

00551
2



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

Facultad de Química
Programa de Maestría y Doctorado
en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS
COMPONENTES RESISTENTES A CIANURO Y
ANTIMICINA DE LA CADENA RESPIRATORIA DE
Euglena gracilis

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS *Bioquímica*
P R E S E N T A :

Q.F.B. NORMA ANGÉLICA CASTRO GUERRERO



MÉXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2002



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Dra. Irma Bernal Lugo
VOCAL	Dr. Edgardo Escamilla Marván
SECRETARIO	Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez
SUPLENTE	Dra. Marina Gavilanes Ruiz
SUPLENTE	Dr. Federico Martínez Montes

Esta tesis se desarrolló en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

ASESOR DEL TEMA

Dr. Rafael Moreno Sánchez

SUSTENTANTE

Q.F.B. Norma Angélica Castro Guerrero

RESUMEN

Se ha propuesto un modelo de cadena respiratoria en *Euglena gracilis*, en el cual existen dos componentes respiratorios alternos, uno resistente a antimicina que cataliza una reacción similar a la del bc_1 y otro resistente a cianuro (quinol oxidasa alterna) que reduce al oxígeno directamente a partir de la poza de quinonas. Los datos sugieren que el componente resistente a antimicina (*by-pass*) tiene una especificidad y/o afinidad diferente a las quinonas con respecto al bc_1 . La quinol oxidasa alterna muestra una sensibilidad hacia compuestos que inhiben a las reportadas en plantas, sugiriendo que éstas y la encontrada en *Euglena* son de la misma naturaleza. La actividad de citocromo *c* reductasa se encontró disminuida en mitocondrias de células cultivadas en presencia de inhibidores respiratorios (cepa antimicina y cepa cianuro), aunque en la cepa antimicina se detectó un aumento relativo de la actividad de *by-pass* con respecto a la del bc_1 . La actividad de citocromo *c* reductasa, en membranas libres de quinonas endógenas, fue menos sensible a inhibidores utilizando quinonas exógenas, debido posiblemente al tratamiento de congelación, liofilización y extracción con solventes al que fueron expuestas. Además, en estas membranas el cianuro inhibió por completo la respiración, indicando inactivación o degradación de la quinol oxidasa alterna. Por cromatografía líquida de alta presión de extractos quinólicos provenientes de estas cepas, se encontraron diferencias en el contenido de ubiquinona-9 y rodoquinona-9, identificadas con base en tiempos de retención de quinonas conocidas y por espectros de absorción de muestras obtenidas por cromatografía en capa fina. La relación RQ-9/UQ-9 aumentó significativamente en las cepas antimicina y cianuro, sugiriendo que la RQ-9 está presente preferentemente durante la transferencia de electrones a través de los componentes alternos, principalmente cuando el *by-pass* está involucrado. Además hay un aumento en el contenido total de quinonas y lípidos en la cepa cianuro.

El reconocimiento de una banda proteica en inmunoréplicas utilizando un anticuerpo dirigido contra la oxidasa alterna de *Chlamydomonas* indica que la actividad resistente a cianuro en *Euglena* se debe a una oxidasa alterna similar a la reportada para plantas, algas y otros microorganismos.

ÍNDICE

	pág.
INTRODUCCIÓN.....	1
Cadenas respiratorias alternas.....	1
AOX tipo planta.....	1
Cadenas respiratorias en levaduras.....	7
Cadenas respiratorias de protistas.....	8
Cadena respiratoria en <i>Euglena gracilis</i>	10
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVOS.....	13
MÉTODOS.....	14
RESULTADOS.....	20
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES.....	47
PERSPECTIVAS.....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49

INTRODUCCIÓN

CADENAS RESPIRATORIAS ALTERNAS

Las plantas, bacterias y otros organismos como algas, hongos y protistas poseen una cadena respiratoria compleja donde, además de las enzimas respiratorias como las descritas en mitocondrias de mamíferos, existen componentes resistentes a inhibidores específicos de los complejos respiratorios clásicos que catalizan reacciones alternas (Fig. 1).

La clasificación de estas enzimas se ha realizado con base en sus propiedades fosforilativas o no fosforilativas y su sensibilidad a ciertos compuestos como ácidos hidroxámicos, así como en las regiones de aminoácidos altamente conservadas que se conocen principalmente en plantas.

El uso de inhibidores específicos para los componentes alternos y clásicos, ha permitido el estudio de las actividades respiratorias relativas de cada una de estas vías en diferentes condiciones (Stewart *et al.*, 1990; Wagner, 1995; Millenaar *et al.* 2001).

OXIDASA ALTERNA (AOX) EN PLANTA

Desde 1929 se encontró la presencia de una actividad respiratoria resistente a cianuro en células o tejidos de plantas, relacionada con una disminución en el rendimiento energético de la célula y un aumento en la producción de calor.

Función

La reacción catalizada por la AOX involucra la oxidación del quinol para reducir al oxígeno directamente sin la translocación de protones, liberando la energía como calor (Siedow *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 1991). Se ha relacionado la actividad de esta enzima con procesos de termogénesis y polinización (Meeuse *et al.*, 1975) en la familia *Araceae* en la que el tejido puede alcanzar hasta 15 °C más que la

temperatura ambiente permitiendo la volatilización de compuestos olorosos que atraen a los insectos.

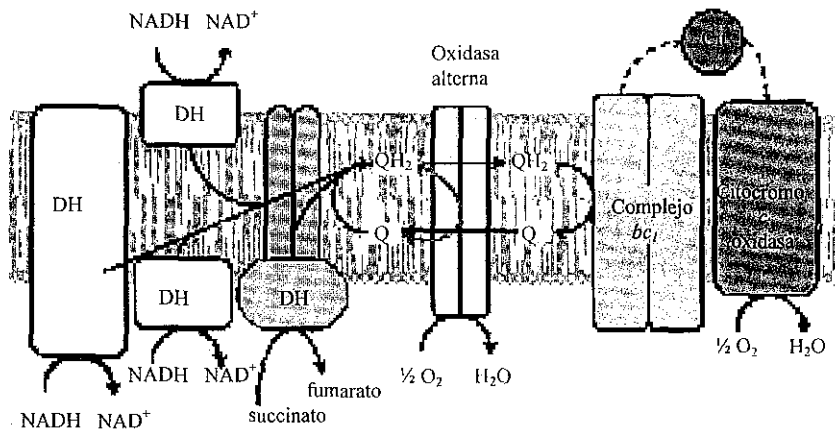


Fig. 1 Cadena respiratoria de plantas. DH: deshidrogenasa, QH₂: quinol, Q: quinona.

La ubicuidad de esta enzima en plantas y otros organismos no termogénicos sugiere que estas enzimas poseen otras funciones en procesos de detoxificación y estrés oxidativo (estrés osmótico, refrigeración, congelación). En estas condiciones se induce la actividad de la AOX (Purvis *et al.*, 1993; Ribas Carbo *et al.* 2000), y en consecuencia se mantiene un flujo electrónico que permite la formación de intermediarios producidos durante el ciclo de Krebs (Wagner *et al.*, 1997) y el bombeo de protones por el sitio I (NADH deshidrogenasa).

Uno de los grandes problemas de los organismos aeróbicos es que al saturarse o bloquear la vía clásica hay producción de especies reactivas de oxígeno principalmente en el sitio III. La vía alterna, que es inducida a bajas temperaturas

en algunas plantas, participa en estos procesos, reduciendo el nivel de superóxido generado en la mitocondria, disminuyendo así el daño por estrés oxidativo (Stewart *et al.*, 1990, Wagner, 1995, Maxwell *et al.*, 1999).

Se propone que la AOX participa en este proceso para mantener el nivel redox del ubiquinol. Al tener dos sitios de unión para el oxígeno y requerir la transferencia de 4 electrones por átomo de oxígeno (Purvis *et al.*, 1993; Popov *et al.*, 1997), la AOX puede funcionar eficientemente para drenar equivalentes reductores.

Se ha sugerido que la vía alterna funciona solo cuando la carga de energía celular es alta o cuando se pierde el balance entre el suministro de carbohidratos y la necesidad de ellos para el crecimiento estructural, la producción de energía, el almacenamiento y la osmoregulación (Elthon *et al.*, 1989).

Una señal mas directa de activación de la AOX, ha sido el nivel de reducción de la poza de quinonas, ya que se ha encontrado una relación entre la actividad de oxidasa alterna y el nivel de reducción, cuando éste es mayor del 30% (Wagner *et al.*, 1997). Sin embargo, estudios recientes (Millenaar *et al.*, 2001) han mostrado que no hay una relación directa en estos parámetros, y sí una relación conjugada de varios factores con respecto a esta actividad.

Características generales y estructura

En 1978 se logró la solubilización de una oxidasa en *Arum maculatum* a la que se le atribuyó esta actividad respiratoria alterna y a la que se denominó oxidasa alterna (AOX). Sin embargo, su inestabilidad impidió realizar un estudio mas extenso sobre sus propiedades cinéticas y estructurales (Sulse *et al.*, 1998). Por pruebas de inmunorélicas se han encontrado entidades proteicas de la AOX de 32, 34 y 36 kDa en *Arum maculatum* (Sulse *et al.*, 1998). En 1986 se produjo un anticuerpo monoclonal dirigido contra las formas inducibles de proteína en la planta *Sauromatum guttatum*, responsables de la actividad resistente a cianuro (Elthon *et al.*, 1989).

La cantidad de esta enzima varía entre especies y tejidos, aunque en general se encuentra que la cantidad y la actividad son mayores en tejidos verdes.

Con este anticuerpo se identificaron a numerosas AOX en una gran variedad de plantas (Day *et al.*, 1995; Siedow *et al.*, 1995; Siedow *et al.* 2000), hongos (Lambowitz *et al.*, 1989), tripanosomas (Clarkson *et al.*, 1989) y amibas (Jarmuszkiewicz *et al.*, 1997).

La secuencia de aminoácidos se ha deducido del cDNA la cual posee un péptido señal en la región N- terminal, que se pierde una vez que la proteína ha sido importada a la mitocondria. La masa molecular de la proteína madura en *Suromatum guttatum* ha sido calculada en 32.2 kDa y contiene 283 aminoácidos.

Se ha aislado un cDNA y dos diferentes genes que codifican a la AOX, conduciendo a una secuencia (Rhoads *et al.*, 1991) y a un modelaje estructural (Day *et al.*, 1995; Siedow *et al.*, 1995; Moore, *et al.*, 1995, Siedow *et al.*, 2000). La enzima está conformada por un centro de reacción con un núcleo bi-férrico y diferentes hélices que por sus características parecen formar una proteína transmembranal (Siedow *et al.*, 1995; Andersson *et al.*, 1999)

Por análisis de hidropatía se han encontrado características conservadas que indican dos regiones hidrofóbicas con carácter de α -hélices y aminoácidos altamente conservados que se proponen forman parte de hélices que atraviesan la membrana. Estas regiones están separadas por aproximadamente 40 aminoácidos incluyendo una hélice anfipática probablemente expuesta al espacio intermembranal, y dos regiones hidrofílicas de aproximadamente 100 aminoácidos en ambos extremos terminales con pequeñas regiones altamente conservadas en el extremo C- terminal. Ha surgido otra propuesta en donde la enzima no es transmembranal; sin embargo, en este modelo, la región sugerida para el espacio intermembranal está del mismo lado que los centros de reacción y los extremos terminales, ya que al parecer esta secuencia es importante para la catálisis (Moore *et al.*, 2000) (Fig. 2). Se ha encontrado que las regiones no conservadas corresponden principalmente a partes del gen que codifican para péptidos de dimerización y sitios de regulación (Berthold *et al.*, 1999).

En mitocondrias de *Acanthamoeba castelanii* se encuentra una reacción cruzada con el anticuerpo monoclonal dirigido contra la AOX de *Sauromatum gutatum*.

Se revelaron 3 formas monoméricas (38, 35 y 32 kDa), además de una forma dimérica de 65 kDa aunque en mucho menor cantidad, indicando que en esta amiba el monómero es la forma activa (Jarmuszkiewics *et al.*, 1997).

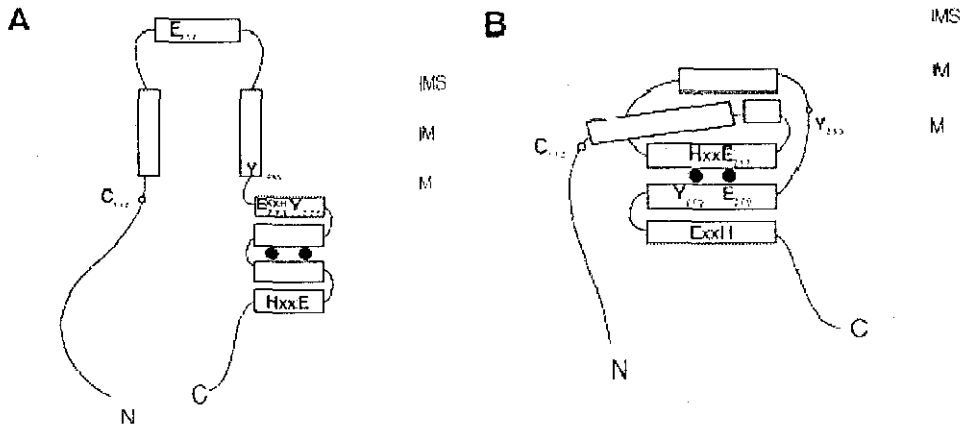


Fig. 2 Modelos propuestos de la AOX de plantas; modelo A: proteína transmembranal, modelo B: proteína no transmembranal.

Las AOX son particularmente sensibles a algunos compuestos como ácidos hidroxámicos (Schonbaum *et al.*, 1971), disulfiram (Grover *et al.*, 1978), n-propil galato (Siedow *et al.*, 1980) y difenilamina (Baker *et al.*, 1963). De esta manera la respiración resistente a cianuro y sensible a estos compuestos es útil en el diagnóstico de la actividad de oxidasa alterna tipo planta.

Sitio activo

Se ha sugerido que un metal de transición forma parte del sitio catalítico de la enzima. Al parecer, es el hierro el metal involucrado debido a experimentos que han mostrado en *Hansenula anomala* que la ausencia de hierro da lugar a una enzima de 36 kDa inactiva, la cual recupera su actividad una vez que se adiciona hierro al medio de cultivo (Minagawa *et al.*, 1990). Además, se han encontrado dos copias de un motivo conservado que une hierro, por lo que se ha propuesto una similitud de esta enzima con las metano monooxigenasas (Wagner *et al.*, 1998).

Regulación

El incremento en la cantidad de la proteína de 35 kDa está acompañado de un incremento en la actividad resistente a cianuro en *Acanthamoeba castellanii* (Jarmuszkiewics *et al.*, 1997). También se ha observado esta relación en *Petunia híbrida*, donde al parecer, el peróxido es un segundo mensajero que induce la expresión genética de la AOX (Wagner 1995).

El estrés y la inhibición de la vía de los citocromos en plantas resultan en un incremento en la cantidad y actividad de AOX, (Stewart *et al.*, 1990) y también se ha encontrado un aumento en el transcrito del gen AOX1 que codifica a la especie activa, aunque se ha encontrado en algunos tejidos y organismos que en ausencia de algún estrés, su actividad es muy alta (Ito *et al.*, 1997).

Se han encontrado residuos de aminoácidos importantes para la activación de la enzima y que participan en la dimerización, la cual parece ser la forma activa de la enzima en plantas (Ito *et al.*, 1997; Jarmuszkiewics *et al.*, 1997)

La AOX en plantas es una enzima dimérica, donde el estado de reducción y oxidación de la cisteína 78, regula su actividad (Umbach *et al.*, 1993; Rhoads *et al.*, 1998). Otro mecanismo de activación involucra a los α -cetoácidos, principalmente piruvato (Day *et al.*, 1995) que activan a la AOX formando un tiohemiacetal (Umbach *et al.*, 1996) cuando la cisteína está reducida (Ribas Carbo *et al.*, 1997).

CADENAS RESPIRATORIAS EN LEVADURAS

En levaduras también se han encontrado componentes similares a las oxidasas alternas presentes en plantas. Particularmente, *Candida parasilopsis* exhibe una cadena respiratoria compleja en la que participa una cadena clásica y otra alterna insensible a antimicina pero inhibible por amital, SHAM o mixotiazol a concentraciones más altas de las utilizadas para inhibir enzimas en otros organismos (Guerin *et al.*, 1994).

Algunos de los componentes de la cadena alterna en esta levadura han sido caracterizados: dos deshidrogenasas específicas para NADH y NADPH, dos citocromos *c* con potenciales redox diferentes (180 y 280 mV), una oxidasa alterna con un máximo de absorbencia a 590 nm y la presencia de bajas cantidades de una quinona diferente a la ubiquinona 9, que no ha sido completamente identificada, presente en esta levadura. (Guerin *et al.*, 1994).

Titulaciones de la oxidación de NADH con diferentes concentraciones de mixotiazol revelaron dos componentes de unión para quinonas, sugiriendo que hay dos proteínas involucradas en la unión de quinonas o 2 sitios con diferente afinidad en la misma proteína. (Guerin *et al.*, 1994).

En el resto de microorganismos en los que se ha reportado la presencia de estas vías alternas se ha encontrado que ramifican a nivel de la poza de quinonas. En *Candida parasilopsis* existe una regulación diferente del flujo electrónico entre las dos vías; se propone que en este organismo la actividad de la vía alterna no depende solo del estado redox de la poza de quinonas, sino del tipo de quinona (Guerin *et al.*, 1994).

Se ha logrado expresar la AOX de planta en levadura. Albury *et al.* clonaron el gen de la oxidasa alterna de *Sauromatum guttatum* en *Schizosaccharomyces pombe*, logrando identificar la presencia de actividad respiratoria resistente a cianuro y sensible a octil-galato. Esta actividad no fue estimulada en presencia de piruvato, el cual activa la especie dimérica en plantas, sugiriendo que la expresión de un polipéptido es suficiente para expresar actividad alterna, es decir, la proteína en su estado monomérico puede ser activa (Albury *et al.*, 1996).

Se ha sugerido que otro citocromo tipo *b* participa en la cadena respiratoria, reduciendo a cualquiera de los citocromos *c* presentes en *Candida* (A y B), sin bombear protones, aunque no existen datos que indiquen una afinidad o especificidad diferente entre éste y el complejo III (Guerin *et al.*, 1994) (Fig. 3). Este componente fue evidenciado al observar que el porcentaje de citocromo *b* reducido con antimicina incrementa al adicionar SHAM sugiriendo la presencia de un citocromo de este tipo en la vía alterna.

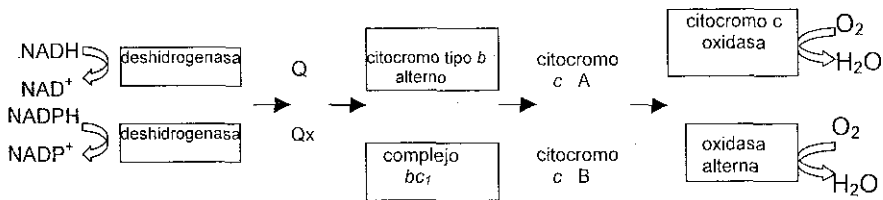


Fig. 3 Cadena respiratoria alterna y clásica propuesta para *Candida parasilopsis*. Q: quinona, Qx: quinona X.

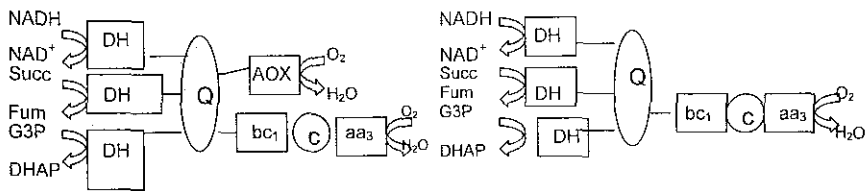
También se han reportado oxidasas alternas tipo planta en hongos filamentosos patógenos (Joseph- Horne *et al.*, 1998; Affourtit *et al.*, 2000)

CADENAS RESPIRATORIAS DE PROTISTAS

Estos organismos poseen generalmente cadenas respiratorias complejas que poseen una quinol oxidasa alterna, similar a la reportada para plantas, aunque con características particulares como la activación por nucleósidos monofosfatados y evidencia de la participación de otra enzima alterna, además de una fumarato reductasa (Covián, 2000) (Fig. 4).

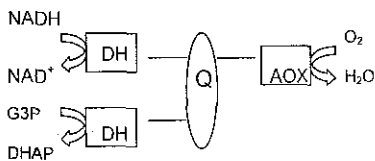
Los tripanosomátidos poseen un metabolismo en el cual durante la adición de CO₂, los productos finales como piruvato, succinato y acetato, son excretados. Existen diferencias en los productos finales excretados, en diferentes estadios y en diferentes especies. En la presencia de oxígeno, todos poseen un metabolismo en el cual el NADH es oxidado en la cadena respiratoria.

Cuando están en el torrente sanguíneo, *Phytomonas sp.* y *Trypanosoma brucei* oxidan al NADH con una ubiquinol-oxígeno oxidoreductasa sensible a SHAM. Recientemente se ha mostrado que esta oxidasa alternativa es homóloga a las oxidasas alternativas tipo planta, ya que se ha encontrado un gen que codifica una oxidasa alterna (Van Hellemond *et al.*, 1998) cuya estructura primaria es similar a la presente en muchas plantas (Siedow *et al.*, 1995), en *Neurospora crassa* y en *Hansenula anomala* (Day *et al.*, 1995).

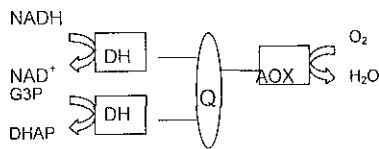


Trypanosoma brucei (forma procíclica)

Leishmania spp. (promastigotes)



Trypanosoma brucei (trypomastigotes)



Phytomonas sp. (promastigotes)

Fig. 4 Cadenas respiratorias en protistas. G3P: glucosa 3- fosfato, DHAP: dihidroxiacetona fosfato, DH: deshidrogenasa, Q: quinona, AOX: oxidasa alterna, aa₃: citocromo c oxidasa.

CADENA RESPIRATORIA EN *Euglena gracilis*

En la cadena respiratoria de *Euglena gracilis* existe una NADH-ubiquinona oxidoreductasa sensible a rotenona además de una NADH deshidrogenasa insensible a rotenona que no transloca protones. También se encontró oxidación de succinato, sugiriendo un sitio II, similar al descrito para cadenas respiratorias de mamíferos (Buetow, 1989). Asimismo, posee un complejo III atípico sensible a antimicina y resistente a mixotiazol (Fig. 5).

La citocromo *c* oxidasa de *Euglena* (Buetow *et al.*, 1965, Sharpless *et al.*, 1970) requiere ferrocitocromo *c*-₅₅₈ específicamente como donador natural de electrones. Esta enzima, en *Euglena*, contiene los citocromos *a* y *a*₃, como la de mamíferos y tiene una *K*_m por oxígeno de 0.05 μM (Buetow, 1989). Adicionalmente, las mitocondrias de *Euglena* tienen la capacidad de oxidar D- y L- lactato por una D- y L- lactato deshidrogenasa independiente de piridín nucleótidos (Jasso Chávez *et al.*, 2001).

La oxidación de lactato está acoplada a dos sitios de conservación de energía (Sharpless *et al.*, 1979), 50 a 90% de la respiración es resistente a antimicina, por lo que se propone que la transferencia de electrones con este sustrato procede en mayor medida por una ruta alternativa que salta al sitio III y que ha sido asociado a un citocromo tipo *b* (Buetow, 1989).

Moreno-Sánchez *et al.* (2000) han reportado que la respiración y la actividad de citocromo *c* reductasa es 45% resistente a antimicina cuando se usa L- lactato como sustrato y es sensible a mixotiazol.

También posee una respiración resistente a cianuro y antimicina, la cual puede ser inducida en cultivos con etanol o medios de succinato adicionados con antimicina (Sharpless *et al.*, 1970, Buetow, 1989) y que no está asociada a la producción de H₂O₂ y es estimulada con AMP (Buetow, 1989) como en las AOX de ciliados (Doussiere *et al.*, 1984) y levaduras (Vanderleyden *et al.*, 1980).

Buetow obtuvo resultados donde la respiración insensible a cianuro debida a la oxidación de succinato no está asociada a la fosforilación oxidativa, proponiendo

la existencia de una citocromo oxidasa nueva asociada a la cadena. La Km de esta enzima por oxígeno (3.7 μM) fue mayor que la del sitio IV (0.5 μM) (Buetow, 1989).

La mitocondria de *Euglena gracilis* posee ubiquinona-9 y rodoquinona-9 (Fig. 6) (Powls *et al.*, 1966), esta última es otra benzoquinona que forma parte del sistema de fumarato reductasa en algunos organismos eucariontes cuando crecen en anaerobiosis. La concentración de ambos compuestos en presencia de oxígeno son similares (Powls *et al.*, 1966, Threlfall *et al.*, 1972). Además, el tratamiento de mitocondrias aisladas con solventes orgánicos o la exposición a la luz UV ocasiona la pérdida de estos compuestos, disminuyendo la respiración y la actividad de citocromo *c* reductasa. La actividad reconstituida con decilbenzoquinona, un análogo sintético de la ubiquinona, es sensible a antimicina (Moreno *et al.*, 2000). Esto sugiere que la afinidad del complejo III y de la quinol citocromo *c* oxidoreductasa insensible a antimicina por el ubiquinol y /o rodoquinol es diferente.

La respiración resistente a cianuro es del 10% con L- lactato como sustrato oxidable. Se ha relacionado la presencia de un citocromo tipo *b* que fija monóxido de carbono con esta actividad alterna y sin embargo no ha sido demostrado, la cual sería similar al citocromo *bo* de *E. coli* (Sharpless *et al.*, 1970, Devars *et al.*, 1998), aunque la sensibilidad parcial hacia compuestos descritos como inhibidores de las AOX de plantas, las cuales son proteínas no citocrómicas y la nula participación de esta enzima en la fosforilación oxidativa, no apoyan esta hipótesis (Moreno *et al.*, 2000).

Datos referentes a la secuencia de aminoácidos obtenida para las AOX de varios organismos ha permitido una clasificación mas cuidadosa de éstas, mostrando que, aunque existen regiones conservadas, hay diferencias sustanciales entre ellas , sugiriendo una estructura, asociación y regulación diferente (Chauduri *et al.*, 1998).

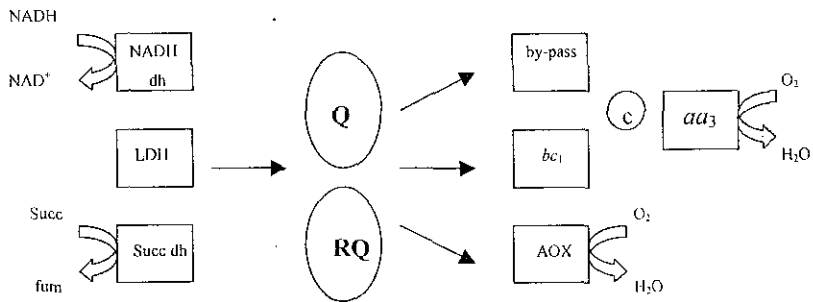
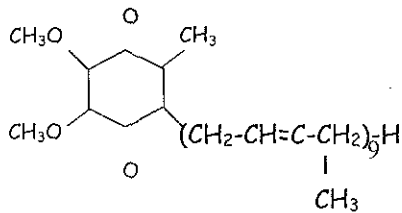


Fig. 5: Cadena respiratoria de *Euglena gracilis*.

A



B

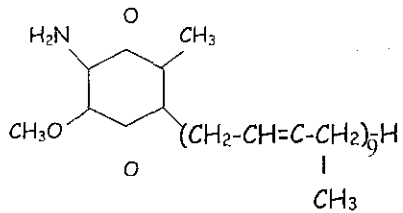


Fig. 6: Estructura de las quinonas presentes en mitocondrias de *Euglena gracilis*. A: ubiquinona-9; B: rodoquinona-9.

HIPÓTESIS

La cadena respiratoria de *Euglena gracilis* posee dos componentes diferentes, uno resistente a antimicina y sensible a mixotiazol que cataliza una reacción similar a la del complejo III y una quinol-oxígeno oxidoreductasa similar a la que se ha reportado en plantas.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar bioquímicamente el componente resistente a antimicina y a la quinol-oxígeno oxidoreductasa de la cadena respiratoria de *Euglena gracilis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto de la exposición a antimicina o cianuro sobre el crecimiento y la respiración mitocondrial en *Euglena gracilis*, en particular sobre las actividades de oxidasas (sensible e insensible a cianuro) y citocromo c reductasas (sensible e insensible a antimicina).
- Identificar y determinar la concentración de quinonas en mitocondrias de *Euglena gracilis* Z cultivada en presencia o ausencia de inhibidores.
- Determinar el efecto de la exposición a antimicina o cianuro en el contenido de ácidos grasos y citocromos en mitocondrias de *Euglena gracilis*.
- Evaluar la sensibilidad de la oxidasa alterna hacia compuestos que inhiben la oxidasa alterna de plantas de plantas sobre la oxidasa alterna en mitocondrias de *Euglena gracilis* cultivada en presencia cianuro.
- Evaluar la naturaleza de la oxidasa alterna utilizando un anticuerpo dirigido contra la oxidasa alterna de *Chlamydomonas reinhardtii*.

HIPÓTESIS

La cadena respiratoria de *Euglena gracilis* posee dos componentes diferentes, uno resistente a antimicina y sensible a mixotiazol que cataliza una reacción similar a la del complejo III y una quinol-oxígeno oxidoreductasa similar a la que se ha reportado en plantas.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar bioquímicamente el componente resistente a antimicina y a la quinol-oxígeno oxidoreductasa de la cadena respiratoria de *Euglena gracilis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto de la exposición a antimicina o cianuro sobre el crecimiento y la respiración mitocondrial en *Euglena gracilis*, en particular sobre las actividades de oxidasas (sensible e insensible a cianuro) y citocromo c reductasas (sensible e insensible a antimicina).
- Identificar y determinar la concentración de quinonas en mitocondrias de *Euglena gracilis* Z cultivada en presencia o ausencia de inhibidores.
- Determinar el efecto de la exposición a antimicina o cianuro en el contenido de ácidos grasos y citocromos en mitocondrias de *Euglena gracilis*.
- Evaluar la sensibilidad de la oxidasa alterna hacia compuestos que inhiben la oxidasa alterna de plantas de plantas sobre la oxidasa alterna en mitocondrias de *Euglena gracilis* cultivada en presencia cianuro.
- Evaluar la naturaleza de la oxidasa alterna utilizando un anticuerpo dirigido contra la oxidasa alterna de *Chlamydomonas reinhardtii*.

MÉTODOS

Cultivo de *Euglena gracilis*

Euglena gracilis Z se cultivó en la oscuridad con agitación orbital de 120 rpm, a temperatura ambiente (20 a 25° C) en medio organotrófico pH 3.5 descrito por Hutner (Hutner, 1956), el cual contiene glutamato y malato como fuente de carbono.

Euglena gracilis Z se cultivó en medios que contenían 4 μM de antimicina ó 300 μM de cianuro por varias generaciones (450 generaciones aproximadamente).

En estos medios, las células se cosecharon al alcanzar la fase logarítmica tardía (84 h). Las células cosechadas fueron lavadas y centrifugadas en medio de amortiguación SHE (250 mM sacarosa, 10 mM de ácido N-(2-hidroxietyl) piperazin N-(2-etano) sulfónico (HEPES) y 2 mM de ácido etilenglicol- bis- (β -aminoetileter)- N', N', N', N'- tetraacético (EGTA)), pH 7.3.

Preparación de mitocondrias

Las mitocondrias fueron aisladas por sonicación y centrifugación diferencial con el método modificado de Moreno- Sánchez y Raya (1987).

Las células cosechadas en fase exponencial (84 h), lavadas con medio SHE (250 mM de sacarosa, 10 mM de ácido N- (2-hidroxietyl) piperazin- N- 2-etanosulfónico (HEPES) y 1 mM de ácido etilen glicol- bis(β -aminoetil eter) N, N, N, N, tetraacético (EGTA)), se resuspendieron a una concentración final de 2×10^9 células / mL en el mismo medio, añadiendo albúmina de suero bovino (BSA) libre de ácidos grasos a una concentración final de 0.2 %, para someterlas a sonicación con amplitud de 20- 22 micrones (80% de la potencia máxima) durante cuatro intervalos de 7 s cada uno con 1 minuto de descanso entre cada intervalo, utilizando una punta de sonicación de 1 cm de diámetro, en un sonicador Branson 450. Se centrifugó a 900 X g durante 10 minutos para separar los restos de pared y membrana celular. El sobrenadante enriquecido con las fracciones

mitocondriales se centrifugó a 10,000 X g durante 10 min. El sedimento resultante conteniendo las fracciones mitocondriales, se resuspendió en un volumen mínimo de medio SHE y se incubaron en presencia de ADP 1 mM y BSA 0.2% por 10 min. agitando ocasionalmente de forma suave.

Por último, se centrifugó la fracción mitocondrial con medio SHE a 10, 000 X g y se resuspendió el sedimento en un volumen mínimo del mismo amortiguador. Se adicionó BSA libre de ácidos grasos a una concentración final de 0.2%.

La proteína se cuantificó por el método de Biuret usando BSA como estándar en las muestras centrifugadas a 3000 r. p. m. por 10 min. para eliminar la presencia de paramilo, carbohidrato de reserva de *Euglena* que interfiere en la cuantificación proteica.

Medición de respiración aeróbica

Se realizó midiendo el consumo de oxígeno utilizando un electrodo tipo Clark a 30 ° C, en medio KME (KCl 120 mM, MOPS 20 mM y EGTA 1 mM, pH 7.2) adicionado con 5 mM de fosfato y 1 mM de MgCl₂ para llevar a cabo la síntesis de ATP. Las mediciones de respiración se realizaron en 2 mL de medio utilizando 1 mg de proteína mitocondrial y diferentes sustratos oxidables por la cadena respiratoria de *Euglena*: L- lactato 10 mM, D- Lactato 10 mM y succinato 10 mM. Para la titulación con inhibidores (cianuro, antimicina, SHAM, *n*-propil galato, disulfiram y difenilamina) se utilizó mas proteína (1.5 mg de proteína/ mL) para medir fácilmente las actividades residuales en presencia de estos compuestos.

Medición de actividad de citocromo c oxidasa

Para la medición de la actividad de citocromo oxidasa se midió el consumo de oxígeno utilizó medio KME adicionado con una solución fresca de ascorbato 5 mM pH 6 y antimicina 1 µM para bloquear la transferencia de electrones provenientes del complejo III. El sustrato utilizado para inducir el consumo de

oxígeno fue *n,n,n,n*-tetrametil-*p*-fenil-*n*-diamina (TMPD) 2 mM. El consumo de oxígeno considerado fue el sensible a azida de sodio 10 mM.

Los cálculos se hicieron con base en la solubilidad del oxígeno en la Ciudad de México, 400 ng At O/ mL a 30 ° C y 2240 metros sobre el nivel del mar.

Citocromo *c* reductasa

100 µg de proteína mitocondrial fueron incubados a 30 ° C en 1 mL de medio SHE adicionado con ADP 1 mM, fosfato 5 mM, MgCl₂ 1 mM y ferricitocromo *c* de caballo 30 µM. Se inició la reacción con L-lactato 10 mM, D-lactato 10 mM, succinato 10 mM o decil- benzoquinol (DBQ) 60 µM, que fue reducido según Rieske (Rieske, 1967). Los ensayos se hicieron en presencia de cianuro 1 mM.

Se midió la reducción del citocromo *c* como la diferencia de absorbencia a 550 nm menos 540 nm, en un espectrofotómetro de doble longitud de onda SLM- Aminco DW- 2000. El coeficiente de extinción usado para cálculos fue de 19 mM⁻¹ cm⁻¹ (Degli Esposti, 1991).

Cuantificación de quinonas

Extracción de quinonas.

Se realizaron 4 extracciones con 100 mL de iso-octano, cada una, a partir de 50 mg de proteína mitocondrial. Cada extracción consistió de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, con agitación suave. Posteriormente se evaporó la fracción del solvente con un flujo suave de nitrógeno. Una vez evaporado por completo, se resuspendieron las quinonas en un volumen mínimo de etanol grado HPLC.

Detección por TLC y espectrofotometría.

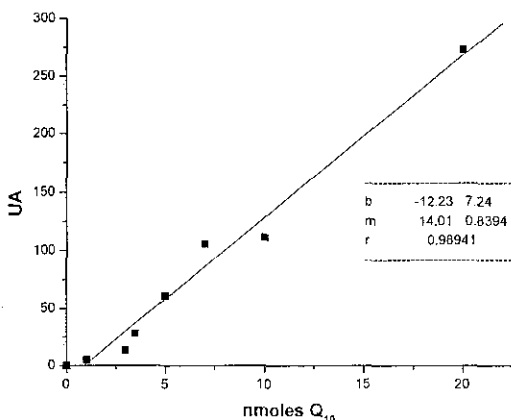
Los extractos obtenidos con solventes también se sometieron a cromatografía en placa fina de sílica gel. Se obtuvieron los espectros de

absorción de cada uno de ellos, disolviendo la sílica raspada de cada compuesto con etanol, para separar la muestra. Los espectros obtenidos fueron comparados con espectros de absorción de estándares para Q-10 (comercial), Q-9 (de corazón de rata) (Lass, 1997) y RQ-9 (de *Rhodospirillum rubrum*) (Parson, 1965). También se obtuvo el espectro en la región de infrarrojo de la RQ-9 y de masas de la RQ-9 y Q-9.

Cuantificación de las quinonas.

El extracto quinónico se analizó por HPLC en fase reversa a través de una columna C-18 Waters Nova- Pack, utilizando una mezcla de etanol: metanol 3:2 como fase móvil, con un flujo de 0.5 mL/ minuto a una longitud de onda de 285 nm. Los picos correspondientes a la Q-9 y RQ-9 fueron cuantificados con base en el área bajo la curva del estándar de Q₁₀ cuya concentración fue determinada por espectrofotometría de UV en cubetas de cuarzo utilizando un coeficiente de extinción de 158 mM⁻¹ cm⁻¹ a 275 nm (Takamiya, 1993). Las áreas de los picos obtenidos no varían entre 275 y 290 nm.

La curva de calibración correspondiente al estándar Q₁₀ se muestra a continuación:



Cuantificación de citocromos

Se obtuvieron los espectros oxidado (con persulfato de amonio) y reducido (ascorbato 0.5 M pH 6, o ditionita) de preparaciones mitocondriales en una solución amortiguadora que contiene 120 KCl, 20 mM ácido 3-(N-Morfolino)-propanosulfónico (MOPS) y 0.5 mM de EGTA (solución amortiguadora de KME) - glicerol 1:1. Con el espectro de reducido con ascorbato menos el espectro de oxidado con persulfato se cuantificaron los citocromos c_1 y c usando la diferencia de absorbencia a 561 menos 540 nm con un coeficiente de extinción molar (ϵ) de $17.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Degli Esposti *et al*, 1991). El espectro reducido con ditionita menos reducido con ascorbato permitió cuantificar el citocromo b usando la diferencia de absorbencia a 563 menos 578 nm con un $\epsilon = 25.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Priest y Hajduk, 1992). El citocromo a se cuantificó a partir del espectro ditionita menos oxidado a 609 menos 630 nm tomando $\epsilon = 16 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Gray, 1994).

Cuantificación de ácidos grasos

Muestras de 10 mg de proteína mitocondrial fueron almacenadas a -70°C en presencia de 50 μg de butil- hidroxitolueno (BHT) / mg de proteína hasta su uso. Se descongeló la muestra y 1 mL de BHT en 0.02 % (v/v) en metanol, 50 μg de fosfatidilcolina- diheptadecanoil como estándar interno, 1 mL de 0.9 % NaCl y 2 mL de cloroformo fueron adicionados y mezclados por 20 segundos. Esta suspensión se centrifugó a 1,600 x g por 5 minutos. Este procedimiento se repitió una vez más. La fase orgánica fue deshidratada adicionándole 1.5 g de Na_2SO_4 (anhidro), entonces la mezcla fue filtrada a través de una capa de algodón. El solvente fue evaporado bajo un flujo de N_2 . Las muestras secas fueron mezcladas con 0.1 mL de tolueno, 2 mL de metanol anhidro y 0.04 mL de ácido sulfúrico. Esta mezcla fue calentada a 80°C por 2 h. Las muestras tratadas fueron mezcladas con 1 mL de NaCl al 5 % y 2 mL de hexano mezclando fuertemente. Se repitió

una vez este procedimiento. Las muestras fueron evaporadas con N_2 y almacenadas a $-72^\circ C$ hasta realizarse la cromatografía de gases.

Las condiciones de la cromatografía de gases fueron: una columna CPSIL 8CB (espesor 0.25 mm) usando helio como acarreador, a una velocidad de flujo de 1 mL/ min. a $195^\circ C$ usando un cromatógrafo Carlo Erba model 2300.

Western blot

Se realizó la electroforesis de las preparaciones mitocondriales según Laemmli. Las proteínas de los geles se transfirieron a nitrocelulosa a 100 Volts durante 1h a $4^\circ C$. El papel de nitrocelulosa se secó con un papel absorbente. Para comprobar la transferencia, el carril con los marcadores de peso molecular se reveló con tinción de Ponceau- S. Para realizar el ensayo inmunoenzimático, se bloquearon los espacios vacíos del papel de nitrocelulosa durante 30 minutos a $37^\circ C$ con agitación empleando SST (solución salina de tris, pH 7.5)- leche al 5 %. Se retiró la solución anterior y el papel se puso en contacto con el suero de conejo anti-AOX de *Chlamydomonas reinhardtii* en un título de 1 : 2000, utilizando como diluyente la solución de bloqueo diluida 1 : 3 con SST. Se incubó durante 1.5 h a $37^\circ C$ o 18 h a temperatura ambiente, de preferencia con agitación. La solución anterior se desechó y el papel se lavó 3 veces con solución SST, cada lavado de 10 min.. Después, el papel se dejó secar y se puso en contacto con la cantidad adecuada de conjugado anti- conejo con fosfatasa alcalina o peroxidasa diluido con SST- tween al 0.05 % por 18 h a $4^\circ C$ o durante 1.5 h a $37^\circ C$. El papel se lavó 3 veces con SST- tween, de 10 min. cada lavado. Finalmente, se lavó en SST para eliminar el tween. Para revelar el conjugado de fosfatasa alcalina, el papel se puso en contacto con 30 mL de una solución de $NaHCO_3$ 0.1 M, $MgCl_2$ 1mM pH 9.8. Se agregaron 300 μL de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato) y 300 μL de NBT (nitroazul de tetrazolio). Se esperó a que aparecieran las bandas y se lavó el papel con agua para detener la reacción. Para revelar por quimioluminiscencia el conjugado de peroxidasa se utilizó un sistema de revelado comercial (ECL + Plus).

RESULTADOS

Crecimiento celular

Euglena gracilis Z, cultivada en medio Hutner, llega a la fase exponencial a las 50 horas, alcanzando su etapa estacionaria a los 4 días aproximadamente (línea punteada). La densidad celular alcanzada en esta etapa es de aproximadamente $7.2 \times 10^6 \pm 0.5$ células/mL. En cultivos adicionados con $4 \mu\text{M}$ de antimicina, *Euglena* presenta una curva de crecimiento en la que la etapa exponencial se alcanza también a las 50 horas, además su densidad celular final sólo es del 50% de la de los cultivos control ($3.4 \times 10^6 \pm 0.05$ células/mL). Los cultivos en presencia de $300 \mu\text{M}$ de cianuro, tienen una velocidad de crecimiento similar a las células expuestas a antimicina, pero alcanzando una densidad celular mayor ($6 \times 10^6 \pm 1.7$ células/mL) ($n = 4$) (Fig. 7).

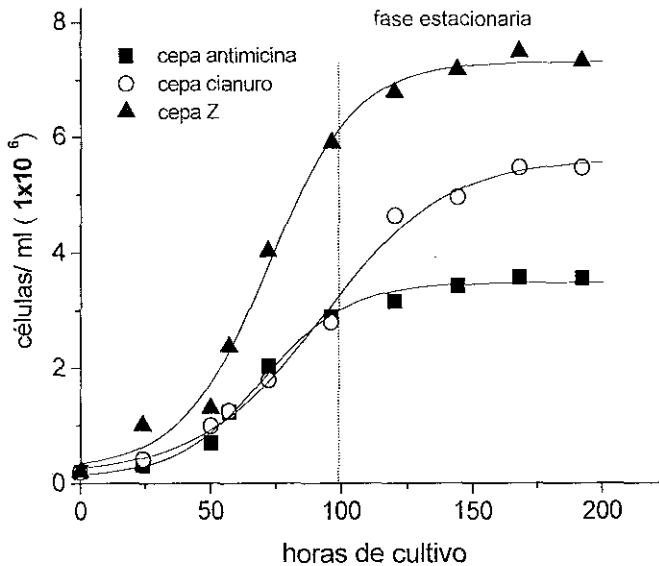


Fig. 7: Curvas de crecimiento de cultivos representativos de *Euglena gracilis* cepa Z, antimicina y cianuro en medio Hutner (glutamato + malato).

Las determinaciones de consumo de oxígeno, citocromo *c* reductasa, cuantificación de quinonas y de ácidos grasos se realizaron en mitocondrias aisladas de *Euglena gracilis* cultivada en medio Hutner con y sin inhibidores (antimicina o cianuro), en el inicio de la fase estacionaria (4 días) donde el rendimiento celular es mayor y la presencia de quistes es prácticamente nula. Estas células se denominaron cepa Z, Z-antimicina y Z-cianuro. Los rendimientos mitocondriales obtenidos fueron de 60 ± 12 , 32 ± 10 y 50 ± 8 g de proteína en peso húmedo /L de cultivo, respectivamente.

Consumo de oxígeno

Diferentes sustratos pueden ser oxidados por la cadena respiratoria en la mitocondria de *Euglena gracilis* (Tabla 1). La actividad respiratoria mitocondrial fue similar a la de mitocondrias intactas de otros tejidos como hepatocitos, o como en cadenas respiratorias de algunas bacterias, utilizando diferentes sustratos. Sin embargo, se observó un mayor consumo de oxígeno cuando L- y D- lactato fueron utilizados. Se ha descrito la presencia de dos lactato deshidrogenasas independientes de piridín-nucleótidos, específicos para cada uno de los isómeros, que participan en la cadena respiratoria transfiriendo electrones a la poza de quinonas en *Euglena* (Jasso -Chávez, 2001).

Tabla 1: Respiración de estado 3 en mitocondrias control de *Euglena gracilis* Z utilizando diferentes sustratos.

Los datos representan el promedio de determinaciones \pm desviación estándar

Sustrato	ngAtO/min/mg proteína
Succinato 10 mM	63 ± 5
NADH 1 mM	135 ± 8
L- lactato 10 mM	215 ± 15
D- lactato 10 mM	260 ± 16

La presencia de diferentes inhibidores en cultivos de *Euglena gracilis* ocasionó una disminución en la actividad respiratoria clásica, no así en la actividad de la oxidasa alterna mostrando un aumento relativo en la participación de esta enzima en la respiración total. En la cepa Z se ha encontrado una respiración resistente a cianuro del 10% (27.9 ± 16 ng At O/ min/ mg proteína) al utilizar L-lactato como sustrato (Moreno Sánchez, 2000); al cultivar en presencia de 300 μ M de cianuro (Z-cianuro), la respiración en presencia de 1 mM de cianuro es del 30% aproximadamente (Fig. 8). La actividad específica remanente, sin embargo, fue similar (39.4 ± 10 ng AtO/min/mg proteína) a la de las mitocondrias de células cultivadas en ausencia de inhibidores (27.9 ± 16 ngAtO/min/mg)).

Lo mismo se observó en la cepa antimicina donde hubo un incremento del 50 (cepa control) al 70 % de respiración resistente a 1 μ M de antimicina (72.5 ± 11.3 ng At O/ min/ mg proteína). En ambos casos utilizando L- lactato como sustrato (Tabla 2).

Tabla 2: Efecto del cianuro o antimicina sobre la respiración en mitocondrias provenientes de células de *Euglena* cultivadas en ausencia o presencia de inhibidores

Los valores indican el promedio \pm desviación estándar, excepto donde se indica. Las actividades se cuantificaron utilizando 10 mM de L-lactato como sustrato.

Cepa	ngatO/ min/ mg proteína mitocondrial		
	sin inhibidor	1 mM cianuro	1 μ M de antimicina
Z	215 ± 15	27.9 ± 16	122.5 (2)
Z-cianuro	134.2 ± 9.3	39.4 ± 10	74.5 (2)
Z-antimicina	110.5 ± 4	13 ± 5	72.5 ± 11.3

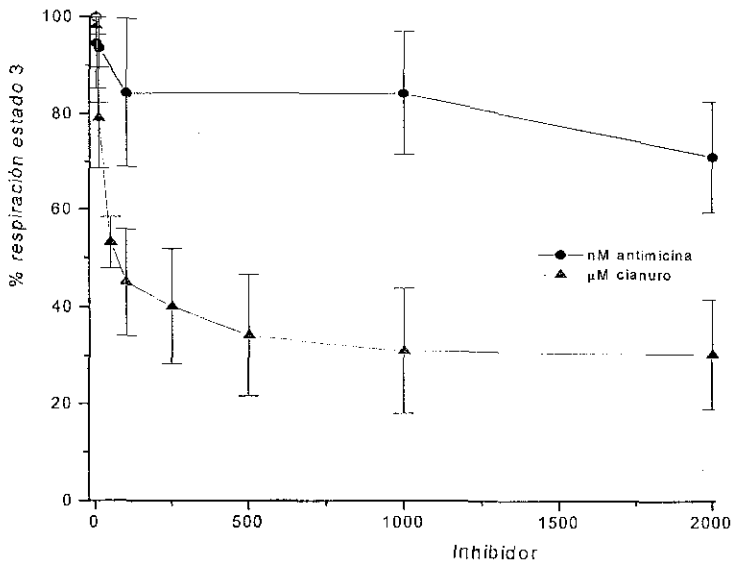
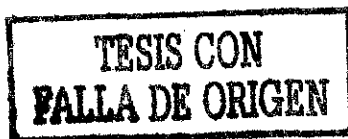


Fig. 8: Curvas de inhibición con cianuro o antimicina en mitocondrias de *Euglena* cultivada en presencia de cianuro o antimicina. ▼, inhibición por cianuro de *Euglena* Z- cianuro; ●, inhibición por antimicina de *Euglena* Z- antimicina. Cada punto indica el promedio de 4 preparaciones mitocondriales \pm desviación estándar.

Se midió la actividad de TMPD oxidasa para evaluar la actividad de citocromo c oxidasa. En mitocondrias de células Z-cianuro se obtuvo una actividad de 264 ± 98 ng At O/ min / mg proteína y en la cepa antimicina de 377 ± 80 ng At O/ min / mg proteína ($n = 3$). La cepa control tiene una actividad de 410 ± 73 ng At O/ min / mg proteína ($n = 4$). Las curvas de inhibición con cianuro para la actividad TMPD oxidasa en mitocondrias de células Z-antimicina y Z-cianuro muestran un comportamiento bifásico, como anteriormente se ha reportado para la cepa Z, presentando 2 diferentes valores de K_i (Tabla 3) que fueron calculados a partir del gráfico de Dixon (Fig. 9).



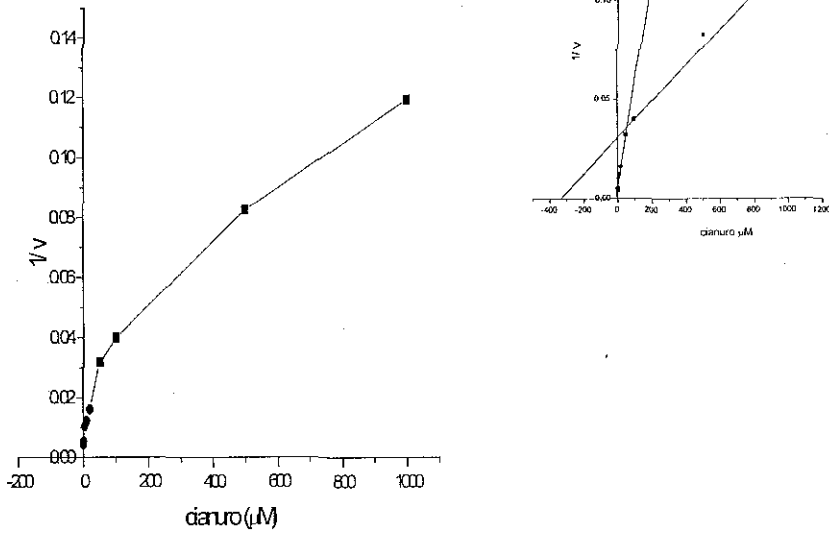


Fig. 9: Gráfico de Dixon de un experimento representativo obtenido a partir de la curva de inhibición por cianuro de la actividad de TMPD oxidasa en mitocondrias de *Euglena gracilis* Z-cianuro (A). Las constantes de inhibición (K_i) se obtuvieron del cruce de las líneas en el eje de las abscisas (B).

Tabla 3: Constantes de inhibición (K_{i1} y K_{i2}) por cianuro en mitocondrias de *Euglena* cultivada en ausencia o presencia de inhibidores.

Los valores representan el promedio \pm desviación estándar obtenidas a partir del gráfico de Dixon excepto donde se indica. El número de determinaciones se muestra entre paréntesis.

Cepa	(μM)	
	K_{i1}	K_{i2}
Z *	10 (1)	46 (1)
Z-cianuro	10 ± 3 (3)	175 ± 75 (3)
Z-antimicina	17 ± 2 (3)	40 ± 10 (3)

*ref. Devars y Moreno Sánchez, 1992.

La constante de inhibición de alta sensibilidad hacia el cianuro fue similar para las cepas tratadas (Z-cianuro y Z-antimicina) respecto a la cepa Z. En mitocondrias de Z-cianuro, la K_{i2} es mas grande (Tabla 3) (Devars, 1998).

Efecto de inhibidores de AOX de plantas en la respiración resistente a cianuro de *Euglena gracilis*.

El consumo de oxígeno o respiración residual en presencia de 1 mM de cianuro en la cepa cianuro fue del 30% de la respiración total. Sobre esta actividad se midió la inhibición de diferentes compuestos reportados como inhibidores de la oxidasa alterna en mitocondrias de plantas, con el objetivo de evaluar la sensibilidad de la oxidasa alterna de *Euglena* hacia estos compuestos.

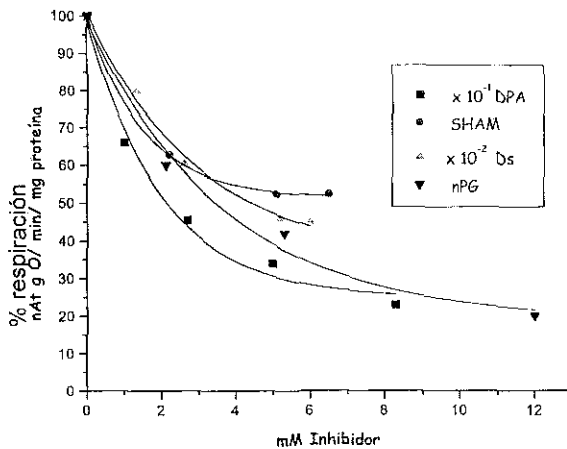


Fig. 10: Curvas de titulación con inhibidores de oxidasas alternas de plantas. La actividad se midió en presencia de 1 mM de cianuro y con diferentes concentraciones de: ■ difenilamina (DPA); ● ácido salicilhidroxámico (SHAM); ▲ disulfiram (Ds) y ▼ n- propilgalato (nPG). Las concentraciones de inhibidor están dadas en mM excepto donde se indica.

La Fig. 10 muestra que estos compuestos solo tienen un efecto inhibitorio del 50 al 80%, a concentraciones mayores (1 orden de magnitud aproximadamente) de las que inhiben por completo a las oxidasas alternas de plantas y levaduras. El n-propilgalato y la difenilamina inhiben en mayor magnitud la actividad alterna, sin embargo, las concentraciones mas bajas para lograr este efecto se logran con el disulfiram.

Citocromo c reductasa

Se midió la reducción de citocromo c para evaluar, usando inhibidores, la actividad del complejo III y del complejo resistente a antimicina (*by-pass*). En la tabla 4 se observa que en ambas cepas el succinato se oxida preferentemente a través del *bc*₁ (sensible a antimicina), mientras que los sustratos L- y D-lactato son oxidados por ambas vías, aunque se observa una preferencia a través del *by-pass*, principalmente cuando se oxida D- lactato. En la cepa antimicina se observa claramente que la actividad existente corresponde al *by-pass*, y que la actividad del *bc*₁ es prácticamente nula.

En la cepa cianuro no hubo cambios significativos en el patrón de inhibición obtenido con mixotiazol y antimicina en las actividades de citocromo c reductasa con respecto a la cepa control, excepto en que las actividades específicas fueron menores (datos no mostrados).

Los ensayos se realizaron en preparaciones mitocondriales frescas, pues la actividad de citocromo c reductasa disminuye 20 a 40% en preparaciones mitocondriales sometidas a congelación.

Tabla 4: Actividad de citocromo c reductasa en mitocondrias frescas de *Euglena gracilis* Z y Z- antimicina

Los datos representan el promedio de 5 experimentos \pm desviación estándar. Se utilizaron 10 mM de L-lactato, D-lactato o succinato como sustrato y 1 μ M de antimicina o 10 μ M de mixotiazol como inhibidores.

	(nmol cit c red/ min/ mg proteína)					
	cepa Z			cepa Z-antimicina		
	sin inhibidores	antimicina	mixotiazol	sin inhibidores	antimicina	mixotiazol
L-lactato	103 \pm 16	61 \pm 5	43 \pm 7.5	29 \pm 10	32 \pm 6	5 \pm 1
D- lactato	191 \pm 32	90 \pm 8	48 \pm 8	69 \pm 35	56 \pm 12	5 \pm 1
succinato	39 \pm 9	3 \pm 1	22 \pm 5	3 \pm 1	3 \pm 1	0

La actividad de citocromo c reductasa se ensayó en un sistema libre de quinonas, para determinar la actividad del complejo III y del *by-pass*, reincorporando una quinona exógena (decil ubiquinona, DBQ) (Tabla 5).

Tabla 5: Reconstitución de la actividad de citocromo c reductasa en mitocondrias de células Z-antimicina depletadas de quinonas endógenas.

Se utilizaron 10 mM de L- lactato, D- lactato o succinato como sustrato y 1 μ M de antimicina o 10 μ M de mixotiazol como inhibidores.

Se reincorporó 20 μ M de decilubiquinona como quinona exógena.

Los datos representan el promedio de 4 experimentos \pm desviación estándar, excepto donde se indica.

nmoles cit c red/ min/ mg proteína

	L-lac	L-lac + DBQ	D-lac	D-lac+DBQ	Succ	Succ + DBQ
sin inhibidores						
liofilizadas	11 \pm 6	13 (2)	17 \pm 2	11 \pm 6.4	2 \pm 1.6	10 (2)
liofilizadas* extraídas	1 \pm 1	12 \pm 5	10 \pm 6	13.6 \pm 3	0.5 \pm 0.6	7 \pm 4
1 μM antimicina						
liofilizadas	10 \pm 5	12 (2)	17 \pm 10	21 \pm 11	4.4 \pm 1.5	7 \pm 2
liofilizadas* extraídas	2 \pm 1	11 \pm 4	9 \pm 0	12 \pm 3	0 (2)	8 (2)
10 μM mixotiazol						
liofilizadas	8 \pm 3	11 \pm 5	10 \pm 1.4	16 \pm 9	3.6 \pm 0.7	12 \pm 0.2
liofilizadas* extraídas	0.4 \pm 0.7	9 \pm 6	1 \pm 1	10.6 \pm 2	0	5 \pm 1.5

Con L- láctico, la actividad disminuyó casi a cero, la cual se recupera con DBQ. Sin embargo, se pierde la sensibilidad a antimicina y mixotiazol, aunque no es posible inferir las razones por las cuales sucede esto. Estas preparaciones también pierden un 50% de sensibilidad hacia estigmatelina, otro potente inhibidor del complejo III y del *by-pass* (datos no mostrados). La extracción de las quinonas con *iso*-octano disminuyó considerablemente la actividad endógena

debido a ubiquinona, pero su reconstitución con decilubiquinona (DBQ) y diferentes sustratos la incrementó 5 a 10 veces.

Al medir consumo de oxígeno se observa la misma pérdida de sensibilidad a estos compuestos (Tabla 6). Por otro lado, el consumo de oxígeno obtenido al reconstituir con la quinona exógena es totalmente sensible a cianuro mostrando la labilidad de la oxidasa alterna.

Tabla 6: Reconstitución de la respiración en mitocondrias de células Z-antimicina depletadas de quinonas endógenas

Se utilizaron 10 mM de L- lactato, D- lactato o succinato como sustrato y 1 μ M de antimicina o 10 μ M de mixotiazol como inhibidores.

Se reincorporaron 20 μ M de decilubiquinona como quinona exógena.

Los datos representan el promedio de 4 experimentos \pm desviación estándar, excepto donde se indica.

	ngatO/ min/ mg proteína					
	L-lac	L-lac + DBQ	D-lac	D-lac+DBQ	Succ	Succ + DBQ
sin inhibidores						
lío filizadas	38.5 \pm 15	35 \pm 17.7	94 \pm 40	55.5 \pm 31	20.6 \pm 10.7	31 \pm 12
lío filizadas* extraídas	12.7 \pm 6	18 \pm 12.6	14.5 \pm 7	23.5 \pm 13	11 \pm 7	5.5 \pm 2.2
antimicina						
lío filizadas	23 \pm 7.2	23 \pm 6.4	71.5 \pm 33	57.7 \pm 28	11 \pm 5.4	23 \pm 8.8
lío filizadas* extraídas	0 (1)	18.4 (1)	16 \pm 4	22 \pm 12	0 (2)	13 (2)
mixotiazol						
lío filizadas	25 (1)	18.6 (1)	30 \pm 12.3	22 \pm 6.7	9 \pm 3	9.6 \pm 4.2
lío filizadas* extraídas	0	18	13.6 \pm 6	14 \pm 7	10 (1)	10 (1)

Cuantificación de quinonas

Los extractos quinónicos obtenidos de las preparaciones anteriores fueron analizados mediante diferentes técnicas con el objetivo de: 1) identificar los tipos de quinonas presentes en mitocondrias de *Euglena* (ubiquinona- 9 y rodoquinona- 9) ; 2) purificarlas y 3) cuantificar cada una de estas benzoquinonas en las cepas control, cianuro y antimicina.

Para el primer objetivo se recurrió a la cromatografía en capa fina (Fig 11), donde se identificaron las quinonas presentes en el extracto obtenido con solventes de mitocondrias de *Euglena gracilis* Z, mediante el uso de diferentes estándares (Tabla 7).

Tabla 7: Comparación de los corrimientos en placas de sílica- gel de estándares Q₁₀ y RQ₁₀ , y del extracto obtenido con solventes de *Euglena gracilis* Z .

Se utilizó una mezcla de hexano: acetato de etilo 9: 1 como fase móvil.

compuesto	Rf
std Q ₁₀	0.75
rodoquinona - 10 (de <i>Rhodospirillum</i>)	0.61
std Q ₆	0.7
ubiquinona- 9 (de <i>Euglena</i>)	0.73
rodoquinona- 9 (de <i>Euglena</i>)	0.6

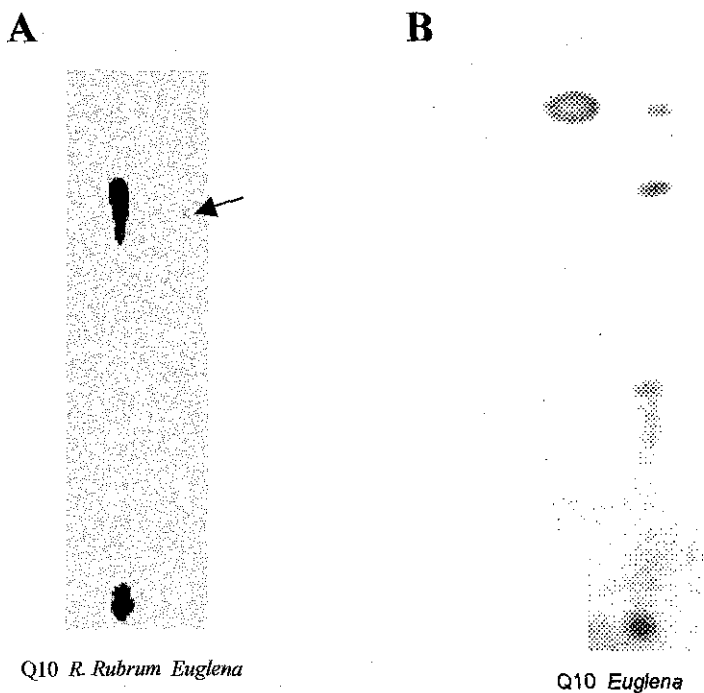


Fig. 11: **A.** Cromatogramas en capa fina de: 1 std Q_{10} , 2 RQ_{10} de *Rhodospirillum rubrum*, 3 extracto quinónico de *Euglena gracilis*; **B** 5, revelado con yodo del std Q_{10} y 6, extracto quinónico de *Euglena gracilis* utilizándose una mezcla de hexano: acetato de etilo 9:1 como fase móvil.

Con base en los R_f correspondientes a las quinonas, se extrajeron los compuestos identificados como ubiquinona-9 y rodoquinona-9 (Fig. 11) mediante su resuspensión en etanol.

Se obtuvieron los espectros de absorción en la región UV (Fig. 12)

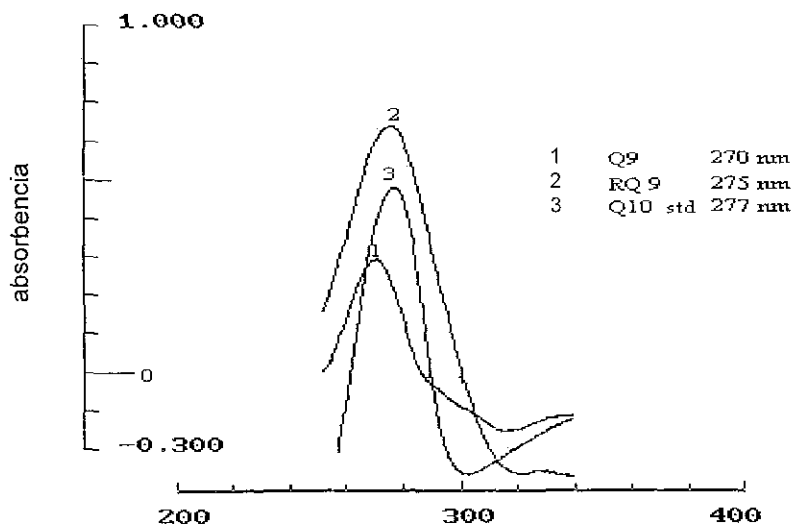


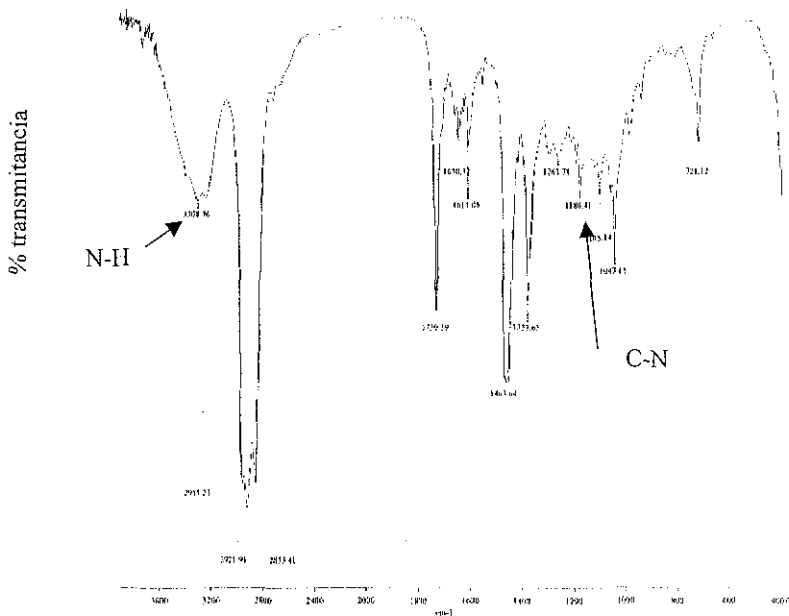
Fig. 12: Espectros de absorción en la región UV del estándar de Q₁₀ y de la Q₉ y RQ₉ de *Euglena gracilis*.

Se observa que la longitud de onda del máximo de absorción del compuesto asignado como Q₉ no corresponde específicamente al del estándar comercial de Q₁₀, esto puede deberse a alguna modificación ocasionada por el procedimiento de extracción de los compuestos.

El espectro obtenido en la región de infrarrojo muestra claramente que el compuesto identificado como pico 2 corresponde a la rodoquinona, como se había

reportado anteriormente, detectándose la señal del grupo amino a 3308 y 1180 nm (Powls, 1966) (Fig. 13)

Sin embargo la espectroscopia de masas muestra la degradación de ambos compuestos, ya que el peso molecular del fragmento mas grande registrado es de aproximadamente 400 (Fig. 14), debido posiblemente al tratamiento y condiciones de almacenaje al que se han sometido las muestras, aunque el análisis por este método de estándares es necesario. El peso molecular de ambos compuestos es de 794 y 779 g/ mol, para la ubiquinona y rodoquinona con nueve cadenas isoprenoides, respectivamente.



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Fig. 13: Espectro en la región de infrarrojo de la rodoquinona- 9 de *Euglena gracilis* Z.

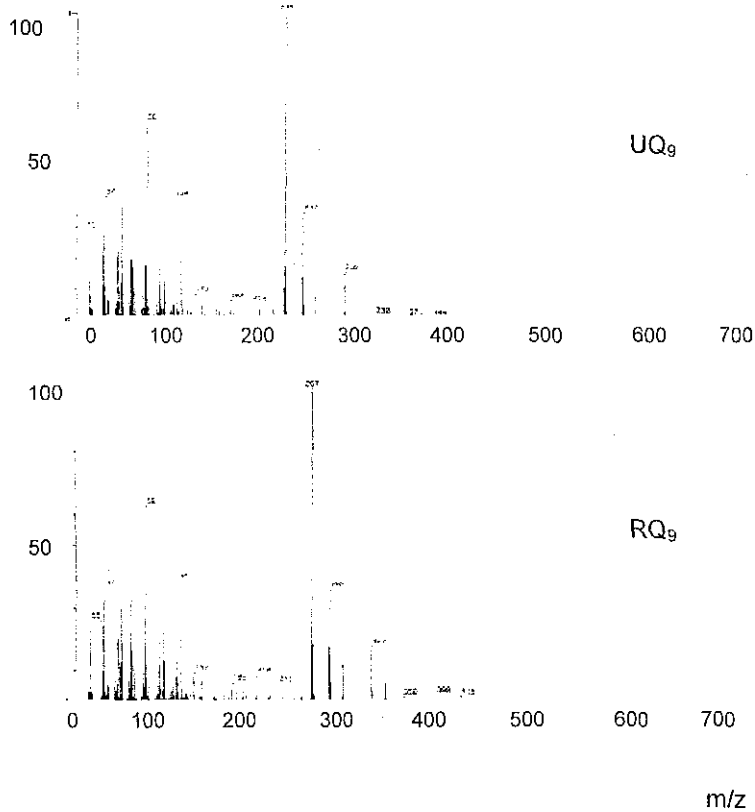


Fig. 14: Espectroscopia de masas de los compuestos correspondientes a ubiquinona- 9 y rodoquinona 9 de *Euglena gracilis* Z. m/Z: masa molecular/ carga neta.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se cuantificó el contenido de rodoquinona y ubiquinona en las diferentes cepas de *Euglena gracilis* Z en cromatogramas obtenidos por HPLC a partir del área bajo la curva de las señales dadas por estos compuestos, identificados con base en los tiempos de retención de los estándares utilizados (Fig. 15).

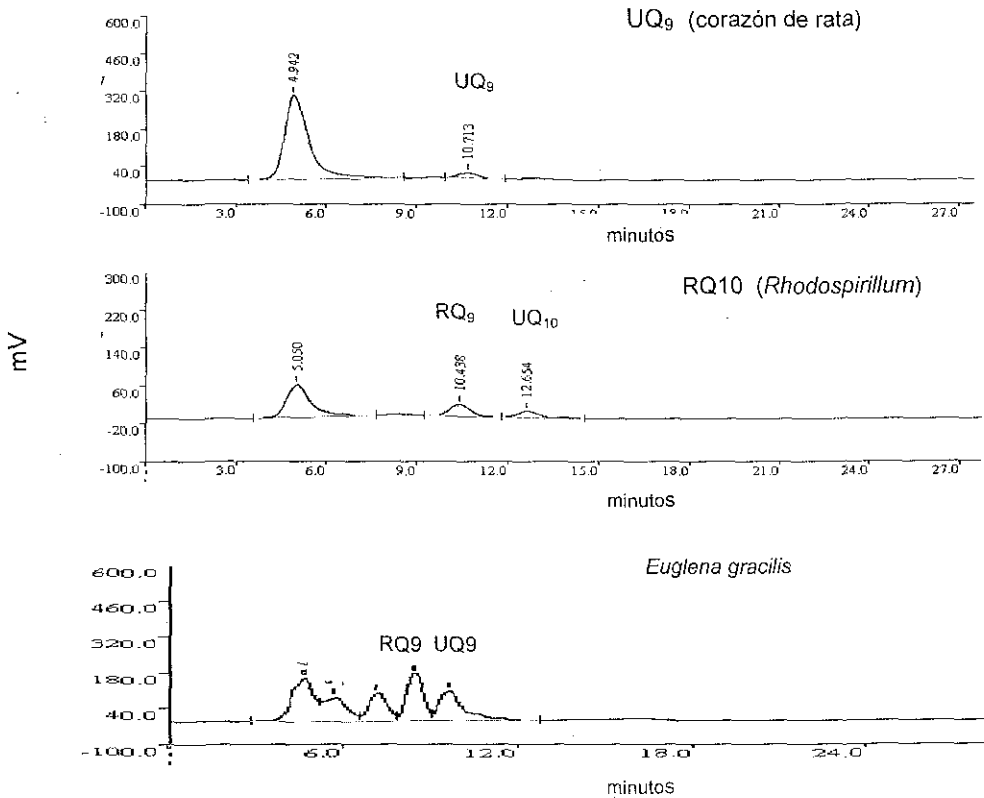


Fig. 15: Cromatogramas de los estándares de Q₉ obtenida de corazón de rata, de RQ₁₀ de *Rhodospirillum rubrum*, y extracto obtenido con isooctano de *Euglena gracilis* a una velocidad de flujo de 0.5 mL/ min.

Se encontró un aumento en la relación rodoquinona / ubiquinona en las cepas antimicina y cianuro. Por otra parte, el contenido total de quinonas es mayor en la cepa cianuro (Tabla 8).

Tabla 8: Concentración de ubiquinona y rodoquinona en mitocondrias de *Euglena gracilis* cultivada en ausencia o presencia de inhibidores.

La fase móvil utilizada fue una mezcla de etanol: metanol 3: 2 a una velocidad de 0.5 mL/min.

(nmol/ mg proteína mitocondrial)			
	Z	Z-Antimicina	Z-Cianuro
RQ ₉	0.53 ± 0.02	0.6 ± 0.07	2.5 ± 0.1
Q ₉	0.4 ± 0.04	0.25 ± 0.04	1.3 ± 0.07
RQ ₉ / Q ₉	1.3 : 1	2.4 : 1	1.9 : 1

Cuantificación de citocromos

El contenido de citocromos es en general menor que los reportados para otros organismos (Takamiya, 1992). Sin embargo, la proporción de los diferentes tipos: a, b y c + c₁, corresponden bien para la cepa Z (b: 1, c + c₁: 1.5, a: 2) (Buetow, 1989). Además el contenido de citocromo c + c₁ es similar al obtenido anteriormente para *Euglena* (69 pmol/ mg) (Covián, 1999).

Al cultivar a *Euglena* en presencia de antimicina se observa una disminución del 50% en el contenido de citocromos a y b, mientras que para los cultivos expuestos a cianuro la disminución es significativa en el contenido de citocromo a y b (Tabla 9).

Al obtener espectros a temperatura de nitrógeno líquido, se obtiene una mayor definición en los máximos de absorción del citocromo b y del c + c₁, sin embargo, la cuantificación a partir de los espectros obtenidos a temperatura ambiente es suficientemente precisa (Fig. 16).

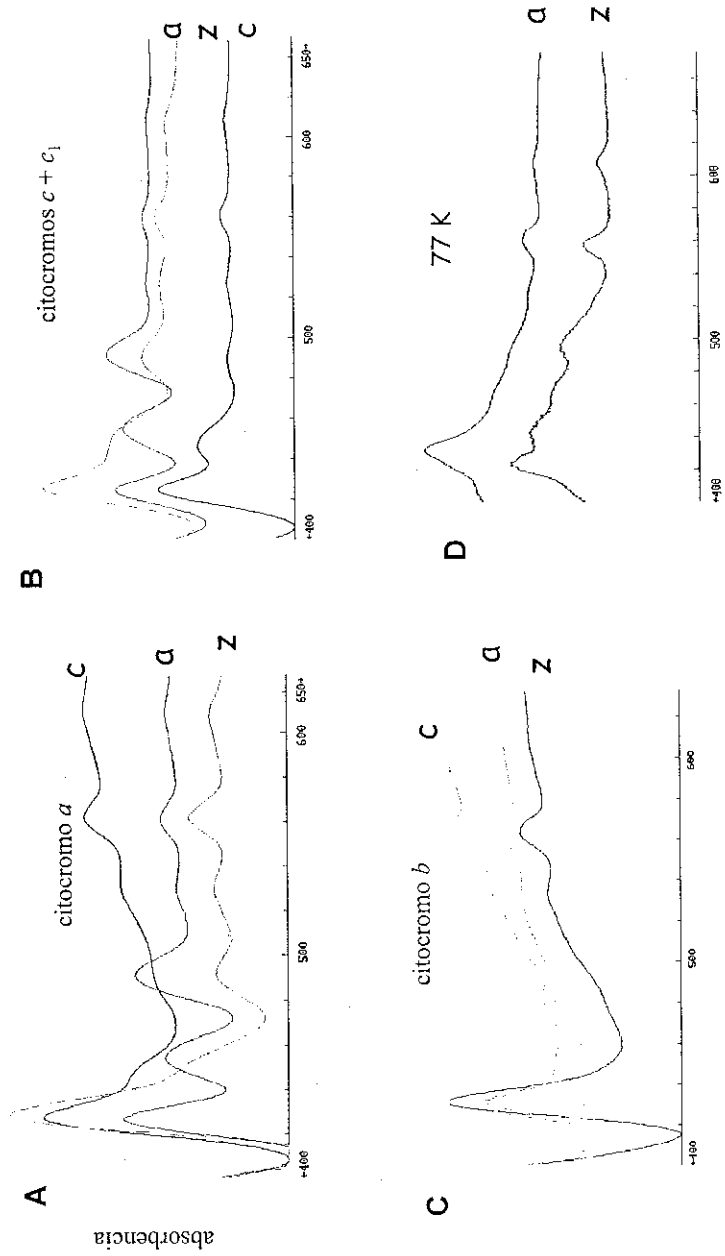


Fig. 16: Espectros a temperatura ambiente de 2 mg de proteína mitocondrial de las cepas control (z), antimicina (a) y cianuro (c). A: espectro reducido con ditionita menos oxidado; B: espectro reducido con ascorbato menos oxidado; C: espectro reducido con ditionita menos reducido con ascorbato; D: espectro a 77 K de mitocondrias reducidas con ditionita menos oxidado con persulfato.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Tabla 9: Comparación del contenido de citocromos en mitocondrias de *Euglena gracilis* Z cultivada en ausencia o presencia de antimicina o cianuro.

Los datos representan el promedio de dos determinaciones.

Los contenidos fueron obtenidos de las diferencias de absorbencia de 561 menos 540 nm para $c + c_1$, 563 menos 578 nm para b y 609 menos 630 nm para a .

CEPA	pmol / mg proteína		
	a (609 nm)	b (563 nm)	c + c ₁ (561 nm)
Z	121.6	58.4	85.7
Antimicina	59.5	30	64.2
Cianuro	84	41.6	99.6

Tabla 10: Relación entre la actividad del complejo III y del *by-pass* y el contenido de citocromo tipo b

La actividad de citocromo c reductasa esta en nmoles citocromo c red/ min/ mg y la concentración de citocromo tipo b (cit b) en pmol/ mg

Cepa	Actividad	cit b	Act/ cit b
Z	103 ± 16	58.4	1.76
Z-anti	29 ± 10	30	0.96

La relación actividad/ citocromo b muestra que, en células control, la actividad de los componentes resistente y sensible a antimicina está relacionada con citocromos tipo b , también en las células expuestas a antimicina, donde la

actividad corresponde prácticamente a la actividad enzimática del *by-pass*, un citocromo tipo *b* está involucrado (Tabla 10).

Cuantificación de ácidos grasos

La cuantificación de ácidos grasos totales presentes en una preparación membranal mitocondrial, muestra que no hay un cambio en la proporción de ácidos grasos saturados e insaturados, sin embargo, la cantidad de ácidos grasos totales en la cepa cianuro fue mayor (Tabla 11). Este dato sugiere que hay cambios en la membrana.

Tabla 11: Comparación de los ácidos grasos mas abundantes en mitocondrias de *Euglena gracilis* cultivada en presencia o ausencia de inhibidores.

La cuantificación de ácidos grasos se realizó mediante el programa GOLD de Varian, versión 2.

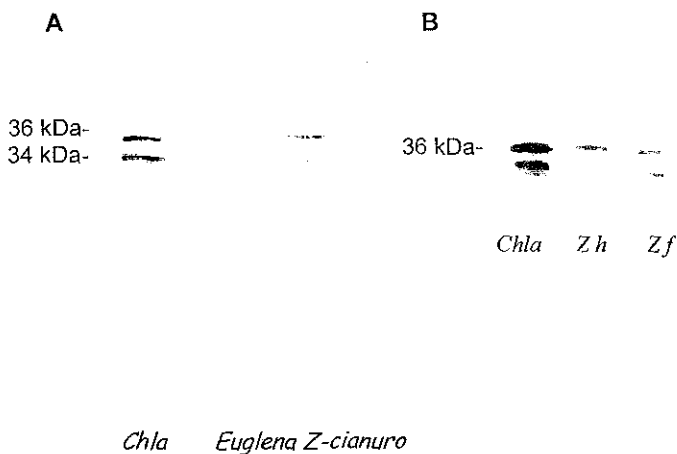
Los datos expresan el porcentaje promedio de 3 preparaciones mitocondriales \pm desviación estándar.

Acido graso	Z	Z-antimicina	Z-cianuro
Ac. palmítico	11 \pm 0.7	14 \pm 3	12.7 \pm 2
Ac. araquídico	19 \pm 0.7	19 \pm 5	18.5 \pm 4.7
C 20: 5n-3	19.4 \pm 1	14.4 \pm 3.3	20 \pm 3
C 22: 4n	8.4 \pm 0.1	9 \pm 3.3	7 \pm 2.2
C 22: 6n-3	19 \pm 0.9	13 \pm 3.2	16 \pm 2.4
sat : insat	1:1.5	1:1	1:1.3
ac. grasos totales (μ g/ mg proteína mitocondrial)	404 \pm 96.5	343 \pm 120	712 \pm 103

Detección de la oxidasa alterna por inmunorélicas (Western blot)

Se encontró un reconocimiento del anticuerpo dirigido contra la oxidasa alterna codificada por el *Aox1* de *Chlamydomonas reinhardtii* en las muestras de *Euglena gracilis* Z y cepa cianuro hacia una banda de aproximadamente 36 kDa.

El control con *Chlamydomonas* muestra la proteína correspondiente a la AOX descrita para este organismo de aproximadamente 36 kDa (Fig. 17 A).



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Fig 17 : Detección de la oxidasa alterna en mitocondrias de *Chlamydomonas reinhardtii* (*Chla*) y *Euglena gracilis* heterotrófica Z (*Zh*), Z-CN y fotosintética (*Zf*) en inmunorélicas, utilizando un anticuerpo anti-AOX de *Chlamydomonas reinhardtii*. **A.** revelado con fosfatasa alcalina, **B.** revelado por quimioluminiscencia.

Cuando se reveló por quimioluminiscencia (Fig. 17 B), fue mas evidente el reconocimiento del anticuerpo hacia las proteínas correspondientes a la proteínas inactivas y activa de la enzima (34, 32 y 36 kDa respectivamente) de *Chlamydomonas*, además reconoció nuevamente la proteína de 36 kDa en

Euglena gracilis heterotrófica y hubo reconocimiento hacia una proteína de 36 y 32 kDa en *Euglena gracilis* fotosintética, donde la actividad respiratoria es totalmente sensible a cianuro (Tabla 12).

Tabla 12: Efecto del cianuro y de un inhibidor de oxidasa alterna sobre la actividad *Euglena gracilis* heterotrófica cultivada en ausencia o presencia de inhibidores y *Euglena gracilis* fotosintética.

Los datos de actividad representan el promedio de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

	ngat O/ ml/ mg proteína			% inhibición		
	L-láctico 10 mM	NaCN 1 mM	n- propil galato 5 mM			
Z heterotrófica	215 \pm 8.5	90	12			
Zh- CN	134.2 \pm 9.3	70	50.6			
Zh- A	110.5 \pm 4	90	-			
Z fotosintética	162 \pm 19	100	0			

DISCUSIÓN

La cadena respiratoria de *Euglena* puede oxidar diferentes sustratos como: succinato, NADH externo, glutamato, malato, D- y L- lactato (Sharpless, 1970). El uso de inhibidores evidenció que la oxidación de L- lactato se lleva a cabo por los componentes resistentes a inhibidores y por la vía clásica; el D- lactato parece ser oxidado preferentemente por el componente resistente a antimicina aunque existe oxidación por el complejo III y por la oxidasa alterna. El consumo de oxígeno con succinato es preferentemente a través del complejo bc_1 (Moreno- Sánchez, 2000). En plantas también se ha encontrado que la actividad alterna es dependiente del tipo de sustrato utilizado (Wagner, 1995), siendo el NADH el que se oxida principalmente por esta vía, aunque en *Euglena* este sustrato es oxidado por ambas vías (clásica y alterna).

Se ha encontrado que los componentes alternos pueden ser constitutivos o inducibles. En plantas la exposición del organismo a condiciones de estrés como congelación, refrigeración o presencia de algún inhibidor respiratorio, estimula la actividad de la vía alterna (Stewart, 1990, Wagner, 1995). El aumento de la actividad alterna respiratoria también se ha relacionado directamente con la cantidad de enzima y de RNA mensajero (Stewart, 1990, Ito, 1997).

En *Euglena*, el cultivo en presencia de cianuro o antimicina estimuló la actividad de oxidasa alterna 20% aproximadamente con respecto a la actividad a través de los citocromos. Este porcentaje refleja que, aunque la magnitud de la actividad es similar a la presente en la cepa control, su participación en la actividad total es mayor. Además la exposición a alguno de los inhibidores no modificó la resistencia hacia el otro inhibidor, es decir, la exposición a cianuro aumentó relativamente la actividad de la quinol oxidasa alterna, sin modificar la actividad resistente a antimicina. Al exponer las células a antimicina no hubo modificación en la actividad resistente a cianuro. Una exposición mas prolongada al inhibidor no aumentó la respiración resistente a estos compuestos.

Devars *et al.* (1998) obtuvieron un comportamiento bifásico al inhibir con cianuro para una cepa expuesta a 200 μM de cianuro, en donde se observó que la constante de baja sensibilidad es mayor ($K_{i2} = 139 \pm 27 \mu\text{M}$), es decir, tiene menos

afinidad por el cianuro. Estos autores sugirieron que se trataba de la citocromo *c* oxidasa y de una quinol oxidasa alterna.

En esta tesis se obtuvo una K_{i2} similar ($175 \pm 75 \mu\text{M}$) cuando *Euglena* es expuesta a $300 \mu\text{M}$ de cianuro (cepa cianuro). Sin embargo, cuando se varía la concentración de TMPD, en ausencia de cianuro se obtiene solo un componente, aunque con estos resultados este comportamiento no puede ser explicado.

Una posibilidad es que las dos constantes obtenidas pertenecen a la citocromo *c* oxidasa con base en que se ha propuesto que esta enzima presenta cambios estructurales dependiendo de su estado de reducción (Yoshikawa *et al.*, 1998).

En la cepa antimicina no se observan cambios en las constantes de inhibición al cianuro, sugiriendo que la exposición a este inhibidor estimula la actividad alterna (*by-pass*), sin modificar significativamente la actividad de otras enzimas.

Las oxidasa alterna de plantas es sensible a algunos compuestos (disulfiram, ácidos hidroxámicos, difenilamina y alquil galatos). Estos compuestos fueron utilizados en *Euglena*, ya que la sensibilidad a ellos ha sido utilizada como criterio para determinar la similitud entre las AOX de diferentes organismos y las de plantas, las cuales han sido más ampliamente descritas. Se utilizó 1 mM de cianuro para medir solo la actividad alterna, y se realizaron curvas de inhibición de cada uno de los compuestos, mostrando una inhibición máxima del 80% a concentraciones más altas que las necesarias para inhibir en su totalidad a las AOX de plantas. Esto indica que la AOX de *Euglena* no corresponde fielmente a la enzima de plantas, sin eliminar la posibilidad de compartir con ésta algunas características, reflejadas en la sensibilidad parcial a los compuestos mencionados.

En la cepa antimicina, la actividad de citocromo *c* reductasa corresponde solamente al *by-pass* utilizando D-, L- lactato y succinato, probablemente debido a una inactivación del complejo III o a su degradación, debido a que actividad es prácticamente sensible a mixotiazol.

En la cepa cianuro no se observaron cambios significativos en la actividad de citocromo *c* reductasa con respecto a la cepa control, excepto en que las magnitudes fueron menores, lo que se esperaba debido a que el cianuro inhibe a

la citocromo *c* oxidasa, afectando tanto la actividad del *bc₁* como la del *by-pass* porque ambos componentes comparten esta terminal oxidasa.

El proceso de liofilización al que son sometidas las células resulta en una disminución de la actividad de citocromo *c* reductasa y del consumo de oxígeno en *Euglena* de un 70 a un 90 %, además, se pierde parcialmente la sensibilidad a los inhibidores utilizados (mixotiazol y antimicina). Con estigmatelina, otro inhibidor potente del complejo III y del *by-pass* en *Euglena*, también se observó pérdida en la sensibilidad (aproximadamente del 50%). Las razones por las cuales se pierde sensibilidad a estos compuestos no puede ser explicada con estos resultados. La actividad de esta preparación mitocondrial muestra que el uso de un análogo de ubiquinona, la decilbenzoquinona (DBQ), estimula la oxidación de succinato, mientras que inhibe la oxidación de D-lactato, indicando que, en estas membranas, la DBQ compite con las quinonas endógenas que participan en la transferencia de electrones a partir del D-lactato. Esto sugiere que el transportador de electrones entre el sustrato y el *by-pass* puede ser diferente del que transfiere electrones al complejo III.

Como ha sido reportado anteriormente (Powls, 1967), se encontró que la concentración de rodoquinona y ubiquinona de *Euglena* es equimolar. Además se determinó que en la cepa antimicina, el contenido de ubiquinona disminuía, aumentando la relación de RQ_9/Q_9 . Esto sugiere que la rodoquinona es la que está presente principalmente cuando la participación del *by-pass* es mayor. Por otra parte, en la cepa cianuro también se observa un aumento en esta relación, además de un aumento considerable en el contenido total de quinonas. La razón por la cual existe este aumento no se sabe, sin embargo se ha encontrado en plantas (Wagner, 1998) y en *Polytomella* (Reyes Prieto, datos no publicados) este mismo resultado. Wagner *et. al.*, sugieren que este aumento es parte del mecanismo de defensa en mitocondrias de plantas, contra el daño por estrés oxidativo; así una mayor población de quinonas serían reducidas y oxidadas por la AOX, la cual puede unir dos quinoles al mismo tiempo.

Al cultivar a *Euglena* en presencia de antimicina se observa una disminución del 50% en el contenido de citocromos *a* y *b*. Esto correlaciona con el crecimiento y

respiración disminuidos a la mitad que se observan en esta cepa. Los resultados en la actividad de citocromo *c* reductasa muestran que en esta cepa, la actividad se debe principalmente al *by-pass*, sin embargo hasta el momento no es claro si se debe a la inactivación o degradación del bc_1 , aunque la relación actividad/ cit *b* apoya que la transferencia de electrones a través del *by-pass* involucra a un citocromo tipo *b*, pues existe una correlación entre esta actividad y el contenido de citocromo *b* en células donde la actividad del bc_1 es prácticamente nula.

En la cepa cianuro se determinó una disminución del 30% en los citocromos *a* y *b*. Existe una disminución similar en crecimiento y respiración, mientras que no se observan cambios en el contenido de $c + c_1$.

La medición de citocromos a temperatura ambiente en una cepa cultivada en presencia de 200 μ M de cianuro (Devars, 1998) arroja contenidos diferentes a los encontrados en este trabajo. El contenido de citocromo *b* y *c* son mayores, debido a que fueron calculados de espectros de preparaciones totalmente reducidas con ditionita menos espectros de preparaciones totalmente oxidadas, obteniéndose los máximos del citocromo *b* y *c*, sobrepuestos. Al reducir con ditionita, se reduce toda la cadena, de manera que los citocromos *b* y $c + c_1$ están apantallados, ya que sus máximos de absorción son cercanos. Al calcular el contenido de citocromo tipo *b* de un espectro reducido con ditionita menos un espectro reducido con ascorbato, el cual es oxidable por el citocromo *c* (el cual corresponde a 2/3 partes del máximo de absorción a 561 nm), la cuantificación es más precisa, lo mismo pasa con el contenido de citocromo $c + c_1$, el cual fue obtenido utilizando el espectro reducido con ascorbato menos el oxidado.

El contenido del citocromo tipo *a* (102 ± 7 pmol/ mg proteína) sí corresponde al que se obtuvo en este trabajo, debido a que justamente se obtiene del espectro reducido con ditionita menos el oxidado.

El reconocimiento del suero policlonal de α -AOX1 de *Chlamydomonas* hacia una banda proteica de un peso similar al de las enzimas reportadas, en una preparación mitocondrial de *Euglena* sugiere lo siguiente: *Euglena* posee los epítopes que reconoce el anticuerpo en *Chlamydomonas*; al haber reacción cruzada con el antígeno de planta usado (maíz) (datos no mostrados), se sugiere

que la región reconocida es conservada en diferentes organismos, apoyando que la enzima en *Euglena* comparte algunas características con su homóloga en plantas y en *Chlamydomonas*, aunque al utilizar mitocondrias de papa no hubo reconocimiento. La reacción positiva en *Chlamydomonas* utilizando un anticuerpo dirigido contra las AOX de voodoo lily (Derzaph, 1996) mostró que *Chlamydomonas* expresa la forma monomérica y dimérica de la enzima, como en plantas; sin embargo estudios más recientes en la secuencia de aminoácidos de *Chlamydomonas* (Dinant, 2001) evidenciaron la ausencia de la cisteína implicada en la regulación presente en la enzima dimérica, sugiriendo que en este organismo la forma activa es la especie monomérica, como parece suceder en *Euglena*, donde no se detecta una especie dimérica.

Por el contrario, en el ensayo con proteínas mitocondriales de *Euglena* fotosintética, donde el anticuerpo reconoció otra banda de peso molecular menor (32 kDa), que podría corresponder a la especie inactiva (Jarmuszkiewicz, 1997), apoyado además en que la respiración mitocondrial en estas células es totalmente sensible a cianuro.

CONCLUSIONES

- ◆ La exposición de *Euglena gracilis* a cianuro y antimicina incrementa la participación de los componentes alternos resistentes a estos inhibidores.
- ◆ Cuando la transferencia de electrones procede solo a través del *by-pass*, el L-, D- lactato y en mucha menor proporción el succinato son sustratos oxidables; cuando el bc_1 está activo, oxida preferentemente succinato y L-lactato y el *by-pass* L- y D- lactato.
- ◆ La AOX alterna de *Euglena gracilis* está relacionada de forma mas cercana a la oxidasa alterna de *Chlamydomonas reinhardtii*. que a la de plantas.
- ◆ La oxidasa alterna de *Euglena gracilis* es una enzima lábil, sensible a procesos de congelación y liofilización.
- ◆ El congelamiento y liofilización también alteran la sensibilidad a antimicina y mixotiazol de los complejos III y *by-pass* respectivamente.
- ◆ Existe un aumento en el contenido de rodoquinona-9 en las cepas expuestas a inhibidores, relacionado con un aumento en la participación de las vías alternas en la respiración, principalmente cuando el *by-pass* se ve involucrado.
- ◆ El cultivo en presencia de cianuro induce un aumento en el contenido quinónico total y en el contenido de ácidos grasos.
- ◆ Existe una disminución en el contenido de citocromos relacionado con una disminución en el crecimiento y consumo de oxígeno como efecto del cultivo en presencia de inhibidores.

PERSPECTIVAS

Euglena gracilis expuesta a inhibidores respiratorios como cianuro y antimicina, disminuye la transferencia de electrones a través de la vía clásica, aumentando la participación de las rutas alternas, relacionado con la presencia principalmente de rodoquinona 9.

La concentración de este compuesto en condiciones aeróbicas no disminuyó cuando el *bc₁*, o la citocromo c oxidasa son bloqueados, incluso en este último sistema (cultivos con cianuro), el contenido de este compuesto y de la ubiquinona aumentó, apoyando que es posible su participación en la respiración alternativa. Esto puede confirmarse realizando ensayos con rodoquinol, alimentando directamente al *by-pass* y a la AOX, para evaluar la transferencia de electrones de este compuesto reducido hacia estas enzimas. Además podrá calcularse la diferencia en afinidades de ambos componentes por este sustrato y por la ubiquinona.

Otro punto interesante es el estudiar la naturaleza del *by-pass*. Resultados mostrados en esta tesis sugieren que podría tratarse de un citocromo tipo *b*, sin embargo son necesarios análisis espectrofotométricos más detallados.

Respecto a la oxidasa alterna, es interesante encontrar que la clasificación de estas enzimas es más amplia, lo que puede explicar la inconsistencia o poca similitud que existe entre la evidencia que se ha obtenido en *Euglena* y la que se ha reportado en plantas. Estas características apoyan fuertemente una función, regulación y características bioquímicas asociadas más a las enzimas que se han encontrado en otros organismos eucariontes no fotosintéticos, como levaduras o tripanosomátidos.

El análisis más profundo de estas características y de la inferencia en la función que realiza en *Euglena* puede establecer una relación más estrecha con estos organismos.

Bibliografía

1. Albury MS, Affourtit C and Moore A (1998), A highly conserved glutamate residue (Glu- 270) is essential for plant alternative oxidase activity, *J. Biol. Chem.*, 273: 30301- 30305.
2. Albury MS, Dudley P, Watts FZ and Moore AL (1996), Targeting the plant alternative oxidase protein to *Schizosaccharomyces pombe* mitochondria confers cyanide- insensitive respiration, *J. Biol. Chem.*, 271: 17062- 17066.
3. Andersson ME, Nordlund P (1999), A revised model of the active site of alternative oxidase, *FEBS Lett.* 449: 17- 22.
4. Affourtit C, Heaney SP, Moore AL (2000) Mitochondrial electron transfer in the wheat pathogenic fungus *Septoria Tritici*: on the role of the alternative respiratory enzymes in fungicide resistance, *Biochim. Biophys. Acta* 1459: 291- 298.
5. Baker JE, Diphenylamine inhibition of electron transport in plant mitochondria (1963) *Arch. Biochem. Biophys.*, 103: 148- 155.
6. Berthold DA, Andersson ME, Nordlund P (2000) New insight into structure and function of the alternative oxidase, *Biochim. Biophys. Acta* 1460: 241- 254.
7. Buetow DE (1989) The mitochondrion, *The biology of Euglena*, Vol IV, Academic Press, New York, pp. 247- 314.
8. Chaudhuri M, Ajayi W, Hill GC (1998) Biochemical and molecular properties of the *Trypanosoma brucei* alternative oxidase, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 95: 53- 68.
9. Clarkson AB, Bienen EJ, Pollakis G, Grady RW (1989) Respiration of bloodstream forms of the parasite *Trypanosoma brucei brucei* is dependent on a plant alternative oxidase, *J. Biol. Chem.*, 264: 17770- 17776.
10. Covián RM (2000) Cadenas respiratorias en protistas, *BEB*, 19: 226- 236.
11. Day DA, Whelan J, Millar AH Siedow JN and Wiskich JT (1995), Regulation of the alternative oxidase in plant and fungi, *J. Plant Physiol*, 22: 497- 509.
12. Degli Esposti M, Lenaz G (1991) The kinetic mechanism of ubiquinol: cytochrome c reductase at steady state, *Arch. Biochem. Biophys.*, 289 (2), 303- 312.
13. Derzaph TLM and Weger HG, (1996), *J. Physiol.*, 32: 621- 623.

14. Devars S, Hernandez R, Coviàn R, García-Horsman A, Barquera B and Moreno-Sánchez R (1998) The content of alternative oxidase of *Euglena* mitochondria is increased by growth in the presence of cyanide and is not cytochrome c, *J. Euk. Microbiol.*, 45: 122- 130.
15. Devars S, Torres-Márquez ME, Gonzalez- Halphen D, Uribe A, Moreno- Sánchez R (1992), Cyanide- sensitive and cyanide resistant of dark- grown *Euglena gracilis*, *Plant Sci.*, 82 : 37- 46.
16. Dinant M, Baurain D, Coosemans N, Joris B and Matagne RF (2001), Characterization of two genes encoding the mitochondria alternative oxidase in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Curr. Gen.*, 39 (2): 101- 108.
17. Doussièrè J, Vignais V (1984) AMP- dependence of the cyanide- insensitive pathway in the respiratory chain of *Paramecium tetraurelia*, *Biochem J.* 220: 787- 794.
18. Elthon TE, Nickels RL and McIntosh L, (1989), Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria, *Plant Physiol.*, 89: 1311- 1317.
19. Finnegan PM, Wooding AR and Day D (1999), An alternative oxidase monoclonal antibody recognises a highly conserved sequence among alternative oxidase subunits, *FEBS Lett.* 447: 21- 24.
20. Gray KA, Grooms M, Mylykallio H, Moomaw C, Slaughter G y Daldal F, (1994), *Rhodobacter capsulatus* contains a novel *cb-* type cytochrome c oxidase without a Cu_A center, *Biochemistry*, 33: 3120- 3127.
21. Grover SD, Laties GG (1981) Disulfiram inhibition of the alternative respiratory pathway in plant mitochondria, *Plant Physiol.*, 68: 393- 400.
22. Guerin MG and Camougrand NM (1994), Partitioning of electron flux between the respiratory chains of the yeast *Candida parasilopsis*: parallel working of the two chains, *Biochim. Biophys. Acta* 1184: 111- 117.
23. Guerin MG, Zniber S and Camougrand NM (1991), The antimycin- A- insensitive respiratory pathway of *Candida parasilopsis*: evidence for a second quinone involved specifically in its functioning, *Biochim. Biophys. Acta* 1057: 124- 130.
24. Hutner SH, Bach MK y Ross GIM (1956) A sugar containing basal medium for vitamin b₁₂ assay with *Euglena*: application to body fluids, *L. Protozool.*, 3, 101- 105.

25. Ito Y, Saisho D, Nakazono M, Tsutsumi N and Hirai A (1997) Transcript levels of tandem- arranged alternative oxidase genes in rice are increased by low temperature, *Gene*, 203: 121- 129.
26. Jarmuszkiewicz W, Wagner A, Wagner M and Hryniewiecka L (1997), Immunological identification of the alternative oxidase of *Acanthamoeba castellanii* mitochondria, *FEBS Letters* 411: 110- 114.
27. Jasso-Chávez R, Torres- Márquez ME and Moreno- Sánchez R (2001), The membrane- bound L- and D- lactate dehydrogenase activities in mitochondria from *Euglena gracilis*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 390 (2): 295- 303.
28. Joseph- Horne T, Wood PM, Wood CK, Moore AL, Headrick J, Holifomon D (1998) Characterization of a split respiratory pathway in the wheat "take all" fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *J. Biol. Chem.*, 273: 11127- 11133.
29. Laemmli UK (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680-685.
30. Lambowitz AM, Sabourin UR, Bertrand H, Nichols R and McIntosh L (1989) Immunological identification of the alternative oxidase of *Neurospora crassa* mitochondria, *Mol. Cell. Biol.*, 9: 1362-1364.
31. Maxwell DP, Wang Y and McIntosh L (1999), The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 8271- 8276.
32. Meeuse BJD (1975) Thermogenic respiration in Aroids, *Annu Rev Plant Physiol*, 26: 117- 126.
33. Millenaar FF, González-Meler MA, Fiorani F, Welschen R, Ribas- Carbo M, Siedow JN, Wagner AM and Lambers H (2001) Regulation of alternative oxidase activity in six wild monocotyledonous species. An in vivo study at the whole root level. *Plant Physiol.*, 126: 376- 387.
34. Moore AL and Siedow JN (1991), The regulation and nature of the cyanide- resistant alternative oxidase of plant mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, 1059: 121-140.
35. Moreno- Sánchez R, Covián R, Jasso- Chávez R, Rodríguez- Enriquez S, Pacheco Moisés F and Torres- Márques ME (2000), Oxidative phosphorylation supported by an alternative respiratory pathway in mitochondria from *Euglena*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1457: 200- 210.

36. Muskiet FAJ (1983) Capillary gas chromatographic profiling of total long- chain fatty acids and cholesterol in biological materials, *J. Chromat.* 278: 231- 244.
37. Powls R, Hemming (1966) The biosynthesis of quinones from *p*- hydroxybenzoic acid in *Euglena gracilis* var. *bacillaris*, *Phytochem.*, 5: 1249- 1255.
38. Popov VN, Simonian RA, Skulachev VP, Starkov AA (1997), Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria, *FEBS Lett.*, 415: 87- 90.
39. Priest JW and Hajduk JW (1992), Cytochrome *c* reductase purified from *Crithidia fasciculata* contains an atypical cytochrome *c*₁, *J. Biol. Chem.* , 267: 20188- 20195.
40. Purvis AC and Shewfelt RL (1993), Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues?, *Physiol. Plant.*, 88: 712- 718.
41. Rhoads DM, Umbach AL, Sweet CR, Lennon AM, Rauch GS, Siedow JN (1998) Regulation of the cyanide- resistant alternative oxidase of plant mitochondria, *J. Biol Chem.* 273: 30750- 30756.
42. Ribas- Carbo, Aroca R, González- Meler MA, Irigoyen JJ and Sánchez- Díaz M (2000) The electron partitioning between the cytochrome and alternative respiratory pathways during chilling recovery in two cultivars of maize differing in chilling sensitivity, *Plant Physiol.*, 122: 199-204.
43. Rieske JS (1967), *Methods Enzymol* 10 239- 245.
44. Schonbaum GR, Bonner WD, Storey BT, Bahr JT (1971), Specific inhibition of the cyanide- insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hydroxamic acids, *Plant Physiol.*, 47: 124- 128.
45. Sharpless TK and Butow RA (1970), A: An inducible alternate terminal oxidase in *Euglena gracilis* mitochondria, *J. Biol. Chem.*, 245: 58- 70.
46. Sharpless TK and Butow RA (1970), B: Phosphorylation sites, cytochrome complement, and alternate pathways of coupled electron transport in *Euglena gracilis* mitochondria, *J. Biol. Chem.*, 245: 50- 57.
47. Siedow JN (1995) The active site of the cyanide- resistant oxidase from plant mitochondria contains a binuclear iron center, *FEBS Lett.* 362: 10- 14.
48. Siedow JN, Girvin ME (1980), Alternative respiratory pathway: Its role in seed respiration and its inhibition by propyl gallate, *Plant Physiol.* 65: 669- 674.
49. Siedow JN, Umbach AL (2000), The mitochondrial cyanide- resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity, *Biochim. Biophys. Acta* 1459: 432- 439.

50. Sluse FE and Jarmuszkiewicz W (1998) Alternative oxidase in the branched mitochondrial respiratory network: an overview on structure, function, regulation, and role. *Braz J Med Biol Res* 31 : 733-747.
51. Stewart CR, Martin BA, Reding L and Cerwick S (1990), Respiration and alternative oxidase in corn seedling tissues during germination at different temperatures, *Plant Physiol.* 92: 755- 760.
52. Stewart CR, Martin BA, Reding L and Cerwick S (1990), Seedling growth, mitochondrial characteristics and alternative respiratory capacity of corn genotypes differing in cold tolerance, *Plant Physiol.*, 92: 761- 766.
53. Takamiya S, Kita K, Wang H, Weinstein PP, Hiraishi A, Oya H and Aoki T (1993), Developmental changes in the respiratory chain of *Ascaris* mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta.* 1141: 65- 74.
54. Takamiya S, Matsui T, Taka H, Murayama K, Matsuda M and Aoki T (1999), Free-living nematodes *Caenorhabditis elegans* possess in their mitochondria an additional rholoquinone, an essential component of the eukaryotic fumarate reductase system, *Arch. Biochem. Biophys.* , 371: 284- 289.
55. Threlfall DR (1972) Incorporation of L-[Me-²H₃] methionine into isoprenoid quinones and related compounds by *Euglena gracilis*, *Biochim. Biophys. Acta.* 280: 472- 480.
56. Umbach AL, Siedow JN (1996), The reaction of the soybean cotyledon mitochondrial cyanide resistant oxidase with sulfhydryl reagents suggests that alpha- keto acid activation involves the formation of a thiohemiacetal, *J. Biol. Chem.* 271: 25019- 25026.
57. Van den Bergen CWM, Wagner AM, Krab K and Moore AL (1994), The relationship between electron flux and the redox poise of the quinone pool in plant mitochondria, *Eur. J. Biochem.* , 226: 1071- 1078.
58. Van Hellemond JJ and Tielens AGM (1994) Expression and functional properties of fumarate reductase, *Biochem. J.*, 304: 321- 331.
59. Van Hellemond JJ, Klockiewicz M, Gaasenbeek CPH, Ross MH and Tielens AGM (1995), Rholoquinone and complex II of the electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes, *J. Biol. Chem.*, 270: 31065- 31070.
60. Van Hellemond JJ, Simons B, Millenaar FF and Tielens AGM (1998), A gene encoding the plant- like alternative oxidase is present in *Phytomonas* but absent in *Leishmania* spp., *J. Euk. Microbiol.*, 45 (4): 426- 430.

61. Wagner AM (1995) , A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida* cells, FEBS Letters, 368: 339-342.
62. Wagner AM, Krab Klaas (1995), The alternative respiration in plants: Role and regulation, *Physiol. Plant.*, 95: 318- 325.
63. Wagner AM and Wagner MJ (1995), Measurements of in vivo ubiquinone reduction levels in plant cells, *Plant. Physiol.* , 108: 277- 283.
64. Wagner AM and Moore AL (1997), Structure and function of the plant alternative oxidase: Its putative role in the oxygen defense mechanism, *Bioscience Reports*, 17 (3): 319- 333.
65. Wagner AM, Purvis AC (1998), Production of reactive oxygen species in plant mitochondria, A dual role for ubiquinone?, *Plant mitochondria: From gene to function*, p. 537- 541, edited by Moller IM, Glimelius K and Glaser E, Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
66. Yoshikawa S, Shinzawa-Ittoh K, Nakashima R, Yaono R, Yamashita E, Inoue N, Yao M, Jie-Fei M, Peters C, Mizushima T, Yamaguchi H, Tomizaki T, Tsukihara T (1998), Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome *c* oxidase, *Science*, 280: 1723- 1729.