



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**INHIBICIÓN DE LA FERMENTACIÓN DE *Candida albicans*
POR EL CIANURO.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:
OMAR GONZÁLEZ LÓPEZ**



MÉXICO D. F.

2014



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: **PROFESOR:** DRA. ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES

VOCAL: **PROFESOR:** QFB. RUTH EDITH MARTÍN FUENTES

SECRETARIO: **PROFESOR:** DR. ANTONIO PEÑA DÍAZ

1ER. SUPLENTE: **PROFESOR:** M EN B. BEATRIZ RUIZ VILLAFÁN

2° SUPLENTE: **PROFESOR:** DRA. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 306-Oriente, Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Asesor del tema

Supervisor técnico

Dr. Antonio Peña Díaz

M en C. Norma S. Sánchez Sánchez

Sustentante

Omar González López

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	I
2. RESUMEN	1
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MARCO TEÓRICO	4
4.1 Propiedades Generales de las levaduras.....	4
4.2 Género <i>Candida</i>	4
4.3 Metabolismo	6
4.3.1 Fermentación.	7
4.3.2 Respiración	11
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
6. HIPÓTESIS	15
7. OBJETIVOS.....	16
8. METODOLOGÍA	17
8.1 Condiciones de cultivo	17
8.2 Preparación de extractos libres de células.....	18
8.3 Determinación de etanol.....	18
8.4 Transporte de potasio y acidificación del medio	20
8.5 Consumo de oxígeno.....	20
8.6 Actividad enzimática.....	21
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
9.1 Determinación de etanol en diversas cepas de <i>Candida</i> y <i>S. cerevisiae</i>	26
9.2 Transporte de potasio.....	28
9.3 Acidificación	32
9.4 Consumo de oxígeno.....	36
9.5 Determinación de etanol en extractos de <i>C. albicans</i> ATCC 10231	39
9.6 Determinación de actividades enzimáticas en extractos de <i>C. albicans</i> ATCC 10231	40
9.6.1 Hexocinasa.....	41

9.6.2 Fosfofructocinasa.....	41
9.6.3 Aldolasa.....	42
9.6.4 Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	42
9.6.5 Fosfoglicerato cinasa.....	43
9.6.6 Enolasa.....	44
9.6.7 Piruvato cinasa	44
9.6.8 Piruvato descarboxilasa.....	45
9.6.9 Alcohol deshidrogenasa.	45
10. DISCUSIÓN	46
11. CONCLUSIONES	51
12. PERSPECTIVAS.....	51
13. BIBLIOGRAFÍA	52
14. ANEXO.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

Título de la figura.	Página
Figura 1 Vía fermentativa	9
Figura 2 Cadena respiratoria en el género <i>Candida</i>	14
Figura 3 Ejemplo de gráfica de actividad enzimática	22
Figura 4 Inhibición de la producción de etanol en <i>Candidas in vivo</i>	26
Figura 5 Efecto del peróxido de hidrógeno en la producción de etanol en <i>Candida albicans in vivo</i>	27
Figura 6 Transporte de potasio y acidificación del medio en levaduras	29
Figura 7 Transporte de potasio en <i>C. albicans</i> : glucosa, efecto del cianuro	29
Figura 8 Transporte de potasio en <i>S. cerevisiae</i> : efecto del cianuro	30
Figura 9 Transporte de potasio en <i>C. albicans</i> : etanol, efecto del cianuro y H ₂ O ₂	31
Figura 10 Transporte de potasio en <i>S. cerevisiae</i> : efecto del cianuro y H ₂ O ₂	31
Figura 11 pH en <i>C. albicans</i> : glucosa	32
Figura 12 pH en <i>S. cerevisiae</i> : glucosa	32
Figura 13 pH en <i>C. albicans</i> : efecto del cianuro y peróxido de hidrógeno	33
Figura 14 pH en <i>S. cerevisiae</i> : efecto del cianuro y peróxido de hidrógeno	34
Figura 15 pH en <i>S. cerevisiae</i> : etanol	34
Figura 16 pH en <i>C. albicans</i> : etanol	35
Figura 17 pH en <i>S. cerevisiae</i> : efecto del cianuro y peróxido de hidrógeno	35

Figura 18	pH en <i>C. albicans</i> : efecto del cianuro y peróxido de hidrogeno	36
Figura 19	Respiración <i>C. albicans</i> : glucosa y cianuro	37
Figura 20	Respiración <i>S. cerevisiae</i> : glucosa y cianuro	37
Figura 21	Respiración <i>C. albicans</i> : etanol y cianuro	38
Figura 22	Respiración <i>S. cerevisiae</i> : etanol y cianuro	39
Figura 23	Producción de etanol en extractos de <i>C. albicans</i>	40
Figura 24	Actividad de hexocinasa	41
Figura 25	Actividad de fosfofructocinasa	42
Figura 26	Actividad de aldolasa	42
Figura 27	Actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	43
Figura 28	Actividad de fosfoglicerato cinasa	43
Figura 29	Actividad de enolasa	44
Figura 30	Actividad de piruvato cinasa	44
Figura 31	Actividad de piruvato descarboxilasa	45
Figura 32	Actividad de alcohol deshidrogenasa	45
Figura 33	Fluorescencia de NADH en <i>C. albicans</i> y <i>S.cerevisiae</i>	48
Figura 34	Transporte de potasio <i>C. albicans</i> : efecto de la antimicina A	55
Figura 35	Transporte de potasio <i>C. albicans</i> : efecto del CCCP	55
Figura 36	Transporte de potasio <i>C. albicans</i> : etanol, efecto antimicina A	56
Figura 37	Transporte de potasio <i>C. albicans</i> : etanol, efecto CCCP	56
Figura 38	Transporte de potasio <i>S. cerevisiae</i> : efecto de la antimicina A	57

Figura 39 Transporte de potasio <i>S. cerevisiae</i> : efecto del CCCP	57
Figura 40 Transporte de potasio <i>S. cerevisiae</i> : etanol, efecto de la antimicina A	58
Figura 41 Transporte de potasio <i>S. cerevisiae</i> : etanol, efecto del CCCP	58
Figura 42 Respiración <i>C. albicans</i> : efecto de la antimicina A y CCCP	59
Figura 43 Respiración <i>C. albicans</i> : efecto el cianuro y octilgalato	60
Figura 44 Respiración <i>C. albicans</i> : etanol, efecto antimicina A y CCCP	61
Figura 45 Respiración <i>C. albicans</i> : etanol, efecto cianuro y octilgalato	62
Figura 46 Respiración <i>S. cerevisiae</i> : efecto antimicina A y CCCP	63
Figura 47 Respiración <i>S. cerevisiae</i> : efecto del cianuro y octilgalato	64
Figura 48 Respiración <i>S. cerevisiae</i> : etanol, efecto antimicina A y CCCP	65
Figura 49 Respiración <i>S. cerevisiae</i> : etanol, efecto cianuro y octilgalato	66

Título de la tabla

Tabla 1 Taxonomía del género <i>Candida</i>	5
Tabla 2 Compuestos utilizados en transporte de potasio y acidificación del medio	20
Tabla 3 Compuestos utilizados en el consumo de oxígeno	21

1. ABREVIATURAS.

- Acetil CoA Acetil coenzima A.
- ADP Adenosín difosfato.
- ATCC *American Type Culture Collection.*
- ATP Adenosín trifosfato.
- BHAM Ácido benzhidroxámico.
- Bicina N,N-Bis(2-hidroxietil)-glicina.
- BSA Albúmina sérica bovina.
- CCCP Carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona.
- DHAP Dihidroxiacetona fosfato.
- DO Densidad óptica.
- H₂O₂ Peróxido de hidrógeno.
- ITP Inosina trifosfato.
- KCl Cloruro de potasio.
- KOH Hidróxido de potasio.
- MES Ácido 2-[N-morfolino] etanosulfónico.
- MgCl₂ Cloruro de magnesio.
- MgSO₄ Sulfato de magnesio.
- MOPS Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfónico.
- NaCN Cianuro de sodio.
- NAD⁺ β-Nicotín adenín dinucleótido (Oxidado).
- NADH β-Nicotín adenín dinucleótido (Reducido).
- NADPH β-Nicotín adenín dinucleótido fosfato (Reducido).
- Pi Fosfato inorgánico.
- SHAM Salicilhidroxamato.
- Sn Extractos libres de células, sin centrifugar.
- TEA Trietanolamina.
- Tris N-tris[hidroximetil]aminometano.
- U Unidad de actividad enzimática.
- YPD Medio de cultivo que contiene extracto de levadura, peptona y dextrosa (*Yeast peptone dextrose*).

2. RESUMEN.

Candida albicans es una levadura de interés clínico, por ser patógeno oportunista tanto en seres humanos como en animales. En cuanto a su metabolismo, se le considera como aerobio facultativo, con un predominio de los procesos aerobios para la máxima obtención de energía. Sin embargo, se ha demostrado que en esta levadura, el cianuro inhibe tanto la cadena respiratoria como la producción de etanol (glucólisis).

Se decidió evaluar el efecto que tiene este compuesto sobre la vía fermentativa y la participación de las mitocondrias, orgánulos comúnmente afectados por el cianuro; el cual es inhibidor específico de la citocromo c oxidasa en la respiración mitocondrial.

Se estudió el efecto del cianuro en *C. albicans* sobre diversos procesos bioquímicos: a) inhibe la producción de etanol *in vivo*, en todas las cepas del género *Candida*, efecto que no se observa en *Saccharomyces cerevisiae* (levadura modelo); b) inhibe el transporte de potasio y no permite la expulsión de protones al medio externo (glucosa y etanol como sustratos), sin embargo al agregar peróxido de hidrógeno, este efecto se revierte. Tal efecto tampoco se observa en *S. cerevisiae*; c) el consumo de oxígeno, se inhibe parcialmente. El porcentaje remanente, se debe a la existencia de una cadena alterna de transporte de electrones; d) la inhibición de la producción de alcohol por el cianuro se observó en extractos libres de células de *C. albicans* que poseían mitocondrias; este efecto tampoco se observó en los extractos que no poseían mitocondrias, en los que se obtiene un mayor rendimiento y e) disminuye la actividad de tres enzimas de la vía fermentativa: fosfofructocinasa, fosfoglicerato cinasa y alcohol deshidrogenasa. Este efecto sólo se determinó en extractos libres de células que poseían mitocondrias.

Estos datos nos orientan hacia una posible interacción de la fermentación con las mitocondrias en *C. albicans*. Sin embargo no contamos con información

suficiente para definir el mecanismo del fenómeno. Se propone como un posible mecanismo la presencia de complejos denominados metabolones, que asocian las enzimas de la vía fermentativa. También se han descrito asociaciones de algunas enzimas de la fermentación con las mitocondrias, que por un mecanismo que desconocemos, al inhibir la cadena respiratoria con cianuro, podría dar lugar a la inhibición de la vía fermentativa.

3. INTRODUCCIÓN.

C. albicans es una levadura de la Clase de los hemiascomicetos. Esta levadura forma parte de la microbiota normal de los seres humanos, así como de algunos animales; sin embargo, bajo ciertas circunstancias puede generar candidiasis en pacientes inmunodeprimidos, postquirúrgicos, con catéteres venosos e inclusive en lactantes, entre otros, por lo que se considera un microorganismo oportunista. Por este motivo, la mayoría de las líneas de investigación actuales se encuentran enfocadas en la búsqueda e implementación de nuevos tratamientos terapéuticos, basados en aspectos bioquímicos particulares de esta levadura. Se le considera como un microorganismo aerobio facultativo, debido a su capacidad para obtener energía a partir de dos rutas metabólicas: fermentativa y respiratoria (Calahorra, *et al.*, 2012).

En *C. albicans*, la fosforilación oxidativa es llevada a cabo por una cadena respiratoria clásica constituida por complejos enzimáticos, la cual se inhibe con compuestos como cianuro, antimicina A o rotenona, pero también por dos vías complementarias, una vía paralela y una oxidasa alterna que se describe como respiración resistente a cianuro.

Calahorra y cols. 2012, demostró que esta levadura en presencia de cianuro inhibía por completo la producción de etanol. Por consiguiente es importante investigar qué intermediarios metabólicos o estructuras intracelulares están involucradas y el mecanismo por el cual ocurre la inhibición de esta vía en *C. albicans*.

4. MARCO TEÓRICO.

4.1 Propiedades generales de las levaduras.

Los hongos son organismos eucariontes con núcleos organizados, cuya membrana nuclear está bien definida; son aerobios, heterótrofos y en general no motiles (Bonifaz, 2010). Las primeras clasificaciones se basaron en su aspecto macroscópico, e incluía a los hongos filamentosos o mohos, las setas y las levaduras (Madigan *et al.*, 2009).

Dentro de estos hongos encontramos a las levaduras que son microorganismos de los cuales se conoce desde la antigüedad. Estos hongos pertenecen a la clase de los ascomicetos, teniendo como subclase la de los hemiascomicetos. Son organismos eucariontes, esféricos u ovales, en mayor o menor grado anaerobios facultativos, de un tamaño mayor que las bacterias, que son capaces de prosperar en hábitats donde se encuentran disponibles principalmente azúcares y otros compuestos orgánicos (Souciet *et al.*, 2000). En un principio solo se reconocía a *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* como las únicas especies de este género; por tal motivo se les considero como levaduras convencionales (prototipos modelo). A lo largo del tiempo se fueron aislando otros tipos de levaduras con diversos procesos metabólicos; a los cuales se les considera como levaduras no convencionales, ejemplos de estos son *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris*, *C. albicans*, *Debaryomyces hansenii* entre otras (Spencer *et al.*, 2002).

Algunos de los usos que se les da a estos microorganismos radica en el área científica como modelos genéticos. Dentro de la agricultura se estudian algunos procesos metabólicos que pueden aplicarse a otros organismos, considerados como avances biotecnológicos.

4.2 Género *Candida*.

Dentro de este grupo de hongos se encuentra el género *Candida*, el cual incluye un variado número de especies, alrededor de 200, de las cuales 58 son oportunistas tanto en animales como en el hombre, y sólo de 6 a 8 especies se

encuentran con mayor frecuencia en infecciones humanas, sobresaliendo *C. albicans*.

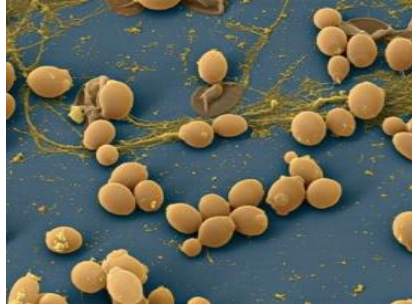


Imagen 1.- Microfotografía electrónica de *C. albicans*.
Tomada de www.microbiologia.wordpress.com

Por lo regular el género *Candida* tiene características definidas; son levaduras con ausencia de pigmento; forma celular variable; su reproducción es por gemación holoblástica o blastoconidio y puede formar pseudohifas o hifas (Bonifaz, 2010), (Tabla 1). *C. albicans*, es oval, posee un diámetro de 3-6 μm , y su reproducción es a través de blastoconidios. Crece en un periodo de dos a tres días a 28°C o 37°C, dando colonias blanquecinas y lisas; la especie se considera parte de la microbiota normal tanto en seres humanos como en animales. Sin embargo, cuando ocurre un cambio en las condiciones normales del huésped, se denomina patógeno oportunista; alrededor del 78% de las infecciones a nivel nosocomial es el principal agente etiológico y se encuentra en un 10% dentro de las infecciones por otras patologías no asociadas a este hongo (Dumitru *et al.*, 2004).

Tabla 1.- Taxonomía del género *Candida*.

Clase	<i>Ascomycetes</i>
Subclase	<i>Hemiascomycetes</i>
Orden	<i>Saccharomycetales</i>
Familia	<i>Saccharomycetes</i>
Género	<i>Pichia, Hansenula, Arxiozyma (estados teleomórficos)</i>
Especies	Los estados anamórficos se les denomina <i>Candida</i> .

Dentro del conocimiento general de los hongos levaduriformes, es necesario discutir aspectos bioquímicos que son fundamentales para este proyecto, por lo que a continuación se aclararan conceptos importantes del metabolismo.

4.3 Metabolismo.

El metabolismo es la suma de todas las transformaciones químicas que se producen en una célula u organismo, en las cuales tiene lugar una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente, que constituyen las rutas metabólicas. Cada cambio químico consiste en la eliminación, transferencia o adición de un átomo o grupo funcional determinado (Nelson y Cox, 2005).

Las enzimas son proteínas consideradas como los catalizadores de las reacciones biológicas; son específicas para las reacciones que catalizan; cada una cataliza solamente un único tipo de reacción química o en el caso de algunas enzimas, reacciones estrechamente relacionadas (Madigan *et al.*, 2009).

En este tipo de reacciones, lo que ocurre es la unión temporal del sustrato con la enzima en su forma tridimensional formando un complejo Enzima-Sustrato. Al ocurrir la reacción se forma una nueva molécula, que a su vez puede ser sustrato de otra enzima. El producto puede ser final, pero organizadas en una serie de reacciones consecutivas constituyen las vías metabólicas.

Es importante establecer que en cuanto a los hongos su nutrición siempre es por absorción de sustancias orgánicas simples o elaboradas (heterótrofos). Para su crecimiento necesitan de carbohidratos como fuente de carbono sobre todo glucosa, sacarosa y maltosa, nitrógeno (proteínas o sales de nitrógeno) y agua; precisan también de iones inorgánicos (Bonifaz, 2010).

Las levaduras presentan una diversidad importante en cuanto a los requerimientos que poseen para el metabolismo de carbono y oxígeno. Existe un grupo que se considera como aerobio obligado, el cual sólo obtiene energía a partir de la respiración; un segundo grupo involucra el metabolismo respiro-fermentativo y por último levaduras que exclusivamente realizan procesos fermentativos (Rozpędowska *et al.*, 2011).

C. albicans tiene la capacidad de obtener energía a partir de dos mecanismos catabólicos: la fermentación y la respiración.

4.3.1 Fermentación.

Se utiliza como un término general que indica la degradación anaeróbica de la glucosa u otros nutrientes orgánicos para obtener energía en forma de ATP (Nelson y Cox, 2005).

Para catabolizar los compuestos orgánicos es necesario tener en cuenta que la energía obtenida se debe conservar, manteniendo el equilibrio redox.

En la fermentación se obtiene energía en forma de moléculas de ATP, a través de dos fosforilaciones a nivel de sustrato. Para lograr este objetivo se generan compuestos orgánicos de alta energía, que se caracterizan por contener un enlace fosfato rico en energía, cuya hidrólisis es muy exergónica (Madigan *et al.*, 2009).

Los compuestos utilizados para realizar este proceso son diversos tipos de azúcares; el más utilizado es en especial la glucosa y el proceso por el cual se degrada se conoce como glucólisis.

La glucólisis también denominada vía de Embden-Meyerhof, es un proceso anaeróbico que se puede dividir en tres etapas principales, cada una de las cuales comprende una serie de reacciones enzimáticas (Fig. 1).

Etapas I: reacciones preliminares.

1. Fosforilación de la glucosa. La glucosa es activada para su posterior utilización mediante la fosforilación en el carbono 6, dando glucosa-6-fosfato; el fosfato es donado por el ATP. En condiciones intracelulares, la reacción es prácticamente irreversible, catalizada por la hexocinasa, en una reacción que requiere Mg^{2+} .
2. Conversión de la glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato. Este proceso lo realiza la enzima fosfoglucosa isomerasa, que cataliza la isomerización reversible de la glucosa-6-fosfato, una aldohexosa, en fructosa-6-fosfato, una cetohehexosa.

3. Fosforilación de la fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-bisfosfato. Está catalizada por la fosfofructocinasa la cual adiciona otro grupo fosforilo del ATP a la fructosa-6-fosfato para obtener fructosa-1,6-bisfosfato. Este proceso es irreversible, generando un producto totalmente destinado a continuar por la vía. La enzima responsable de este paso es un punto importante de regulación dentro de la vía. La actividad de la enzima aumenta cuando se agota el suministro de ATP en las células, y se inhibe cuando la célula tiene una disponibilidad amplia de ATP.
4. Fragmentación de la fructosa-1,6-bisfosfato. En este paso participa la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, cuyo nombre más común es aldolasa. La fructosa-1,6-bisfosfato se rompe dando dos triosas fosfato diferentes, el gliceraldehído-3-fosfato (aldosa) y la dihidroxiacetona fosfato (cetosa). Esta reacción es reversible.
5. Interconversión de las triosas fosfato. Es necesario que la dihidroxiacetona fosfato pueda convertirse en gliceraldehído-3-fosfato, y viceversa, mediante la triosa-fosfato isomerasa, obteniendo dos moléculas de la segunda, que pueden continuar como sustrato de la siguiente enzima dentro de la vía.

Etapa II: producción de NADH, ATP y piruvato.

6. Oxidación del gliceraldehído-3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato. Esta reacción es catalizada por la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Este punto es importante porque se acompaña de la reducción del NAD^+ a NADH, que interviene en diversas rutas metabólicas.
7. Transferencia del fosforilo del 1,3-bisfosfoglicerato al ADP. Este proceso es catalizado por la fosfoglicerato cinasa, la cual transfiere el grupo fosfato de alta energía del grupo carboxilo del 1,3-bifosfoglicerato al ADP, para formar ATP y 3-fosfoglicerato.
8. Conversión del 3-fosfoglicerato en 2-fosfoglicerato. La enzima encargada es la fosfoglicerato mutasa, que cataliza el desplazamiento reversible del grupo fosforilo entre el C-2 y el C-3 del glicerato. Esta enzima tiene como cofactor al Mg^{2+} .

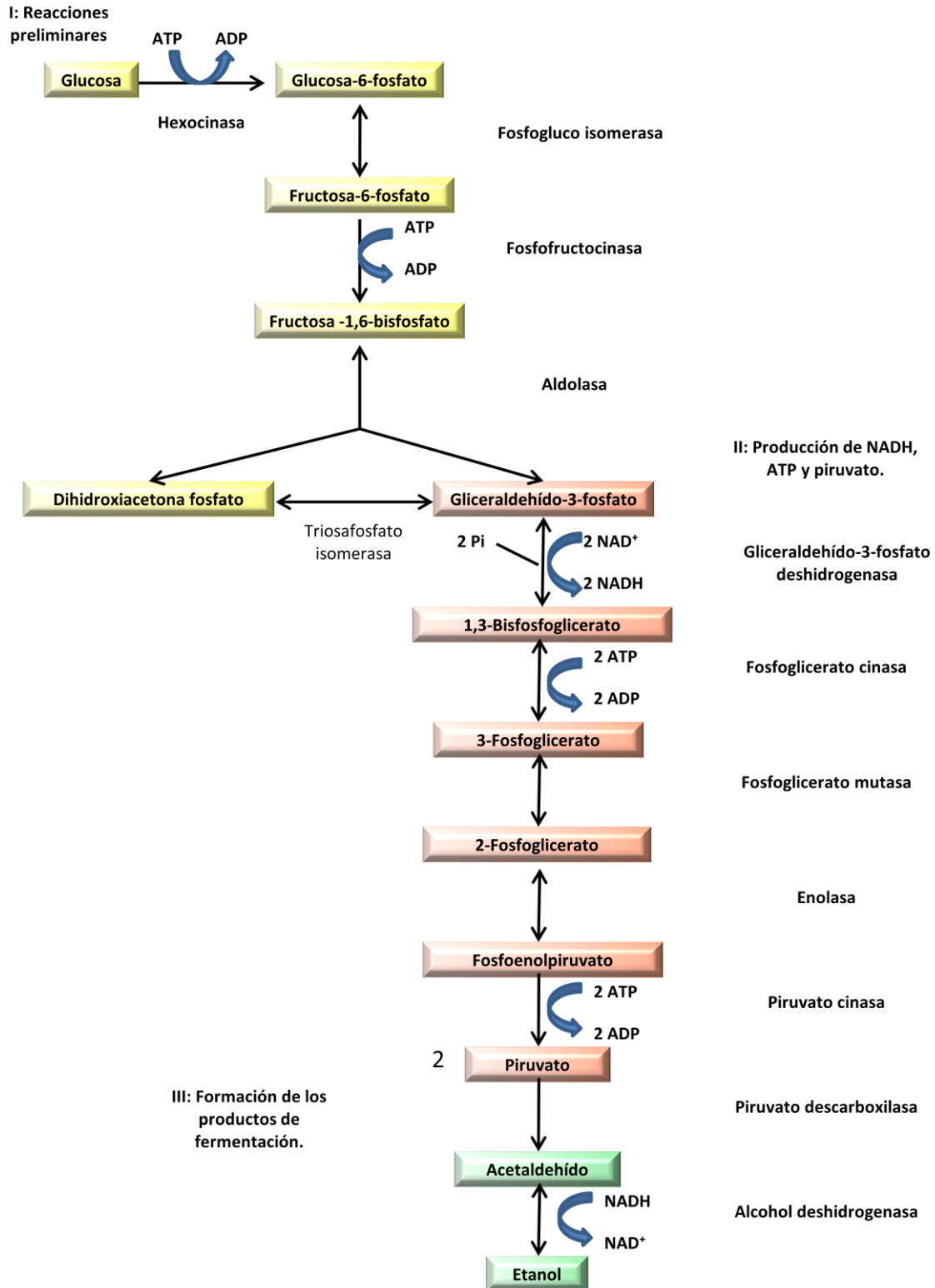


Figura 1.- Vía fermentativa. Secuencia de reacciones que transforman la glucosa en piruvato y el producto de la fermentación, que en las levaduras corresponde a la producción de etanol. En C.

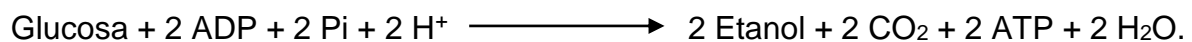
albicans la producción de etanol es menor en comparación a *S. cerevisiae* y además se inhibe en presencia de cianuro (Figura modificada de Madigan *et al.*, 2009 y Askew *et al.*, 2009).

9. Deshidratación del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato. En este paso se encuentra la enzima enolasa, que elimina de manera reversible una molécula de agua del 2-fosfoglicerato, produciendo fosfoenolpiruvato, un compuesto también con un fosfato de alta energía.
10. Transferencia del grupo fosforilo del fosfoenolpiruvato al ADP. En este último paso de la glucólisis se transfiere el grupo fosforilo del fosfoenolpiruvato al ADP, formando piruvato. Este proceso es catalizado por la piruvato cinasa, utilizando como cofactor al Mg^{2+} , pero además requiere de K^+ para funcionar. Es un punto de regulación dentro de la vía, sensible a la presencia de ATP, ácidos grasos y acetil CoA.

Etapa III: El consumo de NADH y los productos de la fermentación.

11. Piruvato descarboxilasa. Esta enzima cataliza la descarboxilación irreversible del piruvato, obteniendo como resultado acetaldehído y CO_2 . En este proceso se necesita Mg^{2+} , y como coenzima la tiamina pirofosfato.
12. Alcohol deshidrogenasa; esta enzima reduce luego el acetaldehído a etanol, utilizando el poder reductor proporcionado por el NADH que se obtuvo en la formación del 1,3-bisfosfoglicerato (Nelson y Cox, 2005).

El balance global de este proceso es el siguiente:



Puede verse que, no obstante la aparente complejidad y el número grande de pasos, en esta vía sólo se producen dos moléculas de ATP, cifra muy inferior a la que se obtiene durante la respiración.

En cuanto a *C. albicans* se le ha clasificado como una levadura Crabtree negativa; esto quiere decir que en presencia de una concentración elevada de glucosa prefiere obtener energía a partir de la fosforilación oxidativa y Pasteur positiva, lo que indica que en presencia de oxígeno, la producción de etanol disminuye (Calahorra *et al.*, 2012).

En relación con esta información, Rozpędowska *et al.* (2011) realizaron experimentos para explicar el metabolismo de la glucosa bajo condiciones anaerobias y aerobias en *C. albicans*. Los resultados obtenidos fueron que en un medio estrictamente anaerobio, el crecimiento de esta levadura es nulo; sin embargo, era capaz de producir cantidades de etanol considerables. En cuanto a la exposición en un medio aerobio, se determinó que era capaz de tener tiempos de duplicación mayores que *S. cerevisiae*, pero en cuanto a la producción de etanol, *C. albicans* obtuvo la menor concentración en el medio evaluado. Es por este motivo que la mayoría de los autores apuntan que esta levadura, de manera preferente realice procesos aeróbicos. Sin embargo, Calahorra *et al.* (2012) consideran que esta vía es un paso importante dentro del metabolismo energético en esta levadura.

Por lo expuesto, estos mismos autores decidieron caracterizar el metabolismo glucolítico en esta levadura. Al evaluar la producción de etanol en presencia de cianuro, compuesto utilizado para inhibir la respiración, determinaron que este compuesto no sólo era capaz de inhibir la cadena respiratoria; también inhibió la producción de etanol. Este fenómeno no sucede en *S. cerevisiae*, la cual en presencia de cianuro estimula o mantiene la producción de etanol para compensar los requerimientos energéticos celulares. A partir de estos resultados, se propuso que esta inhibición en *C. albicans* se encuentra involucrada a partir de la formación del compuesto dihidroxiacetona en la vía glucolítica, lo que implica una menor producción de NADH y ATP que son compuestos energéticos esenciales para continuar con la vía en ausencia de oxígeno.

4.3.2 Respiración.

Este es el segundo proceso catabólico, en el cual existen, por una parte, procesos en los que moléculas reducidas (ricas en electrones), en su mayor parte NADH, estos electrones son utilizadas por diversos complejos para reducir oxígeno (respiración aerobia) y así obtener energía en forma de ATP.

De manera general, el proceso de oxidación de la glucosa hasta formar CO₂ más H₂O, se logra a través, primero de una serie de transformaciones del

piruvato, para después ser sustrato del Ciclo de Krebs en donde la mayor parte de los electrones obtenidos provienen de la acción de las deshidrogenasas que los canalizan hacia aceptores universales de electrones: nucleótidos de nicotinamida (NAD^+ o NADP^+) o nucleótidos de flavina (FMN o FAD). Luego, los electrones de estas moléculas son transportados hasta el oxígeno por una serie de complejos proteicos (I, II, III, IV y V) , localizados en la membrana interna de la mitocondria, que actúan como bombas; es decir, que en su mayoría poseen la capacidad de transportar protones al espacio externo de la mitocondria como resultado del transporte de electrones. De forma general el complejo I es una NADH ubiquinona óxido-reductasa la cual se encarga de transportar los electrones obtenidos de la oxidación del NADH a un conjunto liposoluble denominado ubiquinona. El complejo II se denomina como succinato ubiquinona oxidoreductasa la cual transforma los electrones obtenidos del succinato para formar el complejo QH_2 . El complejo III ubiquinol citocromo c oxidoreductasa que obtiene electrones del QH_2 y los transporta a un complejo hidrosoluble que se denomina citocromo c. El complejo IV citocromo c oxidasa, el cual tiene como función reducir el oxígeno en agua y obtener así los electrones suficientes para translocar protones. El último complejo es el V que pertenece a la ATPasa transmembranal (Cabrera, 2010). El bombeo de protones (con carga positiva) genera una diferencia de potencial entre ambos lados de la membrana. Estos protones son luego utilizados por una ATPasa, o más bien (ATP sintasa) que es un complejo multiproteico cuya función es hacer uso de esta fuerza motriz para fosforilar el ADP, regresando los protones a la matriz mitocondrial y así obtener ATP (Nelson y Cox, 2005).

Existen diversos compuestos que evidencian este proceso los cuales se denominan inhibidores de la cadena respiratoria.

El cianuro es un compuesto orgánico porque presenta carbono en su estructura; bloquea el transporte de electrones del citocromo a_3 (complejo IV) al oxígeno. Lo que implica la inhibición de toda la cadena.

Otro compuesto que se encuentra dentro de esta clasificación, es la antimicina A que actúa en el complejo III, lo que impide la reoxidación del NADH y el FADH_2 .

Existen otros compuestos denominados desacoplantes, los cuales no afectan o incluso aceleran el transporte de electrones, pero que impiden la formación de ATP. La acción de estos compuestos consiste en desacoplar el sistema fosforilante del sistema respiratorio. Ejemplo de estos compuestos son el 2,4-dinitrofenol, el CCCP y el FCCP (Peña *et al.*, 2004).

C. albicans, presenta tres tipos de cadenas respiratorias. La primera es la cadena respiratoria clásica la cual consta de los complejos I, II, III y IV; a diferencia de *S. cerevisiae* que carece del complejo I (Helmerhorst *et al.*, 2002).

La segunda se denomina oxidasa alterna (AOX), comúnmente considerada como responsable de la respiración resistente a cianuro; es un complejo que suele encontrarse en las plantas sometidas a estrés. En *Candida* (Fig. 2) se ha descrito que a partir de la coenzima Q, tiene lugar el transporte de electrones para reducir el oxígeno en agua sin bombear protones al medio externo. Este mecanismo se manifiesta cuando tanto el complejo III como IV no funcionan adecuadamente. Los compuestos que logran inhibir este complejo son el SHAM, BHAM y los alquilgalatos (Veiga *et al.*, 2003).

La última se denomina vía paralela (PAR); en ésta se oxida una serie de compuestos exógenos a partir de la ubiquinona de la cadena clásica. Esta ruta tampoco es capaz de translocar protones, por lo que su funcionamiento sólo ocurre ante el bloqueo en las cadenas principales. Su flujo de electrones tiene una eficiencia pobre por tener sólo el 10% de la capacidad en consumo de oxígeno. Para inhibir este complejo se utiliza amital, mixotiazol y cianuro (Ruy *et al.*, 2006).

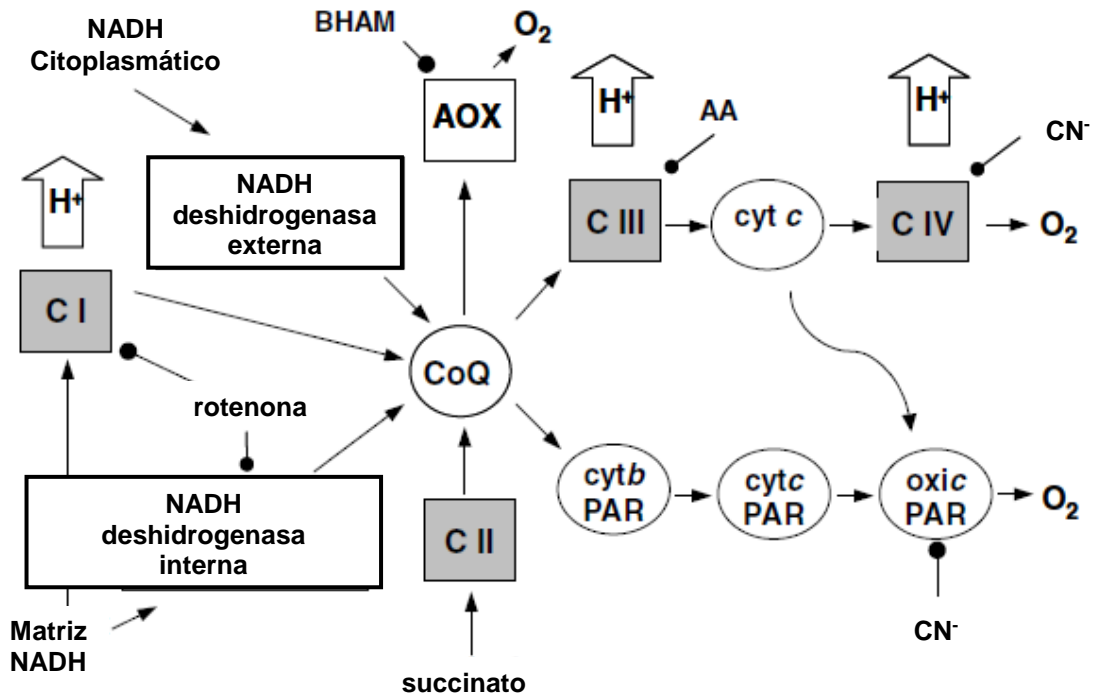


Figura 2.- Representación de las tres vías en la cadena respiratoria del género *Candida*. Es importante señalar que la oxidasa alterna no se inhibe en presencia de cianuro. Abreviaturas C I, II, III y IV: se refiere a los complejos multiproteicos que constituyen la cadena respiratoria; CoQ: se refiere a un conjunto de ubiquinonas que transporta electrones a los subsecuentes complejos; AOX: oxidasa alterna; BHAM: ácido benzohidroxámico; AA: antimicina A; CN⁻: cianuro; cyt c: citocromo c; cyt b: citocromo b; PAR: cadena paralela (Figura modificada de Ruy *et al.*, 2006).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El cianuro es un compuesto orgánico que inhibe el complejo IV y en consecuencia bloquea el paso de los electrones en la cadena respiratoria; en microorganismos como *S. cerevisiae* al ocurrir este fenómeno, aumenta la producción de etanol para compensar los requerimientos energéticos.

C. albicans, en presencia de este compuesto muestra una menor producción de etanol.

Por lo tanto es importante aclarar el efecto que tiene este compuesto sobre la vía fermentativa y si existe la participación de estructuras intracelulares como la mitocondria.

Este tema es de relevancia porque nos puede ayudar a conocer algunos mecanismos bioquímicos diferentes en la fisiología de *C. albicans*.

6. HIPÓTESIS.

La inhibición de la vía fermentativa con cianuro en *C. albicans*, se debe a una interacción de la glucólisis con la respiración mitocondrial.

7. OBJETIVOS.

Objetivo principal:

- Describir el mecanismo por el cual el cianuro inhibe la vía fermentativa en la levadura *C. albicans*, utilizando, para ello, diversas técnicas bioquímicas.

Objetivos particulares:

- Estudiar y desarrollar las metodologías bioquímicas analíticas necesarias para obtener resultados adecuados.
- Realizar los experimentos pertinentes para intentar definir el mecanismo de inhibición de la fermentación por el cianuro en *C. albicans*.
 - Evaluar este efecto en diversas cepas del género *Candida*.
 - Analizar el efecto del cianuro en la fermentación de *C. albicans* determinando la producción de etanol, tanto *in vivo* como en extractos libres de células.
 - Evaluar el transporte de potasio y la acidificación del medio en *C. albicans* en presencia de cianuro y comparar con *S. cerevisiae*.
 - Determinar el efecto del cianuro en el consumo de oxígeno en *C. albicans* en comparación con *S. cerevisiae*.
 - Medir la actividad enzimática de las enzimas glucolíticas en presencia y ausencia de cianuro.

8. METODOLOGÍA.

Para realizar los ensayos se utilizaron las siguientes cepas:

- ❖ *S. cerevisiae* obtenida de una cepa comercial propiedad de La Azteca, S.A., México.
- ❖ *C. albicans* ATCC 10231, aislada de un paciente con broncomicosis.
- ❖ *C. albicans* ATCC 14053, aislada de sangre humana.
- ❖ *C. albicans* ATCC 90028, aislada de sangre humana.
- ❖ *Candida dubliniensis*.
- ❖ *Candida parapsilosis*.

8.1 Condiciones de cultivo.

Las levaduras se mantuvieron en un medio sólido YPD en cajas de Petri, cuya composición es la siguiente:

- 2% Glucosa.
- 2% Peptona de gelatina.
- 1% Extracto de levadura.
- 2% Agar.

De este cultivo se sembró una asada de levadura en 500 mL de medio líquido YPD:

- 2% Glucosa.
- 2% Peptona de gelatina.
- 1% Extracto de levadura.

Este medio se incubó en un agitador mecánico a 250 rpm, 30 °C durante 24 horas. Las células se centrifugaron, realizando dos lavados con agua libre de iones, a 2100 rpm durante 10 minutos. Una vez obtenido el paquete celular se resuspendió en 250 mL de agua para ayunarlas durante 48 horas bajo las mismas condiciones de agitación.

Transcurrido este plazo se cosecharon las células y el paquete obtenido se centrifugó a 3200 rpm durante 10 minutos en una centrífuga clínica con dos lavados de agua.

8.2 Preparación de extractos libres de células.

Se preparó un buffer de ruptura en frío de MOPS-HCl 10 mM pH 7, al cual se le agrega una pastilla, por cada 50 mL de buffer, de una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete de Roche®), cuya función es inhibir las proteasas que existan posteriores a la ruptura y puedan desnaturalizar las enzimas.

El paquete celular se resuspendió en el buffer de ruptura a una proporción de 50% m/v.

Dentro de una cámara para el “bead beater”, se colocó la suspensión (ocupando el 50% del volumen de la cámara), además de perlas de vidrio de 0.45 mm de diámetro con las que se realizó la ruptura. Esta cámara se encontraba dentro de una camisa de hielo, para evitar la desnaturalización de las proteínas. Las células se rompieron con seis pulsos de 30 segundos, con descansos de tres minutos.

La suspensión que se obtuvo se centrifugó en una centrífuga Beckman con un rotor JA-25.50, durante 10 minutos en dos diferentes condiciones:

- ❖ 3000 X g, obteniendo extractos celulares que contienen mitocondrias.
- ❖ 17500 X g, obteniendo extractos celulares libres de mitocondrias.

A cada sobrenadante se le cuantificó la concentración de proteína por el método de Lowry modificado por Markwell *et al.*, (1978). Los extractos se distribuyeron en tubos de eppendorf y se conservaron en un ultracongelador REVCO a -70°C hasta su uso.

8.3 Determinación de etanol.

Se utilizó el espectrofotómetro Beckman DU 650 y celdas de vidrio con un 1 cm de paso de luz.

Se preparó el medio de incubación como sigue:

❖ Buffer MES ajustado con TEA, pH 6.....	10 mM
❖ Glucosa.....	67 mM
❖ KH ₂ PO ₄ , pH 6.5.....	6.7 mM
❖ MgCl ₂	6.7 mM
❖ ATP, sal de sodio.....	0.7 mM
❖ NAD ⁺ , sal de sodio.....	0.5 mM
❖ H ₂ O.....	c.b.p.3 mL

En este medio de incubación se adicionó el elemento biológico, con o sin cianuro de sodio a una concentración de 0.3 mM al igual que peróxido de hidrógeno a una concentración 8.8 µM de la siguiente forma:

- Con células enteras, el equivalente a 200 mg de peso húmedo.
- Extractos sin mitocondrias, 0.5 mg de proteína.
- Extractos con mitocondrias, 0.5 mg de proteína.

La incubación se realizó en un baño a temperatura de 30°C durante 10 minutos. Las muestras se colocaron luego en hielo durante 10 minutos. Los tubos se centrifugaron en una centrífuga clínica a 3200 rpm durante 3 minutos.

Para determinar la cantidad de etanol producida, se utilizó el sobrenadante obtenido por centrifugación. Se preparó un medio con 10 mM de buffer de bicina ajustado con KOH a pH 9, 1.51 mM de NAD⁺ sal de sodio, preparado en el mismo buffer, a un volumen final de 2 mL. Para realizar el ensayo se agregó 0.285 U de aldehído deshidrogenasa (Sigma-Aldrich A-9770), tomando una lectura de absorbancia a 340 nm. Luego se añadió 141.3 U de alcohol deshidrogenasa (Sigma-Aldrich A-7011), se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos para llevar a cabo la reacción, y se registró una segunda lectura al finalizar el tiempo de incubación.

A la par de la determinación, se realizó una muestra estándar de etanol, a una concentración 17.58 mM. Sus cambios de absorbancia se utilizaron para calcular la concentración final de etanol.

Con los datos obtenidos, se realizó un análisis estadístico mediante la prueba de Fischer para definir diferencias significativas entre las varianzas control y las muestras con cianuro. A continuación se aplicó la prueba de t de Student para determinar la diferencia entre las medias poblacionales de ambos tratamientos con un nivel de confianza del 95%.

8.4 Transporte de potasio y acidificación del medio.

En este ensayo se utilizaron las cepas *C. albicans* ATCC 10231 y *S. cerevisiae* "La Azteca".

El ensayo se llevó a cabo en una cámara conectada a un baño a temperatura constante (30° C) y agitación constante. Dentro de esta cámara se colocó un electrodo selectivo para potasio y otro para determinar la concentración de protones libres (pH). Los electrodos se conectan a un voltímetro el cual registra una diferencia de potencial, acoplado a un programa de computadora que transforma la señal en un gráfico.

A continuación se presenta una tabla que resume los componentes que se utilizaron durante los ensayos.

Tabla 2.- Componentes utilizados para determinar el transporte de potasio y acidificación. El volumen total se ajusta con agua hasta 10.0 mL.

Componentes	Concentración inicial	Volumen agregado	Concentración final en el ensayo. (Vol. Final= 10 mL)
Buffer Mes-TEA 0.1 M pH=6	0.1 M	0.2 mL	2 mM
Levadura	50 % m/v	0.5 mL	25 mg/mL
Glucosa	1 M	0.2 mL	20 mM
Etanol	1 M	0.2 mL	20 mM
H₂O₂	8.8 mM	0.01 mL	8.8 µM
NaCN	0.2 M	0.015 mL	0.3 mM

8.5 Consumo de oxígeno.

Este ensayo se realizó en una cámara cerrada, conectada a un baño a temperatura constante (30° C) y agitación constante. Dentro de ella se colocó un

electrodo tipo Clark conectado a un voltímetro que envía las señales a un programa de computadora que registra y grafica la señal en tiempo real.

Tabla 3.- Compuestos utilizados para determinar el consumo de oxígeno.

Componentes	Concentración inicial	Volumen agregado	Concentración final en el ensayo. (Vol. Final= 5 mL)
Buffer Mes-TEA 0.1 M pH=6	0.1 M	0.5 mL	10 mM
Levaduras	50 % m/v	0.05 mL	10 mg/mL
Glucosa	1 M	0.1 mL	20 mM
Etanol	1 M	0.1 mL	20 mM
NaCN	0.2 M	0.0075 mL	0.3 mM

8.6 Actividad enzimática.

Para medir las actividades de diferentes enzimas, se utilizaron métodos indirectos, en los cuales se siguen los cambios de absorbancia del NADH, que absorbe luz a 340 nm. Se utilizó un espectrofotómetro marca Aminco DW-2a UV/Vis, actualizado por la empresa Olis. Tiene un portaceldas que mantiene la temperatura constante y un agitador magnético.

Proceso: Se utilizaron celdas de vidrio de 1 cm de paso de luz, en las que se colocó el medio de reacción específico para evaluar cada enzima. Luego se insertó la celda dentro del espectro donde se mantuvo a 30°C y en agitación constante.

Se indicaron en la computadora las condiciones para realizar la lectura de las muestras. Se inició el trazo sólo con el medio de incubación durante 98 segundos; posteriormente se agregó extracto con una microjeringa como sigue:

- 3000 x g control: medio de reacción más el extracto con mitocondrias.
- 3000 x g NaCN: medio de reacción con 0.3 mM de NaCN más el extracto con mitocondrias.
- 17500 x g Control: medio de reacción más el extracto libre de mitocondrias.
- 17500 x g NaCN: 0.3 mM de NaCN más el extracto libre de mitocondrias.

Se muestra un trazo ejemplo, obtenido por el espectrofotómetro.

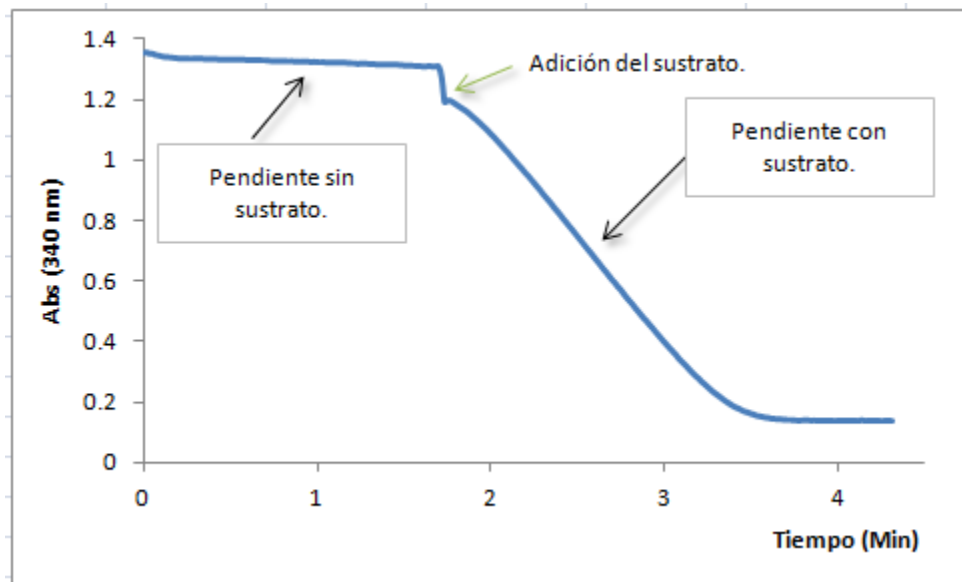


Figura 3.- Ejemplo de la gráfica obtenida en el espectrofotómetro, al evaluar la actividad de una enzima acoplada a los cambios del NADH.

A continuación se presenta el desarrollo para obtener el valor de la actividad enzimática en unidades de nmol/ min/ mg de proteína.

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{\Delta DO * \text{volumen final} * 1000000}{\epsilon * l * t * \text{mg de proteína}}$$

Dentro de la fórmula:

ΔDO : es la diferencia de absorbancia por minuto.

ϵ : coeficiente de absorción molar, en estos ensayos corresponde al NADH, que es $6317 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Bergmeyer *et al.*, 1983).

l : es la distancia del paso de luz de la celda (1 cm).

Se realizó un análisis estadístico mediante la prueba de Fischer para determinar si existe diferencia significativa entre las varianzas del tratamiento control y aquellos a los que se añadió cianuro.

Una vez obtenido el resultado se procedió con el análisis, utilizando la prueba de t de Student para comparar las medias estadísticas, con un nivel mínimo de confianza del 90%.

Protocolo utilizado para cada enzima (Sánchez *et al.*, 2006) y (Bergmeyer *et al.*, 1983):

Hexocinasa

- Buffer de TEA ajustado con KOH a pH 7.6.....40 mM
- Glucosa disuelta en buffer.....222 mM
- MgCl₂8 mM
- NADH sal dipotásica.....0.9 mM
- ATP sal de sodio.....0.6 mM
- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.....0.55 U/mL
- Volumen final.....2.6 mL

Fosfofructocinasa:

- Solución principal (1.8 mL):
 - Buffer Tris pH 7.6.....56 mM
 - ITP.....1.7 mM
 - MgSO₄.....5 mM
 - Sulfato de amonio.....10 mM
 - 2-β mercaptoetanol.....5.6 mM
- Mezcla de enzimas (utilizar 0.1 mL):
 - Buffer Tris-HCl pH 7.6 con BSA.
 - Glicerol-Fosfato deshidrogenasa.....50 U/mL
 - Triosafosfato isomerasa.....300 U/mL
 - Aldolasa.....29.4 U/mL
- Fructosa-6-fosfato sal de sodio.....330 mM
- Volumen final.....2.2 mL

Aldolasa

→ Buffer Tris pH 8.5.....	80 mM
→ MgSO ₄ 7 H ₂ O.....	1.6 mM
→ KCl.....	5.4 mM
→ NADH sal dipotásica.....	0.6 mM
→ Fructosa-1,6 bisfosfato en sal de sodio.....	0.6 mM
→ Triosafofosfato isomerasa.....	1.5 U/mL
→ Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa.....	0.1 U/mL
→ H ₂ O.....	c.b.p. 2.5 mL

Gliceraldehído-3-Fosfato deshidrogenasa

→ Buffer de TEA-KOH pH 7.6.....	82.5 mM
→ MgSO ₄	1.7 mM
→ ATP, sal de sodio.....	1.1 mM
→ Cisteína.....	5 mM
→ NADH, sal dipotásica.....	0.4 mM
→ Ácido 3-fosfoglicérico.....	6 mM
→ Fosfoglicerato cinasa.....	14.8 U/mL
→ H ₂ O.....	c.b.p. 2 mL

Fosfoglicerato cinasa

→ Buffer de TEA ajustado con KOH a pH 7.6.....	78.3 mM
→ MgSO ₄	1.6 mM
→ ATP, sal de sodio.....	1.1 mM
→ EDTA en buffer.....	0.9 mM
→ NADH, sal dipotásica.....	0.2 mM
→ Ácido 3-fosfoglicérico.....	6.5 mM
→ Gliceraldehído-3-Fosfato deshidrogenasa.....	2.5 U/mL
→ Volumen final.....	3.2 mL

Enolasa

→ Buffer de TEA ajustado con KOH pH 7.6.....	83 mM
→ MgSO ₄	3.3 mM
→ ADP , sal de sodio.....	1.1 mM
→ NADH, sal dipotásica.....	0.2 mM
→ Ácido 2-fosfoglicérico.....	0.9 mM
→ Lactato deshidrogenasa.....	18.5 U/mL
→ Piruvato cinasa.....	2.7 U/mL
→ Volumen final.....	3.0 mL

Piruvato cinasa

→ Buffer de TEA ajustado con KOH pH 7.6.....	85.6 mM
→ ADP, sal de sodio.....	4.7 mM
→ NADH, sal dipotásica.....	0.2 mM
→ Fosfoenol piruvato sal de potasio, en un medio con MgSO ₄ 0.05 M y KCl 0.2 M.....	0.9 mM
→ Lactato deshidrogenasa.....	9.2 U/mL
→ Volumen final.....	3.0 mL

Piruvato descarboxilasa

→ Buffer de citrato pH 6.....	99 mM
→ NADH, sal dipotásica.....	5 mM
→ Piruvato de sodio.....	33 mM
→ Alcohol deshidrogenasa.....	22.5 U/mL
→ H ₂ O.....	c.b.p. 2 mL

Alcohol deshidrogenasa

→ Buffer Hepes pH 7.5.....	20 mM
→ NADH, sal dipotásica.....	1.7 mM
→ Acetaldehído.....	1.1 mM
→ H ₂ O.....	c.b.p 2 mL

9. RESULTADOS.

9.1 Determinación de etanol en diversas cepas de *Candida* y *S. cerevisiae*.

Se midió la producción de etanol en diversas cepas de *Candida* en comparación a *S. cerevisiae* la “Azteca”. Este punto era importante para definir si la inhibición por cianuro era específica para el género o era exclusivo de la cepa ATCC 10231.

La Figura 4 muestra que, en efecto, aunque en diferente grado, el cianuro inhibió la fermentación en tres cepas de *C. albicans*, así como en *C. dubliniensis* y *C. parapsilosis*. Se encontró también que la última tiene una menor capacidad fermentativa que las demás. Este efecto no se observa en *S. cerevisiae* quien mantuvo la producción de etanol en presencia del inhibidor.

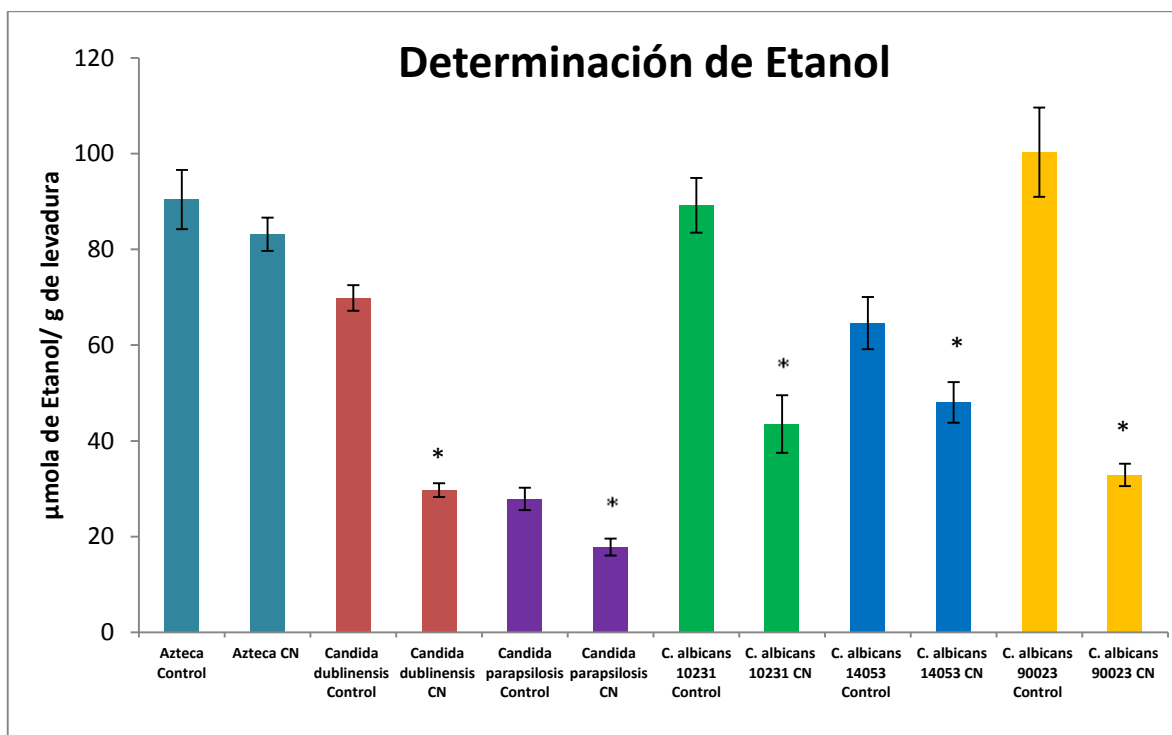


Figura 4.- Inhibición de la producción de etanol en *Candida in vivo* utilizando cianuro a una concentración 0.3 mM, efecto que no se observa en “La Azteca”. Para realizar el ensayo se utilizó 10 mM de buffer MES-TEA pH 6, 67 mM de glucosa, 6.7 mM de KH_2PO_4 pH 6.5, 6.7 mM MgCl_2 , 0.67 mM de ATP y 0.50 mM de NAD^+ , en un volumen final de 3 mL. Se realizó una incubación durante 10 minutos a 30° C y con los sobrenadantes se realizó la determinación (n>6). * existe diferencia significativa respecto a su control.

A partir de estos resultados se decidió continuar la investigación con la cepa *C. albicans* ATCC 10231, y como control negativo del efecto del cianuro sobre la cepa comercial *S. cerevisiae* “La Azteca”.

En esta cepa de *C. albicans* se probó el efecto que ejercía el peróxido de hidrógeno sobre la producción de etanol (Fig. 5). Este compuesto es sustrato de la enzima catalasa que se encuentra en el citosol de la célula, aportando una concentración extra de oxígeno que se utiliza en la cadena respiratoria.

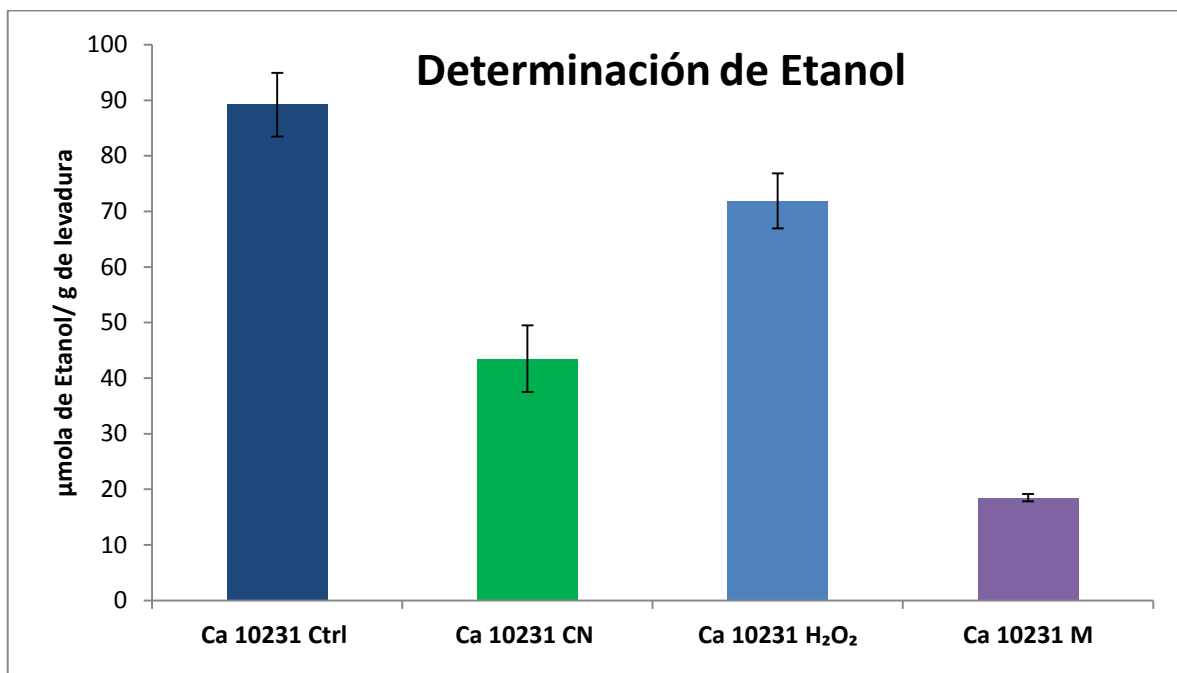


Figura 5.- Efecto del peróxido de hidrógeno en la producción de etanol en la cepa *C. albicans* ATCC 10231. Se realizó la determinación como se describió en el apartado anterior. Los compuestos que se probaron fueron: cianuro de sodio 0.3 mM y peróxido de hidrógeno 8.8 μM ($n>6$). M: se realizó una combinación de cianuro de sodio y peróxido de hidrógeno en el ensayo.

Se observa que en presencia de peróxido de hidrógeno la producción de etanol disminuye con respecto al control por estimular la fosforilación oxidativa en esta levadura que es principalmente aerobia, mientras que al utilizar ambos compuestos la producción de etanol disminuye de manera considerable esto nos da la pauta para plantear que el cianuro inhibe ambas vías y es posible que esta levadura tome una ruta alterna para obtener energía.

9.2 Transporte de potasio.

Este catión se encuentra involucrado en procesos importantes a nivel intracelular, y su transporte es un indicador del metabolismo así como del estado energético de la levadura.

Como primer paso se determinó el transporte en presencia de glucosa como sustrato; este compuesto activa la vía glucolítica y la respiración, que en consecuencia forman ATP, el cual es sustrato de la ATPasa de membrana plasmática, que es capaz de translocar protones al medio externo, modificando el equilibrio, generando un potencial electroquímico, lo que permite el ingreso a la célula de diversos iones entre ellos el potasio, impulsado por dicho potencial (Fig. 6).

Al medir el transporte de K^+ en *C. albicans* con glucosa como sustrato, se encontró que transcurre normalmente (Fig. 7), aunque no tan rápido como en *S. cerevisiae* (Fig. 8). En *S. cerevisiae* el aporte energético puede provenir tanto de la glucólisis como de la respiración, por lo que el cianuro no tiene efecto sobre el transporte del K^+ (Fig. 8). En *C. albicans* por otra parte, el cianuro sí inhibió el transporte. En la figura 6 se observa que utilizando glucosa como sustrato, se produjo un transporte que se puede considerar como control; sin embargo al agregar cianuro 0.3 mM se observó una inhibición total, indicando que están comprometidas ambas vías metabólicas, en concordancia con la inhibición, no sólo de la respiración, sino de la fermentación, mostrada en la Fig. 4.

Se realizaron ensayos en ambas levaduras utilizando otros inhibidores de la cadena respiratoria. La antimicina A actúa a nivel del complejo III y el CCCP, que desacopla la cadena respiratoria. Se observó que no se afecta el transporte en concentraciones de 4 μ M y 20 μ M respectivamente. Esto nos indica que dentro de los compuestos que inhiben la cadena respiratoria, el cianuro tiene una inhibición completa del transporte de potasio en particular para *C. albicans* (figuras mostradas en el anexo).

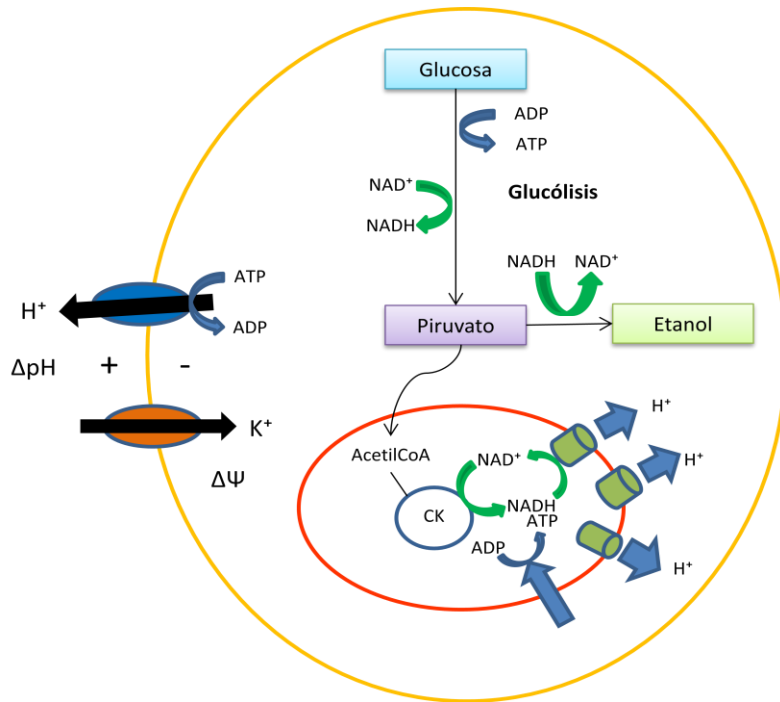


Figura 6.- Transporte de potasio y acidificación del medio en una levadura común. En este gráfico se muestra el proceso por el cual se internaliza potasio por los distintos transportadores membranales específicos (aquí representados por una elipse azul); se genera energía y se expulsan protones al medio externo por la H⁺-ATPasa de membrana plasmática (elipse naranja). CK: Ciclo de Krebs.

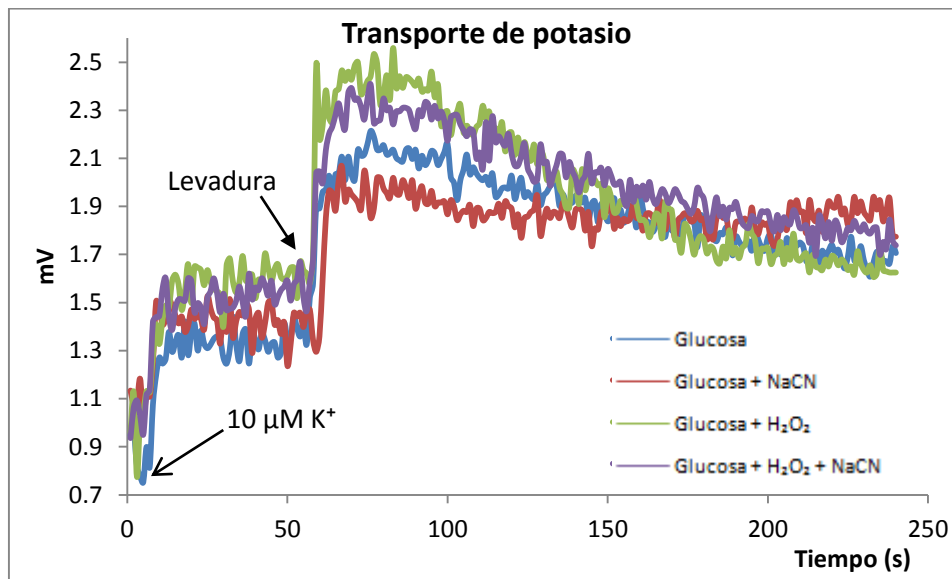


Figura 7.- Transporte de potasio en la levadura *C. albicans* con 48 horas de ayuno. Incubación: 2 mM de MES-TEA pH 6, 20 mM de glucosa, 0.3 mM de NaCN y 8.8 μM de H₂O₂ en un volumen final de 10 mL. Una vez que se inicia el trazo se agregó 10 μM de KCl como referencia y a los 50 segundos 250 mg en peso húmedo de levadura. Trazo representativo de tres repeticiones.

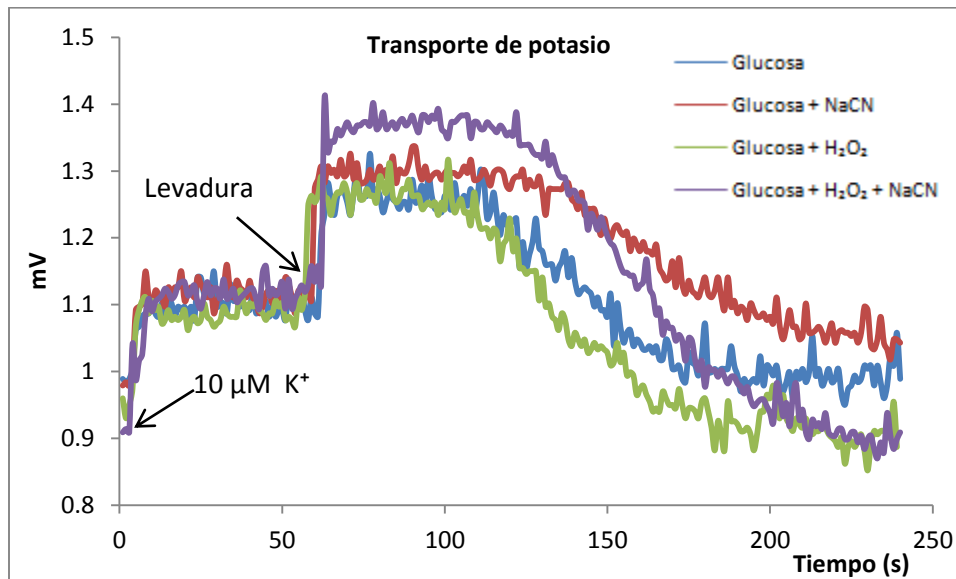


Figura 8.- Transporte de potasio en la levadura *S. cerevisiae* con 24 horas de ayuno. Incubación: 2 mM de MES-TEA pH 6, 20 mM de glucosa, 0.3 mM de NaCN y 8.8 µM de H₂O₂ en un volumen final de 10 mL. Una vez que se inicia el trazo se agregó 10 µM de KCl como referencia y a los 50 segundos 250 mg en peso húmedo de levadura. Trazo representativo de tres repeticiones.

En otro experimento probamos el efecto del uso de peróxido de hidrógeno, que se descompone en O₂ y H₂O, por efecto de la catalasa. El oxígeno que se agrega al medio es utilizado por la levadura para mantener la fosforilación oxidativa y así los niveles energéticos. Tal cosa no ocurre en presencia de cianuro, por estar bloqueada la cadena respiratoria. En tales condiciones, sin embargo, gracias a la glucólisis, debiera haber un transporte del K⁺, por la energía generada en ella, como sucede en *S. cerevisiae* (Fig. 8). Un dato que sorprende (Fig. 7) es que en *C. albicans*, al agregar H₂O₂ en presencia de CN⁻, se recuperó el transporte, en un grado similar al control. Puede verse que en *S. cerevisiae* se conserva el transporte bajo ambas condiciones (Fig. 8).

Otro sustrato utilizado fue el etanol, cuyo aporte energético proviene de la fosforilación oxidativa. Es entendible que en presencia de cianuro el transporte se inhiba por completo en ambas levaduras (Figs. 9 y 10). Sin embargo en *C. albicans*, aunque se observó una inhibición total del transporte con 0.3 mM de NaCN, al agregar también peróxido de hidrógeno, se observó una pequeña aceleración del transporte (Fig. 9), cosa que no sucedió con *S. cerevisiae*. Al utilizar antimicina A y CCCP, el transporte se inhibió totalmente (figuras mostradas

en anexo). En *S. cerevisiae*, no se observó esta reversión del efecto del CN^- (Fig. 10). Estos resultados indican que existe una producción muy pobre de ATP, ocasionado por la interrupción de la vía fermentativa en presencia de cianuro. Sin embargo, es difícil explicar ambos fenómenos: a) la inhibición de la fermentación por el CN^- y b) la reversión de esta inhibición por el peróxido de hidrógeno.

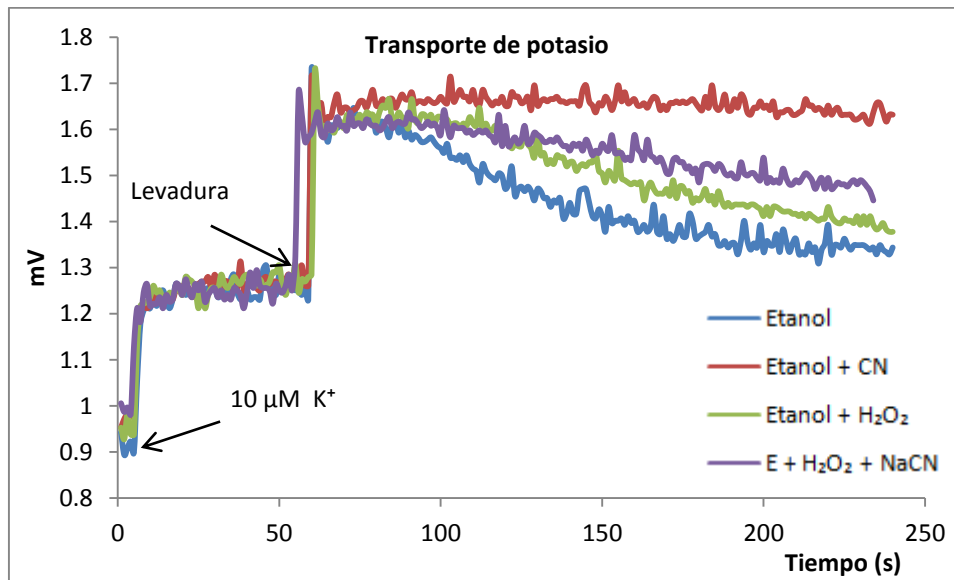


Figura 9.- Transporte de potasio en la levadura *C. albicans* con 48 horas de ayuno. Incubación: 2 mM de MES-TEA pH 6, 20 mM de etanol, 0.3 mM cianuro de sodio, 8.8 μM de H_2O_2 en un volumen final de 10 mL. Una vez que se inicia el trazo se agregó 10 μM de KCl como referencia y a los 50 segundos 250 mg en peso húmedo de levadura. Trazo representativo de tres repeticiones.

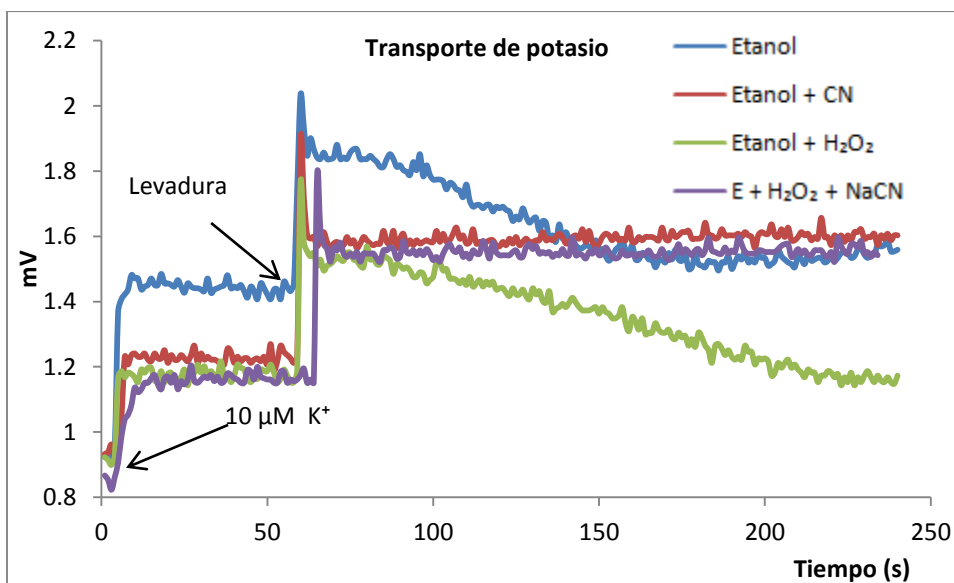


Figura 10.- Transporte de potasio en la levadura *S. cerevisiae* con 24 horas de ayuno. Incubación: 2 mM de MES-TEA pH 6, como sustrato 20 mM de etanol, 0.3 mM cianuro de sodio, 8.8 μM de H_2O_2 en un volumen final de 10 mL. Una vez que se inicia el trazo se agregó 10 μM de KCl como

referencia y a los 50 segundos 250 mg en peso húmedo de levadura. Trazo representativo de tres repeticiones.

9.3 Acidificación.

Tanto *C. albicans* (Fig. 11), como *S. cerevisiae* (Fig. 12) son capaces de acidificar el medio, y este proceso requiere de un sustrato. Las Figuras 11 y 12 muestran que en su ausencia, se produce una alcalinización.

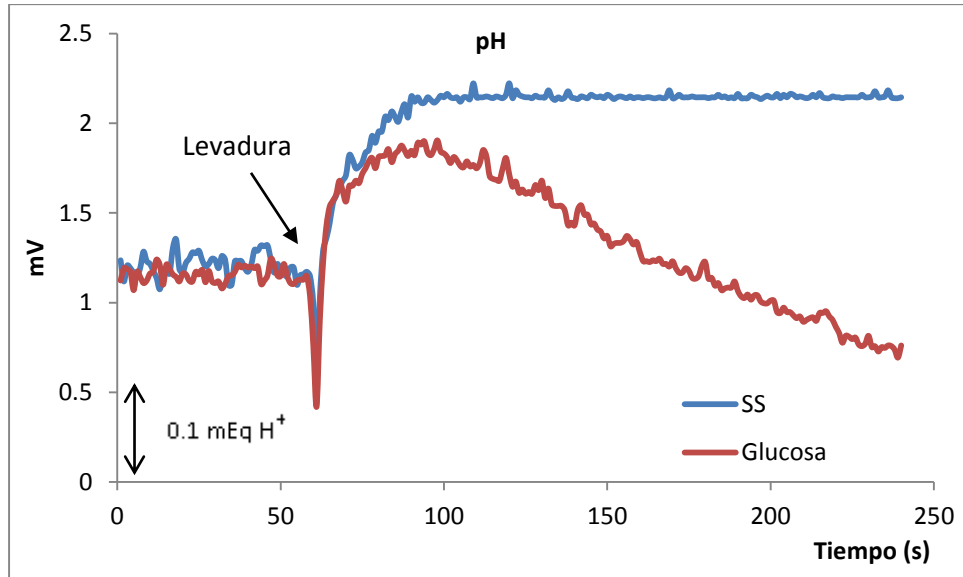


Figura 11.- pH en la levadura *C.albicans* con 48 horas de ayuno. Medio de incubación: 2 mM de MES-TEA pH 6, 20 mM de glucosa en un volumen final de 10 mL. Al iniciar el trazo se agregó 250 mg en peso húmedo de levadura. Se realizó una curva patrón de HCl. SS: sin sustrato. Trazo representativo de tres repeticiones.

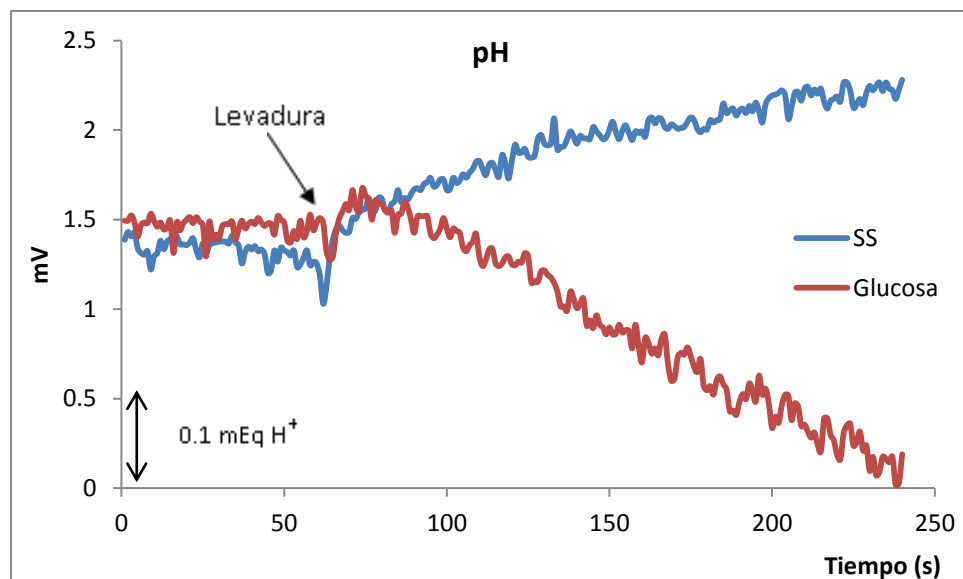


Figura 12.- Cambios del pH producidos por *S. cerevisiae* con 24 horas de ayuno. Medio de incubación: 2 mM de MES-TEA pH 6, 20 mM de glucosa en un volumen final de 10 mL. Al iniciar el

trazo se agregó 250 mg en peso húmedo de levadura. Se realizó una curva patrón de HCl. SS: sin sustrato. Trazo representativo de tres repeticiones.

Existe una relación entre el transporte de potasio hacia el interior de la célula y la salida de protones al medio, pues este último genera el gradiente electroquímico de la membrana plasmática, que impulsa a los cationes al interior de la célula (Peña *et al.*, 1972). La entrada del K^+ aumenta el requerimiento energético de la levadura y se estimula el metabolismo para mantener la concentración del ATP intracelular, que es utilizado por la ATPasa transmembranal para exportar al medio externo. También en *C. albicans* la presencia de K^+ en el medio estimula la acidificación del medio (Fig. 13).

Al agregar cianuro, en *C. albicans*, se observó una inhibición del bombeo de protones al medio, lo cual produce la disminución del potencial electroquímico transmembranal (Fig. 13) y por tanto, la inhibición también del transporte de potasio (Fig. 7). Este efecto se revirtió en ambos al agregar agua oxigenada.

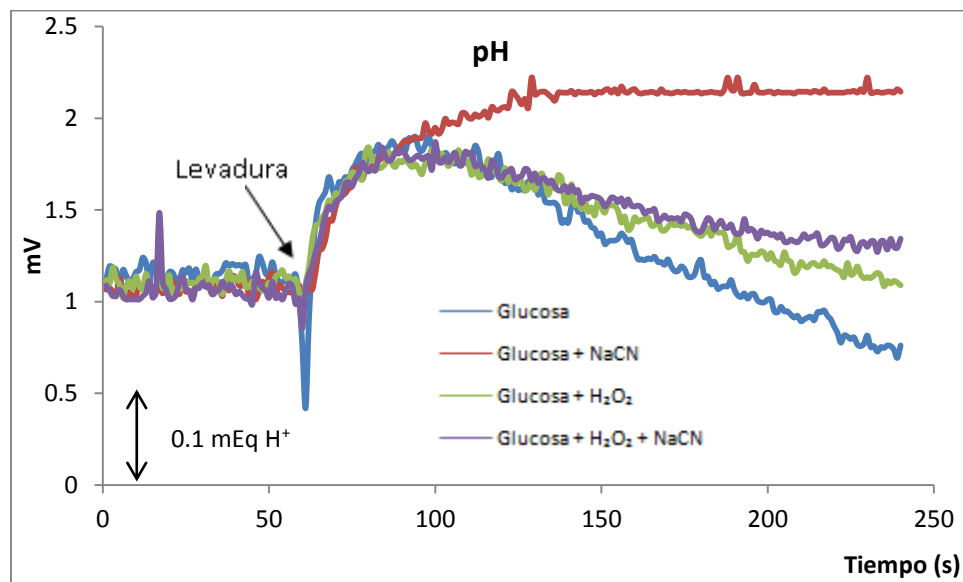


Figura 13.- Cambios del pH del medio producido por *C. albicans* con 48 horas de ayuno. Medio de incubación : 2 mM de MES-TEA pH 6, 20 mM de glucosa, 0.3 mM de cianuro de sodio, 8.8 μ M de agua oxigenada en un volumen final de 10 mL. Al iniciar el trazo se agregó 250 mg en peso húmedo de levadura. Se realizó una curva patrón de HCl. Trazo representativo de tres repeticiones.

En contraste, con *S. cerevisiae* no se observó ni la inhibición del bombeo de H^+ por el CN^- , ni efecto alguno del H_2O_2 (Fig. 14).

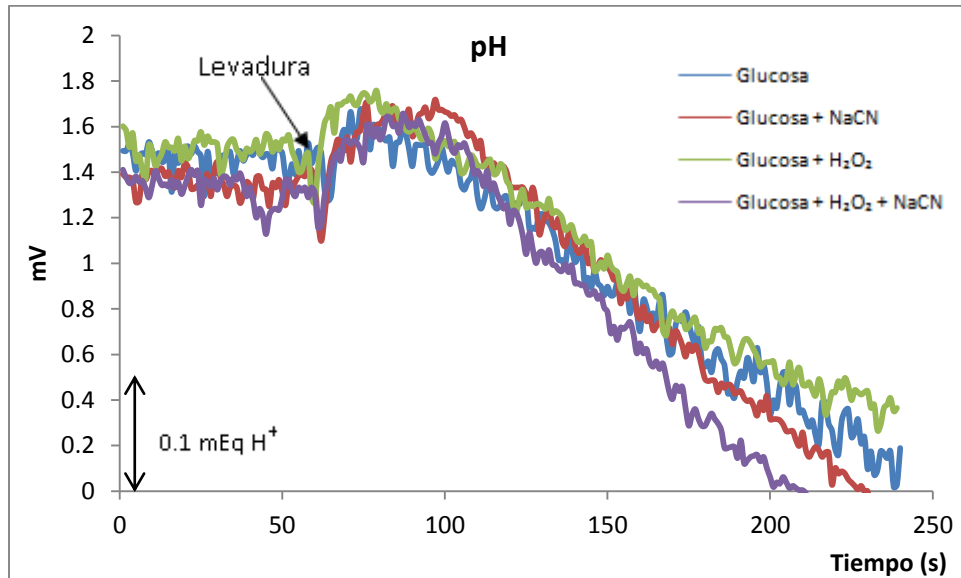


Figura 14.- Cambios del pH con la levadura *S. cerevisiae* con 24 horas de ayuno. Medio de incubación: 2 mM de MES-TEA pH 6, 20 mM de glucosa, 0.3 mM de cianuro de sodio, 8.8 μM de agua oxigenada en un volumen final de 10 mL. Al iniciar el trazo se adiciona 250 mg en peso húmedo de levadura. Se realizó una curva patrón de HCl. Trazo representativo de tres repeticiones.

Con etanol como sustrato, con *S. cerevisiae*, luego de una alcalinización del medio al agregar las células, se observó una muy leve acidificación (Fig. 15). Algo semejante ocurrió con *C. albicans* (Fig. 16).

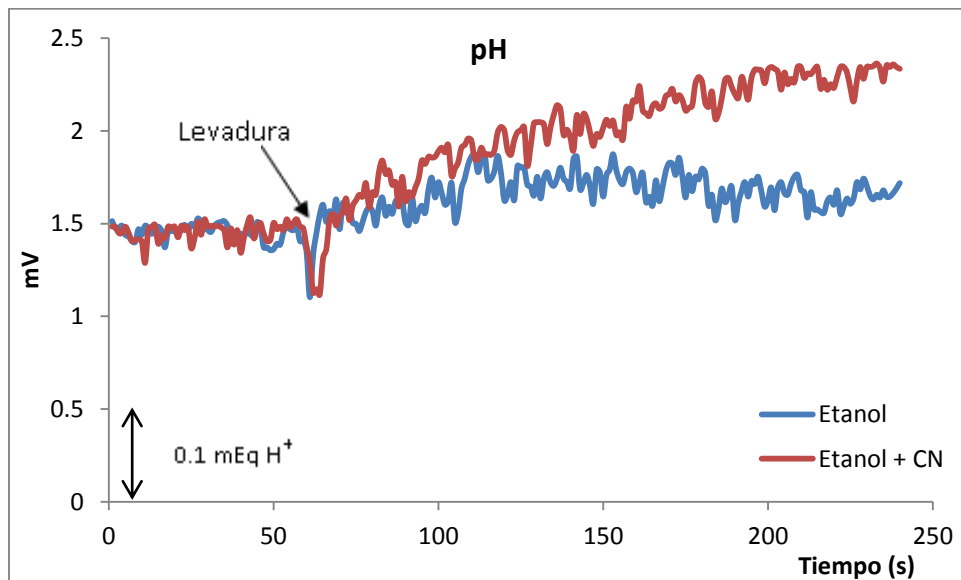


Figura 15.- Cambios del pH del medio producidos por *S. cerevisiae* con 24 horas de ayuno. Medio de incubación: 2 mM de MES-TEA pH 6, 20 mM de etanol en un volumen final de 10 mL. Al iniciar el trazo se agregó 250 mg en peso húmedo de levadura. Se realizó una curva patrón de HCl. Trazo representativo de tres repeticiones.

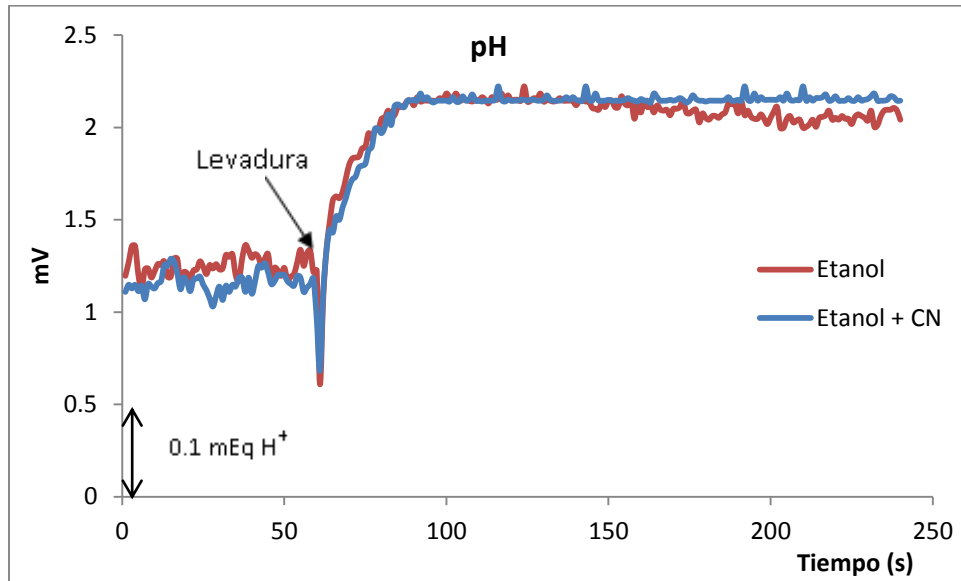


Figura 16.- Cambios del pH del medio con *C. albicans* con 48 horas de ayuno. Medio de incubación: 2 mM de MES-TEA pH 6, 20 mM de etanol en un volumen final de 10 mL. Al iniciar el trazo se agregó 250 mg en peso húmedo de levadura. Se realizó una curva patrón de HCl. Trazo representativo de tres repeticiones.

También en *S. cerevisiae*, la presencia de 0.3 mM de cianuro de sodio, inhibió la acidificación (Fig. 17).

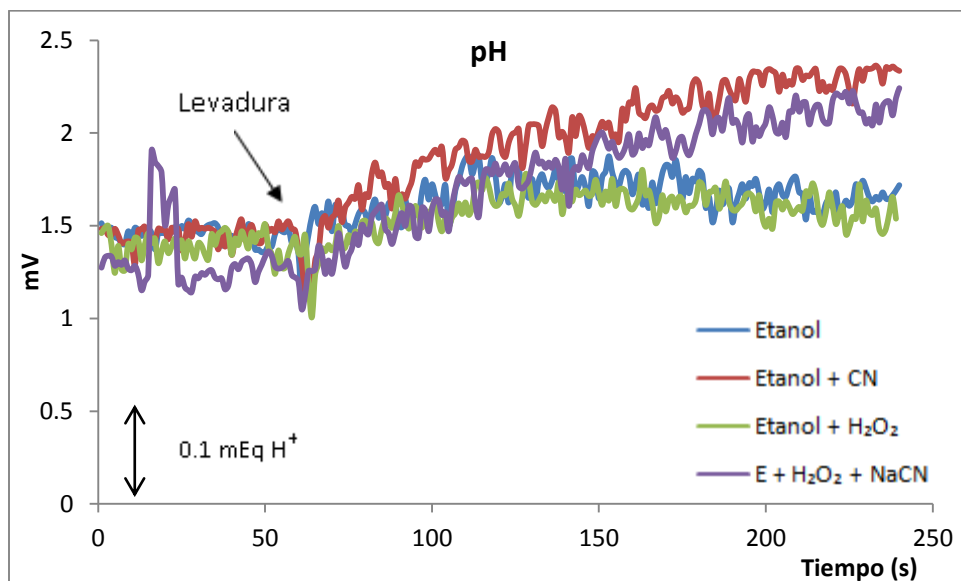


Figura 17.- pH en la levadura *S. cerevisiae* con 24 horas de ayuno. Medio de incubación: 2 mM de MES-TEA pH 6, 20 mM de etanol, 0.3 mM de cianuro de sodio, 8.8 μ M de agua oxigenada en un volumen final de 10 mL. Al iniciar el trazo se agregó 250 mg en peso húmedo de levadura. Se realizó una curva patrón de HCl. Trazo representativo de tres repeticiones.

Algo semejante ocurrió con *C. albicans*, la presencia de CN^- inhibió la acidificación, pero la adición de peróxido de hidrógeno revirtió el efecto, observándose una acidificación semejante a la del trazo control con sustrato (Fig. 18).

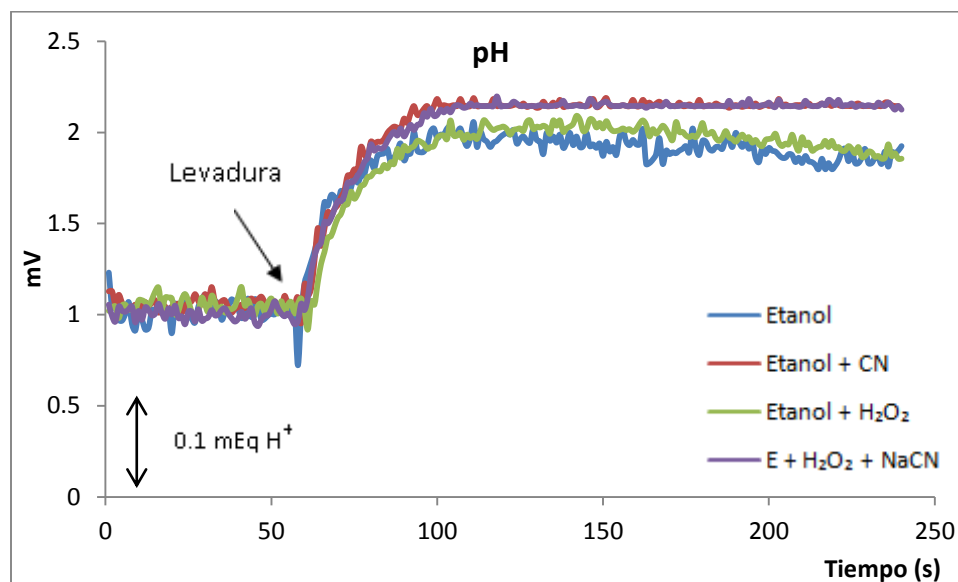


Figura 18.- pH en la levadura *C. albicans* con 48 horas de ayuno. Medio de incubación: 2 mM de MES-TEA pH 6, 20 mM de etanol, 0.3 mM de cianuro de sodio, 8.8 mM de agua oxigenada en un volumen final de 10 mL. Al iniciar el trazo se adiciona 250 mg en peso húmedo de levadura. Se realizó una curva patrón de HCl. Trazo representativo de tres repeticiones.

9.4 Consumo de oxígeno.

Dado que el cianuro es un inhibidor de la respiración, se realizaron experimentos para confirmar su efecto sobre la cadena respiratoria. La Figura 19 muestra que la respiración con glucosa como sustrato, se inhibe en efecto con cianuro en concentraciones de 0.1-0.3 mM; pero no en su totalidad pues esta levadura posee una cadena alterna para el transporte de electrones, insensible al cianuro (Calahorra *et al.*, 2012). Este efecto no se observó en *S. cerevisiae* por carecer de esta cadena (Fig. 20).

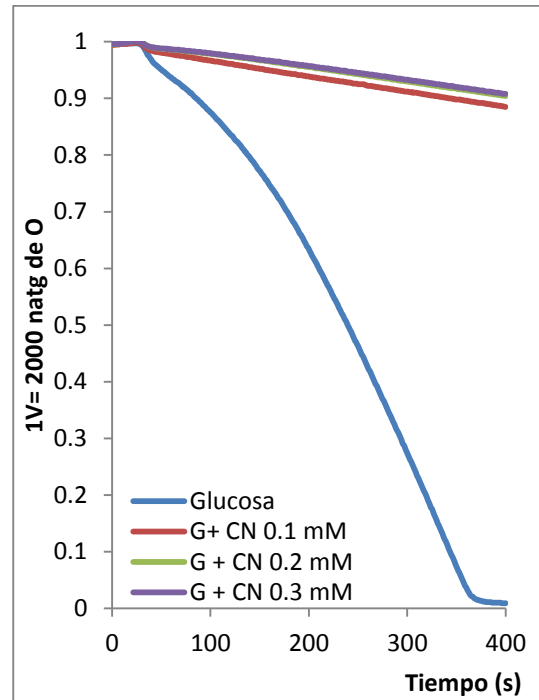
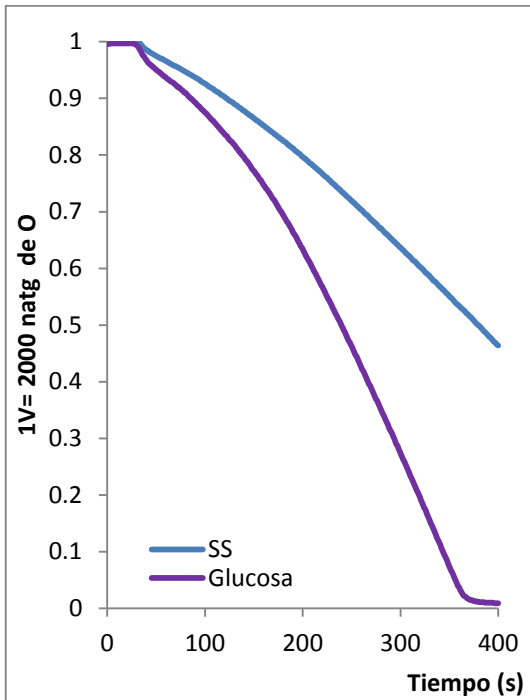


Figura 19.- Respiración de *C. albicans* con 48 horas de ayuno. La levadura (50 mg de peso húmedo) se añadió al siguiente medio de incubación : 10 mM de Buffer MES-TEA pH 6, 20 mM de glucosa y 0.1-0.3 mM de NaCN en un volumen final de 5 mL a una temperatura de 30°C. El seguimiento en el consumo de oxígeno se realizó con un electrodo Clark, conectado a un voltímetro . SS: sin sustrato. Trazo representativo de tres repeticiones.

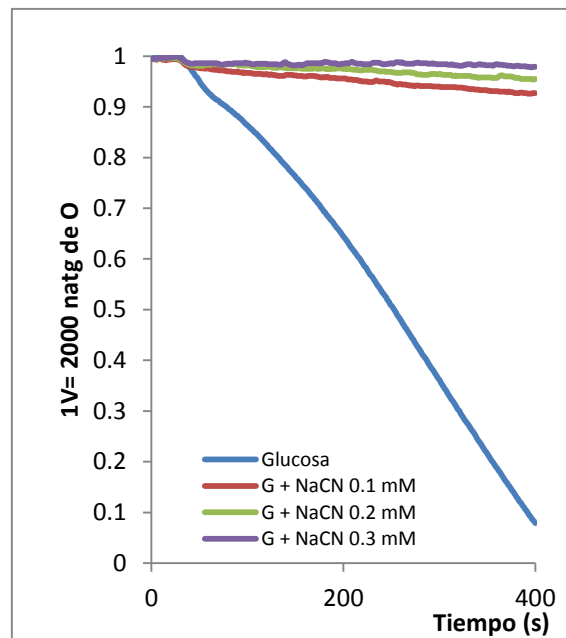
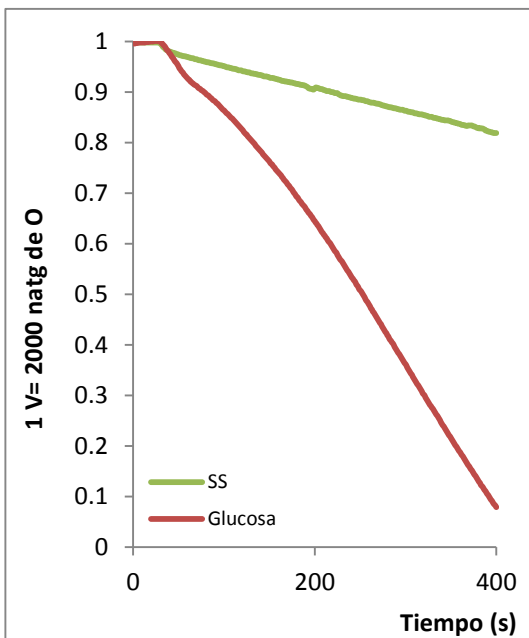


Figura 20.- Respiración de *S. cerevisiae* con 18 horas de ayuno. La levadura (50 mg de peso húmedo) se añadió al siguiente medio de incubación: 10 mM de Buffer MES-TEA pH 6, 20 mM de glucosa y 0.1-0.3 mM de NaCN en un volumen final de 5 mL a una temperatura de 30°C. El

seguimiento en el consumo de oxígeno se realizó con un electrodo Clark, conectado a un voltímetro. SS: sin sustrato. Trazo representativo de tres repeticiones.

Se evaluaron otros compuestos como el CCCP y la antimicina A. Estos compuestos mostraron los efectos esperados; el primero aceleró la respiración; la antimicina A tuvo un efecto inhibitorio retardado, debido a baja solubilidad del compuesto (figuras mostradas en anexos).

Con etanol como sustrato, los efectos fueron semejantes; es decir, el CN⁻ no inhibió totalmente la respiración en *C. albicans*, y sí en *S. cerevisiae* (Figs. 21 y 22). En la sección de anexo se muestra que en *C. albicans*, la adición combinada de cianuro y octilgalato sí produjo la inhibición casi total de la respiración.

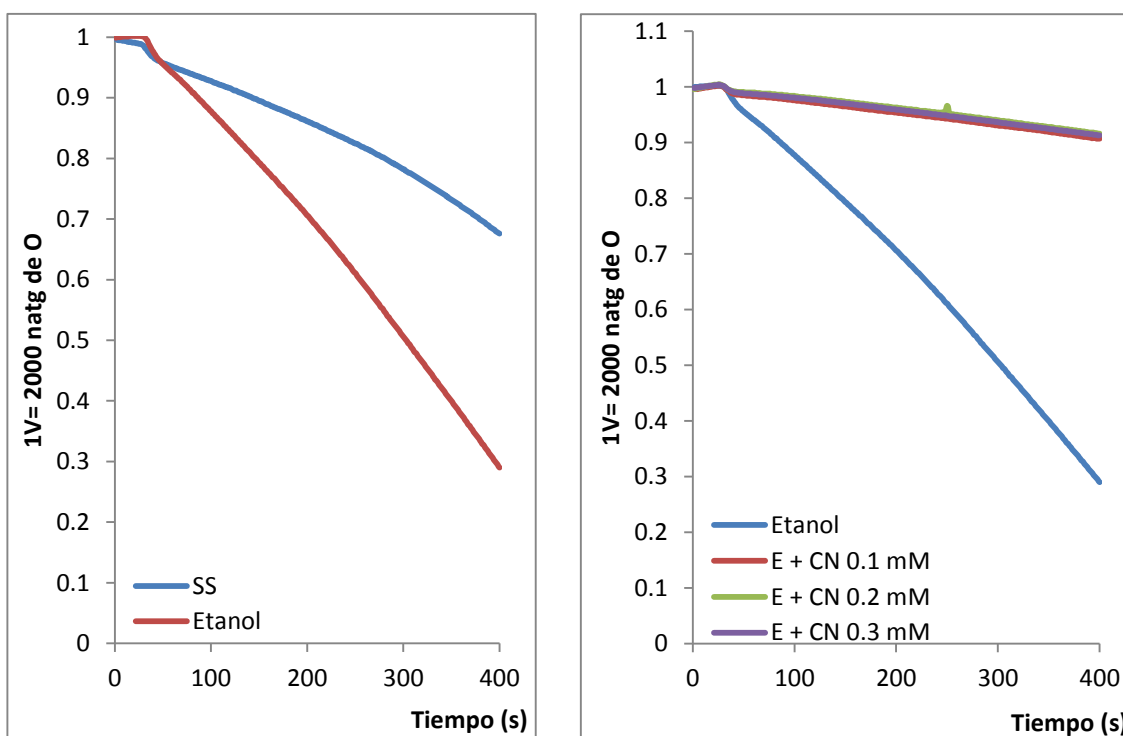


Figura 21.- Efectos del cianuro sobre la respiración en *C. albicans* con 48 horas de ayuno con etanol como sustrato. La levadura (50 mg de peso húmedo), se colocó en 10 mM de Buffer MES-TEA pH 6, 20 mM de etanol y 0.1-0.3 mM de NaCN en un volumen final de 5 mL a una temperatura de 30°C, El seguimiento en el consumo de oxígeno se siguió con un electrodo Clark, conectado a un voltímetro. SS: sin sustrato. Trazo representativo de tres repeticiones.

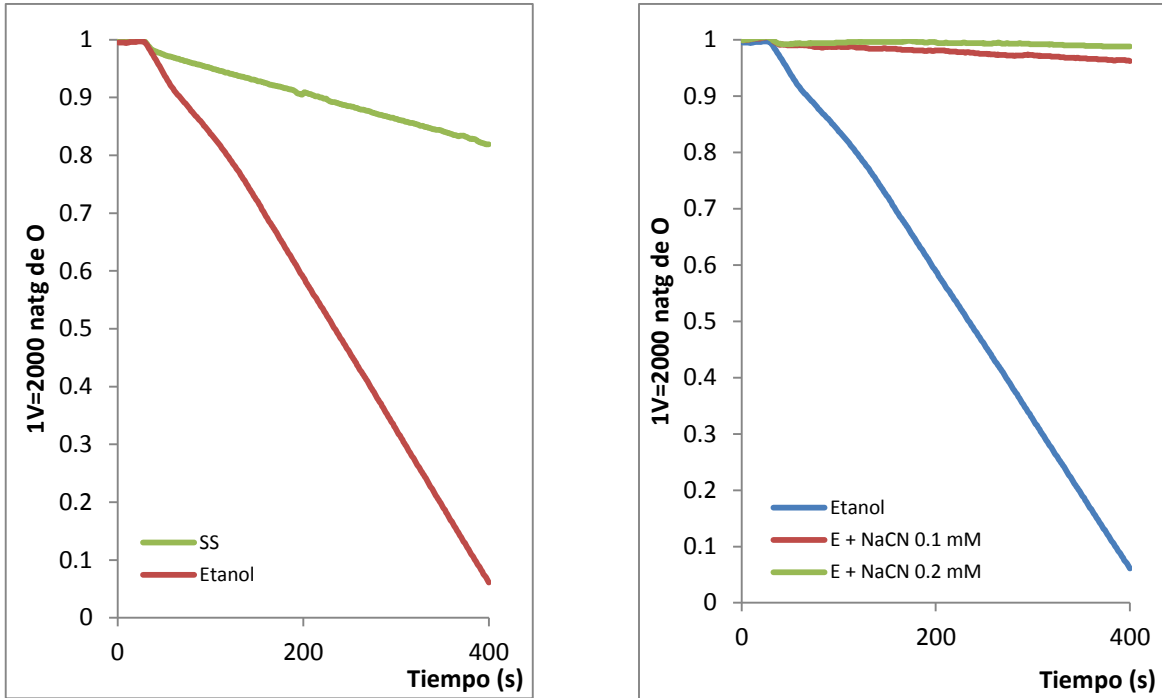


Figura 22.- Respiración de *S. cerevisiae* con 18 horas de ayuno con etanol como sustrato. La levadura (50 mg de peso húmedo), se colocó en 10 mM de Buffer MES-TEA pH 6, 20 mM de etanol y 0.1-0.3 mM de NaCN en un volumen final de 5 mL a una temperatura de 30°C, El consumo de oxígeno se siguió con un electrodo Clark, conectado a un voltímetro. SS: sin sustrato. Trazo representativo de tres repeticiones.

9.5 Determinación de etanol en extractos de *C. albicans* ATCC 10231.

Dado que el cianuro inhibía el transporte de potasio con glucosa como sustrato, y no sólo la respiración, sino también la glucólisis en células enteras, se consideró probable la existencia de alguna interacción de la cadena respiratoria mitocondrial con la vía glucolítica. Para ello se prepararon extractos de las células en dos condiciones; en la primera, luego de lisar las células con perlas de vidrio, se centrifugaron a una velocidad relativamente baja (3000 X g), para deshacerse de las células no rotas y otros fragmentos de mayor tamaño. En la segunda, simplemente se centrifugaron las células a una mayor velocidad (17, 500 X g) para deshacerse de las mitocondrias, que a esta velocidad se separan del extracto.

Con estos dos tipos de preparaciones se determinó luego el efecto del cianuro sobre la producción de alcohol.

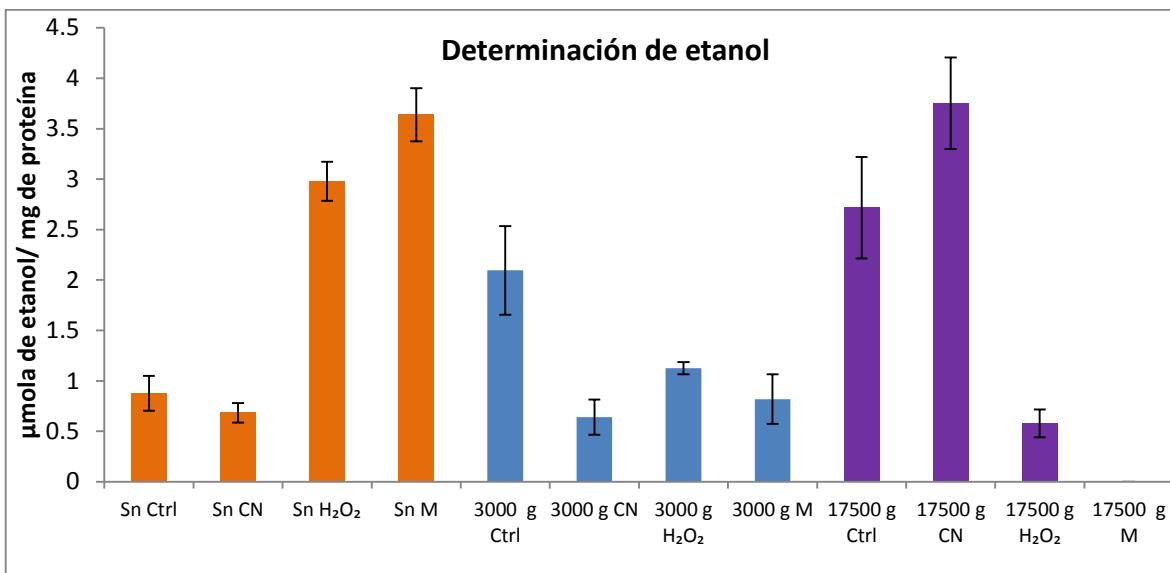


Figura 23.- Producción de etanol por extractos libres de células de *C. albicans* cepa 10231. Se utilizaron extractos sin centrifugar (barras naranjas), o centrifugados a 3000 X g (barras azules) y a 17500 X g (barras moradas). Los extractos (mg de proteína) se incubaron en 10 mM de buffer MES-TEA pH 6, 67 mM de glucosa, 6.7 mM de KH₂PO₄ pH 6.5, 6.7 mM MgCl₂, 0.67 de ATP y 0.50 mM de NAD⁺, en un volumen final de 3 mL. M indica la combinación de cianuro y peróxido de hidrógeno; Sn: extractos libres de células sin centrifugar; CN: cianuro. Con los sobrenadantes se realizó la determinación (n>6).

Este experimento (Fig. 23) muestra, en extractos libres de células, a) la inhibición de la glucólisis por el NaCN 0.3 mM; b) que esta inhibición desapareció en los extractos centrifugados a 17,500 X g; c) que en los extractos de 3000 X g, el peróxido de hidrógeno produjo un aumento de la fermentación, mientras que en los de 17,500 X g produjo una disminución; d) que la adición de H₂O₂ mostró una tendencia a aumentar la fermentación.

Por este motivo se decidió estudiar el efecto del cianuro sobre la actividad de la mayoría de las enzimas que componen la vía.

9.6 Determinación de actividades enzimáticas en extractos de *C. albicans* ATCC 10231.

En esta sección se realizó una aproximación a la actividad de 9 de las enzimas involucradas en la vía fermentativa. Esta determinación nos da un parámetro para conocer si es en este nivel del metabolismo en el cual actúa el cianuro.

9.6.1 Hexocinasa.

Con esta enzima (Fig. 24), se observó que tanto con y sin mitocondrias, en presencia de cianuro, hubo un aumento pequeño, pero estadísticamente significativo.

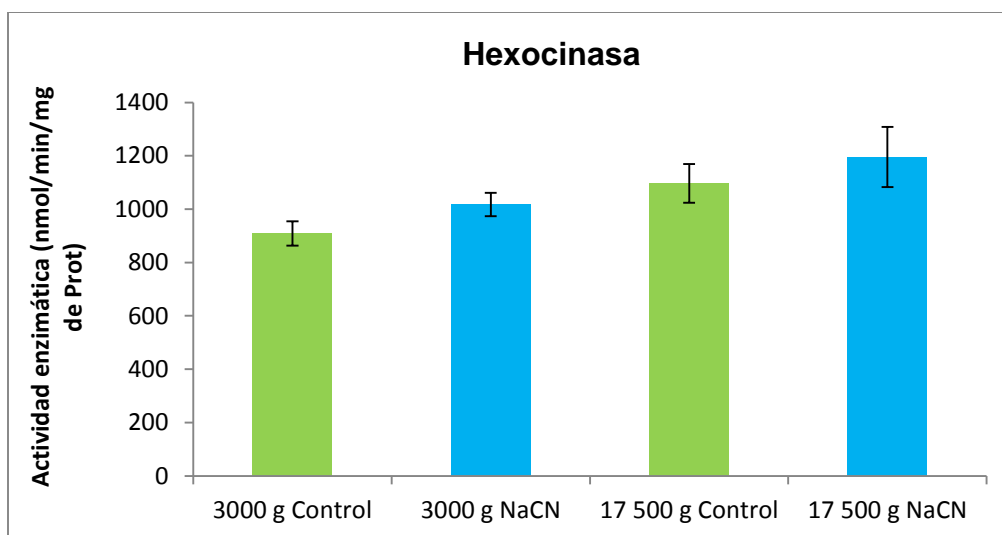


Figura 24.- Actividad enzimática hexocinasa en extractos libres de células de *C. albicans* ayunada durante 48 horas ($n > 3$).

9.6.2 Fosfofructocinasa.

La actividad de esta enzima (Fig. 25), mostró cambios interesantes. La actividad en presencia de cianuro, en los extractos que presentan mitocondrias, mostró una disminución estadísticamente significativa. Por el contrario, en los extractos sin mitocondrias se encontró un aumento, de la actividad en presencia de cianuro.

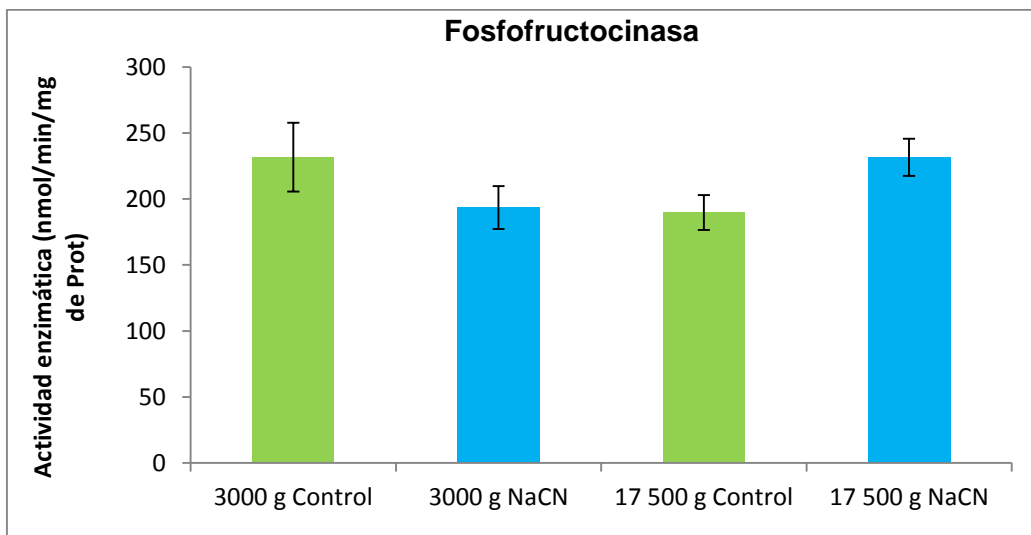


Figura 25.- Actividad enzimática de la fosfofructocinasa en extractos libres de células de *C. albicans* ayunada durante 48 horas (n>3).

9.6.3 Aldolasa.

La actividad de esta enzima, figura 26, mostró un incremento estadísticamente significativo en presencia de cianuro para ambas condiciones.

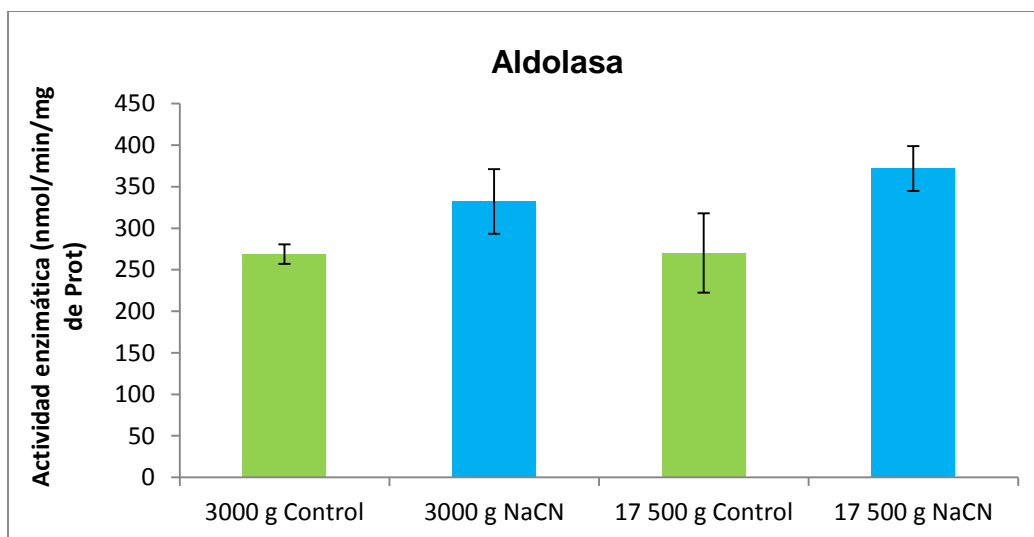


Figura 26.- Actividad enzimática de la aldolasa en extractos libres de células de *C. albicans*, ayunada por 48 horas (n>3).

9.6.4 Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

La actividad de esta enzima, figura 27, no mostró diferencia estadísticamente significativa para ambas condiciones en presencia de cianuro.

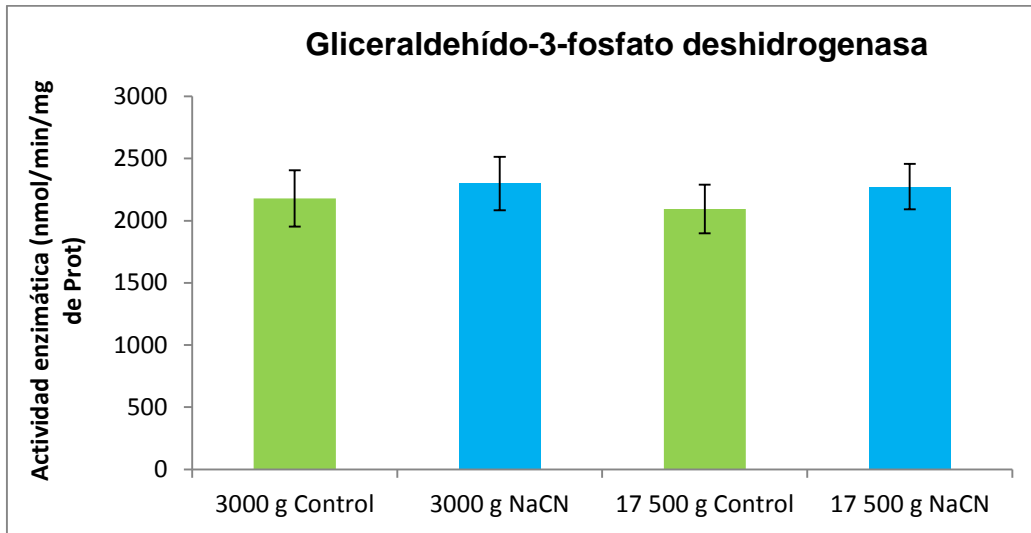


Figura 27.- Actividad enzimática de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en extractos libres de células de *C. albicans* ayunada durante 48 horas (n>3).

9.6.5 Fosfoglicerato cinasa.

Esta enzima es un punto importante dentro de la vía fermentativa, pues se encarga de la transferencia del fosfato del bisfosfoglicerato al ATP. La actividad de esta enzima (Fig. 28), mostró una disminución estadísticamente significativa en presencia de cianuro en los extractos que poseen mitocondrias, mientras que en ausencia de mitocondrias la actividad aumentó.

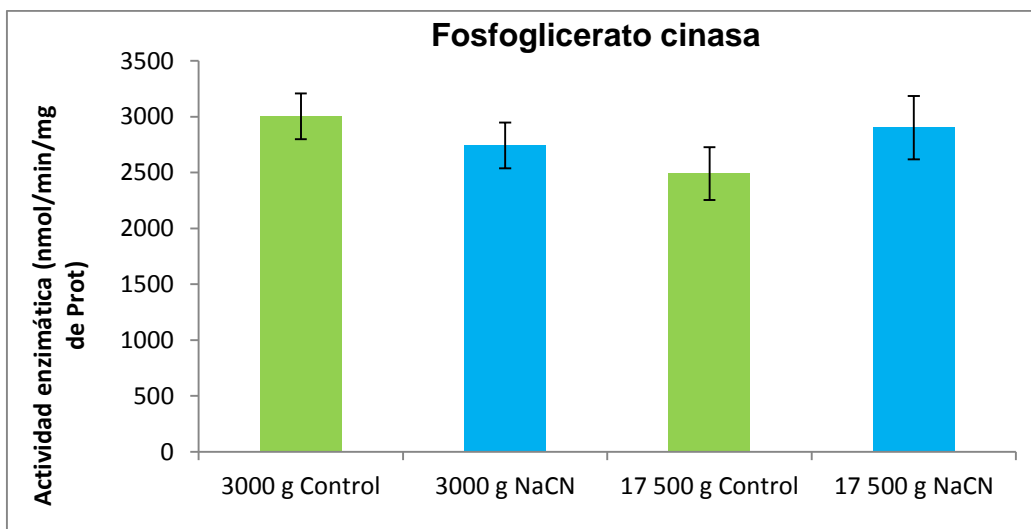


Figura 28.- Actividad enzimática de la fosfoglicerato cinasa en extractos libres de células de *C. albicans* ayunada durante 48 horas (n>3).

9.6.6 Enolasa.

El cianuro produjo un incremento significativamente estadístico en la actividad de la esta enzima, (Fig. 29), en los extractos con mitocondrias; mientras que no hubo cambio en los extractos que carecen de mitocondrias.

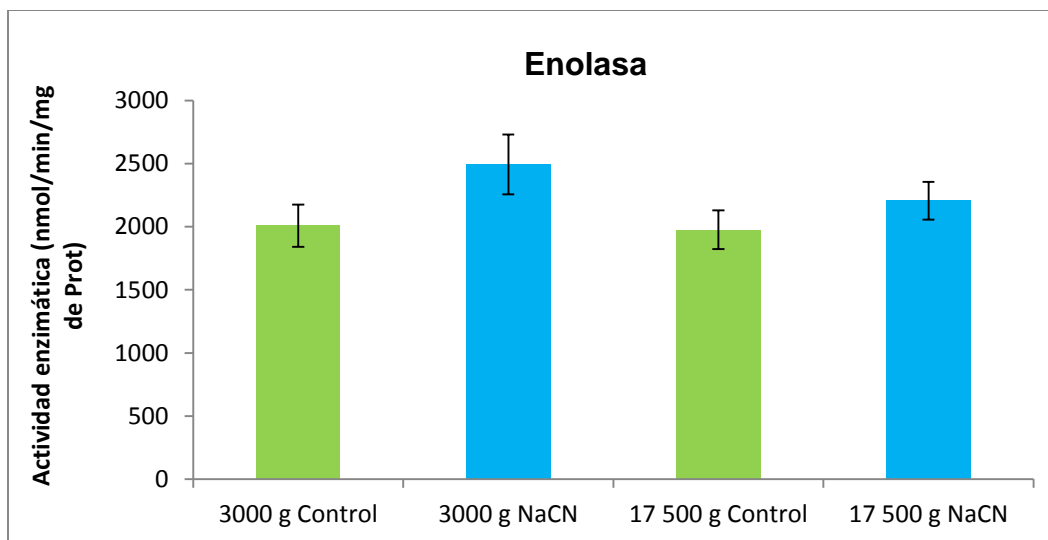


Figura 29.- Actividad enzimática de la enolasa en extractos libres de células de *C. albicans* ayunada durante 48 horas (n>3).

9.6.7 Piruvato cinasa.

La actividad enzimática (Fig. 30), no mostró diferencia en ambas condiciones experimentales en presencia de cianuro.

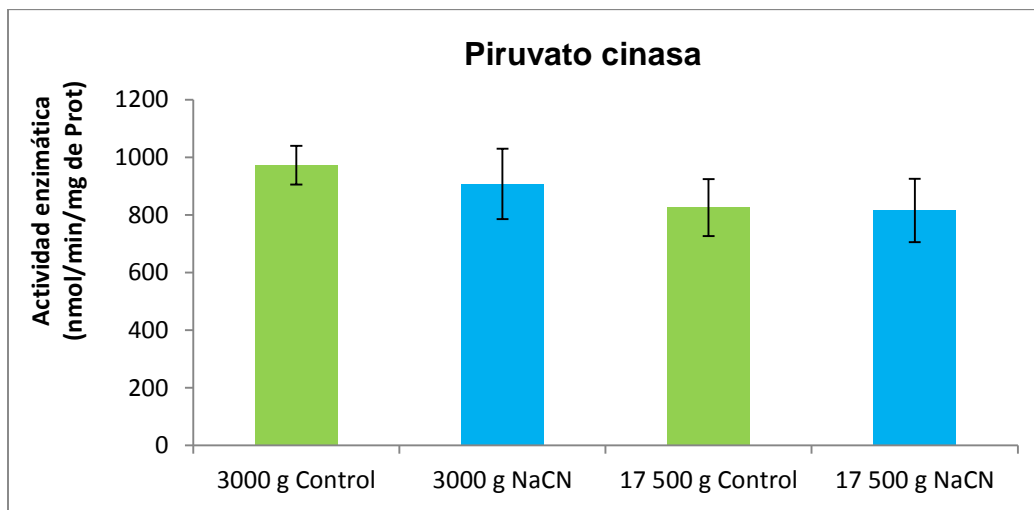


Figura 30.- Actividad enzimática de la piruvato cinasa en extractos libres de células de *C. albicans* ayunada durante 48 horas (n>3).

9.6.8 Piruvato descarboxilasa.

La actividad (Fig. 31), mostró un aumento estadísticamente significativo con el cianuro en los extractos con mitocondrias, contrario a los extractos sin mitocondrias, en los cuales la actividad fue mayor, pero no mostraron cambios.

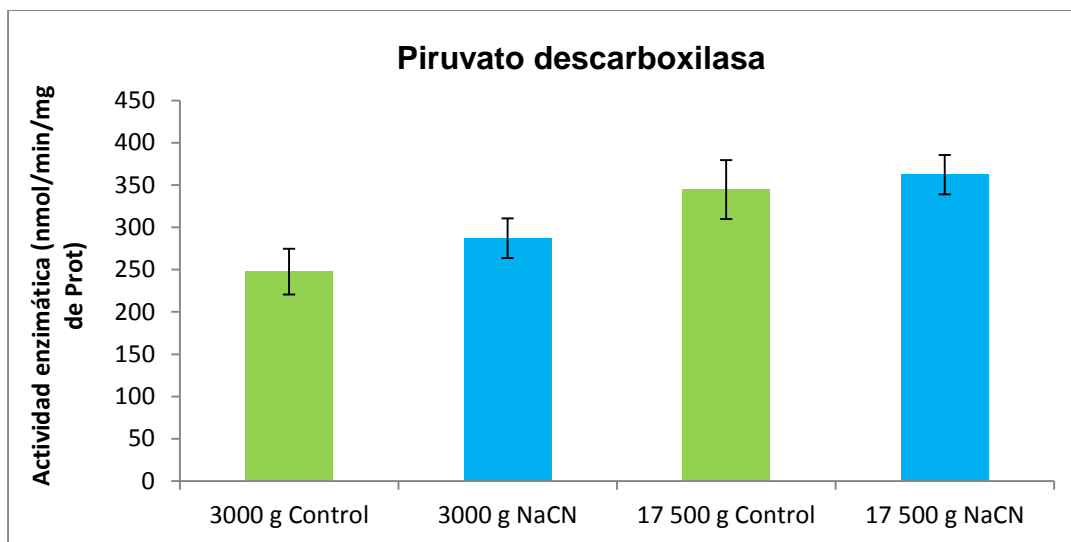


Figura 31.- Actividad enzimática de la piruvato descarboxilasa en extractos libres de células de *C. albicans* ayunadas por 48 horas (n>3).

9.6.9 Alcohol deshidrogenasa.

Esta actividad (Fig. 32), en los extractos con mitocondrias mostró una disminución estadísticamente significativa en presencia de cianuro.

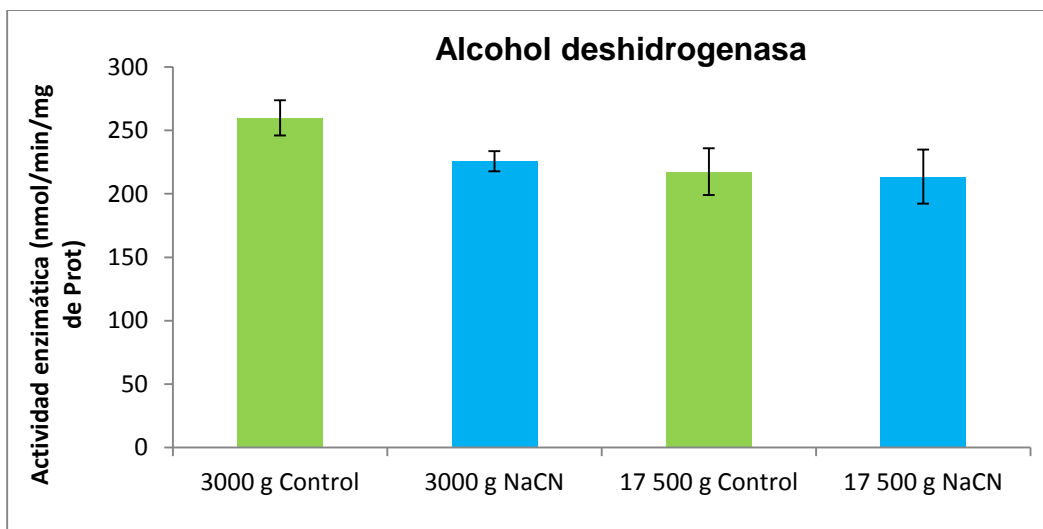


Figura 32.- Actividad enzimática de la alcohol deshidrogenasa en extractos libres de células de *C. albicans* ayunada por 48 horas (n>3).

10. DISCUSIÓN.

C. albicans, es una levadura no convencional, cuya característica objeto de este trabajo es que el cianuro 0.3 mM inhibe por completo tanto la vía glucolítica como la fosforilación oxidativa. Este dato fue obtenido originalmente por Calahorra y cols. (2012). Propusieron que dicha inhibición ocurre en la segunda parte de la vía glucolítica a partir de la formación de gliceraldehído-3-fosfato, sobre la base de los resultados obtenidos al seguir los niveles de NADH; se encontró que la reoxidación de esta coenzima era el paso limitante para continuar con la vía glucolítica en presencia de cianuro. Este efecto es novedoso por no estar presente en otras levaduras.

Por ello, a partir de aquellos resultados se planteó en primer lugar definir si el efecto se encontraba sólo en una cepa o especie, o era característica del género. Se encontró el mismo efecto al evaluar tres cepas de *Candida albicans*, además de estar presente en *C. dubliniensis* y también en *C. parapsilosis*, no obstante que esta última mostró una capacidad menor para la fermentación. Por este motivo se decidió que fuera la cepa 10231, para realizar las determinaciones experimentales, ésta genera una biomasa considerable durante las primeras 24 horas (alrededor de 12 g en 500 mL de medio YPD) y además esta cepa fue modelo experimental en el artículo de Calahorra y cols. (2012), el cual se tiene como referencia en este proyecto. En cuanto al uso de peróxido de hidrógeno en la célula entera, nos dio la pauta para determinar que este compuesto no afecta los niveles de etanol producidos, sin embargo debemos recordar que en presencia de oxígeno esta levadura prefiere obtener energía a través de la fosforilación oxidativa y en cuanto a utilizar tanto cianuro de sodio como peróxido de hidrógeno en un mismo ensayo nos demuestra que la obtención de energía no está limitada a las vías metabólicas clásicas, sino que existe una vía alterna que oxida el NADH producido durante la glucólisis, a estas vías también se le consideran como fermentaciones de compuestos orgánicos, estos datos se comprueban con los subsecuentes resultados.

Los resultados, por otra parte, concuerdan con la inhibición del bombeo de protones, y por consecuencia, del transporte de K^+ esperables. Si en estas

levaduras el cianuro inhibe no sólo la respiración, sino también la fermentación, pues ello repercute sobre todo el metabolismo energético de la célula, que así se ve desprovista de la energía (ATP) necesaria para realizar sus funciones, entre las cuales destacan por su importancia las del transporte de potasio.

Habiendo encontrado el efecto en células enteras, se decidió evaluar *in vitro* la vía glucolítica, preparando extractos libres de células. Para ello se decidió medir, tanto la producción de etanol como la actividad de algunas enzimas. Ya la inhibición de la fermentación por un inhibidor de la respiración permitía sospechar una interacción de las enzimas de la vía glucolítica con la mitocondria.

Por este motivo se decidió someter los extractos a diferentes velocidades de centrifugación para contar con dos preparaciones en las cuales estuvieran o no presentes las mitocondrias.

Se encontró que en los extractos que no se centrifugaron, o en los que se centrifugaron a la menor velocidad, el cianuro disminuyó la producción de etanol, confirmando la hipótesis de que en este proceso están implicadas las mitocondrias, probablemente por una interacción de estos orgánulos con alguna o algunas enzimas de la vía glucolítica.

Buscando aclarar este último hecho, se recurrió a evaluar la actividad de 9 enzimas de la vía glucolítica, bajo ambas condiciones: extractos con mitocondrias (centrifugados a 3000 X g) o libres de mitocondrias (centrifugados a 17,500 X g). Se encontró que para aquellos extractos que presentaban mitocondrias, tres enzimas (fosfofructocinasa, fosfoglicerato cinasa y alcohol deshidrogenasa) mostraron una disminución estadísticamente significativa, de su actividad en presencia del inhibidor.

Se sabe que en general la fosfofructocinasa regula la velocidad de la vía glucolítica por su baja actividad y ser una enzima irreversible; por esto, una disminución en la formación de su producto, ocasiona que la vía se vuelva más lenta, con el efecto subsecuente para el resto de la vía.

La fosfoglicerato cinasa inicia la segunda etapa de la vía, en donde se obtiene energía a través de la fosforilación del ADP a ATP, y la disminución en su

actividad puede causar una disminución de este intermediario, vital para la célula por ser una de las principales fuentes de energía en la glucólisis.

La alcohol deshidrogenasa es una enzima importante al final de la vía para la formación de etanol. Su inhibición implicaría que no se pueda oxidar al NADH, lo que modifica la concentración de NAD⁺, que detendría a la vía a nivel de la glicelaldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

El aumento de la actividad de algunas enzimas en presencia de cianuro es difícil de explicar en cuanto al mecanismo y su significado en la actividad de la vía. Sin embargo, las disminuciones de las actividades de algunas enzimas son de tal magnitud, que cuesta trabajo no invocarlas como la causa de la importante disminución que se observó en la producción de etanol.

Otro dato importante, diferente de lo que se observa en *S. cerevisiae*, consiste en que en esta levadura, en presencia de cianuro, al agregar las levaduras al principio del trazo, en presencia de glucosa, los niveles de NADH, estimados por su fluorescencia a 340 nm, aumentan y luego disminuyen (Fig. 33).

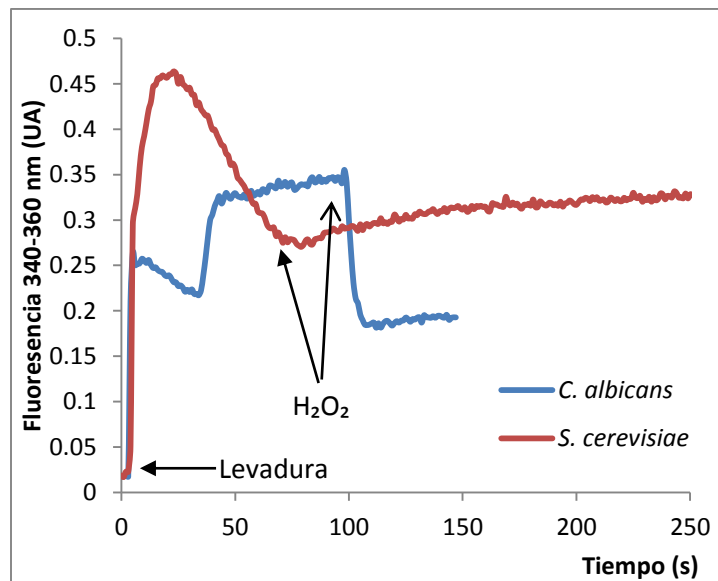


Figura 33.- Reducción del NAD⁺ en *S. cerevisiae* y *C. albicans* en presencia de glucosa: se probó 0.3 mM de Cianuro de sodio y 20 μM de octilgalato. Posteriormente se utilizó peróxido de hidrógeno. UA: unidades arbitrarias (Figura realizada por el Dr. Antonio Peña Díaz, 2014).

En cambio, con *C. albicans*, al agregar la glucosa en presencia de cianuro se produjo un aumento de la fluorescencia, que no va seguido de una disminución, como en *S. cerevisiae*. Tal cosa indica que la segunda parte de la glucólisis está inhibida, impidiendo la reoxidación del NADH para convertirlo en el NAD⁺ necesario para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Este experimento concuerda con lo ya analizado; es decir, que el cianuro inhibe por algún mecanismo la segunda parte de la glucólisis. Sin embargo, otro dato sorprendente es que en las células que están en presencia de cianuro el consumo de glucosa está inhibido y la adición de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) produjo una disminución inmediata del NADH aun por debajo de los niveles iniciales. En este experimento, por otra parte, dio resultados semejantes al hacerlo sólo en presencia de cianuro, o como se muestra en la figura 33, con la presencia adicional de octilgalato, inhibidor este último de la cadena alterna de transporte de electrones, con la idea de que, aun en presencia de cianuro, estuviera funcionando esta vía para deshacerse de los electrones del NADH. Este dato no deja de sorprender, dado que esta levadura se caracteriza por ser Pasteur positiva, en la cual en presencia de oxígeno reprime la producción de etanol y Crabtree negativa (Veiga *et al.*, 2000).

Hasta ahora no tenemos explicación para estos dos fenómenos; sin embargo, los datos indican una estrecha relación de la glucólisis con la mitocondria, cuyo mecanismo no conocemos aún. Proponemos una hipótesis sobre este fenómeno: en organismos más complejos como las plantas, el metabolismo se encuentra altamente coordinado, por lo que se desarrollan complejos enzimáticos denominados metabolones, los cuales forman compartimentos particulares en donde se favorece la transferencia directa de los sustratos, esta canalización de metabolitos a partir del primer producto formado, resultando en una catálisis en forma de cascada, favoreciendo a su vez la eficiencia de la vía (Jørgensen *et al.*, 2005). Este antecedente también ha sido objeto de investigación en la levadura *S. cerevisiae*. Araiza *et al.* (2013) proponen que en esta levadura, existen complejos multienzimáticos de la vía fermentativa, los cuales se estabilizan a través de polímeros de actina, mejorando la eficiencia

de esta vía. En consecuencia con estos antecedentes, se propone que estos metabolitos también se encuentren en *C. albicans* formando así una red con las enzimas de la vía fermentativa, combinada tal vez con procesos mitocondriales, que resulten en que al inhibir la cadena respiratoria en el complejo IV por cianuro, se produzca algún cambio que inhiba o retrase la vía. Harán falta más experimentos que soporten esta propuesta; lo cual quedará como perspectiva del proyecto.

Por otra parte, existe otra vía para la oxidación del NADH, diferente a la cadena respiratoria, que puede operar ante la adición de peróxido de hidrógeno en presencia de los dos inhibidores, cianuro y octilgalato. Ésta es una cadena paralela (PAR) descrita en *C. albicans* (Helmerhost *et al.*, 2002), que reduce el oxígeno en agua, disipando los electrones que el complejo IV no puede procesar. Milani *et al.*, (2001), evaluaron esta vía en *C. parapsilosis*, con la cual determinaron que una concentración mayor a 10 mM de cianuro la inhibe por completo, además determinaron que el porcentaje de oxígeno que se consume es de alrededor del 10%. A nivel experimental nosotros probamos una concentración menor a la inhibitoria en esta vía por lo que esta reoxidación del NADH podría ser a través de esta cadena paralela.

11. CONCLUSIONES.

C. albicans es una levadura de importancia clínica, que tiene procesos metabólicos particulares, un ejemplo de esto es la inhibición de la producción de etanol en presencia de cianuro (inhibidor de la cadena respiratoria). Dentro de este proyecto se trató de definir el mecanismo por el cual sucedía dicho fenómeno, pero hasta este punto no tenemos el sustento necesario para describir este proceso. Lo que encontramos fue que esta interacción es común para el género *Candida*; en cuanto a la producción de etanol es menor en presencia de cianuro y no es un efecto que se observe en la levadura de modelo *S. cerevisiae*; estos resultados son congruentes con la inhibición que se observó tanto en el transporte de potasio, la acidificación del medio y el consumo de oxígeno; este efecto se podría asumir se encuentra ligado a la mitocondria efecto que se determinó en la producción de etanol y actividad enzimática de extractos libres de células.

12. PERSPECTIVAS.

Para conocer el mecanismo del cianuro sobre la vía fermentativa, se propone purificar las enzimas que se ven afectadas con este compuesto orgánico, además de evaluar la actividad enzimática utilizando otros inhibidores de la cadena respiratoria.

Obtener levaduras ρ^- (células que no poseen mitocondrias); evaluar con esta cepa la producción de etanol en presencia de cianuro; este experimento nos confirmaría la interacción de la respiración mitocondrial con la inhibición por cianuro.

Realizar curvas de crecimiento de *C. albicans* ATCC 10231, utilizando cianuro en el medio de incubación, para determinar el comportamiento bajo esta condición.

13. BIBLIOGRAFÍA.

- Araiza-Olivera, D.; Chiquete-Félix, N.; Rosas-Lemus, M.; Sampedro, J.G.; Peña A.; Mujica, A.; Uribe-Carvajal, S. A glycolytic metabolon in *Saccharomyces cerevisiae* is stabilized by F-actin. *FEBS journal* **2013**, 280, 3887-3905.
- Askew, C.; Sellam, A.; Epp, E.; Hogues, H.; Mullick, A.; Nantel, A.; Whiteway, M. Transcriptional regulation of carbohydrate metabolism in the human pathogen *Candida albicans*. *PLOS Pathogens* [en línea] **2009**, 5, 1-20.
- Bergmeyer, H. U.; Grassl, M.; Walter, H. E. *Methods of enzymatic analysis*, 3ª ed; VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1983.
- Bonifaz, T. A. J *Micología médica básica*, 3ª ed; Mc Graw Hill: México, 2010.
- Cabrera, Alfredo. Tesis: Caracterización de la cadena respiratoria y la transición de la permeabilidad de mitocondrias aisladas de *Debaryomyces hansenii*, UNAM, 2010.
- Calahorra, M.; Sánchez, N. S.; Peña, A. Characterization of glycolytic metabolism and ion transport of *Candida albicans*. *Yeast* **2012**, 29, 357-370.
- Dumitru, R.; Hornby, J. M.; Nickerson, K. W. Defined anaerobic growth medium for studying *Candida albicans* basic biology and resistance to eight antifungal drugs. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2004**, 48, 2350-2354.
- Flores, C. L.; Rodríguez, C.; Petit, T.; Gancedo C. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiology Reviews* **2000**, 24,507-529.
- Helmerhorst, E. J.; Murphy, M. P.; Troxler, R. F.; Oppenheim, F. G. Characterization of the mitochondrial respiratory pathways in *Candida albicans*. *Biochimica et biophysica acta* **2002**, 1556, 73-80.
- Jørgensen, K.; Vinther, A.; Morant, M.; Holm, A.; Bjarnholt, N.; Zagrobelny, M.; Bak, S.; Lindberg, B. Metabolon formation and metabolic channeling in

the biosynthesis of plant natural products. *Current opinion in plant biology* **2005**, 8, 280-291.

- Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Dunlap, P. V.; Clark, D. P. *Brock, Biología de los microorganismos*, 12^a ed ; Pearson Addison Wesley: España, 2009.
- Markwell, K. M. A.; Hass, M. S.; Bieber, L. L.; Tolbert, N. E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical biochemistry* **1978**, 87, 206-210.
- Milani G.; Jarmuszkiwicz W.; Sluse-Goffart M. C.; Schreiber Z. A.; Vercesi E. A.; Sluse E. F. Respiratory chain network in mitochondria of *Candida parapsilosis*: ADP/O appraisal of the multiple electron pathways. *FEBS Letters* **2001**, 58, 231-235.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger principios de bioquímica*, 4^a ed; Sarvier: España, 2005.
- Peña, A.; Cinco, G.; Gómez-Puyou, A.; Tuena, M. Effect of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of biochemistry and biophysics* **1972**, 152, 413-425.
- Peña, A; Arroyo, Gómez, Tapia, Gómez. *Bioquímica*, 2^a ed.: Editorial Limusa, México, 2004.
- Rozpędowska, E.; Galafassi, S.; Johansson, L.; Hagman, A.; Piškur, J.; Compagno, C. *Candida albicans*- a pre-whole genome duplication yeast-is predominantly aerobic and a poor ethanol producer. *FEMS Yeast research* **2011**, 11, 285-291.
- Ruy, F.; Vercesi, A. E.; Kowaltowski, A. J. Inhibition of specific electron transport pathways leads to oxidative stress and decreased *Candida albicans* proliferation. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **2006**, 38, 129-135.
- Sánchez N. S.; Calahorra M.; González-Hernández J. C.; Peña A. Glycolytic sequence and respiration of *Debaryomyces hansenii* as compared to *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* [en línea] **2006**, 23, 361-374.
- Spencer, J. F. T.; Ragout de Spencer, A. L.; Laluce, C. Non-conventional yeasts. *Applied microbiology biotechnology* **2002**, 58, 147-156.

- Souciet, J.; Aigle, M.; Artiguenave, F.; Blandin, G.; Bolotin-Frukuhara, M.; Bon, E.; Brottier, P.; Casaregola, S.; Montigny, J.; Dujon, B.; Durrens, P.; Gaillardin, C.; Lépingle, A.; Llorente, B.; Malpertuy, A.; Neuvéglise, C.; Ozier-Kalogéropoulos, O.; Potier, S.; Saurin, W.; Tekaiia, F.; Toffano-Nioche, C.; Wésolowski-Louvel, M.; Wincker, P.; Weissenbach, J. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 1. A set of yeast species for molecular evolution studies. *FEBS Letters* **2000**, 487, 3-12.
- Veiga, A.; Arrabaça, J. D.; Loureiro-Dias, M. C. Cyanide-resistant respiration is frequent, but confined to yeasts incapable of aerobic fermentation. *FEMS Microbiology Letters* **2000**, 190, 93-97.
- Veiga, A.; Arrabaça, J. D.; Loureiro-Dias, M. C. Stress situations induce cyanide-resistant respiration in spoilage yeasts. *Journal of Applied Microbiology* **2003**, 95, 364-371.

14. ANEXO.

Transporte de potasio.

C. albicans en presencia de antimicina A y CCCP.

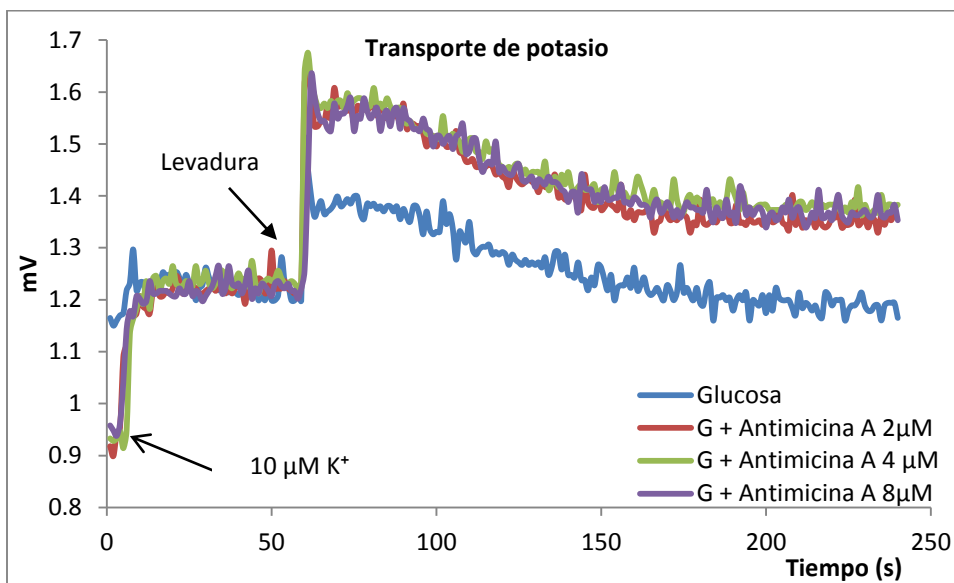


Figura 34.- Transporte de potasio en la levadura *C. albicans* con 48 horas de ayuno. Incubación: 2 mM de MES-TEA pH 6, 20 mM de glucosa, 2-8 µM de antimicina A en un volumen final de 10 mL. Una vez que se inicia el trazo se agregó 10 µM de KCl como referencia y a los 50 segundos 250 mg en peso húmedo de levadura. Trazo representativo de tres repeticiones.

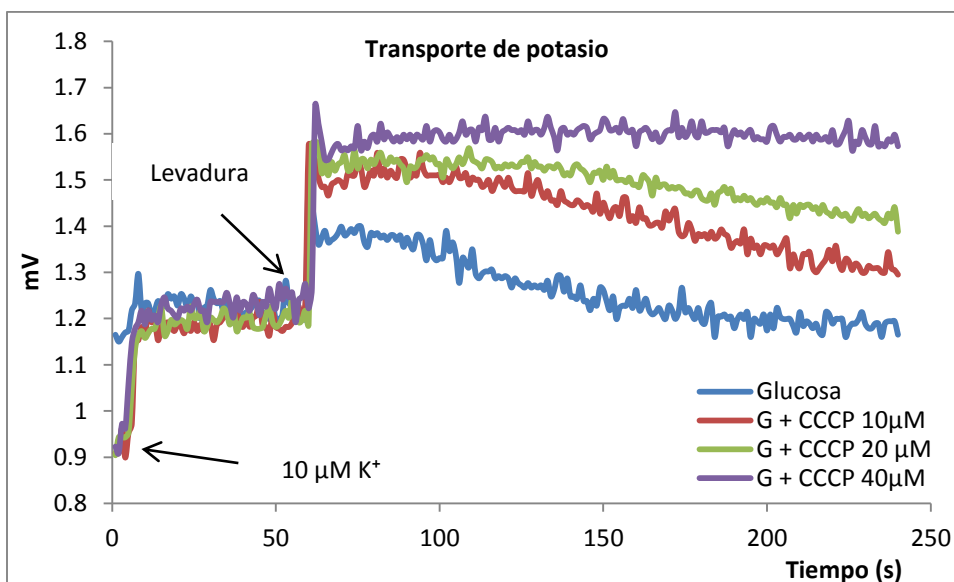


Figura 35.- Transporte de potasio en la levadura *C. albicans* con 48 horas de ayuno. Incubación: 2 mM de MES-TEA pH 6, 20 mM de glucosa, 10-40 µM de

CCCP en un volumen final de 10 mL. Una vez que se inicia el trazo se agregó 10 μM de KCl como referencia y a los 50 segundos 250 mg en peso húmedo de levadura. Trazo representativo de tres repeticiones.

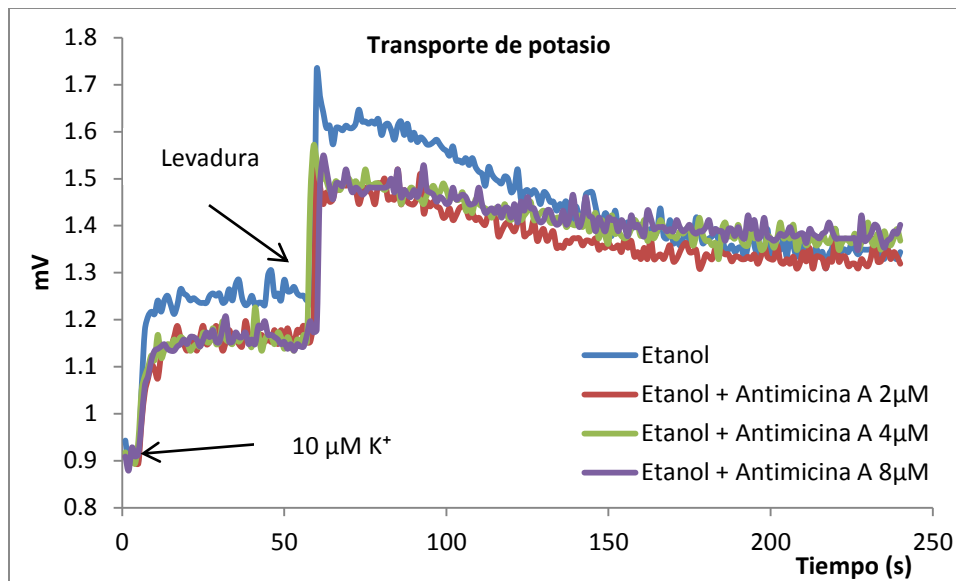


Figura 36.- Transporte de potasio en la levadura *C. albicans* con 48 horas de ayuno. Incubación: 2 mM de MES-TEA pH 6, 20 mM de etanol, 2-8 μM de antimicina A en un volumen final de 10 mL. Una vez que inicia el trazo se agregó 10 μM de KCl como referencia y a los 50 segundos 250 mg en peso húmedo de levadura. Trazo representativo de tres repeticiones.

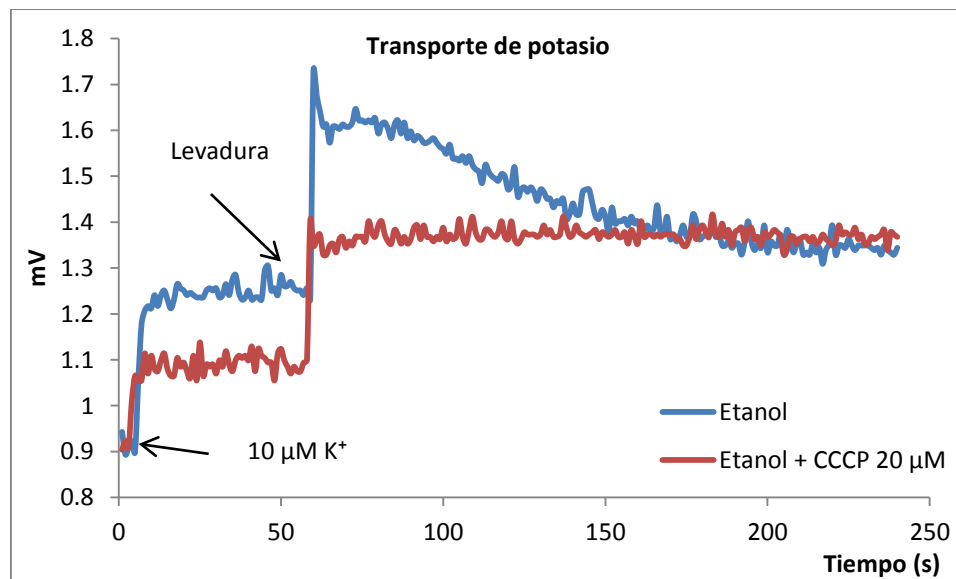


Figura 37.- Transporte de potasio en la levadura *C. albicans* con 48 horas de ayuno. Incubación: 2 mM de MES-TEA pH 6, 20 mM de etanol, 20 μM de CCCP en un volumen final de 10 mL. Una vez que inicia el trazo se agregó 10 μM de KCl como referencia y a los 50 segundos 250 mg en peso húmedo de levadura. Trazo representativo de tres repeticiones.

S. cerevisiae en presencia de antimicina A y CCCP.

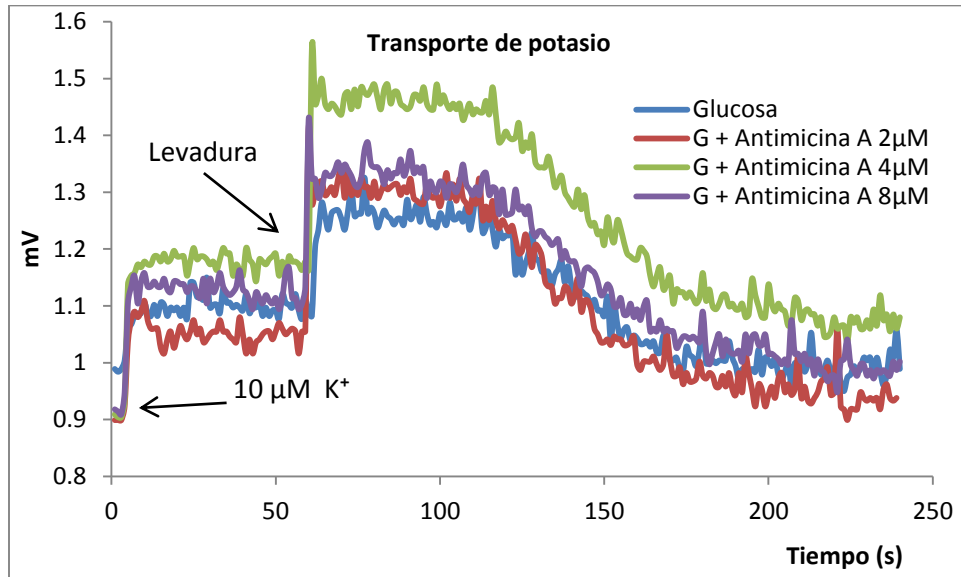


Figura 38.- Transporte de potasio en la levadura *S. cerevisiae* con 24 horas de ayuno. Incubación: 2 mM de MES-TEA pH 6, 20 mM de glucosa, 2-8 µM de antimicina A en un volumen final de 10 mL. Una vez que se inicia el trazo se agregó 10 µM de KCl como referencia y a los 50 segundos 250 mg en peso húmedo de levadura. Trazo representativo de tres repeticiones.

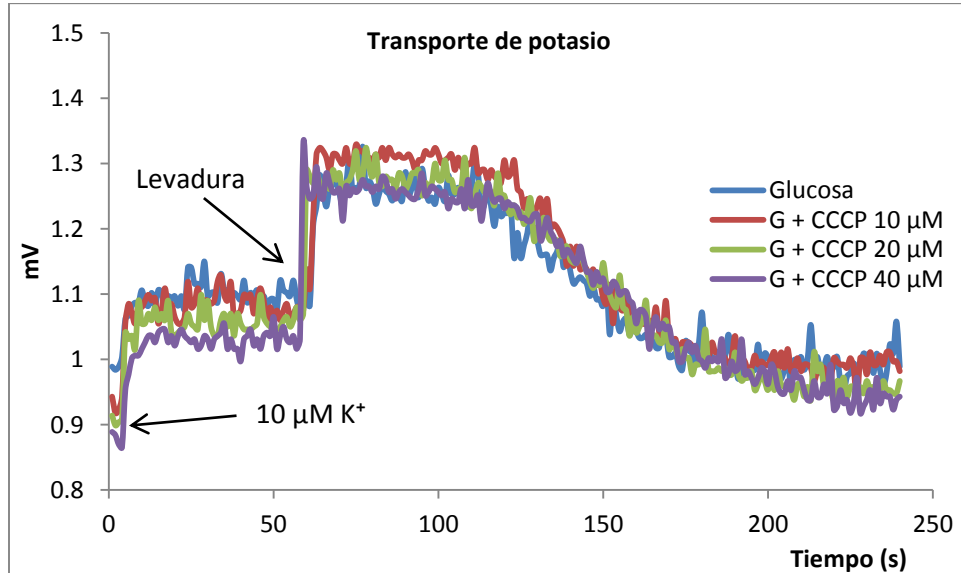


Figura 39.- Transporte de potasio en la levadura *S. cerevisiae* con 24 horas de ayuno. Incubación: 2 mM de MES-TEA pH 6, 20 mM de glucosa, 10-40 µM de CCCP en un volumen final de 10 mL. Una vez que se inicia el trazo se agregó 10 µM de KCl como referencia y a los 50 segundos 250 mg en peso húmedo de levadura. Trazo representativo de tres repeticiones.

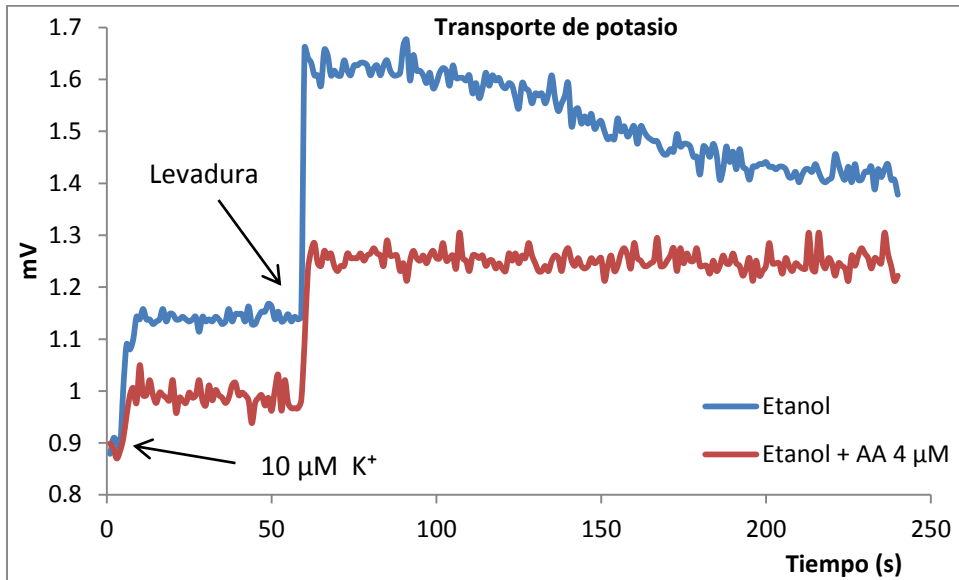


Figura 40.- Transporte de potasio en la levadura *S. cerevisiae* con 24 horas de ayuno. Incubación: 2 mM de MES-TEA pH 6, 20 mM de etanol, 4 μM de antimicina A en un volumen final de 10 mL. Una vez que se inicia el trazo se agregó 10 μM de KCl como referencia y a los 50 segundos 250 mg de peso húmedo de levadura. Trazo representativo de tres repeticiones.

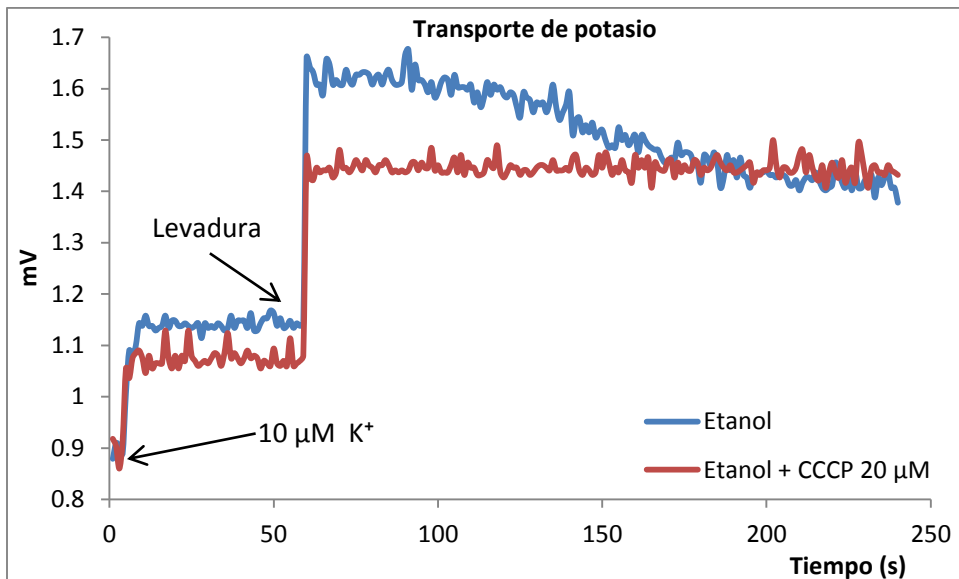


Figura 41.- Transporte de potasio en la levadura *S. cerevisiae* con 24 horas de ayuno. Incubación: 2 mM de MES-TEA pH 6, 20 mM de etanol, 20 μM de CCCP en un volumen final de 10 mL. Una vez que se inicia el trazo se agregó 10 μM de KCl como referencia y a los 50 segundos 250 mg de peso húmedo de levadura. Trazo representativo de tres repeticiones.

Consumo de oxígeno.

C. albicans.

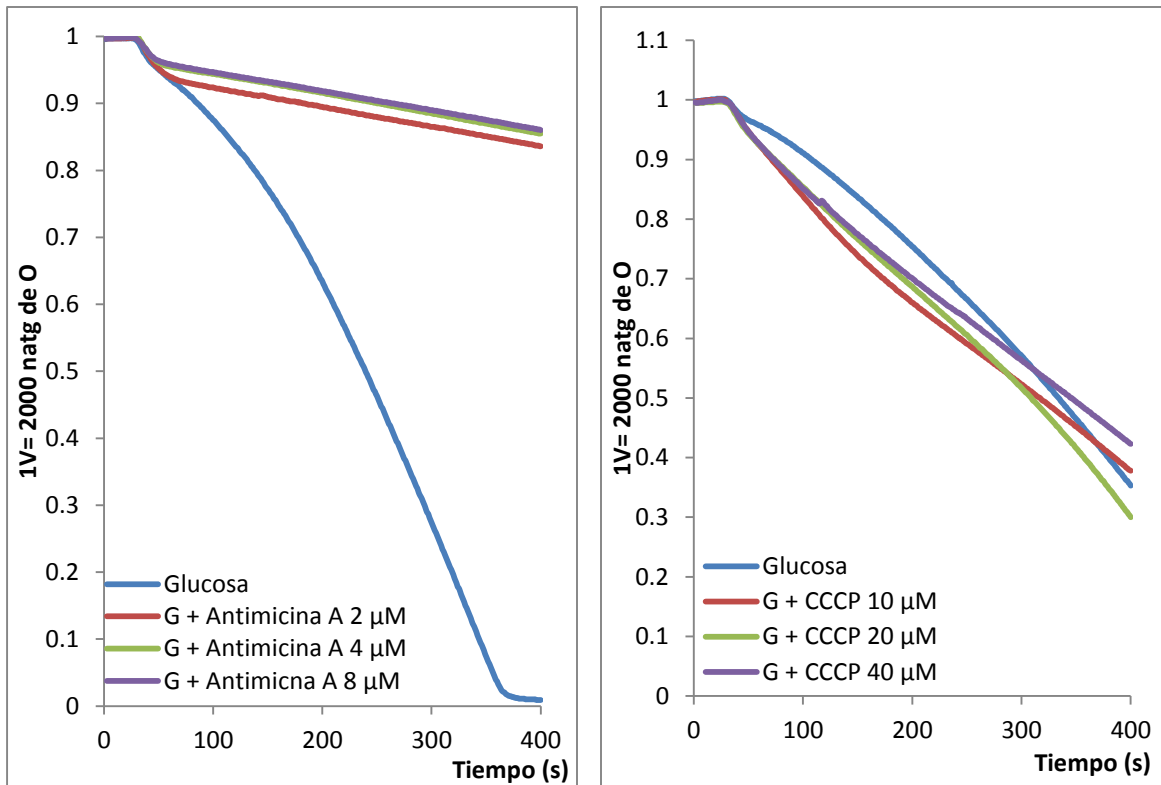


Figura 42.- Efecto de la antimicina A y CCCP sobre la respiración en *C. albicans* con 48 horas de ayuno. La levadura (50 mg de peso húmedo) se añadió al siguiente medio de incubación: 10 mM de Buffer MES-TEA pH 6, 20 mM de glucosa y 2-8 μM de antimicina A o 10-40 μM de CCCP en un volumen final de 5 mL a una temperatura de 30°C. El seguimiento en el consumo de oxígeno se realizó con un electrodo Clark, conectado a un voltímetro. Trazo representativo de tres repeticiones.

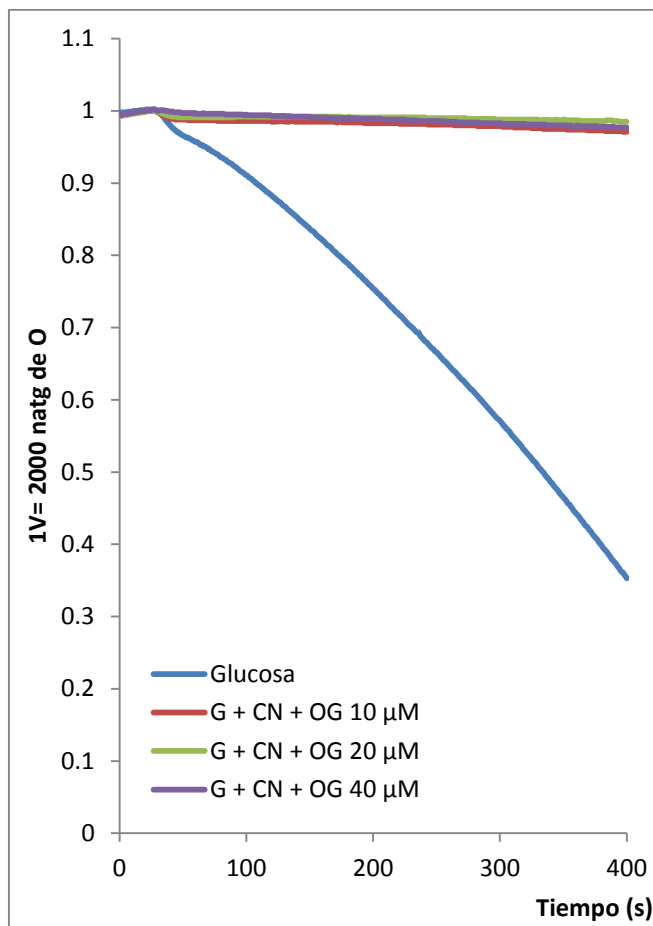


Figura 43.- Efecto de la inhibición de la cadena clásica respiratoria y la oxidasa alterna sobre la respiración en *C. albicans* con 48 horas de ayuno. La levadura (50 mg de peso húmedo) se añadió al siguiente medio de incubación: 10 mM de Buffer MES-TEA pH 6, 20 mM de glucosa, 0.3 mM de NaCN y 10-40 μM de octilgalato en un volumen final de 5 mL a una temperatura de 30°C. El seguimiento en el consumo de oxígeno se realizó con un electrodo Clark, conectado a un voltímetro. Trazo representativo de tres repeticiones.

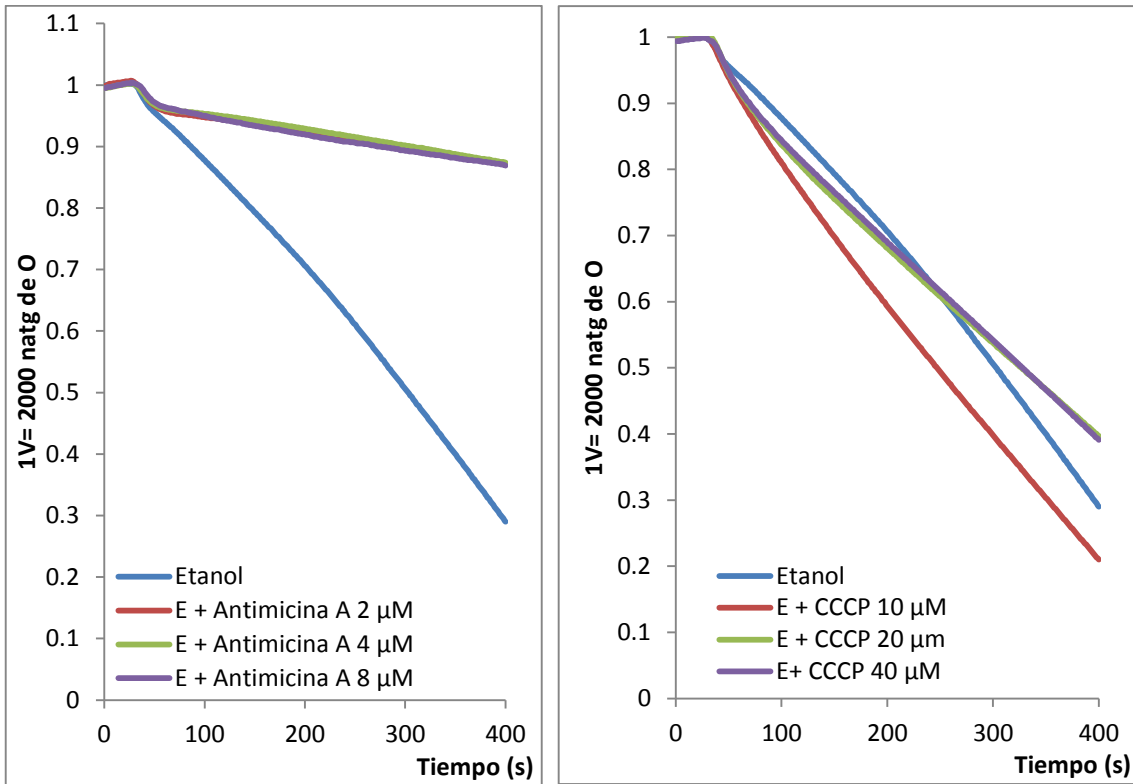


Figura 44.- Efecto de la antimicina A y CCCP sobre la respiración en *C. albicans* con 48 horas de ayuno. La levadura (50 mg de peso húmedo) se añadió al siguiente medio de incubación: 10 mM de Buffer MES-TEA pH 6, 20 mM de etanol y 2-8 μM de antimicina A o 10-40 μM de CCCP en un volumen final de 5 mL a una temperatura de 30°C. El seguimiento en el consumo de oxígeno se realizó con un electrodo Clark, conectado a un voltímetro. Trazo representativo de tres repeticiones.

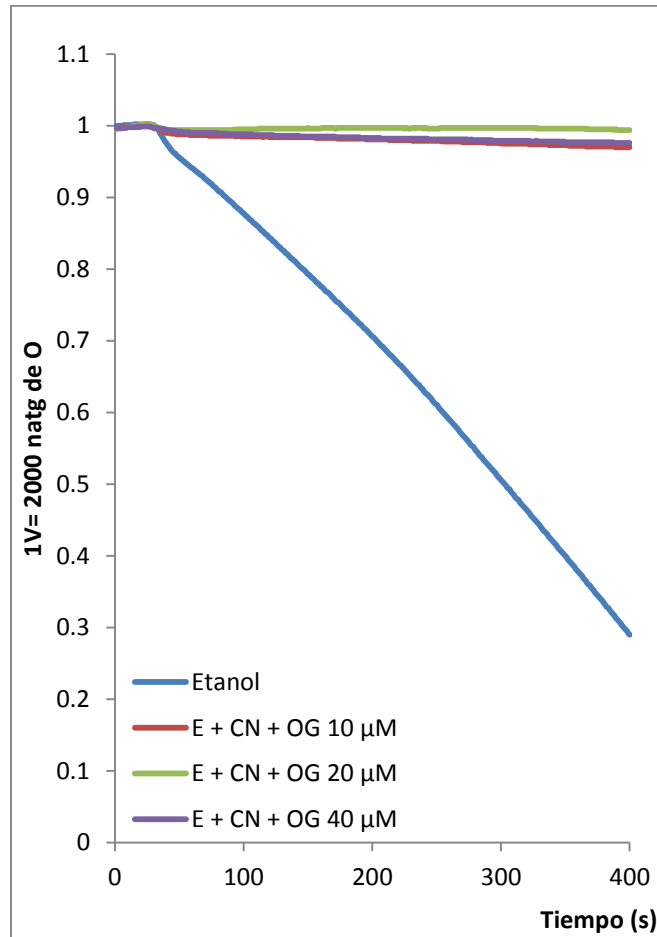


Figura 45.- Efecto de la inhibición de la cadena clásica respiratoria y la oxidasa alterna sobre la respiración en *C. albicans* con 48 horas de ayuno. La levadura (50 mg de peso húmedo) se añadió al siguiente medio de incubación: 10 mM de Buffer MES-TEA pH 6, 20 mM de etanol, 0.3 mM de NaCN y 10-40 μ M de octilgalato en un volumen final de 5 mL a una temperatura de 30°C. El seguimiento en el consumo de oxígeno se realizó con un electrodo Clark, conectado a un voltímetro. Trazo representativo de tres repeticiones.

***S. cerevisiae*.**

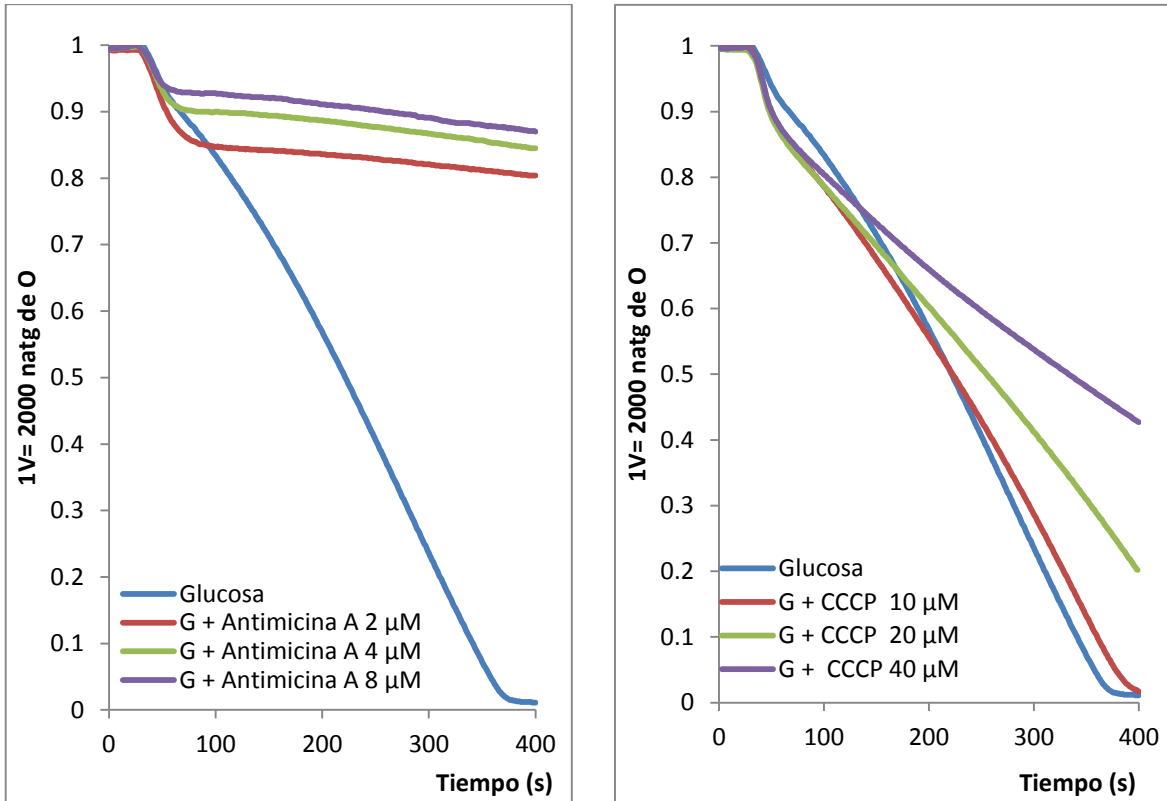


Figura 46.- Efecto de la antimicina A y CCCP sobre la respiración en *S. cerevisiae* con 18 horas de ayuno. La levadura (50 mg de peso húmedo) se añadió al siguiente medio de incubación: 10 mM de Buffer MES-TEA pH 6, 20 mM de glucosa y 2-8 μM de antimicina A o 10-40 μM de CCCP en un volumen final de 5 mL a una temperatura de 30°C. El seguimiento en el consumo de oxígeno se realizó con un electrodo Clark, conectado a un voltímetro. Trazo representativo de tres repeticiones.

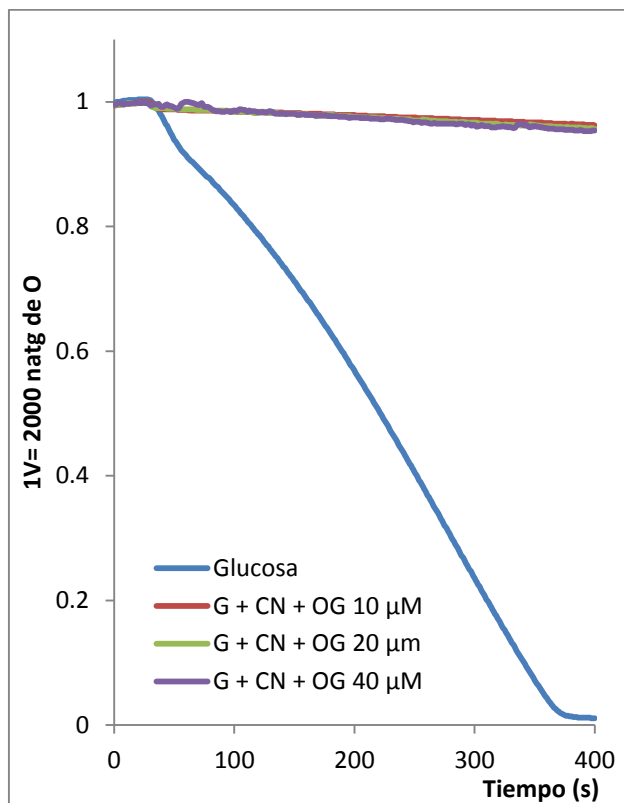


Figura 47.- Efecto de la inhibición de la cadena clásica respiratoria y la oxidasa alterna sobre la respiración en *S. cerevisiae* con 18 horas de ayuno. La levadura (50 mg de peso húmedo) se añadió al siguiente medio de incubación: 10 mM de Buffer MES-TEA pH 6, 20 mM de glucosa, 0.3 mM de NaCN y 10-40 μM de octilgalato en un volumen final de 5 mL a una temperatura de 30°C. El seguimiento en el consumo de oxígeno se realizó con un electrodo Clark, conectado a un voltímetro. Trazo representativo de tres repeticiones.

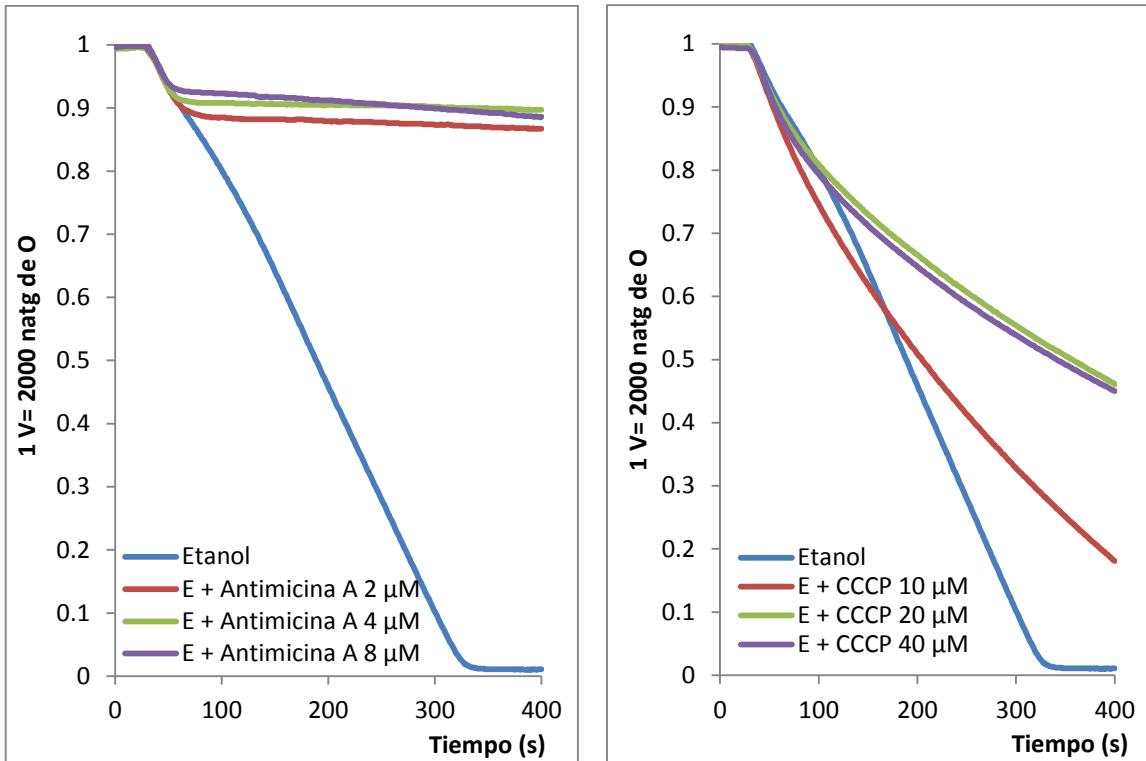


Figura 48.- Efecto de la antimicina A y CCCP sobre la respiración en *S. cerevisiae* con 48 horas de ayuno. La levadura (50 mg de peso húmedo) se añadió al siguiente medio de incubación: 10 mM de Buffer MES-TEA pH 6, 20 mM de etanol y 2-8 μM de antimicina A o 10-40 μM de CCCP en un volumen final de 5 mL a una temperatura de 30°C. El seguimiento en el consumo de oxígeno se realizó con un electrodo Clark, conectado a un voltímetro. Trazo representativo de tres repeticiones.

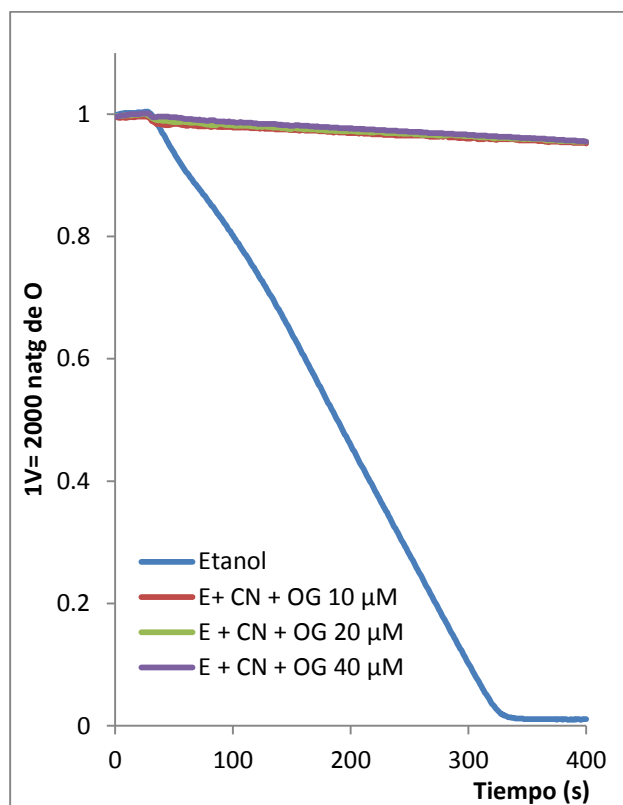


Figura 49.- Efecto de la inhibición de la cadena clásica respiratoria y la oxidasa alterna sobre la respiración en *S. cerevisiae* con 18 horas de ayuno. La levadura (50 mg de peso húmedo) se añadió al siguiente medio de incubación: 10 mM de Buffer MES-TEA pH 6, 20 mM de etanol, 0.3 mM de NaCN y 10-40 μ M de octilgalato en un volumen final de 5 mL a una temperatura de 30°C. El seguimiento en el consumo de oxígeno se realizó con un electrodo Clark, conectado a un voltímetro. Trazo representativo de tres repeticiones.