



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DEL SODIO Y POTASIO SOBRE LAS ENZIMAS
MITOCONDRIALES DE LA LEVADURA
MARINA *Debaryomyces hansenii*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A
ANA BEATRIZ SANTA CRUZ GARCÍA



DIRECTOR DE TESIS: DR. ANTONIO PEÑA DÍAZ





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Ana Beatriz Santa Cruz García

FECHA: 02 Ene, 2004

FIRMA: Ana Beatriz Santa Cruz

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA

**Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

EFEECTO DEL SODIO Y POTASIO SOBRE LAS ENZIMAS MITOCONDRIALES DE LA LEVADURA MARINA *Debaryomyces hansenii*

realizado por ANA BEATRIZ SANTA CRUZ GARCIA

con número de cuenta 97549987 , quien cubrió los créditos de la carrera de: **BIOLOGIA**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Investigador Emérito Dr. Antonio Peña Díaz

Peña
[Signature]

Propietario

M. en I.B.B. Claudia Andrea Segal Kischinevzky

Propietario

Biol. Beatriz Rodarte Murguía

[Signature]

Suplente

Q.F.B. Norma Silvia Sánchez Sánchez

[Signature]

Suplente

M. en C. Juan Carlos González Hernández

[Signature]

**Consejo Departamental de
BIOLOGIA.**

[Signature]
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez.

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGIA.

A mi mamá,
Pues por ella estoy aquí y soy lo que soy.

A mis abues,
Los mejores que pudieron, pueden y podrán existir.

A mis tías, tíos y primos,
Por aguantarme como soy.

A Sergio,
1-7.

“NO AMES LO QUE ERES, SINO LO QUE PUEDES LLEGAR A SER “

INDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	14
MATERIAL Y METODOS	15
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFÍA	36

ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
DOC	Deoxicolato
FAD	Flavina adenina dinucleótido
GDH	Glutamato deshidrogenasa
IDH	Isocitrato deshidrogenasa
MDH	Malato deshidrogenasa
MES	(2-[N-Morfolinio] ácido etanosulfónico)
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
SDH	Succinato deshidrogenasa
TEA	Trietanol amina

INTRODUCCION

CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS LEVADURAS.

Levadura se deriva del latín "levare" que significa levantar. (Kocková-Kratochvilová, 1990). Las levaduras son hongos microscópicos, eucariontes unicelulares, aeróbicos facultativos, que pueden reproducirse por gemación o por fisión y existen algunas especies que forman un micelio verdadero o pseudo hifas. Su tamaño varía entre 1 y 100 micras. (Tuite y Oliver, 1991)

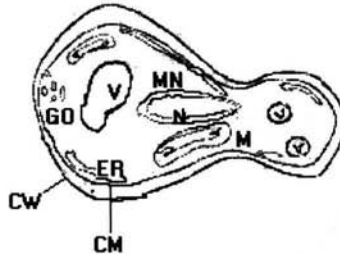


Figura 1. Estructura de la levadura. N=núcleo, MN=membrana nuclear, ER= retículo endoplasmático, V=vacuola, GO=aparato de Golgi, M=mitocondria, CW=pared celular, CM=membrana plasmática. (Kockova-Kratochvilova, 1990)

La facilidad y rapidez de los cultivos, recolección y transferencia de las levaduras de un medio a otro, así como su ciclo celular uniforme, regulación del volumen celular, el fácil manejo de su DNA y RNA y la síntesis de proteínas ofreció desde hace más de un siglo gran versatilidad para ser utilizadas en los laboratorios con muy diversos fines, entre los que destacan los estudios bioquímicos y de la fisiología microbiana en general (Rose y Harrison, 1987).

LAS MITOCONDRIAS

Es difícil saber quien descubrió primero el papel de las mitocondrias; sin embargo Altman en 1890, planteó que estas partículas, a las que llamó bioplastos, eran elementos vivos, capaces como las bacterias, de vivir de manera independiente.

Después de Altman los nombres se suceden: Brenda, Michelis, Otto Warburg; este último desde 1913 tuvo la idea de la relación que existía entre estos gránulos y la

respiración celular. Por último, fue Bensley, en 1930, quien abrió la vía de estudios modernos sobre las mitocondrias, buscando aislarlas a partir de células por la técnica de centrifugación diferencial, lo que no fue logrado sino hasta 1948 por Hogeboom, Schneider y Palade. Fue entonces cuando Kennedy y Lehninger pudieron demostrar que las mitocondrias eran capaces de efectuar todas las etapas de oxidación del ciclo de Krebs (Volfin,2002). Pero no es sino hasta 1957 cuando se introdujo el término “mitocondrion” por Agar y Douglas, para describir estos pequeños cuerpos localizados en el citoplasma.

MORFOLOGIA Y FUNCIONES MITOCONDRIALES

Las mitocondrias se encuentran en todas las células eucariontes y su estructura es muy similar en plantas, animales y hongos. Son los organelos celulares encargados de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular; por tanto, actúan como centrales energéticas de la célula, donde los carbohidratos, lípidos y aminoácidos se oxidan a CO_2 y H_2O por el oxígeno molecular y la energía se transforma en enlaces de ATP (Lehninger, 1995).

Los principales procesos metabólicos que se efectúan en la mitocondria son los siguientes: (Prebble, 1981)

- Descarboxilación oxidativa del piruvato a acetil CoA.
- Oxidación de los ácidos grasos a acetil CoA.
- Ciclo de Krebs.
- Consumo de oxígeno por la cadena respiratoria
- Producción de energía en forma de ATP acoplada al gradiente de H^+ producida por la cadena respiratoria.

Las mitocondrias son organelos ovoides de diferentes tamaños, 0.1 a 0.5 μm por 1 a 2 μm , limitados por una doble membrana dispersos en el citoplasma celular. Su número en una célula depende de la fase del ciclo celular estudiada, de la fuente de carbono y de la concentración de oxígeno. Aproximadamente, el 12% del volumen total de las células está ocupado por las mitocondrias (Stevens, 1981).

Las mitocondrias poseen 2 membranas, una externa y otra interna, las cuales difieren en su composición lipídica y en su actividad enzimática (Figura 2). La membrana externa es lisa y algo elástica, mientras la interna, que es mucho mayor, tiene pliegues o invaginaciones llamadas crestas, además de que su superficie es granular lo que refleja su alto contenido proteico. Entre la membrana externa e interna existe un espacio denominado espacio intermembranal, que alberga moléculas que comunican a las dos membranas (Lehninger,1995).

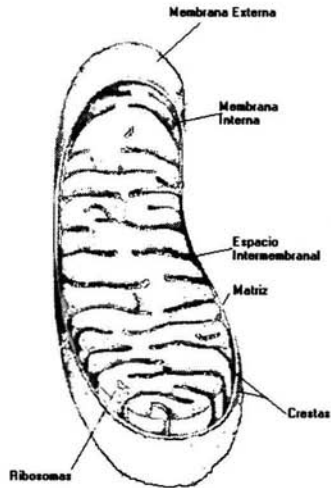


Figura 2. Esquema de la estructura mitocondrial, donde se muestran sus principales componentes.

Dentro de la membrana interna existe un espacio llamado matriz, que es una fase gelatinosa rica en enzimas. Esta presenta cambios de volumen y de organización durante su actividad respiratoria, además de que contiene DNA y ribosomas. Aquí se lleva a cabo la fosforilación oxidativa y transporte de iones, NAD y metabolitos.

En la siguiente tabla se muestran algunas funciones metabólicas que se llevan a cabo en cada uno de los compartimentos mitocondriales.

FUNCIONES	ENZIMAS Y MACROMOLÉCULAS ASOCIADAS
<p style="text-align: center;">MEMBRANA EXTERNA</p> <p>Oxidación de aminas aromáticas. Biosíntesis de cardiolipinas.</p>	<p>Monoamino oxidasa.</p>
<p style="text-align: center;">ESPACIO INTERMEMBRANAL</p> <p>Mantenimiento del balance de adenín nucleótidos.</p>	<p>Adenilato cinasa Nucleósido difosfocinasa y monofosfocinasa.</p>
<p style="text-align: center;">MEMBRANA INTERNA</p> <p>Fosforilación oxidativa. Transporte de Nicotinamida adenín dinucleótidos. Transporte de iones. Transporte de metabolitos.</p>	<p>ATP sintetasa ADP/ATP translocasa. Uniportador de Ca^{2+} y de K^{+}. Acarreador de piruvato, antiportador H_2PO_4/OH, antiportador citrato/ malato, etc.</p>
<p style="text-align: center;">MATRIZ</p> <p>Oxidación del piruvato a acetil CoA. Oxidación de cuerpos cetónicos y de ácidos grasos de acetil CoA. Oxidación de aminoácidos. Parte del ciclo de la urea. Procesamiento de proteínas importadas del citosol. Síntesis de genes que codifican para el RNA mitocondrial y algunas proteínas.</p>	<p>Complejo piruvato deshidrogenasa. Carbamilfosfato sintetasa y ornitina transcarbamilasa. Proteasa para péptidos señal específicos. DNA mitocondrial, DNA polimerasa y primasa. Ribosomas y factores para la transcripción y traducción.</p>

Tabla 1. Algunas de las funciones mitocondriales.

La membrana externa no contiene ninguno de los componentes de la fosforilación oxidativa (Fosforilación enzimática del ADP a ATP acoplada a la transferencia de electrones desde un sustrato hasta el oxígeno), pero posee flavoproteínas como la monoamino- oxidasa, que cataliza la oxidación de diversas monoaminas como la adrenalina (Lehninger,1995). La membrana interna está compuesta de aproximadamente 70% de proteínas y 30% de lípidos, donde predominan la fosfatidiletandomina y cardiolípin; aquí se localizan los citocromos b, c, c₁, a y a₃, F₁ ATPasa y las deshidrogenasas del succinato y NADH. También aquí se encuentra el sistema de fosforilación oxidativa en los eucariontes.

La matriz contiene casi todas las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos: el malato y glutamato deshidrogenasa, que se emplean como los marcadores mitocondriales durante la obtención de fracciones mitocondriales. La única enzima del ciclo de Krebs que no se encuentra soluble en la matriz es la succinato deshidrogenasa, la cual se encuentra en la membrana interna. También en la matriz se encuentran las enzimas de la β-oxidación de los ácidos grasos y la maquinaria genética encargada de producir algunas proteínas como el citocromo b y las proteínas de la fracción Fo de la ATPasa (Lehninger,1995).

CICLO DE KREBS, DEL ACIDO CITRICO O DE LOS ACIDOS TRICARBOXILICOS

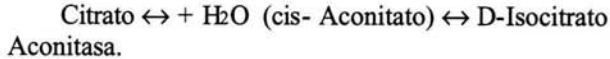
El ciclo de los ácidos tricarboxílicos fue postulado por Krebs en 1937 con su nombre actual; constituye la vía final común para la oxidación de diversos sustratos que en su mayoría entran, como acetil CoA; todas las reacciones de esta vía se llevan a cabo en la matriz mitocondrial. En el ciclo de Krebs se sintetiza un GTP en animales y ATP en plantas y bacterias, y hay cuatro reacciones de óxido-reducción en las que tres pares de electrones son transferidos al NAD⁺ y un par al FAD para dar 3 NADH + 3H⁺ y un FADH₂ que entran a la cadena transportadora de electrones, donde transfieren sus electrones al oxígeno, reoxidándose y generando tres moléculas de ATP por cada NADH + H⁺ y dos moléculas de ATP por cada FADH₂. De esta forma, se produce un total de doce fosfatos de alta energía por cada acetil CoA que ingresa a la cadena para ser oxidados a H₂O + CO₂ (Stryer, 1988). Una de las funciones primarias del ciclo de Krebs es la de aportar hidrógenos a la cadena respiratoria (Lehninger, 1995). El proceso consiste en una serie de reacciones consecutivas que termina en el mismo compuesto en que se inicia (Peña,1983).

El ciclo consta de 8 pasos:

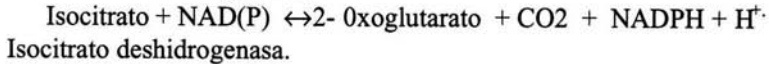
1. Formación de citrato.-

Acetil CoA + Oxaloacetato + H₂O → Citrato + CoA-SH.
Enzima citrato sintasa.

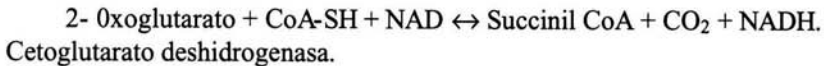
2. Formación de isocitrato.-



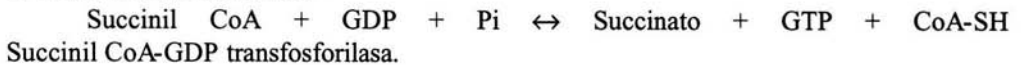
3. Formación de 2- Oxoglutarato.-



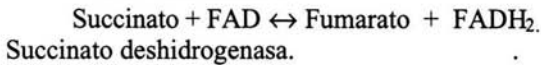
4. Formación de Succinil CoA.-



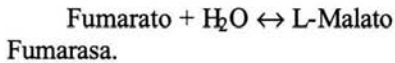
5.- Formación de Succinato.-



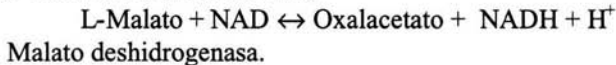
6.- Formación de Fumarato.-



7.- Formación de Malato.-

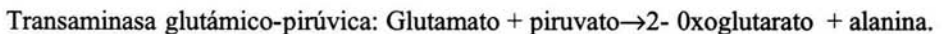
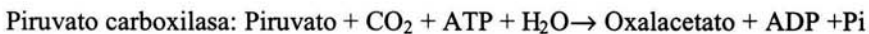
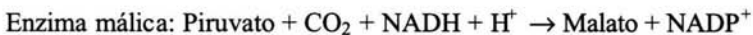


8.- Formación de oxalacetato.-



OTRAS FUNCIONES DEL CICLO DE KREBS

Existen un buen número de moléculas que pueden convertirse en intermediarios del ciclo y entrar a él. Como estas reacciones suelen ser reversibles, también permiten que los intermediarios del ciclo se conviertan en otras moléculas. A continuación se enuncian algunas de estas reacciones:



ENZIMAS MITOCONDRIALES

Glutamato deshidrogenasa (GDH)

Con ayuda de enzimas auxiliares, como la glutamato deshidrogenasa, algunos intermediarios del ciclo de Krebs como el 2- Oxoglutarato, pueden ser removidos de él para dar lugar a aminoácidos. En este caso, el glutamato tiene el mismo esqueleto de carbono que el 2- Oxoglutarato y es sintetizado por transaminación. Luego, el glutamato usa los carbonos del 2- Oxoglutarato para dar purinas, arginina, prolina, glutamina (Lehninger, 1995). La glutamato deshidrogenasa está compuesta por varios polipéptidos, y se encuentra en la matriz mitocondrial. La glutamato deshidrogenasa tiene una participación muy importante en el metabolismo de aminoácidos, en el ciclo de Krebs y en el de la urea.

Malato deshidrogenasa (MDH)

La enzima malato deshidrogenasa fue descubierta en 1910 por Batelli, Stern y Thunberg. Se encuentra en la mitocondria de los eucariontes, funcionando dentro del ciclo de Krebs y en el ciclo malato-aspartato. La malato deshidrogenasa mitocondrial es una enzima dimérica con dos subunidades iguales de un peso molecular aproximado de 33,000 (Stefan, 1992) y una masa molecular de 66-68k Da (Jensen y cols, 1996). Presenta su actividad máxima a un pH de 7.5. Se ha observado que tiene una conservación evolutiva.

Isocitrato deshidrogenasa (IDH)

La enzima isocitrato deshidrogenasa está ampliamente distribuida en la naturaleza; es uno de los componentes del ciclo de Krebs. Tiene un peso molecular de 340,000 y está compuesta por ocho subunidades idénticas.

Succinato deshidrogenasa (SDH)

La enzima succinato deshidrogenasa es una flavoproteína que contiene flavín-adenín-dinucleótido unido covalentemente; se encuentra íntimamente ligada a la membrana interna mitocondrial. Tiene un peso molecular de 100,000 y contiene una molécula de FAD, ocho átomos de hierro y ocho átomos de azufre lábiles frente a los ácidos. La enzima purificada posee dos subunidades, cuyos pesos moleculares son de 30,000 y 70,000, respectivamente (Lehninger, 1995).

La cadena respiratoria mitocondrial

La cadena transportadora de electrones está constituida por los siguientes componentes oxido-reductores: grupos hemo (a, b, c₁ y c), grupos hierro-azufre (Fe-S), mononucleótidos de flavina (FMN), flavín adenín dinucleótidos (FAD) y átomos de cobre (Cu₁, Cu₂), los cuales se encuentran asociados a complejos oligoméricos de las proteínas. Estos últimos están formados por un número diferente de polipéptidos y se encuentran parcialmente embebidos en la bicapa lipídica de la membrana mitocondrial interna (González-Halphen y Vázquez-Acevedo, 1990).

En la fosforilación oxidativa, la síntesis de ATP está acoplada al gradiente de protones formado a través de la membrana interna mitocondrial. Embebidas en la membrana mitocondrial interna se encuentran las proteínas transportadoras, principalmente los citocromos, que forman la cadena respiratoria. Estas proteínas se ensamblan en cinco complejos multiproteicos, denominados I, II, III, IV y V. Que son:

- Complejo I, NADH-deshidrogenasa, NADH-coenzima Q reductasa o NADH-ubiquinona oxidoreductasa.
- Complejo II, Succinato deshidrogenasa o Succinato-coenzima Q reductasa.
- Complejo III, Citocromo *c*-coenzima Q oxidoreductasa o Complejo citocromo *bc*₁.
- Complejo IV o Citocromo oxidasa.
- Complejo V o ATP sintasa

Estos complejos se muestran en la figura 3.

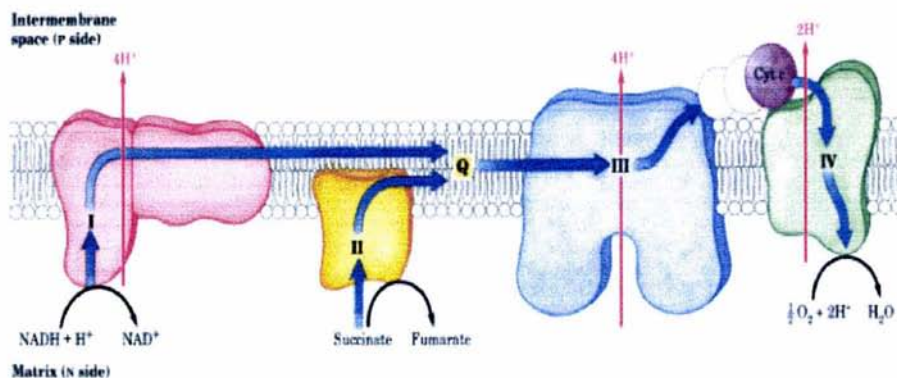


Figura 3. Arreglo de los cuatro complejos respiratorios en la membrana interna mitocondrial interna del mamífero. Complejo I (NADH-CoQ reductasa), Complejo II (Succinato-CoQ reductasa), Complejo III (CoQ-citocromo c reductasa o complejo bc), Complejo IV (citocromo C oxidasa) y la ATP sintasa o complejo V. Los complejos están unidos funcionalmente por la ubiquinona (Q) y por el citocromo c (Cit c). También se muestran los sitios de translocación de protones Sitio I (NADH-CoQ reductasa), Sitio II (CoQ-citocromo c reductasa) y Sitio III (Citocromo c oxidasa).

En las mitocondrias de la levadura, los complejos II a V se encuentran presentes y son semejantes a los descritos para los mamíferos; por otro lado, el complejo I no se expresa en *Saccharomyces cerevisiae* y en su lugar hay dos NADH deshidrogenasas, una externa y otra interna (Hatefi, 1985).

El complejo I, NADH-deshidrogenasa, NADH-coenzima Q reductasa o NADH-ubiquinona oxidoreductasa recibe los electrones de la oxidación del NADH y del succinato, y los pasa a la coenzima Q, la cual se desplaza libremente a través de la membrana mitocondrial interna.

El complejo II, Succinato deshidrogenasa o Succinato-coenzima Q reductasa, tiene un peso molecular de 140 kDa y está formado por cuatro o cinco polipéptidos diferentes, codificados por el DNA nuclear. Contiene a la succinato deshidrogenasa, que es el único componente del ciclo de Krebs que está asociado a la membrana interna mitocondrial, y su función consiste en donar equivalentes reductores a la cadena respiratoria a través de la poza de quinonas (Hatefi, 1985). Este complejo recibe los electrones de la oxidación del $FADH_2$ y los pasa a la coenzima Q.

El complejo III, Citocromo *c*-coenzima Q oxidoreductasa o Complejo citocromo bc_1 , cataliza la transferencia de electrones de la CoQ al citocromo *c*, acoplada a la translocación de H^+ (Beattie y Villalobo, 1982). El complejo III contiene tres diferentes proteínas con grupos redox: el citocromo *b*, el citocromo c_1 y la ferro sulfoproteína de Rieske (Siedow y cols., 1978). La transferencia de electrones a través del complejo III está acoplada a la translocación de protones. Como resultado neto de la oxidación de una molécula de QH_2 , se reducen dos citocromos *c* y se translocan $4H^+$ al lado positivo de la membrana (Trumpower, 1990^a; Trumpower, 1990b). En resumen recibe los electrones de la reoxidación del coenzima Q y los transfiere al citocromo *c*, un transportador electrónico proteico que también puede desplazarse por la membrana.

El complejo IV o Citocromo *c*-oxidasa, cataliza la oxidación de cuatro citocromos *c* para reducir una molécula de oxígeno, que además recibe cuatro H^+ , produciéndose dos moléculas de agua. Esta reacción irreversible es el paso final de las series de reacciones redox involucradas en la respiración (Wikström, 1977). El complejo IV tiene un peso molecular de 160 kDa, y está compuesto por catorce subunidades. Las subunidades I, II y III son codificadas por el DNA mitocondrial y las restantes son codificadas por el DNA nuclear (Power y cols., 1984^a).

El complejo V o ATP sintasa, permite el retorno de los protones al espacio de la matriz mitocondrial a través de un canal específico. La energía liberada por este proceso exergónico impulsa la síntesis endergónica de ATP a partir de ADP y Pi (www.bioq.unizar.es).

En la cadena respiratoria, el transporte de electrones se lleva a cabo probablemente por las múltiples colisiones de los componentes redox: los cuatro complejos respiratorios, la ubiquinona y el citocromo *c* soluble (Hackenbrock y cols., 1986). De esta forma, la energía química de la respiración se transforma en un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna mitocondrial. Esta energía capturada por el complejo V (ATP sintasa ó ATPasa sensible a oligomicina) que la utiliza para promover la unión entre el fosfato (Pi) y el ADP para formar ATP (Mitchell, 1961).

La Coenzima Q. Ubiquinona, es una benzoquinona ligada a diversas unidades de isopreno (CoQ₁₀, CoQ₆, 10 en células de mamíferos, 6 en bacterias). La cola isoprenoide proporciona a la molécula su carácter apolar, permitiéndole una difusión rápida a través de la membrana mitocondrial interna. Su oxidoreducción afecta a un electrón cada vez, a través de un intermediario semiquinona, proporcionando una interfase de conexión entre los transportadores de dos electrones y los citocromos que sólo son transportadores de un electrón. Además, como no solo transporta electrones, sino también protones, juega también un papel clave en el acoplamiento del flujo de electrones con el movimiento de protones.

Los citocromos son moléculas proteicas que poseen un anillo de porfirina con 1 átomo de hierro, denominado grupo heme; difieren entre si en su cadena proteica y en la afinidad por los electrones. Los citocromos transportan un solo electrón sin su respectivo protón a lo largo de la cadena transportadora de electrones. Los citocromos son:

- Citocromo a.- grupo prostético formil porfirin-hierro (580-590 de absorción)
- Citocromo b.- grupo prostético protoporfirin-hierro (556-558 de absorción)
- Citocromo c.- grupo prostético mesohem substituido con un enlace covalente entre hierro y proteína (549-555)

El Citocromo c es una proteína de pequeño tamaño, 13 kDa, asociada a la membrana interna mitocondrial por el espacio intermembranal, pero que se extrae con facilidad en forma soluble. Presenta una secuencia de aminoácidos muy conservada a lo largo de la evolución con una identidad de casi 50% de residuos entre organismos muy diversos. Posee como grupo prostético un hemo de tipo *c* que acepta un electrón del cit *c*₁ del CIII. Posteriormente se desplaza hasta el CIV para donar dicho electrón al centro de cobre binuclear que contiene este enzima.

CARACTERISTICAS GENERALES DE *Debaryomyces hansenii*

La definición de levadura marina comprende todas las levaduras, que son capaces de vivir y reproducirse, para perpetuar su población en un ambiente marino (Van Uden y Fell, 1968). *Debaryomyces hansenii* es una levadura marina, halófila, resistente a pH alcalinos y a altas concentraciones de NaCl en el medio de crecimiento. (Thomè-Ortiz et al., 1998). Esta concentración puede llegar hasta 4.5 M, aunque su óptimo va desde 1.8 hasta 2.4 M. Su tamaño varia entre 2-3.5µ x 2.5-4µ. (Norkrans, 1966).

Se ha observado que *Debaryomyces hansenii* en presencia de concentraciones de 1M de NaCl o KCl el crecimiento es mayor que en medio sin sal. Además, las células acumulan altas concentraciones de cationes como sodio y potasio, además de que poseen una gran habilidad para intercambiar tanto Na⁺ como K⁺ por el catión opuesto; esta característica es una de las razones por la cual puede soportar altas concentraciones de sales. Según la literatura, la osmotolerancia de *Debaryomyces hansenii* no es solo la consecuencia de su capacidad para mantener sus niveles intracelulares de sal, sino también influye el que las

enzimas encargadas de la producción de glicerol no solo son muy tolerantes a la sal, sino se ven estimuladas por esta.

Con respecto a los efectos de las altas concentraciones de sales sobre las enzimas metabólicas, se sabe poco, pero se han hecho estudios como el de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa donde se ha observado que el efecto inhibitorio o tóxico, tanto del NaCl como el del KCl es casi nulo.

También acumula trehalosa, lo que de entrada indicaría que este azúcar podría estar jugando un papel importante dentro del metabolismo de *Debaryomyces hansenii*, sin embargo llama la atención que parece no modificar sus concentraciones ante concentraciones elevadas de sal (González-Hernández, J.C., 2000). Este azúcar se ha descrito como un protector de enzimas ante situaciones de estrés, principalmente el calor, frío y deshidratación (Referencias pertinentes del grupo de Crowe y Uribe), por lo que se decidió investigar si este azúcar es capaz de proteger a las enzimas estudiadas de la inactivación por la sal.

Todo esto lleva a plantear la pregunta de las razones de la resistencia o preferencia de *Debaryomyces Hansenii* a las altas concentraciones de sal, y la necesidad de estudiar este fenómeno. Entre los factores participantes, puede existir una resistencia de las enzimas a altas concentraciones de sal, sin perder su actividad. Ya se han analizado las actividades de las enzimas glucolíticas, pero es importante conocer el comportamiento de las enzimas mitocondriales y los componentes de la cadena respiratoria, dado que estas levaduras respiran mejor en presencia de altas concentraciones de sal. Esto último constituye el objeto de este trabajo.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto producido por altas concentraciones de sodio y potasio, sobre algunas enzimas del ciclo de Krebs: GDH, MDH, IDH, SDH, así como sobre los niveles de los citocromos de la cadena respiratoria.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Determinar las actividades de las enzimas GDH, MDH, IDH y SDH en las levaduras cultivadas en NaCl y KCl.
- Estudiar los efectos de diferentes concentraciones de NaCl y KCl sobre las mismas enzimas.
- Estimar los niveles de los citocromos de la cadena respiratoria mitocondrial en levaduras cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl y KCl.
- Determinar el efecto de la trehalosa sobre las enzimas.

MATERIAL Y METODOS.

MATERIALES.

Material biológico

Como material biológico se utilizó la levadura *Debaryomyces hansenii* variedad Y7426.

METODOS.

Medios de cultivo:

El medio de cultivo utilizado fue YPD, preparado como lo indica la tabla; además se utilizó YPD con 0.6 M de NaCl y YPD con 0.6 M de KCl.

COMPUESTO	CANTIDAD POR LITRO	PORCENTAJE
Extracto de Levadura	10grs.	1%
Peptona	10grs.	1%
Glucosa	20grs.	2%

Para el medio sólido se agregó agar al 2%.

El medio se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Cultivo de la levadura:

Se preparó un preinóculo con una asada de levadura a 200 ml. de medio YPD y se incubó por espacio de 24 hrs. a 30° C con agitación a 250 rpm. Este preinóculo se pasó a un matraz con 800 ml de YPD y se incubó por espacio de 48 hrs. a 30° C con agitación.

Finalizado el tiempo de incubación, se centrifugaron las células a 5,000 rpm durante 2.5 min., el paquete se resuspendió en agua estéril y se centrifugó por segunda vez a la misma velocidad y tiempo. Posteriormente se resuspendieron las células en 125 ml de agua destilada y se volvieron a incubar las células en ayuno por 15 hrs. (se prepararon 4 lts de medio para cada ensayo).

Transcurrido el tiempo se centrifugaron nuevamente 2 veces a 5,000 rpm durante 2.5 min. y se resuspendió el pellet al 50 % de su peso húmedo en buffer de obtención de mitocondrias preparado con manitol al 0.6 M, MES 0.5mM y BSA al 0.1% a un pH de 6.8, y se mantuvo en hielo.

Obtención de los extractos:

Para la obtención de los extractos se rompieron las levaduras en un homogenizador de células marca Braun, utilizando una cámara homogenizadora de 50 ml, en la cual se adicionó el 50% del volumen de perlas de vidrio de 0.25 mm de diámetro y el otro 50% con levaduras a una concentración de 500 mg/ml (peso húmedo). Para la ruptura se le dio un pulso de agitación durante 15 seg., con flujo continuo de CO₂. Para obtener la fracción mitocondrial se realizó centrifugación diferencial como lo indica la figura siguiente:

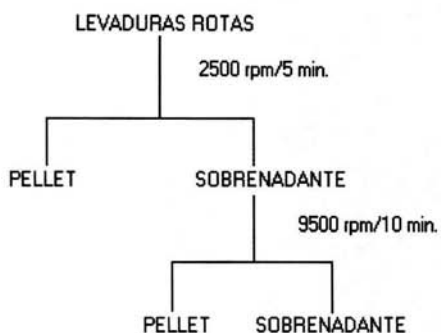


Fig.3.1.- Diagrama de centrifugación para la obtención de los extractos. Al final de la centrifugación de 10 min., el paquete con los extractos se resuspendió con un pincel.

Determinación de proteína por el método de Biuret

Una vez obtenido el extracto, se determinó la proteína por el método del Biuret. Para lo que se prepararon 5 tubos de ensayo, tal como lo muestra la tabla 3.2.

TUBOS	H ₂ O	ALBUMINA	DOC*	EXTRACTOS	BIURET
Blanco	800μl		200μl		2000μl
Estándar 100 (2 tubos)	700μl	100μl	200μl		2000μl
Prob. (2 tubos)	780μl		200μl	20μl	2000μl

*DOC: desoxicolato

Una vez preparados los tubos se agitaron y se incubaron durante 15 min. a temperatura ambiente. Se midió la absorbencia en un espectrofotómetro Shimadzu UV- 160 A, a una longitud de onda de 540nm.

Fórmula para preparar el reactivo de Biuret:

Solución I. En un vaso de precipitado se adicionaron 100ml de agua desionizada; 0.375 gr. de sulfato de cobre y 1.5 gr. de tartrato de sodio potasio; se mezclaron por agitación hasta disolver.

Solución II. En un vaso de precipitado se agregarón lentamente 7.5 gr. de hidróxido de sodio y 25ml de agua desionizada; se mezclaron por agitación hasta disolver.

Cuando ambas soluciones quedaron disueltas, la solución II se adicionó lentamente a la solución I, obteniendo una coloración azul. Posteriormente se aforó a un volumen final de 250ml.

Actividad de la Malato deshidrogenasa:

Se prepararon los siguientes reactivos:

- Buffer MOPS 0.1 M, pH 7.0
- Malato-TEA, 100 mM, pH 7.0
- NAD⁺ 10 mg/ml

En una celda se colocaron los siguientes reactivos:

- | | |
|--------------------|---------|
| - H ₂ O | 1.20 ml |
| - Buffer MOPS | 0.15 ml |
| - Malato-TEA | 0.15 ml |
| - NAD ⁺ | 0.15 ml |
| - Extractos | 40 µl |

Se colocó la celda en el fluorómetro SLM-Aminco a una longitud de onda de 340nm de excitación y 460nm de emisión durante dos minutos, para equilibrar la temperatura a 30 °C y iniciar la reacción con el extracto. Se dejó correr la reacción por espacio de 2 min.

Determinación de la actividad de la Glutamato deshidrogenasa:

Se prepararon los siguientes reactivos:

- MOPS-TEA, 0.1 M, pH 7.0
- Cetoglutarato-TEA, pH 7.0
- NADH, 10 mg/ml

En una celda se colocaron las siguientes cantidades de reactivos:

- H₂O .80 ml
- Buffer MOPS 0.15 ml
- α - Cetoglutarato-TEA 50 μ l
- NADPH 10 μ l
- Extractos 40 μ l
- NH₄

Se colocó la celda en el fluorómetro SLM-Aminco a una longitud de onda de 340nm de excitación y 460nm de emisión durante dos minutos, para equilibrar la temperatura a 30 °C y iniciar la reacción con el extracto. Se dejó correr la reacción por espacio de 2 min.

Determinación de la actividad de la Isocitrato deshidrogenasa.

Se prepararon los siguientes reactivos:

- Buffer MOPS 0.1 M, pH 7.0
- Isocitrato-TEA, 100 mM, pH 7.0
- NAD⁺ 10 mg/ml

En una celda se colocan las siguientes cantidades de reactivos:

- H₂O 1.20 ml
- Buffer MOPS 0.15 ml
- Isocitrato 0.15 ml
- NAD 0.15 ml
- Extractos 40 μ l

Se colocó la celda en el fluorómetro SLM-Aminco a una longitud de onda de 340nm de excitación y 460nm de emisión durante dos minutos, para equilibrar la temperatura a 30 °C y iniciar la reacción con el extracto. La reacción se dejó correr por espacio de 2 min.

Determinación de la actividad de la Succinato deshidrogenasa:

Se prepararon los siguientes reactivos:

- Buffer MOPS 0.1M, pH 7.0
- Succinato- TEA, 100 mM, pH 7.0
- FAD 10 mg/ml

En una celda se colocaron los siguientes reactivos:

- | | |
|--------------------|------------|
| - H ₂ O | 1.20 ml |
| - Buffer MOPS | 0.15 ml |
| - Succinato | 0.15 ml |
| - FAD | 0.15 ml |
| - Mitocondrias | 40 μ l |

Se colocó la celda en el fluorómetro SLM-Aminco a una longitud de onda de 340nm de excitación y 460nm de emisión durante dos minutos, para equilibrar la temperatura a 30 °C y, arrancar la reacción con el extracto. La reacción se dejó correr por espacio de 2 min.

Curva de inhibición con NaCl ó KCl:

Se realizó una curva de inhibición de NaCl y KCl las siguientes concentraciones: 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM y 600 mM.

Esta curva se realizó con ambas enzimas, de levaduras crecidas tanto en medio YPD solo, como con medio adicionado tanto con NaCl como con KCl.

Efecto de la trehalosa

Con la concentración tanto de KCl como de NaCl que inhibió, se probó el efecto de la trehalosa a concentraciones de 100, 200, 300, 400, 500 y 600 mM, sobre las enzimas mitocondriales, provenientes de levaduras crecidas en las tres condiciones, YPD y YPD adicionado con ambas sales.

Determinación de los citocromos:

Se colocó en un tubo de ensayo:

- 4.8 ml de H₂O.
- 200 μl de mitocondrias.

Se colocan 1 ml de la mezcla anterior en una celda de 1mm de paso de luz. A esta celda se le agrega una pizca de persulfato de amonio con el fin de oxidar los citocromos, con esta cubeta se obtuvo el espectro de 395 a 650 nm. Esta medición se tomó como referencia para el trazo con los citocromos oxidados.

Para medir los citocromos reducidos se agregó en la celda de 1 mm de paso de luz, .5 ml de la mezcla de las mitocondrias y una pizca de ditionita (hidrosulfito de sodio), con el fin de reducir. Esta determinación se realiza en las mismas condiciones que la anterior.

RESULTADOS

La malato deshidrogenasa.

Se estudió en primer lugar la enzima malato deshidrogenasa. Se midió la actividad enzimática en extractos de levaduras crecidas en YPD, realizando experimentos para definir los efectos, tanto de la presencia de las sales durante el crecimiento de las células, como los observados mediante su presencia durante la determinación de la actividad.

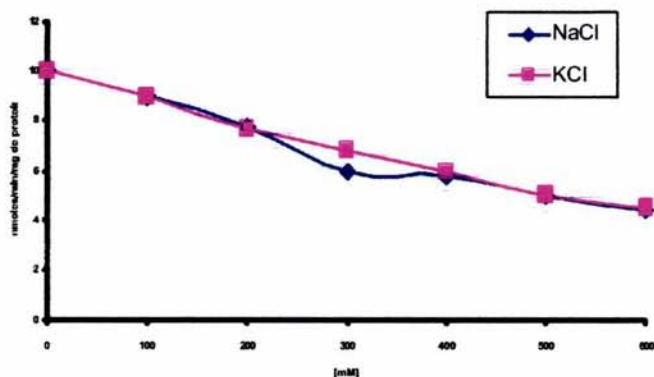


Fig. 4. Efecto de diferentes concentraciones de NaCl y KCl sobre la actividad de la malato deshidrogenasa en levaduras cultivadas en medio YPD sin la adición de sales. La actividad se encuentra en nmoles/min/mg de proteína.

En este caso, como se puede apreciar en la Fig. 4, encontramos un efecto inhibitorio progresivo. Partiendo de una actividad de alrededor de 10 nmoles/min/mg de proteína, a la más alta concentración de 600mM de sal donde se encontró una actividad cercana a 4 nmoles/min/mg de proteína.

De la misma manera se estudiaron los efectos de las sales en levaduras crecidas con medio YPD al cual se le agregó 1.0 M de NaCl o KCl y luego los efectos de la adición de las sales sobre la actividad de la malato deshidrogenasa.

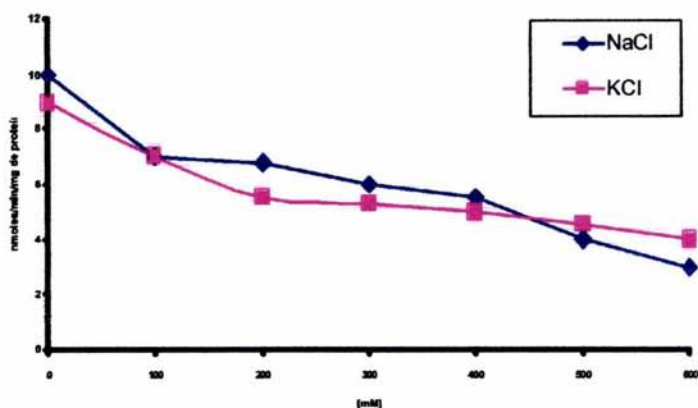


Fig. 5. Efecto de diferentes concentraciones de NaCl y KCl sobre la malato deshidrogenasa en levaduras cultivadas en medio YPD al que se agregó 1.0 M de NaCl. La actividad se encuentra en nmoles/min/mg de proteína.

Después se estudiaron los efectos directos de las dos sales, pero así como en las levaduras crecidas en presencia, ya fuera de NaCl o KCl, y analizando los efectos directos de ambas sales. En resumen, tampoco se encontraron diferencias grandes de los efectos de las sales, a las observadas con la enzima de las levaduras crecidas en YPD solo. La gráfica 5 y 6 muestran los resultados obtenidos.

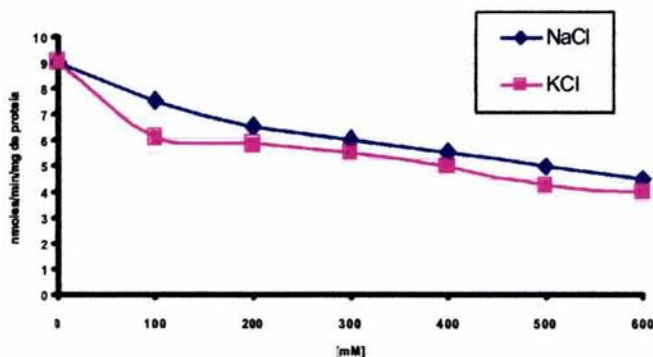


Fig. 6. Efecto de diferentes concentraciones de NaCl y KCl sobre la enzima malato deshidrogenasa en levaduras cultivadas en medio YPD adicionado con 1 M de KCl. La actividad se encuentra en nmoles/min/mg de proteína.

Se puede observar por los resultados obtenidos con la enzima malato deshidrogenasa, que su comportamiento, muestra un mismo patrón de descenso de la actividad para condiciones experimentales semejantes (en las mismas condiciones). Se decidió sin embargo probar otra enzima, también perteneciente al ciclo de Krebs, pero de la membrana mitocondrial, para definir si este comportamiento se repetía, la succinato deshidrogenasa.

Se estudió la succinato deshidrogenasa siguiendo el mismo esquema de las otras; es decir, la actividad control en mitocondrias de células crecidas en YPD, o en YPD adicionado de 1.0 M de NaCl o KCl. También, luego de obtener los extractos, en ellos se estudiaron de nuevo los efectos directos de las mismas sales, en condiciones semejantes a las de las otras dos enzimas; es decir, adicionando NaCl o KCl para observar su comportamiento.

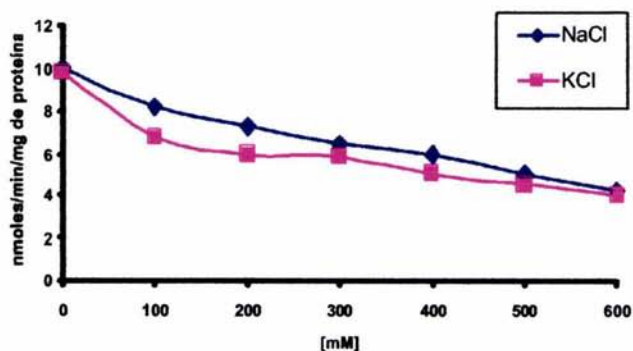


Fig. 7. Efecto de diferentes concentraciones de NaCl y KCl sobre la succinato deshidrogenasa de levaduras cultivadas en YPD. La actividad se encuentra en nmoles/min/mg de proteína.

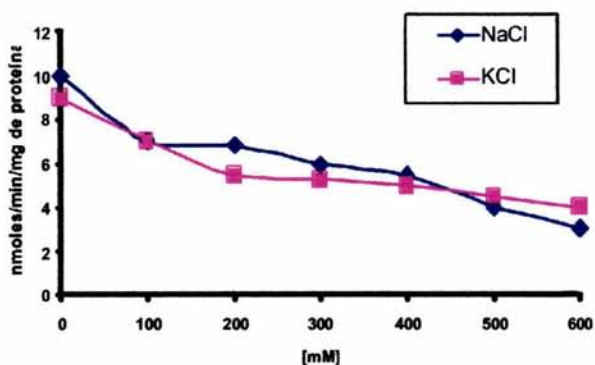


Fig. 8. Efecto de diferentes concentraciones de NaCl y KCl sobre la enzima succinato deshidrogenasa en levaduras cultivadas en medio YPD adicionado con 1.0 M de NaCl. La actividad se encuentra en nmoles/min/mg de proteína.

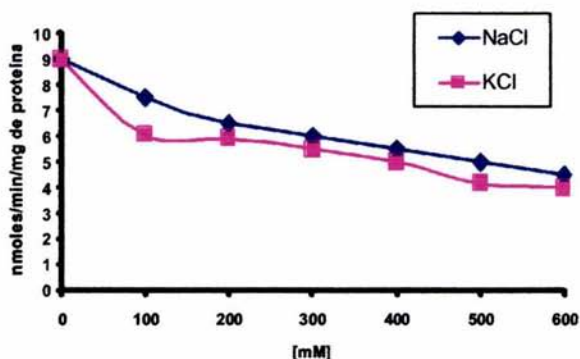


Fig. 9. Efecto de diferentes concentraciones de NaCl y KCl sobre la actividad de la succinato deshidrogenasa en levaduras cultivadas en medio YPD adicionado con 1 M de KCl. La actividad se encuentra en nmoles/min/mg de proteína.

Curiosamente, no obstante de tratarse de una enzima alojada en la membrana de la mitocondria, y como lo muestran las Figs. 7 a 9, el descenso en la actividad enzimática es progresivo a medida que se aumentan las concentraciones de sal, de manera semejante a lo observado con la MDH.

Con los resultados semejantes encontrados en el comportamiento de las dos enzimas estudiadas, se decidió analizar los efectos de las sales, NaCl y KCl sobre la isocitrato deshidrogenasa, utilizando el mismo esquema de determinar los efectos sobre la actividad enzimática sin sales y a diferentes concentraciones de ellas. Los resultados se muestran en las Figs. 10 a 12, ante sus respectivos controles de las levaduras crecidas en YPD, o en YPD al que se agregó NaCl o KCl.

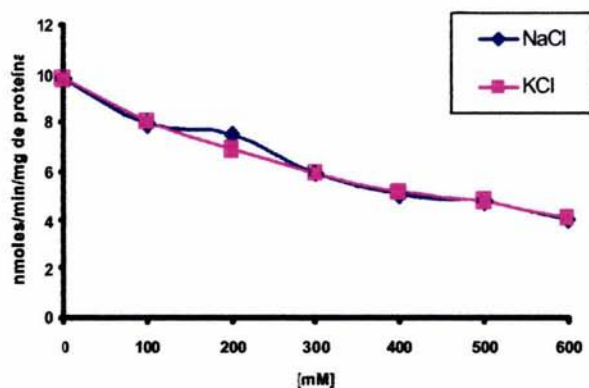


Fig. 10. Efecto de diferentes concentraciones de NaCl y KCl sobre la isocitrato deshidrogenasa de levaduras cultivadas en YPD sin adición de sal.

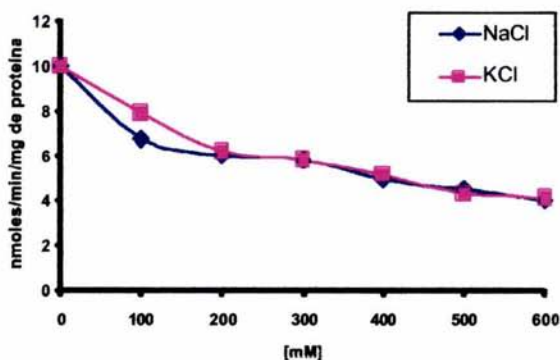


Fig. 11. Efecto de diferentes concentraciones de NaCl y KCl sobre la isocitrato deshidrogenasa en levaduras cultivadas en medio YPD adicionado con 1 M de NaCl.

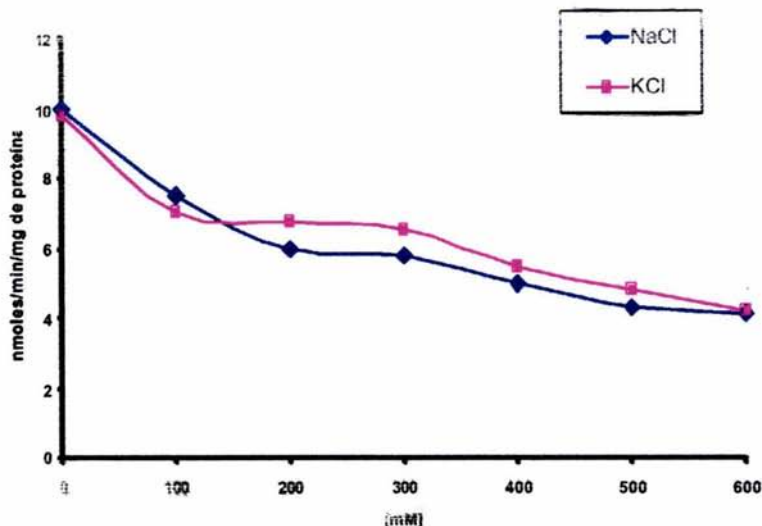


Fig. 12. Efecto de diferentes concentraciones de NaCl y KCl sobre la isocitrato deshidrogenasa en levaduras cultivadas en medio YPD adicionado con 1M de KCl.

La glutamato deshidrogenasa

Al estudiar la enzima glutamato deshidrogenasa dependiente NADPH. Se midió la actividad enzimática en extractos de levaduras crecidas en YPD, tomándola como control para observar los efectos que podía provocar diferentes concentraciones de NaCl y KCl. Los resultados de actividad enzimática obtenidos en este caso no existen, dado que no se pudo obtener la actividad de la enzima, esto dado por la presencia de represión catabólica, pues cuando las mitocondrias presentan una buena actividad en el ciclo de ácido cítrico, se inhibe la desaminación oxidativa del glutamato y solo en el caso de que se necesite combustible para el ciclo del ácido cítrico aumenta su actividad, suministrando 2-oxoglutarato para el ciclo y liberando NH_4 , y como en este caso las levaduras fuerón crecidas en medio rico, el ciclo de Krebs tenía todos los elementos para funcionar activamente sin la necesidad de utilizar a la enzima para suministrar 2-oxoglutarato al ciclo.

En resumen, el efecto de la adición de diferentes concentraciones tanto de NaCl como de KCl sobre las enzimas malato deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa cuando se utilizaron mitocondrias extraídas de levaduras crecidas en medio YPD, fueron inhibitorios en todos los casos, repitiéndose los patrones de inhibición en cuanto a concentraciones en las tres enzimas estudiadas, además de que este efecto sólo es

marcado a las concentraciones elevadas, fenómeno que ya se había observado en estudio previos realizados a la enzima gliceraldehido 3- fosfato deshidrogenasa .

Efecto de la trehalosa

Dada la inhibición progresiva de las sales sobre las enzimas mitocondriales, hasta llegar a niveles importantes a las concentraciones altas, se decidió investigar el posible papel de la trehalosa (α -D-glucopiranosil-[1-1]- α -D-glucopiranososa), que existe en concentraciones significativas en *D. hansenii* (González-Hernández J.C., 2000). Este azúcar se ha descrito como un protector de enzimas ante situaciones de estrés, principalmente el calor, frío y deshidratación (Sanpedro J., 2000), se decidió investigar si este azúcar es capaz de proteger a las enzimas estudiadas de la inactivación por la sal.

Para estudiar esta posible protección en las distintas enzimas, se utilizaron levaduras crecidas, o bien en YPD, o el mismo al que se agregó 0.6 M de NaCl o KCl. Se escogió ahora esta concentración de sal en el medio de cultivo porque no hay gran diferencia en la acumulación de Na^+ y K^+ entre esta concentración y 1.0 M. Luego a las muestras se les agregó, como se indica en cada experimento, 500 mM de cada sal, pues con esta concentración, como se observó en los resultados anteriores, se obtenía una inhibición superior al 50% en la actividad enzimática. Luego, a cada muestra, durante la medida de la actividad, se le agregó trehalosa 400 o 600 mM para observar el efecto del azúcar sobre la enzima. Estas concentraciones de trehalosa se seleccionaron porque se encontró en el laboratorio que *D. hansenii* acumula concentraciones de este orden del azúcar.

Al agregar la trehalosa a las mitocondrias y observar la actividad enzimática, en contra de lo esperado, se registró un descenso en la actividad (Fig. 13), tanto en las mitocondrias sin adición de sal (control), como en las que se agregó NaCl y KCl 500 mM; la trehalosa, en lugar de proteger, inhibió, tanto en la enzima estudiada sin sal, como en aquella a la que se le agregaron las sales. Los resultados fueron semejantes en las cuatro enzimas, pero sí se observó un dato interesante: aunque con sólo dos puntos en cada caso, se observó que la pendiente de la inhibición fue mayor en los controles respectivos que en las enzimas medidas en presencia de sal, de modo que las diferencias en las actividades son mayores en ausencia de trehalosa que en su presencia, al menos para las concentraciones ensayadas. Los resultados se pueden ver en las Figs. 13 a 15.

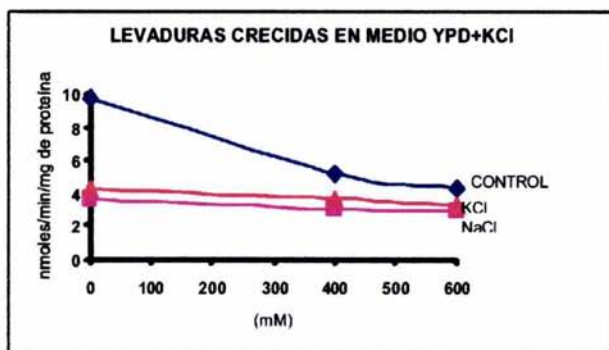
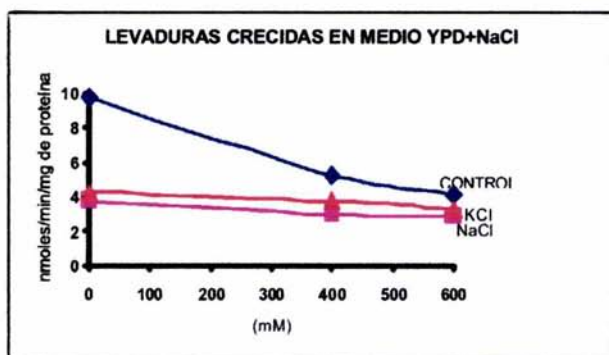
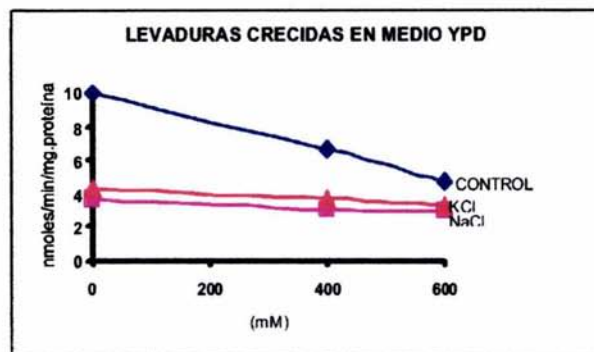


Fig. 13. Efecto de dos concentraciones de trehalosa sobre la actividad de la malato deshidrogenasa de extractos de levadura cultivadas en medio YPD, o bien YPD más 0.6 M de NaCl ó KCl. El ensayo se realizó en ausencia o presencia de 500 mM de NaCl o KCl.

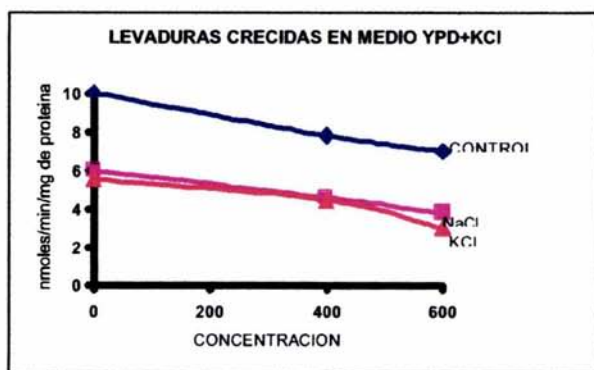
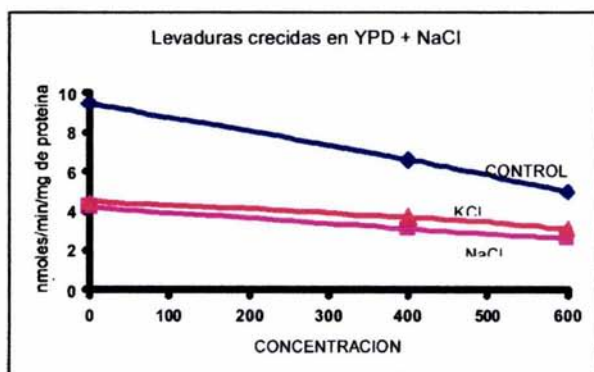
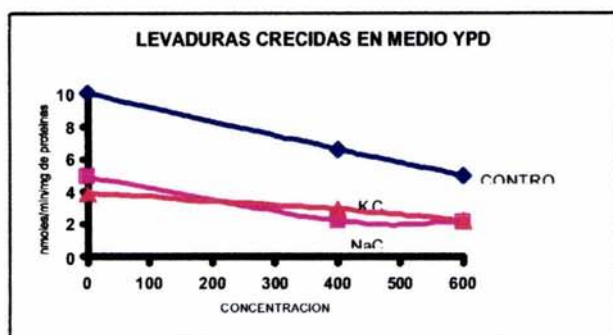


Fig. 14. Efecto de dos concentraciones de trehalosa sobre la actividad de la succinato deshidrogenasa de extractos de levadura cultivadas en medio YPD, o bien YPD más 0.6 M de NaCl ó KCl. El ensayo se realizó en ausencia o presencia de 500 mM de NaCl o KCl.

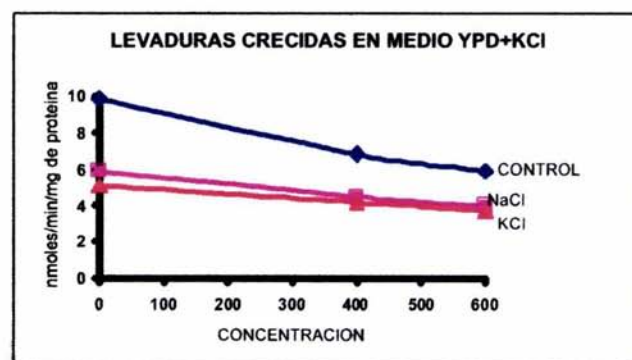
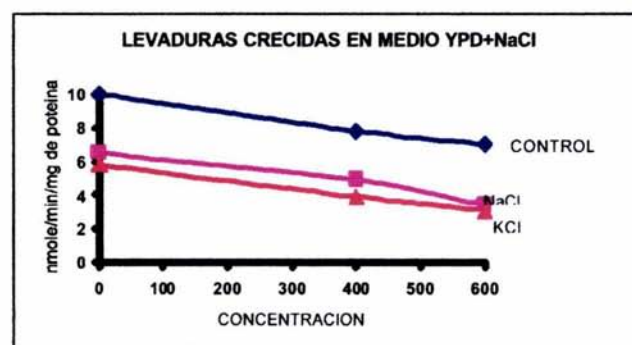
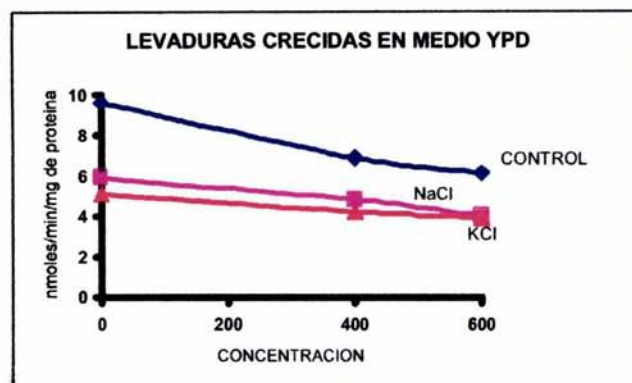


Fig. 15. Efecto de dos concentraciones de trehalosa sobre la actividad de la isocitrato deshidrogenasa de extractos de levadura cultivadas en medio YPD, o bien YPD más 0.6 M de NaCl ó KCl. El ensayo se realizó en ausencia o presencia de 500 mM de NaCl o KCl.

Dicho efecto se puede deber a que el mecanismo por el cual la trehalosa brinda protección es formando una matriz de azúcar que envuelve a la proteína, lo que podría impedir la entrada del sustrato y provocar la inhibición que estamos observando.

Para finalizar se estudiaron los espectros de los citocromos de las células, utilizando para esto mitocondrias extraídas de medio YPD, de medio YPD/NaCl y YPD/KCl. Este resultado se muestra en la Fig. 16.

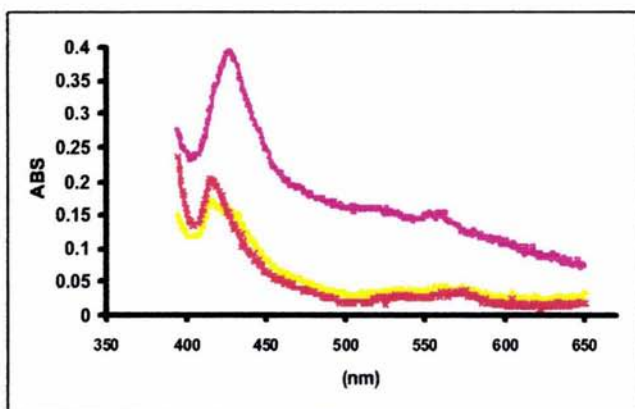


Fig. 16. Espectros de los citocromos de extractos de levaduras cultivadas en YPD (rosa), o en YPD/NaCl (amarillo) o YPD/KCl (naranja).

En los resultados presentados en la Fig. 16 destaca el citocromo *c* alrededor de los 550 nm, como lo señala la literatura; en el caso de las levaduras cultivadas en medio YPD, el pico del citocromo *c* no se observa muy alto, al igual que en el caso de las levaduras crecidas en medio YPD/KCl. En los extractos obtenidas de las levaduras crecidas en YPD más KCl, se observó un pico correspondiente al citocromo *c* (cerca de 550 nm) más alto, indicando que este componente de la cadena respiratoria se produce en mayor cantidad al cultivar a las células en presencia de KCl.

DISCUSION

En particular en las levaduras marinas como *Debaryomyces hansenii*, es importante estudiar el efecto que tienen tanto el NaCl como el KCl sobre las enzimas de la célula, pues a diferencia de otras, las levaduras marinas, al ser colocadas en presencia de concentraciones altas de sodio, semejantes a las del agua del mar (0.6 M) o superiores 1 M o más, lo acumulan en cantidades importantes (Thomé y cols., 1998). No obstante, sus actividades fisiológicas, como la velocidad de crecimiento, el bombeo de protones, la fermentación y la respiración, son ligeramente mayores. Cosa semejante ocurre con el K^+ , que es el catión más abundante del interior de casi todas las células. El potasio es además uno de los cationes más abundantes en la mitocondria (Diwan y cols. 1988) y tiene gran influencia en muchas reacciones enzimáticas y en las funciones mitocondriales, que se requieren para su funcionamiento (Uribe, 1991), además de que igual que el sodio, participa en la regulación de la presión osmótica y en el equilibrio ácido-básico.

El enfoque de nuestro trabajo consistió en estudiar los efectos de las sales de los principales cationes que se acumulan en la levadura cuando se le cultiva en presencia de concentraciones elevadas de NaCl ó KCl, condiciones en las que alcanza a concentrar poco más de 300 mM de K^+ , y alrededor de 200 mM de Na^+ . Se utilizaron dos enfoques diferentes: El primero consistió en cultivar las células en presencia de una concentración alta de sal (1 M), y medir las actividades de las enzimas obtenidas de extractos obtenidos rompiendo las células en un molino con perlas de vidrio. El segundo consistió en medir directamente el efecto de las mismas sales (NaCl o KCl) a concentraciones alrededor de las que se alcanzan dentro de las células al crecerlas en medios con un alto contenido de sal. Para ello se eligieron tres enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, las deshidrogenasas málica, isocítrica y succínica, la última de las cuales se encuentra en la membrana de la mitocondria. Además, se estudió la glutamato deshidrogenasa, otra enzima mitocondrial cercana al mismo ciclo de Krebs, medida en su forma dependiente de NADH, pues los datos del grupo de Luisa Alba (comunicación personal) han demostrado que la actividad de la glutamato deshidrogenasa NADPH dependiente aumenta cuando las células se crecen en presencia de concentraciones elevadas de NaCl.

De los datos obtenidos se desprenden algunas observaciones interesantes, pero la primera que llama la atención es que la actividad de las distintas enzimas seleccionadas para su estudio no disminuyó al crecer las células en presencia de cualquiera de las dos sales; si tomamos las actividades controles de cada una de las células como un índice de su síntesis, podemos inferir que esta no se altera, no obstante las elevadas concentraciones de los cationes, K^+ ó Na^+ que las células acumulan en su interior (Thomé y cols., 1998).

Un segundo hecho que debe señalarse, y que tiene que ver con el objeto del estudio que se realizó, es que las cuatro enzimas cuya actividad se midió en distintas condiciones, se inhibieron de manera semejante, no obstante que son distintas: la malato y la isocitrato deshidrogenasa son enzimas formadas por una sola cadena polipeptídica; la glutamato deshidrogenasa es una enzima multimérica, y la succinato deshidrogenasa, que es la única enzima que se encuentra unida a la membrana interna mitocondrial.

No obstante lo anterior, es importante señalar que la inhibición de la actividad en los cuatro casos, y a las concentraciones de Na^+ ó K^+ que se alcanzan dentro de la célula, al final de cuentas no son tan elevadas. El K^+ llega a acumularse a concentraciones poco mayores de 300 mM, y a estas concentraciones de KCl, la actividad todavía, en casi todos los casos, es de aproximadamente un 60 por ciento. Para el caso del sodio, la situación es todavía más favorable, pues este catión llega a acumularse hasta concentraciones de unos 200 mM, y en esta concentración, según nuestros experimentos, todavía conserva una actividad superior al 70 por ciento. Estos datos concuerdan con los obtenidos por el M. En C. Juan Carlos González en nuestro laboratorio (comunicación personal), quien estudió en un sistema semejante a la alcohol deshidrogenasa.

Otro efecto interesante que se pudo observar fue el provocado por la trehalosa, pues aunque no necesariamente se esperaba una protección de la actividad enzimática por parte de este azúcar y, en este caso, se presentó una inhibición de la actividad enzimática tanto en mitocondrias de levaduras crecidas en medio sin adición de sal como con adición de sal (la concentración utilizada fue de 500 mM). Los resultados obtenidos, sin embargo, no dejan de ser interesantes, dado que el azúcar inhibió a las cuatro enzimas estudiadas, es decir, no protegió contra la inactivación producida por la sal. Es de llamar la atención también que las pendientes de las curvas de inhibición, si bien sólo se trazaron con tres puntos, mostraron en general una pendiente menor cuando las enzimas ya estaban inhibidas por NaCl o KCl, que en los controles ensayados sin la adición de sal. Al parecer, los efectos no son aditivos; pero el efecto inhibitor se puede deber a la forma de protección que provee la trehalosa, pues este disacárido tiene gran capacidad para actuar como protector proteico; lo que se debe probablemente a que estabiliza la estructura compacta de la proteína además de que reduce los movimientos de su estructura central (Sampedro,2001). De esta forma, el mecanismo por el cual la trehalosa estabiliza la estructura nativa de las proteínas involucra su interacción directa con ellas, estableciendo uniones de hidrógeno; así la proteína queda embebida en una matriz de azúcar preservando su actividad y/o estructura. Dado este mecanismo de protección presentado por la trehalosa, puede ser que efectivamente este protegiendo la estructura de las enzimas estudiadas, pero al quedar dichas enzimas envueltas en la matriz del azúcar y, al verse reducidos sus movimientos estructurales, su actividad se vea disminuida por la dificultad de movimiento que pueda presentar para poder actuar sobre el sustrato. De hecho, una de las perspectivas pendientes de este trabajo consiste en estudiar la posible protección de las enzimas contra la inactivación térmica.

De los datos obtenidos, y del hecho que *Debaryomyces hansenii* acumula gran cantidad de trehalosa, es posible que el azúcar sea simplemente un material de reserva, aunque podría pensarse que lo hace para protegerse de los efectos de diferentes tipos de estrés.

En cuanto a los niveles del citocromo c, el hecho de que no se modifique cuando las células se cultivan en presencia de KCl, y sí en presencia de NaCl, requiere de un estudio más profundo. Por ahora sólo se puede concluir que este dato coincide con la mayor capacidad respiratoria de las células cultivadas en presencia de KCl, aunque no se vió afectada por la presencia de NaCl en el medio.

Por ahora, los resultados nos sugieren que por lo menos en el caso de las enzimas mitocondriales, malato, succinato e isocitrato deshidrogenasas muestran una alta resistencia

por parte de las enzimas a las altas concentraciones de sal sin perder su actividad, además de que la trehalosa acumulada por las células de la levadura no tiene una función protectora, por lo menos no en lo que se refiere a la actividad de estas enzimas mitocondriales.

CONCLUSIONES

- No obstante que durante el crecimiento en concentraciones elevadas de sal (1.0 M), *Debaryomyces hansenii* acumula concentraciones intracelulares de Na^+ , y en particular de K^+ , la malato, isocitrato y succinato deshidrogenasas parecen sintetizarse normalmente, a juzgar por las actividades de los controles encontradas en las diferentes condiciones de cultivo utilizadas.
- Las actividades de las enzimas, si bien se inhiben al agregar concentraciones altas de NaCl o KCl, mantienen una actividad importante, aún en presencia de las concentraciones de sal que suele acumular esta levadura al crecerla en presencia de concentraciones elevadas de sal, cerca de 200 mM de Na^+ y más de 300 mM de K^+ .
- La trehalosa no protegió la actividad de las enzimas estudiadas; probablemente se trate de un azúcar de reserva, o bien de un protector contra otros tipos de estrés.

BIBLIOGRAFIA

- Beattie, D.S. y Villalobo, A. (1982) Energy transduction by the reconstituted bc1, complex from yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **257**, 14745.
- Diwan, J.J., Haley, T., y Sanadi, D.R. (1988). Reconstitution of Transmembrane K Transport with a 53 Kilodaltons Mitochondrial Protein. *Biochem. Biophys. Res. Común.* **153**, 224-230
- González-Halphen, D. Y Vázquez Acevedo, M. (1990). Mitochondrias sanas, mitocondrias enfermas. *Información Científica y Tecnológica.* **12**, 27-31.
- González, J.C., Sampedro, J.G., Jiménez- Estrada, M. Y Peña, A. (2002) Producción de glicerol y trehalosa en *Debaryomyces hansenii* (Levadura Marina). Memorias del XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Puerto Vallarta, Jal. 3-8 de noviembre del 2002. Págs. c-77.
- Hackenbrock, R.C., Brad, Ch., y Grupte, S.S. (1986) The Random Collision Model an a Critical Assesment of Difusion and Collision in Mitochondrial Electron Transport. *J. Bioenerg. Biomemb.* **18**, 331-368.
- Hatefi, Y., Haavik, A.G. y Griffiths, D.E. (1962) Studies on the Electron Transfer System: Reduced coenzyme Q (QH₂)- cytochrome c reductase. *J.Biol. Chem.* **237**, 1681-1685.
- Hatefi, Y. (1985). The mitochondria Electron Transport and Oxidate Phosphorilation System. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 1015-1069.
- Kocková-Kratochvílová, A; (1990) Properties of Yeast Population, in *Yeast and Yeast like organisms*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (Federal Republic of Germany) VCH publishers, New York, NY. (USA). Pp 1-6.
- Jensen W., Armstrong J., De Giorgio J., Hearn M., (1996). Stability studies on pig heart mitochondrial malate dehydrogenase: the effect of salts and amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta.* 23-33.
- Lehninger A, (1995). Bioquímica. Ediciones Omega, S.A.
- Mitchell, P, (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature.* **191**, 144-148.
- Norkrans B.(1966) Studies on Marine Ocurring Yeast: Growth Related to pH, NaCl Concentration and Temperature. *Archv fur Mikrobiologie* **54**, 374-392.
- Peña, A. (1983) Química Biológica. Consejo para la enseñanza biológica, A.C. 90- 117.
- Power, S.D., Lochrie, M.A., Sevarina, K.A., Patterson, T.E. y Poyton, R.O. (1984). The Nuclear-coded Subunits of Yeast Cytochromo c Oxidase. *J.Biol.Chem.* **259**, 6564.

Prebble, J.N., (1981) Mitochondria and chloroplasts: basic concepts, Mitochondrial watermovement and substrate transport, Mitochondrial cation transport, in *Mitochondria and Chloroplasts and Bacterial Membranes*. Longman House Burnt Mill, Harlow, Essex, U.K. pp 1-5 y 137-160.

Rose, A.H. y Harrison, J.S.(1987) *Introduction, in The Yeast* (Rose, A.H. y Harrison, J.S., Eds.) Vol. 1. pp 1-4. Academic Press Inc; London.

Siedow, J.N., Pwer, S., Fransisco, F., De la Rosa, F.F y Palmer, G.(1978) The Preparation and Characterization of Highly Purified Enzimically Active Complex III from Baker's Yeast. *J. Biochem.* **253**, 2392.

Sampedro J., Cortés P., Muñoz-Clares R., Fernández A., Uribe S. (2000) Thermal inactivation of the plasma membrane H⁺- ATPasa from *Kluyveromyces lactis*. Protection by trehalose. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1544(2001) 64-73.

Steffan J., Minard K., McAlister-Henn L.(1992) Expression and Function of Heterologous Forms of Malate Dehydrogenase in Yeast. *Arch. Biochemistry and Biophysics*.Vol.293, 1, pp93-102.

Stevens, B. (1981). *In The molecular biology of the yeast, Saccharomyces* (J. Strathern, E. Jones and J. Broach, eds.) Vol. 1, pp.471-504. Cold Springs Harbor Press, Cold Spring Harbor.

Stryer, L. (1988). Glycolysis, in *Biochemistry*. **3a**. Ed. W.H. Freeman and Company, New York USA. Pp 362-363.

Thomé-Ortiz P., Peña A., Ramírez J.(1998) Monovalent Cation Fluxes and Physiological Changes of *Debaryomyces hansenii* Grown at High Concentrations od Kcl and NaCl. *Yeast*, 14, 1355-1371.

Trumpower, B.L. (1990a) Cytochrome bcl Complex of Microorganisms. *Microbiol. Rev.* **54**, 58-63.

Trumpower, B.L. (1990b) The Protonmotive Q Cycle Energy Transduction by Coupling of Proton Traslocation to Electron Transfer by Cytochrome bcl Complex. *J. Biol. Chem.* **265**, 11409-11412.

Uribe, S., Sánchez, N., Peña, A. (1991). Effects of K⁺ and other monovalent cations on yeast mitochondria. *Biochem. Int.* **24**, 615-624.

Van Uden N., Fell J.W.(1968) Marine Yeast. Advances in Microbiology of the Sea.Ed. M.R. Droop and E.S.Ferguson Wood. Vol 1. Academic Press and New York.

Volfin. www.geocities.com/fdocc/volfin.htm

Wikstrom, M. (1977) Proton Pump Coupled to Cytochrome c oxidase in mitochondria. *Nature*. **266**, 271- 273.