

142  
rej



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE CIENCIAS

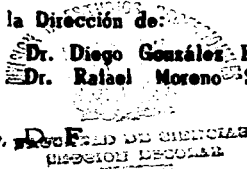
Estudio de los Componentes de la Fosfo-  
rilación Oxidativa en Mitocondrias del  
Alga Incolora Polytomella spp



T E S I S  
Que para obtener el título de  
B I O L O G O  
p r e s e n t a  
ADRIAN REYES PRIETO



Bajo la Dirección de:  
Dr. Diego González Halphen  
Dr. Rafael Moreno Sánchez

México, D.F. 

1997

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Bazule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:  
Estudio de los componentes de la fosforilación oxidativa en mitocondrias  
del alga incolora Polytomella spp.

realizado por Adrián Reyes Prieto

con número de cuenta 8840259-0 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dr. Diego González Halphen

Propietario

Dr. Rafael Moreno Sánchez

Propietario

Dra. Irma Romero Álvarez

Suplente

Dra. Georgina Regina Garza Ramos Martínez

Suplente

M. en ~~Química~~ Química ~~Castillo~~ Castillo Martínez

COORDINACIÓN GENERAL  
DE BIOLOGÍA

**Este trabajo se realizó en el laboratorio 325 Norte del Departamento de Bionérgica del Instituto de Fisiología Celular, UNAM y en los laboratorios del Departamento de Bioqúimica del Instituto Nacional de Cardiología, bajo la dirección conjunta del Dr. Diego González Halphen y el Dr. Rafael Moreno Sánchez.**

**Durante el desarrollo del trabajo de investigación recibí el apoyo de dos becas otorgadas por la Fundación UNAM, una de Iniciación Temprana a la Investigación y otra para la realización de Tesis Profesional.**

**Este trabajo constituye parte del proyecto de investigación apoyado por el donativo 1371-N9306 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), así como por el donativo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) número IN-204595.**

**Quiero agradecer la ayuda técnica que me brindó la Q.B.P. Miriam Vázquez Acevedo para la realización de este trabajo.**

**Agradezco la ayuda prestada por Jorge Sepúlveda de la Unidad de Microscopía Electrónica**

**Agradecimientos:**

**Diego y Rafael, por su apoyo, por todo lo que me han enseñado**

**Ember, Anaïd, Miriam, Soledad y Xóchitl, por su amistad y ayuda en todo momento**

**Aida, Cecilia, Rosa, Sara, José, Conchita, Sivia, Alicia, Horacio, Ramón, José de Jesús, por su amistad, por ayudarme tanto**

**Elena, por que me llevó a aprender todo esto**

**Jorge, por su ayuda**

**Al Dr. Armando Gómez Puyou, por prestarnos su laboratorio**

**A mis sinodales, por revisar mi trabajo, por su comprensión**

**A todos mis amigos y compañeros del Instituto de Fisiología Celular y del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología, por su ayuda**

A Maru,  
por el sueño que me regaló

A Martha y Ricardo,  
por tanto y tanto

A Fabián,  
porque lo mejor está todavía por venir

A mi familia,  
por todo, por cada cosa

A mis grandes amigos,  
ellos ya se conocen, saben quienes son

<b>Índice</b>	<b>Página</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>2</b>
<b>Introducción</b>	<b>4</b>
<b>Función mitocondrial</b>	
Generación de acetil-coenzima A	6
Glucólisis	6
$\beta$ -oxidación	8
El ciclo de los ácidos tricarbóxicos	9
La cadena respiratoria mitocondrial	10
<b>Las oxidasas terminales alternas</b>	<b>14</b>
<b>El género <i>Polytomella</i></b>	<b>16</b>
<b>Antecedentes</b>	<b>20</b>
<b>Hipótesis de Trabajo</b>	<b>20</b>
<b>Objetivos</b>	<b>22</b>
<b>Métodos y Materiales</b>	<b>23</b>
<b>Mantenimiento en cultivo y cosecha de células de <i>Polytomella</i></b>	<b>23</b>
<b>Aislamiento de mitocondrias</b>	<b>24</b>
<b>Consumo de oxígeno</b>	<b>24</b>
<b>Oxidación de sustratos</b>	<b>25</b>
<b>Actividad de ascorbato-TMPD oxidasa</b>	<b>26</b>
<b>Potenciales transmembranales</b>	<b>27</b>
<b>Síntesis de ATP</b>	<b>27</b>
<b>Determinación de proteína</b>	<b>28</b>

## **Resultados**

<b>Aislamiento de mitocondrias y oxidación de sustratos</b>	<b>30</b>
<b>Potenciales transmembranales</b>	<b>35</b>
<b>Síntesis de ATP</b>	<b>36</b>
<b>Nuevos resultados de síntesis de ATP</b>	<b>37</b>

## **Discusión**

<b>Aislamiento de mitocondrias y control respiratorio</b>	<b>38</b>
<b>Oxidación de sustratos</b>	<b>39</b>
<b>Efecto de inhibidores</b>	<b>40</b>
<b>Potenciales transmembranales</b>	<b>43</b>
<b>Síntesis de ATP</b>	<b>44</b>

<b>Perspectivas</b>	<b>46</b>
---------------------	-----------

<b>Referencias bibliográficas</b>	<b>48</b>
-----------------------------------	-----------



## Abreviaturas

<b>Ac-CoA</b>	acetil coenzima A
<b>ADP</b>	difosfato de adenosina
<b>ASB</b>	albúmina de suero bovino
<b>ATP</b>	trifosfato de adenosina
<b>CCCP</b>	carbonil cianuro <i>m</i> -clorofenilhidrazona
<b>CN<sup>-</sup></b>	cianuro
<b>DPA</b>	difenilamina
<b>EGTA</b>	ácido etilenglicol- <i>bis</i> -(β-amino-etil eter) N,N'tetra acético
<b>FAD</b>	flavín dinucleótido (forma oxidada)
<b>FADH<sub>2</sub></b>	flavín dinucleótido (forma reducida)
<b>GDP</b>	difosfato de guanosina
<b>GTP</b>	trifosfato de guanosina
<b>HQNO</b>	<i>n</i> -óxido de 2-heptil-4-hidroxiquinolina
<b>KME</b>	amotiguador (KCl 120 mM, MOPS 20 mM, EGTA 1 mM)
<b>μm</b>	micrómetros
<b>μM</b>	micromolar
<b>mM</b>	milimolar
<b>MOPS</b>	ácido 3-( <i>n</i> -morfolino) propanosulfónico
<b>NAD<sup>+</sup></b>	nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
<b>NADH</b>	nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
<b>NADPH</b>	nicotinamida adenina dinucleótido de fosfato (forma reducida)
<b>nm</b>	nanómetros

<b>nPG</b>	n-propil galato
<b>PI</b>	fosfato inorgánico
<b>SHAM</b>	ácido salicil hidroxámico
<b>SME</b>	amortiguador (sacarosa 120 mM, MOPS 20 mM, EGTA 1 mM)
<b>TMPO</b>	tetrametil-p-fenildiamina
<b>TPP</b>	pirofosfato de timina

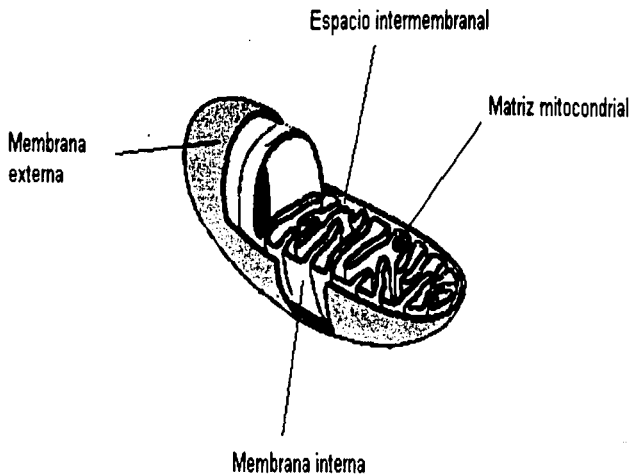
## **Introducción**

En la mayoría de las células eucariotes las mitocondrias ocupan una porción considerable del volumen citoplásmico (25%). La presencia de mitocondrias ha permitido la aparición de mecanismos bioquímicos de importancia fundamental en la historia evolutiva de las células eucariotes: el metabolismo aerobio de los carbohidratos, que permite la utilización del producto final de la glucólisis, el piruvato, para la obtención de una gran cantidad de energía, si se compara con la que se obtiene de un proceso de degradación anaerobia, como es la fermentación ( Darnell y col., 1990).

Dentro de la mitocondria el piruvato es oxidado hasta la formación de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , la energía desprendida de esta oxidación es suficiente para generar treinta moléculas de ATP por cada molécula de glucosa oxidada . En la vía completa de la glucólisis se obtiene una ganancia neta de dos moléculas de ATP.

La mitocondria es un organelo de forma cilíndrica elongada, con un diámetro promedio de  $1 \mu\text{m}$  . Durante el ciclo celular las mitocondrias presentan cambios constantes en su forma, así como cierta movilidad, este fenómeno es conocido como plasticidad mitocondrial; por otro lado las mitocondrias también sufren fusiones múltiples entre ellas, así como posteriores divisiones para generar un número mayor de organelos. Se ha demostrado que este fenómeno tiene estrecha relación con el citoesqueleto ( Alberts y col., 1994) .

Los estudios de microscopía demostraron desde hace tiempo que la estructura mitocondrial comprende dos diferentes membranas especializadas, la presencia de ambas genera dos diferentes compartimientos separados, uno interno, conocido como matriz mitocondrial y otro entre ambas membranas conocido como espacio intermembranal (Figura 1).



**Figura 1.** Representación esquemática de una mitocondria donde se aprecian la membranas interna y externa; la matriz mitocondrial y el espacio intermembranal. (Tomado de Stryer, 1991)

De acuerdo a su posición espacial, las membranas reciben el nombre de externa e interna. La membrana externa, que constituye el perímetro de la mitocondria, se caracteriza por presentar un gran número de copias de una proteína transmembranal con funciones de transporte, la porina, que es muy similar en estructura y función a algunas proteínas que actúan como poros en las membranas externas de las bacterias Gram-negativas. La presencia de los canales de porina confiere una gran permeabilidad a la membrana externa, ya que permite el paso de moléculas hasta de 5000 Daltones de peso molecular, lo que incluye algunas proteínas de bajo peso molecular. Sin embargo, aunque una gran cantidad de moléculas pueden traspasar la membrana externa hacia el espacio intermembranal, pocas de ellas pueden pasar a la matriz, debido a que la membrana interna, a diferencia de la externa, presenta una selectividad alta por las moléculas que pueden traspasarla.

La membrana interna mitocondrial tiene una alta proporción de proteínas como constituyentes, alrededor del 75% del peso total de la membrana se debe a ellas. La alta selectividad de la membrana interna se debe en parte al alto contenido de cardiolipina (un lípido de membrana conocido también como difosfatidil glicerol) que se caracteriza por presentar cuatro ácidos grasos en su estructura, lo que favorece la impermeabilidad a la mayoría de las moléculas con carga eléctrica (Alberts, 1990).

El papel de la membrana en la función mitocondrial es muy importante, gran cantidad de las proteínas presentes son transportadores específicos para moléculas pequeñas que debe ser concentradas en la matriz para el funcionamiento de vías metabólicas muy importantes, como son el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y la degradación de ácidos grasos ( $\beta$ -oxidación). Otro tipo de proteínas embebidas en la membrana interna son los complejos multiméricos de la cadena respiratoria, que son parte esencial de la fosforilación oxidativa para la generación de ATP (Alberts et al 1994), este proceso será abordado con mayor detalle más adelante.

El arreglo estructural de la membrana interna produce plegamientos de la bicapa lipídica, generando las crestas mitocondriales, estos plegamientos aumentan la superficie de la membrana respecto al volumen total del organelo, cuya proporción

puede variar dependiendo del tipo celular. El hecho de aumentar el área de la membrana interna permite que exista una mayor cantidad de proteínas membranales potencialmente activas.

### **Función mitocondrial**

#### **Generación de acetil-coenzima A ( Ac-CoA)**

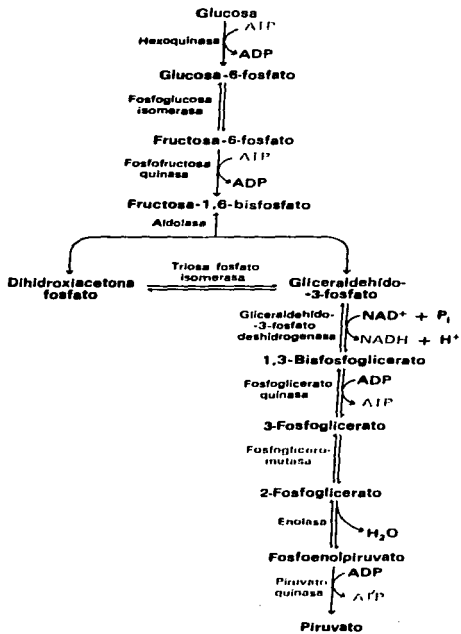
La formación de acetil-coenzima A (Ac-CoA) es el paso inicial para el metabolismo oxidativo mitocondrial, éste se puede generar por dos vías principalmente: a) por la utilización de piruvato proveniente de la glucólisis ( proceso metabólico que no ocurre en la mitocondria, sino en el citosol) y b) por la  $\beta$  -oxidación en la matriz mitocondrial.

#### **a) Glucólisis**

En el primer caso el piruvato es obtenido como producto final de la oxidación anaerobia de una molécula de glucosa, la glucólisis produce dos moléculas netas de ATP y constituye una vía muy primitiva para la obtención de energía, generalizada antes de la aparición de los metabolismos fotosintéticos aerobios que emplean agua como donador de electrones y liberan oxígeno a la atmósfera ( Alberts y col., 1994).

En la glucólisis una molécula de glucosa, una aldohexosa de seis carbonos, es transformada en dos moléculas de piruvato (formada por tres carbonos), mediante una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente y que producen varios intermediarios fosforilados. Durante este procesos se hidrolizan dos moléculas de ATP y se producen por fosforilación a nivel de sustrato cuatro moléculas más de ATP (Stryer, 1990) (Figura 2).

En la primera parte de la glucólisis, la glucosa es convertida a fructuosa 1,6-bisfosfato, por tres reacciones diferentes, una fosforilación, una isomerización y una



**Figura 2.** La vía de la glucólisis. (Tomado de Stryer, 1991)

nueva fosforilación, en esta parte se consumen dos moléculas de ATP. En una segunda parte la fructuosa 1,6-bisfosfato es convertida por medio de una reacción retroaldólica en dihidroxiacetona 3-fosfato y gliceraldehído 3-fosfato, que son moléculas isomerizables entre sí. El gliceraldehído 3-fosfato por una reacción de oxidación y una posterior de fosforilación, es transformado en 1,3-bisfosfoglicerato, que en una siguiente reacción puede transferir un acil-fosfato para la formación de ATP y generación de 3-fosfoglicerato.

A partir de 3-fosfoglicerato se forma 2-fosfoglicerato, éste por deshidratación genera el fosfofenol piruvato, que también puede transferir el grupo fosfato para la síntesis de ATP con la formación de piruvato. Durante la reacción que transforma al gliceraldehído 3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato, que comprende una oxidación, participa como aceptor de electrones  $\text{NAD}^+$  para reducirse y dar NADH, que en organismos aerobios puede transferir sus electrones al oxígeno por medio de la cadena respiratoria, regenerándolo en su forma oxidada. Una vez generado el piruvato en el citosol es transportado al interior de la matriz mitocondrial para su completa oxidación a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . Al estar en la matriz mitocondrial, el piruvato reacciona con la coenzima A y por una descarboxilación del piruvato se obtiene Ac-CoA con la liberación de NADH, este proceso está enzimáticamente catalizado por el complejo de la piruvato deshidrogenasa, y constituye la vía de conexión entre la glucólisis y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. El complejo de la piruvato deshidrogenasa está compuesto por tres diferentes enzimas que participan en la formación de Ac-CoA (Stryer, 1990): El componente piruvato deshidrogenasa (24 subunidades y pirofosfato de tiamina, TPP, como grupo prostético), la dihidrolipoiltransacetilasa (24 subunidades y lipoamida como grupo prostético) y la dihidrolipoildeshidrogenasa (12 subunidades y FAD como grupo prostético).



## **b) La $\beta$ -oxidación**

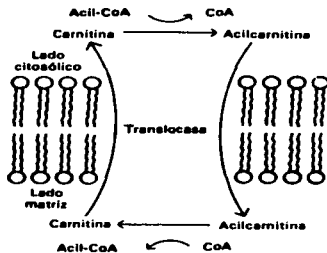
La segunda vía para la formación de Ac-CoA es a partir de la degradación de ácidos grasos y tiene lugar en la matriz mitocondrial.

Para la entrada de los ácidos grasos (producto de la lipólisis de triacilglicérol) desde el citoplasma a la matriz mitocondrial, es necesario que sean activados mediante la formación de un enlace éster entre el grupo carboxilo del ácido graso y el grupo sulfhidrilo de la coenzima A, esta reacción es catalizada por la acil coenzima A sintetasa en la membrana externa mitocondrial. Una vez formado, el acil CoA es transportado al interior de la mitocondria por la carnitina, que es un péptido zwitteriónico formado por residuos de lisina, para ello ocurre una transferencia del grupo acilo unido a la coenzima A a la carnitina, para generar acil-carnitina, reacción catalizada por la carnitina acil transferasa I.

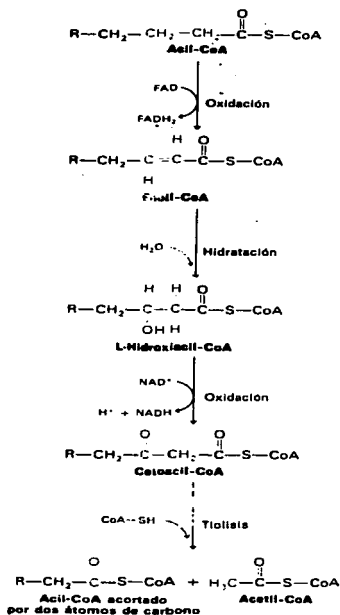
La acil carnitina es transportada de un lado al otro de la bicapa de la membrana interna por una translocasa. Una vez del lado de la matriz el grupo acilo es transferido a otra molécula de coenzima A por la acil transferasa II y se libera en la matriz mitocondrial en forma de acil coenzima A (Figura 3).

En la matriz mitocondrial el acil coenzima A puede ser degradado hasta Ac-CoA mediante el proceso consecutivo conocido como  $\beta$ -oxidación, donde la molécula de acil coenzima A pierde dos átomos de carbono por cada ciclo de degradación (Figura 4).

La primera reacción comprende la oxidación de la acil coenzima A a enoil coenzima A por la formación de un doble enlace trans entre el carbono 2 y el carbono 3 con la participación de FAD<sup>+</sup> como aceptor de electrones. Posteriormente ocurre una hidratación estereo-específica del enoil coenzima A para dar el L- hidroxilacil coenzima A que se oxida con la participación de NAD<sup>+</sup> a  $\beta$ -cetoacil coenzima A. La última reacción de la  $\beta$ -oxidación requiere de la participación de otra molécula de coenzima A y por medio de una ruptura de enlace tiol genera Ac-CoA y un acil coenzima A con dos



**Figura 3.** Mecanismo de internalización de acil coenzima A a la matriz mitocondrial por acción de la carnitina. (Tomado de Stryer, 1991)



**Figura 4.** Degradación de ácidos grasos en la matriz mitocondrial ó β-oxidación. (Tomado de Stryer, 1991)

átomos de carbono menos que al inicio del ciclo. El proceso se repite dependiendo del número de carbonos del ácido graso.

Una vez formado el acetil coenzima A en la matriz mitocondrial puede ser utilizado en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

### **El ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Ciclo de Krebs)**

El ciclo de los ácidos tricarbóxicos constituye la etapa final en los procesos de oxidación de moléculas que pueden aportar energía, como son carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos.

La principal vía de alimentación del ciclo ocurre vía Ac-CoA, sin embargo existen otros puntos donde pueden incorporarse directamente otros intermediarios. Por otro lado el ciclo de los ácidos tricarbóxicos puede aportar precursores para vías biosintéticas.

Las reacciones del ciclo (Figura 5) tienen lugar por completo en la matriz mitocondrial: La primera reacción comprende la producción de citrato y coenzima A por la unión de oxaloacetato con el grupo acetilo del Ac-CoA con la adición de una molécula de  $H_2O$ , el proceso es catalizado la citrato sintetasa. La segunda reacción es una isomerización de citrato a isocitrato con una deshidratación y una hidratación consecutivas por acción de la aconitasa.

La primera reacción de oxidación-reducción del ciclo ocurre con la descarboxilación del isocitrato a  $\alpha$ -cetoglutarato por la isocitrato deshidrogenasa y la reducción de  $NAD^+$ , con la liberación de  $CO_2$ . La siguiente reacción también es de oxidación-reducción cuando el  $\alpha$ -cetoglutarato se convierte a succinil coenzima A con desprendimiento de  $CO_2$  y reducción de otro  $NAD^+$  a NADH por acción del complejo  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa.

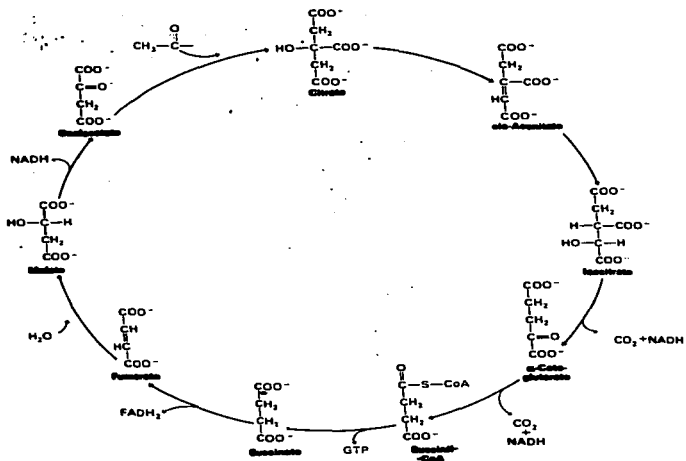


Figura 5. El ciclo de los ácidos tricarbónicos ó ciclo de Krebs . (Tomado de Stryer, 1991)

La reacción catalizada por la succinil coenzima A sintetasa permite la formación de un enlace fosfato al acoplar la ruptura del enlace tióéster a la fosforilación del difosfato de guanosina ( $\text{GDP} + \text{P}_i \longrightarrow \text{GTP}$ ) liberando succinato y coenzima A.

Posteriormente el succinato se transforma en fumarato por una reacción de oxidación catalizada por la succinato deshidrogenasa, donde el  $\text{FAD}^+$  es el aceptor de electrones.

Por acción de la fumarasa, el fumarato es estereoespecíficamente hidratado para formar L-malato, que a su vez es oxidado para generar el oxalacetato, este último paso involucra una nueva readucción de  $\text{NAD}^+$  por la enzima malato deshidrogenasa (Figura 5).

Las moléculas de  $\text{NADH}$  y  $\text{FADH}_2$  formadas durante el ciclo de los ácidos tricarboxílicos son oxidadas en la cadena respiratoria mitocondrial con una transferencia de electrones hasta el oxígeno, acoplado a ese transporte de electrones se sintetiza ATP por mecanismos detallados a continuación.

### **La cadena respiratoria mitocondrial**

La transferencia de electrones del  $\text{NADH}$  y  $\text{FADH}_2$  (provenientes de la glucólisis,  $\beta$ -oxidación y ciclo de los ácidos tricarboxílicos) hacia el oxígeno, libera una gran cantidad de energía que es empleada para la síntesis de ATP, el proceso en conjunto recibe el nombre de fosforilación oxidativa.

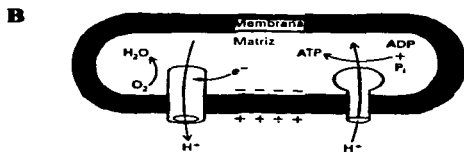
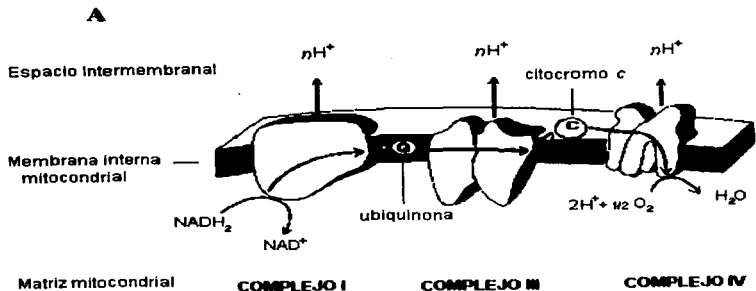
En el transporte de electrones intervienen moléculas con propiedades óxido-reductoras asociadas a proteínas y que en conjunto constituyen los complejos respiratorios mitocondriales, que se encuentran embebidos en la membrana interna mitocondrial. Algunos de estos complejos multiméricos son capaces de bombear protones desde la matriz hacia el espacio intermembranal a la vez que llevan a cabo el transporte de electrones. La translocación de protones genera una fuerza protón-

matriz constituida por un gradiente de pH y un potencial eléctrico a través de la membrana, el regreso de los protones a la matriz por acción del complejo de la ATPasa permite la formación de ATP ( Mitchell, 1975) (Figura 6).

Las moléculas asociadas a las proteínas en los complejos respiratorios y que son capaces de transferir electrones pueden ser flavinas, centros Fe-S, grupos hemo y átomos de Cu. La transferencia de electrones de un acarreador a otro se rige por un concepto electroquímico conocido como potencial redox, que se refiere a la afinidad que tiene por los electrones una molécula en su forma oxidada con respecto a su forma reducida. Así, una molécula reductora como el NADH tiene un potencial redox negativo y una molécula con poder oxidante, como el oxígeno, mantiene un potencial redox positivo. De tal forma que el cambio en la energía libre para una reacción de óxido-reducción puede ser calculado si se conocen los potenciales redox de los reactantes, mediante la siguiente expresión:  $\Delta G^{\circ} = -nF\Delta E^{\circ}$ , donde  $E^{\circ}$  representa el potencial redox estándar,  $F$  la constante de Faraday y  $n$  el número de electrones transferidos. El cambio en el potencial redox entre dos acarreadores de electrones es directamente proporcional a la energía liberada para transferir los electrones de uno a otro, este cambio en la energía libre favorece el bombeo de protones desde la matriz hacia el espacio intermembranal (Figura 7).

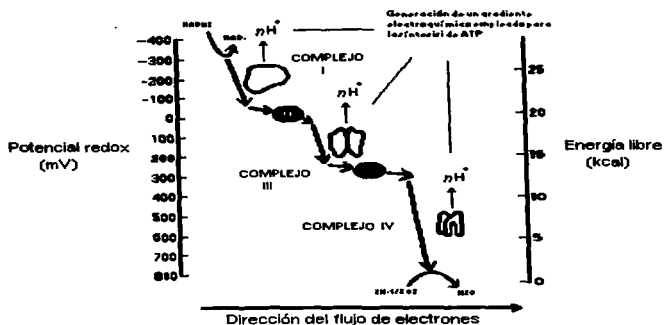
Además de las moléculas unidas a polipéptidos de los complejos respiratorios transmembranales, forma parte de la cadena respiratoria otro grupo hemo unido a una proteína soluble que se encuentra en el espacio intermembranal, que se conoce como citocromo *c* soluble y funciona como acarreador móvil de electrones entre la ubiquinol citocromo *c* oxido-reductasa (complejo *bc<sub>1</sub>*) y la citocromo *c* oxidasa. Otro componente móvil de la cadena respiratoria es la ubiquinona o coenzima Q, que es reducida por las flavoproteínas membranales, y que funciona como acarreador de electrones desde la NADH deshidrogenasa y la Succinato deshidrogenasa hacia el complejo *bc<sub>1</sub>*.

De acuerdo con la clasificación de Hatefi y col. (1962) los complejos que participan en el transporte de electrones y el bombeo de protones para la síntesis de ATP, son los siguientes:



**Figura 6. A)** Los complejos mitocondriales que participan en la generación del gradiente electroquímico de protones acopladamente al transporte de electrones. **B)** Esquema de la fosforilación oxidativa en la mitocondria, donde se observa el empleo del gradiente electroquímico de protones para la síntesis de ATP





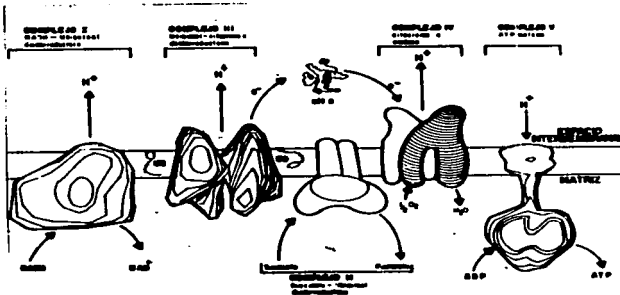
**Figura 7.** Grafica del flujo de electrones desde la oxidación del NADH hasta la reducción del oxígeno para la formación de agua. Se señalan los valores de potencial redox de los complejos mitocondriales, así como los cambios de energía libre que favorecen el bombeo de protones hacia el espacio intermembranal. (Tomado de Alberts, 1990)

<b>NADH-UQ-oxidoreductasa</b>	<b>complejo I</b>
<b>Succinato deshidrogenasa</b>	<b>complejo II</b>
<b>Ubiquinol-citocromo c oxidoreductasa</b>	<b>complejo III</b>
<b>Citocromo c oxidasa y</b>	<b>complejo IV</b>
<b>ATP sintetasa</b>	<b>complejo V</b>

En las figuras 8 se representan los complejos respiratorios de acuerdo a su estructura cristalográfica y en la figura 9 se esquematiza la ruta de transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, así como los inhibidores más conocidos para los complejos que pueden translocar protones; también se puede apreciar el sitio donde el citocromo c soluble puede ser reducido de manera artificial por el TMPD.

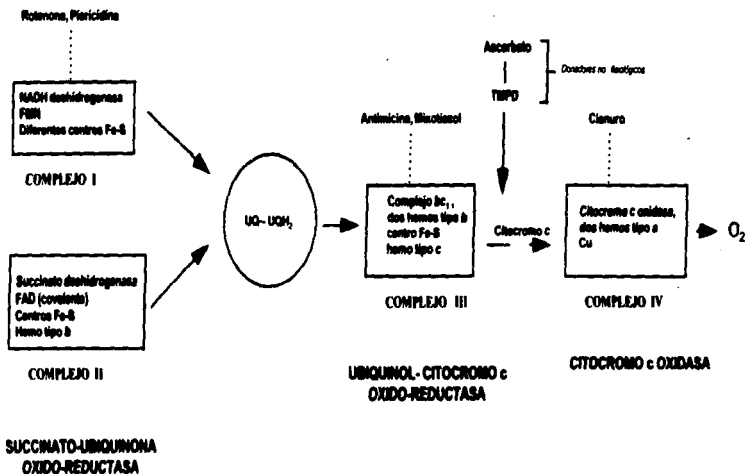
El complejo I posee más de 30 subunidades, en su constitución y su masa molecular es casi tan grande como la subunidad mayor ribosomal. Los centros óxido-reductores que presenta son una molécula de flavina (FMN) y 7 centros binucleares Fe-S. El complejo I transfiere dos electrones desde el NADH a una molécula de ubiquinona, asociado a una translocación de protones a través de la membrana interna. Su función es inhibible por la acción de rotenona y piericidina A.

Otro complejo que puede alimentar la cadena a nivel de la reducción de ubiquinona, es el complejo II, que transfiere los electrones desde el succinato proveniente del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. El complejo II está formado por varios péptidos, los más grandes en masa molecular conforman la succinato deshidrogenasa, la primera de estas subunidades presenta un FAD covalentemente unido, así como un centro Fe-S, el segundo péptido, de menor tamaño, también contiene un centro Fe-S. Se sabe que este complejo presenta un hemo tipo b unido a una de las subunidades menores, probablemente involucrado en el transporte de electrones hasta la quinona.



**Figura 8.** Esquema donde se muestran los complejos de la cadena respiratoria y la ATPasa  $F_1F_0$ , localizados en la membrana interna mitocondrial, así como la ubiquinona y el citocromoc soluble. (Tomado de González-Halphen, 1990).

**NADH-UBIQUINONA  
OXIDO-REDUCTASA**



**Figura 9.** Esquema donde se señalan los componentes clásicos de la cadena respiratoria mitocondrial y la dirección del flujo de electrones (flechas negras), así como los sitios generales de acción de algunos inhibidores específicos de los complejos respiratorios (líneas punteadas).

El complejo III o *bc<sub>1</sub>*, presenta un número variable de subunidades dependiendo del organismo, en bovino se conocen alrededor de 11, de estos péptidos, tres participan en la transferencia de electrones y presentan diferentes grupos redox asociados. Un centro Fe-S en la subunidad V, un hemo *c*<sub>1</sub> en la subunidad IV y dos hemos tipo *b* en la subunidad III. El complejo III puede transferir electrones desde la ubiquinona reducida hasta el citocromo *c* soluble, acopladamente a un bombeo de protones hacia el espacio intermembranal. El transporte de electrones puede ser inhibido en este punto de la cadena respiratoria por antimicina, mixotiazol o HQNO.

El último paso en la transferencia de electrones es efectuado por el complejo IV, que toma los electrones del citocromo *c* soluble y reduce al oxígeno con la generación de agua. Acopladamente a esta reacción la citocromo *c* oxidasa puede translocar protones hacia el espacio intermembranal.

El complejo IV presenta dos grupos redox asociados, el hemo *a* y el hemo *a*<sub>3</sub>, así como dos átomos de cobre (*Cu<sub>A</sub>* y *Cu<sub>B</sub>*). En el bovino se conocen más de 10 subunidades, pero se sabe que son las dos más grandes las que participan en la actividad del complejo, presentando estas últimas homología con las subunidades de la citocromo *c* oxidasa de bacterias, como la de *Paracoccus*. La actividad del complejo IV es inhibida por CO, cianuro y azida (Nicholls y Ferguson, 1992)

El empleo de la energía del transporte de electrones permite el bombeo de protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal por los complejos I, III y IV, lo que genera un gradiente electroquímico de protones, que es empleado por la ATP sintetasa (ATP *asa* *F<sub>1</sub>* *F<sub>0</sub>*) o complejo V; que mediante un flujo de protones hacia la matriz mitocondrial transforma la energía del gradiente electroquímico en energía química de enlace para la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi (Mitchell, 1961, Mitchell, 1975, Mitchell, 1979).

El gradiente electroquímico también puede ser empleado para el transporte de cationes a través de la membrana interna en contra de un gradiente de concentración,

así como de nucleótidos (ATP, ADP), Pi, piruvato, malato y succinato que dependen de energía.

El acoplamiento entre el transporte de electrones y el bombeo de protones es indispensable para la síntesis de ATP, si estas funciones son *desacopladas* por la disipación del gradiente de protones, la síntesis de ATP se detiene, pero no el transporte de electrones, y a pesar de que continúa el bombeo de protones, el gradiente no se genera. Se conocen algunas sustancias capaces de desacoplar estos procesos mediante el acarreamiento de protones a través de la membrana interna, equilibrando las concentraciones a ambos lados de la membrana, dando lugar a un corto circuito por la disminución la fuerza protón-motriz. Estas sustancias (ionóforos), que son ácidos débiles liposolubles, reciben el nombre genérico de agentes desacoplantes.

### **Las oxidasas alternas**

Los estudios de las mitocondrias de plantas han demostrado la presencia de algunos componentes proteicos membranales que no tienen contraparte similar en las mitocondrias de mamíferos, tal es el caso de las múltiples NADH o NADPH deshidrogenasas, que pueden oxidar las coenzimas endógenas o producidas fuera de la mitocondria, así como la existencia de oxidasas terminales alternas que son insensibles a cianuro y antimicina. El grado de insensibilidad de las mitocondrias de plantas a inhibidores del complejo IV, como cianuro, azida y CO, puede ir desde ligera tolerancia a completa resistencia, dependiendo de la fuente biológica (Lance y col., 1985, Siedow, 1990, Moore y Siedow, 1991, Hoefnagel y col., 1995, Day y col., 1994).

La localización de la oxidasas alterna de plantas, se ha propuesto en la membrana interna, con el sitio activo orientado hacia el lado de la matriz, pues se ha demostrado que el tratamiento con tripsina de partículas submitocondriales disminuye la actividad insensible a cianuro hasta en un 50%, lo que no ocurre cuando se realiza el experimento análogo con mitoplastos (Rasmussen, 1990).

Por estudios sobre el estado de reducción de las quinonas, el uso de análogos inhibitorios y extracción de quinonas de la membrana interna, se ha propuesto que el sitio de bifurcación de la oxidasa alterna en plantas se presenta a nivel de la poza de quinonas (Moore y Siedow, 1991). La actividad de la quinol oxidasa es inhibible por ácidos benzohidroxámicos como SHAM (Schonbaum y col., 1971), por n-propilgalato (Siedow y Girvin, 1980), disulfiram (Grover y Laties, 1981) y difenilamina (DPA) (Baker, 1963).

La purificación de algunas oxidasa alternas en plantas muestra la presencia de varias subunidades, entre 4 y 7, así como de algunas proteínas de menor tamaño. En estudios espectroscópicos no se ha observado la presencia de grupos hemo que funcionen como grupos óxido-reductores (Palmer y Huq, 1981).

La existencia de vías alternas del transporte de electrones se conocen para otros organismos como hongos (Guerin y col., 1994), protistas (Devars y col., 1992) y algas (Eriksson, 1995)., en general esta actividad insensible a cianuro presenta características similares a las reportadas para plantas, donde las oxidasa alternas son de tipo quinol oxidasa, con alta sensibilidad a SHAM y no participan en la generación del gradiente electroquímico.

Por otro lado, existe el antecedente en estudios en mitocondrias aisladas de *Euglena gracilis*, donde no se ha observado sensibilidad clara por SHAM en la actividad de oxidasa alterna, y ésta puede generar un potencial transmembranal sensible a desacopiantes (Moreno-Sánchez, datos no publicados). Es de resaltar que en eucariontes no se ha reportado previamente una oxidasa alterna que participe en la formación del gradiente electroquímico de protones. Por otro lado, se sugiere que esta oxidasa alterna de *Euglena gracilis*, no es una quinol oxidasa, y probablemente es una citocromo oxidasa.

En estudios realizados en mitocondrias aisladas de algas clorofitas, como *Chlamydomonas*, también se ha detectado actividad de oxidasa alterna por la

insensibilidad parcial a cianuro en el consumo de oxígeno, y sensibilidad de la actividad remanente a SHAM, sin embargo no se conoce que tipo de actividad presenta y si tiene alguna participación en la fosforilación oxidativa (Weger y col., 1990, Eriksson y col., 1995).

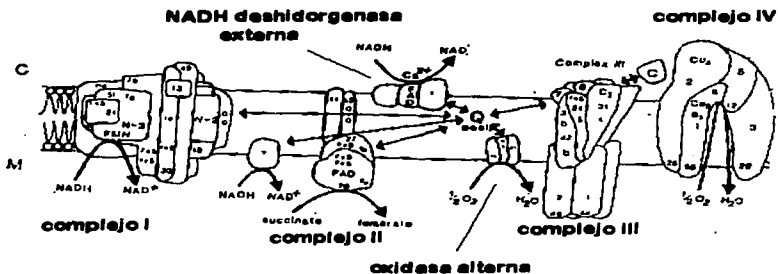
La presencia de citocromo y quinol oxidasas terminales alternas que pueden bombear protones es bien conocida en procariontes (Pustinen y col., 1989). Estas enzimas forman parte de un grupo muy relacionado entre sí, conocido como la familia de oxidasas respiratorias de hierro-cobre (García-Horsman y col., 1994), como son, entre otras, el complejo  $bo_3$  de *Escherichia coli*, los complejos *caa*<sub>3</sub> y *cao*<sub>3</sub> de *Bacillus* y un complejo no identificado totalmente en *Paracoccus denitrificans* y que presenta sensibilidad a mixotiazol, probablemente por que su acción es conjunta con el complejo *bc*<sub>1</sub>.

En la mayoría de los estudios sobre oxidasas alternas en plantas, como ya se mencionó, se ha demostrado que no existe participación de estas proteínas en la generación de el gradiente electroquímico a través de la membrana interna mitocondrial, en otras palabras, las oxidasas alternas en plantas no bombean protones hacia el espacio intermembranal (Siedow y col., 1978, Huq y Palmer, 1978<sub>A</sub>, Huq y Palmer, 1978<sub>B</sub>, Zhang y col., 1996) (Figura 10).

### ***Polytomella***

El género *Polytomella* fue descrito en 1910 (Arago, 1910) y en 1955 fueron aisladas seis diferentes especies con pequeñas diferencias morfológicas, pero provenientes de sitios muy distintos desde el punto de vista ecológico (Pringsheim, 1955). En clasificaciones actuales, *Polytomella* es ubicada dentro del phylum *Chlorophyta* en la familia *Chlamydomonadaceae* junto a géneros como *Polytoma* y *Chlamydomonas* (Melkonian, 1990) (Figura 11). Una característica especial de *Polytomella* es el que es uno de los pocos géneros de clorofitas que carece de capacidad fotosintética, al no presentar cloroplastos en ninguna de las etapas del ciclo





**Figura 10.** Componentes de la cadena respiratoria mitocondrial de plantas donde se puede observar una NADH deshidrogenasa externa ( pueden existir más de un tipo) y una oxidasa alternas (quinol-oxidasa). (Tomado de Moore y Siedow, 1991)

**A****B**

<b>Reino</b>	<b><i>Protoctista</i></b>
<b>Phylum</b>	<b><i>Chlorophyta</i></b>
<b>Clase</b>	<b><i>Chlorophyceae</i></b>
<b>Orden</b>	<b><i>Chlamydomonadales</i></b>
<b>Familia</b>	<b><i>Chlamydomonadaceae</i></b>
<b>Género</b>	<b><i>Polytomella</i></b>

**Figura 11. A)** Fotografía de *Polytomella* spp. tomada por Jorge Sepulveda, encargado de la Unidad de Microscopía Electrónica del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. **B)** ubicación taxonómica del género según Melkonian (Melkonian, 1990).

de vida. Otro aspecto característico de *Polytomella* es la ausencia de pared o cubierta celular, que si se presenta en la mayoría de los géneros de clorofitas (Conner, y col., 1989).

Los organismos comprendidos dentro del género *Polytomella* son unicelulares, caracterizados por la presencia de cuatro flagelos apicales, y como ya se mencionó, por la carencia de cloroplastos y pared celular glucoproteica. El análisis por microscopía ha demostrado que dentro de las células se encuentran gránulos de almidón como reserva de energía, que se han detectado por métodos de tinción con yodo, y que son fácilmente aislables por centrifugación en gradiente de sacarosa (Sheeler y col., 1968).

Las dimensiones de las células oscilan entre 17  $\mu\text{m}$  de largo y 11  $\mu\text{m}$  en la parte más ancha (Lewis y col., 1974). Otro tipo de estudios de microscopía electrónica muestran variaciones en la disposición y forma de las mitocondrias dependiendo del estado metabólico de la célula, y que se refleja en la actividad mitocondrial. Durante las etapas de crecimiento exponencial es posible observar numerosas mitocondrias (alrededor de cuarenta) de forma elongada y distribuidas en una zona a manera de banda en la periferia de la célula; cuando los cultivos están cerca de la fase estacionaria puede observarse una sola mitocondria, que ha sido considerada como resultado de la fusión de las mitocondrias que se observan en fases tempranas del cultivo. La modificación en el número y tamaño de las mitocondrias puede ser resultado de la demanda de la actividad respiratoria, ya que sabe que el consumo de oxígeno y la actividad específica de las enzimas mitocondriales en *Polytomella* declinan hacia la fase estacionaria de crecimiento (Cantor y Withroe, 1970, Cooper y Lloyd, 1972). Así, es posible que la disminución en el número de mitocondrias esté relacionada con la reducción de la actividad respiratoria (Burton y Moore, 1974).

El hecho de que existan géneros de algas incoloras, como es el caso de *Polytomella* dentro de las *Chlamydomonadales*, permite reconstruir, al menos en parte, la historia evolutiva de la clorofitas. Se ha propuesto el origen de esta rama de algas no fotosintéticas, a partir un grupo ancestral, similar a *Chlamydomonas*, que perdió la capacidad fotosintética y la cubierta (pared) celular (Round, 1980). Existen trabajos que

demuestran la similitud entre *Polytomella* y *Chlamydomonas*, a nivel de microscopía electrónica en la estructura del aparato flagelar (Brown y col., 1976<sub>A</sub>) y apoyada recientemente por estudios a nivel de secuencia en los genes nucleares  $\beta$ -*tub* que codifican para la tubulina en ambos géneros y que indican una similitud del 98%; un uso de codones muy parecido y una posición de intrones similar (Conner y col., 1989). Así mismo se sabe que existe una alta similitud entre las secuencias proteicas, (73.8%) de la subunidad I de la citocromo *c* oxidasa, codificada por el gene mitocondrial *cox 1*, de *Polytomella* y *Chlamydomonas*, que demuestra que el origen del grupo de algas incoloras, a partir del tronco de las *Chlamydomonadales*, ocurrió posteriormente al evento endosimbiótico entre el ancestro eucarionte y el ancestro mitocondrial (Antaramian y col., 1996).

Para el estudio de *Polytomella*, se han desarrollado cultivos donde puede mantenerse empleando acetato como única fuente de carbono, y enriquecidos con bacto triptona y extracto de levadura, sin agitación, entre 25° y 29° C (Pringsheim, 1955). Es necesaria la adición de tiamina y cianocobalamina al medio de cultivo para mantener en un nivel alto el contenido de grupos hemo tipo *a*, *b* y *c*, ya que la ausencia de estas vitaminas reduce la cantidad de estos grupos redox entre un 80 y 90% para los dos primeros, y un 40 % para el hemo tipo *c*, provocando alteraciones en la estructura de las mitocondrias (Cantor y Burton, 1975).

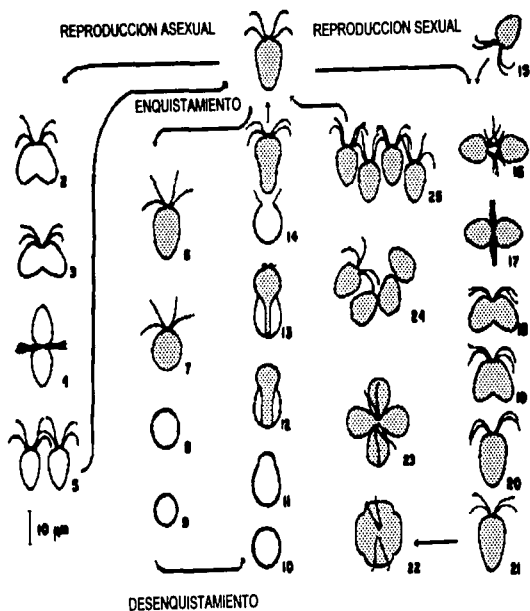
Existen pocos estudios sobre la función mitocondrial en *Polytomella*, pero se han aislado mitocondrias donde se ha podido determinar la presencia de hemos tipo *b*, *c*, *c*<sub>1</sub>, *a* y *a*<sub>3</sub>, flavoproteínas y sensibilidad en el transporte de electrones a antimicina, rotenona, piericidina y altas concentraciones de cianuro, lo cual indica la presencia de una cadena de transporte de electrones clásica (Lloyd y Chance, 1968). Otro tipo de estudios realizados con *Polytomella* han explorado diferentes aspectos del metabolismo mitocondrial, uno de ellos demuestra que la actividad de succinato oxidasa, NADH oxidasa y citocromo *c* oxidasa disminuye en mitocondrias aisladas a partir de cultivos crecidos en presencia de cloramfenicol, que es un inhibidor de la síntesis proteínas en mitocondrias (Lloyd y col., 1970). También se ha descrito la

posible inducción de un sistema enzimático mitocondrial que permite el crecimiento con propionato como única fuente de carbono (Lloyd y col., 1968).

La reproducción en *Polytomella* ocurre por fisión binaria, en una fase asexual, y por una fase sexual de tipo isogámica (Figura 12, estadios 1 a 5). La división de la célula en la fase asexual inicia desde la parte posterior (opuesta a los flagelos) y termina con una separación en la parte anterior hasta que se han formado los cuatro nuevos flagelos, el proceso toma entre 5 y 6 minutos. La isogamia puede ocurrir durante cualquier fase de crecimiento del cultivo (Figura 12, estadios 15 a 25), pero la frecuencia aumenta cuando la población alcanza una mayor densidad. Los isogametos monoicos son ligeramente menores en tamaño que los células vegetativas. Cuando ocurre el contacto, los isogametos se fusionan por la parte anterior generando un cigoto que solo presenta cuatro flagelos y movilidad como el resto de las células, este estadio puede durar de 3 a 3.5 horas, hasta que comienza a reducir su movilidad y se forman placas de división para generar 4 células hijas, de las cuales solo una retiene los cuatro flagelos originales, las tres restantes los generan posteriormente.

El proceso de enquistamiento ocurre en respuesta a las condiciones del medio y se presenta en cultivo poco antes de la fase estacionaria, durante esta etapa más del 80% de la población está constituida por quistes. El enquistamiento inicia cuando la célula vegetativa reduce su movilidad, toma una forma esférica y comienza a desarrollar la cubierta del quiste, se presenta una reducción de los organelos celulares, y aparentemente se pierden los flagelos (Lewis, y col., 1974, Brown, y col., 1976<sub>B</sub>, Brown, y col., 1976<sub>C</sub>) (Figura 12).

El estudio de los complejos mitocondriales purificados en protistas fotosintéticos, así como en otro tipo de algas relacionadas con *Polytomella*, como el caso de *Chlamydomonas*, presenta constantemente un problema debido a la contaminación con proteínas del cloroplasto, ya que desde los primeros pasos para intentar la purificación de proteínas mitocondriales, la fracción mitocondrial aislada presenta regularmente membranas tilacooidales como contaminantes (Atteia, y col., 1992, Atteia, y col., 1994). Sin embargo, el inconveniente que representa la existencia de plástidos



**Figura 12.** Historia de vida de *Polytomella* spp. donde se observan las fases asexual (1-5) y sexual de reproducción (15-22), enquistamiento (6-9) y desenquistamiento (10-14). (Lewis, 1974).

para el estudio de la función mitocondrial en algas, no se presenta en *Polytomella*, ya que como se mencionó con anterioridad, ésta carece de cloroplastos, lo que representa una ventaja inicial para la purificación de proteínas mitocondriales .

Por otro lado, *Polytomella* presenta otra ventaja sobre *Chlamydomonas* para el estudio de la función mitocondrial, ya que al no presentar pared celular permite el empleo de métodos de ruptura celular que ocasionen un mínimo daño a las mitocondrias aisladas, y facilite la obtención de una preparación mitocondrial con la mayoría de las membranas intactas.

### **Antecedentes directos**

Aprovechando las características de *Polytomella* se han realizado varios trabajos sobre los complejos mitocondriales a distintos niveles, como ya se mencionó se tienen preparaciones purificadas y activas del complejo *bc1* (Gutiérrez-Cirlos y col., 1994), de la citocromo *c* oxidasa (Pérez-Martínez, Vázquez-Acevedo y González-Halphen, datos no publicados) y de la ATPasa  $F_1F_0$  (Atteia, Dreyfus y González-Halphen, datos no publicados); así como las secuencias de la subunidad I (*cox I*) (Antaramián y col., 1996) y parcial de la subunidad II (*cox II*) (Vázquez-Acevedo y González-Halphen, datos no publicados) de la citocromo *c* oxidasa.

La obtención de de mitocondrias intactas a partir de cultivos axénicos de *Polytomella* debe resultar sencilla, debido a las características biológicas ya mencionadas de esta alga incolora.

### **Hipótesis de trabajo**

El aislamiento de las mitocondrias de *Polytomella* con métodos mecánicos simples de ruptura, como es la homogenización manual, y aprovechando la ausencia de cloroplastos, que reduce la contaminación por otro tipo de membranas , permitirá el

estudio de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa en algas unicelulares evitando los inconvenientes por destrucción de mitocondrias y presencia de restos tilacoidales.

Por los resultados obtenidos anteriormente con *Polytomella* se puede esperar la presencia de una cadena respiratoria clásica (Lloyd y Chance, 1968). Así mismo por lo reportado para *Chlamydomonas* (Eriksson y col, 1995), que como ya se mencionó es un género muy relacionado con *Polytomella*, existe la posibilidad de que exista una cadena alterna del transporte de electrones, insensible a cianuro.



## **Objetivos**

### **Generales**

Desarrollar un método para el aislamiento de mitocondrias intactas del alga incolora *Polytomella* que presenten control respiratorio.

Realizar una evaluación de la respuesta a diferentes sustratos oxidables, así como el efecto de inhibidores del transporte de electrones.

### **Particulares**

Caracterizar la respiración insensible a cianuro en *Polytomella*, posiblemente debida a la presencia de una oxidasa terminal alterna.

Analizar algunas de las características de la posible oxidasa alterna y el papel que tiene en la cadena respiratoria de *Polytomella*.

## **Métodos y Materiales**

### **Mantenimiento en cultivo y cosecha de células de *Polytomella* spp.**

El cultivo original de *Polytomella* spp. que se conserva en el laboratorio proviene del cepario Semming von Algenkulturen que se localiza en el Pflanzphysiologisches Institut en la Universidad de Göttingen, Alemania y ha sido depositada en el cepario del Departamento de Biotecnología del CINVESTAV del Instituto Politécnico Nacional.

Para el mantenimiento de cultivos frescos de *Polytomella* se inocularon medios esterilizados preparados de acuerdo a una modificación a lo reportado por Wise (1955 y 1959), adicionando alícuotas de cultivos en fase exponencial de crecimiento que constituyeran el 5 % del volumen total del medio esterilizado. El medio contiene acetato de sodio 0.4 % p/v, extracto de levadura 0.2 % p/v y bacto triptona 0.2 % p/v, así como vitaminas B<sub>1</sub> y B<sub>12</sub> en concentraciones de 0.01 mg/ml y 0.5 µg/ml, respectivamente, debido al efecto ya mencionado que provoca la falta de estas vitaminas en la estructura mitocondrial y en el contenido de grupos hemo (Cantor y Burton, 1975).

El medio preparado se depositó en volúmenes de 2 litros dentro de matraces de base ancha para favorecer el intercambio de gases en cultivos estancados, ya que la agitación produce ruptura celular y disminuye el rendimiento del cultivo, el volumen del medio ocupaba el 50 % de la capacidad del matraz. Es importante que la temperatura se mantenga entre 25° y 28° C, porque temperaturas fuera de este intervalo provocan la disminución del ritmo de multiplicación y favorecen el enquistamiento. La cosecha de células se efectuó 48 horas después de la inoculación, cuando el cultivo se encuentra en la fase exponencial de crecimiento, por medio de una centrifugación a 3,500 x g por 10 minutos.

### **Aislamiento de mitocondrias de *Polytomella***

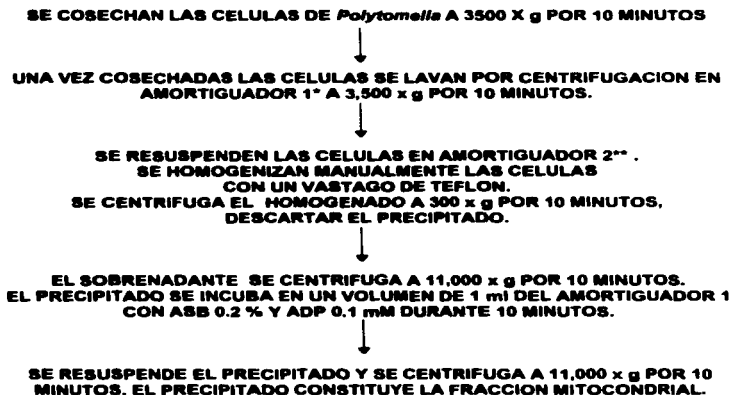
Una vez cosechadas las células se resuspendieron en un amortiguador que contenía sacarosa 250 mM, MOPS 10 mM EGTA 2 mM a pH 7.5 (SME), para efectuar un lavado por centrifugación a 3,500 x g por 10 minutos. Las células así lavadas se resuspendieron para ser homogenizadas en un amortiguador de la mismas características del que se empleó para el lavado (SME), más polivinilpirrolidona (PVP) al 0.7 % p/v, cisteína 0.4 mM y albúmina de suero bovino libre de lípidos (ASB) al 0.2 %, adicionando de 12 a 15 ml del amortiguador a las células cosechadas de cada 2 litros de cultivo.

La ruptura de las células se efectuó por un medio mecánico manual, empleando un vástago de teflón en un tubo de vidrio de un volumen de 10 ml. El homogenado obtenido se centrifugó a 300 x g durante 10 minutos, descartando el precipitado; el sobrenadante, donde se localiza la fracción mitocondrial, se centrifugó a 11,000 x g por 10 minutos, el precipitado obtenido fue resuspendido en un volumen de 1 ml de amortiguador SME para una incubación con ADP 2 mM y ASB 0.2 %. Después del tiempo de incubación se adicionó un mayor volumen de amortiguador SME (12 ml aproximadamente) para resuspender la fracción mitocondrial para realizar una última centrifugación a 11,000 x g durante 10 minutos, el precipitado se resuspendió en 1 ml de amortiguador SME y las mitocondrias así aisladas se emplearon en los ensayos experimentales descritos a continuación. El método de obtención de mitocondrias se resume en la figura 13.

### **Consumo de oxígeno**

Para la medición del consumo de oxígeno en las mitocondrias se utilizó un electrodo de oxígeno tipo Clark con un amortiguador de incubación que contenía KCl 120 mM, MOPS 10 mM, EGTA 1 mM y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1 mM a pH 7.2 (amortiguador KME), en una cámara de 1.9 ml de volumen, con agitación constante a 25° C.

## **AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS DE *Polytomella***



\* Sacarosa 250 mM  
MOPS 10 mM  
EGTA 1 mM  
pH 7.5 (Tris)

\*\* Sacarosa 250 mM  
MOPS 10 mM  
EGTA 1 mM  
PVP 0.7%  
Cisteína 0.4 mM  
ASB 0.2 %  
pH 7.5 (Tris)

**Figura 13.** Método para el aislamiento de mitocondrias de *Polytomella* spp.

### **Oxidación de sustratos**

Después de incubar las mitocondrias en la cámara con el amortiguador KME durante un minuto ( 1 mg de proteína mitocondrial por ml de amortiguador), se adicionaron los diferentes sustratos, registrando el consumo de oxígeno en un graficador conectado al oxímetro durante intervalos de 3 a 6 minutos. Los sustratos empleados fueron succinato 1mM, malato 0.5 mM, glutamato 0.5 mM,  $\alpha$ -cetoglutarato 0.5 mM, L-lactato 10 mM y NADH 1mM. La velocidad de respiración se determinó para cada caso considerando la solubilidad del oxígeno en agua de 400 ngatomos  $O_2$ / ml, a 30°C, a una altitud de 2240 metros sobre el nivel medio del mar.

Para explorar el estado de acoplamiento de las mitocondrias aisladas de *Polytomella*, se adicionó ADP 0.5 mM y fosfato (Pi) en presencia de los diferentes sustratos, con la finalidad de poder calcular el cociente de la velocidad de respiración en presencia de ADP y Pi (estado 3), sobre la velocidad de respiración en ausencia de ADP (estado 4), que se conoce como control respiratorio, y es utilizado como un parámetro importante para conocer el estado de integridad de las membranas mitocondriales.

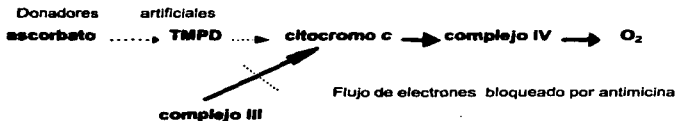
El efecto de inhibidores sobre el consumo de oxígeno se analizó de dos formas distintas: en la primera, el inhibidor se agregó a la cámara de incubación una vez que se había registrado una línea basal de consumo de oxígeno durante 2 minutos en presencia de los diferentes sustratos oxidables; en la segunda, las mitocondrias se incubaron por 1 minuto con el inhibidor, y el sustrato se adicionó posteriormente. Los inhibidores empleados fueron cianuro, antimicina y HQNO, considerados como inhibidores de la vía clásica, así como DPA (Baker, 1963), SHAM (Douce, 1985, Douce, 1977, Bomsel y Calvayrac, 1978) disulfiram (Grover y col., 1981, Keiner y Alexander, 1986) y n-propilgalato (Carre y col., 1988), que son reportados como inhibidores de oxidasas alternas.

Con los datos de oxidación de sustratos y respuesta a inhibidores se elaboraron curvas de sensibilidad, con el fin de poder determinar algunas de las constantes de inhibición para cada caso.

#### **Actividad de ascorbato-TMPD oxidasa**

Para detectar la actividad en el consumo de oxígeno que corresponde solo a la citocromo *c* oxidasa (complejo IV), se emplearon los donadores artificiales de electrones ascorbato y TMPD, que pueden reducir directamente al citocromo *c* soluble, y éste a su vez ser oxidado por el complejo IV, que transfiere los electrones al oxígeno. Estos ensayos se efectuaron en presencia de 1  $\mu\text{M}$  de antimicina para evitar el flujo de electrones desde el complejo III hacia el citocromo *c* soluble. Midiendo de esta forma la actividad de citocromo *c* oxidasa se construyeron curvas de titulación con cianuro y DPA.

La actividad de la citocromo oxidasa empleando ascorbato y TMPD como donadores de electrones se esquematiza a continuación:



## **Potenciales transmembranales**

Para determinar la generación de potenciales transmembranales por las mitocondrias de *Polytomella* se empleó la medición del cambio de absorbancia de la safranina, que ocurre como respuesta a un cambio en la magnitud del potencial transmembranal (Akerman y Wikström, 1976).

Un cambio en la intensidad del potencial modifica las propiedades electrocrómicas de la safranina, lo que permite emplearla como indicador, un aumento en la magnitud del potencial se refleja en un aumento de la absorbancia de la safranina.

Para realizar los ensayos se incubaron las mitocondrias (0.8 - 1 mg) en cubetas de 3 ml con medio KME y safranina 8  $\mu$ M, posteriormente se adicionó el sustrato oxidable a la misma concentración empleada para los experimentos de consumo de oxígeno, y se registró el cambio de absorbancia en un espectrofotómetro de doble rayo en la modalidad de dos haces de luz a 554 y 520 nm. Después se adicionaron alternativamente los diferentes inhibidores y desacoplantes para observar su efecto en el potencial transmembranal, todos los experimentos se realizaron con oxigenación constante y a 30° C.

## **Síntesis de ATP**

Se realizó una cuantificación de síntesis de ATP en mitocondrias de *Polytomella* por medio de la incorporación de  $^{32}$ P al ATP formado en presencia de diferentes sustratos oxidables, y en otros casos con inhibidores del transporte de electrones o desacoplantes.

Las mitocondrias (1 mg) fueron incubadas por 2 minutos en 1 ml de medio KME con glucosa 5 mM, fosfato de sodio 5 mM, hexocinasa de levadura, y  $2 \times 10^6$  cpm/ml

de  $^{32}\text{P}$ , a una temperatura de 30°C. La concentración de sustratos corresponde a la utilizada para los experimentos de consumo de oxígeno.

La reacción de fosforilación se inició con la adición de ADP 0.5 mM pH 7.2 a las mitocondrias previamente incubadas con los sustratos y en cada caso con inhibidores o desacoplantes, después de 3 minutos la reacción se detuvo con ácido tricloroacético (TCA) al 6% p/v. Posteriormente por centrifugación se separó el precipitado correspondiente a la fracción mitocondrial, se tomó 1 ml del sobrenadante para realizar la extracción del  $^{32}\text{P}$  no incorporado a la glucosa por actividad de la hexocinasa. Los pasos de extracción comprendieron el uso de molibdato para atrapar el  $^{32}\text{P}$  no incorporado, solubilizando el complejo molibdato- $^{32}\text{P}$  con acetona y acetato de n-butilo, para separarlo de la fase acuosa. Finalmente se efectuó una lectura en un contador de centelleo para determinar la cantidad de ATP sintetizado (Lindeberg y Ernster, 1951).

### **Determinación de proteína**

Para la cuantificación de la proteína mitocondrial se empleó el método desarrollado por Lowry y col., (1951) con la modificación reportada por Markwell y col., (1978). Se elaboró una curva patrón empleando una solución estándar de ASB para preparar diez diferentes diluciones con agua bidestilada hasta un volumen final de 1 ml, esto dentro de un intervalo de concentración de 10 a 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , con incrementos sucesivos de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para cada dilución. Posteriormente a cada tubo se le agregaron 3 ml de la solución (C) preparada en una relación 100:1 de (A) (carbonato de sodio 2%, hidróxido de sodio 0.4%, tartrato de sodio 0.16% y dodecil sulfato de sodio 0.1%) con (B) (sulfato de cobre 0.4%) dejando incubarse cada tubo preparado por 10 minutos a 20°-25°C. Después del periodo de incubación se adicionaron a cada dilución 3  $\mu\text{l}$  de una mezcla de reactivo de Folin con agua bidestilada en relación 1:1 y se incubaron por 30 minutos. De las muestras de mitocondrias aisladas se prepararon diluciones 1:5 y 1:10 con agua bidestilada, de estas se tomaron 5, 10 y 15  $\mu\text{l}$  respectivamente, llevando a un volumen final de 1 ml con agua bidestilada. A continuación se practicó el mismo procedimiento que para los tubos de la curva patrón. Finalmente se registró la



**absorbancia de cada dilución en un espectrofotómetro a 540 nm, la absorbancia es proporcional al contenido de proteína.**

## **Resultados**

### **Aislamiento de mitocondrias y oxidación de sustratos**

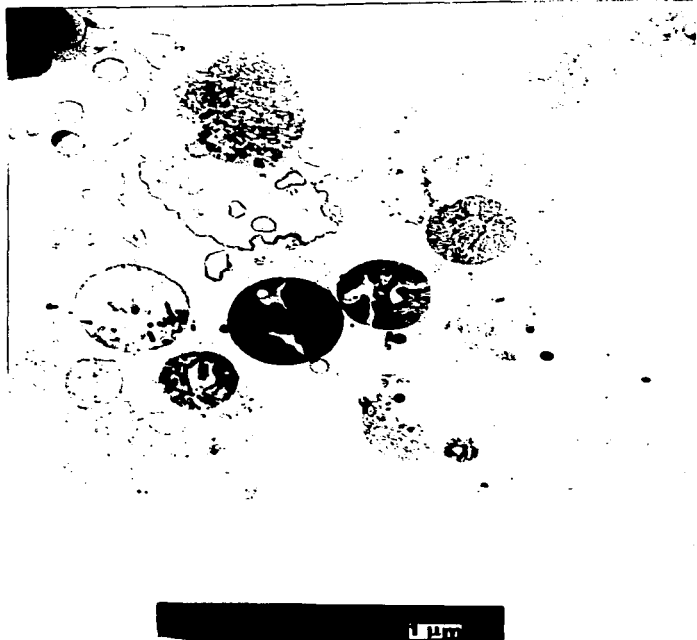
Uno de los objetivos del presente trabajo era el de obtener una preparación mitocondrial que presentara control respiratorio, que como ya se mencionó en la sección de métodos, constituye un parámetro muy importante para conocer el estado de integridad que presentan las mitocondrias.

Para el aislamiento de mitocondrias se desarrolló el método descrito anteriormente y se exploró su efectividad mediante la respuesta a la adición de ADP y desacoplantes en ensayos de oximetría, así como por microscopía electrónica (Figura 14).

Los experimentos de oxidación de sustratos muestran que las mitocondrias aisladas de *Polytomella* pueden consumir oxígeno utilizando succinato y malato como sustratos, pero no así cuando NADH, L-lactato o  $\alpha$ -cetoglutarato son empleados como sustratos oxidables. (Tabla I)

Se observa en la tabla I que de los dos sustratos que estimulan la respiración, succinato es quien lo hace en mayor grado; es importante mencionar que las concentraciones de sustrato empleadas en estos experimentos exceden varias veces, cerca de cuarenta veces, las Km reportadas para enzimas similares en *Euglena gracilis* (Uribe, 1992).

En ningún caso la adición de ADP estimuló la respiración en las mitocondrias de *Polytomella* (Figura 15- A), de la misma forma, la adición de desacoplantes como CCCP (Figura 15-B) y 2,4-dinitrofenol, no permitió ver algún incremento en la velocidad de respiración, por lo que no se obtuvo control respiratorio, y aparentemente, las mitocondrias no presentan acoplamiento entre el transporte de electrones y la síntesis de ATP, al no poder distinguir diferencias entre un estado 3 y un estado 4 (Figura 15) .



**Figura 14.** Micrografías de microscopía electrónica de transmisión de la preparación mitocondrial obtenida con el método descrito, donde se observan mitocondrias intactas y fragmentos membranales. Fotografías tomadas por Jorge Sepulveda de la Unidad de Microscopía Electrónica de Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

**Oxidación de sustratos en mitocondrias  
aisladas de *Polytomella***

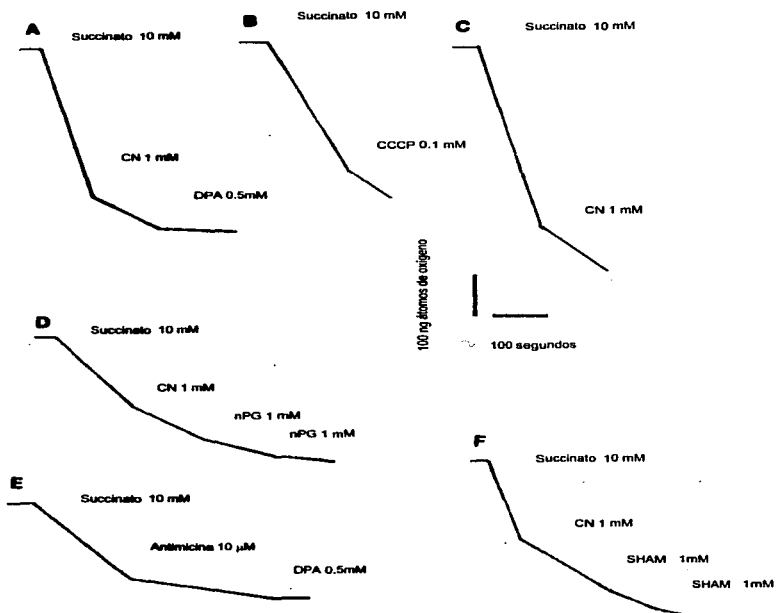
<b>Sustrato</b>		<b>ng atomos/ oxígeno/min/ mg proteína</b>
<b>Succinato</b>	<b>10 mM</b>	<b>25.38 ± 3.77</b>
<b>Malato</b>	<b>5 mM</b>	<b>10.23 ± 2.53</b>
<b><math>\alpha</math>-cetoglutarato</b>	<b>10 mM</b>	----
<b>NADH</b>	<b>10 mM</b>	----
<b>L-lactato</b>	<b>10 mM</b>	----

**Tabla 1.** Velocidad de consumo de oxígeno por las mitocondrias aisladas de *Polytomella* utilizando diferentes sustratos.

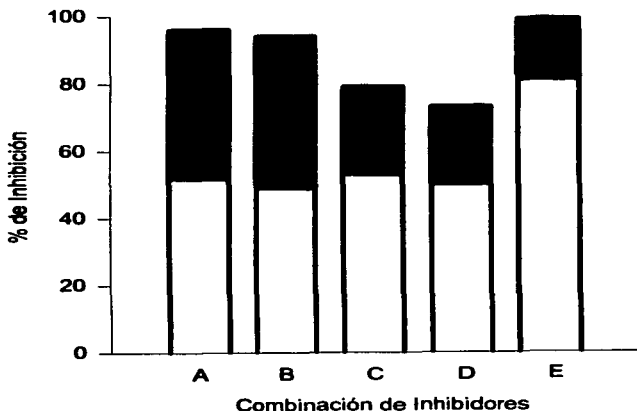
Con el fin de conocer algunas características del transporte de electrones en las mitocondrias de *Polytomella*, se realizaron experimentos para analizar la respuesta a diferentes inhibidores clásicos de la cadena respiratoria; se seleccionó succinato como sustrato para estos estudios, porque es el que incrementa en mayor grado el consumo de oxígeno y por lo tanto permite una mejor determinación del efecto de cada compuesto sobre la velocidad de respiración. Los resultados indicaron que la velocidad en el consumo de oxígeno es sólo parcialmente inhibida por la adición de cianuro (CN) 1mM (Figura 15-C), que es un inhibidor clásico del complejo IV o citocromo c oxidasa. Tomando en cuenta lo anterior y los datos sobre la sensibilidad total a cianuro que presenta la citocromo c oxidasa de *Polytomella* en una fracción purificada (Pérez-Martínez y González-Halphen, datos no publicados), se ha pensado que la actividad de oxidasa remanente en presencia de cianuro puede deberse a la presencia de una oxidasa alterna insensible a cianuro en las mitocondrias de *Polytomella*.

La existencia de una oxidasa alterna en *Polytomella* debe considerarse probable, pues en otra algas clorofitas, como *Chlamydomonas*, ya se ha reportado actividad en el consumo de oxígeno insensible a cianuro, y esta actividad residual es sensible a inhibidores de oxidasas alternas de plantas, como el ácido salicilhidroxámico o SHAM (Webster y Hackett, 1965, Sargent y Taylor, 1972, Goyal y Tolbert, 1989, Weger y col., 1990 y Eriksson y col., 1995). Para conocer las características de esta actividad insensible a cianuro en *Polytomella*, se realizaron ensayos de consumo de oxígeno con cianuro en combinación con inhibidores de oxidasas alternas en plantas y otros organismos como DPA, disulfiram, n-propilgalato y el mismo SHAM (Siedow y Girvin, 1980, Moore y Siedow, 1991, Uribe 1992, Uribe y col., 1992).

Las velocidades de respiración obtenidas indican que la actividad insensible a cianuro es inhibida totalmente por la adición de DPA 0.5 mM (Figura 15-A), pero no ocurre lo mismo con los otros inhibidores de oxidasas alternas utilizados (Figura 16), de tal forma, difenilamina resultó ser un inhibidor potente de la actividad residual de respiración; el efecto de nPG (Figura 15-D) y disulfiram es inhibitorio, pero no anula por completo el consumo de oxígeno; para el caso de SHAM (Figura 15-F), que es reportado como inhibidor específico de oxidasas alternas en plantas, parece que no



**Figura 15.** Trazos de oximetría con las mitocondrias aisladas de *Polytomella*. En todos los casos se empleó succinato 10 mM como sustrato. La concentración final de los inhibidores son cianuro (1 mM), difenilamina (0.5 mM), antimicina (10 mM), *n*-propil galato (1 mM), SHAM (1 mM) y del desacoplante CCCP (0.1 mM). La de ADP es de 0.5 mM.



**Figura 16.** Gráfica donde se muestran los porcentajes de inhibición del consumo de oxígeno cuando se prueban mezclas de cianuro (1 mM) con tres inhibidores de cadena alterna DPA (0.5 mM) **A**, nPG (2 mM) **C** y disulfiram (3 mM) **D**; así como de antimicina (10 mM) con DPA (0.5 mM) **E**. La columna **B** es la misma combinación que en el caso **A**, pero invirtiendo el orden de adición. Las barras claras indican el porcentaje de inhibición producido por la adición del primer inhibidor, las barras oscuras indican el total de inhibición alcanzado después de la adición del segundo inhibidor.  
**A** cianuro-DPA, **B** DPA-cianuro, **C** cianuro-nPG, **D** cianuro-disulfiram, **E** antimicina-DPA.

actúa como tal de la respiración resistente a cianuro en las mitocondrias de *Polytomella*, incluso a concentraciones muy altas, que en otras algas serían inhibitorias (Weger y col., 1990, Goyal y Tolbert, 1989).

Los datos anteriores sugieren la presencia de una oxidasa alterna que es insensible a cianuro, parcialmente sensible a disulfiram y nPG y totalmente sensible a difenilamina.

Por otro lado, en los experimentos con los inhibidores de la cadena clásica de transporte de electrones ( Figura 15-E y Tabla II) muestran que antimicina, inhibidor clásico del complejo III o ubiquinol-citocromo c oxidoreductasa, es un inhibidor muy eficiente de la respiración total en las mitocondrias de *Polytomella*.

Con el fin de conocer con mayor detalle el efecto de inhibidores y diseccionar la actividad de la posible oxidasa alterna, se analizaron los experimentos de titulación con los distintos inhibidores, en todos los casos utilizando succinato como el sustrato oxidable. La curva de titulación con cianuro (Figura 17) indica que aun a concentraciones de 1 mM existe actividad en el consumo de oxígeno (42 % de la actividad sin cianuro), si bien a una concentración de 3 mM (dato no mostrado), setenta veces la  $K_i$  determinada para citocromo c oxidasa en mitocondrias de *Polytomella* (este trabajo, Figura 20), se presenta una inhibición de más del 80%. Sin embargo, a tan alta concentración, el efecto bien puede ser inespecífico.

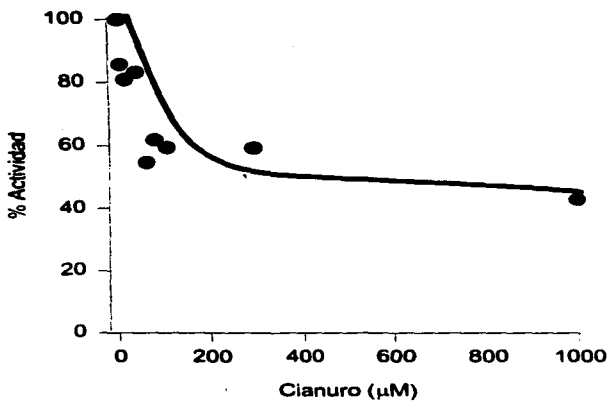
En otro tipo de titulaciones con los inhibidores de oxidasas alternas DPA y n-PG, donde en todos los ensayos se encontraba presente cianuro a una concentración de 0.5 mM (más de diez veces la  $K_i$  calculada), se observa que DPA a una concentración de 0.5 mM, inhibe totalmente la respiración insensible a cianuro (Figura 18), para nPG también se presenta una reducción en la velocidad de consumo de oxígeno pero menor efectividad como inhibidor de la actividad de oxidasa alterna, pues a concentraciones altas no se alcanza una inhibición total (Figura 19). De lo anterior se puede pensar que la probable oxidasa alterna de *Polytomella* es altamente sensible a DPA y en menor grado sensible a nPG.



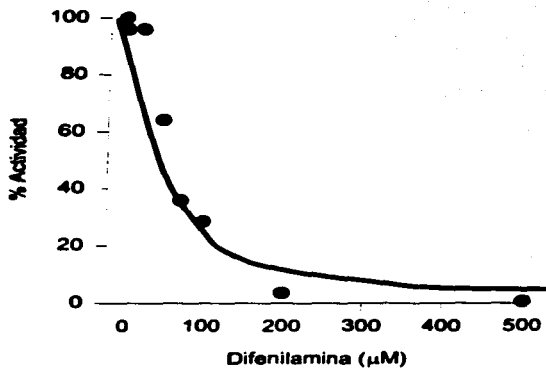
**Efecto de inhibidores del transporte de electrones  
sobre el consumo de oxígeno en  
mitocondrias de *Polytomella***

<b>Inhibidor</b>		<b>Porcentaje de inhibición</b>
<b>Cianuro</b>	<b>1 mM</b>	<b>46.53 ± 4.12</b>
<b>Cianuro</b>	<b>2 mM</b>	<b>67.84 ± 1.97</b>
<b>Difenilamina</b>	<b>0.25 mM</b>	<b>53.41 ± 17.02</b>
<b>Difenilamina</b>	<b>0.5 mM</b>	<b>62.3 ± 15.21</b>
<b>n- propil galato</b>	<b>2 mM</b>	<b>50.4 ± 16.1</b>
<b>Disulfiram</b>	<b>2 mM</b>	<b>35.7 ± 11.5</b>
<b>Antimicina</b>	<b>50 mM</b>	<b>82.32 ± 1.97</b>

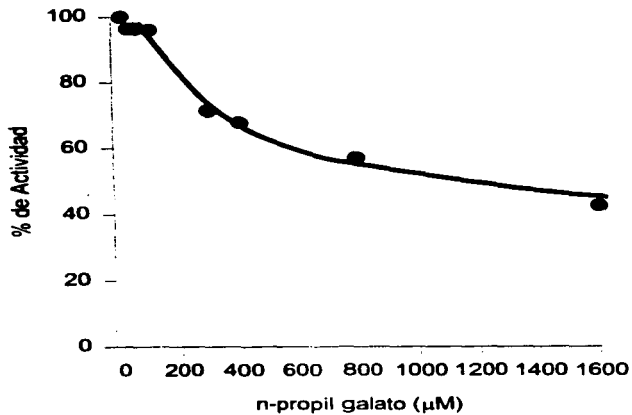
**Tabla II.** Efecto de inhibidores clásicos de la cadena respiratoria y de oxidasas alternas sobre la actividad de consumo de oxígeno en mitocondrias de aisladas de *Polytomella*, empleando succinato como sustrato oxidable.



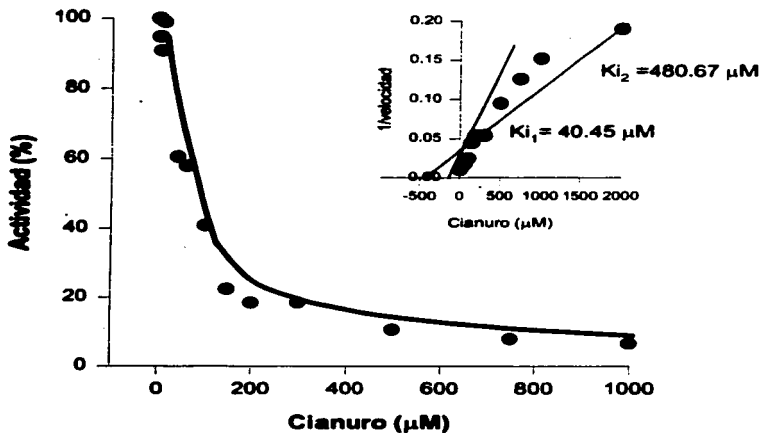
**Figura 17.** Efecto del cianuro sobre la actividad de consumo de oxígeno empleando succinato 10 mM como sustrato.



**Figura 18.** Efecto de difenilamina sobre la actividad de consumo de oxígeno con succinato 10 mM como sustrato, en presencia de cianuro 0.5 mM.



**Figura 19.** Efecto de n-propilgalato de la actividad de consumo de oxígeno con succinato 10 mM como sustrato en presencia de cianuro 0.5 mM.

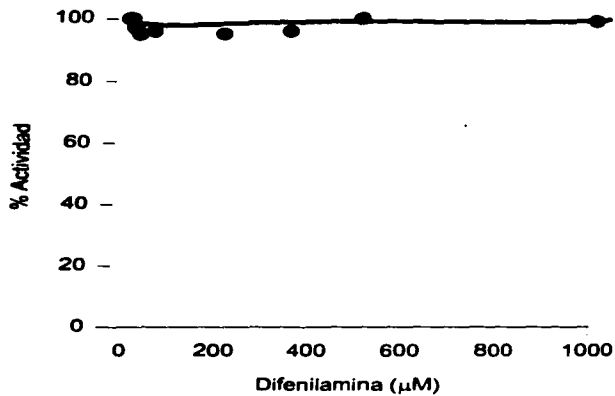


**Figura 20.** Efecto de cianuro sobre la actividad de ascorbato-TMPD oxidasa. En la grafica interna se muestra el regráfico de Dixon para la determinación de la constante de inhibición ( $K_i$ ).

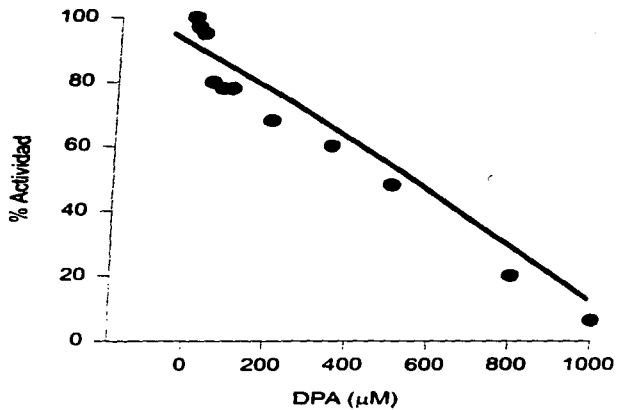
Para determinar el efecto de cianuro en la actividad debida solamente al complejo IV en las mitocondrias de *Polytomella*, podemos observar que el consumo de oxígeno en presencia de antimicina y utilizando el par ascorbato-TMPD como reductores, es totalmente sensible a cianuro (Figura 20), obteniéndose una inhibición del 92% a una concentración de 1 mM, recordemos que a esta misma concentración solo se obtiene un 42 % de inhibición en el consumo de oxígeno con succinato como sustrato (Figura 17), con el análisis de Dixon (Figura 20) se pudieron determinar dos componentes, lo que permitió calcular dos diferentes constantes de inhibición, una de alta afinidad (40  $\mu$ M) y una de baja afinidad (360  $\mu$ M). Una titulación similar pero empleando DPA como inhibidor en la actividad del complejo IV medida con ascorbato-TMPD permite apreciar que no existe un efecto evidente sobre la actividad de la citocromo *c* oxidasa a las concentraciones utilizadas en los experimentos mencionados (Figura 21).

Por otro lado, curvas de titulación construidas sólo con DPA y registrando consumo de oxígeno con succinato como sustrato, muestran una inhibición muy alta en la respiración a concentraciones por arriba de 0.5 mM (Figura 22), esto puede estar mostrando un efecto adicional de DPA sobre la citocromo *c* oxidasa cuando se adiciona en mayores concentraciones. Se sabe que DPA puede inhibir al complejo IV por experimentos realizados con una preparación purificada de citocromo *c* oxidasa de *Polytomella* (Pérez-Martínez y González-Halphen, datos no publicados), sin embargo el análisis de Dixon solo muestra un solo componente para la inhibición con DPA, con una constante de inhibición de 8  $\mu$ M, esto estaría mostrando un solo efecto de DPA sobre la actividad en las mitocondrias de *Polytomella*, para determinar con mayor claridad el efecto que tiene la adición de difenilamina deben efectuarse titulaciones con un número mayor de puntos, para poder distinguir otro componente, si es que en realidad existe un efecto doble. Cabe mencionar que durante todos los experimentos previos la concentración mas alta de DPA empleada fue de 0.5 mM

La titulación con antimicina, indica una inhibición muy alta de la respiración cuando las mitocondrias oxidan succinato (Figura 23). En general se sabe que las

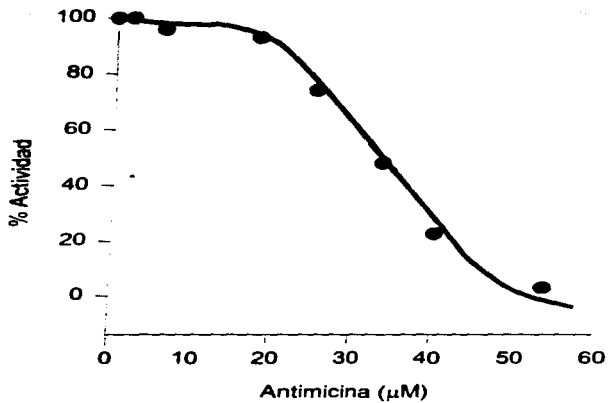


**Figura 21.** Efecto de difenilamina sobre la actividad de ascorbato-TMPD oxidasa.



**Figura 22.** Efecto de difenilamina sobre la actividad de consumo de oxígeno con succinato 10 mM como sustrato.



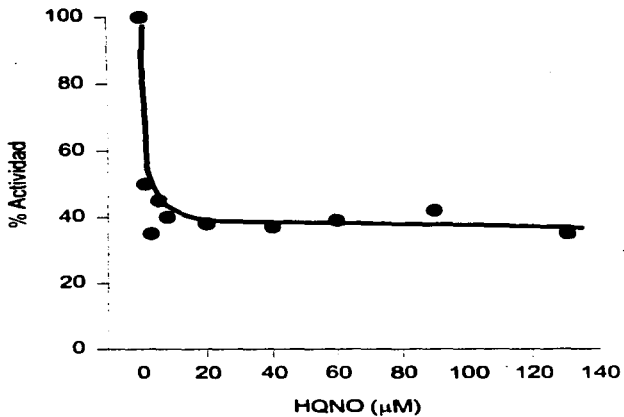


**Figura 23.** Efecto de antimicina sobre la actividad de consumo de oxígeno con succinato 10 mM como sustrato.

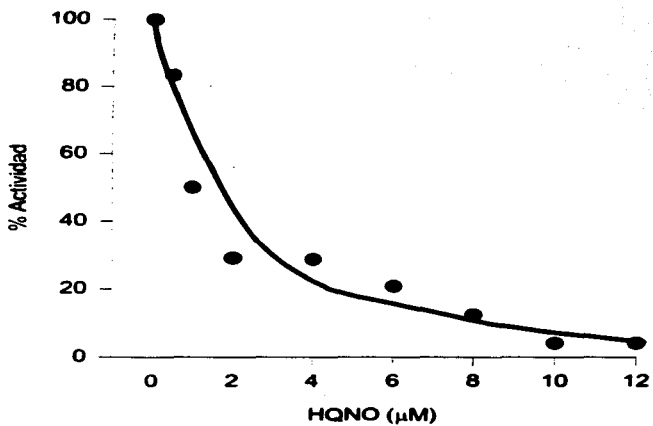
oxidasas alternas en plantas son insensibles a la acción de antimicina (Moore y Siedow, 1991), debido a que son reducidas por ubiquinol y el bloqueo del transporte de electrones a nivel del complejo III no afecta directamente su actividad, sin embargo, para el caso de mitocondrias de *Polytomella* no se detecta un consumo de oxígeno remanente cuando se interrumpe el flujo de electrones con antimicina. Lo anterior indicaría que la probable oxidasa alterna de *Polytomella* no sería una quinol-oxidasa típica de plantas, sino que su ramificación de la cadena respiratoria se encuentra más adelante de la reducción del complejo III, lo que descartaría, en primera instancia, que se trate de una proteína con actividad de quinol oxidasa. Otra posibilidad, que no es posible descartar con estos experimentos, es que la misma antimicina sea un inhibidor de la oxidasa alterna.

El uso de HQNO, otro inhibidor del complejo III, muestra que existe una sensibilidad en la respiración (Figura 24), esto tiene cierta correlación con el efecto de antimicina, ya que al inhibir a la ubiquinol-citocromo *c* oxidoreductasa, se observa un efecto similar en el consumo de oxígeno, pero permanece una actividad remanente en el consumo de oxígeno (28 %). En este caso, existe un punto importante respecto al efecto que pudiera tener el HQNO directamente sobre la oxidasa alterna, ya que se sabe puede actuar como inhibidor de quinol oxidasas que funcionan como oxidasas alternas en plantas. En la curva de titulación con HQNO en presencia de cianuro (Figura 25) podemos observar una gran disminución del consumo de oxígeno, no obstante que la actividad de oxidasa alterna en el caso de *Polytomella* no parece debida a una quinol oxidasa.

Los datos de oximetría sugieren que en las mitocondrias de *Polytomella* se encuentra una oxidasa alterna insensible a cianuro y sensible a DPA, antimicina y HQNO.



**Figura 24.** Efecto de HQNO sobre la actividad de consumo de oxígeno con succinato 10 mM como sustrato.



**Figura 25.** Efecto de HQNO sobre la actividad de consumo de oxígeno con succinato 10 mM como sustrato, en presencia de cianuro 0,5 mM.

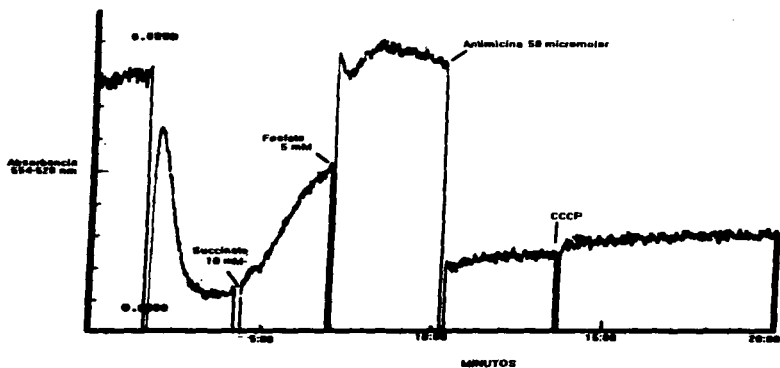
## Potenciales transmembranales

Otro aspecto que proporciona información acerca del estado de integridad de las mitocondrias, es la capacidad de generar potenciales transmembranales, si las mitocondrias no presentan daños en la membrana interna se espera que puedan mantener un gradiente electroquímico de protones en presencia de un sustrato oxidable.

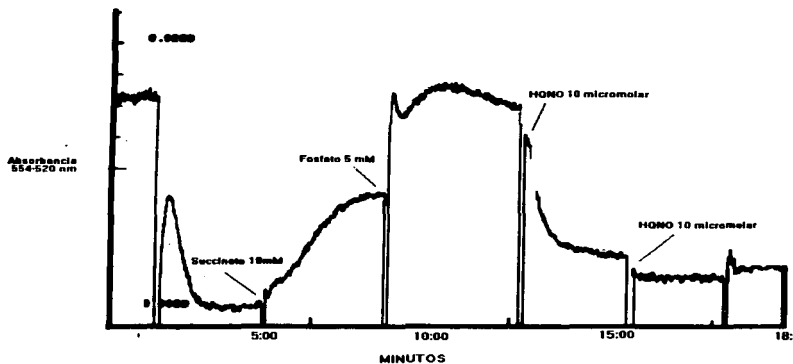
Los experimentos con safranina como indicador, muestran que las mitocondrias de *Polytomella* pueden mantener un potencial transmembranal empleando succinato como sustrato. Los potenciales generados son colapsados por la adición de antimicina (Figura 26), esto parece tener un efecto similar al que tiene este inhibidor en la respiración, indicando que el complejo III puede mantener el gradiente de protones, un efecto análogo ocurre con HQNO que abate totalmente el potencial (Figura 27).

La adición de cianuro no colapsó el potencial generado con succinato, pero la adición de DPA lo reduce totalmente (Figura 28), incluso DPA puede colapsar totalmente el potencial transmembranal sin la adición previa de cianuro (Figura 29). Los resultados anteriores podrían indicar que la oxidasa alterna en las mitocondrias de *Polytomella* puede mantener un gradiente electroquímico, y que dicho gradiente es insensible a cianuro, sin embargo, es sorprendente que la adición de cianuro no disminuya el potencial transmembranal, ya que como se mencionó anteriormente la mayoría de los estudios sobre la citocromo c oxidasa indican que funciona como una bomba de protones y es sensible a cianuro (Nichols, 1982), por lo que se esperaría una disminución en el potencial al adicionar cianuro.

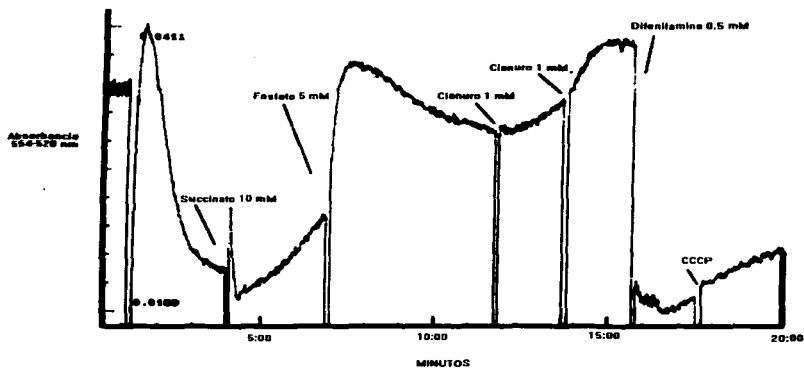
El potencial transmembranal es parcialmente abatible por la adición de nPG (Figura 30), que ya fue probado como inhibidor de la actividad respiratoria insensible a cianuro en las mismas mitocondrias, estos datos apoyan la posibilidad de que la oxidasa alterna de *Polytomella* pueda generar un gradiente electroquímico de protones.



**Figura 26.** Potencial transmembranal generado con succinato 10 mM y colapsado con la adición de antimicina 50  $\mu$ M.

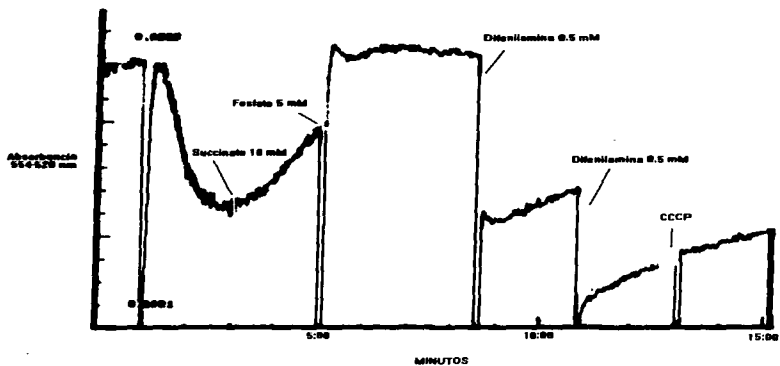


**Figura 27.** Potencial transmembranal generado con succinato 10 mM y colapsado con la adición de HQNO 10  $\mu$ M.

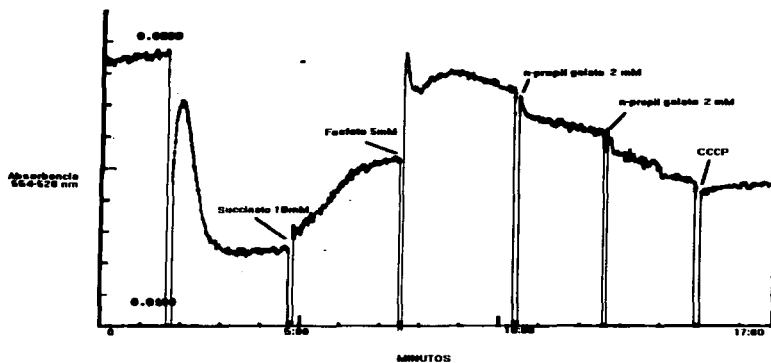


**Figura 28.** Potencial transmembranal generado con succinato 10 mM. Se efectuaron adiciones de cianuro 1 mM y difenilamina 0.5 mM sucesivamente.





**Figura 29.** Potencial transmembranal generado con succinato 10 mM y colapsado con la adición de difenilamina 0.5 mM.



**Figura 30.** Potencial transmembranal generado con succinato y colapsado con la adición de *n*-propilgalato 1 mM.

Los potenciales transmembranales generados por las mitocondrias de *Polytomella* fueron colapsados por la adición del protonóforo CCCP (Figura 31), este efecto es esperado por las características de desacoplante que presenta. En este caso la adición del desacoplante aparentemente disipa el gradiente de protones, sin embargo el efecto del mismo desacoplante en los experimentos de oximetría no permite establecer una correlación clara entre ambos fenómenos.

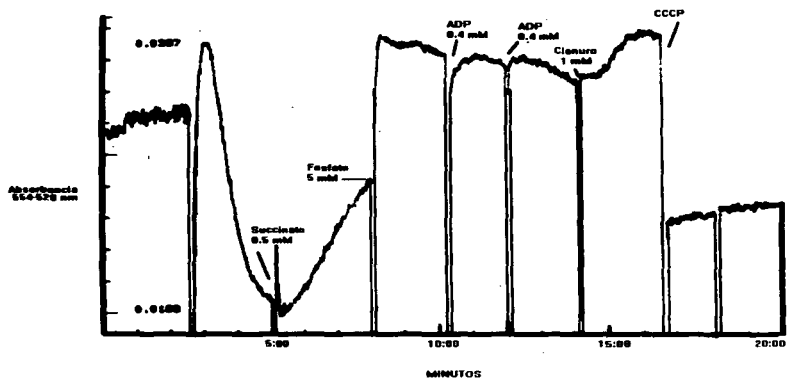
El uso de 2,4-dinitrofenol durante los ensayos con safranina no permite observar alguna respuesta, ya que las características del desacoplante interfieren directamente con la absorbancia en las longitudes de onda utilizadas.

Los experimentos anteriores permiten suponer que el componente del transporte de electrones insensible a cianuro, puede generar un potencial transmembranal sensible a desacoplante.

### **Síntesis de ATP**

Los resultados indican que las mitocondrias de *Polytomella* pueden sintetizar ATP con succinato y malato como sustratos oxidables (Tabla III), así mismo, se observa que la síntesis de ATP es mayor cuando malato es el sustrato.

Con el fin de conocer el papel que pudiera tener en la fosforilación oxidativa una oxidasa alterna capaz de mantener un potencial transmembranal, se exploró el efecto de cada inhibidor, tanto individualmente, como en combinación de cianuro y DPA. En la tabla III se observa que la síntesis de ATP no es totalmente inhibible por cianuro, tanto con succinato como con malato como sustratos. Por otro lado, la combinación de cianuro con DPA reduce en un 80% la síntesis de ATP, los datos obtenidos respecto a cianuro y DPA, coinciden con lo observado en la generación de potenciales transmembranales, donde el cianuro no abate el potencial, pero si la adición de DPA. Estos datos sugieren que *Polytomella* tiene una oxidasa alterna mitocondrial capaz de



**Figura 31.** Potencial transmembranal generado con succinato y colapsado con la adición de CCCP 0.1 mM, posterior a la adición de cianuro 1 mM.

### Síntesis de ATP en mitocondrias de *Polytomella*

Sustrato-Inhibidor	nmoles ATP/min/mg proteína
Succinato	23.27 ± 11.74
Succinato + CN	19.44 ± 9.4
Succinato + CN +DPA	4.94 ± 2.02
Malato	53.71 ± 6.95
Malato + CN	46.71 ± 11
Malato + CN + DPA	10.95 ± 5.22

**Tabla III.** Se muestra la cuantificación de la síntesis de ATP por las mitocondrias aisladas de *Polytomella*, utilizando succinato 10 mM y malato 5 mM como sustratos, así como el efecto de cianuro 0.5 mM, cianuro 0.5 mM+ difenilalmina 0.5 mM y de CCCP 0.1mM.

**generar un potencial transmembranal, el cual es suficiente para impulsar la síntesis de ATP de manera insensible a cianuro.**

Sin embargo, la síntesis de ATP, no muestra disminución por la adición de desacoplantes, ya en los experimentos de consumo de oxígeno se observó que los desacoplantes no incrementaban el consumo de oxígeno, en este caso pudiera ser un problema de la concentración empleada o de solubilidad del desacoplante en las membranas mitocondriales de *Polytomella*, y por ello no hay un efecto evidente.

#### **Nuevos Resultados en la síntesis de ATP**

En experimentos más recientes sobre la síntesis de ATP en las mitocondrias de *Polytomella* se ha encontrado una alta inhibición con cianuro (70% de inhibición), con malato como sustrato oxidable, estos resultados son contrarios a lo obtenido durante el trabajo de tesis, y no permiten suponer que la oxidasa alterna genere un gradiente de protones suficiente para la síntesis de ATP, por ello es necesario la realización de nuevos experimentos para poder aclarar el papel de la oxidasa alterna.

## **Discusión**

### **Aislamiento de mitocondrias y control respiratorio**

Las mitocondrias aisladas de *Polytomella* no presentaron control respiratorio aparente con el método de aislamiento, las imágenes de microscopía electrónica de la preparación muestran mitocondrias que parecen ser íntegras en las membranas, sin embargo, también se pueden observar gran cantidad de contaminantes de naturaleza membranar, pudiendo ser restos de membrana plasmática, de retículo endoplásmico, o bien una gran cantidad de membranas mitocondriales destruidas, probablemente durante la homogenización manual.

A pesar de que se realizaron modificaciones a métodos reportados para el aislamiento de mitocondrias en otro tipo de protistas (Moreno-Sánchez y Raya, 1987), con el fin aprovechar la características de *Polytomella* y reducir al mínimo el posible daño causado a las membranas por métodos que, en principio, pueden considerarse mas drásticos (como el uso de sonicación o empleo de enzimas que degraden la pared celular), se observa una gran cantidad de mitocondrias rotas. Por otro lado, al utilizar otras técnicas como la generación de potenciales transmembranales o la síntesis de ATP, se piensa, en primera instancia, que solamente se detecta la actividad de las mitocondrias intactas.

El hecho de no observar estimulación en el consumo de oxígeno por la adición de ADP en presencia de fosfato o por acción de desacoplantes, indica que no se puede diferenciar entre un estado donde se incremente la oxidación del sustrato por la disipación del gradiente electroquímico para la síntesis de ATP (estado 3), y otro en donde la no disponibilidad de ADP impide el empleo del gradiente de protones por la ATPasa, es decir, no hay control respiratorio.

Sin embargo, por los datos de microscopía electrónica se puede suponer que al existir una gran cantidad de restos mitocondriales y un bajo número de mitocondrias

intactas, los primeros son capaces de consumir oxígeno, pero no pueden tener control respiratorio, de esta forma dichos fragmentos membranales que oxidan sustrato pudieran no evidenciar el efecto del ADP sobre las mitocondrias intactas, análogamente, el efecto del desacoplante podría ser enmascarado por la presencia de un número significativamente elevado de mitocondrias rotas.

### **Oxidación de sustratos**

Sólo succinato y malato estimularon el consumo de oxígeno en las mitocondrias aisladas de *Polytomella*. La oxidación de succinato ocurre vía el complejo II de la cadena respiratoria, que presenta en una de sus subunidades la actividad de succinato deshidrogenasa, que participa en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Esta enzima es la única del ciclo de los ácidos tricarbóxicos que es de naturaleza membranal (Hatefi y col., 1978) por lo que se encuentra tanto en las mitocondrias intactas, como en los fragmentos de la membrana interna que están presentes en la preparación, de tal forma que la adición de succinato estimula el consumo de oxígeno tanto en las mitocondrias intactas, como en los restos de mitocondrias rotas.

En el caso del malato, es posible que exista una enzima málica, similar a la que se presenta en plantas y que se sabe es posible encontrar también en la matriz mitocondrial de algunos organismos. En tal caso, la enzima málica transforma el malato en piruvato, con la liberación de  $\text{CO}_2$  y la reducción de  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}_2$ , éste último puede ser oxidado por la NADH deshidrogenasa alimentando la cadena respiratoria

La oxidación de NADH exógeno sólo se conoce en el caso de plantas, algas y protistas (Siedow, 1982 y Möller y Lin, 1986, Buetow, 1989) donde se localizan NADH deshidrogenas alternas que pueden oxidar el NADH generado fuera de la mitocondria. En el caso de las mitocondrias de *Polytomella*, no se presentó estimulación en el consumo de oxígeno (Tabla I) cuando se adiciona NADH, aunque cabría esperar alguna estimulación por la presencia de membranas mitocondriales rotas que pudieran tomar los electrones del NADH vía el complejo I. En trabajos previos con mitocondrias



aisladas de *Polytomella caeca* , se ha detectado actividad en el consumo de oxígeno con NADH exógeno como sustrato oxidable con sensibilidad parcial a rotenona, y se puede distinguir mas de una vía para la oxidación de NADH, existiendo por lo menos dos para NADH endógeno (Lloyd y Chance, 1968) , sin embargo en este trabajo el NADH exógeno no estimuló la respiración. Es difícil atribuir una causa a esta diferencia en la oxidación de NADH, posiblemente se deba a las características de la especie, que no se ha determinado, con la que se han realizado los experimentos, así como por las condiciones de crecimiento, que se sabe pueden afectar enzimas que oxidan NADH, aumentando o reduciendo su actividad (Evans y Lloyd, 1967).

### **Inhibidores**

El detectar la presencia de una actividad en el consumo de oxígeno resistente a cianuro, abrió la posibilidad de estudiar la respuesta a inhibidores ya conocidos de oxidasas alternas en otros organismos. En principio es claro que existe un componente en la cadena respiratoria de *Polytomella* que presenta insensibilidad a cianuro, y que es totalmente sensible a la acción de DPA . Para la mayoría de los casos de oxidasas alternas de plantas, el ácido salicilhidroxámico es considerado como un inhibidor específico de su actividad. En este trabajo el SHAM no resultó ser un buen inhibidor del consumo de oxígeno insensible a cianuro. En *Chlamydomonas* se conoce el efecto inhibitorio de SHAM sobre la actividad de oxidasa alterna, por la cercanía filogenética de *Polytomella* con *Chlamydomonas*, no resultaría inesperado una oxidasa alterna en *Polytomella* inhibible por SHAM, sin embargo, como ya se mencionó, la actividad de oxidasa alterna en *Polytomella* no es inhibible por SHAM, incluso a una concentración tres veces más alta a la empleada en estudios con *Chlamydomonas*. Este punto muestra una diferencia inicial en las características de la actividad de oxidasa alterna entre ambas algas unicelulares. Por otro lado en los trabajos con mitocondrias aisladas de *Chlamydomonas* no se ha explorado la sensibilidad a antimicina, como tampoco se ha hecho con la naturaleza de la actividad de la enzima (quinol o citocromo oxidasa), (Weger, 1990 , Eriksson y col., 1995).

El SHAM tampoco inhibe la respiración en mitocondrias de *Euglena gracilis* (Kümel y Brinkman, 1988, Uribe, 1992<sub>A</sub>, Uribe y col., 1992). Existen similitudes con *Polytomella* respecto a las características de la respiración resistente a cianuro, que serán comentadas posteriormente.

La combinación de cianuro 0.5 mM y DPA 0.5 mM inhibe totalmente el consumo de oxígeno, independientemente del orden en que se adicionen, lo que permitió una primera aproximación para suponer la existencia de una oxidasa alterna. Las titulaciones con ambos inhibidores siguiendo el consumo de oxígeno en presencia de antimicina con ascorbato y TMPD como donadores de electrones, refuerzan la idea de que la actividad de oxidasa alterna es diferenciable y separable de la actividad del complejo IV (citocromo *c* oxidasa  $aa_3$ ), que como ya se mencionó es totalmente sensible a cianuro.

La titulación con DPA cuando se empleo unicamente succinato como sustrato muestran que la difenilamina esta actuando como un inhibidor efectivo y específico de la actividad de oxidasa alterna. A concentraciones por arriba de 0.5 mM el papel de DPA parece ser sobre ambas vias: una inhibición específica sobre el componente insensible a cianuro y otra sobre la citocromo *c* oxidasa. También en *Euglena* ya se ha reportado un efecto dual de DPA en el consumo de oxígeno (Sharpless y Butow, 1970, Uribe y col., 1992, Devars y col., 1992).

Como ya se dijo, la mayoría de las oxidasas alternas en plantas también presentan insensibilidad a antimicina por su actividad de quinól oxidasas, y esta actividad residual es por tanto sensible a SHAM y DPA (Baker, 1963, Moore y Bonner, 1982, Uribe y col., 1992<sub>B</sub> y Moore y Siedow, 1991). El caso de *Polytomella* es diferente, ya que la adición de antimicina inhibe en más de 90% el consumo de oxígeno, este resultado sugiere que la posible oxidasa alterna no es una quinól oxidasa si consideramos que la inhibición es única y específica sobre el complejo III. Sin embargo, otra posibilidad es que esta oxidasa alterna presente sensibilidad propia a antimicina. A la fecha no hay reportes sobre sensibilidad intrínseca en oxidasas alternas, sin embargo un efecto inhibitorio de mixotiazol, no directo posiblemente, ya se

conoce para una oxidasa terminal alterna bacteriana, por los trabajos realizados con *Paracoccus denitrificans* (Raitio y Wikström, 1994), de donde pueden mencionarse algunas analogías con la oxidasa alterna de *Polytomella*.

En *Paracoccus* ha sido posible la detección de una actividad de oxidasa alterna, diferente a la de quinol oxidasa del complejo  $bc_3$ , que es sensible a antimicina en mutantes que carecen de citocromo c oxidasa funcional (Complejo  $aa_3$ ), lo que indica que existe otro tipo de oxidasa alterna que funciona en conjunto con el complejo  $bc_1$ , por ello la gran sensibilidad a mixotiazol, sin embargo, el complejo no ha sido identificado, pero probablemente presente un hemo tipo b (Raitio y Wikström, 1994), las características de esta oxidasa alterna se asemejan a las que inferimos de los datos obtenidos con *Polytomella*, donde al bloquear el complejo III con antimicina se obtiene una alta inhibición del consumo de oxígeno, además de la posibilidad del que funcione como bomba de protones, característica que se encuentra también en el complejo mencionado en *Paracoccus*.

En tal caso, es posible que la oxidasa alterna de *Polytomella* tenga un mayor número de similitudes con las oxidasas terminales bacterianas, y con la de *Euglena gracilis*, que con las quinol oxidasas de plantas y otras algas. Dada su sensibilidad a antimicina y su evidente baja inhibición a concentraciones muy altas de ácido salicilhidroxámico, así como la capacidad de bombeo de protones, que se sabe no existe en oxidasas alternas de plantas.

Las características que se pueden apreciar sobre la oxidasa alterna de *Polytomella* derivadas de los estudios de oximetría indican que es insensible a cianuro, sensible a DPA, antimicina y HQNO, el primero con una aparente especificidad a concentraciones por debajo de 0.5mM, así como cierta sensibilidad por n-propilgalato (60% a una concentración de 1.5 mM).

## Potenciales transmembranales

Por la generación de potenciales transmembranales se puede suponer que en la preparación de mitocondrias de *Polytomella* se presentan organelos con un estado de integridad en la membrana interna suficiente para mantener un gradiente de protones, que es sensible a desacoplante. Con el uso de esta técnica espectrofotométrica es posible detectar el funcionamiento de las mitocondrias acopladas, aún y cuando existan numerosos fragmentos mitocondriales, ya que éstos no interfieren en los cambios de absorbanza de la safranina que dependen del potencial.

Los potenciales, al no ser colapsables por la adición de cianuro y sí por la de DPA, podrían indicar que la oxidasa alterna de *Polytomella* puede estar manteniendo la magnitud del potencial transmembranal aun en presencia de cianuro, lo que sugiere que es capaz de translocar protones. Esta capacidad solo se conoce para algunas oxidasas diferentes de la tipo  $aa_3$  ( complejo IV) de algunos procariontes, como el caso de *Paracoccus denitrificans* (Raitio y Wikström, 1994), y *Escherichia coli* (Minagawa y col., 1992) ambas eubacterias; y el de la arqueobacteria *Sulfolobus acidocalcaricus*, (Gleisner y col., 1994) sin embargo, en las oxidasas terminales de eucariontes no hay reportes de oxidasas alternas que funcionen como bombas de protones, y solo se ha mencionado esta posibilidad para las mitocondrias de *Euglena gracilis* (Moreno-Sánchez y Raya, 1986, Uribe y col., 1992).

El hecho de que los potenciales sean abatibles por antimicina, HQNO y nPG, relacionan estos datos con los obtenidos para oximetría respecto a la sensibilidad de las mitocondrias de *Polytomella* en el consumo de oxígeno, tanto por la vía clásica como por la oxidasa alterna.

Un punto importante de este trabajo es que abre la posibilidad de que exista una oxidasa terminal mitocondrial insensible a cianuro, capaz de translocar protones. Su posterior caracterización y eventual purificación serían de gran interés, pues no existen

muchas evidencias de oxidasas alternas mitocondriales con las características que sugieren los resultados anteriores.

### **Síntesis de ATP**

Tomando en cuenta los resultados sobre generación de potenciales en presencia de cianuro, es muy interesante conocer si la magnitud de éstos es suficiente para permitir procesos que dependan de esta energía, como es la fosforilación de ADP en ATP.

Los resultados de la tabla III muestran que las mitocondrias de *Polytomella* pueden sintetizar ATP con succinato y malato como sustratos, aún en presencia de cianuro, pero que la adición de DPA a muestras que han sido incubadas con cianuro disminuye claramente la síntesis de ATP. Estos resultados también apoyan la idea de que la oxidasa alterna de *Polytomella* puede bombear protones y generar la energía suficiente para que se lleva a cabo la fosforilación de ADP a ATP por actividad de La ATPasa  $F_1F_0$ , como ocurre en bacterias. En ese caso, el sistema descrito en este trabajo sería el primero no bacteriano donde una oxidasa terminal alterna impulse la fosforilación oxidativa. Sin embargo, hay que tomar en cuenta los resultados más recientes que muestran una alta inhibición por cianuro, que por un lado no apoyan la idea de que la oxidasa alterna pueda generar un potencial transmembranal suficiente para la síntesis de ATP, pero por otro lado no descartan la posibilidad de que la oxidasa alterna de *Polytomella* funcione como bomba de protones y participe en otro tipo de procesos que requieren del gradiente, como es el transporte de iones.

Por otro lado, se sabe la adición de oligomicina, que es un inhibidor de la ATPasa  $F_1F_0$ , y a la cual es totalmente sensible una fracción purificada de la ATPasa de *Polytomella* (Atteia, Dreyfus y González-Halphen, datos no publicados), disminuye la síntesis de ATP alrededor del 60 %, en ausencia de cianuro y DPA (datos no mostrados).

En los experimentos sobre síntesis de ATP no se presenta un efecto de desacoplantes, esto es contradictorio al comparar estos resultados con los obtenidos en la medición de potenciales transmembranales, ya que éstos sí se presenta un colapso del potencial, y se esperaría que la adición del desacoplante disminuyera la fosforilación oxidativa. En este caso pudiera ser que esté ocurriendo incorporación de fosfato por una vía diferente a la ATPasa y que no dependa de la energía del gradiente. Se había pensado en una pirofosfatasa como responsable de esa incorporación, sin embargo este tipo de enzimas funcionan acopladamente al gradiente electroquímico, por lo que es poco probable dicha explicación.

En conclusión, es posible que la oxidasa alterna que los resultados sugieren existe en las mitocondrias de *Polytomella*, tenga las siguientes características:

1. Sea insensible a cianuro
2. Su actividad sea inhibible específicamente por DPA a concentraciones menores de 0.5 mM; la inhibición por nPG es parcial y SHAM no es un inhibidor específico como lo es para oxidasas alternas de plantas y *Chlamydomonas*.
3. Es sensible a antimicina, el grado de inhibición sugiere una bifurcación en el transporte de electrones después de la reducción del complejo III. Alternativamente, la oxidasa alterna puede ser inhibible directamente por antimicina.
4. Presenta sensibilidad a HQNO.
5. Puede translocar protones y generar un gradiente electroquímico en presencia de cianuro. El potencial es abatible por desacoplante.
6. El potencial generado por la oxidasa alterna permitiría la síntesis de ATP. Los desacoplantes parecen no inhibir la síntesis de ATP cuantificada.

## **Perspectivas**

Como próximos estudios a realizar con *Polytomella* se piensa en efectuar pasos de purificación para las mitocondrias aisladas por medio de gradientes discontinuos de percol o iodixanol, con el fin de separar las mitocondrias intactas de los fragmentos membranales, tanto de membrana plasmática como de mitocondrias destruidas.

La obtención de una preparación mitocondrial que presente en su mayoría mitocondrias intactas constituye un aspecto fundamental para estudios que aborden otros aspectos de la función mitocondrial, no tratados en esta trabajo. Así mismo como la caracterización en mayor detalle de la oxidasa alterna, que particularmente abre propias expectativas, como son el tipo de actividad, tipo de grupo redox que presenta y cuantificación de la capacidad de bombeo de protones. Por otro lado, es de interés para el proyecto global sobre *Polytomella* la realización de experimentos sobre la biogénesis de los complejos mitocondriales, a partir de la síntesis *in vitro* de los péptidos y el seguimiento de su importación hacia el interior de la mitocondria, este proceso, se sabe, depende de la generación de un potencial transmembranal, por ello la importancia de obtener mitocondrias acopladas.

El aspecto más importante de este trabajo ha sido la detección en *Polytomella* de una actividad en el consumo de oxígeno y de síntesis de ATP parcialmente sensible a cianuro. La caracterización de esta actividad debida a la presencia de una oxidasa alterna es un punto muy interesante, debido a las características que se han inferido de los resultados obtenidos. Es fundamental aclarar el papel de la oxidasa alterna en la cadena respiratoria de *Polytomella*, sobre todo su posible función como bomba de protones, si se comprueba sería necesario cuantificar el gradiente generado para saber con detalle la participación en los procesos mitocondriales que dependen de energía.

La alta sensibilidad a antimicina, sugiere que no es una quinol oxidasa típica, similar a la de plantas, incluso que no se trate de una quinol oxidasa, por ello es importante la determinación del tipo de actividad que presenta. La posibilidad de

encontrar una citocromo oxidasa terminal, diferente del tipo  $aa_3$ , es probable por las características ya discutidas, y de ser así, se trataría de una oxidasa alterna distinta de la reportada para otro tipo de protistas, incluyendo algas clorofitas. Por otro lado, interesante es abundar sobre el posible papel de la oxidasa alterna de *Polytomella* en la generación de un gradiente electroquímico de protones, para tal fin es necesario realizar experimentos sobre la fosforilación oxidativa en presencia de inhibidores de la vía clásica y de oxidasas alternas, así como de diferentes desacoplates.

Es muy interesante continuar el estudio de esta actividad en *Polytomella*, a fin de conocer si esta oxidasa alterna mantiene una mayor similitud, como indican los datos de sensibilidad a inhibidores y de posible actividad como translocadora de protones, con oxidasas terminales de procariontes, y con lo reportado para *Euglena gracilis*. Aun no existen reportes sobre oxidasas terminales alternas en eucariontes que generen potenciales transmembranales y permitan procesos que dependan de energía.



## Referencias

- Akerman, K.E.O. and Wikström, M.K.F. (1976). **Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential.** *FEBS Lett.* **68**: 191-197
- Alberts, B., Dennis, B., Lewis, L., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. (1994). **Molecular Biology of the Cell**, 4<sup>th</sup>ed. Garland Pub. Inc. New York. 1146 pp.
- Antaramian, A., Coria, R., Ramirez, J. and González-Halphen, D. (1996). **The deduced primary structure of subunit I from cytochrome c oxidase suggests that the genus *Polytomella* shares a common mitochondrial origin with *Chlamydomonas*.** *Biochim. et Biophys. Acta* **1273**:198-202
- Arago, H.(1910). *Mem.Inst. Oswaldo Cruz* **2**: 42-57
- Atteia, A., De Vitry, C., Pierre, Y. and Popot, J.L. (1992). **Identification of mitochondrial proteins in membrane preparations from *Chlamydomonas reinhardtii*.** *J. Biol. Chem.* **267**: 226-234
- Atteia, A., (1994). **Identification of mitochondrial respiratory proteins from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*.** *C. R. Acad. Sci. Ser.III-Vie* **317**: 11-19
- Baker, E.J. (1963). *Arch. Biochem. Biophys.***103**: 148
- Bomsel, J.L. and Calvayrac, R. (1978). In **Plant Mitochondria**. Elsevier, Amsterdam. p 299-306
- Brown, D., Massalaski, A., and Patenadue, R. (1976A). **Organization of Flagellar Apparatus and Associated Cytoplasmic Microtubules in Quadriflagellate alga *Polytomella agilis*.** *J. Biol. Cell* **69**: 106-125
- Brown, D., Massalaski, A. and Leppard, G., (1976B). **Fine Structure of Excystment of the Quadriflagellate Alga *Polytomella agilis*.** *Protoplasma* **90**:155-171
- Brown, D., Leppard, G and Massalaski, A., (1976C). **Fine Structure of Encystment of the Quadriflagellate Alga *Polytomella agilis*.** *Protoplasma* **90**,141-153

- Buetow, D.E. (1989). **The Mitochondrion in The Biology of *Euglena***. Buetow, D.E. (ed.) Vol I. Academic Press. New York. p 247-314
- Burton, M. and Moore, J.(1974). **The Mitochondrion of the Flagellate, *Polytomella agilis***. *J. Ultrastructure Research* **48**: 414-419
- Cantor, M.H. and Burton, M.(1975). **Effects of Thiamine Deprivation and Replacement on the Mitochondrion of *Polytomella agilis***. *J. Protozool.* **22**(1): 135-139
- Cantor, M.H. and Withroe, J. (1970). *Amer.Zool.* **10**: 514
- Carre, I., Bomsel, J.L. and Calvayrac, R. (1988). **Decay of cytochromes and appearance of a cyanide-insensitive electron transfer pathway in *Euglena gracilis***. *Plant. Sci* **54**: 193-202
- Conner, T.W., Thompson, M.D. and Silfow, C.D. (1989). **Structure of the three  $\beta$ -tubulin-encoding genes of the unicellular alga, *Polytomella agilis***. *Geno.* **84**: 345-358
- Cooper, R.A., and Lloyd, D. (1972). *J. Gen. Microbiol.* **72**: 59
- Darnell, J., Lodish, H. and Baltimore, D. (1990). **Molecular Cell Biology**, 2<sup>nd</sup>ed. Scientific American Books. New York. 1105 pp
- Day, D., Millar, A., Wiskich, J.T. and Whelan, J. (1994). **Regulation of Alternative Oxidase Activity in Soybean Mitochondria**. *Plant. Physiol.* **106**: 1421-1427
- Devars, S, Torres-Márquez, E., González-halphen, D., Uribe, A. and Moreno-Sánchez, R. (1992). **Cyanide-sensitive and cyanide-resistant respiration of dark-grown *Euglena gracilis***. *Plant. Sci.* **82**: 37-46
- Douce, R., (1985). **Mitochondria in Higher Plants: Structure, Function and Biogenesis**. Academic Press. Orlando, Florida, U.S.A.
- Douce, R., Moore, A.L. and Neuburger, M. (1977). *Plant Physiol.* **60**: 625-628 \*

- Eriksson, M., Gardeström, P. and Samuelsson, G. (1995). **Isolation, Purification, and Characterization of Mitochondria from *Chlamydomonas reinhardtii***. *Plant. Physiol.* **107**: 479-483
- García-Horsman, A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J. and Gennis, R.B. (1994). **The Superfamily of the Heme-Copper Respiratory Oxidases**. *J. of Bacteriol.* **176**(18): 5587-5600
- Gleissner, M., Eferink, M.G.L., Driessen, A.J.M., Konings, W.N. and Anemüller, S. (1994). **Generation of proton-motive force by an archaeal terminal quinol oxidase from *Sulfolobus acidocalcaricus***. *Eur. J. Biochem.* **224**: 983-990,
- González-Halphen, D. (1990). **El complejo bc<sub>1</sub> de la cadena respiratoria mitocondrial**. *Ciencia* **41**: 133-152
- Goyal, A. and Tolbet, N.E. (1989). **Variations in the alternative oxidase in *Chlamydomonas* grown in air or high CO<sub>2</sub>**. *Plant. Physiol.* **89**: 958-962\*
- Grover, D.S., and Laties, G.G. (1981). *Plant Physiol.* **68**: 393
- Guerin, M.G. and Camougrand, N.M. (1994). **Partitioning of electron flux between the respiratory chains of the yeast *Candida parapsilosis*: parallel working of the two chains**. *Biochim. en Biophys. Acta* **1184**: 11-117
- Gutiérrez-Cirios, E.B. (1994). **Aislamiento y Caracterización del Complejo bc<sub>1</sub> mitocondrial del alga incolora *Polytomella* spp.** Tesis de Maestría. U.A.C.P. y P. del C.C.H. U.N.A.M. México.
- Gutiérrez-Cirios, E.B., Antaramian, A., Vázquez-Acevedo, M., Coria, R. and González-Halphen, D. (1994). **A Highly Active Ubiquinol-Cytochrome c Reductase (bc<sub>1</sub> Complex) from the Colorless Alga *Polytomella* spp., a Close Relative of *Chlamydomonas***. *J. Biol. Chem.* **269** (12): 9147-9154\*
- Hatefi, Y., Haavik, A.G., Fowler, L.R., and Griffiths, D.E. (1962). *J. Biol. Chem.* **237**: 261-2669
- Hatefi, Y. (1978). *Methods Enzymol.* **53**, 3-5 \*

Hoefnagel, M.H.N., Millar, H., Wiskich, J.T. and Day, D. (1995). **Cytochrome and Alternative Respiratory Pathways Compete for electrons in the Presence of Pyruvate in Soybean Mitochondria.** *Arch. of Biochem. and Biophys.* **318**: 394-400\*

Huq, S., and Palmer, J.M. (1978<sub>A</sub>). *Plant Sci. Lett.* **11**: 351-358

Huq, S., and Palmer, J.M. (1978<sub>B</sub>). *FEBS Lett.* **92**: 317-320\*

Kümel, W.V. and Brinkman, K. (1988). **The oxidation of exogenous NADH by mitochondria of *Euglena gracilis*.** *Planta* **176**: 261-268

Lewis, E., Munger, G., Watson, R. and Wise, D. (1974). **Life Cycle of *Polytomella caeca* (Phytomonadida, Polyblepharidae).** *J. Protozool.* **21**(5): 647-649

Lloyd, D. and Chance, B. (1968). **Electron Transport in Mitochondria isolated from the Flagellate *Polytomella caeca*.** *Biochem. J.* **107**: 829-837

Lloyd, D., Evans, D.A. and Venables, S. (1970). **The Effect of Chloramphenicol and Mitochondrial Function of the Flagellate *Polytomella caeca*.** *Journal of General Microbiology* **61**: 33-41 \*

Lloyd, D., Evans, D.A. and Venables, S. (1968<sub>B</sub>). **Propionate Assimilation in the Flagellate *Polytomella caeca*.** *Biochem. J.* **109**: 897-907\*

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. Farr, A.L., and Randall, R.J.(1951). **Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent.** *J.Biol. Chem.* **193**: 265-275

Markwell, M.A.K., Hass, S.M., Biber, L.L. and Tolbert, N.E.(1978). **A Modification of the Lowry Procedure to Simplify Protein Determination in Membrane and Lipoprotein Samples.** *Anal. Biochem.* **87**: 206-210

Melkonian, M. (1990). **Phylum Chlorophyta.** in *Handbook of Protoctista.* Margulis, L., Corliss, J.O., Melkonian, M. and Chapman D.J. (Eds.). Jones and Bartlett Pub. U.S.A. p 608-616

- Minagawa, J., Mogi, T., Gennis, R.B., Anraku, Y. (1992). **Identification of Heme Copper Ligands in subunit I of the Cytochrome *bo* Complex in *Escherichia coli*.** *J. Biol. Chem.* **267**(3): 2096-2014.
- Mitchell, P. (1961). *Nature* **191**: 423-427\*
- Mitchell, P. (1975) *FEBS Lett.* **58**: 1-6\*
- Mitchell, P. (1979). *Science* **206**: 1148-1159\*
- Möller, I.M. and Lin, W. (1986). *Annu. Rev. Plant. Physiol.* **37**: 309-334
- Moore, A.L. and Siedow, J.N. (1991). **The regulation of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria.** *Biochem. et biophys. Acta* **1059**: 121-140
- Moore, A.L. and Bonner, W.D. (1982). *Plant Physiol.* **70**: 1271-1276
- Moreno-Sánchez, R. and Rays, J.C. (1987). **Preparation of Coupled Mitochondria From *Euglena* by Sonication.** *Plant Sci.* **48**: 151-157
- Nicholls, D.G. and Ferguson, S.J. (1992). *Bioenergetics 2.* Academic Press. London. 255pp
- Nicholls, D.G. (1982) *Bioenergetics. An Introduction to the Chemiosmotic Theory.* Academic Press. London. 190 pp.
- Parsonage, D., Greenfield, A.J., and Ferguson, S.J. (1986). *Arch. Microbiol.* **145**: 191-195 \*
- Pringsheim, E.G. (1955). **The Genus *Polytomella*.** *J. Protozool.* **2**: 137-145
- Pustinen, A., Finel, M., Virkki and Wikström, M. **Cytochrome *o*(*bo*) is a proton pump in *Paracoccus denitrificans* and *Escherichia coli*.** (1989). *FEBS Lett.* **248**: 163-167
- Rätio, M. and Wikström, M. (1994). **An alternative cytochrome oxidase of *Paracoccus denitrificans* functions as a proton pump.** *Biochem. et Biophys. Acta* **1188**: 100-106
- Rasmussen, A.G., Möller, I.M., Palmer, J.M. (1990). *FEBS Lett.* **258**: 311-314

- Round, F.E. (1980). **The evolution of Pigmented and Unpigmented Unicells: a consideration of the Protista.** *Biosystems* 12: 61-69
- Sargent, D.F., Taylor, C.P.S. (1972). **Terminal oxidases of *Chlorella pyrenoidosa*.** *Plant Physiol.* 49: 775-778.\*
- Schonbaum, G.R., Bonner, W.T., Storey, B.T., Bahr, J.T. (1971). *Plant Physiol.* 47: 124-128
- Sharpless, T.K. and Butow, R.A. (1970). **Phosphorylation sites, Cytochrome complement and alternate pathways of coupled electron transport in *Euglena gracilis* mitochondria.** *J. Biol. Chem.* 245: 50-57
- Sheeler, P., Cantor, J., Cantor, M. and Granik, R. (1968). **The Stored Polysaccharide of *Polytomella agilis*.** *Life Sciences* 7 ( 11 ): 1045-1051
- Siedow, J.N., Huber, J.C. and Moreland, D.E. (1978). In *Plant Mitochondria*. Duce, G and Lance, C. (eds.) Elsevier. Amsterdam . p 233-240
- Siedow, J.N. (1982). *Recent Adv. Phytochem.* 16: 47-83
- Siedow, J.N. and Grivin, M.E. (1980). *Plant Physiol.* 65: 669-674 \*
- Syrett, P.J. (1951). **The effect of cyanide on the respiration and the oxidative assimilation of glucose by *Chlorella vulgaris*.** *Ann. Bot.* 15: 473-492\*
- Stryer, L. (1966). *Biochemistry*, 3<sup>rd</sup> ed. Freeman. New York. 1089 pp
- Uribe, A. (1992). **Oxidación de Sustratos y Fosforilación Oxidativa en Mitocondrias de *Euglena gracilis*.** Tesis Profesional, Facultad de Ciencias. U.N.A.M., México
- Uribe, A. and Moreno-Sánchez, R. (1992) **Energy-dependent reactions supported by several substrates in coupled *Euglena gracilis* mitochondria.** *Plant Science* \*
- Webster, D.A. and Hackett, D.P. (1965). **Respiratory chain of colorless algae. Chlorophyta and Euglenophyta.** *Plant Physiol.* 41: 1091-1100 \*

Weger, H., Guy, R. and Turpin, D.H. (1990). **Cytochrome and Alternative Pathway Respiration in Green Algae.** *Plant Physiol.* **93**: 356-360.

Wise, D.L. (1955). **Carbon sources of *Polytomella caeca*** *J. Protozool.* **2**: 156-158

Wise, D.L. (1959). *J. Protozool.* **6**: 19

Zhang, Q., Hoefnagel, M.H.N., Wiskich, J.T. (1996). **Alternative oxidase from Arum and soybean: Its stabilization during purification.** *Physiologia Plantarum* **96**: 551-558