



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CARACTERIZACION DE MITOCONDRIAS DE  
EUGLENA GRACILIS CRECIDA EN ETANOL COMO  
UNICA FUENTE DE CARBONO



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

MOISES ERASMO JIMENEZ MAYORGA

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



MEXICO, D. F.,

1994



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La presente tesis de Licenciatura se realizó bajo la dirección del Dr.  
Rafael Moreno Sánchez en el Instituto Nacional de Cardiología  
"Dr. Ignacio Chávez"

**Jurado asignado**

**Presidente**  
**Vocal**  
**Secretario**  
**1er. Suplente**  
**2do. Suplente**

Prof. Magdalena Oliva González.  
Prof. Rafael Moreno Sánchez.  
Prof. Homero Hernández Montes.  
Prof. María Elsa Escudero García.  
Prof. Hortensia Eugenia Lemus Díaz.


**Asesor del tema**



---

Dr. Rafael Moreno Sánchez

**Sustentante**



---

Moisés E. Jiménez Mayorga

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Edmundo Chávez Cossio por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por su apoyo en la realización de esta investigación.

Al Dr. Rafael Moreno Sánchez por su apoyo académico así como su participación como asesor de este trabajo.

Al Dr. Humberto Bravo Alvarez y esposa por su amable contribución para la realización de la presente tesis.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Aída, Norma, Cecilia, Julieta, Horacio y Leticia, gracias por su amistad.

A mis hermanos Marcos, Sergio, Adrián, Reyes, Bárbara, Santos y Rodolfo por su comprensión en la realización de mi trabajo.

A mi madre por su ayuda y apoyo así como su guía por el camino correcto y la fortaleza dada para la culminación y continuación de mis estudios y con quién estaré eternamente agradecido.

A <sup>2</sup>Adrián A. mi mejor amigo por estar en los momentos críticos y de alegría, la persona que me apoya ciegamente sin mirar mis defectos; gracias por tu amistad.

A YHWH por ser mi guía y fortaleza en los momentos más difíciles de mi vida y a quien le debo lo que soy y por lo que algún día seré. Gracias por las alegrías y tristezas y por estar a mi lado siempre que lo necesite en las buenas y en las malas.

A Guillermo y Olga por su colaboración para la realización de este trabajo.

6i2 lfp 6b0c 63 fk if7 jbe2k .6mfc 0 .67oc pd 6i29j fk 6yfi 0 j,f9n 5e2 iki269 pd cc2 9k0n 6mfc 0 jñ,f9n

240efd if7

**PARA YHWH, PAM Y ROSA.**

**CARACTERIZACION DE LAS MITOCONDRIAS  
DE Euglena gracilis CRECIDA EN LA  
OBSCURIDAD CON ETANOL COMO UNICA  
FUENTE DE CARBONO**

INDICE	PAGINA
Prologo-----	1
Generalidades-----	3
Estructura mitocondrial-----	9
Ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs-----	10
El transporte electrónico mitocondrial-----	11
Inhibidores del transporte electrónico-----	16
Antecedentes-----	22
Descripción de algunas enzimas presentes en el ciclo de Krebs de <i>Euglena</i> -----	25
Oxidasa terminal-----	29
Oxidación de sustratos en mitocondrias de <i>Euglena</i> -----	34
La cadena respiratoria de mitocondrias de <i>Euglena gracilis</i> -----	37
Objetivos-----	47
Material y métodos-----	48
Cultivos-----	48
Curvas de Crecimiento-----	49
Obtención de células en fase log, log tardía-----	50
Obtención de mitocondrias-----	51
Potencial de membrana-----	54
Oxidación de sustratos e Inhibición-----	55
Actividad citocromo oxidasa-----	55
Espectros diferenciales en presencia de monóxido de carbono-----	55
Transporte de Ca <sup>2+</sup> -----	56
Resultados y discusión-----	57
Curvas de crecimiento-----	57
Potencial de membrana-----	62
Oxidación de etanol y actividad de citocromo oxidasa-----	77
Oxidación de sustratos-----	80
Transporte de Ca <sup>2+</sup> -----	84
Comparación entre las mitocondrias de células crecidas en etanol, glutamato-malato y peptona-----	89
Espectros diferenciales con CO-----	99
Conclusiones-----	104
Perspectivas-----	107
Referencias Bibliográficas y Hemerográficas-----	109

## PROLOGO

Tiempo antes se realizaban estudios respecto al control de la fosforilación oxidativa en los cuales intervenían por algunas proposiciones como que el ADP o el calcio, podrían controlar la fosforilación oxidativa; al respecto investigadores como Chance, Hansford, Pfeiffer y por parte de nuestro laboratorio Moreno-Sánchez quienes han intentado profundizar respecto a estas teorías; las inclinaciones sobre una u otra teoría se dan conforme a los experimentos realizados por estos grupos de investigadores, de tal manera que hasta el momento existen en el laboratorio aportaciones en las cuales el calcio ejerce un efecto bastante importante.

Se aplicaron entonces diversos modelos como hígado, riñón, corazón, páncreas, cerebro, un modelo celular neoplásico co: las células de hepatoma y finalmente *Euglena*, este último modelo presentaba características sobresalientes como: fácil crecimiento, adaptabilidad a diversas fuentes de carbono, crecimiento en diversos rangos de pH, resistencia a contaminantes, requerimientos nutricionales mínimos y de fácil obtención, se puede obtener material biológico en forma rápida; sin embargo, se conoce muy poco respecto al comportamiento de las mitocondrias en presencia de diferentes fuentes de carbono utilizadas para el crecimiento celular, y la posible relación que existe a nivel molecular en relación al encendido o apagado de genes presentes en las células y en las mitocondrias.

El primer paso fue realizar una caracterización de las mitocondrias de células crecidas en diferentes fuentes de carbono; hallazgos importantes se encontraron en los últimos 10 años en los cuales se encontró que es muy poco el conocimiento y aportaciones dadas por otros investigadores que han trabajado con este modelo celular.



Por lo tanto es importante caracterizar primeramente mitocondrias de células crecidas en diferentes fuentes de carbono y posteriormente aplicar los conocimientos dados hasta el momento respecto al transporte de calcio y sus efectos.

Sin embargo, hemos encontrado grandes hallazgos que nos han hecho inclinarnos por una división de investigación propuesta al principio, de tal manera que actualmente trabajamos en la posibilidad de aislar y purificar la lactato deshidrogenasa de mitocondrias; adaptar a las células a concentraciones tóxicas para el hombre de metales pesados y utilizarse como un método de eliminación de los mismos utilizando a *Euglena* como modelo; demostrar las posibles relaciones taxonómicas existentes entre las mitocondrias de *Euglena* y algunos microorganismos, utilizando criterios bioquímicos para resolver estas incógnitas y finalmente aislar y purificar al citocromo *c* de mitocondrias de *Euglena* crecida en etanol como única fuente de carbono.

## GENERALIDADES

La respiración celular se produce en tres fases principales:

En la primera fase, las moléculas orgánicas de alto peso molecular se oxidan hasta rendir fragmentos de carbonos que se incorporan como acetilos formando acetyl-CoA.

En la segunda fase, estos grupos acetyl de la acetyl-CoA se incorporan al ciclo del ácido cítrico donde se deshidrogenan generando coenzimas reducidas.

En la tercer fase, los protones ( $H^+$ ) y electrones se transfieren a moléculas transportadoras, a estas moléculas se les denomina cadena de transporte de electrones o cadena respiratoria, (Lehninger, 1985). Esta se compone de una serie de estructuras moleculares capaces de trasportar electrones con una secuencia tal que permite la liberación de la energía de óxido-reducción en forma de ATP, denominada fosforilación oxidativa, es decir, esta última se define como el proceso por el cual se forma ATP mediante una serie de transportadores de electrones que se transfieren desde el NADH o el  $FADH_2$  hasta el oxígeno, (Medina, 1986). Algunos aspectos sobresalientes de este proceso son:

1) Se lleva a cabo por sistemas respiratorios localizados en la membrana interna mitocondrial, membrana plasmática bacteriana y membrana tilacoidal en cloroplastos. La mayor proporción del NADH y del  $FADH_2$ , provienen tanto de la oxidación de los ácidos grasos como del ciclo del ácido cítrico, procesos que tienen lugar en la matriz mitocondrial adyacente.

2) La oxidación de NADH y  $FADH_2$  conducen a la formación de tres y dos moléculas de ATP respectivamente. La oxidación y la fosforilación son procesos acoplados mediante un gradiente electroquímico conocido también como fuerza protón-motriz, (ver Figura 1).

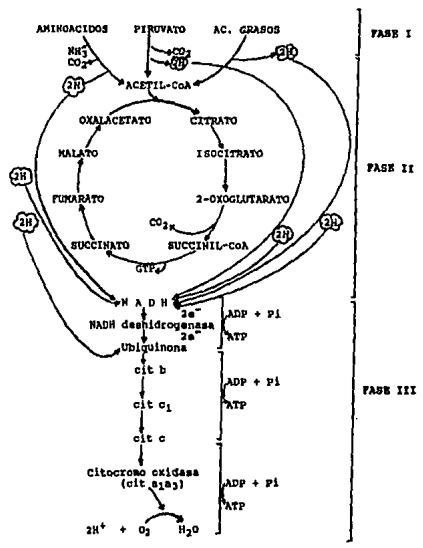


Figura 1. Se muestra el esquema del acoplamiento entre la cadena de transporte de electrones y el ciclo de Krebs, así como los sitios de formación de las moléculas de alta energía (ATP), (Lehninger, 1985).

La fuerza próton-motriz se genera mediante un gradiente de pH y el potencial eléctrico transmembranal:

$$\Delta P = \Delta \Psi - \frac{2.3 RT}{F} \Delta pH ;$$

donde:

$\Delta P$  es la fuerza próton-motriz;  $\Delta \Psi$  el potencial de membrana y  $\Delta pH$  la diferencia entre el pH externo y pH interno; F es la constante de Faraday; R la constante de los gases; T corresponde a la temperatura, (Todeschi, 1980 y Schlodder y cols., 1982).  
 El término  $2.3RT/F$  es igual a 60mV a 30°C y 61mV a 37°C.

La secuencia en la cadena respiratoria debe adaptarse de acuerdo con su potencial de óxido-reducción (redox) estándar, y están acomodados en orden decreciente de electronegatividad. El potencial redox de un par  $X/X^-$ , por ejemplo, es el voltaje observado cuando las concentraciones de  $X$ ,  $X^-$  y  $H^+$ ,  $pH=0$ , son 1M. El potencial redox del par  $H^+/H_2$  es cero voltios (0 V) por definición, (Stryer, 1990).

Un potencial redox negativo significa que una sustancia tiene una afinidad más baja por los electrones que la del  $H_2$ . Un potencial redox positivo significa que la sustancia tiene mayor afinidad por los electrones que el  $H_2$ ; por lo tanto un agente fuertemente reductor como el NADH, tiene un potencial redox negativo, mientras que un agente fuertemente oxidante como el oxígeno tiene un potencial redox positivo, (Stryer, 1990), (ver Tabla I).

Los sitios de fosforilación son aquellos lugares de la cadena respiratoria donde se lleva a cabo la síntesis de ATP acoplada al transporte electrónico, utilizando los siguientes criterios :

I)El cambio de energía libre estándar  $\Delta G^{0'}$  está relacionado con el cambio de potencial redox  $\Delta E'_0$  por:

$$\Delta G^{0'} = -nF\Delta E'_0 ;$$

donde:

$n$  es el número de electrones transferidos.

$F$  es la constante de Faraday y es el cambio de energía correspondiente al paso de un mol de electrones a través de una diferencia de potencial de un voltio (96.39 KJ/electrón-Volt mol o 23.05 Kcal/electrón-Volt mol).  $\Delta E'_0$  expresado en voltios y  $\Delta G^{0'}$  en calorías por mol.

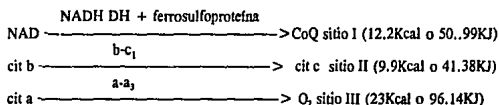
Tabla I. Potenciales Estándar de Oxido-Reducción

Oxidante	Reductor	n	E° <sub>o</sub> (V)
Succinato + CO <sub>2</sub>	2-oxoglutarato	2	-0.670
Acetato	Acetaldehído	2	-0.600
Metil viológeno		1	-0.430
Ferredoxina (ox)	Ferredoxina (red)	1	-0.430
2H <sup>+</sup>	H <sub>2</sub>	2	-0.420
Benzil viológeno		1	-0.311
NAD <sup>+</sup>	NADH + H <sup>+</sup>	2	-0.320
NADP <sup>+</sup>	NADPH + H <sup>+</sup>	2	-0.320
Lipoato (ox)	Lipoato (red)	2	-0.290
Glutatión (ox)	Glutatión (red)	2	-0.230
Acetaldehído	Etanol	2	-0.200
Antraquinona		2	-0.100
Piruvato	Lactato	2	-0.190
Cloruro de trifeniltetrazolium			-0.080
Menaaquinona (ox)	Menaaquinona (red)	1	-0.075
Rubredoxina (ox)	Rubredoxina (red)		-0.057
Citocromo o (ox)	Citocromo o (red)*		-0.018
Duroquinona		2	+0.010
Azul de Metileno	Azul de metileno (red)		+0.011
Fumarato	Succinato	2	+0.030
Citocromo bk	Citocromo bk		+0.030
Glutatión (ox)	Glutatión (red)		+0.040
5-Hidroxi-1,4-Naftoquinona		2	+0.050
Ascorbato	Dehidroascorbato		+0.050
PES (etanosulfato de N-etil fenazonio)		2	+0.055
Citocromo o (ox)	Citocromo o (red)·		+0.060
Citocromo bt	Citocromo bt		+0.060
Citocromo b (3 +)	Citocromo b (+2)	1	+0.070
Fenazinametasulfato			+0.080
Ubiquinona (ox)	Ubiquinona (red)	2	+0.100
Citocromo o (ox)	Citocromo o (red)***		+0.125
2,6-Diclorofenolindofenol			+0.217
DAD (2,3,5,6-tetrametilfenilendiamina)		2	+0.220
Citocromo c <sub>1</sub> (3 +)	Citocromo c <sub>1</sub> (+2)	1	+0.220
CuA			+0.240
Citocromo d (ox)	Citocromo d (red)·		+0.240
Citocromo c (ox)	Citocromo c (red)		+0.250
TMPD <sup>+</sup>	TMPD	1	+0.260
Citocromo o (ox)	Citocromo o (red)**		+0.260
Hidroquinona		2	+0.280
Citocromo a (ox)	Citocromo a (red)		+0.290
CuB			+0.340
Citocromo a <sub>3</sub>	Citocromo a <sub>3</sub>		+0.385
Ferricianuro	Ferrocianuro	1	+0.770
1/2 O <sub>2</sub> + 2H <sup>+</sup>	H <sub>2</sub> O	2	+0.820

E°<sub>o</sub> es el potencial estándar de oxidación-reducción pH 7  
25° C; n: número de electrones transferidos.

- \* Este citocromo b tipo o se detectó en Azotobacter vinelandii;
  - \*\* Este citocromo se detectó en Methylophilus methylotrophus.
  - \*\*\* Citocromo detectado en E. coli, se considera que tiene el mismo potencial redox que el citocromo  $b_{562}$ .
  - Citocromo detectado en E. coli.
  - .. Citocromo detectado en Paracoccus denitrificans.
- Ernster, 1984.; Mahler H., 1966.; Brock T. y cols., 1987.; Anraku Y., 1988.; Nicholls D., 1982.; Stryer L., 1990.; Medina, 1986.; Henry, 1980.; Henry y Wilson, 1981.; Bacarini-Melandri y cols., 1981.; Pudek y Bragg, 1976.; Reid e Ingedew, 1979.; Takaniya y Dutton, 1979.; Koland, Miller y Gennis 1984; Kita, Kiboshi y Anraku, 1986.

De esto se derivan los sitios de fosforilación debido a tres diferencias de potenciales redox, como consecuencia el paso de dos electrones es suficiente para sintetizar una molécula de ATP, (Stryer, 1990). Estos son:



El  $\Delta G^{\circ}$  asociados con la oxidación de NADH hasta el oxígeno corresponden a -219.792 KJ/mol.

**II) Teorema de Acoplamiento:** si la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa están acopladas, ambos fenómenos están conectados de tal manera que pueden funcionar sincrónicamente. De hecho, si a una suspensión de mitocondrias se le suministra sustrato, oxígeno y fosfato, pero no ADP, la respiración, (gasto de oxígeno), es muy baja. Se dice entonces que la mitocondria está en estado 4, es decir, su respiración esta limitada por ADP.

Si se añade ADP, el consumo de oxígeno aumenta considerablemente (estado 3), hasta que todo el ADP es fosforilado. Terminada la fosforilación, la mitocondria recupera lo que se ha denominado estado 4, (Medina, 1986), (ver Figura 2).

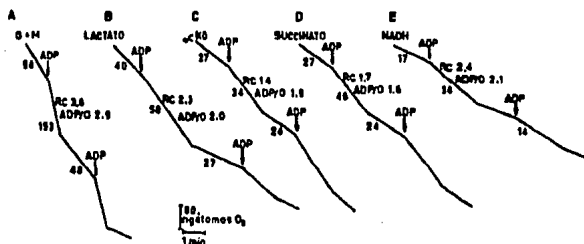


Figura 2. Muestra el ADP/O, Estado 3 y Estado 4 en mitocondrias de células crecidas en glutamato-malato como fuente de carbono. Las mitocondrias fueron incubadas (1mg/ml) en medio KME, donde (A) 720, (B) 450, (C, E) 300 y (D) 250 nmoles de ADP adicionados, (Urbe y Moreno-Sánchez, 1992).

**III) Relación fósforo/oxígeno (P/O):** la relación P/O indica las moléculas de ATP sintetizadas por átomo de oxígeno consumido. Se determina si se añade una concentración conocida de ADP a una suspensión mitocondrial en estado 4, corresponde con el oxígeno necesario para fosforilar todo el ADP añadido, (ver Tabla II).

SUBSTRATO	Consumo de O <sub>2</sub> estado 3 (ngátomos O <sub>2</sub> /mim-1/mg-1)	ADP/O	CR
G + M	150±2 (11)	2.9±0.3	3.6±0.4
α-cetoglutarato	34±2 (4)	1.9±0.4	1.4±0.1
NADH	33±1 (6)	2.3±0.6	2.4±0.1
Succinato	40±2 (6)	1.6±0.2	1.7±0.5
lactato	56±2 (7)	2±0.1	2.3±0.2

Tabla II. Señala el control respiratorio y ADP/O con diversos sustratos en mitocondrias de Euglena gracilis, (Urbe y Moreno-Sánchez, 1992).

En teoría la relación P/O o ADP/O es igual a tres para el caso de los sustratos productores de NADH, a dos para el caso de los sustratos que generan FADH<sub>2</sub> y a uno para el ascorbato.

### ESTRUCTURA MITOCONDRIAL

La mitocondria es el organelo citoplásmico capaz de sintetizar ATP a través de la respiración, el cual es necesario para desarrollar sus funciones vitales. Está constituida por dos membranas denominadas interna y externa, entre ellas se localiza el espacio intermembranal y rodeada por la membrana interna se encuentra la matriz en donde el ciclo de los ácidos tricarboxílicos se lleva a cabo, (ver Figura 3).



Figura 3. Micrografía electrónica de barrido de mitocondrias de *Euglena gracilis* crecida en glutamato-malato + cianuro.



## CICLO DE LOS ACIDOS TRICARBOXILICOS O CICLO DE KREBS.

La fase II del catabolismo o ciclo de los ácidos tricarboxílicos consiste en una serie de reacciones dentro de la mitocondria, cuyo objetivo es proporcionar los intermediarios necesarios ( $H^+$ ) para la obtención de energía proveniente de los nutrientes básicos: carbohidratos, proteínas y lípidos. La mayor parte se transforman en acetil-CoA (fase II), que inicia el ciclo, reaccionando con el oxalacetato y convirtiéndose en citrato. Posteriormente por acción de un sistema de deshidrogenasas específicas se generan cuatro pares de electrones, equivalentes reductores, que reducen tres moléculas de  $NAD^+$  a  $NADH$  y a una de  $FAD^+$  a  $FADH_2$  (fase III), (ver Figura 4).

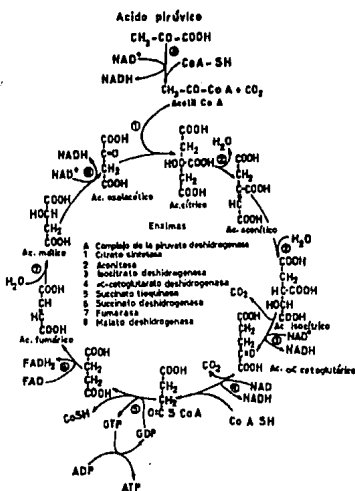


Figura 4. Ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarboxílicos

Después de una vuelta del ciclo se producen dos moléculas de  $\text{CO}_2$ , se regenera el oxalacetato, a partir de malato, y se une a otra molécula de acetil-CoA para reanudar nuevamente el ciclo. Este tiene la peculiaridad de ser catabólico y anabólico (anfibiólico); por ejemplo, el oxalacetato puede participar en la gluconeogénesis, al transformarse en fosfoenol piruvato. Por otra parte, las reacciones anapleróticas proveen al ciclo de algunos componentes, por ejemplo, la restitución de oxalacetato a partir del piruvato por acción de la enzima piruvato carboxilasa, (Lehninger, 1985).

## EL TRANSPORTE ELECTRONICO MITOCONDRIAL

La cadena respiratoria se localiza en la membrana interna mitocondrial. Se compone de ferrosulfoproteínas en las que los átomos de hierro y azufre están dispuestos en estructuras cúbicas, cuyos vértices son ocupados alternativamente por los átomos de fierro y azufre.

Se pueden distinguir tres tipos de ferrosulfoproteínas asociadas:

- 1) Ferrosulfoproteínas asociadas al complejo enzimático NADH deshidrogenasa.
- 2) Ferrosulfoproteínas asociadas al complejo del succinato.
- 3) Ferrosulfoproteínas asociadas con los citocromos b y  $c_1$ .

Las ferrosulfoproteínas relacionadas con el complejo del succinato se denominan S-1, S-2, y las asociadas con el complejo  $\text{NAD}^+$ ; con los símbolos N-1, N-2, etc., (Ernster, 1984). También se ha añadido al esquema anterior dos especies de citocromos tipo b que difieren en su potencial redox y tienen sus máximos en la banda alfa a 562 y 566 nm.

De acuerdo con su actividad enzimática, los cuatro complejos se definen: NADH-Ubiquinona oxidoreductasa (**complejo I**), succinato-ubiquinona oxidoreductasa (**complejo II**), Ubiquinol-citocromo

c oxidoreductasa (**complejo III**) y citocromo c oxidasa (**complejo IV**), (González-Halphen, 1990; Moreno-Sánchez y cols., 1991); siguiendo esta nomenclatura, la ATP-sintetasa se denomina ocasionalmente **complejo V**, (González-Halphen, 1990).

El número de transportadores de cada complejo (cinco en el I, cuatro en el II, cinco en el III y más de dos en el IV), permite que se considere a estas asociaciones como potenciales redox, este concepto indica que la aceptación o donación de un electrón por un componente del complejo, no modifica sensiblemente el potencial redox estándar del complejo en su conjunto; esto permite imaginar a la cadena respiratoria capaz de transportar a un electrón por segundo en estado de reposo (estado 4) y hasta de veinte electrones por segundo en el estado 3.

Por razones energéticas, algunos componentes de la cadena respiratoria y el sistema de síntesis de ATP se encuentran orientados en forma vectorial a través de la membrana de acuerdo con la Teoría Quimiosmótica propuesta por Mitchell, (1961). El dogma central de esta hipótesis establece que las cadenas transportadoras de electrones de las mitocondrias, cloroplastos y bacterias están acopladas a la síntesis de ATP mediante el potencial electroquímico de protones  $\mu\text{H}^+$  que se crea a través de las membranas transductoras de energía. El potencial electroquímico generado por el transporte de electrones se utiliza para impulsar una bomba de protones reversible, que funciona sintetizando ATP (ATP-sintetasa). Por tanto, cada membrana transconductora de energía posee dos bombas de protones, una impulsada por el transporte de electrones o la absorción de fotones y otra por la hidrólisis de ATP; las dos bombas tienen la misma orientación, es decir, que el flujo de electrones a lo largo de la cadena transportadora de electrones produce una traslocación de protones en la misma dirección en la que se origina la hidrólisis de ATP por la ATP sintetasa, (Nicholls, 1982), (ver Figuras 5 A, B ).

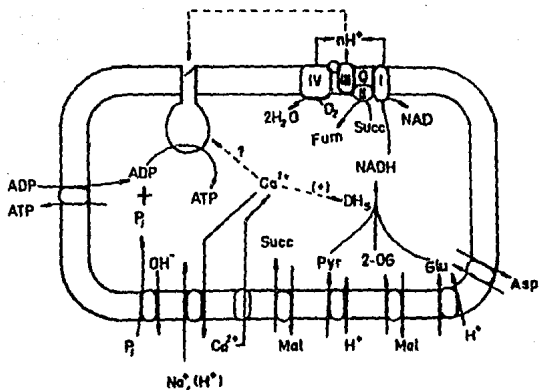
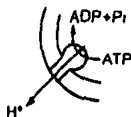


Figura 5A.

Representa el esquema de la fosforilación oxidativa. Esta vía consiste en un sistema de oxidación y uno de fosforilación. El primero requiere el transporte de sustratos oxidables a través de la membrana interna mitocondrial hacia dentro de la matriz. El transporte de piruvato, 2-oxoglutarato y succinato ocurre directo por las distintas moléculas proteicas con diferentes características. El transporte de piruvato utiliza un gradiente de protones, mientras que el transporte de 2-oxoglutarato, succinato y glutamato toma lugar directamente en un cambio electro-neutro con malato o fosfato inorgánico intramitocondrial, y en el caso de glutamato con aspartato, (Moreno-Sánchez y cols., 1991).

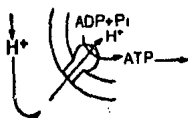
a. La hidrólisis de ATP genera  $\Delta\mu_H$ .



b. Equilibrio



c. Proceso inverso.  
La creación de  $\Delta\mu_H$   
genera ATP



d. Generación continua de ATP  
por un  $\Delta\mu_H$  mantenido por una  
segunda bomba de protones.

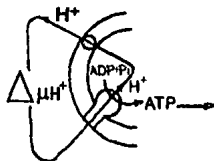


Figura 5B. Se muestra el acoplamiento quimiosmótico de protones, (Nicholls, 1982).

En la mitocondria, los protones eliminados de los diversos sustratos por las deshidrogenasas, donan electrones, los cuales se transfieren al oxígeno molecular, reduciéndolo a agua.

El transporte de electrones puede ser inhibido por rotenona, antimicina y cianuro, entre otros; así como la fosforilación oxidativa puede ser desacoplada por agentes específicos o por ionóforos (2,4 dinitrofenol y valinomicina respectivamente), (ver Figura 6).

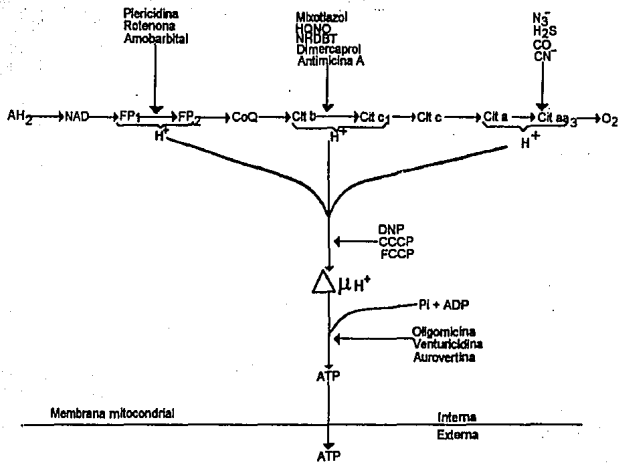


Figura 6. Se muestra la cadena de transporte de electrones ubicando los sitios de inhibición y la posible interacción de algunos desacoplantes.

## INHIBIDORES DEL TRANSPORTE ELECTRONICO

La fosforilación oxidativa de mitocondrias de células de mamífero se bloquea por una serie de compuestos químicos y antibióticos. Un inhibidor es un compuesto químico que puede interrumpir la transferencia de electrones y como consecuencia, la fosforilación oxidativa. La rotenona, la antimicina y el cianuro, (Nicholls, 1982; Ernster, 1984; Martínez y Chávez, 1990), constituyen un ejemplo de inhibidores. Existen otros inhibidores que pueden bloquear la fosforilación oxidativa sin ejercer un efecto en la transferencia de electrones, éstos se distinguen de los anteriores debido a que se encuentran en presencia de un desacoplante no afectan la velocidad de transferencia de electrones, por ejemplo, la oligomicina, la cual puede actuar como inhibidor de la ATPasa.

Los desacoplantes, separan la fosforilación oxidativa de la transferencia de electrones, mediante el colapsamiento de la fuerza protón-motriz por ejemplo el 2,4-dinitrofenol, el CCCP (m-clorofenilhidrazona carbonilcianuro), o FCCP (carbonilcianuro 4-trifluorometoxifenilhidrazona), (Nicholls, 1982).

Para fines de nuestro trabajo clasificamos a los inhibidores de la ubiquinona-citocromo c oxidoreductasa en cuatro grupos según el sitio donde actúan:

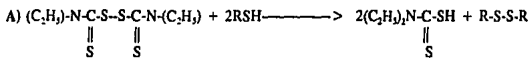
**-Grupo I (metoxi acrilato):** inhibidores de la oxidación de la ubiquinona actuando en la proteína hierro-azufre y en el centro hemo  $b_{566}$ , por ejemplo mixotiazol, oudemansinas y estigmatelinas.

**-Grupo II (hidroxiquinonas):** inhibidores de la reoxidación del centro hierro-azufre y de la reducción del hemo  $b_{566}$  como la alquilhidroxi-benzotiazol (UHDBT y PHDBT), las alquilhidroxi-naftoquinonas (UHNQ) y las quinonas-hidroxiquinolinas (HNDHQQ).

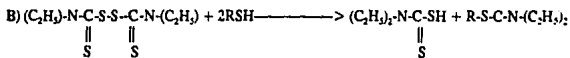
**-Grupo III:** inhibidores de la reducción de la ubiquinona como la antimicina, la funiculocina, los óxidos de hidroxiquinonas (HQNO, NQNO) y el diurón.

**-Grupo IV:** inhibidores varios como la anti-lewisita británica (BAL) que destruye el centro hierro-azufre, (González-Halphen, 1990)

El disulfiram es un potente inhibidor de la cadena alterna en mitocondrias de plantas bloqueándola cuando ciertos sustratos, entre ellos el succinato es usado. Actúa sobre los grupos tiol, puede oxidar el sulfhidrilo y formar un disulfuro simétrico.



o alternativamente una mezcla disulfuro.



Dependiendo de la naturaleza del tiol se formará A o B

**A:** se forma al reaccionar con tioles de bajo peso molecular.

**B:** se forma al reaccionar con proteínas que tengan grupos sulfhidrilo.

Hay evidencias de un segundo sitio de inhibición que puede ser el complejo I, además puede tener un pequeño efecto desacoplante. Las oxidasas alternas de mitocondrias de planta tienen una  $K_i = 7 \mu M$  para **disulfiram** el cual es un inhibidor con mayor potencia que el **SHAM**, (ácido 2-salicilhidroxámico) que cual también inhibe la vía alterna en mitocondrias de plantas y en el estado cuatro cerca del 30% cuando se encuentra cerca de niveles saturantes, (Grover y Laties, 1981).



**Oligomicina:** se enlaza a la  $F_0$ -ATP sintetasa a la membrana y presumiblemente, impide el movimiento de protones hacia el interior que de otra manera, daría lugar a la formación de ATP, aunque sigue permitiendo el transporte de electrones.

**Difenilamina (DPA)** a concentraciones de  $10^{-4}M$ , puede inhibir la NADH oxidasa y la actividad de la succinato oxidasa en mitocondrias de planta, y la cadena alterna de *Euglena*, (aunque no es específico), (Uribe y Moreno-Sánchez, 1992). A concentraciones menores ( $2.7 \times 10^{-4} M$ ), los efectos inhibitorios resultan primeramente de la acción entre el ácido succínico y la NADH deshidrogenasa y el primer componente citocrómico de la cadena de transporte de electrones, (Baker y James, 1963), (ver Figura 7A).

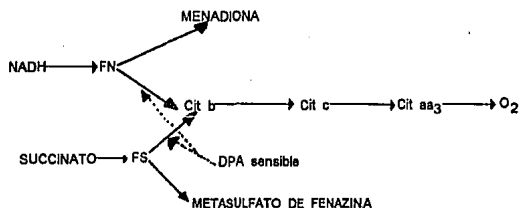
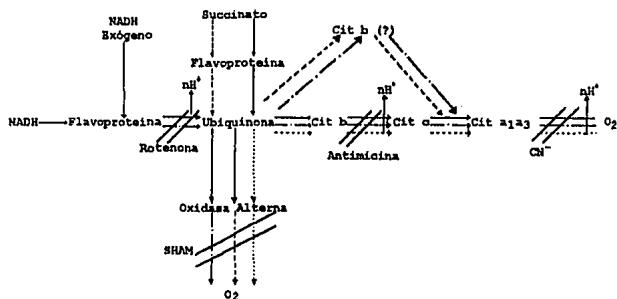


Figura 7A. Inhibición por DPA en la cadena de transporte electrónico.

**Mixotiazol:** inhibe el segmento b-c, de la cadena de transporte de electrones, actúa de manera general parecida a la antimicina, diferenciándose esta última porque no produce una oxidación extra del

citocromo b; además el mixotiazol produce cambios espectrales en el citocromo b de partículas submitocondriales. El compuesto posee sitios de unión en igual número que la cantidad de antimicina al igual que las constantes de unión. Debido al cambio espectral inducido por el mixotiazol, se cree que el sitio de unión del compuesto es el citocromo b del segmento b-c. Aunque no existen pruebas contundentes, pero se cree que el mixotiazol no se une al mismo sitio que la antimicina, (Thierbach, 1981), (ver Figuras 7B, 7C y 7D).



**Figura 7B.** Esquema postulado para las vías de transporte de electrones en mitocondrias de *Euglena*: — Vía sensible a Cianuro; - - - - Oxidasa alterna sensible a SHAM para el transporte de electrones de succinato; ..... Tres vías de oxidación de lactato en donde esta mediado por un citocromo tipo b (designado de esta manera), el cual difiere con el citocromo b sensible a cianuro, con una de las tres vías incluyendo la oxidasa alterna, la segunda es la sensible a antimicina y cianuro y la tercera es la vía resistente a antimicina pero sensible a cianuro; - . - . - . vías distintas de oxidación de NADH exógeno, uno de ellos sensible a rotenona además de incluir la oxidasa alterna, la siguiente es rotenona, antimicina y cianuro sensibles y por último la tercera que incluye al citocromo b y sitios sensibles a rotenona y cianuro pero resistentes a antimicina.

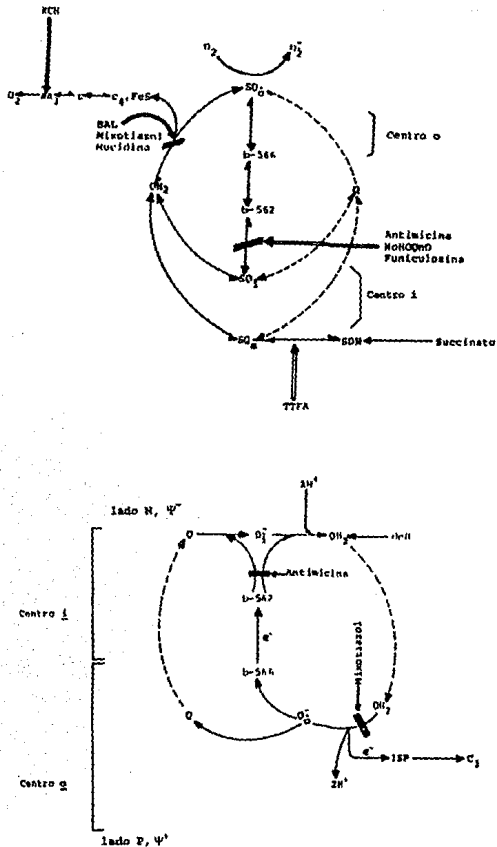


Figura 7C. El ciclo Q mostrando los posibles sitios de inhibición de antimicina, mixotiazol y HQNO, la figura de arriba representa el modelo propuesto por Ksenzko y cols., 1983, la de abajo muestra el esquema propuesto por Tang y Trumpower, 1986.

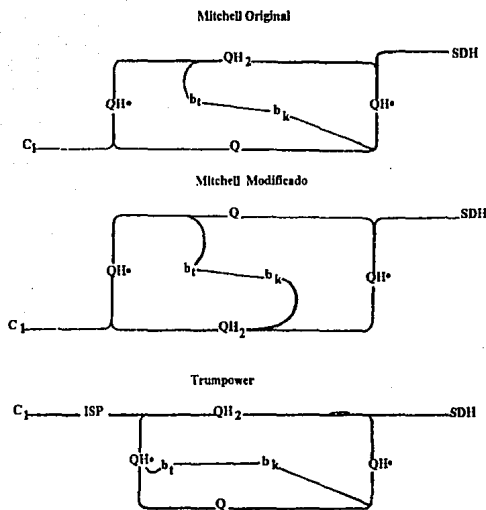


Figura 7d.

El ciclo Q es examinado en términos del transporte electrónico. El ciclo normalmente opera con un electrón introducido por una deshidrogenasa en la superficie interna, representada como  $SDH$  (Succinato deshidrogenasa) del lado derecho. Los electrones son removidos de la superficie externa por un miembro de la cadena de transporte de electrones que se muestra como  $C_1$  (citocromo  $C_1$ ) o  $ISP$  (proteína hierro-azufre de Rieske) del lado izquierdo. La entrada del electrón se reduce de ubiquinona ( $Q$ ) a ubiquinol ( $QH_2$ ) o bien de quinona ( $Q$ ) a semiquinona. En el esquema original de Mitchell, un electrón de la quinona es reciclado vía citocromo  $b$  para regenerar ubiquinona de ubiquinol ( $Q$ ), mientras que el otro electrón se transfiere por el citocromo  $C_1$ . En este esquema, la forma reducida para los citocromos  $b$  es  $QH_2$  y el oxidado es  $Q$ . El esquema se modifica como se muestra en la parte central debido a que  $QH_2^+$  es mayormente reductor que  $QH_2$ . En este esquema un electrón se transfiere del quinol al citocromo  $C_1$  para generar ubiquinona, el presunto reductor de bajo potencial citocromo  $b_1$ , y el otro electrón regresa a través de los citocromos  $b$  para formar ubiquinol a partir de la ubiquinona. En este esquema el par reducido para los citocromos  $b$  es  $Q/QH_2^+$  y el par oxidado es  $QH_2/QH_2^+$ . En el esquema de Trumpower un electrón del ubiquinol se transfiere al citocromo  $C_1$ , vía proteína hierro-azufre, pero el otro electrón se transfiere a través del citocromo  $b$  para formar ubiquinona a partir de la quinona. En este esquema el par  $Q/QH_2^+$  es tanto reductor como oxidante para los citocromos  $b$ . La antimicina bloquea la oxidación de los citocromos  $c$  en todos los esquemas. (Hendler y cols., 1985).

## ANTECEDENTES

*Euglena gracilis* es un microorganismo flagelado, de vida libre con características de planta por presentar película y cloroplastos, (Buetow, 1968) y de célula animal por presentar flagelo y mitocondrias; por la primer razón se considera que es un microorganismo quimioautótrofo; tiene una amplia capacidad de adaptabilidad y crecimiento en una gran variedad de condiciones nutricionales: medios minerales u orgánicos (Hutner, 1956; Hutner y cols., 1966; Haigh y Beevers, 1964; Cook y Carven, 1966; Sharpless y Butow, 1970; Devars y cols., 1992). Además puede crecer y adaptarse a estos medios en condiciones desfavorables, como por ejemplo, crecer en presencia de sustancias tóxicas, metales pesados e inclusive, inhibidores de la cadena de transporte de electrones, (Sharpless y Butow, 1970; Bariaud y Mestre, 1984; Duret y cols., 1984; Bonaly y cols., 1986), (ver Figura 8).

Por ser un organismo unicelular, de fácil manejo, con un período corto de generación, se ha extendido a otras áreas de investigación como síntesis proteica en cloroplastos, (Edelman y Kahana, 1989); biología molecular en cloroplastos utilizando DNA y RNA, aislamiento de ambos ácidos nucleicos, (Hallick y Buetow, 1989; Avadhani y Freyssinet, 1989); síntesis de ácidos grasos, (Inui y cols., 1984 a, b); composición de citocromos de cadena respiratoria, (Sharpless y Butow, 1970 a, b); fosforilación oxidativa, (Yokota y Kitaoka, 1979; Yokota, Haga, Kitaoka, 1985; Buetow y Buchanan, 1965; Sharpless y Butow, 1970 a; Collins, Brown y Merret, 1975; Moreno-Sánchez y Raya, 1987); estudios de contaminación de agua, (Bariaud y Mestre, 1984); por otro lado, *Euglena* puede crecer en medios de cultivo orgánicos como el acetato a pH 6.5-7.0 (Danforth, 1953), etanol a pH 3.5, (Buetow, 1968; Buetow y Buchanan, 1965; Sharpless y Butow 1970 b); en glutamato mas malato a pH 3.5 (Sharpless y Butow 1970 a, b); succinato a pH 3.5, (Sharpless y Butow,

1970 a, b). Por otro lado a *Euglena* se le puede utilizar como modelo hepático, (Thuiller-Bruston, Briand y Laval-Martin, 1990). Estas y otras características hacen de este modelo, una interesante aplicación en la bioquímica básica.

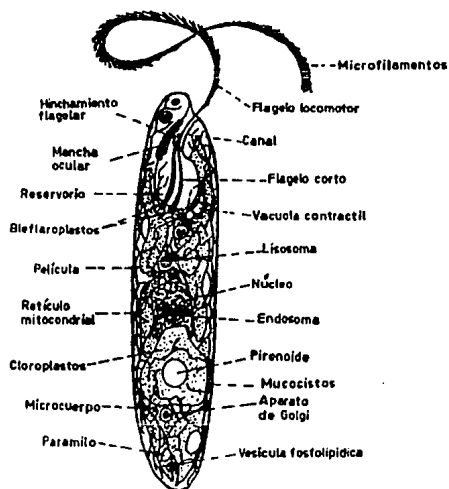


Figura 8. Esquema de *Euglena* mostrando algunas de sus estructuras subcelulares.

*Euglena gracilis* presenta estructuras intracelulares importantes, (ver Figura 8); para su crecimiento la célula necesita de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , nitrógeno, oxígeno, carbono; además requieren vitamina  $\text{B}_1$ , vitamina  $\text{B}_{12}$ , y algunos cofactores, un pH específico, (el mejor crecimiento se logra a pH ácido de 3.5), en la mayoría de los casos el pH adecuado permite un consumo máximo de

oxígeno pero no siempre se obtiene el crecimiento óptimo.

A diferencia del ciclo de Krebs, que se presenta en mitocondrias de células de mamíferos, en el de *Euglena* se observan muchas enzimas diferentes. (ver Figura 9).

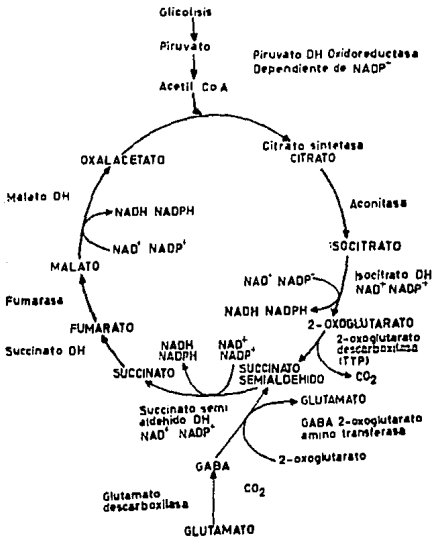


Figura 9. Ciclo de Krebs de *Euglena* con sus diferentes enzimas.

## DESCRIPCION DE ALGUNAS ENZIMAS PRESENTES EN EL CICLO DE KREBS DE *EUGLENA*

**Citrato sintetasa aconitasa: (aconitato hidratasa)** cataliza la reacción de oxalacetato a citrato, se le ha localizado en la matriz mitocondrial y en los glioxisomas de *Euglena gracilis*; participa en el ciclo del glioxilato, (Graves y cols., 1974; Collins y Merret, 1975).

**Aconitasa (aconitato hidratasa):** cataliza la conversión de citrato a isocitrato en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos en mitocondrias de células animales, esta localizada en la matriz mitocondrial; se ha detectado en mitocondria, (Bégin-Heick, 1973) y glioxisomas, (Cook y Carver, 1966; Cook y Heinrich, 1968).

**Isocitrato deshidrogenasa:** lleva a cabo la conversión de isocitrato a 2-oxoglutarato; se han encontrado dos tipos de enzimas dependientes específicamente de  $\text{NAD}^+$  o de  $\text{NADP}^+$ . La especificidad por el  $\text{NAD}^+$  de la isocitrato deshidrogenasa solo se ha encontrado en mitocondria y la otra se ha localizado en citosol; ambas enzimas requieren para su mejor actividad la presencia de  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , (Oda y cols., 1982).

**2-oxoglutarato descarboxilasa y succinato semialdehído deshidrogenasa:** las mitocondrias de plantas superiores y las de células animales, tienen un complejo enzimático que oxida 2-oxoglutarato a succinato vía succinil-CoA catalizado por la 2-oxoglutarato deshidrogenasa, (Zubay, 1988). El paso de succinil CoA a succinato es catalizado por la succinil CoA sintetasa, (también llamada succinil tioquinasa), reacción en la cual la energía del enlace tioéster se conserva como energía química para ser usada en la fosforilación de GDP en mitocondrias de mamífero, (Zubay, 1988), o ADP en mitocondrias de plantas superiores. En contraste, en mitocondrias de *Euglena*, el 2-oxoglutarato es oxidado a succinato vía 2-oxoglutarato descarboxilasa y succinato semialdehído, (ver Figura 9). Las actividades de la enzima son



dependientes de CoA y de pirofosfato de tiamina, se encuentran como enzimas constitutivas; la presencia de dos succinato semialdehído deshidrogenasas, las cuales requieren una de ellas  $\text{NAD}^+$  y la otra de  $\text{NADP}^+$ , catalizan la conversión de succinato semialdehído a succinato, (Tokunaga y cols., 1976b). La ruta de oxidación del 2-oxoglutarato a succinato es rápida, pues uno de los mejores sustratos respiratorios para mitocondrias de *Euglena* es el succinato semialdehído, (Tokunaga y cols., 1976a).

**Succinato deshidrogenasa:** Cataliza la oxidación de succinato a fumarato. Esta enzima es dependiente de la fuente de carbono utilizada para el medio de crecimiento; el acetato promueve la actividad enzimática, (Bégin-Heick, 1973). La adición de glutamato al medio de crecimiento fotoautotrófico aumenta su actividad; su grupo prostético es el  $\text{FAD}^+$ , (Tokunaga y cols., 1976b).

**Fumarasa (fumarato hidratasa):** Cataliza la conversión de fumarato a malato. Esta enzima se localiza en la matriz mitocondrial, su actividad es mayor en células crecidas fotoautotróficamente, en cambio en células de mamíferos esta enzima se encuentra en mitocondria y citosol, (Horrum y Schwartzbach, 1980a).

**Malato deshidrogenasa:** Cataliza la oxidación de malato a oxalacetato. Se han detectado dos formas de esta enzima, una mitocondrial y otra citoplásmica. La forma dependiente de  $\text{NAD}^+$  se encuentra en la matriz mitocondrial de células de animales, (Zubay, 1988) y en plantas, (Rihter, 1978). En *Euglena* la forma dependiente de  $\text{NAD}^+$  ha sido aislada y purificada; se han reportado dos isoenzimas una en citosol y otra en peroxisomas pero con propiedades distintas. La forma dependiente de  $\text{NADP}^+$  se encuentra en matriz en un 42% y en un 50% en el espacio intermembranal; localizada también en cloroplastos de plantas superiores, (Slack, y cols., 1969; Ting y Rocha, 1971).

Davis y Merret (1974), reportaron una malato deshidrogenasa en peroxisomas de *Euglena* mostrando una fuerte inhibición por oxalacetato; en *Euglena* se encuentran las dos formas  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$ , y se localizan en mitocondria y citoplasma, (Peak y cols., 1972). Isegawa y cols. (1984) y Miyatake (1985a), encontraron una forma en matriz y la otra en espacio intermembranal.

Algunas otras diferencias entre otro tipo de mitocondrias y mitocondrias de *Euglena* son por ejemplo la existencia de la lanzadera del **GABA**, (ácido gama amino butírico), y la Piruvato oxidoreductasa dependiente de  $\text{NADP}^+$ , (Inui y cols., 1991)

La lanzadera del **GABA** involucra tres enzimas: glutamato descarboxilasa, GABA-2-oxoglutarato aminotransferasa y succinato semialdehído deshidrogenasa, unidas al glutamato en el ciclo de Krebs, las tres enzimas se encuentran localizadas en la matriz mitocondrial, (Tokunaga y cols., 1979).

La piruvato: $\text{NADP}^+$  oxidoreductasa de *Euglena gracilis*, es una proteína homodimérica con un peso molecular de 309 kDa, es una flavoenzima hierro-azufre que contiene tiamina pirofosfato (TPP); la enzima contiene dos dominios funcionales, uno en el cual contiene un centro hierro-azufre aislable en forma homodimérica por proteolisis; el otro dominio que contiene FAD es liberado en forma monomérica; se ha visto que el piruvato es oxidado en una dependencia de la CoA al formar  $\text{CO}_2$  y la unión de la acetil-CoA en el dominio hierro azufre además de que un par de electrones sea transferido al dominio donde se encuentra el FAD en donde el  $\text{NADP}^+$  es reducido. El TPP (Pirofosfato de tiamina) se le ha considerado que se encuentra unido al dominio hierro-azufre.

La descarboxilación de 2-oxoácidos es catalizada por la CoA libre y por un complejo multienzimático de deshidrogenasas que se localiza en muchos sistemas de organismos vivos, el poder reductor del sustrato es transferido al  $\text{NAD}^+$ ; en contraste la piruvato  $\text{NADP}^+$  oxidoreductasa de

mitocondrias de Euglena gracilis, cataliza la reacción, (Kitaoka y cols., 1989; Inui y cols., 1984):



Se ha encontrado que esta enzima tiene un papel importante en la fermentación de esteres de ceras, (Inui y cols., 1985; Inui y cols., 1982).

## OXIDASAS TERMINALES

Los organismos provistos de sistemas en los cuales se obtiene energía a través del flujo de protones ( $H^+$ ), contienen un sistema transportador de electrones denominados citocromos, término introducido por Keilin (1925). El funcionamiento de esta cadena de transporte de electrones es debida al movimiento electrogénico de la fuerza protón-motriz dirigida hacia la síntesis de ATP, el cual sirve para situaciones secundarias de las células, tales como el transporte de solutos, la secreción de proteínas y la movilidad celular. En bacterias se ha encontrado una amplia colección de componentes transportadores de electrones como grupos fierro-azufre, quinonas, quinonas y citocromos, especialmente citocromos con diferente grupo prostético, tales como el  $aa_3$ , **b**, **c**, **d**, **o**, presentes en membrana citoplásmica. Estos citocromos pertenecen a un grupo diferente de oxidasas terminales en cadenas respiratorias especie-específicas, (Knowless, 1981).

Durante los últimos diez años se ha avanzado en el estudio de los citocromos bacterianos, obteniéndose evidencias respecto a las oxidasas terminales, las cuales contienen menos subunidades, generalmente tres o cuatro, que las oxidasas de mitocondrias de células de eucariotes. Las subunidades de las oxidasas bacterianas guardan cierta similitud con las subunidades de enzimas de tipo eucariote y hasta son usadas como formas de identificación de estructura y función así como mecanismos de interacción quinona-hemo **b**, transporte de electrones acoplada a la traslocación de protones, y reducción de oxígeno en complejos de oxidasas terminales. La nomenclatura introducida por Keilin se ha ido modificando en primer instancia, los nombres originales basados en la definición espectroscópica para los citocromos  $a_1$ ,  $a_2$ , y  $b_1$  de *Escherichia coli* se nombran ahora como: el citocromo  $a_1$  que contiene un protohemo IX, es un citocromo  $b_{595}$ , (Anraku y Gennis, 1987), el citocromo  $a_2$  contiene cloro y por tanto es un citocromo **d**, (Anraku y Gennis, 1987); el

citocromo  $b_1$  es una mezcla de citocromos tipo **b** que contienen protohemos tipo IX, los cuales se ha visto que consisten en cinco componentes, citocromos  $b_{356}$ ,  $b_{361}$ ,  $b_{358}$ ,  $b_{362}$  y **o**, (Anraku y Gennis, 1987).

En muchas bacterias hay más de una oxidasa terminal en la membrana citoplásmica, estos sistemas respiratorios están ramificados a sitios de oxidasas o a sitios de deshidrogenasas, (Ludwig, 1987; Anraku y Gennis, 1987). Hay dos grupos de oxidasas: uno es el de la citocromo c oxidasa (clase **I**) y el otro es una quinol oxidasa (clase **II**). Las oxidasas clase **I** reciben electrones del ferrocitocromo c y reduce al oxígeno molecular para producir agua. Las enzimas de clase **I** pueden dividirse además dentro de dos subgrupos: clase **IA** enzimas que contienen un grupo hemo a y  $Cu^{2+}$  y enzimas de clase **IB** que contienen hemos tipo **b** o hemos tipo **o**.

Las quinol oxidasas, las cuales se han localizado en bacterias y en mitocondrias de plantas, reciben electrones de los ubiquinoles y/o menaquinoles y los transfieren al oxígeno molecular. Estas enzimas están enteramente dispuestas con grupos hemo a, pero contienen hemos tipo **b**, hemos tipo **o** y  $Cu^{2+}$  (clase **IIA**), o hemos tipo **b** y hemos tipo **d**, (clase **IIB**), (Anraku, 1987).

#### **Clase IA: Citocromo c Oxidasas conteniendo Hemos tipo aa<sub>3</sub> o caa<sub>3</sub>**

Las enzimas que pertenecen a esta clase presentan una sorprendente homología y similitud estructural a las enzimas mitocondriales aunque estas están compuestas por dos o tres subunidades, (Ludwig, 1987; Anraku y Gennis, 1987). En principio estas contienen hemos tipo aa<sub>3</sub> o c<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub> y dos átomos de cobre por mol de hemos tipo **a**, y están directamente envueltos en la traslocación de protones.

### Clase IIB: Citocromo c oxidasas conteniendo hemos tipo o

Las oxidasas terminales de la clase **IB** contienen hemos **tipo o** (tipo **b**) y **c o** hemos **tipo o** que pueden recibir electrones a partir del citocromo **c**, se ha encontrado en muchos géneros de bacterias y han atraído la atención de los investigadores porque los sistemas respiratorios mitocondriales enteramente carecen de este tipo de actividad de oxidasas, (Anraku y Gennis, 1987; Cronan y cols., 1987). La coexistencia de oxidasas clase **IB** en varios microorganismos en los cuales las funciones de las oxidasas de clase **IA** se ven mejor reflejadas para el metabolismo energético aeróbico; sin embargo, las oxidasas (**IB**) generan una vía o transporte de electrones alterna bajo condiciones limitantes de  $O_2$  e inclusive en presencia de este, pueden utilizarse en diversas condiciones.

En el presente, las características de las enzimas de clase **IB** como oxidasas terminales pueden describirse como sigue:

- a) Contienen hemos **tipo o** (un tipo **b**) que reacciona con **CO**.
- b) Estas oxidan sustratos con alto potencial, citocromos **c** solubles y **TMPD**, y no presentan actividad de quinol oxidasas.
- c) Sus actividades son inhibidas por bajas concentraciones de azida y cianuro (las  $K_i$ 's encontradas para este sistema son:  $1.13\mu M$  y  $2\mu M$  respectivamente en **Methylophilus methylotrophus**), (Froud y Anthony 1984).
- d) Pueden catalizar la traslocación de protones en proteoliposomas, acoplada con pulsos de ferrocitocromo **c** por cambios en la oxidasas. Hay ahora una evidencia convincente de que estas enzimas son ampliamente distribuidas en bacterias y constituyen una desviación o bifurcación de la cadena de transporte de electrones en paralelo con las oxidasas de tipo terminal de clase **IA**, (Poole, 1983 y Ludwig, 1987). Cabe hacer notar que el nombre de citocromo **o**, descubierto primeramente por Chance y colaboradores (Chance, 1953a,b; Castor y Chance, 1955; Castor y

Chance, 1959) el cual proviene por la unión de este con el CO, la cual es una reacción típica de citocromos identificado como un pigmento con características de oxidasa terminal.

Estudios recientes indican que la oxidasa terminal consistiendo de citocromos **o** (un tipo **b**) y **c**; el citocromo **o**, puede ser purificado cercano a la homogeneidad con una enzima que puede oxidar ferrocitocromo **c** soluble y transferir los electrones al oxígeno molecular; basándose en estos conocimientos, y partiendo de la definición original, (Castor y Chance, 1959), se adoptó el término de **co** o tipo **o** como una nueva nomenclatura para las oxidasas de clase **IB** que consisten en oxidasas de citocromo **c** oxidasa conteniendo hemos tipo **o**, (Anraku y Gennis, 1987); se ha encontrado que para *Methylophilus methylophilus*, un microorganismo metilotrópico obligado, es capaz de inducirse la actividad de CO oxidasa en condiciones de exceso de metanol y condiciones limitantes de oxígeno, incrementando la actividad por aproximadamente 10 veces más. Estudios recientes indican que la cadena respiratoria de este microorganismo está constituida de dos citocromos tipo **o** (tipos **b**) y dos citocromos **c** endógenos; el citocromo **o** presenta un alto potencial redox y reacciona con CO. La actividad de citocromo oxidasa es inhibida no competitivamente por azida ( $K_i = 1.13 \mu\text{M}$ ) y cianuro ( $K_i = 2 \mu\text{M}$ ), (Froud y Anthony 1984).

#### Clase IIA: Quinol Oxidasas conteniendo hemos **b** y hemos **o**

*Escherichia coli*, es un microorganismo facultativo, contiene varios citocromos tipo **b**, cuatro de los cuales son citocromos **b<sub>562</sub>**, **b<sub>558</sub>**, **o**, **b<sub>595</sub>**, son los componentes de las ubiquinol oxidasas, (Anraku y Gennis, 1987); no tienen citocromo **c** oxidasa, se sintetiza un citocromo **c<sub>552</sub>** durante el crecimiento anaeróbico el cual se ha visto recientemente que tiene actividad de hexahemo nitrato reductasa. Shipp y colaboradores midieron

los espectros diferenciales de E. coli a baja temperatura y concluyeron que las bandas alfa, previamente atribuidas al citocromo  $b_1$ , es una composición de las bandas de absorción de cinco o más diferentes pigmentos y que el microorganismo presenta por lo menos tres hemos tipo  $b$ ; también se encontró que son tres los mejores componentes de absorción máxima alrededor de 556, 558 y 563 nm. El complejo citocromo  $b_{562}$ -o es el único ejemplo de la funcionalidad de ubiquinol oxidasa conteniendo hemos  $b$  y  $o$  y dos átomos de cobre, (Matsushita y cols., 1987).

#### **Clase IIB: Quinol oxidasas Conteniendo Hemos b y Hemos d**

Las dos quinol oxidasas conteniendo hemos  $b$  y  $d$  pero no átomos de cobre y han sido purificadas a partir de membranas de Escherichia coli. El complejo  $b_{560}$ - $d$ , es una ubiquinol oxidasa de la cadena respiratoria de Photobacterium phosphoreum, (Watanabe y cols., 1975; Watanabe y cols., 1979; Konishi y cols., 1986).



## OXIDACION DE SUSTRATOS EN MITOCONDRIAS DE Euglena gracilis.

Las mitocondrias de Euglena pueden oxidar una extensa variedad de sustratos incluyendo NADH exógeno, (Buetow y Buchanan, 1965; Sharpless y Butow, 1970; Collins y cols., 1975; Kümmel y Brinkmann, 1988; Devars y cols., 1992; Uribe y Moreno-Sánchez, 1992; Uribe y cols., 1994); lactato, (Preece, 1962; Rutner y Price, 1964; Sharpless y Butow, 1970; Lord y Merret, 1971; Collins y cols., 1975; Calvayrac y cols., 1978; Tokunaga, 1979; Isegawa, 1984; Buetow, 1989; Uribe y Moreno-Sánchez, 1992); succinato, (Buetow y Buchanan, 1965; Sharpless y Butow, 1970 a,b; Khan, 1974; Datta y Khan, 1977; Tokunaga y cols., 1976; Kümmel y Brinkmann, 1988; Moreno-Sánchez y Raya, 1987, Uribe y Moreno-Sánchez, 1992); glutamato/malato, (Buetow y Buchanan, 1965; Khan, 1974; Datta y Khan, 1977; Moreno-Sánchez y Raya, 1987; Uribe y Moreno-Sánchez, 1992; Uribe y cols., 1994); Isocitrato, (Cook y Heinrich, 1968; Graves y Becker, 1972; Collins y Merret, 1975; Oda y cols., 1982); 2-oxoglutarato, (Buetow y Buchanan, 1965., Sharpless y Butow, 1970 a, b., Collins, y cols., 1975 a, b; Calvayrac y cols., 1978; Uribe y Moreno-Sánchez, 1992; Uribe y cols., 1994); Acetato, (Danforth, 1957; Cook y Heinrich, 1968); GABA, (Tokunaga y cols., 1976); succinato semialdehído, (Tokunaga y cols., 1976).

Poco se sabe acerca de la oxidación del etanol, algunos autores mencionan que probablemente sea la misma vía de oxidación del acetato, sin embargo, aún existen dudas al respecto por lo que otros investigadores mencionan que dicha vía no existe o no es probable, (Danforth, 1957; Cook y Carven, 1966 y Danforth y Wilson, 1957). Estos autores encontraron que cuando las células eran crecidas en presencia de etanol o acetato, se induce la síntesis de enzimas del ciclo del glioxilato y

además que en estas mismas condiciones hay un incremento en la capacidad respiratoria comparada con células crecidas en forma autotrófica y/o con sustratos tales como succinato o malato.

Existen dos tipos de alcohol deshidrogenasas: **ADH-1** y **ADH-2** dependientes de  $\text{NAD}^+$ , estas observaciones se hicieron en Astasia longa el cual es un protozoo flagelado perteneciente al orden Euglenida, (Bégin-Heick, 1973); se encontró una actividad once veces más alta en un homogenado de células y cinco veces más en la fracción particulada y probablemente mitocondrial; la **ADH-1** puede inducirse bajo ciertas condiciones y la **ADH-2** se encuentra como una enzima constitutiva. Mego y Farb (1974) describieron una isopropanol deshidrogenasa distinta a la ADH en Euglena gracilis Z; recientemente se ha demostrado la existencia de alcohol deshidrogenasa en la fracción microsomal de células de Euglena gracilis crecida en medio mineral mas lactato o etanol como fuente de carbono, (Julistiono y Briand, 1992); la actividad de la **ADH** disminuye a una concentración de 50mM de etanol, pero la actividad oxidativa de etanol de la fracción microsomal continúa latente; correspondiendo este incremento a un incremento en la cantidad de citocromo  $\text{P}_{450}$ ; esto corresponde a las células de mamífero de igual manera, es decir, que en las células hepáticas, el consumo crónico de alcohol induce una disminución en la actividad de **ADH**; pero existe un incremento en la actividad del sistema oxidante de etanol de la fracción microsomal, que es una forma diferente de oxidación de alcohol respecto a la alcohol deshidrogenasa, (Lieber, 1982); al mismo tiempo este sistema oxidativo es importante en la oxidación de otro tipo de alcoholes, (Garo y cols., 1981; Koop y cols., 1982).

Sharpless y Butow, (1970 a, b), propusieron por primera vez la presencia de vías alternas de oxidación de sustratos en mitocondrias de **Euglena**, en particular de lactato, en la cual se supone es específica para el mismo, así como para el NADH y que se saltan el sitio de inhibición de la antimicina. Estos investigadores encontraron que las mitocondrias de células blanqueadas (crecidas en la obscuridad) de **Euglena** en glutamato/malato como fuente de carbono, exhiben un transporte de electrones que en muchos aspectos se parecen a mitocondrias de células de mamífero.

Encontraron la presencia de tres sitios de acoplamiento, y sugieren que uno de ellos puede ramificarse selectivamente por una vía alterna de transporte de electrones; así como la presencia de una oxidasa de succinato, la cual se encuentra mejor expresada cuando el medio de cultivo contiene succinato + antimicina, o en su defecto contiene etanol como fuentes de carbono, y que se vuelven insensibles a cianuro de potasio (KCN), que es marcadamente estimulada por AMP. Por otro lado, encontraron que el NADH exógeno puede dirigirse por esta misma vía con las mismas observaciones; esta succinato oxidasa parece estar relacionada a la cadena de transporte de electrones a través de la succinato deshidrogenasa.

## LA CADENA RESPIRATORIA DE MITOCONDRIAS DE

### Euglena gracilis

**Euglena** también presenta una cadena de transporte de electrones con características importantes.

La organización de la cadena respiratoria de las mitocondrias de **Euglena** es muy compleja, las mitocondrias presentan una citocromo oxidasa sensible a cianuro la cual parece ser similar a la citocromo oxidasa encontrada en mamíferos y en plantas superiores. Además también presenta vías específicas de oxidación de sustratos como la oxidasa alterna para succinato, lactato, NADH, glicolato y glicina. La oxidación de estos compuestos está acoplada a la fosforilación oxidativa y la formación de ATP, (Douce, 1985; Lloyd, 1974; Tokunaga y cols., 1976a, 1979; Gómez-Silva y cols., 1985; Uribe y Moreno-Sánchez, 1992; Uribe y cols, 1994). En la figura 6 se muestran algunas de las vías de oxidación de los diferentes sustratos.

La vía sensible a cianuro es responsable de la transferencia de electrones a partir de NADH y succinato en mitocondrias de células de mamífero y en mitocondrias de plantas superiores. La cadena respiratoria en células de mamífero, es extremadamente sensible al cianuro; en contraste, prácticamente casi todas las células de plantas presentan una respiración residual en presencia de cianuro, azida, monóxido de carbono o antimicina cuando estos inhibidores se encuentran en concentraciones suficientes para inhibir la citocromo oxidasa o al citocromo **b** completamente, (Siedow, 1982). Así mismo la insensibilidad a cianuro se ha encontrado también en hongos, en protozoarios y algas, (Lloyd, 1974).

Las altas concentraciones de cianuro o antimicina no bloquean completamente la oxidación de succinato por las mitocondrias de **Euglena**, (Buetow y Buchanan, 1965). Esto sugiere la presencia de vías resistentes a cianuro o a antimicina, (Raison y Smillie, 1969; Sharpless y Butow, 1970 a,b). Al parecer esto ocurre dependiendo de la fuente de carbono

utilizada para el crecimiento de las células o en su defecto puede inducirse, por ejemplo, esto ocurre en mitocondrias de células crecidas en etanol como fuente de carbono, pero no en células crecidas en presencia de glutamato más malato. La inducción puede ser por la presencia de antimicina incorporada al medio de crecimiento, (Sharpless y Butow 1970b; Calvayrac y cols., 1971). Devars y cols., (1992) demostraron la sensibilidad de la respiración endógena a cianuro en mitocondrias de células crecidas en medio de peptona + acetato y en mitocondrias de células crecidas en medio de glutamato + malato, también reportaron la relación citocromo  $o/aa_3$  sin que se encontraran diferencias significativas. La actividad de las vías alternas es baja durante la fase de crecimiento exponencial de *Euglena* en un medio definido conteniendo sacarosa, succinato, DL-malato, L-glutamato, DL-aspartato y glicina como fuentes de carbono, pero su actividad se incrementa cuando durante la fase estacionaria de crecimiento, (Stewart y Gregory, 1969; Devars y cols., 1992).

La oxidación de succinato por la vía alterna es resistente al cianuro y la antimicina y es estimulada por la adición de AMP, como lo hace la presencia de ADP, ATP, GMP, o IMP, pero no por la adición de AMPc, (Sharpless y Butow, 1970b); durante los últimos años se ha estudiado este efecto estimulante; en nuestro laboratorio hemos observado que en mitocondrias de células crecidas en diferentes medios de cultivo (peptona, glutamato-malato, y especialmente en etanol), no existe efecto estimulador por AMP, aunque aún existan reportes en donde se mencione esta estimulación, por lo que sugerimos que quizás se trata de un artefacto producido por la actividad de la Adenilato cinasa. La oxidación de succinato por la vía estimulable por AMP no está acoplada a la fosforilación. La oxidación de NADH exógeno en presencia de cianuro es oxidado por la vía resistente a cianuro, esta oxidación no es estimulada por AMP, (Uribe y Moreno-Sánchez, 1992), (ver Figura 7B).

Las mitocondrias de células crecidas en presencia de succinato por largos períodos de tiempo, presentan una actividad de succinato oxidasa caracterizada por una parcial resistencia al cianuro y también a la antimicina y por una carencia de estimulación por el AMP, (Sharpless y Butow, 1970b). Así que entonces las mitocondrias de *Euglena* parecen tener una tercer actividad de succinato oxidasa asociada con sensibilidad al cianuro y una asociada con la estimulación de AMP resistente a cianuro. No se sabe acerca de si la oxidación de succinato por esta tercer vía pueda estar asociada con la fosforilación, (ver Figura 7B).

*Euglena gracilis* oxida D- y L-lactato a muy altas velocidades, (Price y Vallee, 1962; Calvayrac y cols., 1978). Esta oxidación es dependiente de la presencia de zinc en el medio de crecimiento, (Price, 1962). La oxidación de lactato está acoplada a dos fosforilaciones, (Sharpless y Butow 1970 a,b) de acuerdo con los datos encontrados por Rutner y Price (1964) donde los electrones de la oxidación de D-lactato entran a la cadena de transporte de electrones en *Euglena* a nivel de la ubiquinona. Además, la oxidación de D- y L- lactato es inhibida un 40-50% por antimicina. Así que entonces por los resultados encontrados, Sharpless y Butow propusieron que la oxidación de lactato procede por una vía alterna de electrones que se bifurca antes del sitio de inhibición de la antimicina pero que también tiene dos sitios de fosforilación y que uno de ellos se encuentra acoplado al flujo de electrones de los citocromos  $a$  y  $a_3$  al oxígeno y el segundo sitio similar a pero no idéntico con el flujo de electrones del citocromo  $b$  al citocromo  $c$ . En este modelo los electrones son transferidos a partir de lactato, a una molécula de citocromo tipo  $b$  insensible a antimicina y de allí al citocromo  $c$  con su transferencia de electrones acoplada al resto de la cadena de transporte de electrones. La demostración directa de fosforilación oxidativa debida a la oxidación de L-lactato con una ADP/O de aproximadamente 2 la cual es resistente a antimicina (y sensible a HQNO), (Uribe y Moreno-Sánchez,

1992), confirman que el L-lactato es oxidado por una vía alterna que se conecta a nivel de la citocromo c oxidasa.

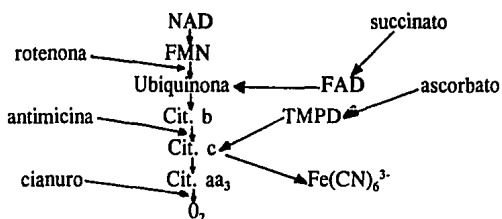
Debido a que la oxidación de lactato es parcialmente sensible a la inhibición por antimicina, los electrones del citocromo b pudieran ser transferidos a la ubiquinona y posteriormente distribuirse al resto de la cadena de transporte de electrones, (ver Figura 7B). Algo de la oxidación de lactato ocurre por la vía insensible a cianuro (contiene la oxidasa alterna), (Calvayrac y Butow, 1971; Collins y Merrett, 1975b; Calvayrac y cols., 1978). Estudios más recientes indican que en presencia de cianuro las mitocondrias pueden generar un potencial de membrana que se puede mantener estable utilizando diversos sustratos; estos resultados sugieren que el **citocromo b tipo o** (oxidasa alterna) puede ser una bomba redox de  $H^+$  en las mitocondrias de *Euglena*, (Uribe y Moreno-Sánchez, 1992).

La oxidación exógena de NADH, está acoplada a la fosforilación, (Buetow y Buchanan, 1965; Sharpless y Butow, 1970a; Kahn, 1974; Collins y cols., 1975; Datta y Kahn, 1977). La oxidación del NADH en las mitocondrias de *Euglena* puede ocurrir por tres vías, (Sharpless y Butow, 1970 a,b) cada una de las cuales se encuentra acoplada a uno o más sitios de fosforilación. La primer vía es sensible a rotenona y cianuro y abarca la vía sensible a cianuro de la cadena de transporte de electrones; la segunda vía es insensible a antimicina y cianuro; la tercer vía es insensible a antimicina pero sensible a cianuro. Esta última vía es a través de la bifurcación de la vía por un citocromo tipo b.

#### **Sitios de fosforilación oxidativa:**

Los resultados de Sharpless y Butow inicialmente se enfocaron a la búsqueda de los sitios de acoplamiento, por lo que por diversos métodos, encontraron las similitudes anteriormente relacionadas con los sitios de acoplamiento en mitocondrias de células de mamífero; los resultados de Sharpless y Butow indican que la oxidación de NADH exógeno es sensible a rotenona con una P/O alrededor de 1/3.

Buetow y Buchanan obtuvieron una P:O con succinato de alrededor de la unidad, implicando la presencia de un sitio análogo al sitio I. En sus experimentos encontraron una reducción rápida del ferricianuro por el succinato en presencia de rotenona y cianuro. La sensibilidad encontrada para la antimicina fue de 74-90% y varía con la concentración de ferricianuro, esto favoreció el estudio del sitio II de fosforilación; la fosforilación también se inhibió un 74% sugiriendo que la mayor parte del flujo de electrones a partir de succinato a ferricianuro atraviesa un sitio análogo al sitio II; para el sitio III de fosforilación utilizaron ascorbato y metasulfato de fenazina. Estos experimentos tienen la ventaja que en ausencia de cianuro, las mitocondrias de *Euglena* catalizan la reducción de ferricianuro y oxígeno a velocidades comparables, así que los dos aceptores pueden competir por los equivalentes reductores derivados del succinato, (ver Figura 10).



**Figura 10.** La figura muestra las posibles vías de entrada de oxidación de succinato y ascorbato así como los aceptores o donadores de electrones artificiales. TMPD (tetrametil-p-fenilendiamina)

Estos experimentos llevaron a la búsqueda de patrones de oxidoreducción de los citocromos mediante espectros diferenciales realizados anaerobicamente, (mitocondrias oxidadas). La banda alfa, la cual apareció perfectamente simétrica con un pico a 559 nm a temperatura



ambiente fue resuelto en otros cuatro componentes con mesetas en 552 nm y 565 nm y con un máximo a 558 y 561 nm realizados a temperatura de nitrógeno líquido.

La banda alfa de la citocromo oxidasa a 607 nm es más pequeña y simétrica, con una meseta a 594 nm. En la región del Soret hay un máximo a 443 y un hombro a 453 nm que sugieren la presencia de dos citocromos tipo a, componentes análogos a las bandas a y a<sub>3</sub> de la citocromo oxidasa en mamíferos. También realizaron espectros a temperatura ambiente utilizando monóxido de carbono anaerobicamente, y succinato para el caso de mitocondrias reducidas. Tales espectros revelaron que había un pico a 445 nm el cual aparece rápidamente y cambia un poco con el tiempo reaccionando característicamente al citocromo a<sub>3</sub> con monóxido de carbono (CO), (ver Figura 11).

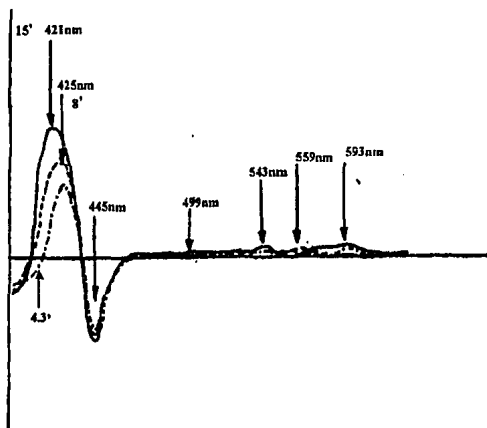
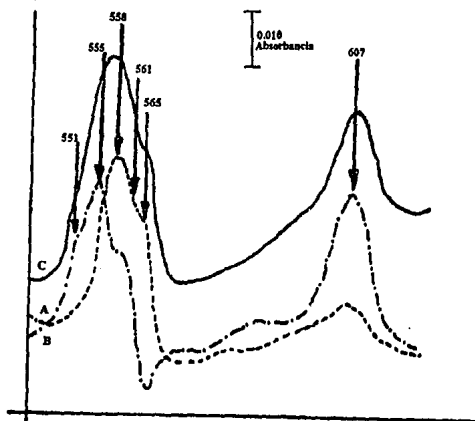


Figura 11. Espectros diferenciales realizados con CO, (ditionita reducida- ditionita CO), a temperatura ambiente, (Sharpless y Butow, 1970 a y b).

Encontraron también un pico pequeño cercano a 593 nm. Hubo un segundo componente el cual reacciona más lentamente con el CO generando un pico a 421 nm y un valle a 430 nm en la región de la banda alfa, (561 nm), aparentemente debido al cambio del acortamiento de la absorción de la banda originalmente encontrada cerca de los 560 nm. El cianuro induce, en la muestra reducida con sustrato, que en el espectro de los citocromos aparezca como un pico simétrico y una inclinación dependiente a 422 y 433 nm respectivamente. Webster y Hackett en 1965, Chance en 1953 y Jones y Redfearn en 1967 encontraron resultados similares en espectros cuando utilizaron a Astasia longa y algunas bacterias. Estos resultados sugieren la existencia de una o más vías alternas a la cadena de transporte de electrones descrita normalmente, también sugieren que la fuente de carbono utilizada puede inducir la presencia de dichas vías o inclusive sobreexpresarse.

El uso de antimicina para la reducción de citocromos tipo b por Bonner en 1965 y aplicado por Sharpless y Butow (1970), mostró una resolución del traslapamiento de las bandas alfa en la región de alrededor de los 558 nm. En la figura 12 en el espectro A encontraron la presencia de dos citocromos tipo b a 558 y 565 nm, en algunos experimentos observaron la presencia de un tercer tipo de citocromo b a 561 nm que fue claramente resuelto según lo muestran las figuras 11 y 12 comparativamente. En el espectro B haciendo diferenciales (succinato + CN<sup>-</sup>)-(succinato + antimicina) encontrándose una pendiente a 552 nm y un pico a 555 nm indicando la presencia de dos citocromos c. La característica principal en la región entre 555 nm y 565 nm es algo compleja y puede deberse al cambio en las bandas alfa de la unión del cianuro con el citocromo mencionado, (ver Figura 12).



**Figura 12.** Espectros diferenciales realizados a temperatura de Nitrógeno líquido.  
 A:) Succinato + Antimicina - Oxidado  
 B:) Succinato + KCN - Succinato + Antimicina  
 C:) Ditionita - Oxidado

No obstante Sharpless y Butow sugieren que parte de la pendiente a 560 nm es debida al citocromo b el cual no conviene reducir totalmente en presencia de antimicina.

La Tabla III muestra los datos de los espectros diferenciales para los citocromos en *Euglena*. El contenido de citocromo oxidasa en todas las preparaciones tienen un promedio de  $0.25 \mu\text{mol}/\text{mg}$  de proteína mitocondrial basándose en las mediciones a temperatura ambiente en la banda alfa a 608 nm con 625 nm como longitud de onda de referencia y considerando un coeficiente de extinción de  $10\text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ , (Yenetani, 1968). La comparación de todo el espectro diferencial sugiere que todo el citocromo tipo c a 555 nm, (Soret a 423 nm) se pierde parcialmente

durante la preparación de las mitocondrias, y por tanto se observa una gran variabilidad en el espectro mitocondrial. Por esta razón Sharpless y Butow identificaron este componente como el citocromo tipo c soluble aislado y caracterizado por Perini, Kamen y Schiff en 1964 y designado en *Euglena* como citocromo 556; Devars y colaboradores (1992) realizaron una serie de experimentos cuantificando el contenido de citocromo aa<sub>3</sub> y el contenido de citocromo o, encontrando que la relación citocromo o/aa<sub>3</sub> puede explicar la sensibilidad al cianuro en mitocondrias de células crecidas en diferentes sustratos.

**TABLA III.** Mostrando los resultados de los espectros diferenciales realizados por Sharpless y Butow.

	banda alfa máxima	Soret max.	Otros factores	
Tipo	nm	intensidad	nm	
a	607	1.0	453	
a	(593?)	(0.3)	444	Se une rápidamente con CO.
b	565	1.0	431	Aumentado con antimicina
b	561	1.9	(428?)	A uno de estos se une lentamente al CO y al cianuro.
b	558	2.2	(437?)	
c	555	1.8	422	citocromo c soluble
c	551	1.0	(419?)	

Sharpless y Butow no detectaron diferencias cualitativas entre los espectros inducidos por succinato y por D-lactato, hay sin embargo, una diferencia cuantitativa en el grado de fomentar la reducción de los citocromos tipo b en la adición de antimicina, dando un incremento de 3 a 4 veces mas para succinato que para lactato. Estos resultados sugieren más de una vía alterna aunque probablemente sea que debido al tratamiento que los autores le dan a las mitocondrias, se puedan desplazar

algunos picos o valles lo cual pueda llevar a una interpretación errónea, al respecto esperamos aplicar estos experimentos y de ser posible mejorarlos aplicando una mejor resolución al realizar los espectros utilizando inclusive bajas temperaturas.

## OBJETIVOS EXPERIMENTALES

### Objetivo General:

Determinar la expresión de la cadena alterna en células crecidas en diferentes fuentes de carbono en mitocondrias de *Euglena* para describir la posible función y la expresión de oxidasas terminales de transporte de electrones.

### Objetivos particulares:

1.-Medir y comparar la oxidación de diversos sustratos en mitocondrias de *Euglena gracilis* crecida en medios de cultivo con etanol, glutamato-malato, glutamato-malato mas cianuro y peptona como fuentes de carbono.

2.-Verificar la integridad mitocondrial mediante la determinación del potencial transmembranal, control respiratorio y ADP/O en mitocondrias obtenidas de células crecidas en medio de etanol, glutamato-malato y peptona.

3.-Verificar la susceptibilidad de estas mitocondrias a varios inhibidores. Comparar éstos resultados con mitocondrias de células crecidas en otras fuentes de carbono.

4.-Cuantificar y comparar el contenido de citocromo b tipo o en mitocondrias de células crecidas en etanol, glutamato-malato, glutamato malato más cianuro y peptona.

5.-Evaluar la capacidad de síntesis de ATP y el transporte de  $Ca^{2+}$  en mitocondrias de células crecidas en etanol como fuente de carbono.

## MATERIAL Y METODOS

### Cultivos:

Se utilizó una cepa de Euglena gracilis con un tiempo de generación de 10-14 horas, las células se crecieron en la obscuridad a temperatura ambiente (20-25°C) y con agitación constante, (61 rev./min.). El medio de cultivo se preparó según el cuadro I con la siguiente modificación: para las células crecidas en medio de etanol como fuente de carbono, el glutamato y el malato se omiten para la preparación. A cada litro de medio se le agregaron 10 ml de vitaminas esterilizadas por filtración.

**Cuadro I.** Medio ácido organotrófico de Hutner 1956.  
concentración final (%)  
(1 litro)

CaCO <sub>3</sub>	0.02
Fuente de Carbono:	
ácido glutámico	0.05
ácido DL-málico	0.2
Minerales	
MgSO <sub>4</sub>	0.05
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.08
ZnSO <sub>4</sub>	0.009
MnSO <sub>4</sub>	0.008
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.002
CoCl <sub>2</sub>	0.00016
CuSO <sub>4</sub>	0.00039
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.00028
NaI	0.000012
FeCl <sub>3</sub>	0.00005
Vitaminas	
Disulfuro de tiamina	0.01
Clorhidrato de piridoxal	0.001
Cianocobalamina	0.1

Para adaptar células que crezcan en presencia de cianuro, se preparó un medio con glutamato/malato como fuente de carbono descrito por Hutner y cols., en 1956 y modificado por Schiff, 1971.

Los medios de cultivo se ajustaron a pH 3.5 con HCl y se esterilizaron por calor húmedo a 15 libras por pulgada cuadrada de presión con un tiempo de 40 minutos. El etanol se agregó después de la esterilización, (previamente esterilizado por filtración) a una concentración de 178mM (10 ml de etanol por litro de medio). Las vitaminas se esterilizan por filtración para evitar daños en su estructura química. Cuando se requirió el cianuro se esterilizó por filtración y se añadió a una concentración final de 0.1-0.2mM.

#### **Curvas de crecimiento:**

Las células se mantuvieron por 3 o cuatro semanas, resembrando cada tercer o cuarto día, (fase log tardía), posterior a la inoculación con el objeto de sincronizar y adaptar a las células al medio de cultivo correspondiente. En matraces Erlenmeyer de 250 ml; se adicionaron 150 ml de medio de cultivo; se contaron las células necesarias para inicio de la curva de crecimiento y se inocularon a una concentración de  $0.2 \times 10^6$  células/ml, (10-12 ml de células previamente adaptadas a un medio con etanol como fuente de carbono por varias generaciones).

Se realizaron transferencias de las células al medio de etanol y al medio de Hutner adicionadas de cianuro por varias generaciones antes de realizar el trabajo experimental, (cuatro o más generaciones). Las células fueron crecidas en 900 ml de medio de cultivo a una concentración inicial de  $0.2 \times 10^6$  células/ml.



Las células se contaron en una cámara de Neubauer y se calcularon los mililitros de células para inocularse según la siguiente fórmula:

$$\text{X ml de células} = \frac{(0.2)(\text{ml de medio})}{(X)(\text{dilución}):1000}$$

donde:

X ml de medio: Cantidad de medio requerido para ajustar la concentración necesaria.

X: promedio del número de células contadas en todos los cuadros de la cámara de Neubauer (cuadros utilizados para contar leucocitos).

Dilución: Sólo en caso de ser necesario.

Para realizar la curva de crecimiento se utilizaron de 100 a 200 ml de medio de cultivo en matraces Erlenmeyer de 500 ml, las células se contaron cada 12-15 horas de crecimiento por espacio de 5 o 6 días hasta obtener los puntos necesarios para hacer la curva; para ello se tomaron alícuotas de 0.1 ml. Para contar a las células se utilizó HCl diluido 1:5 para inmovilizarlas (pH aproximado 2).

#### **Obtención de las células en fase log, log tardía:**

Las células se colectaron por centrifugación, (al cuarto día de la siembra), a 1780xg (3500 rpm) por 13 minutos; se lavaron con medio SHE (Sacarosa 250mM, HEPES 10mM; EGTA 2mM, pH 7.2), se centrifugaron a 327xg (1500 rpm), por 5 min.; se realizó un segundo lavado con medio SHEA (Sacarosa 250mM, HEPES 10mM; EGTA 2mM; Albúmina delipídada 0.2%), a una temperatura de 0-4°C, se centrifugó dos veces a 327xg, (1500 rpm)

### **Obtención de las mitocondrias:**

Las mitocondrias se obtuvieron por sonicación y centrifugación diferencial basándose en el método introducido por Moreno-Sánchez y Raya en 1987 y mejorado por Uribe y Moreno-Sánchez en 1992. Después de lavar a las células, se sonicaron en un sonicador Soniprep 150 con una punta de 0.5 cm de diámetro a  $10\mu\text{m}$  de amplitud (70% de potencia máxima del sonicador), durante 10 segundos, dos ciclos; reposando 50 segundos, para el caso de las células crecidas en etanol; para las células crecidas en Hutner mas cianuro, se sonicaron a  $15\mu\text{m}$  de amplitud por 15 segundos, dos ciclos, con un tiempo de reposo de 50 segundos, (en baño de hielo a  $4^{\circ}\text{C}$ ) el sonicado se llevó a un volumen aproximado de 40-50 ml con medio SHEA y se centrifugó a  $581\times g$  (2000rpm), por 10 minutos.

El sobrenadante se centrifugó a  $8714\times g$  (8500 rpm) por 10 minutos; las mitocondrias se resuspendieron en 0.1-0.2 ml de medio SHEA, se incubaron por 10 min con 0.25 ml de albúmina delípida al 5% y 0.025 ml de ADP 0.2M (ajustado a pH 7.2 con tris); transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a  $8714\times g$  (8500 rpm) por 10 minutos; el paquete mitocondrial se resuspende en la mínima cantidad de medio SHEA.

La concentración de proteína mitocondrial se midió por el método de Biuret, (Gornall, Bardawill y David, 1949), en presencia de 0.1% (peso/volumen) de desoxicolato de sodio; se realizó una curva estándar de proteína utilizando albúmina (10mg/ml). Para eliminar la turbidez ocasionada por el paramilo (enlace glicosídico  $\beta$ -1-6) los tubos se centrifugaron a 3000rpm durante 5min. a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Se realizaron métodos comparativos entre las determinaciones de proteína utilizando para ello el método de Megraw, Kleiman, Rabson o método de enlace del colorante (Doumas, 1975); Este método contiene verde de bromo cresol como reactivo de coloración, este reacciona con la albúmina en forma específica dentro de los primeros 30 segundos de reacción; sin embargo al sobrepasar este intervalo de tiempo, la prueba se

hace totalmente inespecífica, por lo que es capaz de reaccionar con peptidos y proteínas remanentes encontradas en la muestra, (Gustafsson, 1976); el método de absorción en uv, (Murphy y Kies, 1960); el método de Bradford, (1976) y el método de Lowry, (1951). Se encontró que el método más sensible para la determinación de la proteína es el de enlace del colorante, debido a que puede detectar concentraciones de proteína alrededor de 1mg de proteína, utiliza un detergente que puede ser Tritón X-100 o algún otro detergente, el pH del manejo de esta técnica es de alrededor de 4 y el color que tiene este reactivo es amarillo; por lo que para la determinación de la proteína en mitocondrias de *Euglena*, que tienen un color amarillo o amarillo-naranja, este no afectó las mediciones.

El método de absorción en el rango de uv 215-225 nm, (Murphy y Kies 1960), mostró similitud de detección de proteína respecto al método de enlace del colorante, es decir que la concentración de proteína detectada por este método es similar en concentración a la detectada por el método de enlace del colorante; en contraste con el método de Biuret el cual se torna de un color verde claro e inclusive de color gris dependiendo de la cantidad de proteína mitocondrial adicionada; este último método presentó desventajas respecto al método de enlace del colorante por la sobreestimación de los valores; sin embargo, para nuestros fines se utilizó el método de Biuret. A continuación se muestran los datos obtenidos en una curva de proteína con los métodos de Biuret y Megraw, Kleiman y Rabson, (ver Figura 13).

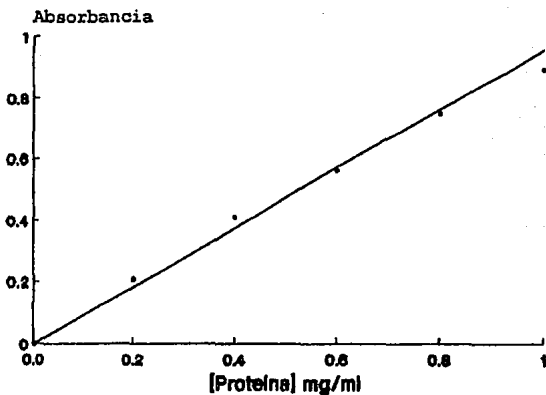
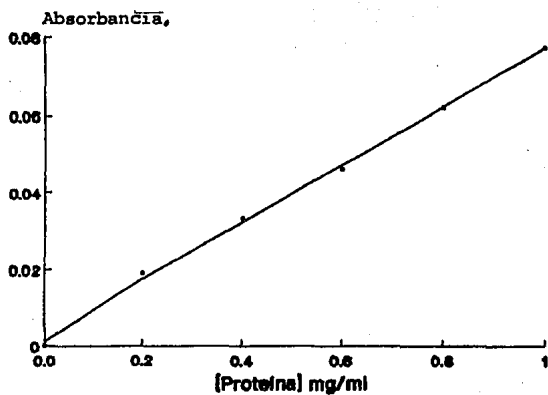


Figura 13. Muestra las curvas patrón para la determinación de proteína mitocondrial en la parte superior se muestra la curva realizada por el método de Biuret y en la parte inferior el método de enlace del colorante, como puede verse, el segundo método puede detectar proteína alrededor de 1mg/ml, el método de Biuret puede detectar concentraciones mucho más elevadas.

### Potencial de membrana:

Para verificar la integridad de la membrana mitocondrial se determinaron potenciales de membrana. Para estos fines se utilizó un medio que contiene sacarosa 16.35mM; KCl 50mM; HEPES (N-2-hidroxietil piperazina) 10mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10mM; acetato de sodio 10mM; a pH 7.2 (Chávez y cols., 1987), y el medio KME que contiene KCl 120mM, MOPS 20mM, EGTA 2mM y fosfato 5mM.

Se utilizó un espectrofotómetro de doble haz, utilizando dos longitudes de onda (511-533 nm); como indicador de potencial membranar se utilizó safranina (5 $\mu\text{M}$ ), (Akerman y Wilkström, 1976), colorante para bacterias cargado positivamente con gran afinidad para los lípidos, (Bally y cols., 1984), esto le permite penetrar la membrana mitocondrial y probablemente tenga un efecto desacoplante sobre el transporte electrónico y la síntesis de ATP, sin embargo, a la concentración utilizada no se observan estos efectos, (ver Figura 14). Para colapsar el potencial membranar se usó CCCP (m-clorofenilhidrazona carbonil cianuro) (0.001mM) que se encuentra cargado negativamente.

Se utilizó lactato como sustrato de oxidación así como la utilización de ATP, la caída del potencial se realizó con oligomicina o CCCP cuando se utilizó ATP y CCCP para el caso del L-lactato. La proteína se adicionó a razón de 3-4mg/2.5ml.

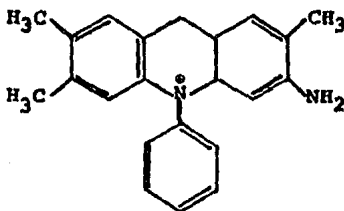


Figura 14. Estructura química de la Safranina

### **Oxidación de sustratos e inhibición:**

Como medio de consumo de oxígeno por las mitocondrias, se utilizó KME más fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5mM). Los sustratos se adicionaron a las siguientes concentraciones: NADH 1mM, L-lactato 10mM, D-lactato 10mM, succinato 10mM, glutamato más malato (7.5/5mM respectivamente), 2-oxoglutarato 10mM; todas las mediciones de consumo de oxígeno se realizaron con un electrodo tipo Clark a 25°C.

Los inhibidores utilizados se preincubaron 5 minutos en presencia de 1mg/ml de proteína mitocondrial con las siguientes concentraciones finales rotenona 0.05mM; disulfiram 0.5mM; SHAM (ácido salicílico hidroxámico) 0.5mM; DPA (difenilamina) 0.25mM; oligomicina 0.01mM; cianuro de potasio 0.1mM; HQNO (2-heptil-4-hidroquinolin-N-óxido) 0.01mM; mixotiazol 0.01mM; antimicina 0.01mM.

### **Actividad de citocromo oxidasa:**

En una cámara de incubación se añadió ascorbato 7mM, antimicina 0.005mM, en 1.9 ml de medio KME (KCl 120mM, MOPS 20mM, EGTA 2mM); después de un tiempo de incubación (1-2min), en presencia de 1mg/ml de mitocondrias, se adiciona TMPD (tetrametil p-fenilendiamina) 0.34mM, y se inhibe su actividad por la adición de  $\text{N}_3^-$  (azida de sodio), 20mM o cianuro 1mM, (Moreno-Sánchez y cols., 1991).

### **Espectros diferenciales en presencia de monóxido de carbono (CO):**

Los espectros se realizaron según el método descrito por Devars y cols. en 1992. Se utilizaron mitocondrias reducidas con ditionita, utilizando medio KME (KCl 120mM, MOPS 20mM, EGTA 2mM, pH 7.2) diluido con glicerol 1:1 (v/v), se adicionaron en cubetas con volumen idéntico a una concentración de proteína mitocondrial de 3-4mg/ml a 25°C. Una muestra experimental se burbujeo por 30 segundos, para revelar el citocromo  $\text{aa}_3$ , o por 16 minutos para revelar el citocromo o;

el espectro diferencial se realizó respecto a la muestra sin tratamiento con CO. El traslapamiento del citocromo aa<sub>3</sub> y el del citocromo o se eliminó por el burbujeo con CO de la cubeta de referencia por 30 segundos. El contenido de citocromos o y aa<sub>3</sub> fue estimado usando los coeficientes de extinción molar reportados para bacterias: (428.5-445 nm) = 148mM<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup> para los citocromos (a+a<sub>3</sub>) y (418-430 nm) = 160mM<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup> para el citocromo o.

#### **Transporte de Ca<sup>2+</sup>:**

El transporte de calcio se midió por el método descrito por Uribe y cols., (1994), siguiendo los cambios de absorbancia de arsenazo III a 675-685nm, (Scarpa y cols., 1978), utilizando un espectrofotómetro de doble haz, con agitación constante; con aereación y 25°C de temperatura. El medio utilizado para las mediciones consistió en una solución de sacarosa, 100mM; HEPES-tris, 10mM; fosfato, 5mM; L-lactato-tris, 10mM con un pH final de 7.2.

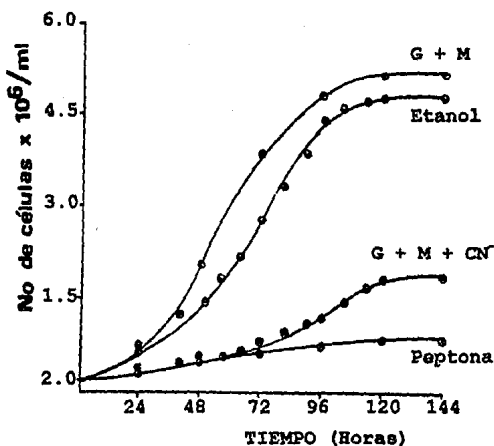
## RESULTADOS Y DISCUSION

### Curvas de crecimiento:

La velocidad de crecimiento celular de Euglena gracilis con etanol como única fuente de carbono fue de tipo sigmoidal. La figura 15 muestra el crecimiento de células de Euglena gracilis en diferentes fuentes de carbono; en estos medios aún después del 5° o 6° día, las células continúan con su movilidad por lo que probablemente continúan reproduciéndose, esto probablemente es debido a la activación de la cadena alterna en condiciones en las cuales ha disminuido el aporte de oxígeno por incremento en la población celular. También durante este período, se aumentó la capacidad de síntesis de pigmentos como los carotenos, esto se observó cuando se obtuvieron las células posteriormente a la fase log, inclusive posteriores a la fase estacionaria, que presentaron pigmentos de color rojo naranja (alrededor del sexto o séptimo día), en contraste con las células obtenidas en fase log temprana o log media, que presentaron pigmentos de color amarillo naranja, (ver Figura 15).

Simultáneamente a este hecho, se observaron también agrupaciones celulares de tipo macroscópico en la fase estacionaria de crecimiento; al igual que los hongos y algunas bacterias del género **Bacillus**, que forman estructuras de resistencia (esporulación), (Brock, 1987), la **Euglena** también presenta estas estructuras denominadas quistes, (Brock, 1987), al igual que **Entamoeba sp.** y algunos otros protozoarios, (Zaman, 1984); los quistes de **Euglena** se conglomeran alrededor de una masa mucilaginosa lo cual permite a la célula sobrevivir por tiempos prolongados; esta fase de enquistamiento se observa en lugar de una fase de muerte encontrada en bacterias las cuales tienen un comportamiento de crecimiento de tipo Gaussiano.





**Figura 15.** Curvas de crecimiento de células en diferentes medios de cultivo, las células se sembraron en matraces Erlenmeyer de 500 ml con los medios mostrados en la gráfica; el crecimiento celular se siguió por espacio de 5 días; el etanol se adicionó a una concentración final de 178mM; el cianuro se adiciona a una concentración de 0.1mM; ambas sustancias se esterilizaron por filtración utilizando membranas de nitrocelulosa de 0.22  $\mu$ m de tamaño de poro. Todas las células excepto las crecidas en peptona crecieron en presencia de 2ml de vitaminas.

Se obtuvieron curvas de crecimiento de células crecidas en medio con etanol, las células se siguieron por espacio de 16 días demostrando que en estas condiciones las células tardan 8-10 días en alcanzar su fase estacionaria; encontramos que inclusive alrededor del día 13-15, la movilidad celular continúa latente, aunque el número de células permanezca invariable, es decir, que posiblemente no se duplican o que

su reproducción sea tan lenta que no sea posible detectarse excepto por períodos prolongados de conteo celular, (ver Figura 16).

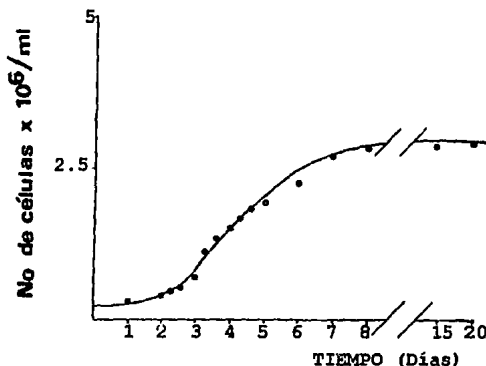


Figura 16. Curva de crecimiento de células crecidas en etanol como fuente de carbono; el crecimiento fue seguido hasta los 20 días presentando movilidad; el conteo de células se realizó en una cámara Neubauer; las células se inmovilizaron con HCl al 5%; o en su defecto por efectos de alcohol residual, que quedan después de limpiar la cámara.

Sin embargo, se han observado modificaciones en la morfología de la *Euglena*, por ejemplo, durante las primeras horas, las células permanecen inmóviles, posteriormente, comienza la movilidad celular ocurriendo esta alrededor de las 24-36 horas; simultáneamente la duplicación también comienza alrededor de este período de tiempo.

Se realizaron curvas de crecimiento celular en presencia de diferentes concentraciones de etanol, buscando las condiciones favorables para el crecimiento celular, así como la inducción de la síntesis de la cadena alterna; para lo cual demostramos que con 10ml de etanol, se obtenía el mejor crecimiento celular, mientras que con una concentración de 89mM (5 ml), el crecimiento celular disminuía; sin embargo, si se adicionan 15 ml de etanol (267mM) el crecimiento celular se abate

drásticamente, por lo que esta concentración resulta ser tóxica para la célula.

También se observó un incremento de material intracelular, por lo que durante este período, las células parecen hincharse y tomar un aspecto negruzco intracelularmente, alrededor de las 72-96 horas las células se alargan hasta aproximadamente. El material celular disminuye y la movilidad celular se incrementa; finalmente después de las 100 horas de crecimiento celular, las células toman el aspecto encontrado alrededor de las 36 horas de crecimiento, permaneciendo la movilidad durante este período hasta alcanzar la fase estacionaria, período en el cual las células adoptan la forma elipsoide y posteriormente adquieren la forma circular; durante este período no se pierde la densidad del material celular interno. Cabe señalar que estos fenómenos se encontraron en células crecidas a temperatura ambiente (20-25°C) y a una velocidad de agitación de 120 rpm; si se incrementan estos parámetros (temperatura y velocidad de agitación), el tiempo en el cual se alcanza la fase log de crecimiento se acorta por lo menos algunas horas y la densidad celular se incrementa rápidamente, por lo que la fase estacionaria se alcanza más rápido.

Esto puede deberse a que por la agitación, la concentración de oxígeno en el medio de cultivo sea lo suficientemente alta de tal manera que la cadena alterna no pueda ser activada y por tanto el crecimiento celular sea debido a la obtención de energía por la cadena de transporte de electrones clásica. Esto también quiere decir que además de la fuente de carbono, la concentración de oxígeno puede ser crucial para la inducción de la cadena alterna y además se relacione con su funcionamiento. Este fenómeno se observó únicamente en células crecidas en etanol, en contraste con células crecidas en glutamato-malato, peptona y glutamato-malato más cianuro, (ver Figura 17 y 15).

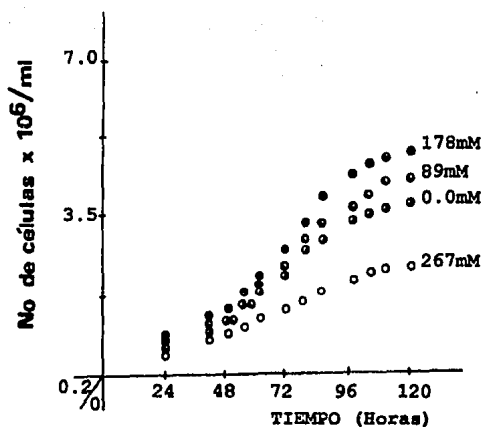


Figura 17. Curva de Crecimiento de *Euglena gracilis* crecida en medio de etanol como única fuente de carbono a diferentes concentraciones.

Estas células alcanzan su fase estacionaria e inmediatamente se enquistan formando masas mucilaginosas.

Las células presentan formas estructurales diferentes inclusive entre sí mismas; las células crecidas con glutamato-malato presentaron una estructura alargada; las células crecidas en peptona presentaron un tamaño más pequeño y tienen estructura ovalada; las células crecidas en etanol presentaron variación en la estructura como se describió anteriormente; respecto a las células crecidas en glutamato-malato más cianuro, se encontró un comportamiento similar a las células crecidas en glutamato-malato; sin embargo, estas células tendieron a blanquearse (menor síntesis de pigmentos).

Para los experimentos realizados con las mitocondrias, se utilizaron células cosechadas en fase logarítmica o logarítmica tardía, para lo cual, las células se cosecharon en el tercer o cuarto día.

Con fines comparativos, también se realizaron curvas de crecimiento celular respecto a diferentes tipos de células crecidas en diferentes sustratos (glutamato-malato, glutamato-malato más cianuro y peptona) encontrando que el mejor crecimiento lo producen las células crecidas en glutamato-malato, posteriormente las células crecidas en etanol, continua con las células crecidas en glutamato-malato + cianuro y finalmente con las células crecidas en peptona:

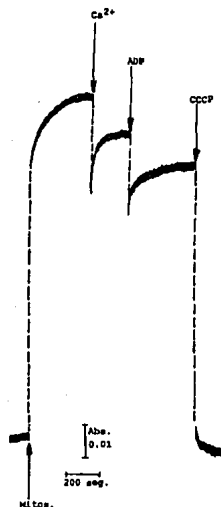
**[Glutamato-malato > Etanol > Glutamato-malato + CN<sup>-</sup> > Peptona]**

El crecimiento celular donde se alcanza el máximo de población es como sigue: para las células crecidas en glutamato-malato,  $5.7 \times 10^6$  células/ml; para las células crecidas en etanol, de  $4.7 \times 10^6$  células/ml; para las células crecidas en glutamato-malato + cianuro, de  $1.8 \times 10^6$  células/ml y de  $0.9 \times 10^6$  células/ml para las células crecidas en medio de peptona, (ver Figura 15).

#### **Potencial de membrana:**

Las mitocondrias obtenidas de las células crecidas en etanol como fuente de carbono, no presentaron la estimulación por ADP en los trazos de oximetría, por tanto los parámetros ADP/O y el control respiratorio no se pudieron determinar. Este hecho nos hizo pensar que posiblemente la obtención de mitocondrias por sonicación estaba dañando la estructura membranal de las mismas así que entonces evaluamos parámetros que permitieran corroborar el daño si es que existía.

Utilizamos la medición del potencial de membrana como primer recurso; al respecto encontramos que las mitocondrias generaban potencial membranar utilizando todos los sustratos, habfa captación de calcio y se colapsaba con CCCP, (ver Figura 18).



**Figura 18.** Muestra los efectos de captación de  $\text{Ca}^{2+}$ , y el colapsamiento con CCCP; el medio utilizado en este caso es el reportado en material y métodos; el sustrato utilizado es lactato a una concentración de 10mM y la proteína se adiciona a razón de 3mg/ml, se utilizaron en las adiciones  $\text{Ca}^{2+}$  0.2mM, ADP 0.4mM y CCCP  $3\mu\text{M}$ ; el indicador de potencial de membrana (safranina) se utilizó a una concentración de  $5\mu\text{M}$ .

Para demostrar si la cadena alterna aportaba un gradiente de protones ( $\text{H}^+$ ) debida a la oxidación de sustratos que pueden dirigirse por la oxidasa alterna, se inhibió la cadena de transporte de electrones clásica, de tal manera que las mitocondrias pudieran generar un potencial de

membrana; siendo esta una forma experimental en la cual se pudiera evaluar la síntesis de ATP por la cadena alterna u oxidasa alterna, además de que esta energía sea suficiente para evaluar el transporte de metabolitos y el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Entonces se utilizaron los inhibidores de la cadena de transporte de electrones y se observaron sus efectos. Encontramos que no había colapsamiento del potencial membranar cuando se utilizaba cianuro a una concentración de 0.1mM. Esta concentración de cianuro fue utilizada debido a que Uribe y Moreno-Sánchez (1992), demostraron que existían 2  $K_i$ 's para cianuro, ( $5\mu\text{M}$  y de  $42.5\mu\text{M}$  utilizando lactato como sustrato), así que la concentración de 0.1mM inhibe totalmente la actividad de la citocromo oxidasa en la cadena de transporte de electrones clásica y mantiene activa la cadena alterna, (utilizando lactato y succinato como sustratos, con estos sustratos se encontró el mejor estímulo de potencial transmembranar), (ver Figura 19 A,B).

A

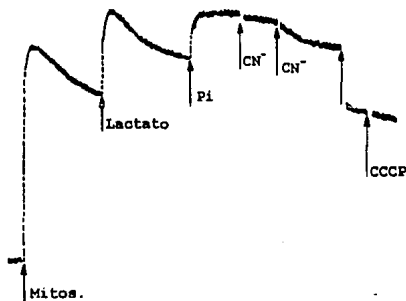


Figura 19A. El potencial de membrana se realizó como se indica en material y métodos, (proteína 3-4mg ml). La adición de cada trazo se realizó como se indica: lactato 10mM, Pi 5mM,  $\text{CN}^-$  100 $\mu\text{M}$  y CCCP 1 $\mu\text{M}$ .

B

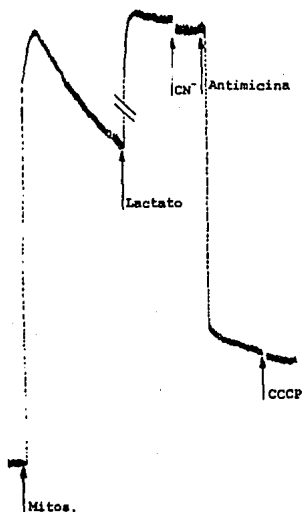
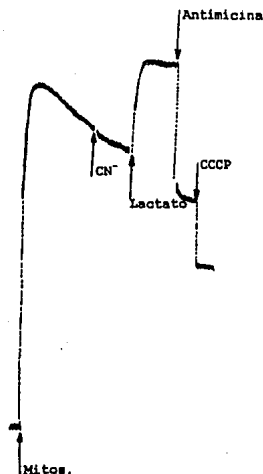


Figura 19B. Para la medición del potencial de membrana se prosiguió como se indica en la sección de material y métodos. La adición se realizó como sigue: lactato 10mM,  $\text{CN}^-$  100 $\mu\text{M}$ , antimicina 0.01mM, CCCP 1 $\mu\text{M}$  y Pi 5mM.

El colapsamiento del potencial de membrana se observó cuando se añadió CCCP (desacoplante ionóforo de  $\text{H}^+$ ). Este colapsamiento del potencial de membrana se observó también cuando se utilizó antimicina a una concentración de 0.01mM, lo cual sugiere que posiblemente la antimicina pueda actuar como desacoplante y al mismo tiempo como inhibidor del sitio II de la cadena de transporte de electrones, (ver Figura 19 B,C).



C



**Figura 19C.** Se muestra el potencial transmembranal de mitocondrias de *Euglena* medido como se indica en material y métodos, las adiciones de los trazos se realizaron como se indica: lactato 10mM,  $\text{CN}^-$  0.1mM, antimicina 0.01mM, y CCCP  $1\mu\text{M}$ .

Aunque la antimicina también podría bloquear el aporte de sustrato a la cadena alterna además de inhibir el complejo  $\text{bc}_1$  y por tanto observarse estos efectos, (ver Figura 7B); una segunda adición de desacoplante CCCP a la preparación en presencia de antimicina, colapsa muy poco el potencial de membrana; nuestras observaciones indican que el mixotiazol y el HQNO no tienen efecto desacoplante como lo tiene la antimicina al respecto, el mixotiazol solo abate el potencial membranar alrededor de un 5-10% y HQNO abate el potencial alrededor de un 10-15%, (ver Figura 19 D,E,F).

D

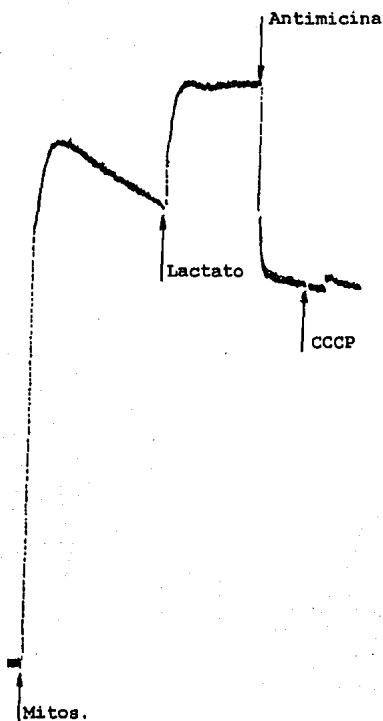


Figura 19D. El potencial transmembranal se realizo como se indica en material y métodos con las siguientes adiciones: lactato 10mM, antimicina 0.01mM, Pi 5mM y CCCP 1 $\mu$ M.

E

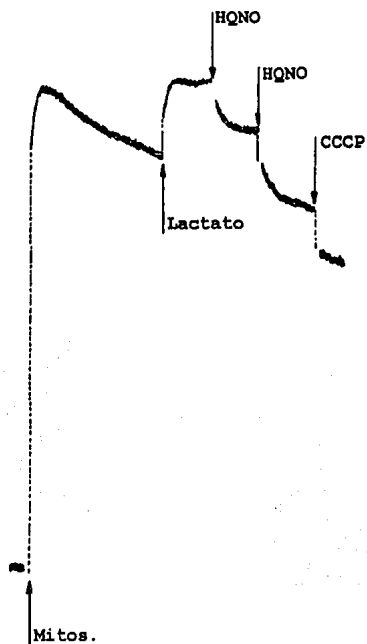
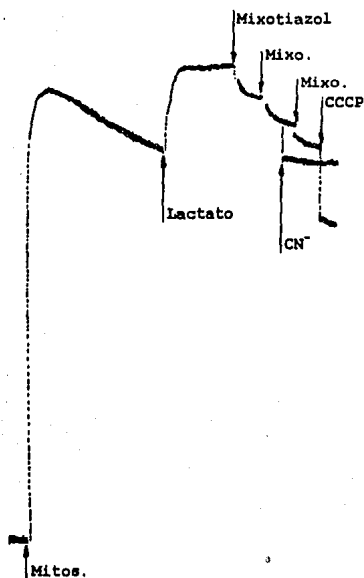


Figura 19E. Se muestra el potencial de membrana de mitocondrias de Euglena medio según la sección de material y métodos las adiciones se realizaron como se indica: lactato 10mM, HQNO 10 $\mu$ M y CCCP 1 $\mu$ M.

F

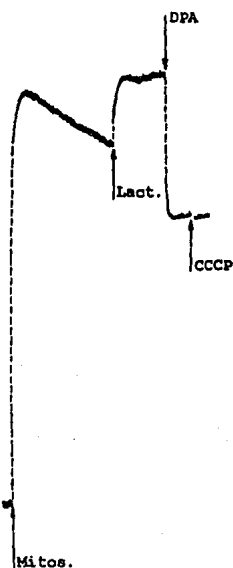


**Figura 19F.** El potencial transmembranal fue medido como se indica en material y métodos las adiciones se realizaron según en la figura 19E. La concentración de mixotiazol se utilizó a 0.006mM.

La adición de DPA colapsa el potencial de membrana, este último inhibidor parece comportarse como desacoplante, sin embargo, su efecto puede deberse a la inhibición de la oxidación del L-lactato por la cadena de transporte de electrones alterna al mismo tiempo que también disminuye el aporte de este sustrato a la oxidasa alterna; lo cual sugiere que la oxidación de L-lactato se dirige preferencialmente por la cadena alterna, (ver Cuadro 3A).

Sin embargo debido a que también hay oxidación de sustrato por la cadena de electrones clásica, este no aporta las necesidades energéticas necesarias para que se realice el potencial membranal, lo que sugiere que la velocidad de oxidación de sustrato sea más elevada por la oxidasa alterna en contraste con la cadena de transporte de electrones clásica; por lo tanto la oxidación del lactato es importante para la formación del gradiente de protones ( $H^+$ ) necesaria para la síntesis de ATP, de tal manera que la disminución en la síntesis de energía es debida a que baja la formación del gradiente de  $H^+$  por la exclusividad de oxidación de L-lactato, (ver Figura 19 G y Cuadro 3A).

G



Figuras 19G. El potencial transmembranal se realizó con el medio como se indica en la sección de material y métodos, (proteína 3-4mg/ml). La adición se realizó como se indica a continuación: DPA 0.25mM, Pi 5mM y CCCP 1 $\mu$ M.

El potencial membranar inducido por la hidrólisis de ATP también se colapsa por la adición de CCCP y por la adición de oligomicina, esta última presentó un efecto inhibitorio de potencial membranar de tipo parcial; los controles respecto a estos potenciales se realizó incubando con CCCP u oligomicina antes de adicionar las mitocondrias, (ver Figura 20 A, B, C).

A

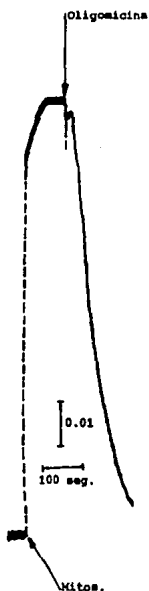


Figura 20A. El potencial se realizó en presencia de 3mg/ml de protefina, ATP 3mM, colapsandolo con oligomicina 0.01mM y CCCP 3 $\mu$ M.

B

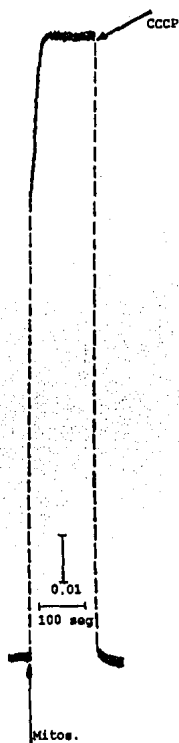


Figura 20B. Se muestra el potencial de membrana de mitocondrias de *Euglena* (3mg/ml) en presencia de ATP 3mM, colapsandolo con CCCP 3 $\mu$ M.

C

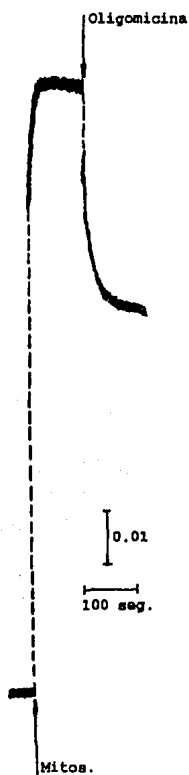


Figura 20C. El potencial de membrana se realizó en presencia de proteína 3mg/ml y ATP 3mM, colapsandolo con oligomicina 0.01mM.



D

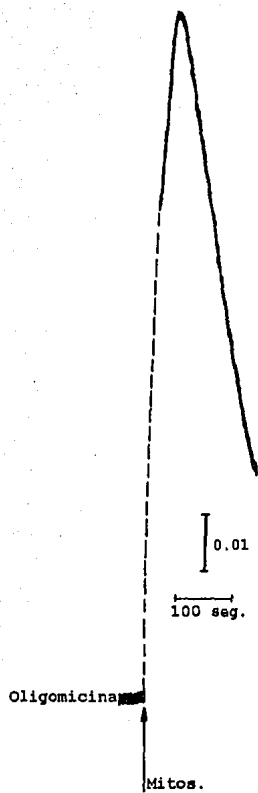


Figura 20D. El potencial de membrana se realizó en presencia de ATP 3mM, protéina (3mg/ml) y fue colapsado con oligomicina 0.01mM.

E

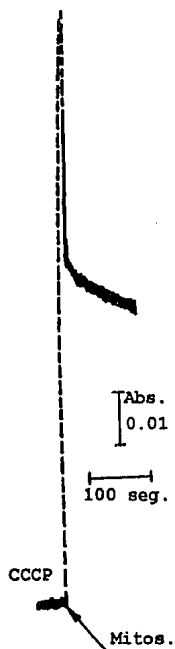


Figura 20E. El potencial de membrana se realizó en presencia de 3mg/ml de proteína, ATP 3mM, colapsándolo con CCCP 3 $\mu$ M.

F

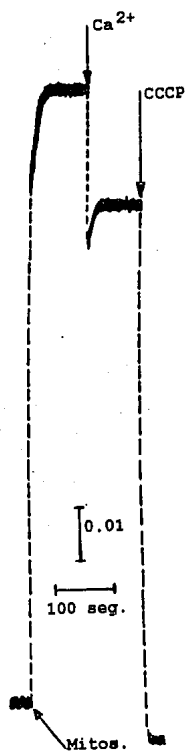


Figura 20F. El potencial se realizó en presencia de ATP 3mM; proteína 3mg/ml; el potencial se colapso con CCCP 3 $\mu$ M.  $\text{Ca}^{2+}$  250  $\mu$ M.

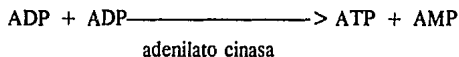
### Oxidación de Etanol y actividad de citocromo oxidasa:

El cuadro 2 muestra la oxidación de sustratos por mitocondrias de células crecidas en etanol: la oxidación de etanol, la oxidación de D-lactato y la actividad de citocromo oxidasa, este experimento se realizó para determinar la posible existencia de la alcohol deshidrogenasa en mitocondrias, como lo habían descrito anteriormente Mego y Farb (1974); al respecto encontramos que la oxidación de etanol es bastante baja considerando que la proteína inclusive se incrementó hasta 2.5-3mg/ml; la oxidación de etanol por las mitocondrias también podría indicar que existen contaminantes de citoplasma que pueden dar resultados falsos positivos; respecto a la oxidación de D-lactato, puede decirse que esta es superior a la oxidación de L-lactato lo cual sugiere la posibilidad de preferencias por oxidación de sustratos (afinidad); incrementando la afinidad por la oxidación de D-lactato que por L-lactato, inclusive, puede deberse a la existencia de dos enzimas diferentes que catalizan la reacción. La actividad de citocromo oxidasa se realizó como indicador de membrana interna mitocondrial y como estudio comparativo entre los diferentes tipos de mitocondrias.

**Cuadro 2:** Oxidación de varios sustratos incluyendo la actividad de citocromo oxidasa: para los experimentos se utilizó el medio KME utilizando las concentraciones descritas en material y métodos; el etanol se añadió a una concentración de 0.356mM, el D-lactato se adiciona a una concentración de 5mM y la actividad de citocromo oxidasa se midió según el método introducido por Moreno-Sánchez y cols., 1991; la cantidad de proteína se adiciona a razón de 1mg/ml, excepto para la oxidación de etanol.

Oxidación	Sustrato		Citocromo oxidasa
	Etanol	D-Láctico	
ngat0/mg min	20-70	295	315

Utilizando otro método por el cual se pudiera evaluar la integridad de la membrana mitocondrial, verificamos si las mitocondrias de *Euglena* crecida en etanol pueden sintetizar ATP utilizando inhibidores que pudieran indicar que la fracción de la cadena respiratoria e inclusive la cadena alterna se encuentran activas para obtener energía; para lo cual utilizamos un método enzimático que consiste en la utilización de glucosa, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, hexocinasa y NADP<sup>+</sup>; midiendo la formación de NADPH + H<sup>+</sup> a una longitud de onda de 340 nm, el ensayo se fundamenta en la formación de ATP por la mitocondria, previa transportación de ADP al interior de la mitocondria; el ATP formado por la mitocondria es transportado al exterior y es utilizado por la hexocinasa para formar glucosa-6-fosfato, el cual sirve como sustrato para la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que en presencia de NADP<sup>+</sup> forma 6-fosfoglucono-δ-lactona, (Stryer, 1990) y NADPH medible espectrofotométricamente; observamos que el efecto de la miocinasa o también llamada adenilato cinasa interfiere con los resultados debido a que la síntesis de ATP no es sensible a oligomicina, indicándonos que la síntesis de ATP no proviene de la ATP sintetasa mitocondrial sino mas bien es por la actividad de esta enzima la cual cataliza la siguiente reacción:



Esta enzima interviene en forma considerable en los experimentos, por lo que intentamos inhibir su actividad, así que entonces utilizamos AMP (inhibidor de la adenilato cinasa), sin embargo, no obtuvimos éxito puesto que este último no inhibe completamente su actividad, por lo que la síntesis de ATP no pudo medirse puesto que presento artefactos, (ver Figura 21).

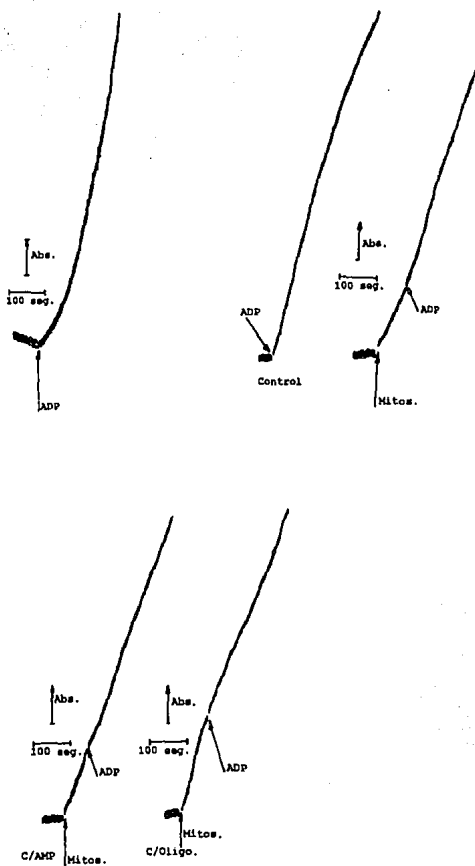


Figura 21.

Para las mediciones enzimáticas se utilizó medio KME (KCl 120mM, MOPS20mM, EGTA 2mM), NADH 0.1mM, Glucosa 10mM, Hexocinasa, Glucosa 6-Fosfato DH. Las lecturas se realizaron a 340nm.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

### **Oxidación de sustratos:**

Respecto a la oxidación de sustratos vía ciclo de Krebs o directamente por la cadena respiratoria, el cuadro 3A muestra el catabolismo mitocondrial de los mismos; también se reporta el efecto que tienen los inhibidores (en porcentaje de inhibición respecto al control). Los inhibidores utilizados nos pueden orientar acerca de la existencia de una cadena alterna, así como la expresión o sobreexpresión de la misma.

Encontramos que el mejor sustrato oxidable después del D-lactato, es el NADH, posteriormente el L-lactato, seguido de la oxidación de glutamato/malato y finalmente la oxidación de 2-oxoglutarato, (ver Cuadro B), todos los experimentos se llevaron a cabo bajo condiciones saturantes de los mismos:

**[D-lactato > NADH > L-lactato > Glutamato/malato > 2-oxoglutarato]**

La oxidación de L-lactato presentó alta sensibilidad para DPA una inhibición parcial de mixotiazol, antimicina, cianuro, SHAM y disulfiram e insensibilidad para rotenona y HQNO así como oligomicina.

Para succinato encontramos alta sensibilidad para mixotiazol, disulfiram y en un 50% a HQNO, con una insensibilidad para cianuro y rotenona así como un efecto inhibitorio parcial de oligomicina.

Para la oxidación de NADH observamos sensibilidad total para rotenona, inhibición en forma parcial del mixotiazol y HQNO, e insensibilidad para SHAM, disulfiram, DPA, oligomicina, cianuro y antimicina.

Para la oxidación de 2-oxoglutarato, encontramos sensibilidad para la mayoría de los inhibidores excepto para el cianuro y sensibilidad en forma parcial para la antimicina.

**PORCENTAJE DE INHIBICION**

SUSTRATO/INHIBIDOR conc. final.	L-LACTATO	SUCCINATO	NADH	2-OXOGLUT.	GLUT./MAL.
Rotenona 0.05mM	10±4	3±3	100±0	100±0	100±0
Antimicina 0.01mM	36±2	42±6	13±5	40±1	0±0
HQNO 0.01mM	15±6	53±10	32±1	100±0	100±0
Mixot. 0.01mM	37±4	72±5	37±7	97±2	100±0
Cianuro 0.1mM	35±7	14±6	0±0	17±4	0±0
Disulf. 0.5mM	34±4	67±3	5±4	100±0	100±0
SHAM 0.5mM	37±4		4±3	85±10	80
DPA 0.25mM	77±7		4±3	100±0	100±0
Oligo. 0.1mM	4±3	38	0±0	81	50
OXIDACION ngatom O <sub>2</sub> /mg.min	200±10	165±5	288±16	92±7	107±6
Conc. de sustrato (mM) [final]	10	10	1	10	10
	n=10	n=8	n=6	n=6	n=7

**Cuadro 3A.** Muestra la inhibición del consumo de oxígeno con diversos sustratos en mitocondrias de *Euzoia gracilis* crecida en etanol como fuente de carbono. Las mitocondrias (1mg/ml) fueron incubadas con los inhibidores por 5 minutos antes de la adición de L-lactato 10mM, Succinato 10mM, NADH 1mM, 2-oxoglutarato 10mM, Glucosaminato 7.5/15mM respectivamente y PI 10mM. Se utilizó medio KME. Los datos representan la media ± error estándar, n=número de experimentos.



Para la oxidación de glutamato/malato, encontramos sensibilidad total para la mayoría de los inhibidores excepto para antimicina y cianuro en los cuales es completamente insensible; la oligomicina inhibe aproximadamente el 50%.

Por los resultados obtenidos, se puede decir que la oxidación del lactato se lleva a cabo por la cadena alterna, la cual es sensible a DPA; esto es, que la oxidación de L-lactato se dirige por la cadena alterna debido a la presencia de la lactato deshidrogenasa en mitocondrias de *Euglena*, la cual puede transferir los electrones a un citocromo b de la cadena de transporte de electrones clásica, a la ubiquinona e inclusive a un citocromo b tipo o. Como la oxidación de L-lactato se salta los sitios de inhibición del HQNO, la antimicina y el mixotiazol, es posible que la ubiquinona sea el aceptor de electrones de la oxidasa de lactato. La insensibilidad a cianuro corrobora que la oxidación de L-lactato se lleva a cabo por la vía alterna. Los inhibidores SHAM y disulfiram (inhibidores de cadena alterna en plantas) solo afectan parcialmente la inhibición de la cadena alterna en mitocondrias de *Euglena* probablemente por la escasa afinidad por el inhibidor en este sistema (ver Cuadro 3A y Figura 7B).

Para el caso del succinato se encontró alta sensibilidad para el disulfiram indicándonos un efecto de este inhibidor sobre la succinato deshidrogenasa, la cual contiene grupos -SH esenciales para la catálisis; sin embargo permanece la insensibilidad para la antimicina y cianuro. El flujo de electrones a partir de la oxidación de este y otros sustratos puede dirigirse por varias maneras de tal forma que cuando se inhiba el sitio II por antimicina, HQNO y/o mixotiazol, los cuales afecten su oxidación, la inhibición promovida por estos será parcial, de tal manera que los electrones pueden desviarse y dirigirse por la cadena alterna como es el caso para la oxidación de L-lactato, succinato y NADH; ello explica la sensibilidad de forma parcial a los inhibidores; también indicaría la preferencia de la oxidación por una u otra vía, de tal manera que hay

sustratos que se pueden oxidar preferencialmente por vía clásica que por vía alterna, como es el caso de la oxidación de 2-oxoglutarato y glutamato-malato; sin embargo, el efecto inhibitorio debido al cianuro respecto a la oxidación de cualquiera de los sustratos resulta ser prácticamente insensible, lo que sugiere que el flujo electrónico puede desviarse a nivel de sitio II hacia la cadena alterna (oxidasa alterna) aunque también pueda ser debida a la presencia de una rodanasa presente en mitocondrias, que pueda catalizar la reacción; es posible además que se pueda llevar a cabo una reacción de formación de cianhidrinas, (reacción de 2-oxoácidos +  $\text{CN}^-$ ), la cual resulta ser una reacción llevada a cabo en forma espontánea por el poder nucleofílico del  $\text{CN}^-$  hacia el grupo carbonilo del 2-oxoglutarato; es decir que la concentración de 2-oxoglutarato es superior a la concentración de  $\text{CN}^-$ , la formación de la cianhidrina correspondiente elimina cianuro en forma libre que pueda inhibir a la citocromo oxidasa y por ende no exista inhibición de la oxidación del sustrato.

Para la oxidación de NADH, encontramos solo sensibilidad parcial en el complejo  $\text{bc}_1$  por HQNO y mixotiazol y total inhibición con la utilización de rotenona, la cual afecta el sitio I. Sin embargo para el resto de los inhibidores no existen efectos en los cuales se reflejará el efecto inhibitorio. Esto sugiere que la oxidación de NADH exógeno es por la NADH deshidrogenasa sensible a rotenona; los electrones pueden además dirigirse por la vía alterna lo cual hace que la inhibición sea prácticamente nula, (ver Figura 7B).

Para la oxidación de 2-oxoglutarato y glutamato-malato, solo se observa insensibilidad para cianuro y antimicina. Podríamos considerar que posiblemente las deshidrogenasas del ciclo de Krebs o los transportadores se vean afectados por los inhibidores de cadena alterna en plantas (SHAM y disulfiram). El DPA para el caso de estos dos sustratos, inhibe totalmente la oxidación, es decir, que la oxidación de estos

sustratos es vía ciclo de Krebs.

### Transporte de $\text{Ca}^{2+}$

La figura 22 A, B, C y D muestra los resultados obtenidos respecto al transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de cianuro a una concentración 0.1mM y utilizando lactato como sustrato; lo que observamos fue un transporte de calcio debida a la aportación de energía dada por la oxidación de L-lactato por la cadena alterna; es decir debido a que la cadena de transporte de electrones clásica se encuentra inhibida por la presencia de cianuro, los electrones solo serán transportados a través de la cadena alterna la cual es insensible a cianuro; además de la preferencia de oxidación del L-lactato por la oxidasa alterna, en donde toda la energía es aportada por el flujo de protones ( $\text{H}^+$ ) ocasionada por la oxidación del sustrato por esta vía, la adición de desacoplante no es capaz de sacar todo el calcio transportado por las mitocondrias, este mismo efecto se observó al adicionar un ionóforo para  $\text{Ca}^{2+}$  (A-23187). Sin embargo, la antimicina es capaz de sacar el calcio transportado, comportandose en este caso como un desacoplante, puesto que la posterior adición de CCCP o A-23187, no son capaces de realizar un efecto aditivo a la antimicina; se decir que estos últimos no son capaces de sacar el  $\text{Ca}^{2+}$  después de la adición de Antimicina. Es necesario realizar experimentos en donde se demuestre que el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  es inhibido en presencia de DPA; este último nos daría información acerca de la oxidación de L-lactato y su preferencia de oxidación así como el posible papel que este tenga respecto al aporte energético a las mitocondrias por la utilización de la oxidasa alterna.

A

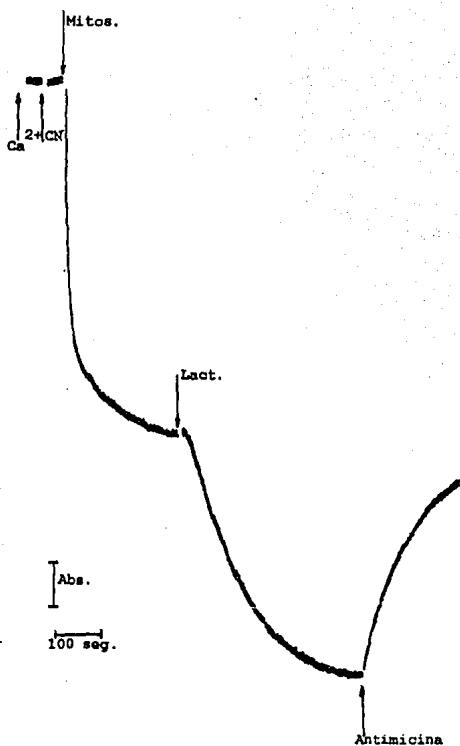


Figura 22 A.

Se muestra el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  de mitocondrias de células de *Euglena* crecida en etanol como única fuente de carbono, se adicionó 2 mg/ml de proteína mitocondrial, en presencia de calcio  $33\mu\text{M}$ , Arsenazo III  $50\mu\text{M}$ , cianuro  $100\mu\text{M}$ , Lactato  $10\text{mM}$ , fosfato  $5\text{mM}$ , CCCP  $5\mu\text{M}$ , Antimicina  $0.01\text{mM}$ . Las lecturas se realizaron a 675-685 nm.

B

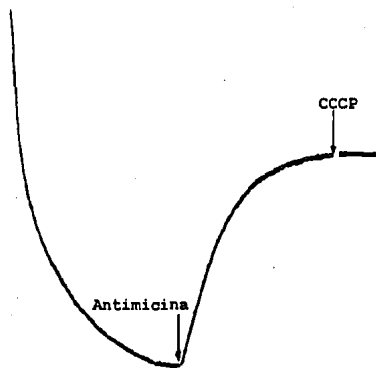
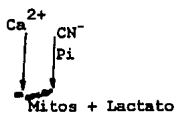


Figura 22 B.

Se muestra el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  de mitocondrias de células de *Euglena* crecida en etanol como única fuente de carbono, se adicionó 2 mg/ml de proteína mitocondrial, en presencia de calcio  $33\mu\text{M}$ , Arsenazo III  $50\mu\text{M}$ , cianuro  $100\mu\text{M}$ , lactato  $10\text{mM}$ , fosfato  $5\text{mM}$ , CCCP  $5\mu\text{M}$ , Antimicina  $0.01\text{mM}$ . Las lecturas se realizaron a 675-685 nm.

C

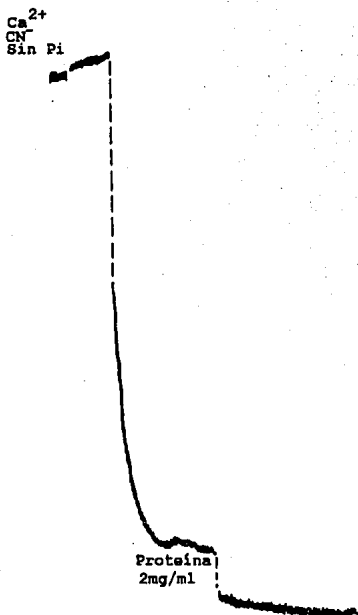


Figura 22 C.

Se muestra el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  de mitocondrias de células de Euglena crecida en etanol como única fuente de carbono, se adicionó 2 mg/ml de proteína mitocondrial, en presencia de calcio  $33\mu\text{M}$ , Arsenazo III  $50\mu\text{M}$ , cianuro  $100\mu\text{M}$ , lactato  $10\text{mM}$ . Las lecturas se realizaron a 675-685 nm.

D

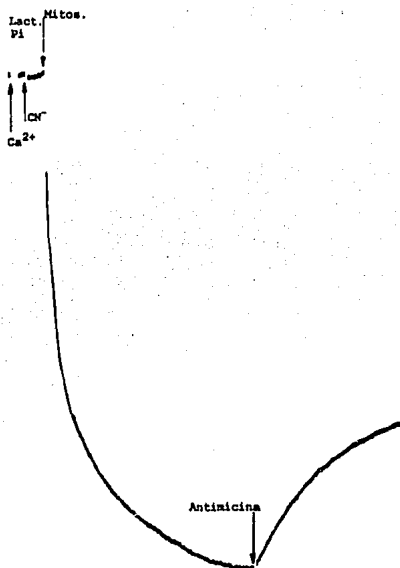


Figura 22D.

Se muestra el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  de mitocondrias de células de *Euglena* crecida en etanol como única fuente de carbono, se adicionó 2 mg/ml de proteína mitocondrial, en presencia de calcio  $33\mu\text{M}$ , Arsenazo III  $50\mu\text{M}$ , cianuro  $100\mu\text{M}$ , lactato  $10\text{mM}$ , fosfato  $5\text{mM}$ , antimicina  $0.01\text{mM}$ . Las lecturas se realizaron a  $675\text{-}685\text{ nm}$ .

Los experimentos de transporte de calcio, muestran la necesidad de fosfato en el medio, (figura 22 B,C), todos los experimentos se realizaron en presencia de cianuro, (figura 22 A,D) el cual solo dejan activa la cadena alterna y eliminan aunque no en sutotalidad la actividad de la cadena clásica, es decir que solo se puede medir la actividad de esta última, sin embargo puede presentar cierto artefacto puesto que no se elimina en su totalidad la actividad de la cadena clásica.

## COMPARACION ENTRE LAS MITOCONDRIAS DE CELULAS CRECIDAS EN ETANOL, GLUTAMATO-MALATO Y PEPTONA.

Para demostrar la sobreexpresión de la cadena alterna de transporte de electrones en las mitocondrias de *Euglena* crecida en medio de etanol como fuente de carbono o en su defecto la inducción de esta, según lo reportado por Sharpless y Butow (1970a,b) se realizaron comparaciones entre los diferentes tipos de mitocondrias obtenidas a partir de células crecidas en fuentes de carbono como peptona y glutamato-malato y glutamato-malato mas cianuro 0.1mM.

En la primera parte comparamos los cuadros de oxidación e inhibición de las diferentes mitocondrias y en la segunda parte se realizaron los espectros diferenciales utilizando CO para cuantificar la concentración de citocromo o.

### Mitocondrias de *Euglena gracilis* crecida en Peptona como fuente de carbono.

El mejor sustrato de oxidación por éstas mitocondrias fue el NADH, posteriormente L-lactato y succinato; 2-oxoglutarato y glutamato-malato no se oxidan, sin embargo, se encontró un control respiratorio de 1.8 para sustratos endógenos y L-lactato, succinato de 2.3, y para glutamato-malato de 1.7; para NADH no se ha encontrado control respiratorio (Cuadro 3B).

Para la oxidación de L-lactato se encontró sensibilidad total en presencia de DPA y en forma parcial para mixotiazol, antimicina, cianuro y HQNO e insensibilidad para rotenona, SHAM y disulfiram, así como oligomicina; esto sugiere que estas mitocondrias presentan cadena alterna para la oxidación de L-lactato. Lo cual sugiere que la expresión de la cadena alterna se encuentra en mucho menor proporción que en las mitocondrias de *Euglena* crecida en etanol como fuente de carbono, inclusive con las mitocondrias de células crecidas en el medio glutamato



más malato (Cuadro 3B).

Respecto a la oxidación de succinato, la sensibilidad es mayor a la presencia de DPA, el cianuro en este caso inhibe totalmente a la citocromo oxidasa al igual que el mixotiazol y la antimicina; SHAM, disulfiram, oligomicina y HQNO no presentan efectos sobre la oxidación, excepto para rotenona, la cual inhibe parcialmente la oxidación del sustrato. Esto puede sugerir que la oxidación del succinato se lleva a cabo por la vía clásica con poca participación de la cadena alterna.

Para NADH, la sensibilidad es mayor para rotenona, disulfiram, DPA y mixotiazol, y se presenta insensibilidad para SHAM, oligomicina, antimicina y cianuro. Con éstos resultados podemos decir que el sustrato se oxida por vía alterna preferentemente (debido a la inhibición por DPA), sin embargo puede también oxidarse por la cadena clásica (debido a la inhibición por mixotiazol).

La oxidación de sustratos, por lo tanto, puede dirigirse tanto por la cadena alterna como la cadena clásica en donde solo succinato, L-lactato y parcialmente NADH se pueden oxidar en forma preferente; las mitocondrias pueden utilizar la cadena clásica en forma similar a como lo hacen con la utilización de la cadena alterna; L-lactato y NADH pueden ser oxidados parcialmente por la cadena alterna; aunque la oxidación por esta vía es dependiente de la concentración de citocromo b tipo o, la sensibilidad a DPA indica su oxidación preferencial sobre la vía, aunque el DPA no es inhibidor específico de la cadena alterna en las mitocondrias de células de *Euglena*, sin embargo es capaz de inhibir la oxidación de sustratos, que son inhibidos en forma total; la insensibilidad a cianuro y la insensibilidad a antimicina apoya este hecho (ver Cuadro 3B), lo que sugiere que la conexión entre la cadena alterna y la cadena clásica a nivel de ubiquinona-citocromo b. En el caso del NADH (el cual se oxida por la NADH deshidrogenasa) es sensible a la rotenona en forma total así que su vía de entrada es por la NADH DH y posteriormente puede ramificar

su flujo electrónico por cualquiera de las rutas conocidas: cadena clásica, cadena alterna u oxidasa alterna, y por tanto comportarse como un proceso insensible a la acción de los diferentes inhibidores, (ver Cuadro 3B).

PORCENTAJE DE INHIBICION *Euglena gracilis* (mitocondrias-log-Peptona)

INHIBIDOR (Sai)	SUSTRATO	L-LACTATO 10mM	SUCCINATO 10mM	NADH 1mM	2-OXOGLUT. 10mM	GLUTAMATO MALATO 10mM
Rotenona	0.05mM	0.0	26±3	100±0	-	100
Antimicina	0.01mM	67±0	100±0	0.0	-	100
Mixotiazol	0.01mM	67±0	100±0	100±0	-	100
HQNO	0.01mM	34±1	1±1	50±0	-	100
Cianuro	0.1mM	39±5	100±0	3±2	-	100
Disulfiram	0.5mM	0.0	0.0	100±0	-	100
SHAM	0.5mM	8±0.1	0.0	5±2	-	100
Difenilamina	0.25mM	100±0	100±0	100±0	-	100
Oligomicina	0.01mM	2±1	2±1	2.5±1	-	100

OXIDACION DE SUSTRATOS		ngatom O <sub>2</sub> mg-1 min-1			
	L-Lactato	Succinato	NADH	2-oxoglut.	Glut/Malat.
	117±13 n=8	71±3 n=6	132±5 n=3	-	31±0.0 n=3
	D-Láctico 10mM				
	142±15 n=2				

CONTROL RESPIRATORIO	L-Láctico	Succinico	NADH	2-oxoglut.	Glut/malt.
	1.85	2.3	1	3.6	1.75

Cuadro 3B. Inhibición del consumo de oxígeno con diversos sustratos en mitocondrias de *Euglena* crecida en peptona como fuente de carbono. Los inhibidores se incubarán por 4 minutos antes de la adición de los sustratos a las concentraciones indicadas; la concentración de proteína fue de 1mg/ml; para los controles respiratorios se adiciono ADP a una concentración final 0.5mM. Los datos representan la media ± error estándar, n= número de experimentos.

### **Mitocondrias de *Euglena gracilis* crecidas en glutamato-malato como fuente de carbono.**

Estos datos se basan en lo reportado por Uribe y Moreno-Sánchez (1992), quienes encontraron que para la oxidación de L-lactato existe alta sensibilidad en el caso de mixotiazol, HQNO, cianuro y DPA; en forma parcial rotenona e insensibilidad frente a antimicina, disulfiram y oligomicina, (ver Cuadro 3C).

Al igual que en los casos anteriores, estas mitocondrias oxidan L-lactato de manera preferente por la cadena alterna, por lo cual resultan insensibles a antimicina, sin embargo es inhibida por cianuro. En el caso del DPA, no existe una sensibilidad del 100%, por lo cual podemos suponer que la oxidación de este sustrato se lleva a cabo por un citocromo b (**tipo o**) y posteriormente se integra a la cadena clásica de transporte de electrones, esto puede explicar su sensibilidad al cianuro y además sugerir que la actividad residual de la oxidación del L-lactato pueda dirigirse por la oxidasa alterna (ver Cuadro 3C).

Para el succinato se encuentra mayor sensibilidad en presencia de antimicina, mixotiazol, HQNO, cianuro, DPA y oligomicina, esto significa que la oxidación de succinato se dirige preferentemente por la cadena clásica, pero que una pequeña fracción (aproximadamente de 3 a 10%) podría dirigirse por la cadena alterna e inclusive utilizar la oxidasa alterna debido a que esta última es poco sensible a SHAM y disulfiram (ver Cuadro 3C).

**Cuadro 3C.** Inhibición del consumo de  $O_2$  con diversos sustratos en mitocondrias de *Euglena gracilis*. Las mitocondrias fueron incubadas con los inhibidores indicados por 4 min antes de la adición de 1mM NADH, 10mM succinato, 10mM L-lactato, 7.5mM de glutamato + 15mM de malato (G+M), y 10mM de alfa-cetoglutarato. Los datos mostrados representan la medida  $\pm$  error estándar de 6 preparaciones usadas.

INHIBIDOR	SUSTRATO				
	G+M	O-KG	NADH	Succinato	Lactato
	% de Inhibición				
Rotenona (0.05mM)	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	96 $\pm$ 4	7 $\pm$ 3	34 $\pm$ 1
Antimicina (0.01mM)	50 $\pm$ 3	100 $\pm$ 0	94 $\pm$ 2	97 $\pm$ 2	14 $\pm$ 6
Mixotiazol (0.01mM)	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	72 $\pm$ 3
HQNO (0.01mM)	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	78 $\pm$ 2
Cianuro (0.1mM)	90 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	62 $\pm$ 5	100 $\pm$ 0	66 $\pm$ 3
DPA (0.25mM)	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	87 $\pm$ 2	77 $\pm$ 3	83 $\pm$ 8
Disulfiram (0.5mM)	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	45 $\pm$ 2	29 $\pm$ 4	9 $\pm$ 2
SHAM (0.5mM)	0 $\pm$ 0	35 $\pm$ 3	14 $\pm$ 1	4 $\pm$ 2	2 $\pm$ 1
Oligomicina (0.1mM)	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	83 $\pm$ 6	83 $\pm$ 4	9 $\pm$ 6

Para el caso del NADH se observó el mismo fenómeno que en el caso del succinato; por lo tanto, el NADH puede oxidarse preferencialmente por la vía clásica, puesto que su oxidación resulta ser sensible a la mayoría de los inhibidores; posiblemente también pueda dirigirse por la cadena alterna (por su sensibilidad al DPA); finalmente para la oxidación del glutamato-malato y el 2-oxoglutarato la sensibilidad se incrementa, sin embargo, llama la atención que en presencia del sustrato 2-oxoglutarato, la inhibición por cianuro sea del 0.0%, lo cual indica exista una reacción entre el cianuro y el 2-oxoglutarato formando cianhidrinas, catalizada incluso por la rodanasa mitocondrial; las cuales abatirían la concentración de cianuro libre que pueda actuar sobre la citocromo oxidasa y por tanto el 2-oxoglutarato libre quede disponible para la oxidación vía ciclo de Krebs; en su defecto, dirigirse por la cadena alterna, lo cual explicaría la insensibilidad a cianuro. Quizás sea necesaria la realización de estudios en espectros diferenciales comparativos en los cuales se demuestre que la cadena alterna presenta todos sus componentes y por lo tanto la oxidación de L-lactato y NADH puedan dirigirse por cualquiera de las vías saltándose el sitio de inhibición del cianuro, (ver Figura 7B).

Las diferencias entre las mitocondrias de células crecidas en peptona, Hutner y etanol son considerables, por ejemplo las mitocondrias de células crecidas en peptona como fuente de carbono no son capaces de oxidar 2-oxoglutarato además de ser altamente sensibles a los inhibidores; utilizando glutamato-malato como sustrato para este último caso, la sensibilidad observada en las mitocondrias de células crecidas en glutamato más malato en menor proporción y aún en menor proporción en las mitocondrias de células crecidas en etanol.

La observaciones en donde se puede observar mejor las diferencias existentes entre los diferentes tipos de mitocondrias se encuentra en la oxidación de lactato y NADH, en los cuales las mitocondrias de células

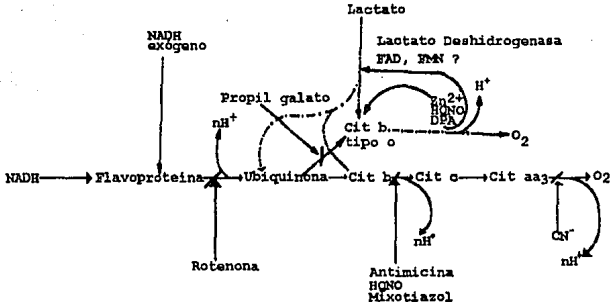
crecidas en etanol como fuente de carbono presentaron menor sensibilidad a los inhibidores; en contraste con las mitocondrias de células crecidas en peptona y Hutner, sugiriendo que el sistema respiratorio o la(s) cadena(s) de transporte de electrones en las mitocondrias de células crecidas en etanol es mucho más eficiente que en las mitocondrias de células crecidas en los medios de peptona y glutamato-malato; esto sugiere que el sustrato en el medio de crecimiento puede inducir la expresión de la o las cadenas alternas en las mitocondrias inclusive también podría modificar la concentración de citocromo b tipo o;

Las diferencias pueden radicar en la capacidad de oxidación de sustratos y la velocidad de oxidación de sustratos con la que las mitocondrias puedan disponer de la cadena alterna de transporte de electrones y la utilización de la misma como una forma de obtención de energía.

Nosotros sugerimos que las mitocondrias de células crecidas en glutamato más malato presentan muy poca expresión de la cadena alterna al igual que las mitocondrias de células crecidas en peptona, es decir que probablemente en las mitocondrias de células crecidas en etanol en contraste con las mitocondrias de células crecidas en glutamato-malato y peptona, se pueda expresar de manera importante el citocromo b tipo o e inclusive la posibilidad de otra citocromo oxidasa que evita que la cadena alterna se vuelva a integrar a la cadena clásica, al respecto, cabe la posibilidad de que también exista alguna ramificación en las mitocondrias de células crecidas en etanol como fuente de carbono; sin embargo, nosotros no hemos podido detectar esta última, por lo que creemos que se podría detectar realizando experimentos a temperatura de nitrógeno líquido, de tal manera que pudiéramos resolver los citocromos si es que existen; existe una tercer posibilidad y es la de suponer que los electrones son transferidos directamente hasta la reducción del oxígeno formándose agua.

La figura 23 muestra la proposición que nosotros hacemos respecto a los datos obtenidos, por lo que creemos que las mitocondrias de células crecidas en medio de etanol tienen una sobreexpresión de la oxidasa alterna, es decir que el citocromo *o* está sobreexpresado de tal manera que le hace insensible a los inhibidores de la cadena clásica; para el caso de las mitocondrias de células crecidas en medio de peptona y glutamato-malato, la ramificación de la cadena alterna se vuelve a integrar a la cadena clásica, (ver Figura 7B) y por tanto, la sensibilidad a cianuro se refleja un poco mas; existe también la posibilidad de que la ramificación ocurra apartir de la ubiquinona; y que la oxidación de L,D-lactato vía lactato deshidrogenasa ceda los electrones a la oxidasa alterna (citocromo *b* tipo *o*) y estos reduzcan al oxígeno directamente; también está la posibilidad de que done los electrones a la ubiquinona e inclusive se los done al citocromo *b* del complejo  $bc_1$  de la cadena clásica y estos dirigirse a lo largo de la vía hasta reducir al oxígeno. En el mismo esquema se encuentra la vía de oxidación propuesta para succinato, la cual es al parecer sensible a SHAM, (ver Figura 7B) ; sin embargo, en nuestro laboratorio no hemos encontrado esta vía puesto que las inhibiciones por SHAM son solo parciales, por lo que creemos que no existe evidencia de esta vía (Uribe y Moreno-Sánchez, 1992), lo que sugiere que posiblemente la oxidasa alterna propuesta, (ver Figura 7B) es la misma oxidasa alterna correspondiente al citocromo *b* tipo *o*. También se integra la posible inhibición por propil-galato la cual se ha sugerido que inhibe a la vía insensible a cianuro. Se han realizado también experimentos en donde se manejaron las relaciones citocromo *o/aa*, la cual pude servir como indicador de sensibilidad a cianuro, (Devars, y cols., 1992), (ver Tabla IV).





**Figura 23.** Muestra el esquema propuesto por nuestro grupo de trabajo, mostrando los sitios de oxidación de lactato, los posibles cofactores de la lactato deshidrogenasa, así como la posible interacción de los diferentes inhibidores.

El L-lactato se oxida preferentemente por la cadena alterna en las mitocondrias de células crecidas el glutamato y/o más malato y en las mitocondrias de peptona, pero en las mitocondrias de células crecidas en etanol, esta oxidación puede desviarse por la cadena clásica (alrededor de 30%). Algunos experimentos que demostrarían que este esquema puede cumplirse en mitocondrias de células crecidas en etanol como fuente de carbono y que probablemente no aparezcan en mitocondrias de células crecidas en glutamato-malato o peptona serían los siguientes, aislar mitocondrias e inhibir la cadena respiratoria de tal manera que se pueda expresar solo la actividad de la cadena alterna así como la insensibilidad a cianuro, azida o ácido sulfhídrico, en esta condición probar que esta cadena alterna es capaz de proporcionar la cantidad necesaria de protones para la obtención de energía; por otro lado aislar al citocromo o y determinar las posibles interacciones que existen con la cadena respiratoria y su posible interacción con enzimas como la lactato deshidrogenasa; al

mismo tiempo podría servir como una forma de relacionar al citocromo o con otras cadenas respiratorias de otros microorganismos.

### **Espectros diferenciales con CO:**

Se realizaron espectros diferenciales comparativos entre las mitocondrias de células crecidas en glutamato más malato con y sin cianuro y las mitocondrias de células crecidas en medio de etanol así como mitocondrias de células crecidas en peptona. Las figuras muestran que la expresión de la citocromo oxidasa se encuentra en los diferentes tipos de mitocondrias. También puede observarse, la expresión de la oxidasa alterna, (citocromo b tipo o), sin embargo se encontró que existía una sobreexpresión de la misma en las mitocondrias de células crecidas en medio de glutamato-malato + cianuro, aunque también se pudo expresar en muy buena proporción en las mitocondrias de células crecidas en medio de etanol; por otro lado, se encontró que hay muy poca expresión de cadena alterna en mitocondrias de células crecidas en medio de glutamato-malato y en mitocondrias de células crecidas en peptona como fuente de carbono.

Encontrándose que en las mitocondrias de células crecidas en glutamato más malato y cianuro poseen una sobreexpresión del citocromo b (tipo o), lo cual sugiere que las mitocondrias de células crecidas en glutamato más malato sobreexpresan la cadena alterna debido a la presencia del cianuro, posteriormente las mitocondrias de células crecidas en etanol y por último las células crecidas en glutamato más malato. Esta sobreexpresión del citocromo b (tipo o) se midió por el pico de absorción del citocromo tipo o a 418 nm con un valle a 430 nm (espectros realizados con CO a intervalos de tiempo de 2, 8 y 16 min; la técnica se basa en la reacción lenta del citocromo o con el monóxido de carbono, de allí que

los períodos de lectura sean prolongados). No se encontró sobreexpresión de otros componentes detectables por métodos espectrofotométricos en los diferentes tipos de mitocondrias provenientes de los diferentes sustratos de crecimiento celular.

La tabla IV muestra la relación de citocromo  $o/aa_3$  y además también muestra la cantidad de citocromo  $o$  y citocromo  $aa_3$  expresado en los diferentes tipos de mitocondrias de células crecidas en los diferentes medios de cultivo; como puede observarse, las mitocondrias de células crecidas en medio de peptona y glutamato-malato presentan una alta sensibilidad al cianuro, en contraste con las mitocondrias de células crecidas en medio de etanol y medio de glutamato-malato mas cianuro. Esto confirma la sugerencia de que existe una sobreexpresión de la oxidasa alterna en mitocondrias de células crecidas en medio de etanol y en mitocondrias de células crecidas en glutamato-malato + cianuro; Devars y colaboradores (1992) habían encontrado una relación de citocromos  $o/aa_3$  de alrededor de 2.5 para las mitocondrias de células crecidas en glutamato-malato y de 2.4 para las mitocondrias de células crecidas en peptona; nuestros datos muestran una disminución substancial debido a la descongelación de las muestras, (mostraron conglomerados de mitocondrias); además de que la realización de los espectros presentó dificultades técnicas; los datos muestran la mitad de los valores obtenidos por Devars y cols., sin embargo la demostración de la sobreexpresión del citocromo  $o$  se pudo comprobar, cabe mencionar que el número de experimentos realizados no son suficientes para contradecir los datos antes publicados.

**Tabla IV.** Muestra el contenido relativo de citocromo o y citocromo aa<sub>3</sub> en mitocondrias de células crecidas en diferentes fuentes de carbono. Las mitocondrias se utilizaron a partir de células en fase log o log media. La cantidad de proteína adicionada en las preparaciones fue de 2mg/ml. Los cálculos se realizaron en base a los coeficientes de extinción molar reportadas para bacterias correspondiendo a (428.5-445 nm)=148/mM por cm para el citocromo a+a<sub>3</sub> y de (418-430 nm)=160/mM por cm para el citocromo o.

Mitocondrias de células crecidas en medio:	Abs (o)	Abs (aa <sub>3</sub> )	[cit o]	[cit aa <sub>3</sub> ]	o/aa <sub>3</sub>	n
			pmol/mg prot.			
Peptona	0.0057	0.0120	17.7	28	0.635	3
Glu/Mal	0.0117	0.0077	36.6	257.42	0.142	5
Etanol	0.0411	0.0015	128.4	5.086	25.16	5
Glu/Mal mas CN-	0.045	0.0049	701.4	8.91	78.7	3

La sobreexpresión de lacadena alterna pudo ser observada al realizar los espectros diferenciales, de tal manera que pudo incrementarse la concentración de citocromo b tipo o en mitocondrias de células crecidas en cianuro, lo que sugiere que además del sustrato utilizado, existen factores como la presencia de inhibidores que pueden facultar a las células para adaptarse a este medio y por tanto incrementar la concentración de citocromo o a nivel mitocondrial; esto se manifiesta por la presencia de un pico y un valle a 409 y 420 nm indicativo de la presencia de citocromo o y un pico y valle a 430 y 445 nm como indicativo de citocromo aa<sub>3</sub>, (ver Figura 24). La figura A muestra los trazos realizados en mitocondrias de células crecidas en glatamato/ malato, el trazo B indica el espectro de

mitocondrias células crecidas en etanol y finalmente el espectro C indica la expresión de citocromos en mitocondrias de células crecidas en glutamato-malato mas cianuro. Esta sobreexpresión indica que posiblemente las mitocondrias de células crecidas en etanol y quizás las mitocondrias de células crecidas en cianuro, se comporten como se muestra en la figura 23, las cuales presentan muy poca expresión de citocromo oxidasa y un incremento en la síntesis de oxidasa alterna, la cual no se cumple en mitocondrias de células crecidas en glutamato-malato y mitocondrias de células crecidas en peptona.

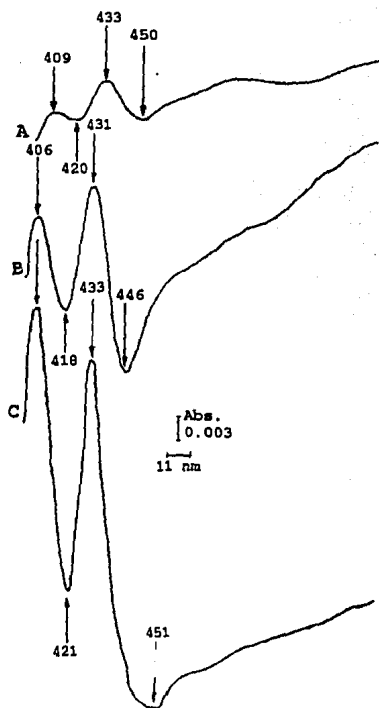


Figura 24.

Se muestran los espectros diferenciales reducidos con monóxido de carbono en mitocondrias de células de *Euglena* crecida en diferentes fuentes de carbono. Se adicionaron 4mg/ml de proteína en un medio conteniendo KME-glicerol 1:1, los citocromos fueron reducidos con ditionita de sodio. Los espectros muestran la reacción a los 16 min con 30 seg. de burbujeo en la cubeta de referencia. A corresponde al espectro de mitocondrias de células de *Euglena* crecida en glutamato-malato; B mitocondrias de células crecidas en etanol como única fuente de carbono y C mitocondrias de células crecidas en glutamato-malato + cianuro.

## CONCLUSIONES

Las células crecidas en etanol como fuente de carbono alcanzan su fase estacionaria alrededor del 5° día de crecimiento celular; sin embargo, la movilidad celular continua inclusive hasta alrededor del catorceavo día de crecimiento, lo que sugiere que la obtención de energía sea dependiente de la cadena alterna la cual se encuentra en actividad durante esta fase de crecimiento celular (Stewart y Gregory, 1969); la movilidad de células crecidas en otras fuentes de carbono si se ve alterada por la densidad celular, en células crecidas en glutamato-malato mas cianuro, pierden movilidad y entran a la fase de enquistamiento celular. Es importante señalar que se esperaba un comportamiento similar de estas últimas células respecto a las células crecidas en etanol, es decir, que la movilidad celular y/o quizás la reproducción continuara durante algún tiempo, sin embargo, los resultados fueron contrastantes; esto sugiere que también la fuente de carbono tiene gran trascendencia durante el crecimiento celular y tiene cierta influencia para la expresión de la cadena alterna.

La sobreexpresión de la cadena alterna en mitocondrias de células crecidas en glutamato-malato en presencia de cianuro no ayuda a la célula para sobrevivir por tiempos prolongados en concentraciones deficientes de oxígeno, o en condiciones de estrés de nutrientes, excepto que ayudan a la célula a adaptarse a las condiciones adversas dadas por la presencia o ausencia de inhibidores, (células crecidas en glutamato-malato + cianuro) al mismo tiempo la presencia de estos últimos pueden tener efecto aditivo sobre la expresión de la cadena alterna. Es decir que en las células crecidas en medios de cultivo en los cuales no se desarrolle la oxidasa alterna en forma excesiva como es el caso de las células crecidas en peptona o en las células crecidas en glutamato malato, la fase logarítmica se alcanzará alrededor del sexto día y posteriormente se obtiene el enquistamiento de las mismas. También es factible demostrar este fenómeno ensayando concentraciones más bajas de cianuro.

La presencia de cianuro o de algún otro inhibidor puede influenciar la inducción de la cadena alterna o de oxidasas alternas en mitocondrias de células crecidas en glutamato-malato, sobreexpresando la síntesis de estas e inclusive de su actividad.

Las mitocondrias de células crecidas en etanol como única fuente de carbono presentaron una notable resistencia a inhibidores convencionales de la cadena de transporte de electrones normal tal como antimicina y cianuro.

La carencia de la inhibición de la antimicina en la oxidación de L- o D- lactato como sustrato implica la utilización de la cadena alterna como vía de flujo de electrones y por tanto su insensibilidad a cianuro se ve acentuada.

La oxidación de algunos sustratos no es inhibida por cianuro, aunque es parcialmente sensible a antimicina. Esto apoya el hecho de que existe influencia de la fuente de carbono utilizado para el crecimiento celular misma que repercute en la exclusividad de oxidación de sustratos e insensibilidad a inhibidores; como es el caso de las mitocondrias de células crecidas en peptona como única fuente de carbono así como las mitocondrias de células crecidas en etanol como fuente de carbono que presentan exclusividad o preferencia de vías de oxidación de sustratos utilizando lactato como sustrato para la oxidación mitocondrial.

Las mitocondrias de Euglena gracilis crecidas en etanol o en otras fuentes de carbono, no son estimuladas (en estado 4) por la adición de AMP; por otro lado las células crecidas en etanol no son estimulables (en estado 4) por la adición de ADP, probablemente por la interferencia de la adenilato cinasa o miocinasa siendo esta última insensible a AMP inclusive en altas concentraciones.

Podemos inferir que la adaptación celular a un medio de cultivo y en especial a la fuente de carbono utilizada, repercute exclusivamente en la síntesis enzimática celular dirigida hacia la creación de un mejor



ambiente para crecimiento celular; por tanto la resistencia o adaptación a un medio de cultivo, así como resistencia a algunos inhibidores de la respiración, por estimulación de síntesis de oxidasa alterna y sobreexpresión de la misma; simultáneamente afecta las subestructuras celulares y sus diferentes compartimentos; la mitocondria es un ejemplo claro, así como la exclusividad de oxidación de algunos sustratos por mitocondrias de células crecidas en diferentes fuentes de carbono.

El mismo sustrato y la concentración de oxígeno en el medio de cultivo probablemente afecten de alguna manera la presencia o ausencia de vías alternas así como la sobreexpresión de la misma. También es posible que la cantidad de elementos vitales como las vitaminas adicionadas para su crecimiento y su concentración tengan el mismo efecto en mayor o en menor escala.

Aseguramos que el comportamiento mitocondrial desde el punto de vista metabólico es diferente con respecto a mitocondrias crecidas en diferentes fuentes de carbono, lo que hace posible la poca susceptibilidad para algunos inhibidores. Creemos que es necesario conocer un poco más tanto a la célula como a la mitocondria situándolas en una escala filogenética y evolutiva para poder dar algunas respuestas de dicho comportamiento.

La relación de citocromo *o/aa*, muestra que se puede inducir la expresión de la cadena alterna dependiendo de los medios de cultivo, es decir que el medio de cultivo como el etanol induce la expresión de la cadena alterna y que además se puede sobreexpresar por la adición de cianuro al medio de cultivo y por tanto, esta sobreexpresión hace insensible a las mitocondrias a CN<sup>-</sup> y antimicina.

## PERSPECTIVAS

La expresión de la cadena alterna o cadenas alternas en muchos organismos de interés para el hombre como es el caso de **Rhizobium**, **Paracoccus**, etc en los cuales se ha demostrado que se pueden expresar en forma diferente respecto a las condiciones en las que se encuentre el microorganismo tanto en su hábitat natural como en el laboratorio; sin embargo no se conoce el papel que tienen las oxidasas alternas y su funcionamiento respecto a la nutrición del microorganismo y en algunos casos la relación simbiótica entre varios organismos (**Rhizobium** y algunas leguminosas). Por estos motivos, nos podemos plantear algunas perspectivas que nos podrían ayudar a proponer algunas posibles funciones de las mismas.

Si el estrés respecto a la concentración crítica de oxígeno incrementa la expresión de la cadena alterna, entonces este parámetro podría utilizarse como un índice de sobreexpresión de esta vía y además demostrar que la síntesis de ATP por esta vía puede ser necesaria para el transporte de sustancias, crecimiento celular y/o reproducción celular.

Por otro lado si la sobreexpresión de la cadena alterna u oxidasas alternas se encuentra en máxima actividad en células crecidas en fase estacionaria (Stewart y Gregory, 1969), sería interesante demostrar que la cadena alterna en mitocondrias de células crecidas en etanol como fuente de carbono presenta este máximo de actividad en fase estacionaria y evaluar los parámetros antes mencionados, así como la máxima expresión y actividad de citocromo b (tipo o).

La sobreexpresión de la cadena alterna en mitocondrias de células crecidas en Glutamato-malato en presencia de cianuro podría aplicarse en mitocondrias de células crecidas en etanol como fuente de carbono en presencia de cianuro, con fines demostrativos respecto a si puede sobreexpresarse aún más la cadena alterna y posiblemente evaluar de mejor manera el funcionamiento de dicha vía así como su composición y

el posible papel que esta tenga respecto al aporte de energía y transporte de metabolitos en la mitocondria y en la célula.

La sobreexpresión de la cadena alterna en las mitocondrias de **Euglena** podrían servir para aislar al citocromo **c** e incorporarlo a membranas artificiales en las cuales se pudiera estudiar mejor las funciones del citocromo **c** y la funcionalidad del mismo.

**REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS Y HEMEROGRAFIAS:**

- Avadhani, N.J., Lynch M.J. y Buetow D.E., 1971 *Exp. Cell. Res.*, 69, 226-288.
- Anraku, Y. y Gennis, R.B., 1987, *Trends Biochem. Sci.*, 12:262-266.
- Anraku, Y., 1987, *Cytocrome Systems*. En: *Molecular Biology and Bioenergetics*, Ed. S. Papa, B. Chance, L. Ernster, J. Jaz. New York.
- Aswood, C. D. 1974, *Clin. Chim. Acta.* 5, 101-108.
- Avadhani, N. G. y Freyssinet, G., 1989. *Polyribosomas, Ribosomas and Ribosomal RNA*, Capitulo 7, 415-477. En: *The Biology of Euglena*, Vol. IV. Ed. Buetow, D.E.. Academic Press, Inc., San Diego, California.
- Baker W. B. y Buetow, D. E., 1976. *J. Protozool*, 23, 167-176.
- Baker W. B. y James E., 1963, *Arch. Bio. Bioph.*, 103, 148-155.
- Bariaud A. y Mestre J.C., 1984, *Bull. Enviro. Toxicol.*, 32: 597-601.
- Bégin-Heick, N., 1973, *Biochem. J.*, 134, 607-616.
- Bonaly J., Miginac-Maslow M., Broshiero E., y Mestre J.C., 1986, *J. Plant Physiol.* 123. 349-358.
- Brock, T. D., Smith, D. W., y Madigan, M.T. 1987. *Energética* 104-139 en *Microbiología*. Prentice Hall S.A. Mexico.
- Buetow D.E., 1968, *Euglena-cells for biological investigation*, 383, En: *The Biology of Euglena*, Ed. Buetown, D.E. Vol. II., Academic Press, Inc., San Diego, California.
- Buetow, D.E. y Buchanan, J.P., 1965. *Biochim. Biophys. Acta*, 96, 9.
- Boheler B.A. y Ernst-Funberg M.L.. 1976, *Arch. Biochem. Biophysics.* 175. 229-235.
- Bradford, M.M., 1976, *Anal. Biochem.*, 72, 248.
- Calvayrac, R., Levy, M., Vazart, J., Briand, J. y Claisse, M., 1978, *Biol. Cell.* 31. 141-148.
- Calvayrac, R. y Butow, R.A., 1971. *Arch. Mikrobiol.*, 80, 62-69.
- Calvayrac, R., VanLente, F. y Butow, R.A., 1971, *Science*, 173, 252-254.
- Carre I., Bumsel I.L. y Calvayrac R., 1988. *Plant Science*, 54, 193-202.
- Castor, L. N. y Chance, B., 1955, *J. Biol. Chem.*, 217, 453-465.
- Castor, L. N. y Chance, B., 1959, *J. Biol. Chem.*, 234, 1587-1589.
- Chance, B., 1953, *J. Biol. Chem.* 202, 383-396.
- Chance, B., 1953, *J. Biol. Chem.* 202. 397-406

- Collins N., Brown R. y Merrett M., 1975, *Biochem. J.*, 150, 373-377.
- Collins N. y Merrett M.J., 1975, *Biochem J.*, 148, 321-328.
- Collins N. y Merrett M.J., 1975 *Plant Physiol.*, 55, 1018-1022.
- Cook J.R., 1968, The cultivation and growth of *Euglena*, 244-314. En: *The biology of Euglena*, Ed. Buetwon D.E., Vol.I, Academic Press, Inc., San Diego, California.
- Cook, J.R. y Carver, M., 1966, *Plant Cell physiol.*, 7, 377-383.
- Cook, J.R. y Heinrich, B., 1968, *J. Protozool.*, 12, 581-584.
- Cronan, J. E. Jr., Gennis, R.B. y Maloy, S.R., 1987. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium Celular And Molecular Biology*, ed. F. C. Neidhardt, 1:31-55. Washington, DC: Am. Soc. Microbiol.
- Danforth W.F., 1953, *Arch. Biochem. Biophys.*, 46, 164-173.
- Danforth W.F., 1968, *Respiration*, 55-71, En: *The Biology of Euglena*, Ed. Buetwon D.E., Vol. II, Academic Press, Inc., San Diego, California.
- Danforth W.F. y Wilson B.W., 1957, *J. Protozool.*, 4, 52-55.
- Datta, D.B. y Kahn, J.S., 1977, *J. Protozool.*, 24, 187-192.
- Devars S., Torres-Márquez M.E., González-Halpen D., Uribe A. y Moreno-Sánchez, R., 1992, *Plant Science*, 82, 37-46.
- Davis, B. y Merret, M.J., 1973, *Plant physiol.*, 51, 1127-1132.
- Davis, B. y Merret, M.J., 1974, *Plant physiol.*, 53, 575-580.
- Douce, R., 1985, *Mitochondria in Higher plants: Structure, Function and Biogenesis*, Ed. Academic Press, Orlando, Florida.
- Doumas, B. T. y Biggs, H.G., 1972. *Methods. Clin. Chem.* 7, 175-188.
- Doumas, B. T. Watson, W. A. y Biggs, H. G. 1971, *Clin. Chim. Acta.* 31, 87-96.
- Duret S., Bonaly J., Bariaud A., Vannereau A. y Mestre J.C., 1986, *Envirom. Res.*, 39, 96-103.
- Dfáz, Z.J.C. y Hicks G.J.J., 1988, *Ciclo de los ácidos tricarbóxicos*, Capítulo 24, Pp 447-475. En: *Bioquímica e Inmunología Vol.I*, Editado por la Facultad de Medicina de la UNAM. Ed. Piensa S.A. de C.V., México, D.F., PP 741.
- Edelman, M. y Kahana, Z.E., 1989, *Chloroplast Protein Synthesis*, Capítulo 5, 335-350. En: *The biology of Euglena*, Ed. Buetow, D.E., Vol IV Academic Press, Inc., San Diego, California.
- Ernster, L., 1984, *Bioenergetics*, Ed. Elsevier Science Publishers, New York. PP 4-93.
- Froud, S.J. y Anthony, C., 1984, *J. Gen. Microbiol.*, 130. 2201-22012.

- Garro, A. J., Seitz, H. K. y Lieber, C. S. 1981, *Cancer Res.* 41, 120-124.
- Gómez-Silva, B., Stern, A.L., Saidha, T. y Schiff, J.A., 1985, *J. Plant Physiol.*, 120, 431-440.
- González-Halpen, D., 1990, *Ciencia*, 41, 133-152.
- Gornall A.G., Bardawill C.J. y David M.M., 1949, *J. Biol. Chem.*, 177, 751-766.
- Graves L.V. y Becker W.M., 1974, *J. Protozool.*, 21, 771-774.
- Grover, D.S. y Laties G.G., 1981, *Plant Physiol.*, 68, 393-400.
- Gustafsson, J. F. C. 1976. *Clin. Chem.*, 22, 616-622.
- Haigh, W. G. y Beevers, H., 1964, *Arch. Biochem. Biophys.*, 107, 147.
- Hallick, R.B. y Buetow, D.E., 1989, *Chloroplast DNA*, *Capitulo 6*, 352-414. En: *The biology of Euglena* Ed. Buetow, D.E., Vol. IV., Academic Press, Inc., San Diego, California.
- Hendler, W., Bunow, B. y Rieske, J.S., 1985, *J. Bioenerg. and Biomemb.*, 17, 51-64.
- Horau A., 1986, *J. Plant Physiol.*, 123, 349-358.
- Horrum, M.A. y Schwartzbach, S.D., 1980, *Plant. Sci. Lett.*, 20, 133-139.
- Horrum, M.A. y Schwartzbach, S.D., 1980, *Planta*, 149, 376-383.
- Hutner S.H., Bach M.K. y Ross G.I., 1956 *J. Protozool*, 3, 101-107.
- Hutner, S.H. , Zahalsky, A.C., Aaronson, S., Baker, H.S. y Frank, O., 1966, *Capitulo 217-*, En: *Methods in cell physiology*, Vol. II, Ed. Prescott, Academic Press, Ney York.
- Inui, H., Yamaji, R., Saidoh, H., Miyatake, K., Nakano Y. y Kitaoka S., 1991. *Arch. Biochem. Biophys.*, 286, 270-276.
- Inui, H., Miyatake, K., Nakano, Y. y Kitaoka, S., 1984 *J. Biochem.*, 96, 931-934.
- Inui, H., Miyatake, K., Nakano, Y. y Kitaoka, S., 1984, *Eur. J. Biochem.*, 142, 121.
- Inui, H., Miyatake, K., Nakano, Y. y Kitaoka, S., 1982. *FEBS lett.*, 150, 89-93.
- Inui, H., Miyatake, K., Nakano, Y. y Kitaoka, S., 1985 *Arch. Biochem. Biophys.*, 237, 423-429.
- Inui, H., Ono, K., Miyatake, K., Nakano. Y. y Kitaoka. S.. 1987. *J. Biol. Chem.*, 262, 9130-9135.
- Isegawa, Y., Nakano Y. y Kitaoka S., 1984, *Plant Physiol*, 76, 814-818.
- Julistiono, H. and Briand, J. 1992. *Comp. Biochem. Physiol.* 102B, 4, 747-755.
- Kahn, J.S., 1974, *Arch. Biochem. Biophys.*, 164, 266-274.
- Kahn J.S., 1973 *Arch. Biochem. Biophys.*, 159, 646-650.

- Kaplan, L. A., y Pesce, A. J. 1984, Proteins 1269-1325 en *Clinical Chemistry*. The C.V. Mosby Company. St. Louis., Toronto, Princeton.
- Kitaoka, S., Nakano, Y., Miyatake, K. y Yokota, A., 1989, Enzymes and their functional location, 1-135. Eñ: *The Biology of Euglena*, Ed. Buetow, D.E., Vol. IV. Academic press, Inc., San Diego, California.
- Kiyoshi, K., Kiyoshi, K. y Anraku, Y., 1986, *Methods in Enzimology*. Vol. 126.
- Knowless, C.J., 1981, *Diversity of bacterial Respiratory Systems*, Vols. I, II. Boca Raton, Fla: CRC Press.
- Koland, J.G., Miller M.J. y Gennis, R.B., 1984, *Biochemistry*, 23, 1051.
- Konishi, K., Ouchi, M., Kita, K. y Horikoshi, I., 1986, *J. Biochem.* 99, 1227-1236.
- Koop, D. R., Morgan M. T., Tapr, G. E. y Coon, M. J. 1982, *J. Biol. Chem.* 257, 8472-8480.
- Ksenzenko, M., Kostanitov, A.A., Khomutov, G.B., Tikhonov, A.N. y Ruuge E.K., 1983, *FEBS letters*, 155, 19-24.
- Kümmel, W. U. y Brinkmann, K., 1988, *Planta*, 176, 261.
- Lehninger, A. L., 1985, *Bioquímica*, Ed. Omega, S.A., Barcelona, España, PP 1117.
- Lieber, C. S., 1982, *Medical Disorder of Alcoholism Pathogenesis and Treatment*, W.B. Saunders, Philadelphia, P.A.
- Lieber, C.S., 1988, *Semin Liver Dis.* 8, 47-68.
- Lord, M.J. y Merret, J.M., 1971, *J. Biochem.*, 124, 275-281.
- Lowry, O. H., Rosebrough, O. H., Farr, N. J. y Randall, R. J., 1951, *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lloyd, D., 1974, "The mitochondria of microorganisms." Academic Press, London.
- Ludwig, B., 1987, *FEMS Microbiol. Rev.*, 46, 41-56.
- Matsushita, K., Nonobe, M., Shinagawa, E., Adachi, O. y Ameyama, M., 1987, *J. Bacteriol.*, 169, 205-269.
- Medina, L., 1986, *Bioenergética y oxidación biológica*, Capítulo 8 y Cadena respiratoria y fosforilación oxidativa, Capítulo 9, 165-235. En: *Bioquímica*, Ed. Herrera, E., Editorial Interamericana, Mexico, D.F.
- Mego, J.L. y Farb, R.M., 1974, *Biochim. Biophys. Acta*, 350, 237..
- Miyatake, K., Enomoto, T., Masuda, R., y Kitaoka, S. 1985a. *Agric. Biol. Chem.* 49, 2779.
- Moreno-Sánchez, R. y Raya, J.C., 1987, *Plant Science*, 48, 151-157.
- Moreno-Sánchez, R., Torres-Márquez, M.E. y Gómez-Puyou, A., 1991, *Trends*

- Biomem. Bioenerg., 1, 119-150.
- Moreno-Sánchez, R., Hogue, B.A., Bravo, C., Newman, A.H., Basile, A.S. y Chiang, P.K., 1991, *Int. J. Biochem.*, 41, 1479-1484.
- Murphy, J. B. y Kies, M. W. 1960. *Biochim. Biophys. Acta*, 45, 382-384
- Nicholls, D.G., 1982, *Bioenergetics: An Introduction to the Chemiosmotic Theory*, Ed. Academic Press, New York.
- Oda Y., Nakano Y. y Kitaoka S., 1982, *Arch. Microbiol.*, 132, 22-25.
- Oda Y., Nakano Y. y Kitaoka S., 1982, *J. Gen. Microbiol.*, 128, 1211-1216.
- Oda Y., Nakano Y. y Kitaoka S., 1982, *J. Gen. Microbiol.*, 128, 853-858.
- Park B.S., Hirotsani A., Nakano Y. y Kitaoka S., 1982, *Agric. Biol. Chem.*, 47, 2561-2567.
- Peak, M. J., Peak, J.G. y Ting, I.P., 1972, *Biochim. Biophys. Acta*, 284, 1-15.
- Perini, F., Kamen, M.O. y Schiff, J.A., 1964, *Biochim. Biophys. Acta*, 88, 74.
- Poole, R. K., 1983. *Biochim. Biophys. Acta*, 768, 293-317.
- Preece, C.A., 1962, *J. Biochem.*, 82, 61-66.
- Pudek, M. y Bragg, P.D., 1976, *Arch. Biochem. Biophys.*, 174, 546.
- Raison, J.K. y Smille, R.M., 1969, *Biochim. Biophys. Acta*, 180, 500-508.
- Reid, G. A. y Ingledew, 1979, *Biochem. J.*, 182, 465.
- Ritcher, G., 1978, "Plant Metabolism", Thieme, Stuttgart.
- Rutner, A.C. y Price. C.A., 1964, *Int. Congr. Biochem.*, 6th, New York, 32 331 (Abstr.).
- Saidha T., Stern A.T., Lee D.H. y Schiff J.A., 1985, *J. Biochem.*, 232, 357-365.
- Scarpa, A., Brinley, F.J., Fiffert, T. y Dubyak, G.R., 1978, *Ann N.Y. Acad. Sci.* 307, 86-112.
- Schiff, J. A., Lyman, H. y Russell, G. K., *Methods Enzimol.*, 1971, 23, 143.
- Schlodder, P. y Gräber H. T. y Witt, H.T. 1982, *Electron transport and Photophosphorilation*, edited by J. Barber. Elsevier Biomedical Press. 105-167.
- Sharpless T.K. y Butow R.A., 1970, *Journal of Biol. Chem.*, 245, 51-57
- Sharpless T.K. y Butow R.A., 1970, *Journal of Biol. Chem.*, 245, 58-71.
- Shigeoka, S., Onishi, T., Maeda, K., Nakano, Y. y Kitaoka, S., 1986, *FEBS lett.*, 195, 43-47.
- Slack, C.R., Hatch, M.D. y Goodchild, D.J., 1969, *Biochem. J.*, 114, 489-498.
- Stryer, L., 1990, *Bioquímica Vol 1*, Ed. Reverté S.A., España, PP 549.
- Stewart, P.R. y Gregory, P., 1969, *Microbios*, 3, 253-266.



- Takamiya, K. y Dutton, M.J., 1979, *Biochim. Biophys Acta*, 546, 1.
- Tang, Hai-lun y Trumpower, B.L., 1986, *Journal of Biol. Chem.*, 261, 6209-6215.
- Thierbach G. y Reinchenbach H., 1981, *Biochim. Biophys. Acta*, 638, 282-289.
- Ting, I.P. y Rocha, V., 1971, *Arch. Biochem. Biophys.*, 147, 156-164.
- Tokunaga, M., Nakano, Y. y Kitaoka, S., 1976, *Agric. Biol. Chem.*, 40, 1439-1440.
- Tokunaga, M., Nakano, Y. y Kitaoka, S., 1976, *Biochim. Biophys. Acta*, 429, 55-62.
- Tokunaga M., Nakano Y. y Kitaoka S., 1979, *J. Protozool.*, 26, 282-289.
- Thuiller-Bruston, F., Briand, J. y Laval-Martin., 1990, *Biochem. Med. Metabol. Biol.*, 44, 159-174.
- Uribe A. y Moreno-Sánchez R., 1992, *Plant Science*, 86, 21-32.
- Uribe A., Chávez E., Jimenez M. y Moreno-Sanchez R., 1994, *Biochim. Biophys. Acta*, 1186, 1-10.
- Watanabe, H., Mimura, N., Takimoto, A. y Nakamura, T., 1975, *J. Biochem.*, 77, 1147-1155.
- Watanabe, H., Kamita, Y., Nakamura, T., Takimoto, A. y Yamanaka, T., 1979, *Biochim. Biophys. Acta*, 547, 70-78.
- Webster, D., Bignel, A. H. C. y Attwood, E. C. 1977, *Clin. Chem.* 23, 5-12.
- Webster, D., Bignel, A. H. C. y Attwood, E. C. 1974, *Clin. Chim. Acta* 5, 101-108.
- Webster, D. 1974, *Clin. Chim. Acta* 53, 109-115.
- Yokota, A. y Kitaoka, S., 1979, *Agric. Biol. Chem.*, 42, 115-120.
- Yokota, A. y Kitaoka, S., 1979, *Agric. Biol. Chem.*, 42, 121-129.
- Yokota, A., Haga, S. y Kitaoka, S., 1985, *Biochem. J.*, 227, 211-216.
- Yonetani, T., 1968 en *Methods in enzymology*. R. W. Estabrook and Pullman, p 332.
- Yokota A., Hosonati K. y Kitaoka S., 1982, *Arch. Biochem. Biophys.*, 213, 530-537.
- Zubay, G., 1988, *Biochemistry*, 2nd edition. MacMillan, New York.

Vanidad de vanidades, dijo el predicador; vanidad de vanidades, todo es vanidad. ¿Que provecho tiene el hombre de todo su trabajo con que se afana debajo del sol?. Una generación va y una generación viene; más la tierra siempre permanece. Sale el sol, y se pone, y se apresura a volver al lugar de donde se levanta. El viento se dirige hacia el sur, y rodea hacia el norte; va girando de continuo, y a sus giros vuelve el viento de nuevo. Todos los ríos van al mar, y el mar no se llena; al lugar de donde los ríos vinieron, allí vuelven para correr de nuevo. Todas las cosas son fatigosas más de lo que el hombre puede expresar; nunca se sacia su ojo de ver, ni el oído de oír. ¿Que es lo que fué? es lo que será. ¿Que es lo que se ha hecho? lo mismo que se hará; y no hay nada nuevo bajo el sol. Hay algo nuevo de lo que pueda decirse que es nuevo?. Ya fué en los siglos que nos han precedido. No hay memoria de lo que precedió, ni tampoco de lo que sucederá habrá memoria en los que seran después.

**Eclesiastes 1: 2-11.**

**En memoria de mi abuelo.**