

La Serie Universitaria de la Fundación Juan March presenta resúmenes, realizados por el propio autor, de algunos estudios e investigaciones llevados a cabo por los becarios de la Fundación y aprobados por los Asesores Secretarios de los distintos Departamentos.

El texto íntegro de las Memorias correspondientes se encuentra en la Biblioteca de la Fundación (Castello, 77. Madrid-6).

La lista completa de los trabajos aprobados se presenta, en forma de fichas, en los Cuadernos Bibliográficos que publica la Fundación Juan March.

Estos trabajos abarcan las siguientes especialidades: Arquitectura y Urbanismo; Artes Plásticas; Biología; Ciencias Agrarias; Ciencias Sociales; Comunicación Social; Derecho; Economía; Filosofía; Física; Geología; Historia; Ingeniería; Literatura y Filología; Matemáticas; Medicina, Farmacia y Veterinaria; Música; Química; Teología. A ellas corresponden los colores de la cubierta.

Edición no venal de 300 ejemplares, que se reparte gratuitamente a investigadores, Bibliotecas y Centros especializados de toda España.

Este trabajo fue realizado con una Beca en el Extranjero, 1974. Departamento de Medicina, Farmacia y Veterinaria.

Fundación Juan March



FJM-Uni 47-Gar
El uso del ácido salicílico para
García-Sancho Martín, Francisco
1031755



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

El uso del ácido salicílico para la medida del pH intracelular en las células de Ehrlich y en escherichia coli

Fco. Javier García-Sancho Martín

47

FJM

Uni-47

Gar

Uso del ácido salicílico para la medida del pH intracelular/Francisco Javier García-Sancho Martín

Fundación Juan March
Serie Universitaria



47

El uso del ácido
salicílico para la medida
del pH intracelular
en las células
de Ehrlich y en
escherichia coli

Fco. Javier García-Sancho Martín



Fundación Juan March
Castelló, 77. Teléf. 225 44 55
Madrid - 6

Fundación Juan March (Madrid)

La Fundación Juan March no se solidariza necesariamente con las opiniones de los autores cuyas obras publica.

Depósito Legal: M - 43304 - 1977
I.S.B.N. 84 - 7075 - 075 - 5
Ibérica, Tarragona, 34.- Madrid-7

I N D I C E

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
METODOS	5
RESULTADOS Y DISCUSION	10
BIBLIOGRAFIA	35

RESUMEN

Se ha usado la relación de distribución que alcanza el ácido salicílico entre las fases intra y extracelular para estimar el pH en las células de Ehrlich y en E. coli. La validez del método se estableció por: i) Comparación de los resultados obtenidos con ácido salicílico con los obtenidos con 5,5-dimetil-2,4-dioxazolidinadiona (DMO); ii) siguiendo los cambios del pH intracelular aparente en circunstancias en las que tales cambios podían predecirse, por ejemplo, al añadir ácidos débiles o conductores de protones al medio; iii) por comparación de los cambios del pH intracelular aparente con la captación de H^+ por las células, estimando esta última de los cambios de pH del medio.

Los resultados óptimos con este indicador se obtienen cuando el pH extracelular está por debajo de 6, ya que en estos casos el indicador se encuentra en su forma penetrante (no disociada) en la proporción suficiente para

alcanzar un equilibrio con la fase intracelular en menos de 30 segundos, permitiendo por tanto seguir cambios del pH intracelular que sucedan en estos periodos tan breves de incubación.

Las células de Ehrlich y las de E. coli se comportaron de un modo similar en muchas de las condiciones experimentales probadas, pero se encontraron diferencias entre ambos tipos de células en la permeabilidad intrínseca de la membrana para los hidrogeniones y en los cambios de este parámetro ocasionados por la disminución de la temperatura a 2°C. Las implicaciones de estas diferencias en la función de la membrana en ambos tipos de célula se analizan y discuten.

INTRODUCCION

La estimación del pH intracelular a partir de la distribución entre los medios intra y extracelular de ácidos o bases débiles fué introducida por Wadell y Butler en 1962 (1), usando el ácido débil 5,5-dimetil-2,4-dioxazolidinadiona (DMO). Si la membrana celular es permeable a la forma no disociada de un ácido débil, pero impermeable a la forma cargada, la relación de distribución alcanzada en el "steady-state" guardará con los valores de pH intra y extracelular la siguiente relación:

$$I/E = \frac{10^{(pH_i - pK')} + 1}{10^{(pH_e - pK')} + 1}$$

en la que I/E representa el cociente de concentraciones alcanzadas por el ácido en cuestión entre el agua intra y extracelular, y pH_i y pH_e representan los valores de pH intra y extracelular, respectivamente. Wadell y Bates han publicado una revisión detallada de la teoría y las limitaciones de este tipo de métodos (2).

Otras sustancias, aparte del DMO, podrían servir para medir el pH intracelular si cumplieren los mismos criterios. Conway y Dowley obtuvieron resultados satisfactorios con ácido acético (3) y se ha visto que una serie de sustancias disociables se distribuyen a través de la membrana celular siguiendo un gradiente de pH (4, 5). Para la medida de pH_i de compartimentos más ácidos que el medio de incubación una base daría mejores resultados que un ácido, ya que su relación de distribución sería mayor. La metilamina se ha usado para medir pH_i en cloroplastos (6) y vesículas cromafines aisladas (7). Nicotina y morfolina se han usado también (8).

Cuando el pH intracelular es mayor que el extracelular, un indicador ácido daría relaciones de distribución mayores que uno básico. En el curso de experimentos sobre el efecto del transporte de aminoácidos ácidos sobre el pH intracelular (9) necesitábamos medir valores de pH intracelular inferiores a 6 con pH extrace-

lular aún más ácido. La distribución de DMO tiende asintóticamente a 1 cuando el valor del pH intracelular que se pretende medir es menor que el pK' del indicador (6.15), y el método pierde toda su precisión. De una serie de ácidos débiles probados en experimentos preliminares encontramos que el ácido salicílico ($pK' = 3.0$) era el que daba mejores resultados.

En el presente trabajo describimos cómo el ácido salicílico puede usarse para medir el pH intracelular en las células de Ehrlich y en células de Escherichia coli. La rapidísima equilibración del indicador entre las fases intra y extracelular lo hace especialmente útil para seguir movimientos rápidos de H^+ a través de la membrana plasmática.

METODOS

El ácido salicílico se determinó a partir de su fluorescencia espontánea en Tris-ClH, 0.5 M, pH 8.4 (excitación 305 nm; fluorescencia 420 nm), o bien por contaje de centelleo líquido (10) usándose en estos casos ácido salicílico- ^{14}C . El agua total se determinó por desecación hasta pe-

so constante, y el espacio extracelular como espacio de sacarosa, determinándose esta última por un método espectrofotométrico (11).

La captación de H^+ en células de Ehrlich o bacterias se estimó a partir de los cambios del pH del medio de incubación, empleándose para estos experimentos medio con capacidad buffer muy reducida.

El manejo de las células de Ehrlich se llevó a cabo como se ha descrito con anterioridad (12). Brevemente, las células se lavaron 4-6 veces con 5 volúmenes de $ClNa$ 0.15 M, y se resuspendieron, finalmente, en el mismo medio a una concentración del 50% (peso de células/volumen de medio). Las incubaciones se iniciaron por la adición de 0.3 ml. de esta suspensión celular al 50% a matraces que contenían 3 ml. de medio de incubación a $37^{\circ}C$ y cantidades "tracer" de $DMO-^{14}C$, ácido salicílico- ^{14}C , o ácido salicílico frío $30 \mu M$, tal como se especifica en cada experimento.

El medio de incubación fué de composición similar al Krebs-Ringer-fosfato, excepto que contenía solamente 0.5 mM de Cl_2Ca ; en los experimentos realizados a pH menor de 6 se usó ϵ -aminocaproato ($\text{pK}' = 4.5$) en lugar de fosfato como buffer. Todos los experimentos con células de Ehrlich se realizaron a 37°C , excepto cuando se indique lo contrario.

El periodo de incubación se terminó por centrifugación a 2500 rpm. durante 2 minutos, y el sedimento celular se extrajo con ácido perclórico 0.6 N. En los experimentos de corta duración se usó un "método de terminación" especial, consistente en la adición de medio frío ($0-4^\circ\text{C}$) al medio de incubación precediendo a la etapa de centrifugación. Este método se ha utilizado ampliamente en estudios de transporte (13)

En los experimentos con bacterias se utilizó una cepa de E. coli K12 CS7 defectiva para metionina. Las bacterias se cultivaron en medio mínimo C (14) complementado con 0.25 mg/ml de metionina. En la fase exponencial, las bacterias se aislaron por centrifugación a 20000 g,

se lavaron y se resuspendieron en una solución conteniendo ClK 45 mM y buffer de fosfato potásico 10 mM, pH 7.3, a una concentración de 10 mg. (peso húmedo)/ml. La concentración de bacterias en la suspensión se estandarizó también con respecto al contenido de proteínas (15) y la absorbancia a 420 nm. La relación de los diferentes parámetros fue: 1 mg. de agua intracelular = 2.82 mg. de peso húmedo = 0.52 mg. de peso seco = 0.44 mg. de proteína = 3.22 unidades de absorbancia a 420 nm.

Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente y pH 4.33 si no se especifica lo contrario. Se iniciaron por la adición de 1 ml. de medio (ClK 45 mM, ϵ -aminocaproato 20 mM) a 0.2 ml. de una suspensión de bacterias (10 mg/ml), y se terminaron por filtración sobre un filtro millipore de 0.45 micras de diámetro de poro. En las incubaciones con bacterias se usó siempre ácido salicílico- ^{14}C y se corrigió para la cantidad de medio extracelular retenida en los filtros por el contaje simultáneo de ^3H , añadiéndose sucrosa tritiada al medio de incu-

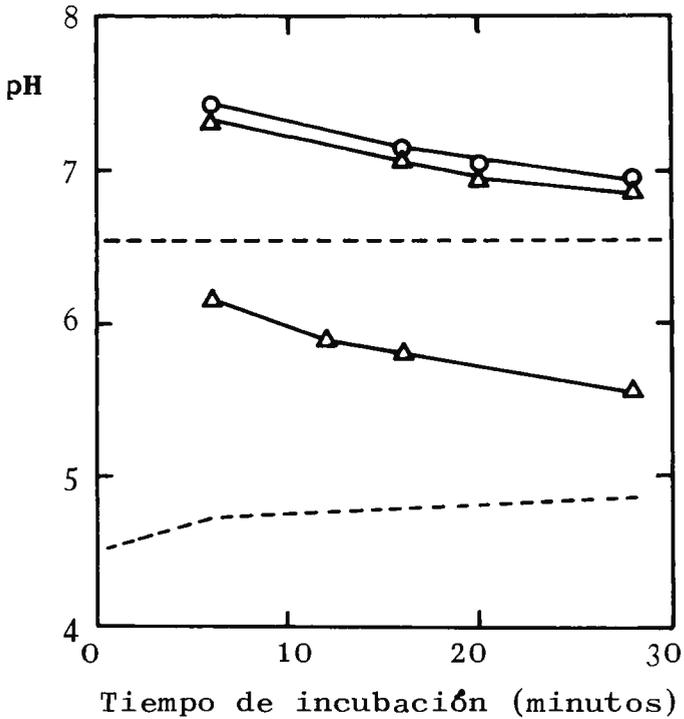


Fig. 1.- Curso temporal de los cambios de pH intracelular en células de Ehrlich incubadas a pH 6.55 (parte superior) o 4.55 (parte inferior). El pH intracelular se calculó a partir de la distribución de ácido salicílico (triángulos) o DMO (círculos). Las líneas a trazos representan el pH del medio.

bación.

RESULTADOS Y DISCUSION

Comparación de los resultados obtenidos con DMO y con ácido salicílico.- La Fig.1 muestra el curso temporal de los cambios del pH intracelular en células de Ehrlich incubadas a pH 6.55 con cantidades "tracer" de DMO y ácido salicílico 30 μ M. Los valores obtenidos con ambos indicadores fueron similares (\pm 0.06 unidades de pH) y el curso temporal completamente superponible. La curva inferior muestra el curso temporal de los valores de pH intracelular aparente obtenidos en células de Ehrlich incubadas a pH 4.5, usando el ácido salicílico solamente, ya que el DMO no daba resultados satisfactorios en estos rangos de pH.

Tiempo necesario para la equilibración del ácido salicílico.- El tiempo necesario para la equilibración del indicador se estudió añadiendo el ácido salicílico después de diferentes periodos de incubación y permitiendo una duración

total de la incubación exactamente igual en todos los casos. En estas circunstancias, una equilibración incompleta del ácido salicílico se reflejaría como una relación de distribución menor. A un pH extracelular de 6.55 la equilibración del ácido salicílico fue completa en los primeros 5 minutos de incubación, el intervalo más corto probado. A pH 4.7 la equilibración fue prácticamente instantánea, siendo suficiente el tiempo empleado en la manipulación de los tubos y la centrifugación al final de la incubación para que se completara la equilibración del indicador.

Desarrollo de un método de terminación para la observación de cambios rápidos del pH intracelular.- Los resultados expuestos en el apartado anterior sugieren que la equilibración del ácido salicílico es lo suficientemente rápida como para permitir el empleo de este indicador para la medida de cambios rápidos del pH intracelular, por ejemplo los asociados con el transporte de ciertas substancias. Para la termina-

ción precisa del periodo de incubación en las células de Ehrlich, que no han tolerado hasta ahora la separación del medio por filtración, lo que suele hacerse es diluir el medio de incubación con 3-4 volúmenes de medio frío ($0-4^{\circ}\text{C}$) antes de la centrifugación. Esta maniobra detiene el movimiento de muchas sustancias (por ejemplo, sodio, potasio, aminoácidos, azúcares) a través de la membrana celular (13).

Cuando realizamos esta maniobra de dilución con medio frío en células incubadas con ácido salicílico nos encontramos con una salida neta del indicador al medio extracelular diluido, como cabría esperar si el movimiento del indicador sucediera por un proceso de difusión simple, poco sensible, por tanto, a la temperatura. Estos movimientos se estudiaron exhaustivamente, usando diferentes concentraciones de ácido salicílico en el medio de incubación, en el diluyente frío o en ambos. Los resultados de estos experimentos indicaron que se alcanzaba un nuevo equilibrio con el medio diluido frío en pocos segundos a pH 4.7, teniendo este equi-

librio las mismas características que el que se alcanzaba a 37°C., es decir que el gradiente de concentración de ácido salicílico que se encontraba a través de la membrana celular en estas condiciones estaba en relación con el gradiente de pH existente entre el medio extracelular y el intracelular de acuerdo con la ecuación que se mencionó en la introducción. Por ejemplo, en dos series paralelas de 5 experimentos cada una las células se incubaron durante 6 minutos a pH 4.7 terminándose la incubación por dilución con medio frío. En la primera serie el medio de incubación, pero no el diluyente frío, contenía ácido salicílico; en la segunda serie se puso el ácido salicílico solamente en el diluyente frío, pero no en el medio de incubación. Los valores calculados para el pH intracelular fueron (media \pm desviación standard) 6.14 ± 0.03 y 6.16 ± 0.04 , respectivamente, sugiriendo que la migración del indicador en el intervalo comprendido entre la dilución con el medio frío y la centrifugación es lo suficientemente rápida para no limitar la relación de distribución que se alcanza en respuesta al gradiente de pH.

TABLA I

Efectos del pH de la suspensión celular fría en las estimaciones del pH intracelular en las células de Ehrlich.

<u>pH de la suspensión fría</u>	<u>Distribución del ácido salicílico</u>	<u>pH intracelular estimado</u>
4.56	316	6.66
4.52	391	6.70
4.18	841	6.70
3.82	1417	6.63
3.89 ^(a)	337	6.18

Las células se incubaron durante 2 minutos en medio a pH 4.5. El diluyente frío contenía buffer a distintos valores de pH, de modo que el pH de la suspensión celular fría tuvo el valor indicado en la primera columna.

(a) En este experimento la suspensión celular fría contenía acetato sódico 0.5 mM.

Sin embargo, a un pH extracelular mayor de 6 la permeabilidad de la membrana al indicador no era suficientemente alta como para que el equilibrio se completase antes de la centrifugación, de modo que, en esas circunstancias, era necesario escoger condiciones especiales para que el movimiento neto del indicador después de la dilución con el medio frío fuera mínimo (por ejemplo, añadir ácido salicílico también al diluyente frío) para obtener un equilibrio aparentemente completo del indicador.

La dilución con medio frío detenía, sin embargo, el movimiento de H^+ , como muestra el hecho de que el pH intracelular aparente no se modificaba con el pH de la suspensión celular fría (Tabla I).

Efectos del 2,4-dinitrofenol sobre el curso temporal de los cambios del pH intracelular de células de Ehrlich incubadas a pH 4.5.— La Fig. 2 muestra que el pH intracelular cayó abruptamente durante los primeros 15 segundos de incubación, usando el método de terminación por dilución fría descrito en el apartado anterior

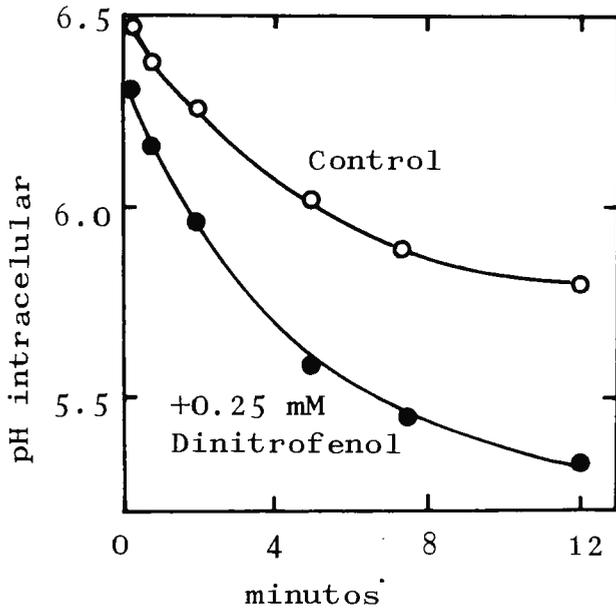


Fig 2.- Efectos del 2,4-dinitrofenol sobre el curso temporal de la caída del pH intracelular en células de Ehrlich incubadas a pH 4.5.

para limitar estos intervalos tan cortos de incubación. La caída fué mucho más gradual en tiempos posteriores. El dinitrofenol aceleró intensamente la caída del pH intracelular, como podria esperarse de su conocido efecto como conductor de protones (16, 17). Los perfiles de captación de H^+ , estimados a partir de los cambios de pH del medio, fueron congruentes con los cambios del pH intracelular.

Correlación entre la captación de H^+ y los cambios del pH intracelular en las células de Ehrlich.— La Fig. 3 muestra que la correlación entre estos dos parámetros fué buena. En presencia de dinitrofenol la pendiente de la línea que define dicha relación no cambia, pero la capacidad de una cantidad determinada de H^+ para disminuir el pH intracelular aumenta. Los datos publicados por Poole y col. (18), que muestran que el dinitrofenol disminuye el pH intracelular en células incubadas a pH 7.4, donde la captación neta de H^+ desde el medio no puede ser grande, son congruentes con los

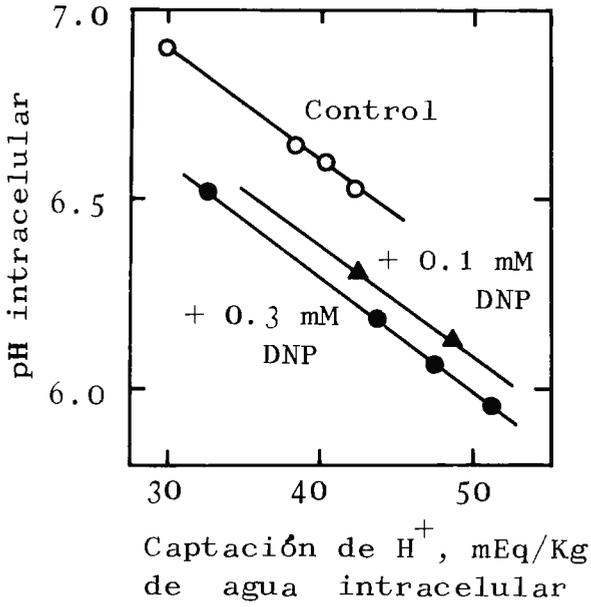


Fig 3.- Correlación entre el pH intracelular aparente y la captación de H⁺ por las células de Ehrlich. DNP: 2,4-dinitrofenol

nuestros. Todos estos resultados sugieren que el dinitrofenol, aparte de aumentar la permeabilidad de la membrana para H^+ , tiene otro efecto, probablemente sobre el metabolismo aumentando la velocidad de producción de metabolitos ácidos, que tiende también a acidificar el medio intracelular.

Efecto de algunos ácidos débiles sobre la respuesta del pH intracelular a cambios del pH extracelular.— La adición al medio de incubación de las sales sódicas de los ácidos cacodílico, acético o fluoracético aceleró la caída del pH intracelular observada tras la incubación a pH 4.5 (Tabla II). Estos ácidos fueron tanto más efectivos cuanto menor era el valor de su pK' , como esperaríamos si estas sustancias actuasen atravesando la membrana en su forma no disociada y liberando un protón en el medio intracelular, siguiendo su distribución los mismos principios que el ácido salicílico. De acuerdo con este mecanismo su efecto no se modificaría notablemente por la temperatura, y, en efecto, la Tabla II muestra que el efecto de

TABLA II

Efectos de la adición de algunos ácidos débiles al medio de incubación o al diluyente frío sobre el pH intracelular en células de Ehrlich.

<u>Compuesto añadido</u>	<u>pK'</u>	<u>pH intracelular</u>	
		<u>A</u>	<u>B</u>
Ninguno	----	6.48	6.51
Cacodilato	6.2	6.46	6.46
Acetato	4.8	6.20	6.18
Fluoracetato	2.7	6.16	-----
2,4-Dinitrofenol	4.0	5.18	5.68

Las células se incubaron durante 2 minutos en medio a pH 4.6, llevándose a cabo la terminación por dilución con medio frío. Los compuestos indicados en la primera columna se añadieron al medio a una concentración de 1.7 mM (valores de pH ilustrados en la columna A) o al diluyente frío a una concentración de 0.5 mM (valores ilustrados en la columna B). Notesé que la concentración final de estos compuestos en la suspensión celular fría es la misma en ambos casos: 0.4 mM.

estas substancias fué exactamente igual si se añadian al medio después de su dilución con medio frío (Compárense las columnas A y B en la Tabla II). El dinitrofenol tuvo un efecto mucho mayor que cualquiera de los anteriores en relación con su pK' , como sería de esperar del mecanismo catalítico atribuido a este compuesto. Su efecto difirió también por ser sensible a la temperatura (Tabla II).

Efectos de la incubación a pH ácido sobre el pH intracelular de E. coli.- La Fig. 4 muestra los valores de pH intracelular, estimados de la distribución de ácido salicílico, en células de E. coli incubadas a pH 4.33 en diferentes circunstancias. La estabilidad temporal del pH intracelular sugiere que la permeabilidad de la membrana bacteriana a H^+ es mucho menor que la de las células de Ehrlich. La adición de glucosa al medio de incubación produjo una pequeña disminución del pH intracelular, que podría ser debida a la producción de metabolitos ácidos durante la glicolisis (19). La adición de acetato o dinitrofenolato produjo

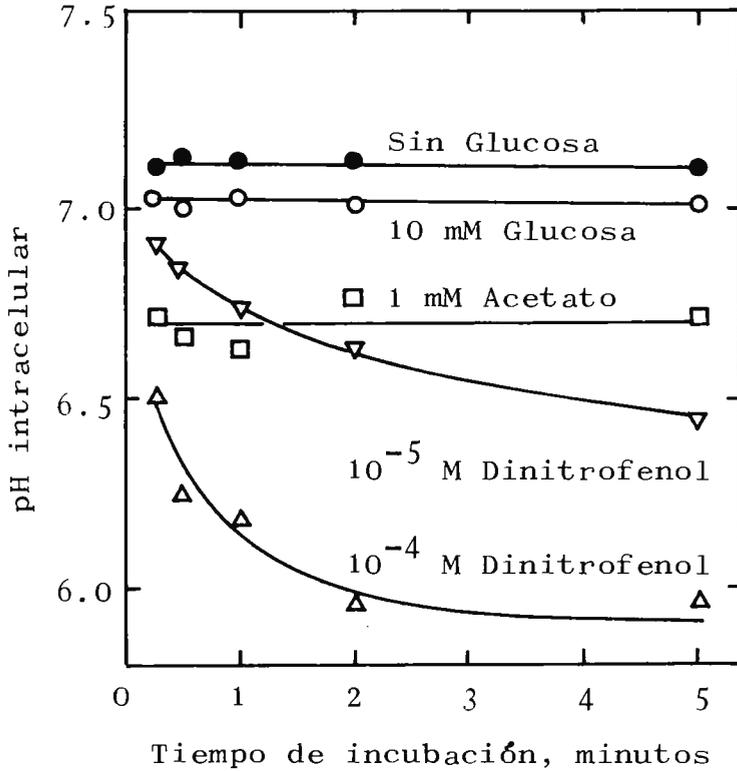


Fig 4.- Curso temporal de los cambios del pH intracelular en células de E. coli incubadas a pH 4.33. El medio contenía glucosa 10 mM, excepto para la primera línea de la parte superior.

también una disminución del pH intracelular, pero, mientras que con el acetato la caída del pH intracelular parecía ser instantánea, con el dinitrofenol esta caída presenta un curso temporal definido.

Permeabilidad de la membrana a H^+ en *E. coli* y en las células de Ehrlich.— Con ambos tipos de células se midió la permeabilidad de la membrana a H^+ a $25^{\circ}C$ y valores de pH extracelular comprendidos entre 4.3 y 4.6 a partir de los cambios del pH del medio, detectados y registrados con el equipo adecuado. En el caso de *E. coli* los valores obtenidos oscilaron entre 0.05 y 0.20 mEq de H^+ /Kg de agua intracelular por minuto. En el caso de las células de Ehrlich los valores obtenidos en las mismas circunstancias fueron mucho mayores: 4 a 6 mEq de H^+ /Kg de agua intracelular por minuto. La adición de dinitrofenol aumentó tremendamente la permeabilidad en ambos casos.

Efectos de algunos ácidos débiles sobre el

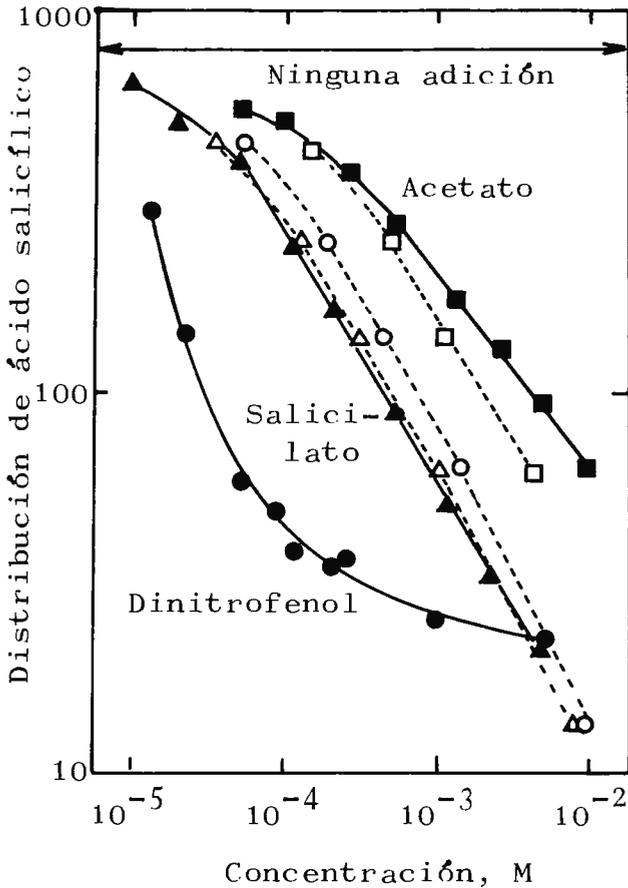


Fig 5.- Efectos de diferentes concentraciones de acetato, salicilato y dinitrofenolato sobre la distribución alcanzada por el ácido salicílico en células de *E. coli* incubadas a pH 4.33 durante 1 minuto. Leyenda en la página siguiente.

Leyenda a la Fig 5.

Los símbolos llenos y las líneas continuas representan datos experimentales. Los símbolos huecos y las líneas a trazos son valores teóricos que corresponden al modelo mencionado en el texto. Estos valores se calcularon usando las siguientes ecuaciones:

\log (relación de distribución del ac. salicílico)=

$$\log \left(\frac{10^{(\text{pH}_i - 3)} + 1}{10^{(\text{pH}_e - 3)} + 1} \right)$$

$$\log (E) = \log (10^{(\text{pH}_e - \text{pK}') + 1}) +$$

$$\log \left[\frac{\text{pH}_o - \text{pH}_i}{B} \right] - \log (10^{(\text{pH}_i - \text{pK}') + 1})$$

En estas ecuaciones, pH_i y pH_e representan los valores de pH intra y extracelular al final de la incubación, pH_o el pH intracelular inicial (se usó un valor de 7.3), B la capacidad buffer del citoplasma bacteriano (se calculó un valor de 19 de los datos de la Fig. 7), y (E) la concentración extracelular de la sustancia probada. En los cálculos se usaron los valores de pK' que se dan en la Tabla II.

pH intracelular de células de E. coli incubadas a pH 4.3..- La Fig 5 muestra los efectos de diferentes concentraciones de acetato, salicilato o dinitrofenolato sobre la relación de distribución alcanzada por el ácido salicílico en 1 minuto de incubación. Los símbolos y las líneas llenas representan los datos experimentales. Las líneas punteadas y los símbolos vacíos representan el efecto que podría predecirse para cada compuesto si actuase únicamente atravesando pasivamente la membrana en su forma no disociada y liberase un protón en el agua intracelular. Este modelo se ajusta razonablemente bien al caso del acetato y el salicilato. La forma curvada de la relación obtenida en el caso del dinitrofenol y su desplazamiento hacia la izquierda con relación al modelo (la línea de puntos) indican que el mecanismo de acción es más complejo para este compuesto. Un efecto catalítico aumentando la permeabilidad de la membrana a H^+ y un aumento de la velocidad de producción de metabolitos ácidos podrían contribuir a explicar las características de la relación obtenida con el dinitro-

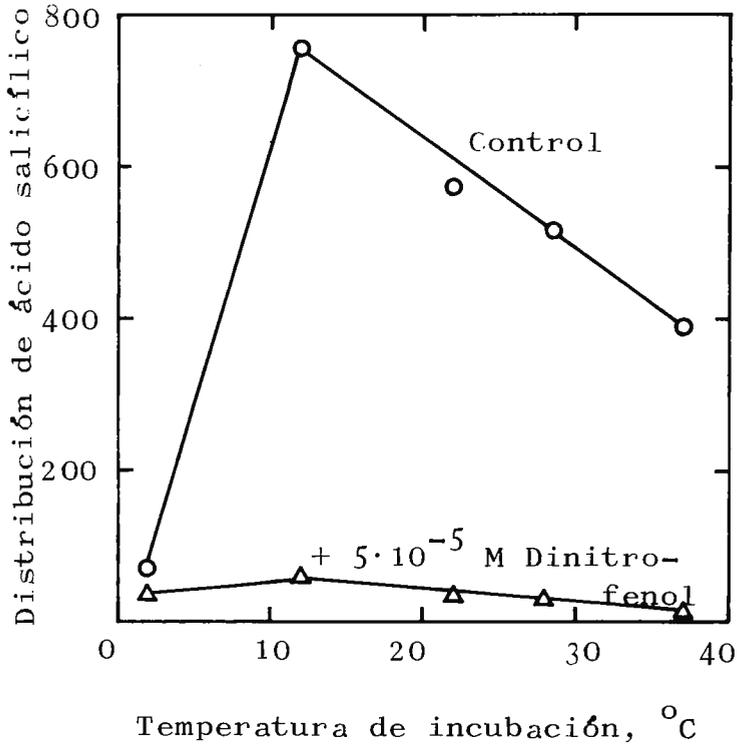


Fig 6.- Efectos de la temperatura de incubación sobre la relación de distribución alcanzada por el ácido salicílico en células de E. coli incubadas a pH 4.33.

fenol.

Efectos de la temperatura sobre la relación de distribución alcanzada por el ácido salicílico en células de E. coli.- La temperatura de incubación modificó la relación de distribución alcanzada por el ácido salicílico en E. coli (Fig. 6). El descenso de temperatura de 37 a 12°C aumentó la relación de distribución alcanzada por el ácido salicílico. Con las células de Ehrlich obtuvimos un cambio similar, aunque no tan marcado. Estos cambios podrían estar en relación con modificaciones temperatura-dependientes de los coeficientes de actividad (8) cambios de la permeabilidad de la membrana a H^+ y cambios en la velocidad de producción de metabolitos ácidos.

Por debajo de 12°C la relación de distribución de ácido salicílico alcanzada en E. coli cayó tremendamente (Fig. 6); el efecto era muy rápido, completándose en menos de 15 segundos. Estudios de la permeabilidad de la membrana a H^+ demostraron un tremendo incremento en estas

TABLA III

Efectos de la incubación a 2°C a diferentes valores de pH sobre la relación de distribución alcanzada por el ácido salicílico en E. coli

<u>Incubación a 2°C</u>	<u>Incubación a 25°C</u>	<u>Distribución final del ácido salicílico</u>	<u>pH intracelular</u>
Ninguna	8 min. a pH 4.33	798	7.23
5 min. a pH 4.33	Ninguna	112	6.38
5 min. a pH 4.33	8 min. a pH 4.33	280	6.78
5 min. a pH 4.33 + 5 min. a pH 7.1	8 min. a pH 4.33	478	7.01

Los cambios rápidos del pH del medio se consiguieron añadiendo soluciones concentradas de buffer de fosfato o de ϵ -aminocaproato a diferentes pH. Cada dato es el valor medio de 2 experimentos

circunstancias. El fenómeno era reversible, ya que si se permitía el calentamiento de la suspensión de bacterias a 25°C la distribución de ácido salicílico aumentaba hasta alcanzar valores próximos a los obtenidos antes del enfriamiento (Tabla III). Este hecho demuestra la participación de un mecanismo de extrusión activa de H^+ durante el periodo de incubación a 25°C. Por otra parte, la mayor parte del H^+ captado durante la incubación a 2°C y pH 4.33 se pierde en una incubación subsecuente a la misma temperatura y pH 7.1 (Compárense las dos últimas líneas en la Tabla III), sugiriendo que la permeabilidad de la membrana bacteriana para H^+ aumenta a 2°C hasta el punto de permitir un equilibrio casi completo de las concentraciones de H^+ entre las fases intra y extracelular. El aumento brusco de la permeabilidad de la membrana por debajo de 12°C es consistente con la observación de Piperno y Oxender (20) de que la mayor parte de los aminoácidos acumulados por E. coli se pierden en pocos segundos al lavar con medio frío "sugiriendo un aparente punto

de transición a esta temperatura que podría estar asociado a un cambio morfológico de la membrana plasmática". Este tipo de efecto, con un aumento generalizado y reversible de la permeabilidad de la membrana a estas temperaturas, podría explicar ambos resultados: la pérdida de aminoácidos y la captación de protones descrita. En relación con estos hechos, es notable que Reijngoud y Tager (21) han observado recientemente que la membrana lisosomal se vuelve completamente permeable a H^+ y otros cationes monovalentes al disminuir la temperatura desde 25 a $0^{\circ}C$. Nótese la diferencia entre el efecto de la temperatura entre E. coli y las células de Ehrlich; en estas últimas la disminución de la temperatura a $2^{\circ}C$ disminuye drásticamente la permeabilidad de la membrana para H^+ (Tabla I). Se ha observado también que una disminución de la temperatura disminuye drásticamente la operación de los sistemas de transporte activo en las células de Ehrlich, pero a la vez evita cualquier pérdida de substrato previamente acumulado (13), al contrario de lo que sucede en E. coli.

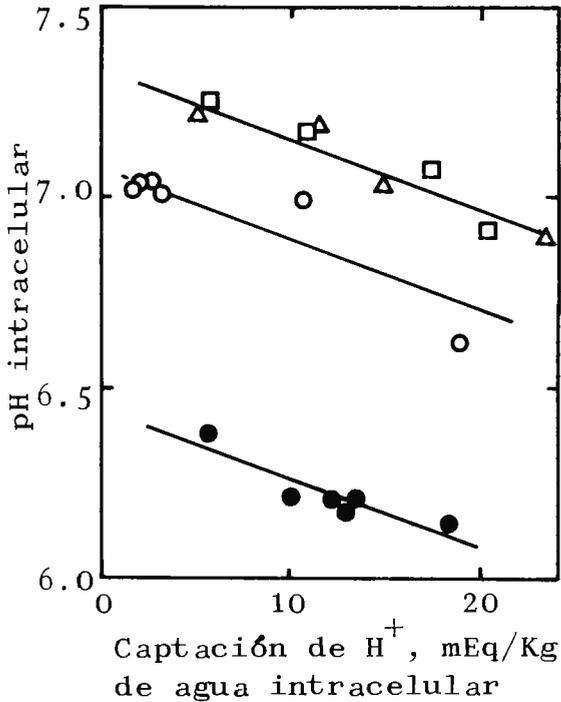


Fig 7.- Correlación entre el pH intracelular aparente y la captación de H^+ en células de E. coli. El medio contenía diferentes concentraciones de acetato (triángulos), salicilato (cuadros), 0.01 mM dinitrofenol (círculos huecos) o 0.1 mM dinitrofenol (círculos rellenos). El periodo de incubación varió entre 15 segundos y 5 minutos.

Relación entre la captación de H^+ y el pH intracelular en E. coli.- La Fig. 7 muestra la correlación entre estos dos parámetros en bacterias incubadas durante diferentes periodos a pH 4.33, añadiendo al medio diferentes concentraciones de acetato, salicilato o dinitrofenolato para aumentar la permeabilidad de la membrana a H^+ . Con los dos primeros, se obtuvo una misma relación captación de H^+ : disminución del pH intracelular. Pero en el caso del dinitrofenol la caída del pH intracelular fué relativamente mayor para una cantidad dada de H^+ captado, un efecto del dinitrofenol que habíamos encontrado también en las células de Ehrlich (Fig 3).

Implicaciones de las diferencias de la permeabilidad de la membrana a H^+ encontradas en células procariotes y eucariotes.- Las diferencias de los gradientes de pH y potencial de membrana encontradas entre diferentes células no han merecido siempre una atención suficiente. La permeabilidad para los hidrogenio-

nes de la membrana plasmática de las células de Ehrlich y otras células eucariotes es suficientemente alta como para impedir el mantenimiento de una fuerza proton-motora notable a través de la membrana celular. Como consecuencia, los gradientes de concentración de otros iones y metabolitos difícilmente podrían ser generados por un simple mecanismo de cotransporte o contratransporte con H^+ de una fase a la otra de la membrana, o por simple electroforesis. Debemos entonces imaginar que los mecanismos que energizan tales sistemas de transporte en las células animales son completamente diferentes a los propuestos en bacterias, mitocondrias y cloroplastos, o bien que el gradiente de hidrogeniones primario, generador de otros gradientes en las células animales, está confinado en regiones ocultas en la membrana, y que fenómenos decisivos de co- y contratransporte con H^+ ocurren en estas zonas escondidas en el espesor de la membrana como se ha sugerido previamente (22, 23).

BIBLIOGRAFIA

1. Waddell, W.J. and Butler, T.C. (1959) J. Clin. Invest., 38, 720-729.
2. Waddell, W.J. and Bates, R.G. (1969) Physiol. Rev., 49, 285-329.
3. Conway, E.J. and Dowley, M. (1950) Biochem. J., 47, 355-360.
4. Schanker, L.S., Nafpliotis, P.A. and Johnson, J.M. (1961) J. Pharmacol. Exptl. Therap., 133, 325-331.
5. Solomon, H.M. and Zieve, P.D. (1967) J. Pharmacol. Exptl. Therap., 155, 112-116.
6. Rottemberg, H., Grunwald, T. and Avron, M. (1972) Eur. J. Biochem., 25, 54-63.
7. Johnson, R.G. and Scarpa, A. (1976) J. Biol. Chem., 251, 2189-2191.
8. Hannan, H.F. and Wiggins, P.M. (1976) Biochim. Biophys. Acta, 428, 205-222.
9. García-Sancho, J., Sánchez, A. and Christensen, H.N. (1977) Biochim. Biophys. Acta, 464, 295-312.
10. Pal, P.R. and Christensen, H.N. (1961) J. Biol. Chem., 236, 894-897

11. Messineo, L. and Musarra, E. (1972) *Int. J. Biochem.*, 3, 691-699.
12. Inui, Y. and Christensen, H.N. (1966) *J. Gen. Physiol.*, 50, 203-224.
13. Christensen, H.N. (1975) "Biological Transport" W.A. Benjamin Inc., Reading, Massachusetts.
14. Davis, B. and Mingioli, E.S. (1950) *J. Bacteriol.*, 60, 17-28.
15. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
16. Mitchell, P. and Moyle, J. (1967) *Biocem. J.*, 104, 588-600.
17. Hopfer, V., Lehninger, A.L. and Thompson, T.E. (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 59, 484-490.
18. Poole, D.T., Butler, T.C. and Williams, M.E., (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, 266, 463-470.
19. Poole, D.T. (1967) *J. Biol. Chem.*, 242, 3731-3736.
20. Piperno, J.R. and Oxender, D.L. (1968) *J. Biol. Chem.*, 243, 5914-5920.

21. Reijngoud, D.-J. and Tager, J.M. (1975)
FEBS let., 54, 76-79.
22. Christensen, H.N., de Céspedes, C.,
Handlogten, M E. and Ronquist, G. (1974)
Ann. New York Acad. Sci., 227, 355-379.
23. Christensen, H.N. and Handlogten, M.E.
(1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 23-27



FUNDACION JUAN MARCH
SERIE UNIVERSITARIA

Títulos Publicados:

- 1.— *Semántica del lenguaje religioso / A. Fierro*
(Teología. España, 1973)
- 2.— *Calculador en una operación de rectificación discontinua/A. Mulet*
(Química. Extranjero, 1974)
- 3.— *Skarns en el batolito de Santa Olalla/F. Velasco*
(Geología. España, 1974)
- 4.— *Combustión de compuestos oxigenados/J.M. Santiuste*
(Química. España, 1974)
- 5.— *Películas ferromagnéticas a baja temperatura/José Luis Vicent López*
(Física. España, 1974)
- 6.— *Flujo inestable de los polímeros fundidos/José Alemán Vega*
(Ingeniería. Extranjero, 1975)
- 7.— *Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental*
José Antonio Salva Lacombe (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1973)
- 8.— *Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos/José Plá Carrera*
(Matemáticas. España, 1974)
- 9.— *El fenómeno de inercia en la renovación de la estructura urbana.*
Francisco Fernández-Longoria Pinazo (Urbanización del Plan Europa 2.000
a través de la Fundación Europea de la Cultura)
- 10.— *El teatro español en Francia (1935–1973) / F. Torres Monreal*
(Literatura y Filología. Extranjero, 1971)
- 11.— *Simulación electrónica del aparato vestibular/J.M. Drake Moyano*
(Métodos Físicos aplicados a la Biología. España, 1974)
- 12.— *Estructura de los libros españoles de caballerías en el siglo XVI.*
Federico Francisco Curto Herrero (Literatura y Filología. España, 1972)
- 13.— *Estudio geomorfológico del Macizo Central de Gredos*
M. Paloma Fernández García (Geología. España, 1975)
- 14.— *La obra gramatical de Abraham Ibn c Ezra/Carlos del Valle Rodriguez*
(Literatura y Filología. Extranjero, 1970)

- 15.— *Evaluación de Proyectos de Inversión en una Empresa de producción y distribución de Energía Eléctrica.*
Felipe Ruíz López (Ingeniería. Extranjero, 1974)
- 16.— *El significado teórico de los términos descriptivos/Carlos Solís Santos*
(Filosofía. España, 1973)
- 17.— *Encaje de los modelos econométricos en el enfoque objetivos-instrumentos relativos de política económica./ Gumersindo Ruíz Bravo*
(Sociología. España, 1971)
- 18.— *La imaginación natural (estudio sobre la literatura fantástica norteamericana).* / *Pedro García Montalvo*
(Literatura y Filología. Extranjero, 1974)
- 19.— *Estudio sobre la hormona Natriurética.* / *Andrés Purroy Unanua*
(Medicina, Farmacia y Veterinaria. Extranjero, 1973)
- 20.— *Análisis farmacológico de las acciones miocárdicas de bloqueantes Beta-Adrenérgicos./ José Salvador Serrano Molina*
(Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1970)
- 21.— *El hombre y el diseño industrial./Miguel Durán-Lóriga*
(Artes Plásticas. España, 1974)
- 22.— *Algunos tópicos sobre teoría de la información./ Antonio Pascual Acosta*
(Matemáticas. España, 1975)
- 23.— *Un modelo simple estático. Aplicación a Santiago de Chile*
Manuel Bastarache Alfaro (Arquitectura y Urbanismo. Extranjero, 1973)
- 24.— *Moderna teoría de control: método adaptativo-predictivo*
Teoría y realizaciones. /Juan Manuel Martín Sánchez
(Ingeniería. España, 1973)
- 25.— *Neurobiología (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
- 26.— *Genética (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
- 27.— *Genética (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
- 28.— *Investigación y desarrollo de un analizador diferencial digital (A.D.D.) para control en tiempo real. /Vicente Zugasti Arbizu*
(Física. España, 1975)
- 29.— *Transferencia de carga en aleaciones binarias./ Julio A. Alonso*
(Física. Extranjero, 1975)
- 30.— *Estabilidad de osciladores no sinusoidales en el rango de microondas.* / *José Luis Sebastian Franco.*
(Física. Extranjero, 1974)

31. – *Estudio de los transistores FET de microondas en puerta común.* Juan Zapata Ferrer. (Ingeniería. Extranjero, 1975).
32. – *Estudio sobre la moral de Epicuro y el Aristóteles esotérico.* / Eduardo Acosta Mendez (Filosofía. España, 1973)
33. – *Las Bauxitas Españolas como mena de aluminio.* / Salvador Ordoñez Delgado (Geología. España, 1975).
34. *Los grupos profesionales en la prestación de trabajo: obrero y empleados.* / Federico Durán López (Derecho. España, 1975)
35. – *Obtención de Series aneuploides (monosómicas y ditelosómicas) en variedades españolas de trigo común.* / Nicolás Jouve de la Barreda. (Ciencias Agrarias. España, 1975).
36. – *Efectos dinámicos aleatorios en túneles y obras subterráneas.* / Enrique Alarcón Alvarez. (Ingeniería. España, 1975).
37. – *Lenguaje en periodismo escrito.* / Fernando Lázaro Carreter, Luis Michelena Elissalt, Robert Escarpit, Eugenio de Bustos, Víctor de la Serna, Emilio Alarcos Llorach y Juan Luis Cebrián. (Seminario organizado por la Fundación Juan March los días 30 y 31 de mayo de 1977).
38. – *Factores que influyen en el espigado de la remolacha azucarera, Beta vulgaris L.* / José Manuel Lasa Dolhagaray y Antonio Silván López. (Ciencias Agrarias. España, 1974).
39. – *Compacidad numerable y pseudocompacidad del producto de dos espacios topológicos. Productos finitos de espacios con topologías proyectivas de funciones reales.* / José Luis Blasco Olcina (Matemáticas. España, 1975).
40. – *Estructuras de la épica latina.* / M^a. del Dulce Nombre Estefanía Alvarez. (Literatura y Filología, España, 1971).
41. – *Comunicación por fibras ópticas.* / Francisco Sandoval Hernandez (Ingeniería. España, 1975).
42. – *Representación tridimensional de texturas en chapas metálicas del sistema cúbico.* / José Antonio Pero-Sanz Elorz (Ingeniería. España, 1974).
43. – *Virus de insectos: Multiplicación, aislamiento y bioensayo de baculovirus.* / Cándido Santiago-Alvarez. (Ciencias Agrarias. Extranjero, 1976).
44. – *Estudio de mutantes de saccharomyces cerevisiae alterados en la biosíntesis de proteínas.* / Lucas Sanchez Rodriguez. (Biología. España, 1976).

45. – *Sistema automático para la exploración del campo visual.*
José Ignacio Acha Catalina (Medicina, Farmacia y Veterinaria.
España, 1975).
46. – *Propiedades físicas de las variedades de tomate para recolección*
mecánica/ Margarita Ruiz Altisent (Ciencias Agrarias.España 1975)

