



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

CAMPUS IZTACALA

400282  61060

**LA OXIDASA ALTERNA DE MITOCONDRIAS DE
*Euglena gracilis***

BO 1214/96
Eg. 2

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A
PEDRO ANGEL GUZMAN CAN





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología bajo la dirección del Dr. Rafael Moreno Sánchez.

Director de la Tesis:

Dr. Rafael Moreno Sánchez

Miembros del Jurado:

M. en C. Sergio Gonzales

M. en C. Martha Salcedo

Biol. Hector Barrera Escorcía

M. en C. Ignacio Peñaloza Castro

El poder del ser humano crece más que su
sabiduría
(S.G)

Sin observaciones los conceptos están vacíos,
sin conceptos las observaciones están ciegas.
(Kant)

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rafael Moreno Sánchez por su apoyo y asesoría para la realización de este trabajo

Al los Drs. Blanca Barquera y Arturo García por su oportuna colaboración y acertada crítica.

A mis padres Angel Guzmán Ortiz y Nice Guadalupe Can Echeverría quienes me han dado algo más que apoyo y cariño y a quienes yo me deberé toda mi vida y aun después de ésta.

A mis hermanos Guadalupe Edith (BBL) y Jesús Edgar (N) por su apoyo, cariño y comprensión.

A Norma por su presencia y cariño que no conoce de fronteras y va más allá de las promesas

A Dios por ser más que una idea y una religión

A mis amigos por sus risas y momentos inolvidables y a todo aquel manuscrito y persona que de alguna manera contribuyó a la realización de este trabajo.

Dedicado a:
Nice, Angel y Norma (G).

Indice

	pag.
Resumen	1
Introducción	2
Morfología de la mitocondria de Euglena	4
Material de reserva	5
Metabolismo celular	6
Fosforilación oxidativa	7
Ciclo de Krebs en <i>Euglena gracilis</i>	8
Cadena respiratoria	12
Citocromos	15
Complejos respiratorios en Euglena	18
Vías alternativas del transporte electrónico	25
Clasificación de las oxidasas terminales	27
Oxidación de sustratos en mitocondrias de Euglena	35
Inhibidores del transporte de electrones	39
Objetivos	43
Metodología	44
Curvas de crecimiento	44
Medición del consumo de oxígeno	45
Medición de actividad de la citocromo oxidasa	45
Aislamiento mitocondrial	45
Medición de citocromos por espectrofotometría	46
Espectros diferenciales en presencia de monóxido de carbono	47
Determinación de proteína	47
HPLC	47
Actividad de la quinol oxidasa	48
Resultados	49
Curvas de crecimiento	49
Evidenciación de la cadena alterna en mitocondrias de <i>E. gracilis</i>	51
Espectros de absorción de las preparaciones mitocondriales	57
Espectro de absorción oxidado-oxidado+CN	61

Espectro de absorción de las diferentes preparaciones mitocondriales en presencia de diferentes sustratos e inhibidores	62
TMPD oxidasa	67
Cromatografía líquida de alta presión de los extractos	76
Actividad de quinol oxidasa	79
Discusión	81
Conclusiones	84
Perspectivas	85
Apéndice I	86
Apéndice II	88
Apéndice III	89
Bibliografía	91

RESUMEN

La presencia de una cadena alterna en el protista *Euglena gracilis* fué evidenciada en 1970 por Sharples y Butow, para ese entonces ya se contaba con trabajos del transporte electrónico en este organismo (Perini, 1964). Sharples y Butow (1970) encontraron que esta cadena alterna puede ser inducida e incrementada por la presencia de un inhibidor en el medio de cultivo o por la fuente de carbono utilizada. Más tarde, Devars y cols. (1992) evaluaron la relación de la oxidasa alterna con respecto a la oxidasa clásica en células crecidas en glutamato/malato, así como en peptona + acetato no encontrando una diferencia significativa en la expresión de estas dos oxidasas. En 1994 en este mismo laboratorio se encontró que la cadena alterna también podía ser expresada e incrementada al crecer a las células en presencia de etanol como fuente de carbono, por lo que en este trabajo se utilizaron dos condiciones: a) etanol como fuente de carbono, y b) un inhibidor que no fuera antimicina en el medio de cultivo (CN) con el fin de obtener una mayor cantidad de oxidasa alterna con respecto a la oxidasa clásica y así poder secuenciar el transporte de electrones a través de esta vía. Se realizaron curvas de crecimiento, espectros de absorción, ensayos de HPLC y otros estudios. Al igual que Devars y cols. (1992) en este trabajo se encontró una relación poco significativa entre la oxidasa alterna y la oxidasa clásica, una insensibilidad parcial cuando se utiliza CN como inhibidor, el aumento en la cantidad de la oxidasa alterna no corresponde con un aumento en la actividad de ésta. La posibilidad de la existencia de más de una oxidasa alterna fué evidenciada por los ensayos de respiración utilizando TMPD como sustrato. Se descartó la idea de que la oxidasa alterna sea del tipo bo, ya que no se detectó este tipo de citocromo en los ensayos de HPLC, y el hecho de que este organismo oxide quinona 1 en presencia de un inhibidor del complejo bcl nos hace sospechar que una de las oxidasas presentes en este organismo sea del tipo quinol oxidasa concluyendo que todas las evidencias presentadas en este trabajo apuntan hacia una relación evolutiva con bacterias del tipo gram negativas como *Paracoccus denitrificans* y *Rhodobacter spheroides* entre otras.

INTRODUCCION

Euglena gracilis es un organismo muy interesante por su origen y características animales y de plantas superiores así, como algunas exclusivas del grupo. Diferentes cepas de *Euglena gracilis* se diferencian entre sí, ya que algunas tienen la capacidad de crecer en hidratos de carbono y otras no. Tienen necesidades orgánicas variadas incluso cuando se desarrollan heterotróficamente presentan una amplia capacidad sintética, por lo que necesitan incorporar nutrientes orgánicos (Buetow 1968).

El género *Euglena* presenta una distribución muy amplia, encontrándose en muy diversos habitats: agua dulce, salobre, ácida, alcalina, en condiciones aeróbicas, anaeróbicas. Por otro lado existen formas solitarias, coloniales, palmelas y parásitas (Barnes, 1988). Este género es taxonómicamente problemático, por presentar características animales y vegetales; por lo que se le ubica en los reinos: animal (flagelo y mitocondria) y plantae (película, cloroplastos y mitocondria). Desde el punto de vista del reino plantae, estos organismos son ubicados como algas y pertenecen a la división euglenophyta (Margulis, 1990). Y son ubicados en estos sitios debido a la presencia de cromatóforos, y muy en especial de flagelos locomotores (Martínez y Gutiérrez, 1988). El orden Euglenida comprende muchas especies divididas en aproximadamente 40 géneros (Leedale, 1968). Su reproducción es asexual por fisión longitudinal binaria.

Euglena gracilis presenta dos tipos de flagelo unidos en la base del reservorio, uno interno que no emerge y usualmente está unido a un fotoreceptor, el cual probablemente contribuye a la transmisión de señales y otro que se extiende más allá de la apertura anterior, siendo el responsable del movimiento helicoidal (Sleigh 1986). Este flagelo presenta filamentos delgados los cuales facilitan el movimiento en el agua. Presentan una mancha ocular o estigma con un pigmento llamado Astaxantina.

Euglena gracilis posee un complejo membranal conocido como película que es rígida y ondulada, se compone de 4 fibrillas, así como de 4 tubulos subpeliculares provenientes del retículo endoplásmico. Esta película contiene 68% de proteínas, 17% de lípidos y 13% de carbohidratos así como un alto

contenido de prolina y valina, y bajas concentraciones de ácido aspártico. Tiene un contenido de esteroides muy bajo.

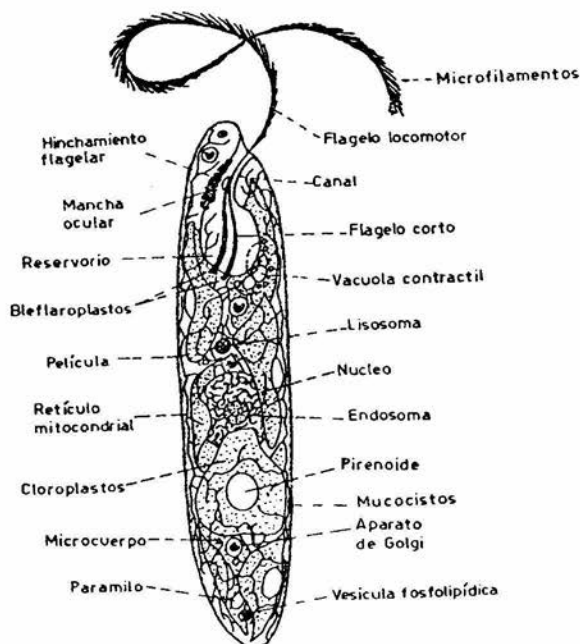


Figura 1.-Esquema de Euglena mostrando algunas de sus estructuras sub celulares tomado de Martínez y Gutiérrez (1988).

Entre los carbohidratos contenidos en esta estructura se encuentran la arabinosa que corresponde al 89% del contenido de carbohidratos, la glucosa (8.6%) y la lactosa (1.6%) contiene además pequeñas cantidades de otros azúcares como ramnosa:fructuosa:xylosa:manosa:glucosamina y ácido glucurónico. Las pentosas comprenden el 80% del total de carbohidratos. Por otro lado estos azúcares pueden estar formando parte de glicoproteínas. (Nakano y cols., 1987).

La película presenta un movimiento citoplásmico ameboso. Se han encontrado fosfatasa ácida en la película. Hay células (secretan mucosa) que tienen la función de lubricar el espacio entre los surcos o estrias (Summer y Blume, 1965)

Las células de *Euglena* crecidas en la obscuridad presentan proplastidos que dan origen a los cloroplastos cuando las células se exponen a la luz.

Morfología de la mitocondria de *Euglena*:

Cada célula de *Euglena gracilis* crecida en la obscuridad contiene más de 500 mitocondrias (Schiff y cols., 1971).

La mitocondria está limitada por dos membranas de 60Å aproximadamente; la membrana interna esta rodeada por una zona cristalina y se caracteriza por ser irregular. El número y la forma de estos organelos varía considerablemente aunque tienen la arquitectura básica común a todas las mitocondrias, tienen 2 membranas, la interna está doblada formando crestas que se extienden hasta la matriz.

La matriz mitocondrial es granular y se hace más densa en la fase estacionaria de crecimiento; al crecer las células en la obscuridad la masa mitocondrial aumenta así como en condiciones deficientes de vitamina B12, y las mitocondrias se hacen más pequeñas.

Las mitocondrias de *Euglena* son estructuras pequeñas, circulares o bandas más o menos largas. En células crecidas en la obscuridad son ovoides o elongadas y en células crecidas en la luz forman un complejo interconectado (Lefort, 1975; Brandes y cols., 1964). Y están ordenadas en condriones que son estructuras parecidas a redes que atraviesan toda la célula, es una estructura plástica y filamentosa que se presenta tanto en células crecidas en la luz como en la obscuridad

Las mitocondrias se funden y se ramifican para formar la red. Esta red está en constante movimiento, ya que constantemente se están fragmentando y fusionando (retículo mitocondrial). Este retículo es delicado y complejo en células control y más restringido en células con fuente de carbono limitada. La fosfatasa ácida se encuentra en regiones específicas del retículo, y se cree que está involucrada en la constante fusión y rompimiento del retículo. La estructura de este retículo varía con las condiciones de crecimiento. A esta estructura se le conoce como mitocondria gigante (Brandes y col., 1964; Leedale y Buetow, 1967; Pelegrini, 1976).

La forma del condrioma cambia cuando la *Euglena* se expone a inhibidores, como antimicina, en este caso la red se forma por filamentos cortos. Aunque no se sabe que ventaja tiene para la *Euglena* el formar esta mitocondria gigante, se ha sugerido que este retículo proporciona una mayor área para la difusión del oxígeno. Este tipo de retículo es ampliamente utilizado en la naturaleza: algas verdes (clorela), euglenoides, protozoarios, fungi, levadura. También en mamíferos, hígado, neuronas, músculo y en plantas superiores (Osafune, 1970; Calvayrac y cols., 1974; Bakeva y cols., 1978).

El condrioma ocupa aproximadamente el 6% del volumen celular en condiciones heterotróficas se hipertrofia y ocupa hasta el 16 % en células crecidas en la obscuridad en donde las crestas se encuentran en forma concentrica.

Las mitocondrias de *Euglena gracilis* pueden formar una red (Mitocondria gigante) que dificulta el aislamiento de mitocondrias acopladas, sin embargo se han aislado mitocondrias intactas por digestión con tripsina (Gómez-Silva y cols., 1985), y por sonicación (Moreno-Sánchez y Raya, 1988). La mitocondria de *Euglena gracilis* contiene tanto DNA como RNA, y el RNA es distinto del RNA contenido en cloroplastos y citoplasma (Krawiec y Eisenstadt, 1970), ya que los hidrolizados ácidos de este RNA mitocondrial tienen baja absorbancia en ultravioleta y pueden ser distinguidos del RNA citoplasmático y del de cloroplastos.

El factor de elongación protéico en mitocondrias de *Euglena* ha sido purificado. Este funciona bien en ribosomas de cloroplastos de *Euglena gracilis*, así como en células de *Escherichia coli* pero no tiene actividad en ribosomas citoplasmáticos de germen de trigo y difiere de la translocasa de levadura ya que esta no tiene actividad en cloroplastos. El grado de sensibilidad de las translocasas a ácido fucshínico se toma como indicativo de la relaciones entre estas, la sensibilidad a este ácido en *Euglena* es similar a la sensibilidad de *Escherichia coli*, pero es 6 veces más sensible que la de *Bacillus subtilis* (Everly y Spremluh, 1985).

Materiál de reserva

La célula de *Euglena* como otros organismos del género Euglenophita acumulan reservas de carbohidrato en forma de paramilo (β 1-3 glucagon)

(Buetow y Buchanans,1968). El paramilo no es degradado en células blanqueadas aun cuando estas crezcan en medios, sin fuente de carbono ni nitrógeno. Sin embargo, el paramilo es degradado rápidamente al exponer las células a la luz y producen metabolitos que les sirven para producción de energía, así como para el desarrollo de cloroplastos. La degradación del paramilo en células blanqueadas puede ser inducida por la presencia de amonio en el medio (Sumida y cols.,1987).

Las reservas de grasa en células de *Euglena* se encuentran en forma de ceras y su degradación es inducida por la presencia de oxígeno. Los compuestos producidos a partir de estas ceras se convierten en compuestos nitrogenados y son utilizados para el desarrollo de proplastidos en la obscuridad. Parte de estos son convertidos en glucosa y luego en paramilo (Osafune y cols.,1990). En anoxia se obtiene ATP de la fermentación de estos ésteres de cera. Un sistema de síntesis de ácidos grasos independiente de malonil CoA interviene en esta fermentación.

La regulación de la fermentación de estos ésteres depende del O_2 y no se ha entendido completamente todavía. En esta regulación también interviene una piruvato deshidrogenasa dependiente de NADP, diferente a la piruvato deshidrogenasa de otros organismos. La piruvato deshidrogenasa es sensible a O_2 como la de organismos anaerobios como *Clostridium acidurico* quien usa FADH y metilbiológico como aceptores de electrones como la de organismos anaeróbios. Es interesante haber encontrado esta enzima sensible a oxígeno en mitocondrias de un eucariote (Inui y cols., 1984).

Metabolismo celular

Este organismo es notable por que se ha visto que puede adaptarse a una gran variedad de condiciones nutricionales (Hutner,1966) tanto autótrofas como heterótrofas. Calvayrac (1972) menciona que las mitocondrias de *Euglena gracilis* crecida en la obscuridad en presencia de diversos sustratos presenta una serie de cambios morfológico cíclicos de acuerdo al ciclo de división celular.

Euglena gracilis es capaz de metabolizar una gran cantidad de sustratos, por que posee una gran cantidad de información genética necesaria para llevar a cabo estas reacciones metabólicas, en presencia de estímulos nutricionales

apropiados. Esta adaptabilidad no parece ser debida a mutaciones, ya que las células de *Euglena* no llevan a cabo recombinación sexual, además de tener un comportamiento cromosómico octaploide (Leedale 1968). Calvayrac y cols. (1985) sugieren que la respiración insensible a CN no es un mecanismo adaptativo ya que esta puede ser incrementada después de dos semanas de anoxia y durante este tiempo la célula compensa la inhibición o la pérdida de la citocromo c oxidasa (Schawb, 1973).

Se ha descrito que las mitocondrias de estos organismos pueden oxidar sustratos como lactato, succinato, Glutamato/malato, isocitrato, 2-oxoglutarato, acetato, GABA, etanol, succinato semialdehído y NADH exógeno. (Buetow y Buchanan, 1965; Sharpless y Butow, 1970; Collins y cols., 1975; Kummel y Brinkmann 1988; Devars y cols., 1992; Price, 1962.; Rutner y Price, 1964; Llord y Merret 1971; Calvayrac y cols., 1978; Tokunaga, 1979; Isegawa, 1984; Khan, 1974, Datta y Khan, 1977; Tokunaga y cols., 1976a; Cook y Heinrick, 1968; Graves y cols., 1974; Oda y cols., 1982; Danfort, 1957; Uribe y Moreno-Sanchez, 1992; Uribe y cols., 1994).

Entre las enzimas glicolíticas *Euglena gracilis* contiene tanto aldolasa clase I (encontradas en plantas y protozoarios) como aldolasas tipo II (encontradas en Hongos, Bacterias y algas verdeazules).

La síntesis de ácidos grasos en *Euglena* a diferencia de los mamíferos no incorpora malonil CoA además de ser sensible a avidina

Fosforilación Oxidativa.

La fosforilación oxidativa en mitocondrias aisladas de *Euglena* fue estudiada por Buetow y Buchanan (1965) quienes mostraron que existe una gran similitud con las mitocondrias de mamífero, cuando las células son crecidas en la oscuridad y se utiliza glutamato/malato como fuente de carbono.

Ciclo de Krebs en *Euglena gracilis*

(Piruvato/NADP Oxidorreductasa)

La descarboxilación oxidativa del piruvato concomitante en la formación de acetilcoenzima A es catalizada por la piruvato deshidrogenasa. En este organismo esta enzima no es un complejo multienzimático ; y cataliza la oxidación del piruvato en una reacción que utiliza NADP. Esta piruvato deshidrogenasa dependiente de NADP juega un papel fisiológico importante en la fermentación de ésteres de cera. La oxidación del piruvato por el NADP y el intercambio de CO₂ son similares a las reacciones catalizadas por la piruvato: ferredoxina oxidoreductasa. La piruvato deshidrogenasa contiene una molécula de FAD y 4 moléculas de Fe el cual parece estar contenido en complejos Fe-azufre. (Inui y cols.,1987). Además esta enzima es inhibida por Oxígeno.

La glutamato deshidrogenasa a diferencia de las células de mamífero solo se localizan en el citosol (Buetow 1969).

La malato deshidrogenasa mitocondrial en *Euglena gracilis* crecida en la obscuridad es principalmente soluble (3 veces más que si se crece en la luz). Este organismo presenta dos malato dehidrogenasas dependientes de NAD y NADP . Esta malato dehidrogenasa oxida al malato, sin embargo una alta concentración de este sustrato tiene efectos inhibitorios sobre la enzima.

Cuando se agrega glutamato al medio los niveles de esta enzima se incrementan siendo el mejor inductor de la expresión de esta enzima. En un experimento para medir la actividad de la malato deshidrogenasa se probaron 8 medios como fuentes de carbono, obteniéndose las siguientes actividades: Glutamato>etanol>ac. acético>ac. succínico> ac. pirúvico>glucosa<ac. málico y fructosa, se vio que la enzima incrementó sus niveles y su actividad usando glutamato seguido de etanol como fuentes de carbono (Englar y Breiger, 1962; Peak y cols., 1972).

A diferencia del ciclo de Krebs de mitocondrias de células de mamífero, las mitocondrias de *Euglena gracilis* (Fig.2) presentan una 2-oxoglutarato descarboxilasa y succinato semialdehído deshidrogenasa las cuales oxidan al 2-oxoglutarato en una reacción dependiente de coenzima A y de pirofosfato

de tiamina, ambas enzimas se encuentran de manera constitutiva en estas células. El succinato semialdehído producido se convierte en succinato por la semialdehído deshidrogenasa. Ambas enzimas son dependientes de NAD y NADPH (Tokunaga y cols., 1976a) y se encuentran en la matriz mitocondrial.

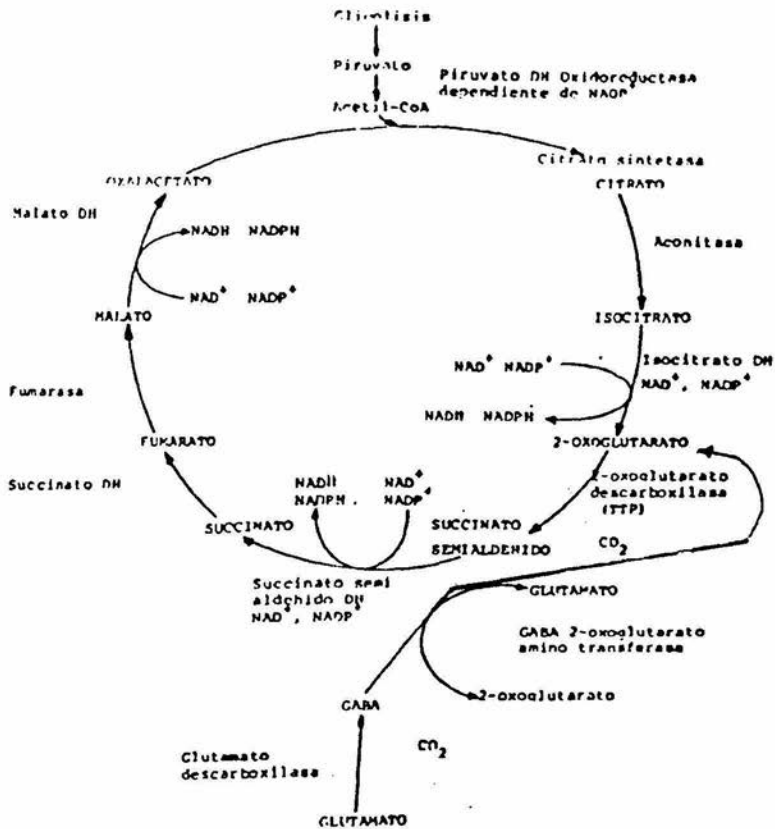


Figura 2. Ciclo de Krebs de *Euglena gracilis* y sus diferentes enzimas (Buetow, 1968)

La enzima que sustituye al complejo de PDH en *Euglena gracilis* es la PDHOR la cual es extremadamente sensible a oxígeno, y el piruvato como sustrato no es oxidado, en presencia de oxígeno este inhibe la actividad de la enzima in situ, in vitro, y reestablece la actividad un 90%. En anaerobiosis la enzima no es sensible a altas concentraciones de piruvato. Esta parece ser la clave para regular en la mitocondria la síntesis de ácidos grasos y la fermentación de ésteres de cera en condiciones anaerobias. La enzima tiene un centro hierro-azufre que contiene TPP. La PDHOR fue aislada y purificada a 30°C por Inui (1990). Es una proteína homodimérica de un peso molecular de 309,000 Da, tiene una actividad de 0.6 $\mu\text{moles/mg/min}$.

El piruvato sufre una descarboxilación a acetaldehído y posteriormente se oxida para formar acetato y finalmente producir AcetilCoA, esto ocurre en levaduras y en *Euglena gracilis* o bien, el piruvato pasa por una carboxilación oxidativa directa a AcetilCoA en una sola reacción como sucede en mamíferos.

Se ha reportado (Yokota y cols., 1982; Inui y cols., 1982 y 1984) en la mitocondria de *Euglena* un complejo de la PDH dependiente de lipoato, CoA y NAD; este complejo está ampliamente distribuido en animales, plantas y algunos microorganismos. Se ha demostrado la presencia de otra PDH pero, dependiente de NADP, metilbiológico y FAD⁺ como aceptores de electrones.

Citrato sintetasa. Cataliza la reacción de oxaloacetato a citrato, y se encuentra localizada en la matriz mitocondrial y los glioxisomas de *Euglena gracilis*; participa en el ciclo del glioxalato (Graves y cols., 1974; Collins y Merret, 1975). Aislada y purificada, está formada de una subunidad con un peso molecular de 44, 000 Da similar a la de otros eucariotes.

Aconitasa. Involucrada en la conversión de citrato a isocitrato localizada en la membrana interna de la mitocondrial y detectada tanto en mitocondrias como en partículas submitocondriales (Bégin-Heic, 1973); en mitocondrias y glioxisomas (Cook, 1968).

Isocitrato Deshidrogenasa. Lleva a cabo la conversión de isocitrato a α -cetoglutarato, se sabe que existen dos formas que son dependientes de NADP las cuales se encuentran localizadas en citoplasma y mitocondrias. La dependiente de NAD sólo se encuentra en mitocondria. En *Euglena gracilis* sólo está presente la forma dependiente de NAD.

En mitocondrias de animales y plantas el α -cetoglutarato es convertido a succinato vía de la succinil CoA catalizado por la α -KGDH (Zubay, 1988). En *Euglena gracilis* no existe el complejo Succinil CoA sintetasa, esta enzima es substituida por la α -cetoglutarato descarboxilasa dependiente de TPP, que presenta una alta especificidad por su sustrato y no es inhibida en presencia de oxaloacetato o piruvato, su localización es en la mitocondria exclusivamente (Shigeoka y cols., 1976). La enzima tiene un peso molecular

aproximado de 248, 000 Da y está compuesta de 4 subunidades idénticas con un peso de 62,000 Da cada una.

Succinato semialdehído deshidrogenasa. La forma dependiente de NADP es 8-9 veces mayor que la dependiente de NAD, aislada y purificada tiene un peso molecular de 150,000 Da (Tokunaga y cols., 1976). Esta enzima forma parte de la "lanzadera" del GABA ya que contribuye a la asimilación de glutamato, que solo como fuente de carbono soporta el crecimiento de *Euglena* (Kempner y Miller, 1965). Por lo tanto, la adición de este al cultivo incrementa la actividad de la enzima.

Glutamato deshidrogenasa. La forma dependiente de NADP está localizada en la matriz mitocondrial en mamíferos y *Tetrahymena pyriformis* (Smith y cols., 1975); la dependiente de NAD en mitocondrias y cloroplastos de plantas superiores (Douce, 1985) su actividad no ha sido reportada en *Euglena gracilis*, pero sí la dependiente de NADP en citosol (Chaudhary y cols., 1984). La oxidación es pobre sólo como glutamato, pero al añadirle malato aumenta considerablemente la actividad por la lanzadera del GABA, que une al ácido glutámico al ciclo de Krebs. Esta oxidación está acoplada a la fosforilación produciendo P:O de 2.3-2.5 (Moreno-Sánchez y Raya, 1987). Es fotoestimulable y tal vez juegue un papel importante en la asimilación de NH_4 y la fotoregulación de esta síntesis ocurre durante el desarrollo de los cloroplastos.

Succinato deshidrogenasa. Está localizada en la membrana interna mitocondrial. Es inhibida en presencia de cicloheximida pero no por cloranfenicol lo cual sugiere que es sintetizada en el citoplasma (Davis y Merret, 1974). En células crecidas en G/M como fuente de carbono, el valor de su K_m es de 1.4 mM y de su V_{max} 0.47 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (Sharpless y Butow, 1970).

Fumarasa. Se encuentra localizada en la matriz mitocondrial, ha sido aislada (Tokunaga y cols., 1979) y purificada por Shibata y cols. (1985) consta de dos subunidades de 60 kDa cada una. La fumarasa que presentan las células de *Euglena* es muy lábil, se estabiliza por fierro y reactivos sulfhidrilos (Susuki y Tamura, 1979). Las células crecidas heterotróficamente en la obscuridad muestran un incremento en la actividad de la enzima al ser iluminadas o por la adición de etanol o malato (Buetow, 1968).

Malato deshidrogenasa. Cataliza la reacción de malato a oxaloacetato. Se ha reportado dos formas una mitocondrial y otra citoplasmica. La forma dependiente de NAD se encuentra en la matriz y está presente exclusivamente en animales (Zubay, 1988) y en plantas. En *Euglena* la forma dependiente de NAD ha sido aislada y purificada. La forma dependiente de NADP se encuentra en matriz en un 42% y un 50% en el espacio intermembranal; localizada en cloroplastos de plantas superiores (Ting y Rocha, 1971). En *Euglena gracilis* se encuentran las dos formas y se localizan en mitocondria (69, 000 Da) y citoplasma (72,400 D) (Peak y cols, 1972). Isegawa (1984), encontraron una forma en matriz y la otra en el espacio intermembranal, con un peso molecular aproximado 71,000 Da.

En un cultivo de *Euglena* crecido heterotróficamente se encontró que en el citoplasma de la células existe un complejo multienzimático que consiste de fosfoenolpiruvato carboxi cinasa, AcetilCoA carboxilasa y malato deshidrogenasa, las cuales están involucradas en el metabolismo de lípidos (Wolpert y Ernst-Fonberg, 1975). La actividad de la fosfoenolpiruvato carboxi cinasa mitocondrial aumenta al doble por la adición de glutamato y en un 50% al añadirle etanol o succinato, sugiriendo que los intermediarios del ciclo de Krebs regulan esta actividad.

Lanzadera del GABA:

En *Euglena gracilis* el ácido γ -aminobutírico en el metabolismo del glutamato involucra tres enzimas: glutamato descarboxilasa, GABA- α -cetoglutarato aminotransferasa y succinato semialdehído deshidrogenasa unidas al glutamato en el ciclo de Krebs. En rata la glutamato descarboxilasa está localizada en el citosol, las otras dos enzimas se encuentran en la mitocondria (Salganicoff y DeRobertis, 1965)

En *Euglena* las tres enzimas se encuentran localizadas en la mitocondria (Tokunaga y cols., 1979)

Cadena Respiratoria.

Los equivalentes reductores producidos en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos entran a la cadena de oxido-reducción localizada en la

membrana interna mitocondrial. En este paso de la vía de la fosforilación oxidativa se completa la oxidación de los sustratos a través de 4 complejos enzimáticos. Estos complejos han sido aislados de mitocondrias de mamífero (Hatefi, 1985).

El complejo uno o NADH-Ubiquinol oxidoreductasa se compone de 16 subunidades y varios grupos prostéticos como flavin mononucleotidos (FMN) y contiene de 16 a 24 átomos de Fe no hémicos organizados en 5 a 8 centros Fe-S. Este complejo cataliza la transferencia de 2 electrones desde el NADH hasta la Ubiquinona que es una molécula pequeña que difunde en el interior de la membrana lipídica. El cambio de potencial generado por este complejo equivale a -0.42 voltios siendo suficiente para que se produzca un transporte de protones hacia el espacio intermembranal. (Ragan, 1978)

El complejo dos o succinato-ubiquinol oxidoreductasa consta de cuatro subunidades y tiene como grupos prostéticos tres centros Fe-S, un citocromo de tipo b y un grupo FAD. El potencial de reducción estándar generado por el paso de electrones desde el succinato hasta la ubiquinona es de -0.113 voltios lo que resulta insuficiente para que se produzca la transferencia de protones de uno al otro lado de la membrana. (Hatefi, 1985)

El complejo tres o Ubiquinol-citocromo c óxido reductasa está compuesto por 11 subunidades y tres grupos prostéticos dos citocromos tipo b, un citocromo tipo c y un centro Fe-S. Al igual que el complejo uno este complejo cataliza la expulsión de protones hacia el exterior de la mitocondria y genera un cambio de potencial de -0.143 voltios. Este complejo cataliza el transporte de electrones desde la ubiquinona hasta el citocromo c. A través de un ciclo que se conoce como el ciclo Q en el que dos protones del ubiquinol son expulsados hacia el exterior de la mitocondria, mientras que uno de sus electrones es transferido al centro Fe/S que a su vez lo transfiere al citocromo c1 y este al citocromo c. Por otro lado el radical semiquinol producido de la oxidación del ubiquinol dona un electrón al hemo b 566 y este al hemo b 562 quien reduce a la quinona para producir de nuevo el radical semiquinol que al captar dos protones de la matriz mitocondria se convierte nuevamente en ubiquinol. (Trumpower 1994) (Fig.3).

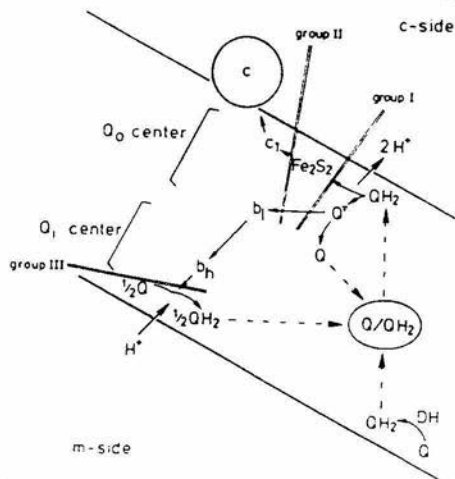


Figura 3. Ciclo Q. Transporte de electrones y protones a través del complejo bc1 mitocondrial. Tomado de Rawn (1989).

El citocromo c es oxidado por el complejo cuatro o Citocromo c oxidasa con la producción de una molécula de agua. Dicho complejo consta de 6-7 subunidades y como grupos prostéticos tiene dos hemo tipo a, y dos átomos de Cu. Esta proteína funciona como bomba de protones ya que libera una energía equivalente a +0.46 voltios. Esta energía es suficiente para ser utilizada por la ATP sintetasa en la síntesis de una molécula de ATP, (7kcal/mol). (Revisado en Nicholls, 1987). Según la hipótesis quimiosmótica, los intermediarios químicos de alta energía son substituidos por una conexión entre procesos químicos y de transporte (Mitchell, 1975).

Cuando los electrones de alta energía de los hidrógenos del NADH y el FADH son transportados a lo largo de la cadena de transporte electrónico, la energía liberada, cada vez que pasan de ciertas moléculas portadoras a la siguiente es utilizada para bombear protones a través de la membrana interna, desde la matriz hasta el espacio intermembranal. Esto crea un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna mitocondrial, y el reflujo de protones a favor de este gradiente es utilizado a su vez para impulsar, a través de una enzima ligada a la membrana la ATP sintetasa, la conversión de ADP + Pi en ATP, completando el proceso de la fosforilación oxidativa.

El ADP es llevado a la matriz mitocondrial por un sistema de transporte de intercambio ADP-ATP, por cada molécula de ADP introducida una molécula

El ADP es llevado a la matriz mitocondrial por un sistema de transporte de intercambio ADP-ATP, por cada molécula de ADP introducida una molécula de ATP es desplazada hacia fuera a favor del gradiente electroquímico. En la figura 4 se muestra la participación de los complejos respiratorios en el transporte de electrones desde el NADH hasta el O_2 , en la membrana mitocondrial.

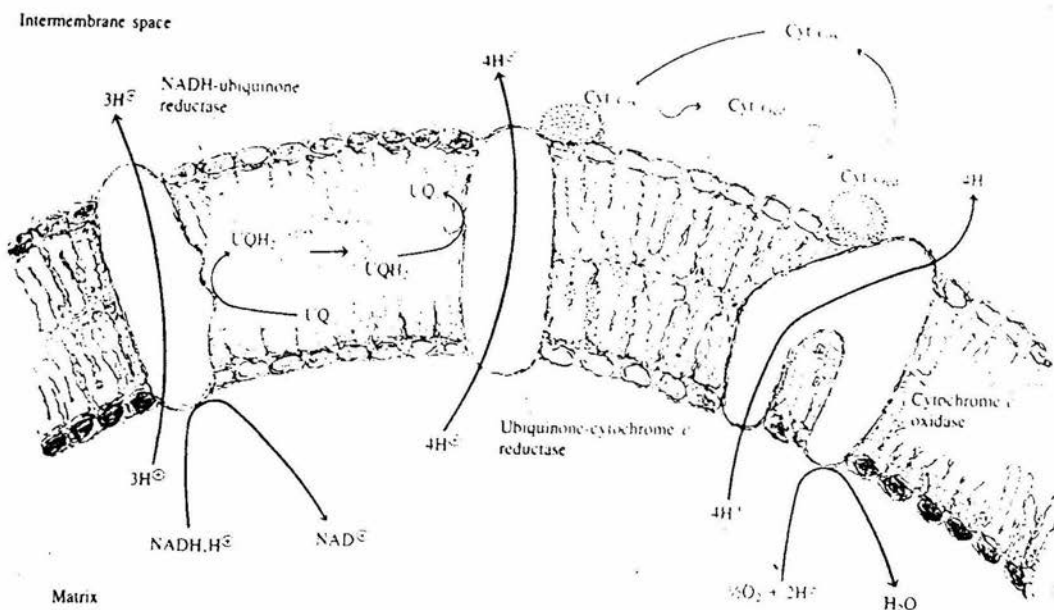


Figura 4. Complejos enzimáticos componentes de la cadena respiratoria. (Rawn 1989)

Citocromos

Los citocromos son un grupo de proteínas que contienen grupos hemo los cuales actúan como acarreadores de un electrón. Estos grupos hemo contienen un átomo de Fe en el centro del anillo tetrapirrólico, el cual oscila entre la forma Ferrosa y Férrica durante el transporte electrónico. Existen tres clases principales de citocromos a, b, y c que difieren en sus cadenas laterales y en el grupo hemo (Fig.5). El grupo hemo del citocromo tipo b es el mismo encontrado en la hemoglobina y mioglobina; el citocromo tipo a difiere en que su grupo hemo está sustituido en su carbono 2 por un grupo vinílico $CH=CH_2$ con un alqueno poliinsaturado y porque su carbono 8 está sustituido por un grupo aldehído. El citocromo tipo b en lugar de tener ambos grupos vinílicos tiene grupos tiometílicos. El citocromo c ha sido el más

estudiado de todos los citocromos y se distingue porque su grupo hemo se encuentra covalentemente unido a través del grupo sulfidrido y este hemo es un factor importante en la estabilidad en la estructura terciaria de la proteína, además de ser el citocromo más conservado en la naturaleza (Rawn, 1989).

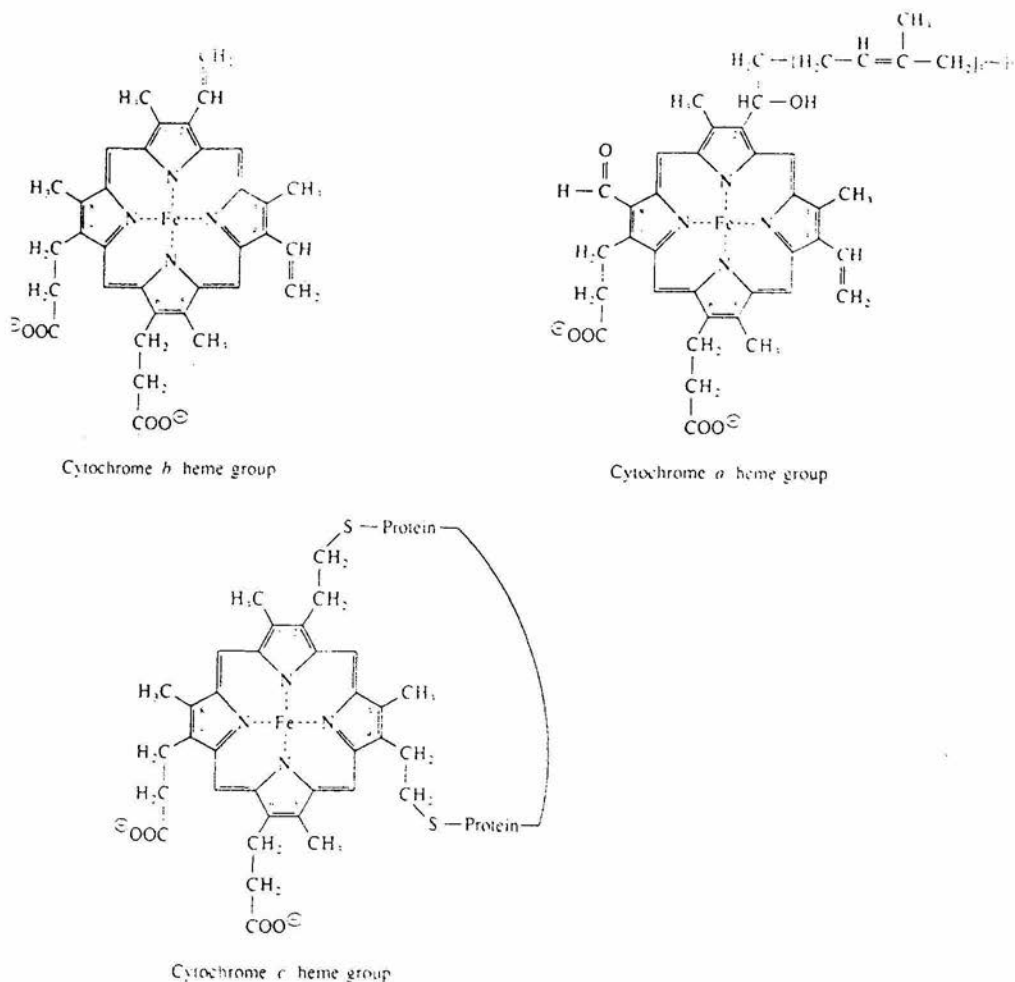


Figura 5. Grupos hemo de los citocromos b a y c.(Rawn 1989)

Las tres clases de citocromos pueden distinguirse entre ellas por diferencia en sus espectros de absorción. En la Tabla 1 se muestran los máximos de absorción característicos de dichos citocromos en la zona α , así como las funciones que se conocen de ellos.

Grupos de citocromo	Nombre y número	Posición del pico α (nm)	Características
a	aa3	595-607	Se encuentra en la mayoría de los organismos eucariotes y procariotes. Se compone de 7-13 subunidades en los eucariotes y de 2-3 en los procariotes. Contiene 2 grupos hemo a y de 2-3 átomos de Cu por molécula.
	a1	aprox.590	Se cree que es la oxidasa terminal de algunas bacterias aeróbicas. Sin embargo no se ha obtenido una citocromo a1 autooxidable (ver ba3)
	caa3	aprox.604 (pico debido al hemo a)	Citocromo e oxidasa obtenido de algunas bacterias (gram positivas).Este citocromo e oxidasa generalmente esta fusionado con la subunidad II
b	b	560-563	Se encuentra en mitocondria y transporta electrones desde la ubiquinona hasta el citocromo c1. Tiene 2 portohemos por molécula. Uno de ellos es responsable del pico a 563 y el otro del pico a 566. Se obtuvo de mitocondrias de corazón de bovino.
	b1	557-560	Originalmente se pensó que era el donador de electrones de la nitrato reductasa en bacterias desnitrificantes. Debido a que el termino b1 es confuso parece mejor no utilizarlo
	b3	559	Se encuentra en fracción microsomal de tejidos no fotosintéticos de plantas. Sin embargo como su función no se ha elucidado el nombre b3 carece de sentido
	b6	563	Funciona como transferencia de electrones en sistemas fotosintéticos de cloroplastos y algas verde azules. Es equivalente al citocromo b de mitocondria.
	b7	560	Se encuentra en varias especies Anum. Parece funcionar en el sistema de oxidasa alterna insensible a cianuro en plantas.
	bo		Es la oxidasa terminal de algunas bacterias y protozoarios. Tiene una molécula de protohemo y una de hemo O o dos de hemo O y una de Cu
c	c	549-558	Funciona como donador electrónico directo para citocromo e oxidasa (aa3, caa3, aco, ba3, baa3, y los tipos co) y enzimas de función similar. Su peso molecular esta entre los 8000 y los 13000 daltons.
	c1	550-561	Funciona como donador de electrones para el citocromo e solo se puede solubilizar en presencia de detergentes. Su peso molecular es de 30000 daltons
d	d	aprox. 630	Probablemente funciona como oxidasa terminal de algunas bacterias (y protozoarios). Sin embargo no ha sido purificado así que sus propiedades se desconocen.
	bd	635 (pico debido al hemo d)	Es la oxidasa terminal de algunas bacterias. tiene 2 protohemos y un hemo d por molécula
	cd1	aprox.625 (pico debido al hemo d1 a un pH de 5.7)	Es la nitrato reductasa de muchas bacterias desnitrificans. Tiene una molécula de hemo c y una de hemo d1 por molécula.

Tabla 1. Tipos de citocromos, sus picos de absorbencia en la zona alfa del espectro, y algunas otras características o propiedades.(Yamanaka,1992)

Complejos respiratorios en *Euglena gracilis*

Complejo I

El complejo I de *Euglena gracilis* contiene flavina (FMN) unida no covalentemente así como 4 centros Fe-azufre (Jonnes 1988)

Al igual que en la gran mayoría de los organismos las células de *Euglena* contienen las coenzimas NADH y FADH intramitocondriales. En contraste con las mitocondrias de plantas (Moller, 1986) quienes oxidan NADH exógeno por una NADH deshidrogenasa insensible a rotenona localizada en la cara externa de la membrana interna mitocondrial. La NADH oxidasa en mitocondrias de *Euglena gracilis* es sensible a rotenona y tiene una eficiencia similar a la NADH deshidrogenasa que oxida el NADH producido en el ciclo de Krebs. (Kummel y Brinkman, 1988). Se ha propuesto que en presencia de CN el NADH es oxidado por la ruta insensible a CN estimable por AMP a diferencia del succinato, esta si esta acoplada a la fosforilación (P:O=1) (Sharpless y Butow, 1970). La K_i para rotenona utilizando NADH como sustrato es de $1.15 \mu\text{M}$. En presencia de rotenona y antimicina, el CN inhibe el 100% del consumo de oxígeno con NADH como sustrato.

complejo II

La succinato deshidrogenasa cataliza la oxidación del succinato a fumarato y transfiere equivalentes reductores preferentemente a la ubiquinona. El alto potencial redox del par fumarato succinato hace insuficiente la contribución de esta enzima en la conservación de energía lo que impide el bombeo de protones. (Jonnes, 1988). La oxidación del succinato se efectúa a través de la vía clásica y es estimable por AMP, ADP, ATP, GMP, e IMP, pero no esta acoplada a la fosforilación. Cuando se utiliza succinato como fuente de carbono en el medio de cultivo (Calvayrac y cols., 1970; Sharpless y Butow, 1970) este no estimula la respiración endógena y la célula obtiene su energía a través de otros procesos metabólicos. El succinato también puede ser oxidado a través de una succinato oxidasa siempre y cuando las células de *Euglena* sean adaptadas a crecer en presencia de antimicina a. Los niveles de succinato deshidrogenasa se ven incrementados con la adición de Glutamato al medio de cultivo (Tokunaga y cols., 1976b).

Quinona

Otro de los componentes de la cadena respiratoria es la quinona. En la que se ha demostrado que es esencial para el flujo de electrones desde las flavo proteínas hasta el oxígeno y es requerido de sustrato para la reducción de los citocromos. Las quinonas están formadas por núcleos 1,4-benzoquinonas o naftoquinonas unidas a largas cadenas de poli isoprenoides. La forma reducida de las quinonas acepta 4 protones para formar los correspondientes quinoles los cuales se forman vía los intermediarios semiquinona. (Jonnes, 1988).

En *Euglena gracilis* existe una quinona con 9 cadenas isoprenoides (Q9) a diferencia de la mayoría de los tejidos animales y plantas que contienen una quinona con 10 cadenas isoprenoides (Q10). (Threlfall y Goodwin, 1968) También se ha encontrado Ubiquinol-8 (Fuller, 1961) siendo mayor la cantidad de Ubiquinol -9 en contrado en este organismo. A diferencia de *E. coli* en donde el ubiquinol-8 se encuentra en mayor cantidad y sirve como intermediario entre las dos oxidasas terminales La oxidación de éstas quinonas conduce a la formación de radicales libres, debido a esto Calvayrac y cols. (1980) propusieron que la vía alterna en *Euglena* pudiera involucrar la oxidación de estos radicales ubisemiquinona con la formación del peróxido de hidrógeno. Sin embargo no se pudo detectar H_2O_2 durante la respiración por la vía alterna (Huq y Palmer 1978; Moore y Rich, 1980; Carter y Gennis 1990).

El continuo monitoreo de los niveles de reducción de la poza de quinonas durante la inhibición progresiva de la actividad de la succinato oxidasa en mitocondrias resistentes a CN, a revelado que el flujo de electrones por la vía alterna es dependiente del nivel de la poza de quinonas. La reducción de la poza de quinonas se incrementa de manera no lineal con respecto a la velocidad de la actividad de la vía alterna en plantas (Siedow y Moore 1992)

Complejo III

El complejo III o ubiquinol-citocromo c oxidoreductasa en *Neurospora crassa*, corazón de bovino y levadura contiene 10 subunidades; en bacterias este complejo solo contiene 3 subunidades correspondientes al citocromo c1 y a la proteína Fe-Azufre ,cuyos grupos prosteticos son de estructura simple.

En *Euglena gracilis* este complejo contiene alrededor de 10 subunidades. Y presenta un máximo de absorbancia a los 558nm a diferencia del común de los citocromos tipo c cuyo máximo de absorción se encuentra a 550nm.

Las subunidades del complejo III indican que este es el único organismo que tiene características estructurales en sus citocromos:

La subunidad I pesa 54933Da y contiene 494 a.a y presenta un 36% de igualdad con la subunidad I de *Neurospora crassa*.

La subunidad II pesa 46559Da y contiene 432 a.a. Tanto la subunidad I como la subunidad II (core) están localizadas en la cara externa de la membrana interna mitocondrial y contienen una región hidrofóbica que atraviesa dicha membrana.

La subunidad IV de esta enzima en *Euglena* corresponde al citocromo c1 con un máximo de absorción a 561nm, siendo diferente al de los otros citocromos c1 cuyo máximo de absorción está a los 555nm

La subunidad IX es particular en *Euglena gracilis* ya que no presenta similitud con la subunidad 9 de levadura y bovino. Su perfil de hidropatía indica que tiene una región hidrofóbica de 36 residuos y es suficiente para atravesar la membrana una vez y una región carboxi terminal hidrofílica de 57 a 70 residuos la cual es rica en aminoácidos ácidos con 4 cargas netas negativas. Interesantemente estas características estructurales también se encuentran en las subunidades 7 y 11 del complejo III de bovino, cada una de las cuales atraviesa la membrana y tiene una región carboxiterminal hidrofílica.(Cui y cols.,1994).

En *Euglena gracilis* crecida en presencia de luz se han encontrado las clases de citocromos comunes a otros tipos de células eucariotes como el citocromo c del cual se han descrito dos tipos (el primero tiene un pico máximo de absorción a 552nm y el otro a 556nm). Su potencial de oxidoreducción es de +310mv lo que resulta más alto que lo reportado para el citocromo c oxidasa en plantas y animales y tiene un peso molecular de 32 KDa (Nishimura , 1956;Mukai y cols.,1992) y el citocromo b (con un pico máximo de absorción a 561nm), con un peso de 37 kDa (Tokunaga y cols.,1976;Mukai y cols.,1988). Por otro lado las células crecidas en ausencia de luz presentan un

hemo del tipo a (cuya máxima de absorción está a 605nm) (Gross y Wolken, 1960; Smillie, 1963).

citocromo c

El citocromo c de *Euglena gracilis* es el único en el que 14 cisteínas forman parte de puentes disulfuro interno y este grupo hemo está unido covalentemente a la cadena polipeptídica por dos puentes que involucran a la cisteína 14 y a la cisteína 17. Este enlace covalente es muy importante para la estabilidad de la proteína nativa, ya que a pH neutro y a 25°C esta proteína estaría doblada en una forma irregular (Brems y Stellwagen, 1983).

Pettigrew (1973) determinó la secuencia de aminoácidos del citocromo c de *Euglena gracilis* y encuentra homología con el citocromo c de algunas líneas de Eucariotes pero diverge considerablemente con respecto al citocromo de ciertas líneas de Eucariotes. Por otro lado la secuencia de aminoácidos del citocromo c de *Euglena gracilis* es similar a la de las bacterias Gram negativas particularmente de las Rhodospirillaceae (Amber y cols., 1991)

Pettigrew (1973) reporta por primera vez la secuencia de aminoácidos de la ferredoxina de Euglenidos. *Euglena gracilis* presenta una homología del 52 al 53% con plantas, animales y hongos (Baba y cols., 1981) y de un 40 a un 44% con algas de *Enteromorpha intestinalis* (Meatiard y Boulter, 1974).

El sitio de unión del hemo al citocromo c de *Euglena gracilis* presenta un solo residuo de cisteína (Mukai y cols., 1992). El citocromo c-552 de *Euglena* ha sido purificado. El pico a 552 es asimétrico y difiere del citocromo de algas y del citocromo f de plantas. Tiene alto contenido de triptófano ya que el pico cerca de los 280 nm tiene un hombro muy ancho, su potencial medio de reducción es constante entre pH 5.5 y 8.1 y baja a pH mayores. Tiene un peso molecular de 17400 Da determinado por cromatografía. El grupo prostético de este citocromo contiene un anillo porfirínico similar al del citocromo c de mamífero. Tiene una gran cantidad de aminoácidos neutros en comparación con la de otros citocromos. Este citocromo es reducido por ácido ascórbico y se reduce difícilmente por ferricianuro. Al igual que el citocromo c de mamífero, este citocromo resiste a hervirlo 5 min así como a pH extremos (1.5-12) (Perini y cols., 1964).

El citocromo c-552 presente en cloroplastos al igual que el de bacterias, algas y plantas superiores, tiene un alto potencial medio (370mv) así como un punto isoelectrico ácido, por lo que algunos autores han sugerido una relación estrecha entre este citocromo de Euglena y los citocromos c de dichos organismos; por otro lado el citocromo c de Euglena tiene una banda alfa simétrica lo que lo hace más parecido al citocromo tipo c2 de la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum*. (Nishimura 1959; Perini y cols., 1964). El citocromo c-558 (556nm) a diferencia del que se encuentra en mamíferos es autooxidable por aire y su pico de absorción es asimétrico (presentando un pico a los 558nm y un hombro a los 555nm y se encuentra en mitocondrias. Este citocromo es atípico debido a la presencia de los dos máximos de absorción. Este citocromo ha sido parcialmente purificado (Perini y cols., 1964) y es importante mencionar que la banda a los 558 nm aparece en espectros a temperatura ambiente y las bandas a los 556 así como a los 555 y 549 nm aparecen cuando se utiliza temperatura a nitrógeno líquido, por lo que se le dió el nombre de citocromo c-558-556 (Calvayrac 1973). Collins (1975) encontró que el citocromo 558 es empleado como un donador de electrones con una actividad importante. Este citocromo es reducido por ácido ascórbico con un potencial medio de reducción de +310 mV similar al de mamíferos y un peso molecular de 27000 Da, no se combina con CO pero se oxida al agitar en aire. Es aún más estable que el citocromo c 552. Este citocromo está unido covalentemente a la enzima, pero no a través de un enlace tioeter (Perini y cols., 1964). Este citocromo es una proteína altamente conservada en la naturaleza por lo que es útil para estudiar relaciones filogenéticas entre organismos. En *Euglenas* crecidas en la obscuridad y con glucosa o con peptona se caracterizó el citocromo c y se encontró que tiene un peso molecular de 12600 Da.

Las mitocondrias de *Euglena* presentan la misma cantidad de citocromo c que de citocromo a este último presenta un pico máximo de absorción a 605nm y también es autooxidable. La cisteína 14 se considera necesaria para la unión del grupo hemo y la tirosina 67 pudiera estar involucrada en el transporte de electrones hacia el grupo hemo (Copertino y Hallic, 1991). El citocromo c en *Euglena gracilis* sufre modificaciones postraduccionales a través de una 2-metyl transferasa cuya actividad máxima es a pH7, y son únicas para este organismo metilan restos de metionina y arginina (Faruquis y cols., 1984). La concentración de citocromo c es mucho más baja que la encontrada en *Sacharomices cereviseae*.

citocromo b

Euglena gracilis presenta 3 tipos de citocromos b detectados a temperatura de nitrógeno líquido (cuyos máximos de absorbancia son 558,561 y 565nm), esta complejidad en citocromos de tipo b hace a este organismo más similar a plantas superiores que a mamíferos (Sharpless y Butow,1970;Yokota y cols.,1978;Douce 1985). El citocromo 561 se encuentra tanto en cloroplastos como en mitocondrias (Perini y col.,1964). La respiración insensible a CN inducida por antimicina a no puede ser atribuible a la deficiencia del citocromo tipo b además se ha observado que este citocromo puede ser oxidado en presencia de CN lo que sugiere que esta vía insensible a CN oxidando succinato podría ser relacionada con la vía de transporte de electrones a través del citocromo b. En este respecto el citocromo b podría funcionar de la misma manera que el citocromo b3 presente en microsomas de raíces de trigo descrita por Martin y Morton (1990) (Raison y Smillie, 1969).

Complejo IV

Los picos a 605 y 442 se atribuyen al citocromo a y están presentes en mutantes de *Euglena gracilis* sin plástidos, así como en células crecidas en la oscuridad. La banda a los 595 y 605nm parece corresponder a un citocromo del tipo aa3 y se encuentra en mitocondrias (Perini y cols.,1964). La actividad de la citocromo c oxidasa es baja en *Euglena gracilis* o ausente en *Astasia longa* y la respiración celular de *Euglena gracilis* es inhibida solo parcialmente por altas concentraciones de CO.(Raison y Simillie,1969).

Bronstrup y Hachtel (1989) purificaron la citocromo c oxidasa de *Euglena gracilis* la cual es diferente a otras citocromo c oxidasas de eucariotes en número de subunidades, propiedades cinéticas y especificidad para sustrato. Consta de 15 subunidades (la I,II y III son sintetizadas en la mitocondria), es la más compleja aislada hasta la fecha. Tiene un peso molecular de 320 kDa, lo cual es debido al bajo contenido de hemo a (6 nm/mg) en la enzima de este organismo. Respecto al número de sitios activos en la enzima, presenta una cinética bifásica, lo que puede interpretarse como dos sitios catalíticos o un sitio catalítico y uno regulador. Con citocromo c 558 la cinética es monofásica, con una Km de 1 μ M (baja afinidad como otras oxidasas de

eucariotes). Un aspecto importante de la citocromo c oxidasa involucra el número de sitios catalíticos en la enzima con diferentes afinidades para el citocromo c mitocondrial. Algunos han sugerido que existe solo un sitio catalítico por monómero de enzima. Estos autores asumen que concentraciones crecientes de citocromo c así como de otros iones polivalentes pueden bajar la afinidad para el citocromo c, probablemente debido a cambios conformacionales en el dominio de unión, ellos consideran que una K_m mayor en las oxidasas de mamífero, es más fisiológica ya que predomina en condiciones de alta fuerza iónica. La cinética monofásica para el citocromo 558 indica que solo hay un sitio activo en la citocromo c oxidasa de *Euglena*.

El polipeptido I (42KD) probablemente corresponde a la subunidad I del complejo de mamíferos. El Polipeptido II (33KD) difiere ligeramente del peso molecular de la subunidad II de animales superiores. El polipeptido III (32KD) es similar a la subunidad III. Se pueden detectar dos tipos de citocromos tipo a en *Euglena*. Su espectro de absorción en la región del soret (α -607 y α -593) sugiere que son análogos de los citocromos a y α_3 de mamíferos

La presencia de una oxidasa terminal insensible a CN en *Euglena* ha sido descrita por diversos autores. Esta oxidasa debe ser la causa en la variación en la actividad respiratoria encontrada en la mitocondria o en la respiración de sustratos y el origen de la célula (Calvayrac, 1978).

Altas concentraciones de citocromo c de *Euglena* reacciona con la citocromo oxidasa de mamífero alcanzando la misma velocidad máxima que el citocromo c de mamífero o levadura, pero es menos afin que estos dos citocromos. Por otro lado, el citocromo c de caballo no reacciona con la citocromo c oxidasa de *Euglena* (Pettigrew, 1987) de tal manera que existen grandes diferencias entre las citocromo c oxidasas de protozoarios y mamíferos.

oxidasa alterna

Euglena gracilis presenta oxidasa alterna la cual es insensible a antimicina A y a CN (Sharpless y Butow, 1970; Calvayrac y cols., 1978) al igual que en fungi y levadura en donde la cadena se ramifica al nivel de la ubiquinona. En O_2 la respiración resistente a CN es inducida por inhibidores del complejo III así como por compuestos sulfurados (Minagawa y cols., 1990). Con la inducción de respiración resistente a CN en *Euglena gracilis* aparece en la mitocondria una proteína de 36KD lo que sugiere fuertemente que esta es la oxidasa alterna (Sakajo y cols., 1991). La producción de esta proteína requiere de oxígeno por lo que se ha sugerido que una especie reactiva derivada del oxígeno esta involucrada en la inducción de esta proteína (Minagawa y Yoshimoto, 1987). Agentes quelantes de radicales libres y agentes antioxidantes inhiben la inducción por antimicina A de respiración resistente a CN y también disminuyen la producción de la proteína de 36KD (Minagawa y cols., 1992). Algunos piensan (Khan 1974) que la inducción de resistencia a inhibidores puede ser debida a una modificación en la membrana mitocondrial (la cual se hace impermeable a efectores hidrofóbicos) o a la utilización de una vía alterna. Sin embargo no existen pruebas para proponer un cambio en la permeabilidad de la membrana ya que estos autores no pudieron comparar el efecto del CCCP en su preparación mitocondrial por no estar acopladas.

Vías alternas de transporte electrónico

La respiración en tejidos de mamíferos es extremadamente sensible a cianuro, en contraste con los tejidos de plantas que presentan una respiración resistente a este inhibidor; u otros como azida, monóxido de carbono; a concentraciones suficientes para inhibir completamente a la citocromo c oxidasa (Siedow, 1991; Douce, 1985). Este tipo de vía alterna se ha encontrado en ciertos tipos de organismos por ejemplo en protistas como Trypanosomas y Euglenidos, en hongos como *Neurospora crassa* y *Hansenula anomala*, en algas verdes como *Chlamydomonas* (Moore y Siedow, 1991); en plantas como *Arum maculatum* y en bacterias como *Rhodobacter spheroides*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* entre otros.

La presencia de una oxidasa alterna depende de la fuente de carbono o puede ser inducida por la presencia de un inhibidor. (Sharpless y Butow 1970). La

presencia de antimicina en el medio de cultivo confiere resistencia de la respiración tanto a este inhibidor como a CN. Sin embargo la presencia de la cadena alterna se induce más rápidamente, si se crecen las células en presencia de CN (Benichou y cols., 1988). También se ha encontrado que ésta cadena es inducida por altas concentraciones de carbohidratos, por la presencia de etileno, por los niveles de ácido salicílico, así como a bajas temperatura en plantas (Meeuse, 1975; Laties, 1982; Moore y Siedow, 1991). Las bajas temperaturas causan el incremento en la actividad en la vía alterna. Las plantas del ártico tienen un particular incremento en la actividad de esta vía. El más dramático ejemplo se presenta en estructuras reproductoras de plantas termogénicas. La regulación de la temperatura basada en la activación de la vía alterna ocurre en las influorescencias (*Arum maculatum*, *Symphocarpus foetidus* y *Sauromatum guttatum*) (Arie y cols., 1991).

Se ha sugerido que esta vía podría tener una función regulatoria en los casos cuando hay un sobre flujo de electrones a través de la vía clásica estando esta saturada o limitada. Esta regulación evitaría un colapso en el potencial transmembranal así como la inhibición de algunas de las enzimas del ciclo de Krebs por una elevación de los niveles del ATP y del NADH. (Lambers, 1982; Moore y Siedow, 1991).

De acuerdo con algunos autores la vía alterna de transporte de electrones empieza a funcionar solo cuando las vías de citocromos estén saturados, las quinonas reducidas y el ADP a niveles bajos (Day y cols., 1980). La respiración insensible a CN permitiría entonces la reducción del NADH y mantendría activo el ciclo de Krebs y por tanto llevaría a la producción de intermediarios metabólicos cuando la vía de citocromo se encuentre estimulada por la disponibilidad de ADP. (Moore y Rich, 1980).

Esta vía funciona ramificando la vía de respiración a nivel de la ubiquinona y donando electrones directamente al oxígeno para formar agua aparentemente en un solo paso de cuatro electrones. (Siedow y Moore, 1993). Se ha demostrado que en la mayoría de los casos las oxidasas terminales funcionan como bombas de protones, excepto en plantas, debido a esto en estos organismos la transferencia de energía es pobre y el calor producido se utiliza por ejemplo para la destilación de sustancias que atraen insectos. (Palmer, 1979) (ver apéndice III). Se ha visto que la subunidad I de las oxidasas

terminales en bacterias es la responsable del bombeo de protones (de Gier y cols., 1994; Raitio y cols., 1994) (ver apéndice III).

Clasificación de las oxidasas terminales

Según Gennis (1992) las oxidasas alternas tienen tres características principales con respecto a su adaptabilidad y diversidad:

I- La síntesis o más correctamente la capacidad de detectar oxidasas esta sujeta a una regulación dramática en respuesta a las condiciones ambientales prevalecientes

II- Algunas oxidasas son multifuncionales lo que se puede demostrar por que utilizan aceptores de electrones además de o en lugar de oxígeno, y también por que pueden funcionar como proteínas almacenadoras de oxígeno.

III- Aún en condiciones ambientales controladas y constantes más de un tipo de oxidasa pueden estar presentes y funcionando cada una de ellas en un punto de ramificación de la cadena respiratoria

Todas las oxidasas terminales a pesar de sus diferencias en sustrato (Quinol o Citocromo c), afinidad por oxígeno y tipo de hemo, así como por composición de metales, estan relacionadas cercanamente como miembros de una superfamilia llamada superfamilia de las oxidasas hemo-cobre.

Las quinol oxidasas actúan como oxidasas terminales siendo aceptores finales de electrones transfiriendo 4 electrones y tienen un potencial redox de 0mV mientras que las citocromos c oxidasa tienen un potencial medio de alrededor de 250mV. La quinol oxidasa mejor estudiada es el citocromo bo de *E.coli* la cual comparte las mismas propiedades funcionales que la citocromo c oxidasa. Matsushita y cols (1984) caracterizaron el mecanismo de generación del $\Delta\psi$ por la citocromo o oxidasa de *Escherichia coli*, quienes encontraron que el número de electrones transportados a través del citocromo o es suficiente para generar un $\Delta\psi$ y un ΔpH , sin embargo no se produce un transporte neto de H^+ a través de esta proteína. Lo anterior no entra en contradicción con Mitchel (1975) debido a que el número de protones transportados no excede del número predicho por la ecuación del potencial electroquímico.

Existen evidencias estructurales e inmunológicas que apoyan la idea de que las oxidasas bacterianas y mitocondriales evolucionaron continuamente, ya que la subunidad I y II de las enzimas bacterianas son similares a dos o tres subunidades sintetizadas en las mitocondrias de Eucariotes. La diferencia en composición de aminoácidos entre las enzimas bacterianas y de Eucariotes con respecto a la subunidad II es probablemente responsable de la variación en la eficacia de la interacción con el citocromo c.

El papel de las otras subunidades en las oxidasas de Eucariotes no está claro pero probablemente tengan una función regulatoria y tienen que ver con la unión del citocromo c a la oxidasa, así como dar origen algunos iones en la estequiometría H^+/e^- o bien la K_m para O_2 puede ser regulada cinéticamente ajustando los niveles de una oxidasa terminal determinada en respuesta a condiciones ambientales y en la regulación de la termogénesis. (Gennis y cols., 1992)

La citocromo c oxidasa de bovino se compone de 13 subunidades, solo tres de las cuales (I, II, III) son sintetizadas en la mitocondria en donde la subunidad I es la más altamente conservada y contiene 12 cruces transmembranales.

Las oxidasas que contienen una subunidad homologa a la subunidad I de la citocromo oxidasa de mamíferos pertenecen a la familia hemo-cobre. Esta subunidad contiene un centro único bimetalico donde el oxígeno se une para ser reducido hasta agua. Este centro bimetalico también conocido como centro binuclear, consta de un grupo hemo (Ligado a un solo residuo de histidina, y tiene un sitio de coordinación libre para unir al oxígeno) y un cobre, llamado Cub. Este átomo de Cu se encuentra a 5Å de distancia del Fe del grupo hemo. Además de este Fe hémico la subunidad I, contiene un segundo grupo hémico que no forma parte del centro binuclear el cual está ligado a dos residuos de histidina y la función de este segundo centro parece ser la de transferir electrones hacia el centro binuclear. (Brown y cols., 1993; Hoster y cols., 1993). Además de presentar ligaduras hacia el hemo a y los centros binucleares hemo aa3 y Cub, presentandose dos espacios transmembranales y un gran dominio hidrofílico al cual se une el Cua y el citocromo c como se observa en la figura 7.

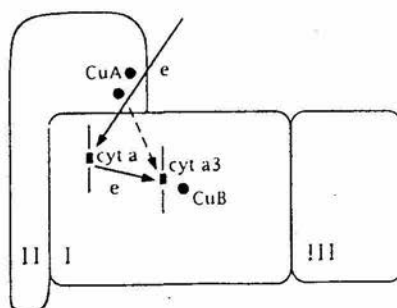


Figura 7.-La unión de la subunidad II con la subunidad I a partir de sus átomos de Cu en la citocromo c oxidasa tomado de Sarastre (1990)

Los 3 tipos de hemos presentes en la subunidad I son hemo B, hemo O y el Hemo A (Fig.8). El hemo tipo O difiere del tipo B por que tiene un grupo hidroximetil farnesil adicional. Ambos citocromos tienen propiedades espectrales de absorción que les confieren su color rojo característico. El hemo tipo A tiene un grupo formilo en lugar de un grupo metilo de los citocromos B y O esto le confiere un espectro de absorción diferente dándole a la proteína un color verde. (Wu y cols., 1992).

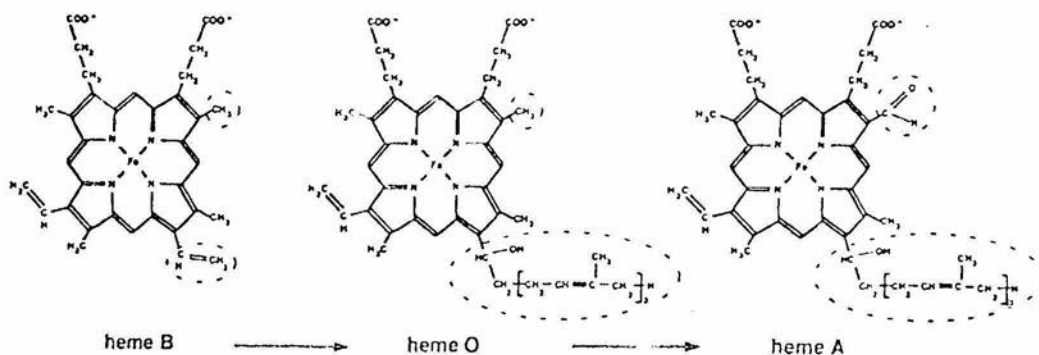


Figura 8. Estructura de los grupos hemos tipo B, O y A y su biosíntesis. (Wu y cols., 1992)

Existen cinco subclases de oxidases hemo-cobre; tres de ellas son citocromo c oxidasa y dos son quinol oxidasa (Trumpower y Gennis, 1994). (Fig.9)

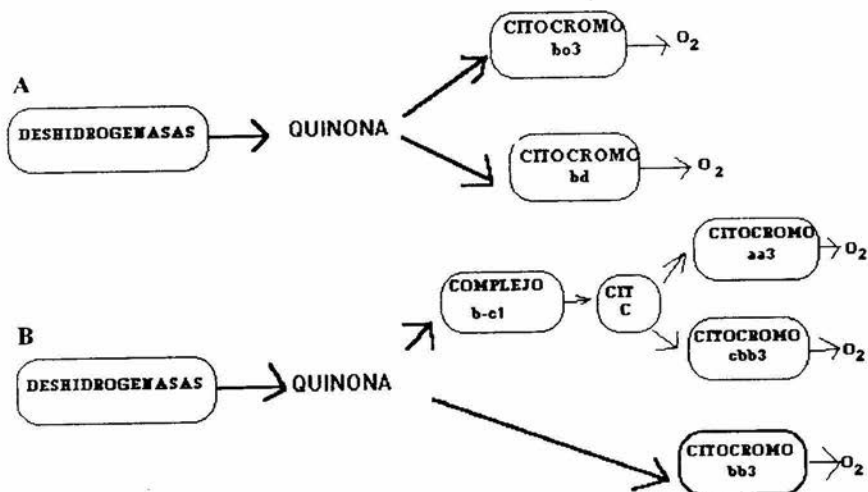


Figura 9. Esquemas de las cadenas respiratorias en *E. coli* (A) y *R. spheroides* (B). Quinol y citocromo oxidasas. (Trumpower y Gennis., 1994).

Todas las citocromos c oxidasas contienen una variante de subunidad II que contiene un segundo centro redox con cobre llamado CuA el cual es el aceptor inicial de electrones del citocromo c y transfiere sus electrones al sitio bimetalico. (Lodder y van Gelder, 1994). El sitio de unión al centro bimetalico esta compuesto por dos cisteinas y dos histidinas provenientes de la subunidad II y subunidad I respectivamente. Por el contrario la subunidad III no contiene centros redox y no parece ser esencial para la actividad de la enzima. (Taanman y Capaldi 1994) La variación observada entre las oxidasas de la familia hemo-cobre radica en que tienen diferentes combinaciones de los hemo tipo a, o, c y b asociados a la subunidad I y son encontradas tanto en quinol oxidasas como en citocromos c oxidasas (Tabla 2). Por ejemplo *Escherichia coli* presenta dos tipos de oxidasas alternas (Kranz y Gennis, 1985) una con un hemo del tipo B asociada al hemo del tipo O (el mas ampliamente distribuido en las citocromo oxidasas de las bacterias) formando la citocromo oxidasas bo (Brown y cols., 1994; Chepuri y cols., 1990). La oxidasas alterna tipo o de *E. coli* ha sido purificada y es capaz de generar un gradiente cuando se reconstituye en liposomas (Moore y Pettigrew, 1990), tiene 4 subunidades que catalizan la oxidación de quinol-8 por dos electrones, así como la reducción de oxígeno molecular por 4 electrones. La enzima contiene un hemo de bajo spin y uno de alto spin, el de

alto espin está acoplado a Cu formando un centro binuclear Hemo/cobre, además de contener dos hemos tipo b (protohemo IX) (Salerno y cols., 1989). Estos datos sugieren que la oxidasa o de *E. coli* es similar a la citocromo c oxidasa de procariotes y eucariotes que contienen hemo a, ya que esta oxidasa también funciona como bomba de protones y los centros catalíticos incluyen 6 hemos coordinados y un centro binuclear hemo/cobre donde el O₂ se reduce a agua. Las secuencias deducidas de las subunidades del citocromo o están relacionadas con las subunidades I, II y III de citocromo c oxidasa, lo que define una nueva superfamilia de oxidasas que utilizan ubiquinol o citocromo c pero comparten similitudes estructurales (Chepuri y cols., 1990). Los grupos de organismos que requieren del citocromo O son las bacterias que requieren hemo, amonio, H₂ y las bacterias que oxidan sulfuro. Numerosos reportes de estudios en bacterias tienden a confirmar que este tipo de citocromos (asociado a CO) presentan máximos de absorción a 410 y a 421 nm

Este citocromo oxidasa presenta de 2 a 4 subunidades dependiendo de la especie y se puede identificar por su capacidad de reaccionar con CO. Los espectros de preparaciones reducidas en presencia de CO muestran señales típicas con un pico a 417 nm y valles a 430 y 560 nm.

El citocromo o de bacterias genera un gradiente de H⁺ a través de reacciones que consumen y liberan protones en ambos lados de la membrana plasmática. (Poole 1984; Matsushita, 1984).

Otro ejemplo de combinaciones de distintos tipos de hemo es en el que participa un hemo de tipo d (Poole y cols., 1985) y dos hemos de tipo Bs (El cual es un hemo b pero en lugar de un anillo pirrólico presenta un anillo clórico), citocromo bd y posiblemente un citocromo a₁. Este citocromo fue descubierto en 1928 en *E. coli* y es muy común en bacterias gram-negativas. Dependiendo del organismo este tipo de citocromo presenta máximos de absorción entre 647 y 652 nm por ejemplo en *Azobacter* aparece un pico a los 632 nm el cual es reducido por CO y en presencia de CN este pico reaparece (632 nm). En *Azobacter vinelandi* a través de una detallada reparación se han podido revelar cuatro componentes con picos a 635, 648, 670 y 585 nm por lo que se dice que están involucrados hemos del tipo b, a₁ y d (Poole, 1983).

El citocromo d se puede encontrar en bacterias gram-heterotróficas. se puede expresar en condiciones de anoxia en presencia de CN y de limitación de Cu (Ingle y Pool, 1984). Presenta una K_m para oxígeno entre 0.02 y 0.39 μM lo que distingue a este citocromo como la oxidasa bacteriana con mayor afinidad por oxígeno.

El citocromo ba3 en donde la enzima del citocromo aa3 es sustituida por un citocromo b se encuentra en *Thermus thermophilus*. Los análogos como el citocromo ba de *Acetobacter acetii* es una quinol oxidasa; el citocromo ca0 contiene tres diferentes hemos y se ha aislado de *Alkaldophilic bacillus*. Este tipo de oxidasas pertenecen al grupo de quinol oxidasas al igual que el citocromo bb3 presente en *Paracoccus denitrificans*, y todas las demás oxidasas terminales pertenecen al grupo citocromo c oxidasas.

Paracoccus denitrificans presenta un citocromo con máximos de absorción a 564 y 609 nm, esta quinol oxidasa purificada puede ser reducida por CN- y es por estas 2 razones que se identificó inicialmente como bo, sin embargo se ha descrito que este pico se mueve en el espectro de absorción con la formación del complejo con CO y es más correctamente identificado como del tipo ba3. Espectros de reducido menos oxidado muestran 2 picos a 560 y 604 nm en donde se separa el pico de 560 al agregar piridinhemocromógeno generándose un pico a los 441 nm lo que indica la presencia del hemo a3 y con la purificación de la quinol oxidasa se obtuvo una proteína de alto espín (a3) sensible a monóxido de carbono. Esa proteína también contiene una proteína de bajo espín (cit b) hemoporfirina IX genuina. Lo que resulta en una oxidasa alterna de tipo ba3. Se cree además que era o debido a que este citocromo es una quinol oxidasa y la quinol oxidasa mejor caracterizada es la bo de *E. coli*. (Oliver-Mathias y cols., 1994; Kranz y Gennis, 1985; Fukaya y cols., 1993)

Otras combinaciones se pueden dar entre los mismos hemos por ejemplo *Paracoccus denitrificans* posee una oxidasa que contiene dos hemos de tipo B (citocromo oxidasa bb3) y puede ser una quinol oxidasa y otra oxidasa que contiene dos grupos hemos del tipo A (citocromo oxidasa aa3), presente también en mamíferos de hecho este citocromo es el utilizado como estándar para las citocromos c oxidasas pero podría ser una quinol oxidasa en *Sulfolobus acidularios* y *Bacillus subtilis*.

Especies	tipo oxidasa	de Donador de electrones	de Hemo de bajo spin de la subunidad I	Hemo de alto spin de la subunidad I	Hemo c de la subunidad II	CuA de la subunidad II	Bonboa de la subunidad II	de Catectanos
Ejemplos bien caracterizados								
<i>Acetobacter aceti</i>	ho3	Quinol	B	O	No	No	ND	
	ba3	Quinol	B	A	No	No	No	
<i>Bacillus subtilis W23</i>	aa3	Menquinol	A	A	No	ND	ND	
<i>Bacillus subtilis W168</i>	caa3	Cyt c	A	A	I	Si	ND	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	aa3	Cyt c	A	A	No	ND	ND	Secuencia de la subunidad I (coxA)
<i>Escherichia coli</i>	ho3	Quinol	B	O	No	No	Si	
<i>Paracoccus denitrificans</i>	aa3	Cyt c	A	A	No	SI	Si	Tiene un gene parecido al de la subunidad I (cul1)
	ba3/bb3	Quinol	B	B/A	No	No	Si	
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	cbb3	Cyt c	B	B	2 o3	No	ND	No contiene subunidades II y III
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Cbb3	Cyt c	B	B	3	No	ND	No contiene subunidad II y III
	aa5	Cyt c	A	A	No	Si	SI	
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	aa3	Caldantra quinol	A	A	No	NO	ND	Sax C es un homologo de el citocromo d
<i>Thermus thermophilus</i>	caa3	Cyt c	A	A	1	Si	Si	Genes fusionados I-c(cxaA) y I-III (caa3)
	ba3	Cyt c	B	A	No	Si	ND	
Ejemplos menos caracterizados								
<i>Acetobacter methanolicus</i>	"co"	Cyt c	Nd	O(?)	Si	ND	ND	
	"ho"	Quinol	B	O(?)	No	ND	ND	
<i>Acetobacter vinelandii</i>	"co"	ND	ND	O(?)	Si	ND	ND	
<i>Bacillus cereus</i>	aa3	Cyt c	A	A	No	ND	ND	Es probablemente una quinol oxidasa
	caa3	Cyt c	A	A	Si	ND	ND	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	"bb3"	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Es probablemente una quinol oxidasa
<i>Nitrobacter agilis</i>	aa3	Cyt c	ND	ND	No	ND	ND	
<i>Rhizobium nodulos</i>	"cbb3"	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Se cree que es del tipo cbb3
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	aa3	Cyt c	A	A	ND	Si	ND	Contiene 3 subunidades

Tabla 2. Oxidasas terminales en distintas especies de organismos y hemos presentes en cada una de ellas. Tomado de García-Horsman y cols.(1994).

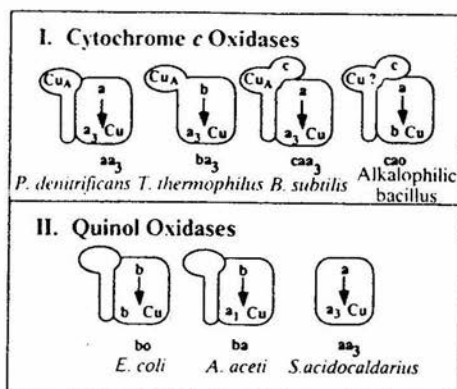


Figura 10.-Ejemplos de citocromos c oxidasas y de quinol oxidasas tomado de Gennis (1991).

El citocromo caa₃ donde se encuentra el hemo c pegado al aa₃ ha sido encontrado en bacilos y *Thermus thermophilus*. Uno de los grupo hemo en estas combinaciones tiene un bajo spin y el otro grupo hemo es de alto spin, es decir que uno de ellos requiere de más electrones para reducirse a comparación del otro.(Fig.9) (Zimmermann y cols., 1988; Matsushita y cols., 1992; Puustinen y cols., 1982; Saraste, 1990; Chepuri y cols 1990; Hill y cols., 1990; Power y cols., 1994; Umbach y cols., 1994; Thomas y cols., 1993; Salerno y cols., 1989; Lubben y cols., 1994).

La citocromo oxidasa mitocondrial y las oxidasas terminales de *Paracoccus denitrificans* y *Thermus thermophilus* catalizan la transferencia de electrones y el transporte de protones sin tener acarreador de proton (Soloz y Carafoli, 1982).

En *Euglena gracilis* se ha encontrado que algún tipo de estas oxidasas se expresa de manera constitutiva pero sus niveles dependen de la fuente de carbono o de la inducción por medio de un inhibidor. En nuestro laboratorio hemos observado que en la mitocondrias de células crecidas en diferentes medios de cultivo (Peptona, Glutamato/Malato, y especialmente en Etanol) no existe efecto estimulador por AMP, esta idea es apoyada por el hecho de que la oxidación de NADH exógeno puede ocurrir por la vía resistente a cianuro, y no es estimulada por AMP.(Uribe y Moreno-Sánchez, 1992).

Oxidación de sustratos en mitocondrias de Euglena.

Euglena gracilis oxida D- y L-lactato a muy altas velocidades, por la lactato deshidrogenasa (Price y Vallee, 1962; Calvayrac y cols. 1978). por una vía alterna que se conecta en la ubiquinona (Uribe y Moreno-Sánchez, 1992), la cual también es capaz de mandar los electrones al resto de la vía clásica. La oxidación del lactato esta acoplada a dos sitios de fosforilación, un sitio acoplado a la cadena que va de citocromo aa₃ hasta el oxígeno y el segundo sitio con un flujo de electrones desde el citocromo b hasta el citocromo c. De acuerdo con el descubrimiento de Rutner y Price (1964) los electrones desde el D-Lactato entran principalmente a la cadena de transporte de electrones de Euglena al nivel de la ubiquinona.

Existe un lactato deshidrogenasa en algas verdes y en pocas algas rastreras pero pudiera ser detectada también en tejido verde de plantas superiores. Calvayrac encontró que la respiración por lactato es muy elevada (4.4µM de O₂/hora/mg de proteína) en presencia de este sustrato, comparada con la respiración en presencia de succinato (2µM de O₂/hora/mg de proteína). Se ha sugerido la presencia de una lactato deshidrogenasa. Esta lactato deshidrogenasa en animales y plantas superiores es inhibida por ATP mientras que la reducción del piruvato es inhibida un 60%. (Rawn, 1989; Nicholls, 1985)

En *Euglena gracilis* el lactato también es metabolizado a través de una vía que transforma lactato a paramilo por una fosfoenol piruvato carboxicinas dependiente de GTP comparable con la que es característica de células hepáticas ; es por esto que la Euglena se ha utilizado como modelo hepatico para estudios farmacológicos

Los más potentes inhibidores de la lactato deshidrogenasa que se parecen a su sustrato son el oxamato (competitivo para piruvato) y oxaloacetato (competitivo para lactato). El inhibidor más potente de esta enzima es el aducto reducido del compuesto piruvato-NADH (Everse y Kaplan, 1973). Uribe y Moreno-Sánchez (1992) encontraron que el mixotiazol y el HQNO inhibidores del citocromo b en mitocondrias de mamífero bloquean la oxidación del lactato y del glutamato+malato.

El NADH exógeno también es oxidado por este organismo solo que entra por el complejo I dando sus electrones al resto de la vía clásica aunque también puede mandarlos por la vía alterna. (Buetow y Buchanan, 1965; Sharpless y Butow, 1970a; Khan, 1974; Collins y cols., 1975; Datta y Khan, 1977; Moller, 1986). En *Euglena gracilis* la oxidación de NADH es sensible a antimicina pero solo parcialmente inhibida por CN lo que apoya la idea de que $>$ NADH es oxidado por una vía alterna. (Kummel y Brinkman 1988; Sharpless y Butow, 1970). Así mismo el succinato que es oxidado por el complejo II (Succinato deshidrogenasa) dona electrones a alguna de las dos vías siempre y cuando una de ellas se encuentre bloqueada. En el siguiente esquema se muestra la secuencia del transporte de electrones y el efecto de inhibidores propuesta en este laboratorio.

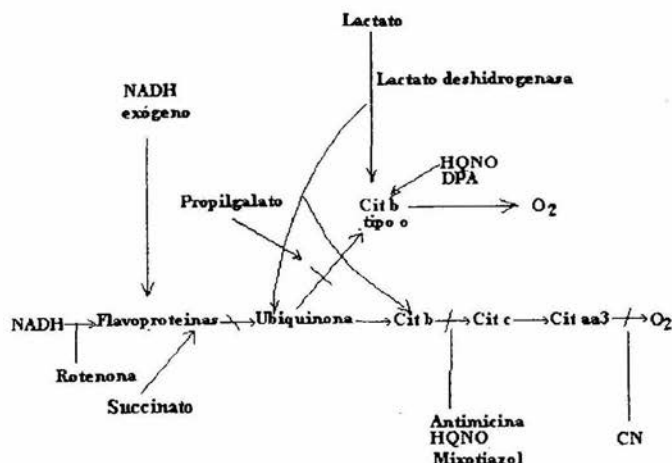


Figura 11. Secuencia de transporte de electrones en presencia de diferentes inhibidores y sustratos propuesta en nuestro laboratorio en el protista *Euglena gracilis*.

La respiración en *Euglena gracilis* es estimulada por Etanol este sustrato podría entrar al ciclo del ácido cítrico o estimular la síntesis de ácidos grasos (Buetow, 1961). Ya que las vías del metabolismo del etanol en *Euglena gracilis* no se conocen completamente, Julistiono y Brian (1992) trataron de caracterizar las dos vías de la alcohol deshidrogenasa así como la del sistema de oxidación del etanol microsomal.

En *Euglena gracilis* existe un sistema microsomal de oxidación de Etanol (MEOS) dependiente del citocromo p-450 este citocromo es inducido con etanol y es una mono oxigenasa que actúa como sistema multienzimático. Este citocromo requiere de dos electrones para su activación por oxígeno. Generalmente el primer electrón es transferido del NADPH al citocromo p-450 a través de la enzima p-450 reductasa. El segundo electrón reduce al complejo p-450 oxígeno y se lleva a cabo por la NADH citocromo b5 reductasa que transfiere un electrón desde el NADH (Julistiono y Brian, 1992). Este citocromo (b5) se encuentra en microsomas y posee máximos de absorción a 423 y 424nm, no es inducible por etanol a diferencia del citocromo p-450 que si es inducible por etanol y también se encuentra en microsomas.

Las células de *Euglena* pueden crecer en glutamato como única fuente de carbono y de nitrógeno (Kempner y Miller 1965). Otros aminoácidos no se utilizan así y solo son útiles como fuente de nitrógeno (Buetow, 1966). Los aminoácidos como nutrientes para *Euglena gracilis* se pueden clasificar en tres grupos:

Grupo I- Son las fuentes de nitrógeno más eficientes que los iones amonio cuando se utiliza el etanol o glucosa como fuente de carbono, en este grupo se encuentra el glutamato, la glutamina, el aspártico, la asparagina, la alanina y serina. El glutamato es el mejor aminoácido nutriente para *Euglena gracilis*. Y las mejores fuentes de nitrógeno son glutámico, glutamina y asparagina cuando se utiliza acetato como fuente de carbono.

Grupo II- Se utilizan como fuente de carbono y de nitrógeno en células crecidas en la luz. Sin embargo cuando se utiliza etanol como fuente de carbono estos aminoácidos solo sirven como fuente de nitrógeno. En este grupo se encuentran los aminoácidos ramificados como la isoleucina. Además de la glicina, la treonina, y la prolina.

Grupo III- No sirven para mantener el crecimiento de *Euglena gracilis* ni tampoco como fuente de carbono ni de nitrógeno. Estos aminoácidos son captados por la células para la síntesis de proteínas entre estos aminoácidos se encuentran los aminoácidos básicos, los aromáticos, los que contienen grupo sulfidrilo y la hidroxiprolina.

Existen cinco aminoácidos que son capaces de inhibir el crecimiento de *Euglena gracilis* y son metionina, cisteína, treonina, leucina y fenilalanina. Esto se explica diciendo que estos aminoácidos compiten por los

sistemas de transporte que son compartidos por varios aminoácidos. Sin embargo el transporte del glutámico no es inhibido por estos amino ácidos ni tampoco la respiración celular, por lo que su efecto puede ser debido a la alteración del metabolismo celular por estos aminoácidos.

La inhibición del crecimiento de *Euglena gracilis* por estos 5 aminoácidos no es revertida por vitaminas pero se reduce al aumentar la fuente de carbono como el Etanol. Entonces, la adición de una cantidad adecuada de la fuente de carbono activa algún sistema metabólico de la célula, el cual evita los efectos tóxicos de dichos aminoácidos aún en un medio pobre en glutamato. La metionina es el aminoácido más tóxico para este organismo, afecta probablemente el metabolismo de moléculas de un carbono. La glicina evita el efecto de la metionina. La inhibición del crecimiento por treonina no se revierte por lisina o metionina apesar de ser antagonizada por valina. (Buetow, 1966; Oda y cols., 1982; Milne y Weissbach, 1964)

Células crecidas en un medio de lactato la actividad de la alcohol deshidrogenasa se incrementa en un día obteniéndose un máximo en tres días. El alcohol se transforma en acetaldehído y este proceso es inhibido por metil pirasol que es un inhibidor de la alcohol deshidrogenasa; debido a que esta sustancia no inhibe a la lactato deshidrogenasa y ya que la actividad puede restablecerse al agregar lactato se concluyó que la enzima activa es la alcohol deshidrogenasa. En células crecidas con 50mM de etanol el desarrollo de la alcohol deshidrogenasa es diferente, la actividad de esta enzima es menor y continua disminuyendo. *Euglena gracilis* posee varios tipos de alcohol deshidrogenasa con diferentes afinidades, ya que se encuentran dos pendientes cuando se estudia el efecto del etanol sobre la actividad de esta enzima. (Julistiono y Brian., 1992; Buetow, 1961).

Los organismos que pueden crecer en acetato o etanol lo hacen metabolizando estos sustratos por reacciones anapleróticas del ciclo del glioxalato (Kórnberg, 1961). Las células de este organismo presentan glioxisomas (microcuerpos), que son organelos especializados en conversión de la acetil coenzima A proveniente de ácidos grasos en carbohidratos (ciclos del glioxalato) las dos enzimas características del ciclo del glioxalato, la malato sintetasa e isocitrato liasa se encuentran en estos organelos.

En *Euglena* pueden encontrarse microcuerpos cuando se crecen en etanol o acetato pero no cuando se crecen en glucosa. Sin embargo, Begin-Heick (1973) no pudo distinguir si las dos enzimas del ciclo del glioxalato se

encontraban en los microcuerpos o en las mitocondrias de euglena ya que estos dos organelos cosedimentan.

Uno de los nutrientes más importantes para el crecimiento de *Euglena gracilis* es la vitamina B12 ya que su ausencia reduce la cantidad de ribonucleotidos, produciendo un sinnúmero de mutaciones en el organismo. Por otro lado la deficiencia de Tiamina no produce efectos muy obvios.

Se propone que en esta cadena la oxidasa alterna es de tipo bo (debido a su reactividad con CO) y que el lactato puede donar sus electrones directamente a esta oxidasa o bien donarlos a la ubiquinona y de ahí a la oxidasa alterna. También propone que los electrones provenientes del lactato pueden ser transferidos al citocromo b de la cadena clásica.

Inhibidores del transporte de electrones.

La transferencia de electrones a través de los complejos respiratorios puede ser bloqueada por una serie de compuestos químicos llamados inhibidores quienes pueden interferir en la entrada del sustrato alterando la permeabilidad disminuyendo los mecanismos de transporte o reduciendo el total de energía potencial disponible para bloquear ya sea las vías enzimáticas o interfiriendo en el proceso de acoplamiento. Para fines de nuestro trabajo enumeramos a los inhibidores según el complejo donde actúan:

El complejo I es inhibido por rotenona, amital y pericidina A (Ragan, 1976). El centro de acción de la rotenona no es aun conocido, aunque se sabe que en presencia de este inhibidor el FMN y los centros Fe/s permanecen en la forma reducida.

El complejo II es inhibido por malonato aunque esta inhibición no es muy específica.

El complejo III Casi todos los inhibidores han sido probados en este complejo al grado de tener cuatro grupos de distintos inhibidores. (Tabla.3)

Grupo I Todos estos inhibidores contienen un grupo β -metoxiacrilato que se parece a la estructura de la Ubiquinona. Bloquean la reducción del centro Fe-azufre y del citocromo b a través de la vía del sitio Q sin embargo permiten la

reducción del citocromo b. La unión de estos inhibidores es competitiva entre ellos así como los inhibidores del grupo II sin embargo no interfieren la unión de inhibidores del grupo III. Todos estos inhibidores producen un corrimiento del espectro del citocromo B1 reducido. Este corrimiento hacia el rojo solo puede detectarse por un espectrofotómetro de doble haz reduciendo tanto la celdilla de referencia como la celdilla de muestra con ditionita, y luego añadiendo el inhibidor a concentración saturante solo a la celdilla de muestra. Dentro de este grupo se encuentra el myxotiazol (extraído de *Myxococcus fulvus*), y varios homólogos de la strobilurina y oudemasina. El Myxotiazol es el inhibidor que se une más fuertemente a esta enzima.

Grupo II Los inhibidores del grupo II tienen una estructura común que contiene un fragmento 6-hidroxiquinona con diferentes sustituciones en las posiciones 2 y 3., así como un sistema de anillos eterocíclicos fundidos al anillo benzoquinona. Estos inhibidores evitan la reoxidación del centro Fe-azufre y la reducción del citocromo b566: Los inhibidores de este grupo bloquean la transferencia de electrones en estado estacionario del succinato o NADH al oxígeno. Bloquean completamente la transferencia de electrones entre el centro Fe-azufre y el citocromo C1 previniendo la reoxidación del centro F1-azufre, después de una transferencia de un electrón desde el ubiquinol hasta este centro. Dentro de este grupo se encuentran la Hidroxi-naftoquinonas como el 3-alkyl-2-hidroxi-quinona (UHNQ), Hidroxi-quinolinas quinonas como el 7-(n-Heptadecilmercapto)-6-hidroxi-5,8-quinolina quinona (HMHQQ), así como otras hidroxi-quinonas.

Grupo III Estos inhibidores a diferencia de los otros dos grupos no presentan analogías estructurales. Bloquean la misma reacción es decir el transporte de electrones desde el centro hémico b562 a la ubiquinona oxidada y el flujo reverso respectivo desde el ubiquinol hacia el hemo b562 estos compiten entre ellos pero se unen independientemente de los inhibidores del grupo I y II. Los inhibidores de este grupo inhiben cualquier transferencia de electrones desde o hacia cualquiera de los centros hémicos b562. Dentro de estos inhibidores se encuentran la antimicina (cuya unión induce un cambio conformacional del complejo b-c1 al cambiar la afinidad de carga de la proteína depletada del complejo Fe-azufre o aumentando drásticamente la estabilidad de la enzima a detergentes), también se encuentra la funiculosina, y también la Hidroxi-quinolina N-oxidosa (HQNO) que es un análogo de

quinona, la unión de este inhibidor induce un pequeño desplazamiento del pico de absorción del hemo b562 reducido.

Grupo IV Aquí se agrupan inhibidores que no pueden ser clasificados en algunos de los tres tipos anteriores como es el caso del 2-3-dimercaptopropanol el cual produce una inhibición irreversible de la proteína Fe-azufre y el DTNB (5-5` ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) el cual como otros agentes reductores de grupos tioles inhiben la reacción del sitio Q uniéndose a a proteína Fe-azufre pero sin destruirla. (von Jagow y Link 1986;Slater 1973;Trumpower 1981;Thierbach y Reichenbach 1981).

El complejo IV es inhibido por KCN, azida y por CO (Siedow y cols.,1991;Douce,1985;Ohnishi y von Jagow, 1985).

Las oxidasas alternas son inhibidas por inhibidores tales como el disulfiram y el SHAM (ácido 2-salicilhidroxámico) quienes inhiben la vía alterna y la fosforilación oxidativa en mitocondrias de plantas.(Laties, 1987), El DPA (Difenilamina) a concentraciones de $2.7 \times 10^{-4} M$, puede inhibir la NADH oxidasa y la actividad de la succinato oxidasa en mitocondrias de planta (Baker,1963) y la cadena alterna en mitocondrias de Euglena (aunque no es específica) (Uribe y Moreno-Sánchez,1992) y por propylgalato (Siedow y Girvin 1980). Parece que el efecto de inhibición está relacionado con la solubilidad del DPA en lípidos.

En el laboratorio se buscan condiciones en las que la cadena alterna de *Euglena gracilis* se exprese en grandes cantidades así como se intenta caracterizar en detalle el transporte electrónico a través de esta vía.Por otro lado se trata de identificar los componentes de esta cadena para hacer planteamientos a cerca de su relación evolutiva con otros organismos.

Inhibitor	Structural formula	Molecular formula
Antimycin ^{28,29}		$C_{27}H_{40}N_2O_9^b$
Funiculosin ^{30,31}		$C_{27}H_{41}NO_7$
HQNO ³² (heptylhydroxyquinoline-N-oxide)		$C_{16}H_{21}NO_2$
NQNO (nonylhydroxyquinoline-N-oxide)		$C_{18}H_{23}NO_2$
Myxothiazol ^{11,12}		$C_{25}H_{31}N_3O_3S_2$
Strobilurin A ¹⁴⁻¹⁶ (mucidin ^{17,18})		$C_{16}H_{18}O_4$
Strobilurin B ¹⁹		$C_{11}H_{10}ClO_2$
Strobilurin C ¹⁹		$C_{21}H_{26}O_4$
Oudemansin A ²⁰		$C_{17}H_{22}O_4$
Oudemansin B ¹⁹		$C_{18}H_{21}ClO_5$

Tabla 3.-Estructura de los inhibidores del complejo bc1 en mamíferos tomado de Von jagow (1986).

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Determinar la correlación entre la respiración resistente a CN y antimicina con el contenido de oxidasa alterna en mitocondrias de *Euglena gracilis* crecida en diferentes fuentes de carbono; así como el elucidar el tipo de hemo componente de dicha oxidasa.

Objetivos Específicos

- 1) Determinar el efecto de: antimicina, mixotiazol, HQNO, DPA, KCN en la velocidad de respiración en mitocondrias de *Euglena* crecida con Etanol o Glutamato/Malato +CN.
- 2) Cuantificar el contenido de citocromo aa3 y oxidasa alterna en mitocondrias de células crecidas con Etanol , Glutamato/Malato+CN o Glutamato/Malato.
- 3) Determinar las constantes de inhibición del KCN y DPA sobre la actividad de la oxidasa terminal (TMPD oxidasa) en mitocondrias crecidas en Etanol o Glutamato/Malato+CN.
- 4) Determinar la actividad de quinol oxidasa (oxidasa alterna) en mitocondrias de células crecidas en Glutamato/Malato+CN o Etanol
- 5) Dilucidar el grupo hemo de la oxidasa u oxidasas en mitocondrias de *Euglena gracilis*

METODOLOGIA

Las muestras de *Euglena gracilis* fueron cultivadas axénicamente en la obscuridad con agitación orbital a 120 rpm y temperatura ambiente (25 C) en los medios de cultivo 1) Glutamato + Malato +KCN (100-200 μ M final) y 2) Etanol: (Hutner y cols., 1965 y modificado por Schiff.,1971).(apéndice 2)

El medio de Etanol contiene los mismos elementos (vitaminas y minerales) pero utiliza como fuente de carbono Ca CO_3 y el Etanol (10ml de etanol por litro de medio, es decir, 1%). Los medios de cultivo sin vitaminas se esterilizaron por 40 min a una presión de 20 libras a 120 C. Las vitaminas B6 y B12 se añadió como Neurobion (MERCK) (2ml/100ml) que junto con la vitamina B1 (0.01gr/100ml) y FeCl_3 (0.05gr/100ml) se esterilizaron por filtración en una membrana miliporo de 0.22 μ m. Posteriormente se agregaron al medio de cultivo al momento de realizar la siembra de las células.

Para sembrar las células se realizó un conteo en una cámara de Neubauer diluyendo e immobilizando con HCl (5mM) y así se ajusta una población de células de $0,2 \times 10^6$ células/ml de acuerdo a la relación:

$$X = (\text{vol}) (0.2) / (X) (\text{dilución}) / 100$$

Donde Vol= Es el volúmen que se quiere sembrar; X= Número de células que se deben sembrar para alcanzar la concentración inicial; 0.2= Es la concentración inicial de células ; X= Es el número de células promedio contadas en la cámara.

Las células se colectaron en la fase logarítmica tardía de crecimiento (4 día) y fueron lavadas por centrifugación a 1000/g por 15 min en un medio que contiene 2mM de EGTA, 0.25m de Sacarosa, 20mM de ácido 3-(N-Morfolino) Propanosulfónico (MOPS) pH 7.2.

Curvas de Crecimiento:

Las células inician su crecimiento después de la inoculación con una población inicial de 0.2×10^6 células/ml (día cero). A partir de este momento se comienzan a tomar muestras de un mililitro a diferentes intervalos de tiempo con lo cual se va cuantificando el número de células (por conteo en la cámara de Neubauer) y se construyen las curvas de crecimiento.

Medición del Consumo de Oxígeno:

El consumo de oxígeno en mitocondrias de *Euglena* se midió con un electrodo de tipo Clark conectado a un oxímetro (YSI model 53) a 25 C en medio que contiene 120mM de KCl, 20mM de MOPS y 2mM de EGTA a pH 7.2 (Medio KME) tomando en cuenta una concentración de oxígeno de 420 ngatO/ml a una altitud de 2300msnm.

Medición de la actividad de la Citocromo Oxidasa:

Se realizó por mediciones del consumo de oxígeno sensible a Azida de sodio 20mM final en un medio que contiene 0.25 M de Sacarosa, 2mM de EGTA y 10mM de HEPES pH 7.2 a 25 C, en el cual se incuban las mitocondrias añadiendo conjuntamente antimicina (0.01mM final) y ascorbato (7mM) a pH 6.8, TMPD 1mM final y las concentraciones indicadas para KCN y/o DPA.

Aislamiento mitocondrial:

Se utilizó el método descrito por Moreno-Sanchez y Raya (1987) con algunas modificaciones, el cual consiste en romper las células por sonicación y recuperar a las mitocondrias por centrifugación diferencial. Se colectaron las células en fase logarítmica tardía de crecimiento y se centrifugaron por 10 min a 1780 X g en un medio que contiene 250mM de Sacarosa, 10mM de HEPES y 2mM de EGTA pH 7.2 (SHE) después se centrifugaron durante 5 min a 327 X g. Posteriormente se lavan dos veces con medio SHE y albúmina bovina delipidada 0.1% (SHEA) centrifugando a 327xg durante 5 min. Las células recolectadas se sonicaron en un sonicador SONIPREP 150 a una intensidad de 10-12 micrones de amplitud en un baño de hielo por 3 intervalos de 15 segundos cada uno. Posteriormente se centrifugó a 581 X g durante 10 min y después a 8714 X g a 4 C por 10 min en una centrifuga SORVALL. El paquete mitocondrial obtenido se resuspendió en el medio SHEA en aproximadamente 5ml y se incubó durante 10 min con 20µl ADP 0.2M y 0.25% de Albúmina delipidada. Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó a 8714 X g durante 10 min y el sobrenadante se resuspendió en aproximadamente en 1ml de SHEA. Obteniéndose aproximadamente 50mg de proteína mitocondrial por litro de cultivo.

En el siguiente diagrama se esquematiza el procedimiento para preparar mitocondrias de *Euglena gracilis*

Aislamiento de Mitocondrias de *Euglena gracilis*.

Colectar las células en fase logarítmica de crecimiento. Centrifugar 10 min 1780xg.

↓
Lavar las células en un medio de sacarosa 250mM, HEPES 10mM, EGTA 2mM (SHE) pH 7.4. Centrifugar 5 min. 327xg

↓
Lavar las células en medio SHE y albúmina delipidada 0.1% (SHEA) 2 veces.

↓
Conteo en cámara de Neubauer.

↓
Sonicar 1-1.5x10⁹ células en 30-40 ml de medio SHEA (10-12μ de amplitud) durante dos intervalos de 15" cada uno en un baño de hielo.

↓
Centrifugar el sobrenadante 10 min a 8714xg.

↓
Resuspender el paquete mitocondrial e incubarlo con 1mM de ADP y 0.25% de albúmina delipidada durante 10 min.

↓
Centrifugar 10 min a 8714xg.

↓
Resuspender en 1 ml de SHEA.

Medición de Citocromos por Espectrofotometría

Se realizó con mitocondrias almacenadas a -72 C durante varios días mediante un barrido espectrofotométrico de 400 a 700 nm, utilizando un espectrofotómetro de doble haz (SLM-Aminco DW2000 uv-vis). Las mitocondrias se incubaron en el medio de KME diluido con glicerol 1:1 (v/v). Se detectaron picos de absorción aproximadamente a los 428.5nm, 560nm y 604nm, su presencia dependió tanto de sustratos como de los inhibidores. El contenido de citocromos fue estimado mediante los coeficientes de extinción molar reportados para bacterias (*Rhodobacter spheroides*). (428.5-445nm)-148mM-1cm-1, (604-630nm)-24mM-1cm-1 para el citocromo aa₃; (560-575nm)-22mM-1cm-1 para el citocromo b y (544-554nm)-23mM-1cm-1 para el citocromo c. (Calhoun y cols., 1993).

Espectros diferenciales en presencia de monóxido de carbono (CO)

Los espectros se realizaron según el método descrito por Devars y cols. (1992). Se utilizaron mitocondrias (2-4mg/ml a 25 C) reducidas con ditionita en el medio de KME diluido con glicerol 1:1 (v/v). Las muestras se burbujearon (con CO) y se leyeron a distintos intervalos de tiempo, 30s, 8min y 16min con un burbujeo de 30s en la celda de referencia. El contenido de citocromos fue estimado como se menciona anteriormente. Los coeficientes de extinción molar utilizados fueron (428.5-445nm)-148mM-1cm-1, (418-430nm)-160mM-1cm-1.

Determinación de Proteína:

La proteína mitocondrial fue estimada por el método de Biuret (Gornall y cols. 1949) en presencia de 1% (P/V) de desoxicolato de sodio y utilizando albúmina como estándar. La turbidez ocasionada por el paramilo fue eliminada centrifugando los tubos después de 20 min de añadido el reactivo de Biuret a 327 X g durante 5 min a 25 C en una centrifuga IEC-CENTRA 8R.

HPLC

Se agregaron 2 ml de volumen de muestra (aproximadamente 60mg) de proteína mitocondrial a 20ml de una mezcla de acético:etanol:agua (70:17:13). Después de agitar la muestra se centrifugó a 5000 rpm por 5 min (aproximadamente 2000 X g). Se recuperó el sobrenadante y se le agregó un volumen de éter igual al de la mezcla de ácido acético. Se forman dos fases de las cuales se eliminó la fase incolora. En algunos casos no se forman estas fases después de la agitación y entonces se centrifuga a 3000 rpm por 5 min para que aparezcan. La fase de color se mezcló con 20 ml de agua con lo que se vuelven a formar dos fases y se recuperó la fase colora la cual se puso a secar en un baño María a 50 C y bajo una atmosfera de N₂. A las muestras secas se le agregó un 1ml de una mezcla de dicloro metano con Etanol al 95% (1:1). Las mezclas se filtraron a través de una membrana de 0.45 μ

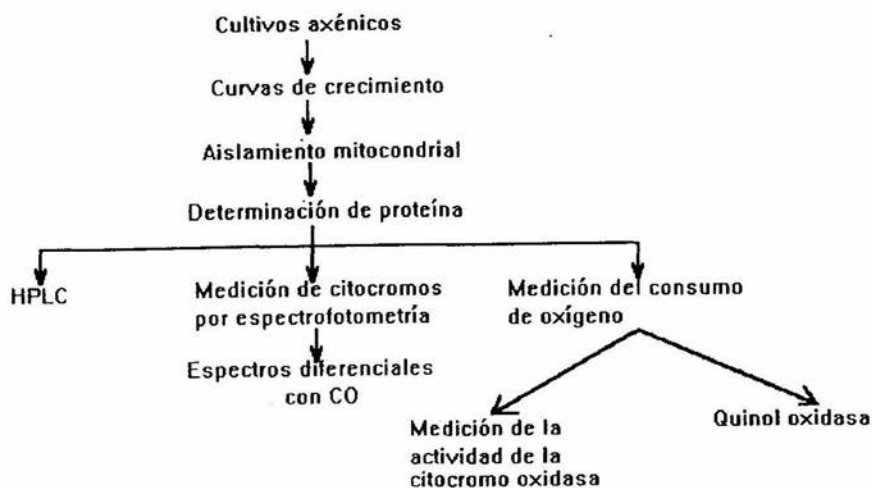
A una mezcla de acetato:HCl:Agua: (9:1:1) se le sonicó durante 1 hora y posteriormente se aplicó a la columna del HPLC como fase móvil. Entonces se aplicaron las muestras y se detectó la absorbancia de las muestras recolectadas a diferentes tiempos y se identificaron los diferentes tipos de

hemo de acuerdo al tiempo de elución. (Sone y Fujiwara, 1991; Minghetti y cols.,1992)

Actividad de la Quinol Oxidasa.

Se midió por consumo de oxígeno sensible a antimicina en presencia de Q1 (quinona con una cadena isoprenoide) a una concentración final de 0.68 mM. En un medio que contiene Sacarosa 250mM/10mM HEPES/2mM de EGTA y 27mM de DTT a pH 7.2 y a una temperatura de 30 C. Después de agregar las mitocondrias (3mg/ml) se incubó con antimicina (20 μ M) y DTT (27mM) durante 5 minutos al cabo de los cuales se agregó la Q1 (0.68mM) y se registró la velocidad del consumo de oxígeno.(Chepuri y cols.,1990).

En el siguiente diagrama se esquematiza la secuencia de ensayos realizados con las mitocondrias de *Euglena gracilis*



RESULTADOS

Curvas de crecimiento

En la **figura 12** se muestra el crecimiento de las células crecidas en un medio con Etanol o Glutamato/Malato +CN.

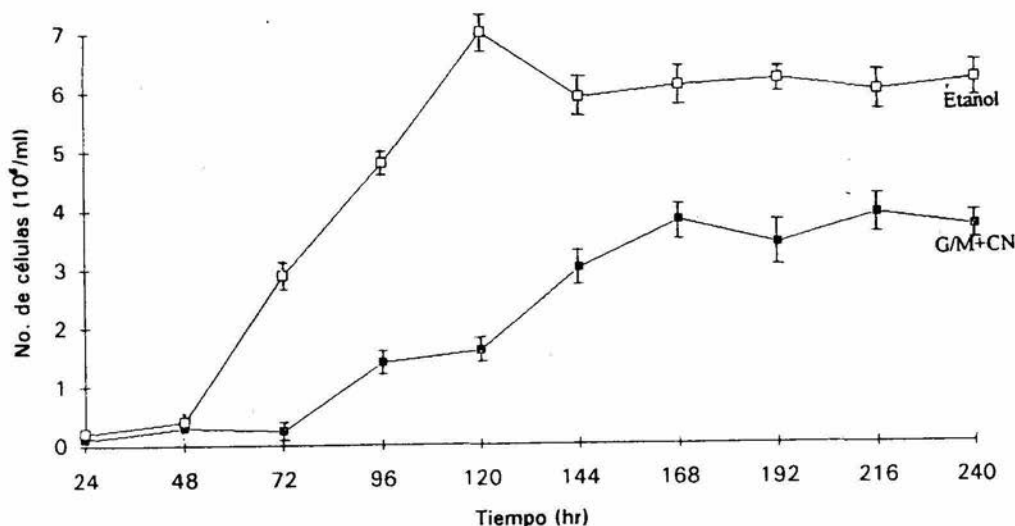


Fig. 12 Curva de crecimiento de células de *Euglena gracilis* crecidas en presencia de Etanol o G/M+CN. Las células se crecieron como se indica en la metodología y se tomaron muestras de los cultivos cada 24 hrs. Los valores representan el promedio de tres ensayos.

Las curvas de crecimiento de células crecidas en un medio de etanol y/o G/M se siguieron por espacio de 20 días a temperatura ambiente (20-25 C), se encontró que las células crecidas en presencia de etanol presentan su fase estacionaria a los 5-7 días además de observarse una movilidad normal a los 13-15 días en la mayoría de las células

La cinética de crecimiento celular de *Euglena gracilis* en presencia de etanol (178 mM) fue de tipo sigmoïdal en donde la fase lag es muy corta, (con respecto a la fase log y estacionaria) debido a que el etanol incrementa la actividad de ciertas enzimas como la fumarasa (Buetow, 1989) por lo que

la actividad metabólica está más acelerada, y eso se ve reflejado en la velocidad de crecimiento de la población así como en la densidad celular alcanzada. También durante el crecimiento se aumentó la capacidad de síntesis de pigmentos (carotenos) dando un color rojizo al paquete mitocondrial. Estas células son crecidas en la obscuridad por lo que ciertas vías metabólicas (ciclo del glioxalato, glicólisis entre otras) pueden ayudar a la síntesis de este tipo de pigmentos.

La cinética de crecimiento presentada por las células crecidas en G/M+CN también fue de tipo sigmoidal pero aquí la fase lag y logarítmica son muy largas quizás debido a la presencia de CN el cual inhibe a nivel de la citocromo c oxidasa (la cual es parcialmente insensible a este inhibidor en este organismo) siendo glutamato y malato los mejores sustratos de crecimiento para estos organismos ya que alimentan directamente al ciclo de Krebs (Smith y cols., 1975; Slak, 1969; Ting y Rocha, 1971; Isegawa, 1984; Miyatake, 1985).

Se obtiene una velocidad muy baja de crecimiento además de una pequeña cantidad de células en presencia de este inhibidor a comparación de las células crecidas en etanol (entre ellas existe una diferencia en la densidad celular de 3.1×10^6 /ml aproximadamente) además, la preparación mitocondrial obtenida es de color amarillo y alcanza su fase estacionaria a los 5-8 días presentandose poca movilidad en la población celular, después de los 8 días.

Posiblemente el hecho de que el crecimiento sea menor en las células crecidas en presencia de CN se deba, a una insuficiente producción de energía por parte de la cadena alterna en estas condiciones. Sin embargo, se ha demostrado en este trabajo que a pesar de que existe una oxidasa alterna propiciada por la presencia del inhibidor, las mitocondrias siguen siendo sensibles a CN, indicando la presencia de una citocromo c oxidasa sensible a CN en estas mitocondrias. Por otro lado se ha propuesto que la energía liberada por la cadena alterna es utilizada principalmente para procesos de transporte a través de la membrana, es decir, que el gradiente electroquímico generado no es utilizado para la síntesis de ATP (Calvayrac y cols., 1985; Benichou y cols., 1988)

La inhibición del crecimiento celular es probablemente debida a un aporte deficiente de energía en presencia del inhibidor, el aumento en la actividad

de la cadena alterna no parece ser suficiente en estas condiciones para compensar esta deficiencia generándose una sobreproducción del complejo IV permitiendo un crecimiento sostenido pero menor (Mcintosh, 1994).

Evidenciación de la cadena alterna en mitocondrias de *Euglena gracilis*

Consumo de oxígeno en presencia de diversos sustratos e inhibidores.

Las células fueron crecidas en un medio de Glutamato/Malato+CN o Etanol. Las Tablas 4 y 5 muestran los valores porcentuales de la inhibición del consumo de oxígeno de mitocondrias preparadas a partir de estas células. Se observa en promedio una sensibilidad del 40% cuando se añade CN y del 51% con antimicina en las mitocondrias de células crecidas en el medio de Etanol, mientras que en las mitocondrias de células crecidas en el medio de Glutamato/Malato+CN el CN inhibe un 34% y la Antimicina un 46.5%. Utilizando DPA en las mitocondrias de Etanol se observa un 51% de inhibición y un 58% en las mitocondrias de Glutamato/Malato+CN. Las concentraciones de los inhibidores fueron tomadas del trabajo de Uribe y Moreno-Sánchez en 1992; quienes encontraron que son intervalos de concentraciones adecuados para inhibir eficientemente la respiración en estas mitocondrias.

Tabla 4 Inhibición del consumo de oxígeno con diferentes sustratos e inhibidores, en mitocondrias de *Euglena gracilis* crecidas en Glutamato/Malato+CN como fuente de carbono. Los datos representan la media \pm error estándar del número de experimentos que se indica entre paréntesis. Se incubaron las mitocondrias (1 mg/ml) durante 5 minutos en el medio KME con 5 mM de K_2PO_4 y la concentración indicada de inhibidor, al término de este lapso se agregó el sustrato que se indica.

		L-láctico 10 mM	Succinato 10 mM	NADH 1 mM
Antimicina	0.01 mM	46.5 \pm 9 (6)	66.0 \pm 9.7(5)	48.0 \pm 6 (6)
Mixotiazol	0.01 mM	54.0 \pm 19(5)	81.0 \pm 13(4)	57.0 \pm 15(5)
HQNO	0.01 mM	36.8 \pm 9.5(6)	53.4 \pm 14(5)	73.0 \pm 9.8(6)
KCN	0.10 mM	34.0 \pm 11(6)	77.0 \pm 9 (5)	47.0 \pm 11(6)
DPA	0.25 mM	58.0 \pm 11(6)	80.0 \pm 8 (5)	80.0 \pm 7 (6)

Oxidación de sustratos en ausencia de inhibidores (ngat O/min/mg)

L-Láctico	Succinato	NADH
57 \pm 6 (6)	30 \pm 7.2 (5)	116.3 \pm 16 (6)

Tabla 5 Inhibición del consumo de oxígeno con diferentes sustratos, en mitocondrias de *Euglena gracilis* crecida en Etanol como fuente de carbono. Los datos representan la media \pm error estandard del número de experimentos que se indica entre paréntesis. El experimento se realizó como se explica en la tabla 4.

		L-Láctico 10 mM	Succinato 10 mM	NADH 1 mM
Antimicina	0.01 mM	51 \pm 12(12)	69 \pm 8(10)	62 \pm 15(8)
Mixotiazol	0.01 mM	36 \pm 5(12)	62 \pm 3(10)	67 \pm 11(8)
HQNO	0.01 mM	50 \pm 13(12)	63 \pm 3(10)	64 \pm 12(8)
KCN	0.10 mM	40 \pm 2(12)	57 \pm 12(10)	88 \pm 8(8)
DPA	0.25 mM	51 \pm 9(12)	81 \pm 6(10)	86 \pm 10(8)

Oxidación de sustrato en ausencia de inhibidores (ngat O/min/mg).

L-láctico	Succinato	NADH
200 \pm 10 (12)	165 \pm 5 (10)	288 \pm 16 (8)

La oxidación del NADH en células crecidas en G/M+CN es inhibida por DPA. Esta inhibición es muy grande probablemente debido a una inhibición de la NADH oxidasa y a la succinato oxidasa, lo cual ocurre en plantas entre 4-10 M. Cuando es agregada antimicina la poca inhibición obtenida es similar la producida por KCN- lo que nos lleva a decir que la oxidación de NADH es parcialmente insensible a antimicina y a CN. Y esto sugiere que la salida a una vía alterna se encuentra en el complejo III.

Cuando se utiliza láctico como sustrato, la inhibición con DPA es alrededor del 60% mientras que la inhibición con los otros inhibidores en general no llega al 50%. Indicandonos la presencia de una vía alterna, aún cuando estas diferencias no son muy significativas. Se pudiera explicar diciendo que el sustrato produce un flujo al parecer preferentemente dirigido a través de la vía alterna, la cual representa un camino más corto hacia la reducción de oxígeno.

En el caso del succinato como sustrato, a diferencia de lo observado con NADH, la inhibición por DPA es ligeramente mayor a la producida por los otros inhibidores. Todas estas evidencias sugieren que en células crecidas en G/M+CN- existe la presencia de una vía alterna. Comparando la

sensibilidad a antimicina y a CN- de mitocondrias aisladas de este tipo de células con células que fueron crecidas en ausencia de este inhibidor (Uribe y Moreno-Sánchez, 1992) (G+M), encontramos que la sensibilidad a estos inhibidores baja especialmente al CN-, sin embargo esta sensibilidad no llegó a ser comparable con la obtenida por Sharples y Butow (1970) quienes obtuvieron una insensibilidad total a antimicina al crecer a la célula en presencia de este último inhibidor (0.3 nmol/ml) y usando succinato como fuente de carbono. Además, nuestro porcentaje de inhibición concuerda con el 30-40% de sensibilidad encontrado por Calvayrac (1970). Comparando con los datos obtenidos por Uribe y Moreno-Sánchez (1992), nosotros obtuvimos una insensibilidad menor en un 20 a 30%.

La inhibición obtenida en este trabajo, a pesar de haberse utilizado 0.1 mM final de CN en los cultivos, no pudo reducirse a los niveles encontrados por Sharples y Butow quienes solamente utilizaron 0.3 nmol/ml de antimicina durante el crecimiento de las células. Esta sensibilidad puede ser atribuida a una disminución en la concentración del CN debido a la volatilidad de este compuesto a diferencia de la antimicina que no es un compuesto volátil. Benichou y cols. (1990) encontraron que la sensibilidad a CN y antimicina disminuye al adaptar a las células a crecer en un medio que contiene 2 mM de antimicina, sin embargo esta disminución solo representa un 10% de inhibición.

Cuando *Euglena gracilis* es crecida en presencia de Etanol como fuente de carbono se observa de igual manera que tanto la oxidación del NADH como la oxidación del succinato son inhibidas fuertemente por DPA, lo cuál había sido descrito ampliamente por Sharples y Butow (1970) quienes encontraron una inhibición del 70% en presencia de 0.33 mM de DPA. Esta alta sensibilidad a DPA no refleja una mayor actividad de la vía alterna, debido a que estas mitocondrias presentan también una elevada sensibilidad a los otros inhibidores. Lo que nos lleva a proponer un flujo de electrones preferentemente por la vía clásica, porque, de otra forma, la sensibilidad a los otros inhibidores debería ser más baja con respecto al DPA (vía alterna).

Otra explicación sería que este inhibidor (DPA) actúa afectando específicamente a enzimas de la vía clásica como son la NADH y succinato deshidrogenasa que se activan en presencia de succinato o NADH. Baker (1963) evidenció la inhibición de la succinato y la NADH deshidrogenasa a concentraciones en el orden de 2.7×10^{-4} M de DPA lo que entra dentro del

rango utilizado en este trabajo. Un efecto del DPA en ambas vías durante la oxidación del succinato fue previamente reportado (Sharpless y Butow, 1970; Devars y cols., 1992).

Utilizando ácido láctico como sustrato oxidable se observa la misma relación entre la inhibición obtenida por inhibidores de cadena clásica y alterna (DPA) es decir, este sustrato promueve el transporte electrónico a través de ambas vías de manera similar, sin embargo, la sensibilidad a antimicina y a CN comparada con la obtenida cuando se utilizan los otros dos sustratos resulta menor, lo que sugiere que este sustrato es oxidado preferentemente por la vía alterna (Sharples y Butow, 1970). Los valores de consumo de oxígeno en presencia de los diferentes inhibidores muestran una preferencia en la oxidación de NADH la cual es seguida por la oxidación de láctico seguido del succinato. La predilección por la oxidación del NADH y del láctico sobre el succinato es una consecuencia de que para la oxidación de este sustrato se requiere de la participación de menos componentes enzimáticos y/o acarreadores; como la lactato deshidrogenasa en el caso de L-láctico, y las dos enzimas que oxidan directamente al NADH exógeno, una de las cuales es dependiente de NAD y la otra es dependiente de NADP (Tokunaga y cols., 1976) encontradas en *Euglena gracilis*. Por lo que la velocidad de oxidación de estos dos sustratos (NADH, L-láctico) es mayor que la oxidación del succinato el cual para llegar al complejo II tiene que ser transportado por un intercambiador de dicarboxilatos (Nicholls, 1985).

Al ver el estímulo en el consumo de oxígeno inducido por ADP en células crecidas con G/M+CN se observa que la respiración fue estimulada con ADP de manera similar en presencia de lactato (24%) y succinato (23%) mientras que esta estimulación fué mayor en presencia de NADH (43%), debido tal vez al mayor número de sitios de fosforilación presentes en la vía de conservación de energía por este sustrato, a comparación de succinato y lactato quienes solamente presentan dos sitios de conservación de energía. En presencia de ADP no se pudo observar una estimulación significativa del consumo de oxígeno, por lo que no se pueden sacar conclusiones a partir del efecto de los inhibidores sobre la respiración en el estado 3. Al afectar el transporte electrónico estos inhibidores pueden afectar la capacidad de los complejos respiratorios para responder a un cambio de potencial transmembranal i.e. a un cambio en la concentración de ADP. Este efecto de los inhibidores es similar entre todos ellos.

La respiración con sustrato en presencia de Etanol fue muy alta con NADH demostrando la preferencia del organismo por este sustrato la cual es seguida por láctico y posteriormente por succinato, la misma preferencia se observó con las células crecidas en G+M/CN. Los valores de respiración con sustrato en comparación con las células crecidas en presencia de CN son muy altas debido tal vez a que este sustrato incrementa la velocidad de ciertas enzimas metabólicas propiciando una mayor velocidad de crecimiento, movilidad y reproducción por lo que el consumo de oxígeno es alto. Pero contrario a lo observado con las células crecidas en presencia de CN ninguna de las preparaciones mitocondriales obtenidas de estas células (etanol) presentó control respiratorio, quizá debido a la presencia del etanol como fuente de carbono, ya que éste es un solvente orgánico capaz de afectar la integridad membranal (Calvayrac y cols., 1973) esto sumado al paso de sonicación en el proceso de aislamiento condiciona la obtención de mitocondrias íntactas en este tipo de células.

La respiración endógena se encuentra alrededor de 4.5 ngat O/min/mg en células crecidas en G/M+CN y en etanol de 5.0 ngat O/min/mg esto refleja que la cantidad de sustrato retenido por las mitocondrias durante el proceso de preparación es similar en las preparaciones utilizadas.

Con el objeto de evidenciar de una manera más confiable la presencia de la cadena alterna en las mitocondrias de este organismo crecido tanto en presencia de G/M+CN como de Etanol se utilizó láctico como sustrato y un exceso de los diferentes inhibidores (Antimicina, HQNO y DPA). Los resultados de estos experimentos se muestran en la tabla 6.

Tabla 6 Se muestra el porcentaje de inhibición promedio de dos ensayos en presencia de un exceso de inhibidor, Utilizando unicamente láctico como sustrato y antimicina, HQNO, y DPA como inhibidores. El experimento se realizó como en la tabla 4.

		Láctico 10 mM	
		G/M+CN	ETANOL
Antimicina	0.1mM	87	96
HQNO	0.1mM	64	65
DPA	1mM	84	94

La inhibición encontrada en las células crecidas en G/M+CN fue alta tanto para antimicina como para DPA. A esta concentración de DPA (1 mM) se inhiben ambas vías (clásica y alterna), en cambio, la antimicina es más

específica, y el hecho de que la antimicina no sea capaz de inhibir en un 100% la respiración de células crecidas en G/M+CN indica la presencia de una cadena alterna. Sharples y Butow obtienen una sensibilidad a DPA de 94% así como una insensibilidad total a antimicina en células crecidas en succinato más antimicina, esto indica que este último inhibidor es capaz de inducir una mayor actividad de la vía alterna a comparación con el CN.

Al usar HQNO (inhibe citocromo b y oxidasa alterna de bacterias) no pudo incrementarse notablemente la inhibición en comparación con concentraciones más bajas, quizá debido a que es 100 veces menos afin que la antimicina por el sitio II (Papa, 1982). El mecanismo de acción de este inhibidor consiste en presentar una conformación análoga a la quinona impidiendo con ello la transferencia de electrones desde la quinona hasta el complejo III, a diferencia de la antimicina quien actúa induciendo un cambio conformacional en el complejo bc1, provocando un cambio en la afinidad de la proteína Fe/S (Von Jagow, 1986).

En las células crecidas en un medio con etanol se encuentran las mismas tendencias que cuando se crecen en G/M+CN. Pero los niveles de inhibición alcanzados son más altos debido a que estas células no fueron adaptadas a crecer en presencia de un inhibidor, esto mismo fue observado cuando se usan menores concentraciones del inhibidor.

La inhibición por antimicina y DPA es la misma cuando se hace respirar a las mitocondrias en presencia de láctico tanto a concentraciones saturantes del inhibidor como a concentraciones pequeñas (Tabla 6). Además, hay que recordar que el DPA es un inhibidor inespecífico de cadena alterna en este organismo (Uribe y Moreno-Sánchez, 1992). Se ha postulado en otros trabajos que la oxidasa alterna en este organismo pudiera ser un citocromo tipo b (Devars y cols., 1992; Sharples y Butow, 1970; Buetow y Buchanan, 1969), por ello mismo es posible que la antimicina al afectar la reducción del citocromo b 562 pueda también afectar la actividad de la oxidasa alterna o que el DPA inhiba también el flujo de electrones a nivel del complejo bc1 lo cual es apoyado porque se tienen dos pendientes con TMPD oxidasa en este trabajo y en el trabajo de Uribe (1992).

Los valores anteriores (tabla 6) muestran la presencia de la vía alterna en las mitocondrias de este organismo la cuál fue medida

espectrofotométricamente y comparada con la citocromo c oxidasa presente en este organismo

Para saber en qué proporciones se encontraba la oxidasa alterna con respecto a la oxidasa clásica se calculó la concentración de citocromos o, aa3 y b de espectros con CO y diferenciales con sustrato e inhibidores.

Espectros de absorción de las preparaciones mitocondriales

Las **figuras 13 y 14** muestran los espectros de reducido ditionita vs ditionita y burbujeado por diferentes lapsos de tiempo con CO. Para ambas preparaciones G/M+CN y Etanol.

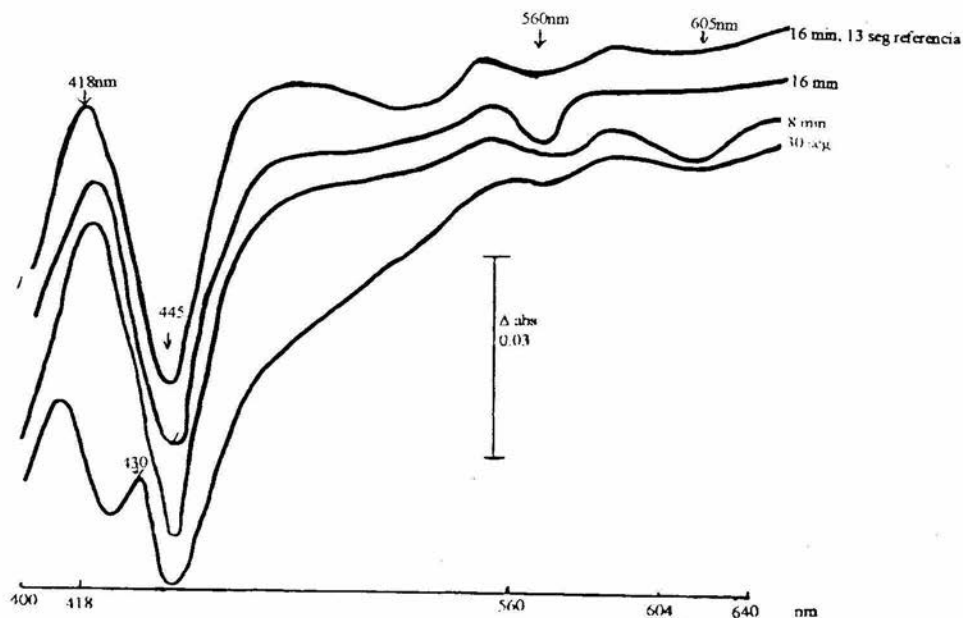


Fig 13 Espectros de mitocondrias de *Euglena gracilis* reducidas con ditionita y burbujeado con monóxido de carbono. Las mitocondrias se extrajeron de células crecidas en G/M+CN.

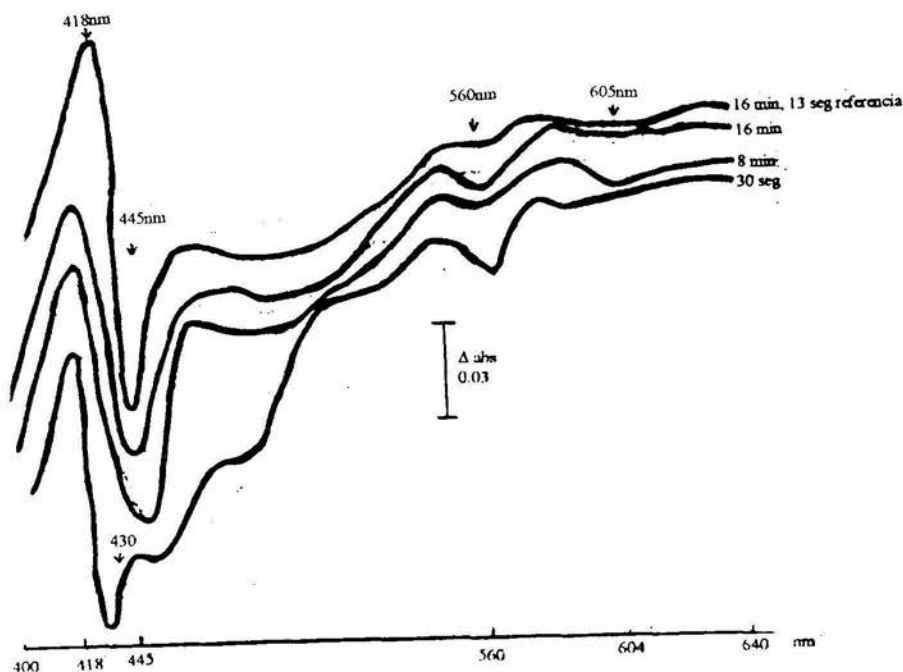


Fig. 14. Espectros de mitocondrias de *Euglena gracilis* reducidas con ditionita y burbujeadas con monóxido de carbono. Las mitocondrias se extrajeron de células crecidas en presencia de Etanol.

En la **figura 13** se puede observar que a los 30 seg de burbujear la muestra (mitocondrias de células crecidas en G/M+CN) con CO pueden distinguirse un pico a los 430 nm con valle a los 445 nm el cual corresponde al citocromo aa₃. Además se definen valles a los 560 y a los 605 nm correspondientes a los citocromos b y aa₃ respectivamente. Esto último sugiere que de las oxidasas que reaccionan con CO en este organismo una es la aa₃ presente generalmente en las vías de transporte y la otra correspondiente a una oxidasa que contiene un hemo tipo b unido a otro hemo tal vez alguna variante del hemo b como bb₃, bo, ba₃ y otras más (Chepuri y cols., 1994) las cuales tienen sensibilidad a CO. A los 8 minutos

de burbujeo con CO aparece un solo pico a los 418 nm característico del citocromo bo (Carter y Gennis, 1990) y a los 16 min de burbujeo con CO con 30 seg de burbujeo en la celda de referencia aparece el pico a los 418 nm además de los dos valles mencionados anteriormente. Los mismos picos fueron detectados por Sharples y Butow (1970).

En la **figura 14** con mitocondrias de células crecidas en etanol se observa lo mismo que en la **figura 13** pero aquí el pico a los 418 se va incrementando conforme el tiempo de burbujeo sea más prolongado debido tal vez a la presencia de carotenoides en las preparaciones mitocondriales de Euglena.

El ensanchamiento del pico a 418 nm característico del citocromo o en ambos casos significaría la presencia de una citocromo oxidasa que reacciona con CO o bien se debe a la presencia de citocromo aa3 sumada en esta banda. Sin embargo, en esta región del espectro otros pigmentos como los carotenos también pueden absorber luz y por tanto interferir en la detección de citocromos.

Devars y cols., 1992 sugirieron que la oxidasa alterna podría contener un citocromo de tipo o pero el pico encontrado a los 418 nm podría corresponder a un citocromo de tipo b o variante de este que reaccione lentamente con CO o CN y azida (los cuales también reaccionan con la oxidasa de cadena clásica), como sucede en bacterias como *Rhodobacter spheroides*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodospirillum rubrum*, *Bradirhizobium japonicum*, *Acetobacter aceti* entre otros (Anemuller, 1992; Anemuller y Schafer, 1990; Buce y Hencel, 1989; Matsushita y cols., 1992; Nubrega y cols., 1990).

Tabla 7 Contenido relativo del citocromo o y aa3 en mitocondrias de células crecidas en Etanol y G/M+CN. Las concentraciones fueron calculadas en base a los coeficientes de extinción molar reportados para bacterias (428.5-445nm) 148mM-1 cm-1 para citocromo aa3 y (418-430nm)160mM-1 cm-1 para citocromo o. Los valores representan la media \pm error estándar del número de experimentos que se indica. Las mitocondrias, se redujeron con ditionita, posteriormente se burbujeó con CO a diferentes intervalos de tiempo 30s, 8min y 16min y se leyó la absorbancia de la muestra entre 400 y 700 nm. El contenido de citocromo aa3 se calculó después de burbujear la muestra con CO por 30 seg y el contenido de citocromo o después de burbujear por 16 min, utilizando mitocondrias previamente congeladas.

Mitocondrias crecidas en medio:	pmol/mg (cit. O)	pmol/mg (cit. aa3)	cit o/cit aa3	n
G/M+CN	50 \pm 6.5	42 \pm 10	1.2	9
Etanol	46 \pm 6	39 \pm 4.5	1.17	8
G/M	29 \pm 7	28 \pm 4.5	1.1	7

En la tabla 7 se observa que la cantidad de citocromo o y citocromo aa3 en células crecidas en G/M+CN y etanol fue mayor que la encontrada para las mitocondrias de células crecidas en G/M (datos menores que los reportados por Devars, 1992), indicándonos con ello la participación del inhibidor en el aumento de la expresión de las citocromo oxidasas, de igual manera la fuente de carbono puede producir un aumento similar en la expresión de estos citocromos; presentándose un ligero incremento de la citocromo oxidasa por lo que se puede decir que no hay una diferencia significativa entre la oxidasa alterna y la citocromo oxidasa como fué encontrado por Devars y cols. (1992) quienes obtienen una relación entre el citocromo o/aa3 alrededor de 2.5 para las mitocondrias de células crecidas en G/M y de 2.4 para las células crecidas en peptona +acetato. Esto indica que ninguna de éstas dos condiciones es suficiente para inducir una sobreexpresión de la cadena alterna sobre la cadena clásica y también que la insensibilidad a CN o antimicina no está relacionada con la predominancia de una vía respiratoria específica, sin embargo la cantidad de oxidasa alterna es dependiente del medio de crecimiento o fuente de carbono (Devars y cols., 1992). Los valores tienden a ser mayores para la oxidasa alterna que para la

oxidasa de la vía clásica sin ser indicativos de una mayor actividad de alguna de estas vías.

Tabla 8 Δ de absorbancia de los valles (550-560nm; 560-575nm) y (585-604nm) de los citocromos b y aa3 respectivamente en mitocondrias de células crecidas en Etanol, G/M+CN y G/M. Los valores representan la media \pm error estándar en el número de experimentos que se indican. El experimento se realizó como se explica en la tabla 7. Los valores corresponden a los 8 min de burbujeo con CO. Se utilizaron de 2 a 4 mg de proteína por experimento.

Mitocondrias crecidas en medio	$\Delta\text{abs} \times 10^3$ 550-560	$\Delta\text{abs} \times 10^3$ 560-575 nm	$\Delta\text{abs} \times 10^3$ 585-604 nm	(n)
G/M+CN	$5.4 \pm 4 \times 10^{-4}$	$3.3 \pm 0.08 \times 10^{-5}$	$1.9 \pm 0.05 \times 10^{-5}$	(8)
Etanol	$4.7 \pm 6 \times 10^{-4}$	$2.7 \pm 0.075 \times 10^{-5}$	$1.5 \pm 0.01 \times 10^{-5}$	(6)
G/M	$4.1 \pm 5 \times 10^{-4}$	$2.5 \pm 0.09 \times 10^{-5}$	$1.3 \pm 0.02 \times 10^{-5}$	(5)

En la tabla 8 se observa que la Δ de absorbancia en las mitocondrias de células crecidas en G/M+CN es ligeramente mayor que la encontrada para las mitocondrias de etanol seguido de las mitocondrias de G/M. Pero realmente estos valores no difieren entre si de manera significativa.

Espectros de absorción oxidado - oxidado +CN

En la **figura 15** utilizando KCN como unico reductor de las oxidasas (inhibidor del citocromo oxidasa) se muestra un espectro representativo con valles muy pronunciados a los 418nm y a los 433nm correspondientes al citocromo de tipo o y al aa3 respectivamente. Además se notan dos valles uno a los 560nm correspondiente al citocromo b y otro valle a los 604nm correspondiente al citocromo aa3. Al igual que los espectros con CO, este experimento evidencia pero de manera inversa la presencia de los citocromos mencionados anteriormente. De esta misma manera se corroboró la existencia de la citocromo oxidasa en Rhodobacter spheroides (García-Horsman y cols., 1994).

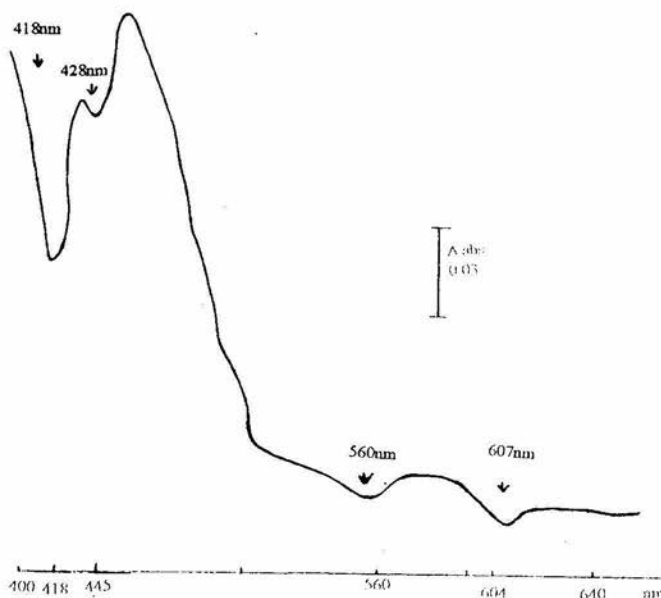
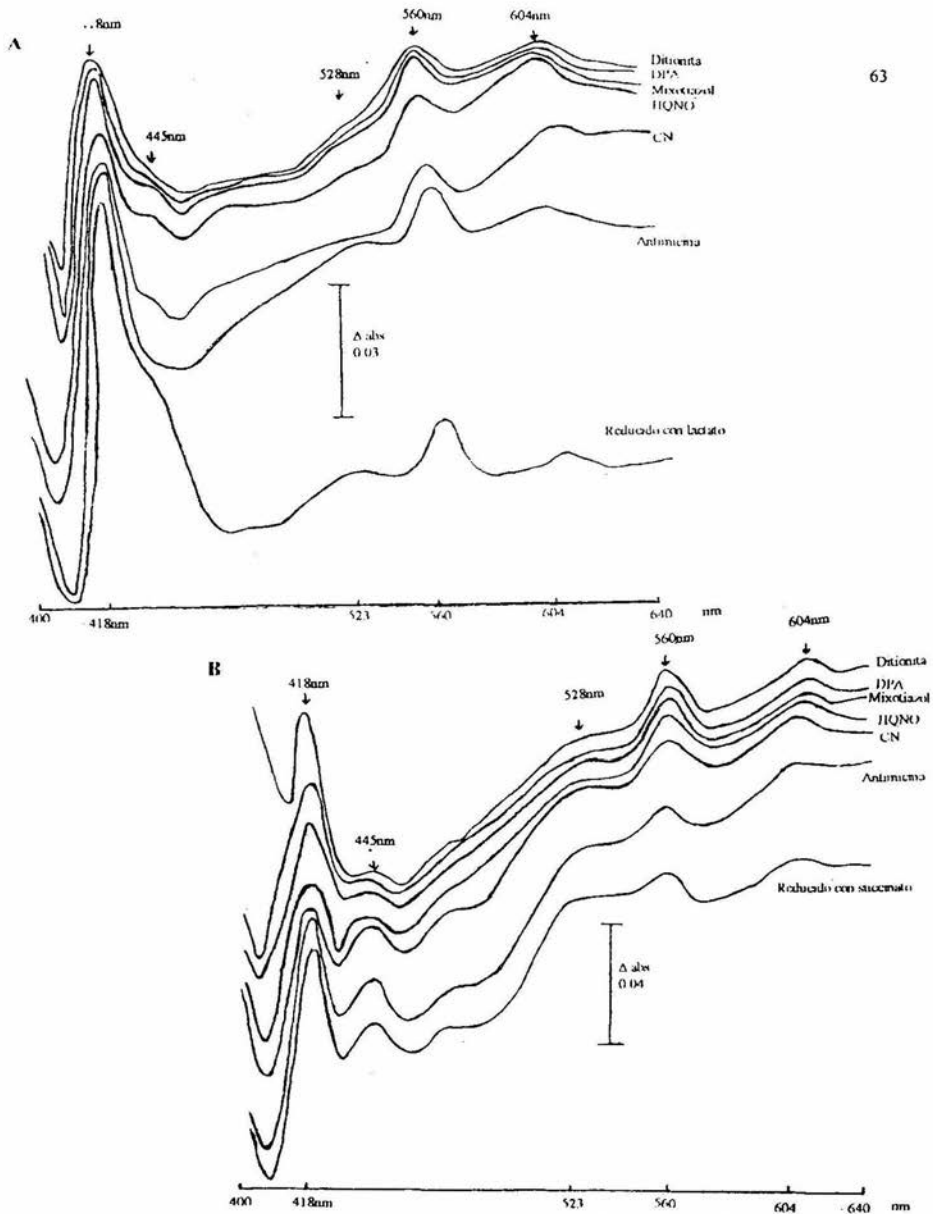


fig. 15 Espectro de absorción de mitocondrias de células crecidas en G/M+CN. Las mitocondrias (2mg/ml) fueron suspendidas en KME:Glicerol 1:1, después de agitar, a la celda de referencia se le agregó 0.10mM de KCN y se registró el espectro de absorción.

Espectros de absorción de las diferentes preparaciones mitocondriales en presencia de diferentes sustratos e inhibidores.

En la **figura 16** se aprecia una secuencia de adición de reductores a la muestra mitocondrial de células crecidas en G/M +CN. Después de agregar láctico como sustrato aparecen 2 picos y un hombro entre los 427 nm-430 nm según la preparación, este hombro es el que se considera para determinar la concentración de citocromo aa3 (428.5 nm). En este caso también existe interferencia por los carotenos (absorben luz entre los 350 y 500 nm) por lo que se sobreestimarían las concentraciones de este tipo de citocromos. Otro de los picos corresponde al citocromo b quien absorbe a los 560 nm y el último de los picos a 607 corresponde al citocromo de tipo aa3. Estos picos ya habían sido reportados por Sharples y Butow (1970) quienes los identificaron como citocromo b y aa3, también aparece un hombro a los 530 nm que es la zona alrededor de la cuál se presentan máximos de absorción para los citocromos del tipo b y c des las bandas β .



Figuras 16 y 17. Espectros diferenciales de células crecidas en G/M+CN. Se muestra la secuencia de reducción con lactato (A) o succinato (B), KCN, antimicina y ditionita. Las mitocondrias se incubaron (2 mg/ml) con el inhibidor durante 5 min en KME: glicerol 1:1, y se añadieron los sustratos e inhibidores sucesivamente donde se indica.

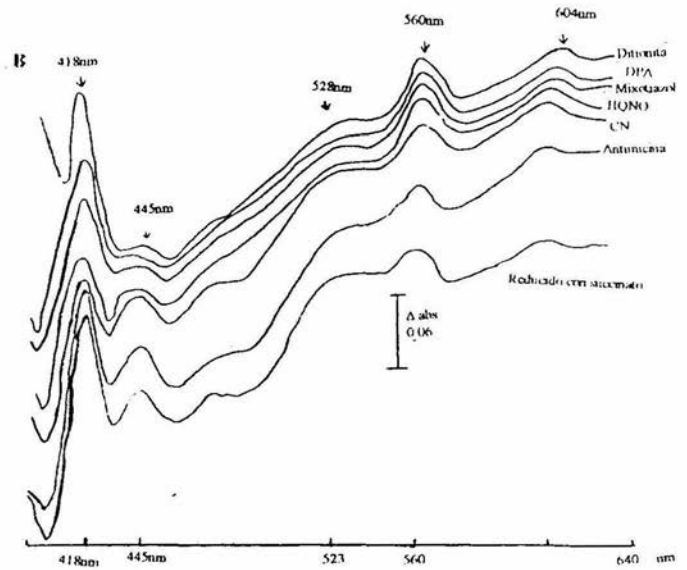
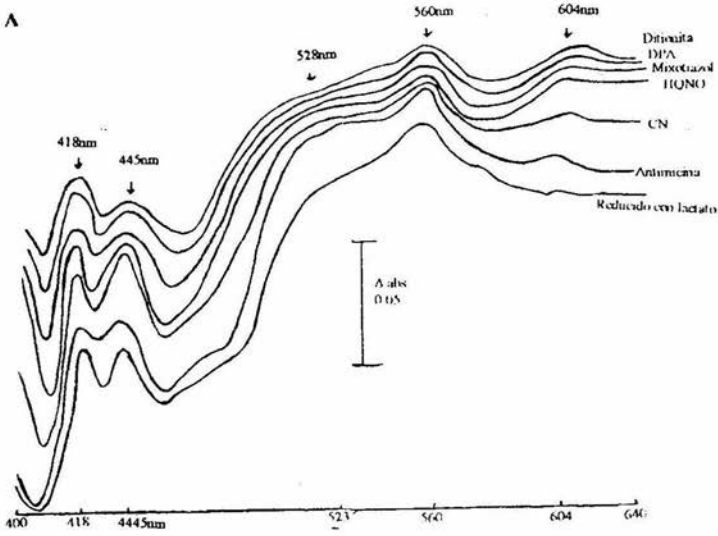
Cuando se agrega antimicina se incrementa la absorbancia a todas las longitudes de onda mencionadas, lo mismo ocurre cuando se agrega CN y ditionita en forma consecutiva o HQNO o mixotiazol. Cuando se adiciona DPA junto con antimicina y ditionita se observan los mismos picos a 428, 560 y 607 nm.

En el espectro de la **figura 17** se utilizó succinato como sustrato observándose 3 picos uno a los 418, otro a los 560 y otro a los 604 nm y otro más a los 445 que correspondería a un caroteno y un hombro a los 428 nm correspondiente al citocromo aa₃. Cuando se agregó antimicina los mismos picos aparecieron además del hombro a los 528 nm. Esto mismo ocurre cuando se adiciona KCN y ditionita de manera secuencial incrementándose los niveles de absorbancia al igual que en el caso de láctico como en el caso anterior, al agregar distintos inhibidores DPA, HQNO o mixotiazol, aparecen los mismos picos junto con un aumento en la absorbancia, con la diferencia de que en presencia de este sustrato todos los picos se definen mejor.

En la **figura 18 y 19** se utilizaron mitocondrias de células crecidas en etanol adicionándoles láctico y/o succinato como sustrato y diversos inhibidores de manera secuencial, una vez más se observaron picos a los 418 nm, 560nm y 604 nm y 445 nm además los hombros a los 428 nm y a los 528. Incrementándose también la absorbancia con la adición secuencial de antimicina, CN, HQNO, mixotiazol, DPA y ditionita.

En este caso los pigmentos carotenoides interfirieron en mayor medida en la medición, debido a que estos organismos al crecerlos en presencia de carbonato de calcio y etanol sintetizan niveles más elevados de carotenos incluso puede notarse a simple vista un color rojizo en la preparación, a diferencia de las células de G/M+CN que presentan una coloración amarillenta.

Debido a lo discutido anteriormente se puede decir que este método que utiliza varios sustratos e inhibidores para la detección de citocromos espectroscópicamente no es una buena aproximación para diferenciar la cantidad de oxidasas alternas y clásica a temperatura ambiente, ya que a pesar de donar electrones a diferentes niveles y ser inhibidos sólo ciertos complejos respiratorios, no puede obtenerse una reducción diferencial de los citocromos. Esto es en parte debido a que los inhibidores actúan como



Figuras 18 y 19. Espectros diferenciales de células crecidas en Etanol. Se muestra la secuencia de reducción en respuesta a lactato (A) o succinato (B) y KCN, Antimicina y ditionita. El experimento se realizó como en las figuras 14 y 15.

reductores para varios componentes de la cadena ya que además de actuar en el sitio blanco que se ha descrito para ellos producen una reducción consecutiva de los componentes que se encuentran antes en la cadena de transporte electrónico.

Tabla 9 Contenido relativo de citocromo b y citocromo aa3 en mitocondrias de células crecidas en Etanol y G/M+CN, determinado por espectros diferenciales. Las concentraciones fueron calculadas en base a los coeficientes de extinción molar reportados para bacterias (560-575 nm) $22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el citocromo b y (604-630 nm) $24 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, (428.5-445nm) $148 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el citocromo aa3 (García-Horsman y cols., 1994; Siedow y Moore, 1993). Los valores representan el promedio \pm error estandar del número de experimentos que se indican. Las mitocondrias se incubaron por 30 min a una concentración de 2mg/ml en KME:glicerol (1:1). Una de las celdas (experimental) se redujo con distintos sustratos y distintos inhibidores mientras que la otra celda (referencia) se mantenía oxidada con aire.

Mitocondrias crecidas en medio:	sustrato	pmol/mg (cit.b) (560-575nm)	pmol/mg (cit.aa3) (604-630nm)	pmol/mg (cit.aa3) (428.5-445nm)	n
G/M+CN	L-láctico	198 \pm 3.5	106 \pm 8	50 \pm 7	8
Etanol	L-láctico	178 \pm 14	102 \pm 7	47 \pm 6	10

Las concentraciones de citocromos encontradas en estos espectros se muestran en la tabla 9, en donde se observa que la cantidad de citocromo b y citocromo aa3 son similares en las células crecidas en G/M+CN y las células crecidas en etanol.

En los experimentos en los que se utilizó succinato como sustrato, el tiempo de preincubación fué más largo ya que a tiempos más cortos no es posible tener un espectro con máximos de absorción bien definidos. Es probable que en presencia de este sustrato se alcance la anoxia más rápidamente que en presencia de láctico. Por lo que obtendríamos completamente reducidos a los citocromos en estas condiciones, definiendose mejor sus picos característicos. No se encontró diferencia significativa en la cantidad de citocromos cuando se utiliza lactato o succinato como reductores.

Los valores encontrados para el citocromo b y el aa3 son muy similares a los reportados por Buetow y Buchanan (1965) además no se encontró una diferencia en citocromo aa3 cuando se reduce la muestra con CO o cuando se reduce la muestra con distintos sustratos e inhibidores.

TMPD oxidasa

Con el objetivo de identificar cuantas oxidasas participan en el transporte electrónico en *Euglena* así como determinar su sensibilidad a inhibidores como el CN se evaluó el consumo de oxígeno en presencia de TMPD. En las **figuras 21 y 22** se muestran las gráficas correspondientes a la inhibición proporcionada por diferentes concentraciones de KCN en mitocondrias de células crecidas en G/M+CN o Etanol. En las **figuras 23 y 24** se muestran las gráficas correspondientes a la inhibición proporcionada por diferentes concentraciones de DPA en mitocondrias de células crecidas en G/M+CN o Etanol. La K_m para TMPD fue calculada de una gráfica de concentración de sustrato contra velocidad de respiración (**Fig. 25 y 26**). Estos ensayos fueron hechos tanto en mitocondrias de células crecidas en un medio de G/M+CN o en un medio con Etanol. La **Figura 20** muestra un trazo representativo de la TMPD oxidasa.

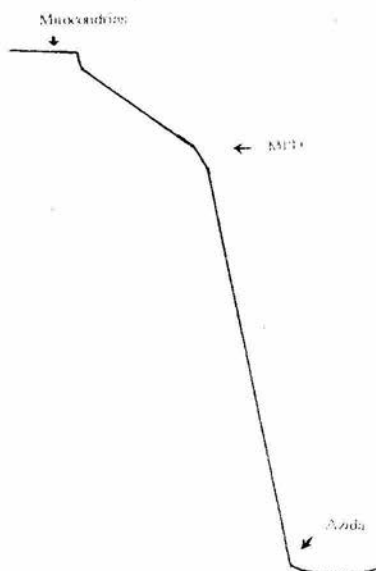


Figura 20. Trazo representativo del consumo de oxígeno de mitocondrias de *Euglena gracilis*. Se agregaron de 3 a 5 mg de proteína al medio KME en presencia 7 mM de ascorbato, después de 5 min de preincubación, se agregaron: 1 mM de TMPD y 20 mM de azida de sodio.

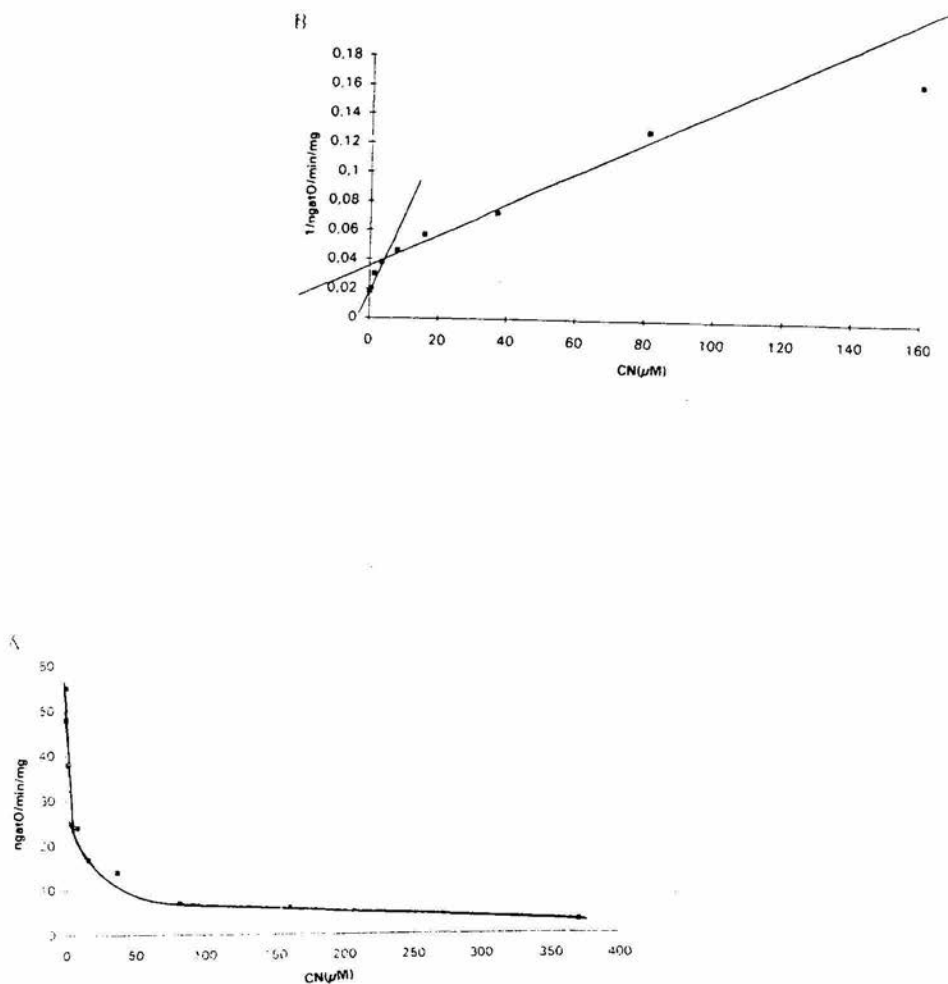


Figura 21. Inhibición por KCN de la respiración de mitocondrias de células crecidas en G/M+CN (A) y la representación de Dixon (B). Las mitocondrias se incubaron durante 5 min en el medio SHE y en presencia de antimicina 0.01 mM, ascorbato 7 mM, así como las concentraciones indicadas de inhibidor. Después de los 5 min se agregó 1 mM de TMPD, y después de registrar la velocidad de respiración se agregó 20 mM de azida de sodio.

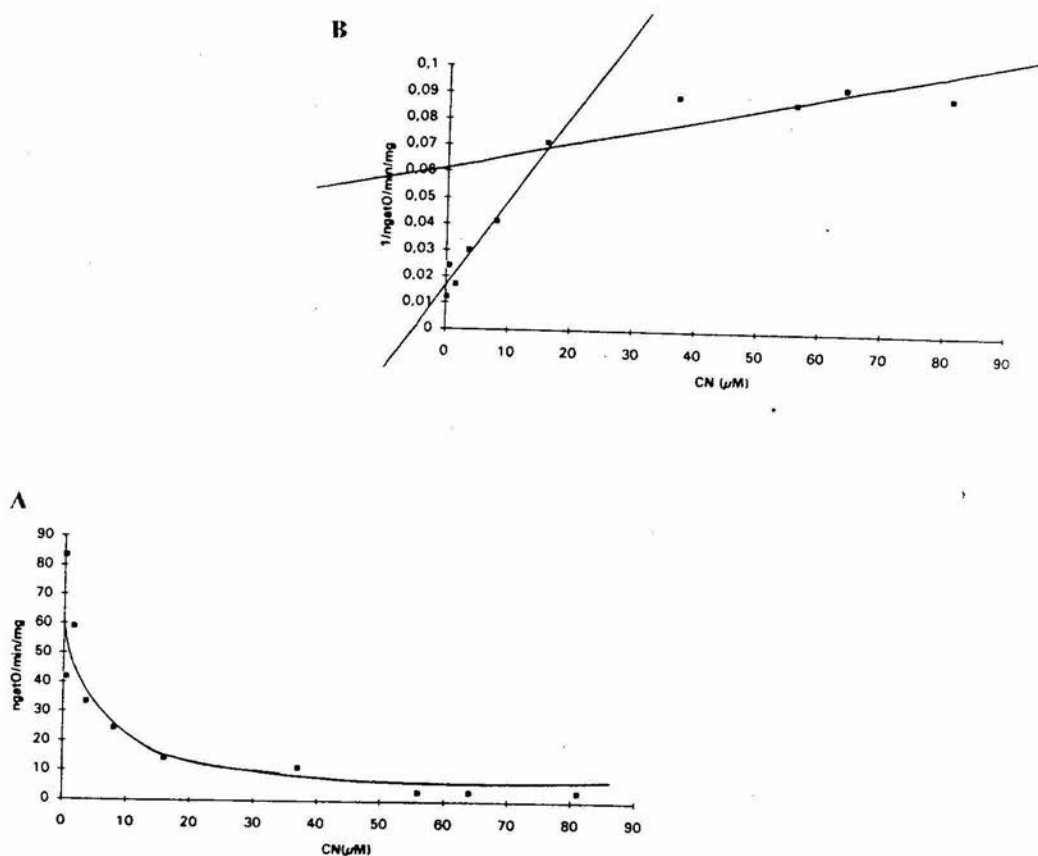


Fig. 22. Inhibición por CN de la velocidad de respiración estimulada por TMPD. Se utilizaron mitocondrias de células crecidas en Etanol(A) y la representación de Dixon (B). El ensayo de consumo de oxígeno se realizó como se indica en la figura 21 en presencia de las concentraciones indicadas de CN.

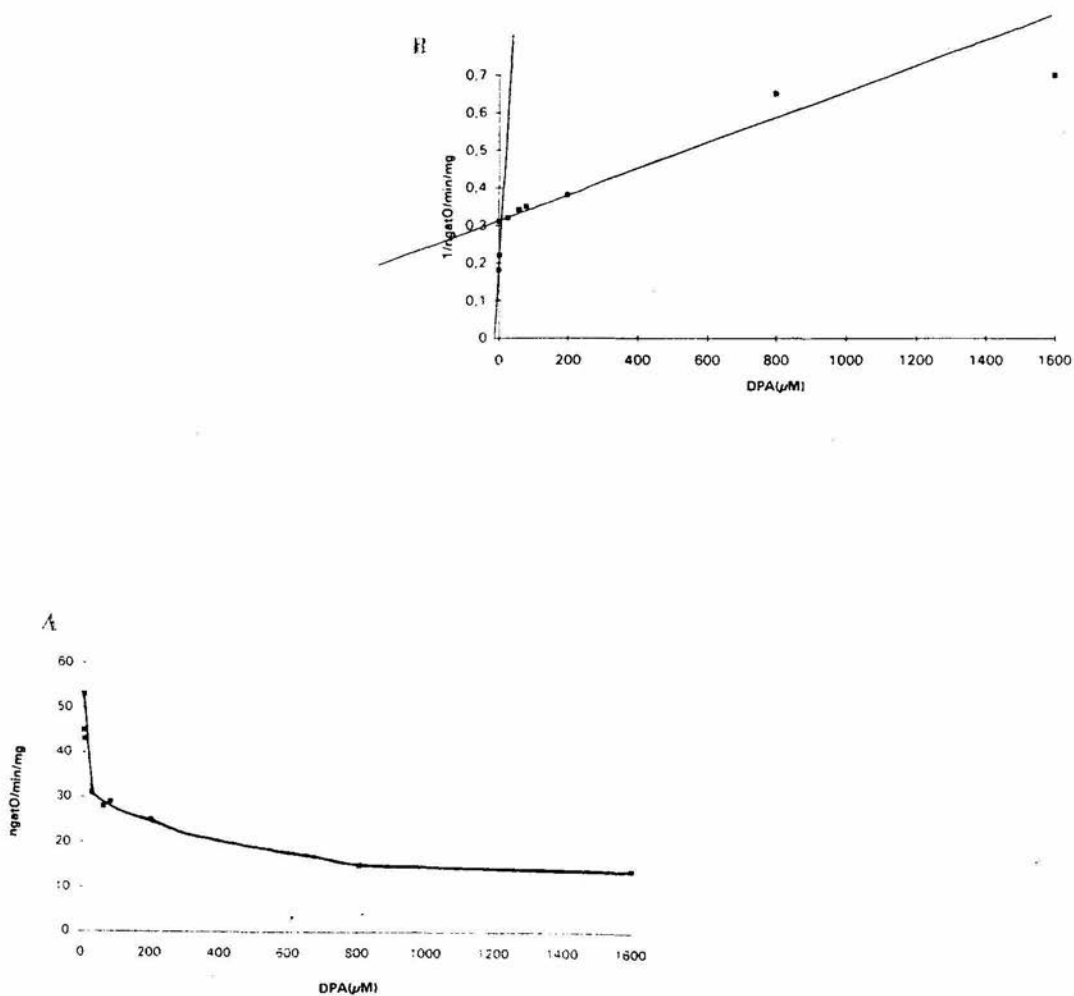


Fig 23. Inhibición por DPA de la velocidad de respiración estimulada por TMPD. Se utilizaron mitocondrias de células crecidas en G/M+CN (A) y la representación de Dixon (B). El ensayo de consumo de oxígeno se realizó como se indica en la figura 21 en presencia de las concentraciones indicadas de DPA.

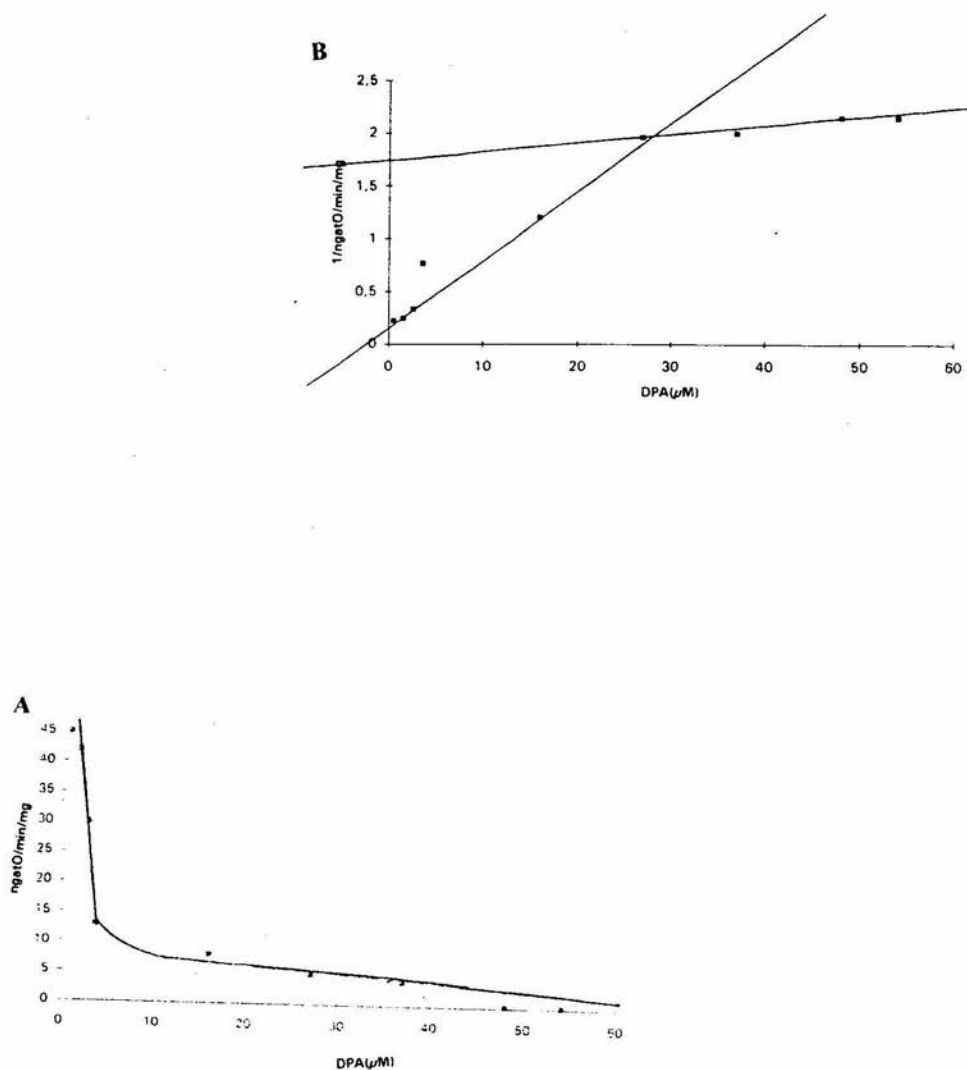


Figura 24.- Inhibición por DPA de la velocidad de respiración estimulada por TMPD. Se utilizaron mitocondrias de células crecidas en Etanol(A) y la representación de Dixon (B). El ensayo de consumo de oxígeno se realizó como se indica en la figura 21 en presencia de las concentraciones indicadas de DPA.

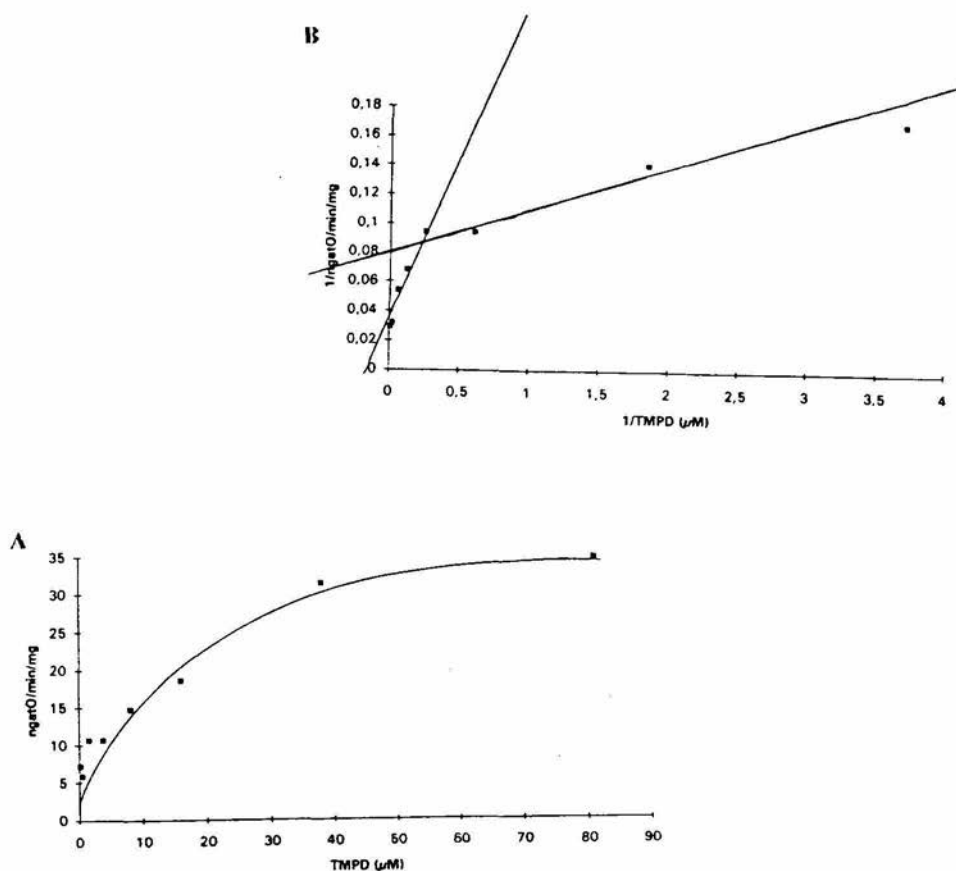


Figura 25.-Dependencia de la velocidad de respiración en la concentración de TMPD. (A) mitocondrias de células crecidas en G/M+CN y (B) la representación de Lineweaver y Burke. Las mitocondrias se incubaron durante 5 min en el medio SHE y en presencia de antimicina 0.01 mM, ascorbato 7mM mM, al termino de la incubación se añadió la cantidad indicada de TMPD y después de registrar la velocidad de respiración se agregó 20 mM de Azida de sodio.

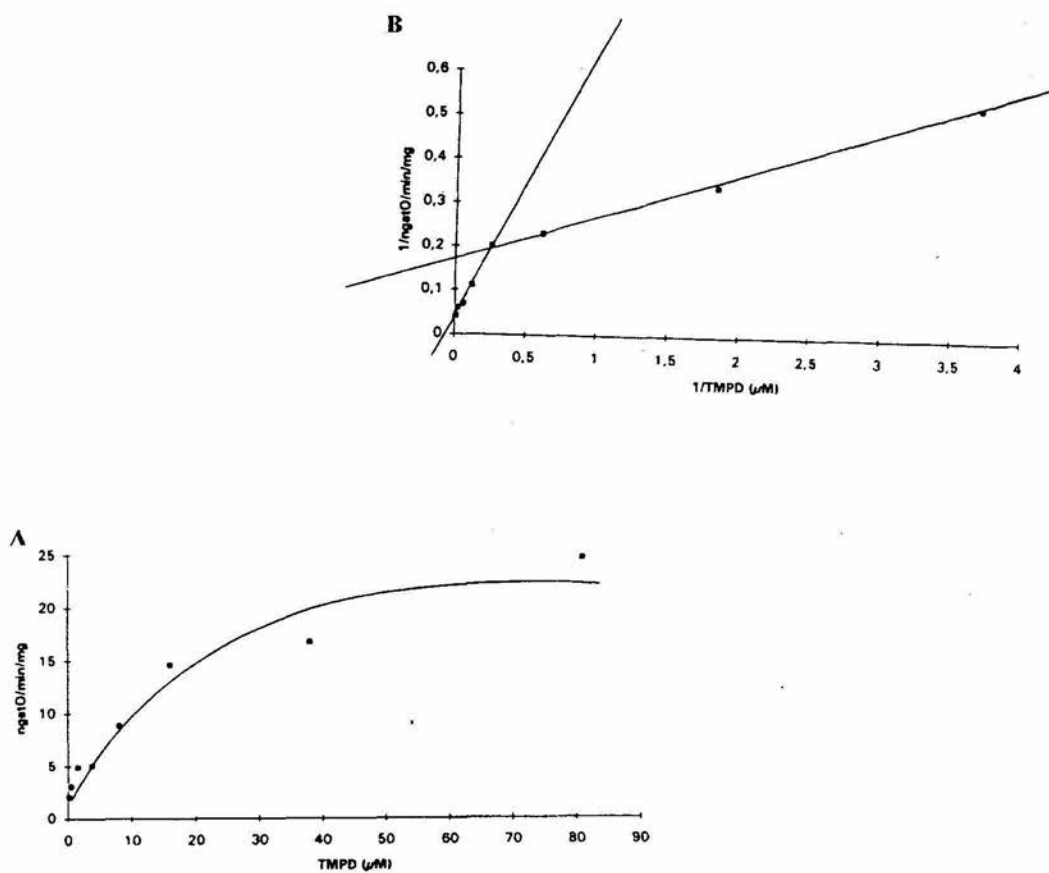


Figura 26.-Dependencia de la velocidad de respiración en la concentración de TMPD. (A) mitocondrias de células crecidas en Etanol y (B) la representación de Lineweaver y Burke. Las mitocondrias se les trato de la misma manera que en la figura 25.

Las **figuras 21 y 22** usando TMPD como sustrato revelan dos pendientes que son indicativas de la cantidad de oxidasas presentes en este organismo, debido a que una de las pendientes corresponde a una oxidasa de alta afinidad y otra a una oxidasa de baja afinidad es decir que una oxidasa requiere de una concentración muy alta de CN para inhibirse y otra requiere de concentraciones bajas para inhibirse. Esto mismo puede verse en las **figuras 23 y 24** usando las mismas concentraciones de DPA (Inhibidor de cadena alterna en plantas). En donde se presentan dos pendientes (una de alta y otra de baja afinidad) que indicarían la presencia de dos oxidasas alternas. Pero el DPA es un inhibidor inespecífico el cual puede afectar otros sitios incluso la oxidasa clásica, provocando con ello la presencia de dos pendientes. Como estos ensayos son una medida indirecta de la cantidad de oxidasas presentes es posible que este organismo contenga más de una oxidasa alterna al igual que P. denitrificans, R. spheroides y R. capsulatus.

La cinética obtenida al variar la concentración de TMPD demuestra que existe una similitud en la actividad de TMPD oxidasa de ambas preparaciones ya que ambas preparaciones presentan una curva hiperbólica sugiriéndonos que no es una enzima cooperativa o alostérica. Al ver el inverso de la gráfica puede compararse que solo existe una pendiente, es decir una sola enzima TMPD oxidasa pero en las gráficas obtenidas para ambos tipos de células pueden observarse puntos dispersos que pudieran definir otra pendiente de tal forma que se podría pensar en la existencia de otra oxidasa aparte de la clásica lo cual no resulta extraño debido a la presencia de dos o más oxidasas en bacterias gramnegativas como las mencionadas anteriormente.

Tabla 10 Constantes de inhibición y de sustrato (K_i y K_m) para mitocondrias de células crecidas en CN o Etanol. Las mitocondrias se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de inhibidor o sustrato y las constantes fueron calculadas de una gráfica de Dixon o Lineweaver y Burke. Los valores representan el promedio expresado en μM \pm error estándar del número de experimentos que se indica entre paréntesis. Las mitocondrias se incubaron (1mg/ml) por 5 min en el medio SHE, ascorbato (7mM) y antimicina 0.01mM después de lo cual se agregó TMPD 1mM y esta respiración fue inhibida con azida 1mM entre 80 y 90%.

Mitocondrias de células crecidas en	G/M+CN		Etanol	
Inhibidor	K_{i1}	K_{i2}	K_{i1}	K_{i2}
CN (μM)	27 \pm 4.4 (4)	245 \pm 8 (4)	16 \pm 5 (4)	129 \pm 7.6 (4)
DPA (μM)	64 (1)	360 (1)	37 (1)	216 (1)
		Km (TMPD mM)		
TMPD (mM)	1.3 (1)		2.7 (1)	
		Vmax (ngatmO/min/mg)		
	35		23	

A partir de la cinética de inhibición se calcularon los valores de la constante de inhibición (K_i). Estos datos se muestran en la tabla 10. Encontrándose dos K_i que representan una menor insensibilidad al CN cuando las células son crecidas en presencia de este inhibidor. Los datos encontrados son mayores que los obtenidos por Devars y Cols. (1992) en mitocondrias crecidas en peptona+ acetato y en G/M y también mayores que los obtenidos por Uribe (1992) en células crecidas en G/M. Con respecto al valor obtenido al crecer las células en presencia de Etanol las cuales mostraron una sensibilidad (dos K_i) un poco mayor para este inhibidor. Esto nos habla de que la actividad de la cadena alterna presente en este organismo es inducida por un inhibidor o por la fuente de carbono como lo sugirieron Sharpless y Butow (1970).

Al utilizar diluciones con DPA que es inhibidor de cadena alterna se obtiene también dos K_i . En las células crecidas en G/M+CN la sensibilidad al inhibidor es menor que en la encontrada para células crecidas en Etanol. Esto sugiere, que la presencia de CN en el medio de cultivo hace que se produzcan más oxidasas (espectros diferenciales con CO) provocando con ello una insensibilidad parcial a inhibidores de cadena clásica y alterna

viendose reflejado en la tabla 4 aunque no hubo una insensibilidad como la obtenida por Sharpless y Butow (1970). En células crecidas en un medio con etanol, se produjo un incremento en las oxidasas y en la insensibilidad parcial por la acción de los inhibidores (HQNO, antimicina y mixotiazol) siendo también éste (etanol) un buen agente para el incremento de la cadena alterna y clásica.

Se llevó a cabo una evaluación de la dependencia de la velocidad de respiración con respecto a la concentración de TMPD, hallandose una Km más baja para las células crecidas en G/M+CN (ver tabla 10) y una más alta para las células crecidas en presencia de etanol. Esto nos indica que las oxidasas de las células crecidas en G/M+CN son más afines por su sustrato que las de células crecidas en etanol.

Con el uso de concentraciones excesivamente altas de CN y DPA (por arriba de los 160 μ M) no se incrementa aún más la inhibición, y esto es probablemente debido a que a estas concentraciones la integridad de la mitocondria se ve afectada presentandose incluso un incremento en el consumo de oxígeno debido a un efecto desacoplante.

Cromatografía líquida de alta presión de los extractos.

Para saber el tipo de oxidasas que forman parte de esta cadena se realizó HPLC en donde se detectan los grupos hemos constituyentes de estas oxidasas. Se utilizaron como referencia muestras de bacterias como *E.coli.*, *Paracoccus denitrificans.*, así como también mitocondrias de mamífero., y de *Euglena gracilis* crecidas en los medios de Glutamato/Malato, Glutamato/Malato+CN y Etanol (Fig.27 y 28).

La **figura 27** muestra los picos de absorción obtenidos para las diferentes muestras. En las muestras de *E.coli* se detectaron picos de absorción a los 6.43 min y a los 14.44 min característicos de los hemos de tipo b y o respectivamente. En la preparación de *P.denitrificans* se detectaron hemos del tipo b y a (6.37min y 12.57min), mientras que en las muestras de mamífero se detectaron solamente los hemos de tipo b y a. Por otro lado, *Euglena gracilis* crecida en presencia de Glutamato/Malato, Glutamato/Malato+CN o Etanol presentó los hemos del tipo b y a (6.40 min y 12.80 min). Esto último sugiere que las mitocondrias de *Euglena gracilis*

tienen una gran similitud con las células de *Paracoccus denitrificans* y no con *E.coli* ya que no presentan el hemo de tipo O.

En todos los casos el grupo hemo c no apareció debido a que está unido covalentemente a la apoproteína. Hay que recordar que este hemo es el más externo y se encuentra en el espacio intermembranal (Rawn, 1989). Por esa peculiaridad este grupo hemo es de muy fácil separación en presencia de solventes orgánicos, por ello mismo este grupo hemo es el más estudiado hasta la fecha, y es el más conservado en la naturaleza (Rawn, 1989; Buse y cols., 1989). La metodología de la preparación de las muestras para ser leídas en el cromatograma, utiliza solventes orgánicos como la acetona con el fin de extraer todos los pigmentos por una columna de Sephadex y con ello evitar la interferencia de estos pigmentos en la lectura de los hemos.

Cuando se corren conjuntamente muestras de *Euglena gracilis* crecidas en Etanol y *Paracoccus denitrificans* pueden apreciarse tanto los hemos del tipo b, como del a pero no del tipo o. Si se hace lo mismo con extractos de mitocondrias de *Euglena gracilis* crecidas en Etanol y células de *E.coli* se pueden observar los hemos del tipo b, a y o. Estos experimentos corroboran las observaciones anteriores. (fig. 27) en donde *Euglena gracilis* carece del hemo tipo o.

El hecho de que únicamente se encontraran hemo del tipo b y aa3 en *Euglena gracilis* y que estos hemos estén en cantidades mayores cuando las células se crecen en presencia de un inhibidor (CN) seguidas del tipo de sustrato como etanol y G/M muestra que el incremento sí depende de la presencia del inhibidor y del sustrato como lo sugiere Sharples y Butow (1972) pero que ninguno de éstos es factor condicional para la sobreexpresión diferencial de una oxidasa alterna debido a que tanto el hemo de vía alterna como el de vía clásica se incrementan de igual manera sin predominar una con respecto a la otra vía y esto es corroborado con las cantidades obtenidas de los espectros (Ditionita vs Ditioninta en presencia de CO). La presencia de estos hemos en *Euglena gracilis* sugiere una relación más estrecha con *Paracoccus denitrificans* y Rhodospirillacea que son bacterias gram negativas (Ambler y cols., 1991; Raitio y Wikstrom, 1994) más que una relación con *Escherichia coli* debido a que *Euglena gracilis* no presenta un hemo de tipo o como lo había sugerido Devars y cols. (1992) y Uribe y Moreno -Sánchez (1992)

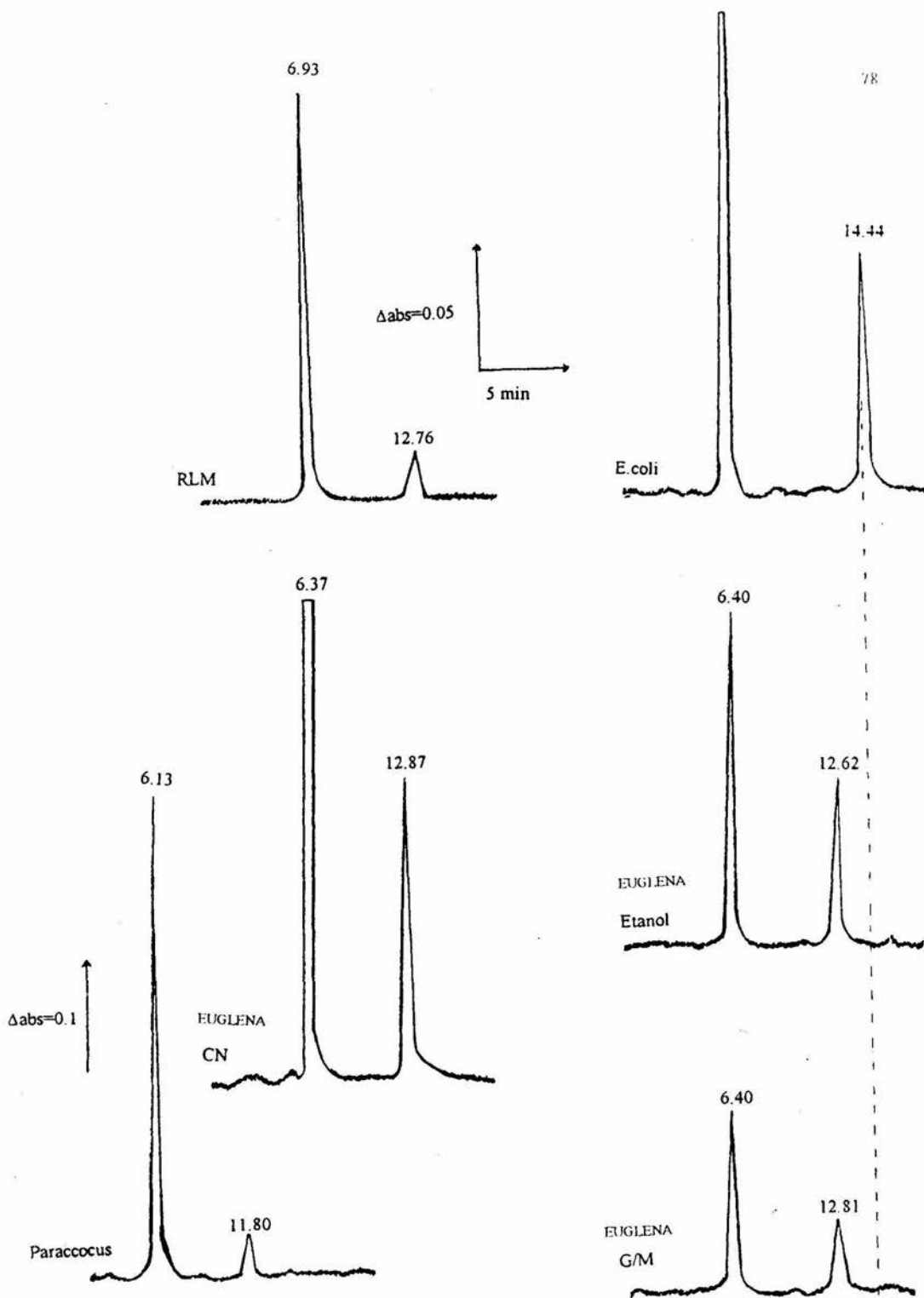


Figura 27 Cromatograma obtenido con distintas muestras. Las muestras fueron procesadas como se indica en la metodología y se detectaron los picos de absorción a diferentes tiempos de elución (RLM mitocondrias de hígado de rata).

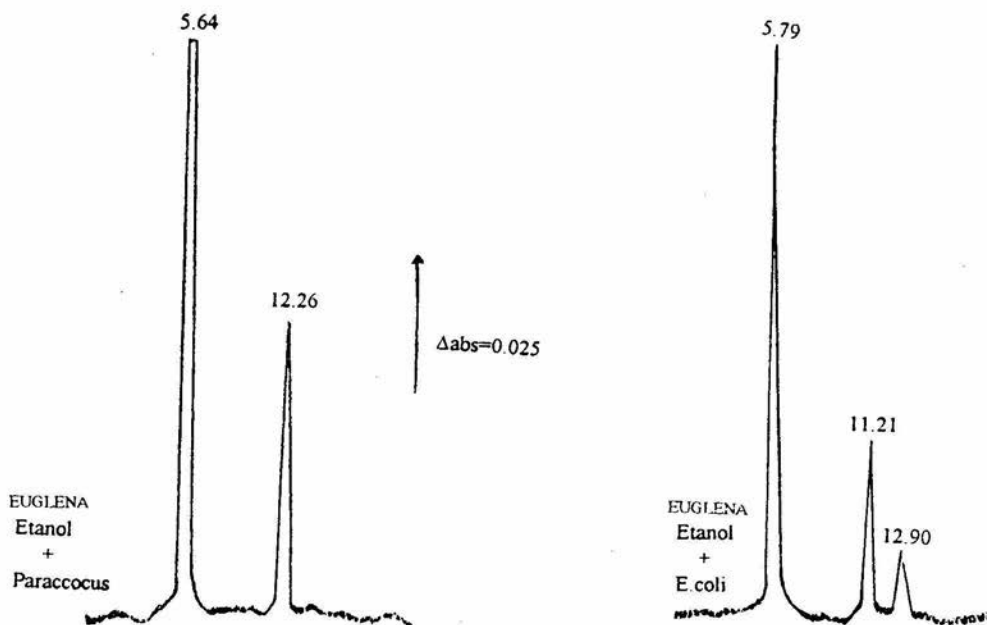


Fig. 28. Cromatograma obtenido con muestras de *Euglena gracilis* crecida en presencia de Etanol, *Paraccocus denitrificans* y *Escherichia coli*. Las muestras se procesaron como se indica en la figura 16 excepto que se utilizaron dos muestras a la vez.

Actividad de quinol oxidasa

Se estudió el consumo de oxígeno en presencia de varios tipos de quinonas en mitocondrias de células crecidas en G/M +CN sin embargo, solo la quinona 1 fue capaz de estimular el consumo de O a una velocidad de 91 ngatO/min/mg en presencia de antimicina (5 mM) y de DTT. En *Paracoccus denitrificans* (Oliver-Mattias y cols., 1994) reportan una actividad específica para quinol oxidasa ba3 purificada de 40 unidades por mg utilizando un método fotométrico y ubiquinol 1 como sustrato. Lo que significa una evidencia de cadena alterna en estas mitocondrias y que la oxidasa que forma parte de esta vía alterna es una quinol oxidasa.

La quinol oxidasa más caracterizada hasta la fecha es la que se encuentra en células de *Escherichia coli*. Este organismo oxida también ubiquinol 1 en presencia de inhibidores de cadena clásica (Chepuri y cols., 1990). Lo que no es sorprendente debido a la presencia de una cadena de vía alterna (bo) y también a que este ubiquinol es oxidado por la mayoría de los organismos in situ. *Arum maculatum* oxida ubiquinol 1 a 390 nmol O/min/mig (Rich, 1978; Ragan, 1978).

En *Euglena gracilis* a pesar de que se oxida Q1 a altas velocidades se han encontrado Q9 y Q8 en mayor cantidad y probablemente estas sean las quinonas que se utilicen como donadores de electrones durante el crecimiento de este organismo (Threffal y Goodwin, 1964; Pwols y Hemming, 1966).

Por lo expuesto anteriormente proponemos que existe una gran similitud entre las oxidasas alternas de *Euglena gracilis* y *Paracoccus denitrificans* la cual es del tipo ba3 y reacciona con CO, CN y azida disociándose el pico a los 420-428 nm mismo que se presenta en mitocondrias de *Euglena gracilis*, la diferencia radica en que en este organismo el alto contenido de carotenos interfiere con la definición de este pico. Una vez que se purifique la quinol oxidasa de *Euglena gracilis* el tipo de hemo podría evaluarse por el método de piridin hemocromógeno como fue evaluado por Williams (1964) para los hemos del complejo IV en hígado de rata.

DISCUSION

La presencia de una vía alterna en este protista (*Euglena gracilis*) fue evidenciada en 1970 por Sharpless y Butow quienes encontraron que este organismo es insensible a inhibidores como antimicina y KCN. Además de proponer que la cadena alterna puede ser inducida por la presencia de un inhibidor en el medio de cultivo o por la fuente de carbono utilizada. Nosotros encontramos evidencia que apoya esta idea ya que después de hacer una caracterización de la oxidasa alterna (como su actividad y niveles de expresión); encontramos que los medios G/M+CN o Etanol inducen un incremento moderado en cadena alterna con respecto a las de G/M, pero no se encontró una insensibilidad a inhibidores de cadena clásica tan notable como la que obtuvieron Sharpless y Butow quienes utilizaron dos medios uno que contenía succinato+antimicina y otro que contenía acetato.

Además de observar en este trabajo el incremento de la oxidasa alterna, se observó, un incremento en la oxidasa clásica no variando significativamente la relación de la oxidasa o/aa3. Lo cual había sido reportado por Devars y cols. (1992) quienes evaluaron esta relación en células crecidas en G/M y peptona +acetato. Esto es indicativo de que la actividad de ambas vías deben compensar la producción de energía en condiciones de stres, es decir, que el incremento en la cantidad de la oxidasa alterna no es suficiente para el requerimiento celular, por lo que la oxidasa clásica tiende a compensar este deficit; incrementandose de igual manera. Por otro lado la cantidad de oxidasa no refleja necesariamente una mayor actividad de la vía, ya que los porcentajes encontrados para la inhibición con DPA y de cadena clásica no variaron en proporción al aumento en la cantidad de oxidasa alterna. Se encontró también que al utilizar TMPD como sustrato, existe una mayor insensibilidad tanto a KCN como a DPA con respecto a los valores obtenidos por Devars y cols. (1992) y Uribe (1992) y al igual que estos autores las gráficas de inhibición presentan dos pendientes sugiriendo que estos inhibidores afectan tanto a la vía clásica como a la alterna. La afinidad encontrada para TMPD (Km) es muy similar para ambos tipos de células y parece ser que existen al menos dos tipos de oxidasa (TMPD oxidasa) como ocurre en *Paracoccus denitrifans* y *Rhodobacter spheroides* y *Rhodobacter capsulatus* y el resto de las bacterias gram-negativas.

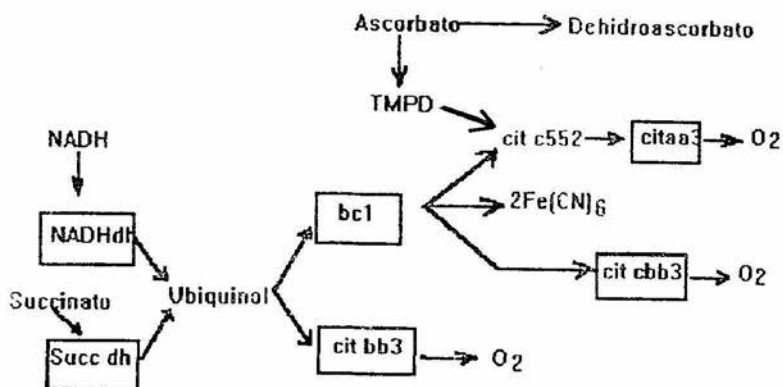


Figura 28. Componentes del transporte de electrones en *Paracoccus denitrificans*. Tomado de Raitio (1994).

En cuanto a la naturaleza de la oxidasa alterna se encontró evidencia de que este es una quinol oxidasa ya que estas mitocondrias son capaces de oxidar quinona-1 en presencia de antimicina.

Los ensayos de HPLC descartan la idea de la presencia de un citocromo bo en *Euglena gracilis* como había sugerido Devars y cols., (1992). En este trabajo se obtuvo evidencia para sugerir que la oxidasa alterna pertenece al tipo bb3 por la presencia de hemo tipo b revelada en este ensayo, pero es más probablemente que sea del tipo ba3 ya que, se detectó la presencia de hemo tipo aa3 junto con el hemo del tipo b. Lo anterior es apoyado por los trabajos de de Guier y cols.(1994) y de Oliver-Matthias y cols. (1994) quienes encontraron una oxidasa alterna del tipo ba3 en *Paracoccus denitrificans*, la cual reacciona con CO y presenta picos de absorción que se desplazan a través del espectro y que corresponden a los encontrados por nosotros en *Euglena gracilis*. Además, los ensayos de HPLC realizados con muestras de *Paracoccus denitrificans*, revelaron la presencia de hemos del tipo b y del tipo aa3. Esta oxidasa fue purificada presentando máximos de absorción a 560nm y a 607 nm los cuales son detectados en nuestras preparaciones.

Por lo anteriormente expuesto se propone que existe una relación evolutiva muy estrecha entre *Euglena gracilis* y las bacterias gram-negativas en especial *P. denitrificans*.

Debido a la gran similitud entre las mitocondrias de *Euglena gracilis* y este tipo de bacterias Gram-negativas; es posible que en algún momento de la evolución relacionado con el surgimiento de células eucariotes este tipo de bacterias hayan establecido relaciones simbióticas con células del tipo de *Euglena gracilis* que forman parte del grupo de eucariotes más primitivos.

CONCLUSIONES

El incremento en la vía alterna es dado por la fuente de carbono o por la presencia de un inhibidor en el medio, solo que este incremento es acompañado por un aumento similar en la oxidasa de la vía clásica tanto con respecto a la cantidad de citocromos detectados como con respecto a la actividad de consumo de oxígeno.

El tipo de hemo encontrado en mitocondrias de *Euglena gracilis* no es del tipo o, sino que es del tipo b similar al que se encuentra en *Paracoccus denitrificans*, lo que permite establecer una posible relación filogenética entre estos dos organismos, i.e. entre *Paracoccus* y Euglenophytos.

La presencia de dos pendientes en los ensayos de TMPD oxidasas en este organismo, en Etanol o G/M+CN demuestra que existen dos tipos de oxidasas (clásica y alterna) en estas mitocondrias.

La adición del CN en los medios de cultivo no es capaz de hacer a las mitocondrias totalmente insensibles a inhibidores como la antimicina, HQNO y otros. Por lo que este organismo sigue siendo parcialmente insensible a estos inhibidores, significando que la actividad de la o las oxidasas alternas no se ve incrementada en estas condiciones.

PERSPECTIVAS

Una manera de entender el porqué de la existencia de una oxidasa alterna en *Euglena gracilis* es estudiando las condiciones bajo las cuales la vía alterna es inducida o expresada, así como su participación en el transporte electrónico llevándonos a establecer relaciones evolutivas con otros organismos.

Se ha observado que en bacterias, la anoxia es una condición favorable para la aparición de oxidasas alternas, tales como el citocromo bo o el citocromo bd en *Escherichia coli*. Entonces este mismo parámetro podría utilizarse para la expresión de una oxidasa alterna que no haya sido medida por no ser activa en otras condiciones, o bien para evaluar la cantidad de oxidasa alterna presente en este organismo (*Euglena gracilis*)

Como se sabe que muchas de las oxidasas alternas en bacterias y en plantas son quinol oxidasa, sería interesante demostrar que una oxidasa alterna de *Euglena gracilis* pertenezca a este grupo de oxidasas, esto puede evaluarse realizando curvas de afinidad usando quinona como sustrato e inhibidores de esta enzima.

Además faltaría realizar espectros a temperatura de nitrógeno líquido con el fin de obtener una mejor resolución de la oxidación o reducción de los citocromos presentes en el transporte de electrones cuando este organismo es crecido en presencia de CN o Etanol.

Hacer espectros de piridin hemocromogeno para dilucidar los hemos que participan en este transporte y para el tipo de oxidasas presentes en este organismo.

Con la obtención de cepas en la que se lesione el DNA que codifique para la síntesis de la oxidasa clásica y quede únicamente el DNA que codifica para la quinol oxidasa se podrán hacer ensayos de respiración y/o síntesis de ATP, espectrofotometría, así como estudios cinéticos en presencia de inhibidores, en los que se encuentre involucrada únicamente la quinol oxidasa.

Por último, faltaría aislar la o las citocromo oxidasas (alternas) evaluando el bombeo de protones, la síntesis de ATP y de la secuencia de aminoácidos que constituyen a estas hemo proteínas y evaluar algún parentesco filogenético con alguna bacteria (*Paracoccus denitrificans*) o con alguna planta llevándonos a ubicar a este organismo en un Reino.

APENDICE I

ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
AMP	foafato de adenosina
CCCP	(m-clorofenilhidrazona carbonil cianuro)
CN	Cianuro
CO	Monoxido de carbono
DPA	Difenilamina
DTT	Ditiotreitol
DTNB	(5-5' ditiobis (ácido 2-nitobenzoico)
EGTA	Etilen glicol tetra acétato
FAD	Flavin adenin dinucleotido
FADH	Flavin adenin dinucleotido reducido
FCCP	(Carbonil cianuro 4-trifluorometoxifenilhidrazona)
GABA	Acidogama amino butírico
G/M	Glutamato/Malato
G/M+CN	Glutamato/Malato+Cianuro
GMP	Fosfato de guanina
HEPES	Acido N-2-hidroxietyl peracina-N'2-etanolsulfonico.
HPLC	Cromatografia líquida de alta presion
HQNO	Heptylhidroxiquinoline-N-oxide
IMP	Fosfato de inosina
KGDH	Cetoglutarato deshidrogenasa
KCN	Cianuro de Potasio.

KME	Cloruro de potasio(120mM), MOPS (10mM) y EGTA (1mM)
MOPS	acido3- (N-morfolina) propanolsulfonico
NADH	Nicotin amide dinucleotido reducido
NAD	Nicotin amide denucleotido
NADPH	Fosfato de nicotin amide dinucleotido
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PDHOR	Piruvato deshidrogenasa /NADP oxidoreductasa
P:O	Relación fosforo/oxígeno
SHAM	(Acido-2-sali)cilhidroxamico
SHE	Sacarosa (150mM), HEPES (25mM) y EGTA (1mM)
SHEA	Sacarosa (150mM), HEPES (25mM), EGTA (1mM) y 0.5% de albúmina
TMPD	Tetrametil p-fenilendiamina
TPP	Pirofosfato de tiamina

APENDICE II

Medio de Glutamato+Malato:

Elemento	Concentración final (mg) en 1litro de medio.
----------	--

CaCO ₃	0.02
-------------------	------

Fuente de carbono:

ácido l-Glutamico	0.5
-------------------	-----

ácido dl-Malico	0.2
-----------------	-----

Minerales:

MgSO ₄	0.05
-------------------	------

(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.02
--	------

KH ₂ PO ₄	0.08
---------------------------------	------

ZnSO ₄	0.009
-------------------	-------

MnSO ₄	0.008
-------------------	-------

Na ₂ MoO ₄	0.002
----------------------------------	-------

CoCL ₂	0.00016
-------------------	---------

CuSO ₄	0.00039
-------------------	---------

H ₃ BO ₄	0.00028
--------------------------------	---------

NaI	0.000012
-----	----------

FeCl ₃	0.0005
-------------------	--------

Vitaminas:

Disulfuro de Tiamina (B1)	0.010
---------------------------	-------

Clorhidrato de Piridoxina (B6)	0.0001
--------------------------------	--------

Cianocobalamina (B12)	0.010
-----------------------	-------

pH 3.5 ajustado con KOH

Composición del medio de cultivo Hutner

APENDICE III

Cadena respiratoria alterna en plantas

La oxidasa alterna es común en todas las plantas en donde se transfieren electrones directamente del Ubiquinol al oxígeno y esta transferencia de electrones no está acoplada a la síntesis de ATP (Fig. 6)(Lambers, 1982). Esta vía alterna presenta una energía de conservación en el sitio II (entre el citocromo b y el c) y el sitio III (entre el citocromo a y a3). Así mismo la oxidación del succinato, y de NADH por la vía alterna genera potencial de membrana (Moore, 1986; Moore y Boner, 1982). Sin embargo la oxidación del malato por la vía alterna sí genera potencial de membrana (Moore y Bonner 1982; Nicholls, 1987).

Como la oxidación de sustratos por la vía alterna en plantas no genera potencial de membrana, la respiración no debería ser estimulada por desacoplantes como valinomicina. Bergen y cols., (1991) describieron que la valinomicina inhibe la transferencia de electrones a través de la vía alterna. Esta inhibición (entre 1 y 5 μ M) no tiene que ver con cambios en el potencial de membrana por que también se presenta en ausencia de un potencial (en presencia de K), así como en presencia de FCCP. La inhibición de la cadena alterna por valinomicina es más potente que por hidroxamatos los cuales tienen que utilizarse en concentraciones mM.

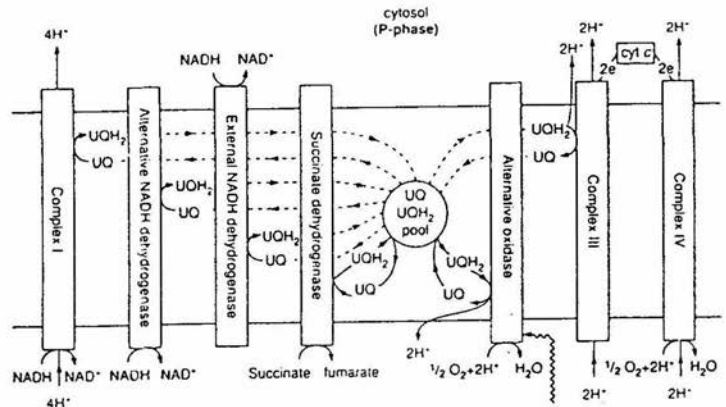


Fig 6.- Transporte electrónico entre los componentes de la cadena respiratoria en plantas, mostrando la inhibición por SHAM tomado de Nicholls (1985)

Cadenas respiratoria en bacterias

Las vías de este organismo son muy variadas debido a tres razones: 1) contienen diversos tipos de cadenas transportadoras de electrones. 2) Una determinada bacteria puede modificar su cadena respiratoria como respuesta a variaciones en las condiciones de crecimiento. 3) Muchas cadenas respiratorias bacterianas presentan ramificaciones con vías alternativas que transportan los electrones hacia una amplia variedad de aceptores terminales de electrones. Esta complejidad refleja una gran versatilidad de las bacterias. Por ejemplo *E. coli* posee una cadena respiratoria lineal cuando crece en condiciones altamente aerobias, con citocromo *c* o como oxidasa terminal. Si la cantidad de oxígeno es limitada, se sintetiza el citocromo *d* y el flujo de electrones se ramifica. Finalmente, en condiciones estrictamente anaerobias los electrones pueden ser transferidos al nitrato o al fumarato. Un grado de complejidad aun mayor se presenta en las bacterias púrpuras no sulfuradas, que poseen una vía fotosintética cíclica de transferencia de electrones cuando hay luz, y una cadena respiratoria con oxígeno como aceptor final en la oscuridad; estas dos vías comparten un cierto número de componentes comunes. (Figura 9)

Las cadenas respiratorias de bacterias que crecen en un medio aerobio emplean transportadores de electrones similares a los mitocondriales pero no idénticos, incluyendo proteínas Fe-azufre, flavoproteínas, quinonas y citocromos. Sin embargo solo en unos pocos casos como en *Paracoccus denitrificans* la secuencia y estructura de estos transportadores de electrones son muy similares a la de las mitocondrias. (Jonnes 1977; Nicholls 1987)

BIBLIOGRAFIA

- Ambler R., Kamen M., Bartsch R. y Meyer T. "Aminoacid secuencias of *Euglena viridis* ferredoxin and cytochrome c" *Biochem J.* 276: 47-52 (1991)
- Ariue O., Recca A. Linzer A y Ilya R. "Alternative respiration and heat Evolution in plant". *Plant Physiol.* 47: 1545-1550.(1991)
- Anemuller S., Bill E., Scharfer G., Trautwein A y Teixeira M. "EPR studies of cytochrome aa3 from *S. acidularius*." *Eur J. Biochem.* 210:133-138. (1992)
- Anemuller S., Schafer G. "Cytochrome aa3 from *Sulfolobus acidocaldarius*. A single-subunit, quinol oxidizing archabacterial terminal oxidase" *Eur. J. Biochem* 191: 297-305. (1990)
- Babba M., Darga L., Gootman L. y Czelusiniak J. *J. Mol. Evol.* 17: 197-213 (1981)
- Bakeeva L., Chentsou Y. y Skulachev V. "Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaaphragm muscle" *Biochem. Biophys. Acta* 510: 349-369(1978)
- Baker J. E. "Diphenylamine-inhibition of electron transport in plant mitochondria" *Arch. Biochem. Biophys.* 103: 148-155. (1963)
- Barnes R. "Zoologia de los invertebrados" 5a edición Interamericana pp. 230-233. (1988)
- Begin-Heick N "The localization of enzymes of intermedian,metabolism in *Astasia* and *Euglena*" *J. Biochem* 134: 607-616.(1973)
- Benichou P.,Calvayrac R. y Claisse M. "Induction by antimycin A of cyanide-resistant respiration in heterotrophic *Euglena gracilis*: Effects on growth respiration and protein biosynthesis" *Planta* 175: 23-32 (1988)
- Bergen C., Vanden K., Krabk W.y Vander plas L. "Valinomycin a very effective inhibitor of the cyanide-insensitive alternative pathway in plant mitochondria" *Bichim Biophys Acta* 1058: 203-208.(1991)
- Bloom J. y Buetow D. "Biochemical changes during acetate deprivation in *Euglena*" *Exp.Cell. Res.* 29: 407-421(1963)
- Brand J., Martin A., Lucas E. y Vorbeck M. "The structure of rat liver mitochondria and reevaluation" *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 59: 1097-1103 (1974)
- Brems D. y Stellwagen E. "Conformational transissions of cytochrome C Having a single thioether bridge" *J. Biol. Chem* 258: 10919-10923 (1983)
- Briand L. y Calvayrac R. Paramylon synthesis in Heterotrophic y Photoheterotrophic *Euglena* (*Euglenophyceae*)" *J. Phy Col.*16 :234-239 (1980)
- Bronstrup V. Y Hachtel W. "Cytochrome c oxidase of *Euglena gracilis* : Purification, characterization and identification of mitochondrially synthesized subunit" *J. Bioenerg Biomembr* 21: 359-373 (1989)
- Brown S., Moody A. J., Mitchell P. y Rich. P. R. "Binuclear centre structure of terminal protonmotive oxidases" *FEBS Lett* 316: 216-223 (1993)
- Brown S., Rumbley J. N., Moody A. J., Thomas J. W., Gennis R. B. y Rich P. R. "Flash photolysis of the carbon monoxide compounds of wild-type and mutant variants of cytochrome bo from *Escherichia coli*" *Biochem. Biophys. Acta* 1183: 521-532.(1994)

- Buetow D. "Aminoacid as nitrogen sources for the growth of *Euglena gracilis* and *Astasia longa*". J. Protozool 13: 585-587 (1966)
- Buetow D. "Morphology and ultrastructure of *Euglena*" en: The biology of *Euglena* edit. Buetow D. Vol I academic press Ney york. pp. 109-184. (1968)
- Buetow D. E. "Ethanol stimulation of oxidative metabolism in *Euglena gracilis*" Nature 190: 11961-11966. (1961)
- Buetow D. E. y Buchanan P. J. "Oxidative phosphorylation in mitochondria isolated from *Euglena gracilis*" Biochim. Biophys. Acta 96: 9-17 (1965)
- Buetow D. E., "Euglena-Cells for biological investigation" in: Buetow D. E. (Ed.), "The biology of *Euglena*" Vol. II Academic Press, New York, p. 383 (1968)
- Buetow D. y Buchanans D. "Isolation of mitochondria from *Euglena gracilis*" Exp. Cell. Res. 36: 204-207 (1964)
- Buetow D. "The mitochondrion" en: The biology of *Euglena* edit. Buetow D. Vol IV Academic Press New York pp. 247-314 (1968)
- Buse G., Hensel. S., y Fee. J. "evidence for a cytochrome oxidase subunit I and a cytochrome c subunit II fused protein in the cytochrome c1aa3 of *T. Thermophilus*" Eur J. Biochem 181:261-268. (1989).
- Calhoun M., Thomas J., Hill J., Shapleigh M., Tecklenburg S., Ferguson-Miller G., Babcock J., Alben y Gennis R. "Identity of the axial ligand of the high-spin heme in cytochrome oxidase: Spectroscopic characterization of mutants in the bo-type oxidase of *Escherichia coli* and the aa3-type oxidase of *Rhodobacter spheroides*" J. Biol. Chem. 32: 10905-10911 (1993)
- Calvayrac F., Laval-Martin D., Hubert M., Best-Bellpomme M. y Villaume M. "ATP production and catalytic- type activities in etiolated of green *Euglena gracilis*" Comp. Biochem. Physiol. 8113: 1009-1017 (1985)
- Calvayrac R. "Le cycle des mitochondries chez *Euglena gracilis* R. en culture synchrone" These de doctoral (1972)
- Calvayrac R. Leui M., Vazart J. Biand J. y Claisse M. "Activity cytochrome oxidase des mitochondries d' *Euglena gracilis* z: Comparacion de l'oxidation du ferrocitocrome c-558 et de ferrocitocromes de mamiferes" Biol. Cell. 31: 141-148 (1978)
- Calvayrac R. y Butow R. A. "Cytochrome c oxidase: understanding nature's design of a proton pump" Arch. Microbiol. 80: 60-62 (1971)
- Calvayrac R. y Claisse M. "Etude spectrale à basse température chez *Euglena gracilis* Z en culture synchrone sur milieu lactate: Variation the teneur en cytochrome 556". Planta. 112: 17-24 (1973)
- Calvayrac R., Betaux O., Lefort-tran M. y Valencia R. "Generalization du cycle mitochondrial chez *Euglena gracilis* Z en cultures synchrones heterotrophe et phototrophe". Protoplasma 80: 355-370 (1974)
- Calvayrac R., Buetow R. "Effect of antimycin-A on respiration and mitochondrial structure of *Euglena gracilis* Z". Arch. Microbiol. 80:62-71. (1971)
- Calvayrac R., Laval-martin D., Briand J. Y Farineau J. "Paramylon sithesis by *Euglena gracilis* photoheterotrophical grown under low O2 pressure; Description of a mitochondrioplast complex". Planta 153: 6-13 (1981)

Calvayrac R., Laval-Martin D., Farineu J. "Detection of mitochondrial-chloroplast complex connected with paramylon synthesis in photoheterotrophic *Euglena gracilis* culture under low oxygen pressure" *Biol. Cell.* 39: 80-85 (1980)

Calvayrac R., Van Lente F. y Butow R. A. "*Euglena gracilis*: formation of giant mitochondria" *Science* 173: 252-254 (1978)

Carter K. y Gennis R. "Reconstitution of the ubiquinone-dependent pyruvate oxidase system of *Escherichia coli* with the cytochrome *o* terminal oxidase complex" *J. Biol. Chem.* 268: 10986-10990 (1990)

Chaudhary y Merret M. "Glycolate pathway enzymes in mitochondria from phototrophic organotrophic and mixotrophic cells of *Euglena*" *Planta* 162: 518-523 (1984)

Chepuri V. y Gennis R. B. "The use of gene fusions to determine the topology of all of the subunits of the cytochrome *o* terminal oxidase complex of *Escherichia coli*" *J. Biol. Chem.* 265: 12978-1298 (1994)

Chepuri V., Lemieux L. J., Au D. C.-T y Gennis R. B. "The sequence of the *cyo* operon indicates substantial structural similarities between the cytochrome *o* ubiquinol oxidase of *Escherichia coli* and the *aa3*-type family of the cytochrome *c* oxidases" *J. Biol. Chem.* 265: 11185-11192 (1990)

Chepuri V., Lemieux L., Hill J., Alben J. O. y Gennis R. B. "The requirement of *ArcA* in *Fnr* for peak expression of the *cyd* operon in *Escherichia coli* under microaerobic conditions" *Biochim. Biophys. Acta* 1018: 124-127 (1990)

Clavayrac R. "Relation entre les substrats, la respiration et la structure mitochondriale chez *Euglena gracilis* (z)", *Arch Microbiol* 73: 308-314 (1970)

Collins N. y Merrett M. J. "Microbody-marker enzymes during transition from phototrophic to organotrophic growth in *Euglena*" *Plant Physiol.* 55: 1018-1022 (1975)

Collins N. y Merrett M. J. "The localization of glycolate-pathway enzymes in *Euglena*" *Biochem. J.* 148: 321-328 (1975)

Collins N., Brown R. y Merrett M. "Oxidative phosphorylation during glycolate metabolism in mitochondria from phototrophic *Euglena gracilis*" *Biochem. J.* 150: 373-377 (1975)

Cook J. "The cultivation and growth of *Euglena*" en: *The biology of Euglena* Edit Buetow Vol I Academic Press New York. pp.294-314 (1968)

Cook J. "Influence of light of acetate utilization in green *Euglena*" *Plant Cell. Physiol.* 6: 301-307 (1965)

Copertino D. y Hallick R. "Group II twintron: an intron within an intron in a chloroplast cytochrome *b*-559 gene" *The Embo J.* 10: 433-442 (1991)

Cui S., Mukai K., Saeki K. K. y Matsubara H. "Molecular cloning and nucleotide sequences of cDNAs encoding subunits I, II, y IX of *Euglena gracilis* mitochondrial complex III" *J. Biol. Chem.* 269: 98-107 (1994)

Danforth W. F. "The Biology of *Euglena*" Vol. III pp. 55-71 Academic Press, New York (1968)

Datta D. B. y Kahn J. S. "Some biochemical properties of mitochondria isolated from *Euglena gracilis*" *J. Protozool.* 24: 187-192 (1977)

Davis B. y Merrett M. "The effect of light on the synthesis of mitochondrial Enzymes in Division-synchronized *Euglena* culture" *Plant Physiol.* 53: 575-580 (1974)

- Day A., Aaron G. y Laties G. "The interaction of cyanide-resistant respiration with the cyanide-sensitive pathway" in: P. K. Stumpf and E. E. Conn (eds) *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise* vol. 2 Academic Press pp.179-241 (1980)
- de Gier J.-W. L., Lubben M., Reijnders W. N., Tipker C. A., van Spanning R. J. M., Stouthamer A. H. y van der Oost J. "The terminal oxidases of *Paracoccus denitrificans*" *Mol. Microbiol.* 13: 183-196 (1994)
- Devars S., Torres-Marquez M. E., Gonzales-Halphen D., Uribe A., y Moreno-Sánchez R. "Cyanide-sensitive and cyanide-resistant respiration of dark-grown *Euglena gracilis*" *Plant Science* 82: 37-46 (1992)
- Deuce R. "Mitochondria in Higher plants: Structure, Function and Biogenesis" Academic Press, Orlando Florida (1985)
- Englar S. y Breiger H. "Beef-heart and properties of crystalline supernatant malic dehydrogenase" *Biochem. Biophys. Acta* 56: 571-583 (1962)
- Everly S. y Spremull L. "Purification and characterization of the mitochondrial translocase from *Euglena gracilis*". *Arch. Biochem. Biophys.* 243: 246-253 (1985)
- Everse J. y Kaplan V. "Lactate dehydrogenases: structure and function" *Adv Enzimol.* 37: 61-133 (1973)
- Franklin F. y Schiff J. "Blue light induced absorbance changes associated with carotenoids in *Euglena*". *Planta* 146: 119-127 (1979)
- Faruqu J., Tuck M y Paik W. "Purification and characterization of enzymes from *Euglena gracilis* that methylate methionine and Arginine residues of cytochromes". *J. Biol. Chem.* 260: 537-545 (1984)
- Fukaya M., Tayama T., Ebisuya H., Okumura H., Kawamura I. y Horinochi S. *J. Bacteriol.* 175: 4307-4314 (1993)
- Fuller "The biology of *Euglena*" en Buetow ed Vol II Academic Press N.Y. (1961)
- Garcia-Horsman A., Berry E., Shapleigh J., Alben A., and Gennis B. "A novel cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* that lacks CuA" *Biochem.* 33: 3113-3119 (1994)
- Gennis R. "Some recent advances relating to prokaryotic cytochrome c reductases and cytochrome c oxidases". *Biochem. Biophys. Acta.* 1058: 21-24 (1991)
- Gennis R., Casey R., Azzi A. Y Ludwig B. "Purification and characterization of the cytochrome c oxidase from *Pseudomonas sphaeroides*". *Eur. J. Biochem.* 125: 189-195 (1982)
- Gomez-Silva B., Stern A., Saidha T. y Schiff S. "Oxidative phosphorylation coupled to respiration in highly purified intact *Euglena* mitochondria". *J. Plant. Physiol.* 120: 431-441 (1985)
- Gornall A. G., Bardawill C. J. y Davis M. M. "Determination of serum proteins by means of the biuret reaction" *J. Biol. Chem.* 177: 751-766 (1949)
- Graves L. V. y Becker W. M. "Localization of glyoxylate cycle enzymes in glyoxysomes in *Euglena*" *J. Protozool.* 21: 771-774 (1974)
- Gross y Wolken "The biology of *Euglena*" en Buetow ed. Vol II Academic Press N.Y. (1960)
- Hallick R. B. y Buetow D. E. in: "The biology of *Euglena*" edited by Buetow D.E. Vol. IV (1989) Academic Press New York

Hasegawa M., Hashimoto T., Adashi J., Wabe N. y Miyata T. "Early branching in the evolution of eucariotes: Ancient divergence of *Entamoeba* that lacks mitochondria revealed by protein sequence data" *J. Mol. Evol.* 36: 380-388 (1993)

Hatefi Y. "The mitochondrial electron transport chain and oxidative phosphorylation" *Annu. Rev. Biochem.* 54: 1015-1069 (1985)

Hill G. y Pettigrew G. "Evidences for the aminoacid sequence of *Critidia fasciculata* cytochrome c 555" *Eur. J. Biochem.* 57: 265-276 (1975)

Hill S. S., Viollet A., Smith T. y Anthony C. "Roles for enteric d-type cytochrome oxidase in N_2 fixation and microaerobiosis" *J. Bacteriol.* 172: 2071-2078 (1990)

Horum y Schwartzbach. "Nutritional regulation of organelle biogenesis in *Euglena* Photo-and Metabolite induction of mitochondria" *Planta* 1490: 376-383 (1980)

Hosler J. P., Ferguson-Miller S., Calhoun M. W., Thomas J. W., Hill J., Lemieux L., Ma J., Georgiou C., Fetter J., Shapleigh J., Tecklenburg M. M. J., Babcock G. T. y Gennis R. B. "Insight into the active-site structure and function of cytochrome oxidase by analysis of site-directed mutants of bacterial cytochrome *aa3* and cytochrome *bo*" *J. Bioenerg. Biomembr.* 25: 121-136 (1993)

Huq S. y Palmer J. "Superoxide and hydrogen peroxide production in cyanide-resistant *Arum maculatum* mitochondria" *Plant Sci. Lett.* 11: 351-358 (1978)

Hutner S. H., Bach M. K. y Ross G. I. "A sugar containing basal medium for vitamin B12-assay with *Euglena*. application to body fluids" *J. Protozool.* 3: 101-107 (1965)

Hutner S.H., Zahalsky A. C., Aaronson S., Baker H. S., y Frank, O., in: "Methods in cell physiology", D. M. Prescott (editor) Vol. II Academic Press, New York pp. 217-230 (1966)

Ingledeu J. y Pool R. "The respiratory change of *Escherichia coli*" *Microbiol Rev.* 48:222-271. (1984)

Inui H., Miyatake K., Nakano Y. y Kitaoka S. "Occurrence of oxygen-sensitive, NADP dependent pyruvate dehydrogenase in mitochondria of *Euglena gracilis*" *J. Biochem.* 96: 931-937 (1984)

Inui H., Miyatake K., Nakano Y. y Kitaoka S. "Production and composition of wax esters by fermentation of *Euglena gracilis*" *Agric. Biol. Chem.* 47: 2669-2671 (1983)

Inui H., Miyatake K., Nakano Y. y Kitaoka S. "The physiological role of oxygen-sensitive pyruvate dehydrogenase in mitochondrial fatty acid synthesis in *Euglena gracilis*" *Arch. Biochem. Biophys.* 237: 423-429 (1985)

Inui H., Miyatake K., Nakano Y. y Kitaoka S. "Wax ester fermentation in *Euglena gracilis*" *FEBS Lett* 150:89-72 (1982)

Inui H., Ono K., Miyatake K., Nakano Y. y Kitaoka S. "Purification and characterization of pyruvate: NADP+ oxidoreductase in *Euglena gracilis*" *J. Biol. Chem.* 262: 9130-9135 (1987)

Inui H., Ono K., Miyatake K., Nakano Y. y Kitaoka S. "Pyruvate:NADP oxidoreductase from *Euglena gracilis*: Mechanism of O_2 inactivation of the enzyme and its stability in the aerobe" *Eur. J. Biochem* 142:121-126. (1987)

Isegawa Y., Nakano Y. y Kitaoka S. "Conversion and distribution of cobalamin in *Euglena gracilis* z with special reference to its location and probable function within chloroplasts" *Plant Physiol.* 76: 814-818 (1984)

Jonnes C. " Bacterial gram-negativa energy transduction" *Protoplasm* 27: 1-8 (1988)

- Jonnes C. y Redferd E. "The cytochrome system of *Azobacter vinelandii*" (1977)
- Julistiono H., Brian D. "Microsomal Etanol-oxidizing sistem in *Euglena gracilis* similarities between *Euglena* and mamalian cell sistens" *Comp. Biochem. Physiol.* 102: 747-755 (1992)
- Kahn J. S. "*Euglena gracilis* phenotipic resistance to 2,4 Dinitrophenol" *Arch. Biochem. Biophys.* 159: 646-650 (1974)
- Kahn J. S. "Physiologycal adaptation of *Euglena gracilis* to uncoplers and inhibitorrs" *Arch. Biochem. Biophys.* 164: 266-274 (1973)
- Kempner E y Miller J "The molecular biology of *Euglena gracilis* I. Growth conditions and cellular composition" *Bichim. Biophys. Acta.* 104: 10-17 (1965)
- Kornberg H. "Relat sub biochem" *Adv Enzimol.* 23: 461-470 (1961)
- Kransz R. G. y Gennis R. B. "Immunological investigation of the distribution of cytochromes related of the two terminal oxidases of *Escherichia coli* gram-negative bacteria" *J. Bacteriol.* 161: 709-713 (1985)
- Krawiec S. y Eisentadt J. "Ribonucleic acids from the mitochondria of bleached *Euglena gracilis*" *Biochim. Biophys. Acta.* 217: 120-131 (1970)
- Kümmel W. U. y Brinkmann K. "The oxidation of exogenous NADH by mitochondria of *Euglena gracilis*" *Planta* 176: 261-268 (1988)
- Lambers H. "Cyanide-resistant respiration: a non-phosphorylating electron transport pathway acting as an energy overflow" *Plant Physiol.* 55: 478-485 (1982)
- Laties G. G. "The cyanide-resistant alternative path in higher plant respiration" *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 33: 519-55 (1982)
- Leedale G. "The biology of *Euglena* I." Buetow D. edition p.185 Acadeemic press New york. (1968)
- Leedale G. y Buetow D. "uglenoid flagelates" Prentice-Hall N.Y. (1967)
- Lefort- Tran M. *Colloq. Int. C.N.R.S.* 240: 297-308 (1975)
- Llord M. J. y Merrett J. M. "The intracellular localization of glycollate oxidoreductase in *Euglena gracilis*" *J. Biochem.* 124: 275-281 (1971)
- Lodder A. J., Wever R. y Van Gelder B. F. "Effects of cytochrome c on the oxidase of reduced cytochrome c oxidase by hydrogen peroxide" *Biochem. Biophys. Acta* 1185: 303-310 (1994)
- Lodder A. L. y Van Gelder B. F. "A comparison of three preparations of cytochrome oxidase. Optical absorbance spectra, EPR spectra and reaction towards ligands" *Biochem. Bipophys. Acta* 1186: 67-74 (1994)
- Lubben M., Arnaud S., Castresana J., Warne A., Albracht S. P. J. y Sarastre M. "An archae-bacteria terminal oxidase combines core structures of two mitochondrial respiratory complexes" *Eur. J. Biochem.* 224: 151-159 (1994)
- Margullis L., Corlis J., Melkonian L. y Chapman. "Hand book of protista" Jones y Bartler. Boston USA 255-310 (1990)
- Martinez J. y Gutierrez E. "Introducción a la protozoología" Trillas pp. 59-75 (1988)

- Matsushita K., Ebisuya H. y Adach O. "Homology in the structure and the prostetic groups between two different terminal oxidases, cytochrome a1 and cytochrome o of *Acetobacter aceti*" J. Biochem. 267: 24748-24753 (1992)
- Matsushita K., Ebisuya H., Ameyama M., y Adachi O. "Change of the terminal oxidase from cytochrome a1 in shaking cultures to cytochrome o in static cultures of *Acetobacter acetii*" J. Bacteriol. 174: 122-129 (1992)
- Matsushita K., Patel L. y Kaback R. "Cytochrome o type oxidase from *Escherichia coli*. Characterization of the enzyme and mechanism of the electrochemical proton gradient generation". Biochem. 23: 4703-4714 (1984)
- Mcintosh. W. Protoplasma 30: 124-135. (1994).
- Meeuse B. J. D. "Thermogenic respiration in aroids" Annu. Rev. Plant Physiol. 26: 117-126 (1975)
- Milne L. y Weissbach H. "inhibition of L-metionine of the growth of *Eugloena gracilis* in a glutamic-acid. medium" Arch. Biochem. Biophys. 132: 170-174 (1964)
- Meatyard K. y Boulter D. Phytochemisry. 13: 2777-2782. (1974).
- Minagawa J. M., Mogi T., Gennis R. B. y Anraku Y. "Identification of the heme and copper ligands in subunit I of the cytochrome bo complex in *Escherichia coli*" J. Biol. Chem. 267: 2096-2104 (1982)
- Minagawa N. y Yoshimoto A. "The induction of Cyanide-resistant respiration in *Asenula anomala*" J. Biol. Chem. 101: 1141-1146 (1987)
- Minagawa N., Koga S., Nakano M., Sakajo S. y Yoshimoto A. "Possible involvement of superoxide anion in the induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenmala anomala*" FEBS Lett. 302: 217-219 (1992)
- Minagawa N., Sakajo S., Komiyama T. Y Yoshimoto A. "A 32 kDa mitochondrial protein is responsible for cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*" FEBS Lett. 264: 149-152 (1990)
- Minghetti K.C., Goswitz V., Gabriel. N., Hill J., Barassi C., Georgius D., Chan S. y Gennis R." Modified, large-scale purification of the cytochrome o complex of *E. coli*. yields a two heme/one copper terminal oxidase with high specific activity" Biochemistry 31:6917-6924.(1992).
- Mitchell P. "Coupling of phosphorylation to electron and proton transfer by a chemiosmotic type of mechanism" Nature (London) 191: 423-427 (1961)
- Mitchell P. "Proton motive redoix mechanism of the cytochrome bc1 complex in the respiration change: proton motive ubiquinone cycle" FEBS Lett 56: 1-6 (1975)
- Moller I. "NADH dehydrogenases in plant mitochondria" Plant Physiol. 67: 517-520 (1986)
- Moore A y Boner W. " Measurement of membranes potentials in plant mitochondria with the safranine method" Plant Physiol. 70: 1271-1276 (1982)
- Moore A. L. y Siedow J. N. " The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria" Biochim. Biophys. Acta 1059: 121-140 (1991)
- Moore G. y Pettigrew G. "Cytochrome c evolutionary, structural and physicochemical aspects" Spring Berling p. 13 (1990)
- Moore L. y Rich P. "The bioenergetic of plants mitochondria". Trends Biochem. Sci. 5: 284-288 (1980)

- Moreno-Sánchez R. y Raya J. C. "Preparation of coupled mitochondria from *Euglena* by sonication" *Plant Science* 48: 151-157 (1987)
- Mukai Y., Yoshida M., Toyosaki H., Yao P., Wakabayashi S. y Matsubara H. "An atypical heme-binding structure of cytochrome c1 of *Euglena gracilis* mitochondrial complex III" *Eur. J. Biochem.* 178: 649-656 (1992)
- Nakano Y., Urad Y., Urader Y., Kitaoka S. "Isolation purification and characterization of the pellicle of *Euglena gracilis* z" *J. Biochem. Tokio* 102: 1053-1063 (1987)
- Nicholls D. "Cadenas respiratorias" en *Bioenergética; Introducción a la teoría quimiosmótica* Edit. Reverté S.A. pp.129-131 (1987)
- Nishimura "The biology of *Euglena*" en Buetow ed. Academic Press N.Y. (1956)
- Nubrega M.P., Nobrega F.G. y Tzagoloff "COX10 codes for a protein homologous to the ORF1 product of *Paracoccus denitrificans* and is required for the synthesis of yeast cytochrome oxidase" *J Biol Chem* 265: 14220-14226. (1990).
- Oda Y., Nakano Y. y Kitaoka S. "The mechanism of growth inhibition by threonine in *Euglena gracilis* regulation of isolated serine-valine biosynthesis by α -oxo butyrate" *Arch. Microbiol.* 132: 22-25 (1981)
- Oda Y., Nakano Y. y Kitaoka S. "Utilization toxicity of exogenous aminoacids in *Euglena gracilis*" *J. Gen. Microb.* 128: 853-858 (1982)
- Oliver-Matthias H., Jian-shu T., Andreas T. y Bernd L. "A cytochrome ba3 functions as a quinol oxidase in *Paracoccus denitrificans*" *J. Biol. Chem.* 269:23079-23086. (1994)
- Osafune T., Sumida S., Eharat V., Eji N y Schiff S. "Lipid (wax) and Paramylum as sources of carbon and energy for the early transferred to an inorganic medium" *Electron. Microsc. 39: 372-381 (1990)*
- Palmer J. "The uniqueness of plant mitochondria" *Biochem. Soc. Trans.* 7: 246-252 (1979)
- Palmer J. *Biochem Soc. Trans.* 7:246-252. (1979).
- Papa S. *Biochim Biophys Acta* 456:39-84 (1982).
- Peak M., Peak J. y Ting F. "Isoenzymes of malate dehydrogenase and the regulation in *Euglena gracilis* z" *Biochem. Biophys Acta* 284: 1-15 (1972)
- Pelegri "The biology of *Euglena*" en Buetow ed. Vol II Academic Press N. Y. (1976)
- Perini F., Kamen M. y Schiff J. "Iron-containing proteins in *Euglena* I. Detection and characterization" *Biochem. Biophys. Acta* 88: 74-90 (1964)
- Pettigrew C. "The aminoacid sequence of cytochrome c from *Euglena gracilis*" *Nature* 241: 531-533 (1973)
- Pettigrew C., Leave J., Meyer T. y Ryle A. "Purification, properties and aminoacid sequence of atypical cytochrome c from two protozoa *Euglena gracilis* and *Crithidia ancopelti*" *J. Biochem.* 147: 291-302 (1975)
- Poole R. "A structural and functionally diverse group of electron-transfer proteins" *Biochem. Biophys. Acta* 726:205-243 (1983)
- Poole R. "Bacterial cytochrome oxidases " Anteny edition Academic Press London (1984)

- Poole R. K., Baines B. S., Hubbard J. A. M. y Williams H. D. "Microbial metabolisms of oxygen: rebinding and reduction of oxygen by bacterial cytochrome oxidase" 31-62. (1985)
- Powers L., Lauraeus M., Reddy K. S., Chance B y Wikstrom M. "Structure of the binuclear heme iron-copper site in the quinol-oxidizing cytochrome aa₃ from *Bacillus subtilis*" *Biochem. Biophys. Acta* 1183: 504-512 (1994)
- Price C. A. y Vallee A. "A zinc dependent lactate dehydrogenases in *Euglena gracilis*" *J. Biochem.* 82: 61-66 (1962)
- Powls y Hemming "Ubiquinone" *The Biology of Euglena* " Buetow ed. vol. II Academic Press N.Y. (1966)
- Puustinen A., Morgan J. E., Verkховsky M., Thomas J. W., Gennis B. y Wikstrom R. B. "The low spin heme site of cytochrome o in *Escherichia coli* is promiscuous with respect to heme type" *Biochem.* 31: 10363-10369 (1992)
- Radin W. "Differetial regulation of nitrate reductase induction in roots and shoots of cotton plants" *Plant Physiol.* 55: 178-182 (1975)
- Ragan C. y Heron C. "NADH-Ubiquinone oxidoreductase" *Biochem. J.* 174: 783-790 (1978)
- Raison K. y Smillie R. "Respiratory cytochromes of *Euglena gracilis*." *Biochem. Biophys. Acta.* 180: 500-508 (1969)
- Raitio M. y Wikstrom M. "An alternative cytochrome oxidase of *Paracoccus denitrificans* functions as a proton pump" *Biochim. Biophys. Acta* 1186: 100-116 (1994)
- Rawn D. J. "Biochemistry" Neil Patterson Publisher New York pp. 363-378 (1989)
- Rich P. R. "Quinol oxidation in *Arum maculatum* mitochondria and its application to the assay solubilization and partial purification of the alternative oxidase" *FEBS Lett.* 96: 252-256 (1978)
- Rutner A. C. y Price C. A. *Int. Congr. Biochem.*, 6th New York 32: 331 (Abstr) (1964)
- Sakajo S., Minagawa N., Komoyama T. y Yoshimoto A. "Molecular cloning of CDAN for antimycin A-inducible mRNA and its role in cyanide-resistant respiration in *Hasenulka anomala*" *Biochem. Biophys. Acta* 1090: 102-108 (1991)
- Salerno J. C., Bolgiana B. y Ingledew W. J. "Potentiometric titration of cytochrome bo type quinol oxidase of *Escherichia coli*: evidence of the heme-heme and copper-heme interaction" *FEBS Lett.* 247: 101-105 (1989)
- Salerno J., Bolgiaro B. Pole R., Gennis R. Y Ingledew W. "Heme-copper and heme-heme interactions in the cytochrome bo containin quinol oxidase of *Escherichia coli*" *J. Biol. Chem.* 265: 4364-4368 (1990)
- Salganicoff L. y Robertis E. "Subcellular distribution of the enzymes of the glutamic acid, glutamine and gama-aminobutiryc acid cycles in rat brain" *J. Neurochem.* 12: 287-309 (1965)
- Saraste M. "Structural features of cytochrome oxidase" *Rev. Biophys.* 23: 331-366 (1990)
- Sarastre M., Holm L., Lemieux L., Lubben M. y Vander oost J. "The happy family of cytochorme oxidases" *Biochem. Soc. Trans.* 19: 608-612 (1991)
- Schantz R., Rchantz M. Dutaron H. "Changes in aminoacid and peptide composition of *Euglena gracilis* during chloroplast development" *Plant Sci. Lett.* 5: 313-324 (1975)

- Schwartz B., Schiff J., Golosteis N. "Events surrounding the early development of *Euglena* chloroplasts" *Plant Physiol.* 56: 313-317 (1975)
- Schiff J. "A genes safe light for the study of chloroplast development and ather photomorphogenic phenomen" *Methods Enzimol.* 24: 321-322 (1972)
- Schiff J., Laiman H. y Russell G. "Isolation of mutant from *Euglena gracilis*" *Methods of Enzymol.* 23: 143-162 (1971)
- Schwab A. "Mitochondrial protein systhesis and cyanide-resistant respiration in copper depleted cytochrome oxidase deficient *Neurospora crassa*" *FEBS Lett.* 35: 63-66 (1973)
- Schiff J. "The control of chloroplast differentiation in *Euglena*. In *proc III Int. Congr on Photosyntesis*" Auron M. ed. Elsevier Amsterdam 1691-1717 (1974)
- Sharpless T. K. y Butow R. A. "An inducible alternate terminal oxidase in *Euglena gracilis* mitochondria" *J. Biol. Chem.* 245: 58-70 (1970)
- Sharpless T. K. y Butow R. A. "Phosphorilation sites, citochrome complement and alternative pathways of coupled electron transport in *Euglena gracilis* mitochondria" *J. Biol. Chem.* 245: 50-57 (1970)
- Shibata H., Gardiner W. y Schwartzbach D. "Purification caracterization and inmunologycal properties of fumarase from *Euglena gracilis* var. *bacillaris*" *J. Bacteriol.* 164:762-768 (1985)
- Shigeoka S. y Nakano Y. "Characterization and molecular properties of 2-oxoglutarate descarboxilase from *Euglena gracilis*" *Arch. Biochem. Biophys.* 228: 22-28 (1991)
- Shigeoka S., Onishi T., Maeda K., Nakano Y. y Kitaota S. "Ocurrence of thiamin pyrophosphate-dependent 2-oxoglutarate descarboxylase in mitochondria of *Euglena gracilis*" *FEBS Lett.* 195: 43-47 (1976)
- Siedow J. N. y Moore A. L. "*Rhodohacter capsulatus* contains a novel cb-type cytochrome c oxidase without a CuA center" *Biochim. Biophys. Acta* 1142: 165-174 (1993)
- Siedow J. N., Whelan J. Jearns A., Wiskich J. T. y Day D. "A Biochemical and Physiological Aspect of Plant Respiration" Academic Press. Netherlands, pp. 19-27 (1991)
- Siedow J. y Grivin M. "Alternative respiratori pathway its role in seed respiration and its inhibition by propylgallate" *Plant Physiol.* 65: 669-674 (1980)
- Siedow J. Y Moore A. "A kinetic model for the regulation of electron ransfer through the cianide resistant pathway in plant mitochondria" *Biochem. Biophys. Acta* 1142 (1992)
- Slack c y Hatch M. "Distribution of enzymes in Mesophill and parenchyma sheath chloroplasts of maize leaves in relation to the c4-Dicarboxylic acid pathway of photosynthesis" *J. Biochem.* 114: 489-492 (1969)
- Slater E. "The mechanisms of action of the respiratory inhibitor, antimycin" *Biochem. Biophys. Acta* 301: 129-154 (1973)
- Sleigh A. "Protozoologia" Blume Madrid p. 379 (1986)
- Smille M. "Enzymology of *Euglena*" en *The Biology of Euglena* Buetow ed. Vol. II Academic Press N. Y. pp. 1-54 (1963).
- Smith E., Austen B., Blumenthal K y Nyc J. Academic Press New York 2: 293-377 (1975)

- Soloz M., Carafoli E. y Ludwig B. "The cytochrome c oxidase of *Paracoccus denitrificans* pumps protons in the reconstituted system" *J. Biol. Chem.* 257: 1579-1582 (1982)
- Sone, N., and Fujiwara. "Haem O can replace haem A in the active site of cytochrome c oxidase from thermophilic bacterium PS3". *FEBS. Lett* 288: 154-158. (1991)
- Stirpe F y Barbieri L. "Ribosome-inactivating proteins up to date" *FEBS Lett.* 195: 1-2 (1986)
- Sumida S., Ehara T., Osafune T., Hase E. "Ammonia and light-induced degradation of paramylum in *Euglena gracilis*" *Plant Physiol.* 28: 1587-1592 (1987)
- Summer J. y Bloume J. "Cell division in *Astasia longa*" *Exp. Cell. Res.* 39: 504-527 (1965)
- Taanman J y Capaldi R. "Purification of yeast cytochrome c oxidase with a subunit composition resembling the mammalian enzyme" *J. Biol. Chem.* 267: 22481-22486 (1992)
- Therbach G. y Reichenbach H. "Mixotiazol a new inhibitor of the cytochrome bc₁ segment of the respiratory chain" *Biochem. Biophys. Acta* 638: 282-289 (1981)
- Thomas J. W., Puustien A., Alben J. O., Gennis R. B. y Wikstrom M. "Site directed mutagenesis of highly conserved residues in helix VIII of subunit I of the cytochrome bo ubiquinol oxidase from *Escherichia coli*: an amphipatic transmembrane helix that maybe important in convenient protons to the binuclear centre" *Biochem.* 32: 10923-10928 (1993)
- Threlfall y Goodwin "Ubiquinone" en *The biology of Euglena* Buetow ed. Vol. II Academic Press N. Y. (1964)
- Ting J. Y Rocha V. "NADP specific malate dehydrogenase of green spinach leave tissue" *Arch. Biochem. Biophys.* 147: 156-164 (1971)
- Tokunaga M., Nakano Y. y Kitaoka S. "Separation and properties of the NAD-linked and NADP-linked isozymes of succinic semialdehyde dehydrogenase in *Euglena gracilis* Z." *Biochim. Biophys. Acta* 429: 55-62 (1976a)
- Tokunaga M., Nakano Y. y Kitaoka S. "The mitochondrion" in: "The Biology of *Euglena*" Vol. IV edited by Buetow D.E. Academic Press N. Y. (1985)
- Tokunaga M., Nakano Y. y Kitaoka S. "Subcellular localization of the GABA-shut enzymes in *Euglena gracilis* strain Z" *J. Protozool.* 26: 471-473 (1979)
- Tokunaga M., Nakano Y., y Kitaoka S. "Preparation of Physiologically intact mitochondria from *Euglena gracilis*" *Agric. Biol. Chem.* 40: 1439-1440 (1976b)
- Trumpower B. "New concept of the role of ubiquinone in the mitochondrial respiratory chain" *J. Bioenerg. Biomembr.* 13: 1-2 (1981)
- Trumpower B. L y Gennis R. B. "Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: The enzymology of coupling electron transfer reaction to transmembrane proton translocation" *Annu. Rev. Biochem.* 63: 676-716 (1994)
- Umbach A., L., Wiskich J. T. y Siedow J. N. "Regulation of alternative oxidase kinetics by pyruvate and intermolecular disulfide bond redox status in soybean seedling mitochondria" *FEBS Lett.* 348: 181-184 (1994)
- Uribe A. Chávez E., Jiménez M., Zazueta C. y Moreno-Sánchez R. "Characterization of Ca²⁺ transport in *Euglena gracilis* mitochondria" *Biochim. Biophys. Acta* 1186: 107-116 (1994)

- Uribe A. y Moreno-Sánchez R. "Energy -dependent reactions supported by several substrates in coupled *Euglena gracilis* mitochondria" *Plant Science* 86: 21-32 (1992)
- Vanderbergen C., Krab C., Wagner A. y Vanderplas L. "Valinomycin a very effective inhibitor of the cyanide alternative pathway in plant mitochondria" *Biochim. Biophys. Acta* 1058: 203-208 (1991)
- Vanlerberghe G. C. y McIntosh L. "Coordinate regulation of cytochrome and alternative pathway respiration in tobacco" *Plant Physiol.* 100: 1846-1851 (1992b)
- Vanlerberghe G. C. y McIntosh L. "Lower growth temperature increases alternative pathway capacity and alternative oxidase protein in tobacco" *Plant Physiol.* 100: 115-119 (1992a)
- Von Jagow T. y Link A. "use of specific inhibitors on the mitochondria bc1 complex" *Methods Enzymol.* 12: 253-271 (1986)
- Wilson T., Antonini G., Malatesta F., Sarti P., y Brunori M. "Probing the oxygen binding site of cytochrome c oxidase by cyanide" *J. Biol. Chem.* 269: 24114-24119 (1994)
- Williams J. *Gene Arch. Biochem. Biophys* 107:537-543. (1964)
- Wolpert J. y Ernest-fonberg M. "A multienzyme complex for CO₂ fixation" *Biochem.* 4: 1099-1102 (1975)
- Wu W., Chang C. K., Varotsis C., Babcock G. D., Puustinen A. y Wikstrom M. "Structure of the heme o prostetic group from the terminal quinol oxidase of *Escherichia coli*" *J. Am. Chem. Soc.* 114: 1182-1187 (1992)
- Yamanaka T. "The biochemistry of bacterial cytochromes" pp.11-13 (1992)
- Yokota A., Hag S. y Kitaoka S. "Purification and some properties of glioxalate reductase NADP and its functional location in mitochondria in *Euglena gracilis*" *Biochem.* 227: 211-216 (1985)
- Yokota A., Hosotani K. y Kitaoka S. "Mecanism of metabolic regulation in photoassimilation of propionate in *Euglena gracilis* z" *Arch. Biochem. Biophys.* 213: 530-537 (1982)
- Yokota A., Nakano Y. y Kitaoka S. "Some biochemical properties of mitochondria isolated from *Euglena gracilis*" *Agric. Biol. Chem.* 42: 121-125 (1978)
- Zimmermann B. H., Nitsche C. I., Fee J. A., Rusnak F., y Munck E. "Properties of a copper-containing cytochrome ba₃: a second terminal oxidase from the extreme *Thermus thermophilus*" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5779-5783 (1988)
- Zubay G. "Biochemistry" second edition Mcmillan Ney York pp. 295-310 (1988)