



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DE CATIONES MONOVALENTES (Na^+ Y K^+) SOBRE LOS
COMPONENTES DE LA CADENA RESPIRATORIA DE *Debaryomyces*
hansenii

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Ulrik Hiram Pedroza Dávila

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Salvador Uribe Carvajal
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Diego González Halphen
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar
[Facultad de Química](#)

Ciudad de México. Octubre, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Durante los estudios de maestría el sustentante Ulrik Hiram Pedroza Dávila recibió una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) CVU 883299.

Ayudado parcialmente por un donativo de la DGAPA-PAPIIT IN203018 al Dr. Salvador Uribe. Se reconoce la colaboración de la técnico académico Dra. Natalia Chiquete Félix.

A los miembros de mi comité tutor, conformado por el Dr. Diego González Halphen y al Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar, por sus consejos y comentarios que enriquecieron este proyecto.

A los integrantes de mi jurado de examen: Dra. Sobeida Sánchez Nieto, Dra. Xochitl Pérez Martínez, Dr. Oscar Flores Herrera, Dr. Rafael Villalobos Molina y Dra, Ana Cecilia Zazueta Mendizabal.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo otorgado para asistir y participar en el XXI Congreso Bioenergética y Biomembranas.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Mitocondria	1
1.2.- Teoría quimiosmótica.	1
1.3.- Cadena respiratoria	3
1.3.1.- Complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa)	3
1.3.2.- Complejo II (Succinato: ubiquinona oxidoreductasa)	4
1.3.3.- Complejo III ₂ (Ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa).....	4
1.3.4.- Complejo IV (Citocromo c oxidasa).....	5
1.3.5.- Complejo V (ATP-sintasa).....	6
1.3.6.- Componentes alternos de la cadena respiratoria.....	7
1.3.7.- Mecanismos de desacoplamiento	8
1.4.-Transporte transmembranal	9
1.4.1.- Transporte de iones en la mitocondria	10
1.5.- Organismos halófilos	11
1.6.- <i>Debaryomyces hansenii</i>	13
1.7.- Cadena respiratoria de <i>D. hansenii</i>	13
1.8.- Efecto de cultivo de <i>D. hansenii</i> con cationes monovalentes	15
1.9.- Cationes monovalentes	16
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
3. HIPÓTESIS	19
4. OBJETIVOS	19

5. MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1.- Cepa empleada	20
5.2.- Condiciones de cultivo	20
5.3.- Aislamiento de mitocondrias	20
5.4.- Cuantificación de proteína	21
5.5.- Consumo de oxígeno y acoplamiento respiratorio.....	21
5.6.- Potencial transmembranal	22
5.7.- Actividades enzimáticas de los complejos respiratorios	22
6. RESULTADOS	24
7. DISCUSIÓN	37
8. CONCLUSIONES.....	44
9. PERSPECTIVAS.....	45
10. REFERENCIAS.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Teoría quimiosmótica.....	2
Figura 2. Clasificación de tipos de transporte transmembranal.....	10
Figura 3.- Transporte de cationes monovalentes en la mitocondria..	11
Figura 4.- Efecto de la hipersalinidad en organismos no halófilos.....	12
Figura 5.- Mecanismo de adaptación de organismos halófilos/halotolerantes.	13
Figura 6.- Composición de la cadena respiratoria de <i>D. hansenii</i> ..	14
Figura 7.- Efecto de cultivar <i>D. hansenii</i> con altas concentraciones de sales..	16
Figura 8.- Efecto de los iones monovalentes sobre el potencial transmembranal de mitocondrias aisladas de <i>D. hansenii</i>	27
Figura 9.- Efecto de diferentes cationes monovalentes sobre la actividad NADH:citocromo c reductasa (CI-CIII ₂).	28
Figura 10.- Efecto de diferentes cationes monovalentes sobre la actividad NADH deshidrogenasa del complejo I usando NADH como sustrato.	29
Figura 11.- Efecto de diferentes cationes monovalentes sobre la actividad NADH deshidrogenasa del complejo I usando piruvato-malato como sustrato.	30
Figura 12.- Efecto de diferentes cationes monovalentes sobre la actividad de la citocromo c oxidasa.....	32
Figura 13.- Efecto de los cationes monovalentes sobre la actividad de los componentes de la cadena respiratoria de <i>D. hansenii</i>	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Efecto de diferentes cationes monovalentes sobre el consumo de oxígeno y control respiratorio (CI + CIII ₂ + CIV) de mitocondrias aisladas de <i>Debaryomyces hansenii</i> cuando el PTP está abierto	25
Tabla 2.- Efecto de diferentes cationes monovalentes sobre el consumo de oxígeno y control respiratorio (CI + CIII ₂ + CIV) de mitocondrias aisladas de <i>Debaryomyces hansenii</i> cuando el PTP está cerrado.....	26
Tabla 3.- Efecto de diferentes cationes monovalentes sobre el consumo de oxígeno y control respiratorio (CII + CIII ₂ + CIV) de mitocondrias aisladas de <i>Debaryomyces hansenii</i>	31
Tabla 4.- Efecto de diferentes cationes monovalentes sobre el consumo de oxígeno y control respiratorio (CIV) de mitocondrias aisladas de <i>Debaryomyces hansenii</i>	32
Tabla 5.- Efecto de diferentes cationes monovalentes sobre el consumo de oxígeno (eNDH + CIII ₂ + CIV) de mitocondrias aisladas de <i>Debaryomyces hansenii</i>	34
Tabla 6.- Efecto de la incubación del ion K ⁺ sobre el consumo de oxígeno mitocondrias aisladas de <i>Debaryomyces hansenii</i>	36

LISTA DE ABREVIATURAS

AOX: Oxidasa alterna

CCCP: *p*-clorocarbonilcianurofenilhidrazona

CR: Control respiratorio

DCPIP: 2,6-diclorofenolindofenol

FAD: Flavin adenin dinucleótido

FMN: Flavin mononucleótido.

mK_{ATP}: Canal de potasio mitocondrial sensible a ATP.

Pi: Fosfato inorgánico

PTP: Poro de transición de la permeabilidad.

TMPD: tetrametil-*p*-fenilenediamina.

VDAC: Canal aniónico dependiente de voltaje.

$\Delta\psi$: Potencial transmembranal.

RESUMEN

Debaryomyces hansenii es una levadura halotolerante de interés biotecnológico por su capacidad de sintetizar lípidos para biodiesel y su uso en la industria alimenticia. Su metabolismo está adaptado a condiciones de hipersalinidad, donde incrementa su crecimiento, consumo de oxígeno, fermentación y sintetiza solutos compatibles. Previamente se describió que sus mitocondrias aumentan su consumo de oxígeno por medio del cierre del poro de transición de la permeabilidad (PTP) en respuesta a cationes monovalentes (Na^+ y K^+). Aquí, se evaluó el efecto de estos iones sobre los componentes de la fosforilación oxidativa de *D. hansenii*. Cuando el PTP está abierto, al emplear piruvato-malato para estimular la respiración a nivel del complejo I, los cationes K^+ y Rb^+ incrementaron el control respiratorio. Por otro lado, bajo las mismas condiciones, cuando el PTP está cerrado, el consumo de oxígeno se incrementó 70%, manteniendo el control respiratorio. En ambos casos los cationes Li^+ y Na^+ no tuvieron efecto, a diferencia de lo previamente reportado. Al utilizar succinato para estimular la respiración a nivel de complejo II, se disminuyó el consumo de oxígeno al emplear cualquiera de las cuatro sales. No hubo diferencia en el consumo de oxígeno a nivel del complejo IV (Sustrato TMPD+ascorbato) o de la NADH deshidrogenasa alterna (Sustrato NADH) por ningún catión monovalente. Cuando la actividad de cada complejo enzimático se evaluó individualmente, no se detectó ningún incremento. Se concluye que la activación del consumo de oxígeno no se debe a un efecto directo sobre los complejos respiratorios. Datos preliminares indican que en presencia de K^+ a tiempos prolongados la estimulación del consumo de oxígeno se abate, probablemente debido al transporte del K^+ hacia la matriz mitocondrial.

ABSTRACT

Debaryomyces hansenii is a halotolerant yeast, widely used in the food industry and as a potential biodiesel source. Hypersalinity enhances its metabolism, e.g., increases growth, oxygen consumption, fermentation and synthesis of compatible solutes. Previously, it was determined that Na⁺ and K⁺ ions increase the rate of coupled oxygen consumption in *D. hansenii* mitochondria. This effect was attributed to closure of the permeability transition pore (PTP). Here, the effect of these cations on *D. hansenii* respiratory chain components was evaluated. When PTP is closed, K⁺ and Rb⁺ increased the respiratory control when complex I substrates pyruvate-malate were used. By contrast, in the same conditions, when the PTP is closed, oxygen consumption was accelerated 70% upon the addition of KCl or RbCl with no change in the respiratory control. In both cases Na⁺ and Li⁺ had no effect, opposed to what was previously reported. On the other hand, when complex II substrate succinate was used, oxygen consumption was inhibited by all the different salts. No difference in oxygen consumption was appreciated at complex IV (Substrate TMPD+Ascorbate) or alternative NADH dehydrogenase level (Substrate NADH). When individual respiratory complexes were evaluated, no effect was observed in enzymatic activity from the addition of the different salts. Thus, the increased rate of oxygen consumption cannot be attributed to a direct effect on the respiratory chain from the monovalent cations. Preliminarily, it seems that the observed increase in oxygen consumption disappears when the sample is incubated with K⁺. This effect might be attributed to the transport of K⁺ into the mitochondrial matrix.

1. INTRODUCCIÓN

1.1.- Mitocondria

La mitocondria es un organelo formado por una membrana externa y una membrana interna (Wohlrab, 2009). Entre ambas membranas se delimita el espacio intermembranal, mientras que al interior de la membrana interna se contiene a la matriz mitocondrial (Kühlbrandt, 2015). La membrana externa es lisa y permeable a moléculas pequeñas, mientras que la membrana interna forma invaginaciones, es mayormente proteica y es rica en cardiolipina, además es altamente impermeable (Distler et al., 2008).

La mitocondria se originó a partir de una α -proteobacteria que quedó atrapada en una arqueobacteria, conformando a la célula eucariota (Martin et al., 2015). A medida que esta asociación fue evolucionando, el genoma de la α -proteobacteria se fue reduciendo y compactando, ya que la mayoría de sus genes se perdieron o fueron transferidos al genoma de la arqueobacteria (Gustafsson et al., 2016).

Mediante la fosforilación oxidativa, la mitocondria es la principal fuente de ATP en la célula (Kühlbrandt, 2015). Este proceso consiste en la síntesis de ATP por la ATP-sintasa, a partir del gradiente electroquímico formado por la cadena respiratoria acoplada a la transferencia de electrones al oxígeno (Friedman y Nunnari, 2014). Otras vías metabólicas mitocondriales son el ciclo de Krebs, la oxidación de ácidos grasos, la síntesis y degradación de aminoácidos, la síntesis de cuerpos cetónicos, de pirimidinas, de grupos hemo, de urea y centros hierro-azufre (Calvo y Mootha, 2010; Stehling y Lill, 2013). Asimismo contribuye a la regulación de procesos celulares como señalización, crecimiento y diferenciación celular y apoptosis (Osellame et al., 2012).

1.2.- Teoría quimiosmótica

Bill Slater (1953) presentó la teoría de acoplamiento químico, que ilustra como las reacciones redox sucesivas de la cadena respiratoria forma intermediarios que almacenan la energía necesaria para la síntesis de ATP (Robinson, 1997) Por otro lado, Paul Boyer (1975) propuso la hipótesis del cambio conformacional, donde la síntesis de ATP es impulsada por cambios

conformacionales en las proteínas respiratorias. El modelo actualmente aceptado es el de Mitchell (1961), que planteó la teoría del acoplamiento quimiosmótico, que consiste en que una reacción química puede generar el transporte vectorial de un componente químico con carga a través de una vía específica, generando un gradiente electroquímico. Este gradiente electroquímico, que en el caso de los protones se llama fuerza protón-motriz, puede disiparse de manera acoplada a la síntesis de ATP a través de una ATP sintasa (Mitchell, 1985).

En la mitocondria, la cadena de transporte de electrones transporta dos electrones del NADH al oxígeno, obteniendo energía en tres pasos para bombear protones al espacio intermembranal (Hirst, 2010). La membrana interna mitocondrial es impermeable a H^+ y a otros iones (Ling, 1981), permitiendo producir y mantener la fuerza protón-motriz usada para la síntesis de ATP por el complejo V y el transporte de metabolitos (Morelli et al., 2019) (Figura 1).

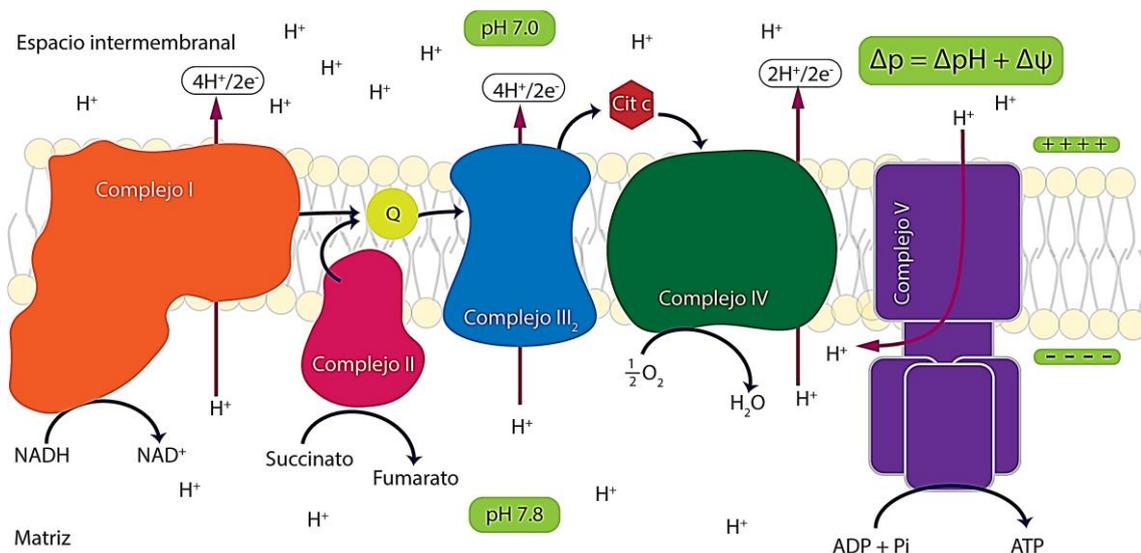


Figura 1.- Teoría quimiosmótica. La cadena de transporte de electrones dona los electrones del NADH o del succinato hasta su receptor final, el oxígeno. Los complejos I, III₂ y IV translocan protones de la matriz al espacio intermembranal. Los protones acumulados en el espacio intermembranal forman un gradiente químico (ΔpH) y eléctrico ($\Delta \psi$). En conjunto estos dos componentes conforman la fuerza protón-motriz que impulsa el reingreso de los protones hacia la matriz mitocondrial por el complejo V sintetizando ATP a partir de ADP y Pi. Modificado de Morelli et al. (2019).

1.3.- Cadena respiratoria

1.3.1.- Complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa)

Este complejo oxida el NADH, producido por el ciclo de Krebs y la β -oxidación, regenerando la poza de NAD^+ (Hirst, 2010). Los electrones del NADH pasan por una serie de centros redox (FMN, centro Fe-S) hasta llegar al aceptor de electrones, la ubiquinona (Walker, 1992). Este proceso está acoplado con el bombeo de protones hacia el espacio intermembranal (Wirth et al., 2016) con una estequiometría de $4\text{H}^+/2\text{e}^-$ (Ripple et al., 2013).

El complejo respiratorio I es el de mayor tamaño (Efremov y Sazanov, 2011). Tiene una forma de "L", con un brazo en la membrana interna mitocondrial, y el otro orientado hacia la matriz mitocondrial (Hofhaus et al., 1991). Varía en composición, el complejo I procariota es el más simple, el cual consiste de 14 subunidades centrales requeridas para la transducción de energía (Efremov y Sazanov, 2011). En la mitocondria, estas 14 subunidades están conservadas, de las cuales siete son hidrofílicas y componen el brazo y son codificadas en el genoma nuclear (Hirst, 2010). Las otras siete están codificadas en el genoma mitocondrial, constituyendo el brazo embebido en la membrana (Walker, 1992). En las mitocondrias, adicionalmente se tienen otras proteínas codificadas en el genoma nuclear, llamadas accesorias que tienen función regulatoria o de estabilidad (Wirth et al., 2016). El número de subunidades accesorias depende del organismo, por ejemplo; los mamíferos tienen 31 subunidades (Zhu et al., 2016) mientras que *Yarrowia lipolytica* solo tiene 28 (Yip et al., 2011).

El mecanismo por el cual el bombeo de protones y la transferencia de electrones están acoplados no es claro (Hirst, 2013). El modelo más aceptado consiste en que los 4 protones se translocan al mismo tiempo impulsados por la reducción de una molécula de quinona (Efremov y Sazanov, 2011). Por otro lado, el modelo de cambio de estabilización de dos estados consiste en dos reducciones sucesivas de un electrón a la quinona, que inducen cambios conformacionales que resultan en la translocación de dos protones por reducción (Brandt, 2011).

Los inhibidores del complejo I se unen al sitio de unión a la quinona, como la rotenona, la piericidina A y las amiloridas (Murai y Miyoshi, 2016).

En *Saccharomyces cerevisiae* y otras levaduras relacionadas, este complejo está ausente, en su lugar hay tres NADH deshidrogenasas alternas (de Vries y Marres, 1987).

1.3.2.- Complejo II (Succinato: ubiquinona oxidorreductasa)

El complejo II transfiere los electrones del succinato a la ubiquinona, por medio de los grupos prostéticos (FAD, centros Fe-S, grupo hemo) (Hägerhäll, 1997). Este proceso está acoplado a la oxidación del succinato para formar fumarato en el ciclo de Krebs (Bezawork-Geleta et al., 2017).

Consiste de cuatro subunidades codificadas en el genoma nuclear (Kluckova et al., 2013). Dos subunidades del complejo II anclan al complejo a la membrana interna mitocondrial, mientras que las otras dos forman el centro catalítico que se orienta hacia la matriz mitocondrial (Sun et al., 2005).

A diferencia de otros complejos, la succinato deshidrogenasa no bombea protones al espacio intermembranal (Cecchini, 2003). Sin embargo, sirve como punto de entrada de electrones a la cadena respiratoria y un sitio de regulación del ciclo de Krebs (Schultz y Chan, 2001).

Los inhibidores del complejo II pueden actuar sobre la región catalítica (malonato, ácido 3-nitropropionico) o sobre el sitio de unión a ubiquinona (atpeninas, tenoiltrifluoroacetona) (Kluckova et al., 2013).

1.3.3.- Complejo III₂ (Ubiquinol: citocromo c oxidorreductasa)

El complejo III₂ mediante el citocromo bc₁ oxida el ubiquinol presente en la membrana interna mitocondrial, reduciendo al citocromo c hidrosoluble, acoplado a la translocación de protones al espacio intermembranal (Hunte et al., 2003). Es un dímero simétrico compuesto de diez subunidades, de las cuales sólo una está codificada en el genoma mitocondrial (García-Guerrero et al., 2018). Solamente tres subunidades pueden transferir electrones, el citocromo b, que contiene los sitios de unión a quinona (Q_P y Q_N) y dos grupos hemo tipo b, el citocromo c₁ y la proteína Fe-S de Rieske (Fernandez-Vizarra y Zeviani, 2018).

El mecanismo de acoplamiento entre la transferencia de electrones y la translocación de protones del complejo III₂ se denomina ciclo Q (Mitchell, 1975). El ubiquinol se oxida en el sitio Q_P, en el cual los dos electrones divergen; el primero reduce al citocromo c, mientras que el segundo se transfiere al sitio Q_N, donde reduce una ubiquinona a semiubiquinona (Crofts et al., 2008). La oxidación del ubiquinol en el sitio Q_P resulta en el paso de dos protones al espacio intermembranal (Trumpower, 1990). Al oxidar otra molécula de ubiquinol en el sitio Q_P, un electrón reduce a otro citocromo c, mientras que el otro reduce la semiubiquinona a ubiquinol obteniendo dos protones de la matriz mitocondrial (Schultz y Chan, 2001). Por lo que su estequiometría es de 4H⁺/2e⁻ (Trumpower, 1990).

Los inhibidores del complejo III₂ pueden actuar sobre; sitio Q_P (antimicina A), el sitio Q_N (mixotiazol) o se pueden unir a ambos sitios (2-n-nonil-4-hidroxiquinolina N-óxido) (Esser et al., 2004).

1.3.4.- Complejo IV (Citocromo c oxidasa)

El complejo IV es la enzima terminal de la cadena de transporte de electrones, cataliza la transferencia de los electrones del citocromo c al oxígeno, reduciéndolo a agua, un proceso acoplado al bombeo de protones (Wikström y Sharma, 2018).

En los mamíferos se compone de 13 subunidades, de las cuales, las tres subunidades catalíticas (I-III) se codifican en la mitocondria, el resto son nucleares y se cree que su función es de estabilidad y translocación de protones (Kadenbach, 2003). El complejo IV tiene cuatro centros redox; un centro de cobre binucleado Cu_A localizado en la subunidad II, un centro de cobre mononucleado Cu_B y dos grupos hemo, a y a₃, presentes en la subunidad I (Schultz y Chan, 2001).

El citocromo c reducido transfiere los electrones al sitio Cu_A y posteriormente pasan al grupo hemo a y al centro binucleado compuesto del sitio Cu_B y el grupo hemo a₃ para reducir oxígeno hasta agua (Shimada et al., 2017; Zhao et al., 2019).

En total, por cuatro electrones que se transfieren al complejo IV, ocho protones se eliminan de la matriz mitocondrial, la mitad se usan para formar dos moléculas de agua (protones escalares) y los otros cuatro se bombean al espacio intermembranal, por lo tanto la estequiometría de protones bombeados es de $2H^+/2e^-$ (Wikstrom, 1977).

Los inhibidores del complejo IV como el cianuro, la azida de sodio y el monóxido de carbono, se unen al centro binucleado constituido por el sitio Cu_B y el grupo hemo a_3 (Way et al., 1984).

1.3.5.- Complejo V (ATP-sintasa)

El complejo V cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico usando el potencial electroquímico de protones transmembranal (Okuno et al., 2011). Puede funcionar en la dirección contraria, cuando el potencial electroquímico es insuficiente; es decir, hidroliza ATP para generar un gradiente de protones y restaurar el potencial electroquímico (Dittrich et al., 2003).

Las ATP sintasas se encuentran ampliamente distribuidas en membranas productoras de energía de bacterias, mitocondrias y cloroplastos (Hahn et al., 2018). Consisten en un nanomotor con dos segmentos; uno membranal F_0 y uno hidrofílico F_1 , conectados por el tallo central y el brazo periférico (Walker, 2013). Las subunidades γ , δ y ϵ de la F_1 en conjunto con las subunidades c de la F_0 , conforman el rotor (Yoshida et al., 2001). Por otro lado, el estator está compuesto por las subunidades a y b_2 de la F_0 y las subunidades α , β y OSCP de la F_1 (Yoshida et al., 2001).

El dominio hidrofílico F_1 cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i (Walker, 2013). La F_0 está embebida en la membrana y genera un torque rotatorio por la translocación de protones dirigido por un potencial electroquímico, que se transmite por el tallo central al dominio F_1 (Yoshida et al., 2001).

El dominio F_0 consiste en las subunidades ab_2c_n ($n = 10-15$ subunidades c) (Okuno et al., 2011). El paso de protones impulsa la rotación del oligomérico

de subunidades c , que a su vez esta acoplado a la rotación de la subunidad γ y de la F_1 (Fillingame et al., 2002).

En el segmento F_1 , las unidades α y β se alternan formando un hexámero que rodea a la subunidad γ (Abrahams et al., 1994). Los centros catalíticos están en las interfaces α - β (Abrahams et al., 1994). En condiciones fisiológicas, la F_0 rota la subunidad γ en dirección de las manecillas del reloj, ocasionando el cambio conformacional de las subunidades $\alpha_3\beta_3$, que catalizan la síntesis de ATP (Okuno et al., 2011). La hidrólisis de ATP induce la rotación de la F_0 en la dirección opuesta (Yoshida et al., 2001).

La síntesis de ATP por el complejo V se basa en el mecanismo de cambio de afinidad (Boyer, 1997). Consiste en la interconversión cíclica de tres estados (abierto, entreabierto y cerrado) de los sitios catalíticos de la F_1 , provocado por la rotación de la F_0 (Junge y Nelson, 2015; Walker, 2013).

El inhibidor de la ATP sintasa más empleado es la oligomicina, que se une a la interfase de las subunidades a y c del dominio F_0 evitando el paso de protones hacia la matriz mitocondrial (Devenish et al., 2000).

1.3.6.- Componentes alternos de la cadena respiratoria

La cadena respiratoria en plantas (Sweetman et al., 2019), bacterias (Kalnenieks et al., 2019) y hongos está ramificada (Veiga et al., 2003). Por ejemplo, en plantas y hongos, existen NADH:ubiquinona oxidorreductasas, resistentes a rotenona, que realizan la misma reacción que el complejo I, sin translocar protones al espacio intermembranal (Kerscher et al., 1999).

Las NADH deshidrogenasas pueden encontrarse en la cara interna o externa de la membrana interna mitocondrial (Schwartzgubel y Palmer, 1982). La función de las NADH deshidrogenasas externas es donar electrones del NADH producido en el citosol a la poza de quinonas (Kerscher et al., 2008), así como posibles sistemas de lanzaderas como etanol/acetaldehído (von Jagow y Klingenberg, 1970). Por otro lado, la oxidación de NADH por las deshidrogenasas internas sirve para incrementar la poza de quinol, y regenerar el NAD^+ , lo que puede ser benéfico cuando se requiere un crecimiento rápido y abundante (Kerscher et al., 2008). En algunas levaduras, como *S. cerevisiae*,

que carecen de complejo I, es la única enzima capaz de donar los electrones de NADH matricial a la ubiquinona (Büschges et al., 1994).

Los inhibidores clásicos del complejo I no inhiben estas enzimas alternas, sin embargo, son sensibles a la flavona (de Vries y Grivell, 1988).

Por otro lado, plantas, algunos hongos y protistas poseen, junto con la vía citocrómica clásica, una oxidasa alterna (AOX) resistente a cianuro localizada en la cara interna de la membrana interna mitocondrial, que no está acoplada al bombeo de protones (Rogov y Zvyagilskaya, 2015). Esta proteína esta codificada en el genoma nuclear, cataliza la oxidación del ubiquinol reduciendo el oxígeno a agua, liberando calor en el proceso (Vanlerberghe, 2013).

En plantas, la AOX tiene un papel termogénico (Wagner et al., 2008). Además, permite mantener la actividad de la cadena respiratoria con una vía citocrómica comprometida (Rogov y Zvyagilskaya, 2015), manteniendo la actividad del ciclo de Krebs (Vanlerberghe et al., 1997). Además, permite evitar una sobreproducción de ROS (Maxwell et al., 1999). Algunos inhibidores de la AOX, son el ácido salicilhidroxámico y el propil galato (Berthold, 1998).

1.3.7.- Mecanismos de desacoplamiento

El paso lento de los electrones por la cadena respiratoria tiene como consecuencia la producción de ROS (Turrens, 2003). Con el fin de evitarlo, la mitocondria mantiene una alta tasa de consumo de oxígeno mediante mecanismos de desacoplamiento (Guerrero-Castillo et al., 2011).

Además de enzimas redox que no translocan protones, el principal mecanismo de desacoplamiento fisiológico son los vías de disipación del gradiente de protones (Guerrero-Castillo et al., 2011).

Por ejemplo, en los mamíferos y algunas levaduras, las proteínas desacoplantes (UCPs del inglés Uncoupling proteins) son proteínas transmembranales que inducen la entrada de protones del espacio intermembranal hacia la matriz mitocondrial disipando el gradiente electroquímico (Cadenas, 2018).

Adicionalmente, el poro de transición de la permeabilidad (PTP), es un canal de naturaleza proteínica inespecífico, de identidad desconocida, permeable a diferentes solutos que abate los distintos gradientes electroquímicos (Bernardi et al., 2015; Hunter et al., 1976). Se conocen distintos efectores del cierre y apertura de este canal, en los mamíferos el Ca^{2+} abre el PTP, mientras que el ATP y la ciclosporina A lo cierran (Davidson y Halestrap, 1990). En contraste, en *S. cerevisiae*, altas concentraciones de fosfato (Guérin et al., 1994) y Ca^{2+} cierran el PTP (Pérez-Vázquez et al., 2003).

1.4.-Transporte transmembranal

Las membranas celulares son barreras permeables y selectivas, que permiten mantener un ambiente constante en su interior (Lodish et al., 2000). El transporte de una molécula a través de una membrana se puede clasificar con base a diversos criterios: si está mediado por proteínas, acoplado al metabolismo, el número de especies involucradas y si involucra transferencia en la carga neta (Nicholls y Ferguson, 2002) (Figura 2).

El soluto puede translocarse con o sin la participación de una proteína transportadora (Henderson, 2018). Cualquiera de estos dos mecanismos puede ser pasivo; sin embargo, sólo el mediado por proteínas puede ser acoplado al metabolismo, como la hidrólisis de ATP (Henderson, 2018).

Cuando el transporte involucra un solo soluto se le denomina uniporte (Ruprecht y Kunji, 2020); mientras que el transporte acoplado de dos especies puede ser en paralelo (simporte), y en direcciones opuestas (antiporte) (Ruprecht y Kunji, 2020). En caso de que estos mecanismos no ocasionen un cambio en la carga neta a través de la membrana, se les denomina electroneutros (Ruprecht y Kunji, 2020). En caso contrario, el mecanismo es eléctrico, que puede ser electrogénico (crea un potencial) o electroforético (se mueve en respuesta a un potencial preexistente) (Nicholls y Ferguson, 2002; Ruprecht y Kunji, 2020).

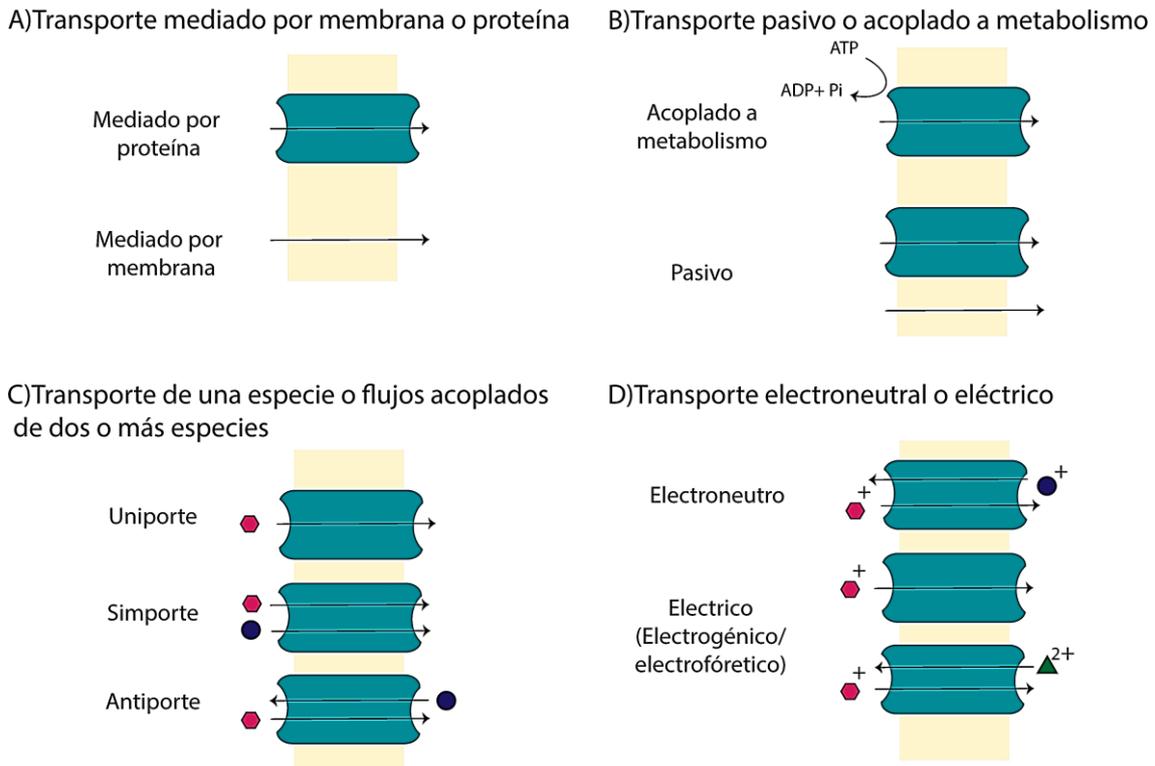


Figura 2. Clasificación de tipos de transporte transmembranal. A) El transporte puede ser mediado por la bicapa o por una proteína. B) El transporte puede ser pasivo o acoplado por metabolismo. C) El transporte puede ser por una sola especie (uniporte), o dos o más especies que puede ser por cotransporte (simporte) o intercambio (antiporte). D) Estos mecanismos pueden ser electroneutros o eléctricos (electrogénicos o electroforéticos). Modificado de Nicholls y Ferguson (2002).

1.4.1.- Transporte de iones en la mitocondria

El transporte de los iones Na^+ y K^+ a la matriz mitocondrial se esquematiza en la Figura 3. La membrana externa no es una barrera para el paso de iones, que son capaces de pasar a través de VDAC (del inglés Voltage-dependent anion channel) (Krammer et al., 2015). El bombeo de protones forma el potencial transmembranal, permitiendo el ingreso de K^+ por el canal del potasio sensible a ATP (mK_{ATP}) o por difusión simple (Garlid y Paucek, 2003).

El ingreso de K^+ a la matriz mitocondrial es impulsado por el potencial transmembranal, ya que su concentración es similar al del citosol (Laskowski et al., 2016). La entrada neta de K^+ se acompaña por hinchamiento mitocondrial, por lo que el antiportador K^+/H^+ elimina el exceso del ion K^+ (Garlid y Paucek, 2003). Este antiportador transporta todos los cationes alcalinos a tasas similares (Nakashima y Garlid, 1982). En contraste, el intercambiador

Na^+/H^+ es específico del ion sodio (Mitchell y Moyle, 1969), pero no se encuentra en *S. cerevisiae* (Villalobo et al., 1981).

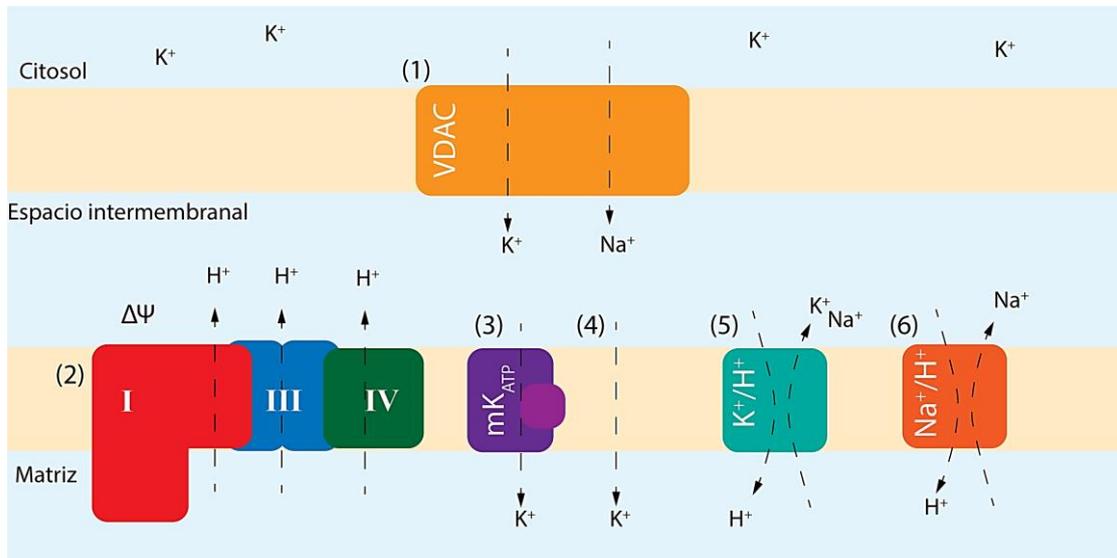


Figura 3.- Transporte de cationes monovalentes en la mitocondria. (1) La membrana externa mitocondrial permite el ingreso de cationes monovalentes. (2) Los complejos respiratorios bombean protones al espacio intermembranal. (3) Este $\Delta\psi$ es utilizado por el mK_{ATP} para ingresar K^+ a la matriz mitocondrial. (4) Asimismo puede existir una difusión de los iones (4). La actividad del intercambiador K^+/H^+ (5), que puede transportar otros cationes, y del intercambiador Na^+/H^+ (6) específico al ion Na^+ (ausente en *S. cerevisiae*), evitan el hinchamiento mitocondrial. Modificado de Garlid y Paucek (2003).

1.5.- Organismos halófilos

Los organismos halófilos requieren concentraciones altas de sales para crecer. Se encuentran distribuidos en los tres reinos (*Bacteria*, *Eukarya* y *Archea*) (Kivistö y Karp, 2011). Se categorizan como halotolerantes (organismos no halófilos que pueden crecer en hipersalinidad), así como ligera, moderadamente o extremadamente halófilos, dependiendo del intervalo de concentración donde crecen de manera óptima (Kushner, 1986; Oren, 2013; Ventosa et al., 1998).

Los halófilos crecen en condiciones donde se suprime el crecimiento de otros organismos (Kivistö y Karp, 2011). En organismos no adaptados a condiciones hipertónicas, se induce un gradiente osmótico, disminuyendo el agua intracelular, concentrando los componentes citoplasmáticos, lo que ocasiona la desnaturalización de macromoléculas (McGenity y Oren, 2012; Weinisch et al., 2018) (Figura 4).

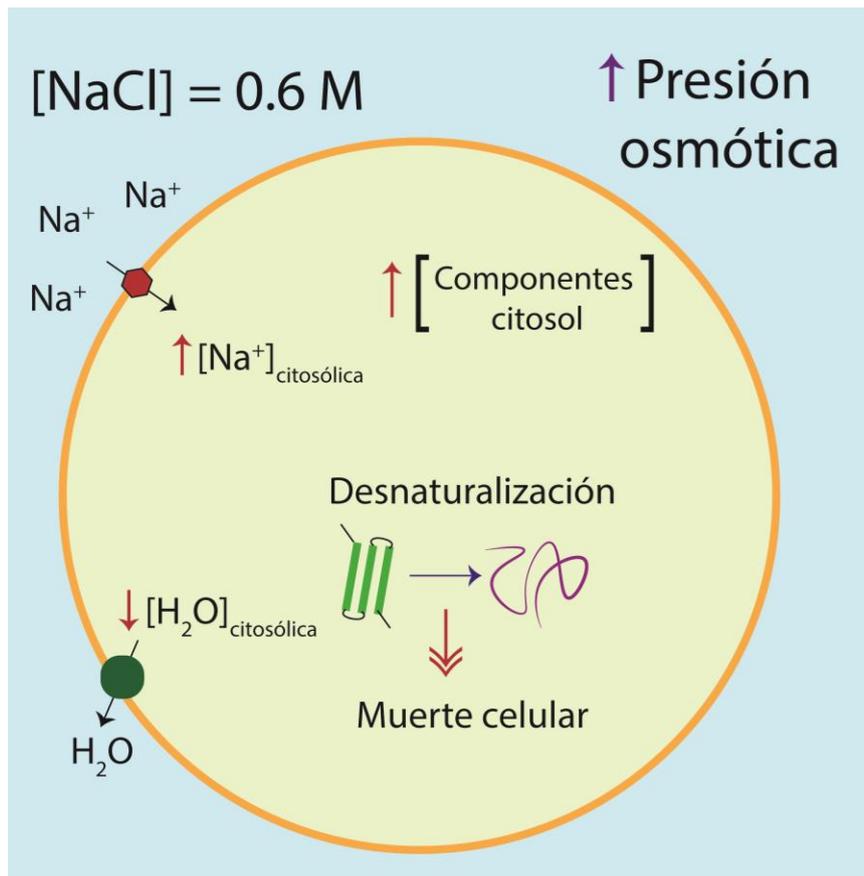


Figura 4.- Efecto de la hipersalinidad en organismos no halófilos. Las altas concentraciones de sales ocasionan mayor presión osmótica, aumentando la entrada de iones al citosol y la salida de agua. Esto ocasiona un incremento en la concentración de componentes intracelulares y en consecuencia su desnaturalización. Basado en Weinisch et al. (2018).

Las células tienen que mantener isosmolaridad con la concentración de sales e incluso ser hiperosmóticas para mantener el turgor (Oren, 2013). Existen dos mecanismos de adaptación a altas concentraciones de sales: *salt-in* y *salt-out* (Figura 5). El primer mecanismo consiste en la acumulación de altas concentraciones de iones K⁺ y Cl⁻ en el citoplasma (Oren, 2013). Esta adaptación permite poca flexibilidad, ya que requiere enzimas y proteínas adaptadas a hipersalinidad para mantener su actividad y estabilidad (Dennis y Shimmin, 1997).

Por otro lado, el fenómeno *salt-out* evita altas concentraciones intracelulares del catión por medio de transportadores (Oren, 2013). El equilibrio osmótico se consigue por la síntesis de solutos compatibles (Kempf y Bremer, 1998); moléculas de bajo peso molecular, altamente solubles en agua y no tienen efecto inhibitorio a concentraciones molares, lo que permite

mantener enzimas sin adaptaciones (Oren, 2013). Este mecanismo permite mayor flexibilidad y que el microorganismo crezca en un mayor intervalo de concentraciones (Gunde-Cimerman et al., 2018).

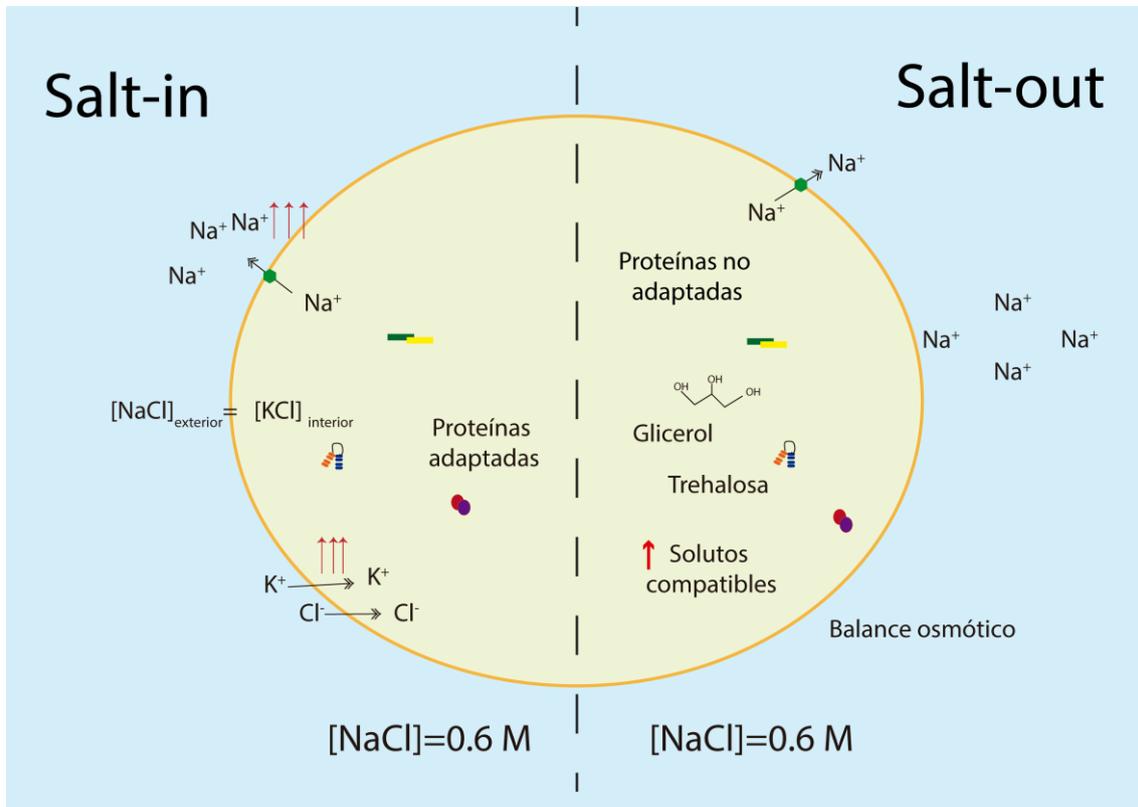


Figura 5.- Mecanismo de adaptación de organismos halófilos/halotolerantes. Izquierda: *Salt-in*, se equilibra la concentración de iones del medio con los intercelulares para proporcionar equilibrio osmótico, en consecuencia, las proteínas del sistema están adaptadas a condiciones hipersalinas. Derecha: *Salt-out*, transportadores expulsan los iones al medio, a su vez sintetizan solutos compatibles para mantener balance osmótico. Basado en Gunde-Cimerman et al (2018).

1.6.- *Debaryomyces hansenii*

Debaryomyces hansenii es una levadura ascomiceta marina osmotolerante, halotolerante y criotolerante (Aggarwal y Mondal, 2009; Wrent et al., 2014). Este hongo es de particular interés biotecnológico porque acumula lípidos, sintetiza el edulcorante xilitol, se utiliza en la producción de lácteos y en el curado de carnes (Breuer y Harms, 2006).

1.7.- Cadena respiratoria de *D. hansenii*

La cadena respiratoria de la mitocondria de *D. hansenii* posee cuatro complejos respiratorios clásicos (I, II, III₂ y IV) (Figura 6) (Cabrera-Orefice et al.,

2014a). Los complejos I, III₂ y IV de *D. hansenii*, además de estar en forma individual, pueden asociarse en supercomplejos, mientras que la ATP-sintasa se encuentra en forma monomérica y dimérica (Cabrera-Orefice et al., 2014a).

Adicionalmente, tiene dos oxidorreductasas en la cara externa de la membrana interna mitocondrial; una NADH deshidrogenasa alterna (NDH2e) y una glicerol fosfato deshidrogenasa mitocondrial (GPDH) (Cabrera-Orefice et al., 2014a). Asimismo, tiene una ubiquinol oxidasa constitutiva insensible a cianuro y activada por AMP, que tiene una expresión máxima en la fase estacionaria (Cabrera-Orefice et al., 2014a). Esta oxidasa es necesaria para mantener la función mitocondrial en condiciones de estrés (Garcia-Neto et al., 2017). Como el complejo II, las deshidrogenasas externas y la oxidasa alterna no bombean protones al espacio intermembranal (Kerscher et al., 2008; Vanlerberghe, 2013) y no se asocian en supercomplejos (Cabrera-Orefice et al., 2014a).

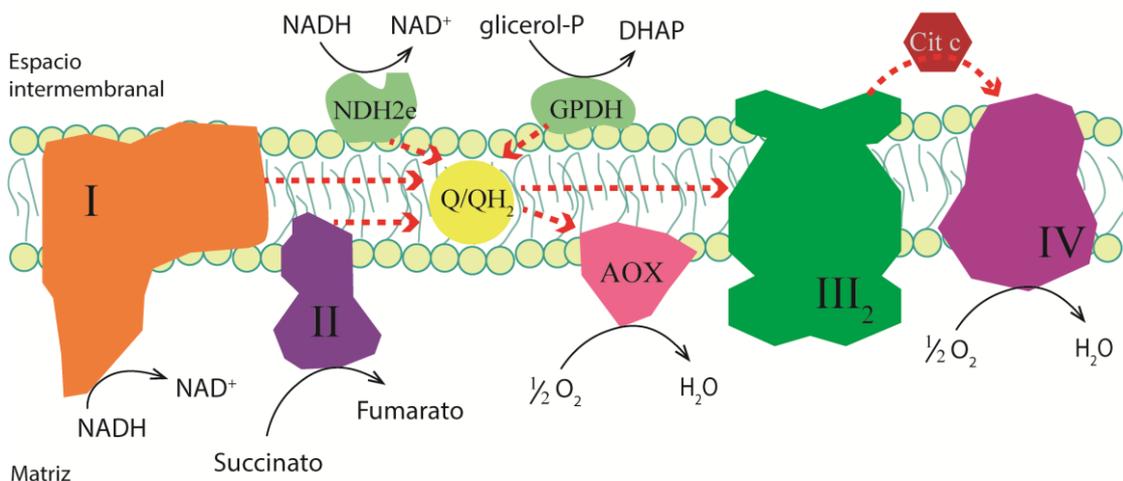


Figura 6.- Composición de la cadena respiratoria de *D. hansenii*. Consiste en los complejos respiratorios clásicos (I, II, III₂ y IV), más NADH deshidrogenasa alterna en la cara externa de la membrana interna (NDH2e), una glicerol fosfato deshidrogenasa y una oxidasa alterna (AOX). Modificado de Cabrera-Orefice et al. (2014).

Como en los mamíferos y en *S. cerevisiae*, las mitocondrias de *D. hansenii* experimentan la transición de la permeabilidad (Cabrera-Orefice et al., 2010). Este proceso consiste en la apertura de un canal que disipa los gradientes electroquímicos en la mitocondria (Bernardi et al., 2015). El PTP de *D. hansenii* es sensible a las concentraciones de fosfato; además, su apertura se inhibe con cationes divalentes (Mg²⁺ y Ca²⁺) y con monovalentes (Na⁺ y K⁺)

(Cabrera-Orefice et al., 2010). A pesar de no conocer la identidad de las proteínas que componen el PTP, se considera que su apertura y cierre es un sistema de desacoplamiento fisiológico (Guerrero-Castillo et al., 2011)

Durante la fase estacionaria, el consumo de oxígeno y el control respiratorio dependiente de complejo I disminuye, este fenómeno se atribuye a una menor concentración de NAD⁺ en la matriz mitocondrial y se ha interpretado como otro mecanismo de desacoplamiento fisiológico (Cabrera-Orefice et al., 2014b).

1.8.- Efecto de cultivo de *D. hansenii* con cationes monovalentes

Cuando *D. hansenii* es cultivada en altas concentraciones de sal se incrementa su crecimiento (Figura 7) (Almagro et al., 2000; González-Hernández et al., 2005). En estas condiciones aumenta la síntesis de sustratos compatibles, como el glicerol, arabitol y trehalosa, sustancias altamente solubles que permiten mantener el balance osmótico sin afectar el metabolismo (Adler y Gustafsson, 1980; González-Hernández et al., 2005; Gustafsson y Norkrans, 1976; Jadhav et al., 2018; Larsson y Gustafsson, 1987). Asimismo, las vacuolas de *D. hansenii*, permiten almacenar Na⁺ y mantener las concentraciones citosólicas de K⁺ (Herrera et al., 2017).

D. hansenii al ser cultivada en presencia de 0.6 M NaCl o KCl, las concentraciones intracelulares de estos cationes son 143 y 176 mM, respectivamente (González-Hernández et al., 2004). En comparación, en condiciones fisiológicas la concentración de Na⁺ en el citoplasma *S. cerevisiae* es de 20 mM y de K⁺ es de 300 mM (Olz et al., 1993). Se ha especulado que el mecanismo de transporte de los iones K⁺ o Na⁺ dependen de una ATPasa que funciona como bomba de protones, de un intercambiador K⁺/H⁺ y de un sistema de intercambio catión/catión (Thomé-Ortiz et al., 1998). En estas mismas condiciones, incrementan el metabolismo aerobio y, en menor medida, la glucólisis y la fermentación (Calahorra et al., 2009; Sánchez et al., 2008).

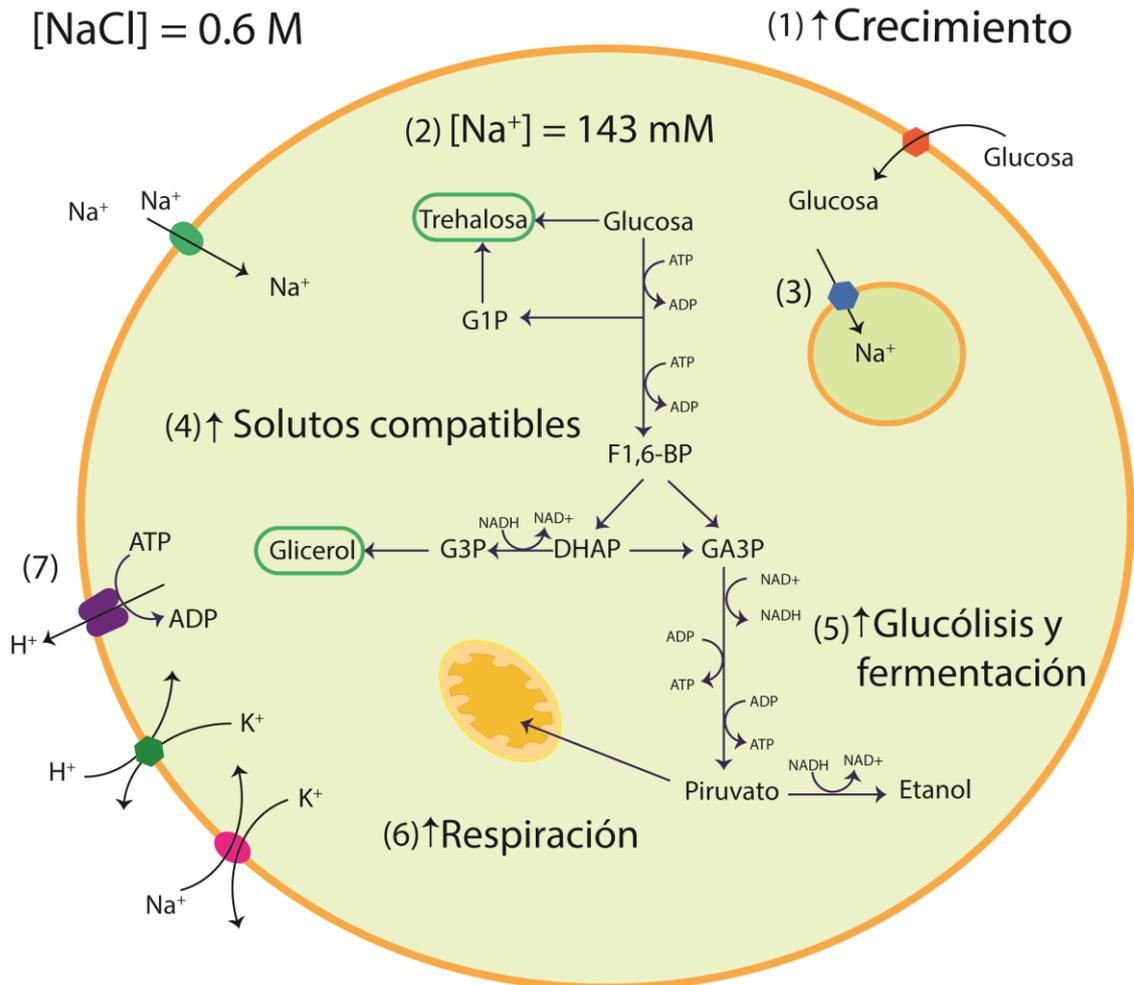


Figura 7.- Efecto de cultivar a *D. hansenii* en altas concentraciones de sales. (1) Aumenta la tasa de crecimiento (Almagro et al., 2000). (2) Los cationes monovalentes se acumulan en el citosol (González-Hernández et al., 2004). (3) Almacén de cationes en la vacuola (Herrera et al., 2017). (4) La síntesis de solutos compatibles como glicerol y trehalosa incrementa (González-Hernández et al., 2005). (5) La glucólisis y la fermentación es mayor (Calahorra et al., 2009). (6) Incrementa el consumo de oxígeno (Sánchez et al., 2008). (7) Transportadores propuestos responsables de mantener la concentración de cationes en el citosol (ATPasa de protones, antiportador K⁺/H⁺ y antiportador K⁺/Na⁺) (Thomé-Ortiz et al., 1998). G1P (Glucosa-1-fosfato), F1,6-BP (Fructosa 1,6-bifosfato), DHAP (Dihidroxiacetona fosfato), G3P (Glicerol-3-fosfato) y GA3P (Gliceraldehído-3-fosfato).

1.9.- Cationes monovalentes

Los metales alcalinos son ubicuos en la naturaleza, en términos de abundancia Li⁺, Rb⁺ y Cs⁺ son mucho menos abundantes e importantes. Fr⁺, es un elemento traza radioactivo (Kim et al., 2016). Todos estos elementos son metales con una configuración electrónica ns¹ y, consecuentemente, sólo ocurren en la naturaleza como cationes monovalentes (Sigel et al., 2016).

En los sistemas biológicos, los iones están comúnmente involucrados en procesos osmóticos y balances electrolíticos (Kim et al., 2016). En fluidos biológicos estos iones se encuentran como especies completamente hidratadas (Kim et al., 2016), es decir moléculas de agua se unen a iones metálicos por enlaces ion-dipolo de carácter electrostático, lo que aumenta el radio del ion (Israelachvili, 2011; Persson, 2010). Los iones más pequeños tienen un radio hidratado mayor debido a que su campo eléctrico es más intenso (Israelachvili, 2011). El tamaño del ion sodio hidratado es más grande que del ion potasio, a pesar de que el ion sodio (1.0 Å) es más pequeño que el potasio (2.8 Å) (Israelachvili, 2011). Esta propiedad permite a los transportadores discriminar entre los diferentes iones (Kandori et al., 2018); por ejemplo, el ion K^+ requiere ser deshidratado por su transportador para poder ser translocado a través de la membrana (Zhou et al., 2001), a diferencia de los transportadores de Na^+ que requieren que el ion esté hidratado (Kühlbrandt, 2016).

Los iones Na^+ y K^+ también pueden actuar como cofactores o efectores alostéricos de diferentes enzimas, al estabilizar intermediarios catalíticos o posicionar sustratos (Vašák y Schnabl, 2016).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En altas concentraciones extracelulares de KCl o NaCl el crecimiento, el metabolismo aerobio y, en menor medida, la fermentación de *D. hansenii* se incrementan (Sánchez et al. 2008; Sánchez et al. 2006; Garcia-Neto et al. 2017). La halotolerancia de esta levadura se puede atribuir, parcialmente, a sus transportadores de cationes monovalentes (Thomé-Ortiz et al. 1998) y a la síntesis de sustratos compatibles (Prista et al., 2005).

La concentración de sodio en el citosol de la levadura incrementa de 10 mM al rango de 100 mM cuando se cultiva en altas concentraciones de NaCl (0.6-1 M) (González-Hernández et al. 2004). Por consiguiente, tanto las proteínas como los organelos de la levadura tienen que soportar estas concentraciones de cationes monovalentes.

Como una levadura aerobia obligada, la mayor parte del ATP sintetizado por *D. hansenii* proviene de la fosforilación oxidativa (Pfeiffer y Morley, 2014). Por lo que se ha propuesto que su mitocondria está optimizada para funcionar en altas concentraciones de sales (Cabrera-Orefice et al., 2010; Sánchez et al., 2006). Por ejemplo, previamente se reportó que en las mitocondrias de *D. hansenii*, los iones Na^+ y K^+ cierran el poro de transición de la permeabilidad (Cabrera-Orefice et al., 2010). Asimismo, estos cationes incrementan el control respiratorio, el potencial transmembranal y la síntesis de ATP (Cabrera-Orefice et al., 2010). Debido a que las concentraciones del ion K^+ son similares en el citosol y en la matriz mitocondrial (Laskowski et al., 2016), y a las altas concentraciones de Na^+ intracelular, las proteínas que componen la cadena respiratoria de *D. hansenii* posiblemente están constantemente expuestas a altas concentraciones de estos cationes monovalentes.

Con base en la importancia del control ejercido por los cationes monovalentes sobre el metabolismo aerobio de *D. hansenii*, existe la posibilidad que los cationes monovalentes afecten de manera directa la eficiencia de los complejos respiratorios como un mecanismo de optimización del crecimiento celular. Por lo tanto, decidimos analizar el efecto de los cationes monovalentes sobre la respiración y sobre cada uno de los complejos respiratorios de *D. hansenii*.

3. HIPÓTESIS

Los cationes monovalentes estimulan la fosforilación oxidativa de *D. hansenii* al aumentar la eficiencia de uno o varios componentes de su cadena respiratoria.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si los cationes monovalentes estimulan la actividad y eficiencia de uno o varios componentes de la fosforilación oxidativa de *D. hansenii*.

Objetivos específicos

- Determinar el efecto de los cationes monovalentes sobre los complejos proteicos involucrados en el consumo de oxígeno acoplado de mitocondrias de *D. hansenii*
- Evaluar la actividad enzimática de cada uno de los complejos respiratorios mitocondriales en membranas de mitocondrias de *D. hansenii* en presencia de cationes monovalentes.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Cepa empleada

Se utilizó la cepa Y7426 de *Debaryomyces hansenii* (Departamento de Agricultura US). La cepa fue mantenida en cajas de medio de cultivo Na-YPGal (extracto de levadura 1%, peptona 2%, galactosa 2%, NaCl 1 M y bacto-agar 2%).

5.2.- Condiciones de cultivo

Las levaduras se cultivaron de la siguiente manera: una colonia de levadura se inoculó en 100 mL de medio Na-YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%, NaCl 0.6 M) en 3 matraces ranurados independientes. El medio se suplementó con 50 µL/L de antiespumante. Los matraces se incubaron en un agitador orbital a 200 rpm por 48 h a 28°C. Posteriormente, cada precultivo fue usado para inocular 750 mL de medio fresco en matraces ranurados. Se continuó la incubación por 24 horas bajo las mismas condiciones.

5.3.- Aislamiento de mitocondrias

Las levaduras fueron cosechadas y lavadas por centrifugación (4000 xg por 5 minutos) y suspendidas en agua destilada. Después del tercer lavado, el paquete celular se suspendió en una solución compuesta de sorbitol 1 M, maleato 10 mM, albúmina de suero bovino 0.2%, pH 6.8 (Tris) a 4°C. Las células se vaciaron en una cámara de *bead-beater* de 300 mL con un volumen del 70% de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro. El contenedor se introdujo a una camisa con hielo y las células se rompieron mecánicamente en frío, al aplicar cuatro pulsos de 20 segundos con intervalos de reposo de 2 minutos entre cada uno.

Las mitocondrias se aislaron por centrifugación diferencial. El homogeneizado se centrifugó a 3000 xg por 5 min, posteriormente el sobrenadante se recuperó y centrifugó a 17 500 xg durante 15 min. El paquete obtenido se suspendió en la solución con albúmina usando un pincel y se centrifugó nuevamente a 3000xg por 5 min y el sobrenadante se centrifugó a 17 500 xg por 15 min. El paquete de mitocondrias se suspendió en medio sin

albúmina y se mantuvo a 4°C durante la cuantificación de proteína y todos los ensayos.

5.4.- Cuantificación de proteína

La concentración de proteína se determinó por el método de biuret (Gornall et al., 1949) en un espectrofotómetro Beckman DU-50 a 540 nm. A 2 mL del reactivo de biuret se le adicionó 125 µL de desoxicolato de sodio 5%, 350 µL de agua destilada y 25 µL de la muestra.

5.5.- Consumo de oxígeno y acoplamiento respiratorio

Para evaluar la calidad de la preparación de mitocondrias se determinó su control respiratorio (CR) mitocondrial. Este parámetro es el cociente entre la velocidad del consumo mitocondrial de oxígeno en estado fosforilante (estado III, con un sustrato oxidable y ADP) y velocidad del consumo de oxígeno en reposo (estado IV, con sustrato oxidable y sin ADP). Una preparación se consideró adecuada si el valor del CR era superior a 1.8.

El consumo de oxígeno se determinó usando un electrodo tipo Clark conectado a un oxímetro (Strathkelvin Instruments 782) acoplado a una computadora para la adquisición de datos y cálculo de la pendiente. La cámara de reacción (1 mL) se mantuvo a 30°C y en agitación por una barra magnética. Se utilizó como medio de respiración sorbitol 1 M, maleato 10 mM pH 6.8 (Tris). Para evaluar el CR en condiciones óptimas se adicionaron los efectores: fosfato inorgánico (10 mM), MgCl₂ (1 mM) y KCl (75 mM) usando piruvato-malato como sustratos (10 mM de cada uno). Para inducir el estado III se adicionó ADP a una concentración final de 500 µM. La concentración de mitocondrias empleadas fue de 0.5 mg/mL.

Para evaluar el efecto de los iones monovalentes se omitió el uso de MgCl₂ y KCl, adicionando la sal del catión monovalente (K⁺, Na⁺, Li⁺ o Rb⁺) a 100 mM de concentración final. La concentración de fosfato, así como los inhibidores y sustratos empleados en cada ensayo se indican en los pies de las tablas correspondientes.

5.6.- Potencial transmembranal

El potencial transmembranal se determinó con el colorante catiónico safranina (Safranina-O). La molécula de safranina interactúa con la mitocondria cuando ésta genera un potencial transmembranal ($\Delta\psi$), ocasionando un cambio en su color (Akerman & Wikström, 1976). Los cambios de absorbancia se determinan en un espectrofotómetro de doble haz (Aminco DW 2000) en modo dual a 511- 533 nm a temperatura ambiente. Al generar el potencial transmembranal la diferencia de absorbancia se incrementa.

El potencial transmembranal obtuvo su valor máximo usando 10 mM de fosfato inorgánico (PTP cerrado). En esta condición se adicionaron los diferentes iones monovalentes (K^+ , Na^+ , Li^+ o Rb^+) a 100 mM. En todos los casos se utilizó safranina-O 10 μ M en una celda de reacción de 2 mL y como sustrato piruvato-malato 10 mM. Para abatir el potencial transmembranal se utilizó *p*-clorocarbonilcianurofenilhidrazona (CCCP) a 5 μ M.

5.7.- Actividades enzimáticas de los complejos respiratorios

Las actividades enzimáticas se evaluaron como se describió (Spinazzi et al., 2012; Uribe et al., 1985), usando las distintas concentraciones de los iones monovalentes. En todos los casos el medio de reacción fue Tris-HCl 50 mM pH 7.5, la concentración de mitocondrias usada fue 0.1 mg/mL y se evaluaron los diferentes cationes monovalentes (K^+ , Na^+ , Li^+ o Rb^+) a 100 mM. Los cambios de absorbancia se determinaron en un espectrofotómetro de doble haz (Aminco DW 2000).

5.7.1.- Actividad NADH:citocromo c reductasa

Se determinó la reducción del citocromo c (30 μ M) a 540 nm, empleando como sustrato NADH (25 μ M). Se adicionó flavona 500 μ M y NaCN 100 μ M para inhibir la NADH deshidrogenasa alterna y el complejo IV, respectivamente. El coeficiente de extinción del citocromo c es 18.5 $mM^{-1}cm^{-1}$.

5.7.2.- Actividad NADH deshidrogenasa

Se determinó siguiendo la reducción de 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) (80 μ M) a 600 nm usando como sustrato NADH (25 μ M). Se adicionó flavona 500 μ M y NaCN 100 μ M para inhibir la NADH deshidrogenasa alterna y

el complejo IV, respectivamente. El coeficiente de extinción del DCPIP es $19.1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$,

5.7.3.- Actividad citocromo c oxidasa

Se evaluó la oxidación del citocromo c reducido con ditionita ($30 \text{ }\mu\text{M}$). Se adicionó antimicina A ($5 \text{ }\mu\text{M}$) para inhibir el complejo III₂. El coeficiente de extinción del citocromo c es $18.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

6. RESULTADOS

Para aislar las mitocondrias se hicieron algunas modificaciones a partir del método previamente descrito (Cabrera-Orefice et al., 2010). Para obtener mayor cantidad de biomasa se emplearon matraces ranurados para oxigenar mejor el cultivo. Asimismo, se obtuvo mayor biomasa con medio Na-YPD (55 ± 5 g peso húmedo/3 L) en lugar de Na-YPLac (40 ± 5 g peso húmedo/3 L). La mayor biomasa del medio con glucosa permitió la obtención de mitocondrias con mayor acoplamiento (CR = 2 ± 0.2) en comparación con las levaduras cultivadas en medio con lactato (CR = 1.4 ± 0.2).

6.1.- Efectos de diferentes cationes monovalentes sobre el consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas de *D. hansenii*

Se determinó el efecto de los diferentes cationes monovalentes sobre el consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de las levaduras de *D. hansenii* cosechadas en la fase logarítmica. La concentración utilizada de las sales (100 mM) se basó en la cantidad de potasio y sodio presentes en el citoplasma de *D. hansenii* cultivada en altas concentraciones salinas (0.6 o 1 M) (González-Hernández et al., 2004).

Se evaluó si los iones Li^+ y Rb^+ tienen el mismo efecto que el Na^+ y K^+ sobre el consumo de oxígeno, tanto en el estado III como el estado IV (Tabla 1). Como sustrato respiratorio se empleó piruvato-malato (10 mM de cada uno), con el cual se obtiene un mayor consumo de oxígeno y control respiratorio en mitocondrias de *D. hansenii* (Cabrera-Orefice et al., 2010). Este sustrato es oxidado por las deshidrogenasas de la matriz mitocondrial para producir NADH, que es posteriormente oxidado por el complejo I (Pesta y Gnaiger, 2012).

Los ensayos se realizaron a baja concentración de fosfato (0.1 mM), donde el PTP se encuentra abierto. Cuando no se empleó ningún catión monovalente, el consumo de oxígeno no se incrementó al adicionar el ADP (CR = 0.91 ± 0.26). Esto se debe a que los protones bombeados por los complejos respiratorios hacia el espacio intermembranal pueden reingresar a la matriz mitocondrial a través del PTP abierto, evitando la formación del gradiente electroquímico para la síntesis de ATP.

Por otro lado, los iones K^+ y Rb^+ incrementaron el acoplamiento de las mitocondrias en una condición de bajo fosfato ($CR = 1.47 \pm 0.074$ y 1.7 ± 0.1 , respectivamente), debido a un aumento del consumo de oxígeno en el estado III. Lo anterior indica que estos dos iones parecen propiciar el cierre del PTP para formar el gradiente electroquímico. En contraste, los iones Li^+ y Na^+ no tuvieron efecto sobre el consumo de oxígeno, y en consecuencia sobre el control respiratorio ($CR = 1.02 \pm 0.181$ y 0.949 ± 0.17 , respectivamente).

Tabla 1.- Efecto de diferentes cationes monovalentes sobre el consumo de oxígeno y control respiratorio (CI + CIII₂ + CIV) de mitocondrias aisladas de *Debaryomyces hansenii* cuando el PTP está abierto.

	Consumo de oxígeno (natgO/mg prot*min)		
	Estado IV	Estado III	CR
Pi 0.1 mM	14.32 ± 2.94	13.08 ± 0.96	0.91 ± 0.26
+ LiCl 100 mM	25.73 ± 2.5	26.26 ± 7.34	1.02 ± 0.181
+ NaCl 100 mM	29 ± 13	27.54 ± 10.61	0.95 ± 0.17
+ KCl 100 mM	30.52 ± 6.58	45.18 ± 11.76*	1.47 ± 0.074*
+ RbCl 100 mM	35.68 ± 6.33*	61.28 ± 13.2*	1.71 ± 0.1*

Medio de reacción: sorbitol (1 M), maleato (10 mM) pH 6.8 (Tris), fosfato (Pi) 0.1 mM y piruvato-malato (10 mM) como sustrato. El control respiratorio es el cociente entre los estados III/IV. El estado III se indujo al adicionar ADP (500 μ M). Concentración de mitocondrias 0.5 mg/mL. n= 3. Los datos se expresan como el promedio \pm DS. ANOVA de una sola vía (Prueba de múltiples comparaciones de Tukey). * $p < 0.05$ comparado con el control.

El aumento del control respiratorio por K^+ pero no por Na^+ , se contrapone con lo reportado previamente donde se indica que ambos iones ocasionan el cierre del PTP (Cabrera-Orefice et al., 2010). En las condiciones ensayadas, a bajas concentraciones de fosfato (0.1 mM), los iones K^+ y Rb^+ incrementaron el control respiratorio en las mitocondrias de *D. hansenii*.

Debido a que el incremento del consumo de oxígeno parece deberse a un efecto sobre el PTP, para evaluar el efecto específico de cada uno de los cationes monovalentes sobre los componentes de la cadena respiratoria se cambió la concentración de fosfato de 0.1 mM, donde el PTP está abierto, a 10 mM, en la cual el PTP permanece cerrado (Cabrera-Orefice et al., 2010). En estas condiciones, en ausencia de cationes monovalentes, la tasa de consumo de oxígeno incrementó tanto en estado IV como en estado III con respecto a

bajas concentraciones de fosfato (Tabla 2). Asimismo, el control respiratorio aumentó (0.91 ± 0.26 a 2.31 ± 0.44), lo que refleja que el PTP está cerrado.

La adición de Na^+ y Li^+ incrementó el consumo de oxígeno en el estado III, mientras que el estado IV fue similar al control de fosfato, lo que se refleja en un incremento en el CR. Por otro lado, la presencia de K^+ y Rb^+ incrementa el consumo de oxígeno en el estado III como en el IV. Sin embargo, la proporción del incremento es similar en ambos estados con respecto al control (75% y 95% del K^+ y Rb^+ , respectivamente), por lo que el control respiratorio no cambió.

Tabla 2.- Efecto de diferentes cationes monovalentes sobre el consumo de oxígeno y control respiratorio (CI + CIII₂ + CIV) de mitocondrias aisladas de *Debaryomyces hansenii* cuando el PTP está cerrado.

	Consumo de oxígeno (natgO/mg prot*min)		
	Estado IV	Estado III	CR
Pi 10 mM	64.06 ± 11.75	145.39 ± 18	2.31 ± 0.44
+ LiCl 100 mM	69.86 ± 5.8	185.86 ± 5.4 *	2.67 ± 0.3 *
+ NaCl 100 mM	61.4 ± 5.15	189.4 ± 13.42 *	3.09 ± 0.28 *
+ KCl 100 mM	112.66 ± 4.38 *	255.33 ± 19.63 *	2.27 ± 0.23
+ RbCl 100 mM	125 ± 11.29 *	285 ± 15.23 *	2.28 ± 0.14

Medio de reacción: sorbitol 1 M, maleato 10 mM pH 6.8 (Tris), fosfato (Pi) 10 mM y piruvato-malato 10 mM como sustrato. El control respiratorio es el cociente entre los estados III/IV. El estado III se indujo al adicionar ADP (500 µM). Concentración de mitocondrias 0.5 mg/mL. n= 3. Los datos se expresan como el promedio ± DS. ANOVA de una sola vía (Prueba de múltiples comparaciones de Tukey). * $p < 0.05$ comparado con el control.

A altas concentraciones de fosfato, donde el PTP está cerrado, los iones K^+ y Rb^+ incrementaron el consumo de oxígeno sin haber aumentado el control respiratorio. Lo que parece indicar que el incremento del consumo de oxígeno es independiente del PTP. Similar al ensayo en concentraciones bajas de fosfato, el efecto Na^+ es diferente al del K^+ .

6.2.- Efecto de diferentes cationes monovalentes sobre el potencial de membrana mitocondrial

Con el fin de descartar que el efecto sobre el consumo de oxígeno por los diferentes cationes monovalentes se deba al menor potencial de

membrana, se determinó si este parámetro se modifica por la adición de las sales usando safranina-O como indicador. La safranina interactúa con la mitocondria cuando ésta genera un potencial transmembranal ($\Delta\psi$), lo que ocasiona un cambio en espectro de absorción (Akerman & Wikström, 1976). Para abatir el potencial formado se emplea el protonóforo CCCP.

Todos los ensayos se realizaron en las mismas condiciones que el consumo de oxígeno (Pi 10 mM, piruvato-malato 10 mM). A esta concentración de fosfato el PTP está cerrado, por lo que el potencial transmembranal se mantuvo estable (Figura 8). La adición de los iones K^+ y Rb^+ , no tuvo efecto sobre el potencial transmembranal con respecto al control de fosfato (10 mM) (Figura 8). En contraste los iones Na^+ y Li^+ abatieron parcialmente el potencial transmembranal.

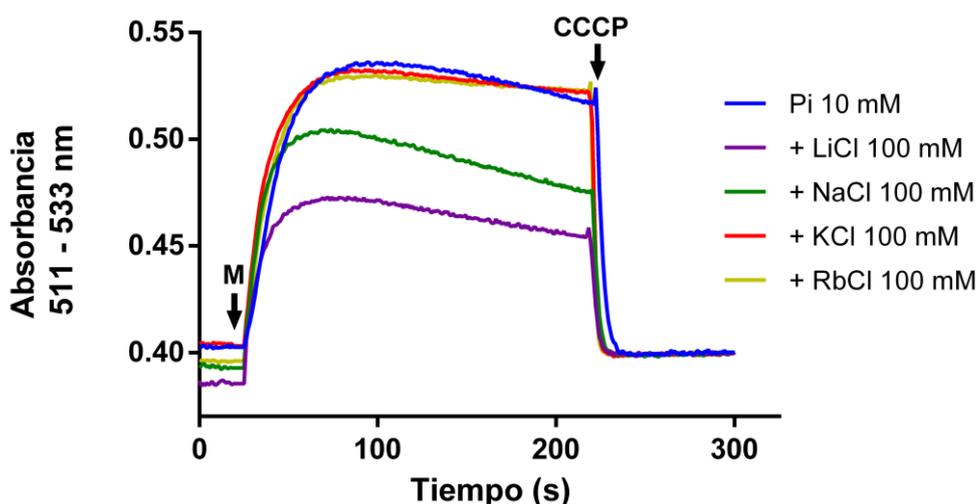


Figura 8.- Efecto de los iones monovalentes sobre el potencial transmembranal de mitocondrias aisladas de *D. hansenii*. El sustrato empleado fue piruvato-malato (10 mM). Mezcla de reacción: Sorbitol (1 M), maleato (10 mM) pH 6.8 (Tris), fosfato (Pi) 10 mM, safranina-O (10 μ M). Temperatura ambiente. Volumen final 2 mL. Donde se indica mitocondrias (M) (0.5 mg/mL) o CCCP (5 μ M), fueron adicionados.

A pesar de que el potencial transmembranal fue menor con la adición de Li^+ y Na^+ , el incremento del consumo de oxígeno se observó por los cationes monovalentes que mantuvieron el potencial transmembranal (K^+ y Rb^+). Por lo tanto, en conjunto con los datos de consumo de oxígeno, se puede descartar el efecto del PTP sobre la activación observada.

6.3.- Efecto de diferentes cationes monovalentes sobre la actividad de Complejo I o NADH-Ubiquinona óxido-reductasa

En los ensayos de consumo de oxígeno se utilizó como sustrato respiratorio al piruvato-malato, que son oxidados en la matriz mitocondria por deshidrogenasas, reduciendo NAD^+ a NADH , que es posteriormente oxidado por el complejo I. Por lo tanto, para corroborar el incremento del consumo de oxígeno se evaluó la actividad del complejo I en membranas de mitocondrias.

Primeramente, se evaluó la actividad de NADH :citocromo c reductasa ($\text{CI} + \text{CIII}_2$). Se empleó NADH como sustrato, que dona por medio del complejo I sus electrones a la poza de quinonas y, posteriormente por medio del complejo III_2 , al citocromo c. Se utilizó flavona para inhibir la deshidrogenasa alterna, así como cianuro para bloquear el paso de electrones al complejo IV.

No hubo un aumento en la actividad NADH : citocromo c reductasa por la adición de los diferentes cationes monovalentes (Figura 9). Incluso se registró una inhibición leve de la actividad por K^+ y Rb^+ .

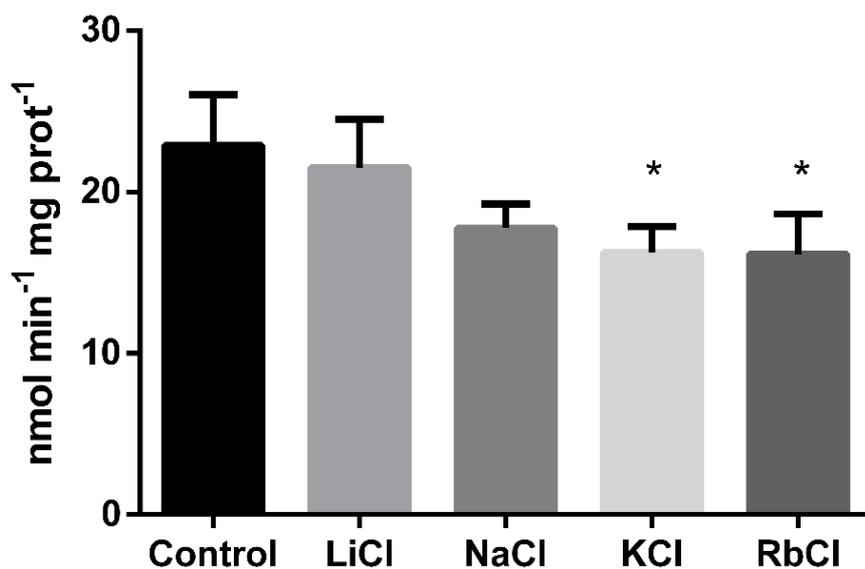


Figura 9.- Efecto de diferentes cationes monovalentes sobre la actividad NADH :citocromo c reductasa (CI-CIII_2). Medio de reacción: Tris-HCl (50 mM) pH 7.5. Sustrato NADH (25 μM) y citocromo c (30 μM). Concentración de membranas mitocondriales 0.1 mg/mL. Se adicionó flavona (500 μM) y cianuro (100 μM) para inhibir la NADH deshidrogenasa alterna y el complejo IV, respectivamente. Concentración de sales 100 mM. $n = 3$. Los datos se expresan como el promedio \pm DS. ANOVA de una sola vía (Prueba de múltiples comparaciones de Tukey). * $p < 0.05$ comparado con el control sin sal.

La actividad NADH :citocromo c reductasa comprende las actividades tanto del complejo I y el complejo III_2 , por lo que la activación del complejo I

podría ser limitada por un efecto sobre el complejo III₂. Por lo tanto, para evaluar individualmente el complejo I, se determinó su actividad en membranas de mitocondrias. Nuevamente se empleó NADH como sustrato, así como flavona y cianuro como inhibidores. Sin embargo, en lugar de citocromo c se utilizó al DCPIP como aceptor de electrones. Similar a la actividad NADH:citocromo c reductasa, ningún catión monovalente tuvo efecto activador sobre la actividad individual del complejo I (Figura 10).

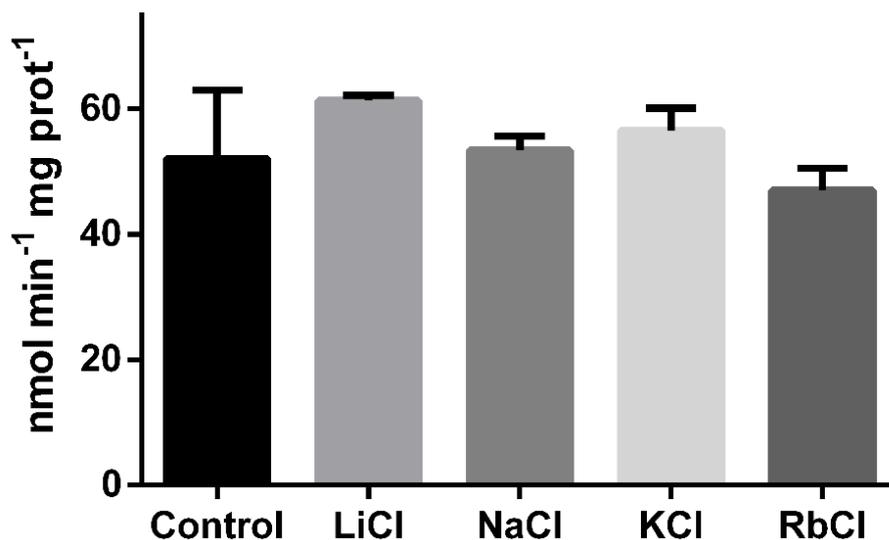


Figura 10.- Efecto de diferentes cationes monovalentes sobre la actividad NADH deshidrogenasa del complejo I usando NADH como sustrato. Medio de reacción: Tris-HCl (50 mM) pH 7.5, DCPIP (80 μ M). Sustrato NADH (25 μ M). Concentración de membranas mitocondriales 0.1 mg/mL. Se adicionó flavona (500 μ M) y cianuro (100 μ M) para inhibir la NADH deshidrogenasa alterna y el complejo IV, respectivamente. Concentración de sales 100 mM. n = 3. ANOVA de una sola vía (Prueba de múltiples comparaciones de Tukey). * $p < 0.05$ comparado con el control.

A pesar de que se observó un incremento del consumo de oxígeno por cationes monovalentes usando piruvato-malato, no se apreció un incremento de la actividad enzimática del complejo I usando NADH como sustrato. Por lo tanto, se reemplazó el NADH por piruvato-malato como sustrato para determinar la actividad del complejo I e indirectamente el efecto de los cationes monovalentes sobre algunas deshidrogenasas productoras de NADH del ciclo de Krebs. Como se utilizó membranas mitocondriales, se adicionó NAD⁺ al medio de reacción para evitar que fuera una limitante.

Al usar el mismo sustrato en el consumo de oxígeno se observó una ligera disminución de la actividad NADH deshidrogenasa (Figura 11). Por lo tanto, la actividad del complejo I no se ve incrementada por los cationes

monovalentes al adicionar NADH directamente u obtenerlo a partir de las deshidrogenasas del ciclo de Krebs.

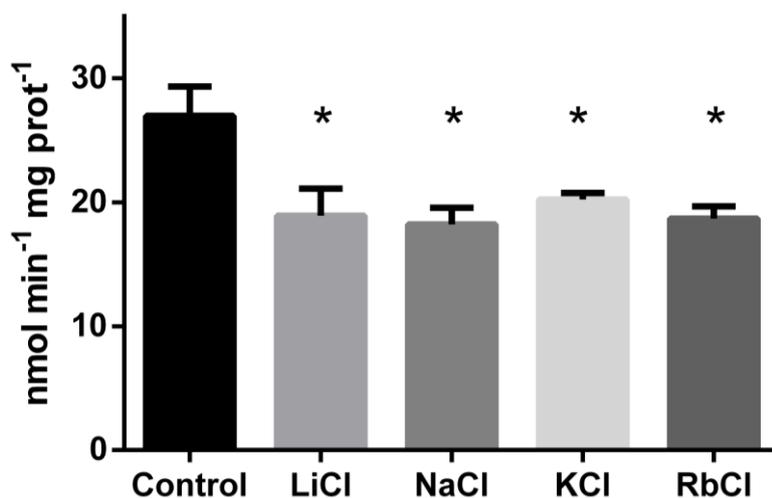


Figura 11.- Efecto de diferentes cationes monovalentes sobre la actividad NADH deshidrogenasa del complejo I usando piruvato-malato como sustrato. Medio de reacción: Tris-HCl (50 mM) pH 7.5, DCPIP (80 μ M) y NAD⁺ (200 μ M). Sustrato piruvato-malato (625 μ M). Concentración de membranas mitocondriales 0.1 mg/mL. Se adicionó flavona (500 μ M) y cianuro (100 μ M) para inhibir la NADH deshidrogenasa alterna y el complejo IV, respectivamente. Concentración de sales 100 mM. n = 3. Los datos se expresan como el promedio \pm DS ANOVA de una sola vía (Prueba de múltiples comparaciones de Tukey). * $p < 0.05$ comparado con el control.

6.4.- Efectos de cationes monovalentes sobre el complejo II, succinato-ubiquinona óxido-reductasa

Aparentemente, el incremento parece no ser atribuible al complejo I. Por lo que el efecto activador observado por K⁺ y Rb⁺, usando piruvato-malato como sustrato, podría ser a nivel del complejo III₂ o IV. Como tanto el complejo I y el complejo II donan los electrones a la poza de quinonas, si la activación fuera a nivel de los complejos III₂ o IV se mantendría sin importar el origen de los electrones.

Por esta razón, se cuantificó el consumo de oxígeno utilizando succinato, el sustrato del complejo II. Se adicionó rotenona, para inhibir al complejo I y evitar la transferencia de electrones en sentido contrario (Hirst y Roessler, 2016). A diferencia de lo observado al usar un sustrato del complejo I, cualquiera de las sales empleadas ocasionó una inhibición en el consumo de oxígeno (70-80%), tanto en el estado III como el IV (Tabla 3), con respecto al control sin cationes monovalentes.

Tabla 3.- Efecto de diferentes cationes monovalentes sobre el consumo de oxígeno y control respiratorio (CII + CIII₂ + CIV) de mitocondrias aisladas de *Debaryomyces hansenii*

	Consumo de oxígeno (natgO/mg prot*min)		
	Estado IV	Estado III	CR
Pi 10 mM	250.26 ± 33	292.93 ± 40.93	1.16 ± 0.01
+ LiCl 100 mM	69.46 ± 24.29 *	76.13 ± 31.41 *	1.08 ± 0.13
+ NaCl 100 mM	50.4 ± 7 *	57.06 ± 11.17 *	1.12 ± 0.07
+ KCl 100 mM	76.66 ± 17.25 *	84.66 ± 20.86 *	1.1 ± 0.09
+ RbCl 100 mM	72 ± 14.23 *	93.33 ± 34.2 *	1.24 ± 0.18

Medio de reacción: sorbitol (1 M), maleato (10 mM) pH 6.8 (Tris), fosfato (Pi) 10 mM succinato (5 mM) como sustrato. Se adicionó rotenona (50 µM) para inhibir el complejo I. El control respiratorio es el cociente entre los estados III/IV. El estado III se indujo al adicionar ADP (500 µM). Concentración de mitocondrias 0.5 mg/mL. n = 3. Los datos se expresan como el promedio ± DS. ANOVA de una sola vía (Prueba de múltiples comparaciones de Tukey). * $p < 0.05$ comparado con el control.

Por lo tanto, los cationes monovalentes inhibieron el consumo de oxígeno dependiente del complejo II. Al usar succinato se obtuvo un efecto contrario con lo obtenido al usar piruvato-malato. Por lo tanto, no se puede descartar que el fenómeno de activación pueda ocurrir a nivel de los complejos III₂ o IV.

6.5.- Efectos de cationes monovalentes sobre el complejo IV, citocromo c oxidasa

Para evaluar específicamente el efecto de los cationes monovalentes sobre el complejo IV, se cuantificó exclusivamente el consumo de oxígeno por el complejo IV. Como sustrato respiratorio se utilizó TMPD, que en presencia de ascorbato, puede donar electrones al citocromo c, que es posteriormente oxidado por el complejo IV. Se adicionó antimicina A para inhibir al complejo III₂.

Los diferentes cationes monovalentes no ocasionaron ninguna diferencia en la tasa de consumo de oxígeno (Tabla 4). Para confirmar lo anterior, se evaluó la actividad citocromo c oxidasa en membranas de mitocondria, midiendo la oxidación del citocromo c. Similar al consumo de oxígeno, no se apreció una diferencia en la actividad enzimática del complejo IV (Figura 12).

Basado en lo anterior, los cationes monovalentes no tiene efecto sobre la actividad del complejo IV.

Tabla 4.- Efecto de diferentes cationes monovalentes sobre el consumo de oxígeno y control respiratorio (CIV) de mitocondrias aisladas de *Debaryomyces hansenii*

	Consumo de oxígeno (natgO/mg prot*min)		
	Estado IV	Estado III	CR
Pi 10 mM	254.93 ± 24.9	252.26±40.64	0.98 ± 0.06
+ LiCl 100 mM	311.6 ± 40.32	336.93 ± 70.87	1.07 ± 0.092
+ NaCl 100 mM	279.73 ± 5.46	291.73 ± 10.63	1.04 ± 0.058
+ KCl 100 mM	314.4 ± 25.2	367.73 ± 44.4	1.18 ± 0.23
+ RbCl 100 mM	316.8 ± 10.82	318.13 ± 6	0.995 ± 0.062

Medio de reacción: sorbitol (1 M), maleato (10 mM) pH 6.8 (Tris), fosfato (Pi) 10 mM y TMPD (0.1 mM) más ascorbato (0.4 mM) como sustrato. Se adicionó antimicina A (5 µM) para inhibir el complejo III₂. El control respiratorio es el cociente entre los estados III/IV. El estado III se indujo al adicionar ADP (500 µM). Concentración de mitocondrias 0.5 mg/mL. n = 3. Los datos se expresan como el promedio ± DS. ANOVA de una sola vía (Prueba de múltiples comparaciones de Tukey).* p < 0.05 comparado con el control.

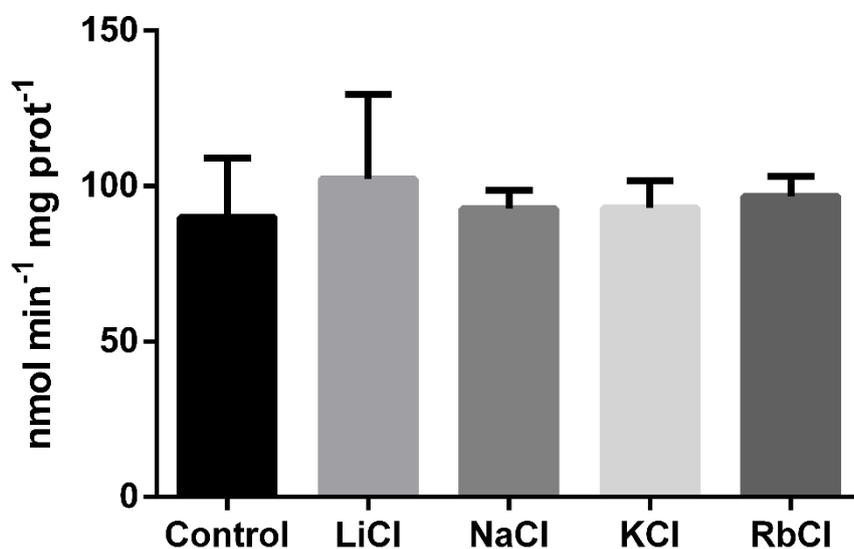


Figura 12.- Efecto de diferentes cationes monovalentes sobre la actividad de la citocromo c oxidasa. Medio de reacción: Tris-HCl 50 mM pH 7.5. Sustrato citocromo c reducido con ditionita (30 µM). Concentración de membranas de mitocondrias 0.1 mg/mL. Se adicionó antimicina A (5 µM) para inhibir el complejo III₂. Concentración de sales 100 mM. n = 3. Los datos se expresan como el promedio ± DS. ANOVA de una sola vía (Prueba de múltiples comparaciones de Tukey).* p < 0.05 comparado con el control sin sal.

6.6.- Efectos de cationes monovalentes sobre el complejo III₂, ubiquinona-citocromo c óxido-reductasa.

Debido a que los complejos I y IV no parecen ser afectados por los cationes monovalentes, el complejo III₂ podría ser la razón del mayor consumo de oxígeno al emplear piruvato-malato como sustrato. Tanto el complejo I y II, donan sus electrones a la poza de quinonas, por lo que, si el complejo III₂ se activara, sería independiente del sustrato respiratorio inicial. Cómo el complejo II se inhibió por los cationes monovalentes, una alternativa para evaluar indirectamente el complejo III₂, es el evaluar el consumo de oxígeno alimentando la NADH deshidrogenasa externa, que también dona sus electrones a la poza de quinonas. Si el consumo de oxígeno se mantiene igual, tanto el complejo III₂ como la NADH deshidrogenasa no se verían afectados por los cationes monovalentes. Por otro lado, si el consumo de oxígeno aumenta, el complejo III₂, la NADH deshidrogenasa externa o ambos componentes se ven activados por las sales.

Se determinó el consumo de oxígeno utilizando NADH, que es oxidado por la NADH deshidrogenasa alterna de la mitocondria de *D. hansenii* (Tabla 5), empleando rotenona para evitar la oxidación del NADH por el complejo I. Ninguna de las sales tuvo efecto en el consumo de oxígeno, lo que sugiere que el complejo III₂ no se activa por la adición de los cationes monovalentes.

Tabla 5.- Efecto de diferentes cationes monovalentes sobre el consumo de oxígeno (NDH2e + CIII₂ + CIV) de mitocondrias aisladas de *Debaryomyces hansenii*

	Consumo de oxígeno (natgO/mg prot*min)
Pi 10 mM	642.66 ± 107.15
+ LiCl 100 mM	644.53 ± 115.9
+ NaCl 100 mM	564 ± 69.02
+ KCl 100 mM	648.66 ± 117.41
+ RbCl 100 mM	615.2 ± 53.38

Medio de reacción: sorbitol (1 M), maleato (10 mM) pH 6.8 (Tris), fosfato (Pi) 10 mM y NADH (100 µM). Se adicionó rotenona (50 µM) para inhibir el complejo I. Concentración de mitocondrias 0.1 mg/mL. n= 3. Los datos se expresan como el promedio ± DS. ANOVA de una sola vía (Prueba de múltiples comparaciones de Tukey). * $p < 0.05$ comparado con el control.

Por lo tanto, los complejos I, II, III₂ y IV, además de la NADH deshidrogenasa externa, no son afectados por los cationes monovalentes. Adicionalmente, la poza de quinona también puede ser oxidada por la oxidasa alterna. Sin embargo, la expresión en la fase logarítmica de la AOX es baja y el consumo de oxígeno residual al emplear cianuro fue el mismo en presencia o ausencia de algún catión monovalente, por lo que la activación por K⁺ y Rb⁺ parece ser por la vía citocrómica. En las condiciones empleadas, la glicerol fosfato deshidrogenasa no participaría en el consumo de oxígeno, por lo que no fue evaluada, sin embargo no se descarta su posible activación por los cationes monovalentes.

6.7.- El posible efecto del transporte de potasio sobre la fosforilación oxidativa

Debido a que no se apreciaron cambios en la actividad de ningún componente conocido de la cadena respiratoria de *D. hansenii*, el incremento del consumo de oxígeno no se debe a un efecto directo sobre los complejos respiratorios. Un posible efecto indirecto que tendría la adición del K⁺ es su transporte a la matriz mitocondrial que podría ser responsable del incremento en el consumo de oxígeno. Por lo tanto, incubar las mitocondrias con el catión

provocaría con el paso del tiempo el gradiente de potasio disminuya y desaparezca su efecto sobre el consumo de oxígeno.

Así que se incubó las mitocondrias en la cámara del oxímetro con la misma concentración de KCl a diferentes periodos de tiempo (0, 5, 10 o 20 min) y se adicionó piruvato-malato para iniciar la reacción (Tiempo final de incubación de todas las preparaciones 20 min) (Tabla 6).

En comparación con el consumo de oxígeno en ausencia de incubación de las mitocondrias (Tabla 2), la tasa de consumo de oxígeno disminuyó cuando se incubó a las mitocondrias por un periodo prologando antes de adicionar el sustrato (Tabla 6). Esta disminución posiblemente se deba a las condiciones del ensayo (en agitación y a 30°C por 20 min), que pudieron haber causado un daño mecánico en la integridad de las mitocondrias.

En tiempos cortos de incubación (0, 5 o 10 min) con KCl todavía se observó un aumento (40-64%) en el consumo de oxígeno comparado con las condiciones donde se incubó solamente con fosfato. En contraste, con un tiempo largo de incubación ($t = 20$ min) no se observó el incremento en el consumo de oxígeno, incluso se observó una ligera reducción de la tasa de consumo de oxígeno con respecto al control sin KCl.

En este periodo de tiempo la concentración de K^+ en la matriz mitocondrial y en el medio de respiración estarían cercanas al equilibrio. Posiblemente si se utiliza un inhibidor del transporte de potasio, como la quinina, se pueda preservar la activación de la cadena respiratoria a tiempos prolongados de incubación. Antes de poder concluir sobre el efecto del transporte de potasio sobre el incremento del consumo de oxígeno, se debe descartar que el fenómeno se deba un daño en la integridad de las mitocondrias. Ya hemos diseñado experimentos para descartar daño mitocondrial, como incubar a las mitocondrias en el oxímetro y adicionar después de diferentes periodos el KCl y el sustrato juntos. Estos ensayos se deben repetir para comprobar su validez ($n=1$).

Tabla 6.- Efecto de la incubación del ion K⁺ sobre el consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas de *Debaryomyces hansenii*.

	Consumo de oxígeno (natgO/mg prot*min)		
	Estado IV	Estado III	CR
Pi 10 mM (20 min)	38.8	74.8	1.92
+ KCl 100mM (0 min)	55.8	87.88	1.57
+ KCl 100mM (5 min)	64.8	112.8	1.74
+ KCl 100mM (10 min)	64.32	108.32	1.68
+ KCl 100mM (20 min)	31.24	51.24	1.64

Medio de reacción: sorbitol (1 M), maleato 10 mM pH 6.8 (Tris), fosfato (Pi) 10 mM y piruvato-malato (10 mM) como sustrato. El control respiratorio es el cociente entre los estados III/IV. El estado III se indujo al adicionar ADP (500 µM). Concentración de mitocondrias 0.5 mg/mL. n = 1.

7. DISCUSIÓN

En la naturaleza, *D. hansenii* se halla de manera ubicua en ambientes marinos y cuerpos de agua hipersalinos, como las salinas (Breuer y Harms, 2006; Kandasamy et al., 2012). En el mar, esta levadura está expuesta a altas concentraciones de NaCl (0.6 M) y en menor medida a KCl (10 mM) (Cabrera-Orefice et al., 2010). Para poder sobrevivir a estas condiciones, *D. hansenii* desarrolló mecanismos de adaptación tales como la síntesis de solutos compatibles (Adler y Gustafsson, 1980; González-Hernández et al., 2005) y la expulsión de los cationes de su citoplasma (Thomé-Ortiz et al., 1998). Sin embargo, estos procesos son energéticamente costosos para la célula (Oren, 1999). Como levadura Crabtree-negativa, *D. hansenii* sintetiza ATP principalmente por la fosforilación oxidativa (Pfeiffer y Morley, 2014). Por lo tanto, se ha sugerido que sus mitocondrias están especialmente adaptadas para funcionar en las altas concentraciones de cationes acumuladas en su citoplasma (Cabrera-Orefice et al., 2010).

Previamente se reportó en mitocondrias de *D. hansenii* incubadas a bajas concentraciones de fosfato, que el K⁺ y Na⁺ aumentan el control respiratorio y el potencial transmembranal, debido al cierre del PTP (Cabrera-Orefice et al., 2010). Sin embargo, en este trabajo el efecto de acoplamiento no fue observado en presencia del ion sodio (Tabla 1). Asimismo, a altas concentraciones de Pi (PTP cerrado), la adición de K⁺ y Na⁺ no incrementó el consumo de oxígeno (Tabla 2) a diferencia de lo previamente reportado (Cabrera-Orefice et al., 2010).

La diferente respuesta a los iones monovalentes puede deberse a la utilización de distintas fuentes de carbono del medio de cultivo, ya que en este trabajo se empleó glucosa en lugar de lactato. La glucosa es metabolizada en piruvato por la glucólisis, que posteriormente puede ser reducido en etanol en el citosol o ingresar a la mitocondria para producir acetil-CoA (Pfeiffer y Morley, 2014). A pesar de que *D. hansenii* tiene un metabolismo aerobio obligado, una porción de la glucosa es fermentada en etanol (Sánchez et al., 2006). Por otro lado, en *S. cerevisiae*, el lactato es oxidado en piruvato por una lactato deshidrogenasa mitocondrial, donando los electrones al citocromo c (Lodi y

Ferrero, 1993). Se ha identificado en el genoma de *D. hansenii* la presencia del gen de una lactato deshidrogenasa mitocondrial (Cholet et al., 2007), por lo que el catabolismo de lactato podría ser similar.

La adaptación a las diferentes fuentes de carbono es principalmente transcripcional, ocasionando una reprogramación de diversas rutas metabólicas como el metabolismo del carbono, síntesis de proteínas y almacenamiento de carbohidratos (Turcotte et al., 2010). Este fenómeno también ocurre en levaduras Crabtree-negativa, como *Yarrowia lipolytica* y *Kluyveromyces lactis* (Weinhandl et al., 2014). Por lo tanto, es necesario establecer si esta diferencia en la estimulación del consumo de oxígeno es por la fuente de carbono.

El aumento en el consumo de oxígeno de mitocondrias de *D. hansenii* sólo fue observado en presencia de los iones K^+ y Rb^+ , empleando piruvato-malato como sustrato respiratorio (Tabla 2). El hecho de que el efecto difirió respecto al metal alcalino usado, indica que el fenómeno no depende de la fuerza iónica de la solución. La razón por la cual los iones Li^+ y Na^+ no afectan el consumo de oxígeno, a diferencia de los iones K^+ y Rb^+ , puede atribuirse al tamaño iónico de los diferentes cationes lo que alteraría su interacción con proteínas (radio iónico hidratado de 0.36 nm y 0.33 nm para el Na^+ y K^+ , respectivamente) (Israelachvili, 2011), o la presencia de transportadores específicos.

Se considera que las concentraciones del ion K^+ en la matriz mitocondrial y el citosol son similares, siendo el potencial transmembranal el que impulsa su ingreso a la matriz mitocondrial (Laskowski et al., 2016). Se usó una concentración de iones monovalentes menor o cercana a la concentración de K^+ fisiológico (108-153 mM) (González-Hernández et al., 2004). Durante el proceso de aislamiento las mitocondrias en un medio sin K^+ ocasiona la salida de este catión por el intercambiador K^+/H^+ (Garlid, 1980). A diferencia del transportador K^+/H^+ en mamíferos, en *S. cerevisiae* este transportador funciona en condiciones no energéticas y se puede activar de manera espontánea (Manon y Guérin, 1993; Welihinda et al., 1993), por lo que las mitocondrias obtenidas posiblemente tengan una menor concentración de K^+ que en condiciones fisiológicas.

El incremento del consumo de oxígeno en respuesta a cationes monovalentes se ha observado en otros organismos. Por ejemplo, en mitocondrias de brotes de trigo, la adición de NaCl incrementa el consumo de oxígeno empleando NADH, sin embargo fue inhibida al usar malato, piruvato, succinato o glutamato (Jacoby et al., 2016). Esta estimulación se observó también al usar ascorbato+TMPD como sustrato o al inhibir a la AOX (Jacoby et al., 2016). Por otro lado, en mitocondrias de la planta halófila *Mesembryanthemum crystallinum* L, la incubación con NaCl incrementa la síntesis de ATP (Tran et al., 2020). La concentración de NaCl requerida para obtener una mayor síntesis de ATP depende la cantidad de la sal presente durante el cultivo, lo que indica que la exposición a la sal afecta la sensibilidad de la mitocondria a la misma (Tran et al., 2020).

En mitocondrias aisladas de *D. hansenii* el incremento del consumo de oxígeno se observó al utilizar piruvato-malato como sustrato respiratorio (Tabla 2). Por lo tanto, se decidió evaluar la actividad de cada complejo respiratorio individualmente para ubicar el sitio donde ocurre la estimulación. No hubo incremento en el consumo de oxígeno al usar un sustrato de la NADH deshidrogenasa alterna (Tabla 5) o del complejo IV (TMPD-ascorbato) (Tabla 4) como sustratos respiratorios, lo que indica que no son estimulados por los cationes monovalentes empleados. Se puede considerar que el complejo III₂ no se ve afectado por los metales alcalinos, ya que tanto el complejo I como la NADH deshidrogenasa alterna donan los electrones a la poza de quinonas, por lo que, si fuera a nivel de complejo III₂, el efecto se observaría independientemente si se oxida el NADH en la cara interna o externa de la membrana interna mitocondrial.

Adicionalmente, los cationes monovalentes inhibieron el consumo de oxígeno al emplear succinato como sustrato, indicando que el complejo II se ve afectado de manera negativa (Tabla 3). En modelos de isquemia reperfusión, se ha ligado la inhibición del complejo II a la apertura del canal de potasio sensible a ATP, así como inhibidores de este transportador estimulan la actividad del complejo II (Wojtovich y Brookes, 2008). Por otro lado, en mitocondrias de un cultivo primario de células endoteliales de aorta bovina, la adición de NaCl disminuyó el consumo de oxígeno dependiente del CII, sin

afectar a la respiración dependiente de CI y CIV(Hernansanz-Agustín et al., 2020). Adicionalmente, el Na^+ inhibió la actividad succinato:citocromo c reductasa (CII+CIII₂), pero no afectaba la actividad NADH: citocromo c reductasa (CI+CIII₂) en membranas de mitocondria (Hernansanz-Agustín et al., 2020). Se propone que la interacción del Na^+ con los fosfolípidos alteran la fluidez de la membrana interna mitocondrial, disminuyendo la difusión de la ubiquinona (Hernansanz-Agustín et al., 2020). A diferencia del CII, los complejos I, III₂ y IV se asocian en supercomplejos, por lo no se afectarían por la disminución de la difusión de la ubiquinona (Hernansanz-Agustín et al., 2020).

Basado en lo anterior, se propuso que la activación ocurría a nivel del complejo I, por lo que se evaluó la actividad NADH:citocromo c reductasa (Figura 9) y NADH deshidrogenasa (Figura 10) del complejo I en presencia de los cationes monovalentes (100 mM). Sin embargo, no se observó ningún incremento en su actividad por los diferentes cationes.

Considerando lo anterior, el efecto de los cationes monovalentes sobre la actividad de los complejos respiratorios depende del componente de la cadena respiratoria (Figura 13). El consumo de oxígeno se ve aumentado por K^+ o Rb^+ usando piruvato-malato como sustrato, por lo que se esperaría que la activación se de a nivel de los complejo I, III₂ o IV. Sin embargo, al evaluar su actividad de manera individual no se observó cambios. Adicionalmente, la AOX y la NADH deshidrogenasa externa tampoco se ven alteradas por la adición de las sales. Caso contrario, el complejo II se ve inhibido por las sales.

Como los componentes de la cadena respiratoria no se vieron afectados por los cationes monovalentes, se consideró la posibilidad de que el efecto estimulador se debiera a un aumento en la producción de NADH por las deshidrogenasas del ciclo de Krebs, lo que explicaría que solo se aprecia el aumento en el consumo de oxígeno empleando piruvato-malato. Previamente, en mitocondrias de hígado de rata, se describió que las deshidrogenasas del ciclo de Krebs son activadas por el ion Ca^{2+} (Denton et al., 1980). Asimismo, el complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) de la corteza renal porcina, incrementa su actividad (12-42%) al adicionar 80 mM de KCl y NaCl dependiendo de la fuerza iónica del medio (Pawelczyk et al., 1992). En

mitocondrias de brotes de trigo, el NaCl (150 mM) disminuye la actividad de los complejos piruvato deshidrogenasa y oxoglutarato deshidrogenasa, mientras que no tiene efecto sobre la malato deshidrogenasa (Che-Othman et al., 2020). Por consiguiente, se determinó indirectamente la actividad de las deshidrogenasas productoras de NADH del ciclo de Krebs. El piruvato es oxidado por el complejo piruvato deshidrogenasa produciendo acetil-CoA, mientras que el malato se oxida en oxaloacetato por la malato deshidrogenasa mitocondrial (Gnaiger, 2014). Ambas reacciones producen NADH, que posteriormente dona sus electrones al DCPIP por medio del complejo I. Sin embargo, no se observó aumento en la actividad NADH deshidrogenasa por ningún catión monovalente (Figura 11), lo que descarta una activación a nivel de estas dos deshidrogenasas.

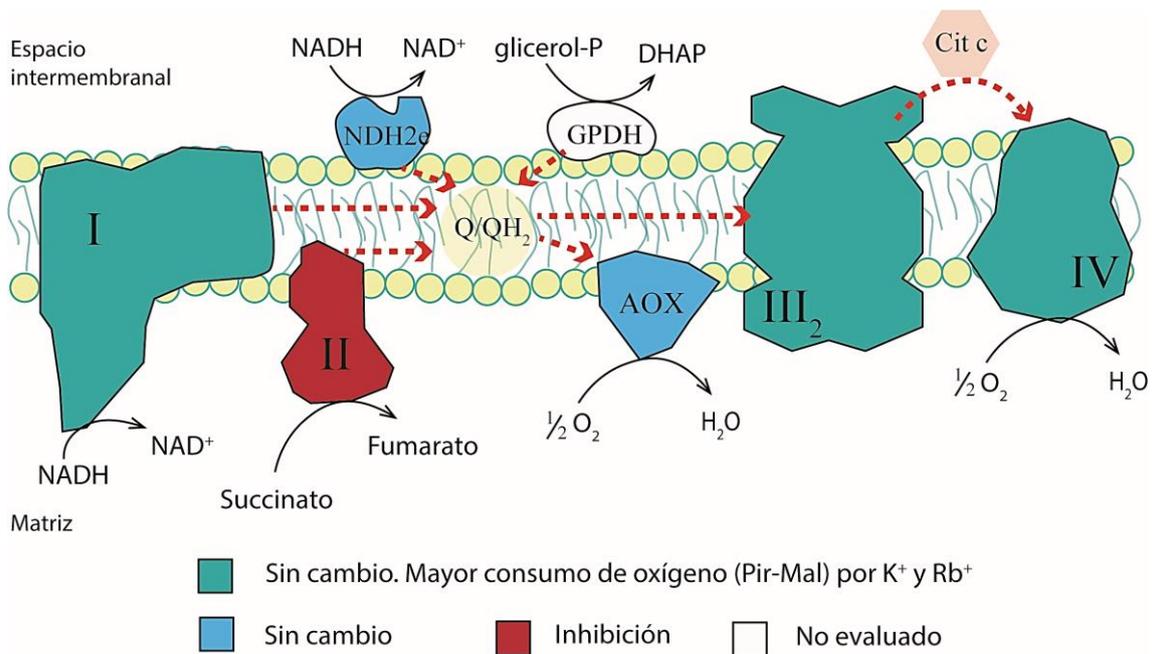


Figura 13.- Efecto de los cationes monovalentes sobre la actividad de los componentes de la cadena respiratoria de *D. hansenii*. El complejo II se inhibe por todas las sales empleadas (rojo). La actividad de las oxidorreductas alternas, NDH₂ y AOX, no se altera por ninguna sal (azul). La actividad de los complejos I, III₂ y IV no se ve alterada, pero el consumo de oxígeno cuando incrementa al usar piruvato-malato como sustrato en presencia solo de K⁺ y Rb⁺. La actividad de la glicerol fosfato deshidrogenasa no se fue evaluada.

Debido a que ningún componente individual de la cadena respiratoria parece ser el responsable del aumento de consumo de oxígeno en respuesta al potasio, se consideró que el transporte de potasio puede ser el responsable (Tabla 6). Preliminarmente, se encontró que, a un mayor tiempo de incubación

(20 min), se pierde el aumento de la tasa de consumo de oxígeno. Esto se puede deber a que el gradiente de concentración del potasio se haya disipado al ingresar a la matriz mitocondrial.

Se considera que el ingreso de K^+ hacia la matriz mitocondrial es impulsado por el $\Delta\psi$, por un mecanismo electroforético (Paggio et al., 2019). En *S. cerevisiae*, el KCl incrementa también el consumo de oxígeno, sin embargo el potencial transmembranal disminuye (Manon et al., 1995). Este fenómeno depende de la concentración de P_i (Castrejón et al., 1997), por lo que se ha especulado que se debe a que el intercambio K^+/H^+ sobrepasa al simporte $H^+:P_i$ ocasionando la apertura del poro de transición de la permeabilidad (Bradshaw y Pfeiffer, 2013). Similarmente, la activación de un canal de potasio de alta conductancia activado por el calcio mitocondrial de células endoteliales, aumentó el consumo de oxígeno en condiciones no fosforilantes sumado a la disminución del potencial transmembranal y de la síntesis de ATP (Bednarczyk et al., 2013). Por otro lado, en mitocondrias de cotiledones de chícharos, la alta concentración extramitocondrial de potasio resulta en menor fosforilación de ADP (Hamman y Spencer, 1977). Sin embargo, en el caso de las mitocondrias de *D. hansenii* se mantiene un potencial transmembranal al incubarse con K^+ y Rb^+ (Figura 8), por lo que el proceso no es electroforético.

A un alto $\Delta\psi$, el paso de electrones por la cadena respiratoria se ralentiza, provocando la acumulación de intermediarios reducidos, como la semiquinona, que posteriormente reaccionan produciendo ROS (Cadenas, 2018). Por lo tanto, la disminución del $\Delta\psi$ en respuesta al ingreso de potasio a la matriz mitocondrial, se considera un mecanismo que pudiera para evitar la producción de ROS, al incrementar el flujo de electrones (Laskowski et al., 2016). *D. hansenii* tiene otros mecanismos de desacoplamiento fisiológico, como la apertura del PTP (Cabrera-Orefice et al., 2010), la expresión de AOX (García-Neto et al., 2017) y la disminución de NAD^+ en la matriz mitocondrial durante la fase estacionaria (Cabrera-Orefice et al., 2014b). Posiblemente, debido a su constante exposición a condiciones salinas, en *D. hansenii* el desacoplamiento que ocurriría al ingresar el K^+ a la matriz mitocondrial no sea muy eficiente, por lo que desarrolló mecanismos alternativos para disminuir su producción de ROS. Otra posibilidad es que este fenómeno sea dependiente

de la fase de crecimiento, por ejemplo, que en la fase estacionaria donde se requiere mantener mayor consumo de oxígeno para evitar la sobreproducción de ROS (Guerrero-Castillo et al., 2012), se active el transporte de potasio. Por consiguiente, se debe evaluar si se preserva el fenómeno de activación en distintas fases del crecimiento.

La incubación de las mitocondrias a un medio con altas concentraciones de sales equivaldría fisiológicamente, al aumento del ingreso de los iones al interior de la célula por difusión pasiva, almacenándose en el citosol (González-Hernández et al., 2004). Para poder expulsar los cationes parcialmente y poder modificar los patrones en la expresión de proteínas para la síntesis de solutos compatibles, la levadura requiere mayor producción de ATP (Oren, 1999). Previamente se ha reportado que en la fase estacionaria, tanto la fermentación y la respiración incrementan durante el crecimiento en condiciones de hipersalinidad (Calahorra et al., 2009; Sánchez et al., 2008). El gradiente que se forma entre la concentración de los cationes entre el citosol y la matriz mitocondrial podría ser una estrategia para sintetizar rápidamente el ATP, requerido para los mecanismos adaptativos activados por cascadas de señalización, y para expulsar parcialmente los cationes al medio extracelular. Sin embargo, falta establecer que este incremento en el consumo de oxígeno este acoplado a una mayor síntesis de ATP.

8. CONCLUSIONES

Los iones K^+ y Rb^+ aumentan la tasa de consumo de oxígeno tanto en estado III como IV de la mitocondria de *D. hansenii*, cuando se utiliza piruvato-malato como sustrato.

Los cationes monovalentes tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad del complejo II.

La estimulación del consumo de oxígeno no se debe al efecto directo sobre los complejos respiratorios ni sobre componentes alternos de la cadena respiratoria.

9. PERSPECTIVAS

Debido a que la sensibilidad a los cationes monovalente fue diferente cuando se empleó glucosa en lugar de lactato (Cabrera-Orefice et al., 2010), es necesario establecer si este fenómeno depende de la fuente de carbono.

Como la expresión de algunos elementos de la cadena respiratoria y los sistemas de desacoplamiento varían acorde a las distintas fases de crecimiento (Cabrera-Orefice et al., 2014b, 2014a), la activación por K^+ podría variar de manera similar. Por lo tanto, se debe establecer si la estimulación se preserva durante la fase estacionaria.

Similarmente, la expresión de la AOX varía si se cultivan las levaduras con NaCl, KCl, sorbitol o sin un agente osmótico (Garcia-Neto et al., 2017). Por consiguiente, se debe determinar si el mecanismo de activación es intrínseco o en respuesta a un estímulo osmótico.

Corroborar la inhibición del complejo II por un ensayo enzimático (succinato deshidrogenasa y succinato:citocromo c reductasa). Determinar si el efecto inhibitorio se debe a un cambio en la fluidez de la membrana interna mitocondrial, como lo observado en cultivos celulares (Hernansanz-Agustín et al., 2020).

Relacionar el flujo de potasio con la aceleración de la fosforilación oxidativa, utilizando inhibidores de transporte de potasio como la quinina o la glibenclamida.

-10. REFERENCIAS

- Abrahams, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R., Walker, J.E., 1994. Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370, 621–628. <https://doi.org/10.1038/370621a0>
- Adler, L., Gustafsson, L., 1980. Polyhydric alcohol production and intracellular amino acid pool in relation to halotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Arch. Microbiol.* 124, 123–130. <https://doi.org/10.1007/BF00427716>
- Aggarwal, M., Mondal, A.K., 2009. *Debaryomyces hansenii*: An osmotolerant and halotolerant yeast, en: *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Springer Netherlands, pp. 65–84. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8292-4_4
- Akerman, K.E., Wikström, M.K., 1976. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.* 68, 191–7.
- Almagro, A., Prista, C., Castro, S., Quintas, C., Madeira-Lopes, A., Ramos, J., Loureiro-Dias, M.C., 2000. Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 56, 191–197. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00220-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00220-8)
- Bednarczyk, P., Koziel, A., Jarmuszkiewicz, W., Szewczyk, A., 2013. Large-conductance Ca²⁺-activated potassium channel in mitochondria of endothelial EA.hy926 cells. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 304, H1415–H1427. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00976.2012>
- Bernardi, P., Rasola, A., Forte, M., Lippe, G., 2015. The mitochondrial permeability transition pore: Channel formation by F-ATP synthase, integration in signal transduction, and role in pathophysiology. *Physiol. Rev.* 95, 1111–1155. <https://doi.org/10.1152/physrev.00001.2015>
- Berthold, D.A., 1998. Isolation of mutants of the *Arabidopsis thaliana* alternative oxidase (ubiquinol: oxygen oxidoreductase) resistant to salicylhydroxamic acid. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1364, 73–83. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00015-2)

- Bezawork-Geleta, A., Rohlena, J., Dong, L., Pacak, K., Neuzil, J., 2017. Mitochondrial Complex II: At the Crossroads. *Trends Biochem. Sci.* 42, 312–325. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.003>
- Boyer, P.D., 1997. The ATP synthase—A splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 717–749. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.717>
- Boyer, P.D., 1975. A model for conformational coupling of membrane potential and proton translocation to ATP synthesis and to active transport. *FEBS Lett.* 58, 1–6. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(75\)80212-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(75)80212-2)
- Bradshaw, P.C., Pfeiffer, D.R., 2013. Characterization of the respiration-induced yeast mitochondrial permeability transition pore. *Yeast* 30, 471–483. <https://doi.org/10.1002/yea.2984>
- Brandt, U., 2011. A two-state stabilization-change mechanism for proton-pumping complex i, en: *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. Elsevier, pp. 1364–1369. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.04.006>
- Breuer, U., Harms, H., 2006. *Debaryomyces hansenii* - An extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*. <https://doi.org/10.1002/yea.1374>
- Büschges, R., Bahrenberg, G., Zimmermann, M., Wolf, K., 1994. NADH: Ubiquinone oxidoreductase in obligate aerobic yeasts. *Yeast* 10, 475–479. <https://doi.org/10.1002/yea.320100406>
- Cabrera-Orefice, A., Chiquete-Félix, N., Espinasa-Jaramillo, J., Rosas-Lemus, M., Guerrero-Castillo, S., Peña, A., Uribe-Carvajal, S., 2014a. The branched mitochondrial respiratory chain from *Debaryomyces hansenii*: Components and supramolecular organization. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1837, 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.07.011>
- Cabrera-Orefice, A., Guerrero-Castillo, S., Díaz-Ruiz, R., Uribe-Carvajal, S., 2014b. Oxidative phosphorylation in *Debaryomyces hansenii*: Physiological uncoupling at different growth phases. *Biochimie* 102, 124–136. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.03.003>
- Cabrera-Orefice, A., Guerrero-Castillo, S., Luévano-Martínez, L.A., Peña, A.,

- Uribe-Carvajal, S., 2010. Mitochondria from the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* (halophilic organelles?). *J. Bioenerg. Biomembr.* 42, 11–19. <https://doi.org/10.1007/s10863-009-9264-0>
- Cadenas, S., 2018. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1859, 940–950. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2018.05.019>
- Calahorra, M., Sánchez, N.S., Peña, A., 2009. Activation of fermentation by salts in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res.* 9, 1293–1301. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00556.x>
- Calvo, S.E., Mootha, V.K., 2010. The Mitochondrial Proteome and Human Disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 11, 25–44. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082509-141720>
- Castrejón, V., Parra, C., Moreno, R., Peña, A., Uribe, S., 1997. Potassium collapses the δP in yeast mitochondria while the rate of ATP synthesis is inhibited only partially: Modulation by phosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* 346, 37–44. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0273>
- Cecchini, G., 2003. Function and Structure of Complex II of the Respiratory Chain. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 77–109. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161700>
- Che-Othman, M.H., Jacoby, R.P., Millar, A.H., Taylor, N.L., 2020. Wheat mitochondrial respiration shifts from the tricarboxylic acid cycle to the GABA shunt under salt stress. *New Phytol.* 225, 1166–1180. <https://doi.org/10.1111/nph.15713>
- Cholet, O., Hénaut, A., Casaregola, S., Bonnarne, P., 2007. Gene Expression and Biochemical Analysis of Cheese-Ripening Yeasts: Focus on Catabolism of L-Methionine, Lactate, and Lactose. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2561–2570. <https://doi.org/10.1128/AEM.02720-06>
- Crofts, A.R., Holland, J.T., Victoria, D., Kolling, D.R.J., Dikanov, S.A., Gilbreth, R., Lhee, S., Kuras, R., Kuras, M.G., 2008. The Q-cycle reviewed: How well does a monomeric mechanism of the bc1 complex account for the function of a dimeric complex? *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*

<https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2008.04.037>

- Davidson, A.M., Halestrap, A.P., 1990. Partial inhibition by cyclosporin A of the swelling of liver mitochondria in vivo and in vitro induced by sub-micromolar $[Ca^{2+}]$, but not by butyrate. Evidence for two distinct swelling mechanisms. *Biochem. J.* 268, 147–152. <https://doi.org/10.1042/bj2680147>
- de Vries, S., Grivell, L.A., 1988. Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH: Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 176, 377–384. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14292.x>
- de Vries, S., Marres, C.A.M., 1987. The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *BBA Rev. Bioenerg.* 895, 205–239. [https://doi.org/10.1016/S0304-4173\(87\)80003-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4173(87)80003-4)
- Dennis, P.P., Shimmin, L.C., 1997. Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 90–104. <https://doi.org/10.1128/.61.1.90-104.1997>
- Denton, R.M., McCormack, J.G., Edgell, N.J., 1980. Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism. Effects of Na^+ , Mg^{2+} and ruthenium red on the Ca^{2+} -stimulated oxidation of oxoglutarate and on pyruvate dehydrogenase activity in intact rat heart mi. *Biochem. J.* 190, 107–117. <https://doi.org/10.1042/bj1900107>
- Devenish, R.J., Prescott, M., Boyle, G.M., Nagley, P., 2000. The oligomycin axis of mitochondrial ATP synthase: OSCP and the proton channel. *J. Bioenerg. Biomembr.* <https://doi.org/10.1023/A:1005621125812>
- Distler, A.M., Kerner, J., Hoppel, C.L., 2008. Proteomics of mitochondrial inner and outer membranes. *Proteomics* 8, 4066–4082. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800102>
- Dittrich, M., Hayashi, S., Schulten, K., 2003. On the mechanism of ATP hydrolysis in F1-ATPase. *Biophys. J.* 85, 2253–2266. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74650-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74650-5)

- Efremov, R.G., Sazanov, L.A., 2011. Structure of the membrane domain of respiratory complex I. *Nature* 476, 414–421. <https://doi.org/10.1038/nature10330>
- Esser, L., Quinn, B., Li, Y.F., Zhang, M., Elberry, M., Yu, L., Yu, C.A., Xia, D., 2004. Crystallographic studies of quinol oxidation site inhibitors: A modified classification of inhibitors for the cytochrome bc₁ complex. *J. Mol. Biol.* 341, 281–302. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.065>
- Fernandez-Vizarra, E., Zeviani, M., 2018. Mitochondrial complex III Rieske Fe-S protein processing and assembly. *Cell Cycle* 17, 681–687. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1417707>
- Fillingame, R.H., Angevine, C.M., Dmitriev, O.Y., 2002. Coupling proton movements to c-ring rotation in F₁F_o ATP synthase: Aqueous access channels and helix rotations at the a-c interface. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1555, 29–36. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(02\)00250-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(02)00250-5)
- Friedman, J.R., Nunnari, J., 2014. Mitochondrial form and function. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature12985>
- García-Guerrero, A.E., Camacho-Villasana, Y., Zamudio-Ochoa, A., Winge, D.R., Pérez-Martínez, X., 2018. Cbp3 and Cbp6 are dispensable for synthesis regulation of cytochrome b in yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 293, 5585–5599. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000547>
- Garcia-Neto, W., Cabrera-Orefice, A., Uribe-Carvajal, S., Kowaltowski, A.J., Luévano-Martínez, L.A., 2017. High osmolarity environments activate the mitochondrial alternative oxidase in *Debaryomyces hansenii*. *PLoS One* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169621>
- Garlid, K.D., 1980. On the Mechanism of Regulation of the Mitochondrial K⁺/H⁺ Exchanger, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*.
- Garlid, K.D., Paucek, P., 2003. Mitochondrial potassium transport: The K⁺ cycle. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1606, 23–41. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(03\)00108-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(03)00108-7)
- Gnaiger, E., 2014. Mitochondrial Pathways to Complex I: Respiration with

- Pyruvate, Glutamate and Malate, en: Mitochondrial pathways and respiratory control. An introduction to OXPHOS analysis. pp. 1–9.
- González-Hernández, J.C., Cárdenas-Monroy, C.A., Peña, A., 2004. Sodium and potassium transport in the halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* 21, 403–412. <https://doi.org/10.1002/yea.1108>
- González-Hernández, J.C., Jiménez-Estrada, M., Peña, A., 2005. Comparative analysis of trehalose production by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under saline stress. *Extremophiles* 9, 7–16. <https://doi.org/10.1007/s00792-004-0415-2>
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M., 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177, 751–66.
- Guérin, B., Bunoust, O., Rouqueys, V., Rigoulet, M., 1994. ATP-induced Unspecific Channel in Yeast Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 269, 25406–10.
- Guerrero-Castillo, S., Araiza-Olivera, D., Cabrera-Orefice, A., Espinasa-Jaramillo, J., Gutiérrez-Aguilar, M., Luévano-Martínez, L.A., Zepeda-Bastida, A., Uribe-Carvajal, S., 2011. Physiological uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation. Studies in different yeast species. *J. Bioenerg. Biomembr.* 43, 323–331. <https://doi.org/10.1007/s10863-011-9356-5>
- Guerrero-Castillo, S., Cabrera-Orefice, A., Vázquez-Acevedo, M., González-Halphen, D., Uribe-Carvajal, S., 2012. During the stationary growth phase, *Yarrowia lipolytica* prevents the overproduction of reactive oxygen species by activating an uncoupled mitochondrial respiratory pathway. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1817, 353–362. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.11.007>
- Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A., Oren, A., 2018. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiol. Rev.* 42. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/femsre/fuy009>
- Gustafsson, C.M., Falkenberg, M., Larsson, N.-G., 2016. Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Biochem.* 85,

- 133–160. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014402>
- Gustafsson, L., Norkrans, B., 1976. On the mechanism of salt tolerance - Production of glycerol and heat during growth of *Debaryomyces hansenii*. Arch. Microbiol. 110, 177–183. <https://doi.org/10.1007/BF00690226>
- Hägerhäll, C., 1997. Succinate: Quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. 1320, 107–141. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(97\)00019-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(97)00019-4)
- Hahn, A., Vonck, J., Mills, D.J., Meier, T., Kühlbrandt, W., 2018. Structure, mechanism, and regulation of the chloroplast ATP synthase. Science (80-.). 360. <https://doi.org/10.1126/science.aat4318>
- Hamman, W.M., Spencer, M., 1977. Relationship of potassium ion transport and ATP synthesis in pea cotyledon mitochondria. Can. J. Biochem. 55, 376–383. <https://doi.org/10.1139/o77-052>
- Henderson, P.J.F., 2018. Membrane Transport: Energetics and Overview, en: Encyclopedia of Biophysics. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–13. https://doi.org/10.1007/978-3-642-35943-9_809-1
- Hernansanz-Agustín, P., Choya-Foces, C., Carregal-Romero, S., Ramos, E., Oliva, T., Villa-Piña, T., Moreno, L., Izquierdo-Álvarez, A., Cabrera-García, J.D., Cortés, A., Lechuga-Vieco, A.V., Jadiya, P., Navarro, E., Parada, E., Palomino-Antolín, A., Tello, D., Acín-Pérez, R., Rodríguez-Aguilera, J.C., Navas, P., Cogolludo, Á., López-Montero, I., Martínez-del-Pozo, Á., Egea, J., López, M.G., Elrod, J.W., Ruíz-Cabello, J., Bogdanova, A., Enríquez, J.A., Martínez-Ruiz, A., 2020. Na⁺ controls hypoxic signalling by the mitochondrial respiratory chain. Nature 1–5. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2551-y>
- Herrera, R., Salazar, A., Ramos-Moreno, L., Ruiz-Roldan, C., Ramos, J., 2017. Vacuolar control of subcellular cation distribution is a key parameter in the adaptation of *Debaryomyces hansenii* to high salt concentrations. Fungal Genet. Biol. 100, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.02.002>
- Hirst, J., 2013. Mitochondrial Complex I. Annu. Rev. Biochem. 82, 551–575. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-070511-103700>

- Hirst, J., 2010. Towards the molecular mechanism of respiratory complex I. *Biochem. J.* <https://doi.org/10.1042/BJ20091382>
- Hirst, J., Roessler, M.M., 2016. Energy conversion, redox catalysis and generation of reactive oxygen species by respiratory complex I. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1857, 872–883. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.12.009>
- Hofhaus, G., Weiss, H., Leonard, K., 1991. Electron microscopic analysis of the peripheral and membrane parts of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). *J. Mol. Biol.* 221, 1027–1043. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)80190-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)80190-6)
- Hunte, C., Palsdottir, H., Trumpower, B.L., 2003. Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc₁ complex. *FEBS Lett.* [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00391-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00391-0)
- Hunter, D.R., Haworth, R.A., Southard, A.H., 1976. Relationship between Configuration, Function, and Permeability in Calcium-treated Mitochondria", *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*.
- Israelachvili, J.N., 2011. Interactions Involving Polar Molecules, en: Israelachvili, J.N. (Ed.), *Intermolecular and Surface Forces (Third Edition)*. Academic Press, pp. 71–90. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375182-9.10004-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375182-9.10004-1).
- Jacoby, R.P., Che-Othman, M.H., Millar, A.H., Taylor, N.L., 2016. Analysis of the sodium chloride-dependent respiratory kinetics of wheat mitochondria reveals differential effects on phosphorylating and non-phosphorylating electron transport pathways. *Plant. Cell Environ.* 39, 823–833. <https://doi.org/10.1111/pce.12653>
- Jadhav, K., Kushwah, B., Jadhav, I., 2018. Insight into compatible solutes from halophiles: Exploring significant applications in biotechnology, en: *Microbial Bioprospecting for Sustainable Development*. Springer Singapore, pp. 291–307. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0053-0_16
- Junge, W., Nelson, N., 2015. ATP Synthase. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034124>

- Kadenbach, B., 2003. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1604, 77–94.
- Kalnenieks, U., Balodite, E., Rutkis, R., 2019. Metabolic Engineering of Bacterial Respiration: High vs. Low P/O and the Case of *Zymomonas mobilis*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00327>
- Kandasamy, K., Alikunhi, N.M., Subramanian, M., 2012. Yeasts in marine and estuarine environments. *J. Yeast Fungal Res.* 3, 74–82. <https://doi.org/10.5897/JYFR12.003>
- Kandori, H., Inoue, K., Tsunoda, S.P., 2018. Light-Driven Sodium-Pumping Rhodopsin: A New Concept of Active Transport. *Chem. Rev.* 118, 10646–10658. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00548>
- Kempf, B., Bremer, E., 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* 170, 319–330. <https://doi.org/10.1007/s002030050649>
- Kerscher, S., Dröse, S., Zickermann, V., Brandt, U., 2008. The three families of respiratory NADH dehydrogenases. *Results Probl. Cell Differ.* https://doi.org/10.1007/400_2007_028
- Kerscher, S.J., Okun, J.G., Brandt, U., 1999. A Single External Enzyme Confers Alternative NADH:ubiquinone Oxidoreductase Activity in *Yarrowia lipolytica*. *J. Cell Sci.* 112, 2347–54.
- Kim, Y., Nguyen, T.-T.T., Churchill, D.G., 2016. Bioinorganic Chemistry of the Alkali Metal Ions. pp. 1–10. https://doi.org/10.1007/978-3-319-21756-7_1
- Kivistö, A.T., Karp, M.T., 2011. Halophilic anaerobic fermentative bacteria. *J. Biotechnol.* 152, 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.08.014>
- Kluckova, K., Bezawork-Geleta, A., Rohlena, J., Dong, L., Neuzil, J., 2013. Mitochondrial complex II, a novel target for anti-cancer agents. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.10.015>
- Krammer, E.-M., Vu, G.T., Homblé, F., Prévost, M., 2015. Dual Mechanism of Ion Permeation through VDAC Revealed with Inorganic Phosphate Ions and Phosphate Metabolites. *PLoS One* 10, e0121746.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121746>

- Kühlbrandt, W., 2016. Three in a row—how sodium ions cross the channel. *EMBO J.* 35, 793–795. <https://doi.org/10.15252/embj.201694094>
- Kühlbrandt, W., 2015. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol.* <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0201-x>
- Kushner, D.J., 1986. Molecular adaptation of enzymes, metabolic systems and transport systems in halophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 39, 121–127. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(86\)90070-4](https://doi.org/10.1016/0378-1097(86)90070-4)
- Larsson, C., Gustafsson, L., 1987. Glycerol production in relation to the ATP pool and heat production rate of the yeasts *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* during salt stress. *Arch. Microbiol.* 147, 358–363. <https://doi.org/10.1007/BF00406133>
- Laskowski, M., Augustynek, B., Kulawiak, B., Koprowski, P., Bednarczyk, P., Jarmuszkiewicz, W., Szewczyk, A., 2016. What do we not know about mitochondrial potassium channels? *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1857, 1247–1257. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.03.007>
- Ling, G.N., 1981. Oxidative phosphorylation and mitochondrial physiology: a critical review of chemiosmotic theory, and reinterpretation by the association-induction hypothesis. *Physiol. Chem. Phys.* 13, 29–96.
- Lodi, T., Ferrero, I., 1993. Isolation of the DLD gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding the mitochondrial enzyme D-lactate ferricytochrome c oxidoreductase. *MGG Mol. Gen. Genet.* 238, 315–324. <https://doi.org/10.1007/BF00291989>
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J., 2000. Transport across Cell Membranes, en: *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman, New York, pp. 633–664.
- Manon, S., Guérin, M., 1993. Evidence for three different electrophoretic pathways in yeast mitochondria: Ion specificity and inhibitor sensitivity. *J. Bioenerg. Biomembr.* 25, 671–678. <https://doi.org/10.1007/BF00770253>
- Manon, S., Roucou, X., Rigoulet, M., Guérin, M., 1995. Stimulation of oxidative

- phosphorylation by electrophoretic K^+ entry associated to electroneutral K^+/H^+ exchange in yeast mitochondria. *BBA - Bioenerg.* 1231, 282–288. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(95\)00088-Z](https://doi.org/10.1016/0005-2728(95)00088-Z)
- Martin, W.F., Garg, S., Zimorski, V., 2015. Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0330>
- Maxwell, D.P., Wang, Y., McIntosh, L., 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 8271–8276. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.8271>
- McGenity, T.J., Oren, A., 2012. Hypersaline environments, en: *Life at Extremes: Environments, Organisms and Strategies for Survival*. CABI Publishing, pp. 402–437. <https://doi.org/10.1079/9781845938147.0402>
- Mitchell, P., 1985. Molecular mechanics of protonmotive F_0F_1 ATPases. Rolling well and turnstile hypothesis. *FEBS Lett.* 182, 1–7. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)81142-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)81142-X)
- Mitchell, P., 1975. The protonmotive Q cycle: A general formulation. *FEBS Lett.* [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(75\)80359-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(75)80359-0)
- Mitchell, P., 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144–148. <https://doi.org/10.1038/191144a0>
- Mitchell, P., Moyle, J., 1969. Translocation of some Anions Cations and Acids in Rat Liver Mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 9, 149–155. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1969.tb00588.x>
- Morelli, A.M., Ravera, S., Calzia, D., Panfoli, I., 2019. An update of the chemiosmotic theory as suggested by possible proton currents inside the coupling membrane. *Open Biol.* 9. <https://doi.org/10.1098/rsob.180221>
- Murai, M., Miyoshi, H., 2016. Current topics on inhibitors of respiratory complex i. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1857, 884–891. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.11.009>
- Nakashima, R.A., Garlid, K.D., 1982. Quinine Inhibition of Na^+ and K^+

- Transport Provides Evidence for Two Cation/H⁺ Exchangers in Rat Liver Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 257, 9252–9254.
- Nicholls, D.G., Ferguson, S.J. (Stuart J., 2002. *Bioenergetics 3*, 3rd Edition. ed. Academic Press.
- Okuno, D., Iino, R., Noji, H., 2011. JB Review Rotation and structure of F₀F₁-ATP synthase. <https://doi.org/10.1093/jb/mvr049>
- Olz, R., Larsson, K., Adler, L., Gustafsson, L., 1993. Energy flux and osmoregulation of *Saccharomyces cerevisiae* grown in chemostats under NaCl stress. *J. Bacteriol.* 175, 2205–2213. <https://doi.org/10.1128/jb.175.8.2205-2213.1993>
- Oren, A., 2013. Life at high salt concentrations, en: *The Prokaryotes: Prokaryotic Communities and Ecophysiology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 421–440. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30123-0_57
- Oren, A., 1999. Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 334–348. <https://doi.org/10.1128/membr.63.2.334-348.1999>
- Osellame, L.D., Blacker, T.S., Duchon, M.R., 2012. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 26, 711–723. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2012.05.003>
- Paggio, A., Checchetto, V., Campo, A., Menabò, R., Di Marco, G., Di Lisa, F., Szabo, I., Rizzuto, R., De Stefani, D., 2019. Identification of an ATP-sensitive potassium channel in mitochondria. *Nature* 572, 609–613. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1498-3>
- Pawelczyk, T., Easom, R.A., Olson, M.S., 1992. Effect of ionic strength and pH on the activity of pyruvate dehydrogenase complex from pig kidney cortex. *Arch. Biochem. Biophys.* 294, 44–49. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90134-I](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90134-I)
- Pérez-Vázquez, V., Saavedra-Molina, A., Uribe, S., 2003. In *Saccharomyces cerevisiae*, Cations Control the Fate of the Energy Derived from Oxidative Metabolism Through the Opening and Closing of the Yeast Mitochondrial Unselective Channel. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35, 231–241.

<https://doi.org/10.1023/A:1024659615022>

- Persson, I., 2010. Hydrated metal ions in aqueous solution: How regular are their structures? *Pure Appl. Chem.* 82, 1910–1917.
- Pesta, D., Gnaiger, E., 2012. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods Mol. Biol.* 810, 25–58. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0_3
- Pfeiffer, T., Morley, A., 2014. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Front. Mol. Biosci.* 1. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00017>
- Prista, C., Loureiro-Dias, M.C., Montiel, V., García, R., Ramos, J., 2005. Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res.* <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.12.009>
- Ripple, M.O., Kim, N., Springett, R., 2013. Mammalian complex I pumps 4 protons per 2 electrons at high and physiological proton motive force in living cells. *J. Biol. Chem.* 288, 5374–5380. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.438945>
- Robinson, J.D., 1997. Oxidative Phosphorylation: Chemical-Coupling Hypothesis, en: *Moving Questions*. Springer New York, pp. 247–260. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7600-9_16
- Rogov, A.G., Zvyagilskaya, R.A., 2015. Physiological role of alternative oxidase (from yeasts to plants). *Biochem.* 80, 400–407. <https://doi.org/10.1134/S0006297915040021>
- Ruprecht, J.J., Kunji, E.R.S., 2020. The SLC25 Mitochondrial Carrier Family: Structure and Mechanism. *Trends Biochem. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.11.001>
- Sánchez, N.S., Arreguín, R., Calahorra, M., Peña, A., 2008. Effects of salts on aerobic metabolism of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res.* 8, 1303–1312. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00426.x>
- Sánchez, N.S., Calahorra, M., González-Hernández, J.C., Peña, A., 2006. Glycolytic sequence and respiration of *Debaryomyces hansenii* as

- compared to *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23, 361–374.
<https://doi.org/10.1002/yea.1360>
- Schultz, B.E., Chan, S.I., 2001. Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*
<https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.30.1.23>
- Schwitzguebel, J.P., Palmer, J.M., 1982. Properties of mitochondria as a function of the growth stages of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 149, 612–619. <https://doi.org/10.1128/jb.149.2.612-619.1982>
- Shimada, S., Shinzawa-Itoh, K., Baba, J., Aoe, S., Shimada, A., Yamashita, E., Kang, J., Tateno, M., Yoshikawa, S., Tsukihara, T., 2017. Complex structure of cytochrome *c*–cytochrome *c* oxidase reveals a novel protein–protein interaction mode. *EMBO J.* 36, 291–300.
<https://doi.org/10.15252/emj.201695021>
- Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R.K.O., 2016. The Alkali Metal Ions: their Role for Life. Preface to Volume 16. *Met. Ions Life Sci.* 16, vii–xi.
- Slater, E.C., 1953. Mechanism of phosphorylation in the respiratory chain. *Nature* 172, 975–978. <https://doi.org/10.1038/172975a0>
- Spinazzi, M., Casarin, A., Pertegato, V., Salviati, L., Angelini, C., 2012. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat. Protoc.* 7, 1235–1246.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2012.058>
- Stehling, O., Lill, R., 2013. The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis: Mechanisms, connected processes, and diseases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011312>
- Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M., Rao, Z., 2005. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein Complex II. *Cell* 121, 1043–1057. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.025>
- Sweetman, C., Waterman, C.D., Rainbird, B.M., Smith, P.M.C., Jenkins, C.D., Day, D.A., Soolea, K.L., 2019. Atndb2 is the main external NADH dehydrogenase in mitochondria and is important for tolerance to

- environmental stress. *Plant Physiol.* 181, 774–788.
<https://doi.org/10.1104/pp.19.00877>
- Thomé-Ortiz, P.E., Peña, A., Ramírez, J., 1998. Monovalent cation fluxes and physiological changes of *Debaryomyces hansenii* grown at high concentrations of KCl and NaCl. *Yeast* 14, 1355–1371.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199811\)14:15<1355::AID-YEA331>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199811)14:15<1355::AID-YEA331>3.0.CO;2-0)
- Tran, D.Q., Konishi, A., Morokuma, M., Toyota, M., Agarie, S., 2020. NaCl-stimulated ATP synthesis in mitochondria of a halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Prod. Sci.* 23, 129–135.
<https://doi.org/10.1080/1343943X.2019.1682462>
- Trumpower, B., 1990. The protonmotive Q cycle. *J. Biol. Chem.* 265, 11409–11412. <https://doi.org/10.3109/10409239409086800>
- Turcotte, B., Liang, X.B., Robert, F., Soontorngun, N., 2010. Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. *FEMS Yeast Res.* <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00555.x>
- Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
- Uribe, S., Ramirez, J., Peña, A., 1985. Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. *J. Bacteriol.* 161, 1195–1200.
- Vanlerberghe, G.C., 2013. Alternative oxidase: A mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms14046805>
- Vanlerberghe, G.C., Vanlerberghe, A.E., McIntosh, L., 1997. Molecular genetic evidence of the ability of alternative oxidase to support respiratory carbon metabolism. *Plant Physiol.* 113, 657–661.
<https://doi.org/10.1104/pp.113.2.657>
- Vašák, M., Schnabl, J., 2016. Sodium and Potassium Ions in Proteins and Enzyme Catalysis. Springer, Cham, pp. 259–290.

https://doi.org/10.1007/978-3-319-21756-7_8

- Veiga, A., Arrabaça, J.D., Sansonetty, F., Ludovico, P., Côrte-Real, M., Loureiro-Dias, M.C., 2003. Energy conversion coupled to cyanide-resistant respiration in the yeasts *Pichia membranifaciens* and *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res.* 3, 141–148. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00189-7](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00189-7)
- Ventosa, A., Nieto, J.J., Oren, A., 1998. Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 504–544. <https://doi.org/10.1128/membr.62.2.504-544.1998>
- Villalobo, A., Briquet, M., Goffeau, A., 1981. Electrogenic proton ejection coupled to electron transport through the energy-conserving site 2 and K⁺/H⁺ exchange in yeast mitochondria. *BBA - Bioenerg.* 637, 124–129. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(81\)90217-6](https://doi.org/10.1016/0005-2728(81)90217-6)
- von Jagow, G., Klingenberg, M., 1970. Pathways of Hydrogen in Mitochondria of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Eur. J. Biochem.* 12, 583–592. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1970.tb00890.x>
- Wagner, A.M., Krab, K., Wagner, M.J., Moore, A.L., 2008. Regulation of thermogenesis in flowering Araceae: The role of the alternative oxidase. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1777, 993–1000. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.04.001>
- Walker, J.E., 2013. The ATP synthase: The understood, the uncertain and the unknown. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 1–16. <https://doi.org/10.1042/BST20110773>
- Walker, J.E., 1992. The Nadh: Ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Q. Rev. Biophys.* 25, 253–324. <https://doi.org/10.1017/S003358350000425X>
- Way, J., Leung, P., Cannon, E., ... R.M.-C.F., 1988, U., 1984. The mechanism of cyanide intoxication and its antagonism. Wiley Online Libr.
- Weinhandl, K., Winkler, M., Glieder, A., Camattari, A., 2014. Carbon source dependent promoters in yeasts. *Microb. Cell Fact.*

<https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-5>

- Weinisch, L., Kühner, S., Roth, R., Grimm, M., Roth, T., Netz, D.J.A., Pierik, A.J., Filker, S., 2018. Identification of osmoadaptive strategies in the halophile, heterotrophic ciliate *Schmidingerothrix salinarum*. PLoS Biol. 16. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003892>
- Welihinda, A.A., Trumbly, R.J., Garlid, K.D., Beavis, A.D., 1993. On the regulation of Na⁺/H⁺ and K⁺/H⁺ antiport in yeast mitochondria: Evidence for the absence of an Na⁺-selective Na⁺/H⁺ antiporter. BBA - Bioenerg. 1144, 367–373. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(93\)90122-V](https://doi.org/10.1016/0005-2728(93)90122-V)
- Wikström, M., Sharma, V., 2018. Proton pumping by cytochrome c oxidase – A 40 year anniversary. Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.03.009>
- Wikstrom, M.K.F., 1977. Proton pump coupled to cytochrome c oxidase in mitochondria [24]. Nature 266, 271–273. <https://doi.org/10.1038/266271a0>
- Wirth, C., Brandt, U., Hunte, C., Zickermann, V., 2016. Structure and function of mitochondrial complex i. Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. 1857, 902–914. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.02.013>
- Wohlrab, H., 2009. Transport proteins (carriers) of mitochondria. IUBMB Life 61, 40–46. <https://doi.org/10.1002/iub.139>
- Wojtovich, A.P., Brookes, P.S., 2008. The endogenous mitochondrial complex II inhibitor malonate regulates mitochondrial ATP-sensitive potassium channels: Implications for ischemic preconditioning. Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. 1777, 882–889. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.03.025>
- Wrent, P., Rivas, E.M., Gil de Prado, E., Peinado, J.M., de Silóniz, M.I., 2014. Debaryomyces, en: Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition. Elsevier Inc., pp. 563–570. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00081-1>
- Yip, C.Y., Harbour, M.E., Jayawardena, K., Fearnley, I.M., Sazanov, L.A., 2011. Evolution of respiratory complex I “Supernumerary” subunits are present in the α-proteobacterial enzyme. J. Biol. Chem. 286, 5023–5033.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.194993>

Yoshida, M., Muneyuki, E., Hisabori, T., 2001. ATP synthase - A marvellous rotary engine of the cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
<https://doi.org/10.1038/35089509>

Zhao, R.Z., Jiang, S., Zhang, L., Yu, Z. Bin, 2019. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int. J. Mol. Med.*
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>

Zhou, Y., Morais-Cabral, J.H., Kaufman, A., MacKinnon, R., 2001. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel–Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414, 43–48. <https://doi.org/10.1038/35102009>

Zhu, J., Vinothkumar, K.R., Hirst, J., 2016. Structure of mammalian respiratory complex i. *Nature* 536, 354–358. <https://doi.org/10.1038/nature19095>