.* **72** : 1139-1148.

Romani A, Marfella C y Scarpa A. (1993b). Hormonal stimulation of Mg^{2+} uptake in hepatocytes. Regulation by plasma membrane and intracellular organelles. *J. Biol. Chem.* **268** : 15489-15495.

Romani A y Scarpa A. (1992). Regulation of cell magnesium. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**:1-12.

Romani AM y Scarpa A. (2000). Regulation of cellular magnesium. *Front. Biosci.* **5** : D720-734.

Roucou X, Manon S y Guerin M. (1997a). Conditions allowing different states of ATP- and GDP-induced permeability in mitochondria from different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1324** : 120-132.

Roucou X, Manon S y Guerin M. (1997b). Modulation of the electrophoretic ATP-induced K^+ transport in yeast mitochondria by delta pH. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **43** : 53-61.

Rutter GA, Osbaldeston NJ, McCormack JG y Denton RM. (1990). Measurement of matrix free Mg^{2+} concentration in rat heart mitochondria by using entrapped fluorescent probes. *Biochem. J.* **271** : 627-634.

Sanadi DR, Hughes JB y Joshi S. (1981). Activation of potassium-dependent H^+ efflux from mitochondria by cadmium and phenylarsine oxide. *J. Bioenerg. Biomembr.* **13** : 425-431.

Schuster SM y Olson MS. (1974). Studies of the energy-dependent uptake of divalent metal ions by beef heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **249** : 7151-7158.

Singh AP y Nicholls P. (1984). Energized transport of potassium ions in the absence of valinomycin by cytochrome c oxidase-reconstituted vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* **777**:194-200.

Skulskii IA, Saris NE y Glasunov VV. (1983). The effect of the energy state of mitochondria on the kinetics of unidirectional cation fluxes. *Arch. Biochem. Biophys.* **226**:337-346.

Sloane BF, Scarpa A y Somlyo AP. (1978). Vascular smooth muscle mitochondria: magnesium content and transport. *Arch. Biochem. Biophys.* **189** : 409-416.

Sorgo R, Zhang CJ y Tedeschi H. (1985). The internal concentration of K^+ in isolated rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **806** : 272-276.

Trautschold, I., W. Lamprecht, y G. Schweitzer. (1985). UV method with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. En Bergmeyer (Ed) *Methods in Enzymatic Analysis.* **7**:346-357.

Uribe S, Sanchez N, Pena A. (1991). Effects of K^+ and other monovalent cations on yeast mitochondria. *Biochem. Int.* **4** : 615-623.

Uribe S, Rangel P y Pardo JP. (1992). Interactions of calcium with yeast mitochondria. *Cell Calcium.* **13** : 211-217.

Uribe S, Rangel P, Pardo JP y Pereira-Da-Silva L. (1993). Interactions of calcium and magnesium with the mitochondrial inorganic pyrophosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **217** : 657-660.

Velours J, Rigoulet M y Guerin B. (1977). Protection of yeast mitochondrial structure by phosphate and other H^+ donating anions. *FEBS. Lett.* **81** : 18-22.

Villalobo A, Briquet M, Goffeau A. (1981). Electrogenic proton ejection coupled to electron transport through the energy-conserving site 2 and K^+/H^+ exchange in yeast mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **637** : 124-129.

Walker GM. (1986). Magnesium and cell cycle control: an update. *Magnesium*. **5** : 9-23.

Welihinda AA, Trumbly RJ, Garlid KD, Beavis AD. (1993). On the regulation of Na^+/H^+ and K^+/H^+ antiport in yeast mitochondria: evidence for the absence of an Na^+ selective Na^+/H^+ antiporter. *Biochim. Biophys. Acta*. **1144** : 367-373.

Williams, RJP. (1993). In *Magnesium and the cell*, (Birch, N. J., ed.), Academic Press, New York. pp. 15-30.

Zoccarato F, Rugolo M, Siliprandi D y Siliprandi N. (1981). Correlated effluxes of adenine nucleotides, Mg^{2+} and Ca^{2+} induced in rat-liver mitochondria by external Ca^{2+} and phosphate. *Eur. J. Biochem*. **114** : 195-199.

Zsurka G, Gregan J, Schweyen RJ. (2001). The human mitochondrial Mrs2 protein functionally substitutes for its yeast homologue, a candidate magnesium transporter. *Genomics*. **72** : 158-168.

Anexo 1

Composición del Medio de cultivo de levaduras (Kloett)

KH_2PO_4	2.0 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.513 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.382 g
Bacto peptona	5.0 g
Extracto de Levadura	2.5 g
Lactato de sodio al 50%	7.12 ml
Glucosa	40.0 g
Agua c. b. p	1.0 l

Esterilizar a 120°C por 15 minutos.