

00346 16
24.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

LOCALIZACION Y CARACTERIZACION CINETICA
DE LA LACTATO DESHIDROGENASA DE
Euglena gracilis.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A :
BIOLOGA AIDA URIBE MEDINA



DIRECTOR DE TESIS: DR. RAFAEL MORENO SANCHEZ.

MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

259996



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A los Dr. Rafael Moreno Sánchez, Dra. María Eugenia Torres Márquez, Dr. Diego González Halphen, M. en C. Silvia Devars Ramos, Dr. Juan Luis Rendón Gómez, Dra. Marietta Tuena Sangri y Dra. Georgina Regina Garza Ramos Martínez, miembros del jurado, por sus comentarios y el tiempo dedicado para la revisión del trabajo escrito de tesis.

INDICE

INTRODUCCION	1
LACTATO DESHIDROGENASAS DEPENDIENTES DE NAD ⁺ (nLDH).....	1
LACTATO DESHIDROGENASAS INDEPENDIENTES DE NAD ⁺ (iLDH).....	6
<i>Euglena gracilis</i>	
Generalidades.....	10
Taxonomía.....	10
SISTEMA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES	
<i>Euglena gracilis</i>	18
Bacterias.....	24
Plantas.....	29
Algas.....	31
OBJETIVOS	32
MATERIALES Y METODOS	37
CULTIVO Y COSECHA DE <i>Euglena gracilis</i>	33
OBTENCION DE LA FRACCION MITOCONDRIAL.....	33
OBTENCION DE PARTICULAS SUBMITOCONDRIALES.....	33
DETERMINACION DE PROTEINA.....	34
CONSUMO DE OXIGENO.....	34
DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS	
<i>Citocromo oxidasa</i>	35
<i>Malato Deshidrogenasa</i>	35
<i>Monoamino Oxidasa</i>	35
<i>Lactato Deshidrogenasa Citoplásmica</i>	36
<i>Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa</i>	36
<i>Succinato Deshidrogenasa</i>	36
<i>Glucosa 6 Fosfatasa</i>	37
<i>Lactato Deshidrogenasa</i>	37
UTILIZACION DEL β -MERCAPTOETANOL.....	37
OBTENCION Km, Vmax y Ki's.....	37
CURVAS DE pH Y TEMPERATURA.....	38
POTENCIAL DE MEMBRANA.....	38
GRADIENTE ELECTROQUIMICO DE PROTONES.....	39
PREPARACION DE LAS MUESTRAS PARA ELECTROFORESIS.....	39
ELECTROFORESIS NATIVA.....	39
ZIMOGRAMA.....	40

RESULTADOS Y DISCUSION	41
ACTIVIDAD DE ENZIMAS MARCADORAS.....	41
EFFECTO DEL pH Y LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA LDH.....	45
DETERMINACION DE LOS PARAMETROS CINETICOS DE LA LDH.....	49
INHIBICION DE LA OXIDACION DE L-Lactato y D-lactato.....	53
CONSTANTES DE INHIBICION.....	58
POTENCIAL DE MEMBRANA.....	65
DETERMINACION DEL Δ pH EN PSM DE <i>Euglena gracilis</i>	67
ACTIVACION DE LACTATO DESHIDROGENASA POR β -MERCAPTOETANOL.....	70
EFFECTO DE LA DEFICIENCIA DE ZINC EN EL MEDIO DE CULTIVO.....	72
SOLUBILIZACION DE LA LACTATO DESHIDROGENASA.....	73
ELECTROFORESIS EN CONDICIONES NATIVAS.....	74
CONCLUSIONES	79
BIBLIOGRAFIA	82

ABREVIATURAS

ACoA	Acetil coenzima A
ACMA	9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina
ADP	Adenosin 5' difosfato
AMP	Adenosin 5' monofosfato
ATP	Adenosin 5' trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino delipidada
CCCP	Carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona
CN	Cianuro
DCPIP	Diclorofenol indofenol
DMSO	Dimetilsulfoxido
DPA	Difenilamina
DTT	Ditiotreitól
D-LDH	D-lactato deshidrogenasa
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético
EGTA	Acido etilenglicol bis-(-aminoetil éter)-N,N,N,N tetraacético
FAD	Flavín adenín dinucleótido (forma oxidada)
FADH	Flavín adenín dinucleótido (forma reducida)
FCN	Ferricianuro
FMN	Flavín mononucleótido (forma oxidada)
HEPES	Acido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico
HQNO	2-Heptil-4-hidroxiquinolina-N-oxido
L-LDH	L-lactato deshidrogenasa
MOPS	Acido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
NAD ⁺	Nicotinamida adenín dinucleótido (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenín dinucleótido (forma reducida)
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenín dinucleótido (forma reducida)
NBT	Azul de nitro-tetrasolium
N ₂ N ₃	Azida de sodio
PMS	Metasulfato de fenazina
SHAM	Acido salicilhidroxámico
TCA	Acido Tricloroacético
TEMED	N,N,N,N-tetrametil etilendiamina
TMPD	Tetrametil-p-fenilenediamina
TRIS	Hidroximetil aminometano

INTRODUCCION

Las primeras células que aparecieron durante la evolución vivieron en una atmósfera sin oxígeno, por lo que se sospecha que la glucólisis fue la vía metabólica que se encargó de suministrar la energía a los primeros microorganismos. Los organismos han tenido la capacidad de regenerar continuamente el NAD^+ durante la glucólisis anaerobia por medio de la transferencia de electrones desde el NADH para formar un producto final reducido como es el lactato, reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa.

El conocimiento de la variación estructural y la importancia funcional de las enzimas de una extensa variedad de organismos puede no solo contribuir al entendimiento de la especificidad de las enzimas sino también a dilucidar sus relaciones filogenéticas.

La familia de las lactato deshidrogenasas es una de las más ampliamente estudiadas en diversos organismos (Holbrook, 1975). Existen dos formas de lactato deshidrogenasas la L-LDH y la D-LDH con diferentes especificidades por su sustrato. La enzima en vertebrados y algunas plantas es específica para L-lactato. Los invertebrados, hongos y procariotes pueden presentar las dos formas enzimáticas dependiendo de las especies. Algunos eucariotes como *Euglena* y ciertos procariotes poseen ambas enzimas, con una elevada especificidad para sus sustratos. (Gleason y cols, 1966; Long y Kaplan, 1968; Garvie, 1980; Dennis; Gasser y cols, 1960; Everse y Kaplan, 1973)

LACTATO DESHIDROGENASAS DEPENDIENTES DE NAD^+ (nLDH)

Cuando a los tejidos animales no se les suministra oxígeno suficiente para llevar a cabo la oxidación aeróbica del piruvato y del NADH producido en la glucólisis, el NAD^+ se regenera a partir del NADH mediante la reducción del piruvato a lactato por la lactato deshidrogenasa. Ciertos tejidos y tipos celulares (retina, cerebro, eritrocitos) también producen lactato a partir de la glucosa aún en condiciones aerobias.

La lactato deshidrogenasa reduce al piruvato transformándolo en el isómero L del ácido láctico, al tiempo que oxida NADH en NAD⁺ (coenzima), de acuerdo con la reacción:



En mamíferos el producto de la glucólisis anaerobia es invariablemente el isómero L del lactato; sin embargo, en algunos microorganismos que producen lactato el isómero formado puede ser L- o D-, o una mezcla de ambos. En ambos casos la enzima correspondiente depende de NAD⁺. Estas variaciones se deben a las diferencias en estereoespecificidad de las LDH's responsables del paso final en la formación del lactato. El piruvato es convertido a L-lactato o D-lactato por las diferentes LDH's denominadas L-nLDH y D-nLDH, respectivamente.

Todas las L-LDH bacterianas estudiadas pertenecen al tipo nLDHs. son citosólicas, y difieren entre sí con respecto a sus características cinéticas, movilidad electroforética, pH óptimo y temperatura óptima. Todas tienen una masa molecular de 140 000 y consisten de 4 subunidades (tetrámeros) idénticas de 36 000 Da cada una (Long y Kaplan, 1968). Al parecer, las enzimas específicas para D-lactato tienen una masa molecular de la mitad del tetrámero, por lo que se ha sugerido que la unidad funcional o catalítica corresponde al dímero (Futai, 1973).

La composición de aminoácidos presenta diferencias que pueden ser características de grupos particulares de organismos. Primero, en las LDH animales hay 4 o más residuos de cisteína por subunidad; sin embargo, en *Lactobacillus* sólo existen de 1 a 2 residuos. Segundo, en todas las L-LDH animales, el número de residuos de glicina y alanina es elevado, aunque en bacterias es muy bajo, incluyendo la D-LDH de *E.coli*. Tercero, al parecer existen LDH's con alguna interacción cooperativa cuando la unión de un ligando está influenciada por la unión de otro en un sitio diferente al sitio catalítico de la proteína. Estas "enzimas alostéricas" difieren de las demás LDH en su alto contenido de isoleucina (Buetow, 1968).

Algunas L(+)-nLDH bacterianas son moduladas por fructosa 1,6-bisfosfato y requieren de la presencia de iones divalentes como Mn^{2+} y Co^{2+} , los cuales aumentan su eficiencia catalítica (Hensel y cols. 1977).

Hay evidencias de que la D-nLDH es una proteína constitutiva en tanto que la L-nLDH es inducida en el medio de cultivo en presencia de lactato (Kaback, 1970). En *Lactobacillus* se ha reportado que la actividad de la L-LDH aumenta en la fase logarítmica de crecimiento cuando el pH es neutro, mientras que si el pH es ácido (4.5-5) aumenta la actividad de la D-LDH (Hensel y cols. 1977). Otro factor que modula la actividad de estas enzimas bacterianas es la temperatura, ya que son muy sensibles al calor y se activan entre 25-30°C (Kotik y Zuber, 1992). La estabilidad al calor de la enzima es muy compleja, las L(+)-LDHs de *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *Pediococcus* y *Bacillus subtilis*, se activan después de 5 min a 50°C y se inactivan un 50% después de 5 minutos a una temperatura entre 60-80°C. La enzima en *B. subtilis* no se inactiva después de 4 horas a 50°C. Las D-LDHs de *L. acidophilus*, *L. jensennii*, *L. fermentatum*, y *L. lactis* se inactivan un 98% después de 5 minutos a 50°C. Las enzimas presentan mecanismos de protección al aumento de temperatura, pues la inactivación por calor puede ser reversible al incubarse con D-lactato, NAD^+ ó NADH. (Gasser, 1970)

La variedad de LDH en el género *Lactobacillus* ha sido usada como característica taxonómica para la diferenciación entre especies dentro del mismo género (Gasser, 1970).

Aunque existen diferencias entre las nLDH alostéricas y no alostéricas, en el género *Lactobacillus* la composición de aminoácidos es muy uniforme, semejante a la que se encuentra en L-LDH de mamíferos. Se ha encontrado una región entre bacterias y mamíferos homóloga con la región del sitio activo.

Estudios comparativos de L-LDH de 5 diferentes grupos taxonómicos (figura 1) demostraron un alto grado de identidad en su estructura primaria entre los péptidos A3 y A4 que comprenden la región funcional del asa de la enzima, así como la región A6, que tiene el sitio de unión al sustrato en la arginina 171 y un grupo tiol "esencial" en la

cisteína 165. Al parecer la L-LDH de mamíferos y la de bacterias son codificadas por genes homólogos (Hensel, 1977).

		160	165	171
Pez-perro	M ₁	Ile-Ile-Gly-Ser-Gly-Cys-Asn-Leu-Asp-Ser-Ala-Arg		
Cerdo	H ₁	Val-Ile-Gly-Ser-Gly-Cys-Asn-Leu-Asp-Ser-Ala-Arg		
Conejo	H ₁	Val-Ile-Gly-Ser-Gly-Cys-Asn-Leu-Asp-Ser-Ala-Arg		
Res	H ₁	Val-Ile-Gly-Ser-Gly-Cys-Asn-Leu-Asp-Ser-Ala-Arg		
Pollo	H ₁	Val-Ile-Gly-Ser-Gly-Cys-Asn-Leu-Asp-Thr-Ala-Arg		
Rana Toro	M ₁	(Val-Ile-Gly-Ser-Gly-Cys-Asn-Leu-Asx-Ser-Ala-Arg)		
Langosta		Val-Ile-Gly-Ser-Gly-Thr-Asx-Leu-Asx-Ser-Ser-Arg		
<i>L. casei</i>		Val-Val-Gly-Ser-Gly-Thr-Ser-Leu-Asx-Thr-Ala-Arg)		
<i>L. curvatus</i>		(Val-Ile-Gly-Ser-Gly-Thr-Ser-Leu-Asx-Ser-Ala-Arg)		
<i>L. plantarum</i>		(Val-Ile-Gly-Ser-Gly-Thr-Ser-Leu-Asx-Ser-Ser-Arg)		
<i>L. acidophilus</i>		(Val-Ile-Gly-Ser-Gly-Thr-Ser-Leu-Asx-Thr-Gly-Arg)		

Figura 1. Secuencia de aminoácidos de diferentes grupos taxonómicos de la región que tiene el sitio de unión al sustrato de diversas lactato deshidrogenasas. Las secuencias entre paréntesis son basadas sólo en la composición de aminoácidos y su homología (Hensel,1977).

En la bacteria *Desulfovibrio vulgaris* se caracterizó la D-LDH, la cual es específica para D-lactato (Km 0.8mM), esta fuertemente unida a la membrana y utiliza al DL-2-hidroxi-butirato como sustrato donador de electrones. Al parecer, en esta especie la enzima se induce en presencia de D-lactato en el medio de cultivo. No hay evidencias de la actividad de una L-LDH. Una característica particular es que sólo el citocromo C₅₃₃ purificado del mismo organismo puede ser reducido y es el aceptor de esta enzima, por lo que se le ha llamado D-lactato:ferricitocromo C₅₃₃ oxidorreductasa. El NAD⁺, NADP⁺, FAD, FMN, citocromo c de levadura y de caballo no son reducidos por esta enzima. Presenta insensibilidad a oxalato (1mM) y cianuro (1 mM) cuando D-lactato como sustrato (Ogata, 1981).

En *Lactobacillus helveticus* (figura 2) el gene de la D-LDH dependiente de NAD⁺ fué clonado y sobreexpresado en *E.coli*. Se dedujo la secuencia de

		20	40	60
helDLDH	TKBFAYAIRKDEEFLNEWKEAHKDI	DDDDYTDKLLTPETAKLAKGADGVVVYQQLDYTAD		
butDLDH	TKIFAYAIREDEKPFLEKWE	DAHKDVEVEYTDKLLTPETAALAKGADGVVVYQQLDYTAE		
plaDLDH	MKIIAYAVRDDRPF	FDWMKENPDVEVKLVPELLTEDNVDLAKGFDGADVYQKDYTAE		
casHICDH	MKIIAYGARVDEIQYFKQWAKD-	TGNTLEYHTEFLDENTVEWAKGFDGINSLQTPPYAAG		
		80	100 ↓	120
helDLDH	TLQALADAGVTKMSLRNVGV	DDNIDMDKAKELGFQITNVPVYSPNAIAEHA	AIQAARVLRQ	
butDLDH	TLQALADNGITKMSLRNVG	DDNIDMAKAKELGFQITNVPVYSPNAIAEHA	AIQAARILRQ	
plaDLDH	VLNKLADEGVKNI	SLRNVGVDDNLDVPTVKARGLNISNVPAYS	SPNAIAELSVTQLNQLLRQ	
casHICDH	VFEKMAYGIKFLTIRNVG	TDNIDMTAMKQYGI	RLSNVPAYS	PAIAEAFALTD
		*	*	*
		140	160	180
helDLDH	D-KRMDEKMAKRDLRW	APTIGREVRDQVVG	VVGTGHIGQVFM	RIMEGFGAKVIHYDIFKN
butDLDH	A-KAMDEKVARHDLRW	APTIGREVRDQVVG	VVGTGHIGQVFM	QIMEGFGAKVIAYDIFRN
plaDLDH	T-PMFNKKLAKQDFR	WAPDIAKELNMTIVGVIGTGRIGRAA	IDIFKFGFGAKVIGYDVYRN	
casHICDH	MKGVAQLQAGDYEKAG	TFIGKELGQQTIVG	VMGTGHIGQVAIKL	KFGFGAKVIAYDPYPM
		*	*	*
		200	220	↓ 240
helDLDH	PELEKKGYYVDSLDD	LYKQADVLSLHDPDVPANVHMINDK	SIAMKDG	VVIVNCSRGRLV
bulDLDH	PELEKKGYYVDSLDD	LYKQADVLSLHVPDVPANVHMINDK	SIAMKQD	VVIVNVS
plaDLDH	AELEKEGMYVD	TLDELYAQADVITLHVPALKDNYHML	NADAFSKMKG	GAYILNFARGTLI
casHICDH	KGDHPDFDYV-SLED	LFKQSDVIDLHVP	GIEQNTHIINEA	AFNLMPGAI
		*	*	*
		260	280	300
helDLDH	DTDAVIRGLDSGKIF	GFVMDTYEDEVGVFNKD	WEGKEFPDKRLAD	LIDRPNVLVTPHTAF
bulDLDH	DTLAVIRGLDSGKVF	GYAMDVYEGEVGFNED	WEGKEFPDARLAD	LIDRPNVLVTPHTAF
plaDLDH	DSEDLIKALDSGK	VAGAALVTYETKIFNKD	LEGQTI	DDKVF
casHICDH	DTQAMLSNLKSGK	LAGVGIDTYETEDLLN	LAKHGSFKDPL	WDEL
		*	*	*
		320		
helDLDH	YTTHAVRNMVVKAF	NNLKLINGEKP	DS	PVALNKNKF
bulDLDH	YTTHAVRNMVVKAF	DNLELIEGKEA	ET	PKVVG
plaDLDH	YTETAVHNMVHVS	MNSNKQFI	ETG	KADTQVKFD
casHICDH	YTETAVHNMVYF	SLQLHVDL	FTKFK	PARKLLVQQVWN

Figura 2. Alineación de la secuencia de aminoácidos de la D-LDH y D-2-hidroxisocaproato deshidrogenasa en el género *Lactobacillus*. Los residuos de aminoácidos conservados de las 4 enzimas se encuentran con letras más oscuras. **helDLDH**, *L. helveticus* D-lactato deshidrogenasa; **plaDLDH**, *L. plantarum* D-lactato deshidrogenasa; **bulDLDH**, *L. bulgaris* D-lactato deshidrogenasa; **casHICDH**, *L. casei* D-2-hidroxisocaproato deshidrogenasa (Lerch y col. 1989). El asterisco denota residuos de aminoácidos que también son conservados en glicerato deshidrogenasa, D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa y el gene *pdxB* de una posible fosfato deshidrogenasa (Schoenlein y col. 1989). Las flechas indican los residuos de aminoácidos esenciales identificados por estudios de modificación química (Tomado de Kochhar y cols. 1992).

aminoácidos de esta enzima: el polipéptido consiste de 336 residuos los cuales presentan una secuencia silmilar a la que se observa en las D-2-hidroxiácidos deshidrogenasas (Kochhar y cols. 1992), lo que sugiere que estas proteínas pueden tener otras actividades enzimáticas no exploradas.

La D-LDH es un nuevo miembro de la familia de las 2-hidroxiácido deshidrogenasas recientemente propuestas y diferente de las L-LDH. Su especificidad por el hidroxipiruvato sugiere fuertemente que la enzima no solo tiene actividad de D-LDH sino también de D-glicerato deshidrogenasa. Los residuos conservados de esta enzima parecen ser residuos involucrados en el sitio de unión al sustrato y en la reacción catalítica correspondiente (Kochhar y cols. 1992).

LACTATO DESHIDROGENASAS INDEPENDIENTES DE NAD⁺ (iLDH)

Otro tipo de LDH, que no utiliza como coenzima NAD⁺, se encuentra en una gran variedad de bacterias; las enzimas de este tipo son denominadas iLDH y tienen diferentes funciones en diferentes especies (Garvie,1980). Igual que para las nLDH también pueden producir L- o D- lactato.

Algunas iLDH son citosólicas, otras están asociadas a membranas, y algunas otras se inducen si el lactato se utiliza como fuente de carbono en el medio de cultivo (Kline y cols, 1965); estas iLDH son generalmente flavoproteínas y catalizan reacciones de oxido-reducción utilizando FMN o FAD como cofactor.

Las iLDHs unidas a membrana convierten el lactato en piruvato. En *E.coli* no hay evidencia de la reacción reversa *in vivo* o *in vitro*; esta bacteria utiliza lactato como fuente de carbono y su oxidación está acoplada a la transducción de energía (Kohn y Kaback,1973).

Algunas iLDHs como la de *E.coli* y *A. aerogenes*, están asociadas con el transporte de electrones en presencia de D-lactato (Futai,1973; Short y cols. 1974; Kohn y Kaback, 1973; Pascal y Pichinoty, 1965; Kemp, 1972). En *E.coli*, la D-iLDH es constitutiva, mientras que la L-iLDH es inducible en presencia de L-lactato o glucosa. En

Pseudomonas aeruginosa tanto la L-iLDH como la D-iLDH también están involucradas en el transporte de electrones y son inducibles; oxidan ambos isómeros del lactato con diferentes aceptores de electrones, por lo que se propone que son isoenzimas. Estas isoformas se localizan en la membrana mitocondrial y al parecer tienen un grupo tiol esencial para su función ya que son sensibles a p-dicloromercuriobenzoato, una propiedad inusual de las iLDHs.

La D-iLDH es constitutiva en *A.aerogenes* (Kline y cols.1986) mientras que en *Staphylococcus aureus* puede ser inducida por altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo.

La D-iLDH de *E. coli* ha sido aislada, purificada y reconstituída en vesículas (Zhen-YuSun y col. 1995); esta enzima oxida el D-lactato (K_m 0.6mM) a pH 7.0 y utiliza FAD como coenzima. Ha sido implicada en las reacciones de transferencia de electrones y en el transporte activo de varios aminoácidos así como de algunos azúcares (Barnes y Kaback, 1971). Se ha propuesto que la enzima de *E. coli* es un monómero de aproximadamente 72000 Da; sensible a oxamato ($K_i=2 \times 10^{-4}$ M), oxalato, y cianuro ($K_i=1.5$ mM). El cianuro estimula la enzima a pH neutro e inhibe la actividad a pH alcalino. Con arsenato (1 mM) se inhibe solamente 10% a diferencia de la L-nLDH que se inhibe totalmente.

Se ha utilizado el reactivo de Ellman {ácido 5-5'-ditiobis(2- nitrobenzoico)} para conocer si la D-nLDH de *E.coli* , contenía en su estructura grupos sulfhidrilos. Los 6 grupos sulfhidrilos titulados en presencia de 2% de SDS, mostraron que la D-LDH no contiene ninguna unión -S-S- (Dowd y cols.1995).

En *Lactobacillus plantarum*, se ha secuenciado y clonado un gene que codifica para la D-LDH, el cual ha sido expresado en células de *E. coli*. Las secuencias de la D-LDH de *E. coli* y la D-LDH de *Lactobacillus plantarum* no presentan similitud entre ellas (figura 3). La D-LDH de *L. plantarum* es homóloga a la D-3 fosfoglicerato deshidrogenasa de *E. coli* y es homóloga también con la D-2-hidroxicaproato deshidrogenasa de *L. casei* (Taguchi, 1991). Los residuos conservados involucran el sitio de unión al sustrato y la reacción catalítica de esta enzima. También se encuentran involucrados los residuos

His¹⁹⁵ y Asp¹⁶⁸; este par juega un papel esencial en la catálisis. Además, la Arg¹⁷¹ es importante para la unión del sustrato, orientación y reconocimiento del sitio de unión al sustrato. Las secuencias alrededor de estos residuos están muy conservadas en varias especies; la Arg²³⁵ de la D-LDH es la arginina conservada en el alineamiento, además, dos residuos de histidina (His²⁰⁵-His²⁰⁶), y tres residuos de ácido aspártico Asp¹⁹³, Asp²⁰⁰ y Asp²⁴⁰ están conservados en las cinco 2-hidroxiácido deshidrogenasas (Taguchi, 1991).

Esta familia consiste en enzimas D- estereoespecíficas con especificidad por el piruvato y el hidroxipiruvato; la D-LDH tiene actividad de D-glicerato deshidrogenasa. Los residuos del sitio activo de las secuencias de esta familia de proteínas son muy conservados y están involucrados en la unión del sustrato al sitio catalítico (Kochhar y col. 1992).

En resumen la actividad de la LDH, dependiendo del organismo que se trate, puede tener una actividad dependiente o no de NAD⁺. Su sustrato, determinado *in vitro* puede ser un el isómero D- o L-lactato. También pueden ser de localización membranar y dependientes de FAD o FMN.

	10	20	30
LDH	MKI IAYAVRDER PFFDTWMKENPDVEVKLVPEL		
HIDH	MKI IAYGARVDEIQYFKQWAKDGTNTLEYHT - EFHK		
PGDH	MAXVSLKDKIKFLLVEGVHQALESLSRAAGYTNI EFKK		
HPR	AKPVQIEVWNPNGKYRVVSTKPNPCTRWINLLIEQDCRVEICTEKT ILS		
PDXB	MKILV		
	40	50	60
LDH	LTEDNVDLAKGFDGADVYQQDYTAEVLNKLADEGVKNISLRNVGVDNLD		
HIDH	LDENTVEWAKGFDGINSIQTTTPYAAGVFEKMHAYGIKPLTIRNVGTDNID		
PGDH	ALDDDEQLKESIRDAHF IGLRSRTHLTEDVINAAEKLVAIGCFICIGNQVD		
HPR	VEDILALIGDKCDGVIGQLTEDWGEVLFSAISRAGGKAFSNMVAVGNVVD		
PDXB	DENMPYARDLFSRLGEVTAVPGRPI PVAQLADADALMVRSVTKVNESLLA		
	90	100	110
LDH	VPTV - KARGLNISNVPAYS PNAIAELSVTQLMQLLRQTPMFNK KKLAKQDF		
HIDH	MTAM - KQYGI RLSNVPAYS PAAIAEFALTD TLYLLRNMGKVQAQLQAGDY		
PGDH	LDAAAK - RGIPVFNAPFSNTRSV AELVIGELLLL RGVPEANAKAMRGVW		
HPR	VNAANKY - GVAVGNTPGVLTETT AELAASLSLAAARRIVEADEFMRAGRY		
PDXB	GKPI - KPVGTATAGTDMVDEAWLKQAGIGFSAAPGCNAIAVVEYVFSLL		
	140	150	160
LDH	RW - APD - IAKELNMTVGVIGTGRIGRAAIDI PKGFGAKVIGDYVYRNA		
HIDH	EK - AGTFIGKELGQQT VGVMTGCHIGQVAIKL FKGF GAKVIAYDPYPMK		
PGDH	NKLAAGSF - - EARGKX LGIIGYGHIGTQLGILAESLGMVYFYDIE - NK		
HPR	DGWLPNLFVGNLLKGETVGVIGAGRIGSAYARMVVEGFKMNL IYFDLYQS		
PDXB	MLAERDGF - - - SLYDRTVGIVGVGNVGRRLQARLEALGIKTL LDCPPRAD		
	190	200	210
LDH	ELEKEGMYVDTL - - - - - DELYAQADVITLHVPALK - -		
HIDH	GDHPDFDYV - SLE - - - - - D - LFKQSDVIDLHVPGIE - -		
PGDH	LPLGNATQVQHL - - - - - D - LLNMSDVVSLHVPENP - -		
HPR	TRLEKEVNTAYGEFLKANGEAPVTWRASSMDEVLEADVISLH - PVLDK -		
PDXB	RGDEGDFR - - SL - - - - - DELVQRADILTFHTP - LFKD		
	220	230	240
LDH	- - - DNYHMLNADAFSKMKDGAYILNFARCTLIDSEDLIKALD SGKVAGAA		
HIDH	- - - QNTHIINEAAFNLMKPGAIVINTARNLIDTQAMLSNLKSGKLAGVG		
PGDH	- - - STKHMMAKAKEISLMKPGSLLINASRGTVVDIPALCDALASKLAGAA		
HPR	- - - TTFHLVNKESL KAMKDAI LINC SRGPVIDEALVDHLRDNPMFRVG		
PDXB	GPYKTLHLADEKLI RSLKPGAILINACRGAVVDNTALLTCLNEGQKLSVV		
	260	270	280
LDH	LVTYEYETKIFNKDLEGQTI DDKVFMMNLFNRDNVLTTPHTAFYTETA VHN		
HIDH	IDTYEYETEDLLNLAKHGSFKDPLWDELGMNVVLSPHIAYTETA VHN		
PGDH	IDVFPT E - - - - - PATNSDPETSPLCEFDNVLLTPHIGGSTQEAQEN		
HPR	LDVFEDE - - - - - PYMKPGLADMKNAIIVPHIASASKWTREG		
PDXB	LDVWEGE - - - - - PELNVELLKKV - DIGTSHIAGTYLEGKAR		
	310	320	330
LDH	MVHVSMSNSKQFIETGKADTQVK - - - PD		
HIDH	MVYFSLQHLVDFLT KFKPARKLL - - - VQVVN		
PGDH	IGLEVAGKLIKYS DNGSTLSAVN - - - FPEVSL - - - - PL - - HGRRRLMHI		
HPR	MATLAAALNLV LKIKGYPVWSDPNRVEPFLDENVSPPAASPSIVNAKALGN		
PDXB	GTTQVFEAYS KPIGHEQHVALDTLLPAPEFGRITLMGPLDQPTLKRVLVHL		

Figura 3. Comparación de las secuencias de D-2 hidroxiaácido deshidrogenasas. Los aminoácidos idénticos de la D-LDH se encuentran señalados con letras más oscuras. Los números de alineación indican la posición de los residuos de aminoácidos en las D-LDH. LDH, *L. plantarum* D-lactato deshidrogenasa; HID, *L. casei* D-hidroxiosocaproato deshidrogenasa; PGDH, *E. coli* D-3- fosfoglicerato deshidrogenasa; HPR, hidroxipiruvato reductasa de pepino, PDXB, *E. coli* producto del gene *pdxb* (Taguchi y col. 1991)

Euglena gracilis

Generalidades

En los últimos años se han efectuado un gran número de investigaciones con protozoarios, dirigidas al conocimiento de estos organismos y en parte al estudio de fenómenos biológicos generales. Los estudios con cultivos axénicos han tenido mucha importancia, tanto para conocer los sistemas bioquímicos que utilizan los protozoos con el fin de obtener energía, como para el conocimiento de los tipos de moléculas requeridas para algunas reacciones sintéticas.

Se ha estudiado la n-LDH de muchos organismos y se ha purificado a partir de mamíferos, plantas, bacterias y hongos. Los péptidos importantes que las componen han conservado su estructura primaria durante la evolución, indicando un origen común.

En *Euglena* se ha descrito la presencia de una D-lactato deshidrogenasa dependiente de flavín mononucleótido directamente unida a la cadena respiratoria (Uribe y cols, 1992), la cual también ha sido descrita en *E.coli* (Zhen-Yu-Sun y cols. 1993). Esto convierte a *Euglena* en un buen modelo de estudio, sugiriendo quizás alguna relación funcional entre ambas enzimas.

Taxonomía

En particular, el género *Euglena* es un taxón complicado por el hecho de presentar características de células animales y vegetales, como lo son la presencia de una envoltura celular compleja ó película y de cloroplastos (Patersson.1991); ocupa así una posición única en la evolución (Leedale,1974; 1978). Los euglenoides son los organismos más relacionados con los kinetoplástidos: tripanosomátidos y bodónidos por lo que, dependiendo del autor, han sido ubicados en el reino vegetal ó en el reino protista (Klvcic y cols. 1984; Jin-Yan-Cui, 1994).

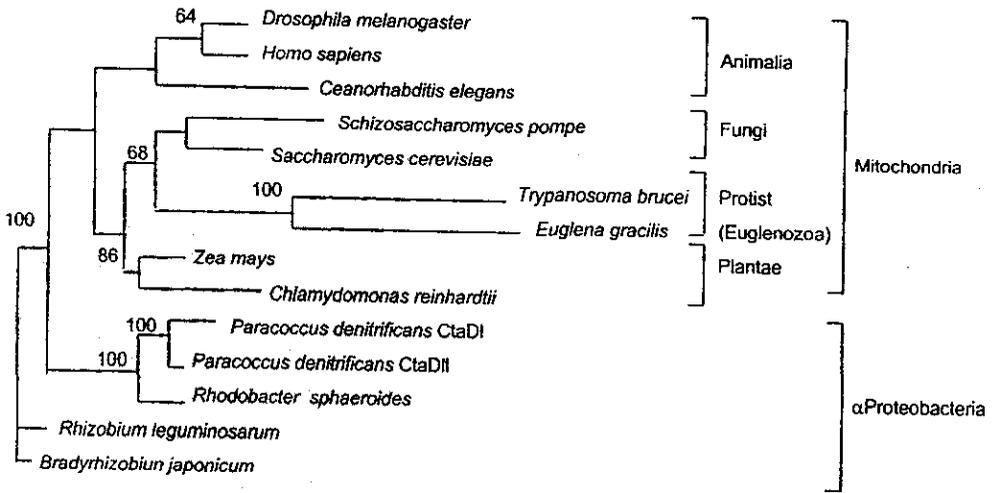
Se han realizado análisis filogenéticos usando COI (gene Ia de subunidad I de la citocromo oxidasa) y Hsp 60 (proteína de choque térmico) (figura 4) y las secuencias de las proteínas sugieren relaciones entre los genomas mitocondriales de *E.gracilis* y kinetoplástidos, (Yasuhira y cols, 1997) lo cual coincide con las relaciones filogenéticas

de estos grupos previamente reportados utilizando RNAr (Gualtieri, 1993) y pre-mensajeros de RNA nucleares a través de un mecanismo de "trans-splicing" (Tessier y cols. 1991).

Por otra parte, se ha propuesto que estas relaciones filogenéticas entre *Euglena* y *Trypanosoma* coinciden ya que, al parecer la célula hospedera de esta endosimbiosis secundaria (en que un eucarionte se introduce en otro eucarionte) fué otro protozoario que ha sido relacionado paralelamente con los tripanosomas (Palmer y Delwiche, 1996). *Euglena* y *Trypanosoma*, representan la primera línea celular conteniendo mitocondrias (Hensgens y cols. 1984), por lo que se sugiere que un evento evolutivo como la endosimbiosis secundaria se llevó a cabo en estos organismos.

Algunos genes que codifican para proteínas esenciales de cloroplastos y mitocondrias son codificados en genomas de organismos con antecedentes de vida libre, los posibles endosimbiontes que dieron origen a estos organelos. Estos procesos de transferencia de "proteínas endosimbióticas" o sus genes, es un caso especial que se lleva a cabo entre Reinos y al parecer esta transferencia es horizontal, lo que tiene una gran importancia dentro del contexto biológico (Henze y cols. 1995).

A



B

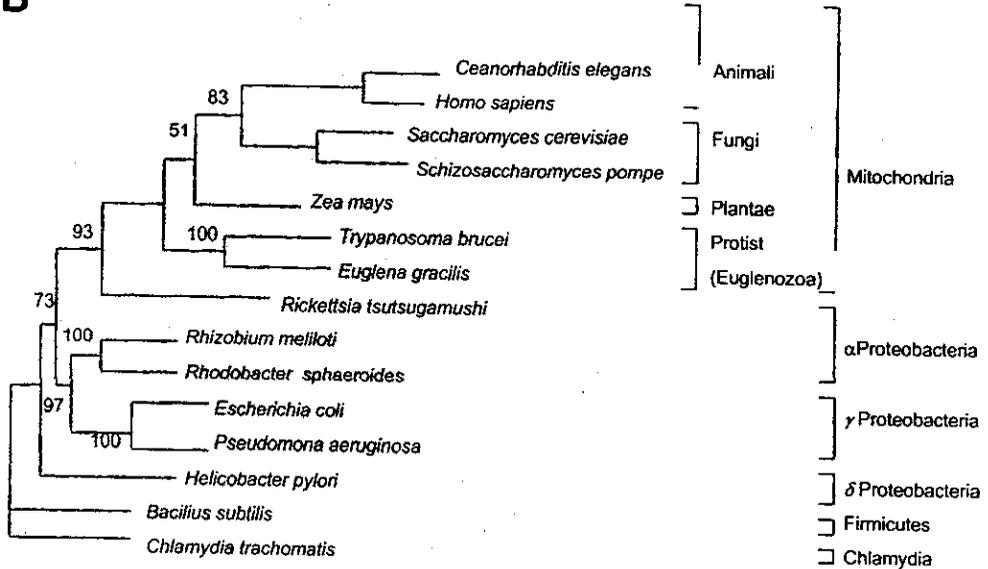


Figura 4. Reconstrucción filogenética de dos genes mitocondriales de diversos eucariontes
 A. COI. B. Hsp60. (Yasuhira, 1997)

Desde el punto de vista botánico *Euglena* pertenece a la División *Euglenophyta* (del griego eu=verdadero, glene=globo ocular y phyton=planta), clase *Euglenophyceae* (Margulis,1981).

Por otra parte, si se considera como organismo protista, la clasificación de *Euglena*, según Levine y cols. (1990) sería:

Reino	Protista
Phylum	Sarcomastogophora
Subphylum	Mastigofora
Clase	Phytomastigophorea
Orden	Euglenidae
Suborden	Euglenina
Género	<i>Euglena</i>
Especie	<i>gracilis</i>

La propuesta actual de ubicación taxonómica de *Euglena gracilis* (Margulis et al,1990)

Reino	Protista
Phylum	Euglenida
Clase	Euglenophyceae

Euglena es un flagelado protista de acuerdo con sus características morfológicas (Walne y Kivic,1989; Triemer y Farmer,1991) y moleculares (Sogin y col.1989; Baldauf y Palmer,1993; Henze y cols.1995). Es considerado un organismo monofilético y está estrechamente relacionado con los kinetoplástidos. Los miembros de la familia Euglenozoa representan una línea divergente en la evolución temprana de líneas de eucariontes con mitocondrias (Sogin y col.1989).

Este organismo presenta en la parte anterior una invaginación por donde entra el alimento que consiste en un canal estrecho que se expande posteriormente en un reservorio en donde se vacía la vacuola contráctil.

Euglena gracilis presenta dos tipos de flagelos unidos a blefaroplastos en la base del reservorio, uno interno que no emerge y esta unido al fotoreceptor (Sleigh,1986). También, presentan una mancha ocular o estigma el cual contiene astaxantina, un pigmento encontrado en crustáceos (Buetow, 1968).

Como todos los protozoarios, excepto las amibas, posee una película la cual presenta surcos en espiral; adyacentes a la película se encuentran mucocistos, los cuales secretan material mucoide para lubricar entre los surcos de la película durante las contracciones (Buetow,1982). Otra característica única de la película es su contenido relativamente alto de carbohidratos. La pentosa y la metilpentosa componen el 80% del total de los azúcares, difiriendo de las membranas de otros organismos en donde el componente mayor es la hexosa. Solo presenta un aminoazúcar, la glicosamina.

Con respecto a la composición lipídica de la película, los más abundantes son el ácido linoléico, araquidónico, mirístico y palmítico. Los triglicéridos varían dependiendo de la fuente de carbono del cultivo. Los fosfolípidos que contiene son fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol también tiene galactolípidos y sulfolípidos como los típicos de organismos fotosintéticos. El ergosterol es el esteroil más abundante en *Euglena* y constituye del 0.05-0.1% del total en peso húmedo (Buetow, 1968).

La reproducción es asexual por fisión longitudinal binaria con división simetrogénica, el tiempo generacional varía entre 10 y 22 horas dependiendo de la fuente de carbono y la cepa (Sleigh,1986). Se ha observado la formación del huso mitótico, pero no forma placa ecuatorial metafásica y los cromosomas que carecen de centrómeros se desplazan hacia los polos de manera autónoma.

Con respecto a las mitocondrias, estas varían en cantidad, tamaño y estructura. Las mitocondrias están limitadas por dos membranas de 60 Å aproximadamente. Según las condiciones de crecimiento y la fuente de carbono, en *Euglena* se han observado dos poblaciones de mitocondrias (Leedale,1978); una en forma de red filamentosa y ramificada que recibe el nombre de retículo mitocondrial, el cual ocupa del 15% al 16% del volumen total de la célula, y puede ser temporal (Calvayrac y cols. 1972.,1974.,

Ledoight y cols. 1972., Lefort-tran, 1975) y otra población de mitocondrias las cuales son pequeñas y redondas distribuidas en toda la célula (Raya y Moreno-Sánchez, 1987). En ausencia de fuente de carbono en el medio de cultivo se observan mitocondrias encapsuladas en una membrana que es comparable con vacuolas autofágicas encontradas en otros organismos.

En *Euglena* crecida en la obscuridad, Osafune y cols. (1987) observaron diferencias morfológicas en las mitocondrias durante la fase estacionaria de crecimiento; una población de forma reticular y otra redonda, proponiendo que estos cambios dependían del ciclo celular, la fuente de carbono y la presencia o ausencia de inhibidores.

Otros microorganismos (*Microsomas pusilla*, *Trachelomonas*, *Menodeum*, *Rhabdomonas*, *Chlamydomonas* y *Chlorella*) así como algunas levaduras y plantas presentan un retículo mitocondrial similar al de *Euglena*.

En cuanto a la división de las mitocondrias existen dos modelos, uno propone que es durante la división celular que todo el condrioma se divide, y el otro que se fragmenta previamente formando mitocondrias, las cuales se reparten entre las células hijas (Buetow, 1989).

A diferencia de animales y plantas, *Euglena gracilis* sintetiza paramilo como polisacárido de reserva, un polímero glucosídico con enlaces β 1-3 entre los monosacáridos. Por otra parte, se ha demostrado (Briad y col. 1981) que en *Euglena* el lactato es metabolizado a lo largo de la vía que transforma lactato en el polisacárido de reserva paramilo, por la presencia de una fosfoenol piruvato carboxinasa dependiente de GTP (Cook, 1966). La trehalosa se encuentra como segundo carbohidrato de reserva (Miyatake y col. 1984).

Para su crecimiento el intervalo de pH del medio de cultivo puede variar de 2.8 a 7.8, dependiendo de la fuente de carbono (Cook, 1968). Las células sobreviven a condiciones extremas de anoxia o altos niveles de radiación ionizante (Buetow, 1989) y son capaces de soportar altas concentraciones de metales pesados como plomo, cadmio

y mercurio (Bariaud y Mestre, 1984., Bariaud, 1985, De Filippis, y col. 1994., Navarro y cols. 1997).

SISTEMA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES

Euglena gracilis

Las mitocondrias de *Euglena* presentan funciones similares a las descritas en mitocondrias de mamíferos y plantas en cuanto a la obtención de energía.

Danforth, (1953) fué el primero en demostrar la existencia del ciclo de Krebs en *Euglena*, así como la oxidación de diversos sustratos. Así, el etanol, el acetato y el lactato son oxidados a pH 7.0, mientras que el succinato, fumarato y malato son oxidados en medio ácido. Como se mencionó anteriormente las mitocondrias aisladas de este organismo oxidan diversos sustratos, principalmente lactato (Price, 1962; Rutner y Price, 1964; Sharpless y Butow, 1970; Lord y Merret, 1971; Collins y cols. 1975; Calvayrac et al, 1978; Tokunaga, 1979; Isegawa, 1984; Buetow, 1989; Uribe y Moreno-Sánchez, 1992).

Aunque *Euglena* tiene una cadena de transferencia de electrones la cual incluye los complejos I, II, III y IV, algunos de estos componentes tienen características bioquímicas atípicas (Sharpless y Butow, 1970). La oxidación de algunos sustratos es sensible a diversos inhibidores de la cadena de transporte de electrones como la rotenona, la antimicina, el amital, y el cianuro, o de la fosforilación oxidativa como la oligomicina; sin embargo, esta sensibilidad es parcial, lo cual sugiere la existencia de una cadena de electrones alterna (Sharpless y Butow, 1970) similar a la que se encuentra en mitocondrias de plantas, bacterias, levaduras y otros microorganismos (Henry y Nyns, 1975), además de la cadena de transporte de electrones clásica sensible a la rotenona, la antimicina y el cianuro.

En *Euglena*, Perini y cols. (1964) reportaron la presencia de distintos citocromos (a, b y c), así como la existencia de un citocromo o (tipo b) que funciona como oxidasa terminal (Devars y cols. 1992), aunque la participación de estos componentes en la oxidación de sustratos insensible a cianuro no ha sido demostrada.

En *Euglena* el citocromo c, funciona como acarreador de electrones entre los complejos III y IV, está unido covalentemente al hemo, a través de un enlace sencillo tioéter (esto es una particularidad en *Euglena*). También el citocromo c₁ tiene un máximo de absorción a 561 nm en *Euglena* a diferencia de los citocromos comunes que absorben a 553 nm, además de estar unido a una secuencia (-Phe-Ala-Pro-Cys-His) diferente a la de otros organismos (-Cys-Xaa-Xaa-Cys-His-) (Mukai y cols. 1989).

Por otra parte, se ha propuesto que en células de *Euglena* crecidas en presencia de antimicina se induce una vía alterna (Sharpless y Butow, 1970). En estudios realizados en nuestro laboratorio se observó la sobreexpresión de la cadena alterna en mitocondrias de *E. gracilis* crecidas en etanol y glutamato+malato+cianuro como fuentes de carbono (Jiménez-Mayorga, 1994 y Guzmán y cols. 1994).

En *E. gracilis* la oxidación de lactato insensible a cianuro y la estimulación por AMP de la cadena alterna también depende de la fuente de carbono (Sharpless y Butow, 1970). Esta cadena alterna de transporte de electrones es capaz de oxidar el NADH exógeno y endógeno, el succinato y el lactato, se estimula por AMP, es insensible a el cianuro y la antimicina, pero sensible a DPA (Sharpless y Butow, 1970; Collins y col. 1975; Calvayrac y col. 1978; Moreno-Sánchez y Uribe y cols. 1992).

La información disponible ha llevado a proponer la existencia de diversas rutas para la oxidación de sustratos en *Euglena*:

Ruta de la citocromo oxidasa sensible a CN. Esta cadena sensible a CN es similar a la encontrada en mitocondrias de plantas y animales, y tiene como función la transferencia de electrones desde el NADH endógeno y el succinato al oxígeno (Butow, 1989)

Ruta de la citocromo oxidasa insensible a CN. Esta vía es estimulada por AMP, es sensible a SHAM (ruta de la oxidasa alterna) insensible a CN, y se utiliza en el transporte de electrones desde el succinato, sin acoplarse a la fosforilación de ADP.

En *Euglena gracilis* esta posible oxidasa alterna no está identificada.

Ruta propuesta para la oxidación de Lactato Price, demostró en 1962 la oxidación de lactato en extractos celulares de *Euglena*; al parecer esta oxidación depende de zinc en el medio de cultivo. Por otra parte, se obtuvo evidencia de 2 LDH dependientes de NAD^+ , una insoluble que no disminuye su actividad por deficiencia de zinc (D-LDH), y una soluble que es sensible a la falta de zinc en el medio de cultivo (L-LDH).

Lord y Merret (1971) y Collins y Merret (1975) observaron la oxidación de D-lactato en células de *Euglena* crecidas en presencia de luz, en las cuales la inhibición en presencia de cianuro 1mM fué sólo del 10%.

Por otra parte, se ha propuesto que la oxidación del lactato está acoplada a dos sitios de fosforilación (Sharpless y Butow 1970 a,b): un sitio acoplado a la transferencia de electrones que va del citocromo aa_3 al oxígeno y el segundo sitio con un flujo de electrones desde el citocromo b (quizás el b_{565}) al citocromo c (figura 5). Rutner y Price (1964), propusieron que los electrones del D-lactato entran a la cadena de transporte de electrones de *Euglena* principalmente a nivel de la ubiquinona.

Cabe señalar que el potencial de membrana generado por la oxidación de L-lactato es parcialmente sensible a cianuro y de acuerdo con lo observado por Moreno-Sánchez y Raya (1987), que la respiración resistente a cianuro es capaz de generar un potencial de membrana .

Butow (1989) ha propuesto diversas vías de oxidación del lactato en mitocondrias de *Euglena* (figura 5), que se resumen a continuación:

- 1) Los electrones provenientes de la oxidación del lactato entran a la cadena respiratoria por una iDLH que tendría FAD o FMN como grupo prostético, de donde van a un citocromo tipo b que los transfiere al citocromo c acoplado a la fosforilación) y finalizan con la citocromo c oxidasa. Esta vía involucra a la oxidasa alterna que es sensible a SHAM y CN. Sin embargo, el SHAM de acuerdo con lo ya reportado por Kümmel y Brinkmann (1988), y Schonbaum (1971) no tiene efecto en la oxidación de diversos sustratos, en particular el lactato en las mitocondrias de *Euglena*.

2) Los electrones que llegan al citocromo "tipo b" son transferidos a la ubiquinona y siguen la cadena de transporte de electrones clásica sensible a antimicina y CN; ó una vía insensible a antimicina (50-90%) pero sensible a CN.

3) Una vía insensible a CN que involucra a la oxidasa alterna (Calvayrac y Butow, 1971; Collins y Merret 1975; Calvayrac y cols. 1978) donde se propone un citocromo tipo "b" insensible a antimicina.

Vía normal	-----	2 ATPs	sensible a antimicina
Citocromo aa ₃ vía citocromo "b"	-----	2 ATPs	insensible a antimicina
Vía de la oxidasa alterna	-----	0 ATPs	insensible a antimicina

En *Euglena* se ha reportado que la vía insensible a CN se modifica por la fuente de carbono (Sharpless y Butow, 1970., Henry y Nyns, 1975), aunque su función biológica no esta bien establecida; esta condición es similar a lo que sucede en procariotes (Escamilla y cols. 1987).

Se ha encontrado en *Euglena* que la síntesis de ATP con L-lactato es parcialmente sensible a antimicina (18.8% de inhibición) y sensible a CN (80.8% de inhibición), esto podría ser otra evidencia de que la vía alterna es capaz de llevar a cabo síntesis de ATP en presencia de CN.

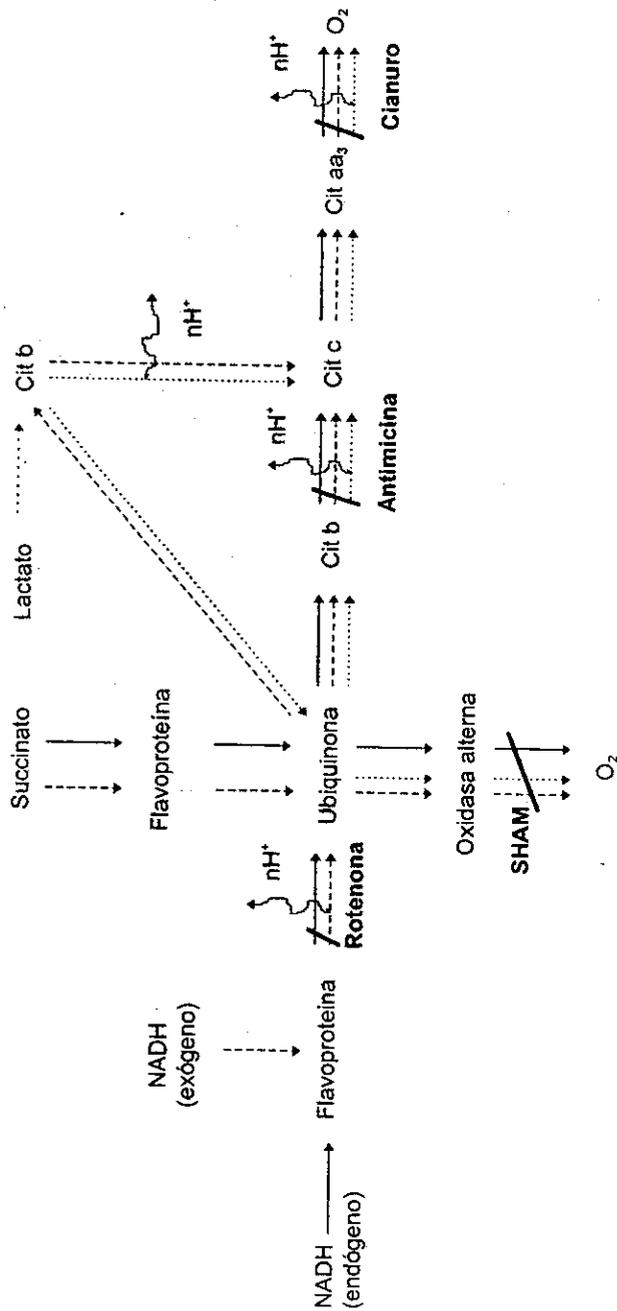


Figura 5. Esquema propuesto de las múltiples vías de transferencia de electrones en la mitocondria de *Euglena gracilis*. \longrightarrow vía de la citocromo oxidasa sensible a CN, $\cdots\cdots\cdots$ vía resistente a CN, sensible a SHAM, estimulada por AMP (oxidasa alterna), para el transporte de electrones del succinato. \rightarrow vía de transporte de electrones del lactato mediada por un citocromo tipo "b", involucrando la oxidasa alterna, o sensible a antimicina y CN, resistente a antimicina y sensible a CN. \rightarrow vía de transporte de electrones del NADH exógeno. (Tomado de Buetow, 1989)

Una demostración directa de la fosforilación oxidativa acoplada a la oxidación de L-lactato es la resistencia a la antimicina y sensibilidad al HQNO confirmando que este sustrato es oxidado por la vía alterna (Uribe y cols. 1992) . Como se mencionó anteriormente, el L-lactato dona sus electrones a la cadena mediante un citocromo tipo "b" (componente de la vía alterna), el cual transfiere electrones al citocromo "c" acoplado a la fosforilación ; esta transferencia de electrones es más sensible a CN que a antimicina, en tanto que Sharpless y Butow (1970) observaron que la respiración con D-lactato es más sensible a la antimicina que con L-lactato.

Propusimos así que en las mitocondrias de *Euglena gracilis* existen dos vías, una alterna resistente a cianuro que parece no estar acoplada a la síntesis de ATP, y otra vía, que depende la lactato para llevar a cabo diversas reacciones dependientes de energía (Uribe y Moreno-Sánchez, 1992).

La presencia de una lactato deshidrogenasa en partículas submitocondriales de *E. gracilis* sugiere que dicha enzima es un componente integral de la membrana interna cuando la fuente de carbono del cultivo es glutamato+malato (Uribe y cols, 1992). Interesantemente, estas características son muy similares a las descritas para cadenas respiratorias de bacterias.

En el laboratorio se ha propuesto un esquema (figura 6) con respecto a los datos obtenidos, mostrando los sitios de oxidación del L-lactato, los posibles cofactores de la lactato deshidrogenasa, así como su interacción con diversos inhibidores (Jiménez, 1994).

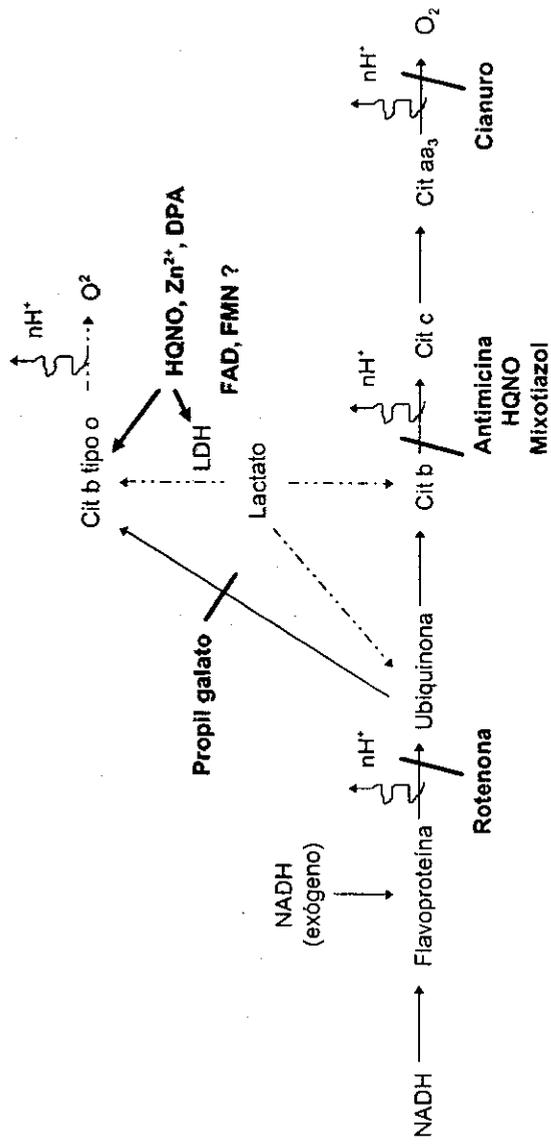


Figura 6. Esquema propuesto por nuestro grupo de trabajo para el flujo de electrones en la mitocondria de *Euglena*, mostrando los sitios de oxidación del lactato, posibles cofactores, y posible interacción de los diferentes inhibidores.

Por lo que respecta al trabajo realizado en nuestro laboratorio, los datos han sugerido que la respiración insensible a antimicina y cianuro en *Euglena* se debe a la presencia de una oxidasa alterna que se expresa de forma constitutiva, aunque sus niveles parecen depender de la fuente de carbono (tabla 1) o de la presencia de inhibidores en el medio de cultivo. El grado de inhibición de la respiración si depende de la presencia de inhibidores, pero no la cantidad de la enzima.

Tabla 1. Inhibición del consumo de oxígeno en mitocondrias de *Euglena gracilis* crecidas en distintas fuentes de carbono. Las mitocondrias (1mg/ml) fueron incubadas con los inhibidores durante 5 minutos antes de la adición de L-lactato (10 mM). Los datos representan el porcentaje de inhibición y son el promedio de 5 preparaciones \pm error estándar (Uribe, 1992; Jiménez-Mayorga, 1994; Navarro-Moreno, 1995)

Inhibidores	Fuentes de Carbono		
	Etanol	Glutamato + Malato	Peptona
Rotenona (0.5 mM)	10 \pm 4	34 \pm 1	0 \pm 0
Antimicina (0.01 mM)	36 \pm 2	14 \pm 6	67 \pm 0
Mixotiazol (0.01 mM)	37 \pm 4	72 \pm 3	67 \pm 0
HQNO (0.01 mM)	15 \pm 6	78 \pm 2	34 \pm 1
CN (0.1 mM)	35 \pm 7	66 \pm 3	39 \pm 5
DPA (0.25 mM)	77 \pm 7	83 \pm 8	100 \pm 0
Disulfiram (0.5 mM)	34 \pm 4	9 \pm 2	0 \pm 0
SHAM (0.5 mM)	37 \pm 4	2 \pm 1	8 \pm 0.1
Velocidad de Respiración (ng átomos de O ₂ /mg/min)	200 \pm 10	90 \pm 6 (10)	117 \pm 13

Bacterias

Se ha demostrado en bacterias que la expresión funcional de la cadena alterna depende de la fuente de carbono del cultivo y del estadio de crecimiento (Escamilla y cols. 1988). En particular en *Euglena* parece ser inducida en presencia de etanol (Hosotani y cols. 1988; Ono y cols. 1995) o lactato (Calvayrac, 1970; 1971; 1978).

Las cadenas respiratorias de bacterias tienen diversas oxidasas terminales que se expresan simultáneamente. El citocromo aa_3 de bacterias tiene funciones análogas al citocromo aa_3 mitocondrial. El citocromo o es una oxidasa terminal que contiene un hemo tipo "b", en *E.coli* la ubiquinol: O_2 oxidoreductasa, contiene dos hemo tipo "b", uno forma un centro bimetálico con cobre, como el citocromo aa_3 .

En procariotes se conocen tanto citocromo como quinol oxidasas terminales alternas que bombean protones (Puustinen y cols. 1989). Estas enzimas se agrupan dentro de la familia de oxidasas respiratorias Fe-Cu, que incluyen al complejo bo_3 de *E. coli*, caa_3 y cao_3 de *Bacillus* y un complejo no totalmente identificado en *Paracoccus denitrificans* (García-Horsman y cols. 1994). En este organismo el consumo de oxígeno con succinato como sustrato se reduce entre un 40-50% en presencia de mixotiazol ($8.8\mu M$), sugiriendo que la actividad sensible a mixotiazol, es debida a una oxidasa alterna que es el citocromo o (Parsonage y cols. 1986).

Se ha aislado y purificado el citocromo c de *P.denitrificans*, el cual presenta características físicas y funcionales similares a las encontradas en citocromos aislados de otras bacterias, también presentan un citocromo "cd" inducible que funciona *in vivo* como nítrito reductasa. Además, tanto *Paracoccus* como *Hydrogenomona entrophia*, *E.coli* y *Bacillus megaterium* muestran un tipo de control respiratorio similar al mitocondrial, y esto es raramente observado en otras preparaciones de membranas bacterianas.

La cadena respiratoria de *P. denitrificans* (Figura 7) tiene componentes adaptativos y constitutivos, que están ausentes en mitocondrias. Su cadena respiratoria incluye dentro de estos componentes adaptativos una transhidrogenasa dependiente de NAD^+ , succinato deshidrogenasa, NADH deshidrogenasa, y algunas

enzimas del ciclo de Krebs, flavoproteínas, proteínas Fe-S, ubiquinona 10, (como única quinona funcional de la cadena), 2 citocromos b y 2 citocromos c fácilmente distinguibles de los componentes de la cadena respiratoria de células con crecimiento aeróbico, citocromo aa₃ y citocromo oxidasa y baja sensibilidad a antimicina y rotenona. Los componentes adaptativos incluyen una hidrogenasa, formato deshidrogenasa, y una lactato deshidrogenasa la cual se induce dependiendo de la fuente de carbono.

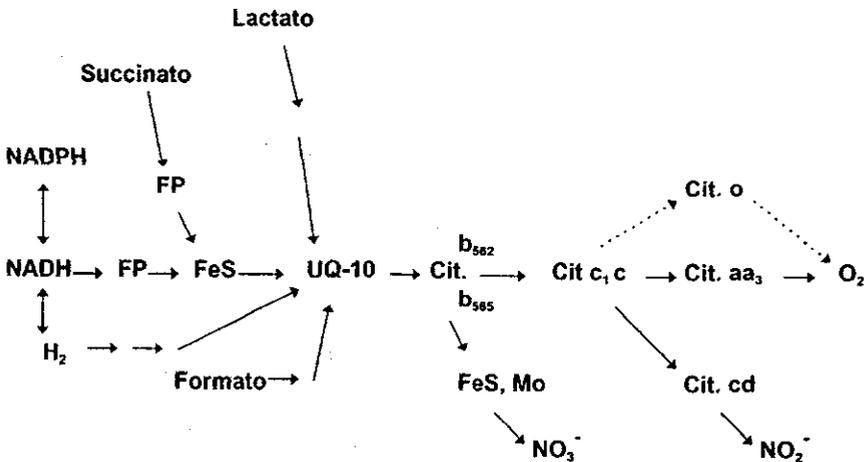


Figura 7. Cadena respiratoria de *Paracoccus denitrificans*. Componentes adaptativos y constitutivos de la cadena de transporte de electrones. Tomado de John y Whatley, 1975.

El lactato dona sus electrones a la ubiquinona (figura 7) la nitrato reductasa y la nitrito reductasa (citocromo cd). En estas mitocondrias la velocidad de respiración se incrementa con la adición de ADP y FCCP, y disminuye en presencia de venturicidina y oligomicina (John y Whatley, 1975).

Paracoccus denitrificans posee una cadena respiratoria que incluye NAD⁺ transhidrogenasas, NADH y succinato deshidrogenasas, ubiquinol como única quinona funcional, dos citocromos b, dos citocromos c, y una citocromo oxidasa. Esta cadena es sensible a bajas concentraciones de antimicina y rotenona, pero es poco sensible a CN, por lo que se ha propuesto la presencia, como en otras bacterias, (John y Whatley, 1975) de una vía alterna en la cual existen componentes constitutivos y componentes inducibles de la cadena de transporte de electrones. Entre estos últimos podemos mencionar el "citocromo cd" que funciona *in vivo* como una nitrito reductasa.

El lactato entra a nivel del citocromo "b" en *Euglena*. Se ha sugerido que la lactato deshidrogenasa es un componente adaptativo en *Paracoccus*, similar a lo propuesto por Buetow para *Euglena*, además, *P. denitrificans* puede utilizar ácido láctico y etanol como únicas fuente de carbono y así modificar los componentes de su cadena de transporte de electrones que son inducibles.

Como el patrón de oxido-reducción con L-lactato como sustrato fué parcialmente sensible a rotenona y mixotiazol, y el DPA y el HQNO lo redujeron totalmente, esto parece indicar que la oxidación de L-lactato está asociado con la formación de NADH.

En *P. denitrificans* la transferencia de electrones involucra la reducción del oxígeno molecular y este proceso está acoplado con la reducción de el nitrito y el nitrato (figuras 8 y 9). Esta cadena es capaz de generar un potencial electroquímico transmembranal. *Paracoccus* presenta una elevada adaptabilidad ya que utiliza diferentes aceptores finales de electrones dependiendo de la disponibilidad de oxígeno.

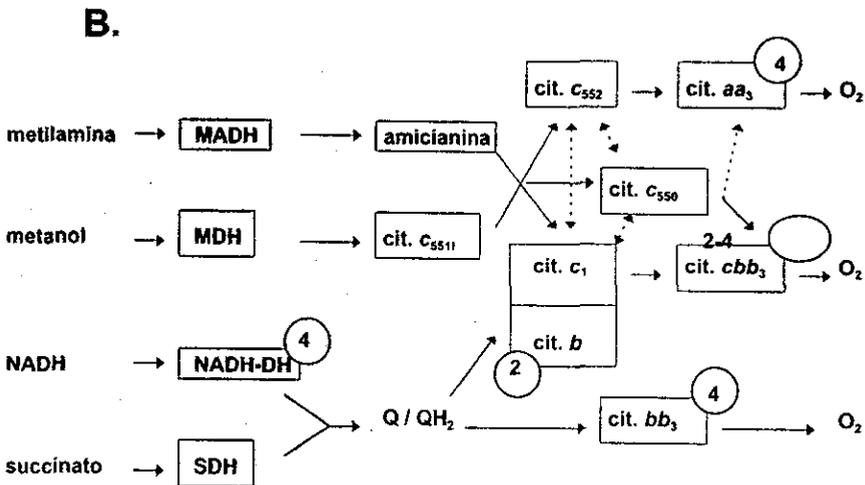
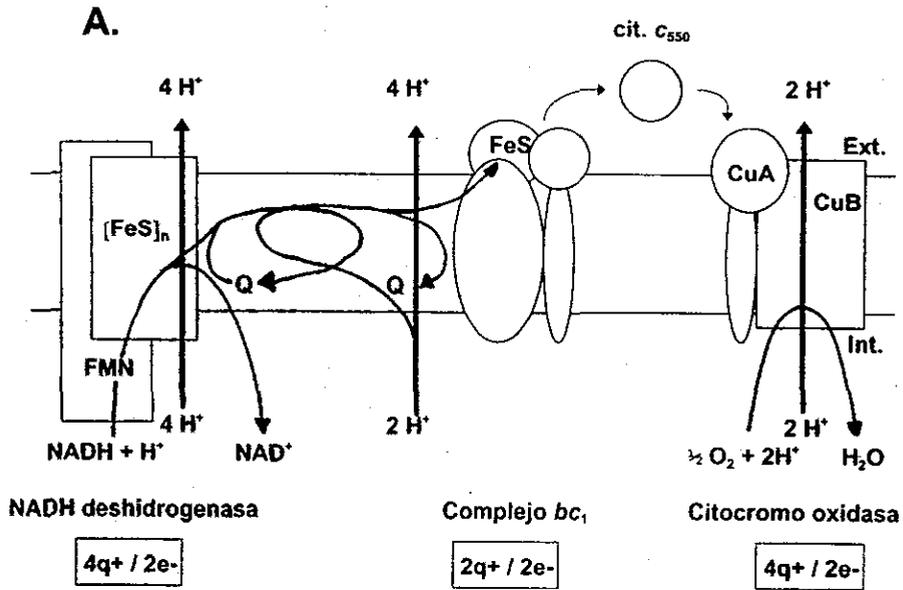
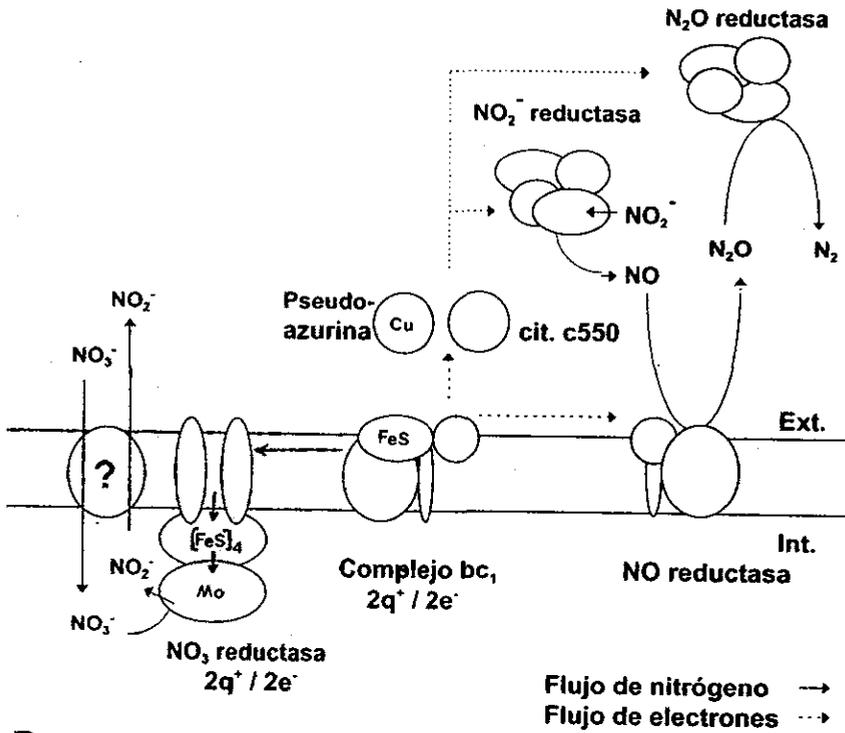


Figura 8. Respiración aeróbica. (A) esquema de la cadena respiratoria como la que se encuentra en la membrana interna mitocondrial y en la membrana citoplásmica de bacterias aeróbicas: NADH deshidrogenasa, ubiquinona (Q), complejo bc₁, citocromo c₅₅₀ y citocromo c oxidasa. (B) cadena respiratoria aeróbica en *Paracoccus denitrificans*. Metilamina deshidrogenasa (MADH), metanol deshidrogenasa (MDH), NADH-DH, y succinato deshidrogenasa. Los números delimitados con círculos indican la estequiometría. Tomado de Van Spanning y cols. 1995.

A.



B.

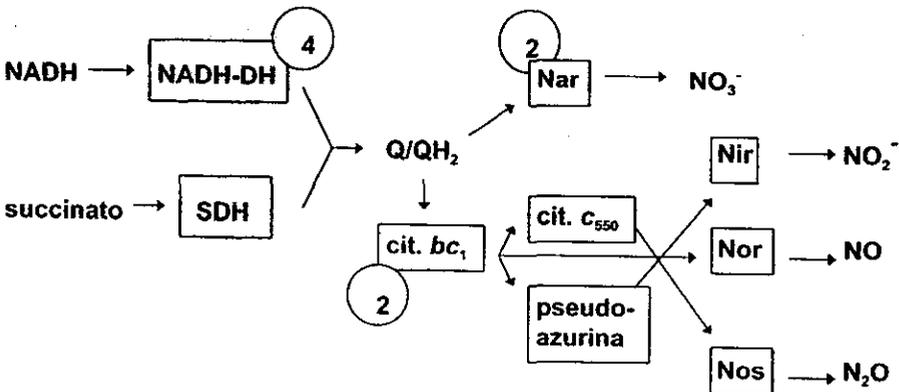


Figura 9. Respiración anaeróbica. (A) esquema del complejo polipeptídico involucrado en la denitrificación, localizado en la membrana citoplásmica de bacterias anaeróbicas. (B) cadena respiratoria anaeróbica de *Paracoccus denitrificans*. Nitrito reductasa (Nar), nitrilo reductasa (Nir), óxido nítrico (Nor), y óxido nítrico (Nos), citocromo c550, pseudoazurina que es un acarreador de electrones alterno del complejo bc1 hacia Nir y Nos, en analogía con el cbb3 oxidasa. La estequiometría se indica con círculos. Tomado de Van Spanning y cols. 1995.

Plantas

En plantas también se ha demostrado la existencia de oxidasas terminales alternas insensibles a CN y antimicina (figura 10). Algunas varían en cuanto a la sensibilidad a diversos inhibidores, lo que depende de la fuente de carbono del medio de cultivo (Lance y col. 1985; Siedow, 1980; Moore y Siedow, 1991; Hoefnagel y col. 1995; Day y col. 1994). También se ha demostrado que éstas no tienen la capacidad de formar un gradiente electroquímico de protones (Siedow, 1978; Hud y Palmer, 1978; Zhang, 1996).

Rasmusson (1990) determinó que estas oxidasas están asociadas a la membrana mitocondrial interna orientadas hacia la matriz, ya que el tratamiento con tripsina en partículas submitocondriales disminuye la actividad insensible a KCN en un 50%, lo que no sucede en mitoplastos.

Se ha propuesto que el sitio de bifurcación de la oxidasa alterna es a nivel de las quinonas (Moore y Siedow, 1991) . La actividad de la quinol oxidasa es sensible a ácidos benzohidroxámicos (SHAM) (Schonbaum y cols. 1971) , al n-propil galato (Siedow y Girvin, 1980), al disulfiram (Grover y Laties, 1981) y al DPA (Baker, 1963).

En plantas existe una oxidasa alterna sensible a SHAM, y parcialmente sensible a CN, antimicina, azida, y CO. Esta vía es similar a encontrada en hongos y algas (Lloyd, 1974)

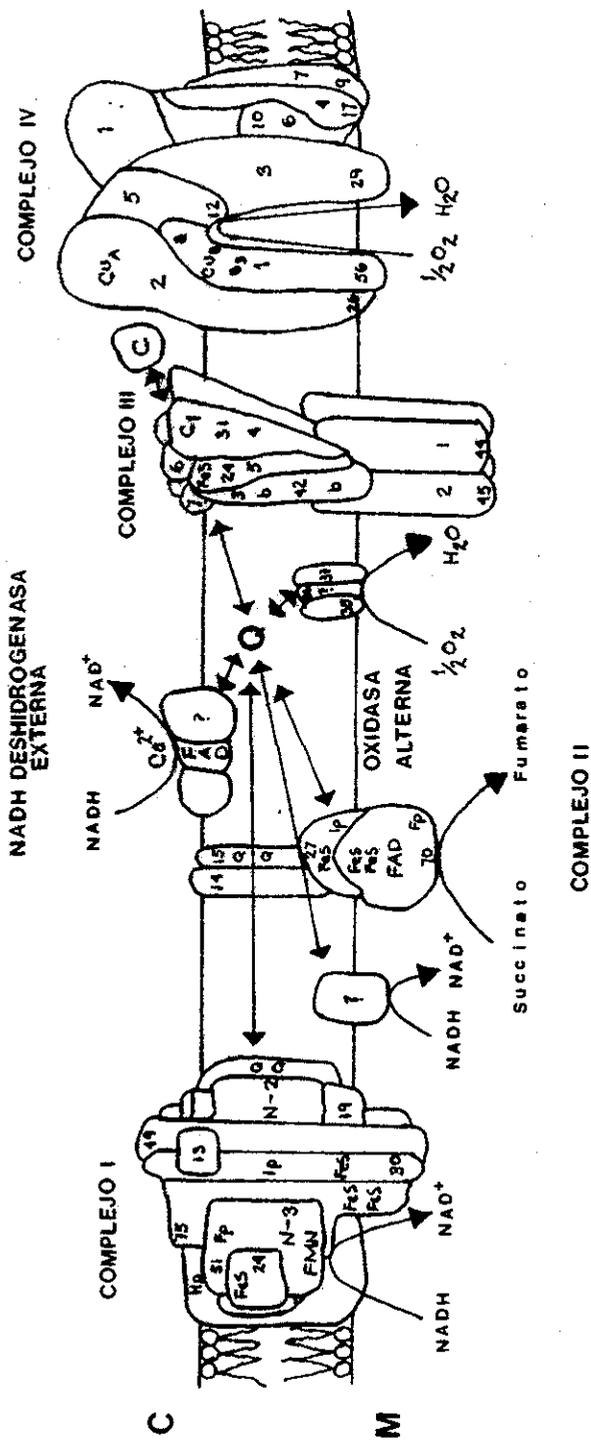


Figura 10. ORGANIZACION DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL DE PLANTAS.

Se observa una NADH deshidrogenasa externa y una oxidasa alterna (Quinol-oxidasa). C=citosol M=matriz
Tomado de Moore y Siedow, 1991.

La existencia de vías alternas de transporte de electrones se conoce en hongos (Guerin y cols. 1994), protistas (Devars y cols. 1992), y algas (Eriksson, 1995).

La actividad es insensible a CN similar a lo ya reportado en plantas, donde las oxidasas alternas son del tipo quinol oxidasas con elevada sensibilidad a SHAM y no forman gradiente electroquímico. En *Euglena* la vía es insensible a SHAM y si participa en la formación de potencial. Se sugiere que esta oxidasa alterna, no es una quinol oxidasa sino que probablemente se trate de una citocromo oxidasa (Uribe y cols. 1992).

Algas

En mitocondrias aisladas de algas clorofitas como *Chlamydomonas*, se ha detectado la actividad de una oxidasa alterna parcialmente insensible a CN y sensible a SHAM (Weger y cols. 1990; Eriksson y cols. 1995) aunque no se conoce su participación en la fosforilación oxidativa.

En mitocondrias de *Polytomella* (alga incolora) se ha determinado la presencia de hemos b, c, c₁, a y a₃, algunas flavoproteínas; así como sensibilidad a antimicina, rotenona, piericidina y altas concentraciones de KCN (Lloyd y Chance, 1968). La existencia de una oxidasa alterna insensible a KCN parcialmente sensible a disulfiram y propil-galato y totalmente sensible al DPA, la antimicina y el HQNO fué recientemente reportada (Reyes, 1997).

OBJETIVOS

El interés por conocer la función de las enzimas que intervienen en la oxidación de los distintos sustratos de la cadena de transporte de electrones tanto en organismos procariontes como eucariontes, ha llevado a varios grupos de investigación a desarrollar diversos métodos para aislar cada una de estas enzimas en forma pura y activa.

En el caso de *Euglena gracilis*, hasta la fecha no se ha realizado ninguna caracterización de la lactato deshidrogenasa mitocondrial. Por lo que para el presente estudio se plantearon los siguientes objetivos:

1) Determinar si la actividad de la lactato deshidrogenasa con L-lactato y D-lactato dependía de una determinada vía de oxidación, para lo cual se midió la respiración alimentada con los susodichos sustratos en presencia de diversos inhibidores del transporte de electrones tanto en mitocondrias como en partículas submitocondriales de *Euglena gracilis*.

2) Explorar la existencia de una oxidasa alterna, insensible a cianuro, asociada a la actividad de la LDH.

3) Identificar la localización de la lactato deshidrogenasa independiente de NAD^+ de *Euglena gracilis*.

4) Caracterizar cinéticamente la Lactato deshidrogenasa independiente de NAD^+ en mitocondrias y partículas submitocondriales de *Euglena gracilis*.

5) Identificar la actividad de la o las enzimas que tengan como sustrato L-lactato y D-lactato en geles nativos.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó la cepa Z de *Euglena gracilis*, que tiene como características: a) un tiempo generacional de 10-22 horas, dependiendo de la fuente de carbono (Buetow, 1968); b) tendencia a blanquearse entre 34-35°C (Hutner y cols, 1965) y crecimiento nulo en galactosa como fuente de carbono (Cook, 1968).

CULTIVO Y COSECHA DE *Euglena gracilis*:

Se realizaron cultivos axénicos de *E. gracilis* crecidos en la obscuridad como reportan Moreno-Sánchez y Raya (1987), utilizando un medio ácido organotrófico (Hutner y cols, 1956) modificado de acuerdo con Schiff (1971), a pH inicial de 3.5; las vitaminas B1, B6 y B12 se obtuvieron de cápsulas de complejo vitamínico (neurobión) y fueron esterilizadas por filtración en Millipore (Cantor y Burton, 1975). El cultivo se mantuvo en agitación constante (61 rev/min) a temperatura ambiente (20-25°C) y con glutamato más malato como fuente de carbono (Uribe y cols, 1992). Las células se cosecharon en la fase logarítmica de crecimiento (3 1/2 días)

OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN MITOCONDRIAL:

Se siguió el método descrito por Moreno-Sánchez y Raya (1987), con algunas modificaciones (Uribe y cols. 1992). Las células fueron rotas por sonicación y se recuperaron las mitocondrias por centrifugación diferencial 8500 rpm, en un medio estándar que contiene sacarosa 250mM, HEPES 10mM, EGTA 2mM y 0.1% de albúmina delipidada (medio SHEA) a pH 7.2.

OBTENCIÓN DE PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIALES:

Para la preparación de las partículas submitocondriales, se descongelaron las mitocondrias, utilizando una concentración de aproximadamente 200 mg/ml de proteína en el medio de SHEA en un volumen final de 26-30ml agregando 15mM de MgCl₂ y 1mM de ATP. La suspensión se sonicó en un sonicador Soniprep 150 (10-12 micrones de amplitud) en baño de hielo, durante 6 intervalos de 10

segundos c/u, dejando un intervalo de 1 minuto entre uno y otro período de sonicación. El homogenado resultante se centrifugó a 12500 rpm durante 12 minutos y el sobrenadante se centrifugó a 31000 rpm durante 45 min. Las partículas se resuspendieron en el medio de SHEA, y lavadas 2 veces con el mismo medio de obtención.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

La proteína fué estimada por el método de Biuret (Gornall y cols, 1949) en presencia de 1% (p/v) de desoxicolato de sodio y utilizando albúmina libre de ácidos grasos como estándar. La turbidez ocasionada por el paramilo fué eliminada centrifugando los tubos a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C después de 20 min de añadido el reactivo.

También se utilizó el método de Lowry y cols (1951), con las modificaciones señaladas anteriormente.

CONSUMO DE OXÍGENO

La determinación del consumo de oxígeno en mitocondrias y partículas submitocondriales de *Euglena* se realizó en un oxímetro marca YSI, a 30°C, en medio KMEP, que consiste en KCl 120 mM, MOPS 20 mM, EGTA 2 mM y K_2HPO_4 5mM, pH 7.2.

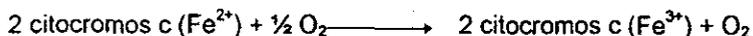
La oxidación de los sustratos como succinato (10mM), L-lactato (10mM) y D-lactato (5mM), se llevó a cabo incubando durante 1 minuto a las mitocondrias o a las PSM en el medio KMEP a una concentración de proteína de 1 mg/ml y 100 µg/ml respectivamente, antes de añadir los sustratos.

Los inhibidores utilizados se preincubaron 4 minutos en presencia de 1 mg/ml de proteína con las concentraciones finales descritas en la tabla 5. La reacción se inició agregando el sustrato.

DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

Citocromo oxidasa.

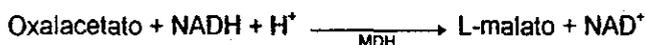
La actividad de esta enzima se determinó mediante el consumo de oxígeno, empleándose donadores artificiales de electrones (ascorbato y TMPD) que reducen al citocromo c soluble. Las mitocondrias (1 mg/ml) y las PSM (100 µg/ml) de *Euglena* se incubaron en medio KME, 7mM de ascorbato, y en presencia de antimicina 5 µM para evitar la transferencia de electrones del complejo III al citocromo c soluble. La reacción se inició por adición de TMPD (0.34mM). La actividad de la citocromo oxidasa se inhibió con NaN₃ 20 mM (Moreno-Sánchez y cols., 1991).



Malato Deshidrogenasa

Se utilizaron 2 ml de la mezcla de reacción conteniendo 50 mM de amortiguador de fosfato de potasio a pH 6.3, 0.5 mM oxaloacetato, 0.1mM NADPH (fresco) y 0.025% Tritón X 100 y 500 µg/ml de proteína.

La mezcla de reacción sin oxaloacetato fué preincubada a 30°C durante 1 minuto, iniciando la reacción con oxaloacetato. Se midió la reacción a 340 nm.



Monoamino oxidasa

Se utilizó 1.96ml de amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7.5 con NaOH), más 0,04ml de benzilamina 0.25M. La reacción fué iniciada añadiendo el extracto a una concentración final de 0.050 mg/ml y siguiendo el cambio de absorbancia a una longitud de onda de 250 nm. Para el calculo de actividad específica se utilizó un coeficiente de extinción molar para el benzaldehído de 13 mM⁻¹ cm⁻¹ a 250 nm.



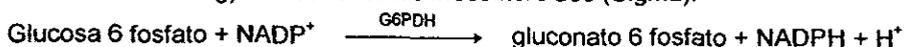
Lactato deshidrogenasa citoplásmica

El ensayo se realizó en 2.5 ml de amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 7.5 (NaOH), 0.1 mM de NADH, 100 μl de piruvato (3 mg/ml), y 1 mM de KCN. Se incubaron durante 1 minuto a 30°C con agitación constante y se inicia la reacción al añadir 1 mg de proteína total. Se leyó a 340 nm. Para corroborar el ensayo se añadieron 5 μl de LDHc de músculo de conejo (Sigma) de una dilución 1:200.



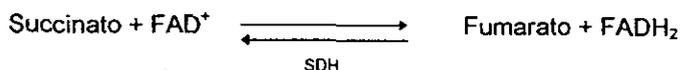
Glucosa 6 Fosfato deshidrogenasa

Se realizó en 2.5 ml de medio HEPES 100 mM (pH 8.0) empleando 1mg de proteína mitocondrial en presencia de 2mM de KCN, 10 mM glucosa 6 fosfato, 1 mM ATP, 2 mM MgCl_2 , hexocinasa 10 μl de una dilución 1:3 (1mg/ml 130-250 unidades /mg). La reacción se inicia adicionando 1 mM de NAD^+ o NADP^+ , y se detectó por el cambio de absorbancia a una longitud de onda de 340 nm. Para corroborar si el sistema funcionó se utilizaron 20 μl de G6F-DH (2mg/ml; >750 unidades NAD^+/mg) de *Leuconostoc mesenteroides* (Sigma).



Succinato Deshidrogenasa

Se utilizó un amortiguador de fosfatos a una concentración de 50mM, (pH 7.2) conteniendo 0.01 mM KCN y 50 μg de proteína, en un volumen total de 1ml. La reacción se inició con succinato a una concentración final de 10mM. Se midió en un espectro de doble haz en el modo dual 575-550 nm.



Glucosa 6 Fosfatasa

La reacción se llevó a cabo en 0.6ml de MES o PIPES 0.1M (pH 6.5), conteniendo 1.66 mM final de EDTA y 16.6 mM de Glucosa 6-fosfato. Se añadieron 50 µg de muestra, y la mezcla se incubó durante 15 minutos a 30°C en agitación constante. La reacción se detuvo adicionando 1 ml de TCA al 10%. Las muestras se centrifugaron 15 minutos a 3000 rpm a 4°C. Del sobrenadante se tomó una muestra para determinar la concentración de fosfato libre empleando al método descrito por Sumner (1954).



Lactato Deshidrogenasa

La lactato deshidrogenasa se ensayó en mitocondrias y PSM en medio KME utilizando PMS para acoplar la transferencia de electrones entre el L-lactato el D-lactato y el 2,6 DCPIP. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 3ml, KME 2.8ml, DCPIP 50µM, KCN 1mM, PMS 500µM, L-lactato 10mM ó D-lactato 5mM. Se utilizaron 100 µg/ml de proteína.

La reacción se inició con la adición de los sustratos y fué medida siguiendo la disminución en absorbancia a 600 nm.

UTILIZACIÓN DEL β-MERCAPTOETANOL.

Se realizó la determinación de la actividad de la lactato deshidrogenasa en partículas submitocondriales con FCN 50 µM y PMS 2 mM en presencia de diferentes concentraciones de β-mercaptoetanol, incubando durante 1 minuto; la reacción se inicio con la adición de los sustratos.

Obtención de Km, VMAX y Ki's

Los valores de la constante de Michaelis-Menten (Km), para diversos sustratos tanto en mitocondrias como en PSM de *Euglena* se obtuvieron de las dobles recíprocas de las gráficas de velocidad vs [S].

Los valores de las constantes de inhibición (K_i) se determinaron de gráficos de Dixon calculando la inversa de la velocidad del consumo de oxígeno; las concentraciones de L-lactato y D-lactato se mantuvieron constantes en 2 mM y 5mM respectivamente, y se determinó el efecto que sobre la actividad ejerce el incremento de la concentración del inhibidor.

CURVAS DE pH Y TEMPERATURA

Se determinó el consumo de oxígeno en medio KMEP a diferentes valores de pH incubando las PSM durante 3 minutos a cada pH e iniciando la reacción con la adición del sustrato.

La determinación de la temperatura óptima se realizó en 1 ml de medio KME, en presencia de DCPIP, PMS como se describió previamente y 1 mM de KCN, con L-lactato y D-lactato. Se incubaron las PSM en el medio a cada una de las temperaturas durante 3 minutos y se inició la reacción con la adición de los diferentes sustratos.

Los valores de la energía de activación se obtuvieron a partir de los valores de la curva de temperatura utilizando la ecuación de Arrhenius.

POTENCIAL DE MEMBRANA

Se determinó el potencial transmembranal generado por las mitocondrias de *Euglena*; para ello, se siguió el cambio de absorbancia de la safranina, que ocurre como respuesta a un cambio de magnitud del potencial transmembranal (Akerman y Wikstrom, 1976).

Se realizaron los ensayos incubando las mitocondrias (1 mg/ml) en un volumen final de 3 ml en un medio que contiene KCL 120mM, MOPS 20mM, EGTA 2mM a (pH 7.2), CCCP 5 μ M, safranina 5 μ M, 100 μ M y 2mM cianuro. Posteriormente, se adicionó el sustrato oxidable, registrándose el cambio de absorbancia 533 y 511 nm en un espectrofotómetro de doble haz en el modo dual. Los inhibidores se adicionaron a las concentraciones indicadas en la figura. Para

colapsar el potencial de membrana se utilizó CCCP $5\mu\text{M}$. Todos los experimentos se realizaron con oxigenación y a 30°C

GRADIENTE ELECTROQUÍMICO DE PROTONES

Determinación del pH por el método fluorimétrico (ACMA). Para evaluar experimentalmente el pH interno en partículas submitocondriales se utilizó un método que se basa en la captación de aminas fluorescentes por una suspensión de PSM. Se ha demostrado que la captación es dependiente de la constante de disociación de la amina y también del número de aminas ionizables. Las muestras fueron medidas a una longitud de onda de excitación de 415 nm y se registró la emisión a 480 nm. Se adicionaron 2.5 ml de medio, el cual contiene 200 mM sacarosa, 5 mM MgCl_2 , 10 mM MOPS, 100 μM EGTA (pH 7.2), y 2 μM de ACMA. Se colocó la celda en la cámara a la cual se le había ajustado la temperatura y se proveyó de oxígeno. Se inició la reacción al añadir el L- ó D-lactato, para posteriormente agregarle ATP-Mg. A todos los trazos se les añadió nigericina. Las PSM con los distintos inhibidores se preincubaron durante 1 minuto.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA ELECTROFORESIS.

Para determinar la solubilidad de la actividad enzimática las PSM de *Euglena gracilis* se incubaron en medio KME (pH 7.2) a 30°C ; esta preparación se trato con Lubrol PX 0.1% durante 5 minutos en agitación y parte de esta preparación se tomó directamente para los geles; y otra parte de la muestra tratada se centrifugó durante 15 minutos a 3000 rpm para obtener el sobrenadante y la pastilla fué lavada dos veces con medio KME y se dializó durante toda la noche. Se determinó la proteína del sobrenadante por el método de Lowry. Se utilizaron 50 μg de proteína. Las muestras de las membranas de *P. denitrificans* y *E.coli* se trataron de la misma forma que a las PSM de *Euglena*.

ELECTROFORESIS NATIVA

Esta electroforesis se realizó en geles en gradiente del 3% al 10% con algunas modificaciones a la técnica descrita por Shagger y Von Jagow (1991).

ZIMOGRAMAS

Se reveló la actividad los geles agregando los sustratos L-lactato 10 mM o D-lactato 5 mM en un amortiguador de Tris 0.5 M a pH 8.8, en presencia de PMS 500 μ M y NBT 0.005 % , a temperatura ambiente por 30 minutos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ACTIVIDAD DE ENZIMAS MARCADORAS

Como se mencionó en la introducción, existen reportes que sugieren la presencia de una LDH asociada a la membrana interna mitocondrial de *Euglena gracilis*. En esta tesis nos propusimos realizar un estudio sistemático de la localización de la iLDH mitocondrial, para lo cual, se determinó el grado de contaminación de las PSM midiendo las actividades enzimáticas de proteínas de otros compartimentos celulares. En la tabla 2, se puede observar que la enzima citosólica, la G6PDH y la G6Pasa de la fracción microsomal están entre 6 y 10 veces menos activas en las PSM que en las mitocondrias comparadas con la actividad presente en el homogenado. Por otro lado, la MDH y la LDHc no se detectaron en las PSM, lo que sugiere que en esta fracción submitocondrial existen pocos contaminantes citoplasmáticos y de la matriz mitocondrial.

Por otro lado, se detectó 20 veces menos actividad de la MAO en PSM que en las mitocondrias, lo que sugiere una baja contaminación de enzimas de la membrana externa. Por otro lado, la citocromo oxidasa y la succinato deshidrogenasa, dos enzimas que se localizan en la membrana interna mitocondrial, incrementaron su actividad aproximadamente dos veces en las PSM en relación a la fracción mitocondrial, lo cual indica que durante el aislamiento de las PSM la actividad de estas enzimas se enriquece. Para el caso de la citocromo oxidasa, es conveniente mencionar que el ensayo se realizó sin la adición de citocromo c exógeno, el cual, como se ha reportado para otros sistemas mitocondriales (Devars y cols. 1992), podría estar perdiéndose durante el aislamiento de las PSM. Sin embargo, datos previos de este laboratorio han demostrado que en mitocondrias de *Euglena gracilis*, la adición de citocromo c de caballo o levadura, no modificó la velocidad del consumo de oxígeno, aunque este fenómeno no se ha determinado en la fracción de las PSM.

De los resultados obtenidos con las enzimas marcadoras, podemos concluir que las PSM de *Euglena gracilis* son una fracción enriquecida de la membrana interna mitocondrial, la cual contiene niveles mínimos de actividades extramitocondriales, y que los niveles de contaminación no afectan ni modifican la actividad de la LDH que se desea caracterizar. Por otra parte, estos resultados coinciden con lo ya reportado por Isegawa en *Euglena* (1984), en donde la actividad de la lactato deshidrogenasa se encontró en la fracción mitocondrial, tiene una actividad de $0.70 \mu\text{mol}/\text{min}$ (100%), y una actividad determinada en la membrana mitocondrial interna de $0.25 \mu\text{mol}/\text{min}$ (36.1 %). No se encontró actividad en membrana externa, espacio intermembranal y matriz mitocondrial.

Las electromicrografías obtenidas de las PSM de *Euglena gracilis* muestran que las vesículas están selladas e íntegras, ya que no se observan fracciones de membranas dispersas (figura 11).

Como se describió en la introducción, se ha reportado que las mitocondrias de *Euglena* poseen una LDH que es capaz de reconocer tanto a L- como D-lactato en una reacción en la cual la enzima es independiente de NAD^+ . Para identificar su localización precisa y con el antecedente de que está enzima está asociada a la fracción mitocondrial, en particular con la membrana interna mitocondrial, se aislaron partículas submitocondriales en las cuales se determinó la actividad de esta enzima. Se observó que en las mitocondrias la actividad de la LDH incrementó 3 veces con L-lactato y 7 veces con D-lactato en relación al homogenado (tabla 2). De manera similar, las PSM mostraron un ligero incremento de la actividad de la LDH en presencia de L- y D-lactato, respectivamente (tabla 2).

A



B

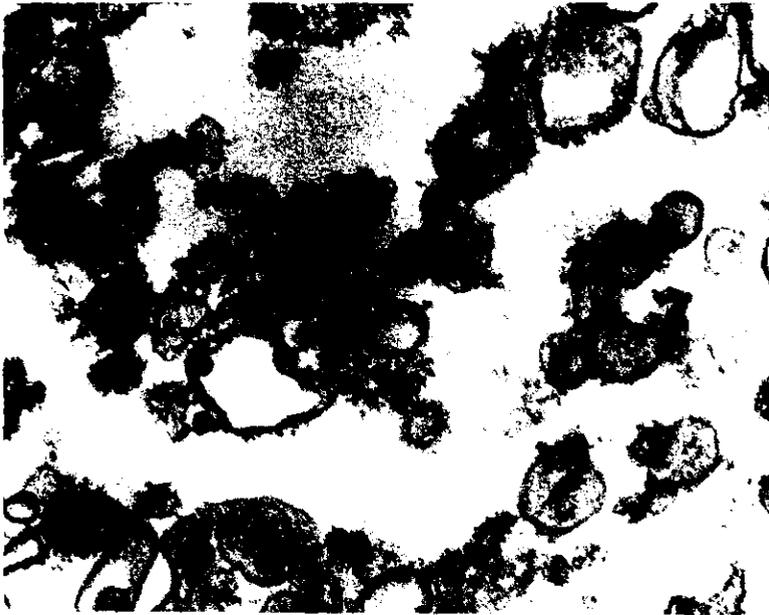


Figura 11. Electromicrografía de transmisión de partículas submitocondriales de *Euglena gracilis* células crecidas en G+M como fuente de carbono en ausencia de luz. (A) Partículas submitocondriales 60,000 aumentos (B) Partículas Submitocondriales 94,500 aumentos.

Estos resultados parecen indicar que la actividad de la LDH esta asociada a la membrana interna mitocondrial, ya que durante la preparaci3n de las PSM, (las cuales est3n formadas b3asicamente de membrana interna), la actividad de esta enzima increment3. Por otro lado, no se detect3 actividad de LDH asociada a membrana en los sobrenadantes. Con estos resultados, la caracterizaci3n de la LDH se realiz3 empleando estas PSM.

Tabla 2. Actividad de las enzimas marcadoras durante el aislamiento de las PSM de mitocondrias de *Euglena gracilis*.

Enzimas	Homogenado	SN1	Mitocondria	SN2	PSM
FRACCI3N MICROSOMAL					
G6Pasa ^a	46 ± 4	769 ± 60	139 ± 6	96 ± 32	15 ± 4
CITOS3LICAS					
G6PDH ^a	60 ± 3.2	67 ± 1.4	36 ± 2.1	24 ± 1.6	6 ± 1
MDH ^a	173 ± 6	N.D.	84 ± 5	N.D.	N.D.
LDHc ^a	40 ± 2	53 ± 2	38 ± 2	N.D.	N.D.
MEMBRANA EXTERNA MITOCONDRIAL					
MAO ^a	15 ± 1	29 ± 2	150 ± 6	46 ± 3	7 ± 0.5
MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL					
Citocromo oxidasa ^b	N.D.	N.D.	300 ± 6	N.D.	590 ± 8
SDH ^a	N.D.	N.D.	234 ± 7	N.D.	390 ± 12
L-LDH ^a	30 ± 3.6	N.D.	197 ± 16	N.D.	308 ± 11
D-LDH ^a	23 ± 5	N.D.	153.7 ± 107	N.D.	2106 ± 114

SN1 y SN2 se refiere a los sobrenadantes obtenidos entre el homogenado y las mitocondrias de 12,000 x g y entre las mitocondrias y las PSM de 105,000 x g respectivamente. G6PD = glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; G6Pasa = glucosa-6-fosfatasa, enzima marcadora de la fracci3n microsomal (Smillie, 1963); MDH = malato deshidrogenasa; LDHc = lactato deshidrogenasa citos3lica dependiente de NAD; MAO = monoamino oxidasa; Cit. oxidasa = citocromo oxidasa; SDH = succinato deshidrogenasa; ND = no detectado. Las actividades est3n reportadas como: a) nmolas min⁻¹mg⁻¹; b) ng3tomos de O₂ min⁻¹ mg⁻¹. * las actividades fueron medidas con L-lactato o D-lactato con DCPIP y PMS. Los datos representan la actividad y son el promedio de 4 preparaciones ± error est3ndar.

Collins y Merret (1975), reportaron previamente la actividad de D-LDH determinada por reducci3n del 2,6 DCPIP con D-lactato como sustrato en extractos celulares de *Euglena gracilis*. Utilizaron un gradiente continuo de sacarosa para separar las distintas fracciones y observaron que el pico de

actividad de la D-LDH correspondía a la fracción mitocondrial, como sucede con nuestra preparacion. No detectaron actividad con L-lactato como sustrato, a diferencia de lo que encontramos en mitocondriales y PSM de *Euglena*. La actividad de la succinato deshidrogenasa también fue encontrada en la fracción mitocondrial.

Lord y Merret (1971), detectaron la oxidación de D-lactato en una fracción del gradiente de sacarosa que correspondía a la fracción mitocondrial, pero tampoco encontraron actividad con L-lactato. La LDH encontrada oxida glicolato, y su actividad aumenta en presencia de D-lactato y viceversa.

En algunos géneros de algas la lactato deshidrogenasa tiene la capacidad de oxidar ambos sustratos, pero en *Euglena*, esta oxidación parece llevarse a cabo por dos enzimas diferentes.

Isegawa y cols (1984), determinaron la actividad de enzimas marcadoras para las diferentes fracciones en mitocondrias de *Euglena* purificadas en un gradiente de Percoll (tabla 3). Utilizaron LDH (citocromo c) como marcadora de membrana interna, la cual no presentó contaminación con otras fracciones, la succinato semialdehído deshidrogenasa (SSDH) como enzima marcadora de matriz mitocondrial, y la adenilato cinasa como marcadora de espacio intermembranal. La actividad de la glucosa 6 fosfatasa fue localizada en el homogenado crudo, y principalmente en microsomas (85.1% con respecto al control).

EFEECTO DEL PH Y DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA LDH

La LDH mitocondrial de *Euglena gracilis* tiene la capacidad de oxidar tanto al L-lactato como al D-lactato. Este dato sugiere dos alternativas: 1) la enzima tiene un sitio con diferente afinidad para cada sustrato o 2) hay dos enzimas, una para cada sustrato.

Tabla 3. Actividad de las enzimas marcadoras en diferentes fracciones de *Euglena* obtenidas de gradiente de sacarosa. (Tomada de Isegawa y cols. 1984).

Fracción	Proteína (mg)	MDH		LDH (cit c)	SSDH	Adenilato cinasa
		NADP	NAD ⁺			
mitocondria aislada	9.8 (100)	8.62 (100)	21 (100)	0.7 (100)	2.33 (100)	6.43 (100)
memb. Externa	0.32 (3.3)	0	0	0	0.02 (0.7)	0
espacio intermemb.	4.95 (50.5)	4.42 (51.2)	0.25 (1.1)	0	0.16 (6.9)	0.89 (13.8)
memb. Interna	1.33 (13.6)	0.54 (6.3)	0	0.25 (36.1)	0	0
matriz	4.50 (45.9)	36.5 (42.4)	17.3 (82.1)	0	7 (72.9)	0

Actividad en $\mu\text{mol}/\text{min}$

El porcentaje de distribución se reporta entre paréntesis

Para determinar si la LDH está presente como dos formas enzimáticas, se realizaron los siguientes experimentos. La figura 12 muestra que la actividad con respecto al pH para D-lactato fue mayor que para L-lactato, y de hecho se observa un comportamiento similar, lo cual podría interpretarse como la existencia de una sola enzima. Sin embargo, de manera particular, el pH de la actividad máxima de oxidación del lactato en *Euglena* es 7.0, ya que para otras LDH membranales, como la de *E. coli*, se han descrito actividades máximas a pH de 8.0 y 8.5. Esta característica podría estar asociada a las diferentes condiciones intracelulares de cada especie.

Por otro lado, la temperatura estimuló la actividad de la LDH de manera semejante para ambos sustratos (figura 13) y aunque la actividad es máxima a 30°C tanto para L- como para D-lactato, el D-lactato fue el sustrato

preferentemente oxidado. De manera similar al comportamiento observado para el pH, la actividad de la LDH mostró un patrón semejante a diferentes temperaturas para la oxidación de L-lactato, en el cual se observó una disminución de la actividad a partir de los 30°C.

A diferentes temperaturas una reacción tiene lugar a diferentes velocidades. La constante de velocidad es dependiente de la temperatura. La relación entre la constante de velocidad y la temperatura absoluta se define por la ecuación de Arrhenius, en donde la energía de activación es el mínimo de energía que deben adquirir las moléculas para poder reaccionar. La ecuación de Arrhenius demuestra que cuanto mayor sea la energía de activación mayor es la velocidad con respecto a la temperatura.

La máxima actividad de la enzima de *Euglena* se encontró a 30°C, y la energía de activación E_{act} para la reacción enzimática de la LDH en presencia de sus diferentes sustratos (figura 14), calculada por la ecuación de Arrhenius fue de 4.075 Kcal/mol y 3.890 Kcal/mol para L-lactato y D-lactato, respectivamente. Este valor de E_{act} es similar al reportado por Isewaga para la LDH (cit c) en la fracción mitocondrial de *Euglena*, el cual es de 3.7 Kcal/mol.

Sin embargo, los resultados anteriores no permiten concluir si existen dos isoenzimas de la LDH en las mitocondrias de *Euglena gracilis*, pero fueron útiles para determinar la actividad de la LDH.

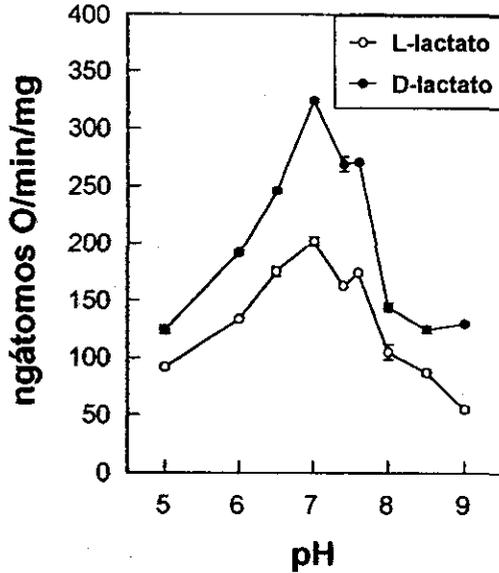


Figura 12. Efecto del pH sobre la actividad de la LDH con L-lactato y D-lactato en PSM de *Euglena gracilis*. Se determinó el consumo de oxígeno para cada sustrato. El medio de incubación utilizado fué KME a los valores de pH mostrados en la gráfica, como se describe en Material y Métodos. Los datos representan la media \pm error estándar de 4 preparaciones.

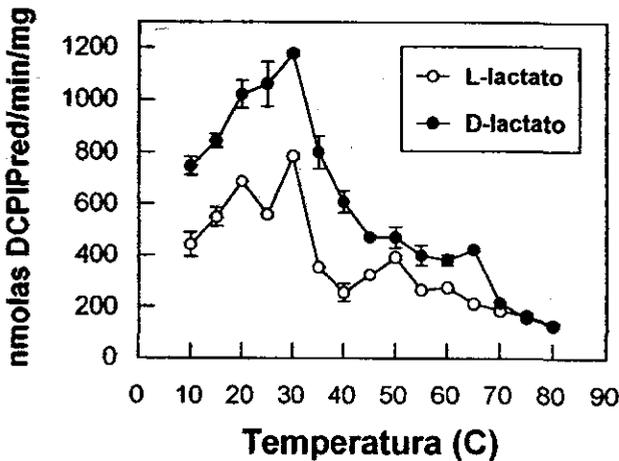


Figura 13. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la LDH con L-lactato y D-lactato en PSM de *Euglena gracilis*. La determinación se realizó como se menciona en materiales y métodos. Los valores representan la media \pm error estándar de 3 preparaciones.

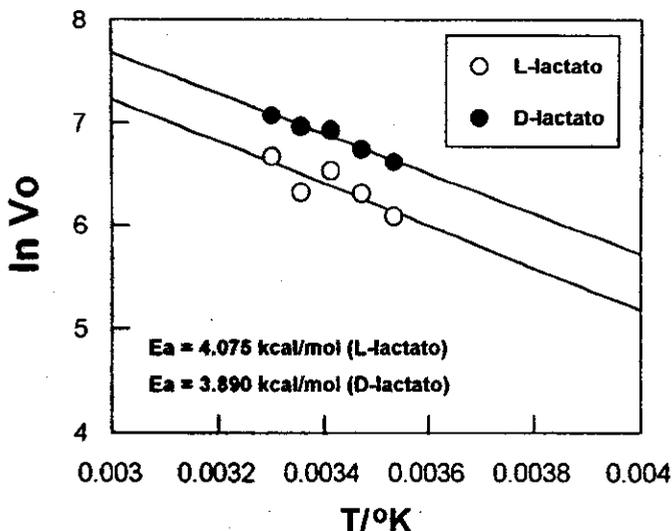


Figura 14. Gráfica de Arrhenius para la determinación de la energía de activación de la reacción catalizada por la LDH en PSM de *Euglena gracilis*, con L-lactato y D-lactato como sustratos (n=3). Los datos se ajustaron a la siguiente ecuación: $\ln = -(E_a/R)(1/T) + \ln A$, donde E_a es la energía de activación, T es la temperatura en grados kelvin y R tiene un valor de $1.9872 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$.

DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA LDH.

Los valores de K_m y V_{max} para L-lactato y D-lactato, obtenidos con mitocondrias y PSM, se muestran resumidos en la tabla 4. Para el caso de L-lactato en mitocondrias estos valores ya se habían reportado previamente midiendo el consumo de oxígeno (Uribe y cols. 1992).

Estos valores se obtuvieron a partir de las gráficas de Lineweaver-Burk empleando los datos de velocidad inicial contra concentración de sustrato, figuras 15 y 16.

La K_m para D-lactato en mitocondrias (figura 15) fue de 0.72 mM con una V_{max} de 318 ngátomos $O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ a pH 7.2. El valor de K_m para la D-lactato deshidrogenasa de *E. coli* es similar a la encontrada en *Euglena*, 0.6 mM, y el valor de K_m para el L-lactato es de 0.018 mM a pH óptimo entre 8.0 y 9.0. La enzima de *E. coli* presenta una K_m en presencia de 1.5 mM de CN con MTT-PMS

a pH 8.0 con D-lactato es de 2.2 mM a 3.3 mM, mientras que a pH de 7.0 el valor es de 2.5 mM. La K_m para D-lactato de la enzima purificada de *E. coli* es de 6×10^{-4} M y en presencia de CN es de 1.4 mM. El ácido oxámico (2×10^{-4} M) inhibe un 50% la D-lactato deshidrogenasa purificada (Futai, 1973). También se ha reportado la K_m para D-lactato deshidrogenasa de *Desulfovibrio vulgaris* (D-lactato: ferricitocromo c553 oxidoreductasa); dicho parámetro es de 0.8 mM a 37°C y a pH de 8.5. En el caso de la LDH independiente de NAD^+ asociada a membrana en *Paracoccus denitrificans* la K_m para D-lactato es de 0.81 mM y para L-lactato 4.4 mM (Zboril, 1996). De estos datos podemos concluir que el valor de K_m para D-lactato obtenido para las mitocondrias de *Euglena* es muy similar a la ya reportada en otros organismos. Lord y Merret reportaron una K_m para la oxidación del D-lactato de 0.0066 mM.

Con respecto a las PSM, la K_m para L-lactato (figura 16 A) no tuvo variación en comparación con la obtenida en mitocondrias; sin embargo, en el caso del D-lactato (figura 16 B) la K_m disminuyó. La V_{max} fue de 1128 nmolas DCPIP reducido $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ para L-lactato y de 1887 nmolas DCPIP reducido $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ para D-lactato, lo que representa un incremento de 2 y 6 veces, respectivamente, con respecto a los datos obtenidos en mitocondrias, sugiriendo que la afinidad de la enzima por el D-lactato como sustrato es mayor que para L-lactato, por otra parte, se sugiere un enriquecimiento de la LDH en las PSM, corroborando la localización de la enzima en la membrana interna mitocondrial.

En ambos casos con D-lactato y L-lactato se observó una conducta típicamente hiperbólica, en donde la variación de la velocidad cambia en función de la concentración del sustrato.

Por otra parte, las diferentes V_{max} observadas con L-lactato y D-lactato en la tabla 4 podrían ser debido a que el transporte membranal de sustratos está íntimamente ligado al consumo de oxígeno, ya que en PSM esto no se observa. En la figura 16 A, con L-lactato se observa una inhibición por sustrato que no se ve con D-lactato figura 16 B, además con D-lactato se observa un fenómeno de cooperatividad, que tal vez influya en algún mecanismo de regulación.

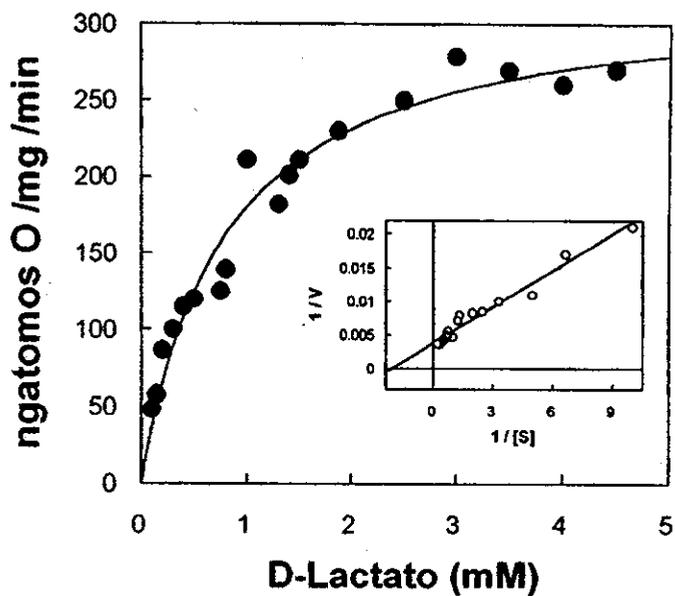


Figura 15. Efecto de la concentración del D-lactato sobre la velocidad de consumo de O_2 de la reacción catalizada por la LDH en mitocondrias de *Euglena gracilis*. De estos valores se obtienen K_m y V_{max} .

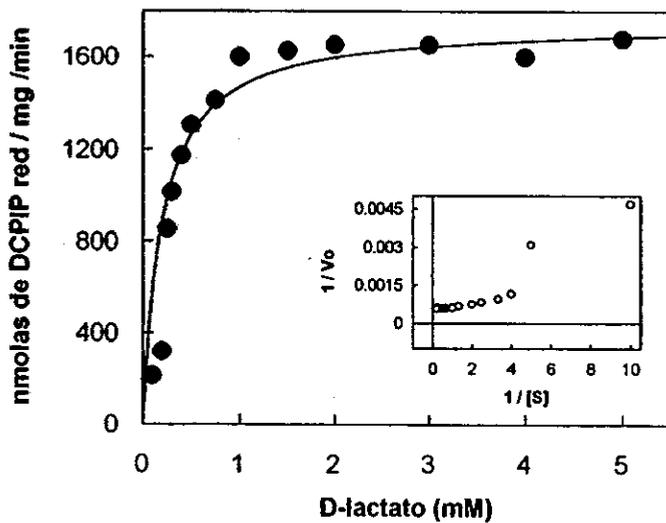
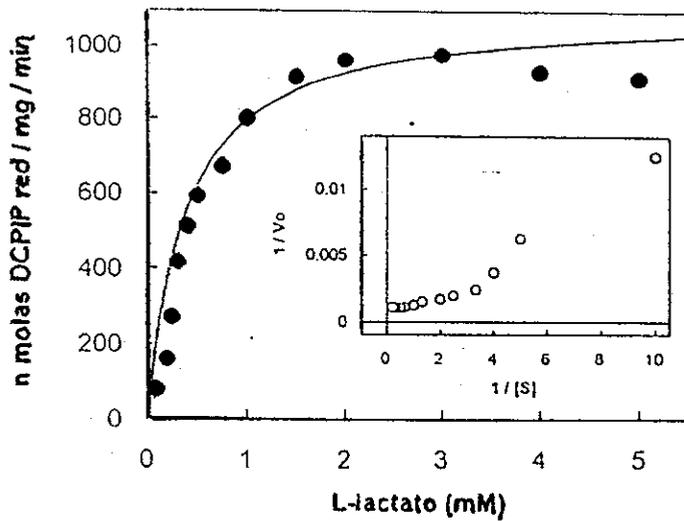


Figura 16. Cinética de la LDH en PSM de *Euglena gracilis* en presencia de L-lactato (A) y D-lactato (B) como sustratos. El recuadro muestra el regráfico de Lineweaver-Burk.

Tabla 4. Parámetros cinéticos para la lactato deshidrogenasa de mitocondrias y PSM de *Euglena gracilis*, en presencia de L-lactato o D-lactato. Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres preparaciones.

Sustrato	Mitocondrias		PSM	
	Km ^a	Vmax ^b	Km ^a	Vmax ^b
L-lactato	0.52 \pm 0.04	55 \pm 3.6	0.54 \pm 0.09	1128 \pm 66.4
D-lactato	0.72 \pm 0.09	318 \pm 12.4	0.32 \pm 0.07	1887 \pm 115.5

En mitocondrias a = mM; b = ngátomos O₂ min⁻¹mg⁻¹, en partículas submitocondriales a= mM b= nmolas DCPIP reducido min⁻¹mg⁻¹.

INHIBICIÓN DE LA OXIDACIÓN DE L-LACTATO Y D-LACTATO.

La respuesta de la respiración con diversos inhibidores de la oxidación de L-lactato y D-lactato en mitocondrias y PSM se muestra en la tabla 5.

La oxidación de L-lactato o D-lactato tanto en mitocondrias como en PSM fué parcialmente sensible a la rotenona (35-40%), quizá la sensibilidad parcial refleja que parte del lactato entra por sitio I (sensible a rotenona) y otra parte entra a nivel de ubiquinona (insensible a rotenona), mientras que la oxidación de succinato no es inhibida totalmente por rotenona (datos no mostrados)

La oxidación de lactato en mitocondrias y PSM de *Euglena gracilis* fue parcialmente sensible a inhibidores de la cadena respiratoria clásica, como la antimicina, el CN, el mixotiazol y el HQNO, esto podría sugerir que estos sustratos se oxidan preferentemente por una vía alterna insensible a estos inhibidores.

Aunque hay que tomar en cuenta que de acuerdo con el esquema de la figura 6, el cianuro debería ser un buen inhibidor, ya que en la vía alterna que se propone no esta involucrada la oxidasa alterna.

Sharpless y Butow (1970) observaron que en las mitocondrias de *Euglena* la LDH es más sensible a la presencia de la antimicina cuando el sustrato es D-lactato que cuando es L-lactato, semejante a lo observado en la tabla 5, por lo

tanto podemos sugerir que el D-lactato se oxida por una vía insensible a antimicina. Además, en las PSM oxidando D-lactato el comportamiento es contrario

Tabla 5. Inhibición del consumo de oxígeno en mitocondrias y PSM de *Euglena gracilis* (% de inhibición) en estado 4. El control es la actividad total en ausencia de inhibidores (nmolas $P_i \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Las mitocondrias y las PSM fueron incubadas con los inhibidores indicados durante 4 minutos antes de la adición del sustrato a 30°C, como se describe en Materiales y Métodos, utilizando L-lactato 10 mM o D-lactato 5 mM.

Inhibidor	Mitocondrias		PSM	
	L-lactato	D-lactato	L-lactato	D-lactato
Control	90 ± 6	270 ± 11	830 ± 15	1576 ± 32
Antimicina (0.01 mM)	14 ± 6	44 ± 6	25 ± 0.3	18 ± 2
Cianuro (0.1 mM)	66 ± 3	79 ± 0.25	62 ± 5	70 ± 0.5
Mixotiazol (0.01 mM)	72 ± 3	68 ± 1	50 ± 2	22 ± 0.4
HQNO (0.01 mM)	24 ± 1	13 ± 2	34 ± 0.6	16 ± 4
DPA (0.25 mM)	83 ± 2	47 ± 0.3	61 ± 4	40 ± 3
Oxamato (0.01 mM)	44 ± 1	94 ± 2	32 ± 1.5	96 ± 4
Oxalato (0.25 mM)	21 ± 4	84 ± 3	14 ± 2.6	30 ± 2
Propil galato (5 mM)	20 ± 0.5	17 ± 3	37 ± 6	32 ± 1.4
SHAM (0.5 mM)*	12 ± 1	0	0	22 ± 1.3
Disulfiram (0.5 mM)*	9 ± 2.3	0	10.4 ± 0.9	13.5 ± 0.45

Los valores representan el promedio de 6 experimentos ± S.D.

* = los valores representan el promedio de 3 experimentos ± S.D.

Perini (1964) observó que el consumo de oxígeno en *Euglena* es inhibido ligeramente por CO, mientras que el cianuro inhibe casi el 100%, lo que no observamos en nuestras preparaciones de mitocondrias y PSM. El cianuro se ha utilizado para inhibir a la D-LDH de *E.coli* asociada a la membrana, pero esta inhibición es del 50% a concentraciones de 1.5 mM; en *Euglena* 0.1 mM de cianuro inhibe la oxidación de ambos sustratos entre el 60 y el 80% (tabla 5). Al aumentar las concentraciones de CN entre 1.5 y 2 mM la inhibición no aumentó (dato no mostrado).

En *Prototheca sapffi* y *Chlorella sp.* se ha determinado que el CN (0.1 mM) sólo inhibe la respiración entre 33 y 45%, mientras que en presencia de antimicina (3µg/ml) se llega al 82% de inhibición, por lo que se ha propuesto la

existencia de una cadena alterna (Weger, 1990). Estos datos son semejantes a los reportados en este trabajo.

En mitocondrias de *Polytomella spp* la actividad respiratoria es solo parcialmente inhibida con 1 mM de CN (46%) y 2 mM de CN (68%) con succinato como sustrato; (estas mitocondrias no oxidan el lactato). Esta sensibilidad parcial al cianuro es totalmente inhibida por DPA 0.5 mM (entre 90 y 95%). Con propil galato (2 mM) y disulfiram (3 mM), inhibidores de la oxidasa alterna, la oxidación del succinato es parcialmente sensible entre 50 y 36% respectivamente (Reyes, 1997). Esto no ocurre en mitocondrias y PSM de *Euglena*, donde estos inhibidores no tienen ningún efecto. En las mitocondrias de *Polytomella spp* la antimicina es un potente inhibidor, a diferencia de lo que se observa en *Euglena*

Se ha mencionado que esta oxidasa alterna en mitocondrias de *Polytomella* no es una quinol oxidasa típica como en las plantas, sino que su ramificación se encuentra por delante del complejo III, por su alta sensibilidad a antimicina y su inhibición parcial por CN. Probablemente esta oxidasa alterna sea capaz de formar un gradiente electroquímico de protones, Reyes (1997).

La DPA es un inhibidor específico de cadena alterna en plantas (Baker 1963). En mitocondrias y PSM de *Euglena*, inhibe la respiración insensible a antimicina, alcanzando un 80% de inhibición cuando se usa L-lactato como sustrato. En contraste, con la antimicina la inhibición fué solo parcial (14%). El D-lactato, la DPA y la antimicina tienen un efecto similar en mitocondrias. En el caso de las PSM (tabla 5) oxidando L-lactato o D-lactato, la respiración es más sensible a la DPA (60%) que a la antimicina (25%).

Se sabe que la antimicina y el mixotiazol son antibióticos capaces de bloquear el paso de electrones en el complejo bc_1 , ya que su unión a nivel del citocromo b se da con una elevada afinidad (Von Jagow, cols. 1984), lo cual puede explicar los resultados de la sensibilidad con los diferentes sustratos.

Se ha mencionado que el mixotiazol inhibe un 30% en mitocondrias de plantas la actividad de la ubiquinol citocromo c reductasa (Schonbaum, 1971). En el caso de las mitocondrias de *Euglena*, la respiración con ambos isómeros del

lactato se inhibió mas del 60%, mientras que en el caso de las PSM, con D-lactato la inhibición de esta deshidrogenasa fué de sólo el 22%. Lo anterior sugiere que en el proceso está involucrada una vía alterna de oxidación del D-lactato que quizás involucre al citocromo tipo "b", componente de la cadena alterna.

El oxamato es un análogo del lactato, por lo que es utilizado como inhibidor competitivo de la LDH. Se ha reportado que inhibe tanto la oxidación de lactato como la vía de reducción del piruvato (Schwert y cols. 1963).

En el caso de mitocondrias y PSM de *Euglena* oxidando D-lactato, el oxamato es un inhibidor muy potente, mas no para la oxidación de L-lactato (tabla 5). Este inhibidor se ha utilizado para caracterizar distintas LDH's en bacterias. En *E.coli*, el oxamato 0.2 mM inhibe la D-lactato deshidrogenasa purificada un 50% (Futai, 1973) en comparación con la D-LDH de *Euglena* que es más sensible puesto que presenta una inhibición de casi el 100% a concentraciones 20 veces más bajas que las reportadas para bacterias.

La presencia de una D-LDH en *Euglena* ya había sido reportada en extractos crudos, que oxidaban específicamente este isómero del lactato, pero no se caracterizó (Lord y Merrel, 1971). Aunque la misma enzima parece capaz de oxidar glicolato, pero en las condiciones utilizadas por estos autores la actividad de glicolato como sustrato fue de 1/10 con respecto a la oxidación del D-lactato-

A diferencia de las LDHs de algunas bacterias, en las PSM de *Euglena* el oxalato solo inhibe el consumo de oxígeno entre un 14 y un 30% con L-lactato y D-lactato, respectivamente (tabla 5).

El propilgalato, inhibidor propuesto para cadenas alternas, no tuvo efecto mayor al 40% con ambos sustratos, tanto en mitocondrias como en PSM de *Euglena*. Se ha propuesto que si el consumo de oxígeno es inhibido totalmente por CN, no es afectado por el propilgalato (Buetow, 1989). En este trabajo encontramos que la oxidación de los isómeros del lactato en mitocondrias y PSM es parcialmente sensible a CN, pero poco sensible a propilgalato, involucrando una cadena de transporte de electrones alterna, ya que si se utilizan una

combinación de ambos inhibidores a las concentraciones que utilizamos la inhibición es del 100%.

Finalmente, el SHAM y el disulfiram también se han utilizado para inhibir la vía insensible a CN en mitocondrias de plantas (Graver, 1981); en el caso de *Euglena* no tuvieron efecto ni en mitocondrias ni en PSM sugiriendo que quizás exista una vía insensible a estos inhibidores como la reportada en plantas.

La sensibilidad parcial de la LDH a los diferentes inhibidores en presencia de L-lactato y D-lactato en mitocondrias y PSM de *Euglena*, indicaría la preferencia de la oxidación de este sustrato por una u otra vía. Por lo tanto, se propone que el D-lactato se oxida por la vía alterna que es sensible a DPA; en esta vía la deshidrogenasa transfiere los electrones al citocromo "b" tipo "o" de la vía alterna.

Se ha propuesto que la fuente de carbono del medio de cultivo, y la presencia de inhibidores en el medio puede inducir la expresión de la o las cadenas alternas en mitocondrias de *Euglena*, y quizá modificar la concentración del citocromo "b" tipo "o", como sucede en las mitocondrias de las células crecidas en etanol y en etanol mas KCN (Guzmán y cols, 1994)

CONSTANTES DE INHIBICIÓN

Con el fin de caracterizar el tipo de inhibición producido por el oxalato y el oxamato, se probó su efecto en PSM de *Euglena gracilis*. Para ello, se realizaron curvas de titulación. Los valores de las constantes de inhibición se determinaron graficando la inversa de la velocidad contra la concentración de inhibidores, con L- y D-lactato como sustratos en presencia de DCPIP como aceptor de electrones artificial, como se muestra en las figuras 17, 18, 19 y 20.

Los valores de K_i se calcularon a partir del intercepto en el eje de las abscisas. Los valores de las distintas K_i aparentes se muestran resumidos en la tabla 6.

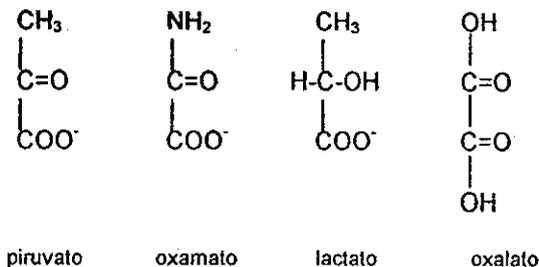
La K_i del oxalato con L-lactato como sustrato fue de 0.24 mM ; además, de acuerdo al gráfico de Dixon que se muestra en la figura 17 B se trata de una inhibición de tipo competitiva.

La actividad de la LDH con D-lactato en presencia de oxalato muestra una inhibición de tipo no competitiva (figura 18), en donde el valor de la K_i es de 0.33 mM; este tipo de inhibición es característica de enzimas que actúan con dos o mas sustratos. En este caso la unión del inhibidor al parecer no bloquea la fijación del sustrato y viceversa. La K_m para el sustrato no, se altera por la presencia del inhibidor, pero la V_{max} disminuye.

Las K_i 's obtenidas revelan que el oxalato no parece tener preferencia por L-lactato o D-lactato , a diferencia del oxamato, en el cual se observa que tiene preferencia por el D-lactato. De hecho , este último se ha utilizado en bacterias para determinar si es una o son dos las enzimas involucradas en la oxidación del sustrato.

La actividad de la LDH con L-lactato, tiene una K_i en presencia de oxamato de 0.02 mM (figura 19 B) y también es una inhibición de tipo competitiva. Para D-lactato con oxamato, el valor de K_i es de 0.5 μ M (figura 20 B) la cual muestra una elevada afinidad de la enzima por el inhibidor.

En el caso de la D-LDH de *E.coli* el oxalato y el oxamato tienen un comportamiento como inhibidores de tipo competitivo (Futai, 1973), como se ha reportado también para el piruvato a altas concentraciones, que inhibe la actividad de la LDH en mitocondrias de *Euglena* (Inui, 1990). Todos estos inhibidores son análogos estructurales:



Estos resultados, así como los mostrados en la tabla 5 nos habian de las distintas sensibilidades de la enzima hacia los inhibidores.

Tabla 6. Constantes de inhibición obtenidas en PSM de *Euglena gracilis* en presencia de oxalato y oxamato con L-lactato (10 mM) o D-lactato (5 mM) como sustratos.

Sustrato	Inhibidor	
	Oxalato (0.25 mM)	Oxamato (0.01 mM)
L-lactato	Ki = 0.24 mM	Ki = 8 µM
D-lactato	Ki = 0.33 mM	Ki = 0.49 µM

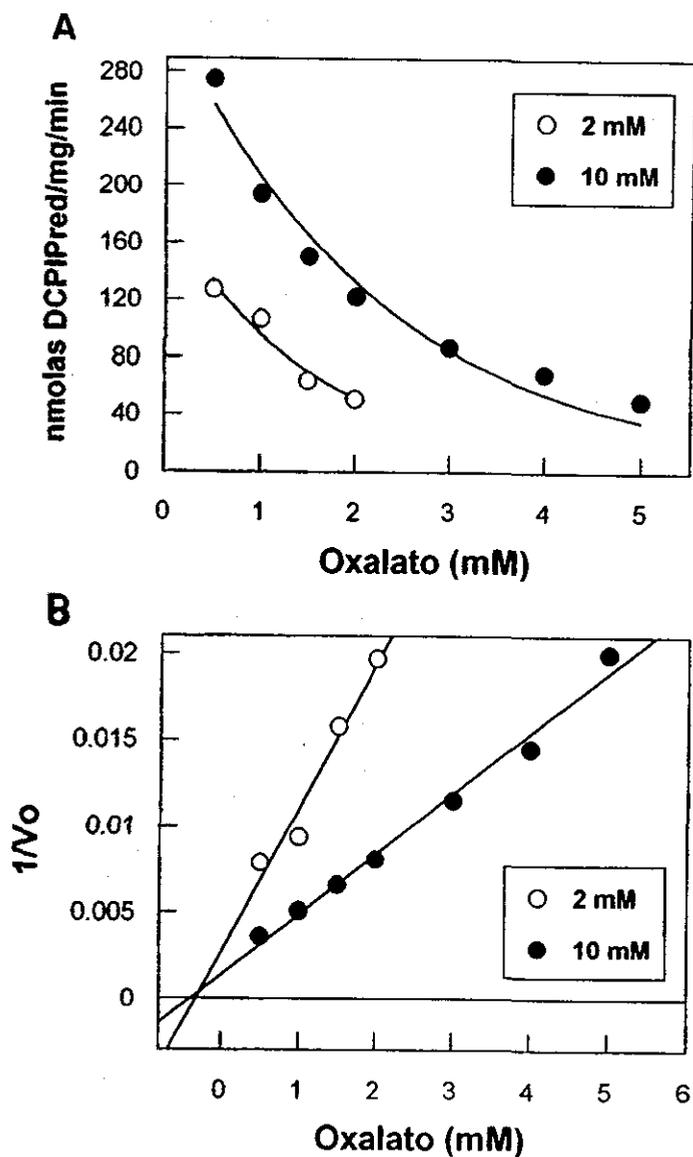


Figura 17. (A) Actividad de la LDH con L-lactato a diferentes concentraciones de oxalato en PSM. (B) Gráficas de Dixon en donde se representa el valor de la K_i para oxalato en presencia de L-lactato 2 mM y 10 mM en PSM de *Euglena gracilis*.

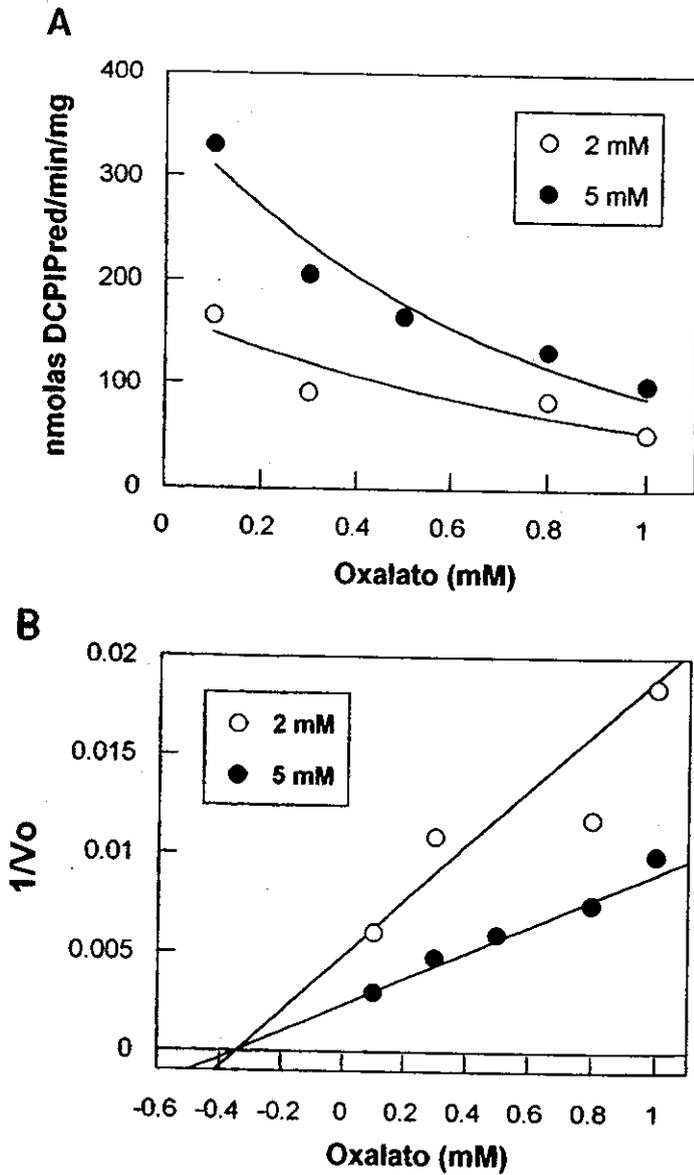


Figura 18. Valor de la K_i para oxalato con D-lactato como sustrato en PSM de *Euglena gracilis*. (A) actividad con D-lactato en presencia de oxalato, (B) Gráfico de Dixon

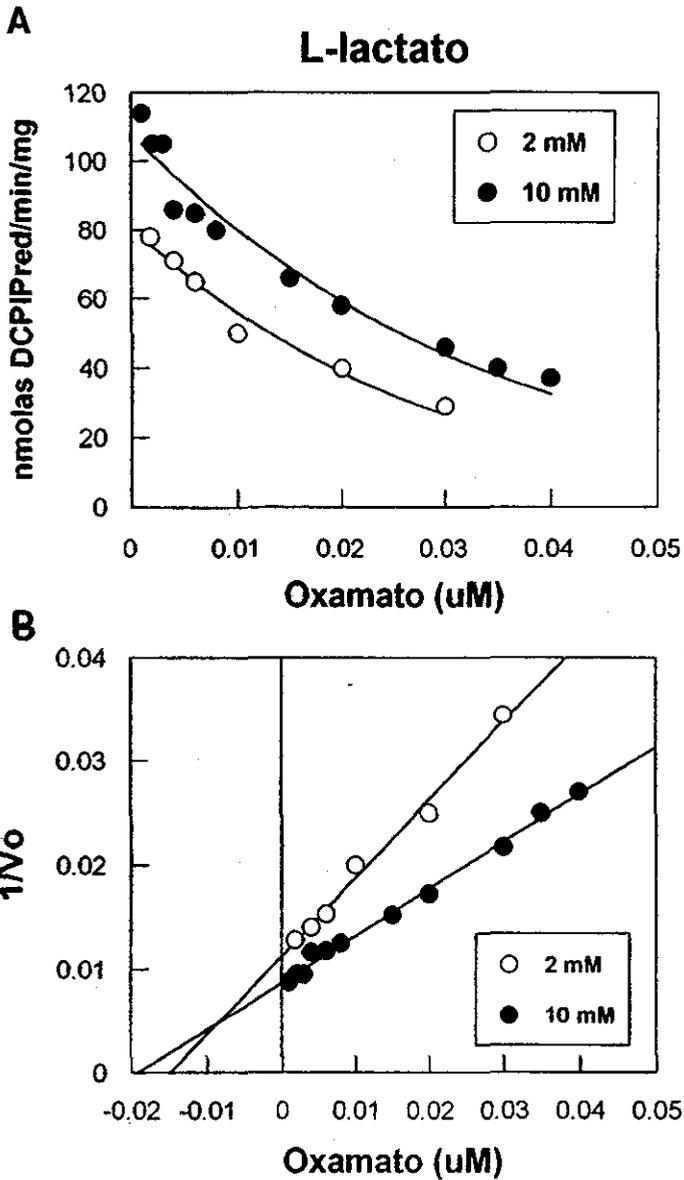


Figura 19. Valor de la K_i para oxamato con D-lactato 2 mM y 10 mM como sustrato en PSM de *Euglena gracilis*. (B) Gráfico de Dixon

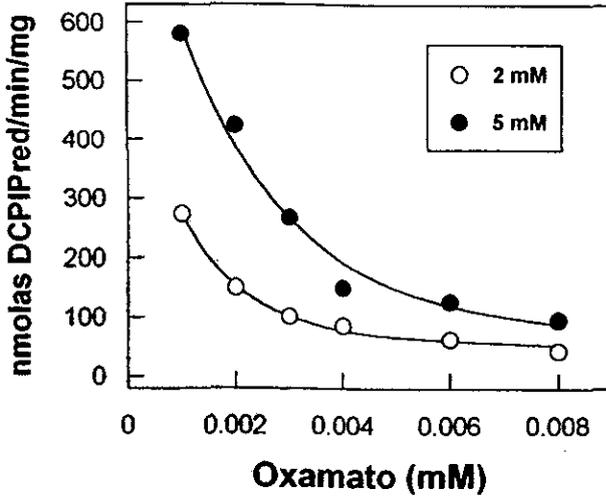
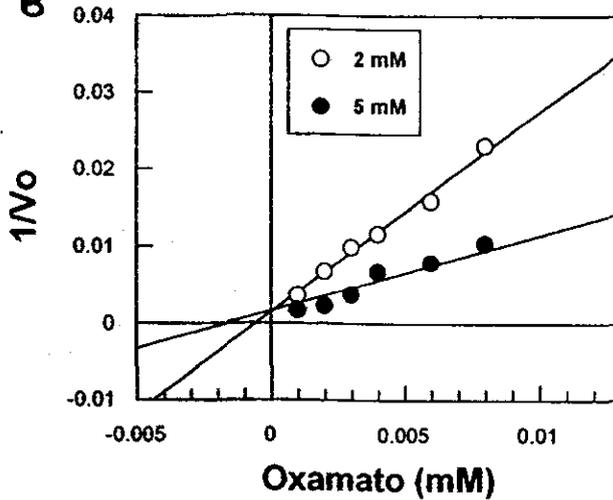
A**D-Lactato****B**

Figura 20. Gráfico de Dixon (**B**) para la obtención del valor de K_i para oxamato sobre la LDH en presencia de D-lactato como sustrato en PSM de *Euglena gracilis*.

POTENCIAL DE MEMBRANA.

Las mitocondrias de *Euglena gracilis* son capaces de generar un potencial de membrana con L-lactato ó D-lactato según revela la prueba semicuantitativa de safranina (figura 21). Se puede observar aquí que el CN no colapsa completamente el potencial de membrana generado por la oxidación de ambos sustratos, lo que sugiere que la respiración resistente a CN es capaz de generar un potencial de membrana sensible a desacoplantes. En contraste, la adición de DPA (0.25 mM) abate el potencial de membrana; sin embargo, su efecto también puede deberse a la inhibición de la oxidasa alterna.

Para demostrar si la cadena alterna es capaz de generar un gradiente de H^+ se determinó el potencial de membrana utilizando L-lactato o D-lactato ; y se observó que aún en presencia de 0.1 mM y 0.2 mM de KCN (aprox. 10 veces la K_i reportada en mitocondrias de mamíferos) se forma potencial por lo que se sugiere que la cadena alterna es capaz de generar el potencial de membrana. Esto es interesante ya que estas oxidasas alternas terminales en eucariotes como algunas plantas son capaces de generar potencial transmembranal y permitir procesos que dependan de energía, mientras que esto no sucede en otros organismos como las bacterias y los hongos.

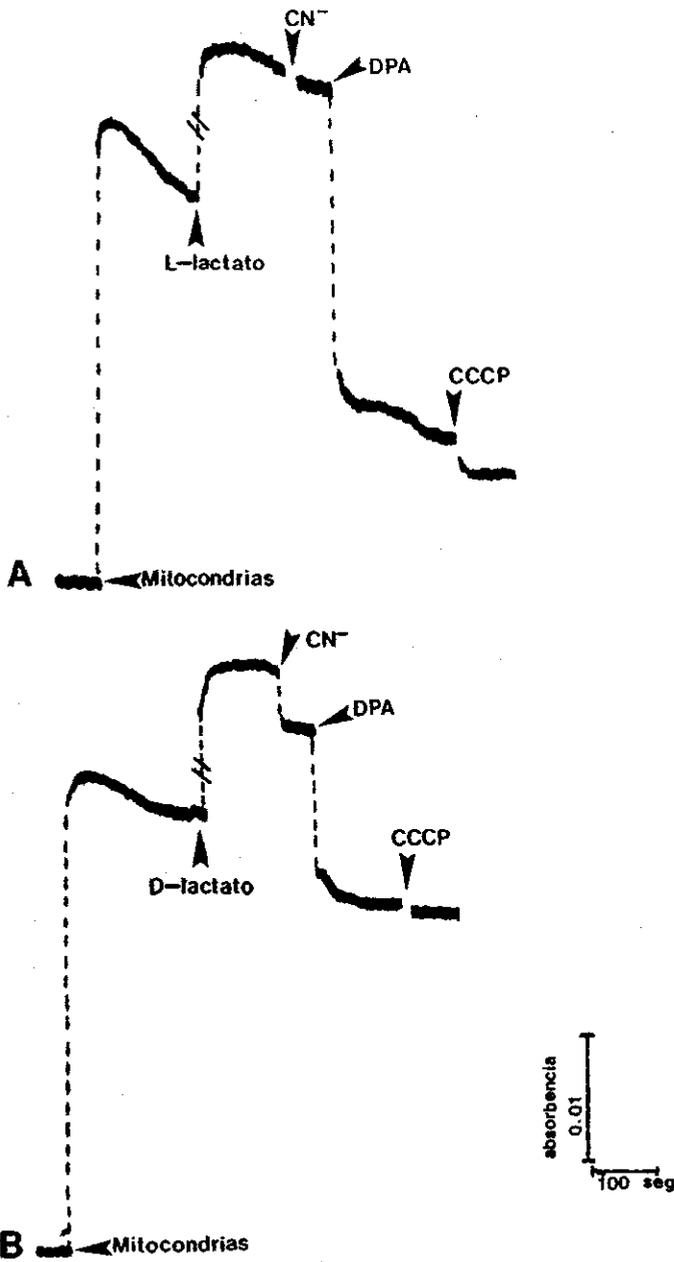


Figura 21. Potencial de membrana generado con 10 mM de L-lactato (A) y 5 mM de D-lactato (B) en mitocondrias de *Euglena gracilis*. Donde se indica cianuro (CN) 100 μ M, 5 μ M CCCP, colapsado por la adición de DPA 0.25 mM.

DETERMINACIÓN DEL Δ PH EN PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIALES DE *EUGLENA GRACILIS*

Para determinar si las PSM son capaces de generar un gradiente de H^+ , se utilizó el indicador fluorescente ACMA con L-lactato (figura 22) y D-lactato (figura 23) como sustratos.

Al final de los trazos se añadió nigericina 5 μ M, la cual actúa como ionóforo para el K^+ pero en intercambio por H^+ , por lo que suprime el gradiente de H^+ generado a través de la membrana.

Se pudo observar que el L-lactato y el D-lactato generan un gradiente de H^+ , como sucede en presencia de ATP-Mg²⁺ que es el sustrato de la ATPasa. El oxalato y oxamato inhiben la formación del gradiente de H^+ generado por L-lactato, pero al añadirle el ATP-Mg²⁺ no es inhibido el gradiente, lo que sugiere que este inhibidor bloquea la actividad de la LDH y no la de la ATPasa. En PSM de *Euglena* (figura 22), con L-lactato en presencia de 1 Mm de CN hay formación del gradiente de H^+ como con ATP-Mg²⁺.

Con respecto a la generación del gradiente de H^+ inducido por D-lactato (figura 23), sucede lo mismo que con el L-lactato. Esto puede sugerir que en las PSM, ya sea con L-lactato ó D-lactato como sustratos reductores se genera un gradiente de H^+ por lo que deben de estar acopladas. Los electrones van del lactato hasta el oxígeno quizá involucrando al citocromo b como componente de la vía alterna insensible a CN.

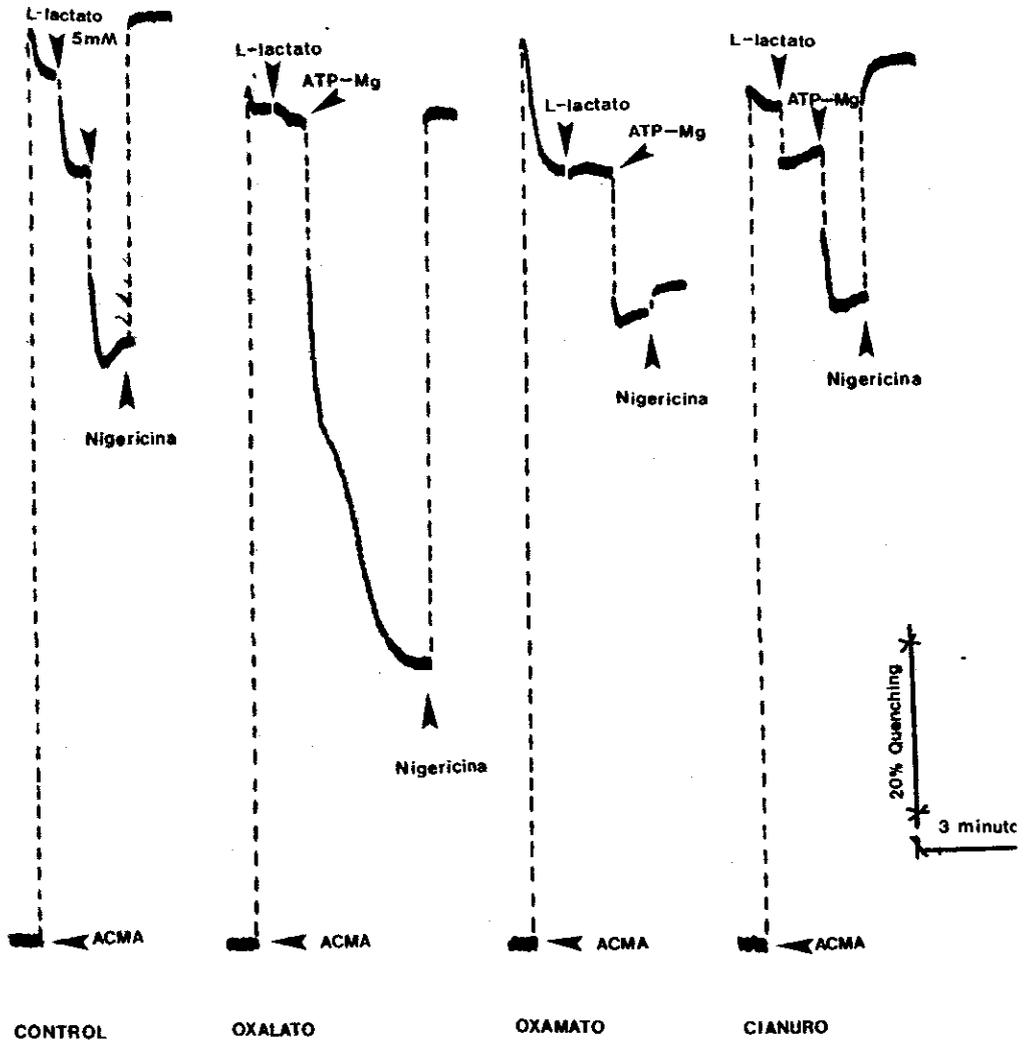


Figura 22. Determinación del ΔpH en PSM de *Euglena gracilis* utilizando como indicador fluorescente ACMA con L-lactato (10 mM). ATP-Mg²⁺ 2 mM, oxalato 0.25 mM, oxamato 0.01 mM, cianuro 1 mM y nigericina

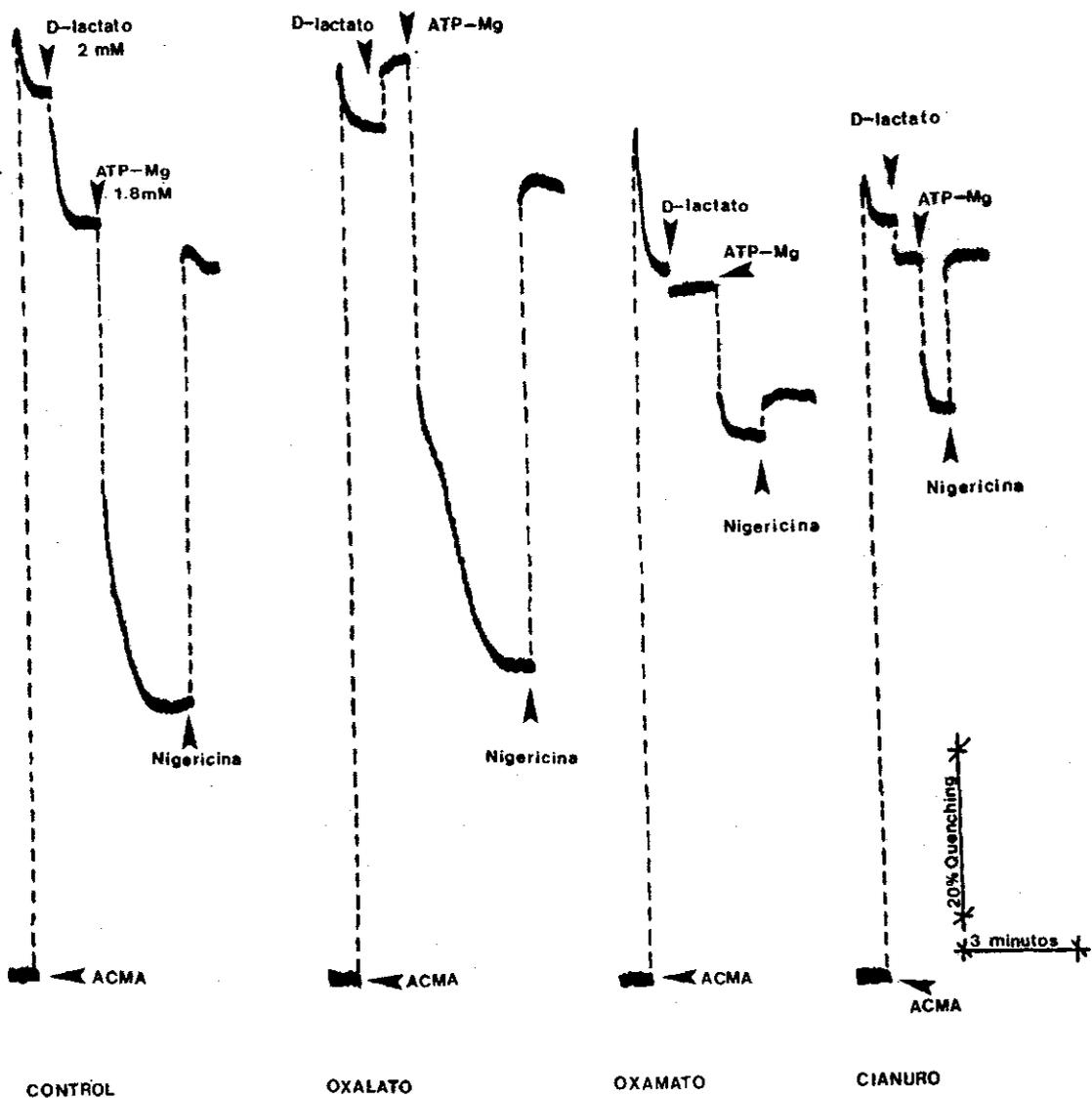


Figura 23. Determinación del ΔpH en PSM de *Euglena gracilis* utilizando como indicador fluorescente ACMA con D-lactato (5 mM). ATP-Mg²⁺ 2 mM, oxalato 0.25 mM, oxamato 0.01 mM, cianuro 1 mM y nigericina 5 μM .

ACTIVACIÓN DE LA LACTATO DESHIDROGENASA POR β -MERCAPTOETANOL

La regulación controlada de los procesos metabólicos es requerida en todos los organismos para adaptarse a cambios ambientales. Las respuestas (síntesis o degradación de enzimas, activación alostérica, activación por modificación covalente, efecto del cambio en la relación tiol/disulfuro) a ciertos estímulos son muy diversas y de duración variable en todos los sistemas biológicos, así como el o los mecanismos de regulación involucrados.

Por otra parte, se ha reportado que ciertas "proteínas esenciales" que presentan grupos sulfhidrilos son estabilizadas por agentes reductores como el mercaptoetanol y el DTT (Gilbert, 1982).

La lactato deshidrogenasa de PSM de *Euglena gracilis* es una enzima que presentó activación por β -mercaptoetanol; los datos se presentan en la figura 24.

El que la enzima presente activación por β -mercaptoetanol sugiere que tiene puentes disulfuro. Este reductor actúa sobre los puentes disulfuro formando disulfuros mixtos con las cadenas laterales de cisteína. En presencia de un exceso de β -mercaptoetanol los disulfuros mixtos también pueden ser reducidos, de modo que el producto final es una proteína en la cual los disulfuros (cistina) están completamente transformados en sulfhidrilos (cisteína).

Este comportamiento se ha reportado en otras enzimas, tales como la fructosa difosfatasa de hígado de conejo y la guanilato ciclasa, indicando que la enzima y el activador se unen por puentes disulfuro a pH de 7.0 o 7.5 (Nakashima y col. 1969; Brandwein y col. 1981). Sin embargo, en este caso la enzima tiene un activador y quizás en la LDH exista un activador que no conocemos.

Se ha propuesto que la modulación *in vivo* mediante intercambios tiol/disulfuro puede servir como un "tercer mensajero" biológico en respuesta a los niveles de AMPc (Gilbert, 1982). Esto sería muy interesante en un organismo como *Euglena*, ya que solo se ha reportado este comportamiento en algunas enzimas de mamíferos, bacterias, algas y algunas plantas superiores, (Ondarza,

1989) y no en el caso de protozoarios. Si la LDH de *Euglena* presenta esta particularidad podria explicar su adaptabilidad a diversos ambientes.

En el caso de la D-LDH de *E. coli* se utiliza 1 mM de β -mercaptoetanol para estabilizar a la enzima durante su purificación. En el caso de *P. denitrificans* la presencia de diferentes agentes SH, no tuvo ningún efecto en la actividad de la D-LDH. (Zborit.1996)

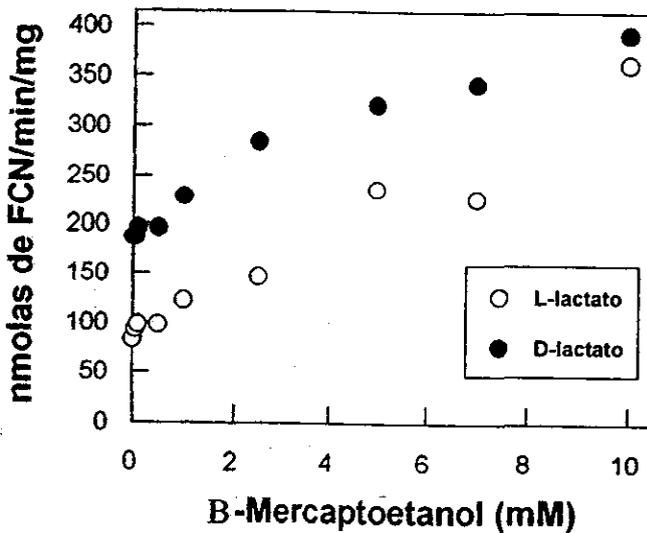


Figura 24. Activación de la LDH en presencia de β -mercaptoetanol con L-lactato y D-lactato en PSM de *Euglena gracilis* utilizando ferricianuro (FCN) para la determinación de la actividad. Los valores representan la media de dos experimentos independientes.

EFFECTO DE LA DEFICIENCIA DE ZINC EN EL MEDIO DE CULTIVOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA LACTATO DESHIDROGENASA.

Se ha propuesto que la oxidación de L-lactato y D-lactato en extractos de células de *Euglena gracilis* depende de la presencia de zinc en el medio de cultivo (Price, 1962). La actividad de la deshidrogenasa láctica con D-lactato y L-lactato (10 mM) disminuye su actividad en ausencia de zinc con respecto al control. En el caso del D-lactato disminuye 6 veces y para el L-lactato 5 veces independientemente de la fase de crecimiento del cultivo, indicando que la D-LDH es más sensible a la ausencia de zinc.

Con base en lo anterior, se determinó el efecto del zinc en la oxidación de L-lactato o D-lactato en las mitocondrias obtenidas de células crecidas en ausencia de zinc en el medio de cultivo, y en ausencia de este metal la velocidad del consumo de oxígeno disminuye un 40% con L-lactato como sustrato. La actividad de D-lactato, fue más sensible a la ausencia de zinc disminuyendo 70% con respecto a los controles (tabla 7). De acuerdo con lo anterior, podemos concluir que el zinc es necesario para la actividad de esta enzima en el metabolismo del lactato. Además, esta deshidrogenasa láctica, que requiere zinc, pertenecería al grupo de las llamadas metaloenzimas.

Por otra parte, quizás exista una relación con respecto a la deficiencia de zinc, ya que el sistema que es dependiente de zinc oxida preferentemente D-lactato y es sensible a oxamato, mientras que el sistema independiente de zinc es sensible a DPA.

Por otra parte, se encontró que la oxidación de el succinato y el glutamato-malato no se ve afectada por la ausencia de zinc en el medio, lo que sugiere que la deficiencia de zinc es específica para la actividad de la D-lactato deshidrogenasa (tabla 7).

En bacterias el zinc se utiliza como un potente inhibidor del citocromo o (Kita y cols. 1986)

Efectos similares con respecto a la modificación de la actividad de algunas enzimas se han reportado en *Aspergillus nidulans* (Cardenas, 1995) dependiendo de la presencia o ausencia de zinc.

Tabla 7. Consumo de oxígeno en mitocondrias de *Euglena gracilis* (obtenidas de células crecidas en presencia y ausencia de zinc en el medio de cultivo) con D-lactato y L-lactato. La concentración de ZnSO₄ se indica entre paréntesis (% en 1 litro).

Condición	ngátomo O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹			
	D-lactato (5 mM)	L-lactato (10 mM)	Succinato (10 mM)	G + M (15 mM + 7.5 mM)
Cultivo control (0.009%)	170 ± 4.9	80 ± 3.3	76 ± 2	60 ± 2
Cultivo en ausencia de zinc	54 ± 2.0	48 ± 1.3	67 ± 3.5	53 ± 4

Los valores indican el promedio de 5 determinaciones ± S. D.

G + M = Glutamato + Malato.

SOLUBILIZACIÓN DE LA LACTATO DESHIDROGENASA

Como primer intento para purificar la LDH se probó el efecto de diversos detergentes sobre la actividad de la enzima en presencia de L-lactato y D-lactato en PSM de *Euglena gracilis*.

Los detergentes Tween 20 (0.5%), Tritón (1%), CHAPS (0.15%), DOC (0.15%), Lauril maltósido (0.1%) y Octilglucósido (0.1%), disminuyeron más del 50 % de la actividad de la enzima, por lo que no se utilizaron para este tratamiento.

En presencia de Lubrol PX (0.1%) se obtuvo una fase soluble en la cual se localizó la mayor cantidad de proteína (65-75%) con un aumento en la actividad de la enzima, tanto con L-lactato como con D-lactato (tabla 8). Esta actividad se determinó en presencia de DCPIP como aceptor de electrones.

Ambas actividades se determinaron a los 60 minutos después del tratamiento y no se observaron cambios, por lo que la enzima es estable con respecto al tiempo, lo que sugiere que el detergente no inactiva a la enzima

Tabla 9. Actividad de la lactato deshidrogenasa con L-lactato y D-lactato en PSM de *Euglena gracilis* tratadas con Lubrol PX. Los valores representan la media \pm desviación estándar de 3 preparaciones.

	nmolas DCPIP reducido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	
	L-Lactato	D-Lactato
Control	968 \pm 15	1536 \pm 25.7
Lubrol PX (0.1%) sobrenadante	1402 \pm 17.5	4597 \pm 39.3

ELECTROFORESIS EN CONDICIONES NATIVAS.

Se realizó la electroforesis en condiciones nativas de la fracción solubilizada con Lubrol PX de las partículas submitocondriales obtenidas de *Euglena gracilis*.

Puesto que los experimentos con inhibidores sugieren la existencia de 2 LDH's, la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas podrían mostrar una movilidad electroforética diferente para las dos actividades. Así pues, se esperaría la aparición de varias bandas de actividad si se tratara de enzimas distintas. Los resultados se muestran en las figuras 25 y 26.

En el caso del precipitado de PSM de *Euglena gracilis* con L-lactato tratadas con Lubrol PX (figura 25-1), se observó una sola banda (A), en el caso de *P. denitrificans* se observan varias bandas (B), lo interesante es que una coincide con la banda que se revela en *Euglena*. En el caso de las membranas de *E.coli* (C) hay una actividad que no ingresa al gel separador y otra que se revela con un r_f similar al caso de *Euglena* y *P. denitrificans*.

Al revelar la actividad de esta misma fracción con D-lactato (figura 25-2) de esta misma fracción se observan dos bandas para las PSM de *Euglena gracilis*

(carril A), siendo la de mayor actividad la banda de alto peso molecular. Esta no coincide con la banda de actividad de la muestra de membranas de *P. denitrificans* (carril B), ni con aquella de las membranas de *E.coli* (carril C), cuya actividad está asociada a una banda de bajo masa molecular.

Estas diferencias en presencia del D-lactato podrían explicarse suponiendo que la proteína se agrega y se distribuye en 2 poblaciones de diferente masa molecular. Sin embargo, la actividad en presencia de L-lactato solo muestra una banda, sin observarse modificaciones en el estado de agregación proteico. Por otra parte, podemos sugerir la existencia de dos enzimas, una de las cuales es específica para L-lactato y otra para D-lactato

Estos resultados se muestran en las figura 26 encontrándose nuevamente que al revelar la actividad de la enzima con D-lactato (figura 26-2) se observa una banda bien definida de alto peso molecular como la que se muestra en los geles anteriores, mientras que con L-lactato (figura 26-1) no se observa una banda bien definida, lo que puede deberse por lo menos a dos posibilidades: que hay una mayor sensibilidad a la remoción del detergente y no se encuentra activa o bien a que la enzima no esta totalmente solubilizada.

Los experimentos de esta preparación de PSM de *Euglena* solubilizadas con el detergente Lubrol PX, sugieren la presencia de dos enzimas, ya que revelan patrones de electroforesis distintos para el caso del D-lactato. Sin embargo, es necesario incrementar la pureza de la preparación y realizar nuevos experimentos para esclarecer si se trata de dos enzimas distintas, así como determinar la secuencia de su extremo amino terminal y compararlas con la LDH reportada para *E. coli*, la cual se encuentra purificada y se conoce su masa y secuencia primaria (Futai, 1973).

Esta D-LDH de *E.coli* presenta la característica de que al estar asociada con el detergente es un monómero, pero en ausencia del detergente forma dímeros o trímeros, al parecer este disocia al agregado a monómeros aumentando la actividad (Futai, 1993; Khon y Kaback, 1973).

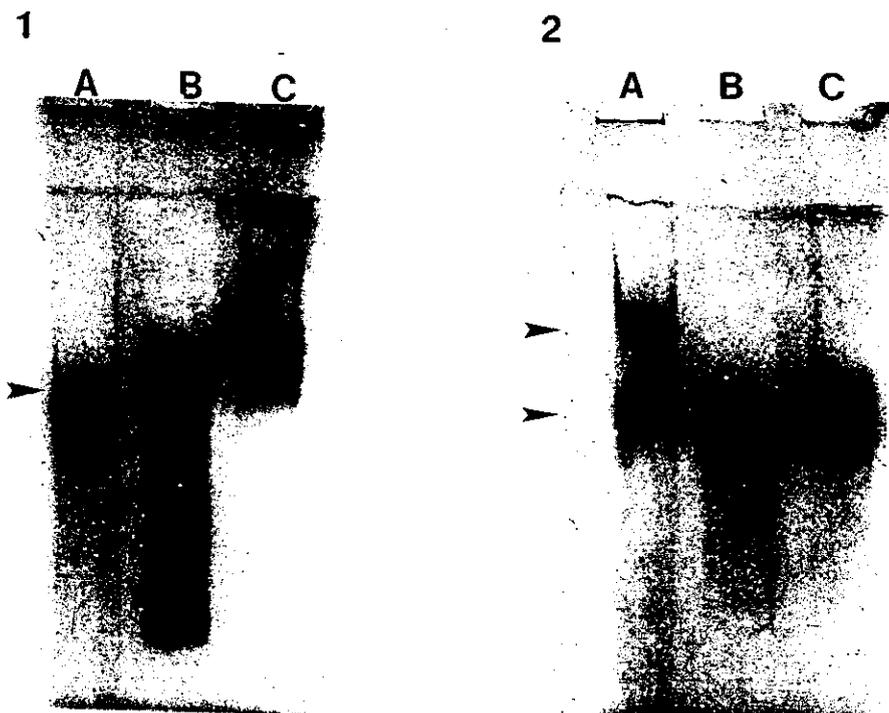


Figura 25. Electroforesis en condiciones nativas del precipitado de las PSM de *Euglena gracilis* tratadas con 0.1% de lubrol PX A; en el carril B, membranas de *P. denitrificans* , y en el carril C membranas de *E.coli* , ambas tratadas en las mismas condiciones que las PSM de *Euglena gracilis*, los geles fueron corridos y revelados como se describe en Materiales y Métodos (1) L-lactato y con (2) D-lactato

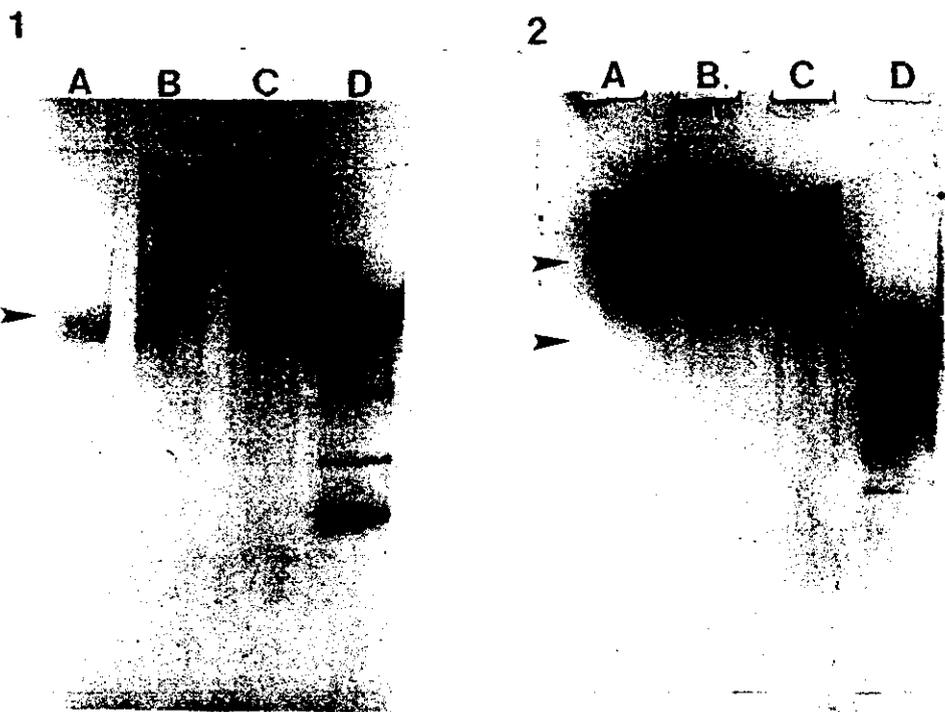


Figura 26. Electroforesis en condiciones nativas de la fracción tratada con Lubrol PX y dializada del sobrenadante de las PSM de *Euglena gracilis*. (A) PSM tratadas con 0.1% de Lubrol PX; (B) PSM de *Euglena gracilis* tratadas con 0.3% de Lubrol PX; (C) membranas de *P. denitrificans* y (D) membranas de *E.coli* tratadas con se describe en Materiales y Métodos. La actividad se reveló con (1) L-lactato o (2) D-lactato.

Por otra parte, se midió el consumo de oxígeno con L-lactato o D-lactato en diversos organismos de los cuales se aislaron mitocondrias y membranas como se muestra en la tabla 9. Con L-lactato solo hubo consumo de oxígeno en mitocondrias de *Euglena* y *Trypanosoma cruzi*, y en membranas de *P. denitrificans*, *E. coli*, *B. subtilis*, *B. cereus* y *B. stearothermophilus*.

La oxidación de D-lactato fué exclusiva de *E. gracilis*, *Paracoccus* y *E. coli*. En el caso de la oxidación con succinato y NADH casi todas las preparaciones presentaron actividad.

Esto podría tener trascendencia filigenética ya que los tripanosomátidos son líneas muy cercanas a los Euglenidos.

Tabla 9. Consumo de oxígeno en mitocondrias, membranas y fracciones purificadas de diversos organismos (0.5 mg/ml) con diferentes sustratos, utilizando como medio de incubación KMEP a 30°C, pH 7.4. Los valores representan la media de dos preparaciones independientes, excepto las mitocondrias de *Euglena* (n=10) y las membranas aisladas de *E. coli* y *P. denitrificans* (n=6).

	ngátomos O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹			
	L-lact	D-lact	Succinato	NADH
MITOCONDRIAS				
<i>Euglena gracilis</i> (5)	167±3	350±7	80±5	50±3
<i>Polytomella sp</i>	N.D.	N.D.	73	48
<i>Vicia faba</i>	N.D.	N.D.	13	28
<i>Phaseolus vulgaris</i>	N.D.	N.D.	53	44
Alfalfa	N.D.	N.D.	46	82
<i>Trypanosoma cruzi</i>	26	N.D.	10	N.D.
<i>Crithidia sp</i>	N.D.	N.D.	12	21
Cisticercos (fracción purif.)	N.D.	N.D.	60	N.D.
MEMBRANAS				
<i>Escherichia coli</i> (5)	34±1.5	137±4	N.D.	N.D.
<i>Paracoccus denitrificans</i> (5)	81±3	170±6	N.D.	N.D.
<i>Rodospirillum rubrum</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Bacillus subtilis</i>	12	N.D.	10	454
<i>Bacillus cereus</i>	10	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	7	N.D.	14	1733

N.D. No Detectato. L-lact = 10 mM; D-lact = 5 mM; Succinato = 10 mM; NADH = 1 mM.

CONCLUSIONES

1. Las mitocondrias y las PSM de *Euglena gracilis* oxidan L- y D-lactato en una reacción independiente de piridín nucleótidos. Llama la atención una D-LDH dependiente de flavinas directamente unida a la cadena respiratoria, que solo ha sido descrita para *E. coli* (Futai, 1973) y otras bacterias (Zboril, 1996).

2. La oxidación de L-lactato y D-lactato en mitocondrias y PSM de *Euglena gracilis* es parcialmente sensible a antimicina, CN, mixotiazol, y HQNO. Esto sugiere que en el proceso está involucrada una vía de oxidación alterna de este sustrato que no involucra al complejo bc₁ ni a la citocromo oxidasa. Esto es apoyado por el hecho de que el DPA inhibe la oxidación del lactato. Sin embargo, el SHAM no inhibe de manera específica y eficiente la respiración insensible a CN en *Euglena*. La insensibilidad a los diferentes inhibidores puede interpretarse en términos de una cadena respiratoria alterna como había sido propuesto por Sharpless y Butow (1970) y Butow (1989).

3. Se propone que el lactato se oxida por la vía alterna que se bifurca antes del sitio de inhibición de la antimicina, involucrando una oxidasa alterna sensible a cianuro.

Las electroforesis nativas obtenidas de PSM de *Euglena gracilis* solubilizadas con Lubrol PX sugieren la presencia de dos enzimas, ya que revelan patrones electroforéticos distintos, sin embargo, se requiere purificarla para asegurar si se trata de dos enzimas distintas.

La ausencia de zinc en el medio de cultivo también modifica la actividad de la enzima, siendo más sensible la oxidación con D-lactato que con L-lactato.

4. La oxidación de D-lactato en mitocondrias y PSM de *E. gracilis* es sensible al oxamato, pero no así la oxidación del L-lactato, lo que sugiere la

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

existencia de dos enzimas involucradas en la oxidación de estos sustratos; alternativamente puede tratarse de una enzima con afinidades distintas por los isómeros del lactato. Los experimentos electroforéticos apoyan el modelo de dos enzimas específicas involucradas en la oxidación de los isómeros del lactato.

5. La actividad enzimática de diversas fracciones subcelulares sugieren que la enzima se encuentra localizada en la membrana interna mitocondrial como se reportó por Uribe y Moreno-Sánchez, (1992). Además de ser una enzima que depende de zinc en el medio de cultivo, por lo que podríamos decir que es una metaloenzima.

6. Las mitocondrias de *Euglena gracilis* tienen la capacidad de generar un gradiente electroquímico de protones en presencia de CN, y este potencial se mantiene estable utilizando L-lactato o D-lactato como sustratos y es sensible a desacoplantes, lo que podría sugerir que la oxidasa alterna involucrada puede ser una bomba redox de H^+ en estas mitocondrias.

Aunque no se conoce el papel metabólico de esta enzima, quizá le permita a *E. gracilis* el uso óptimo de recursos en un medio competitivo. Esto podría tener relación o implicaciones evolutivas.

Por otro lado, quizás sea una enzima reguladora, la cual podría controlar la división celular dependiendo de las fuentes de carbono que se utilicen en el medio de cultivo y la expresión de oxidasas alternas, o que simplemente esta oxidasas se expresen para responder a situaciones de estrés.

La cinética de la oxidación de L-lactato y D-lactato presentan diferencias entre LDH's sugiriendo diferentes mecanismos para la unión del sustrato y su especificidad.

7. La activación de la enzima por β -mercaptoetanol sugiere algún tipo de modulación, mediante la relación tiol-disulfuro, esto podría servir como un

"tercer mensajero" en respuesta a niveles de AMPc, como se ha reportado para otros organismos, lo que podría sugerir que *E. gracilis* sea un organismo fácilmente adaptable.

La presencia de la actividad de una lactato oxidasa en mitocondrias y PSM de *Euglena* quizás sugiera una unión evolutiva entre cadenas respiratorias alternas de bacterias y la mitocondria de *E. gracilis*.

Indagar en las rutas de oxidación de los diferentes sustratos de *E. gracilis* podría dar información sobre la adaptabilidad de este organismo a diferentes ambientes.

BIBLIOGRAFIA.

- Akerman, K.E.O. y Wikstrom, M.K.F. (1976). Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS. Lett.* 68, 191-197.
- Alberts, B; Dennis, B; Lewis, L; Raff, M; Roberts, K. y Watson, J.D. (1994). *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. Garland Pub. Inc. New York. 1146 pp.
- Ambler, P.R. Kamen, D.M; Bartsch, G.R. y Meyer, E.T. (1991). Amino acid sequences of *Euglena viridis* ferredoxin and cytochromes c. *Biochem. J.* 276, 47-52.
- Atteia, A; De Vitry, C; Pierre, Y. y Popot, J.L. (1992). Identification of mitochondrial proteins in membrane preparations from *Clamydomonas reinhartii*. *J. Biol. Chem.* 267: 226-234
- Baker, E.J. (1963). Diphenylamine inhibition of electron transport in plant mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 103: 148 - 155.
- Bariaud, A. , Bury, M., Mastre, J.C. (1985). Mechanism of Cd²⁺ resistance in *Euglena*. *Physiol.* 63: 382 -386.
- Bandwein, J.H; Lewicki, A.J. y Murad, F. (1981). Reversible Inactivation of Guanylate Cyclase by Mixed Disulfide. *J.Biol.Chem.* 256: 6, 2958-2962.
- Barnes, M.E. Jr. y Kaback, R.H. (1971). Mechanisms of Active Transport in Isolated Membrane Vesicles. Part 1. The site of energy coupling between D-lactic DH and beta-galactoside transport in *E. coli* membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 246 (17): 5518-5522.
- Betsche, T. (1981). L-Lactate dehydrogenase from leaves of higher plants. Kinetics and regulation of the enzyme from lettuce (*Lactuca sativa* L.) *J. Biochem.* 195, 615-622.
- Blum, J.J. y Buetow, D.E. (1963).. Biochemical Changes During Acetate Deprivation and Repletion in *Euglena*. *Exp.Cell.Res.* 29, 407-421
- Bomsel, J.L. y Calvayrac, R. (1978). In *Plant Mitochondria*. Elsevier, Amsterdam. 299-306
- Brandes, D., Buetow, D.E., Bertini, F., y Malkoff, D.B. (1964) *Exp. Mol. Pathol.* 3, 583-609.

- Brandt, J.T., Martin, A.P., Lucas, F.V. y Vorbeck, M.L. (1974). The Structure of rat liver mitochondria: A Reevaluation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59, 1097-1103.
- Briand, J., Calvayrac, R., Laval-Martin, D. y Farineau, J. (1981). *Plant* 151, 168-175.
- Bandwein, J.H; Lewicki, A.J. y Murad, F. (1981). Reversible Inactivation of Guanylate Cyclase by Mixed Disulfide. *J. Biol. Chem.* 256:6, 2958-2962.
- Brönstrop, U. y Hachtel, W. (1989). Cytochrome c Oxidase of *Euglena gracilis*: Purification, Characterization and Identification of Mitochondrially synthesized subunits. *J. Bioenerg. Biomemb.* 21(3): 359-373.
- Brunold, C. y Schiff, J.A. (1976). Studies of Sulfate Utilization by Algae. *Plant Physiol.* 57, 430-436.
- Buetow, D.E. (1961). Ethanol Stimulation of Oxidative Metabolism en *Euglena gracilis*. *Nature.* 190, 1196.
- Buetow, D.E. (1968). Morphology and Ultrastructure of *Euglena* en: *The Biology of Euglena* (D.E. Buetow, ed). Vol. I. Academic Press. N.Y. 109-184.
- Buetow, E.D. (1989). The Mitochondrion in The Biology of *Euglena*. Buetow, D.E. (ed.) Vol IV. Academic Press, N.Y. p. 247-314.
- Buetow, E.D. y Buchanan, J.P. (1965). Oxidative phosphorylation in mitochondria isolated from *Euglena gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 96: 9-17
- Calvayrac, R. (1971). Action de l' antimicine A sur la respiration et la structure des mitochondries d' *Euglena gracilis* Z. *Arch. Mikrobiol.* 80. 62-69
- Calvayrac, R., Butow, R.A. y Lefort-Tran, M. (1972) *Exp. Cell Res.* Cyclic Replication of DNA and Changes in Mitochondrial Morphology During the Cell Cycle of *Euglena gracilis*. 71, 422-432.
- Calvayrac, R., Laval-Martin, D., Hubert, M., Best-Belpomme, M. y Villaume, M. (1985) *Comp. Biochem. Physiol.* 813, 1009-1017
- Calvayrac, R., Levy, M., Vazart, J., Briand, J. y Claisse, M. (1978). Activite cytochrome oxydases des mitochondries d' *E. gracilis* z: Comparision del' oxydation dm ferrocyclochrome C-558 de ferrocyclochromes c. de mamiferes. *Biol. Cell.* 31, 141- 148
- Calvayrac, R., Bertaux, O., Lefort-Tran, M. y Valencia, R. (1974). *Protoplasma.* 80, 355-370.

- Cannons, C.A. y Merret, J.M. (1984). Regulation of synthesis of citrate synthase in regreening *Euglena gracilis*. *Eur. J. Biochem.* 142: 597-602.
- Capaldi, R.A. (1982). Arrangement of proteins in the mitochondrial inner membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 694 (3): 291-306.
- Cárdenas, G.M. (1995). Una Nueva Mutante de *Aspergillus nidulans* afectada diferencialmente en el crecimiento y la esporulación. Tesis Maestría en Ciencias (Biología Celular). Facultad de Ciencias U.N.A.M. México.
- Carre, I., Bomsel, J.L. y Calvayrac, R. (1988). Decay of cytochromes and appearance of a cyanide-insensitive electron transfer pathway in *Euglena gracilis* grown in Anoxia. *Plant. Sci.* 54, 193-202.
- Cavalier-Smith, T. (1987). *The Origin of Eukaryote and Archaeobacterial Cells.* *Annals. N. Y. Academy. Sci.* 503: 17-54
- Chaudhary, M., Fayyaz, A. y Merret, J.M. (1984). Glycolate-pathway enzymes in mitochondria from phototrophic, organotrophic and mixotrophic cell of *Euglena gracilis* *Planta.* 162. 518-523.
- Chaudhary, M., Fayyaz, A., Cannons, C.A. y Merret, J.M. (1984). *Plant Science Letters* 34. 89.
- Chávez, E., Zazueta, C. y Bravo, C. (1989). Extensive Ca²⁺ release from energized mitochondria induced by disulfiram. *J. Bioenerg. Biomemb.* 21 (3): 335-345.
- Collins, N. y Merret, J.M. (1975). The Localization of Glycolate-Pathway Enzymes in *Euglena*. *J. Biochem.* 148. 321-328
- Collins, N., Brown, H.R. y Merret, J.M. (1975) *J. Biochem.* 150. 373.
- Cook, J.R. (1968). The cultivation and growth of *Euglena*, en: Buetow, E.D. (Ed.), *The Biology of Euglena*, Vol. I, Academic Press, N.Y. 244-314.
- Cui, J., Mukai, K., Saeki, K. y Matsubara, H. (1994) Molecular cloning and nucleotide sequences of cDNAs encoding subunits I, II, and IX of *Euglena gracilis* mitochondrial complex III. *J. Biochem.* 115, 98-107.
- Day, D; Millar, A; Wiskich, J.T. y Whelan, J. (1994). Regulation of Alternative Oxidase Activity in Soybean Mitochondria. *Plant. Physiol.* 106: 1421-1427.

Danforth, W. F. (1968). Respiration, en: Buetow, E.D. (Ed.), The Biology of *Euglena*, Vol. II. Academic Press, N.Y. 55-71.

Datta, B.D. y Khan, S.J. (1977). Some Biochemical properties of mitochondria isolated from *Euglena gracilis*. J. Protozool. 24(1). 187-192

Davis, B. y Merret, J.M. (1974). The Effect of Light on the Synthesis of Mitochondrial Enzymes in Division-synchronized *Euglena* Cultures. Plant. Physiol. 53, 575-580

Davies, D.D. y Davies, S. (1972). Purification and Properties of L(+)- Lactate Dehydrogenase from Potato Tubers. Biochem. J. 129: 831-839.

Day, D.A., Millar, A. H., Wiskich, J.T. y Whelan, J. (1994) Regulation of alternative oxidase activity by pyruvate in soybean mitochondria. Plan. Physiol. 106, 1421-1427.

De Pierre, J.W. y Ernest, I. (1977). Enzyme topology of intracellular membranes. Annu. Rev. Biochem. 46, 201-262.

Delorme, E., Gómez-Silva, B., Stern, I.A. y Schiff, A.J. (1986). Protein synthesis linked to respiration and phosphorylation in intact *Euglena* mitochondria. Plant. Cell. Physiol. 27(1), 177-182.

Devars, S; Torres-Márquez, E; Gonzalez-Halphen, D; Uribe, A. y Moreno-Sánchez, R. (1992). Cyanide-sensitive and cyanide-resistant respiration of dark-grown *Euglena gracilis*. Plant .Sci. 82: 37-46.

Devars, S., Hernández, R. Moreno-Sánchez, R. (1997). Enhanced Heavy Metal Tolerance in two strains of photosynthetic *Euglena gracilis* by preexposure to mercury or cadmium. Archives of Environm. Cont. and Toxicology.

De Filippis, L.F. y Pallaghy, C.K. (1994). Heavy Metals: sources and biological effects. In: Rai, L.C., Gaur, J.P., Soeder, C.J. (eds). Advances in limnology series: algae and water pollution. Eschwerzbarsche. Press, Stuttgart, pp. 31-77.

De Vrij, W; Bulthuis, A.R. y Konings, N.W. (1988). Comparative Study of Energy-Transducing Properties of Cytoplasmic Membranes from Mesophilic and Thermophilic *Bacillus* Species. J. Bacteriol. 170: 2359-2366.

Dockerty, A. y Merret, J.M. (1979). Isolation and Enzymic Characterization of *Euglena* Proplastids. Plant Physiol. 63, 468-473

- Doelle, W.H. (1971). Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Dependent and Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Independent Lactate Dehydrogenase in Homofermentative and Heterofermentative Lactic Acid Bacteria. *J. Bacteriol.* 108(3): 1284-1289.
- Douce, R. (1985). *Mitochondria in Higher Plants: Structure, Function and Biogenesis*. Academic Press. Orlando Florida.
- Douce, R; Moore, A.L. y Neuburger, M. (1977). *Isolation and Oxidative Properties of Intact Mitochondria Isolated from Spinach Leaves*. *Plant Physiol.* 60: 625-628.
- Douglas, A.S. y Donald, M.W. (1988). *Química Analítica*. McGraw Hill. Interamericana. España.
- Dowd, S.R., Pratt, E.A. Sun, Z. y Ho, Ch. (1995) Nature and environment of the sulfhydryls of membrane-associated D-lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1252, 278-283.
- Duret, S., Bonaly, J., Bariaud, A., Vnnereau, A. y Mestre, J.C. (1986). *Environmental Research.* 39, 96-103.
- Eriksson, M., Gardeström, P. y Samuelsson, G. (1995). Isolation, Purification and Characterization of Mitochondria from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant. Physiol.* 107: 479-483.
- Escamilla, J.E., Barquera, B., Ramirez, R., García-Horsman, A. y del Arenal, P. (1988) Role of menaquinone in inactivation and activation of the *Bacillus cereus* forespore respiratory system. *J. Bacter.* 170, 5908-5912.
- Everse, J. y Kaplan, N.O. (1973). *Adv. Enzymol.* 28, 61-133
- Fiskum, G. y Lenninger, A.L. (1980). *Fed. Proc.* 39-7: 2432-2436.
- Futai, M. (1973) Membrane D-lactate dehydrogenase from *Escherichia coli*. Purification and properties. *Biochemistry.* 12, 2468-2474.
- Futai, M. (1974). Reconstitutin of transport dependent on D-lactate or glycerol-3-phosphate in membrane vesicles of *E. coli* deficiente in the corresponding dehydrogenase. *Biochemistry.* 13: 2327 - 2333.
- Futai, M., y Kimura, H. (1977). Inducible membrane bound D-lactate dehydrogenase from *E.coli*. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* 252: 5820 -5827.

Garcia-Horsman, A.J; Barquera,B; Rumbley, J; Jixiang, M.A. y Gennis, B. R. (1994). The Superfamily of Heme-Copper Respiratory Oxidases. *J. Bacteriol.* 176:18. 5587-5600

Gartland, R.C. (1973). Purification and properties od DL-lactate dehydrogenase from *leuconostoc mesenteroides* Arcg. *Biochem. Biophys.* 157: 36 -43.

Garvie, I.L. (1980). Bacterial Lactate Dehydrogenase. *Microbiol. Rev.* 44 (1), 106-139.

Gasser, F. y Gasser, C. (1971) Immunological relationships among lactic dehydrogenases in the genera *Lactobacillus* and *Leuconostoc*. *J. Bacter.* 106, 113-125.

Gilbert,F.H. (1982). Biological Disulfides: The Third Messenger? Modulation of Phosphofructokinase Activity by Thiol/Disulfide Exchange. *J. Biol. Chem.* 257:20, 12086-12091.

Gleasson, F.H., Nolan, R.A., Wilson, A.C. y Emerson, R. (1966). D(-)-Lactate Dehydrogenase in Lower Fungi. *Science.* 152, 1272-1273.

Gleissner,M., Elferink, M.G.L., Driessen, A.J.M., Konings, W.N. y Anemuller, S. (1994). Generation of proton-motive force by the archael terminal quinol oxidase from *Sulfolobus acidocalcarius*. *Eur. J. Biochem.* 224: 983-990.

Gómez-Silva, B., Stern, I.A., Saidha, T. y Schiff, A.J. (1985). Oxidative phosphorylation coupled to respiration in highly purified intact *Euglena* mitochondria. *Plant. Physiol.* 120, 431-440.

Gornall, G.A., Bardawill, J.C. y David, M.M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction *J. Biol. Chem.* 77, 751-766.

Graves, L.B. Jr., Trelease, R.N., Grill, A. y Becker, W.M. (1974) Localization of glyoxylate cycle enzymes in glyoxysomes in *Euglena*. *J. Protozol.* 19, 527-532.

Grary, M.W. (1992). The endosymbiont hypothesis revisited. *Int. Rev. Cytol.* 141: 233 - 377.

Grobovsky, L.V. Hershenson, S., y Ernst-Fonberg, M.L. (1991) *FEBS Lett.* 102, 261-264.

Grover, D.S. y Laties, G.G. (1981). Disulfiram Inhibition of alternative respiratory pathway in plant mitochondria. *Plant Physiol.* 68. 393-400

Guzmán, P.A., Jiménez-Mayarga, M.E. y Moreno-Sánchez R. (1994). Sobreexpresión de cadena alterna en mitocondrias de *Euglena gracilis* crecidas en el medio de etanol y GTM + CN XX Congreso Nacional de Bioquímica. Zacatecas, Zac. SMB.

Gualtieri, P. (1993) New Trends in Photobiology: *Euglena gracilis*: is the photoreception enigma solved? *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 19, 3-14.

Hatefi, Y. (1985). The Mitochondrial Electron Transport and Oxidative Phosphorylation System. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 1015-1069.

Henze, K., Badr, A., Wettern, M., Cerff, R. y Martin, W. (1995) A nuclear gene of eubacterial origin in *Euglena gracilis* reflects cryptic endosymbioses during protist evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 9122-9126.

Hensgens, L.A., Brakenhoff, J., De Vries, B.F., Sloof, P., Tromp, M.C., Van Boom, J.H. y Benne, R. (1984). The sequence of the gene for cytochrome c oxidase subunit I. a frameshift containing gene for cytochrome c oxidase subunit II and seven unassigned reading frames in *Trypanosoma brucei* mitochondrial maxi-circle DNA. *Nucleic. Acids. Res.* 12: 7327-7344.

Hensel, R., Mayr, U., Fujiki, H. y Kandler, O. (1977) Comparative studies of lactate dehydrogenases in lactic acid bacteria. *Eur. J. Biochem.* 80, 83-92.

Hensel, R., Mayr, U., Stetter, K.O. y Kandler, O. (1977) Comparative studies of lactic acid dehydrogenases in lactic acid bacteria. *Arch. Microbiol.* 112, 81-93.

Holbrook, J.J., Liljas, A., Steindel, S.J., Rossmann, M.G. in the *Enzymes*, 3rd ed. (Boyer, P.D. ed) Vol. 11, 191-292, Academic Press, New York.

Hutner, H.S. y Bach, K.M. (1956). A sugar-containing basal medium for vitamin B12-assay with *Euglena*; application to body fluids. *J. Protozool.* 3. 101-112.

Hoefnagel, N.M.H; Millar, H.A; Wiskich, T.J. y Day, A.D. (1995). Cytochrome and Alternative Respiratory Pathways Compete for Electrons in the Presence of Pyruvate in Soybean Mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 318: 2; 394-400.

Horrum, A.M. y Schwartzbach, D.S. (1980). Nutricional Regulation of Organelle Biogenesis in *Euglena*: Photo- and Metabolite Induction of Mitochondria. *Planta*. 149: 376-383.

Ingledeu, W.J. y Poole, R.K. (1984). Respiratory Chains of *E. coli*. *Microbiol. Rev.* 48, 247-271

Inui, H., Miyatake, K., Nakano, Y. y Kitaoka, S. (1984). *J. Biochem.* 96, 931.

Inui, H., Miyatake, K., Nakano, Y. y Kitaoka, S. (1990). Pyruvate:NADP+ oxidoreductase from *Euglena gracilis*: Mechanism of O₂-inactivation of the enzyme and its stability in the aerobic. *Arch. Biochem. Biophys.* 280(2), 292-298

Inui, H., Miyatake, K., Nakano, Y. y Kitaoka, S. (1982). Wax ester fermentation in *Euglena gracilis*. *FEBS. Lett.* 150(1). 89-93.

Inui, H., Miyatake, K., Nakano, Y. y Kitaoka, S. (1985). The physiological role of oxygen-sensitive pyruvate dehydrogenase in mitochondria fatty acid synthesis in *Euglena gracilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 237(2). 423-429

Inui, H., Ono, K., Miyatake, K., Nakano, Y. y Kitaoka, S. (1987). Purification and Characterization of Pyruvate: NADP⁺ Oxidoreductase in *Euglena gracilis*. *J. Biol. Chem.* 262(19). 9130-9135.

Isegawa, Y., Nakano, Y. and Kitaoka, S. (1984). Submitochondrial Location and Some Properties of NAD⁺ and NADP⁺-Linked Malate Dehydrogenase in *Euglena*. *Agric. Biol. Chem.* 48(2). 549-552.

Jin-Yan Cui., Mukai, K., Saeki, K. y Matsubara, H. (1994). Molecular Cloning and Nucleotide Sequences of cDNAs Encoding Subunits I, II and IX of *Euglena gracilis* Mitochondrial Complex III. *J. Biochem.* 115, 98-107.

Jiménez, M.M.E. (1994). Caracterización de Mitocondrias de *Euglena gracilis* crecidas en etanol como única fuente de carbono. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. U.N.A.M. México.

John, P. y Whatley, R.F. (1975). *Paracoccus denitrificans* and the evolutionary origin of the mitochondrion. *Nature*. 254. 495-498.

Kaback, R.H. y Milner, S.L. (1970). Relationship of a Membrane-bound D(-)-Lactic Dehydrogenase to Amino Acid Transport in Isolated Bacterial Membrane Preparations. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 66(3): 1008-1015.

- Kaplan, A.L. Ph.D. y Pesce, J.A. Ph.D. (1991). *Clinical Chemistry*. The C.V. Mosby Company. St. Louis Missouri. 51-73
- Karp, G. (1984). *Cell Biology*. Mc Graw-Hill Book Company. 2a. Edition, New York. 309-348.
- Kelly, N; Delaney, M. y Pádraig O'Carra. (1978). Affinity Chromatography of Bacterial Lactate Dehydrogenases. *J. Biochem.* 171, 543-547.
- Khan, S.J. (1974). Physiological adaptation of *Euglena gracilis* uncouplers and Inhibitors of oxidative phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 164, 266-274.
- Khym, J.X. (1975). *Clin. Chem.* 21, 1245-1252.
- Kita, K, Konishi, K. y Anraku, Y. (1986). Purification and properties of two terminal oxidase complexes of *E. coli*. aerobic respiratory chain. *Methods Enzymol.* 126, 94-113.
- Kitaoka, S., Nakano, Y., Miyatake, K. y Yokota, A. (1989). Enzymes and their functional location, en: Buetow, E.D. (Ed.), *The Biology of Euglena*, Vol, IV, Academic Press. N.Y. 1-136.
- Kivic, P.A. y Walne, P.L. (1984). An evaluation of a possible phylogenetic relationship between the Euglenophyta and Kinetoplastida. *Origins of Life.* 13, 269-288.
- Kline, E.S., Brandt, R.B., Laux, J.E., Spainhour, S.E., Higgins, E.S., Rogers, K.S., Tinsley, S.B. y Waters, M.G. (1986). *Arch. Biochem. Biophys.* 246, 673-680.
- Kochhar, S., Hunziker, P.E., Leong-Morgenthaler, P. y Hottinger, H. (1992) Evolutionary relationship of NAD⁺-dependent D-lactate dehydrogenase: comparison of primary structure of 2-hydroxy acid dehydrogenases. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 184, 60-66.
- Kochhar, S., Hottinger, H., Chuard, N., Taylor, P.G., Atkinson, T., Scawen, M.D. y Nicholls, D.J. (1992) Cloning and overexpression of *Lactobacillus helveticus* D-lactate dehydrogenase gene in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 208, 799-805.
- Kohn, L.D. y Kaback, R.H. (1973). Mechanisms of Active Transport in Isolated Bacterial Membrane Vesicles. Purification and Properties of the Membrane-bound D-lactate Dehydrogenase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 248: 7012-7017.

Kotik, M. y Zuber, H. (1992) Evidence for temperature-dependent conformational changes in the L-lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochemistry*. 31, 7787-7795.

Kümmel, W.U. y Brinkmann, K. (1988). The Oxidation of exogenous NADH by mitochondria of *Euglena gracilis*. *Planta*. 176, 261-268

La Noue, K.F. y Schoolwerth, A.C. (1979). Metabolite transport in Mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 48, 871-922.

Ledoight, G., Calvayrac, R., Orcival-Lafont, A.M. y Pineau, B. (1972). *Planta*. 103, 254-262.

Leedale, G. F. (1978) Phylogenetic Criteria in Euglenoid Flagellates. *Biosystems*. 10, 183-187.

Lefort-Tran, M. (1975) *Colloq. Int. C.N.R.S.* 240, 297-308.

LéJohn, B.H. (1971). D(-)-Lactate Dehydrogenase in Fungi: Kinetics and Allosteric Inhibition by Guanosine Triphosphate.. *J. Biol. Chem.* 246 (7): 2116-2126.

Lloyd, D. (1974). "The Mitochondria of Microorganisms". Academic Press. London.

Lord, M.J. y Merret, J.M. (1971). The Intracellular Localization of Glycollate Oxidoreductase in *Euglena gracilis* *J. Biochem.* 124, 275-281.

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

Lynch, V.H. y Calvin, M. (1953). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 56, 890.

Malkoff, B.D. y Buetow, E.D. (1964). Ultrastructural Changes During Carbon Starvation in *Euglena gracilis*. *Exp. Cell. Res.* 35, 58-68.

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

Merret, M.J. (1987). In *Plant Mitochondria: Structural, Functional and Physiological Aspects*. Plenum. New York. 203-206.

Meyer, R. y Hildebrand, E.J. (1988). Photochemistry and Photobiology, B: Biology 2. 443-453.

Miyatake, K., Enamoto, T. y Kitaoka, S. (1984). Detection and Subcellular Distribution of Pyrophosphate: D-fructose 6-Phosphate Phosphotransferase (PFP) in *Euglena gracilis*. Agric. Biol. Chem. 48, 2857-2859.

Miyatake, K., Ito, T. y Kitaoka, S. (1984). Subcellular Location and Some Properties of Phosphoenol-pyruvate Carboxykinase (PEPCK) in *Euglena gracilis*. Agric. Biol. Chem. 48, 2139.

Miyatake, K., Washio, K., Yokota, A., Nakano, Y., y Kitaoka, S. (1986). Purification and Immunological Properties of NAD⁺-linked Malate Dehydrogenase Isozymes from *Euglena gracilis*. Agric. Biol. Chem. 50, 2651-2653.

Miyatake, K., y Kitaoka, S. (1981). NADH-Dependent Glutamate Synthase in *Euglena gracilis* Z. Agric. Biol. Chem. 45, 1727-1729.

Moller, I.M. y Lin, W. (1986). Annu. Rev. Plant. Physiol. 37, 309-334.

Moore, A. L. y Siedow, J.N. (1991) The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 1059, 121-140.

Moreno-Sánchez, R. y Raya, J.C. (1987). Preparation of Coupled Mitochondria from *Euglena* by Sonication. Plant Sci. 48. 151-157.

Moreno-Sánchez, R., Devars, S., López-Gómez, F., Uribe, A. y Corona, N. (1991). Distribution of control of oxidative phosphorylation in mitochondria oxidizing NAD-linked substrates. Biochim. Biophys. Acta. 1060, 284-292.

Mukai, K., Yoshida, M., Toyosaki, H., Yao, Y. Wakabayashi, S. y Matsubara, H. (1989) An atypical heme-binding structure of cytochrome c₁ of *Euglena gracilis* mitochondrial complex III. Eur. J. Biochem. 178, 649-656.

Müller, M. (1988). Energy metabolism of Protozoa without mitochondria. Ann. Rev. Microbiol. 42: 465-487.

Nakano, Y., Urade, Y., Urade, R. y Kitaoka, S. (1987). J. Biochem. 102, 1053-1063.

Nakashima, K. Pontremoli, S. y Horecker, L.B. (1969). Activation of Rabbit Liver Fructose Diphosphatase by Coenzyme A and Acyl Carrier Protein. Proc. Nat. Acad. Sci. 64: 947-951.

Navarro, M.L.G. (1995). Desarrollo de la Tolerancia a Metales Pesados por el Protista *Euglena gracilis*. Tesis Profesional, Facultad de Química. U.N.A.M. México.

Navarro, L., Torres-Marqués, M.E., González-Moreno, S., Devars, S., Hernández, R. y Moreno-Sánchez, R. (1997). Comparison of Physiological Changes in *Euglena gracilis* During Exposure to Heavy Metals of Heterotrophic and Autotrophic Cells. *Comp. Biochem. Physiol.* 116C (3): 265-272.

Nicholls, D.G. (1982). *Bioenergetics. An Introduction to the Chemiosmotic Theory.* Academic Press, London. 190.

Oda, Y., Miyatake, K., Nakano, Y., y Kitaoka, S. (1981). Subcellular Location and Some Properties of Isocitrate Dehydrogenase Isozymes in *Euglena gracilis*. *Agric. Biol. Chem.* 45, 2619-2621.

Oda, Y., Nakano, Y., y Kitaoka, S. (1982) *Arch. Microbiol.* 132, 22-25.

O'Farrell, H.P. (1975). High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of protein. *J. Biol.Chem.* 250(10): 4007-4021.

Ogata, M; Arihara, K y Yagi, T. (1981). D-Lactate Dehydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris*. *J. Biochem.* 89: 1423-1431.

Ondarza, N.R. (1989). Enzyme Regulation by Biological Disulfides. *Bioscience Reports.* 9:5, 593-604.

Ono, K; Kawanaka, Y; Izumi, Y; Inui, H; Miyatake, K; Kitaoka, S. y Nakano, Y. (1995). Mitochondrial Alcohol Dehydrogenase from Ethanol-Grown *Euglena gracilis*. *J. Biochem.* 117, 1178-1182.

Osafune, T., Tukada, S., Sumida, S., Ehara, T y Hase, E. (1987). J. Biggins, ed. Vol.4, pp.9. 609-612. Martinus Nijhoff Dordrecht.

Packer, L. (1967). Energy-linked low amplitude mitochondrial swelling. *Methods Enzymol.* 10, 685-689.

Padan, E., Zilberstein, D. y Rottenberg, H. (1976). The Proton Electrochemical Gradient in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 63, 533-541.

Padovan, C.A., Dry, B.I y Wiskich, T.J. (1989). An Analysis of the Control of Phosphorylation-Coupled Respiration in Isolated Plant Mitochondria. *Plant. Physiol.* 90, 928-933.

Palmer, J.D. y Delwiche, C.F. (1996). Second-hand chloroplasts and the case of the disappearing nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 7432-7435.

Parsonage, D., Greenfield, A.J., y Ferguson, S.J. (1986). *Arch. Microbiol.* 145, 191-196

Peak, J.M., Peak, G.J. y Ting, P.I. (1972). *Biochimica et Biophysica Acta.* 284. 1.

Pesce, A., Rondy, T., Stolzenbach, F., Castillo, F. y Kaplan, N. (1967) The comparative enzymology of lactic dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* 242, 2151-2167.

Poole, K.R. (1983). Bacterial Cytochrome Oxidases. A Structurally and Functionally Diverse Group of Electron-Transfer Proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 726: 205-243.

Porter, N., Drozd, W.J. y Linton, D.J. (1983). The Effects of Cyanide on the Growth and Respiration of *Enterobacter aerogenes* in Continuous Culture. *J. Gen. Microbiol.* 129, 7-16.

Price, C.A. (1961). A Zinc-Dependent Lactate Dehydrogenase in *Euglena gracilis*. *Biochem. J.* 82: 61-66.

Pudek, R.M. y Bragg, D.P. (1975). Reaction of Cyanide with Cytochrome d in Respiratory Particles from Exponential Phase *Escherichia coli*. *FEBS Letts.* 50 (2): 111-113.

Puustinen, A; Finel, M; Virkki, M. y Wikstrom, M. (1989). Cytochrome o (bo) is a proton pump in *Paracoccus denitrificans* and *Escherichia coli*. *FEBS. LETT.* 249:2, 163-167.

Raison, J.K. y Smillie, R.M. (1969). Respiratory cytochromes of *Euglena gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 180, 500-508.

Raitio, M. y Wikstrom, M. (1994). An Alternative Cytochrome oxidase of *Paracoccus denitrificans* Functions as a Proton Pump. *Biochem. et Biophys. Acta.* 1186: 100-106.

Rasmusson, A.G., Möller, I.M., Palmer, J.M. (1990). *FEBS Lett.* 259: 311-314.

Reyes, P.A. (1997). Estudio de los componente de la Fosforilación Oxidativa en Mitocondrias del Alga Incolora *Polytomella* spp. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias U.N.A.M. México.

Rich, R.P., Wiegand, K.N., Blum, H., Moore, L.A., y Booner, D.W. (1978). *Biochimica et Biophysica Acta*. 525. 325.

Rihter, G. (1978). "Plant Metabolism". Thieme, Stuttgart.

Rottenberg, H. (1984). Membrane Potential and Surface Potential in Mitochondria: Uptake and Binding of Lipophilic Cations. *J. Memb. Biol.* 81, 127-138.

Rustin, R., Alin, M.F. y Lance, C. (1986). Discrimination between Duroquinol Oxidase Activity and the Terminal Oxidation step of the Cyanide-Resistant Electron Transport Pathway of Plant Mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135, 677-682.

Rutner, A.C. Y Price, C.A. (1964). Localization of a sulphate-activating system within *Euglena* mitochondria. *Int. Congr. Biochem.*, 6th, New York. 32, 331. (Abstr).

Saidha, T., Stern, A.I., Lee, D.H. y Schiff, J.A. (1985) *J. Biochem.* 232, 357-365.

Santos, E., Kung, H.F., Young, I.G. y Kaback, R. (1982). *In vitro* synthesis of the membrane-bound D-lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 21: 2085-2091.

Sargent, D.F. y Taylor, C.P.S. (1972). Terminal Oxidases of *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant Physiol.* 49: 775-778.

Schiff, J.A., Lyman, H. y Russell, G.K. (1971). Isolation of Mutants from *Euglena gracilis*. *Methods. Enzymol.* 23, 143-162.

Schoenlein, P.V., Roa, B.B. y Winkler, M.E. (1989). *J. Bacteriol.* 171: 6084-6092.

Schonbaum, G.R., Bonner, W.D., Storey, B.T. y Barh, J.T. (1971). Specific inhibition of the cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hidroxamic acids. *Plant. Physiol.* 47, 124-128.

Seeger, W.J. y Carell, E.F. (1991). *Science*. 79, 143-148.

Sharpless, K.T. y Butow, A.R. (1970a). Phosphorylation sites, cytochrome complement and alternate pathways of coupled electron transport in *Euglena gracilis* mitochondria. *J. Biol. Chem.* 245(1). 50-57.

Sharpless, K.T. y Butow, A.R. (1970b). An inducible alternate terminal oxidase in *Euglena gracilis* mitochondria. *J. Biol. Chem.* 245(1). 58-70

- Sharpless, T.K. y Butow, R.A. (1970). Phosphorylation sites, Cytochrome complementand Alternate Pathways of Coupled Electron Transport in *Euglena gracilis* Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 245: 50-57.
- Shibata, H., Gardiner, W.E. y Schwartzbach, S.D. (1985). *J. Bacteriol.* 164, 762.
- Shigeoka, S. y Nakano, Y. (1991). Characterization and molecular properties of 2-oxoglutarate decarboxylase from *Euglena gracilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 288, 22-28.
- Shigeoka, S., Hanaoka, T., Kishi, N. y Nakano, Y. (1992). Effect of L-glutamate on 2-oxoglutarate decarboxylase in *Euglena gracilis*. *J. Biochem.* 282, 319-323.
- Shigeoka, S., Onishi, T., Maeda, K., Nakano, Y. y Kitaoka, S. (1986). Occurrence of thiamin pyrophosphate-dependent 2-oxoglutarate decarboxylase in mitochondria of *Euglena gracilis*. *FEBS. Lett.* 195(1,2), 43-47.
- Schoenlein, P.V., Roa, B.B. y Winkler, M.E. (1989). *J. Bacteriol.* 171: 6084-6092.
- Short, S.A. y Kaback, H. R. (1975) Localization of D-lactate dehydrogenase in native and reconstituted *Escherichia coli* membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 250, 4291-4296.
- Siedow, J.N. y Girvin, M.E. (1980). Alternative Respiratory Pathway. Its Role in Seed Respiration and its Inhibition by Propil Gallate. *Plant Physiol.* 65, 669-674.
- Siedow, J.N. y Moore, A.L. (1993). A Kinetic Model for the Regulation of Electron Transport through the Cyanide-Resistant Pathway in Plant Mitochondria. *B.B.A.* 1141: 165-174.
- Slack, C.R., Hatch, M.D. y Goodschild, D.J. (1969). *J. Biochem.* 114, 489-498.
- Smith, E.L., Austen, B.M., Blumenthal, K.M. y Nyc, J.F. (1975) Academic Press. New York. 2, 293-367
- Sogin, M.L., Gunderson, J.H., Elwood, H.J., Alonson, R.A. y Peattie, D.A. (1989). Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science.* 243: 75-77.
- Summer, J.R. y Blum, J.J. (1965). *Exp. Cell. Res.* 39, 504-527.
- Sun, Z. Dowd, S.R., Felix, C., Hyde, J.S. y Ho, C. (1995) Stopped-flow kinetic and biophysical studies of membrane-associated D-lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1252, 269-277.

Susuki, S. y Tamura, T. (1979). Proc. Annu. Meet. Agric. Chem. Soc. Japan. 220.

Taguchi, H. y Ohta, T. (1991). D-Lactate dehydrogenase is a member of the D-isomer-specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family: Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the D-lactate dehydrogenase gene of *Lactobacillus*. J. Biol. Chem. 266, 12588-12594.

Tamponnet, C., Barbotin, J-N. y Calvayrac, R. (1989). Appl. Microbiol. Biotechnol. 32. 211.

Taylor, S. y Oxley S. (1976) Homologies in the active site regions of lactate dehydrogenases. Arch. Biochem. Biophys. 175, 373-383.

Tessier, L.H., Keller, M., Chan, R.L., Fournier, R., Weil, J.H. y Imbault, P. (1991). Short leader sequences may be transferred from small RNAs to pre-mature mRNAs by trans-splicing in *Euglena*. EMBO. J. 10: 2621-2625.

Tessier, L.H., van der Speck, H. y Gualberto, J.M. (1997) The *cox1* gene from *Euglena gracilis*: a protist mitochondrial gene without introns and genetic code modifications. Curr. Genet. 31, 208-213.

Ting, I.R. y Rocha, V. (1971). NADP-Specific Malate Dehydrogenase of Green Spinach Leaf Tissue. Arch. Biochem. Biophys. 147, 156-164.

Tokunaga, M., Nakano, Y. y Kitaoka, S. (1976). Preparation of Physiologically Intact Mitochondria from *Euglena*. Agric. Biol. Chem. 40(7): 1439-1440

Tokunaga, M., Nakano, Y. y Kitaoka, S. (1976). Separation and Properties of the NAD-Linked and NADP-Linked Isozymes of Succinic Semialdehyde Dehydrogenase in *Euglena gracilis* z. Biochim. Biophys. Acta. 429. 55.

Tokunaga, M., Nakano, Y. y Kitaoka, S. (1979). Subcellular Localization of the GABA-Shunt Enzymes in *Euglena gracilis* Strain Z. J. Protozool. 26(3) : 471-473.

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. y Moreno-Sánchez, R. (1992). Energy-dependent reactions supported by several substrates in coupled *Euglena gracilis* mitochondria. Plant Science. 86: 21-32

Van den Bergen, M.W.C; Krab, K; Wagner, M.A. y Van der Plas, W.H.L. (1991). Valinomycin: a very effective inhibitor of the cyanide-insensitive alternative pathway in plant mitochondria. *Biochim et Biophys Acta*. 1058: 203-208.

Van Spanning, M.J.R., de Boer, N.P.A., Reijnders, M.N.W., De Gier L.W.J., Delorme, O.C., Stouthamer, H.A., Westerhoff, V.H., Harms, N. y Van der Oost, J. (1995). Regulation of Oxidative Phosphorylation: The Flexible Respiratory Network of *Paracoccus denitrificans*. *J. Bioenerg. Biomemb.* 27 (5): 499-512.

Von Jagow, G. y Link, T.A. (1986). Use of specific inhibitors on the mitochondrial bc₁ complex. *Methods Enzymol.* 126, 253-271.

Walker, J.M. (1984) Gradient SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods in Molecular Biology Vol. I. Proteins*. John M. Walker. Human Press. Clifton, New Jersey.

Watanabe, F., Nakano, Y. y Kitaoka, S. (1985). *Agric. Biol. Chem.* 49(7) 2203-2204.

Watanabe, K., Nakano, Y. y Kitaoka, S. (1987). *Arch. Microbiol.* 149, 30-35.

Webster, D.A. y Hackett, D.P. (1965). Respiratory chain of colorless algae. *Chlorophyta and Euglenophyta. Plant Physiol.* 41: 1091-1100.

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

White, C.D. y Sinclair, R.P. (1971). Branched Electron-Transport Systems in Bacteria. *Microbial. Physiol.* 5: 173-211.

Whittaker, A.P. y Danks, M.S. (1982). Mitocondria: estructura, función y formación. *CECSA. México D.F.* 87-89.

Whittaker, H.R. y Margulis, L. (1978). "Protist Classification and the Kingdoms of Organisms". *BioSistemas.* 10. 3.

Willard, H.H., Merrit, JR. L.L. y Dean, A.J. (1975). *Métodos Instrumentales de Análisis. Comp. Ed. Cont.* 463-494, 829-866

Williamson, J.R. y Corkey, B.E. (1969). Assays of intermediates of the citric acid cycle and related compounds by fluorometric enzyme methods. *Methods Enzymol.* 13, 434-513.

Willison, C.J. y John, P. (1979). Mutants of *Paracoccus denitrificans* Deficient in c-type Cytochromes. 115: 443-450.

- Wilson, B.W. y Danforth, W.F. (1958). J. Gen. Microbiol. 18, 535-542.
- Willison, C.J. y John, P. (1979). Mutants of *Paracoccus denitrificans* Deficient in c-type Cytochromes. J. Gen. Microbiol. 115: 443-450.
- Wolper, J.S. y Ernest-Fonberg, M.L. (1975). A Multienzyme Complex for CO₂ Fixation. Biochemistry. 14 (6): 1095-1103.
- Wyckoff, A.H; Chow, J; Whitehead, R.T. y Cotta, A.M. (1997). Cloning, Sequence, and Expression of the L-(+) Lactate Dehydrogenase of *Streptococcus bovis*. Current. Microbiol. 37: 367-373.
- Yamauti, J., Yoshimura, S., Takagahara, I., Fujii, K., Tai, A., Yamashita, J. y Horio, T. (1981). J. Biochem. 90, 941-955.
- Yasuhira, S. y Simpson, L. (1997) Phylogenetic affinity of mitochondria of *Euglena gracilis* and kinetoplastids using cytochrome oxidase I and hsp60. J. Mol. Evol. 44, 341-347.
- Yokota, A., Haga, S., y Kitaoka, S. (1985) J. Biochem. 227, 211-216.
- Yokota, A., Hosotani, K. y Kitaoka, S. (1982). Mechanism of Metabolic Regulation in Photoassimilation of Propionate in *Euglena gracilis* Z. Arch. Biochem. Biophys. 213(2). 530-537
- Young, G.I, Jaworowski, A. y Poulis, M. (1982). Cloning of the Gene for the Respiratory D-Lactate Dehydrogenase of *Escherichia coli*. Biochemistry. 21, 2092-2095.
- 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.
- Zboril, P. y Wernerova, V. (1996). The Isolation and Some Properties of the Membrane-bound Lactate Dehydrogenase of *Paracoccus denitrificans*. Biochem. Mol. Biol. Int. 39(3). 595-605.
- Zhen-Yu-Sun, Hoai-Thu N Truong; Pratt, E.A; Sutherland, C.D; Kulig, E.C; Homer, J.R; Groetsch, M.S; Hsue, Y. P. y Chien Ho. (1993). A 19F-NRM study of the membrane-binding region of D-lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. Protein Science. 2: 1938-1947.

Zhen-Yu-Sun, Dowd, R.S; Felix, C; Hyde, S.J. y Chien Ho. (1995). Stopped-flow kinetic and biophysical studies of membrane-associated D-lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *B.B.A.* 1252: 269-277.

Zhen-Yu-Sun; Pratt, A; Simplaceanu, V. y Chien Ho. (1996). A 19F-NMR Study of the Equilibrium Unfolding of Membrane-Associated D-Lactate Dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 35: 16502-16509.

Zubay, G. (1988) *Biochemistry.* 2nd edition. MacMillan New York.