

001079

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

I Z T A P A L A P A

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

D C B S

/  
ACOPLAMIENTO ENERGETICO Y FLUORESCENCIA  
DEL BROMURO DE ETIDIO EN MEMBRANAS  
MITOCONDRIALES .

TESIS QUE PRESENTA

GERARDO AVILA GARCIA

PARA OBTENER EL TITULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

ESPECIALIDAD BIOLOGIA EXPERIMENTAL

BIOQUIMICA Y BIOFISICA

MEXICO, D.F. 1981

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO  
EN LOS LABORATORIOS DE BIOQUIMICA Y  
BIOFISICA DEL DEPARTAMENTO DE CIEN-  
CIAS DE LA SALUD, DE LA UNIVERSIDAD  
AUTONOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA,  
BAJO LA DIRECCION DE :

DR. SERGIO ESTRADA  
DEPTO. CIENCIAS DE LA SALUD

TUTOR

DR. ANTONJO PEÑA  
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN  
FISIOLOGIA CELULAR.

ASESOR

DR. FERNANDO ANTON-TAY  
DEPTO. BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION

ASESOR

AGRADEZCO SINCERAMENTE LA VALIOSA COLABORACION  
PARA LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO DE LA M.en C.  
MIREYA TORO CALZADA .

# I N D I C E

	PAG
INTRODUCCION.....	1
I. La membrana biológica.....	1
II. La mitocondria.....	2
1. Transformaciones estructurales acopladas al estado energizado.	3
2. Transiciones de fase de lípidos y movilidad translacional lateral de las proteínas integrales .....	5
3. La fluidez y su función en la membrana transductora de energía .....	10
III. LA FLUORESCENCIA COMO METODO DE ESTUDIO DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS.....	12
1. Clasificación de los monitores fluorescentes.....	14
2. Mediciones del potencial transmembranal y gradiente de pH en membranas transductoras de energía.....	15
A. Gradiente de pH.....	16
i. Estudios en cloroplastos.....	18
ii. Estudios en membrana mitocondrial.....	19
iii. Estudios en cromatóforos bacterianos.....	21
B. Potencial transmembranal.....	23
3. Safranina.....	24
4. ANS.....	26
i. Cambios dependientes de energía en mitocondrias y partículas submitocondriales.....	31
5. Cianinas, Merocianinas y Oxonoles.....	33
i. Mecanismos de Cianinas, Merocianinas y Oxonoles.....	35

6. Quelantes fluorescentes.....	45
7. Bromuro de Etidio .....	49
i. Efectos biológicos del Bromuro de Etidio.....	52
ii. Efectos del Bromuro de Etidio en mitocondria.....	52
IV. OBJETIVOS.....	54
MATERIALES.....	55
I. Reactivos químicos .....	55
II. Aparatos.....	55
MÉTODOS.....	55
I. Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata.....	55
II. Mitocondrias tipo I.....	56
III. Mitocondrias tipo II.....	57
IV. Mitocondrias tipo III .....	57
V. Determinación de proteína.....	57
VI. Medición del consumo de oxígeno.....	58
VII. MEDICION DE LA FLUORESCENCIA DEL BROMURO DE ETIDIO...	58
1. Determinación de los espectros de excitación y emisión.....	58
2. Determinación del % de fluorescencia relativa.....	60
3. Disminución del contenido de ATP de mitocondrias tipo II.....	60
4. Determinación de la unión del Bromuro de Etidio a mitocondrias.....	61
RESULTADOS.....	62
I. Fluorescencia del Bromuro de Etidio y acoplamiento energético en mitocondrias no tratadas con EDTA(mitocondrias tipo I).....	62

II.	Fluorescencia del Bromuro de Etidio y acoplamiento energético en mitocondrias tipo II.....	65
III.	Fluorescencia del Bromuro de Etidio en mitocondrias tipo II energizadas con ATP.....	67
IV.	Relación de la fluorescencia del Bromuro de Etidio con los cambios en la unión del colorante en membranas mitocondriales..	71
V.	Dependencia de la fluorescencia del Bromuro de Etidio en el acoplamiento energético como una función de la concentración del colorante en la membrana mitocondrial.....	75
DISCUSION.....		79
I.	Fluorescencia del Bromuro de Etidio en membranas mitocondriales tipo II.....	80
II.	Fluorescencia del Bromuro de Etidio en mitocondrias tipo II y III.	81
III.	Cambios en el equilibrio dinámico de la unión del Bromuro de Etidio asociado con la conservación de energía.....	87
IV.	Cambios de la fluorescencia del Bromuro de Etidio en presencia de ATP.....	91
V.	Fluorescencia del Bromuro de Etidio a altas concentraciones en mitocondrias tipo II.....	93
CONCLUSIONES.....		94
BIBLIOGRAFIA.....		98

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
NADH	Nicotinamida adenin dinucleótido reducido
DSC	Barrido calorimétrico diferencial
ESR	Resonancia electrónica del spin
Fe - S	Proteína hierro - azufre
$\Delta\psi$	Gradiente de potencial eléctrico transmembranal
$\Delta\text{pH}$	Gradiente de pH transmembranal
ANS	1-anilinaftalen-8-sulfonato
PS	Pireno-3-sulfonato
MNS	2-(N-metilanilinaftalen-6-sulfonato)
TNS	2-p-Toluidinaftalen-6-sulfonato
AP	Acido-2-(9-antroil) palmítico
DNS	5-Dimetil-1-naftalen sulfonilo
TPB <sup>-</sup>	Ion Tetrafenilborato
SCN <sup>-</sup>	Ion Tiocianato
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ion amonio
DCMU	3-(3, 4 - Diclorofenil)-1, 1-dimetil urea
FCCP	Carbonilcianuro p-trifluorometoxifenil hidrazona
Di-O-C <sub>6</sub> (3)	3,3'-Dihexiloxacarbocianina
Di-S-C <sub>3</sub> (5)	3,3'-Dipropiltiodicarbocianina
Di-S-C <sub>2</sub> (5)	3,3'-Dietiltiodicarbocianina
Di-I-C <sub>3</sub> (5)	3,3'-Dipropilindodicarbocianina
OX-VI	bis (3-propil-5-oxaisoxazol-4-il) pentametino oxonol
OX-V	bis (3-fenil-5-oxoisoxazol-4-il) pentametino oxonol
CCCP	Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona
SDS	Dodecil sulfato de sodio
ADN	Acido desoxirribonucleico
EDTA	Acido etilendiamino tetracético
TEA	Trietanolamina
EGTA	Acido etilenglicol bis-( $\beta$ -aminoetil eter) N, N' - tetraacético
TMPD	Hidrocloreuro de N,N,N',N' tetrametil p-fenilenediamina

## I N T R O D U C C I O N

I. La membrana biológica. Los diferentes tipos de membrana biológicas aún cuando presentan uniformidad en cuanto a su organización (estructura), muestran una gran diversidad de funciones, como son la transducción de energía, la respuesta inmune, el aislamiento eléctrico, la secreción de proteínas, la propagación de impulsos, etc.

Una característica común en todas ellas, es su composición fundamental, que es de lípidos y proteínas. Existen evidencias experimentales que señalan que los lípidos se encuentran arreglados formando una bicapa(1). ¿Que es entonces, lo que permite las diferencias en cuanto a la funcionalidad de la membrana?. La posible respuesta a esta pregunta, parece estar dada por las disimilitudes en los detalles finos, que comprenden, la naturaleza química, la disposición y la relación entre lípidos y proteínas(1, 2). Estas diferencias, posiblemente vistas como "simples", son las responsables de la diversidad de las funciones membranales(2, 3) . La combinación de estudios espectroscópicos y estudios bioquímicos, han permitido determinar tanto detalles estructurales como algunas de las relaciones estructura-función.

De las membranas intracelulares, la membrana mitocondrial posiblemente sea la más interesante, debido a las funciones que desempeña y a la topología tan complicada que presenta. A continuación se señalan algunas de las características más importantes de la mitocondria, principalmente en relación con el proceso de la transducción de energía, que es la parte central de la presente tesis.

II. La mitocondria . La mitocondria es una estructura que presenta una membrana externa, un espacio intermembranal, una membrana interna, y una matriz mitocondrial . La membrana interna se pliega constituyendo las comunmente llamadas crestas mitocondriales, por lo tanto su área de superficie es mucho mayor que la de la membrana externa. Esta membrana es posiblemente la membrana intracelular más estudiada, debido a la importancia de sus actividades metabólicas, que incluyen, la transferencia de electrones a lo largo de las proteínas de la cadena respiratoria y el acoplamiento de la energía derivada de este proceso a la fosforilación del ADP (4,5). El paso de electrones entre las proteínas de la membrana es muy rápido, se estima que se requiere la interacción proteína-proteína durante un tiempo igual al tiempo medio de sus oxidaciones, por ejemplo, en el caso de la oxidación del citocromo c mediante la citocromo oxidasa, se requiere unicamente de dos milisegundos(6). Sin embargo, las interacciones entre otros componentes redox en la membrana, son más lentos como en el caso del retardo en la transferencia de equivalentes reductores entre el citocromo b y el citocromo c<sub>1</sub> y entre las flavoproteínas y el citocromo b (7). Se tienen también reportes sobre el retardo en la velocidad y tiempo medio de la síntesis del ATP acoplada con respecto a la oxidación de la citocromo oxidasa( 8 ).

Irrespectivo de los retardos inherentes a la transferencia de electrones y a la transducción de energía, existen algunos datos que sugieren que las proteínas de la mitocondria están estabilizadas por una interacción continua de proteínas( 9 ); se ha planteado que las proteínas específicas de

la cadena respiratoria están ordenadas con un espacio intermolecular lateral a través del plano de la membrana. El hecho de que este tipo de membranas esté dotado de un alto contenido de proteínas(75%) en comparación con otras membranas de células eucarióticas(7,10) se esgrime como apoyo a una interacción proteína-proteína continua .

La membrana externa contiene un porcentaje pequeño de la masa mitocondrial, en tanto que la membrana interna, posee entre el 80-95% de las proteínas mitocondriales unidas a la membrana y más del 90% de los lípidos mitocondriales totales( 2).

Mediante diversas técnicas se ha determinado la existencia de varias enzimas en la membrana externa de la mitocondria, entre ellas se encuentran la Acil Co A sintetasa, la Aminooxidasa, la NADH-Citocromo b<sub>5</sub> reductasa, la Citocromo b<sub>5</sub> glicerol fosfato acil transferasa, la Fosfolipasa A<sub>2</sub>( 2 ), y recientemente una proteína Fe-S(11) .

1. Transformaciones estructurales acopladas al estado energizado. En la mitocondria, paralelamente a los cambios de energización, se presentan transformaciones en la conformación de la membrana(7,12,13,14 ). Tales cambios se observaron inicialmente en mitocondrias aisladas de hígado de rata y en células estructural y funcionalmente intactas(15). En la actualidad se reconoce que los cambios estructurales se presentan universalmente en todas las membranas transductoras de energía, irrespectivo del tipo celular de donde se aíslen estas membranas .

En mitocondrias metabólicamente intactas, se observa en forma consistente, una configuración condensada de la membrana interna plegada

al azar, sin una clara distinción entre las crestas y la matriz. Durante la energización con sustratos respiratorios y el subsecuente inicio de la fosforilación oxidativa con ADP, ocurren variaciones estructurales cíclicas en la membrana (incrementos en volumen y condensaciones), las cuales son completamente bloqueadas tanto por inhibidores del transporte de electrones como por inhibidores y desacoplantes de la fosforilación oxidativa (7, 12). Dichos cambios han sido estudiados por microscopía electrónica de barrido criograbado y criofractura (12, 16, 17). La interpretación general de estos datos es parcialmente consistente con el planteamiento de la hipótesis conformacional (18). Sin embargo, la carencia de conceptos contundentes, los cuales puedan servir para el entendimiento del mecanismo de la conservación de la energía, revela lo inadecuado del conocimiento existente en la organización molecular y su interrelación con los eventos metabólicos que ocurren en esta membrana. Las observaciones de las transformaciones estructurales que suceden durante los procesos energéticos, demuestran que esta membrana puede sufrir una rápida reorganización de la superficie, lo cual requiere de un alto grado de flexibilidad, plasticidad, y tal vez un alto grado de libertad de movimiento de los componentes membranales. En parte, esto parecería contradecir el señalado alto porcentaje de proteínas integrales, lo cual ciertamente tiende a restringir la plasticidad y flexibilidad de las membranas. Es en base a este contexto que se examinan detalles de algunas de las características en la organización molecular de la membrana mitocondrial interna.

2. Transiciones de fase de lípidos y movilidad translacional lateral de las proteínas integrales. Los fosfolípidos mitocondriales bajo condiciones fisiológicas, existen en varios estados o fases (termotrópicas o mesomorfismo liotrópico), (19). Una de las fases características es la  $L_{\alpha}$  la cual presenta una organización de rango largo que corresponde a un estado de cristal líquido lamelar (L) y, una organización de rango corto, que corresponde a un estado de parafina líquida ( $\alpha$ ). Esta fase  $L_{\alpha}$  confiere suficiente movilidad a la membrana permitiendo la interacción entre sus componentes. Al efectuarse estudios de barrido calorimétrico diferencial (DSC) en combinación con microscopía electrónica con la técnica de criofractura tanto en mitocondrias intactas, como en mitoplastos (16, 17), se encontró que existe una distribución similar de los componentes proteicos en preparaciones de mitocondrias y mitoplastos de hígado de rata, corazón y levadura (16). Sin embargo se observó una diferencia en la distribución asimétrica de partículas intramembranales entre membrana interna y membrana externa. La mayoría de las partículas, se localizan en las monocapas de las dos membranas que ven hacia la matriz. Es decir, la matriz citoplasmática para el caso de la membrana externa y de la matriz mitocondrial para el caso de la membrana interna. Las caras expuestas por la fractura de la membrana mitocondrial enfriada lentamente desde  $30^{\circ}\text{C}$  a  $10^{\circ}\text{C}$  presentan, en el caso de la membrana interna, una alta densidad de partículas intramembranales distribuidas al azar, las cuales posiblemente representan proteínas integrales intercaladas en la porción hidrófoba de la bicapa (7, 16). Esta membrana interna muestra aproximadamente  $6\ 000$  partículas/ $\mu^2$ , a diferencia de la membrana externa,

que presenta aproximadamente la mitad(16).

En la membrana interna, las partículas más pequeñas presentan un diámetro entre 4 y 5 nm, mientras que aproximadamente el 70% de las partículas miden entre 10 y 18 nm de diámetro a diferencia con otro tipo de membrana de células eucarióticas. Este alto contenido de partículas de tamaños variados podría corresponder a las proteínas de la cadena respiratoria que comprenden los citocromos(excepto citocromo c) , y varias deshidrogenasas unidas a la membrana, además de subunidades no catalíticas de la ATPasa y varias proteínas translocadoras de iones y sustratos. Las partículas ocupan aproximadamente un tercio del área de superficie de la membrana(15, 17); además las proteínas que las constituyen presentan un requerimiento de espacio para su movilidad lateral translacional. El potencial para esta movilidad puede ser considerablemente alto, siempre y cuando la bicapa lipídica sea fluida y que las proteínas no estén estabilizadas por una red continua y rígida de proteína-proteína.

Cuando las mitocondrias son enfriadas lentamente hasta 0°C, por debajo de la temperatura de transición exotérmica, se presenta una clara separación lateral entre regiones "lisas", libres de partículas y regiones ricas en ellas en la cara hidrófoba de la membrana externa. Tal separación estructural no se manifiesta en la membrana interna. Sin embargo, si la mitocondria intacta es congelada lentamente hasta -8°C, se presentan separaciones laterales tanto en la membrana interna como en la externa. Tal separación lateral termotrópica protagoniza posiblemente la agregación de las partículas y es muy probable que sea el resultado del crecimiento

de las regiones que excluyen proteínas durante las transiciones de la fase lipídica cristalina a un estado de gel en la bicapa, como lo indican estudios de calorimetría diferencial de barrido( 7 ) . Estas separaciones laterales termotrópicas de los componentes tanto de la membrana interna como externa son completamente reversibles(7 ), ya que la rápida desagregación, la libre difusión lateral y la completa dispersión al azar de las partículas intramembranales ocurren en la membrana cuando se incrementa la temperatura, lo cual es consistente con las propiedades de fusión de la bicapa membranar. De considerable significación en estos estudios, es la determinación de que la separación lateral entre las proteínas integrales y el estado de gel de la bicapa, así como la reversa de esta separación en la membrana transductora de energía, no altera en lo absoluto la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa . Las mitocondrias equilibradas a  $-8^{\circ}\text{C}$  durante 8-15 minutos y llevadas a  $30^{\circ}\text{C}$ , son totalmente eficientes en la fosforilación oxidativa y presentan el mismo grado de control metabólico que mitocondrias no tratadas bajo estas condiciones( 7 ).

Los datos referentes al alto grado de fluidez de la membrana mitocondrial a temperatura fisiológica, son consistentes con el conocimiento de la composición lipídica de la membrana. El contenido de lípidos en la mitocondria es bajo(25-27%) en relación con otro tipo de membranas biológicas (2,7, 19). Sin embargo, contiene un porcentaje alto(90%) de glicerofosfolípidos (20), como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, cardiolipina y fosfatidilinositol. La fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina representan aproximadamente el 80% de los lípidos de la membrana interna y colectivamente contienen un 53 %

ácidos grasos insaturados(20); la cardiolipina a su vez, se localiza exclusivamente en la membrana interna y contiene un 90% de ácidos grasos insaturados, de los cuales, un 80% está constituido por el ácido oleico(18 : 1 ) y ácido linoleico (18 : 2), (7).

Las transiciones exotérmicas, que se presentan a bajas temperaturas en la membrana interna mitocondrial, son consistentes con la relación total de fosfolípidos saturados e insaturados en la membrana, que es de 0.65 , además de la ausencia total de colesterol. En comparación, puede hacerse notar que la membrana externa presenta un rango mayor de temperatura en su transición exotérmica, así como una relación de fosfolípidos saturados-insaturados de 1.75, y una relación molar de colesterol-fosfolípidos de 0.13 (7) .

La membrana interna, que es la transductora de energía, está constituida por un 75% de proteínas, de las cuales entre el 60 y 70 % son integrales (21); la mayoría de estas últimas son metabólicamente activas, probablemente globulares(22), y asociadas hidrofólicamente con las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos.

El papel de la estructura de la membrana en la función de los sistemas multienzimáticos del transporte de electrones y de la fosforilación oxidativa se ha estudiado por varios grupos de trabajo. El problema central concerniente es cómo estas enzimas interactúan unas con otras y qué tan necesaria es la membrana para esta interacción, la pregunta que se plantea es; ¿estos complejos están ensamblados en forma fija, o difunden lateralmente en forma independiente unos de otros interaccionando solamente cuando ellos

colisionan? .

Debido a los rápidos eventos secuenciales involucrados en la fosforilación oxidativa, muchos investigadores son atraídos por la hipótesis que los componentes involucrados están organizados en complejos(2) y que éstos a su vez se organizan en multicomplejos(7, 9). En apoyo a esta hipótesis existen datos en base a cálculos efectuados en consideración a las proteínas totales de la membrana, encontrándose que solamente el 40% de la superficie membranal interna parece estar cubierta por una bicapa lipídica, estando el resto ocupado por proteínas(23, 24). Sin embargo, si los cálculos se basan sólo en las proteínas integrales de la membrana, se establece que dos tercios de la superficie están ocupados por los fosfolípidos y el resto por las proteínas(25). En este contexto se plantea que la difusión lateral de los componentes proteicos en el plano de la membrana interna puede ser un factor importante para la interacción de las proteínas integrales bajo condiciones fisiológicas. Sin embargo, se considera que la capacidad de difusión lateral no necesariamente es el mecanismo principal por el cual la interacción ocurre, sino que tanto la difusión como la existencia de complejos multi-enzimáticos ensamblados pueden tener un papel importante en el transporte de electrones y síntesis de ATP, debido a que la cadena respiratoria y el sistema de síntesis de ATP constituyen entre el 30 y 40 % de las proteínas totales de la membrana interna mitocondrial; el resto, se atribuye a enzimas translocadoras de iones y sustratos y posiblemente a proteínas estructurales (26) .

Una manera de estudiar la difusión de componentes membranales es

utilizando policationes, como la ferritina, que se une electrostáticamente a la superficie de la membrana interna y que inhibe tanto la actividad de la citocromo oxidasa como la actividad de la permeasa de succinato(27), proporcionalmente al grado y localización de su interacción. Debido a la unión electrostática de la ferritina en la superficie de la membrana, se puede analizar la distribución del ligando unido a la superficie, simultáneamente con la localización de las partículas intramembranales en la cara hidrófoba. Así, el polication se une a grupos aniónicos en la superficie de la membrana transductora de energía, migrando lateralmente con las proteínas integrales de la membrana durante la transición del estado cristalino líquido a un estado de gel(7).

### 3. La fluidez y su función en la membrana transductora de energía .

Cuando en la membrana interna mitocondrial, se analiza la actividad metabólica, en función de la relación del tiempo medio entre la oxidación de algunos componentes redox y la síntesis de ATP, es difícil establecer una relación en términos de un acoplamiento físico entre los componentes redox y la ATPasa. En el caso del tiempo medio de oxidación del citocromo c-oxidasa, que es de 0.5 mseg(7), la síntesis de ATP acoplada a esta oxidación muestra un retardo considerable en la velocidad y tiempo medio, el cual es de 100 mseg(8, 28), tal retardo puede racionalizarse en términos del tiempo requerido para los cambios conformacionales de los componentes redox y la ATPasa durante el acoplamiento conformacional en la membrana, o el tiempo requerido para establecer el gradiente protón-motriz a través de la membrana para generar ATP. Considerando la naturaleza fluida de la mem-

brana transdutora de energfa, tal retardo puede tambi3n ser explicado por la interacci3n de algunos de los componentes de difusi3n macromolecular en toda la reacci3n durante la cual la energfa oxidativa es transducida.

La velocidad de desplazamiento lateral de los citocromos en la membrana interna puede ser una limitante para la interacci3n del citocromo c con el citocromo a en la cadena respiratoria. Asimismo, para los tiempos de oxidaci3n del citocromo b y las flavoprotefnas(6), el tiempo de retardo en la transferencia de equivalentes reductores a la cadena de citocromos desde succinato y NADH deshidrogenasa es consistente con la relaci3n del contenido de deshidrogenasas y la cadena de citocromos en la membrana, la cual es de 1:10(6). En este caso, la ubiquinona parece funcionar como un componente redox que "va y viene" entre la deshidrogenasa y los citocromos b para liberar equivalentes a la cadena de citocromos(29). Tal libertad de movimiento requerida para estos eventos metab3licos est3 dada por: un medio ambiente lipfdico altamente fluido, consistente con la baja viscosidad de aproximadamente 0.1 p a 30°C, determinada para la fase lipfdica de la mitocondria(30); la alta movilidad de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolpidos(detectada por espectroscopfa de NMR-carbono 13); y la carencia total de colesterol(31).

En lo que respecta a las protefnas integrales de las membranas biol3gicas, la movilidad lateral translacional debida al movimiento Browniano ocurre con un coeficiente de difusi3n de aproximadamente  $5 \times 10^{-9} \text{cm}^2 \text{seg}^{-1}$  (32, 33), el cual es semejante a un desplazamiento molecular de 100 nm/seg. En el caso de las protefnas integrales de la membrana transdutora de

energía mitocondrial, el potencial de difusión lateral puede ser mayor que  $10 \text{ nm} \times 100 \text{ mseg}^{-1}$ (7) .

La compleja organización estructural y funcional de los seres vivos depende de la constante disponibilidad de energía química, principalmente en forma de potenciales electroquímicos o de enlaces de alta energía.

El mecanismo por el cual la energía libre liberada durante el transporte de electrones se acopla a la síntesis de ATP tanto en organelos fotosintéticos como respiratorios, es de fundamental importancia y ha sido sujeto de extensivas investigaciones en varios laboratorios en los últimos años. Estos estudios han generado sugerencias constructivas e interesantes, pero no plantean la respuesta definitiva a la pregunta sobre cual es la naturaleza del acto primario de la conservación de la energía. La conservación primaria de la energía tanto en organelos fotosintéticos como respiratorios probablemente ocurre en locus membranales similares, los cuales se localizan en la membrana osmóticamente activa. La integridad de la membrana es un requerimiento estricto para el propio funcionamiento del aparato de acoplamiento energético, lo que hace extremadamente difícil resolver su mecanismo en detalle. Sin embargo, recientemente se han utilizado moléculas fluorescentes(34-37) y paramagnéticas(38-40) para el estudio de las membranas biológicas, lo que da una nueva panorámica para la solución del problema .

### III. LA FLUORESCENCIA COMO METODO DE ESTUDIO DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS.

La metodología que se describe en este trabajo involucra la introduc-

ción a la membrana mitocondrial de una molécula, que presenta propiedades fluorescentes: el bromuro de etidio. En general, el uso de agentes fluorescentes presenta dos limitaciones. La primera es que la introducción de moléculas extrañas podría perturbar en cierto grado, el orden e interacciones moleculares del sistema en estudio. La segunda es que, en un sistema de ensamblaje tan complejo como la membrana, es muy difícil conocer, la localización precisa del cromóforo. Sin embargo estos dos problemas no son insuperables.

La información básica contenida en las mediciones de emisión de moléculas fluorescentes se relacionan con el micromedio ambiente que rodea al cromóforo. Por esta razón, la fluorescencia no es aplicable para resolver problemas estructurales o dinámicos a un nivel atómico, pero es un método ideal por su simplicidad y sensibilidad en las mediciones para localizar eventos en porciones moleculares restringidas, de un sistema tan complejo como lo es la membrana biológica.

Los métodos fluorescentes tienen la ventaja de tener una sensibilidad de varios ordenes de magnitud mayor que la que presentan los métodos paramagnéticos; tal sensibilidad hace útiles a los métodos fluorescentes en el estudio de reacciones biológicas específicas. Asimismo un gran número de moléculas fluorescentes presentan una sensibilidad muy alta a la polaridad del medio ambiente, así como a movimientos moleculares, estos dos factores ofrecen una ventaja importante sobre pruebas de resonancia electrónica del spin (ESR), las cuales responden únicamente al movimiento molecular.

La aplicación de técnicas fluorescentes en los sistemas biológicos

implica la participación de cromóforos fluorescentes con diversas características. A continuación se da una clasificación de este tipo de moléculas .

1. Clasificación de los monitores fluorescentes. . Los cromóforos pueden ser intrínsecos al sistema ,tal es el caso del triptofano en las proteínas, y extrínsecos, en cuyo caso se les llama rastreadores fluorescentes, siendo estos últimos los más ampliamente utilizados en los estudios de sistemas biológicos. Los rastreadores fluorescentes se clasifican en tres grandes grupos, los cuales se caracterizan por el tipo de interacción con el sistema en estudio .

1. Moléculas iónicas o electrostáticas. Son moléculas con carga eléctrica neta, por lo que pueden ser atraídos por cargas opuestas localizadas en la superficie de la membrana; esto produce una alteración de la fluorescencia asociada al movimiento del fluoróforo, del medio acuoso a la membrana, y viceversa(34, 35) .

2. Compuestos que se unen covalentemente a grupos específicos de la membrana formando aductos fluorescentes. La unión covalente tiene la ventaja de que su interacción a los sitios de unión se puede determinar por métodos químicos que involucran la degradación del sistema. Al mismo tiempo, si su unión es en sitios de importancia funcional, probablemente interfieran de manera significativa con las propiedades bioquímicas del sistema .

3. Quelantes fluorescentes. Estos reactivos se unen a iones con una alteración concomitante del espectro de fluorescencia, la cual muestra la interacción característica con los cationes unidos a la superficie de la

membrana(41, 42) .

En la tabla 1 , se muestran algunos de los cromóforos más comúnmente usados para el estudio de los fenómenos membranales .

2. Mediciones del potencial transmembranal y gradiente de pH en membranas transductoras de energía . Los cambios en el potencial transmembranal( $\Delta\Psi$ ) y en el gradiente de pH( $\Delta\text{pH}$ ) son eventos esenciales en las células y organelos, debido a que controlan las funciones básicas celulares. La propagación del impulso nervioso, la transducción de energía y la incorporación de iones y metabolitos son algunos de los procesos que directamente dependen de la magnitud y transcurso de  $\Delta\Psi$  y/o  $\Delta\text{pH}$  . Con referencia a la fosforilación oxidativa, uno de los postulados centrales de la hipótesis quimiosmótica(4,5) es la existencia del gradiente del potencial electroquímico de protón(fuerza protonmotriz) a través de la membrana mitocondrial, el cual está constituido de un potencial transmembranal y de un gradiente de pH. En mitocondria, el potencial de membrana se ha considerado como el componente más relevante del gradiente del potencial electroquímico de protón. Sin embargo, la determinación tanto del gradiente eléctrico como químico es fundamental para el conocimiento del mecanismo de la fosforilación oxidativa y del transporte de iones en la mitocondria .

En situaciones en las cuales es practicamente imposible la utilización de microelectrodos, el  $\Delta\Psi$  y el  $\Delta\text{pH}$  se han determinado de manera indirecta a partir de la distribución al equilibrio de iones lipofílicos radiactivos(43, 44) y ácidos o aminas permeables a la membrana(45). En principio, las técnicas radioquímicas, requieren que las moléculas marcadas se equilibren rápida -

Tabla 1. Compuestos fluorescentes utilizados en el estudio de las membranas

I. NO COVALENTES

<u>Nombre químico o convencional</u>	<u>Siglas</u>	<u>Propiedad o locus membranal que mide</u>
1-Anilinaftalen-8-sulfonato	ANS	Polaridad, estado energético mitocondrial. potencial transmembranal, carga de superficie.
Pireno-3-sulfonato	PS	Volumen membranal
2-(N-metilnilino naftalen-6-sulfonato)	MNS	Polaridad, conformación .
2-p-Toluidinaftalen-6-sulfonato	TNS	Estado energético de mitocondria
Bromuro de Etidio	EB	Estado energético de mitocondria .
Eosina	----	Polaridad
Quinacrina, Atebrina, Proflavina, Acridina naranja de acridina, Amarillo de acridina, Corifosfina, fosfina, benzoflavina, Rojo neutro violeta neutro, 9-aminoacridina	-----	Estado energético de cloroplasto, partículas submitocondriales, cromatóforos bacterianos, pH .
Safranina	-----	Potencial transmembranal, carga de superficie.
Acido 12-(9-antroil)esteárico	-----	Conformacion de membrana, reducción de ubiquinona
Acido 2-(9-antroil)palmitico	AP	mitocondria

Cianinas	-----	Potencial transmembranal
Merocianinas	-----	Potencial transmembranal
Oxonoles	-----	Potencial transmembranal

## I I C O V A L E N T E S

Dimetilaminoestilbeno isotiocianato	-----	proteínas de membrana
Acetato mercúrico de fluoresceína	-----	Unión a mitocondrias
5-Dimetil-1-naftalen. sulfonilcloruro	DNS	Movimiento rotacional en membrana
Fluoresceína isotiocianato	-----	Movimiento rotacional en membrana
Cloruro de Dansilo	-----	Proteínas de membrana

## I I I Q U E L A N T E S

Tetraciclina	-----	Carga de superficie
clorotetraciclina	-----	Carga de superficie
metaciclina	-----	Carga de superficie

Metaciclina

-----

Carga de superficie

Minociclina

-----

Carga de superficie

oxitetraciclina

-----

Carga de superficie

mente a través de la membrana y que no interactúen de manera significativa con ella y/o con otros componentes de la preparación. Aún cuando estos criterios sean satisfechos, este tipo de experimentos son laboriosos y, en la mayoría de los casos se requiere de la separación de las fracciones celulares del medio de suspensión, lo cual no hace un método aceptable para mediciones de cinética. Sin embargo, y debido a la gran relevancia que representa el gradiente electroquímico, recientemente se ha manifestado un considerable interés en el desarrollo y uso de moléculas cuya absorción y/o fluorescencia sean específicamente sensibles a cambios del potencial transmembranal o del pH(45-51) . A continuación se presenta información sobre la determinación de ambos gradientes en membranas transductoras de energía .

A. Gradiente de pH . Se ha observado que moléculas fluorescentes como la atebrina, 9-aminoacridina, naranja de acridina, amarillo de acridina, proflavina, corifosfina, fosfina, benzoflavina, rojo neutro y violeta neutro, son captadas bajo condiciones de energización, por partículas submitocondriales (52-57), cloroplastos(49, 58-62), y cromatóforos bacterianos(63-68). Esta incorporación se correlaciona al  $\Delta$ pH generado a través de la membrana . Asimismo, se establece como un consenso general, que los colorantes anteriormente mencionados requieren un anión lipofílico para su incorporación en la membrana(54-57, 69, 70), aunque se ha reportado que algunos aniones lipofílicos(69, 70) como el  $\text{TPB}^-$  y el  $\text{SCN}^-$  inhiben la incorporación de naranja de acridina y del rojo neutro .

Albert y col. (71) y Dell'Antone(56) han estudiado el comportamiento de la ionización de las acridinas, demostrando por diferentes líneas de investigación (49, 56, 58, 72) que las moléculas monitoras "ideales de la energización muestran cierto grado de ionización.

Los colorantes naranja de acridina, rojo neutro, violeta neutro y atebrina presentan un alto coeficiente de partición hacia la fase orgánica, en el rango de pH de 6.5 y 8.5. Un alto coeficiente de partición parece ser requerimiento necesario para observar la incorporación de las acridinas como consecuencia de los procesos de energización(54, 55), y como se esperaría para un proceso dependiente de pH, el ionóforo nigericina(en presencia de potasio) y el ión  $\text{NH}_4^+$  inhiben la incorporación de todas las acridinas(54, 55, 67, 73, 74).

Los experimentos de partición entre cloroformo:agua muestran que los valores de partición pueden ser incrementados, cuando la afinidad del colorante por la fase acuosa es disminuida por la adición de aniones en esta fase. En todos los casos, el colorante se mueve a través de la interfase en su forma cargada, probablemente formando pares iónicos con los aniones lipofílicos(56, 57, 75).

En general se acepta que los aniones, en la incorporación de bases débiles en cloroplastos, cromatóforos y partículas submitocondriales incrementan el  $\Delta\text{pH}$  debido a la reducción del potencial eléctrico transmembranal positivo en el interior, creado por la salida de protones(76-79). Este mismo mecanismo es sugerido para la incorporación de acridinas(54, 55).

Azzi y col. (57) reportan que la emisión de fluorescencia de atebrina

y naranja de acridina es también sensible a la composición iónica de su medio ambiente. La propiedad de las acridinas de disminuir su fluorescencia y cambiar sus características espectrales por la adición de iones al medio, puede reflejar un fenómeno de agregación del colorante inducido por las sales(53, 56, 57). Tal agregación también puede ocurrir en solventes de baja constante dieléctrica debido a la fuerte interacción entre las moléculas del colorante no separadas por el solvente. Cuando los colorantes básicos interaccionan con aniones, tienden a agregarse como una consecuencia de la disminución de repulsiones electrostáticas o por facilitar las interacciones hidrofóbicas(53, 57). Algunos polímeros aniónicos son muy efectivos en producir cambios en la fluorescencia y absorbancia de los colorantes catiónicos, debido a que las moléculas del colorante se unen estrechamente facilitando interacciones electrostáticas entre ellas y el polímero(53).

i. Estudios en cloroplastos. Cuando en la oscuridad, se adiciona atebрина a una suspensión de cloroplastos, se observa una disminución inicial de la fluorescencia debida a la unión de la atebрина a los cloroplastos. Cuando los cloroplastos son energizados por iluminación, la fluorescencia remanente de la atebрина desaparece. Esta disminución no ocurre cuando el transporte de electrones es bloqueado por DCMU, pero es restaurada por la adición de ascorbato más diaminodureno(donador de electrones a la cadena fotosintética después del bloqueo por DCMU, asimismo por ADP y por el inhibidor Dio-9(60).

Los cloroplastos son capaces de presentar una incorporación activa de protones dependiente de energía luminosa(80), o de energía química si se

favorece una acumulación interna de protones (por incubación con ácido succínico), para alcanzar un rápido equilibrio con el exterior del organelo, se produce un estado energizado que puede efectivamente ser utilizado para la síntesis de ATP(81). Bajo condiciones del llamado brinco ácido-base, se nota una disminución de la fluorescencia, cuya magnitud es dependiente del gradiente de pH inducido. Así en tres modalidades diferentes de energización de la membrana de los cloroplastos, se produce una disminución de la fluorescencia de la atebrina, la cual en ciertas condiciones es proporcional a la unión de la atebrina con los organelos ya sea en la luz o en la obscuridad(58). Sorprendentemente, sin embargo, se encontró que en cloroplastos desnaturalizados por calor, la fluorescencia de la atebrina fue completamente extinguida (independientemente de la presencia de luz y desacoplantes). Los datos de la fluorescencia por la unión del colorante a los cloroplastos desnaturalizados y los obtenidos por la energización de estos son muy semejantes, esto indica que la unión debida a la energización ocurre por la presencia de sitios negativos en la membrana(53, 56, 58, 62, 67), más que en la fase acuosa interna del organelo. Probablemente la desnaturalización por calor causa una exposición irreversible de partes de la membrana con estos sitios, de tal manera que la unión ocurre de un modo no dependiente de la energización.

ii. Estudio en membrana mitocondrial. Experimentos realizados con vesículas mitocondriales (evertidas con respecto a mitocondrias intactas) han sugerido que dichas vesículas presentan una carga más positiva sobre la superficie externa y más negativa en la interna(79, 82-85). Subsecuentemente

otros trabajos (58, 59, 86, 87) han mostrado que el movimiento de atebrina se lleva a cabo en una dirección opuesta a lo esperado. Azzi y col. (57) demuestran que la atebrina y naranja de acridina interaccionan con la membrana de los fragmentos mitocondriales, y señalan que estas dos moléculas cargadas positivamente migran desde el medio acuoso a la membrana, durante la conservación de la energía. Sin embargo, el movimiento de atebrina y naranja de acridina puede efectuarse solamente en presencia de aniones permeables (54-57, 69, 70). De lo anterior, se establece que el movimiento del colorante no es un proceso primario ligado a la conservación de la energía, sino que probablemente es una consecuencia de la incorporación primaria de los aniones (56, 57).

En las partículas membranales de mitocondria se observa que el ATP así como el succinato inducen una disminución de la fluorescencia del colorante, la cual está acoplada a los procesos de energización. Este fenómeno, en el caso del succinato, es apoyado por el efecto de FCCP, el cual previene o revierte la disminución de la fluorescencia inducida por el sustrato (56, 57).

Es importante hacer notar que las diferencias de las respuestas de atebrina y naranja de acridina acoplada a los procesos de conservación de energía, con respecto a otros monitores fluorescentes (88, 89) como el bromuro de etidio (89-91), consisten en el requerimiento de iones para los cambios de fluorescencia y absorbancia. Además en la ausencia de aniones añadidos, la naranja de acridina y la atebrina son liberadas de la membrana al energizarse ésta con succinato o ATP. La conclusión de estos estudios establece que las acridinas tienden a excluirse de la membrana de los fragmentos

mitocondriales por un proceso de energización en ausencia de aniones, y a ser incorporadas a la membrana, en la presencia de ellos (57) .

iii. Estudios en cromatóforos bacterianos . En partículas respiratorias bacteriales de polaridad membranal invertida, las reacciones redox de la cadena oxidativa producen una entrada de protones, generándose un gradiente de pH transmembranal(92, 93). La determinación cuantitativa de este gradiente de pH se ha realizado midiendo la fluorescencia de aminas como la 9-aminoacridina y atebrina(49, 63-68). Cuando la membrana se energiza, ocurre un apagamiento de la fluorescencia de estas moléculas, interpretado como el resultado de su acumulación en la membrana(49, 67). La variación de la fluorescencia dependiente de energía, de la atebrina y la 9-aminoacridina, ha sido observada en partículas de Rhodospirillum rubrum(50, 68) y más recientemente, ha sido posible medir el gradiente de pH inducido por la luz en cromatóforos de Rhodopseudomonas sphaeroides(64, 67). El gradiente calculado a partir de la extinción de la fluorescencia de la 9-aminoacridina es de 1.3 a 2.2 unidades de pH mayor que los determinados a partir de la incorporación de metilamina o por las mediciones de incorporación de protones(63, 65, 66).

Estas discrepancias ponen en duda la utilidad de la extinción de la fluorescencia de la 9-aminoacridina como un indicador de  $\Delta$ pH, y se ha sugerido que la disminución de la fluorescencia se debe al atrapamiento de la molécula en el interior de las partículas membranales debido a un proceso pH-dependiente. Datos a favor y en contra de este postulado se han presentado para cloroplastos, cromatóforos, partículas submitocondriales y liposomas

(49, 51, 54, 61, 62, 94). Sin embargo, Kraayenhof(58, 62) ha obtenido resultados convincentes en contra de la penetración del colorante al interior de la vesícula, ya que ha encontrado en cloroplastos, moléculas de acridina unidas en forma covalente tanto a proteínas no permeables como a la membrana de los tilacoides, cuya fluorescencia disminuye cuando los organelos se energizan. Asimismo las moléculas del colorante unidas a la membrana muestran respuestas rápidas en la fluorescencia cuando se produce una iluminación con luz actínica(58). Estos y otros resultados se han explicado o bien por la suposición de que la extinción de la fluorescencia es causada por interacciones electrostáticas entre la acridina cargada positivamente y la membrana energizada, o por una interacción que promueve la dimerización o agrupamiento de las moléculas en la membrana(52, 53), o por causas de un cambio en el valor del pKa de la acridina que tendría como resultado su protonación y por lo tanto una difícil unión a la membrana(58, 62, 95). Sin embargo, existen diversas evidencias sugerentes que el apagamiento de la fluorescencia de 9-aminoacridina es debido a la interacción de la molécula con la membrana(67).

En R. sphaeroides, se puede observar que la disminución de la fluorescencia tiene dos componentes, uno sensible a nigericina y por lo tanto pH-dependiente, y otro no sensible a nigericina(67). En ninguno de los dos componentes, la extinción de la fluorescencia se debe a la acumulación del colorante en el volumen interno del cromatóforo por el  $\Delta$ pH transmembranal; el componente no sensible a nigericina, tampoco está relacionado al potencial eléctrico transmembranal o a procesos dependientes de una fuerza proton-

motriz, ya que no es afectado por valinomicina(67). Se plantea que la extinción de la fluorescencia puede reflejar cambios en la carga de superficie(67), debido a separaciones de cargas en los centros de foto-reacción, esto apoyado por experimentos en liposomas "energizados" por un gradiente de pH artificial en los cuales la parte del apagamiento de la fluorescencia no es detectada. Por lo tanto, es aparente que este apagamiento de la fluorescencia es dependiente del número de moléculas las cuales son realmente adsorbidas por la membrana en la oscuridad, como un resultado de la interacción entre las moléculas del colorante o entre las moléculas del colorante y los centros de foto-reacción, tal vez por transferencia de energía(67).

B. Potencial transmembranal . El potencial de membrana se ha determinado en una gran variedad de estructuras, eritrocitos(96-98), células tumorales ascíticas(99, 100), microorganismos(101, 102), protozoarios(103), mitocondria(104, 105 ), vesículas membranales(97), neuronas(106), y axón gigante de calamar(47, 107). En todos estos casos los métodos han sido varios y los resultados no son consistentes entre sí. Particularmente en el caso de la mitocondria el potencial de membrana se ha determinado por la distribución de  $K^+$  o  $Rb^+$  a través de la membrana mitocondrial en presencia de valinomicina(108). El potencial calculado se encuentra dentro del rango de 130-190 mv(con polaridad positiva extramitocondrial). La diferencia en los valores reportados en este sistema, por varios autores puede en su mayor parte ser atribuida a que hayan considerado valores distintos para el volumen de la matriz. Por lo tanto, varios laboratorios con el deseo de calcular el potencial de membrana con mayor exactitud, han trabajado en metodologías para

obtener moléculas con actividad óptica aceptable en las cuales la absorbancia y/o fluorescencia sean específicas para el potencial de membrana(46, 47, 109, 110).

El uso de monitores fluorescentes extrínsecos en el estudio de los fenómenos de membrana ha tenido un ímpetu considerable desde el descubrimiento de diversas variedades de colorantes sensibles al potencial transmembranal, los cuales se han utilizado para detectar cambios en el potencial de membrana de nervio y fibras musculares aisladas, células en suspensión (97, 109), organelos(102, 109), y vesículas(97, 110-113). Como ejemplo de estas moléculas sensibles al potencial transmembranal tenemos a la safranina, ANS, TNS(46, 114), y a un grupo particular de colorantes que comprende tres clases: Cianinas, Merocianinas, y Oxonoles.

3.Safranina . La safranina es un colorante catiónico que interacciona con sitios internos de la membrana mitocondrial, tanto en mitocondrias intactas como en partículas submitocondriales, en un proceso dependiente de energía(52, 109). Los cambios espectrales observados se han interpretado como debidos a una agregación del colorante(52, 115), la cual es inhibida en forma competitiva por calcio. Por lo tanto se sugiere que dicho proceso ocurre por el sistema de transporte de calcio en la mitocondria(52, 115). Sin embargo Akerman y Saris(116) demuestran que en vesículas de fosfolípidos con safranina incorporada, ocurre el fenómeno de agregación del colorante, cuando se induce un potencial de difusión de potasio a través de las membranas liposomales. Cuando se añade valinomicina a liposomas cargados con cloruro de potasio, y suspendidos en un medio de cloruro de colina , el espectro de la

safranina cambia de una manera característica(116). Si se incrementa la concentración de liposomas, el grado de disminución de la absorbancia es menor, probablemente debido a una desagregación de la safranina. Por lo tanto, es evidente que el hacinamiento se asocia con la creación de un potencial de difusión membranal debido a la valinomicina que induce el movimiento de potasio(salida). Además, la safranina al ser un catión rodeado de grupos hidrófobos, puede realmente penetrar al centro no polar de la membrana, encontrándose una relación de partición alta hacia la fase orgánica, aproximadamente de 100(116) . Debido a esto, es altamente probable que el cambio producido en el espectro sea resultado de la acumulación del colorante en el interior de la membrana como una respuesta a un potencial transmembranal. Otros autores han reportado que el potencial de difusión de  $K^+$  o  $H^+$  a través de la membrana mitocondrial aislada(en presencia de valinomicina o FCCP) y con polaridad positiva extramitocondrial, origina un cambio espectral de la safranina debido a la agregación, el cual es idéntico al observado en la energización de la mitocondria por sustratos oxidables, hidrólisis de ATP o por la generación de un potencial de difusión de calcio en presencia de un translocador artificial del ión divalente en las membranas mitocondriales(117,118) . Colonna(115) sugiere que la agregación de la safranina en la mitocondria puede ser el resultado de la unión del colorante a grupos cargados negativamente y fijos en el medio hidrófobo de la membrana mitocondrial. Si esto es así, el rearrreglo de estas cargas y/o su medio que favorece el agrupamiento coinciden con el desarrollo de un campo eléctrico a través de la membrana(109,116,117). Este cambio espectral está

linealmente relacionado con el desarrollo de un potencial de membrana entre 170-200 mv y es cuantitativamente el mismo irrespectivo de que sea producido por el gradiente de  $K^+$  o  $H^+$  .

4. ANS . El ANS(1-anilino-8-naftalensulfonato) se ha utilizado para el estudio de una gran variedad de fenómenos durante la actividad celular , fundamentalmente en las transducciones energéticas en las membranas que conservan energía.

El fluoróforo ANS, también se ha empleado para el estudio de una variedad de proteínas y lipoproteínas, generando información acerca de sus posibles cambios estructurales.. Las propiedades más características del ANS fueron descritas por primera vez por Weber y Laurence(119). Este monitor se excita en la región de 360-390 nm con una emisión máxima a 560 nm(88), que cambia hacia el azul cuando la polaridad del solvente disminuye, o cuando interactúa con regiones no polares de proteínas y/o membranas(34, 35, 120-122), teniendo como consecuencia un incremento en la eficiencia cuántica(121) .

La dependencia de la emisión máxima sobre la polaridad del solvente puede ser interpretada en términos de un mecanismo de orientación del dipolo(121). En solventes polares, el cromóforo presenta baja eficiencia cuántica debido a que algo de la energía de excitación se utiliza para la orientación de los dipolos del solvente, de esta manera la longitud de onda de emisión es desplazada hacia el rojo en un medio ambiente polar. Por lo tanto la polaridad de la región de interacción ANS-proteína o membranas, puede entonces evaluarse en términos de dos parámetros, la emisión máxima y la

eficiencia cuántica de la fluorescencia del colorante.

En estudios de biomembranas, sin embargo, puede plantearse la siguiente pregunta ¿ se une el ANS a los lípidos, a las proteínas, o a ambos, y en qué proporción? .

Las primeras evidencias de unión del ANS a los lípidos fueron los trabajos de Vanderkooi y Martonosi(123, 124) y Rubalcava y col. (125) . Vanderkooi y Martonosi, reportaron que la adición de fosfolipasa C, pero no la tripsina, disminuyen la intensidad de la fluorescencia del monitor en suspensiones de vesículas de retículo sarcoplásmico, en base a estos resultados proponen que el ANS se une a los lípidos y no a las proteínas de membrana. Por el contrario Hasselbach(126) encuentra, que el ANS se une a las aminas alifáticas, por lo que propone que la unión es a las proteínas de membrana. Esta propuesta fue reforzada por las observaciones de que la fluorescencia de ANS aumenta, en vesículas de retículo sarcoplásmico aún después del tratamiento con fosfolipasa A(127). Sin embargo, observaciones similares de Rubalcava(125) permiten concluir que el ANS es una molécula que se une a una interfase apolar, de naturaleza neutra o catiónica. Estudios de difracción de rayos X(128) en bicapas de lecitina en presencia de ANS, permitieron concluir que el monitor ocupa en la bicapa, la región de interfase de las cabezas de los grupos polares en donde la porción fluorescente no polar del monitor penetra una corta distancia entre las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos.

Sin embargo, en base a estudios de la vida media del espectro de la fluorescencia del ANS unido a vesículas de sarcolema de rata(129, 130), se

encontró que el ANS se une tanto a lípidos como a proteínas(121, 129, 131-133), ya que el decaimiento de la fluorescencia difiere marcadamente entre los dos casos, de 14-20 nanosegundos para el ANS unido a las proteínas(129, 134), y de 5 a 9 nanosegundos para el caso de los lípidos(131). En apoyo a los datos de que el ANS se une a las proteínas, existen estudios de transferencia de energía de los residuos de triptofano de las proteínas de la membrana al ANS unido. En base a la eficiencia de esta transferencia, se pudo calcular la distancia promedio triptofano-ANS, como una función del grado de saturación de la membrana por el fluoróforo, encontrándose que el promedio de la distancia del ANS es muy cercano a las proteínas, el cual no es muy diferente al encontrado en complejos ANS-proteína(34, 134) .

Así también otros estudios demuestran que las proteínas presentan una mayor afinidad al colorante, pero solamente la mitad de la capacidad para unirlo(129). A su vez Slavic(120) indica que en levadura, por lo menos, el 95% del ANS total incorporado se une a los lípidos de la membrana y que solamente un porcentaje muy bajo se encuentra en las proteínas de membrana.

En cuanto al efecto de los iones en la respuesta de ANS, existe un consenso general en el cual se establece, que el incremento de la fluorescencia del colorante en la membrana, es dependiente de la adición de iones, cuyo efecto se debe enteramente a la creación de sitios adicionales de interacción. Los incrementos tanto en la fluorescencia como en la unión del ANS en fantasmas de eritrocitos(125, 135-137), microsomas de cerebro(138), retículo endoplasmático liso y rugoso(139), y vesículas de fosfolípidos(34, 35)

se deben a la adición de sales, cuyo efecto en la unión del colorante a la membrana, está en función directa con el número de cargas del ión(123-125). En fantasmas de eritrocitos y microsomas de músculo esquelético, los cationes mono y divalentes producen efectos diferentes, pero no se observan diferencias significativas entre cationes del mismo número de carga(123-125,140). Estudios más detallados en microsomas de cerebro de rata permitieron observar efectos diferenciales y el grado de efectividad sobre la unión del ANS por los cationes monovalentes, siendo ésta  $\text{NH}_4^+ > \text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$ (35) .

Otras moléculas que producen un efecto similar al de los cationes, son los anestésicos, cuyo efecto probablemente esté relacionado con cambios en la carga de las membranas. Entre los anestésicos estudiados se encuentran, la butacaína, cocaína, dietil éter, cloroformo, metoxiflurano, y enflurano; los cuales se analizaron en suspensiones de fosfolípidos(140), retículo sarcoplásmico(141), mitocondria(142), sinaptosomas y fantasmas de eritrocitos(142).

Otro de los factores que produce cambios importantes en la fluorescencia de los cromóforos, es el pH. En membranas de eritrocitos(125,137) y en membranas de retículo sarcoplásmico(123), suspendidas en una solución a un pH por debajo de 7, se produce un incremento en la fluorescencia, el cual es debido a su vez, a un incremento en la interacción del colorante con la membrana. Sin embargo, un cambio en el pH de 3 unidades(7.4 a 10.15) no afecta la respuesta del ANS en las membranas por más de un 20%(88) . Si las observaciones de la fluorescencia se efectúan en etanol al 80%, las variaciones en el pH desde 3 a 11, no producen modificaciones en ella ,

asimismo en albúmina sérico bovina entre los pH 5 y 9 (88,143) .

Las curvas de titulación en varios sistemas membranales en presencia de ANS muestran la participación de grupos con un pKa en el rango de 3.2-4.2, dependiendo de la fuerza iónica de la solución(137,138,140,144) . El tratamiento de fantasmas de eritrocitos(34) y microsomas(138) con neuroaminidasa, no modifica la forma de las curvas de titulación, mostrando que los residuos de ácido sialico no son los responsables para el efecto encontrado, en contraste, a los datos de Freedman y Radda(137). Concluyéndose que los incrementos de la fluorescencia observados a pH bajos, son el resultado de la combinación de cambios en la eficiencia cuántica, la constante de disociación y el número de sitios presentes en la membrana(144).

Los estudios de cinética han permitido establecer que los incrementos de la fluorescencia son bifásicos en todos los sistemas estudiados, eritrocitos(135,136,145), bacterias(146), cultivo de hepatocitos y hepatomas(147), y membranas mitocondriales(35,82,88,144). La simple interpretación de este fenómeno es que el incremento rápido representa la unión del colorante a sitios fácilmente accesibles("sitios rápidos") y que el incremento lento representa la interacción con sitios que requieren la penetración del monitor a la membrana("sitios lentos") .Brocklehurst y col. (144), establecen que todas las respuestas del ANS en los procesos dependientes de energía ocurren en los sitios lentos(los cuales se pueden considerar como sitios internos en la membrana), que pueden ser saturados a una concentración menor de ANS que los sitios rápidos(144). Posiblemente, la velocidad de penetración del monitor a los sitios de poca accesibilidad, refleja el empaquetamiento de los

complejos lipoproteicos en la membrana. La diferencia entre estos sitios cinéticamente distinguibles, permite notar que los componentes rápidos y los lentos representan interacciones con sitios de superficie e internos de la membrana respectivamente, pero sin establecer si estos sitios internos están simplemente en la superficie interna de la membrana o si están en la interfase polar-no polar, localizados en regiones específicas de la membrana(145).

i. Cambios dependientes de energía en mitocondrias y partículas sub-mitocondriales. El estado energizado de la membrana, puede ser analizado por el ANS, debido a que dicho proceso produce cambios en la emisión de este colorante en la mitocondria(79, 83, 148), fragmentos mitocondriales(82, 88, 148), y membranas bacterianas(146) . Se ha establecido que las variaciones de la fluorescencia asociada con los procesos de conservación de la energía se deben al cambio en la distribución relativa de las moléculas del monitor entre el medio y la fase de la membrana(79, 82, 83, 148).

Al interaccionar el ANS con partículas submitocondriales sonicadas se observa tanto un incremento en la fluorescencia como un típico cambio hacia el azul en el pico de emisión. La presencia de sustratos oxidables o ATP producen un aumento adicional en la fluorescencia, el cual es revertido por la adición de inhibidores del transporte de electrones o desacoplantes. Por lo que se propone que este último incremento en la fluorescencia refleja el "estado energizado" de la membrana, de tal manera que se pueden establecer las condiciones necesarias para generarlo y definirlo cuantitativamente(82, 149).

Azzi(83) reporta que durante la energización de la membrana además

del incremento en la fluorescencia se presenta un incremento en la unión del colorante a las partículas submitocondriales, en comparación a las mitocondrias intactas en donde se presenta una disminución tanto en la fluorescencia como en la unión del ANS(79). La respuesta en el estado energizado, muestra una alta afinidad de la membrana por el colorante y una virtual independencia de factores externos como pH y fuerza iónica. La energización es asimismo acompañada por un incremento neto en la distribución de cargas negativas en la superficie externa y de cargas positivas en la superficie interna de la membrana mitocondrial interna(57, 83), y que es esta separación de cargas, la responsable de las respuestas del ANS en los procesos dependientes de energía. Sin embargo, a pesar, de que el consenso general de que la respuesta del ANS dependiente de energía, refleja una separación de cargas en la membrana, los análisis cualitativos y cuantitativos de la fluorescencia en el estado energizado y no energizado(82), sugieren que entre estos dos estados se presentan diferencias mayores que son difíciles de explicar en base a una distribución neta en la carga de superficie(83), y que es más factible, que la respuesta del ANS dependiente de energía refleje una separación de cargas en un "loci" especial o región de la membrana, diferente al sitio de interacción durante el proceso no dependiente de energía; esto último es apoyado por presentarse una alta afinidad, una fluorescencia con una eficiencia cuántica relativamente alta, e independencia a los factores externos como el pH y la fuerza iónica.

En base a lo anterior se concluye que los dos tipos de respuesta del ANS involucran sitios de unión diferentes en naturaleza y localización en la

membrana; los sitios de unión dependientes de un estado no energizado son preexistentes y localizados superficialmente, mientras que los sitios dependientes de energía son "formados" como resultado de la conversión de la energía y probablemente estén localizados dentro de la membrana(82, 83) . Asimismo, se propone que la "formación" de nuevos sitios se debe a un incremento en la eficiencia cuántica del colorante unido, debido a cambios en la estructura de la membrana, los cuales son reflejo del medio ambiente de los sitios de unión. Sin embargo, en base a estudios comparativos entre ANS y TNS se han dado evidencias para establecer que los cambios observados en la fluorescencia durante la energización tanto en mitocondrias como en partículas submitocondriales no pueden ser explicados exclusivamente por cambios en la eficiencia cuántica de los fluoróforos unidos(79), sino que también pueden ser adscritos a los cambios en la constante de equilibrio de la reacción entre el colorante y sus sitios de unión , con un movimiento consecuente de los colorantes, en el caso de la partícula submitocondrial, desde el medio acuoso exterior, a la membrana, y en el caso de las mitocondrias intactas, de la membrana al medio, de ahí que se plantee que las dos posibilidades pueden coexistir y que el incremento de la fluorescencia del ANS durante los procesos de energización, podría ser la suma de los cambios de unión y de la eficiencia cuántica del colorante(79) .

5. Cianinas, Merocianinas y oxonoles . Existen tres clases principales de los colorantes del tipo de las polimetinas, que son moléculas sensibles al potencial transmembranal. Esta clase de compuestos son las merocianinas, las cianinas y los oxonoles, los cuales se caracterizan por presentar una

estructura de dos anillos unidos por una cadena de carbonos con dobles ligaduras conjugadas(150). Dicha cadena proporciona una importancia fundamental en la utilización de estos compuestos, debido a que la magnitud de la absorción máxima de los colorantes incrementa con la longitud de la cadena hidrocarbonada, lo cual ha permitido sintetizar moléculas cuyo espectro de absorción y emisión no se superponen significativamente con las principales bandas de los pigmentos intrínsecos de las membranas biológicas. Debido a que las bandas de absorción de estos colorantes son generalmente intensas, es posible utilizarlos en concentraciones micromolares en los estudios de las membranas, provocando mínimas perturbaciones al sistema. Además, como la mayoría de ellos son fluorescentes, proporcionan sensibilidad adicional para el estudio de las membranas en suspensión . A esto, se suma una gran ventaja que consiste en tener la posibilidad de alterar notoriamente la magnitud de sus respuestas espectrales por la modificación de grupos sustituyentes, los cuales aunque no forman parte del cromóforo óptico, controlan factores como carga y afinidad de unión a la membrana.

En el caso de las merocianinas cuya estructura no presenta carga neta, es posible convertirlas en moléculas cargadas, mediante una unión covalente entre el cromóforo y grupos funcionales, como sulfonatos o amino cuaternarios, por lo que la carga en estos colorantes, se localiza en el grupo funcional.

En cuanto a las cianinas que poseen carga positiva y a los oxonoles que tienen carga negativa, ésta se encuentra totalmente deslocalizada en toda

la estructura cromofórica. Esta diferencia en la localización versus la deslocalización de la carga tiene implicaciones importantes con respecto a la permeabilidad del colorante en la membrana y al mecanismo de las propiedades ópticas dependientes de potencial. La permeabilidad de las cianinas y oxonoles (carga deslocalizada) es 100 veces mayor que la permeabilidad de las merocianinas y el ANS (carga localizada). Además la sustitución de  $C_n=CH_2CH_2CH_3$  por  $C_n=CH_2CH_2CH_2SO_3^-$  reduce 100 veces la permeabilidad del colorante (47). Por último, otro factor que afecta la permeabilidad del colorante es la longitud de las cadenas de los radicales alquilo, a mayor longitud mayor permeabilidad (hasta un máximo). Esta tendencia puede ser explicada por el aumento de la solubilidad de los colorantes en la región hidrocarbonada de la membrana.

i. Mecanismos de cianinas, merocianinas y oxonoles. Los monitores de potencial transmembranal se pueden dividir en dos clases, los de respuesta lenta y los de respuesta rápida (110). Los colorantes de respuesta lenta (colorantes de acumulación o redistribución), responden a cambios en el potencial de membrana en segundos. Estos colorantes penetran y actúan por un mecanismo que involucra una redistribución del colorante cargado entre el medio y el interior de la célula, organelo, o vesícula, presentándose cambios en su absorción o fluorescencia en el orden de un 80 a 90% con respecto los cambios iniciales. Ejemplos de este tipo de colorantes son las cianinas y oxonoles (110).

La segunda clase de compuestos, que comprenden a los colorantes de respuesta rápida, responden al potencial transmembranal en el rango de

microsegundos. Los cambios ópticos que se presentan se deben a que el colorante en presencia de un potencial se localiza en la membrana o muy cerca de ella. Los ejemplos de esta clase de compuestos son las cianinas merocianinas y oxonoles, así como colorantes de tipo estearil, presentándose cambios en su absorción y fluorescencia en el orden de 0.001% a 1% .

En cuanto a los colorantes de respuesta lenta, el 1974 Hoffman y Laris (96), reportaron que una serie de colorantes del tipo de las cianinas eran notablemente sensibles al potencial de membrana de células en suspensión. Ellos reportaron que en experimentos con eritrocitos humanos y de Amphiuma , en presencia de 3,3'-dihexiloxacarbocianina(Di-O-C<sub>6</sub>-(3), la fluorescencia del colorante disminuyó en 50% al inducir con valinomicina una hiperpolarización de las células. A su vez, la depolarización produjo un incremento de la fluorescencia. En ambos sistemas, eritrocitos humanos y de Amphiuma , el cambio de fluorescencia fue proporcional al potencial de membrana generado, medido éste por diferentes métodos(110) .

Con respecto al mecanismo de acción de los colorantes de respuesta lenta, Sims y col. (97) después de realizar experimentos espectroscópicos y de unión con 29 colorantes del tipo de las cianinas en eritrocitos, proponen un mecanismo general para este tipo de colorantes, asimismo reportan una serie de cianinas con una mayor sensibilidad al potencial , entre las que destacan la Di-S-C<sub>3</sub>(5), la cual muestra variaciones en la fluorescencia tan grandes como de un 80% en células hiperpolarizadas. La respuesta de esta clase de colorantes altamente fluorescentes, permeables y catiónicas, es el resultado de la partición del colorante entre la célula y el medio extra -

celular, la cual es dependiente del potencial. La hiperpolarización produce una incorporación de la cianina cargada positivamente, mientras que la depolarización produce su liberación(96). La fluorescencia del complejo célula-colorante es significativamente extinguida cuando la proporción del complejo se incrementa, así como por la adición de valinomicina, lo cual se debe a la formación de agregados del colorante, que producen una reducción de la fluorescencia.

Hladky y col. (151-153), han reportado una serie de datos acerca del estado de asociación colorante-célula, estos autores encuentran que una gran cantidad de la Di-S-C<sub>3</sub>-(5) acumulada por los eritrocitos se presenta en una forma no fluorescente unida a la oxihemoglobina. Sin embargo, también se observan cambios en células y preparaciones vesiculares libres de la hemoglobina, en donde los agregados moleculares se localizan posiblemente en solución o asociados con la parte interna de la membrana. Más recientemente, Freedman y Hoffman(154) demuestran que durante la hiperpolarización de los globulos rojos, la interacción de agregados del colorante a la hemoglobina, no es un requerimiento necesario para observar la extinción. Con la cianina Di-I-C<sub>3</sub>(5), se produce una disminución del 50% de la fluorescencia, debida a la hiperpolarización, y además el cambio en el espectro de absorción no demuestra evidencias de la formación de dímeros o de otros agregados moleculares del colorante. La naturaleza de este proceso con la cianina Di-I-C<sub>3</sub>(5) se ha elucidado parcialmente, y se sugiere que el colorante acumulado se encuentra interaccionando con regiones no polares de

las proteínas y membranas(154).

Los colorantes que se redistribuyen entre el medio y el interior de la célula u organelo presentan una respuesta razonablemente rápida a los cambios de potencial. Estos colorantes deben ser altamente permeables a la membrana, aún cuando presentan carga. Lo anterior se ha confirmado para varias cianinas (47,112,155), de las cuales las más permeables son las que presentan substituyentes alquilo de longitud moderada(2 carbonos a 6 carbonos), que a su vez son las más sensitivas para este tipo de estudios en la mayoría de las preparaciones utilizadas. Asimismo, los oxonoles( de carga negativa), pueden cruzar la membrana rápidamente (47,156). La elevada permeabilidad tanto de las cianinas positivas, como de los oxonoles negativos(157) está relacionada con la deslocalización de la carga en toda la estructura del cromóforo. Por el contrario, los colorantes con carga localizada son impermeables a la membrana. Aún cuando, el ANS y la merocianina 540, presentan un grupo sulfonilo, aparentemente penetran en las células pequeñas, organelos y vesículas a una velocidad apreciable(158) , **sin** embargo, esta velocidad no es comparable con la de las cianinas y oxonoles (47,112). A pesar de que los colorantes oxonólicos tienen características similares a las cianinas, no se han utilizado extensivamente. No obstante Chance y col. (102,156,157), han trabajado activamente en determinar el mecanismo de la sensibilidad al potencial de membrana de oxonoles comparando la fluorescencia y absorbancia del OX-VI con los cromóforos carotenoides (102) . Los oxonoles estudiados, presentan cambios ópticos dependientes del potencial, sin observarse modificaciones en el estado de agregación, el.

mecanismo más probable involucra una redistribución del colorante entre la célula y el interior de ella, uniéndose a sitios internos de la membrana y probablemente a los constituyentes citoplasmáticos.

Como se señaló con anterioridad, los cambios de transmitancia y fluorescencia de los colorantes de respuesta rápida se presentan en un tiempo menor de los milisegundos. Es decir, son de  $10^2$ - $10^5$  veces más rápidos que los observados en los colorantes de redistribución(48,107,159). Debido a la sensibilidad de este tipo de colorantes resulta más práctico medir la relación señal-ruido(S/N) en lugar de medir los cambios ópticos(160) .

Los mecanismos definidos por mediciones de cambios ópticos dependientes de potencial, caen en cuatro categorías: rotación-dimerización, asociación-disociación, electrocromismo y rotación pura .

El mecanismo de rotación dimerización fue originalmente propuesto por Ross y col. (161), para explicar los cambios de absorción de la merocianina 540 en axones gigantes de calamar. Este mecanismo involucra un cambio en el equilibrio dinámico entre las moléculas monoméricas del colorante orientadas en forma perpendicular a la membrana y la población de moléculas dimerizadas orientadas paralelamente a la superficie de la membrana. Este mecanismo ha sido apoyado por diversos trabajos(110,160, 162), en los cuales se concluye que se presenta una reorientación del colorante en la membrana en seguimiento a un cambio en el potencial y que las mediciones en los espectros son consistentes con la formación de dímeros.

La fuerza que promueve la reorientación de la merocianina es indudablemente el cambio en la energía del cromóforo dipolar(el momento

dipolar es del orden de 10 Debye) cuando este rota en el campo eléctrico de la membrana. El hecho de que el grupo sulfonato esté unido al cromóforo, sirve solamente para orientar al colorante en la membrana y prevenir su posible penetración en ella. La substitución de este grupo por uno cargado positivamente como el trimetil amonio, no cambia el signo de la señal de absorción y solamente afecta en forma ligera la forma del espectro del colorante monomérico y dimérico unidos a la membrana(110).

El mecanismo de asociación-disociación fue propuesto por Waggoner y colaboradores(155) para explicar los cambios rápidos en las respuestas de las cianinas y oxonoles en axón gigante de calamar y membranas de bicapas lipídicas. El término "asociación-disociación"(on-off) es utilizado por los autores para describir la partición rápida dependiente de potencial, del colorante entre los sitios de unión en la membrana y la región acuosa a través de la membrana. El tamaño promedio de las señales de los cambios de absorción para la cianina Di-S-C<sub>2</sub><sup>-</sup>(5), es de  $10^{-5}$ , con un tiempo de respuesta de  $\leq 10$  microsegundos. Para que la señal pueda ser observada, la concentración del colorante a ambos lados de la membrana debe ser diferente. Sin embargo, debido a que estos colorantes son permeables, se requiere mantener la concentración asimétrica con un potencial constante, al cual se sobreponen los potenciales utilizados para los estudios requeridos, lo que dificulta la interpretación de los resultados. Los colorantes más hidrofóbicos son los más permeables, y se ha hecho necesario la adición de colesterol en las bicapas para disminuir la permeabilidad de las cianinas(113, 163), sin embargo esto incrementa la permeabilidad de los colorantes oxonólicos.

Tanto para las cianinas como para los oxonoles, los datos no son consistentes con un mecanismo que consiste en que una cantidad del colorante bajo la influencia de un potencial, se mueve rápidamente entre los sitios de unión en la membrana, y la fase acuosa cercana a ella. Para algunos colorantes, que se agregan sobre la membrana, el mecanismo para los cambios de absorbancia puede ser un cambio en el estado de agregación de las moléculas del colorante localizadas en la membrana.

Bashford y col. (156) han medido las cinéticas de unión del OX-VI a la membrana de vesículas lipídicas; ellos encuentran que la fase rápida de unión presenta una velocidad constante de segundo orden de  $9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  y una velocidad constante de disociación de  $17 \text{ seg}^{-1}$ . Estos valores con el de la concentración del colorante en la solución, le han permitido a Waggoner (155) en experimentos con bicapas lipídicas negras de glicerilmonooleato, establecer que la velocidad del mecanismo asociación-disociación para los oxonoles ocurre en milisegundos más que en microsegundos como se había observado en otros experimentos en el mismo sistema (156).

El mecanismo de electrocromismo (efecto Stark) consiste en la modificación de las propiedades de absorción de un cromóforo en un campo eléctrico que se manifiesta como un desplazamiento en la frecuencia del pico de absorción. Los cambios electrocromáticos lineales son altamente dependientes de la orientación relativa del cromóforo y del campo eléctrico. Estos pueden ser hacia el rojo o al azul, dependiendo si la variación en la dirección del dipolo es orientada de manera paralela o antiparalela a la dirección del campo eléctrico. Si la estructura del

cromóforo es simétrica, el cambio en el momento dipolar es cero, y puede presentarse un electrocromismo no lineal(110,164) .

Los cambios electrocrómicos se han observado experimentalmente en soluciones, gases, matrices de poliestireno, películas evaporadas y multicapas lipídicas orientadas. Este mecanismo se ha postulado para explicar los cambios observados en los carotenoides de cloroplastos y cromatóforos. Un hecho importante que distingue al electrocromismo de otro tipo de mecanismos es el tiempo de respuesta de las variaciones ópticas. Los cambios electrocrómicos no requieren el movimiento de los cromatóforos en la membrana, por lo tanto pueden ocurrir en escalas de tiempo de subnanosegundos, a diferencia de los mecanismos que requieren el movimiento de los colorantes, los cuales presentan un tiempo de respuesta mayor que 0.1 microsegundo(162). Desafortunadamente, de manera general, no es posible que las respuestas de las cargas eléctricas en las membranas sean más rápidas que 3 microsegundos, y es imposible establecer si un colorante opera o no por el mecanismo electrocrómico y si el tiempo de respuesta óptica es menor que 3 microsegundos. Los colorantes como la merocianina 540, presenta una respuesta en un tiempo mayor que 30 microsegundos en el axón de calamar y por lo tanto es bastante claro que no es un colorante electrocrómico(159) .

El mecanismo de rotación pura se propuso para explicar los cambios relativamente pequeños de fluorescencia, vistos con los colorantes naftaleno sulfonatos(46). A concentraciones bajas de merocianina 540, en donde la concentración del dímero en la membrana es baja, las señales de

absorbancia y fluorescencia pueden resultar exclusivamente de una reorientación del cromóforo. A pesar de esto, se establece, que ninguno de los grandes cambios de absorción y fluorescencia pueden ser explicados exclusivamente por este mecanismo(110) .

Sin embargo, recientemente, a pesar de los datos existentes en la literatura referentes al mecanismo de respuesta rápida de los oxonoles , Smith y Chance(150)al efectuar estudios cinéticos del OX-VI en partículas submitocondriales presentan argumentos contundentes en contra de la factibilidad de operación del OX-VI por todos los mecanismos anteriormente descritos en este tipo de preparaciones membranales. Estos autores establecen fundamentalmente que la concentración efectiva del colorante que tiene una constante de velocidad de segundo orden, para la unión pasiva del OX-VI a las partículas submitocondriales es aproximadamente 7 milimolar. Si esta constante de velocidad es utilizada en un proceso rápido de energización, la concentración requerida debe ser incrementada por un factor de 30, lo cual excede en una alta proporción a la concentración utilizada por Smith y Chance, para lo cual, en el mecanismo propuesto por Waggoner (155), se requiere una región de una concentración local alta cerca de la superficie de la membrana. Además para observar una señal óptica se requiere de un potencial constante generado por pulsos de voltaje aplicados a través de la membrana lipídica utilizada por Waggoner y col. (47, 112, 155), y en el sistema de membranas excitables utilizadas por Cohen y col. (159), en el cual se mantiene un potencial en reposo. Tales potenciales pueden ser responsables de generar la formación de un gradiente de concentración local

establecido por un mecanismo de difusión. La existencia de tales potenciales preexistentes en las partículas submitocondriales es improbable, debido fundamentalmente a que estas preparaciones están libres de sustratos endógenos. Esto último es apoyado por las observaciones de que el espectro de absorción de OX-VI en la presencia de partículas submitocondriales sin sustratos adicionados, puede ser virtualmente recuperado en forma completa, por la adición de un desacoplante a la preparación energizada implicando la ausencia de un potencial de membrana preexistente; así como los datos obtenidos para la unión pasiva del colorante a las partículas, las cuales son idénticos tanto en ausencia como en presencia del desacoplante CCCP(150).

En lo que respecta, al mecanismo de rotación dimerización, es también improbable que pueda ser aplicado a los colorantes oxonólicos ya que el momento dipolar permanente en esta molécula es pequeño, debido a la deslocalización de su carga en el sistema conjugado. Así que estos colorantes no son susceptibles a una fuerza o momento de rotación apreciable, cuando un potencial eléctrico transmembranal está presente. Asimismo, los oxonoles muestran poca tendencia a formar agregados(157), al menos cuando se encuentran libres en solución, de ahí que el mecanismo sugerido que involucra un cambio en el equilibrio monómero-dímero en la membrana es también poco factible. Por lo que, las condiciones necesarias para los mecanismos propuestos en los procesos que operan en el rango de microsegundos aparentemente no funcionan en el sistema OX-VI-partículas submitocondriales (150).

En lo que respecta a las bacterias fotosintéticas, Bashford , Chance

y Prince(102) reportan, que los oxonoles(OX-V;VI;VII;VIII,y IX) presentan un tiempo de respuesta entre 20 y 140 milisegundos, por lo tanto no pueden ser utilizados para determinar las fluctuaciones de los cambios de potencial en el rango de submilisegundos. Asimismo establecen que los oxonoles pueden ser utilizados como indicadores confiables del potencial a través de membranas transductoras de energía que no posean moléculas intrínsecas que reporten el potencial .

6. Quelantes fluorescentes . El tercer gran grupo de monitores fluorescentes comprende a los llamados "quelantes fluorescentes", que se caracterizan por interaccionar con los cationes unidos en las membranas, con una concomitante alteración en su espectro de fluorescencia. Entre este tipo de compuestos se encuentran los antibióticos clorotetraciclina, tetraciclina , metaciclina, y minociclina. De los cuatro indicadores, el primero es el que genera señales mayores para el registro de los cationes divalentes(41) .

En base a las características fluorescentes de este tipo de monitores varios autores han determinado su selectividad iónica en soluciones acuosas. La adición de cationes di y trivalentes al monitor, induce cambios batocromáticos en el espectro de absorción del antibiótico(165, 166), así como en su espectro de emisión(41, 167). Mitscher y col. (168) han observado variaciones en el espectro de dicroísmo circular de la tetraciclina en solución acuosa, debido a la adición de cationes divalentes, que consisten en diferencias insignificantes entre los espectros de los complejos antibiótico- $\text{Ca}^{2+}$  y antibiótico- $\text{Mg}^{2+}$  . Sin embargo en soluciones de metanol al 90% , si se presentan diferencias considerables tanto en los espectros de absorción como

en los de fluorescencia entre estos dos complejos(42). Esto indica que las variaciones en los espectros son fuertemente dependientes de la polaridad del medio.

En la tabla II , se muestran los incrementos de fluorescencia de la clorotetraciclina, a 338 nm de excitación y 520 nm de emisión, así como las constantes de disociación de los complejos antibióticos-cación divalente. La clorotetraciclina se une a  $Mg^{2+}$ ;  $Ca^{2+}$ ;  $Sr^{2+}$ ; y  $Zn^{2+}$ , generandose un aumento en la fluorescencia, pero en el caso de especies paramagnéticas como el  $Mn^{2+}$  y el  $Co^{2+}$ , producen una extinción de la señal(169) .

Los espectros de fluorescencia de la clorotetraciclina- $Ca^{2+}$ , también difieren del complejo con  $Mg^{2+}$  en metanol al 90% . Es decir, el espectro de emisión del monitor- $Ca^{2+}$  presenta un pico a 530 nm, mientras que con  $Mg^{2+}$ , se presenta a 520 nm; posiblemente estos cambios en metanol sean un indicio de diferencias conformacionales entre los dos complejos(42) . Asimismo se hace evidente que la polaridad del medio tiene una gran influencia sobre la afinidad del monitor hacia los cationes. De esta manera, la secuencia en soluciones acuosas es la siguiente  $Zn^{2+} > Sr^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+}$ , a diferencia de la secuencia que se presenta en metanol al 70% :  $Zn^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+} > Sr^{2+}$  ; la relación entre el catión y el monitor es de 1:1 tanto en la fase acuosa como metanólica(42) .

Para establecer tanto los incrementos en la fluorescencia como su selectividad hacia los cationes en relación con el medio hidrófobo se han realizado estudios en una variedad de detergentes con diferentes cargas . En micelas de SDS, se encuentra un aumento de la fluorescencia de la cloro-

Tabla II . Constantes de unión de clorotetraciclina a cationes divalentes .

Catión	Medio	$K_D$ M	Incremento de la fluorescencia sobre el antibiótico libre en agua.
$Mg^{2+}$	acuoso	267	23
$Mg^{2+}$	metanol 50%	114	66
$Zn^{2+}$	acuoso	42	10.5
$Ca^{2+}$	acuoso	440	7.5
$Sr^{2+}$	acuoso	65	10.7
$Mg^{2+}$	SDS	110	101
$Mg^{2+}$	membrana de eritrocito	370	109
$Mg^{2+}$	membrana de microsomas	400	207

tetraciclina, causado por la interacción del antibiótico con el  $Mg^{2+}$ , este incremento es de 101 comparado con 23 para el mismo complejo sin SDS cuando se utiliza un detergente neutro, como el tritón X-100, se presenta una situación semejante a la de la solución acuosa sin detergente. Lo anterior está de acuerdo con el hecho de que este tipo de detergentes no forman complejos con cationes(41) .

El aumento de la fluorescencia en presencia de cationes divalentes, también se observa en las membranas biológicas, tales como fantasmas de eritrocitos y microsomas de músculo(41). La unión del complejo antibiótico-catión a la membrana, se confirma por la disminución de la fluorescencia

cuando se adiciona NaCl , ya que el sodio compite con los cationes divalentes por los sitios de interacción, con lo que se reduce la cantidad de iones divalentes unidos a la membrana y consecuentemente la fluorescencia.

Una situación diferente se presenta en el caso de la mitocondria , en donde se encuentra un alto incremento de la fluorescencia aún en ausencia de cationes adicionados, esto se debe probablemente a la interacción del monitor a cationes unidos con alta afinidad a la membrana mitocondrial(41). La adición de inhibidores del transporte de electrones, produce una ligera disminución en la fluorescencia, la cual es restaurada por la adición de sustratos oxidables del siguiente sitio de acoplamiento, que a su vez se abate por la subsecuente adición de desacoplantes de la fosforilación oxidativa .

Los cambios observados en la fluorescencia por la alteración del metabolismo mitocondrial, indican que la fluorescencia no es una respuesta directa del estado energizado del organelo durante los procesos de conservación de energía, sino que puede ser un reflejo de la migración de los iones en la membrana en respuesta a los cambios metabólicos .

La clorotetraciclina también se ha utilizado como un monitor de la interacción del calcio en membranas de retículo sarcoplásmico(170-172) , mitocondria(41, 173, 174), eritrocito y nervio(175) . Se ha observado que la afinidad de este monitor para el calcio es menor que para el magnesio(41, 42) en un medio acuoso, sin embargo, esta selectividad se revierte en un medio no polar, lo que tiene como consecuencia que la clorotetraciclina se una preferencialmente a las membranas biológicas que selectivamente

retienen calcio(41, 42, 170, 171) .

7. Bromuro de Etidio . El bromuro de etidio es un compuesto fluorescente derivado del fenantridinio(Bromuro de 3, 8-Diamino-5-Etil-6-Fenil - fenantridinio) el cual se une a sitios hidrófobos de macromoléculas como el ADN y proteínas, y de estructuras tales como membranas. Sus propiedades electrónicas han sido calculadas por varios métodos semiempíricos

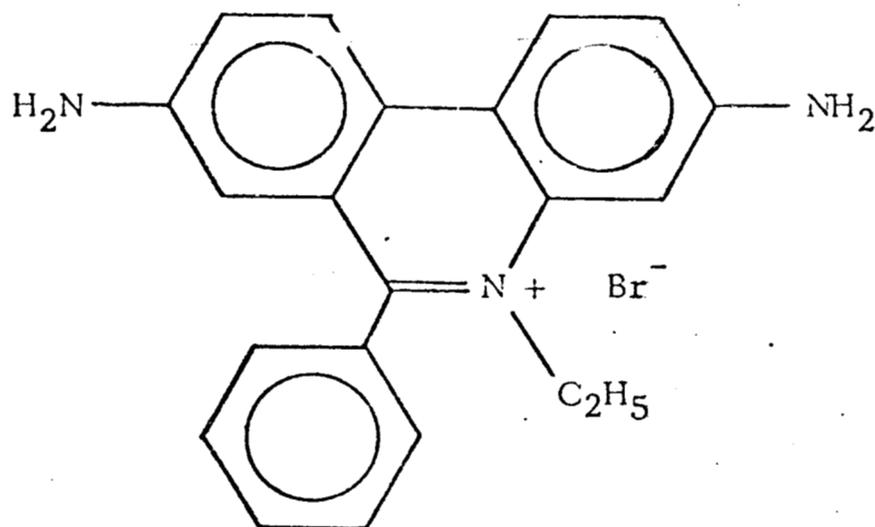


Figura 1. Estructura del Bromuro de Etidio .

de la mecánica cuántica(177, 178) que han permitido diferenciar si la interacción del etidio con un sitio hidrófobo dado, ocurre al azar o bien está dirigida por una interacción efectiva. Estudios de la distribución de carga del sitio de interacción del etidio, al que denominaremos arbitrariamente como "receptor", han permitido mapear tridimensionalmente, el potencial electrostático molecular que genera el receptor. Se ha determinado que el origen de este potencial deriva fundamentalmente de dos grupos aniónicos ionizados(que en el caso del ADN son dos grupos fosfato). El etidio en un

campo aniónico similar al encontrado en los biopolímeros(178), muestra una reorientación preferencial en la vecindad del receptor.

La energía involucrada, puede ser atribuída a interacciones electrostáticas a grandes distancias y a una deslocalización de electrones inducida cuando el catión bromuro de etidio se aproxima al receptor .

Las propiedades electrónicas del bromuro de etidio en el estado fundamental, se han calculado utilizando un método computarizado (PCILO) y analizando la geometría de sus cristales(178), fig. 2 . Como se mencionó anteriormente, el bromuro de etidio es un derivado del fenantridinio ligeramente no planar ; el sustituyente fenilo forma un ángulo de  $97^\circ$  con el plano medio, y el carbono terminal del sustituyente etilo forma un ángulo de  $84^\circ$  con el mismo plano. En la posición 8 posee un sustituyente amino cuyo nitrógeno tiene una hibridización  $sp^3$  . Por análisis conformacional se ha determinado que los hidrógenos del fenantridinio tienen una orientación opuesta al grupo etilo y que los nitrógenos de los grupos amino están en ángulo recto a este plano(178) .

La distribución de electrones en el etidio(fig. 2), obtenida a partir de la matriz de densidad y mediante la asignación de valores teóricos para optimizar las polaridades de unión, señala una deslocalización de la carga positiva clásicamente atribuída al nitrógeno cuaternario. Se determinó que este nitrógeno tiene una carga de sólo  $+0.0818 e^*$  , el resto de la carga

---

$e^*$ = carga neta electrónica

neta, se distribuye entre los grupos funcionales. La carga del grupo etilo es de + 0.2236 e , la del fenilo es de + 0.1702 e, la de los grupos amino

001079

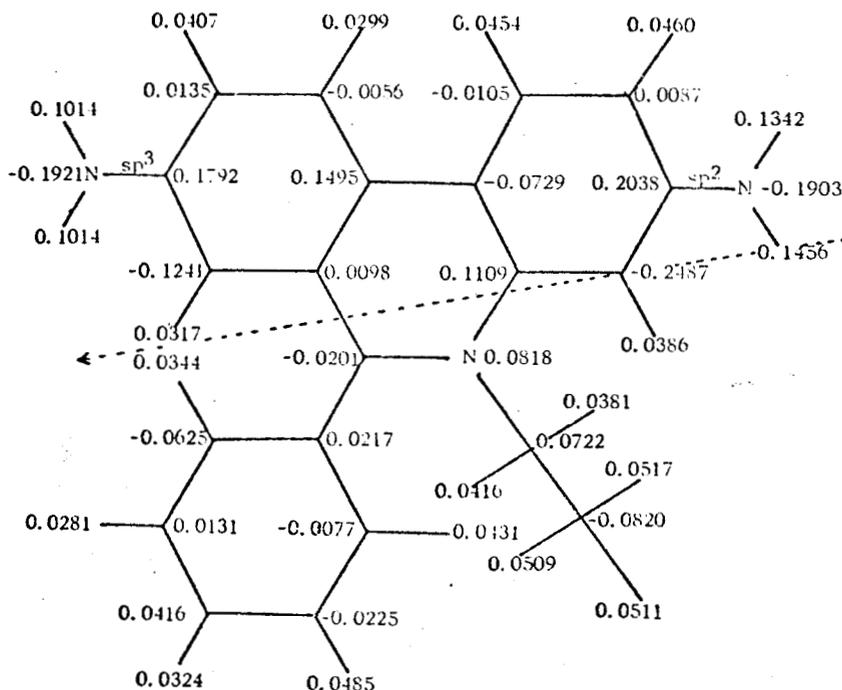


Fig. 2. Distribución de la carga atómica neta en el bromuro de etidio. La dirección del dipolo se indica por la flecha punteada(ref. 178).

es de + 0.1002 e, y la del fenantridinio es de + 0.5067 e. De esta manera se tiene que el 60% de la carga positiva está deslocalizada sobre la porción amino-fenantridinio de la molécula, y el resto, sobre los grupos fenilo y etilo .

Como resultado de la distribución de cargas y de las contribuciones no despreciables de la hibridización de sus orbitales atómicos, el bromuro de etidio posee un momento dipolar de 24.59 D(178) .

i . Efectos biológicos del Bromuro de Etidio . El bromuro de etidio fue originalmente sintetizado y estudiado como un efectivo agente tripanicida(179). Más recientemente, este compuesto ha recibido considerable atención como agente específico para el estudio de genóforos extracromosomales en bacterias(180), algas(181), hongos(182), protozoarios(179), y células de mamíferos(183), así como agente mutagénico altamente específico y efectivo en levaduras anaeróbicas facultativas(184). Estos efectos del bromuro de etidio se han asociado a su interacción con los ácidos nucleicos, descrita por vez primera por Lerman(185). Este investigador observó que en la vecindad inmediata de los residuos con bromuro de etidio, aparece una cadena de nucleótidos no enrollados lo cual, modifica significativamente las propiedades físicas y biológicas del ADN(177); encontró además, que el bromuro de etidio produce un efecto inhibitorio sobre la ADN polimerasa y sobre la ARN polimerasa dependiente de ADN (186) . Sin embargo, Aktipis y col. (187) establecen que el efecto inhibitorio del bromuro de etidio sobre las polimerasas, puede deberse al menos parcialmente , a un incremento en la estabilidad de la hélice de ADN, lo cual dificulta la disociación de determinadas regiones de la hélice y en consecuencia, la replicación o transcripción del poli - nucleótido .

ii . Efectos del Bromuro de Etidio en mitocondria . Datos en la literatura indican que el etidio inhibe tanto la fosforilación oxidativa(188), como la translocación de nucleótidos(189) en membrana mitocondrial.

La adición de bromuro de etidio a mitocondrias produce una pérdida del control respiratorio, efectiva a una concentración de 100 micromolar,

y una inhibición del estado 3(189) . A concentraciones mayores de etidio, la pérdida del control respiratorio ocurre más rápidamente, observándose un ligero incremento en la incorporación de oxígeno en el estado 4 de la respiración. El hecho de que en el estado 3, el etidio inhiba completamente la incorporación de oxígeno sin que se altere la relación ADP:O y el estado 4, son indicios de que este catión inhibe a la fosforilación oxidativa por un mecanismo que no es el desacoplamiento mitocondrial(188).

Se ha sugerido además que el etidio actúa como un inhibidor competitivo de la translocación de nucleótidos, inhibiendo la unión reversible del ADP a la nucleótido translocasa, esto se ha reforzado por estudios realizados con otros colorantes lipofílicos estructuralmente similares al etidio, como la rhodamina-6G, ya que su adición a mitocondrias altera la cinética de la translocasa de los nucleótidos de adenina(189) .

También se ha encontrado que el bromuro de etidio puede modificar directa o indirectamente el sistema de transporte de potasio en levadura (190,191). Asimismo se ha establecido que mitocondrias tratadas con etidio presentan un drástico decremento en su contenido de citocromo  $a-a_3$  (aproximadamente del 80%), así como una reducción variable de citocromo b(192, 193), y una disminución en la actividad de la ATPasa sensible a oligomicina, produciéndose alteraciones estructurales reversibles.

Es conveniente aclarar que todos estos efectos atribuidos al bromuro de etidio se obtienen utilizando concentraciones altas del colorante(  $>100 \mu\text{M}$ ) (189-193) y con períodos de incubación muy prolongados que van de 3-5 días o más(193) .

En 1969 Gitler, Rubalcava y Caswell(89), señalaron que el bromuro de etidio se unía a membranas mitocondriales energizadas con un incremento en su fluorescencia. Se encontró que esta unión es de muy alta afinidad para un pequeño número de sitios. Estos datos así como los de Chance(194) y Azzi y Santato(149), indican que variaciones en el estado metabólico de la mitocondria producen un cambio en la señal de la fluorescencia del etidio. Los resultados iniciales señalados sugirieron que el etidio es un monitor fluorescente que registra cargas de superficie en adición a la polaridad del medio ambiente circundante(89-91) .

#### IV . O B J E T I V O S

El presente trabajo tiene como objetivos principales :

1. Caracterizar las condiciones en que ocurren los cambios de la fluorescencia del Bromuro de Etidio durante las transiciones energéticas de membranas mitocondriales

2. Caracterizar la respuesta del Bromuro de Etidio a dichas transiciones energéticas .

a. En preparaciones energizadas con sustratos de los tres segmentos de conservación de energía de la cadena oxidativa

b. En preparaciones energizadas con ATP .

## M A T E R I A L E S

### Reactivos químicos .

Los compuestos utilizados en este trabajo fueron grado reactivo analítico Merck y Sigma. El agua empleada en la preparación de las soluciones fué bidestilada en un destilador de vidrio.

### Aparatos.

1. Centrífuga refrigerada Sorvall, modelo RC-5.
2. Baño de agua circulante a temperatura constante, Leitz .
3. Espectrofotómetro Carl Zeiss, modelo PM 6
4. Espectrofotómetro Aminco DW-2a UV-VIS, con la unidad total de fluorescencia, la señal se registra en un graficador X-Y Hewlett Packard. Un filtro de gelatina Kodak N<sup>o</sup> 25 .
5. Sistema de filtrado Millipore 1225, con filtros de 0.45 micras de malla.
6. Polarógrafo con salida a un sistema de amplificadores diseñado , desarrollado y construido por B. Chance, D. Mayer y B. Pressman(195), conectado a un graficador Honeywell 1508 Visicorder.

## M E T O D O S

### Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata.

Las mitocondrias se aislaron de hígado de rata macho de un peso promedio de 200 g, siguiendo el método descrito por Johnson y Lardy(196).

Se procedió a matar la rata con un golpe en la cabeza, e inmediatamente se extrajo el hígado. El hígado fué lavado varias veces con una

solución de sacarosa 0.08 M, manitol 0.25 M (ajustada a pH 7.4 con TEA), y una vez cortado finamente con tijeras se homogeneizó en una solución de sacarosa 0.08 M, manitol 0.25 M, EDTA 0.001 M (pH 7.4) en un homogeneizador Potter-Elvehjem y un vástago de teflón, obteniéndose un homogeneizado al 10%. Todos los pasos realizados en este procedimiento se efectuaron a una temperatura de 0-4°C. El homogeneizado se centrifugó a 600 x g durante 15 minutos en una centrifuga Sorvall RC-5 con un rotor SS-34, descartándose la pastilla nuclear. El sobrenadante se recentrifugó a 17 000 x g durante 10 minutos para separar la fracción mitocondrial. El sobrenadante se descartó y la pastilla se resuspendió manualmente en un medio de sacarosa 0.08 M, manitol 0.25 M ajustando el pH a 7.4 con TEA. Se centrifugó nuevamente a 17 000 x g durante 10 minutos obteniéndose finalmente la pastilla mitocondrial.

## II . Mitocondrias tipo I

Las mitocondrias aisladas se resuspendieron en un medio que contenía sacarosa 0.18 M, TEA 0.005 M a pH 7.4, en un volumen final de 40 ml por hígado. Una vez resuspendidas manualmente, las mitocondrias se incubaron durante 10 minutos a 30°C con agitación suave. Este medio se centrifugó a 17 000 x g por 10 minutos y la pastilla se resuspendió y se lavó dos veces con sacarosa 0.25 M a pH 7.4. Durante todo el procedimiento a excepción de la incubación la temperatura fue de 4°C. Finalmente, las mitocondrias obtenidas se resuspendieron en sacarosa 0.25 M a pH 7.4.

### III . Mitocondrias tipo II .

Para la obtención de este tipo de mitocondrias se siguió el mismo procedimiento que las del tipo I, adicionando al medio de incubación 0.001 M de EDTA a pH 7.4 .

### IV . Mitocondrias tipo III .

Para la obtención de este tipo de mitocondrias se siguió el mismo procedimiento que las mitocondrias tipo I y II, con 0.001 M de EGTA a pH 7.4 en el medio de incubación .

### V. Determinación de protefna .

El método empleado fue el de Biuret . A 0.02 ml de la suspensión mitocondrial, se le adicionaron 0.2 ml de una solución de Desoxicolato de Sodio al 5%( en Na OH 0.01 N), se agitó y en seguida se añadieron 1.5 ml de reactivo de Biuret\* y 1.28 ml de agua bidestilada, se agito nuevamente y la mezcla se colocó en un baño de agua a 37°C durante 15 minutos , posteriormente se registro la densidad óptica mediante el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm contra un blanco de Desoxicolato de Sodio, reactivo de Biuret y agua bidestilada . La lectura se relacionó a una curva patrón obtenida con varias concentraciones de albúmina sérica bovina .

---

\* Reactivo de Biuret .

1.5 g de Sulfato de Cobre pentahidratado, 6.0 g de Tartrato de Sodio y Potasio y 300 ml de Hidróxido de Potasio al 10 % , llevándose a un litro con agua bidestilada .

## VI. Medición del consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno se midió por un método polarográfico mediante un electrodo vibrátil de platino y un electrodo de calomel, como electrodo de referencia, insertado dentro de una celda de 5 ml que contenía la suspensión mitocondrial .

## VII . MEDICION DE LA FLUORESCENCIA DEL BROMURO DE ETIDIO .

Como se indicó en la sección de materiales, se utilizó el espectro - fotofluorómetro Aminco DW-2a para la medición de la fluorescencia del bromuro de etidio . El rayo de luz de excitación proveniente del monocromador, es reflejado por los espejos planos A, A' y B, B' de la unidad de fluorescencia(fig. 3) . El rayo incide sobre la muestra y la celda de referencia en ángulo recto con respecto a la trayectoria óptica normal del monocromador . Esta geometría ortogonal es utilizada para evitar una posible "contaminación" de la señal fluorescente por la luz de excitación . Para asegurarse que la luz de excitación seleccionada por el monocromador , llegue en su mayor parte al fotodetector, se coloca un filtro de cuarzo entre el fotodetector y el portaceldas que evita que la luz se desvíe al incidir sobre las celdas . Asimismo el espejo C detrás del portaceldas incrementa efectivamente la fluorescencia haciéndola incidir hacia el fotodetector .

### 1. Determinación de los espectros de excitación y emisión

El espectro de excitación de un compuesto fluorescente se obtiene

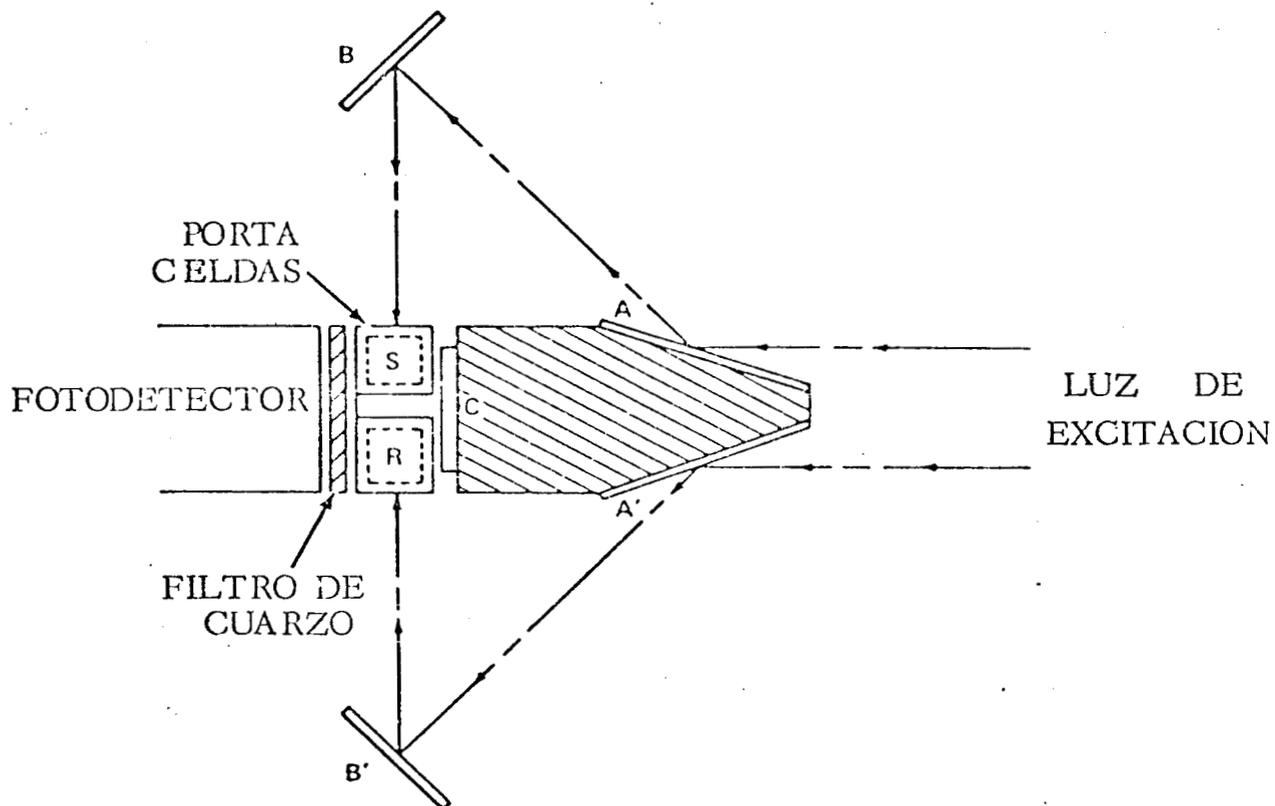


Figura 3. Diagrama óptico de la unidad de fluorescencia

mediante un barrido de la longitud de onda de excitación, midiendo la intensidad de la luz emitida por la muestra, con respecto a un estándar de Sulfato de Bario .

El espectro de emisión, se obtiene haciendo incidir en la muestra fluorescente, luz a la longitud de onda de máxima excitación. La medición de la luz emitida se hace con respecto al estándar de Sulfato de Bario , además para eliminar la interferencia de la luz de excitación, se utiliza un filtro secundario que absorbe a la longitud de onda de excitación .

## 2 . Determinación del % de la fluorescencia relativa

Se seleccionó la longitud de onda de excitación para el bromuro de etidio en suspensión mitocondrial(510 nm) y se hizo incidir sobre las celdas de muestra y referencia . La emisión se detectó a 610 nm utilizando un filtro de gelatina de corte secundario Kodak N° 25 .

El % de fluorescencia relativa se obtuvo al colocar la misma concentración de bromuro de etidio en las celdas de referencia y muestra .

El 0% de la fluorescencia relativa correspondió a la diferencia de fluorescencia, cuando la muestra se intercambia por una celda sin bromuro de etidio. La diferencia correspondió a toda la escala del graficador .

## 3 . Disminución del contenido de ATP de mitocondrias tipo II.

Mitocondrias de hígado de rata(tipo II) recién preparadas(30 microlitros de una suspensión patrón conteniendo 100 mg/ml) se incubaron en una celda del fluorómetro en el siguiente medio(volumen final 3 ml) :

200 mM de sacarosa; 10 mM de TEA, pH 7.4 ;1 microgramo/ml de rotenona durante 5 minutos. La incubación disminuye el contenido de ATP de las mitocondrias recién preparadas(197), de manera espontánea en ausencia de sustratos oxidables .

#### 4 . Determinación de la unión del Bromuro de Etidio a mitocondrias.

Los parámetros de unión del etidio a la membrana mitocondrial fueron medidos de la siguiente manera: se adicionaron mitocondrias(1.0 mg de proteína mitocondrial/ml) a un medio de incubación equilibrado a temperatura ambiente, constituido de sacarosa 200 mM, TEA 10 mM a pH 7.4, enseguida se adicionó bromuro de etidio a diferentes concentraciones(0.25 - 10 micromolar), después de un minuto el medio fue filtrado en un sistema de filtración Millipore con filtros de 0.45 micras de tamaño de poro . Las membranas retenidas se lavaron con el mismo medio y una alícuota de 1 ml del filtrado fue diluido en SDS al 5% . La fluorescencia de esta solución fue analizada a 510 nm y su concentración fue obtenida a partir de una curva patrón de calibración de bromuro de etidio en SDS al 5% . A su vez las membranas retenidas en el filtro fueron solubilizadas en SDS y su fluorescencia determinada de la manera anteriormente mencionada .

En el caso de mitocondrias energizadas el procedimiento fue idéntico a excepción de la adición de 5mM de algún sustrato oxidable o 1 mM de ATP .

## R E S U L T A D O S

Cuando el etidio se une a mitocondrias intactas, la respuesta de la fluorescencia del colorante a cambios en el acoplamiento energético es críticamente dependiente de que las membranas sean expuestas a un medio que contenga EDTA previo al análisis fluorométrico(ver métodos) . Así, los datos descritos a continuación hacen una clara distinción del tipo de preparaciones membranales utilizadas para la evaluación experimental .

### 1 . Fluorescencia del Bromuro de Etidio y acoplamiento energético en mitocondrias no tratadas con EDTA(mitocondrias tipo I) .

La adición de 5  $\mu$ M de bromuro de etidio a una suspensión de mitocondrias(a pH 7.4) no tratadas con EDTA produce un incremento de la fluorescencia del 60% comparada con la del etidio en la ausencia del organelo(fig. 4) . La fluorescencia del colorante unido a la membrana no es alterada por la adición de glutamato, succinato o ascorbato(más TMPD), aún en presencia de ADP . Bajo condiciones similares , 1 mM de ATP produce un incremento inmediato de la fluorescencia con valores del 50% con respecto al incremento inicial . Este incremento no se modifica en lo absoluto(fig. 4), por la adición posterior de inhibidores de cadena respiratoria y desacoplantes.

Por lo tanto es claro que ni la oxidación de los sustratos ni la hidrólisis de ATP alteran la fluorescencia del etidio en las mitocondrias tipo I. En otros términos, la insensibilidad de los efectos del ATP a los inhibidores

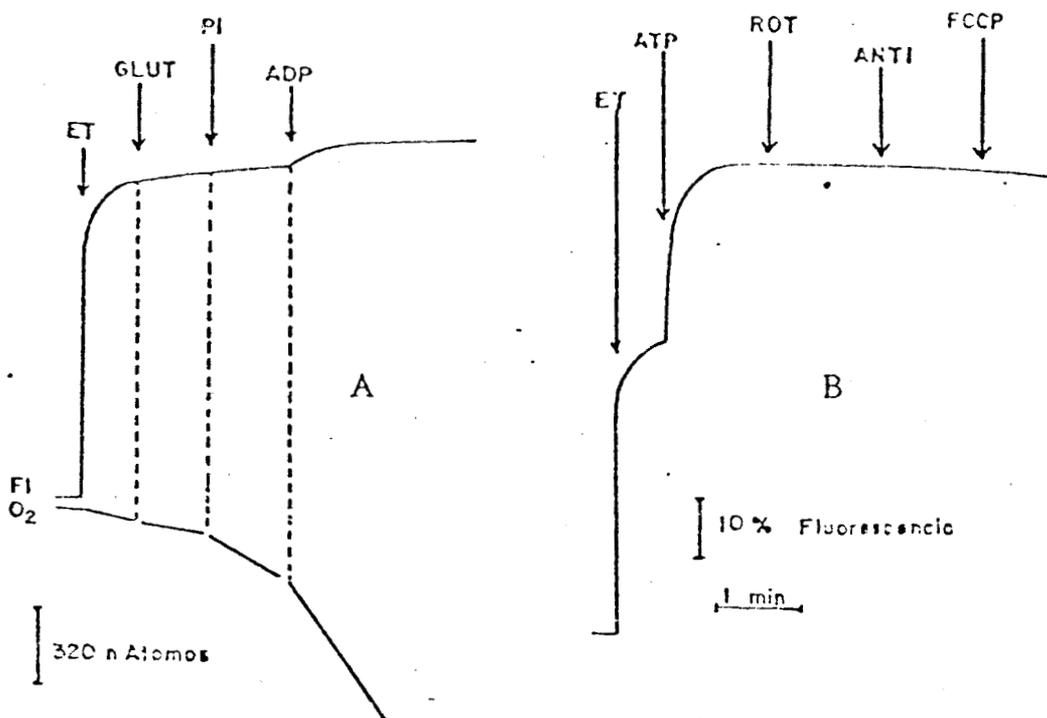


Fig. 4 . A. Medición del % de la fluorescencia del bromuro de etidio en membranas tipo I (no tratadas con EDTA) y medición simultánea del consumo de oxígeno. El medio básico de reacción contiene 10 mM de TEA-HCl pH 7.4, 200 mM de sacarosa pH 7.4 y 5  $\mu$ M de etidio. Las mitocondrias equivalen a 1 mg de proteína/ml. Las adiciones subsiguientes se efectuaron donde se indica a una concentración: 5 mM de glutamato; 2 mM de fosfato; 0.2 mM de ADP.

B. Medición del % de fluorescencia del bromuro de etidio en membranas tipo I. El medio basal fue el mismo que en el panel A. Se realizaron adiciones posteriores donde se indica. Las concentraciones utilizadas fueron: 1 mM de ATP;  $8 \times 10^{-7}$  M de rotenona;  $1 \times 10^{-6}$  M de antimicina y  $2.3 \times 10^{-6}$  M de FCCP. La escala de fluorescencia es similar para los dos paneles.

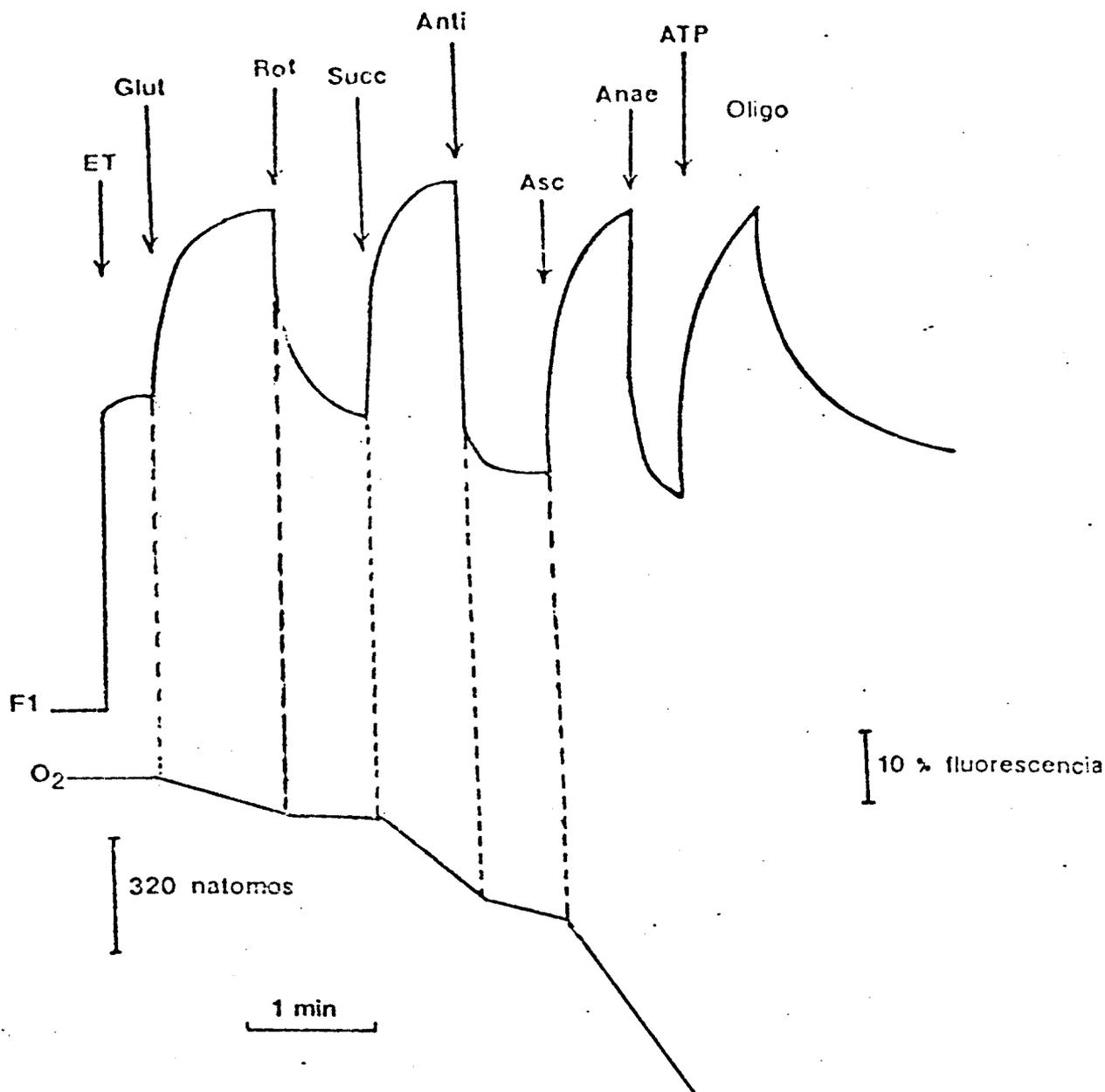


FIG. 5 . Medición simultánea de la fluorescencia del bromuro de etidio y del consumo de oxígeno en mitocondrias tratadas con EDTA (tipo II). Las condiciones experimentales son similares a las de la fig. 4 . Glutamato, succinato y ascorbato( 5 mM), rotenona ( $8 \times 10^{-7} M$ ), antimicina( $1 \times 10^{-6} M$ ), ATP( 1 mM), y oligomicina ( $1.2 \times 10^{-7} M$ ) .

metabólicos sugirió que el efecto de este nucleótido no es mediado a través de su papel clásico de donador de grupos fosfato .

Experimentos adicionales no mostrados con nucleótidos de citidina, inosina y uridina presentan un efecto similar al del ATP, que depende estrictamente del número de residuos fosfato del nucleósido .

Se debe hacer notar que ninguno de los nucleótidos antes señalados incluyendo al ATP presentan efecto alguno sobre la fluorescencia del monitor cuando éste último se une a membranas de fantasmas de eritrocitos .

## II . Fluorescencia del Bromuro de Etidio y acoplamiento energético en mitocondrias tipo II .

La fluorescencia del bromuro de etidio( $5\mu\text{M}$ ) en presencia de mitocondrias tratadas con EDTA, al igual que en las mitocondrias tipo I, es de un 60% mayor que la fluorescencia del etidio en solución acuosa . Sin embargo, existe una diferencia notable a la respuesta de la adición de sustratos oxidables o de ATP . Cuando se agrega alguno de ellos se observa un incremento adicional de la fluorescencia, que puede ser inhibido o prevenido por inhibidores de los segmentos I, II, o III del transporte de electrones dependiendo del sustrato utilizado, o por oligomicina, en el caso de ATP . Cuando la preparación mitocondrial llega a un estado de anaerobiosis el incremento adicional de la fluorescencia mencionado en el párrafo anterior desaparece(fig. 5) .

Resulta evidente que el bromuro de etidio en presencia de mitocondrias tipo II es sensible a la activación o inhibición de la transferencia

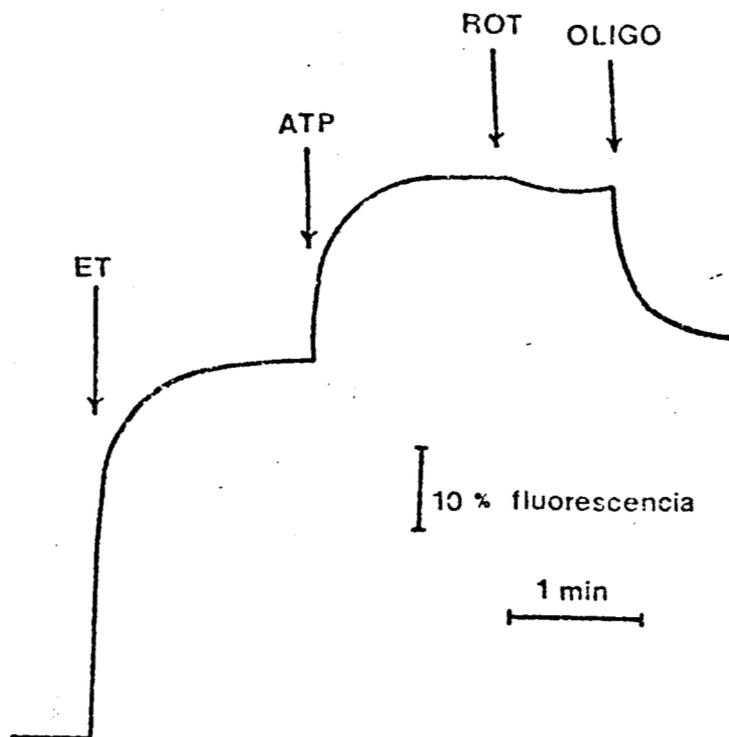


FIG. 6 . Efecto de oligomicina y rotenona sobre el incremento de la fluorescencia dependiente de energía en mitocondrias intactas tratadas con EDTA. La preparación mitocondrial fue tratada para disminuir el contenido de ATP endógeno según lo descrito en la sección de Métodos. El medio es similar al de la fig. 4 . ATP ( 1 mM), rotenona( $8 \times 10^{-7} \text{M}$ ) y oligomicina( $1.2 \times 10^{-7} \text{M}$ ).

de electrones en los tres segmentos de conservación de la energía de la cadena respiratoria, así como a la hidrólisis del ATP .

Como se observa en la fig. 5 , el bromuro de etidio a una concentración de 5  $\mu$ M no tiene efecto desacoplante en mitocondrias tipo II, determinado mediante la medición del consumo de oxígeno .

### III . Fluorescencia del Bromuro de Etidio en mitocondrias tipo II energizadas con ATP .

La adición de 1 mM de ATP a mitocondrias tipo II , con bajo contenido de ATP , produce un incremento de la fluorescencia(33 % del valor producido por la adición de etidio), que es revertido únicamente por la adición de oligomicina y no por rotenona que es un inhibidor del transporte de electrones(fig. 6) . Cuando la fluorescencia alcanza el máximo de disminución, después de haber agregado oligomicina, la adición de succinato(5 mM) produce un incremento de la fluorescencia(fig. 7) que alcanza un valor de 45% respecto al incremento inicial producido por etidio, que a su vez se revierte por la adición de antimicina(1  $\mu$ g/ml) . Cambios similares de fluorescencia también se obtienen por la adición de sustratos de sitios I y III los cuales son revertidos por rotenona y cianuro de potasio respectivamente.

Las figuras 7 y 8-B indican que en mitocondrias tipo II, ocurre una modificación de la fluorescencia al agregar sustratos e inhibidores del transporte de electrones, posterior al incremento inducido por ATP, en presencia o ausencia de oligomicina . Lo cual no sucede en preparaciones tipo I(fig. 8-A) .

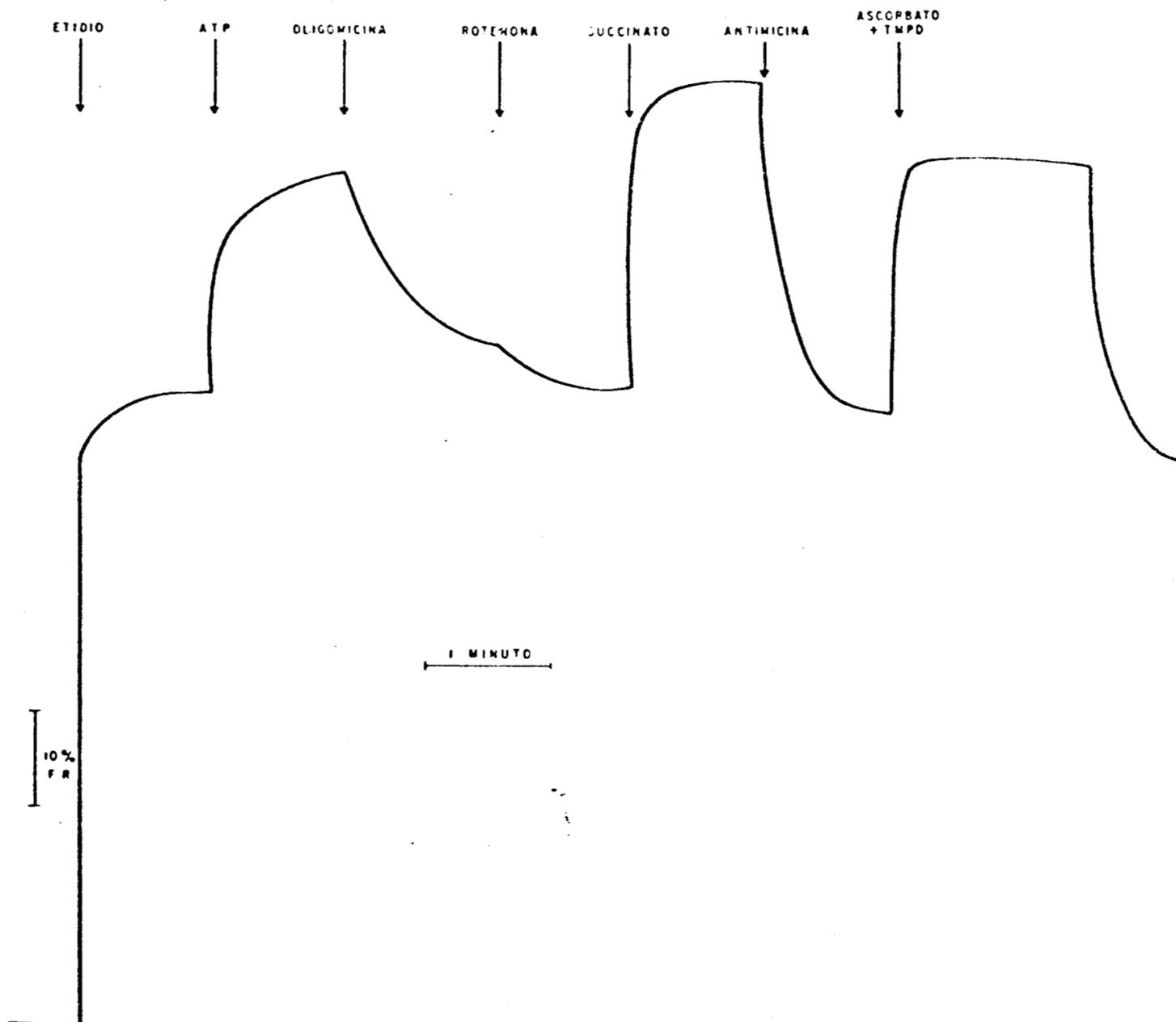


Figura 7. Efecto de oligomicina sobre el incremento de la fluorescencia dependiente de energía en mitocondrias intactas tratadas con EDTA. El medio de reacción es similar al de la fig. 4. ATP (1 mM), oligomicina ( $1.2 \times 10^{-7}$  M), rotenona ( $8 \times 10^{-7}$  M), succinato, antimicina, ascorbato y TMPD a concentraciones similares que la figura 5.

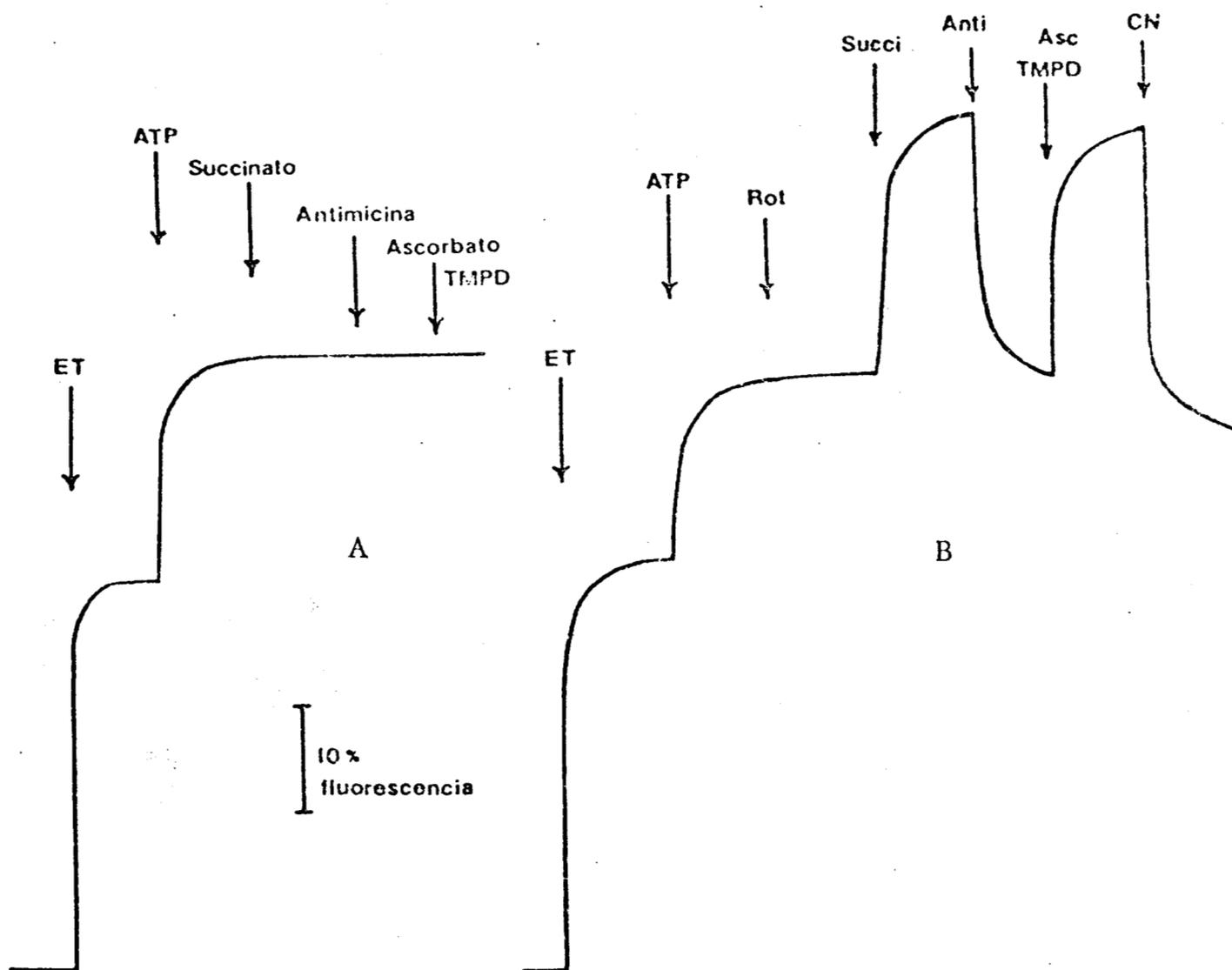


FIG. 8 . Efecto de ATP y sustratos oxidables sobre la fluorescencia del bromuro de etidio en mitocondrias del tipo I (panel A) y del tipo II (panel B). El medio básico de reacción es similar a la fig. 4. ATP (1 mM), succinato (5 mM), rotenona ( $8 \times 10^{-7}$ ), antimicina ( $1 \times 10^{-6}$  M), ascorbato (5 mM) y TMPD (0.3 mM) .

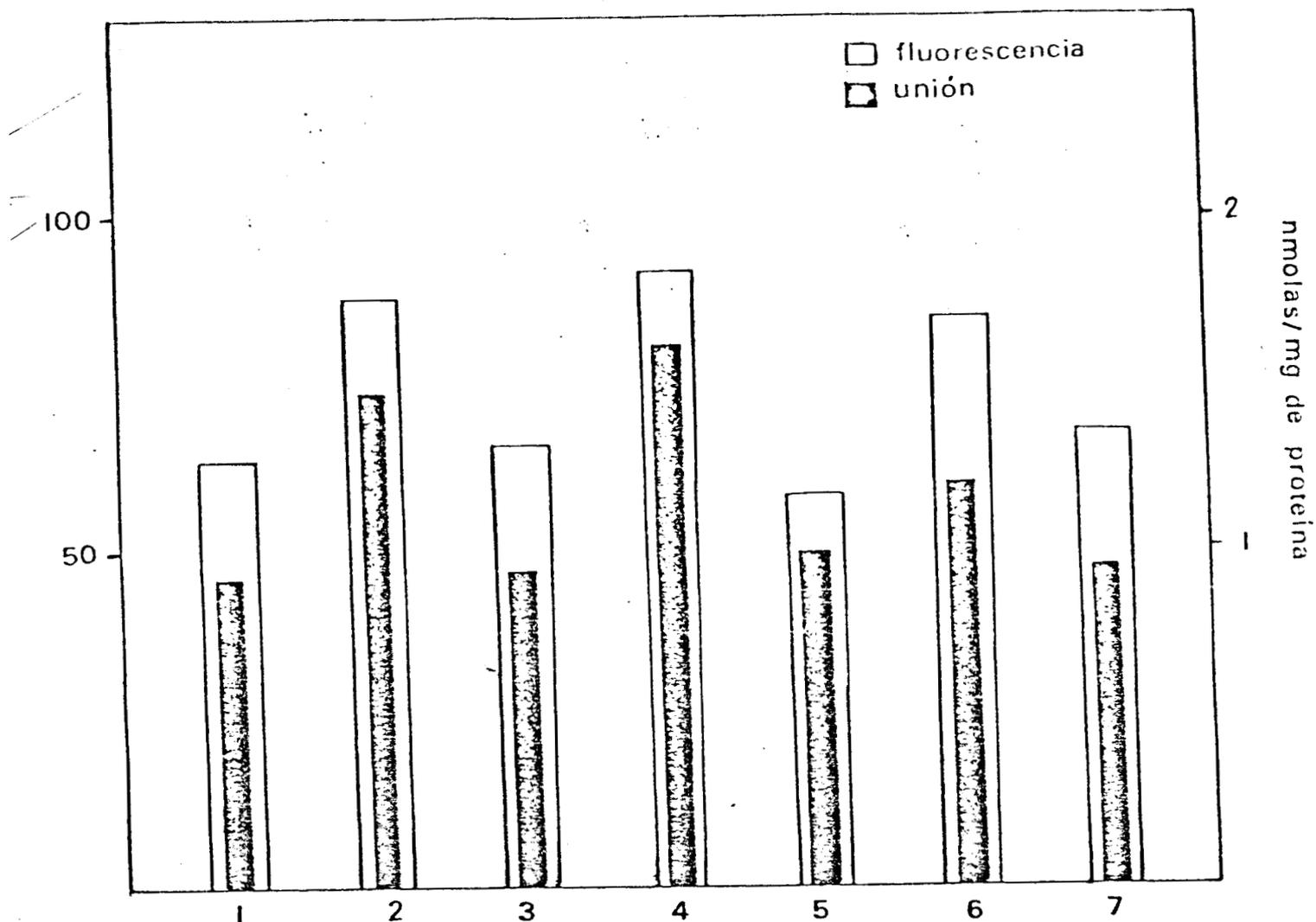


FIG. 9. Relación fluorescencia-unión del bromuro de etidio en mitocondrias tipo II en diferentes estados metabólicos. El medio básico de reacción es similar a la fig. 4. 1) mitocondrias intactas no energizadas, 2) + glutamato (5 mM); 3) glutamato + rotenona ( $8 \times 10^{-7} M$ ); 4) succinato (5 mM); 5) succinato + antimicina ( $1 \times 10^{-6} M$ ); 6) ATP (1 mM); 7) ATP + oligomicina ( $1.2 \times 10^{-7} M$ ).

#### IV . Relación de la fluorescencia del Bromuro de Etidio con los cambios en la unión del colorante en membranas mitocondriales .

Los datos concernientes a los parámetros de unión del bromuro de etidio en mitocondrias tipo II, asociados con los procesos de la conservación de energía se señalan en la tabla III .

Se observa que cuando se adicionan sustratos oxidables, glutamato o succinato, para energizar la membrana se tiene un aumento en el % de fluorescencia relativa del bromuro de etidio, y un incremento en la unión del colorante a la membrana. La adición de inhibidores del transporte de electrones, provoca tanto una disminución en el % de fluorescencia relativa como en la fijación de etidio en la membrana. Esta disminución llega a tener los mismos valores que la preparación sin sustratos agregados . Como se observa, de los dos sustratos utilizados, el que promueve mayor adhesión del monitor a la membrana, es el succinato, y con respecto al ATP es el que produce menor fijación .

En la figura 9, se representan gráficamente los datos de la tabla III; se muestra que el % de fluorescencia relativa del bromuro de etidio con la unión del mismo, a membranas mitocondriales tipo II, guardan una relación directa entre sí .

La figura 10, muestra la relación existente entre la fijación del bromuro de etidio a mitocondrias no energizadas y energizadas, en presencia de varias concentraciones del colorante (0-10  $\mu$ M) .

Se observa que tanto en mitocondrias en ausencia de sustrato como en mitocondrias energizadas, se alcanza la saturación en el rango de las

## M E M B R A N A S   T I P O   I I

	F:R	ETIDIO UNIDO nmolas/mg de proteína
	64	0.92
GLUTAMATO	88	1.49
GLUTAMATO + ROTENONA	66	0.94
SUCCIONATO	92	1.63
SUCCIONATO + ANTIMICINA	59	1.01
A T P	85	1.23
ATP + OLIGOMICINA	68	0.95

Tabla III. Relación fluorescencia-unión del bromuro de etidio en mitocondrias tipo II en diferentes estados metabólicos. Las condiciones són similares a la fig. 9 .

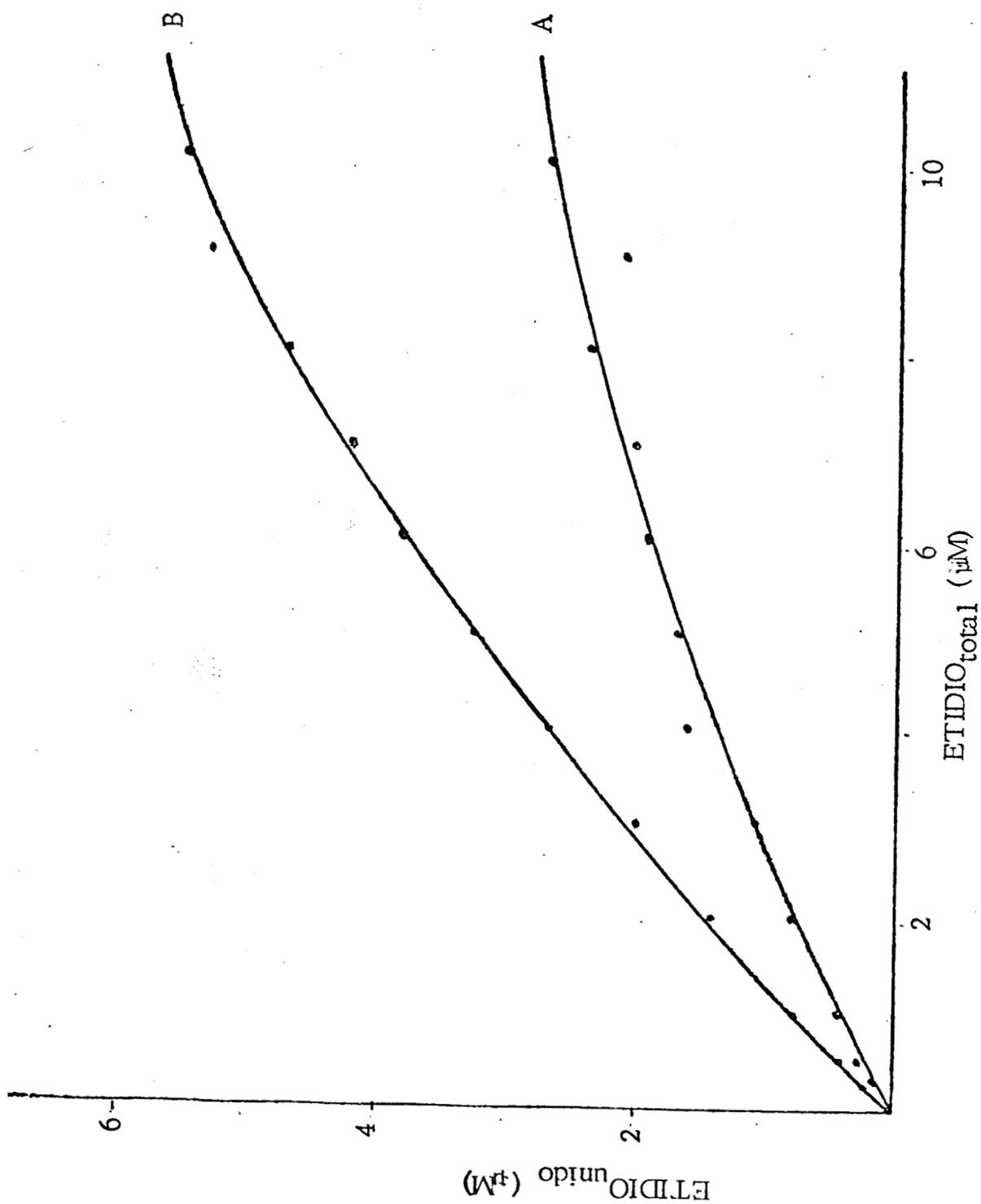


FIG.10. Dependencia de la fijación del bromuro de etidio con respecto a varias concentraciones del colorante. Las condiciones son similares a la fig.4. A. Sin ninguna adición . B. En presencia de rotenona( 1  $\mu\text{g/ml}$ ) y de succinato(5 mM)

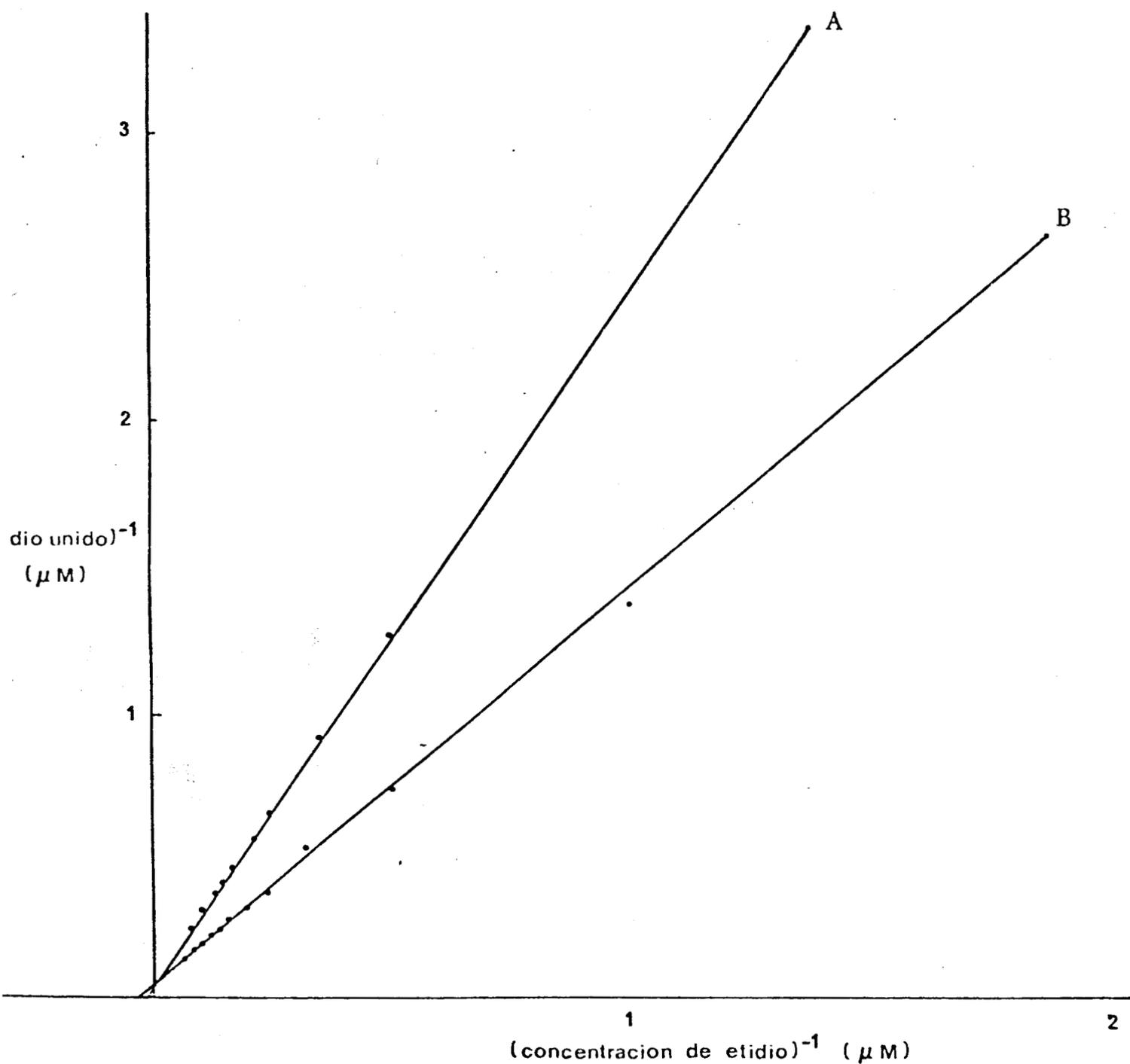


FIG. 11. Doble recíproca de la concentración total del bromuro de etidio y del unido a mitocondrias tipo II energizadas(B) y no energizadas(A). El medio básico de reacción es similar al de la fig. 4. A. sin ninguna adición. B.  $1 \mu\text{g/ml}$  de rotenona y  $5 \text{ mM}$  de succinato. La concentración de etidio se varió de  $0\text{-}10 \mu\text{M}$ .

concentraciones utilizadas .

La figura 11 muestra la gráfica de la doble recíproca de la concentración del bromuro de etidio y del etidio unido a mitocondrias energizadas y no energizadas .

Se obtuvieron dos curvas diferentes para las dos preparaciones. El valor de la  $K_m$  para mitocondrias energizadas fue de  $26.6 \mu M$  y de  $80 \mu M$  para mitocondrias en ausencia de succinato .

En la figura 12 se tiene la gráfica de Scatchard( concentración de etidio unido/ concentración de etidio total vs concentración de etidio unido) en mitocondrias con y sin sustrato. Como se observa se obtuvieron dos gráficas diferentes, con un número de sitios distinto para cada una de ellas. Estos valores son  $5.2$  y  $10.2$  nmolas de etidio/mg de proteína para mitocondrias en ausencia y presencia de succinato respectivamente, que corresponden a la intersección de la porción lineal de la gráfica en el eje de las abcisas .

#### V .Dependencia de la fluorescencia del Bromuro de Etidio en el acoplamiento energético como una función de la concentración del colorante en la membrana mitocondrial .

Los resultados hasta ahora señalados, se obtuvieron a concentraciones  $10 \mu M$  de bromuro de etidio . A continuación se indican los efectos de los sustratos e inhibidores de la cadena respiratoria en función de la concentración de etidio de  $0.5 \mu M$  hasta  $50 \mu M$ (fig. 13) . Se observa que cuando la concentración de etidio utilizada es de  $25-50 \mu M$ , la adición de

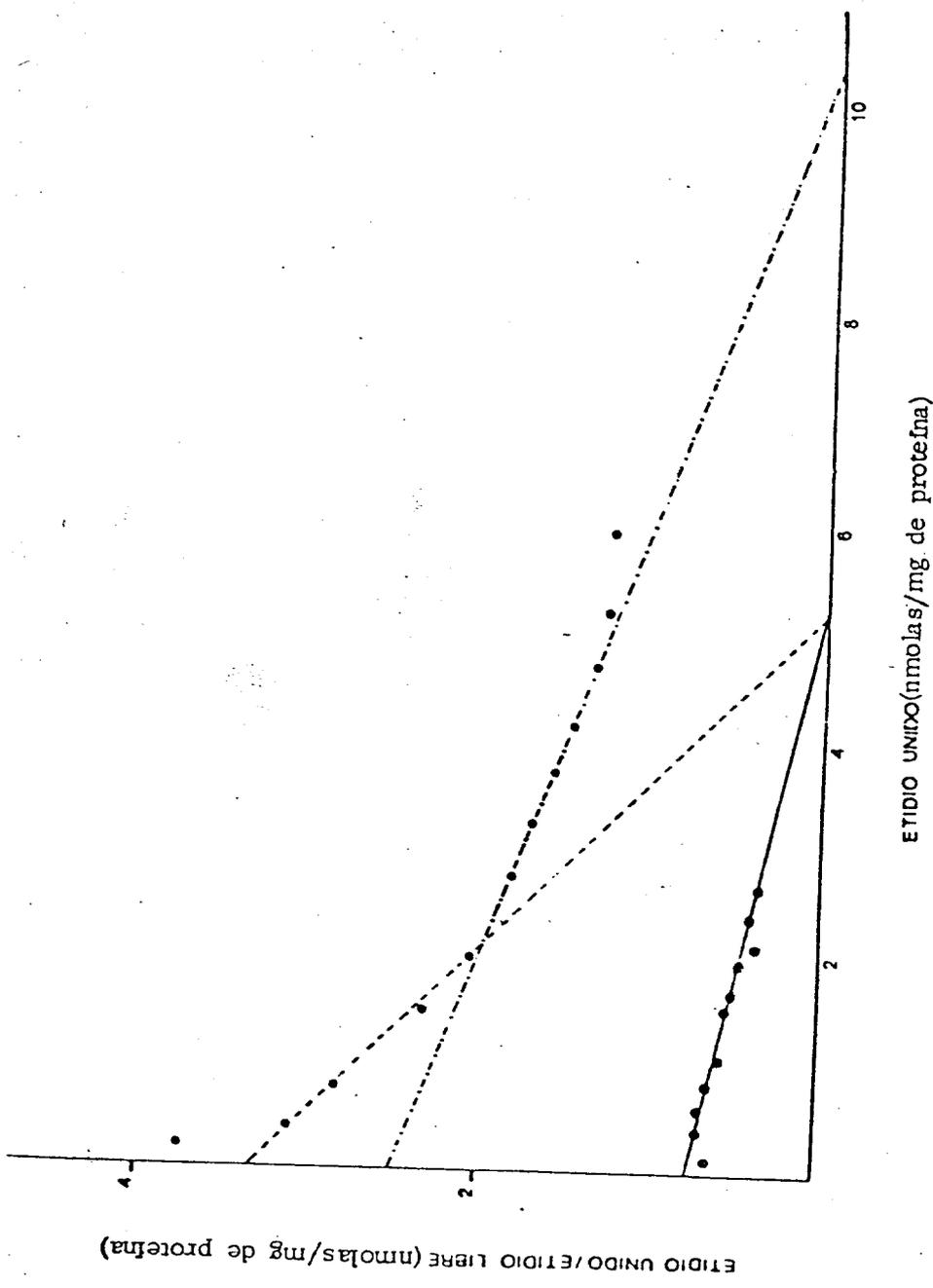


FIG.12.: Scatchard de la unión de bromuro de etidio a mitocondrias intactas (tipo I) energizadas y no energizadas. El medio de reacción es similar al de la fig. 4. A, sin ninguna adición. B, 1  $\mu$ g/ml de rotenona y 5 mM de succinato. La concentración de etidio se varió de 0-10  $\mu$ M. Las líneas punteadas indican las pendientes de la curva B.

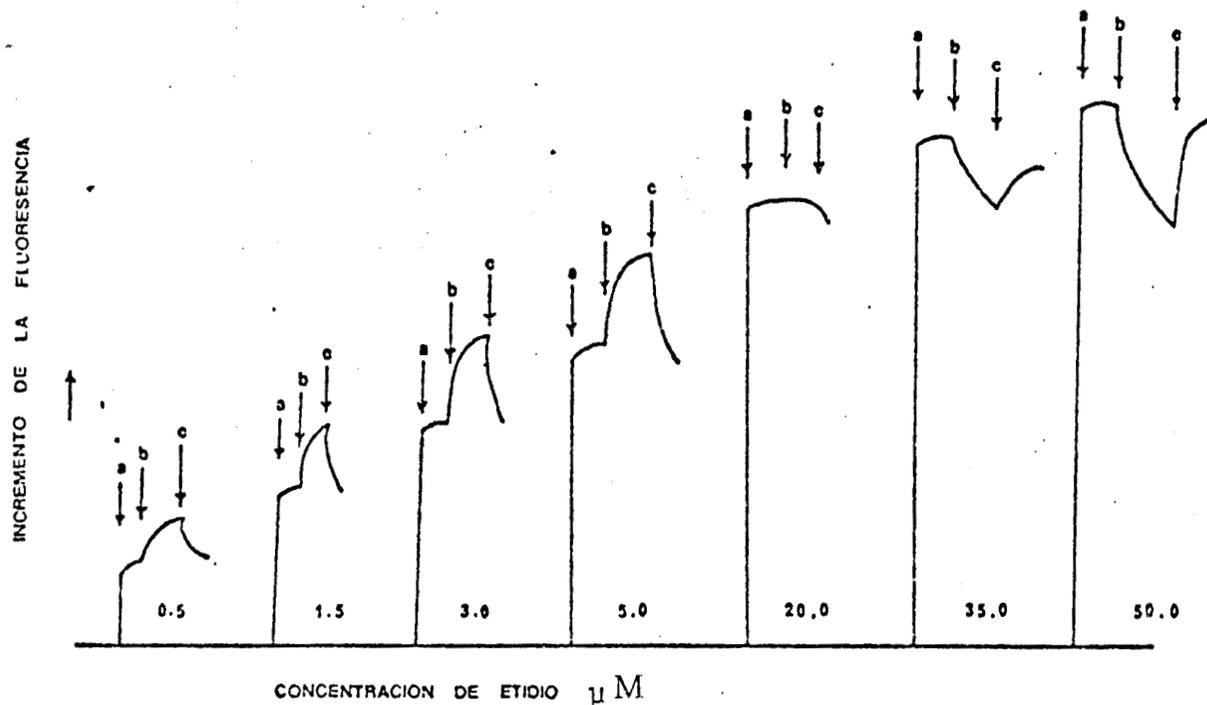


FIG. 13 .Variaciones de la fluorescencia en mitocondrias tipo II energizadas, como una función de la concentración del bromuro de etidio. El medio básico de reacción similar al de la fig. 4 .(a) adición de etidio , (b) adición de succinato 5 mM, (c) adición de antimicina  $1 \times 10^{-6}$  M .

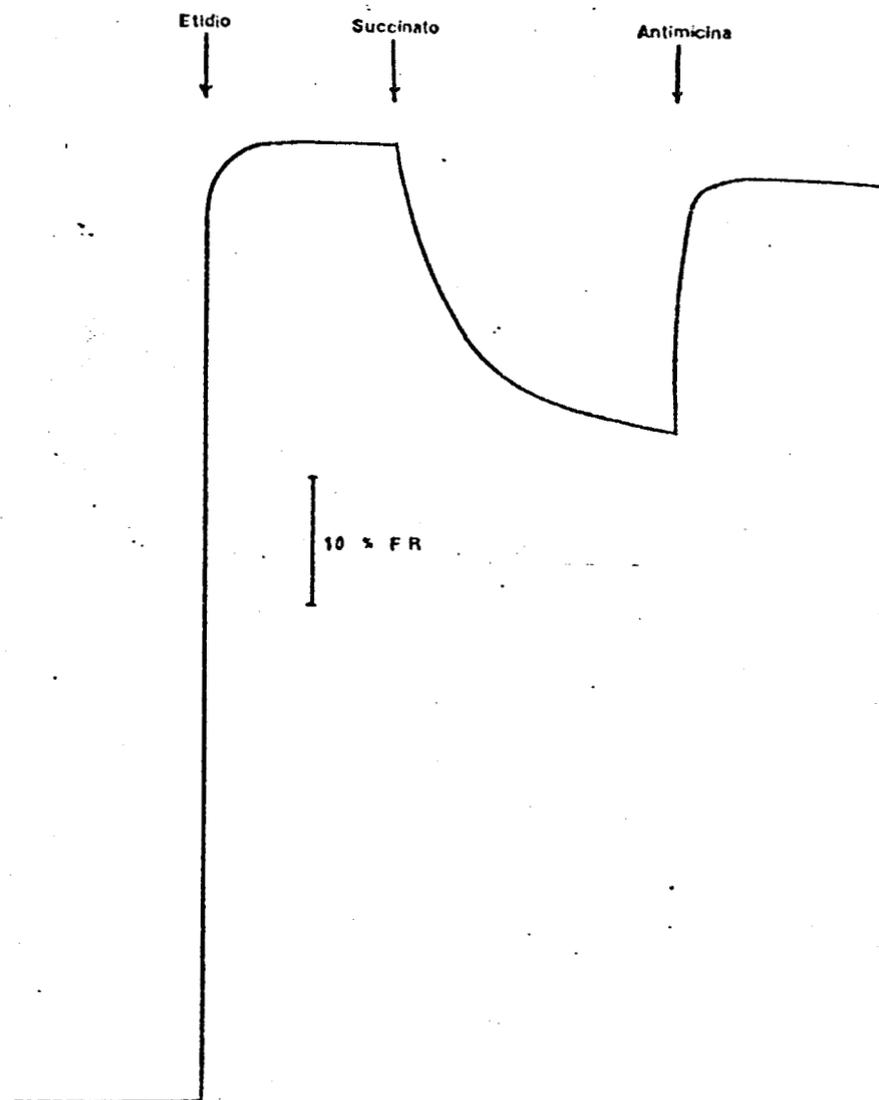


FIG.14. Fluorescencia del bromuro de etidio en mitocondrias tipo II energizadas con 5 mM de succinato. El medio básico de reacción similar al de la fig. 4. La concentración de bromuro de etidio fue de 50  $\mu$ M.

sustratos produce un 30% de disminución de la fluorescencia inicial; la adición de inhibidores del transporte de electrones produce a su vez un incremento de la fluorescencia (figs. 13, 14). Estos efectos son opuestos a los obtenidos cuando se tiene una concentración de etidio de 0.5-5.0  $\mu\text{M}$ , como se muestra en la misma figura 13.

## D I S C U S I O N

El presente trabajo describe las características del bromuro de etidio como un monitor de las transiciones de cargas negativas de superficie que ocurren en mitocondrias metabólicamente activas. Se han descrito otras moléculas fluorescentes como el ANS(34, 144), la n-fenil-1-naftilamina y el 1-toluidino-naftalen-8-sulfonato(34, 35); el 1,6-difenil 1,3,5-hexatrieno y el perileno sensibles a la microviscosidad ambiental(198, 199); el pireno sulfonato y el pireno sulfonamida sensibles al volumen(200); y algunos colorantes fluorescentes extremadamente sensibles al potencial eléctrico, como diversas cianinas(37, 47), merocianinas(37, 47, 110) y oxonoles(102, 156).

Estrada-O(90) encontró que la intensidad de la fluorescencia relativa del bromuro de etidio incrementa hasta cinco veces cuando se une a detergentes neutros(Brij-36 T) con respecto a la fluorescencia mostrada en agua. Sin embargo, el incremento es de 16 veces cuando el colorante se une a micelas aniónicas. En cambio cuando el etidio se une a micélas catiónicas ocurre un incremento despreciable de la fluorescencia. Resulta claro que se obtendrá un incremento notable de la fluorescencia, cuando el

colorante se encuentra en un medio hidrófobo con cargas negativas. Estos datos indican que el bromuro de etidio además de ser sensible a cambios en la polaridad de su microambiente(89, 201), es sensible a la presencia de cargas negativas en la vecindad de los sitios hidrófobos. Por lo tanto es necesario considerar ambos factores para analizar cualquier cambio en la fluorescencia del bromuro de etidio .

### I . Fluorescencia del Bromuro de Etidio en membranas mitocondriales tipo II .

Como se observa en la fig. 4, la adición de bromuro de etidio a mitocondrias tipo I(no tratadas con EDTA) produce un incremento de la fluorescencia. La oxidación de ácidos carboxílicos del ciclo de Krebs así como inhibidores del transporte de electrones y desacoplantes no producen ningún efecto en la fluorescencia basal del etidio en mitocondrias tipo I(figs. 4, 8-A). En este tipo de preparaciones el bromuro de etidio es incapaz de registrar los cambios asociados al transporte de electrones. Sin embargo, la adición de 1 mM de ATP provoca un incremento de la fluorescencia basal sensible a oligomicina e insensible a inhibidores del transporte de electrones y desacoplantes(fig. 4-B) , lo que sugiere una posible interacción del colorante a la ATPasa mitocondrial de acuerdo con los datos encontrados por Mahler (202) e Higuti(203) de la unión de bromuro de etidio a la ATPasa.

Es importante señalar que las mitocondrias tipo I, presentan dos sitios de unión del etidio, uno inespecífico y otro que solamente se expone al actuar la ATPasa .

## II. Fluorescencia del Bromuro de Etidio en mitocondrias tipo II y III

A diferencia de los datos anteriores, cuando las mitocondrias son incubadas con EDTA (figs. 5 y 8-B) se observan incrementos y disminuciones notables en la fluorescencia, debido a la oxidación de sustratos y a la inhibición del transporte de electrones en los tres segmentos de la cadena respiratoria respectivamente. Asimismo la adición de ATP produce un aumento en la fluorescencia, el cual es revertido por òligomicina. Aparentemente en este tipo de mitocondrias, es posible exponer otro sitio de unión del colorante, asociado al transporte de electrones de cadena respiratoria. En cuyo caso se tendrían entonces: un sitio inespecífico cuya interacción con el etidio produce un % de incremento de la fluorescencia igual en los dos tipos de preparaciones. Un segundo sitio involucrado aparentemente con la actividad de la ATPasa similar tanto en mitocondrias tipo I (figs. 4 y 8-A) como en mitocondrias tipo II (figs. 5, 6 y 8-B). Y un tercer sitio que se hace evidente únicamente en mitocondrias tipo II, probablemente debido a la remoción del magnesio unido a sitios críticos de superficie, lo que permite que el etidio registre transiciones de carga de superficie y/o transiciones de polaridad del microambiente durante el transporte de electrones en los tres segmentos de la cadena respiratoria.

El papel del magnesio para que el etidio presente estas respuestas se hace evidente por los resultados obtenidos cuando en el medio de incubación el EDTA es reemplazado por EGTA (fig. 15), este último quelante como se sabe tiene mayor afinidad para calcio que para magnesio, no obstante, si se considera que la fluorescencia del bromuro de etidio incrementa cuando

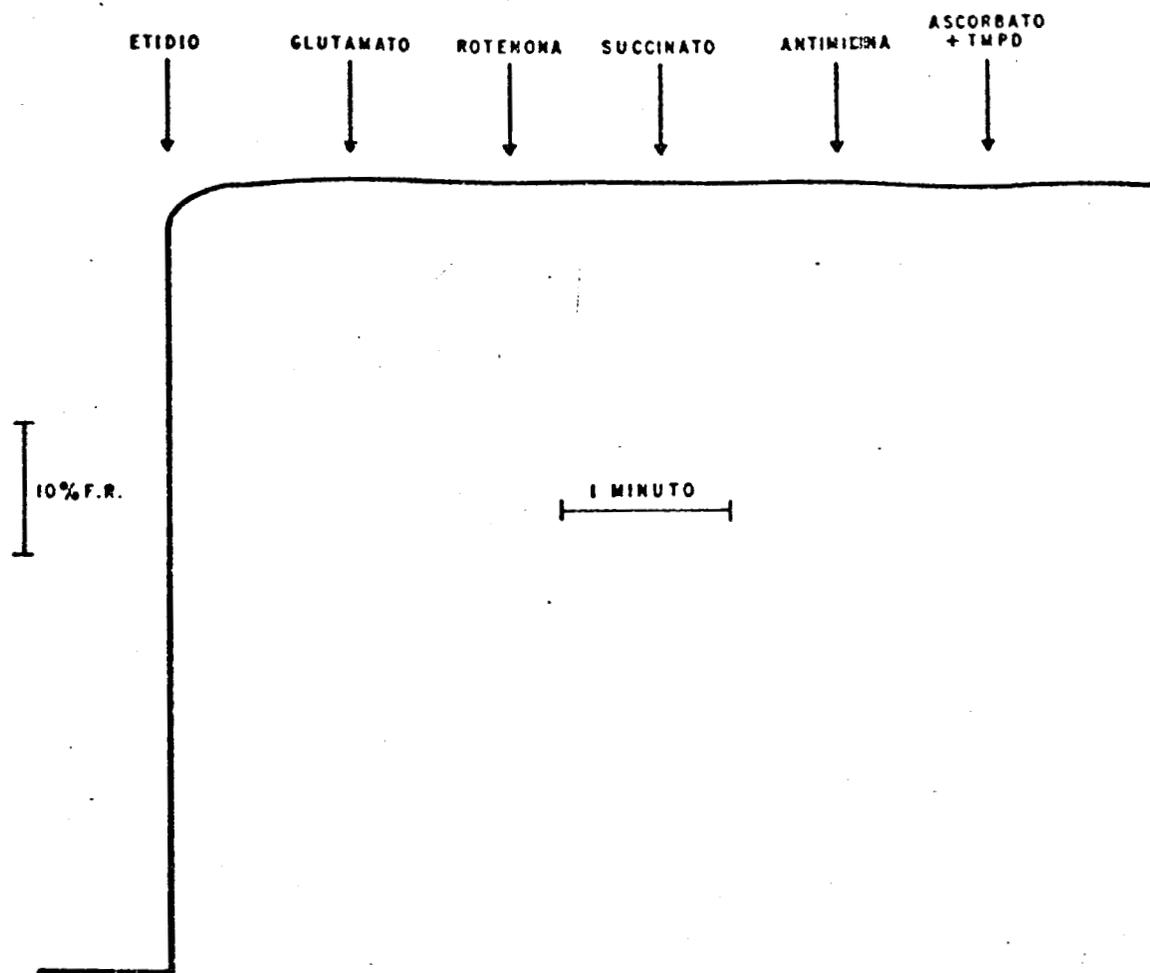


FIG.15 . Fluorescencia del bromuro de etidio en mitocondrias tipo III (tratadas con EGTA). El medio básico de reacción contiene 10 mM de TEA-HCl(pH 7.4), 200 mM de sacarosa pH 7.4 y 5  $\mu$ M de bromuro de etidio. Las mitocondrias equivalen a 1 mg de proteína/ml. Glutamato, succinato y ascorbato(5 mM) rotenona( $8 \times 10^{-7}$  M), antimicina( $1 \times 10^{-6}$  M) y TMPD(0.3 mM)

el colorante se une a sitios hidrófobos negativos como lo señalan los experimentos en micélas neutras, aniónicas y catiónicas, se debería esperar el mismo efecto al remover  $Mg^{2+}$  o  $Ca^{2+}$  de la membrana mitocondrial ya que se dejarían expuestos sitios negativos. Sería poco factible que el etidio mostrara diferente afinidad hacia los dos sitios ya que lo único que permite la interacción del colorante es su naturaleza negativa .

Se ha encontrado que la unión del magnesio a la membrana mitocondrial es mayor en un rango de pH de 6.5 a 7.0 . Los constituyentes de membrana que presentan un pKa entre estos valores de pH son los residuos de histidina de las proteínas, y los grupos fosfato de los fosfolípidos(204) . Estos últimos son los sitios de unión más probables ya que existen evidencias en la literatura de la interacción magnesio-fosfolípidos en diversos sistemas membranales(205, 206), estos sitios requieren una concentración relativamente alta de magnesio para saturarse. En cambio, no se tienen datos sobre la interacción magnesio-histidina .

Habercom y Cheung(204) han sugerido que la unión magnesio-fosfolípidos es un factor importante para la integridad de la membrana en base a que vesículas de retículo sarcoplásmico tratadas con EDTA aumentan su permeabilidad .

Datos en la literatura demuestran que mientras la clorotetraciclina muestra poco o ningún incremento de unión a membranas de eritrocitos o microsomas en la ausencia de cationes divalentes, en el caso de la mitocondria(41) se produce un incremento de la fluorescencia del antibiótico , que ocurre aproximadamente durante un minuto y está probablemente

asociado con la unión de la clorotetraciclina a los cationes unidos con alta afinidad a la membrana mitocondrial. Es bien conocido que lavados repetidos de mitocondrias no eliminan del todo el calcio y magnesio. La adición de rotenona para inhibir la respiración produce una ligera disminución en la fluorescencia, mientras que la adición de succinato restaura los niveles altos de fluorescencia. La subsecuente adición de otros agentes inhibidores, así como antimicina, producen una disminución de la fluorescencia. Por lo tanto la clorotetraciclina parece fluorecer al unirse al sitio negativo al cual está unido el cation divalente.

La naturaleza de los cambios de la fluorescencia del bromuro de etidio en la mitocondria, podría ser hasta cierto punto semejante a los observados con clorotetraciclina, sin embargo, la situación parece ser diferente ya que la clorotetraciclina es fluorescente en los sitios de interacción con los cationes divalentes unidos a la membrana, y como este antibiótico es probablemente capaz de penetrar la membrana, posiblemente la fluorescencia observada pueda deberse a los cationes unidos en la superficie interna de la membrana mitocondrial(41).

Una posible explicación de los resultados presentados durante la oxidación de sustratos, es que la unión del etidio catiónico a la membrana mitocondrial interna ocurre en sitios cuya carga negativa podría depender del estado energizado por sustratos(79, 82, 83) y/o de variaciones en el acceso de  $Mg^{2+}$ . En membranas no tratadas con EDTA(fig. 4), el magnesio así como otros iones monovalentes y divalentes forman complejos en la superficie con grupos cargados negativamente de protefmas y de las

porciones polares de los fosfolípidos, como fosfatidilserina y fosfatidilglicerol.

El magnesio al estar unido a estos sitios electronegativos, no los hace accesibles para la interacción con el etidio en tales preparaciones membranales. El colorante podría localizarse fundamentalmente en la interfase de la membrana visualizando el medio ambiente de las transiciones de las cargas negativas de la superficie no acopladas y acopladas energéticamente. La figura 5 sugiere que el tratamiento con EDTA puede causar la exposición de sitios aniónicos de membrana (previamente unidos al magnesio) para la interacción con el etidio.

Durante los procesos de conservación de la energía, se puede inducir una reorientación inicial del colorante mediante las cargas negativas de la superficie o de la translocación limitada del colorante hacia ciertos loci en la membrana, seguida por un incremento en la fijación neta del colorante inducida por la generación de un potencial transmembranal negativo.

Es concebible que el etidio pueda registrar en parte el potencial transmembranal al moverse hacia partes más "internas" de la membrana. Un cambio en su posición podría probablemente inducir un cambio en su eficiencia cuántica o en su vida media, pero es también posible que nuevos sitios de unión al etidio puedan hacerse más accesibles cuando el colorante está unido en lugares "profundos" de la membrana; así, otras moléculas del etidio pueden moverse hacia la membrana durante los cambios en el potencial transmembranal e incrementar la unión a las cargas negativas de superficie.

Ciertamente, la translocación electroforética neta promovida por el potencial puede ocurrir incluso en magnitudes significativas. Sin embargo,

los cambios en las cargas negativas a las cuales está unido el magnesio y/o la hidrofobicidad la cual es un reflejo de la fluorescencia de la fracción del colorante unido, puede también reflejar cambios estructurales de los componentes de membrana .

Gitler y Montal(207) han mostrado que la interacción de cationes con algunas proteínas, cambian drásticamente su solubilidad; por lo tanto las proteínas de membrana interna en presencia de cationes pueden presentar modificaciones en su posición dentro de la membrana debido a la variación en su hidrofobicidad. Se han registrado cambios en la fluorescencia de monitores tales como pireno-3-sulfonato, ANS y sus derivados en preparaciones mitocondriales en diferentes estados metabólicos(34, 35) . Sugiriéndose que durante la energización se tiende a una disminución en el volumen de la región interna de la membrana .

Por otra parte Chance y col. (88) proponen que durante la transición del estado 3 al 4 ocurren cambios conformacionales en los complejos lipoprotéicos, y que estas transiciones en la membrana producen una estructura más ordenada en el estado energizado, con un incremento en la estructura beta de las proteínas(208) . Esto produce una liberación de moléculas de agua "estructurada" de macromoléculas membranales, detectándose incrementos en la emisión de fluorescencia del monitor siempre y cuando éste ocupe regiones de la membrana que contengan "agua estructurada" . A su vez, esta exclusión de agua puede tener como consecuencia hacer accesibles grupos negativos(fosfato y/o carboxilo, ocupados por el agua(34) . Un inconveniente de esta hipótesis es la lentitud de eventos físicos asociados

a la estructuración del agua membranar, que contrasta con la rápida respuesta de la fluorescencia del etidio y con la alta velocidad del ciclo de oxidoreducción del citocromo  $b_t$ (194) .

Antes de tratar de dar una explicación de las variaciones de fluorescencia del bromuro de etidio en las diferentes preparaciones mitocondriales estudiadas, es conveniente analizar la relación existente entre la unión del colorante a la membrana y su respuesta fluorescente .

### III Cambios en el equilibrio dinámico de la unión del Bromuro de Etidio asociado con la conservación de energía .

Chance(194) ha encontrado que el etidio es capaz de mostrar transiciones rápidas y en paralelo en tiempo a las respuestas del citocromo  $b_t$  las cuales ocurren por la energización de la mitocondria. Tales efectos no modifican significativamente la constante de disociación del colorante unido a la membrana. Estos resultados previamente sugeridos por Gitler(89) indican que algunas de las transiciones membranales acopladas al transporte de electrones registradas por el colorante, son el resultado de cambios primarios en la intensidad relativa de la fluorescencia .

Las evidencias directas de que los cambios en la fluorescencia del bromuro de etidio están relacionados con el movimiento del fluoróforo hacia y desde la membrana, están dadas por las mediciones del etidio libre y unido en diferentes estados metabólicos de la mitocondria. Como se observa en la figura 9, existe una relación notable entre la unión del etidio y los cambios en la fluorescencia en mitocondrias tipo II energizadas y no energizadas .

La adición de sustratos oxidables, glutamato y succinato o ATP , a mitocondrias tipo II en presencia de etidio induce un incremento paralelo en la fijación y fluorescencia del etidio en la membrana(fig. 9) . Las diferencias de sustratos en promover los cambios de fluorescencia y de unión del colorante aparentemente se relacionan con la velocidad con que inducen el transporte de electrones en membrana mitocondrial(fig. 5) .

Haciendo una comparación de los efectos de ATP versus succinato en mitocondrias tipo II, se observa, que ocurre un porcentaje de incremento de la fijación de etidio similar al porcentaje de incremento en la fluorescencia en el caso de succinato, en tanto que en presencia de ATP ocurre una diferencia en el porcentaje de fluorescencia dos veces mayor que el porcentaje de fijación de etidio en mitocondrias. Esto puede reflejar diferencias en el promedio de la eficiencia cuántica por molécula unida como Gitler(89) y Chance(194) sugieren para algunos efectos de la fluorescencia del etidio . Claramente el etidio también responde con un incremento en su unión a la alcalinización de la membrana(209) . Sin embargo, podrían también estar involucrados cambios en la eficiencia cuántica del monitor como se ve por ejemplo en las membranas tipo II sin ninguna adición, o por efecto del potencial transmembranal que induzca un incremento en la afinidad de la membrana por el etidio .

A su vez, la inhibición del transporte de electrones del segmento I (rotenona, polieter XXVIII más potasio) y del segmento II(antimicina), o la inhibición de la ATPasa mitocondrial(oligomicina) producen una disminución significativa tanto de la fluorescencia como de la unión del etidio en dife-

rentes preparaciones mitocondriales(fig. 9, tabla III), alcanzan prácticamente los niveles basales .

Los experimentos anteriores sugieren que la fluorescencia del etidio se debe en una gran parte a su movimiento desde el medio acuoso a la matriz hidrófoba de la membrana. Sin embargo, queda abierta la posibilidad de que los cambios se deban en una pequeña proporción a cambios de la eficiencia cuántica del fluoróforo permanentemente unido a la membrana .

En apoyo a estos datos se tienen que estudios combinados con compuestos aniónicos(ANS y TNS), así como con catiónicos(Auramina-O) han sugerido que la carga de superficie de la membrana mitocondrial es más negativa en la porción externa y más positiva en la región interna, cuando ATP o sustratos oxidables son adicionados(83) . Este modelo parece a su vez apoyado por datos de Skulachev(43, 85), concernientes a la medición del movimiento de moléculas cargadas hacia y desde la membrana mitocondrial. Los estudios con partículas submitocondriales(consideradas invertidas con respecto a las mitocondrias intactas) han sugerido que los fragmentos durante la conservación de energía presentan una carga más positiva en la superficie externa y más negativa en la interna(79, 82, 83). La generación de un potencial transmembranal negativo interno en mitocondrias intactas, durante el proceso de transporte de electrones y el acoplamiento energético(4, 5 ) puede estar parcialmente relacionado con el incremento de la unión del colorante catiónico. Parece, sin embargo, que un incremento en la cantidad del colorante unido no es solamente explicado por un incremento en la fluorescencia.

Las variaciones en la fijación del etidio asociados a los procesos de conservación de energía en la membrana mitocondrial son probablemente debidos a cambios en la afinidad de los sitios de membrana para el etidio.

Los experimentos realizados con el fin de determinar la posible diferencia tanto en la naturaleza como en el número de sitios de unión del bromuro de etidio en mitocondrias tipo II en presencia de succinato como sustrato oxidable, se indican a continuación .

La fig. 10 representa la variación de la concentración del etidio unido a la membrana con respecto a la concentración total de etidio utilizada. La curva A que corresponde a la unión del colorante a sitios en membranas no energizadas, presenta un comportamiento de saturación con una constante de afinidad de  $80.0 \mu\text{M}$ , valor obtenido de la gráfica de la doble recíproca (fig. 11). Según la relación de Scatchard (fig. 12) presenta un número de sitios de  $5.2 \text{ nmolar/mg}$  de proteína . La curva B correspondiente a mitocondrias energizadas con succinato, sigue una cinética de Michaelis con una constante de afinidad de  $26.6 \mu\text{M}$ , obtenida de la gráfica de  $1/\text{etidio unido}$  vs  $1/\text{etidio total}$  (fig. 11) .

El análisis de las gráficas de doble recíproca y Scatchard del etidio unido a la membrana mitocondrial (figs. 11 y 12) indican que la conservación de la energía (inducida por la adición de sustratos) se asocia con una disminución en la  $K_m$  aparente para el etidio  $80 \times 10^{-6} \text{M}$  para mitocondrias no energizadas a  $26.6 \times 10^{-6} \text{M}$  para mitocondrias energizadas, sin cambio en el número de sitios de unión durante la energización . Esta variación en la  $K_m$  podría ser una consecuencia de un cambio estructural en los sitios

de unión o un cambio por el potencial eléctrico a través de la membrana (89, 194) .

La energización incrementa la afinidad de la membrana por el etidio (figs. 11 y 12), presentándose dos sitios de fijación del colorante. Un tipo de sitio de baja afinidad ( $n=10.2$  y  $K_d=4.3$ ) y otro de alta afinidad ( $n=5.2$  y una  $K_d=1.57$ ) . Estos dos sitios de fijación posiblemente corresponden a los sitios de unión que presentan las mitocondrias sin energizar y a la exposición o formación de nuevos sitios al llevarse a cabo las reacciones de oxido-reducción de la cadena respiratoria.

La energización de la membrana tiene como resultado un rearrreglo conformacional del esqueleto lipoprotéico entre el cual aparecen algunos grupos aniónicos y otros grupos se enmascaran. El efecto de la energización de la membrana produce un incremento en la interacción entre los grupos aniónicos y los cationes orgánicos. Esto puede ser debido a un incremento en la nucleofilicidad del sitio o a un incremento en la hidrofobicidad(35) del medio ambiente donde se localiza el sitio de interacción del etidio(178)

#### IV. Cambios de la fluorescencia del Bromuro de Etidio en presencia de ATP.

La adición de ATP produce un incremento de la fluorescencia del bromuro de etidio tanto en mitocondrias tipo I como en mitocondrias tipo II.

Experimentos de unión del etidio a la membrana tipo II indican que existe un incremento en la fijación del colorante en presencia de ATP, y una disminución al adicionar oligomicina

Una serie de evidencias experimentales indican la existencia de una interacción entre el bromuro de etidio y la ATPasa mitocondrial. Se ha encontrado que el bromuro de etidio y algunos derivados se unen a sitios lipofílicos de la ATPasa, tentativamente identificados como el componente de menor peso molecular de la porción sensible a oligomicina(184). Reportes de Peña y col. (210) indican que el etidio inhibe en un 25% la actividad de la ATPasa de hígado de rata en partículas submitocondriales, pero la porción soluble de la enzima( $F_1$ ) es escasamente inhibida. Los datos antes mencionados sugieren que el "blanco" para el bromuro de etidio es la porción  $F_0$  de la mencionada enzima más que la porción catalítica( $F_1$ ). Sin embargo Crosby y col. (211) describen una clara inhibición de la porción soluble purificada  $F_1$  de la ATPasa, y en base a evidencias cinéticas propone que el "blanco" para este compuesto se localiza en sitios no catalíticos de  $F_1$ .

El etidio presenta una cinética clásica de inhibición no competitiva con respecto a  $ATP-Mg^{2+}$ , indicando que no tiene interferencia con la unión de  $ATP-Mg^{2+}$  en la porción  $F_1$ , requiriéndose una concentración de 220  $\mu M$  de etidio para presentarse un 50% de inhibición de la porción  $F_1$ .

Una de las situaciones aún no perfectamente esclarecidas, es la referente que si la unión dependiente de energía del etidio a la membrana mitocondrial refleja el potencial de membrana o la energización de regiones localizadas de la membrana mitocondrial interna(79, 83, 203).

Higuti y col. (203) han estudiado la unión del etidio dependiente de ATP en la membrana interna mitocondrial en función del potencial de membrana o de la energización de ella, en base a la inactivación del sistema

ATPasa en la membrana por oligomicina . Bertina(212) encontró que el sistema ATPasa mitocondrial( $F_1$ - $F_0$ ) une una mol de oligomicina/mol de  $F_0$  con una baja constante de disociación. La interacción de etidio dependiente de energía a la mitocondria energizada con ATP alcanza un equilibrio después de 3 minutos(203). Nosotros encontramos que la adición de oligomicina (1.0  $\mu$ g/mg de proteína) causa un 80% de disminución en la fluorescencia y un decremento en la unión del etidio del 77% con respecto al control . Esta fijación del etidio es independiente del estado de oxido-reducción de los componentes de la cadena respiratoria, ya que después de inhibir la fijación del etidio a la ATPasa con oligomicina se encuentra una respuesta en la fluorescencia del bromuro de etidio a la adición de sustratos oxidables. Asimismo se observa una respuesta en la fluorescencia del etidio a ATP cuando la cadena respiratoria está inhibida .

#### V. Fluorescencia del Bromuro de Etidio a altas concentraciones, en mitocondrias tipo II .

En mitocondrias tipo II, la presencia de altas concentraciones de etidio(  $>10 \mu$ M) produce un aumento de la fluorescencia, correspondiente a la unión del etidio a los sitios de alta afinidad. La adición de sustratos produce una extinción de la fluorescencia que es revertida por la adición de inhibidores, a diferencia de lo que ocurre cuando el etidio se tiene a concentraciones menores . Este comportamiento aparentemente contradictorio puede deberse a las concentraciones relativamente altas del colorante . Posiblemente a bajas concentraciones el etidio se fija a la membrana, mien-

tras que a mayores concentraciones, la generación del potencial transmembranal por la adición de sustratos(pero no ATP) permite que una mayor concentración de etidio se fije a la membrana, presentándose un fenómeno de agregación del monitor, que a su vez ocasiona una disminución de la fluorescencia. Esta agregación también puede ocurrir en solventes de baja constante dieléctrica debido a la fuerte interacción entre las moléculas del colorante no separadas por las moléculas del solvente. Cuando el colorante catiónico interacciona con sitios aniónicos, tiende a agregarse como una consecuencia de la disminución de las repulsiones electrostáticas o una facilitación de las interacciones hidrofóbicas(53). Esto se ha demostrado también en polímeros aniónicos , los cuales son muy efectivos en producir cambios de la fluorescencia y absorción de los colorantes catiónicos, ocasionando que las moléculas del colorante se junten facilitando la interacción electrostática entre ellos(53) .

## C O N C L U S I O N E S

Los resultados experimentales permiten concluir que el bromuro de etidio se comporta como un catión lipofílico móvil que es incorporado a la membrana mitocondrial a través de un proceso dependiente de energía . Presenta propiedades fluorescentes las cuales se manifiestan al fijarse a sitios membranales de baja constante dieléctrica. El bromuro de etidio es, además, un monitor sensible a los cambios en la polaridad del microambiente, lo que le permite registrar los procesos relacionados con la transferencia y la conservación de energía en la membrana mitocondrial. Las variaciones

de fluorescencia estrictamente acopladas a la transformación membranal de energía sólo se observan cuando la membrana ha sido parcialmente desprovista de magnesio y sustratos endógenos en un medio que contiene EDTA. En dichas condiciones, la fluorescencia del colorante es incrementada o abajada por la estimulación o el bloqueo del transporte de electrones como una función dependiente de la concentración del etidio unido .

El efecto de ATP y/o los sustratos con respecto al efecto de rotenona antimicina y oligomicina indican la ventaja del etidio sobre otros monitores en lo referente al estudio funcional de las membranas mitocondriales intactas. Es útil para determinar tanto las alteraciones de carga de superficie que pueden hacerse evidentes durante los procesos de acoplamiento y desacoplamiento energético como los posibles mecanismos involucrados en la transferencia de energía que dependen de potenciales de superficie y transmembranal.

Otro aspecto importante de este trabajo es el referente a la importancia del magnesio para permitir observar variaciones de la fluorescencia del bromuro de etidio acopladas a las transiciones energéticas. Para esto se propone un modelo para tratar de explicar el papel funcional del magnesio. Este catión divalente ocupa ciertos sitios críticos de superficie. Al remover el magnesio de dichos sitios por la acción del EDTA, se permite tanto la unión del etidio a los lugares de superficie como su penetración hasta la parte interna de la membrana. Por lo tanto al energizar la mitocondria el etidio presente en ambos lugares "reporta" las variaciones energéticas y responde incrementando o disminuyendo la fluorescencia. En base a esto

podemos sugerir la existencia de tres sitios de interacción del bromuro de etidio .

a) Sitios de baja especificidad, no asociados a las transiciones energéticas posiblemente ligados a interfases membranales con carga aniónica de superficie.

b) Sitios membranales de mayor especificidad que se exponen al tratar a las mitocondrias con EDTA, los cuales muestran una alta especificidad para interaccionar con el fluoróforo catiónico al energizarse la mitocondria (creándose el potencial transmembranal negativo interno) . Tal energización facilita la interacción y la atracción electroforética del etidio al interior de la membrana. Estos sitios aniónicos e hidrofóbicos, normalmente están ocupados por el magnesio y a profundidades variables en la membrana .

c) Sitios ligados a la fijación del etidio a la ATPasa( $F_1$  o  $F_0$ ) mitocondrial ocupando sitios que pueden también selectivamente ser ocupados por cationes orgánicos e inorgánicos en la estructura de la enzima.

El transporte de electrones a lo largo de la cadena oxidativa produce un marcado incremento de la fluorescencia a concentraciones menores de 10 micromolar de bromuro de etidio; contrariamente promueve un abatimiento en su fluorescencia a concentraciones del monitor mayores de 25 micromolar. Ambos procesos, el incremento y el abatimiento de la fluorescencia dependientes de energía son totalmente revertidos por inhibidores clásicos del transporte de electrones en los tres segmentos de conservación de energía de la cadena respiratoria. Contrario a lo observado cuando la energía proviene del transporte de electrones, la hidrólisis de ATP produce

un incremento pero no una disminución de la fluorescencia del etidio a todas las concentraciones del colorante utilizadas, siendo este efecto revertido por oligomicina.

Se sugiere que las variaciones en el potencial de membrana y los cambios en las cargas de superficie ligadas a cationes como el magnesio facilitan tanto la unión y translocación del monitor a la porción lipídica de la membrana mitocondrial, como a sitios aniónicos intramembranales selectivos, algunos de los cuales estarían asociados con la ATPasa mitocondrial.

## B I B L I O G R A F I A

1. Hendler, R. W. 1971. Biological membrane ultrastructure. *Physiol. Rev.* 51: 66
2. De Pierre, J. W., and Ernster, L. 1972. Enzyme topology of intracellular membranes . *Ann. Rev. Biochem.* 46: 201
3. Singer, S. J., and Nicolson, G. L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720
4. Mitchell, P. 1966. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation . *Biol. Rev.* 41 :445
5. Mitchell, P. 1977. Vectorial chemiosmotic processes. *Ann. Rev. Biochem.* 46:996
6. Chance, B., De Vault, D. , Legallais, V., Mela, L., and Yonetani, T. 1967. En; Nobel Symposium 5, Fast Reactions and Primary Processes in Chemical Kinetics(Claesson, S. Ed.) p 437. Interscience Pub. New York
7. Hackenbrock, C. R. 1977. Molecular organization and the fluid nature of the mitochondrial energy transducing membrane. En: Structure of biological membranes. (Abrahamsson, S. , and Pascher, I. Eds.) p 199 . Plenum Press. New York-London .
8. Thayer, W. S. , and Hinkle, P, C. 1975. Kinetics of adenosine triphosphate synthesis in bovine heart submitochondrial particles. *J. Biol. Chem.* 250:5336
9. Capaldi, R. A. , and Green, D. E. 1972 . Membrane proteins and membrane structure . *FEBS Lett.* 25: 205
10. Vanderkooi, G., Senior, A. E., Capaldi, R. A., and Hayashi, H. 1972 . Biological membrane structure, IIL . The lattice structure of membranous cytochrome oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 274:38
11. Backstrom, D. , Hoffstrom, I. , Gustafsson, I., and Ehrenberg, A. 1973 . An iron sulfur protein in the mitochondrial outer membrane, reducible by NADH and NADPH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53:596
12. Andrews, P. M. , and Hackenbrock, C. R. 1975. A scanning and stereographic ultrastructural analysis of the isolated inner mitochondrial membrane during change in metabolic activity. *Exp. Cell Res.* 90:127

13. Hackenbrock, C. R. 1968. Ultrastructural basis for metabolically linked mechanical activity in mitochondria II. Electron transport-linked ultrastructural changes in mitochondria. *J. Cell. Biol.* 37:345
14. Hackenbrock, C. R. 1966. Ultrastructural basis for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J. Cell. Biol.* 30:269
15. Hackenbrock, C. R. , Rhen, T. G. , Weinbach, E. C. , and Lemasters, J. J. 1971. Oxidative phosphorylation and ultrastructural transformation in mitochondria in the intact ascites tumor cell. *J. Cell. Biol.* 51:123
16. Packer, L. 1974. Molecular architecture of energy transducing membranes related to function. En: *Biomembranes architecture, Biogenesis, Bioenergetics and Differentiation.* (L. Packer . Ed.) p. 147. Academic Press. New York.
17. Packer, L. 1973. Functional organization of intramembrane particles of mitochondrial inner membranes. En: *Membrane structure and mechanisms of biological energy transduction.* (J. Avery, Ed. ) p. 115. Plenum press. New York.
18. Boyer, P.D. 1974. Conformational coupling in biological energy transductions. En: *Dynamics of energy-transducing membranes.* (L. Ernster, R. Stabrook, and E. C. Slater. Eds.) p. 289. Elsevier, Amsterdam.
19. Kagawa, L. 1976. Reconstitution of the inner mitochondrial membrane. En: *The enzymes of biological membranes. Vol. 4. Electron transport systems and receptors.* (A. Martonosi, ED. ) p. 125. Plenum Press. New York, London.
20. Colbeau, A. , Nachbaur, J. , and Vignais, P. M. 1971. Enzymatic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 249:462
21. Harmon, H. J. , Hall, J. D. , and Crane, F. L . 1974. Structure of mitochondrial cristae membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 344:119
22. Jost, P. C. , Griffith, O. H. , Capaldi, R. A. , and Vanderkooi, G. 1973 . Evidenci for boundary lipid in membranes. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 70:480.
23. Branton, D. , and Deemer, D. W. 1972. *Membrane Structure.* p 70 . Vienne Springer.

24. Packer, L. 1973. En: Mechanisms in Bioenergetics. (G. F. Azzone, L. Ernster, S. Papa, E. Quagliariello, and N. Siliprandi, Eds.) p. 33. Academic Press, New York.
25. Vanderkooi, G. 1974. Organization of protein in membranes with special reference to the cytochrome oxidase system. *Biochim. Biophys. Acta* . 344:307.
26. Ernster, L. 1975. *FEBS Symp.* 35:257
27. Hackenbrock, C. R., and Hammon, K. M. 1975. Cytochrome c oxidase in liver mitochondria. Distribution and orientation determined with affinity purified immunoglobulin and ferritin conjugates. *J. Biol. Chem.* 250:9185.
28. Lemaster, J. J., and Hackenbrock, C. R. 1975. Stopped flow rapid kinetics of oxidative phosphorylation as determined by firefly luciferase luminescence. *Fed. Proc.* 34:596
29. Kroger, A., and Klingenberg, M. 1973. The kinetics of the redox reactions of ubiquinone related to the electron-transport activity on the respiratory chain. *Eur. J. Biochem.* 34:358
30. Keith, A., Bulfield, G., and Snipes, W. 1970. Spin-labeled Neurospora mitochondria. *Biophysic. J.* 10:618
31. Keough, J. M., Oldfield, E., Chapman, D., and Beynon, P. 1973. Carbon-13 and proton nuclear magnetic resonance of unsonicated model and mitochondrial membranes. *Chem. Phys. Lipids* 10:37
32. Liebman, P. A., and Entine, G. 1974. Lateral diffusion of visual pigment in photoreceptor disk membranes. *Science.* 185:457.
33. Poo, M. M., and Cone, R. A. 1974. Lateral diffusion of rhodopsin in the photoreceptor membrane. *Nature (Lond)* 247:438
34. Radda, G. K. 1971. The design and use of fluorescent probes for membrane studies. *Curr. Top. in Bioenerg.* 4:81
35. Radda, G. K., and Vanderkooi, J. 1972. Can fluorescent probes tell us anything about membranes? *Biochim. Biophys. Acta* 265:509.
36. Azzi, A. 1975. The application of fluorescent probes in membrane studies. *Q. Rev. Biophys.* 8:237..

37. Waggoner, A. S. 1976. Fluorescent probes of membranes. En: The Enzymes of biological membranes. Physical and chemical techniques. (A. Martonosi, Ed.) Vol. 1, p. 119. Plenum Press. New York.
38. Melthorn, R. J., and Keith, A. D. 1972. Spin-labeling of biological membranes. En: Membrane molecular biology. (C. F. Fox., and A. Keith, Eds.) p. 192. Sinauer Assoc. Stanford, California.
39. Smith, I. C. P. 1972. The spin label method. En: Biological applications of electron spin resonance spectroscopy. (H. M. Swartz., J. R. Bolton, and D. C. Borg, Eds.) p. 483. John Wiley and Sons. New York
40. Wallach, D. F., and Weinzler, R. J. 1974. Evolving strategies and tactics in membrane research. Spring Verlag. New York.
41. Caswell, A. H., and Hutchison, J. D. 1971. Visualization of membrane bound cations by a fluorescent technique. Biochem. Biophys. Res. Commun. 42:43
42. Caswell, A. H., and Hutchison, J. D. 1971. Selectivity of cation chelation to tetracyclines: evidence for special conformation of calcium chelate. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43:625
43. Skulachev, V. P. 1971. Energy transformations in the respiratory chain. Curr. Top. Bioenerg. 4:127
44. Rottenberg, H. 1975. The measurement of transmembrane electrochemical gradients. J. Bioenerg. 7:61
45. Padan, E., and Rottenberg, H. 1973. Respiratory control and the proton electrochemical gradient. Eur. J. Biochem. 40:431
46. Conti, F. 1975. Fluorescent probes in nerve membranes. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 4:287
47. Waggoner, A. S. 1976. Optical probes of membrane potential. J. Membrane Biol. 27:317
48. Cohen, L. B., and Salzberg, B. M. 1978. Optical measurement of membrane potential. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 83:36
49. Schuldiner, S., Rottenberg, H., and Avron, M. 1972. Determination of  $\Delta\text{pH}$  in chloroplasts-fluorescent amines as a probe for the determination of pH in chloroplasts. Eur. J. Biochem. 25:64
50. Gromet-Elhanan, Z. 1971. Relationship between light-induced quenching of atebtrin fluorescence and ATP formation in Rhodospirillum rubrum chromatophores. FEBS Lett. 13:124.

51. Casadio, R. , and Melandri, B. A. 1977. The behavior of 9-aminoacridine as an indicator of transmembrane pH difference in liposomes of natural bacterial phospholipids . J. Bioenerg. Biomembr. 9:17
52. Dell Antone, P., Colonna, R., and Azzone, G. F. 1972. The membrane structure studied with cationic dyes. I. The binding of cationic dyes to submitochondrial particles and the question of the polarity of the ion-translocation mechanism. Eur. J. Biochem. 24:553
53. Dell Antone, P. , Colonna, R. , and Azzone, G. 1972. The membrane Structure studied with cationic dyes. 2. Aggregation metachromatic effects and pKa shifts. Eur. J. Biochem. 24:566
54. Lee, C. P. 1971. A fluorescent probe of the hydrogen ion concentration in EDTA particles of beef heart mitochondria. Biochemistry 10:4375
55. Rottenberg, H. , and Lee, C. P. 1975. Energy dependent hydrogen ion accumulation in submitochondrial particles. Biochemistry 14:2675
56. Dell Antone, P. , Cusinato, O. , and Volpato, O. 1978. Mechanisms of acridine uptake by submitochondrial particles. Arch. Biochem. Biophys. 191:413
57. Azzi, A. , Fabro, A. , Santato, M. , and Gherardini, P L. 1971. Energy transduction in mitochondrial fragments interaction of the membrane with acridine dyes. Eur. J. Biochem. 24:404
58. Kraayenhof, R. 1973. Atebrin and related fluorochromes as quantitative probes of membrane energization. En: Fluorescence techniques in cell biology. (A. A. Thaer and M. Sernetz, Eds.) p. 381. Springer Verlag. Berlin.
59. Kraayenhof, R. 1970. Quenching of uncoupler fluorescence in relation to the "energized state" in chloroplasts. FEBS Lett. 6:161.
60. Kraayenhof, R. , Izawa, S. , and Chance, B. 1972. Use of uncoupling acridine dyes as stoichiometric energy probes in chloroplasts. Plant Physiol. 50:713
61. Fiolet, J. W. T. , Bakker, E. P. , and Van Dam, K. 1974. The fluorescence properties of acridines in the presence of chloroplasts or liposomes. Biochim. Biophys. Acta 368:432
62. Fiolet. J. W. T. , Van der Erf-Ter Haar, L. , Kraayenhof, R. , and Van Dam, K. 1975. On the stimulation of the light induced proton uptake by uncoupling aminoacridine derivatives in spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 387:320.

63. Casadio, R. ,Baccarini-Melandri, A. ,and Melandri, B. A. 1974. On the determination of the transmembrane pH difference in bacterial chromatophores using 9-aminoacridine. *Eur. J. Biochem.* 47:121
64. Michels, P. A. M. , and Konings, W. N. 1978. The electrochemical proton gradient generated by light in membrane vesicles and chromatophores from Rhodopseudomonas sphaeroïdes. *Eur. J. Biochem.* 85:147
65. Casadio, R. ,Baccarini-Melandri, A. , Zannoni, D. , and Melandri, B. S. 1974. Electrochemical proton gradient and phosphate potential in bacterial chromatophores. *FEBS Lett.* 49:203
66. Baccarini Melandri, A. , Casadio, R. , and Melandri, B. A. 1977. Thermodynamics and kinetics of photophosphorylation in bacterial chromatophores and their relation with the transmembrane electrochemical potential difference of protons. *Eur. J. Biochem.* 78:389
67. Elema, R. P. , Michels, P. A. M. , and Konings, W. N. 1978. Response of 9-aminoacridine fluorescence to transmembrane pH-gradients in chromatophores from Rhodopseudomonas sphaeroides. *Eur. J. Biochem.* 92:381
68. Gromet-Elhanan, Z. 1972. Changes in fluorescence of atebriane and anilinonaphthalene sulfonate reflecting two different chromatophores. *Eur. J. Biochem.* 25:84
69. Dell Antone, P. , Frigeri, L. , and Azzone, G. F. 1973. The effects of electrolyte on the interaction of cationic dyes with energized mitochondrial fragments. *Eur. J. Biochem.* 34:448
70. Dell Antone, P. , and Azzone, G. F . 1974. Inhibition of energy-linked uptake of acridine dyes by permeant anions. *FEBS Lett.* 39:67.
71. Albert, A. 1966. The acridines their preparation physical, chemical and biological properties and uses. Edward Arnold. London .
72. Schuldiner, S. , and Avron, M. 1971. On the mechanism of the energy-dependent quenching of atebriane fluorescence in isolated chloroplasts. *FEBS Lett.* 14:233
73. Singh, A. P. , and Bragg, P. D. 1977. ATP-dependent proton translocation and quenching of 9-aminoacridine fluorescence in inside-out membrane vesicles of a cytochrome-deficient mutant of Escherichia coli . *Biochim. Biophys. Acta.* 464:562

74. Dell Antone, P and Volpato, O. 1977.  $H^+$  gradient in submitochondrial particles generated by an electroneutral  $H^+/Mn^{2+}$  exchange. FEBS Lett. 81:243
75. Celis, H., Estrada-O. S., and Montal, M. 1974. Model translocators for divalent and monovalent ion transport in phospholipid membranes. I. The ion permeability induced in lipid bilayers by the antibiotic X-537A. J. Membrane Biol. 18:187
76. Montal, M., Chance, B., and Lee, C. P. 1970. Ion transport and energy conservation in submitochondrial particles. J. Membrane Biol. 2:210
77. Mitchell, P., and Moyle, J. 1965. Evidence discriminating between the chemical and the chemiosmotic mechanisms of electron transport phosphorylation. Nature 208:1205 .
78. Papa, S., Guerrieri, F., Lorusso, M., and Quagliariello, E. 1970 . FEBS Lett. 10:295
79. Azzi, A., Gherardini, P., and Santato, M. 1971. Fluorochrome interaction with the mitochondrial membrane. The effect of energy conservation. J. Biol. Chem. 246:2035
80. Neuman, J., and Jagendorf, A. T. 1964. Light-induced pH changes related to phosphorylation by chloroplasts. Arch. Biochem. Biophys. 107:109
81. Jagendorf, A. T., and Uribe, E. 1966. ATP formation caused by acid - base transition in spinach chloroplasts. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 55:170 .
82. Nordenbrand, K., and Ernster, L. 1971. Studies of the energy-transfer system of submitochondrial particles. Fluorochrome response as a measure of the energized state. Eur. J. Biochem. 18:258
83. Azzi, A. 1969. Redistribution of the electrical charge of the mitochondrial membrane during energy conservation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 37:254
84. Grinius, L. L., Jasaitis, A. A., Kadziauskas, Y. P., Liberman, E. A., Skulachev, V. P., Topali, V. P., Tsofina, L. M., and Vladimirova, M. A. 1970. Conversion of biomembrane-produced energy into electric form . Biochim. Biophys. Acta. 216:1
85. Liberman, E. A., and Skulachev, V. P. 1970. Conversion of bio-membrane produced energy into electric form IV. General discussion. Biochim. Biophys. Acta 216:30

86. Eilerman, L. J. M. 1970. Oxidative phosphorylation in Azotobacter vinelandii . Atebrin as a fluorescent probe for the energized state. Biochim. Biophys. Acta 216:231 .
87. Eilerman, L. J. M. 1971. En: Energy transduction in respiration and photosynthesis. (E. Quagliariello, S. Papa. , and C. A. Rossi, Eds. ) p. 659 Adriatica Editrice, Bari, Italy .
88. Azzi, A. , Chance, B. , Radda, G. K. , and Lee, C. P. 1969. A fluorescence probe of energy-dependent structure changes in fragmented membranes. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 62:612 .
89. Gitler, C. , Rubalcava, B. , and Caswell, A. 1969. Fluorescent changes of ethidium bromide on binding to erythrocyte and mitochondrial membranes. Biochim. Biophys. Acta 193:479 .
90. Estrada-O, S. , Calderón, E. , Rubalcava, B. , y Gitler, C. 1976. Acoplamiento energético, ATPasa y fluorescencia del bromuro de etidio en membranas mitocondriales y modelo. XI Reunión Nacional de la Soc. Mexicana de Bioquímica. p 198 .
91. Avila-García, G. , Toro-Calzada, M. , y Estrada-O. S. 1978. Detección de un locus electronegativo funcional en el segmento NADH-Co Q de la membrana mitocondrial. XII Reunión Nacional de la Soc. Mexicana de Bioquímica. p 151 .
92. Rottenberg, H. , Grunwald, T. , and Avron, M. 1971. Direct determination of pH in chloroplasts and its relation to the mechanism of photo - induced reactions. FEBS Lett. 13:41.
93. Rottenberg, H. , Grunwald, T. , and Avron, M. 1972. Determination of  $\Delta$ pH in chloroplasts. Eur. J. Biochem. 25:54.
94. Deamer, D. W. , Prince, R. C. , and Crofts, A. R. 1972. The response of fluorescent amines to pH gradients across liposome membranes . Biochim. Biophys. Acta. 274:323 .
95. Huang, C. S. , Kopacz, S. J. , and Lee, C. P. 1977. Energy-linked protonation of quinacrine in beef heart submitochondrial membranes . Biochim. Biophys. Acta 459:241
96. Hoffman, J. F. , and Laris, P. C. 1974. Determination of membrane potentials on human and amphiuma red blood cells by means of a fluorescent probe. J. Physiol. London. 239:519 .
97. Sims, P. J. , Waggoner, A. S. , Wang, C. H. , Hoffman, J. F. 1974. Studies on the mechanisms by which cyanine dyes measure membrane potential in red blood cell and phosphatidylcholine vesicles. Biochemistry 13:3315

98. Guillet, E., and Kimmich, G. 1978. Differential effects of erythrocyte lysates on spectra of potential-sensing carbocyanine dyes. *Biochim. Biophys. Acta.* 509:385 .
99. Laris, P. C., Pershadsingh, H. A., Johnstone, R. M. 1976. Monitoring membrane potentials in Ehrlich ascites tumor cells by means of a fluorescent dye. *Biochim. Biophys. Acta.* 436:475 .
100. Philo, R. D., and Eddy, A. A. 1975. The electrogenicity of amino acid absorption in mouse Ascites-tumour cells . *Biochem. Soc. Trans.* 3:904
101. Pick, U., and Avron, M. 1976. Measurement of transmembrane potentials in Rhodospirillum rubrum chromatophores with an oxacarbo-cyanine dye. *Biochim. Biophys. Acta.* 440:189 .
102. Bashford, C. L., Chance, B., and Prince, R. 1978. Oxonol dyes as monitors of membrane potential: Their behaviour in photosynthetic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 545:46 .
103. Doughty, M. J., and Dodd, G. H. 1976. Fluorometric determination on the resting potential changes associated with the chemotactic response in Paramecium. *Biochim. Biophys. Acta.* 451:592
104. Tedeschi, H. 1974. Mitochondrial membrane potential: evidence from studies with a fluorescent probe. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71:583
105. Laris, P. C., Bahr, D. P., Chaffee, R. R. j. 1975. Membrane potentials in mitochondria preparations measured by means of a cyanine dye . *Biochim. Biophys. Acta.* 376:415 .
106. Ross, W. N., and Reichardt, L. F. 1979. Species-specific effects on the optical signals of voltage-sensitive dyes. *J. Membrane Biol.* 48:343 .
107. Ross, W. N., Salzberg, B. M., Cohen, L. B., Grinvald, A., Davila, H. V., Waggoner, A. S., and Wang, C. H. 1977. Changes in absorption, fluorescence, dichroism, and birefringence in stained giant axons optical measurement of membrane potential. *J. Membrane Biol.* 33:141 .
108. Azzone, G. F., Zannotti, A., and Colonna, R. 1978. Induction of electro-neutral exchanges of  $H^+$  with  $Na^+$ , divalent and organic cations in rat liver mitochondria. *FEBS Lett.* 96:141 .
109. Akerman, K, E-O. 1979. Qualitative measurements of the mitochondrial membrane potential in situ in Ehrlich ascites tumor cells using the safranin method. *Biochim. Biophys. Acta.* 546: 341 .
110. Waggoner, A. S. 1979. Dye indicators of membrane potential. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 8:47 .

111. Salama, G., Johnson, R. G., and Scarpa, A. 1980 . Spectrophotometric measurements of transmembrane potential and pH gradient in chromaffin granules. *J. Gen. Physiol.* 75:109.
112. Waggoner, A. S., Sirkin, D., Tolles, R. L., and Wang, C. H. 1975 . Rate of membrane penetration of potential-sensitive dyes. *Biophys. J.* 15:2
113. Szabo, G. 1974. Dual mechanism for the action of cholesterol on membrane permeability. *Nature. London.* 252: 47 .
114. Ferguson, S. J., Lloyd, W. J., and Radda, G. K. 1976. On the nature of the energized state of submitochondrial particles; investigations with N-aryl naphthalene sulphonate probes. *Biochim. Biophys. Acta.* 423:174.
115. Colonna, R., Massari, S., and Azzone, G. F. 1973. The problem of cation binding sites in the energized membrane of intact mitochondria . *Eur. J. Biochem.* 34:577 .
116. Akerman, K. E-O., Saris, N. -E. L. 1976. Stacking of safranin in liposomes during valinomycin-induced efflux of potassium ions . *Biochim. Biophys. Acta.* 426:624 .
117. Akerman, K. E-O., and Wikstrom, M. K. F. 1976. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.* 68:191 .
118. Akerman, K. E. A. 1978 . Changes in membrane potential during calcium ion influx and efflux across the mitochondrial membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 502:359
119. Weber, G., and Laurence, D. J. R. 1954. Fluorescent indicators of adsorption in aqueous solution and on the solid phase. *Biochem. J.* 56: XXXI.
120. Slavick, J., and Razjivin, A. P. 1978. Binding of ANS to the biological membrane. *Studia Biophysica*, 73:157 .
121. Stryer, L . 1965. The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin . A fluorescent probe of non-polar binding sites. *J. Mol. Biol.* 13:482 .
122. Rawitch, A. B., and Hwan, R. -Y. 1979. Anilinonaphthalene sulfonate as a probe for the native structure of bovine alpha lactalbumin: absence of binding to the natives monomeric protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91:1383 .
123. Vanderkooi, J. M., and Martonosi, A. 1971a . Sarcoplasmic reticulum. XII. The interaction of 8-anilino-1-naphthalene sulfonate with skeletal muscle microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 144:87.

124. Vanderkooi, J. M., and Martonosi, A. 1971 b. Sarcoplasmic reticulum XIII. Changes in the fluorescence of 8-anilino-1-naphthalene sulfonate with skeletal muscle microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 144:87.
125. Rubalcava, B., Martínez de Muñoz, D., and Gitler, C. 1969. Interaction of fluorescent probe with membranes. I. Effect of ion on erythrocyte membranes. *Biochemistry* 8:2742.
126. Hasselbach, W., and Heimberg, K. W. 1970. The interaction of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate with the membranes of the sarcoplasmic reticulum and various lipid compounds. *J. Membrane Biol.* 2:341.
127. Augustin, J., and Hasselbach, W. 1973. Studies on the fluorescence of 1-anilino-8-naphthalenesulfonate by the membranes of the sarcoplasmic reticulum. *Eur. J. Biochem.* 35:114
128. Leeslauer, W., Cain, J. E., and Blasie, J. K. 1972. X-ray diffraction studies of lecithin bimolecular leaflets with incorporated fluorescent probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69:1499.
129. Zierler, K., and Rogus, E. 1978. Fluorescence of 1,8-anilino-naphthalene sulfonic acid bound to proteins and to lipids of sarcolemma. *Biochim. Biophys. Acta.* 514:37 .
130. Zierler, K., and Rogus, E. 1979. Temperature effects on 1,8-anilino-naphthalene sulfonic acid. Fluorescence with sarcolemma vesicles . *Biochim. Biophys. Acta.* 551:389 .
131. Haynes, D. H., Staerk, H. 1974. 1-anilino-8-naphthalene sulfonate; a fluorescence probe of membrane surface structure composition and mobility. *J. Membrane Biol.* 17:313 .
132. Wallach, D. F. H., Ferber, E., Selin, D., Weidekamm, E., and Fischer, H. 1970. The study of lipid protein interaction in membranes by fluorescent probes. *Biochim. Biophys. Acta.* 203:67 .
133. Ohyashiki, T., and Mohri, T. 1979. 1-anilino-8-naphthalene sulfonate as a probe of conformational changes of rabbit intestinal brush border membranes on addition salts and sugars. *J. Biochem.* 85:857.
134. Weber, G., and Daniel, E. 1966. Cooperative effects in binding by bovine serum albumin. II. The binding of 1-anilino-8-naphthalenesulfonate polarization of the ligand fluorescence and quenching of the protein fluorescence. *Biochemistry* 5:1900
135. Radda, G. K., and Smith, D. S. 1973. Human erythrocyte ghosts: relationship between membrane permeability and binding kinetics of the fluorescent probe 1-anilino-naphthalene-8-sulfonate. *Biochim. Biophys. Acta* 318:197

136. Fortes, P. G. S., and Hoffman, J. F. 1971. Interaction of the fluorescent anion 1-anilino-8-naphthalene sulfonate with membrane charges in human red cell ghosts . J. Membrane Biol. 5:154 .
137. Freedman, R. B., Radda G.K. 1969 . The interaction of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate with erythrocyte membranes. FEBS Lett. 3:150
138. Gomperts, B., Lantelme, F., and Stock, R. 1970. Ion association reactions with biological membranes, studied with the fluorescent dye 1-anilino-8-naphthalenesulfonate. J. Membrane Biol. 3:241
139. Dallner, G., and Azzi, A. 1972. Structural properties of rough and smooth microsomal membranes. A study with fluorescence probes. Biochim. Biophys. Acta 255:587 .
140. Feinstein, M. B., Spero, L., and Felsenfield, H. 1970 . Interactions of a fluorescent probe with erythrocyte membrane and lipids: effects of local anesthetics and calcium. FEBS Lett. 6:245
141. Vanderkooi, J., and Martonosi, A. 1971. En: Probes of structure and function of macromolecules and membranes. (B. Chance., C. P. Lee., and J. K. Blasie. Eds). Vol 1, p 293 . Academic Press. New York .
142. Okuda, C., and Ogli, K. 1979. Fluorometric study with 1-anilino-8-naphthalene sulphonate on membrana surface charge changes induced by inhalation anaesthetics. FEBS Lett. 101: 399 .
143. Chen, R. F. 1967. Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment. J. Biol. Chem. 242:173
144. Brocklehurst, J. R., Freedman, R. B., Hancock, D. J., and Radda, G. K. 1970. Membrane studies with polarity-dependent and excimer-forming fluorescence probe. Biochem. J. 116:721 .
145. Fortes, P.A.G., and Hoffman, J. F. 1974. The interaction of fluorescent probes with anion permeability pathways of human red cells . J. Membrane Biol. 16:79 .
146. Braun, V., and Oldmixon, E. 1979. Relationship between steps in 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS) fluorescence and changes in the energized membrane state and in intracellular and extracellular adenosine 5'-triphosphate(ATP) levels following bacteriophage T<sub>5</sub> infection of Escherichia coli . J. Supramol. Struct. 10:329
147. Cheng, S., and Levy, D. 1978. The interaction of the anionic fluorescence probe 1-anilino-8-naphthalene-8-sulfonate, with hepatocytes and hepatoma tissue culture cells. Biochim. Biophys. Acta. 511:419 .

148. Jasaitis, A. A. , Kuliene, V. V. , Skulachev, V. P. 1971. Anilinonaphthalene-sulfonate fluorescence changes induced by ion-enzymatic generation of membrane potential in mitochondria and submitochondrial particles. *Biochim. Biophys. Acta.* 234:177 .
149. Azzi, A. , and Santato, M. 1971. Interaction of ethidium with the mitochondrial membrane: cooperative binding and energy linked changes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44:211.
150. Smith, J. C. , and Chance, B. 1979. Kinetics of the potential sensitive extrinsic probe oxonol VI in beef heart submitochondrial particles. *J. Membrane Biol.* 46: 255 .
151. Hladky, S. B. , and Rink, T. J. 1976. Membrane potentials and properties of human erythrocyte and ghosts assessed with a fluorescent dye 3, 3-dipropyl-2, 2-thiacarbocyanine, di-S-C<sub>3</sub>-(5). *J. Physiol.* 258:100p
152. Rink, T. J. , and Hladky, S. B. 1976. pH changes in human erythrocytes reported by 3, 3-dipropylthiadiazocarbocyanine, di-S-C<sub>3</sub>-(5) . *J. Physiol.* 263:213 .
153. Hladky, S. B. , and Rink, T. J. 1976. Potential difference and the distribution of ion across the human red blood cell membrane: a study of the mechanisms by which the fluorescent cation , di-S-C<sub>3</sub>-(5), reports membrane potential. *J. Physiol(London).* 263:287 .
154. Freedman, J. C. , and Hoffman, J. F. 1979. The relation between dicarbocyanine dye fluorescence and the membrane potential of human red blood cells set at varying Donnan equilibria. *J. Gen. Physiol.* 74:187.
155. Waggoner, A. S. , Wang, C. H. , and Tolles, R. L. 1977 . Mechanism of the potential dependent light absorptions changes of lipid bilayers membranes in the presence of cyanine and oxonol dyes . *J. Membrane Biol.* 33:109 .
156. Bashford, C. L. , Chance, B. , Smith, J. C. , and Yoshida, T. 1978. The behaviour of oxonol dyes in phospholipid dispersions. *Biophys. J.* 25:63
157. Smith, J. C. , Russ, P. , Cooperman, B. S. , and Chance, B. 1976. Synthesis, structure determination, spectral properties, and energy-linked spectral properties of the extrinsic probe oxonol V in membranes. *Biochemistry* 15:5094
158. Williams, W. P. , Layton, D. G. , and Johnston, C. 1977. An analysis of the binding of fluorescence probe in mitochondrial systems . *J. Membrane Biol.* 33:21'.

159. Cohen, L. B. , Salzberg, B. M. , Davila, H. V. , Ross, W. N. , Laudowne, D. , Waggoner, A. S. , and Wang, C. H. 1974. Changes in axon fluorescence during activity: molecular probes of membrane potential. *J. Membrane Biol.* 19: 1.
160. Waggoner, A. S. , and Grinvald, A. 1977. Mechanisms of rapid optical changes of potential sensitive dyes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 303:217
161. Ross, W. N. , Salzberg, B. M. , Cohen, L. B. , and Davila, H. V. 1974. A large change in dye absorption during the action potential. *Biophys. J.* 14:983.
162. Dragsten, P. R. , and Webb, W. W . 1978. The mechanism of membrane potential sensitivity of merocyanine M-540. *Biochemistry* 17:5228.
163. Szabo, G. 1976. The influence of dipole potentials on the magnitude and the kinetics of ion transport in lipid bilayers membranes. En: *Extreme environment: mechanisms of microbial adaptation* (M. R. Heinrich, Ed.) p. 321. Academic Press. New York .
164. Cheng, W. K. 1975. Electrochromic properties of membrane probes. *Biomembranes.* 7:56
165. Ibsen, K. H. , and Urist, M. R. 1962. Complexes of calcium and magnesium with oxytetracycline. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 109:797.
166. Doluisio, J. T. , and Martin, A. N. 1963. *J. Med. Chem.* 6:16
167. Kohn, K. W. 1961. Mediation of divalent metal ions in the binding of tetracycline to macromolecules. *Nature(Lond)* 191:1156
168. Mitscher, L. A. , Bonacci, A. C. , Slater-Eng, B. , Hocker, A. K. , and Sokoloski, T. D. 1968. *Antimicrob. Agents. Chemother.* p 111.
169. De agustine, R. P. , Eling, T. E. , and Fouts, J. R. 1970. The interaction of a fluorescent probe with rat hepatic microsomes. *Fed. Proc.* 29:738
170. Carvalho, C. M. A. , and Carvalho, A. P. 1977. Fluorometric monitoring of calcium binding to sarcoplasmic reticulum membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 468:21.
171. Fabiato, A. , and Fabiato, F. 1979. Use of chlorotetracycline fluorescence to demonstrate  $Ca^{++}$ -induced release of  $Ca^{++}$  from the sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac cells. *Nature* .281:146.

172. Lau, Y. H. , Chiu, T. H. , Caswell, A. T. , and Potter, L. T. 1974. Effects of  $\beta$ -bungarotoxin on calcium uptake by sarcoplasmic reticulum from rabbit skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61:510
173. Caswell, A. H. 1972. The migration of divalent cations in mitochondria visualized by a fluorescent chelate probe. *J. Membrane Biol.* 7:345
174. Schuster, S. M. , and Olson, M. S. 1974. Studies of the energy-dependent uptake of divalent metal ions by beef heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 249:7151 .
175. Hallet, M. , Schneider, A. S. , and Carbone, E. 1972. Tetracycline fluorescence as calcium probe for nerve membrane with some model studies using erythrocyte ghosts. *J. Membrane Biol.* 10:31.
176. Caswell, A. H. , and Warren, S. 1972. Observation of calcium uptake by isolated sarcoplasmic reticulum employing a fluorescent chelate probe. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46:1757.
177. Ornstein, R. L. , and Rein, R. 1979. Energetic and structural aspects of ethidium cation intercalation into DNA minihelices. *Biopolymers* 18:2821
178. Dean, P. M. , and Wakelin, L. P. G. 1979. The docking manoeuvre at a drug receptor: a quantum mechanical study of intercalative attack of ethidium and its carboxylated derivative on a DNA fragments . *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 287:571
179. Newton, B. A. 1974. En: Trypanosomiasis and Leishamianiasis with special reference to Chagas disease. *Ciba Foundation Symposium* 20. p. 285. Elsevier, Amsterdam .
180. Bouanchaud, D. H. , Scavizzi, M. R. , and Chabbert, Y. H. 1969. Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in enterobacteria and Staphylococci . *J. Gen. Microbiol.* 54:417.
181. Flechtner, V. R. , and Sager, R. 1973. Ethidium Bromide induced selective and reversible loss of chloroplast DNA . *Nature New Biology* 241:277
182. Borst, P . 1972. Mitochondrial nucleic acids. *Ann. Rev. Biochem.* 41:333.
183. De Vris, H. , and Kroon, A. M. 1970. Euflavin and ethidium bromide. Inhibitors of mitochondriogenesis in regenerating rat liver. *FEBS Lett.* 7:347

184. De Nobrega Bastos, R., and Mahler, H. P. 1974. Molecular mechanisms of mitochondrial genetic activity. Effects of ethidium bromide on deoxyribonucleic acid and energetics of isolated mitochondria . J. Biol. Chem. 249:6617 .
185. Lerman, L. S. 1961. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. J. Mol. Biol. 3:18 .
186. Waring, M. J. 1965. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. J. Mol. Biol. 13:269
187. Aktipis, S., Martz, W. W., and Kindelis, A. 1975. Thermal denaturation of the DNA-ethidium complex redistribution of the intercalated dye during melting. Biochemistry 14:326
188. Higgins, E. S., Dunlavey, B. L., Friend, W. H., and Rogus, K. S. 1975 . Ethidium bromide inhibits mitochondrial phosphorylating oxidation. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 149:1055 .
189. Grinwood, B. G., and Wagner, R. P. 1976. Direct of ethidium bromide up on mitochondrial oxidative phosphorylation and morphology . Arch. Biochem. Biophys. 176:43 .
190. Peña, A., and Ramírez, G. 1975. Interaction of ethidium bromide with the transport system for monovalent cations in yeast. J. Membrane Biol. 22:369 .
191. Peña, A., Mora, A., and Carrasco, N. 1979. Uptake and effects of several cationic dyes on yeast. J. Membrane Biol. 47:261 .
192. Naum, I., and Pious, D. A. 1971. Reversible inhibition of cytochrome oxidase accumulation in human cell by ethidium bromide. Exp. Cell. Res. 65:335.
193. Stuchell, R. N., Weinstein, B. I., and Beattie, D. S. 1975. Effects of ethidium bromide on the respiratory chain and oligomycin-sensitive adenosine triphosphate in purified mitochondria from the cellular slime, Dictyostelium discoideum. J. Biol. Chem. 250:570 .
194. Chance, B. 1970. Fluorescent probe environment and the structural and charge changes in energy-coupling of mitochondrial membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 67:560.
195. Pressman, B. C. 1965. Induced active transport of ions in mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 53 :1076 .
196. Johnson, D., and Lardy, H. A. 1967. Isolation of liver or kidney mitochondria. Methods Enzymol. 10:94 .

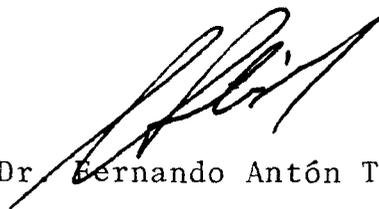
197. Azzi, A. 1979. Use of fluorescence to study energy-linked processes. *Methods Enzymol.* 56:496.
198. De Laat, S. W. , Van Der Saag, P. T. , AD Nelemans, S. , and Shinitzkey, M. 1978. Microviscosity changes during differentiation of neuroblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 509:188.
199. Kawasaki, Y. , Wakayama, N. , Koike, T. , Kawai, M. , and Amano, T. 1978. A change in membrane microviscosity of mouse neuroblastoma cell in association with morphological differentiation. *Biochim. Biophys. Acta.* 509:440.
200. Kano, K. , and Fendler, J. H. 1978. Pyranine as a sensitive pH probe for liposome interiors and surfaces. pH gradients across phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* 509: 289 .
201. Le Pecq, J. B. 1973. Ethidium bromide : a fluorescent probe of nucleic acid structure and its potential for in-vivo studies . En: *Fluorescence techniques in cell biology* (A. A. Thayer and M. Sernetz, Eds. ) p. 301. Springer-Verlag. New York, Heidelberg, Berlin.
202. Mahler, H. R. 1976. Mitochondrial assembly: attempts at resolution of complex functions. En: *Mitochondria Bioenergetics, Biogenesis, and membrane structure.* (L. Packer, and Gómez Puyou, A. Eds. ) p. 213 . Academic Press. New York .
203. Higuti, T. , Arakaki, N. , and Hattori, A . 1979. Localized energization of the mitochondrial inner membrane by ATP. *Biochim. Biophys. Acta.* 548: 166 .
204. Habercom, M. S. , and Cheung, H. C. 1978. Ligand binding to sarcoplasmic reticulum. The effects of  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  and ATP binding on the fluorescence of membrane-bound pyrene. *Arch. Biochem. Biophys.* 191:756 .
205. Papahadjopoulos, D. , Vail, W. J. , Paugborn, W. A. , and Poste, G. 1976. Studies on membrane fusion. II. Induction of fusion in pure phospholipid membranes by calcium ions and other divalent metals. *Biochim. Biophys. Acta* 448:265
206. Hauser, H. , Hinckley, C. C. , Krebs, J. , Levine, B. A. , Phillips, M. C. , and Williams, R. J. P. 1977. The interaction of ions with phosphatidylcholine bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.* 468:364 .
207. Gitler, C. , and Montal, M. 1972. Formation of decane - soluble proteolipids: Influence of monovalent and divalent cations. *FEBS Lett.* 28:329

208. Graham, J. M. , and Wallach, D. F. H. 1969, Energy-dependent protein conformational transitions in mitochondrial membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 193:225
209. Estrada-O. S. , Comunicación personal
210. Peña, A. , Chávez, E. , Cárabez, A. , and Tuena de Gómez Puyou, M. 1977. The metabolic effects and uptake of ethidium bromide by rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 180:522
211. Crosby, B. , Boutry, M. , and Goffeau, A. 1979. Inhibition of soluble yeast mitochondrial ATPase by ethidium bromide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88:448
212. Bertina, R. M. , Schrier, P. I. , and Slater, E. C. 1973. The binding of aurovertin to mitochondria and its effects on mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta* 305:503.

El Jurado designado por el Departamento de Ciencias de la Salud de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa, aprobó esta Tesis el día 3 de agosto de 1981.



Dr. Sergio Estrada Orihuela



Dr. Fernando Antón Tay



Dr. Antonio Peña Díaz