

UAM-I
✓ CBS

CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DE LOS
COMPLEJOS DE NIGERICINA CON CATIONES
METALICOS. RELACION CON SU ACTIVIDAD
IONOFORETICA.*

TESIS QUE PRESENTA EL

✓ BIOL. RAUL ALVA GARCIA

PARA OBTENER EL GRADO DE

✓ MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA

MEXICO, D.F., MARZO DE 1989

APOYADO PARCIALMENTE POR EL FONDO RICARDO J. ZEVEDA, 44/86 Y 169/87

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

087383

La Maestria en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa cuenta con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por medio del subsidio 2115-007945 para el fortalecimiento del postgrado nacional.

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 Dr. Eduardo Arzt, el Dr. Jorge Cerbón, el Biol. Gonzalo de Allende, el M. en C. Miguel Angel Elizondo, el Ing. Gaspar Mayor, el Dr. Yunny Meas, el M. en C. Jorge Morales, la M. en C. Erika Piedras, la Biol. Blanca Rivera y la Dra. Ligia Toro.

Esta Tesis también contó, en parte de la producción experimental, con la contribución y competente ayuda de Antonio Lugo, estudiante de la Carrera de Biología Experimental y el invaluable apoyo de Ma. Eugenia Ramírez, estudiante de Ingeniería Bioquímica Industrial.

Mi más sincero agradecimiento con el Dr. Sergio Estrada Orihuela, la M. en C. Mireya Toro Calzada y el Dr. Antonio Campero Celis, por su encomiable estímulo, persistente guía y compromiso moral durante esta etapa de mi formación como investigador.

Finalmente, agradezco a Rubén Elizalde el software proporcionado y a Magdalena Alva la revisión del escrito final en busca del "último error" (nobody's perfect).

Para mis padres, que desde pequeño han estimulado mi curiosidad y que poseen la fuerza titánica para levantarme todas las mañanas.

Para mis hermanos, porque siempre han proporcionado un ambiente propicio para la crítica, la discusión racional y apasionada.

Para María Eugenia, que viniste a complementar las discusiones que hacían falta y fuiste la fuerza detrás de este escrito.

Te amo con todo mi hipotálamo!

La presente Tesis se realizó bajo la tutoría del Dr. Sergio Estrada Orihuela y la asesoría de la M. en C. Mireya Toro Calzada del Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa y del Dr. Antonio Campero Celis del Departamento de Química de la División de Ciencias Básicas e Ingeniería, U.A.M.I.

El trabajo experimental se llevó a cabo, en gran parte, dentro de los laboratorios de Bioquímica y Biofísica del Área de Investigación Básica del Depto. de Ciencias de la Salud, U.A.M.I. Los estudios de espectroscopia de EPR se hicieron en el Depto. de Química, U.A.M.I., mientras que los espectros de $^1\text{H-NMR}$ se corrieron en el Departamento de Química del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, gracias a la participación del Dr. Jorge Cerbón del Departamento de Bioquímica del mismo Centro.

Esta Tesis fue escrita en una computadora personal DENKI Corona con un procesador de palabra WordStar, v. 3.30; las tablas y los pies de figura se elaboraron con el programa Flow Charting II+, v. 2.40 y se imprimió en una impresora Laser-Jet Hewllet-Packard.

PROLOGO

El estudio de las características estructurales de los complejos del antibiótico políeter nigericina con diversos cationes metálicos y de tierras raras busca contribuir a sentar las bases moleculares de la relación que guardan las variaciones en su estructura con su capacidad de discriminación entre diferentes metales para, en su caso, correlacionarla con su actividad ionoforética. Con este propósito en mente, el presente trabajo se planteó los siguientes objetivos particulares: 1. identificar la posibilidad de que la nigericina forme complejo con cationes metálicos di- y trivalentes para ampliar su rango de selectividad iónica; 2. determinar las características estructurales de los complejos de la nigericina con cationes metálicos mono-, di- y trivalentes para relacionarla con la flexibilidad estructural mostrada por este políeter; 3. determinar las constantes de afinidad iónica de la nigericina con metales mono-, di- y trivalentes para correlacionarla con su capacidad de atrapar y liberar cationes metálicos en procesos de transporte. Se encontró que la nigericina tiene un perfil de interacción iónica que abarca desde los metales alcalinos y alcalinotérreos (Li, Na, K, Rb, Cs y Ca) hasta metales de transición y tierras raras (Cu, Fe, y Pr), además de que se discriminan, por primera vez en el campo a nivel internacional, los eventos fisicoquímicos que constituyen al transporte iónico mediado por el ionóforo carboxílico nigericina.

R. A. G., Iztapalapa, D.F., marzo, 1989.

INDICE

PROLOGO

CAPITULO I. INTRODUCCION	1
1. LOS SERES VIVOS COMO SISTEMAS TERMODINAMICOS	2
2. EL TRANSPORTE EN SISTEMAS BIOLOGICOS	4
3. LOS ANTIBIOTICOS POLIETERES COMO TRANSPORTADORES MODELO	6
4. LAS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS Y EL TRANSPORTE	9
5. LA FLEXIBILIDAD MOLECULAR DE LA NIGERICINA	11
6. OBJETIVO	13
7. DISEÑO EXPERIMENTAL	14
 CAPITULO II. METODOS	 15
1. FORMACION DE COMPLEJOS	15
A. Saturación	15
B. Formación <u>in situ</u>	17
a) Titulación potenciométrica	18
b) Titulación colorimétrica	19
2. IDENTIFICACION DE COMPLEJOS	20
A. Espectroscopia Ultravioleta/ Visible	20

B. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Protón	20
C. Espectroscopia de Resonancia Paramagnética del Electrón	21
3. CONSTANTES DE FORMACION	22
 CAPITULO III. RESULTADOS	24
1. FORMACION DE COMPLEJOS	24
A. Saturación	24
B. Formación <u>in situ</u>	26
a) Titulación potenciométrica	26
b) Titulación colorimétrica	27
2. IDENTIFICACION DE COMPLEJOS	28
A. Espectroscopia Ultravioleta/ Visible	29
B. Resonancia Magnética Nuclear de Protón	31
C. Resonancia Paramagnética del Electrón.	32
3. CONSTANTES DE FORMACION	33
 CAPITULO IV. DISCUSION	35
1. SE AMPLIA EL PERFIL DE INTERACCION IONICA DE LA NIGERICINA	35
2. CARACTERISTICAS ESPECTROSCOPICAS DE LOS COMPLEJOS NIGERICINA-CATION	43
3. LA SELECTIVIDAD IONICA DE LA NIGERICINA Y SU RELACION CON EL TRANSPORTE	49

4. CONSECUENCIAS BIOLOGICAS DEL COMPORTAMIENTO DE LOS POLIETERES CARBOXILICOS. UNA PROPUESTA	53
CAPITULO V. CONCLUSIONES	57
1. ANTIBIOTICOS POLIETERES POLIVALENTES	57
2. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS Y BIOLOGICAS	58
3. MODELO DE COMPLEJACION Y TRANSPORTE	59
CAPITULO VI. BIBLIOGRAFIA	60

CAPITULO I. INTRODUCCION

"En ciencias exactas, causa y efecto no son mas que eventos ligados en secuencia. . . si los procesos que llamamos metabolismo y transporte representan eventos en una secuencia, no sólo puede el metabolismo ser causa del transporte, sino también el transporte puede ser la causa del metabolismo."

Peter Mitchell.

El presente trabajo trata sobre las "Características estructurales de los complejos de nigericina con cationes metálicos y su relación con su actividad ionoforética". El objetivo que persigue -mediante una revisión selectiva de la literatura del campo y la aportación de información original específica- es el de contribuir a establecer las bases de la relación que guardan las variaciones físicas y químicas de los complejos que pueda formar el antibiótico políeter nigericina con distintos cationes metálicos, con su capacidad para discriminarlos y en su caso, correlacionarla con la actividad ionoforética de este antibiótico. Estas variaciones tienen características novedosas que son de gran interés biológico.

1. LOS SERES VIVOS COMO SISTEMAS TERMODINAMICOS.

Todo lo que existe en el universo está formado por materia y energía; una forma en 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 inanimada (Lehninger, 1982). Qué es lo que marca esta diferencia entre lo vivo y lo no vivo?

Un ser vivo es un sistema que intercambia materia y energía con el medio circundante, manteniéndose en un estado de equilibrio dinámico -llamado metaestable o estacionario (von Bertalanfi, 1968)- por lo que desde el punto de vista de un termodinámico se trata de un sistema abierto. Mas no sólo eso, sino que 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 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 caracteriza a la vida (Young, 1971). La materia viviente presenta, además, la propiedad de mantener este patrón de actividades constante, pues esto representa su perpetuación. Por ello, todas las actividades realizadas por un organismo están dirigidas a mantener la constancia de esta organización. Esto ocurre a pesar de los cambios constantes que se suceden en el medio que los rodea. Esta propiedad, 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 gasto de energía.

Recientemente se ha establecido que la vida no puede ser definida por una estructura determinada o por una serie de componentes, sino por la intrincada relación dinámica que guardan estos entre sí mismos (Sagan, 1980) y, a su vez, con el ambiente. 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 conformado por las mismas sustancias en dos momentos diferentes.

Un organismo difiere notablemente de su medio externo, pues concentra y excluye -dentro de sus límites- ciertos componentes en una organización determinada (Danielli, 1975). Este 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 gasto de energía y para tolerar este déficit, el organismo dirige otras actividades apropiadas para obtener más materia y energía.

Como se ha hecho evidente, los sistemas vivientes, para mantenerse en sus estados semiconstantes, deben gastar energía y 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 del sistema de regresar al equilibrio. Y esa tendencia aumenta conforme el sistema se aleja aun 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.

2. EL TRANSPORTE EN SISTEMAS BIOLÓGICOS.

Ya que está establecido que los seres vivos difieren de su entorno, salta a la vista el hecho de que deben poseer alguna frontera física o estructura que mantenga la integridad del organismo. Simplemente no existen organismos vivientes, sin importar su simpleza o complejidad, que no posean una frontera física -o membrana- que los separe del ambiente (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). Aún 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, 1982; Jencks, 1983).

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 col., 1978). La transferencia o transporte de especies iónicas a través de las membranas biológicas genera pequeños gradientes de potencial eléctrico (Estrada-O., 1983) que son componentes vitales para la formación de la fuerza químico-motriz responsable de la producción de energía biológica en forma de trifosfato de adenosina (ATP) (Mitchell, 1961).

La mayoría de las membranas biológicas están formadas 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) -de matriz lipídica- con consistencia de mosaico asimétrico fluido (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

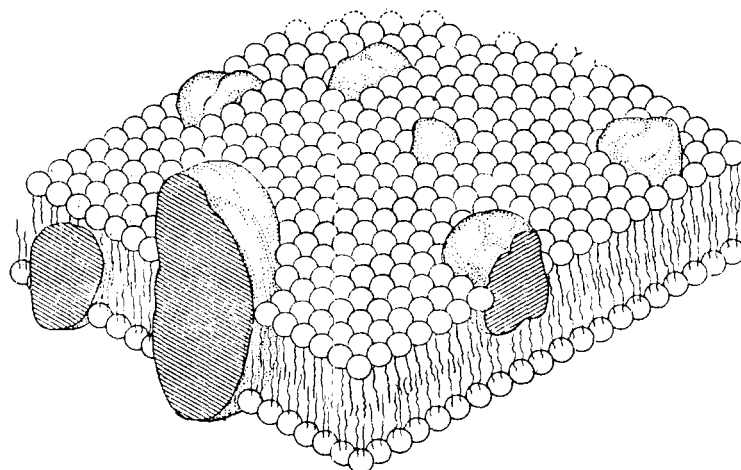


Figura 1. Modelo de mosaico fluido (Singer y Nicolson, 1972) de las membranas biológicas (Tomado de Lehninger, 1985). La membrana consiste de una bicapa de fosfolípidos con proteínas globulares incorporadas a diferentes niveles. Las pequeñas esferas representan a los grupos fosfato asociados al agua; las hebras delgadas son las colas hidrofóbicas que constituyen la matriz o seno de la membrana.

Tabla I. Características generales de los Políterres Carboxílicos.^a

Políter	Especie Productora ^b	Algunos Efectos Biológicos ^c
Alborixina	<i>S. hygroscopicus</i> , <i>S. albus</i>	
Ionomicina	<i>S. hygroscopicus</i> , <i>S. conglobatus</i>	
Nigericina	<i>S. hygroscopicus</i> , <i>S. albus</i> , <i>S. violaceoniger</i>	Aumenta Em; abate transporte de serotonina; aumenta lactato
Carriomicina	<i>S. hygroscopicus</i>	
Dianemicina	<i>S. hygroscopicus</i>	Aumenta la contractilidad cardíaca
Eteromicina	<i>S. hygroscopicus</i>	
Lenoremicina	<i>S. hygroscopicus</i>	Aumenta la contractilidad cardíaca
Leuseramicina	<i>S. hygroscopicus</i>	
Septamicina	<i>S. hygroscopicus</i> , <i>S. albus</i>	Aumenta la contractilidad cardíaca
Salinomicina	<i>S. albus</i>	Aumenta la contractilidad cardíaca
Grisorixina	<i>S. albus</i> , <i>S. griseus</i>	
Narasina A	<i>S. aureofaciens</i>	
Lisocelina	<i>S. cacaoi asoensis</i> , <i>S. longwoodensis</i>	Aumenta la contractilidad cardíaca
Calcinicina	<i>S. chartreusis</i>	Regula flujos de Mg^{2+} y Sr^{2+} ; abate Em; altera [AMPc], [GMPc]
Monensina	<i>S. cinnamomensis</i>	Aumenta Em; abate transporte de serotonina; aumenta [GMPc]
Lasalócido A	<i>S. lasaliensis</i>	Flujo de aminos; abate Em; inhibe síntesis de ADN, ARN

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

^bTodas estas especies pertenecen al género Streptomyces.

^cLos símbolos empleados significan: Em, potencial de membrana; Mg^{2+} , magnesio; Sr^{2+} , estroncio; [AMPc], concentración de AMP cíclico; [GMPc], concentración de GMP cíclico.

iónicas, por lo que las células de los organismos contienen -en sus membranas- mecanismos de translocación de iones o acarreadores que facilitan el transporte iónico a través de los lípidos membranales (Racker, 1979; Schultz, 1980).

El transporte vectorial de iones lo realizan las proteínas inmersas en las membranas biológicas (Kotik, 1983). La direccionalidad del transporte respecto a la membrana es sumamente importante (Mitchell, 1961) ya que, al separar componentes permeables e impermeables entre compartimientos, se incrementa la magnitud de los gradientes químicos o eléctricos y es capaz de regular la vía de los procesos metabólicos (Sauer, 1983), sea en el sentido de las reacciones exergónicas o el de las endergónicas (Tanford, 1983).

Por lo tanto, uno de los temas 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).

3. LOS ANTIBIOTICOS POLIETERES COMO TRANSPORTADORES 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 terapéuticos antimicrobianos, anticoccidiales (Ruff, 1982) y cardioactivos (Sutko y col., 1977; Gachon y Moins, 1982;

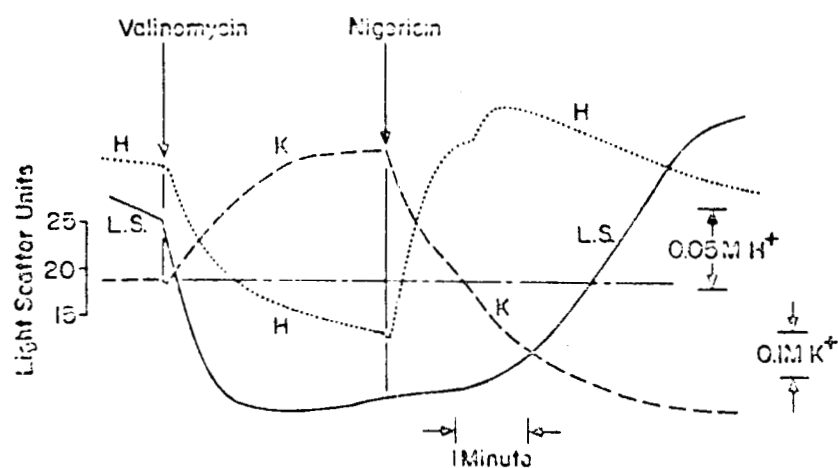


Figura 2. Efectos de valinomicina y nigericina sobre el transporte de potasio y protones en mitocondria (Tomado de Pressman, 1969).

Tabla II. Principales Poliéteres Carboxílicos publicados desde 1951.^a

Poliéter	Fórmula mínima	Peso molecular (g/mol)
Alborixina	$C_{48}H_{84}O_{14}$	885.2
Grisorixina	$C_{40}H_{68}O_{10}$	709.0
Monensina A	$C_{36}H_{62}O_{14}H_2O$	688.9
Narasina A	$C_{43}H_{72}O_{11}$	765.0
Nigericina	$C_{40}H_{68}O_{11}$	724.9
Salinomicina	$C_{42}H_{70}O_{11}$	751.0
Carriomicina	$C_{47}H_{80}O_{15}$	885.1
Dianemicina	$C_{47}H_{78}O_{14} \cdot H_2O$	885.1
Eteromicina	$C_{48}H_{82}O_{16}$	915.2
Lenoremicina	$C_{47}H_{77}O_{13}Na$	873.1
Septamicina	$C_{48}H_{81}O_{16}Na$	937.1
Ionomicina	$C_{41}H_{70}O_9Ca$	746.5
Lasalócido A	$C_{34}H_{54}O_8 \cdot C_2H_5OH$	636.9
Lisocelina	$C_{34}H_{59}O_{10}Na \cdot \frac{1}{2} H_2O$	659.8
Calcimicina	$C_{29}H_{37}N_3O_6$	523.6

^aInformación extraída de Westley (1982) y Taylor y col. (1982).

Moins y col., 1982; Osborne y col., 1982a; Hanley y Slack, 1982; Reed y Bokoch, 1982; Osborne y col., 1982b) (Tabla I). El mecanismo de la acción antimicrobiana de estos antibióticos fue descrito por primera ocasión hace ya más de dos décadas. En 1967, Estrada-O. y col. descubrieron que el modo de acción de uno de estos antibióticos, la nigericina, está asociado a su capacidad para catalizar el intercambio de potasio por protón a través de membranas lipídicas (Figura 2).

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

En ese tiempo se conocían sólo unos cuantos de estos ionóforos carboxílicos. En la Figura 3 se puede observar que dentro de este grupo de antibióticos monocarboxílicos -con propiedades de solvatación en membranas lipídicas idénticas a las de la nigericina- se encuentran el X-537 A o lasalócido A, la monensina y la dianemicina.

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 (M) que se encuentra entre 500 y 1,000 g/mol (Tabla II).

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 col., 1967; Reed, 1979; Szabo, 1981; Taylor y col., 1982; Gad y col., 1985). Estas selectividades han sido determinadas en diferentes sistemas, tanto de membranas biológicas como artificiales (Tabla III). Por esta propiedad, estos ionóforos han servido como valiosos modelos para ilustrar las características dinámicas de acarreadores en membranas (Eisenman, 1968; Pressman, 1968; Pressman, 1973), así como 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 sodio, potasio y calcio desempeñan en el metabolismo (Feinstein y col., 1977; Shamoo y Murphy, 1979; Malaisse y col., 1980; Breitbart, 1981; Reed, 1982; Lombardini, 1985; Nuñez y Glass, 1985; Soltof y Mandel, 1986), así como en sistemas naturales que transforman energía, como mitocondrias intactas (Graven y col., 1966; Graven y col., 1967; Estrada-O. y col., 1967; Pressman, 1969; Wipf y Simon, 1970; Chapel y col., 1979; Hatefi y col., 1982), partículas sub-mitocondriales (Montal y col., 1970), bacterias (Guffanti y col., 1979; Ahmed y col., 1983), bacterias fotosintéticas (Rott y Avi-Dor, 1977), partículas sub-bacteriales (Garty y col., 1979), algas (Doughty y Diehn, 1982), cloroplastos (Packer, 1967; Larkum y Boardman, 1974; Walker, 1975; Telfer

Tabla III. Selectividad de Transporte Catiónico de Poliéteres Carboxílicos.^a

Poliéter	Secuencia	Modelo Experimental
Monensina A	$\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Li}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$	Mitocondrias, eritrocitos y liposomas
Grisorixina	$\text{Ag}^+ > \text{Ti}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Rb}^+ > \text{Na}^+ > \text{Cs}^+$	Electrodo de intercambio iónico
Nigericina	$\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Na}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Li}^+$	Mitocondrias, eritrocitos y liposomas
Salinomicina	$\text{Rb}^+, \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+, \text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+}, \text{Sr}^{2+}$	Tres fases, $\text{H}_2\text{O}:\text{CCl}_4:\text{H}_2\text{O}$
Narasina A	$\text{Na}^+ > \text{K}^+, \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Li}^+ > \text{NH}_4^+$	Mitocondrias
Alborixina	$\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Na}^+, \text{Cs}^+ > \text{Li}^+$	Electrodo de intercambio iónico
Dianemicina	$\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Rb}^+, \text{Li}^+, \text{Cs}^+$	Mitocondrias, eritrocitos y liposomas
Carriomicina	$\text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Cs}^+$	Tres fases, $\text{H}_2\text{O}:\text{CCl}_4:\text{H}_2\text{O}$
Septamicina	$\text{Fe}^{2+} > \text{O}$	Liposomas
Eteromicina	$\text{K}^+, \text{Na}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Ca}^+$	Tres fases, $\text{H}_2\text{O}:\text{CHCl}_3:\text{H}_2\text{O}$
Calcimicina	$\text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mg}^{2+}, \text{Ba}^{2+}$	Liposomas
Lasalócido A	$\text{Ca}^{2+}, \text{Cs}^+ > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{etanolamina} > \text{Rb}^+ > \text{Na}^+ > \text{norepinefrina} > \text{Im}^{3+} > \text{epinefrina} > \text{isoproterenol}$	Tres fases, $\text{H}_2\text{O}:(39\% \text{CHCl}_3, 61\% \text{decano}):\text{H}_2\text{O}$

^aInformación extraída de Taylor y col. (1982).

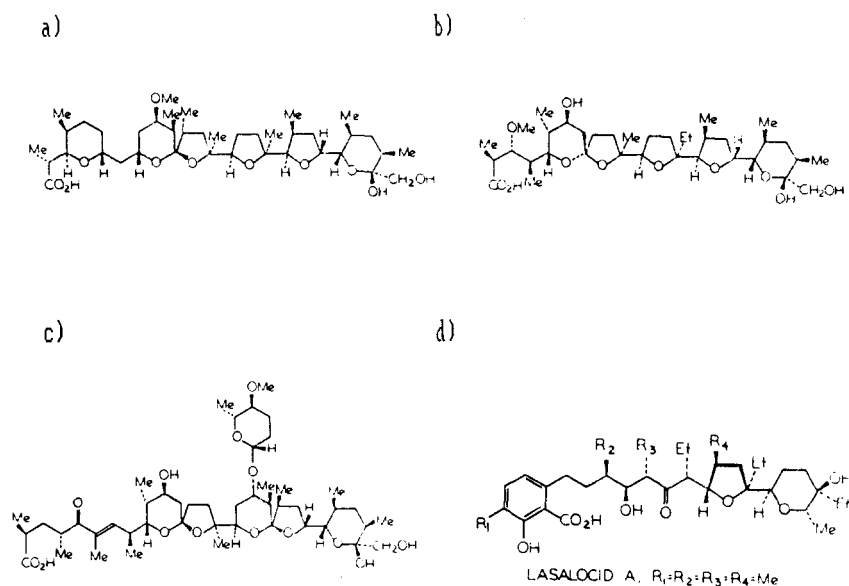


Figura 3. Estructura química de los cuatro poliéteres carboxílicos conocidos hasta 1967: a) nigericina, b) monensina, c) lasalócido A y, d) dianemicina.

y col., 1975; Ben-Hayyim y Krause, 1980), tilacoides (Bulychev y Vredenberg, 1976) y microsomas vegetales (Sze, 1980).

4. LAS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS 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 electrones 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 4). Al otro extremo de la molécula se encuentran uno o más grupos hidroxilo ($R-OH$). Son estos grupos los que pueden establecer puentes 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 col. determinaron, por difracción de rayos-X, la estructura macrocíclica cristalina de la sal de plata del ionóforo monocarboxílico nigericina. En la Figura 5 se puede observar que la esfera de hidratación del metal es sustituida por su coordinación con los oxígenos O1, O2, O5, O6 y O7 de la molécula. Posteriormente, estudios de espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón (^1H-NMR) en solución en cloroformo, realizados por Rodios y Anteunis (1977), muestran que en el complejo con sodio

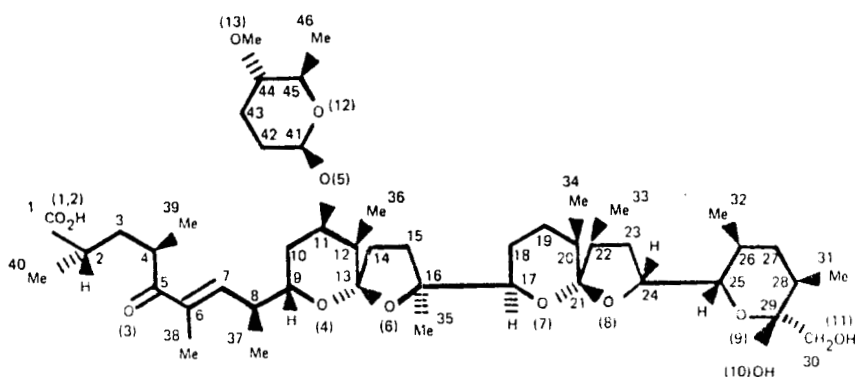


Figura 4. Estructura química general y sistema de numeración de átomos de carbono y oxígeno usados en la literatura sobre Poliéteres Carboxílicos (Tomados de Westley, 1982).

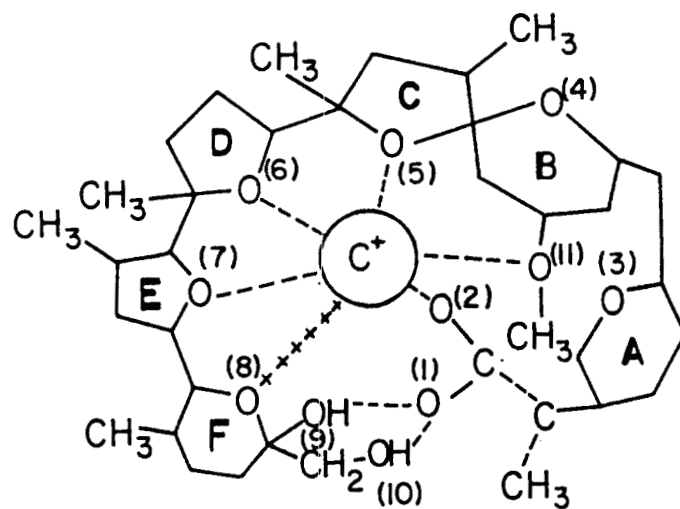


Figura 5. Estructura ciclica de coordinación de la nigericina con iones metálicos, basada en los estudios por difracción de rayos-X (Steinrauf y col., 1968) y por 1H -NMR en solución en cloroformo deuterado (Rodios y Anteunis, 1977). Tomada de Arzt (1984).

también el 08 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 antiport (K/H) mediado por la nigericina (Figura 6):

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 del ion, sino su actividad química o concentración la que mueve al ionóforo. Una vez disociado el complejo, la nigericina adquiere de nuevo la carga negativa del carboxilato; la presencia de cationes hidrógeno o protones provoca que el carboxilato se protone a carboxilo y que el ionóforo regrese al lado de donde tomó al catión potasio para sustituirlo por el protón, 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 col.

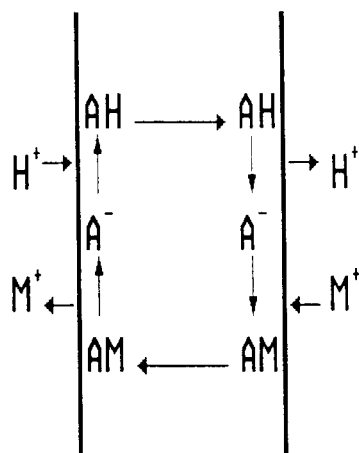


Figura 6. Modelo de transporte catiónico electroneutro -antiport- mediado por el políster monocarboxílico nigericina. Los símbolos significan: A^-) acarreador aniónico; AH) acarreador protonado; AM) complejo acarreador-metal; M^+) catión metálico; H^+) protón.

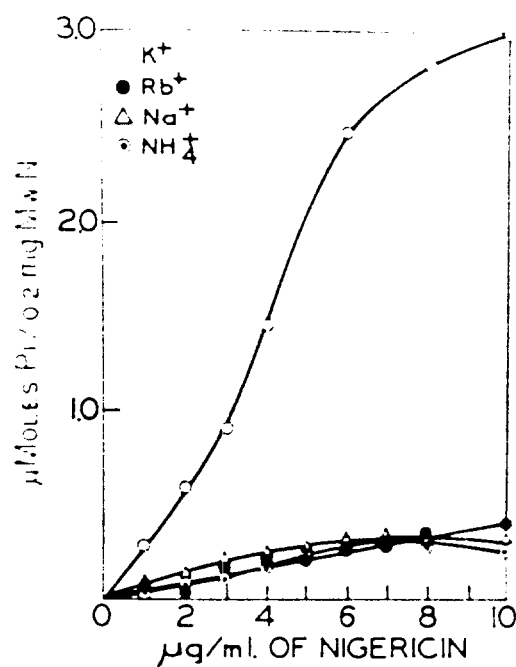


Figura 7. Efecto de la concentración de nigericina sobre la actividad de la ATPasa mitocondrial en presencia de diferentes cationes de metales alcalinos (Estrada-O. y col., 1967).

en 1967, así como los observados en membranas mitocondriales, de eritrocitos y en artificiales de fosfolípidos (Henderson y col., 1969), en las que se observa un intercambio equitativo de K/H mediado por nigericina.

5. LA FLEXIBILIDAD MOLECULAR DE LA NIGERICINA.

Sin embargo, ya en 1967, Estrada-O. y col. encontraron que, si bien a concentraciones bajas -menores de 0.1 μM - se promueve un intercambio antiport 1:1, a concentraciones mayores de polietilén, la nigericina estimula la hidrólisis de ATP en mitocondrias intactas en presencia de potasio (Figura 7), lo que -de acuerdo con la hipótesis quimiosmótica de Mitchell (1961)- sugiere que, además de actuar como intercambiador electroneutro, este ionóforo transportaba carga neta a través de la membrana, a favor del gradiente de potencial eléctrico.

Por otra parte, Taylor y col. (1982) mencionan que existe evidencia de que otros polietéres carboxílicos, como la grisorixina, 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 col. (1975) y Toro y col. (1976) demostraron, independientemente, -por 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:cation) de 2:1 (Figura 8).

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 potasio 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 potasio. Por otro lado, estos cambios en la molecularidad no afectan de modo significativo la secuencia de selectividad iónica para el transporte mediado por la nigericina (Tabla IV).

A la luz de la flexibilidad mostrada por la nigericina, Arzt (1984), trabajando en colaboración con nuestro grupo, encontró que este poliéter sí puede interactuar con litio, aunque a la fecha no existe evidencia -en los sistemas experimentales tradicionales- de que el cation sea translocado (Tablas III y IV). El espectro de $^1\text{H-NMR}$ de la nigericina se modifica notablemente en presencia de litio (Figura 9). Los ensanchamientos de algunas señales escogidas de acuerdo con los datos publicados por Rodios y Anteunis (1977), Toro y col. (1987), sugieren un cambio importante en la movilidad de estas regiones dentro de la estructura de la molécula. Estos efectos deben adjudicarse a la presencia

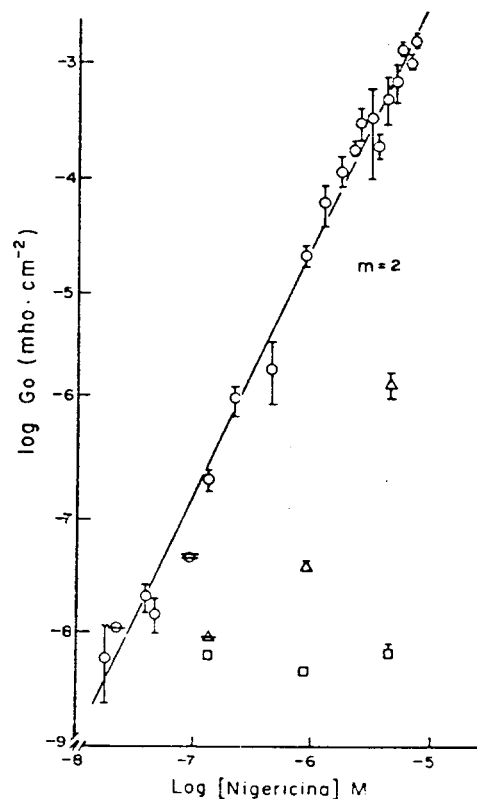


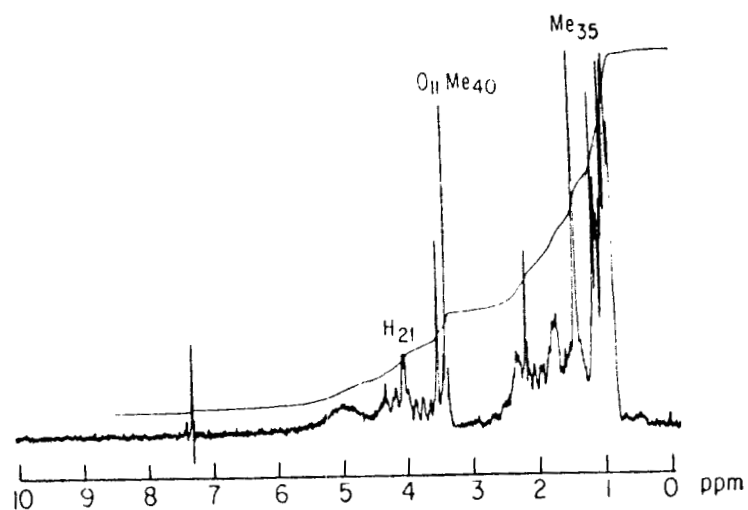
Figura 8. Efecto de la concentración de nigericina en la conductancia de BLM, a pH 8.0 en presencia de K^+ 100 mM (Toro y col., 1976).

Tabla IV. Potenciales biiónicos (E_{AB}) para bicapas lipídicas en presencia de nigericina, y su secuencia de selectividad iónica a diferentes valores de pH.^a

Electrolito A (in):B (ex)	E_{AB} (mV)	
	pH 4.0	pH 8.0
$K^+ : Rb^+$	-15	-10.87
$K^+ : Na^+$	-30	-12.6
$K^+ : Cs^+$	-28	-16.83
$K^+ : Li^+$	-36	-28.6
pH	Secuencia de Selectividad	
8.0	$K^+ > Rb^+ > Na^+ > Cs^+ > Li^+$	
4.0	$K^+ > Rb^+ > Cs^+ > Na^+ > Li^+$	

^aTomada de Toro y col. (1987).

a)



b)

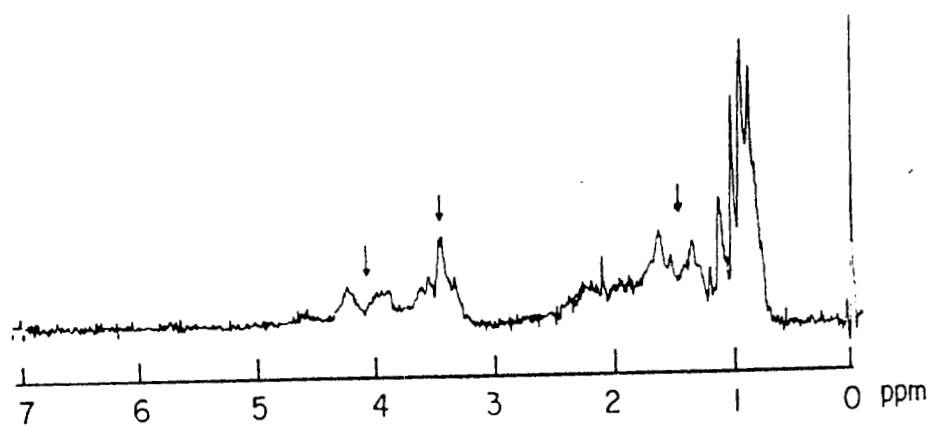


Figura 9. Espectros de ^1H -NMR a 90 MHz en CDCl_3 del ácido libre de la nigericina (a) y del complejo NIG-Li^+ (b). Se usó TMS como estándar interno (Tomados de Toro y col., 1987; y Arzt, 1984).

del catión dentro de la corona de coordinación del poliéter.

6. OBJETIVO.

Son estos hallazgos -la flexibilidad molecular mostrada por la nigericina y su aparente capacidad para interactuar con el litio que es un catión monovalente al que no transporta- los que conducen a considerar que este ionóforo monocarboxílico pueda tener un perfil de interacción iónica mucho más amplio que el supuesto hasta ahora.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es el de "contribuir a sentar las bases fisicoquímicas de la relación que guardan las variaciones estructurales de la nigericina con su capacidad de discriminación entre diferentes metales para, en su caso, correlacionarla con su actividad ionoforética".

Con este objetivo general en mente, se propusieron inicialmente los siguientes objetivos particulares:

1. Identificar la posibilidad de que la nigericina forme complejos de coordinación con cationes metálicos divalentes y trivalentes para ampliar su perfil de selectividad iónica.
2. Determinar las características estructurales de los complejos de la nigericina con cationes metálicos monovalentes, divalentes y trivalentes para relacionarla con la flexibilidad estructural mostrada por este poliéter

monocarboxílico.

3. Determinar las constantes de afinidad iónica de la nigericina con metales monovalentes, divalentes y trivalentes para correlacionarla con su capacidad para atrapar y liberar cationes metálicos en procesos de transporte.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Para alcanzar los objetivos particulares planteados, se desarrolló el siguiente diseño experimental central, complementado con otros enfoques experimentales:

1. Se intentó la formación de complejos de nigericina con los cationes de los metales Ca(II), Cu(II), Fe(III) y Pr(III) por métodos de saturación química de fases sólido/líquido (Toro y col., 1987) y por titulación in situ.

2. Los complejos así formados se caracterizaron por análisis de espectroscopia ultravioleta/visible (UV/VIS), de ¹H-NMR y de resonancia paramagnética electrónica (EPR).

3. Se determinaron las constantes de equilibrio de la reacción de formación de los complejos de nigericina:cación, en sistemas de una sola fase homogénea de características fisicoquímicas conocidas (Toro y col., 1987).

CAPITULO 2. METODOS

"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,
Lengueta de vibora y aguijón de salamandra,
Pata de lagarto y ala de lechuza,
Para un encantamiento de efecto poderoso,
Como un caldo infernal hirviente y burbujeante."

William Shakespeare, Macbeth.

1. FORMACION DE COMPLEJOS.

A. Por saturación.

Los complejos de nigericina con los cationes metálicos litio (Li(I)), calcio (Ca(II)), cúprico (Cu(II)), férrico (Fe(III)) y praseodimio (Pr(III)), se prepararon por saturación del ácido libre del ionóforo con un exceso de sal inorgánica del catión -no soluble en cloroformo- (Toro y col., 1987).

Para cada catión estudiado se tomaron 10 mg de ácido libre de nigericina, cortesía del Dr. Phillip A. Miller, la Dra. Lilian H. Sello y el Dr. John W. Westley (Hoffman-La Roche, Inc., Nutley, New Jersey); se disolvieron con 2 ml de cloroformo grado espectroscópico (Merck) en un tubo cónico (Pyrex) previamente lavado y enjuagado con cloroformo. Se agregaron 100 equivalentes de sal inorgánica correspondiente

al catión en estudio, divididos en tres partes, agitándose vigorosamente en mezcladora (Lab-Line Instruments 1290) tres minutos cada vez. Se sedimentó la sal inorgánica por centrifugación a 3000 rpm durante 15 min (Centrifuga SOL-BAT, Aparatos Científicos). Se pasó el sobrenadante (complejo nigericina-catión) a otro tubo cónico y se lavó el precipitado del primer tubo con 2 ml de cloroformo; se dejó sedimentar la sal inorgánica por gravedad y se pasó el sobrenadante al segundo tubo. Se concentró la solución de complejo a 2 ml por evaporación a baño maría, bajo corriente de nitrógeno gaseoso (INFRA). Se repitió el proceso cinco veces, hasta completar un exceso de 500 equivalentes de metal por poliéter (500:1).

Mediante una jeringa de vidrio de 3 ml se pasó el sobrenadante a través de un filtro resistente a solventes orgánicos con diámetro de poro de 0.45 micrometros (Gelman Science Acrodisc-CR 4219) a una ampollita tarada; se evaporó a sequedad a baño maría y se liofilizó durante tres horas (LABCONCO Freeze Dryer 3). Finalmente se pesó la ampollita y se calculó el rendimiento por peso.

Para incrementar el rendimiento se lavó dos veces cada tubo cónico con 2 ml de cloroformo, agitando 3 minutos cada vez; se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos y se filtraron los sobrenadantes a la ampollita tarada. Se evaporó el solvente, se liofilizó el complejo obtenido, se pesó y se calculó de nuevo el rendimiento.

Las sales utilizadas para la formación de complejos por saturación en cloroformo fueron los carbonatos de litio, de

calcio (Merck) y cúprico (J.T.Baker); los cloruros férrico hexahidratado (J.T.Baker) y de praseodimio (ICN); y el sulfato férrico n-hidratado (J.T.Baker). Todas estas sales fueron grado reactivo.

Se observaron las propiedades físicas más notables de cada complejo preparado y se corrieron espectros de absorción electrónica UV/VIS, de ^1H -NMR y de EPR.

B. Formación in situ.

La formación in situ de los complejos se hizo por titulación del ácido libre de nigericina (aproximadamente 0.1 mM) con cantidades crecientes de cloruro del catión metálico estudiado, en una mezcla homogénea con 45% (vol/vol) de dioxano grado espectroscópico (Merck) en agua destilada y desionizada (Millipore Milli-Q), con una constante dieléctrica de 38.48, ajustada a pH 7.76 con alícuotas de soluciones -en dioxano/agua 45%- de hidróxido de tetrametil amonio (TMAOH) 1.0 M, trietanol amina (TEA) 0.1 M y/o ácido clorhídrico (HCl) 0.1 N (todos fueron de Merck, grado reactivo), y a una temperatura constante de 25 ± 1 C (298 K). Todas las soluciones se prepararon frescas el mismo día del experimento.

La formación de los complejos se registró por técnicas potenciométricas o colorimétricas, dependiendo de las características fisicoquímicas de cada catión.

a) Titulación potenciométrica.

Las mediciones potenciométricas de los cationes Li(I), sodio (Na(I)), potasio (K(I)), rubidio (Rb(I)), cesio (Cs(I)) y Ca(II), se hicieron en una celda de vidrio (Pyrex) de 5 ml con agitación continua. La temperatura se mantuvo constante por medio de un flujo de agua corriente. Se siguió simultáneamente la lectura de pH y de diferencia del potencial eléctrico del catión con un electrodo combinado de vidrio (Orion 91-03 o A.H.Thomas 4094-S10) y un electrodo catión-selectivo -con un electrodo de calomel (Beckman 41239) como referencia- conectados a un par de potenciómetros (Beckman 3550 y 4500) (Toro y col., 1987).

Los electrodos selectivos para catión empleados fueron: el Beckman 39047, para litio, potasio, rubidio y cesio; el Beckman 39046 para sodio (THE BECKMAN HANDBOOK OF APPLIED ELECTROCHEMISTRY, 1980); y un electrodo Microelectrodes MI-600 para calcio. Los electrodos se dejaron equilibrar durante una semana -previa a cada experimento- en una solución 0.1 N del cloruro del catión correspondiente en agua. Su respuesta nernstiana se verificó previamente mediante curvas de calibración de diferencia de potencial eléctrico (mV) contra potencial de catión ($pM = -\log[M]$) en el medio de dioxano/agua 45% (Figuras 10, 11 y 12). Las curvas de calibración y las titulaciones, se hicieron con los cloruros de litio, sodio, potasio, rubidio, cesio y calcio, grado reactivo (Merck).

En la titulación de nigericina con Li(I), Na(I), K(I),

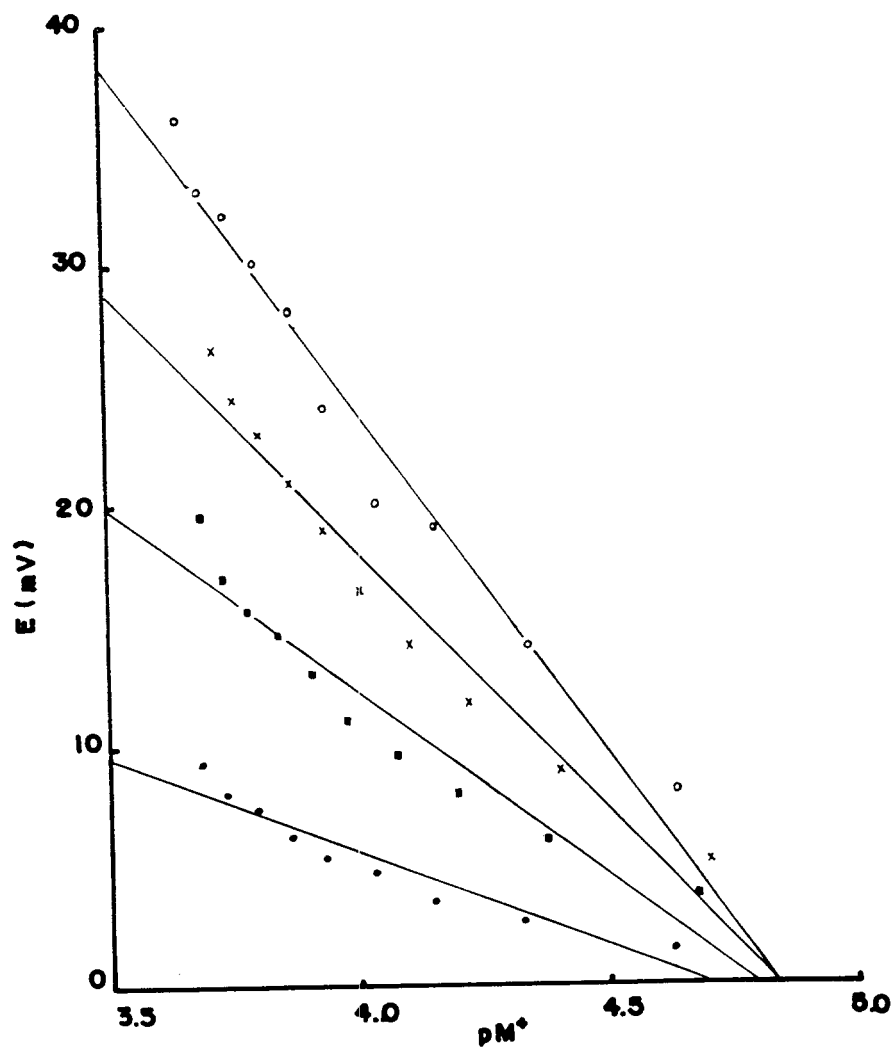


Figura 10. Curva de calibración del electrodo catiónico Beckman 39047 en solución de dioxano:agua (D:A) 45%, ajustado con TMAOH y HCl a pH 7.76. Se agregaron alícuotas de 10 μ l de soluciones salinas 8×10^{-3} M en D:A, a una celda de 4 ml con agitación continua. Las sales empleadas fueron: o LiCl, ■ KCl, x RbCl y • CsCl.

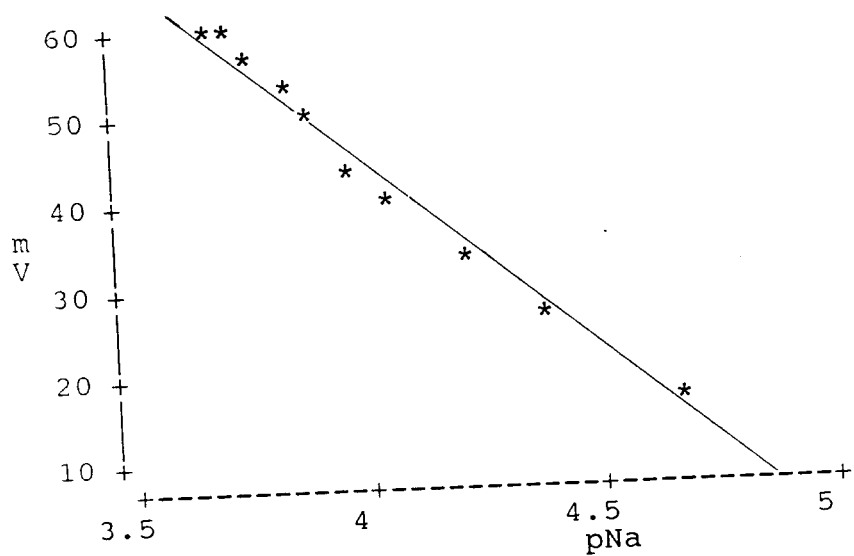


Figura 11. Curva de calibración del electrodo catiónico Beckman 39046 en las mismas condiciones que en la Figura 10. La sal empleada fue NaCl.

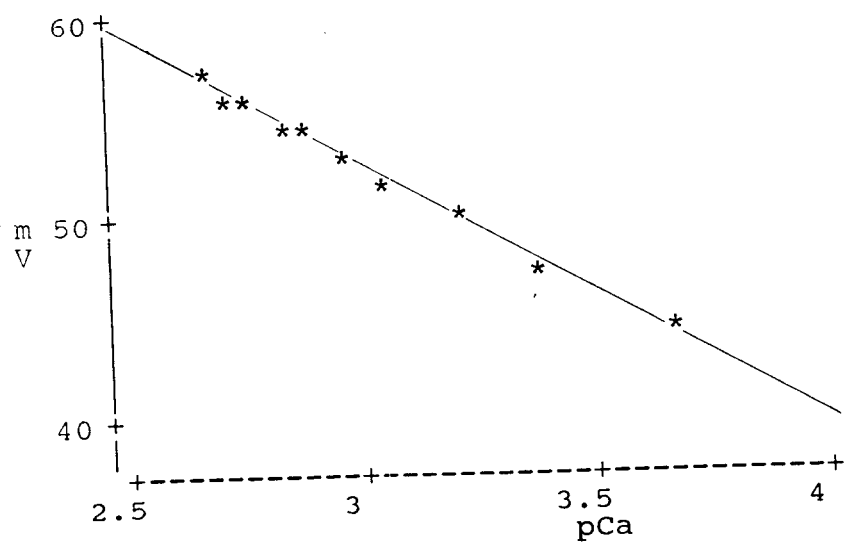


Figura 12. Curva de calibración del electrodo catiónico Microelectrodes MI-600 en las mismas condiciones que en la Figura 10. La sal empleada fue CaCl_2 .

Rb(I), Cs(I) y Ca(II), se observó la disminución en la diferencia de potencial eléctrico (mV) producido por el catión libre en presencia de poliéter (Toro y col., 1987). Suponiendo que los sitios de unión de las moléculas de nigericina son idénticos e independientes para ligar a cada uno de los cationes metálicos, se trazaron las curvas de unión, relativas a la concentración total de nigericina, de cada una de las titulaciones a temperatura constante (Tinoco y col., 1978).

b) Titulación colorimétrica.

La detección colorimétrica de la formación de los complejos de nigericina con Li(I), Ca(II) y Fe(III) se hizo en presencia de 0.05 mM del indicador metalocrómico antipirilazo III (AP-III), de ICN (Figura 13) (Scarpa y col., 1978a), en dioxano/agua 45%, en celdas cuadradas de cuarzo (1 cm de paso de luz) con una capacidad de 3 ml, con agitación continua. Los cambios en el espectro de absorción en el visible (VIS) del indicador se registraron con un espectrofotómetro ultravioleta/visible, AMINCO UV/VIS DW-2a. La temperatura ambiente se mantuvo constante mediante un acondicionador de aire (Freiven S-188-103).

Se comprobaron los cambios en los espectros de absorción electrónica, absoluto y diferencial, en el VIS del AP-III -en presencia de nigericina- en el medio de dioxano/agua, por medio de su titulación con soluciones de

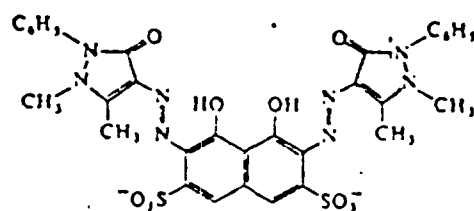
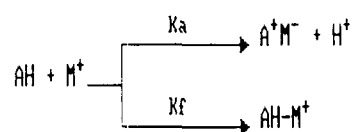


Figura 13. Estructura química del indicador metalocrómico para calcio AP-III (Tomada de Scarpa y col., 1978a).

Tabla V. Constante de equilibrio (Kf) para la reacción de formación de los complejos poliéter carboxílico-catión, en solución en una sola fase con propiedades fisicoquímicas conocidas.^a



$$\text{K}_f = \frac{[\text{AH-M}^+]}{[\text{AH}] [\text{M}^+]}$$

$$\text{K}_a = \frac{[\text{A}^-\text{M}^+] [\text{H}^+]}{[\text{AH}] [\text{M}^+]}$$

^aSe compara la ecuación de Kf con la de la constante de acidez (Ka), que corresponde a la formación de la sal poliéter carboxílico-catión. AH) poliéter protonado; M⁺) catión metálico; A⁻M⁺) sal de poliéter-catión; H⁺) protón; AH-M⁺) complejo poliéter-catión.

cloruro de litio, calcio y fierro (III).

2. IDENTIFICACION DE COMPLEJOS.

A. Espectroscopia Ultravioleta/Visible.

Con el objeto de identificar y cuantificar, tanto al ácido libre de nigericina como a los complejos formados, se corrieron los espectros de absorción electrónica en el ultravioleta (UV) del ácido libre de nigericina (Hoffman-La Roche) y de la sal de sodio de la monensina (Eli-Lilly Laboratories, Indiana) en etanol en un espectrofotómetro Beckman Acta M-IV, de 181 nm a 305 nm. Se hicieron curvas de absorbancia (A) contra concentración (c), desde 0.01 μ M hasta 0.5 mM de cada políéter.

La interacción de la nigericina con los cationes Ca(II), Cu(II), Fe(III) y Pr(III), se verificó por cambios en el espectro de absorción UV del políéter; el solvente utilizado en cada espectro se especifica en la Figura 18. Se buscaron principalmente cambios en la longitud de onda de máxima absorbancia de la nigericina en presencia de los diferentes cationes estudiados, extinción de las señales espectroscópicas características de los metales en cuestión o la aparición de señales nuevas.

B. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Protón.

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón

('H-NMR) de los complejos nigericina-Li(I), nigericina-Ca(II) y nigericina-Pr(III), formados por saturación, se realizó en solución en deuterocloroformo en un espectrómetro NMR de 90 MHz, Varian EM-390. Como estándar interno se usó tetrametilsilano (TMS). El espectro control del ácido libre de nigericina se obtuvo de una solución preparada directamente con la muestra del poliéter proporcionada por los Laboratorios Hoffman-La Roche.

Para evidenciar la interacción de los cationes de Li(I), Ca(II) y Pr(III) con el poliéter se analizaron algunas señales del espectro de 'H-NMR de la nigericina (Rodios y Anteunis, 1977): los grupos metilo 35 (Me35), vecinal al oxígeno 5 (O5); el protón 21 (H21), próximo al oxígeno 7 (O7) y el metilo 40 (Me40) unido al oxígeno 11 (O11). Estos grupos están cercanos a oxígenos de coordinación (Figura 15) y, por lo tanto, sus señales de 'H-NMR muestran ensanchamientos y corrimientos químicos importantes al interactuar con cationes metálicos (Toro y col., 1987).

C. Espectroscopia de Resonancia Paramagnética del Electrón.

Por su configuración electrónica, algunos cationes de metales de transición y de tierras raras o lantánidos poseen propiedades espectroscópicas más ricas que los iones de metales alcalinos y alcalinotérreos, por lo que cuando son estudiados por medio de resonancia paramagnética del

electrón o del spin del electrón (EPR) brindan información sobre los parámetros de su coordinación con electrones de ligandos moleculares (Wertz y Bolton, 1972).

Los espectros de EPR de los complejos de Cu(II), Fe(III) y Pr(III) con nigericina, formados por saturación, se obtuvieron en estado sólido, a temperatura ambiente, en un espectrómetro ESR Bruker ER 200 D-SRC. De cada complejo liofilizado se pesó 1 mg y se disolvió en 1 ml de cloroformo. Las muestras se pasaron, con pipeta Pasteur de talle largo, a celdas o tubos especiales para EPR (Drago, 1977) y se evaporaron a baño maría.

3. CONSTANTES DE FORMACION.

Las constantes de equilibrio de la reacción de formación (Kf) de los complejos de nigericina con los cationes Li(I), Na(I), K(I), Rb(I), Cs(I) y Ca(II) se determinaron por titulación potenciométrica -con electrodos selectivos para catión- en el medio homogéneo de una sola fase de dioxano/agua 45%, previamente descrito en FORMACION DE COMPLEJOS.

La reacción general de formación de complejos nigericina-catión considerada se muestra en la Tabla V. Los valores de las constantes de equilibrio se calcularon como el log Kf cuando las concentraciones totales de catión y poliéter en el medio son equivalentes, esto es, con nigericina 0.1 mM y cloruro de catión 0.1 mM, y considerando una estequiometría poliéter:metal de 1:1 (Toro y col.,

1987). Se hicieron un mínimo de siete titulaciones por cada cación; se calculó un log Kf en cada titulación (Arzt, 1984) y se obtuvo la media de log Kf de todos los valores.

CAPITULO III. RESULTADOS

"... 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.

Los resultados que a continuación se presentan constituyen una aportación original a la literatura internacional 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 total veracidad y certidumbre de la amplia capacidad de los antibióticos poliéteres carboxílicos para interactuar de manera íntima con una gran diversidad de cationes metálicos.

1. FORMACION DE COMPLEJOS.

A. Saturación.

En la Tabla VI se muestran las propiedades físicas de los complejos de nigericina formados con diferentes cationes metálicos.

La saturación de la nigericina con carbonato de litio dió como resultado la formación del complejo nigericina-litio (NIG-Li(I)) con apariencia de polvo blanco cristalino,

Tabla VI. Propiedades Físicas de los Complejos Nigericina-Catión Polivalente, formados por saturación en CHCl_3 .

Complejo	Apariencia	Solubilidad observada
Nigericina-Li(I)	Polvo blanco	Soluble en CHCl_3 y en etanol
Nigericina-Ca(II)	Polvo blanco	Soluble en CHCl_3 y en etanol caliente; insoluble en etanol frío
Nigericina-Cu(II)	Polvo gris-verde	Soluble en CHCl_3 y en etanol; insoluble en n-hexano
Nigericina-Pr(III)	Polvo verde	Soluble en CHCl_3 y en etanol
Nigericina-Fe(III)	Polvo café	Soluble en CHCl_3 y en etanol

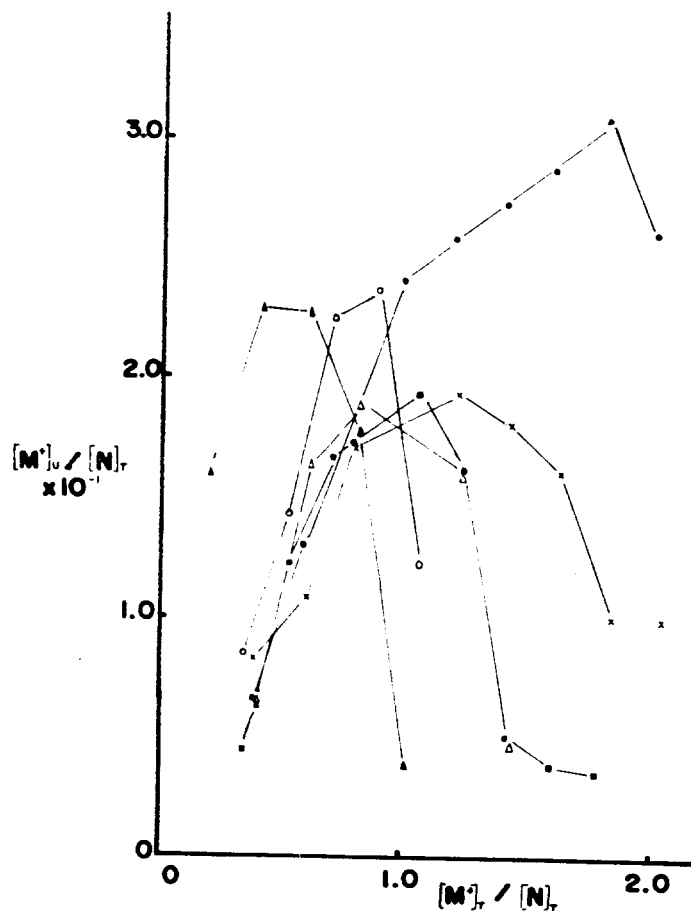


Figura 14. Isotermas de unión relativa de los cationes alcalinos y calcio a la nigericina. Se tituló una solución 1×10^{-4} M del ácido libre del políeter en las mismas condiciones experimentales descritas en la Figura 10. Las sales empleadas fueron o LiCl, o NaCl, x KCl, RbCl, Δ CsCl y $\triangle$ CaCl₂.

soluble en cloroformo y en etanol.

Por el contrario, su saturación con carbonato de calcio produjo un polvo blanco de aspecto pastoso, lo que sugería un cambio en las propiedades físicas de la nigericina por la formación de un complejo con el ion calcio (NIG-Ca(II)); estos cambios hacen que el complejo, que es soluble en cloroformo, no lo sea en etanol frío, sino caliente.

También se observó que a partir de la saturación de la nigericina con carbonato cúprico se produce la formación de un complejo con cobre (NIG-Cu(II)), que se acompaña con un cambio notable en sus propiedades físicas; el complejo tiene aspecto de polvo gris verdoso, soluble en cloroformo pero insoluble en hexano.

Debido a que el carbonato de fierro se oxida fácilmente al ser expuesto al aire (Cotton y Wilkinson, 1966), su empleo en el protocolo de saturación establecido resultaba inconveniente. Por lo tanto, para probar la interacción de la nigericina con Fe(III) se escogió el cloruro férrico; sin embargo, en contraposición con la información contenida en THE MERCK INDEX (1976), esta sal de fierro es muy soluble en cloroformo, por lo que finalmente se eligió al sulfato férrico como la sal idónea para la saturación del poliéter con Fe(III). El producto obtenido, presumiblemente el complejo nigericina-Fe(III) (NIG-Fe(III)), tiene aspecto de polvo de color café claro, cuyas propiedades de solubilidad en solventes orgánicos son iguales a las del ácido libre del poliéter.

Por último, la interacción de la nigericina con cloruro de praseodimio -una sal fácilmente dissociable, no soluble en cloroformo- no altera las propiedades de solvatación del poliéter en solventes orgánicos, pero sí se observa un colorido verde claro en el polvo obtenido que evidencia, por sí mismo, la interacción del poliéter con este lantánido (NIG-Pr(III)).

B. Formación in situ.

La factibilidad termodinámica de la interacción de la nigericina con los cationes metálicos en solución, se verificó por medio de la formación de los complejos in situ por titulación en un medio favorable de constante dieléctrica de 38.48 y pH 7.76 (Toro y col., 1987) a concentraciones equimolares de poliéter carboxílico y catión.

a) Titulación potenciométrica.

Por las propiedades electrolíticas de los metales alcalinos y alcalinotérreos en solución, la titulación potenciométrica en una sola fase homogénea es una técnica apropiada para confirmar la interacción de la nigericina con los cationes litio, sodio, potasio, rubidio, cesio y calcio.

Los valores de la pendiente (m) de las curvas de calibración con los cationes metálicos sugieren que la baja constante dieléctrica del medio (38.48) -comparada con la

del agua pura (78.0)- afecta la respuesta de los electrodos (Figuras 10, 11 y 12). Sin embargo, las lecturas de la diferencia del potencial eléctrico, en función de la concentración del catión, 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.

En la Figura 14 se muestran las isoterms de unión relativa, de concentración de metal unido ($[M]_u/[N]_t$) en función de la concentración de metal total ($[M]_t/[N]_t$), de los cationes de los metales Li, Na, K, Rb, Cs y Ca a la nigericina; en todas ellas se puede observar una fase de unión sigmoidea, con una unión máxima, seguida de una disminución en la concentración de catión unido.

b) Titulación colorimétrica.

A pesar de que el AP-III es un indicador metalocrómico para Ca(II) (Scarpa y col., 1978a) se estudió la formación de los complejos NIG-Li(I), NIG-Ca(I) y NIG-Fe(III) in situ en solución mediante el seguimiento de sus cambios espectroscópicos en presencia y ausencia de poliéter y catión.

En la Figura 15 se muestran los espectros de absorción electrónica absoluta del AP-III en presencia de los metales Li(I), Ca(II) y Fe(III). Se observa que el espectro del indicador se modifica dramáticamente en forma específica en presencia de los cationes metálicos Ca(II) y Fe(III); por el contrario, el catión Li(I) no altera al espectro de absorción del AP-III (Figura 15b). A su vez, tampoco el políeter nigericina produce alteraciones en el espectro VIS del indicador. En cambio, en las Figuras 15c y 15d, se observa que el espectro del AP-III modifica sus características en presencia de los complejos NIG-Ca(II) y NIG-Fe(III).

El efecto de los cationes y los complejos sobre el espectro de absorción del AP-III es más evidente en la Figura 16, en la que se ilustran los espectros diferenciales del indicador metalocrómico contra varias concentraciones de los metales Ca(II), Fe(III) y de los complejos NIG-Ca(II) y NIG-Fe(III). Como se puede observar, si bien la longitud de onda de máxima absorbancia no se modifica sustancialmente, los cambios en los coeficientes de extinción y en los puntos isosbéticos son significativos y específicos de cada catión y complejo metálico.

2. IDENTIFICACION DE COMPLEJOS.

Se observó que las propiedades fisicoquímicas de la nigericina se modifican en función del catión con el que interactúa. El estudio de los cambios en estas propiedades

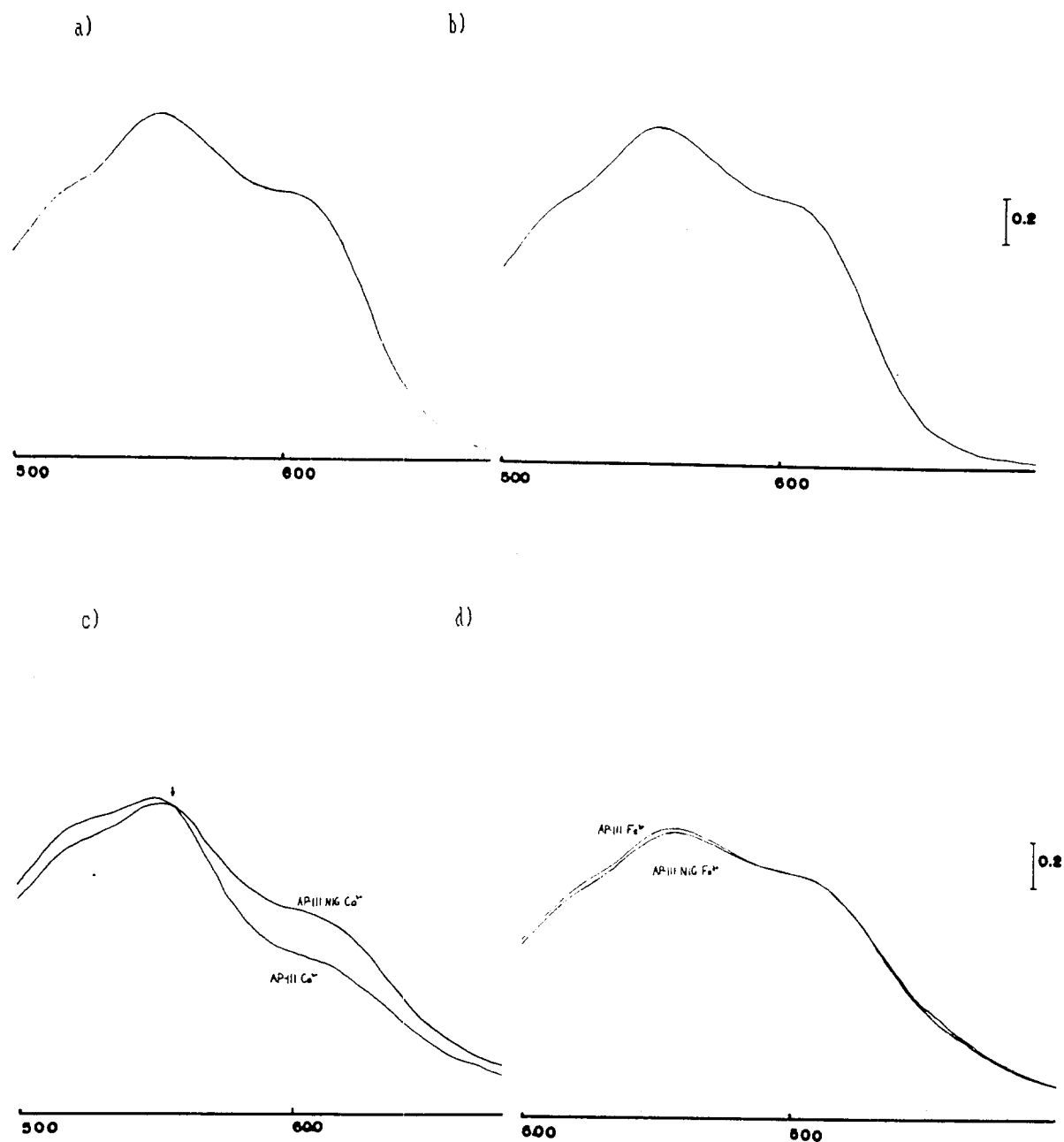
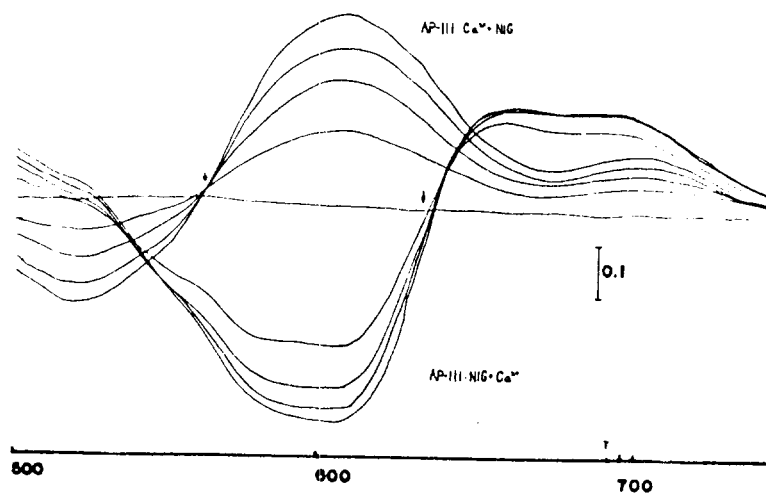


Figura 15. Espectros de absorbancia absoluta en el VIS del AP-III (a) y en presencia de Li^+ , NIG-Li^+ (b); Ca^{2+} , NIG-Ca^{2+} (c); Fe^{3+} y NIG-Fe^{3+} (d). Los espectros del indicador en presencia y en ausencia de metal, con o sin nigericina, se obtuvieron en un espectrofotómetro AMINCO DW2a UV/VIS. La celda contenía 2 ml de AP-III $50 \mu\text{M}$ en la misma solución que en la Figura 10. Se agregaron $10 \mu\text{l}$ del cloruro del catión 10^{-2} M ; donde se indica se agregaron $10 \mu\text{l}$ de nigericina $2 \times 10^{-2} \text{ M}$.

a)



b)

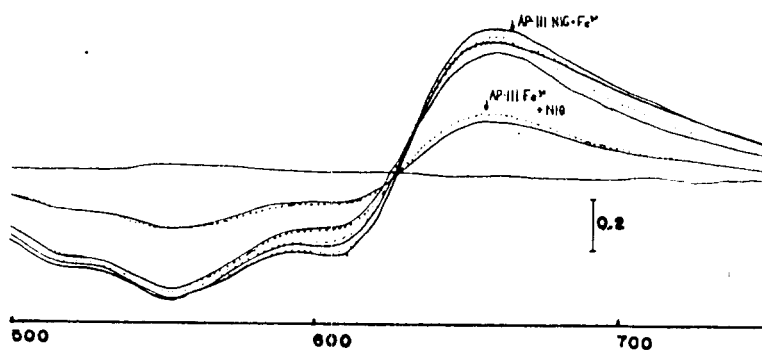


Figura 16. Espectros de absorbancia diferencial del AP-III en presencia de Ca^{2+} , NIG- Ca^{2+} (a); Fe^{3+} y NIG- Fe^{3+} (b). Se obtuvieron en el mismo espectrofotómetro descrito en la Figura 15. Tanto la celda de referencia como la de muestra contenían 2 ml de AP-III $50 \mu\text{M}$ en la misma solución de la Figura 10. Se agregaron alícuotas de $10 \mu\text{l}$ del cloruro del catión 10^{-2} M ; donde se indica se agregaron alícuotas de $10 \mu\text{l}$ de nigericina $2 \times 10^{-2} \text{ M}$.

fisicoquímicas, mediante técnicas espectroscópicas con diferentes niveles de resolución, permite determinar las huellas digitales de cada complejo formado y facilita su posterior identificación.

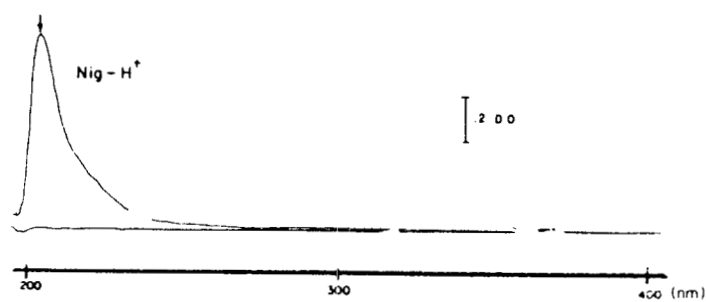
A. Espectroscopia Ultravioleta/Visible.

Por su configuración electrónica, la molécula de nigericina no tiene bandas de absorción en el VIS; en cambio, presenta absorción 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 presenta un pico de absorción máxima a 205 nm, con una disminución pronunciada del coeficiente de extinción hasta los 220 nm; a partir de esta longitud de onda, este antibiótico poliéter no presenta absorción alguna (Figura 17a).

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 sal de sodio de la monensina en etanol, éste presenta un pico máximo de absorbancia aproximadamente a una longitud de onda de 215 nm (Figura 17b).

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

a)



b)

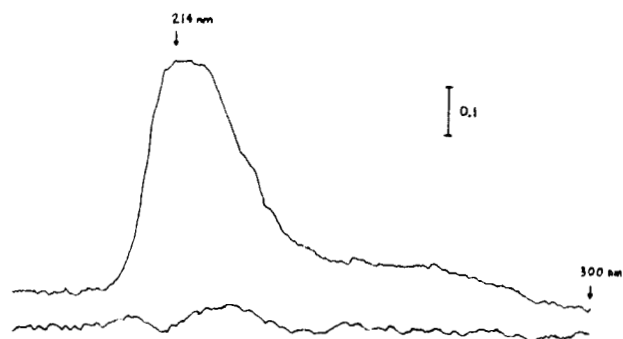


Figura 17. Espectros de absorbancia absoluta de los polímeros nigericina, ácido libre 10^{-4} M (a) y sal de sodio de monensina 10^{-4} M (b) en etanol absoluto. Los espectros se obtuvieron a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Beckman Acta M-IV.

de concentraciones de poliéter que van del orden micromolar al milimolar (Tabla VII), por lo que no es posible hacer determinaciones directas de la concentración de poliéter por métodos de espectroscopia UV/VIS. Además, los espectros de ambas moléculas presentan corrimientos en la longitud de onda de máxima absorbancia, tanto hacia el rojo como hacia el violeta, los cuales no se correlacionan con la concentración del poliéter (resultados no mostrados).

En la Figura 18 se observan los espectros de absorción electrónica, en la región UV del espectro electromagnético, de los complejos nigericina-cation -obtenidos por saturación- en solución.

El complejo NIG-Ca(II) en cloroformo presenta absorción desde 200 nm hasta 300 nm (Figura 18a) con un pico máximo a 216 nm, y hombros a 230 y 278 nm. Por otro lado, en las Figuras 18 b, c y d se puede observar que el Cu(II), el Fe(III) y el Pr(III) producen cambios notables en el espectro de absorción UV/VIS del ácido libre de la nigericina en etanol. El cloruro de praseodimio en etanol tiene un espectro de absorción en el VIS con señales finas características a 446, 470, 482 y 580 nm (Figura 19). Estos picos se extinguen en presencia del poliéter; en su lugar se obtiene un ensanchamiento del espectro de absorción desde los 200 hasta los 400 nm, con un máximo a 222 nm de longitud de onda (Figura 18d). Lo anterior sugiere fuertemente la interacción del antibiótico nigericina con estos cationes metálicos.

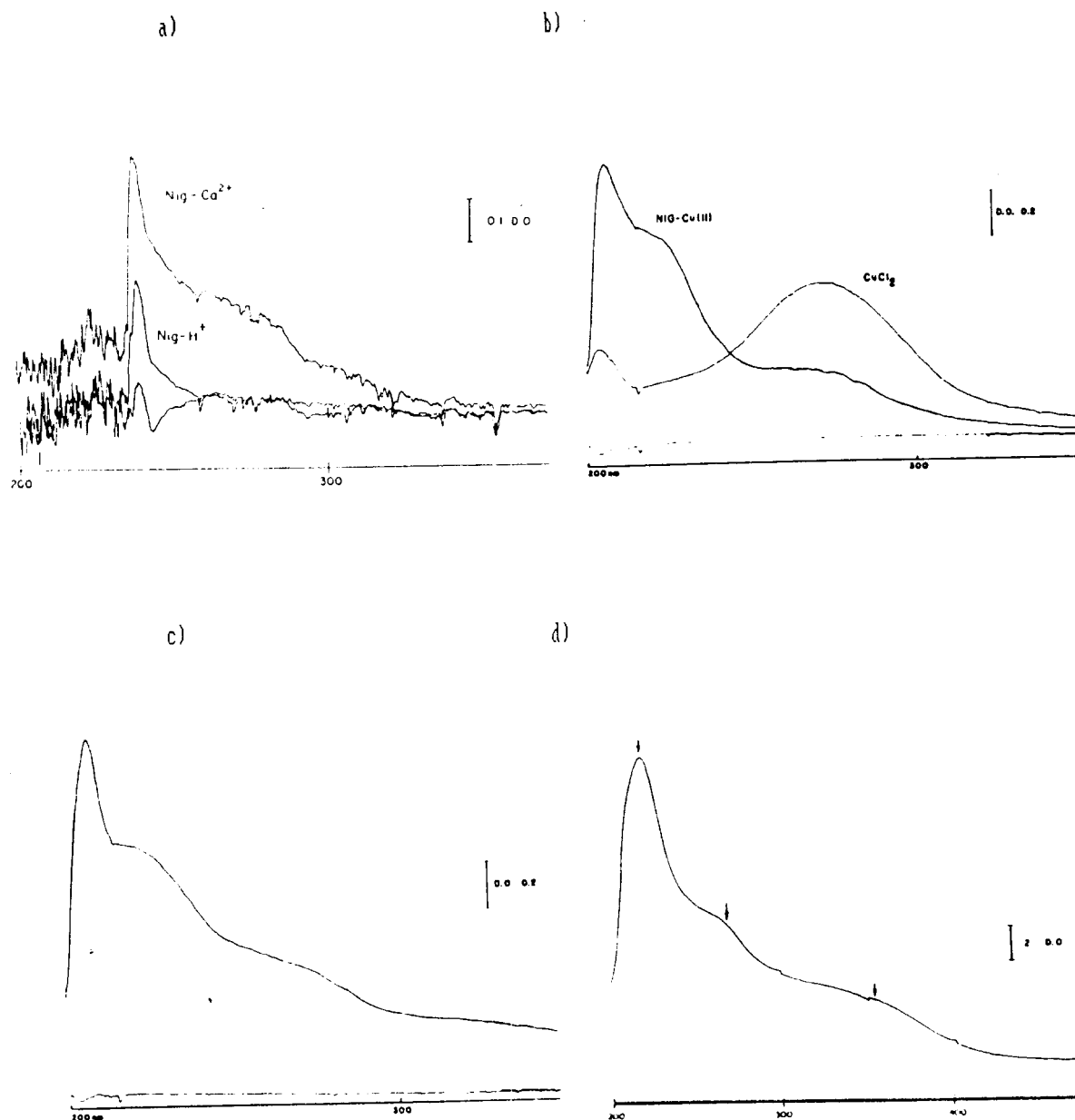


Figura 18. Espectros de absorbancia absoluta de los complejos de nigericina con los cationes Ca^{2+} , en CHCl_3 (a); Cu^{2+} (b), Fe^{3+} (c) y Pr^{3+} (d) en etanol absoluto. Los espectros se corrieron a temperatura ambiente. Los tres primeros se obtuvieron en un espectrofotómetro AMINCO DW2a y el cuarto, en un Beckman Acta M-IV. Los complejos se obtuvieron por saturación en CHCl_3 como se describe en Metodos.

Tabla VII. Parámetros espectroscópicos en el UV de los polímeros nigericina, ácido libre y sal de sodio de monensina en función de la concentración.^a

Concentración (M)	Abs _{λmax}	
	Nigericina-H	Monensina ⁻ Na ⁺
1x10 ⁻⁸	0.050	0.038
2x10 ⁻⁸	0.045	0.072
4x10 ⁻⁸	0.044	0.050
6x10 ⁻⁸	0.042	0.074
8x10 ⁻⁸	0.045	0.060
1x10 ⁻⁷	0.054	0.030
2x10 ⁻⁷	0.046	0.070
4x10 ⁻⁷	0.058	0.074
6x10 ⁻⁷	0.045	0.030
8x10 ⁻⁷	0.036	0.160
1x10 ⁻⁶	0.052	0.050
2x10 ⁻⁶	0.031	0.042
4x10 ⁻⁶	0.037	0.078
6x10 ⁻⁶	0.032	0.040
8x10 ⁻⁶	0.064	0.040
1x10 ⁻⁵	-	0.026
2x10 ⁻⁵	0.044	0.022
4x10 ⁻⁵	0.040	0.072
6x10 ⁻⁵	0.028	0.014
8x10 ⁻⁵	0.044	0.034
1x10 ⁻⁴	0.130	0.044

^aLos espectros se obtuvieron como se indica en la Figura 17.

^bAunque no se indican, la λ_{max} a cada concentración presenta corrimientos (v. explicación en el texto).

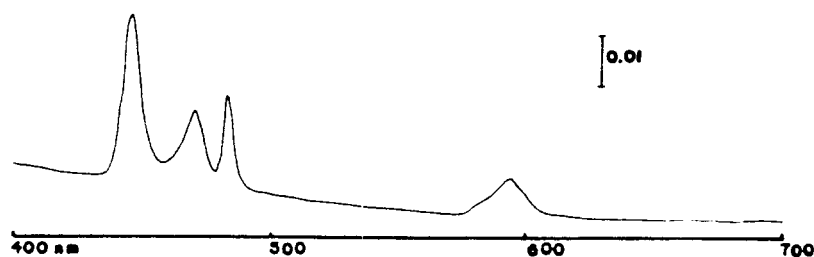


Figura 19. Espectro de absorbancia absoluta en el VIS del PrCl_3 10^{-2} M en etanol; se obtuvo a temperatura ambiente en un espectrofotómetro AMINCO DW2a.

B. Resonancia Magnética Nuclear de Protón.

La espectroscopia de NMR ofrece la posibilidad de estudiar el comportamiento dinámico de moléculas en solución sin la necesidad de "incorporar" metales pesados, necesarios para los estudios conformacionales por difracción de rayos-X (Anteunis, 1982).

Se obtuvieron los espectros de ^1H -NMR de la nigericina y de los complejos NIG-Ca(II) y NIG-Pr(III), en cloroformo deuterado, preparados por saturación. En la Figura 20 se puede observar que el espectro ^1H -NMR del ácido libre del poliéter se modifica dramáticamente en presencia de los dos cationes.

En la Tabla VIII se muestran los valores de corrimiento químico de protón obtenidos para la nigericina y los complejos con Ca(II) y Pr(III) -en ppm, con TMS como referencia interna- de las señales asignadas al H21, Me35 y O11-Me40, según fueron publicadas anteriormente para la sal de sodio del poliéter (Rodios y Anteunis, 1977). Además se comparan estos valores con los de los complejos NIG-K(I) (Toro y col., 1987) y NIG-Li(I) (Arzt, 1984). Se puede observar que se producen corrimientos químicos notables cuando la nigericina se encuentra en presencia de Li(I) y Ca(II), mientras que los ensanchamientos son más importantes en el caso del Li(I) y el Pr(III). En adición a esto, dado que los cambios espectrales son dependientes del catión presente en la muestra, esta técnica espectroscópica permite

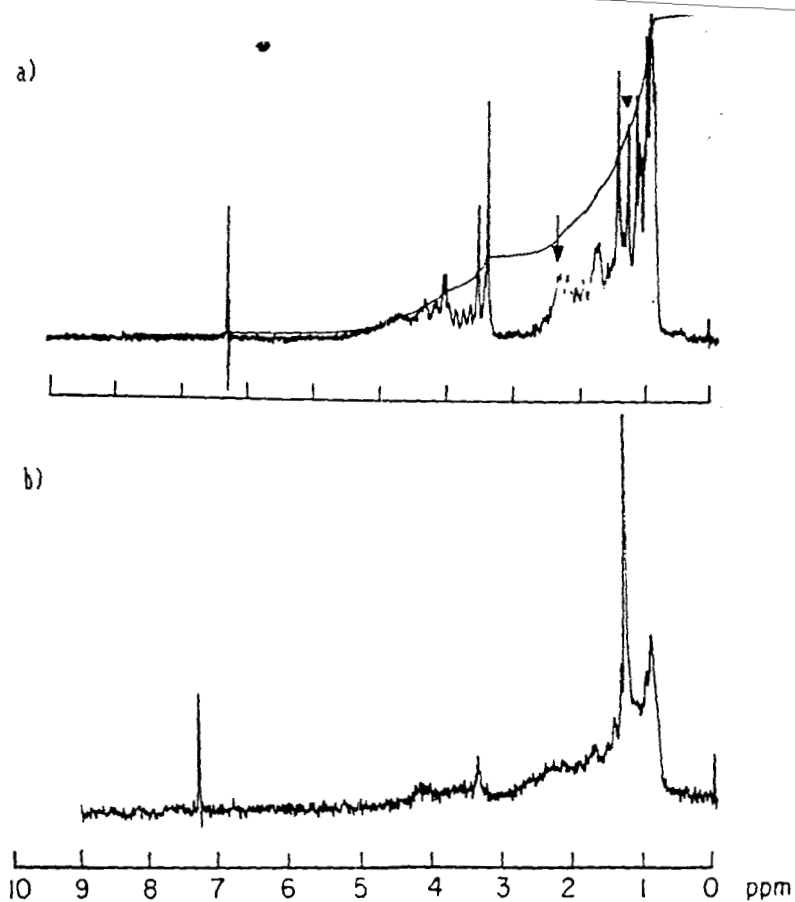


Figura 20. Espectros de $^1\text{H-NMR}$ a 90MHz en CDCl_3 de los complejos de nigericina con Ca^{2+} (a) y Pr^{3+} (b). Los complejos se prepararon como se indica en la Figura 18. Las flechas indican los cambios mas importantes respecto al espectro del ácido libre.

Tabla VIII. Corrimientos químicos (en ppm, TMS como referencia interna) en los espectros $^1\text{H-NMR}$ a 90 MHz de los complejos de nigericina con diferentes cationes metálicos, en CDCl_3 .^a

Muestra	Señales		
	H21	Me35	Me48
Nigericina	4.024	1.419	3.353
Nigericina- Li^+ ^b	4.24-ma	1.54-ma	3.42, 3.44-a
Nigericina- K^+ ^c	4.25	1.6	3.62
Nigericina- Ca^{2+}	4.03	1.43-a	3.38-a
Nigericina- Pr^{3+}	ma	1.39-ma	3.33-ma

^aLos complejos se formaron como se describe en la Figura 18.

a: ancha, ma: muy ancha.

^bTomados de Arzt (1984).

^cTomados de Toro y col. (1987).

087383

identificar las huellas dactilares en el espectro de $^1\text{H-NMR}$ de cada complejo.

C. Resonancia Paramagnética del Electrón.

Los estudios por espectroscopia de EPR de metales con propiedades magnéticas, ligados dentro de quelatos iónicos, puede brindar información sobre la estructura electrónica en el interior de los complejos de coordinación.

Los complejos de nigericina, formados por saturación en cloroformo, con los cationes de los metales de transición Cu(II) y Fe(III) , y el lantánido Pr(III) , se estudiaron por espectroscopia de EPR.

En la Figura 21 se observan las señales paramagnéticas de los cationes Cu(II) y Pr(III) , y el efecto ferromagnético del Fe(III) , lo que confirma la formación de los complejos NIG-Cu(II) , NIG-Fe(III) y NIG-Pr(III) , ya que al carecer de electrones no apareados dentro de su estructura, el ácido libre de nigericina es silencioso en este tipo de espectroscopia.

Los diferentes complejos se identifican al caracterizar los parámetros Hamiltonianos del spin del electrón de cada metal, los cuales se muestran en la Tabla IX. El complejo NIG-Fe(III) presenta señales ferromagnéticas características del catión Fe(III) a campo bajo $-g\ 4.702$ y $g\ 3.664-$ y además se resuelven otros parámetros de campo paralelo y campo perpendicular alrededor de 3000 G. En cuanto al complejo NIG-Cu(II) , su espectro paramagnético muestra señales de la

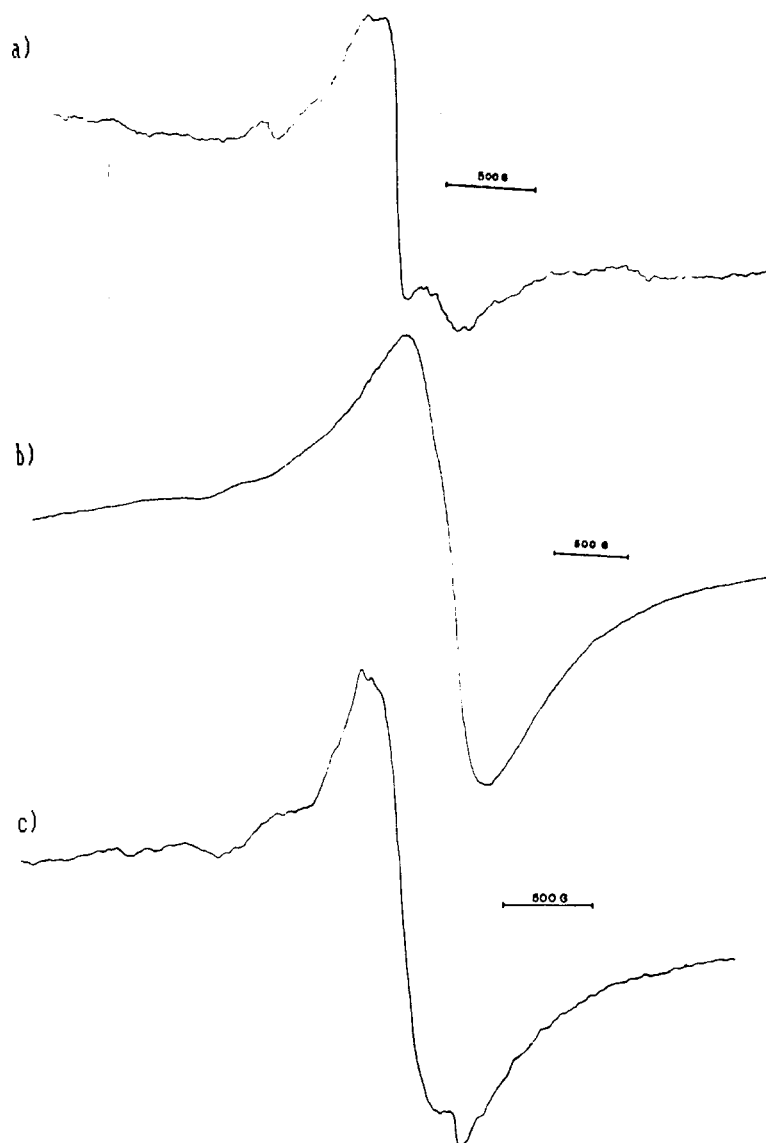


Figura 21. Espectros de EPR a temperatura ambiente de los complejos de nigericina con Cu^{2+} (a), Fe^{3+} (b) y Pr^{3+} (c) en estado sólido. Los complejos se prepararon como se indica en la Figura 18.

Tabla IX. Parámetros Hamiltonianos del spin del electrón de los espectros de EPR a temperatura ambiente de los complejos de la nigericina con diferentes cationes metálicos en estado sólido.^a

Complejo	g_1	g_2	$g_{\parallel}$	$g_{\perp}$	$A_{\parallel}(\text{cm}^{-1})$	$A_{\perp}(\text{cm}^{-1})$
NIG- Cu^{2+}			2.486	2.163	0.0139	0.0041
NIG- Fe^{3+}	4.702	3.664	2.401	1.953	nr	nr
NIG- Pr^{3+}			2.444	2.272	0.0057	0.0042

^aLos complejos se prepararon como se describe en la Figura 18.

estructura hiperfina, tanto en la región paralela como perpendicular a 3000 G. Finalmente, resultó posible obtener el espectro de EPR del complejo NIG-Pr(III), en el que aparentemente se resuelven las señales paramagnéticas de estructura hiperfina con parámetros paralelos y perpendiculares de 2.444 y 2.272, respectivamente.

3. CONSTANTES DE FORMACION.

En la Tabla X se muestran los valores de las constantes de formación ($\log K_f$) calculados para los complejos de nigericina con los cationes de los metales Li, Na, K, Rb, Cs y Ca a pH 7,76 y constante dieléctrica de 38.48. En estas condiciones experimentales el 50% del ácido libre de nigericina se encuentra ionizado a nigericinato y la unión del poliéter 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 col., 1987).

Las desviaciones estándar de los valores calculados de $\log K_f$ muestran que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las K_f -en una sola fase homogénea- de los seis complejos estudiados por medio de técnicas potenciométricas. Esto sugiere que la probabilidad de que el poliéter forme clatratos con todos estos cationes es similar, irrespectivo de que sean o no transportados a través de membranas lipídicas. Los valores de diferencia de

Tabla X. Valores de $\log K_f$ y energía libre estándar (ΔG°) de los complejos de nigericina con los cationes alcalinos y Ca^{2+} en una sola fase a pH 7.76 y ϵ 38.48.^a

Complejo	$\log K_f$	ΔG° (Kcal/mol)
NIG-Li ⁺	4.16 $\pm$ 0.34	-5,681
NIG-Na ⁺	3.91 $\pm$ 0.22	-5,339
NIG-K ⁺	3.70 $\pm$ 0.08	-5,053
NIG-Rb ⁺	3.70 $\pm$ 0.25	-5,053
NIG-Cs ⁺	3.82 $\pm$ 0.34	-5,271
NIG-Ca ²⁺	3.53 $\pm$ 0.29	-4,821

^aLa nigericina (10^{-4} M) se disolvió en D:A 45% (v/v). El pH se ajustó con TEA y HCl. La titulación se hizo con el cloruro del catión como se indica en Métodos.

Tabla XI. Propiedades de unión catiónica del políster carboxílico nigericina determinadas en diferentes condiciones experimentales.^a

Modelo Experimental					Secuencia
K ⁺	Rb ⁺	Na ⁺	Cs ⁺	Li ⁺	Extracción en Tolueno - n-butanol(7:3)
100	13	2	0.6	0.01	Fase acuosa pH = 10.0, desplazando ⁸⁶ Rb ⁺
K ⁺		Na ⁺			Constantes de formación potenciométrica en metanol
1.5x10 ⁵		2.4x10 ⁴			
3.0x10 ⁴		6.6x10 ³			en metilcelosol - H ₂ O (4:1)
-		9.2x10 ³			en metanol, metodos de relajación
Norepinefrina > epinefrina >					Extracción en Tolueno - n-butanol(7:3)
Kex = 5.0		1.0			Fase acuosa pH = 9.0
etanolamina					

^aInformación extraída de Taylor y col. (1982).

energía libre estándar de la formación de estos complejos (Tabla X), calculados a partir de los resultados de K_f , confirman la factibilidad termodinámica de la formación de los complejos antes mencionados.

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 (resultados no mostrados), lo que confirma que el catión -cualquiera que éste sea- no desplaza al protón, por lo que el políeter permanece prácticamente sin disociar dentro del complejo de coordinación (Toro y col., 1987).

Por otra parte, los resultados de formación de complejos aquí obtenidos no se correlacionan con las curvas y secuencias de selectividad de complejación y transporte catiónico publicadas para la nigericina en diferentes sistemas experimentales (Figura 22), ni con ningún otro parámetro estudiado con anterioridad en la formación de complejos de poliéteres carboxílicos con cationes metálicos u orgánicos (Tabla XI) (Taylor y col., 1982).

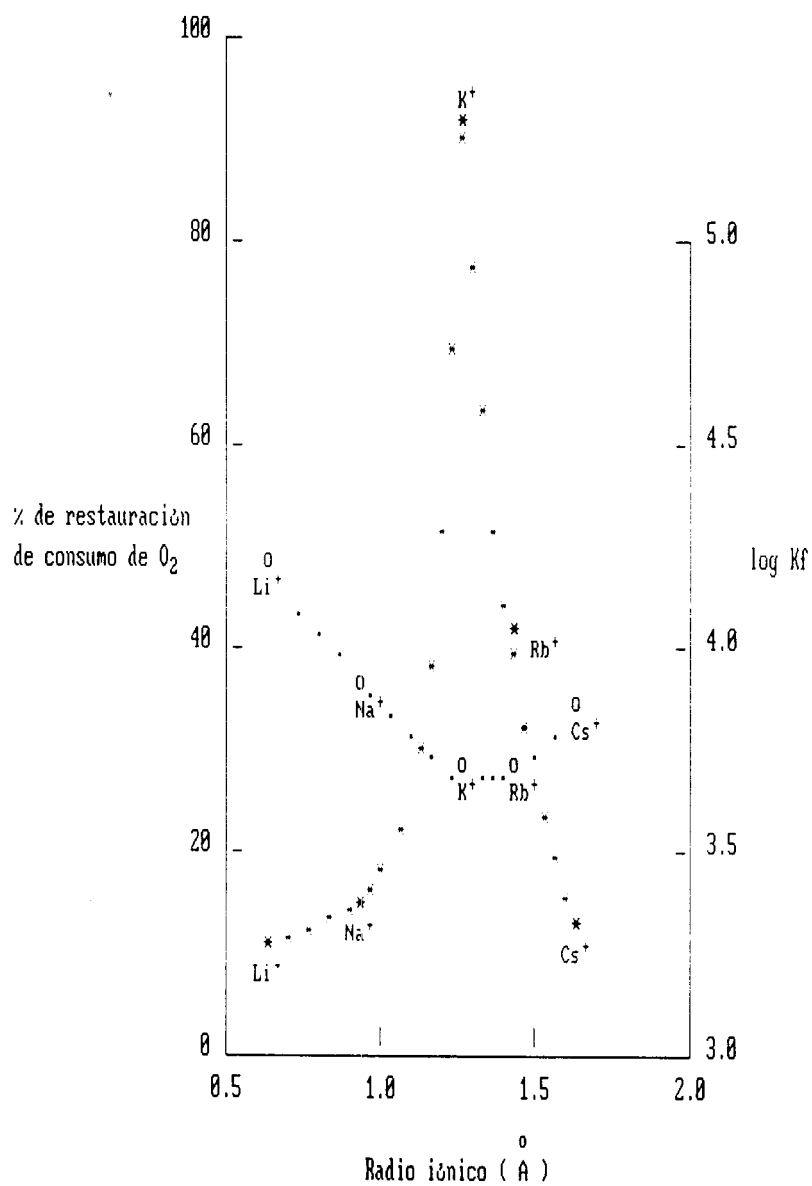


Figura 22. Comparación de la selectividad iónica de formación de complejos nigericina-catión, como $\log K_f$, con la curva de transporte catiónico mediado por la nigericina a través de membranas mitocondriales, medido como % de la restauración de la respiración en presencia de gramicidina (Estrada y col., 1967b).

CAPITULO IV. DISCUSION

"Y al principio, todo fue curiosidad."

Isaac Asimov.

Con base en las evidencias presentadas por Arzt (1984) que sugerian, por primera ocasión, que el antibiótico políeter monocarboxílico nigericina posee la capacidad de interactuar con cationes metálicos a los cuales no transporta, se decidió emprender un análisis más ambicioso en la búsqueda de los patrones fisicoquímicos que regulan la interacción políeter-metal, para tratar de correlacionarlos con la actividad ionoforética de esta familia de antibióticos. Por tal motivo, se comenzó por verificar la formación del complejo NIG-Li(I) para, posteriormente, ampliar el estudio a complejos catiónicos polivalentes.

1. SE AMPLIA EL PERFIL DE INTERACCION IONICA DE LA NIGERICINA.

El carbonato de litio es una sal muy poco soluble en agua (1.5 g en 100 ml, a 0 C) e insoluble en cloroformo. Sin embargo, ya que el litio se ioniza fácilmente -con un potencial de ionización de 5.39 ev- si es factible la utilización de esta sal para probar la interacción del metal con el políeter nigericina.

Por su parte, el Li(I) es un catión muy pequeño -tiene un radio iónico de Pauling de $0.60 \overset{\text{O}}{\text{\AA}}$ (Day y Selbin, 1969)- que se solvata con gran facilidad, por lo que su radio efectivo de hidratación llega a ser de $3.40 \overset{\text{O}}{\text{\AA}}$ (Cotton y Wilkinson, 1966).

Como demuestran claramente los resultados arriba presentados, se verificó la capacidad de la nigericina para interactuar y formar complejo con el catión Li(I) a pesar de que prácticamente no lo transporta a través de fases hidrófobas. Este fenómeno muy bien puede ser explicado si se considera que el litio -por su gran poder polarizante- tiende a formar enlaces covalentes, lo que provocaría que el complejo NIG-Li(I) fuera difícilmente dissociable.

El Ca(II) es un catión sumamente importante que participa en el ajuste de múltiples propiedades vitales de los sistemas biológicos: regula la actividad enzimática (Scarpa, 1972); es un intermediario fundamental en la transmisión de información entre las células nerviosas (Akerman y Nicholls, 1983); juega el papel de medio de comunicación, como segundo mensajero, para la realización de procesos metabólicos intracelulares (Berridge, 1985), y produce efectos significativos en la estabilidad de la estructura y función de las membranas celulares (Mikkelsen, 1976). De aquí el interés en estudiar el mecanismo íntimo de interacción de este catión con moléculas modelo que funcionan como acarreadores iónicos membranales.

Tradicionalmente los antibióticos poliéteres

carboxílicos se han clasificado como antibióticos monovalentes y divalentes, dependiendo del estado de oxidación de los cationes metálicos que transportan (Taylor y col., 1982). Así, los políéters monensina y nigericina, que translocan sodio y potasio respectivamente, son antibióticos "monovalentes", mientras que los acarreadores de Ca(II) , 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(I) y trivalentes como el Pr(III) (Fernández y col., 1973; Grandjean y Laszlo, 1982; Everett y col., 1983; Grandjean y Laszlo, 1984; Grandjean y Laszlo, 1986; Shastri y col., 1987), mientras que prácticamente ningún antibiótico monovalente se ha mostrado capaz de movilizar cationes polivalentes a través de barreras hidrófobas.

Experimentos realizados en BLM (Toro, 1976) han mostrado la imposibilidad de la nigericina para translocar al catión Ca(II) . Sin embargo, los resultados aquí presentados indican, en forma definitiva, que este antibiótico sí interactúa con calcio; y no sólo eso, sino que las propiedades de solvatación del políéter se modifican de manera significativa (Tabla VI). Es probable que estos cambios se correlacionen con su incapacidad para actuar como acarreador de Ca(II) .

La existencia de un complejo NIG-Ca(II) no móvil coincide con la función que tiene el calcio en el anclaje y la estabilización de algunas moléculas a los fosfolípidos de las membranas biológicas (Ivanov, 1975).

Como el Ca(II) es un catión que posee características electrónicas muy simples (Tabla XII), las posibilidades de estudiar las transiciones de los electrones en sus orbitales por técnicas físicas o espectroscópicas directas son escasas.

Por otro lado, se ha observado que los cationes de metales de transición y de lantánidos -o tierras raras- son capaces de imitar algunas funciones del Ca(II) , en ocasiones con más eficiencia, o de competir con éste en diversos sistemas biológicos celulares y subcelulares (Mikkelsen, 1976; Martin y Richardson, 1979; Akerman y Nicholls, 1983).

La comparación entre complejos de Ca(II) y de metales de transición y lantánidos brinda información muy rica sobre las características electrónicas de su unión a moléculas ligantes.

La coordinación de cationes lantánidos con sitios afines por Ca(II) se ve favorecida por la similitud de sus propiedades fisicoquímicas. El rango del radio iónico de los cationes lantánidos trivalentes, que va desde 0.85 hasta 1.15 Å, se encuentra alrededor del valor del radio iónico del calcio (0.99 Å); y la estructura de coordinación se puede ajustar a la del Ca(II) mediante la hibridización de orbitales.

Las características electrónicas de los cationes lantánidos les proporcionan propiedades ópticas que facilitan su rápida identificación. El intenso color verde del Pr(III) , que se debe a transiciones de electrones entre

sus orbitales "f", es característico del catión trivalente y es independiente del ambiente en que se encuentre. De este modo, el color verde del producto de la saturación de la nigericina con cloruro de praseodimio es evidencia de que el catión Pr(III) interactúa con el polietéer (Tabla VI) a pesar de no ser transportado por el mismo (Grandjean y Laszlo, 1984).

Por su parte, los complejos organometálicos de la mayoría de los metales de transición se identifican por tener un fuerte carácter covalente y ser altamente estables. Estas características favorecen la formación de enlaces de coordinación con oxígenos ligantes. Al igual que los lantánidos, la configuración de sus electrones, en este caso los ubicados en orbitales "d", les confieren colores característicos.

La presencia del metal Cu(II) se sugiere por el color verde del complejo NIG-Cu(II) (Tabla VI), lo que es muy frecuente en los complejos organometálicos que forma este catión.

La formación del complejo NIG-Fe(III) se evidencia por el cambio en las propiedades físicas observadas en el producto, y se apoya en la gran afinidad que tiene el catión Fe(III) por oxígenos ligantes.

Ahora bien, podría pensarse que la saturación de la nigericina con diferentes sales metálicas obliga al polietéer a formar complejos iónicos con cualquier especie química que posea carga eléctrica positiva. Por lo tanto, resulta

conveniente realizar experimentos sobre la facilidad real de formación de estos complejos en condiciones menos extremas. Los estudios termodinámicos de la formación in situ, en una solución homogénea con propiedades fisicoquímicas conocidas, de los complejos poliéter-cation proporcionan este tipo de información. Con este fin se seleccionaron los cationes alcalinos, el Ca(II) y el Fe(III) para verificar la formación espontánea de los complejos nigericina-cation.

Las isotermas de unión catiónica, relativa a la concentración total de nigericina en la solución, sugieren que el poliéter se satura más rápidamente con cesio y litio que con potasio, rubidio y sodio (Figura 14). Por otro lado, la proporción de litio y sodio unidos a la nigericina en la saturación es mayor que la de potasio, rubidio y cesio. Por su parte, el Ca(II) muestra una saturación muy rápida del poliéter, con una proporción alta de cation unido (ligeramente mayor que la de litio). En todas las isotermas se observa una disminución en la proporción de cation unido después de la saturación. Este efecto en la concentración de metal unido podría deberse a un cambio en la molecularidad o estequiometría de los complejos formados o a la unión inespecífica -o adsorción- de los cationes al poliéter.

Considerando la hipótesis anterior, se realizó el análisis de las isotermas de unión poliéter-cation por medio de los métodos de Langmuir y Scatchard (Tabla XIII). Se encontró que las gráficas que se obtienen con estos modelos, presentan patrones poco comunes que no permiten la

Tabla XII. Configuración electrónica y radios iónicos de diferentes cationes metálicos.^a

Catión	Configuración isoelectrónica externa	Radio iónico (Å)
Li ⁺	1s ²	0.68
Ca ²⁺	3s ² 3p ⁶	0.99
Cu ²⁺	3s ² 3p ⁶ 3d ⁹	0.72
Fe ³⁺	3s ² 3p ⁶ 3d ⁵	0.64
Pr ³⁺	4d ¹⁰ 5p ⁶ 6s ²	1.06

^aExtraídas de Cotton y Wilkinson (1966), Day y Selbin (1969).

Tabla XIII. Isotermas de unión de Langmuir y de Scatchard de las titulaciones de la nigericina con los cationes alcalinos y Ca²⁺.^a

NIG-Li ⁺				NIG-Na ⁺				NIG-K ⁺			
Langmuir		Scatchard		Langmuir		Scatchard		Langmuir		Scatchard	
1/[Li] _T	1/[Li] ₀	v	v/[Li] _L	1/[Na] _T	1/[Na] ₀	v	v/[Na] _L	1/[K] _T	1/[K] ₀	v	v/[K] _L
42553	-	-	-	48077	44843	-	-	43478	-	-	-
21321	89286	0.855	2389	24096	28902	0.667	1610	21834	107527	0.831	2272
14245	53191	1.435	2782	16103	20576	1.309	2108	14598	82645	1.084	1922
10707	34014	2.251	3517	12106	15432	1.732	2096	10977	52356	1.714	2381
8591	32468	2.364	2761	9709	12771	2.407	2337	8803	52083	1.728	1831
7174	62500	1.231	997	8110	10320	2.581	2093	7353	46083	1.958	1713
6165	-	-	-	6969	8650	2.733	1904	6317	49751	1.819	1316
5408	-	-	-	6112	7446	2.878	1759	5540	56180	1.614	994
4819	-	-	-	5447	6566	3.081	1674	4936	90090	1.009	527
				4914	5646	2.606	1281	4454	90090	1.003	470

NIG-Rb ⁺				NIG-Cs ⁺				NIG-Ca ²⁺			
Langmuir		Scatchard		Langmuir		Scatchard		Langmuir		Scatchard	
1/[Rb] _T	1/[Rb] ₀	v	v/[Rb] _L	1/[Cs] _T	1/[Cs] ₀	v	v/[Cs] _L	1/[Ca] _T	1/[Ca] ₀	v	v/[Ca] _L
50000	-	-	-	47847	-	-	-	4831	6135	1.633	789
25063	200000	0.447	1200	23981	156250	0.634	1795	2415	4032	2.492	602
16750	72993	1.228	2669	16026	60241	1.648	3599	1616	4049	2.489	402
12594	53476	1.679	2765	12040	52632	1.890	2954	1215	5650	1.788	217
10101	58139	1.548	1893	9652	92592	1.078	1161	974	25641	0.395	38
8439	46296	1.949	2012	8064	61350	1.630	1513	814	-	-	-
7246	55555	1.629	1359	6930	212766	0.471	338	699	-	-	-
6357	175439	0.517	341	6079	-	-	-	613	-	-	-
5666	232558	0.391	227	5417	-	-	-	546	-	-	-
5112	250000	0.365	190	4888	-	-	-	493	-	-	-

^aLas condiciones experimentales están descritas en Métodos; las concentraciones del polímero y el catión están en el orden de 10⁻⁴ M. $v = [N^{n+}]_0/[N]_T$.

determinación de los parámetros de las ecuaciones (resultados no mostrados), como la constante de unión y la fracción de sitios ocupados en la molécula ligante. Por lo tanto, a partir de este análisis se hace evidente que la dinámica de la formación de los complejos nigericina-cation estudiados sigue un modelo de interacción mucho más complejo que los diseñados a la fecha.

Preocupados por la confirmación de los hallazgos anteriores -es decir, del aumento en el perfil de interacción iónica de la nigericina- que están en aparente contradicción con lo previsto en la literatura internacional, se buscó proporcionar evidencia complementaria, por otro método novel, de la formación de los complejos NIG-Li(I) (Arzt, 1984), NIG-Ca(II) y NIG-Fe(III) en solución in situ. Al respecto, aunque el AP-III ha sido ampliamente usado como un indicador de Ca(II) libre en sistemas celulares o subcelulares a pH fisiológico (Scarpa y col., 1978b), a la fecha no existen reportes sobre su comportamiento espectroscópico en medios no acuosos ni de su interacción con antibióticos poliéteres carboxílicos o con complejos iónicos de los mismos.

En la Figura 15a se muestra el espectro absoluto de absorción electrónica VIS del AP-III en un medio de constante dieléctrica de 38.48, a pH 7.76. Si bien el espectro del indicador metalocrómico libre es similar al publicado por Scarpa y col. (1978a; 1978b), el de su complejo con Ca(II) presenta modificaciones en los puntos isosbásticos y en el coeficiente de extinción que dependen,

aparentemente, de las propiedades dieléctricas del medio.

Scarpa y col. (1978a) demostraron que el espectro de absorción del AP-III sufre modificaciones significativamente diferentes en presencia de distintos cationes divalentes.

Tomando en consideración la observación anterior, pero en función de la carga eléctrica positiva y del radio del ión, se analizó la posible interacción del indicador AP-III con los cationes Li(I) y Fe(III) para que, de ser éste el caso, se pudiera calificar la unión metálica a la molécula de nigericina (Figura 15).

Por un lado, la adición de Li(I) no produce cambios espectrales mayores en el AP-III. Por el contrario, la presencia de Fe(III) induce cambios importantes en el espectro del indicador, los cuales son diferentes de los producidos por el Ca(II) . A diferencia de los espectros obtenidos en medio acuoso (Scarpa y col, 1978b), estos cambios no son lineales, al menos en el intervalo de concentraciones catiónicas estudiadas (Figura 16).

Al llevar a cabo la titulación de la nigericina con los cationes Ca(II) y Fe(III) en presencia de AP-III se observó la inducción de cambios espectrales en el indicador provocados por la formación de los complejos NIG-Ca(II) y NIG-Fe(III) . Dado que es común que el AP-III se aglomere alrededor del catión ligado (Ríos y Schneider, 1981), es posible que durante la reacción se esté produciendo un complejo formado por AP-III, nigericina y catión, o que el

indicador se una al complejo NIG-cation, como lo hace con algunos receptores proteínicos (Dorogui, 1984).

Hasta aquí, las evidencias experimentales de la interacción de la nigericina con los cationes Li(I) (Arzt, 1984), Ca(II), Cu(II), Fe(III) y Pr(III) sugieren que la nigericina es un antibiótico poliéter monocarboxílico que posee un perfil de interacción iónica que se extiende más allá de los metales alcalinos tradicionalmente estudiados dentro de los antibióticos monovalentes.

2. CARACTERISTICAS ESPECTROSCOPICAS DE LOS COMPLEJOS NIGERICINA-CATION.

A diferencia de otras familias de productos naturales y de moléculas orgánicas sintéticas, los estudios sobre la estructura de los poliéteres carboxílicos -similares a la nigericina- y de sus complejos metálicos se han basado en el empleo de técnicas de espectroscopia de infrarrojo (IR) (Stempel y col., 1969; Ireland y col., 1985), de NMR (Anteunis, 1982; Seto y Otake, 1982; Caughey y col., 1983; Kuboniwa y col., 1985; Cuet y Dauphin, 1986; Evans y Bender, 1986; Evans y Dow, 1986) y de difracción de rayos-X (Duesler y Paul, 1982; Van Roey y col., 1984).

A causa de su estructura química alifática, la nigericina carece de grupos cromóforos o coloridos, por lo que esta es una molécula incolora. Este ha sido el motivo de que resulte complicada la obtención de información

espectroscópica UV/VIS y de la consecuente ausencia de ésta en la literatura internacional del campo. Por lo tanto, el análisis espectroscópico de absorción en el UV/VIS de los complejos nigericina:cación, aquí presentado, es un enfoque novel para el estudio de las variaciones estructurales de los mismos.

Por la falta de grupos cromóforos la absorción electrónica de los poliéteres carboxílicos nigericina y monensina se limita a la región lejana del espectro UV, a longitudes de onda menores de los 220 nm. Si bien la longitud de onda de máxima absorbancia es característica de cada antibiótico, el comportamiento de ambos espectros, en función de la concentración de poliéter, es similar. En la Tabla VII se observa que no existe un patrón lineal definido de la absorbancia electrónica a diferentes concentraciones de ionóforo. Este efecto puede deberse al potencial que tiene este tipo de antibióticos para agregarse en estructuras micelares, propias de todas las moléculas de naturaleza anfipática. Tal interpretación encuentra una amplia base de sustento en los antecedentes existentes sobre la capacidad que tiene la nigericina para formar agregados moleculares en función de su concentración y en presencia de potasio (Ferguson y col., 1971; Toro y col., 1976; Alegria, 1979; Toro y col., 1987). El análisis cuidadoso de estos experimentos permite establecer, de forma definitiva, la gran plasticidad de este poliéter para formar oligómeros móviles a partir de una concentración mínima indispensable o

concentración micelar crítica (CMC), la cual depende fuertemente de las propiedades fisicoquímicas del medio (Figura 23).

Como se ha visto hasta el momento, los cambios conformacionales de las moléculas ligantes, causados por su coordinación con cationes metálicos, pueden hacerse evidentes mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas apropiadas. Así, mientras las técnicas tradicionales empleadas -IR, NMR de protones y difracción de rayos-X- principalmente proporcionan información sobre la conformación molecular de la especie ligante, la adquisición de datos sobre la estructura electrónica del catión unido ha estado limitada a la que se puede obtener por NMR de isótopos pesados de los metales (Braunlin y col., 1985), lo que constituye un problema metodológico y económico muy importante.

Por este motivo, con el fin de adquirir información electrónica por parte del catión ligado a la nigericina, se aprovecharon las propiedades fisicoquímicas que poseen los metales de transición y lantánidos, y que son útiles para su análisis por técnicas de espectroscopia UV/VIS y EPR, no empleadas con anterioridad en el estudio de los complejos poliéter carboxílico-metal.

Como ya se mencionó en la primera parte de la DISCUSION, el espectro de absorción VIS del Pr(III) se debe a transiciones electrónicas en los orbitales 4f. Los cambios en el ambiente de estos electrones, debidos a su interacción con ligandos moleculares, producen efectos importantes en el

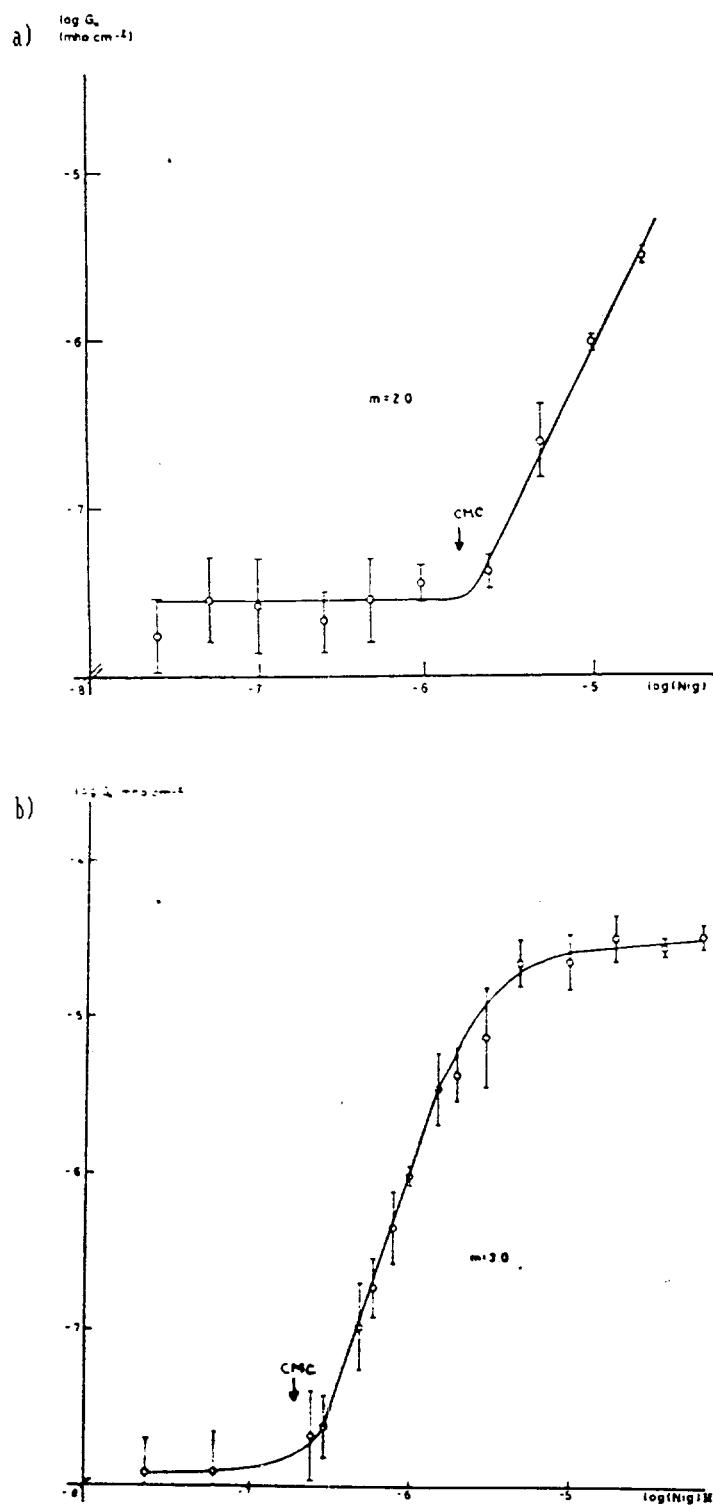


Figura 23. Efecto de la concentración de nigericina en la conductancia de BLM a dos valores de pH, en presencia de K^+ 100 mM. a) pH 9.4 con TEA y NaOH, glicina 0.05 M; b) pH 4.0 con TEA y ácido fórmico 0.05 M.

espectro de absorción del catión (Mikkelsen, 1976). Otra propiedad útil del Pr(III) es que, por su configuración electrónica, posee un momento magnético neto, que se manifiesta como un efecto paramagnético.

El estudio espectroscópico del complejo NIG-Pr(III) muestra resultados sorprendentes. El hallazgo más notable fue la resolución misma del espectro de EPR del complejo obtenido a temperatura ambiente (Figura 21c), ya que la unión de los cationes lantánidos a macromoléculas produce el ensanchamiento de sus bandas de absorción paramagnética. Además, también se alcanza a resolver la estructura electrónica hiperfina del catión Pr(III) dentro del complejo (Tabla IX). Sin embargo, esta información no es suficiente para describir las características de simetría del ambiente electrónico del complejo en solución. Para esto es necesario obtener los espectros de EPR a temperatura de nitrógeno líquido (-170 C). Por lo tanto, son la espectroscopia en el VIS y la de $^1\text{H-NMR}$ las que ponen en evidencia las propiedades fisicoquímicas del complejo NIG-Pr(III). La extinción de las señales finas del Pr(III) en el VIS (Figuras 18d y 19) sugiere una interacción muy fuerte con los grupos ligantes de la nigericina. Esta hipótesis parece confirmarse al observar los efectos que produce el catión lantánido en las señales del espectro $^1\text{H-NMR}$ del poliéter (Figura 20b); presentan desplazamientos y ensanchamientos muy grandes debidos al paramagnetismo del Pr(III). Los ensanchamientos son, además, consecuencia de la inmovilidad

de los protones en la molécula de nigericina.

Estos resultados son similares a los que se obtienen cuando se estudia el complejo NIG-Li(I) por espectroscopia de $^1\text{H-NMR}$ (Arzt, 1984). A diferencia de los corrimientos del espectro del complejo NIG-K(I) (Tabla VIII), publicados por Toro y col. (1987), el ensanchamiento del espectro del poliéter en presencia del catión Li(I) es provocado por una disminución en la movilidad de la molécula, producida por una interacción sumamente estrecha entre molécula y catión, que se correlaciona con la tendencia del Li(I) a formar uniones covalentes de coordinación con especies ligantes (v. primera parte de la DISCUSION).

En cambio, el espectro $^1\text{H-NMR}$ del complejo NIG-Ca(II) presenta un patrón de desplazamiento químico en sus señales diferente al de los cationes Li(I) y Pr(III) (Tabla VIII). Si bien, no se observan cambios numerosos, sí son notables los corrimientos y ensanchamientos de algunos picos que demuestran una modificación importante dentro de la estructura conformacional de la molécula de nigericina; el ensanchamiento de una señal a 2.2 ppm y el aumento en la intensidad de otra a 1.2 ppm sugieren la formación de, por lo menos, dos poblaciones de protones funcionalmente distintos.

Por otra parte, la realización de estudios comparativos con complejos formados con cationes de la serie de transición-d permite establecer patrones característicos de coordinación con moléculas ligantes. El espectro de absorción VIS de los cationes de transición se debe a la

distribución de los electrones en orbitales degenerados; al exponerse a la influencia del ambiente de los orbitales de la especie ligante, el espectro de absorción se modifica notablemente. En cuanto a la técnica de EPR, a diferencia de los lantánidos, las señales paramagnéticas de los cationes de transición son fácilmente observables en los complejos de coordinación que forman.

Lo común en los complejos de coordinación que forma el Cu(II) es que sus bandas de absorción se vean ensanchadas dificultando la resolución de su estructura electrónica hiperfina. Sin embargo, a pesar de que el espectro EPR del complejo NIG-Cu(II) se ensancha apreciablemente (Figura 21a) -comparado con el del cloruro cristalino del Cu(II) (Figura 24)- se resuelven señales de la estructura hiperfina del catión metálico. A partir de estos datos (Tabla IX) es posible realizar algunas estimaciones de la naturaleza y estabilidad de la coordinación del Cu(II) dentro del complejo (Tabla XIV) que sugieren la formación de enlaces de coordinación con carácter iónico.

Por su parte, en el experimento análogo con el Fe(III), no sólo se resolvieron señales características del catión a campo bajo (Figura 21b) que evidencian la presencia del metal en el complejo, sino que se identifican otros parámetros de campo paralelo y perpendicular que parecen ser propios del complejo NIG-Fe(III).

Hasta el momento es evidente que la nigericina es un

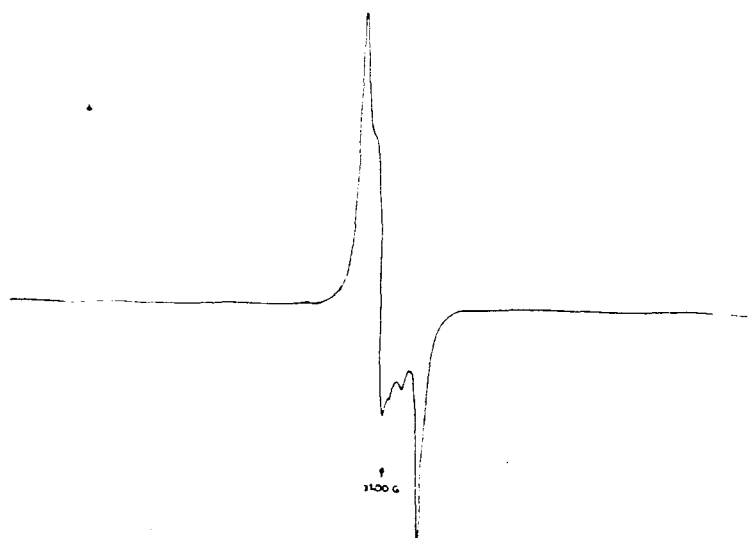


Figura 24. Espectro de EPR a temperatura ambiente del CuCl_2 en estado sólido. El espectro se corrió como se describe en la sección de Métodos.

Tabla XIV. Parámetros de coordinación del Cu(II) dentro de la molécula de nigericina.^a

Parámetro orbital	Valor calculado
x^2	0.8265
y^2	-1.23
z^2	-2.33

^aEstos valores se obtienen de la estructura hiperfina resuelta a temperatura ambiente, por lo que son tentativos.

antibiótico poliéter monocarboxílico que posee una amplia capacidad para interactuar con distintos cationes metálicos, originando una gran diversidad de complejos con variaciones estructurales individuales, los cuales le confieren propiedades físicas y químicas diferentes con un amplio potencial de alterar su modo de acción en sistemas biológicos. Sin embargo, aún es necesario realizar estudios a mayor resolución -UV/VIS en estado sólido, ¹H-NMR de dos dimensiones, EPR a temperatura de nitrógeno líquido, cristalografía de rayos-X y otras técnicas espectroscópicas directas, como el dicroísmo circular (CD)- para poder establecer las "huellas digitales" de los complejos de nigericina con cationes metálicos diferentes.

Al respecto, es muy probable que los antibióticos poliéteres que poseen dobles enlaces conjugados -como la narasina B, la dianemicina, el lasalócido A y la calcimicina- presenten bandas importantes de absorción y emisión en el espectro UV que permitan la identificación de sus huellas dactilares, como lo sugieren los estudios realizados por medio de técnicas de CD (Pfeiffer y Deber, 1979; Painter y Pressman, 1980; Caughey y col., 1986).

3. LA SELECTIVIDAD IÓNICA DE LA NIGERICINA Y SU RELACION 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 mecanismo -físico y químico- de funcionamiento 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 6 (Taylor y col., 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 conjunto constituyen al proceso completo del transporte.

Por lo tanto, para describir el mecanismo físico y

químico íntimo del transporte iónico mediado por la nigericina es necesario analizar uno por uno los postulados planteados en el párrafo anterior.

El estudio de la reacción de interacción de la nigericina con cationes metálicos, en solución homogénea de composición y propiedades fisicoquímicas conocidas, brinda información sobre su capacidad para formar complejos estables. Los resultados presentados en la Tabla VI confirman la hipótesis ya planteada de que la nigericina forma complejos con una gran variedad de cationes metálicos, además de que no existe diferencia en la estabilidad de los mismos (Tabla VII). Se deben considerar, además, la importancia que revisten propiedades del medio, como el pH, que alteran la afinidad de los grupos ligantes por los cationes metálicos (Tam y Williams, 1986).

Tales hallazgos no se correlacionan con los resultados obtenidos en los sistemas experimentales tradicionalmente empleados para la determinación de las "secuencias de selectividad iónica" de complejación (Tabla XI) ni con las curvas de transporte en membranas artificiales y naturales (Figura 22).

Los modelos de unión catiónica ensayados, generalmente están 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: la formación del complejo en la interfase y la solvatación del mismo en la fase orgánica. Además, a la fecha no se han realizado este tipo de estudios, en forma

sistemática, tomando en consideración las características de los solventes.

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 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 mecanismo general para el transporte de cationes metálicos mediado por los poliéteres monocarboxílicos tipo nigericina (Figura 25). El valor de pH del microambiente acuoso adyacente a la membrana afecta en la disociación del grupo carboxilo del poliéter, lo que depende de su constante de acidez; la información existente sugiere que la molécula protonada es más afín que la aniónica para unir al metal (Toro y col., 1987). La alta concentración química del catión induce su unión a la molécula ligante en la interfase membrana-agua; si, a su vez, la concentración del poliéter en la membrana es suficiente, es posible que varias moléculas se aglomeren alrededor del catión en función del pH interfásial originando un oligómero conductor. Una vez formado el complejo poliéter-metal, éste debe solubilizarse en la fase orgánica para poder difundir, a favor del

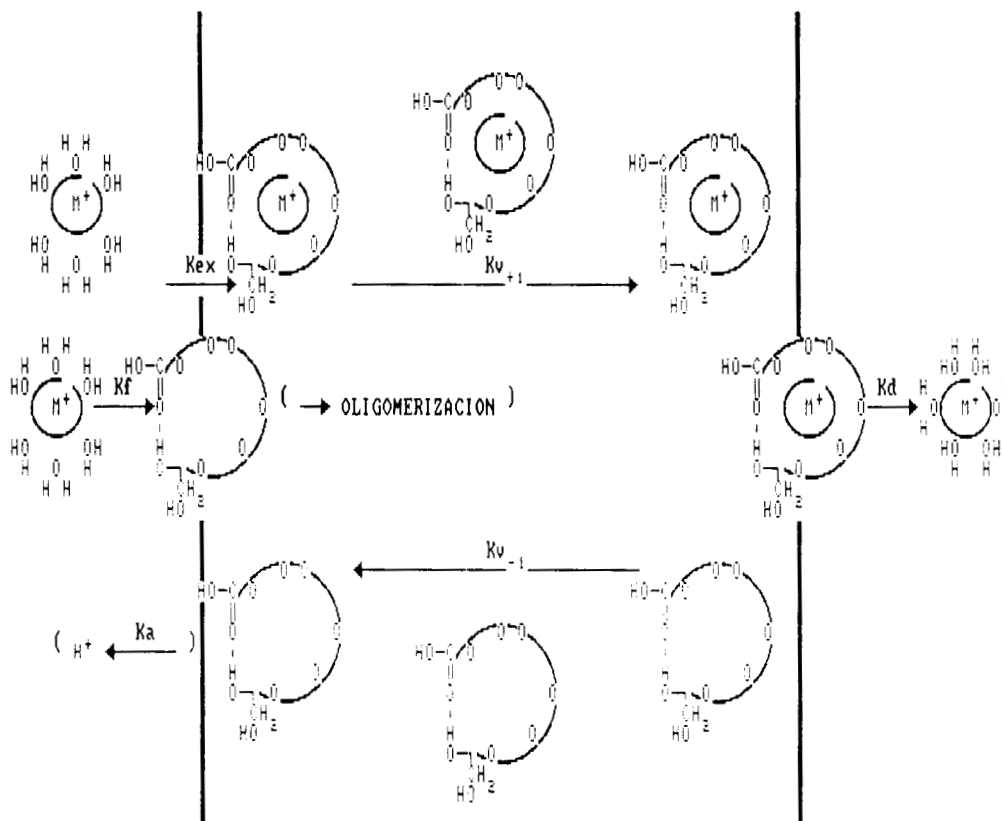


Figura 25. Modelo de transporte catiónico mediado por antibióticos polímeros carboxílicos. Se distinguen los eventos individuales que constituyen al proceso total de la difusión facilitada a favor del gradiente iónico. Explicación en el texto.

gradiente químico del catión, a través de las cadenas lipídicas de la matriz hasta el otro extremo de la membrana. Cuando el complejo se encuentra en la interfase, la molécula se disocia del catión que se solubiliza en el medio acuoso. Así, el políéter libre difunde de vuelta para completar un ciclo de transporte.

La discriminación definitiva de los eventos y factores que regulan al transporte de iones llevado a cabo por los antibióticos poliéteres será posible mediante la aplicación de técnicas cuantitativas de alta resolución en el estudio sistemático de diversos modelos experimentales, como soluciones homogéneas, sistemas de dos fases y transporte a través de membranas artificiales.

4. CONSECUENCIAS BIOLÓGICAS DEL COMPORTAMIENTO DE LOS POLIÉTERES CARBOXILICOS. UNA PROPUESTA.

Desde el descubrimiento de su mecanismo de acción (Estrada-O. y col., 1967), el antibiótico políéter monocarboxílico nigericina ha jugado un papel sumamente importante en el progreso del conocimiento biológico, bioquímico y biofísico de la función que tienen los gradientes iónicos en la regulación del metabolismo de los seres vivos. Su uso como herramienta experimental en múltiples modelos biológicos ha puesto al descubierto una gran diversidad de efectos bioquímicos en los sistemas estudiados (Reed, 1979; Reed, 1982). La mayoría de estos efectos han podido ser explicados

por el mecanismo de transporte descrito en la literatura. Sin embargo, las causas de algunas alteraciones bioquímicas y fisiológicas observadas quedan poco claras. La inhibición de la mitosis de linfocitos humanos (Daniele y col., 1978), la inhibición de la síntesis de proteínas en reticulocitos de conejo (Breitbart, 1981), el aumento en la permeabilidad a proteínas en células de mamíferos -HeLa- (Alonso y Carrasco, 1982) y la entrada de fierro a reticulocitos de conejos (Nuñez y Glass, 1985), son sólo algunos de los efectos fisiológicos y bioquímicos de la nigericina que quedan por aclarar.

Algunos de los efectos biológicos, arriba descritos, de la nigericina podrían correlacionarse con su mostrada capacidad para formar complejos no móviles con cationes de metales polivalentes, como el Ca(II) o el Fe(III) . Por cierto, dicha capacidad es la primera aportación a la literatura del campo en que se muestra la existencia de "agentes quelantes lipofílicos" de origen biológico que podrían ser usados en el estudio de la accesibilidad de metales de transición -de interés biológico (Nielsen, 1984; Mertz, 1985)- a sus sitios de unión en biomoléculas. Un hallazgo notable sobre la formación de complejos poliéter-cación no móviles, es la hecha por Cuer y Dauphin (1986), en la que se encuentra que el producto final de la bioconversión de un antibiótico análogo a la nigericina, la grisorixina, aunque pierde su capacidad para transpotar potasio, sigue formando complejos de coordinación con el

cación. Semejante observación no puede dejarse de lado si se considera que el ionóforo se convierte, entonces, en una poza para almacenamiento o en una vía de escape de cationes metálicos en los organismos.

La otra consecuencia de los hallazgos experimentales del presente trabajo es el impacto que tiene el comportamiento fisicoquímico de los poliéteres carboxílicos en el concepto vital de "economía biológica". La existencia de familias de moléculas que pueden modificar su función biológica -dependiendo de su concentración, de la polaridad, del pH, de la conductancia del medio, de la actividad iónica y de otros factores microambientales- presenta una ventaja a la función celular. La optimización de los recursos con los que cuentan las células es una idea que ha sido planteada para explicar el funcionamiento de diversos procesos metabólicos. Por ejemplo, se ha propuesto la presencia de una sola "especie" de grupos moleculares en algunas proteínas de membranas que transforman energía (Cramer y col., 1985), así como la existencia de un diseño común para la formación de canales membranales (Unwin, 1986).

Si consideramos que los seres vivos son sistemas termodinámicos que aumentan su complejidad a expensas de incrementar el desorden del medio que los rodea, salta a la vista que el dispendio de los recursos del ambiente llevaría a los organismos a su autodestrucción, a mediano o largo plazo. Si fuera este el destino de la vida -como la forma más compleja de materia en el universo- resultaría,

entonces, muy decepcionante el final del largo camino evolutivo que comenzó con un inmenso estallido hace más de 20 mil millones de años.

Finalmente, las consideraciones desarrolladas a lo largo de esta Tesis, influyen potencialmente en otros campos de estudio de las ciencias biológicas. Por ejemplo, las variaciones funcionales que sufren la nigericina y otros poliéteres carboxílicos, bajo la influencia de los cambios ambientales estudiados, dan luz sobre los efectos que pueden producir alteraciones similares del ambiente ecológico sobre los organismos que los habitan. La acidificación de los ecosistemas acuáticos libera al medio metales que normalmente no son solubles. Al mismo tiempo, los cambios en el pH modifican la afinidad de las membranas biológicas por los cationes metálicos (Tam y Williams, 1986), por lo que en este caso -que es solo uno de muchos cambios biológicos posibles- el impacto ecológico es enormemente negativo.

Así, el verdadero progreso humano es la consecuencia de la interrelación -premeditada o no- que se da entre las diferentes actividades de investigación científica, aplicada y básica o fundamental; pero ante todo, es producto de la amplia perspectiva del trabajo y la mentalidad interdisciplinaria de los individuos que las desarrollan.

CAPITULO V. CONCLUSIONES

"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.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta investigación representan una verdad parcial, no una teoría completa, sobre las propiedades de complejación y transporte catiónico mediado por antibióticos poliéteres. Para ello es necesario realizar más estudios fisicoquímicos fundamentales sobre el papel que desempeñan los diferentes eventos del transporte identificados.

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

1. ANTIBIOTICOS POLIETERES POLIVALENTES.

A diferencia del modelo general aceptado sobre la naturaleza de formación de complejos poliéter-catión (Taylor y col., 1982), se demuestra la amplia capacidad de la nigericina para formar complejos con los cationes metálicos Ca(II), Cu(II), Fe(III) y Pr(III) (Tabla VI). De esta manera, se amplía el perfil de selectividad iónica de la nigericina en

relación a su interacción con metales divalentes y trivalentes.

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

2. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS Y BIOLOGICAS.

El estudio de las propiedades espectroscópicas de la interacción de la nigericina con los cationes Ca(II) , Cu(II) , Fe(III) y Pr(III) , puso en evidencia las características generales más notables de los complejos poliéter-metal formados, además de que mostró sus diferencias (Figura 18, Tablas VIII y IX). Estas diferencias pueden correlacionarse con las propiedades biológicas observadas para algunos de los complejos; también permiten predecir el comportamiento que tendrán estos complejos al ensayarse en sistemas biológicos modelo.

Sin embargo, la descripción de las variaciones estructurales de los complejos no puede ser muy detallada, ya que se requiere el uso de técnicas espectroscópicas de alta resolución, que no estuvieron disponibles durante el desarrollo del trabajo experimental. También es necesaria la determinación cuantitativa de los cambios de estequiometría.

que sufre la nigericina en las distintas condiciones experimentales ensayadas.

3. MODELO DE COMPLEJACION Y TRANSPORTE.

La determinación de las constantes de formación de los complejos de nigericina con los cationes monovalentes alcalinos y con Ca(II) demostró que no existen diferencias significativas en la afinidad del poliéter para interactuar con cationes de diferente tamaño y estado de oxidación (Tabla X).

Además, la correlación de estos resultados con datos publicados -obtenidos en otros sistemas y modelos experimentales- permitió hacer la clara discriminación de la clatración y la solvatación y la estabilidad como tres eventos individuales que, con independencia, forman parte y contribuyen a la secuencia de acontecimientos que ocurren dentro del proceso general del transporte catiónico mediado por poliéteres carboxílicos (Figura 25).

CAPITULO VI. BIBLIOGRAFIA

Ahmen, S. y Booth, I.R. 1983. THE USE OF VALINOMYCIN, NIGERICIN, AND TRICHLOROCARBANILIDE IN CONTROL OF THE PROTONMOTIVE FORCE IN Escherichia coli CELLS. BIOCHEM. J. 212, 105-112.

Akerman, K.E.O. y Nicholls, D.G. 1983. Ca TRANSPORT AND THE REGULATION OF TRANSMITTER RELEASE IN ISOLATED NERVE ENDINGS. TRENDS BIOCHEM. SCI. 8, 1-2.

Alegria, G. 1979. TRANSPORTE CATIONICO EN MEMBRANAS LIPIDICAS NEGRAS MEDIADO POR NIGERICINA. TESIS DE LICENCIATURA EN FISICA. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

Alonso, M.A. y Carrasco, L. 1982. MOLECULAR BASIS OF THE PERMEABILIZATION OF MAMMALIAN CELLS BY IONOPHORES. EUR. J. BIOCHEM. 127, 567-569.

Anteunis, M.J.O. 1982. STRUCTURE, CONFORMATION, AND MECHANISM OF ACTION AS REVEALED BY PROTON NMR. En: POLYETHER ANTIBIOTICS 2, 245-334. J.W. Westley, Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York.

Arzt, E. 1984. INFLUENCIA DEL MICROAMBIENTE EN LA FORMACION DE AGREGADOS MOLECULARES DE IONOFOROS CARBOXILICOS. TESIS DE MAESTRIA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D.F.

Ben-Hayyim, G. y Krause, G.H. 1980. TRANSPORT OF MONO- AND DIVALENT CATIONS ACROSS CHLOROPLAST MEMBRANES MEDIATED BY THE IONOPHORE A23187. ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. 202, 546-557.

Berridge, M.J. 1985. THE MOLECULAR BASIS OF COMMUNICATION WITHIN THE CELL. SCI. AM. 253(4), 124-134.

Braunlin, W.H., Drakenberg, T. y Forsén, S. 1985. METAL ION NMR: APPLICATION TO BIOLOGICAL SYSTEMS. CURR. TOP. BIOENERG. 14, 97-147.

Breitbart, H. 1981. EFFECTS OF IONOPHORES AND METABOLIC INHIBITORS ON PROTEIN SYNTHESIS IN RABBIT RETICULOCYTES. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 656, 160-166.

Bulychev, A.A. y Vredenberg, W.J. 1976. EFFECT OF IONOPHORES A23187 AND NIGERICIN ON THE LIGHT-INDUCED REDISTRIBUTION OF Mg, K AND H ACROSS THE THYLACOID MEMBRANE. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 449, 48-58.

Carrel, A. 1936. LA INCOGNITA DEL HOMBRE. Ed. Diana, México, D.F., 1969.

Caughey, B., Painter, G., Pressman, B.C. y Gibbons, W.A. 1983. THE SOLVENT POLARITY DEPENDENT CONFORMATIONAL EQUILIBRIUM OF THE CARBOXYLIC IONOPHORE NARASIN: A PROTON NMR STUDY. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. 113, 832-838.

Caughey, B., Painter, G.R., Drake, A.F. y Gibbons, W.A. 1986. THE ROLE OF MOLECULAR CONFORMATION IN ION CAPTURE BY CARBOXYLIC IONOPHORES: A CIRCULAR DICHROISM STUDY OF NARASIN A IN SINGLE-PHASE SOLVENTS AND LIPOSOMES. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 854, 109-116.

Cereijido, M. 1983. TERMODINAMICA Y ORIGEN DE LA VIDA. En: HOMENAJE A OPARIN. pp. 91-105. M. Artís, M. Casanueva y N. Chávez, Comp., Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D.F.

Cotton, F.A. y Wilkinson, G. 1966. ADVANCED INORGANIC CHEMISTRY. 2a ed. Interscience Publishers, John Wiley & Sons, Inc., New York, New York.

Cramer, W.A., Widger, W.R., Herrmann, R.G. y Trebst, A. 1985. TOPOGRAPHY AND FUNCTION OF THYLAKOID MEMBRANE PROTEINS. TRENDS BIOCHEM. SCI. Marzo, 125-129.

Cuer, A. y Dauphin, G. 1986. STRUCTURE AND CONFORMATION OF BIOCONVERSION PRODUCTS OF A CARBOXYLIC IONOPHORE ANTIBIOTIC, GRISORIXIN, BY MEANS OF TWO-DIMENSIONAL NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE. J. CHEM. SOC. PERKIN TRANS. II 1986, 295-299.

Chapel, M., Jeminet, G., Gachon, P., Debise, R. y Durand, R. 1979. COMPARATIVE EFFECTS OF IONOPHORES GRISORIXIN, ALBORIXIN AND TWO DERIVATIVES ON K GLUTAMATE EFFLUX IN RAT LIVER MITOCHONDRIA. J. ANTIBIOT. 32, 740-745.

Daniele, R.P., Holian, S.K. y Nowell, P.C. 1978. A POTASSIUM IONOPHORE (NIGERICIN) INHIBITS STIMULATION OF HUMAN LYMPHOCYTES BY MITOGENS. J. EXP. MED. 147, 571-581.

Danielli, J.F. 1975. THE BILAYER HYPOTHESIS OF MEMBRANE STRUCTURE. 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.

Day, M.C. y Selbin, J. 1969. THEORETICAL INORGANIC CHEMISTRY. 2a ed. Van Norstrand Reinhold Co., New York, New York.

Dorogi, P.L. 1984. KINETICS AND MECHANISM OF Ca BINDING TO ARSENAZO III AND ANTIPYRYLAZO III. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 799, 9-19.

Doughty, M.J. y Diehn, B. 1982. PHOTSENSORY TRANSDUCTION IN THE FLAGELLATED ALGA, Euglena gracilis. III. INDUCTION OF Ca-DEPENDENT RESPONSES BY MONOVALENT CATION IONOPHORES. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 682, 32-43.

Drago, R.S. 1977. PHYSICAL METHODS IN CHEMISTRY. W.S. Saunders Co., Philadelphia, Pennsylvania.

Duesler, E.N. y Paul, I.C. 1982. X-RAY STRUCTURES OF THE POLYETHER ANTIBIOTICS. En: POLYETHER ANTIBIOTICS 2, 87-195. J.W. Westley, Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York.

Eisenman, G. 1968. ION PERMEATION OF CELL MEMBRANES AND ITS MODELS. FED. PROC. 27, 1249-1251.

Estrada-O., S. 1983. EL DESCUBRIMIENTO DE LOS IONOFOROS CARBOXILICOS. CIENCIA 34, 183-192.

Estrada-O., S., Graven S.N. y Lardy, H.A. 1967. EFFECTS OF NIGERICIN ON THE MITOCHONDRIAL ION TRANSPORT AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION. FED. PROC. 26, 610-614.

Estrada-O., S., Graven, S.N. y Lardy, H.A. 1967. POTASSIUM ION-DEPENDENT HYDROLYSIS OF ADENOSINE TRIPHOSPHATE INDUCED BY NIGERICIN IN MITOCHONDRIA. J. BIOL. CHEM. 242, 2925-2932.

Evans, D.A. y Bender, S.L. 1986. TOTAL SYNTHESIS OF THE IONOPHORE ANTIBIOTIC X-206. STUDIES RELEVANT TO THE STEREOSELECTIVE SYNTHESIS OF THE C(17)-C(26) SYNTHON. TETRAHEDRON LETT. 27, 799-802.

Evans, D.A. y Dow, R.L. 1986. TOTAL SYNTHESIS OF THE IONOPHORE ANTIBIOTIC IONOMYCIN. ASYMMETRIC SYNTHESIS OF THE C1-C10 AND C11-C16 SYNTHONS. TETRAHEDRON LETT. 27, 1007-1010.

Everett, G.W., Parker, S.B. y Williams, R.J.P. 1983. BINDING OF CALCIUM(II) AND LANTHANUM(III) BY A MICROBIAL IONOPHORE. EVIDENCE FOR A DYNAMIC, INTRAMOLECULAR DONOR EXCHANGE IN COMPLEXES OF LASALOCID A. BIOCHEMISTRY 22, 6149-6155.

Feinstein, M.B., Henderson, E.G. y Sha'afi, R.I. 1977. THE EFFECTS OF ALTERATIONS OF TRANSMEMBRANE Na AND K GRADIENTS BY IONOPHORES (NIGERICIN, MONENSIN) ON SEROTONIN TRANSPORT IN HUMAN BLOOD PLATELETS. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 468, 284-295.

Ferguson, S.M.F., Estrada-O., S. y Lardy, H.A. 1971. POTASSIUM-SPECIFIC UNCOUPLING BY NIGERICIN. J. BIOL. CHEM. 246, 5645-5652.

Fernández, M.S., Celis, H. y Montal, M. 1973. PROTON MAGNETIC RESONANCE DETECTION OF IONOPHOR MEDIATED TRANSPORT OF PRASEODYMIUM IONS ACROSS PHOSPHOLIPID MEMBRANES. BIOCHIM.

BIOPHYS. ACTA 323, 600-605.

Fox, S.W. 1976. THE EVOLUTIONARY SIGNIFICANCE OF PHASE SEPARATED MICROSYSTEMS. ORIGINS LIFE 7, 49-68.

Gachon, P. y Moins, N. 1982. EFFECTS OF THE MONOCARBOXYLIC IONOPHORE GRISORIXIN ON MYOCARDIAL FUNCTION AND METABOLISM IN THE PERFUSED WORKING RAT HEART. IRCS MED.SCI. 10, 209-210.

Gad, S.C., Reilly, C., Siino, K., Gavigan, F.A. y Witz, G. 1985. THIRTEEN CATIONIC IONOPHORES. THEIR ACUTE TOXICITY, NEUROBEHAVIORAL AND MEMBRANE EFFECTS. DRUG CHEM. TOXICOL. 8, 451-468.

Garty, H., Eisenbach, M., Shuldman, R. y Caplan, S.R. 1979. LIGHT-INDUCED pH CHANGES IN SUB-BACTERIAL PARTICLES OF Halobacterium halobium. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 545, 365-375.

Grandjean, J. y Laszlo, P. 1982. COMPLEXATION OF Pr BY TWO DIFFERENT IONOPHORES ENHANCES MARKEDLY ITS TRANSPORT RATE. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. 104, 1293-1297.

Grandjean, J. y Laszlo, P. 1984. SYNERGISTIC TRANSPORT OF Pr ACROSS LIPID BILAYERS IN THE PRESENCE OF TWO CHEMICALLY DISTINCT IONOPHORES. J. AM. CHEM. SOC. 106, 1472-1476.

Grandjean, J. y Laszlo, P. 1986. PRASEODYMIUM(III) TRANSPORT ACROSS PHOSPHOLIPID VESICLES IN THE JOINT OF AN IONOPHORE AND A FATTY ACID. J. AM. CHEM. SOC. 108, 3483-3487.

Graven, S.N., Lardy, H.A. y Johnson, D. 1966. ANTIBIOTICS AS TOOLS FOR METABOLIC STUDIES. V: EFFECT OF NONACTIN, MONACTIN, DINACTIN AND TRINACTIN ON OXIDATIVE PHOSPHORYLATION AND ADENOSINE TRIPHOSPHATASE INDUCTION. BIOCHEMISTRY 5, 1724-1735.

Graven, S.N., Lardy, H.A. y Estrada-O., S. 1967. ANTIBIOTICS AS TOOLS FOR METABOLIC STUDIES. VIII. EFFECT OF NONACTIN HOMOLOGS ON ALKALI METAL CATION TRANSPORT AND RATE OF RESPIRATION IN MITOCHONDRIA. BIOCHEMISTRY 6, 365-371.

Guffanti, A.A., Davidson, L.F., Mann, T.M. y Krulwich, T.A. 1979. NIGERICIN-INDUCED DEATH OF AN ACIDOPHILIC BACTERIUM. J. GEN. MICROBIOL. 114, 201-206.

Hanley, H.G. y Slack, J.D. 1982. PHARMACOLOGY OF LASALOCID. En: POLYETHER ANTIBIOTICS 1, 341-367. J.W. Westley, Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York.

Hatefi, Y., Yagi, T., Phelps, D.C., Wong, S.Y., Vik, S.B. y Galante, Y.M. 1982. SUBSTRATE AFFINITY CHANGES IN MITOCHONDRIAL ENERGY-LINKED REACTIONS. PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. 79, 1756-1760.

- Henderson, P.J.F., McGivan, J.D. y Chappell, J.B. 1969. THE ACTION OF CERTAIN ANTIBIOTICS ON MITOCHONDRIAL, ERYTHROCYTE AND ARTIFICIAL PHOSPHOLIPID MEMBRANES. THE ROLE OF INDUCED PROTON PERMEABILITY. BIOCHEM. J. 111, 521-535.
- Herrera, A.L. 1942. A NEW THEORY OF THE ORIGIN AND NATURE OF LIFE. SCIENCE 96, 14.
- Ireland, R.E., Habich, D. y Norbeck, D.W. 1985. THE CONVERGENT SYNTHESIS OF POLYETHER IONOPHORE ANTIBIOTICS: THE SYNTHESIS OF THE MONENSIN SPIROKETAL. J. AM. CHEM. SOC. 107, 3271-3278.
- Ivanov, V.T. 1975. "SANDWICH" COMPLEXATION IN CYCLOPEPTIDES AND ITS IMPLICATIONS IN MEMBRANE PROCESSES. ANN. N. Y. ACAD. SCI. 264, 221-243.
- Jenks, W.P. 1983. WHAT IS A COUPLED VECTORIAL PROCES? CURR. TOP. MEMBRANES TRANSPORT 19, 1-19.
- Kotyk, A. 1983. J. BIOENERG. BIOMEMBRANE 15, 307-319.
- Kuboniwa, H., Nagami, S., Yamaguchi, K., Hirao, A., Nakahama, S. y Yamazaki, N. 1985. A COILED SYNTHETIC CARBOXYLIC IONOPHORE CAPABLE OF ENCAPSULATING A POTASSIUM ION. J. CHEM. SOC., CHEM. COMMUN. 1985, 1468-1469.
- Larkum, A.W.D. y Boardman, N.K. 1974. THE EFFECT OF NIGERICIN AND VALINOMYCIN ON CO₂ FIXATION ELECTRON TRANSPORT AND P518 IN INTACT SPINACH CHLOROPLASTS. FEBS LETT. 40, 229-232.
- Lehninger, A.L. 1982. PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY. Worth Publishers, Inc., New York, New York.
- Liu, C.M. 1982. MICROBIAL ASPECTS OF POLYETHER ANTIBIOTICS: ACTIVITY, PRODUCTION, AND BIOSYNTHESIS. En: POLYETHER ANTIBIOTICS 1, 43-102. J.W. Westley, Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York.
- Lombardini, J.B. 1985. OPPOSING INTERACTIONS OF IONOPHORES (VALINOMYCIN AND MONENSIN) ON CALCIUM ION UPTAKE IN RAT RETINAL PREPARATIONS. NEUROCHEM. RES. 10, 77-88.
- Malaisse, W.J., Anjaneyulu, K., Anjaneyulu, R. y Couturier, E. 1980. IONOPHORE-MEDIATED Ca COUNTERTRANSPORT: ROLE OF Na, Li OR H GRADIENT. MOLECULAR CELL. BIOCHEM. 30, 67-70.
- Markin, V.S., Sokolov, V.S., Boguslavsky, L.I. y Jaguzhinsky, L.S. 1975. NIGERICIN-INDUCED CHARGE TRANSFER ACROSS MEMBRANES. J. MEMBRANE BIOL. 25, 23-45.
- Martin, R.B. y Richardson, F.S. 1979. LANTHANIDES AS PROBES FOR CALCIUM IN BIOLOGICAL SYSTEMS. Q. REV. BIOPHYS. 12, 181-209.

Mertz, W. 1985. METABOLISM AND METABOLIC EFFECTS OF TRACE ELEMENTS. En: TRACE ELEMENTS IN NUTRITION OF CHILDREN. R.K. Chandra, Ed., Nestle Nutrition, Vevey/Raven Press, New York, New York.

Michel, H. 1983. CRYSTALLIZATION OF MEMBRANE PROTEINS. TRENDS BIOCHEM. SCI. Febrero, 56-59.

Mikkelsen, R.B. 1976. LANTHANIDES AS CALCIUM PROBES IN BIOMEMBRANES. En: BIOLOGICAL MEMBRANES. pp. 153-190. D. Chapman y D.F.H. Wallach, Eds., Academic Press, London, England.

Miller, G.J. 1978. LIVING SYSTEMS. McGraw-Hill, Inc., New York, New York.

Mitchell, P. 1961. COUPLING OF PHOSPHORYLATION TO ELECTRON AND HYDROGEN TRANSFER BY A CHEMI-OSMOTIC TYPE OF MECHANISM. NATURE 191, 144-148.

Mitchell, P. 1982. CHEMIOSMOTIC ATPase MECHANISMS. ANN. N. Y. ACAD. SCI. 584-601.

Moins, N., Gachon, P., Maublant, J. y Duchene-Marullaz, P. 1982. HEMODYNAMIC EFFECTS OF GRISORIXIN, A MONOCARBOXYLIC IONOPHORE. ARCH. INT. PHARMACODYNAMIE THER. 260, 104-114.

Montal, M., Chance, B. y Lee, C.P. 1970. ION TRANSPORT AND ENERGY CONSERVATION IN SUBMITOCHONDRIAL PARTICLES. J. MEMBRANE BIOL. 2, 201-234.

Nielsen, F.H. 1984. ULTRATRACE ELEMENTS IN NUTRITION. ANN. REV. NUTR. 4, 21-41.

Nuñez, M.T. y Glass, J. 1985. IRON UPTAKE IN RETICULOCYTES. J. BIOL. CHEM. 260, 14707-14711.

Oparin, A.I. 1936. THE ORIGIN OF LIFE. Mc Millan & Co., New York, New York.

Oparin, A.I. 1974. A HYPOTHETIC SCHEME FOR EVOLUTIONARY PROBIONTS. ORIGINS LIFE 5, 223-226.

Osborne, M.W., Wenger, J., Kovzelove, F., Boyd, R. y Zanko, M. 1982. EFFECTS OF LASALOCID AND MONENSIN ON CHICKENS. 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. 1982. BROMOLASALOCID, AN HYPERTENSIVE IONOPHORE. En: POLYETHER ANTIBIOTICS 1, 397-427. J.W. Westley, Ed., Marcell Dekker, Inc., New York, New York.

Packer, L. 1967. VOLUME CHANGES AND CONTRACTILITY IN

MITOCHONDRIAL AND CHLOROPLAST MEMBRANES. ANN. N. Y. ACAD. SCI. 137, 624-640.

Painter, G. y Pressman, B.C. 1980. CIRCULAR DICHROIC DISCRIMINATION OF INCLUSION AND PERIPHERAL COMPLEXES OF THE IONOPHORE LASALOCID A. BIOCHEM. BIOPHYS. RES COMMUN. 97, 1268-1275.

Pfeiffer, D.R. y Deber, C.M. 1979. ISOSTERIC METAL COMPLEXES OF IONOPHORE A23187. FEBS LETT. 105, 360-364.

Pressman, B.C., Harris, E.J., Jagger, W.S. y Johnson, J.H. 1967. ANTIBIOTIC MEDIATED TRANSPORT OF ALKALI IONS ACROSS LIPID BARRIERS. PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. 58, 1949-1956.

Pressman, B.C. 1968. IONOPHORE ANTIBIOTICS AS MODELS FOR BIOLOGICAL TRANSPORT. FED. PROC. 27, 1283-1288.

Pressman, B.C. 1969. MECHANISM OF ACTION OF TRANSPORT-MEDIATING ANTIBIOTICS. ANN. N. Y. ACAD. SCI. 147, 829-841.

Pressman, B.C. 1973. PROPERTIES OF IONOPHORES WITH BROAD RANGE CATION SELECTIVITY. FED. PROC. 32, 1698-1703.

Prosser, B.La T. y Palleroni, N.J. 1982. TAXONOMY OF THE POLYETHER ANTIBIOTIC-PRODUCING ORGANISMS. En: POLYETHER ANTIBIOTICS 1, 21-41. J.W. Westley, Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York.

Racker, E. 1979. TRANSPORT OF IONS. ACCOUNTS CHEM. RES. 12, 338-344.

Reed, P.W. 1979. IONOPHORES. METHODS ENZYMOL. 4, 435-454.

Reed, P.W. 1982. BIOCHEMICAL AND BIOLOGICAL EFFECTS OF CARBOXYLIC ACID IONOPHORES. 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. CARDIOVASCULAR AND RENAL EFFECTS OF A23187 AND MONOVALENT POLYETHER ANTIBIOTICS. En: POLYETHER ANTIBIOTICS 1, 369-395. J.W. Westley, Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York.

Rios, E. y Schneider, M.F. 1981. STOICHIOMETRY OF THE REACTIONS OF CALCIUM WITH THE METALLOCHROMIC INDICATOR DYES ANTIPYRYLAZO III AND ARSENAZO III. BIOPHYS. J. 36, 607-621.

Rodios, N.A. y Anteunis, M. 1977. SOLUTION CONFORMATION OF NIGERICIN-FREE ACID AND NIGERICIN-SODIUM SALT. BULL. SOC. CHIM. BELG. 86, 917-929.

Rott, R. y Avi-Dor, Y. 1977. EFFECT OF IONOPHORIC COMPOUNDS ON AQUEOUS SUSPENSIONS OF PURPLE MEMBRANE. FEBS LETT. 81, 267-270.

Ruff, M.D. 1982. VETERINARY APPLICATIONS. En: POLYETHER ANTIBIOTICS 1, 303-332. J.W. Westley, Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York.

Sagan, C. 1980. COSMOS. Random House, New York, New York.

Sauer, F.A. 1983. THE MEMBRANE EQUILIBRIUM WITH CHEMICAL REACTIONS. CURR. TOP. MEMBRANES TRANSPORT 19, 21-51.

Scarpa, A. 1972. SPECTROPHOTOMETRIC MEASUREMENTS OF CALCIUM BY MUREXIDE. METHODS ENZYMOL. 24, 343-351.

Scarpa, A., Brinley, F.J. y Dubyak, G. 1978. ANTIPYRYLAZO III, A "MIDDLE RANGE" Ca METALLOCHROMIC INDICATOR. BIOCHEMISTRY 17, 1378-1386.

Scarpa, A., Brinley, F.J., Tiffert, T. y Dubyak, G.R. 1978. METALLOCHROMIC INDICATORS OF IONIZED CALCIUM. ANN. N. Y. ACAD. SCI. 307, 86-112.

Schultz, S.G. 1980. BASIC PRINCIPLES OF MEMBRANE TRANSPORT. Cambridge University Press, Cambridge, New York.

Seto, H. y Otake, N. 1982. C NMR SPECTRA OF POLYETHER ANTIBIOTICS. En: POLYETHER ANTIBIOTICS 2, 335-400. J.W. Westley, Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York.

Shamoo, A.E. y Murphy, T.J. 1979. IONOPHORES AND ION TRANSPORT ACROSS NATURAL MEMBRANES. CURR. TOP. BIOENERG. 9, 147-177.

Shastri, B.P., Sankaram, M.B. y Easwaran, K.R.K. 1987. CARBOXYLIC IONOPHORE (LASALOCID A AND A23187) MEDIATED LANTHANIDE ION TRANSPORT ACROSS PHOSPHOLIPID VESICLES. BIOCHEMISTRY 26, 4925-4930.

Singer, S.J. 1975. LIPID-PROTEIN INTERACTIONS IN MEMBRANE AND MODEL SYSTEMS. 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.

Soltoff, S.P. y Mandel, L.J. 1986. POTASSIUM TRANSPORT IN THE RABBIT RENAL PROXIMAL TUBULE: EFFECTS OF BARIUM, OUABAIN, VALINOMYCIN, AND OTHER IONOPHORES. 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. THE STRUCTURE OF NIGERICIN. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. 33, 29-31.

Stempel, A., Westley, J.W. y Benz, W. 1969. THE IDENTITY OF

THE ANTIBIOTICS NIGERICIN, POLYETHERIN A AND X-464. J. ANTIBIOT. 22, 384-385.

Sutko, J.L., Besch, H.R., Jr., Bailey, J.C., Zimmerman, G. y Watanabe, A. 1977. DIRECT EFFECTS OF THE MONOVALENT CATION IONOPHORES MONENSIN AND NIGERICIN ON MYOCARDIUM. J. PHARMACOL. EXP. THER. 203, 685-700.

Szabo, G. 1981. STRUCTURAL ASPECTS OF IONOPHORE FUNCTION. FED. PROC. 40, 92-97.

Sze, H. 1980. NIGERICIN-STIMULATED ATPase ACTIVITY IN MICROSOMAL VESICLES OF TOBACCO CALLUS. PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. 77, 5904-5908.

Tam, S.C. y Williams, R.J.P. 1986. ONE PROBLEM OF ACID RAIN: ALUMINUM. J. INORG. BIOCHEM. 26, 35-44.

Tanford, C. 1983. TRANSLOCATION PASSWAY IN THE CATALYSIS OF ACTIVE TRANSPORT. PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. 80, 3701-3705.

Taylor, R.W., Kauffman, R.F. y Pfeiffer, D.R. 1982. CATION COMPLEXATION AND TRANSPORT BY CARBOXYLIC ACID IONOPHORES. 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. AVAILABILITY OF MONOVALENT AND DIVALENT CATIONS WITHIN INTACT CHOROPLASTS FOR THE ACTION OF IONOPHORES NIGERICIN AND A23187. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 396, 301-309.

THE BECKMAN HANDBOOK OF APPLIED ELECTROCHEMISTRY. 1980. Bull. 7386. Beckman Instruments, Inc., Fullerton, California.

THE MERCK INDEX. 1976. 9a ed. Merck & Co., Rahway, New Jersey.

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. 1976. TRANSFERENCIA DE CARGA A TRAVES DE MEMBRANAS LIPIDICAS NEGRAS Y MITOCONDRIALES MEDIADA POR NIGERICINA. TESIS DE MAESTRIA EN CIENCIAS. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.

Toro, M., Gomez-Lojero, C., Montal, M. y Estrada-O., S. 1976. CHARGE TRANSFER MEDIATED BY NIGERICIN IN BLACK LIPID MEMBRANES. J. BIOENERG. 8, 19-26.

Toro, M., Arzt, E., Cerbon, J., Alegria, G., Alva, R., Meas, Y. y Estrada-O., S. 1987. FORMATION OF ION TRANSLOCATING

OLIGOMERS BY NIGERICIN. J. MEMBRANE BIOL. 95, 1-8.

Unwin, N. 1986. IS THERE A COMMON DESIGN FOR CELL MEMBRANE CHANNELS? NATURE 323, 12-13.

Van Roey, P., Duax, W.L., Strong, P.D. y Smith, G.D. 1984. CONFORMATION, COORDINATION AND ION SELECTIVITY OF THE IONOPHORE X206. ISRAEL J. CHEM. 24, 283-289.

von Bertalanfi, L. 1968. GENERAL SYSTEM THEORY. FOUNDATIONS, DEVELOPMENT, APPLICATIONS. George Brazillier, New York, New York.

Walker, N.A. 1975. UNCOUPLING IN PARTICLES AND INTACT CHOLOPLASTS BY AMINES AND NIGERICIN - A DISCUSSION OF THE ROLE OF SWELLING. FEBS LETT. 50, 98-101.

Wertz, J.E. y Bolton, J.R. 1972. ELECTRON SPIN RESONANCE. McGraw-Hill, Inc., New York, New York.

Westley, J.W. 1982. NOTATION AND CLASSIFICATION. En: POLYETHER ANTIBIOTICS 1, 1-20. J.W. Westley, Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York.

Wipf, H.K. y Simon, W. 1970. MODELLE FUR KOPPLUNGSMECHANISMUS UND TRAGER-INDUZIERTEN ALKALIIONENTRANSPORT IN MITOCHONDRIENMEMBRANEN. HELV. CHIM. ACTA 53, 1732-1740.

Young, J.Z. 1971. AN INTRODUCTION TO THE STUDY OF MAN. Oxford University Press, New York, New York.