

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE QUIMICA**

**Control del metabolismo mitocondrial de *Yarrowia lipolytica*.  
Papel de la oxidasa alterna y efecto de iones inorgánicos.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS  
P R E S E N T A :**

**Sergio Guerrero Castillo**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Jurado asignado

Presidente	<b>Rosa María Ramírez Gama</b>
Vocal	<b>Homero Hernández Montes</b>
Secretario	<b>Salvador Uribe Carvajal</b>
1 <sup>er</sup> Suplente	<b>Jorge Manuel Vázquez Ramos</b>
2 <sup>o</sup> Suplente	<b>Irma Ofelia Bernal Lugo</b>

## Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 305-orientado, Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, 04510 México, DF, México.

## Asesor de tesis:

Dr. Salvador Uribe Carvajal

## Supervisor técnico:

M. en C. Andrés Rojas Hernández

## Sustentante:

Sergio Guerrero Castillo

## Abreviaturas

ANT	translocador de adenin nucleótidos
AOX	oxidasa alterna
$\Delta\Psi$	potencial transmembranal
C.R.	control respiratorio
DOC	desoxicolato de sodio
FCCP	carbonil <i>p</i> -(triflurometoxi) fenilhidrazona
MES	ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
$O_2^{\bullet-}$	radical superóxido
Pi	fosfato inorgánico
PTP	poro de transición de la permeabilidad
ROS	especies reactivas de oxígeno
SHAM	ácido salicilhidroxámico
TEA	trietanolamina
UQ	ubiquinona
UQH <sub>2</sub>	ubiquinol
UQ $^{\bullet-}$	ubisemiquinona
UCP	proteína desacoplante
UDO	unidades de densidad óptica
VDAC	canal de aniones dependiente de voltaje
YD	extracto de levadura/dextrosa
YMUC	canal inespecífico mitocondrial de levadura
YNB	Yeast/Nitrogen Base
YPD	extracto de levadura/peptona/dextrosa

## CONTENIDO

	Pag.
1. Resumen	4
2. Introducción	
2.1 Cadenas respiratorias en diferentes organismos	5
2.2 La transición de la permeabilidad mitocondrial	14
2.3 La proteína desacoplante (UCP)	16
2.4 La detoxificación de electrones en la cadena respiratoria mediante un ciclo fútil.	17
2.5 Hongos dimórficos	19
2.6 <i>Yarrowia lipolytica</i> como sistema de estudio	20
3. Objetivos	23
4. Hipótesis	24
5. Metodología	25
6. Resultados	
6.1 <i>Efecto del medio de cultivo sobre la formación de micelio y sobre el crecimiento de Yarrowia lipolytica.</i>	30
6.2 <i>Aislamiento y caracterización de la cadena respiratoria de mitocondrias acopladas de Yarrowia lipolytica.</i>	33
6.3 <i>Evaluación de sustratos respiratorios. Respiración y <math>\Delta\Psi</math>.</i>	34
6.4 La oxidasa alterna (AOX)	38
6.5 <i>Efecto del fosfato sobre la respiración y el potencial transmembranal.</i>	40
7. Discusión	45
8. Conclusiones	55
9. Bibliografía	56

## RESUMEN

*Yarrowia lipolytica* es un ascomiceto dimórfico que contiene componentes alternos en su cadena respiratoria como en la mayoría de los hongos y plantas; posee una NADH deshidrogenasa externa y una oxidasa alterna, AOX (Barth y Gaillardin (1997); Kerscher y cols., 1999). En *Y. lipolytica* no se ha descrito un poro de transición de la permeabilidad mitocondrial como los que se han reportado en mitocondrias de mamíferos (PTP) o de *S. cerevisiae* (YMUC) (Bernardi y Petronilli, 1996; Manon y cols., 1998). Estos poros son regulados de diferentes formas por moléculas como el ATP, el Pi y el Ca<sup>2+</sup>. En este trabajo se estudiaron los efectos del fosfato y del calcio sobre la respiración y el potencial transmembranal ( $\Delta\Psi$ ) de mitocondrias aisladas de *Yarrowia lipolytica*. No se detectó un canal inespecífico análogo al PTP. Asimismo, se estudió la captación de Ca<sup>2+</sup> por las mitocondrias aisladas de *Y. lipolytica*. El Pi y el Ca<sup>2+</sup> no presentaron ningún efecto sobre la transición de la permeabilidad mitocondrial en las condiciones probadas, no se identificó un canal inespecífico. Por otro lado, la coexistencia de la NADH deshidrogenada externa y la oxidasa alterna posiblemente provean de un sistema de disipación de energía alternativo al poro de transición.

## INTRODUCCIÓN

### ***Cadenas respiratorias en diferentes organismos.***

En todos los organismos aerobios se lleva a cabo un proceso denominado fosforilación oxidativa que consiste en la producción de ATP a partir de la oxidación de diferentes sustratos orgánicos. Durante este proceso, los electrones son transportados a través de una serie de complejos multiproteicos, en un proceso acoplado a un transporte vectorial de protones a través de la membrana. El resultante gradiente de protones o fuerza protón-motriz es utilizado para la fosforilación del ADP (Hatefi y *co/s.*, 1962). En contraste con las células procariotes, en las cuales la fosforilación oxidativa se lleva a cabo en la membrana plasmática, en las células eucariotes, los complejos multiproteicos encargados del transporte de electrones se encuentran embebidos en la membrana interna de las mitocondrias. El transporte de electrones desde sustratos orgánicos hasta el oxígeno molecular, es catalizado por cuatro tipos de enzimas óxido-reductoras. Los centros activos de estas deshidrogenasas contienen piridina, flavina, proteínas hierro-azufre o citocromos. En la cadena respiratoria también participa la coenzima Q o ubiquinona, que es una molécula no proteica y liposoluble. Algunas plantas y hongos presentan algunos componentes alternos de la cadena respiratoria, como deshidrogenasas y oxidasas involucradas en el transporte de electrones. También se observa variación en el número de unidades isoprenoides de la cadena lateral de la coenzima Q.

### *Cadena respiratoria de mamíferos.*

En la membrana interna mitocondrial, el NADH proveniente de la oxidación de diferentes sustratos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos es oxidado a  $\text{NAD}^+$  por una enzima denominada Complejo I o NADH:Ubiquinona óxido-reductasa, la cual, cataliza la transferencia de electrones del NADH a la ubiquinona para formar ubiquinol. Esta oxido-reducción está acoplada al bombeo de 4 protones a través de la membrana interna mitocondrial (Walker, 1992). Esta enzima es la más compleja de la cadena respiratoria, contribuye aproximadamente con el 40% de la fuerza protón motriz generada y está compuesta por 46 subunidades (14 subunidades centrales, y aproximadamente 32 subunidades adicionales). Siete de las subunidades centrales son codificadas por el genoma mitocondrial, y 5 de ellas contienen grupos prostéticos (Hinchliffe y Sazanov, 2005).

El transporte de electrones desde el NADH hasta la ubiquinona se lleva a cabo por medio de cofactores redox o grupos prostéticos, los cuales se encuentran unidos de modo no covalente a diferentes subunidades del complejo I. Los electrones son transportados primeramente a una flavina mononucleótido (FMN) y posteriormente pasan por siete centros hierro-azufre (Fe-S) hasta llegar al sitio de unión de la ubiquinona. Cabe mencionar que a través de los centros redox se transporta un solo electrón a la vez, lo cual aumenta el riesgo de generar radicales libres (Galkin y Brandt, 2005).

Además de su función como transportador de electrones hacia la ubiquinona, el complejo I puede llevar a cabo la reacción reversa, es decir, catalizar la reducción de  $\text{NAD}^+$  con electrones tomados de la poza de quinonas. Colateralmente, otros aceptores de electrones pueden ser reducidos, entre ellos el



oxígeno molecular, generando de este modo el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). La generación de radicales libres podría ser provocada por la oxidación de la flavina mononucleótido debido a su potencial redox negativo. Pero también se podría deber a la oxidación del centro hierro-azufre N1a, ya que es el más negativo del complejo I.

La NADH:Ubiquinona óxido-reductasa puede ser inhibida por rotenona, amital y piericidina. Esta última compite con la ubiquinona por el sitio de unión, debido a la similitud en su estructura.

El complejo II o succinato:Ubiquinona óxido-reductasa es una enzima del ciclo de Krebs, la cual se encuentra anclada a la membrana interna mitocondrial, y a diferencia de los demás complejos multiprotéicos, no es una proteína integral. Esta enzima cataliza la oxidación de succinato a fumarato, y la reducción de la ubiquinona a ubiquinol, sin translocar protones a través de la membrana interna (Lemire y Oyedotun, 2002; Hederstedt y Ohnishi, 1992). El complejo II está compuesto por cuatro subunidades, codificadas por los genes nucleares *SDHA-D*. Contiene un flavin adenin dinucleótido (FAD) como cofactor, unido covalentemente a una de las subunidades mediante un enlace entre el anillo de la isoaloxacina del FAD y un residuo de la proteína, tres centros hierro-azufre, un grupo hemo tipo *b* y dos sitios de unión a quinonas. Los electrones son transportados del succinato al FAD a través de los centros Fe-S, antes de entrar a las subunidades membranales, en donde se lleva a cabo la reducción de la quinona. El malonato es un inhibidor competitivo específico de la succinato deshidrogenasa debido a la semejanza en la estructura con el succinato.

La flavina mononucleótido del complejo I puede reducir aceptores artificiales de electrones generando de este modo radicales libres. Asimismo, en el complejo II se pueden generar especies reactivas en los sitios de unión a quinonas, mediante la generación de ubisemiquinonas ( $UQH^{\cdot-}$ ). Las  $UQH^{\cdot-}$  son necesarias para el mecanismo catalítico de la succinato deshidrogenasa y además son importantes fuentes de producción de radicales superóxido. En este mecanismo, un electrón es transportado del centro [3Fe-4S] de la subunidad Sdhb a la quinona, produciendo la ubisemiquinona. La enzima debe mantener este compuesto inestable hasta que otro electrón sea transferido para generar ubiquinol,  $UQH_2$  (Guo y Lemire, 2003).

Además de los complejos multiprotéicos, la ubiquinona participa en el transporte de electrones en la cadena respiratoria. La ubiquinona o coenzima Q es un transportador de electrones liposoluble. Esta coenzima es una quinona que está unida a una cadena lateral de diez unidades isoprenoides ( $Q_{10}$ ), su forma reducida es el ubiquinol ( $UQH_2$ ), y puede encontrarse parcialmente reducida como ubisemiquinona ( $UQH^{\cdot-}$ ). La semiquinona es una especie reactiva capaz de producir radicales superóxido. La ubiquinona puede ser reducida en sitios de unión en el complejo I y II transportando un par de electrones hacia el complejo  $bc_1$  (Trumpower, 1990). Puesto que la ubiquinona es un compuesto lipofílico, es soluble en la membrana interna mitocondrial interactuando con diferentes complejos multiproteicos de la cadena respiratoria (Osyczka y cols., 2005).

El complejo  $bc_1$  (complejo III o Ubiquinol-citocromo c óxido-reductasa) es un componente de la cadena respiratoria, el cual, cataliza la transferencia de

electrones del ubiquinol al citocromo c. Este mecanismo está acoplado a la translocación de protones de la matriz al espacio intermembranal, colaborando con la fuerza protón motriz para la síntesis de ATP (Hatefi y cols., 1962). El complejo  $bc_1$  está compuesto por once subunidades protéicas y cuatro grupos prostéticos: dos grupos hemo tipo *b* ( $b_L$  o  $b_{565}$  y  $b_H$  o  $b_{562}$ ), un grupo hemo tipo *c*, un centro hierro-azufre (2Fe-2S). El complejo III contiene un sitio de unión a ubiquinona ( $Q_i$  o  $Q_N$ ), separado de otro sitio de unión a ubiquinol ( $Q_o$  o  $Q_P$ ). El ubiquinol es oxidado en el sitio  $Q_o$  localizado cerca del lado P (positivo), es decir, más cercano al espacio intermembranal. Un electrón es transferido hacia el centro 2Fe-2S, posteriormente al citocromo  $c_1$  y por último hasta el citocromo c. La ubisemiquinona generada reduce el citocromo  $b_L$ , el cual transfiere rápidamente el electrón al citocromo  $b_H$  localizado cerca del lado N (negativo, más cercano a la matriz). Por último, el electrón es transferido del  $b_H$  a una semiquinona para generar ubiquinol o a una quinona para formar la semiquinona. El bombeo de protones está dado por la desprotonación del quinol en el sitio  $Q_o$  y la protonación de la quinona reducida en el sitio  $Q_i$ , de este modo, por cada electrón son translocados dos protones de un lado a otro de la membrana interna (Xia y cols., 1997).

El inhibidor característico del complejo III es la antimicina A, la cual bloquea el transporte de electrones del citocromo  $b_H$  a la ubiquinona. Sin embargo, el mixotiazol también inhibe la transferencia de electrones del ubiquinol al centro hierro-azufre, bloqueando el sitio de oxidación  $Q_o$ .

A diferencia del complejo I, en donde la formación de radicales superóxido se puede llevar a cabo en la matriz mitocondrial, en el complejo III la reducción de

oxígeno puede ocurrir en el lado intermembranal, ya que es en el sitio  $Q_P$  donde se generan las ubisemiquinonas, por la oxidación del ubiquinol.

El complejo IV o citocromo c oxidasa cataliza el transporte de electrones desde el citocromo c hasta el oxígeno molecular. Este complejo está compuesto por 2 monómeros iguales de 13 subunidades cada uno, 10 de ellas son codificadas por el genoma nuclear. El complejo IV contiene dos grupos hemo ( $a$  y  $a_3$ ) y dos centros de cobre ( $Cu_A$  y  $Cu_B$ ) a través de los cuales son transferidos los electrones desde el citocromo c hasta el oxígeno molecular (Iwata y cols., 1995). Las subunidades I y II son las que participan en la reacción catalítica y éstas son codificadas por el genoma mitocondrial. En la subunidad II se encuentra el centro  $Cu_A$ , localizado en un dominio extramembranal hacia el espacio intermembranal; está compuesto por dos átomos de cobre que reciben el electrón del citocromo c. El electrón es transferido a los grupos hemo  $a$  y  $a_3$  ubicados en la subunidad I y por último al sitio  $Cu_B$  en donde se lleva a cabo la reducción de media molécula de oxígeno tomando dos protones de la matriz (Wikstrom, 1998).

En la subunidad I se encuentran dos canales denominados D y K, encargados de translocar dos protones hacia el espacio intermembranal y de transportar dos protones para la formación de una molécula de agua, respectivamente (Nicholls y Ferguson, 2002). La actividad de éste complejo puede ser inhibida por cianuro, azida, CO y  $NO_2$ , los cuales bloquean el transporte de electrones desde el citocromo  $a_3$  hasta el oxígeno.

### *Cadena respiratoria de hongos*

A diferencia de los mamíferos, en donde se ha caracterizado bien el transporte de electrones del NADH hasta el oxígeno molecular siguiendo una cadena linear, la mayoría de los hongos poseen, además de los complejos respiratorios anteriormente mencionados, componentes alternos con los cuales el transporte de electrones puede seguir diferentes rutas desde el NADH (citoplásmico o mitocondrial) hasta el oxígeno (Joseph-Horne y cols., 2001). Estas rutas alternas involucran proteínas periféricas que catalizan la misma reacción que los complejos I y IV de mamíferos. Principalmente se encuentran NADH deshidrogenasas alternas, que pueden estar localizadas hacia el espacio intermembranal o hacia la matriz, permitiendo de este modo la oxidación del NADH externo (citoplásmico) sin la necesidad de involucrar procesos indirectos como la lanzadera malato-aspartato. Estas deshidrogenasas son codificadas por un solo gen nuclear, contienen un solo grupo prostético (FAD) y su actividad no es afectada por inhibidores característicos del complejo I, pero son inhibidas por flavonas (Juárez y cols., 2004).

En algunos hongos que carecen del complejo I como *S. cerevisiae*, la presencia de las deshidrogenasas alternas permite la oxidación del NADH. En las mitocondrias de *S. cerevisiae* se encuentran tres NADH-deshidrogenasas periféricas, cada una de una sola subunidad. Dos de ellas están ubicadas en la parte externa y la otra en la parte interna de la membrana interna mitocondrial (Luttik y cols.1998; Marres y cols. 1991; de Vries y cols.1992). Las NADH deshidrogenasas de *S. cerevisiae* oxidan al NADH + H<sup>+</sup>, pero esta reacción no está acoplada al bombeo de protones ya que son proteínas periféricas.

En otros hongos, como *N. crassa*, además del complejo I se observan de 3 a 4 deshidrogenasas alternas de una sola subunidad, localizadas tanto al interior (NDI) como al exterior (NDE) de la membrana interna mitocondrial (Helmerhost y cols., 2005).

Otro componente que presentan algunos hongos en su cadena respiratoria es la oxidasa alterna, la cual actúa, paralelamente al complejo bc<sub>1</sub> para oxidar el ubiquinol, transfiriendo los electrones al oxígeno (Storey, 1976). Está compuesta por una sola subunidad codificada por el genoma nuclear, aunque se puede encontrar también formando un homodímero en algunas especies; se localiza en el lado matricial de la membrana interna mitocondrial. La reacción que cataliza la oxidasa alterna no está acoplada al bombeo de protones, debido a que es una enzima periférica. Es decir, es un sistema alterno que no se encuentra acoplado a la síntesis de ATP (Moore y Siedow, 1991). Esta enzima se encuentra en la mayoría de los hongos con algunas excepciones como *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Kluyveromyces lactis*. Estas enzimas son sensibles a ácidos hidroxámicos (v.gr. ácido salicilhidroxámico, SHAM) y alquil galatos (Siedow y Umbach, 2000). Sin embargo, su actividad no es afectada por inhibidores característicos del complejo IV (Lambers, 1980).

En *Candida albicans*, se han identificado dos oxidasas alternas, AOX1a y AOX1b. A diferencia de la primera que se expresa constitutivamente en niveles bajos, esta última se expresa únicamente cuando se encuentran presentes inhibidores característicos de la respiración, y especies oxidantes. De este modo, se cree que la AOX1b confiere respiración resistente a cianuro a este organismo (Siedow y Umbach, 2000).

### *Cadena respiratoria de plantas*

Además de los complejos multiprotéicos de la cadena respiratoria encontrados en la mayoría de las mitocondrias, diversos organismos poseen componentes adicionales como NAD(P)H deshidrogenasas, oxidasas alternas y proteínas desacoplantes. Estas proteínas adicionales disipan la energía en forma de calor, ya que no bombean protones para la síntesis de ATP (Siedow y Umbach, 2000; Vanlerberghe y McIntosh, 1992; Mariano y cols., 2005). Estos componentes forman vías respiratorias alternas, que juegan un papel importante en la respuesta a estrés modulando la oxidación del ubiquinol para proteger a la mitocondria del daño producido por especies reactivas de oxígeno, ROS (Clifton y cols. 2005). La proteína desacoplante (UCP) únicamente se encuentra activa con la presencia de ROS, por lo cual se ha propuesto que puede monitorear el estado redox de la cadena transportadora de electrones (Echtay y cols., 2002).

En las mitocondrias de *Arabidopsis thaliana* se han encontrado 7 NADH deshidrogenasas, tanto internas como externas, cuya expresión se encuentra influenciada por las condiciones del medio, como la luz, hidratación, temperatura, etc. Además contiene 5 isoformas de oxidasas alternas, y dos tipos de proteínas desacoplantes. Sin embargo, la regulación de la expresión de estos componentes alternos no se ha analizado detalladamente, y se han encontrado diferencias entre algunas especies de plantas estudiadas, principalmente trigo, soya, tabaco y papa (González-Meler y cols. 1999; Laloi y cols., 1997). De igual manera que en los hongos, la función de las deshidrogenasas no se ve afectada por inhibidores como la rotenona, piericidina o amitil; tampoco las oxidasas son inhibidas por cianuro.

Pero sí son inhibidas por los mismos compuestos que afectan las vías respiratorias alternas de los hongos.

### ***La transición de la permeabilidad mitocondrial.***

En mitocondrias de mamífero, se ha observado la existencia de un canal inespecífico de alta conductancia denominado poro de transición de la permeabilidad (PTP), que probablemente está involucrado en fenómenos como la disipación de energía, la detoxificación de iones y la apoptosis (Bernardi y Petronilli, 1996; Crompton, 1999). Actualmente, se cree que el PTP mitocondrial se forma en los sitios de contacto entre la membrana externa e interna; se piensa además que el PTP está compuesto principalmente por proteínas que normalmente tienen otra función celular, como son: el canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) localizado en la membrana externa, que permite el paso de iones, sustratos y moléculas pequeñas desde el citoplasma al espacio intermembranal; el translocador de adenin nucleótidos (ANT) ubicado en la membrana interna y la ciclofilina D, que se encuentra en la matriz mitocondrial, y es la encargada del plegamiento de proteínas que son transportadas desde el citosol a la matriz. Además, dependiendo del tipo de organismo y del tejido, otras proteínas pueden encontrarse asociadas al poro como la hexocinasa o la creatina cinasa (Manon y cols., 1998).

Con el fin de evaluar la participación del VDAC, el ANT y la ciclofilina D, se han realizado diversos estudios en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ya que además de ser genéticamente manipulable, es un organismo anaerobio facultativo, por lo tanto, es capaz de crecer aún sin mitocondrias funcionales. Sin



embargo, los intentos por encontrar un poro de transición de la permeabilidad semejante al de mamífero no han sido del todo exitosos. Sí se encontró un canal inespecífico de alta conductancia, equivalente al PTP de mamífero (Jung y cols.1997) pero su regulación es diferente y en algunos casos opuesta; se le denominó canal inespecífico mitocondrial de levadura (YMUC por sus siglas en inglés) o poro de la transición de la permeabilidad de levadura (yPTP). Hasta el momento no se conocen los elementos que componen este canal.

Con respecto a la regulación de ambos canales, la apertura del PTP de mitocondrias de mamífero, es inducida por fosfato inorgánico (Pi) y  $Ca^{2+}$  (provocando la apoptosis mediante la liberación del citocromo c) e inhibida por ATP, mientras que en el YMUC se ha observado un efecto opuesto tanto del Pi como del  $Ca^{2+}$  (Manon y cols. 1998; Pérez-Vázquez y cols. 2003). En las condiciones en las que el poro se encuentra abierto, se presenta un flujo libre de iones a través de éste, provocando un abatimiento del potencial transmembranal, una aceleración en el consumo de oxígeno y un hinchamiento de las mitocondrias. Por lo cual se ha propuesto que, en condiciones de carga energética alta, el YMUC se encuentra abierto para disipar energía, regulando de este modo la síntesis de ATP. Además, la ciclosporina A, que es un inhibidor de la ciclofilina D e impide la interacción de esta proteína con el translocador de adenin nucleótidos, no tiene ningún efecto sobre este canal (Jung y cols., 1997).

### ***La proteína desacoplante (UCP).***

Las UCPs son proteínas integrales localizadas en la membrana interna mitocondrial. Estas proteínas fueron denominadas desacoplantes, debido a que la primera proteína que se encontró de esta familia (UCP<sub>1</sub>) cataliza la descarga del gradiente de protones generado por la cadena respiratoria de mitocondrias de tejido adiposo café, funcionando como un corto circuito que produce energía en forma de calor (Ricquier y Kader, 1976; Nicholls y Locke, 1984).

La fosforilación oxidativa es el proceso bioquímico, llevado a cabo en las mitocondrias, que resulta en la producción de ATP. En la cadena respiratoria, el transporte de electrones desde sustratos hasta el oxígeno molecular está acoplado a la translocación de protones a través de la membrana. La energía acumulada en el gradiente de protones es utilizada por la ATPsintasa para la fosforilación del ADP. De este modo, si la demanda celular de ATP aumenta, entonces será necesario un incremento en la rapidez de oxidación de sustratos y de bombeo de protones.

La UCP permite la entrada de protones a la matriz, desacoplando la respiración de la síntesis de ATP. De este modo, se produce un aumento en la oxidación del NADH pero disminuye la síntesis de ATP. Este mecanismo de disipación de energía es utilizado para termogénesis (Nicholls y Locke, 1984). También, así se logra mantener el balance redox o reducir los niveles de producción de especies reactivas de oxígeno (Ledesma y cols. 2002).

En mamíferos, además de la proteína desacoplante encontrada en tejido adiposo café de mamíferos (UCP<sub>1</sub>), se han encontrado otras 4 proteínas homólogas: UCP<sub>2</sub>, UCP<sub>3</sub>, UCP<sub>4</sub> y UCP<sub>5</sub>. Estas proteínas homólogas tienen pesos

moleculares entre 30 y 35 KDa y presentan 6 cruces transmembranales, con los extremos amino y carboxilo hacia el espacio intermembranal (Miroux y cols. 1993). Por otra parte, se han identificado otras proteínas homólogas en plantas, protozoarios y hongos (Jarmuszkiewicz y cols. 1999; Jarmuszkiewicz y cols. 2002; Navet y cols. 2005). En contraste con la función de la UCP<sub>1</sub> que desacopla la respiración de la síntesis de ATP para la producción de energía en forma de calor, se ha observado que la UCP<sub>2</sub>, la UCP<sub>3</sub> y algunas proteínas desacoplantes encontradas en plantas tienen una función distinta, ya que no son inducidas por bajas temperaturas. Por esta razón, se ha propuesto que estas proteínas homólogas mantienen el balance redox y limitan la producción de especies reactivas de oxígeno (Goglia y Skulachev, 2003; Ricquier y Bouillaud, 2000).

### ***La detoxificación de electrones en la cadena respiratoria mediante un ciclo futil.***

En las mitocondrias de plantas y de la mayoría de las levaduras, existe una vía alternativa a la fosforilación oxidativa. Esta ruta alternativa transfiere los electrones directamente de la poza de ubiquinol al oxígeno por medio de la oxidasa alterna (AOX), sin pasar por el complejo bc<sub>1</sub> ni por la citocromo c oxidasa (Storey, 1976). Debido a que estos componentes alternativos no translocan protones al espacio intermembranal, la oxidación de sustratos por esta vía, no está acoplada a la fosforilación del ADP (Akimenko y cols., 1979). Por esta razón, el papel que juega la oxidasa alterna en el metabolismo mitocondrial es una interrogante, de la cual, se tienen ya algunos resultados e hipótesis.

En tejidos termogénicos de algunas plantas, la oxidación de sustratos por la vía alterna produce energía en forma de calor necesaria para volatilizar compuestos que atraen insectos polinizadores (Meeuse, 1975). Sin embargo, este mecanismo no involucra microorganismos ni tejidos no termogénicos.

Posteriormente, se propuso que la vía alterna disipa un exceso de energía que permite continuar el ciclo de los ácidos tricarbónicos, independientemente de la síntesis de ATP (Lambers, 1982).

Por otra parte, la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) está ligada al transporte de electrones a través de la cadena respiratoria, particularmente en la formación de ubisemiquinona en el complejo III. Debido a que la mayoría de las especies reactivas de oxígeno actúan sobre la citocromo c oxidasa. Al disminuir la actividad del complejo IV, el flujo de electrones es más lento, incrementando los niveles de reducción de la poza de quinonas, aumentando así la formación del radical ubisemiquinona ( $UQ^{\bullet-}$ ), la vía alterna previene la formación de ROS oxidando la poza de quinonas (Popov y cols., 1997; Millenaar y cols., 1998; Veiga y cols., 2003).

Además de las funciones mencionadas, la vía alterna (respiración resistente a cianuro) puede también participar en la fosforilación oxidativa, pues, a pesar de que la oxidasa alterna no bombea protones al exterior, en presencia de sustratos que reducen al  $NAD^+$  de la matriz, el complejo I se encuentra activo. Los protones translocados por el complejo I al espacio intermembranal son utilizados para la síntesis de ATP, aunque la producción de energía en este caso sea menor (Veiga y cols., 2003). En las mitocondrias de levadura que contienen una respiración resistente a cianuro, se ha encontrado cierta correlación con la presencia de la

NADH:Ubiquinona oxido-reductasa. De 13 levaduras estudiadas que contienen una oxidasa alterna, 12 contienen también al complejo I, siendo *Picchia anomala* la única excepción (Veiga y cols.,2003). Esto indica que la vía alterna puede estar involucrada en la fosforilación oxidativa. Sin embargo, si se utilizan sustratos que donen sus electrones directamente a la ubiquinona, es decir sin estar acoplada la translocación de protones, y el ubiquinol es oxidado por la vía alterna, la oxidación de estos sustratos no produciría ATP, encontrándose en un ciclo fútil, sin producción de ATP y liberación de toda la energía como calor.

### ***Hongos dimórficos.***

El dimorfismo es la capacidad que poseen algunos hongos para crecer en forma de levadura o formando micelio, dependiendo de las condiciones del medio (Ruiz-Herrera y Sentandreu, 2002). El dimorfismo no está restringido a un grupo especial de hongos, pero las condiciones que inducen la transición dimórfica de levadura a micelio o viceversa son extremadamente variables entre especies. Las células de *Saccharomyces cerevisiae*, crecidas en medio sólido con fuentes de nitrógeno limitadas, únicamente presenta una transición de levadura a pseudohifa, es decir, cadenas lineales de células ligeramente alargadas, pero no llega a formar micelio (Gimeno y cols., 1992). En cambio, en hongos como *Candida albicans*, *Ustilago maydis* o *Yarrowia lipolytica*, entre muchos otros, sí se presenta una transición dimórfica completa.

Los factores que principalmente tienen un efecto sobre la transición dimórfica son la temperatura, el pH, las fuentes de carbono y nitrógeno, principalmente. Por ejemplo, en *C. albicans*, *Mucor rouxii*, y en *Yarrowia lipolytica*, modificaciones del

pH del medio inducen cambios en la morfología de estos organismos. Estas tres especies crecen levaduriformes en medios ácidos, mientras que un pH neutro induce la formación de hifas (Odds, 1985; Szabo, 1999).

Para poder estudiar las mitocondrias de *Yarrowia lipolytica* es necesario obtenerlas en grandes cantidades e intactas, es decir, con capacidad para sintetizar ATP. En el laboratorio se ha observado que la forma de levadura es más fácil de romper que la de micelio y por ello se decidió buscar un medio en que se cultivasen las células y se obtuviese un alto rendimiento de células levaduriformes.

### ***Yarrowia lipolytica* como sistema de estudio.**

*Yarrowia lipolytica* es un ascomiceto aerobio obligado que generalmente crece como una mezcla de células levaduriformes y micelios cortos (Ruiz-Herrera y Sentandreu, 2002). Las primeras cepas de *Y. lipolytica* fueron aisladas de alimentos con alto contenido en lípidos como el aceite de oliva, queso y otros productos lácteos. En un principio, este ascomiceto fue ubicado dentro del género *Candida*, denominado *C. lipolytica*, posteriormente se reclasificó como *Endomycolopsis lipolytica*, luego *Saccharomycolopsis lipolytica*, y actualmente se denomina *Yarrowia lipolytica*, siendo la única especie de este género (Kerscher y cols., 2002). No es un organismo patógeno debido probablemente a que no es capaz de crecer a temperaturas mayores a los 35 °C. Se ha estudiado la asimilación de diversas fuentes de carbono, ya que presenta la característica única de metabolizar hidrocarburos alifáticos, incluso alcanos polimetilados y clorados (Barth y Gaillardin, 1997).

A diferencia de *S. cerevisiae*, esta levadura contiene tanto el complejo I de la cadena respiratoria, como una NADH-deshidrogenasa alterna (NDH<sub>2</sub>), localizada en la parte externa de la membrana interna mitocondrial (Kerscher y cols.,1999). Además, la cadena lateral de la ubiquinona de *Y. lipolytica* está compuesta por 9 unidades isoprenoides (Q<sub>9</sub>), lo que contrasta con la de *S. cerevisiae* que sólo es de 6 (Q<sub>6</sub>). Como consecuencia, la cadena respiratoria de este organismo tiene una mayor similitud con la de los mamíferos que con la de *S. cerevisiae*, ya que presentan el complejo I y la ubiquinona contiene 10 unidades isoprenoides. Por otro lado, a diferencia de los mamíferos, *Y. lipolytica* presenta una oxidasa alterna (AOX) como las que se han descrito anteriormente para otras especies de hongos. La cadena transportadora de electrones de *Y. lipolytica* es parecida a las cadenas respiratorias descritas para algunas especies de hongos (por ejemplo, *Ustilago maydis*), y plantas (*Arabidopsis thaliana*), en donde se encuentra ramificado el transporte de electrones debido a la presencia de ambos componentes alternos, NDH y AOX (Juárez y cols., 2004; Siedow y cols., 2000).

No se tienen datos a cerca de la existencia de un poro de transición de la permeabilidad (PTP) mitocondrial en este organismo. Por lo tanto, el estudio del control que diversos factores como los iones inorgánicos (Pi y Ca<sup>2+</sup>) y la carga energética (Pérez Vázquez y cols., 2003) puedan ejercer sobre el PT y el metabolismo mitocondrial de *Yarrowia lipolytica* resulta bastante interesante. Esto nos indicará la importancia que tiene la presencia del complejo I o de componentes alternos de la cadena respiratoria (NADH deshidrogenasa externa y oxidasa alterna) para regular la actividad del PT.

En el presente trabajo se propone aislar mitocondrias acopladas de *Y. lipolytica*, caracterizar su metabolismo aerobio y el efecto de iones inorgánicos (principalmente

fosfato y calcio) sobre la respiración y generación de un potencial transmembranal. Con esto se desea identificar el mecanismo por el que estas mitocondrias eliminan el exceso de equivalentes reductores, sea un poro inespecífico, una proteína desacoplante o un sistema de óxido-reducción no productor de ATP.



## OBJETIVOS

### Objetivo General

Estudiar el metabolismo mitocondrial de *Yarrowia lipolytica* y los efectos de iones como el fosfato y el calcio para identificar el posible mecanismo de eliminación de radicales libres.

### Objetivos específicos.

- Diseñar un medio de cultivo, donde *Y. lipolytica* crezca principalmente en forma de levadura.
- Aislar mitocondrias acopladas de la levadura *Yarrowia lipolytica*.
- Confirmar la sensibilidad a inhibidores específicos de la cadena respiratoria de mitocondrias aisladas de *Y. lipolytica*.
- Evaluar los efectos del calcio y el fosfato sobre el potencial transmembranal de las mitocondrias.
- Determinar los posibles efectos del  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Pi}$  sobre la transición de la permeabilidad mitocondrial de *Y. lipolytica*.
- Comparar los patrones de regulación del flujo de electrones de *Y. lipolytica* con los de otras especies conocidas.

## **HIPÓTESIS**

Si el fosfato y el calcio tienen un efecto sobre la permeabilidad de las mitocondrias aisladas de *Yarrowia lipolytica* similar al que tienen sobre las mitocondrias de mamífero y de *S. cerevisiae*, entonces se puede postular la presencia de un poro de transición.

### **Hipótesis alterna**

Si los iones inorgánicos no tienen efecto en la permeabilidad de las mitocondrias aisladas de *Yarrowia lipolytica*, entonces la oxidasa alterna es suficiente para regular el metabolismo mitocondrial.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Reactivos**

El MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), el manitol, la albúmina sérica bovina, el ADP, el  $MgCl_2$ , el FCCP (carbonil *p*-(trifluorometoxi) fenilhidrazona), el  $CaCl_2$ , la TEA (trietanolamina), la glucosa, el DOC (ácido desoxicólico sal de sodio), el  $NADP^+$ , la hexocinasa, el ATP, la safranina-O, y el lactato de sodio fueron adquiridos de Sigma Chem. Co., (St Louis MO. EUA). La glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa fue adquirida de Worthington Biochemical Corporation (NJ, EUA). El KCl, el ácido fosfórico, el sulfato cúprico, el  $KH_2PO_4$ , el  $(NH_4)_2SO_4$ , y el  $MgSO_4$  fueron adquiridos de J.T. Baker-México, S.A. El tartrato de sodio y potasio fueron comprados en Merck-México, S.A. La bacto-peptona, el extracto de levadura y el YNB se compraron a DIFCO Laboratorios, (Detroit, MI, EUA). Todos los demás reactivos fueron de la mejor calidad asequible comercialmente.

### **Material Biológico.**

Se utilizaron células de *Yarrowia lipolytica* de la cepa E150 (*MatB*, *his-1*, *ura3-302*, *leu2-270*, *xpr2-322*) donada por el Dr. Ulrich Brandt (Universidad de Frankfurt, Centro de Química Biológica, Frankfurt, Alemania).

### **Cultivo de Células**

Debido a que la forma de micelio de *Yarrowia lipolytica* es más resistente a la homogenización que la levaduriforme y que esta resistencia dificulta la obtención de mitocondrias acopladas, se decidió obtener células levaduriformes y

seleccionar el medio en el que se obtuviera el crecimiento más abundante. Con este fin, se probaron diferentes medios de cultivo variando las fuentes de carbono y nitrógeno, y se realizaron observaciones al microscopio. Las diferentes fuentes de carbono utilizadas fueron glucosa, N-acetilglucosamina o extracto de malta. Como fuente de nitrógeno se emplearon glutamina o sulfato de amonio (Ruiz-Herrera y Sentandreu, 2002). Los medios probados fueron:

Medio A: N-acetilglucosamina 1%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5%, Tris 50 mM, pH 5.0;

Medio B: extracto de malta 5%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5%, fosfato 50 mM, pH 6.0;

Medio C: glucosa 1%, L-glutamina 0.5%, fosfato 50 mM, pH 6.0;

Medio D: extracto de malta 5%, L-glutamina 0.5%, fosfato 50 mM, pH 6.0;

Medio YPD: extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 1%, pH 7.0;

Medio YD: extracto de levadura 1%, glucosa 2%, pH 7.0;

Cada medio se complementó con YNB (Yeast/Nitrogen Base) con aminoácidos 1.7 g/l, excepto los medios YPD y YD (Ruiz-Herrera, J. y Sentandreu, R., 2002). En cada caso se realizó un precultivo (100 ml) en YPD, a partir de éste se tomó 1 ml y se inoculó un segundo matraz, incubándose a 28 °C durante 14 horas.

### **Determinación de las curvas de crecimiento**

Se emplearon los medios y condiciones de incubación descritos anteriormente, registrando la densidad óptica de los cultivos a diferentes tiempos de incubación con un colorímetro Klett-Summerson (Klett MFG.Co.)

### **Obtención de mitocondrias**

Las células se lavaron con agua destilada tres veces por centrifugación, se resuspendieron en medio de extracción: MES 5 mM, manitol 0.6 M, albúmina sérica bovina 0.1%, pH 6.8 (TEA). Se homogenizaron empleando un Homogenizador (Bead-Beater Biospec Products, U.S.A) y perlas de vidrio de 0.45 mm de diámetro mediante 3 pulsos de 20 segundos (Uribe y cols. 1985) con una camisa de hielo, y se aislaron las mitocondrias por centrifugación diferencial (Peña y cols. 1977) a 4 °C utilizando una centrífuga Sorvall R5B en un rotor GSA a 2500 rpm/ 5 min. Posteriormente se centrifugó el sobrenadante a 9500 rpm/10 min. El sedimento se resuspendió en medio de extracción con un pincel fino. A continuación se centrifugó nuevamente a 5500 rpm/5 min, y por último se centrifugó el sobrenadante a 12000 rpm/10 min, y se resuspendió el sedimento en medio isotónico (Manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8). Obteniendo una suspensión de mitocondrias, se determinó la concentración de proteína antes de utilizarse.

### **Determinación de proteína.**

La concentración de proteína mitocondrial se determinó por triplicado mediante el método de Biuret (Gornal y cols., 1949) en un espectrofotómetro Beckman DU-50 a 540 nm, añadiendo una alícuota de 25 µl de la suspensión de mitocondrias y 125 µl de desoxicolato de sodio (DOC) al 1% y reactivo de Biuret en un volumen final de 2.5 ml. El cambio en la absorbancia debido a la interacción del  $\text{Cu}^{2+}$  con los enlaces peptídicos generó una coloración violeta, proporcional a la concentración de proteína de la muestra.

## **Oximetría**

El consumo de oxígeno se midió con un electrodo tipo Clark inmerso en una cámara con agitación y temperatura regulada (Estabrook, 1967). El electrodo se conectó a un oxímetro Ysi-5300 con graficador. La reacción se llevó a cabo a 25 °C en un volumen final de 3 ml, en medio isotónico (manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA). Se utilizó una concentración de mitocondrias de 0.5 mg/ml para cada experimento. Se añadieron diferentes sustratos respiratorios para inducir el estado estacionario (IV) y los reactivos necesarios (ADP, Pi) para inducir el estado fosforilante (III), así como un desacoplante (FCCP), para medir el estado desacoplado (U). Los valores del control respiratorio (C.R) se obtuvieron calculando el cociente de la rapidez del consumo de oxígeno en estado III sobre el estado IV.

## **Potencial transmembranal ( $\Delta\Psi$ )**

Para la determinación del potencial transmembranal se empleó naranja de safranina midiendo el cambio de absorbancia utilizando dos longitudes de onda (511-533 nm), en un espectrofotómetro (Aminco DW 2000) en modo dual con agitación constante, con un volumen final de 2 ml (Åkerman y Wikstrom, 1976). Se utilizó el medio isotónico y los reactivos necesarios para generar el potencial. El anaranjado de safranina es un colorante catiónico que interactúa con la membrana mitocondrial cambiando de color al generarse un potencial transmembranal (negativo al interior).

## **Hinchamiento mitocondrial**

Se utilizó un espectrofotómetro (DW 2000 Aminco-Ollis) en modo split y se midió el cambio en la absorbancia a 540 nm (Halestrap y Davidson, 1990). La disminución en la densidad óptica a esta longitud de onda es debida al hinchamiento de las mitocondrias, provocado por la entrada de diferentes iones, lo que resulta en un aumento en la osmolaridad de la matriz y la consiguiente captación de agua.

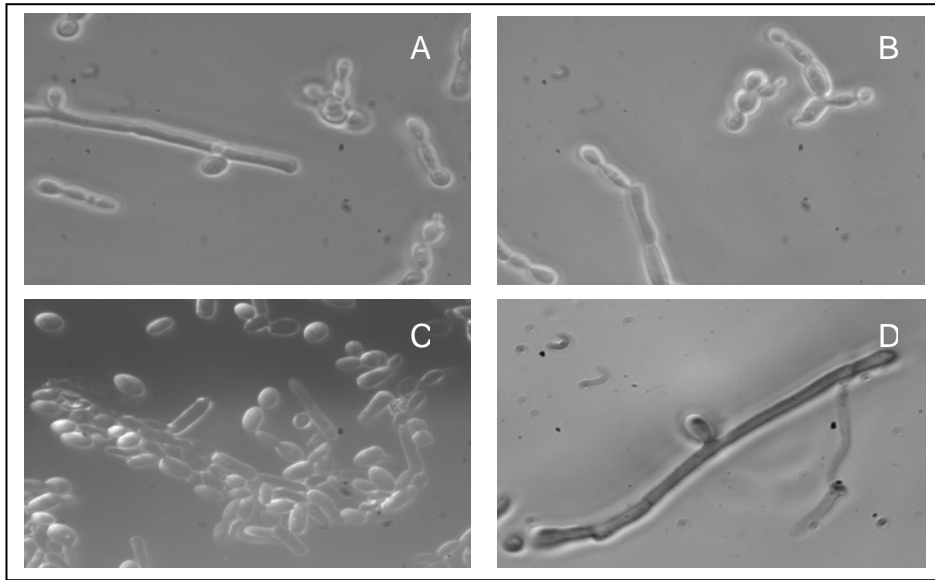
## RESULTADOS

### *Efecto del medio de cultivo sobre la formación de micelio y sobre el crecimiento de Yarrowia lipolytica.*

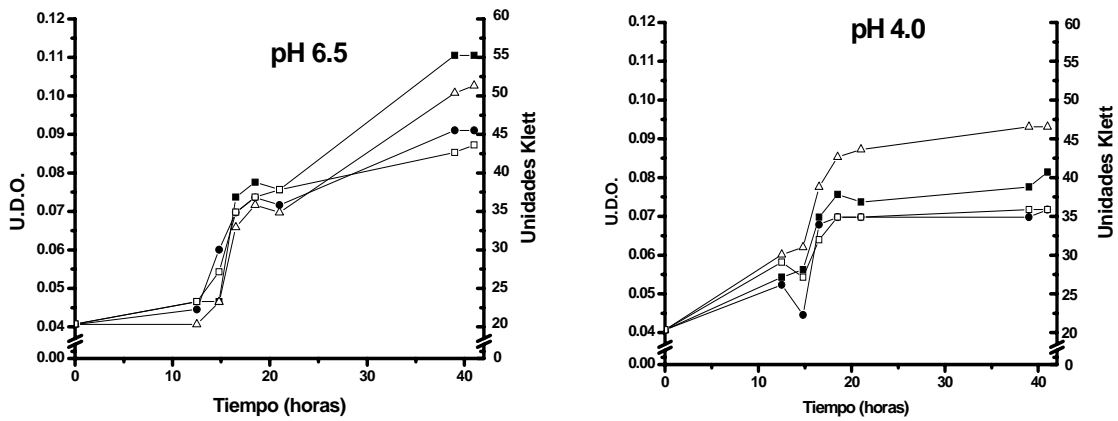
En relación al efecto de los medios de cultivo para la obtención de células de forma levaduriforme, en la figura 1-C se observó que el mejor medio fue el C, con glucosa 1% y L-glutamina 0.5%, en donde casi la totalidad de las células tienen forma de levadura con un pequeño porcentaje de células ligeramente alargadas. En tanto que en los medios A y B aún cuando se observan levaduras, también existen micelios cortos (Fig. 1-A y 1-B, respectivamente). En el medio D, las células crecieron casi exclusivamente formando micelios (Fig. 1-D), resultados similares se obtuvieron con el medio YPD. Respecto al efecto de los medios de cultivo sobre el crecimiento, en el medio YPD la densidad del cultivo aumentó considerablemente, alcanzando 0.8 UDO en 14 horas. Mientras que en el medio de glucosa-glutamina adicionado con YNB (medio C), la densidad del medio a las 14 horas fue de 0.06 UDO.

Con base en estos resultados y buscando obtener una población abundante de levaduras, se procedió a emplear el medio C que contiene glucosa y glutamina y a evaluar el efecto de la concentración de glucosa, la temperatura, el pH y el tiempo de incubación. En la figura 2 se observan variaciones mínimas en la biomasa producida. Se encontró que la mejor condición fue con glucosa 1%, a 30 °C y pH 6.5 (Fig. 2-A). Pero la producción de biomasa fue inferior a la producida en medio YPD.



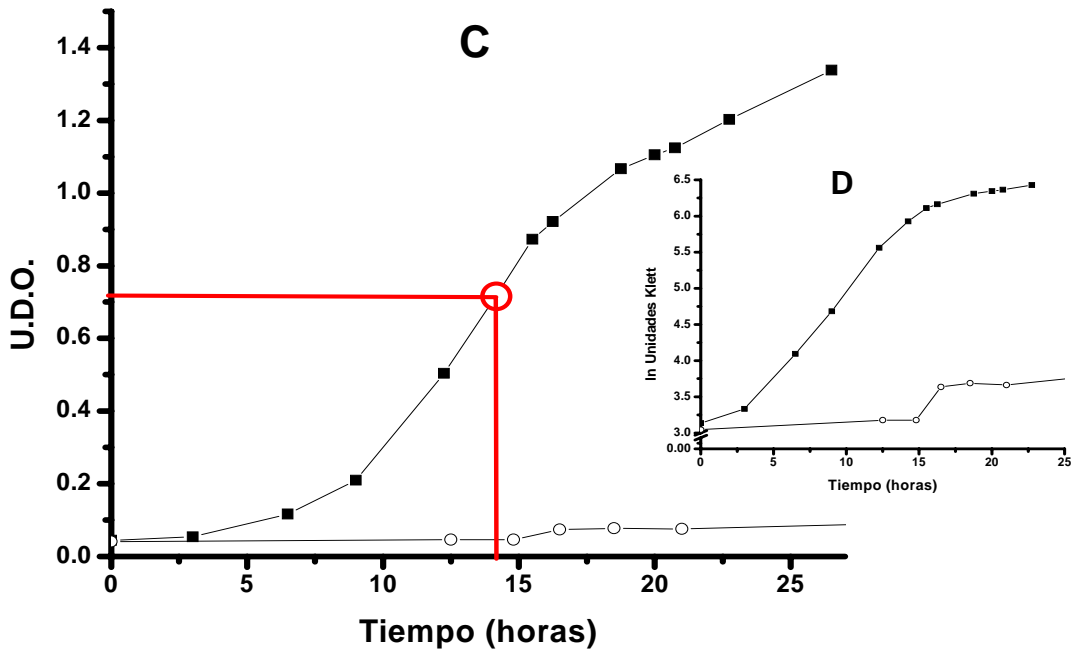
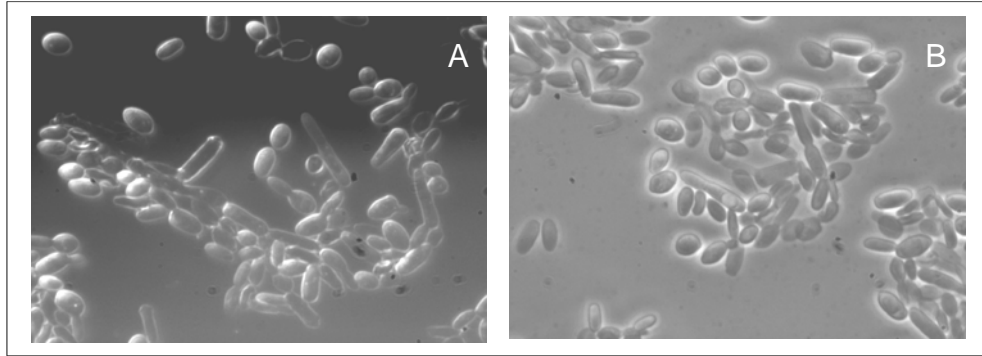


**Fig. 1. Efecto del medio de cultivo sobre la forma de crecimiento de células de *Yarrowia lipolytica*.** A, N-acetilglucosamina 1%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5%, pH 6.0; B, extracto de malta 1%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5%, pH 6.0; C, glucosa 1%, glutamina 0.5 %, pH 6.0; D, extracto de Malta 1%, glutamina 0.5 %, pH 6.0.



**Fig. 2. Efecto de la temperatura, pH y concentración de fuente de carbono del medio de cultivo sobre el crecimiento de células de *Yarrowia lipolytica*.** Células incubadas en medio C (glucosa-glutamina). ■, glucosa 1%, 30 °C; ●, glucosa 1%, 35 °C; △, glucosa 2%, 30 °C; □, glucosa 2%, 35 °C.

Considerando que para aislar mitocondrias son necesarios varios gramos de biomasa, y que con los medios probados no se obtuvieron altos rendimientos. Se decidió probar el medio YD, que contiene extracto de levadura 1% y glucosa 2%, y se disminuyó la velocidad de agitación durante el tiempo de incubación (Pérez-Campo y Domínguez, 2001). En este medio, se obtuvieron células de *Y. lipolytica* levaduriformes en la misma proporción que cuando se utilizó el medio C (Fig. 3 A y B), pero además, se obtuvo un alto rendimiento con respecto a la producción de biomasa, similar a la obtenida con YPD (Fig. 3-C). Por lo tanto, se utilizó este medio para el cultivo de *Yarrowia lipolytica* en todos los experimentos posteriores, en donde las células fueron cosechadas a las 14 horas de incubación a 30 °C. Como se indica en la figura 3-C y 3-D a este tiempo las células se encontraban al final de la fase logarítmica.



**Fig. 3. Comparación entre medios de cultivo y su efecto sobre la forma de crecimiento de células de *Yarrowia lipolytica*.** A, medio C; B, medio YD; C, curvas de crecimiento empleando ambos medios: ■, YD pH 7.0; ○, medio C; D, regráfico de la curva de crecimiento.

*Aislamiento y caracterización de la cadena respiratoria de mitocondrias acopladas de *Yarrowia lipolytica*.*

Después de obtener suficiente biomasa de células levaduriformes de *Yarrowia lipolytica*, se procedió al aislamiento de las mitocondrias por un método mecánico. Se obtuvieron mitocondrias aisladas y acopladas con un control respiratorio de  $1.45 \pm 0.03$  utilizando como sustrato NADH (Tabla 1). Debido al

carácter hidrofílico del NADH, este sustrato no es capaz de permear a través de la membrana interna mitocondrial, por lo tanto es oxidado por la deshidrogenasa alterna (externa). Los valores del control respiratorio utilizando este sustrato, son menores que los obtenidos empleando sustratos del complejo I (Tabla 2). Al oxidarse el NADH adicionado podemos confirmar la presencia de la NADH deshidrogenasa externa. Se ha reportado anteriormente que esta enzima no es inhibida por rotenona, pero es sensible a flavonas (Juárez y cols. 2004).

**Tabla 1. Respiración de mitocondrias aisladas de *Y. lipolytica* en presencia de NADH**

natg O <sub>2</sub> /mg prot/min					
Edo. IV	Edo. III	U	C.R.	U/III	U/IV
733	1066		1.45		
866	1233	1866	1.42	1.51	2.15
833	1233	2066	1.48	1.67	2.48

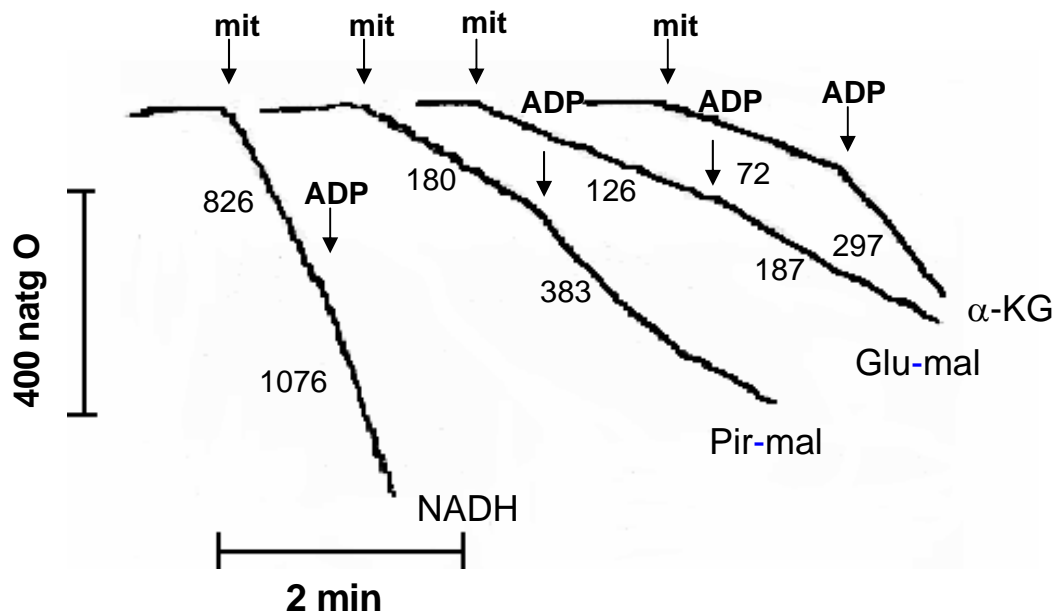
Edo. IV, estacionario; Edo. III, fosforilante; U, desacoplado; C.R., control respiratorio.

Mezcla de reacción: MES 5 mM, Manitol 0.6 M, pH 6.8 (TEA), Pi 4 mM, KCl 20 mM, NADH 0.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, ADP 200 µM, mitocondrias aisladas mecánicamente 0.2 mg prot/ml.

#### *Evaluación de sustratos respiratorios. Respiración y $\Delta\Psi$ .*

Posteriormente, se emplearon diversos sustratos respiratorios, tanto de los complejos I y II como de la NADH deshidrogena externa, y se determinó el potencial transmembranal y el control respiratorio (C.R.). Observando de esta manera que la respiración con  $\alpha$ -cetoglutarato genera un C.R. mayor en comparación con otros sustratos (Tabla 2). En el estado IV (estacionario) en

donde las mitocondrias no sintetizan ATP, utilizando  $\alpha$ -cetoglutarato el consumo de oxígeno es de  $72 \pm 8$  natg  $O_2$ /mg prot/min; y en el estado fosforilante es de  $297 \pm 18$  natg  $O_2$ /mg prot/min, lo que da como resultado un C.R. de  $4.19 \pm 0.29$  (Tabla 2 y Fig. 4). En cambio, por ejemplo, con piruvato el consumo de oxígeno en los estados IV y III es de 180 y 383 natg  $O_2$ /mg prot/min, respectivamente. El cociente respiratorio con piruvato es menor ( $2.19 \pm 0.35$ ). Y con glutamato, a pesar de que el consumo de oxígeno en el estado IV es lento, se obtuvo un C.R. menor, de  $1.51 \pm 0.22$ , porque en el estado fosforilante el consumo de oxígeno también es lento (Fig. 4).



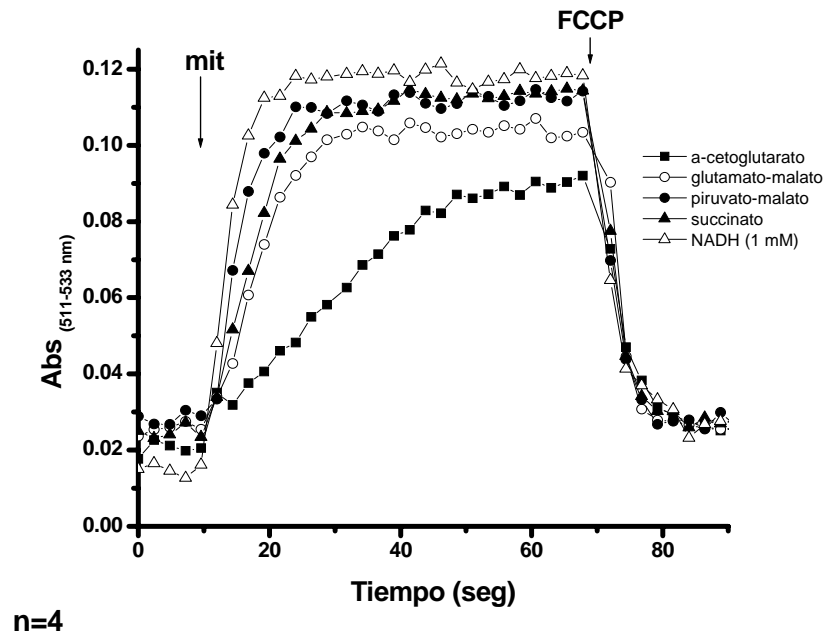
**Fig. 4. Efecto de diferentes sustratos respiratorios sobre el consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de *Y. lipolytica*.** Medio de reacción: MES 5 mM, Manitol 0.6 M, pH 6.8 (TEA), KCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, sustratos respiratorios (NADH 1 mM, Piruvato-malato 10 mM, Glutamato-malato 10 mM,  $\alpha$ -cetoglutarato 10 mM), Pi 4 mM, ADP 200  $\mu$ M, mitocondrias 0.5 mg prot/ml. Volumen final 3 ml. Los números indican el consumo de oxígeno en natg  $O_2$ /mg prot/min. Los trazos son representativos de 4 experimentos.

**Tabla 2. Respiración de mitocondrias aisladas de *Y. lipolytica* empleando diferentes sustratos respiratorios.**

<b>natg O<sub>2</sub>/mg prot/min</b>			
Sustrato	Edo. IV	Edo. III	C.R.
NADH (1mM)	826 ± 35	1076 ± 45	1.3 ± 0.16
Glutamato-malato (10 mM)	126 ± 8	187 ± 11	1.51 ± 0.22
Piruvato-malato (10 mM)	180 ± 12	383 ± 10	2.19 ± 0.35
Succinato (10 mM)	209 ± 9	364 ± 12	1.74 ± 0.12
α-cetoglutarato (10 mM)	72 ± 8	297 ± 18	4.19 ± 0.29

Mezcla de reacción: MES 5 mM, Manitol 0.6 M, pH 6.8 (TEA), Pi 4mM, KCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, ADP 200 μM, mitocondrias aisladas mecánicamente 0.5 mg prot/ml, y las concentraciones de sustrato indicadas para cada uno. n = 4

Los resultados de oximetría concuerdan con los obtenidos al medir el potencial transmembranal. El potencial transmembranal se midió en presencia de diferentes sustratos y se observó que todos aumentaban el  $\Delta\Psi$  que permaneció estable hasta la adición del desacoplante, FCCP (Fig. 5). Un dato que ocurrió repetidamente es el establecimiento más lento del potencial transmembranal cuando se utilizó α-cetoglutarato como sustrato.



**Fig. 5. Efecto de diferentes sustratos respiratorios sobre el potencial transmembranal.** Medio de reacción: MES 5 mM, Manitol 0.6 M, KCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Pi 4 mM, safranina 10 μM, sustrato respiratorio 10 mM excepto NADH (1 mM), mitocondrias 0.5 mg prot/ ml, volumen final 2 ml. Este gráfico es representativo de 4 experimentos.

En contraste con el  $\alpha$ -cetoglutarato, el potencial generado por el piruvato, cuya oxidación también genera NADH en el lado de la matriz, no presenta el mismo comportamiento (Fig. 5). En este caso, el  $\Delta\Psi$  se produce rápidamente y es ligeramente mayor que con el glutamato.

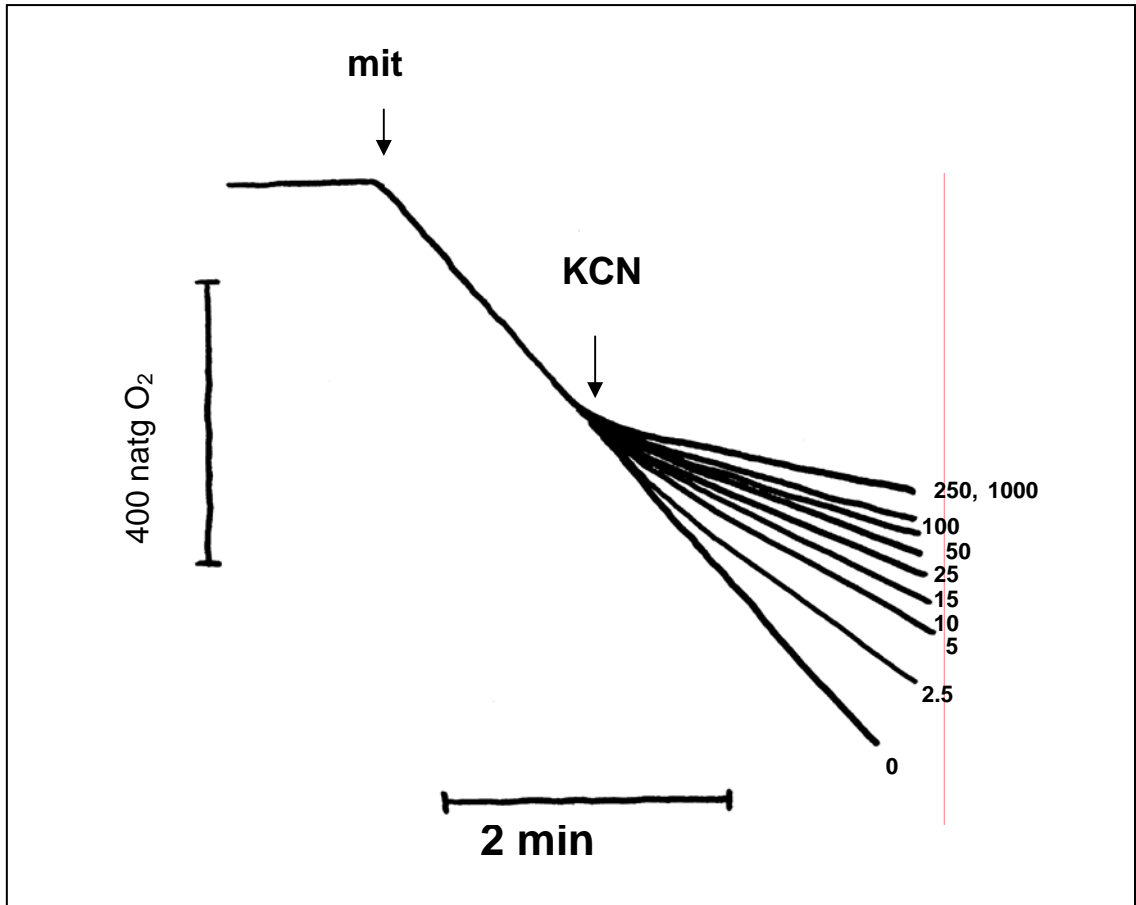
También se observa que la generación del potencial transmembranal al utilizar NADH es ligeramente más rápida que con succinato, aunque a partir de los 40 segundos fueron de la misma magnitud.

### *La oxidasa alterna (AOX).*

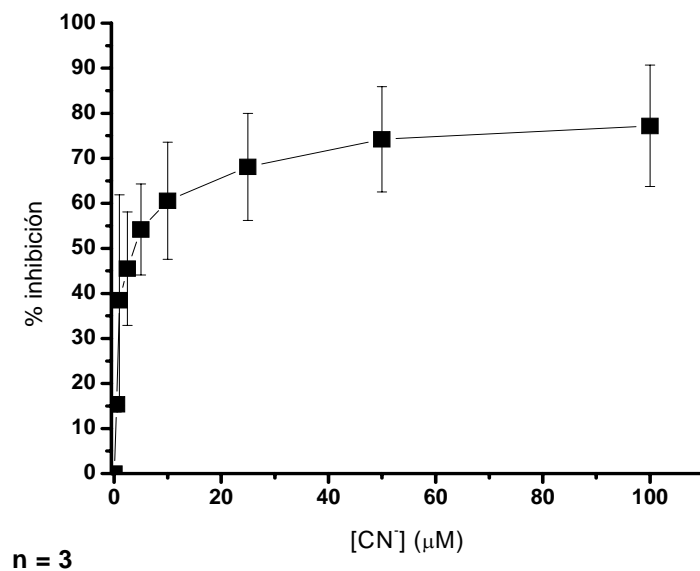
Con el fin de caracterizar el flujo ramificado de electrones de la cadena respiratoria de este organismo se utilizaron diferentes inhibidores de la citocromo oxidasa (complejo IV). En la figura 6, se observa que no hay una inhibición completa por cianuro, ya que el consumo de oxígeno nunca llega a cero, en concentraciones muy elevadas (250 y 1000  $\mu\text{M}$ ) la máxima inhibición es alrededor del 80%. Mientras que el porcentaje de inhibición por azida es de aproximadamente 35% y de Antimicina A (que inhibe al complejo III) del 19 %, en concentraciones de 250 y 150  $\mu\text{M}$ , respectivamente (resultados no mostrados). Lo cual confirma la presencia de una oxidasa alterna no sensible a estos inhibidores.

Para caracterizar la inhibición de la respiración por cianuro, se adicionaron diferentes concentraciones de cianuro y se calculó el porcentaje de inhibición (Fig. 7). Se observó una inhibición del 15 % al añadir 0.5  $\mu\text{M}$  de cianuro. La inhibición de la respiración aumentaba en forma hiperbólica, a concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{M}$  se alcanzó una inhibición máxima de 75-80 % aproximadamente.





**Fig. 6. Inhibición parcial de la respiración por cianuro.** Medio de reacción: MES 5 mM, Manitol 0.6 M, KCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NADH 5 mM, Pi 4 mM, pH 6.8 (TEA), mitocondrias aisladas de *Yarrowia lipolytica* 0.5 mg prot/ml, y las concentraciones indicadas de CN<sup>-</sup> (μM). Los trazos son representativos de tres experimentos.



**Fig. 7. Inhibición de la respiración de mitocondrias aisladas de *Yarrowia lipolytica* provocada por cianuro.** Medio de reacción: Igual que las condiciones empleadas para la figura 4.

*Efecto del fosfato sobre la respiración y el potencial transmembranal.*

Se ha observado que el fosfato es un modulador del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial en otras especies. En mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*, concentraciones elevadas de fosfato (4 mM) mantienen el poro en el estado cerrado, mientras que a concentraciones bajas (0.4 mM) se induce la apertura de éste. En contraste, en mitocondrias aisladas de mamífero el fosfato induce la apertura del PTP depolarizando a la mitocondria.

Con el fin de identificar un posible poro de transición de la permeabilidad en *Yarrowia lipolytica* y comparar la regulación ejercida por este anión con lo observado en otras especies, se estudió el efecto del Pi sobre las mitocondrias aisladas de *Yarrowia lipolytica*. Para esto, se determinó el consumo de oxígeno en los estados estacionario (IV) y fosforilante (III) y se utilizó el control respiratorio

(C.R.) como parámetro para evaluar dicho efecto. Como se puede observar en la Tabla 3, en donde se reporta el consumo de oxígeno, el fosfato presenta un efecto mínimo sobre el control respiratorio. La rapidez del consumo de oxígeno en los estados III y IV presenta una ligera variación, y calculando el cociente se obtienen valores de C.R. que varían ligeramente a las concentraciones de Pi utilizadas (0.4 y 4 mM). El C.R. aumentó en algunos casos, pero el estado IV no se modificó, por lo que no es desacoplamiento sino que parece aumentar la eficiencia de la fosforilación (estado III).

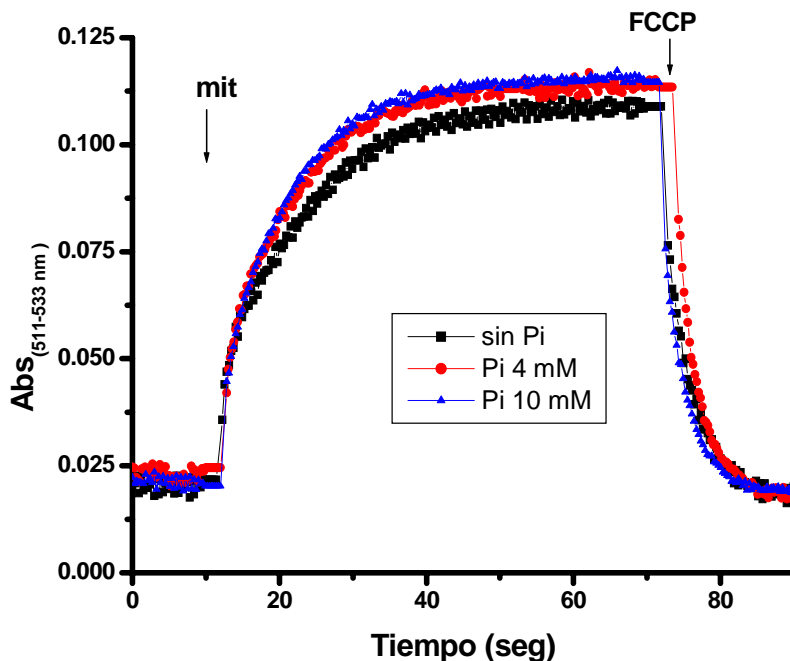
**Tabla 3. Efecto del fosfato sobre la respiración de mitocondrias aisladas de *Y. lipolytica*.**

Sustrato	[Pi] (mM)	natg O <sub>2</sub> /mg prot/min		
		IV	III	C.R.
NADH 1 mM	0.4	1280	1493	1.3
"	4	1160	1520	1.17
Piruvato-malato (10 mM)	0.4	120	240	2.0
"	4	120	333	2.7
Glutamato-malato (10 mM)	0.4	80	134	1.67
"	4	80	147	1.8
Succinato (10 mM)	0.4	147	240	1.64
"	4	147	253	1.72
α-cetoglutarato (10 mM)	0.4	32	120	3.754
"	4	32	147	4.58

Medio de reacción: MES 5 mM, Manitol, 0.6 M, pH 6.8 (TEA), KCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, mitocondrias aisladas 0.2 mg prot/ml, y las concentraciones de fosfato y de sustratos indicadas. n = 3

De igual manera que en el consumo de oxígeno, se midió el efecto del Pi sobre el potencial transmembranal. Se observó una adecuada generación del  $\Delta\Psi$  en todas las concentraciones de Pi empleadas (Figura 10). Los potenciales

generados por las mitocondrias en ausencia de fosfato fueron muy parecidos a los observados en presencia de 4 y 10 mM de este anión.



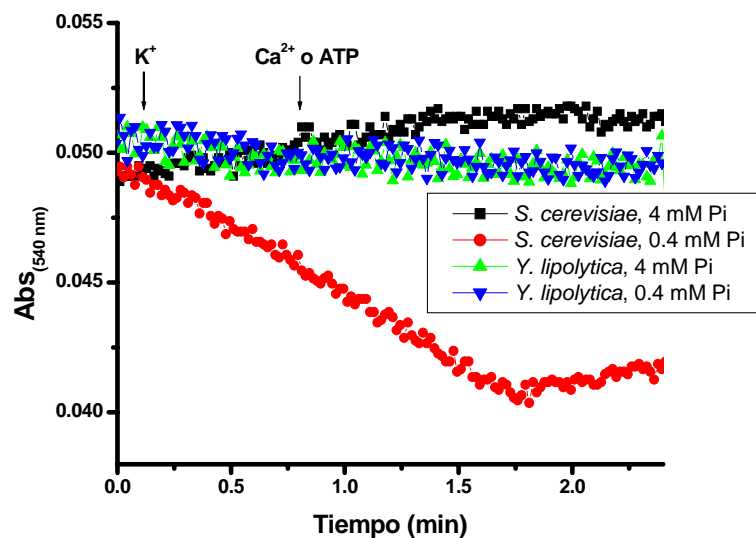
**Fig. 10. Efecto del fosfato sobre el potencial transmembranal en mitocondrias aisladas de *Y. lipolytica*.** Medio de reacción: MES 5 mM, Manitol 0.6 M, KCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, las concentraciones indicadas de Pi,  $\alpha$ -cetoglutarato 10 mM, safranina 10  $\mu$ M, mitocondrias aisladas 0.5 mg prot/ml, volumen final 2 ml.

#### *Efecto del Pi sobre el hinchamiento mitocondrial.*

Mediante el hinchamiento mitocondrial, es posible caracterizar la permeabilidad a iones de la membrana mitocondrial (Davidson y Halestrap, 1990; Halestrap y Davidson, 1990). En mitocondrias de mamífero, con elevadas concentraciones de K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, y Pi, se induce el hinchamiento de las mitocondrias (Bernardi y cols., 1994). Este fenómeno se debe a la apertura del PTP, que permite la entrada de K<sup>+</sup>, el cual aumenta la osmolaridad de la matriz y por ello capta una gran cantidad

de agua, provocando una disminución en la densidad óptica del medio. En mamíferos, este efecto puede ser inhibido por la ciclosporina A, un inhibidor de la ciclofilina D, que al no permitir la interacción de esta proteína con el acarreador de adenin nucleótidos impide la apertura del poro (Halestrap y Davidson, 1990; Petronilli y cols. 1993).

A diferencia de lo que ocurre en las mitocondrias de mamífero, en mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae*, el Pi y el  $\text{Ca}^{2+}$  actúan de manera opuesta, cerrando el canal inespecífico y por lo tanto no hay hinchamiento. Con el fin de observar si estos iones presentan algún efecto sobre las mitocondrias aisladas de *Yarrowia lipolytica* se comparó el hinchamiento de éstas con el de mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 11).



**Fig. 11. Comparación entre *Y. lipolytica* y *S. cerevisiae* del efecto ejercido por el Pi sobre el hinchamiento mitocondrial.** Medio de reacción: MES 5 mM, Manitol 0.6 M, pH 6.8 (TEA), NADH 1mM, mitocondrias 0.5 mg prot/ml, las concentraciones indicadas de Pi en cada trazo, KCl 40 mM donde se indica. En las mitocondrias de *Y. lipolytica* se añadió  $\text{Ca}^{2+}$  25  $\mu\text{M}$  o ATP 200  $\mu\text{M}$ .

Con Pi 0.4 mM, se observó un hinchamiento inducido por K<sup>+</sup> en las mitocondrias de *S. cerevisiae*. Este hinchamiento fue inhibido al incrementar la concentración de Pi. En cambio, en las mitocondrias aisladas de *Yarrowia lipolytica* no se observó un hinchamiento ni en las condiciones que inducen el poro en mitocondrias de *S. cerevisiae*, ni en las condiciones que lo inducen en mitocondrias de mamífero (Fig. 11). A las mitocondrias aisladas de *Y. lipolytica*, además del fosfato, se añadieron Ca<sup>2+</sup> 25 μM y ATP 200 μM, los cuales se ha observado anteriormente que inducen los poros mitocondriales de mamífero y de *S. cerevisiae*, respectivamente. Pero tampoco presentaron efecto alguno.

## DISCUSIÓN

### *Morfología.*

El dimorfismo en *Yarrowia lipolytica* es afectado por varios factores, como la temperatura, el pH del medio, la fuente de carbono y nitrógeno y sustancias no metabolizables. Las condiciones que afectan el dimorfismo en *Y. lipolytica* son diferentes al utilizar medios sólidos y líquidos, y dependen también de la cepa utilizada (Barth y Gaillardin, 1997). En los resultados reportados en este trabajo, únicamente se utilizaron medios líquidos. Esto con el fin de facilitar la cosecha de células que luego se sometieron a ruptura por métodos mecánicos para la obtención de las mitocondrias.

En algunos hongos se ha encontrado que la transición del dimorfismo es controlada principalmente por el pH. Uno de ellos es un basidiomiceto, *Ustilago maydis*, y otro es un ascomiceto, *Candida albicans*. Cabe mencionar que el efecto que tiene el pH sobre el dimorfismo en estas dos especies es opuesto. *U. maydis* crece en forma de levadura a pH cercano a la neutralidad, mientras que al ser incubado en un pH ácido se induce la formación de micelio; en contraste con lo que ocurre en *Candida albicans*, el cual a pH ácido crece predominantemente como levadura (Ruiz-Herrera y cols., 1995; Ruiz-Herrera y Sentandreu, 2002).

Se ha observado que *Y. lipolytica* se comporta como *C. albicans* con respecto a las variaciones del pH del medio, debido probablemente a que estas dos especies se encuentran más cercanas filogenéticamente. En un estudio previo (Szabo, 2002), se encontró que *Yarrowia lipolytica* crece levaduriforme en un 100% a pH 4, mientras que a un pH cercano a la neutralidad se obtienen células en forma de levadura de 20 a 25%. Lo cual concuerda con el crecimiento de *Y.*

*lipolytica* que se observó el emplear medios de cultivo empleando YNB (Yeast Nitrogen Base) adicionado con N-acetilglucosamina y sulfato de amonio, pH 6.0; y los medios adicionados con extracto de malta como fuente de carbono y alguna fuente de nitrógeno, pH 6.0 (Fig. 1).

Anteriormente, se había estudiado el efecto de los distintos factores que inducen el dimorfismo en *Y. lipolytica* (Ruiz-Herrera y Sentandreu, 2002), encontrándose que, en los medios utilizados en la figura 1, las células crecían levaduriformes en su totalidad. A diferencia de lo reportado; cuando se empleó el medio C, con glucosa 2% y L-glutamina 1%, obtuvimos células en forma de levadura en alta proporción. La formación de micelio fue insignificante en comparación con los medios que contenían sales de amonio. En este caso, la fuente de nitrógeno empleada mostró un importante efecto sobre el dimorfismo a diferencia del pH del medio.

La cantidad de biomasa producida utilizando el medio YNB con glucosa-glutamina es muy poca, por lo cual resulta inapropiada para un posterior aislamiento mitocondrial, ya que la proporción de mitocondrias obtenidas por gramo de biomasa es muy pequeña. De este modo, se realizaron algunas variaciones en el medio de cultivo para producir una gran cantidad de biomasa con células levaduriformes en su mayoría. Se incubaron las células a diferente pH y temperatura con el fin de obtener un rendimiento mayor. En las curvas de crecimiento a pH 6.5 se observa un ligero incremento de biomasa en comparación con el crecimiento de las células a pH 4.0, determinado por un aumento en la densidad óptica del medio. Las diferencias no fueron significativas en ninguna de las temperaturas de incubación empleadas (30 y 35 °C), ya que en ninguno de los



casos hubo un incremento notable en la producción de biomasa. Finalmente, se utilizó otro medio de cultivo (YD, extracto de levadura – dextrosa, pH 7.0 a 30 °C) en donde se obtuvieron los requerimientos antes mencionados (Pérez-Campo y Domínguez, 2001). Es decir, se observó un crecimiento predominantemente levaduriforme y una producción de biomasa mucho mayor, en comparación con el medio YNB. Esta biomasa fue suficiente para el aislamiento de las mitocondrias. En este medio de cultivo, la fase logarítmica se inicia a partir de las 4 horas de incubación, y a las 16 horas empezó la fase estacionaria (Fig. 3-D).

#### *Características de las mitocondrias de *Yarrowia lipolytica*.*

Las mitocondrias de *Yarrowia lipolytica* obtenidas por un método mecánico se encuentran acopladas, lo cual se pudo determinar mediante la medición del consumo de oxígeno en presencia de diferentes sustratos respiratorios. El consumo de oxígeno en presencia de NADH como sustrato es mucho mayor que al oxidar otros sustratos del complejo I. Sin embargo, las mitocondrias presentan un control respiratorio (C.R.) menor ( $1.45 \pm 0.03$ ). La aceleración en el consumo de oxígeno probablemente se debe a que el NADH es oxidado por la NADH deshidrogenasa externa. Esta reacción no se encuentra acoplada al bombeo de protones de la matriz al espacio intermembranal, a diferencia de la oxidación del NADH interno por el complejo I. Por esta razón, el transporte de electrones del NADH a la ubiquinona es más rápido, y por lo tanto, la reducción del oxígeno por unidad de tiempo es mayor. Al no ser translocados protones por el complejo I en esta reacción, el cociente del consumo de oxígeno en los estados estacionario (IV)

y fosforilante (III) fue menor, ya que únicamente se translocaron protones por los complejos III y IV de la cadena respiratoria.

Además de la NADH deshidrogenasa, las mitocondrias contienen un sistema alternativo de reducción del  $O_2$  que no es sensible a inhibidores clásicos del complejo IV, como cianuro, azida o monóxido de carbono. Esta oxidasa alterna es inhibida por derivados del ácido hidroxámico como el ácido salicilhidroxámico (Schonbaum y cols, 1971). La oxidasa alterna (AOX), transfiere los electrones de las ubiquinonas al oxígeno molecular para la formación de agua. Esta reacción no se encuentra acoplada a la translocación de protones a través de la membrana interna. Por esta razón, las mitocondrias de *Y. lipolytica* oxidan sustratos sin la generación de un gradiente de protones, en un proceso que podría ser un mecanismo de detoxificación de radicales libres muy eficiente. Si esto es cierto, entonces la existencia de un poro de transición o de una proteína desacoplante sería superflua. Es decir, la oxidasa alterna de *Y. lipolytica* sería suficiente para mantener la poza de quinonas oxidada aún en presencia de un flujo de electrones acelerado.

La combinación de la NADH deshidrogenasa externa y la oxidasa alterna establecerían un sistema de reoxidación del NADH citoplásmico que, aunque fuese fútil permitiría un elevado ritmo metabólico independiente de la fosforilación oxidativa.

A diferencia de lo que ocurre con el NADH citosólico, al emplear sustratos provenientes de la matriz como el piruvato, malato o 2-oxoglutarato para producir NADH del lado interno de la membrana interna mitocondrial, el consumo de oxígeno en los estados III y IV es menor. Este  $NADH + H^+$  localizado en la matriz

mitocondrial es oxidado por el complejo I. El transporte de electrones en estos casos ocurre de manera más lenta, por lo que es probable que la oxidasa alterna no tenga que actuar en este caso. Cuando se emplearon sustratos respiratorios como el piruvato y el 2-oxoglutarato, hay translocación de protones en los complejos I, III y IV, generando un mayor potencial. Estos protones son empleados por la ATPsintasa para la fosforilación del ADP. Por esta razón, al utilizar los sustratos dependientes del complejo I se observa un mayor C.R., en comparación con el obtenido al emplear NADH externo.

Con respecto al potencial transmembranal, se esperaría una mayor generación de éste con la oxidación de sustratos que alimentaran al complejo I, en comparación con el potencial generado por la oxidación del NADH exógeno o del succinato. Simplemente, por el número de protones translocados. Sin embargo, el  $\Delta\Psi$  determinado al emplear NADH o succinato como sustratos respiratorios, es de la misma magnitud que empleando sustratos como el piruvato-malato, o glutamato-malato. En el caso del piruvato, esto podría deberse a que, como se ha observado anteriormente en plantas, la actividad de la oxidasa alterna es estimulada por  $\alpha$ -cetoácidos, siendo el piruvato el más efectivo (Millar y *cols.*, 1993). Sin embargo en estudios realizados en algunos hongos, no se ha observado la inducción de la oxidasa alterna por piruvato, debido a que estas enzimas se encuentran siempre como monómeros, pues carecen de residuos de cisteína que estén involucrados en la dimerización (Umbach y Siedow, 2000; Joseph-Horne y *cols.* 2000). Al ramificar la cadena de transporte de electrones, la actividad de los complejos III y IV disminuye, y por esta razón el potencial

generado es menor. Se ha observado también en plantas que al emplear succinato como sustrato respiratorio, la actividad de la AOX se presenta únicamente cuando la poza de ubiquinonas se encuentra en forma reducida al 50% (Dry y cols., 1989). Al utilizar succinato o NADH, el número de protones bombeados es menor, debido a que el transporte de electrones en la succinato deshidrogenasa o en la NADH deshidrogenasa externa no está acoplado a un bombeo de protones, y únicamente los complejos III y IV producen la diferencia en el potencial. Sin embargo, se genera un  $\Delta\Psi$  rápidamente en ambos casos, esto se debe a que la actividad catalítica de estas deshidrogenasas es más rápida que la del complejo I.

Para el caso del  $\alpha$ -cetoglutarato, se encontró que la rapidez del consumo de oxígeno en el estado IV fue relativamente menor, en comparación con otros sustratos que también donan sus electrones para reducir al  $\text{NAD}^+$  de la matriz por medio de las deshidrogenasas correspondientes. Esta disminución en el consumo de oxígeno en el estado estacionario genera un incremento notable en el C.R., obteniendo un valor de  $4.19 \pm 0.29$ . Lo cual coincide con los trazos de  $\Delta\Psi$  de la figura 5, en donde al utilizar  $\alpha$ -cetoglutarato como sustrato, el potencial tarda en generarse y es relativamente menor que el producido con los demás sustratos. Estas diferencias pueden explicarse si se postula que el  $\alpha$ -cetoglutarato es transportado lentamente al interior de la matriz. No se puede pensar que la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa sea lenta, porque en el estado III si se observa gran aceleración de su actividad. El transporte de  $\alpha$ -cetoglutarato posiblemente se acelere en el estado fosforilante y sea ésta la razón por la cual el consumo de

oxígeno en el estado III sea mayor. Cabe mencionar que el potencial transmembranal se determinó en el estado no fosforilante, es decir, la mezcla de reacción no contiene ADP para llevar a cabo la síntesis de ATP.

#### *Efecto del fosfato sobre la permeabilidad.*

El fosfato se ha caracterizado por ser uno de los principales moduladores del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial tanto en mamíferos, donde abre el poro (Günter y Pfeiffer, 1990; Crompton, 1999) como en levaduras donde lo cierra (Cortés y cols., 2000). En *S. cerevisiae* se ha propuesto que el Pi actúa por fuera de la mitocondria para inhibir el hinchamiento inducido por ATP (Guérin y cols., 1994). Sin embargo existen datos contradictorios que indican que el sitio de acción del Pi está de lado de la matriz, ya que en presencia de mersalil, un inhibidor del transporte de Pi, éste no presenta ningún efecto (Cortés y cols., 2000). Además del Pi, recientemente se ha establecido que el sulfato y el arsenato protegen a la mitocondria de levadura en contra de los efectos del K<sup>+</sup> sobre la apertura del YMUC (Cortés y cols., 2000).

En los resultados obtenidos con *Yarrowia lipolytica* el fosfato no presentó ningún efecto sobre la transición de la permeabilidad mitocondrial. Los controles respiratorios a diferentes concentraciones de Pi variaron ligeramente, a diferencia de lo que ocurre en mitocondrias de *S. cerevisiae*, en donde la apertura del YMUC por bajas concentraciones de Pi (0.4 mM) disminuyen el cociente respiratorio hasta 1.0 (Manon y cols. 1998; Pérez-Vázquez y cols., 2003). En cambio, se observa un efecto protector al incrementar la concentración de Pi hasta 5 mM (Velours y cols., 1997). Es decir, en mitocondrias de *Yarrowia lipolytica*, el Pi a

bajas concentraciones no presentó un efecto desacoplante, ya que el C.R. se mantuvo elevado, debido a que no hay una diferencia importante en la rapidez de consumo de oxígeno entre los estados estacionario y fosforilante. El potencial transmembranal se mantiene excepcionalmente estable en todas las concentraciones probadas e incluso en ausencia de Pi. Lo cual concuerda con el acoplamiento observado en los resultados de oximetría. De igual modo, al medir el potencial transmembranal, el calcio tampoco parece tener un efecto desacoplante sobre las mitocondrias de *Y. lipolytica* (resultados no mostrados), a diferencia de lo que ocurre con las mitocondrias de mamíferos, en donde este catión abate el potencial (Günter y Pfeiffer, 1990).

Con respecto al hinchamiento mitocondrial, no se observó un efecto del Pi en ninguna de las concentraciones utilizadas. El  $\text{Ca}^{2+}$  y el ATP que son moduladores de la apertura del PTP y del YMUC, respectivamente (Crompton, 1999; Jung y cols., 1997; Guerin y cols. 1994), tampoco tienen ningún efecto sobre el hinchamiento mitocondrial provocado por la entrada de  $\text{K}^+$  en las mitocondrias aisladas de *Yarrowia lipolytica*.

#### *El papel de la oxidasa alterna. Actividad y función en el metabolismo mitocondrial de Yarrowia lipolytica.*

Desde hace varios años, Aleksandr Medentsev y cols. (1999) han estudiado la respiración resistente a cianuro en *Yarrowia lipolytica*, encontrando que la oxidasa alterna es inducida en el cambio de la fase exponencial a la fase estacionaria (Medentsev y cols., 1999). Por otro lado, estudios realizados por el mismo grupo revelaron que con la adición de cianuro se estimula el consumo de oxígeno

(Medentsev y Akimenko, 1999). De igual manera, en otras levaduras (*Debaryomyces hansenii* y *Pichia membranifaciens*), la adición de antimicina A, cianuro o azida incrementa el consumo de oxígeno, por la acción de la AOX (Veiga y cols. 2003). En este trabajo, a diferencia de lo observado por Medentsev y Veiga, se observó una inhibición por cianuro hasta del 80% en las concentraciones más altas. Estos resultados no son contradictorios, ya que la estimulación del consumo de oxígeno observado por Medentsev y cols. se determinó en mitocondrias aisladas de células en transición de la fase logarítmica a la fase estacionaria, en donde la actividad de la AOX es mayor. En cambio, la inhibición por cianuro sobre el consumo de oxígeno se observó en mitocondrias aisladas de células en fase logarítmica. En este caso, se observó que sí hay actividad de la oxidasa alterna, debido a que la inhibición no fue completa, pero no aumenta el consumo de oxígeno al adicionar cianuro.

Una de las posibles funciones del canal inespecífico mitocondrial de *S. cerevisiae* es la disipación de energía. A concentraciones elevadas de ATP y bajas de Pi y ADP (es decir, carga energética alta) las células no requieren producir más energía. Es posible que debido a ello, el YMUC se encuentre abierto para abatir el potencial transmembranal y de este modo, disminuir la síntesis de ATP (Pérez-Vázquez y cols., 2003). Por otro lado, *Y. lipolytica*, al poseer componentes alternos en su cadena respiratoria (NDH externa y AOX), el transporte de electrones se encuentra ramificado. De esta manera, es capaz de llevar a cabo la oxidación de algunos sustratos sin la generación de una fuerza protón motriz utilizada por la  $F_1F_0$ -ATPasa para la síntesis de ATP (Akimenko y cols., 1979). De este modo,

*Yarrowia lipolytica* no necesitaría un canal inespecífico para la disipación de la energía. Se postula que la oxidasa alterna de *Y. lipolytica* puede sustituir al poro de transición en cuanto a su función oxidante de la poza de quinonas. Esto a su vez, resultaría en la disminución de radicales libres producidos a este nivel.

En algunas especies de plantas, en las que se encuentran componentes alternos y por ende tienen una cadena de transporte de electrones ramificada, se han encontrado canales inespecíficos que inducen una transición de la permeabilidad en estas mitocondrias (Fortes y cols., 2001; Arpagus y cols., 2002; Yao y cols., 2004). Sería interesante estudiar si las mitocondrias de *Ustilago maydis* y *Neurospora crassa*, que también tienen oxidasas alternas, presentan poros de transición de la permeabilidad.



## CONCLUSIONES

En medio YD *Y. lipolytica* crece predominantemente en forma de levadura produciendo una gran cantidad de biomasa.

Las mitocondrias obtenidas se encuentran acopladas. Se confirma que la cadena respiratoria de *Y. lipolytica* se encuentra ramificada por la presencia de una NADH deshidrogenasa y una oxidasa alterna.

En las condiciones probadas no fue posible identificar un poro de transición regulado por Pi.

El fosfato tuvo un efecto ligero sobre el consumo de oxígeno, mientras que el  $\Delta\Psi$  no resultó afectado.

La oxidasa alterna presente en *Yarrowia lipolytica*, puede controlar la producción de especies reactivas de oxígeno por la alta velocidad que exhibe.

Es posible que gracias a la AOX estas mitocondrias no requieran un poro de transición de la permeabilidad para la disipación de energía.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Åkerman, K.E.O., y Wikstrom, M.K.F. (1976). Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.* **68**, 191–197
2. Akimenko, V.K., Golovchenko, N.P., y Medentsev, A.G. (1979). The absence of energy conservation coupled with electron transfer via the alternative pathway in cyanide-resistant yeast mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **545**, 398-403
3. Arpagus, S., Rawlyer, A., y Braendle, R. (2002). Ocurrente and characteristics of the mitochondrial permeability transition in plants. *J. Biol. Chem.* **277**, 1780-87
4. Barth, G., y Gaillardin, C. (1997). Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews* **19**; 219-37
5. Bernardi, P., Broekemeier, K.M. y Pfeiffer, D.R. (1994). Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporine-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**, 509-17
6. Bernardi, P., y Petronilli, B. (1996). The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal. *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**, 131–138
7. Clifton, R., Lister, R., Parker, K.L., Sappl, P.G., Elhafez, D., Millar, A.H., Day, D.A., y Whelan J. (2005). Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **58**:193–212
8. Cortés, P., Castrejón, V., Sampedro J.G., y Uribe S. (2000). Interactions of arsenate, sulfate and phosphate with yeast mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1456**, 67-76
9. Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* **341**, 233–249
10. Davidson, A.M., y 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<sup>2+</sup>], but not by butyrate. Evidence for two distinct swelling mechanisms. *Biochem J.* **268**, 147-152
11. De Vries, S., van Witzenburg, R., Grivell, L.A., y Marres, C.A.M. (1992). Primary structure and import pathway of the rotenone-insensitive NADH-ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **203**, 587-592
12. Dry, I.B., Moore, A.L., Day, D.A. y Wiskich, J.T. (1989). Regulation of alternative pathway activity in plant mitochondria: nonlinear relationship between electron flux and the redox poise of the quinone pool. *Arch. Biochem. Biophys.* **272**, 148-157
13. Echtay, K.S., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabsons, M.B., Cadenas, S., Stuart, J.A., Harper, J.A., Roebuck, S.J., Morrison, A., y Pickering, S. (2002). Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* **415**, 96-99

14. Estabrook, R.W. (1967). Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurements of ADP : O ratios. *Methods Enzymol.* **10**, 41–47
15. Fortes, F., Castilho, R.F., Catisti, R., Carnieri, E.G. y Vercesi, A.E. (2001). Ca<sup>2+</sup> induces a cyclosporine A-insensitive permeability transition pore in isolated potato tuber mitochondria mediated by reactive oxygen species. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 43-51
16. Galkin, A., y Brandt, U. (2005). Superoxide radical formation by pure complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica*. *J. Biol. Chem.* **280**, 34; 30129-35
17. Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A., y Fink, G.R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth regulation by starvation and RAS. *Cell* **68**, 1077-1090
18. Goglia, F., Skulachev, V.P. (2003). A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet. *Faseb J.* **12**, 1585-91
19. González-Meler, M.A., Ribas-Carbo, M., Giles, L., y Siedow, J.N. (1999). The effect of growth and measurement temperature on the activity of the alternative respiratory pathway. *Plant Physiol.* **120**, 765–772
20. Gornal, A.G., Bardavill, C.J., y David, M.M. (1949). Determination of serum protein by means of the biuret reaction *J. Biol. Chem.* **177**, 751–760
21. Guerin, B., Bunoust, O., Rouqueys, V., y Rigoulet, M. (1994). ATP-induced unspecific channel in yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **269**, 25406-10
22. Gunter, T.E., y Pfeiffer, D.R. (1990). Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol.* **258**, 755-786
23. Guo J., y Lemire, B.D. (2003). The ubiquinone-binding site of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate-ubiquinone oxidoreductase is a source of superoxide. *J. Biol. Chem.* **278**, 48; 47629-35
24. Halestrap, A.P., y Davidson A.M. (1990). Inhibition of Ca<sup>2+</sup>-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem. J.* **268**, 153–160
25. Hatefi, Y., Haavik, A.G., y Griffiths, D.E. (1962). Studies on the electron transfer system. XLI. Reduced coenzyme Q (QH<sub>2</sub>)-cytochrome c reductase. *J. Biol. Chem.* **237**, 1681-5
26. Hederstedt, L., y Onhishi, T. (1992). *Molecular Mechanisms in Bioenergetics* (Ernster, L., ed) pp. 163-197, Elsevier Science Publishers, New York
27. Helmerhorst, E.J., Stan, M., Murphy, M.P., Sherman, F., y Oppenheim, F.G. (2005). The concomitant expression and availability of conventional and alternative, cyanide-insensitive, respiratory pathways in *Candida albicans*. *Mitochondrion* **5**, 200-211

28. Hinchliffe, P., y Sazanov, L.A. (2005). Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I. *Science* **309**, 771-774
29. Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., y Michel, H. (1995). Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* **376**, 660-669
30. Jarmuszkiewicz, W., Sluse-Goffart, C.M., Hryniewiecka, L., y Sluse, F.E. (1999). Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Biol. Chem.* **274**, 23198–202
31. Jarmuszkiewicz, W., Behrendt, M., Navet, R., y Sluse, F.E. (2002). Uncoupling protein and alternative oxidase of *Dictyostelium discoideum*: occurrence, properties and protein expression during vegetative life and starvation-induced early development, *FEBS Lett.* **532**, 459–464
32. Joseph-Horne, T., Babji, J., Wood, P.M., Hollomon, D.W., y Sessions, R.B. (2000). New sequence data enable modelling of the fungal alternative oxidase and explain an absence of regulatory by pyruvate. *FEBS Lett.* **481**, 141-146
33. Joseph-Horne, T., Hollomon, D.W., y Wood, P.M. (2001). Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim. Biophys. Acta* **1504**, 179-195
34. Juarez, O., Guerra, G., Martínez, F., y Pardo, J.P. (2004). The mitochondrial respiratory chain of *Ustilago maydis*. *Biochim. Biophys. Acta* **1658**, 244-251
35. Jung, D.W., Bradshaw, P., y Pfeiffer, D.R. (1997). Properties of a cyclosporin-insensitive permeability transition pore in yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **272**, 21104-12
36. Kerscher, S., Dröse, S., Zwicker, K., Zickermann, V., y Brandt, U. (2002). *Yarrowia lipolytica*, a yeast genetic system to study mitochondrial complex I. *Biochim. Biophys. Acta* **1555**, 83-91
37. Kerscher, S., Okun, J.G., y Brandt, U. (1999). A single external enzyme confers alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase activity in *Yarrowia lipolytica*. *J. Cell Sci.* **112**, 2347-2354
38. Laloi, M., Klein, M., Riesmeier, J.W., Muller-Rober, B., Fleury, C., Bouillaud, F., y Ricquier, D. (1997). A plant cold-induced uncoupling protein *Nature* **389**, 135–136
39. Lambers, H. (1980). The physiological significance of the cyanide-resistant respiration in higher plants. *Plant Cells Env.* **3**, 293-302
40. Lambers, H. (1982). Cyanide-resistant respiration: a nonphosphorylating electron transport pathway acting as an energy flow. *Physiol. Plant.* **55**, 478-485
41. Ledesma, A., García de Lacoba, M., y Rial, E. (2002). The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biology* **3**, 30151-30159
42. Lemire, B.D., y Oyedotun, K.S. (2002). The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate:ubiquinone oxidoreductase. *Biochim. Biophys. Acta* **1553**, 102-116

43. Luttik, M.A.H., Overkamp, K.M., Kötter, P. de Vries, S., van Dijken, P., y Pronk, J.T. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *J. Biol. Chem.* **273**, 24529-34
44. Manon, S., Roucou, X., Guerin, M., Rigoulet, M., y Guerin, B. (1998). Minireview: Characterization of the yeast mitochondria unselective channel: a counterpart to the mammalian permeability transition pore? *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 419–429
45. Mariano, A.B., Valente, C., Cadena, S.M., Rocha, M., de Oliveira, M., y Carnieri, E. (2005). Sensitivities of the alternative respiratory components of potato tuber mitochondria to tito reagents and  $\text{Ca}^{2+}$ . *Plant Physiology and Biochemistry* **43**, 61–67
46. Marres, C.A.M., de Vries, S., y Grivell, L.A. (1991). Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenone-insensitive internal NADH: ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **195**, 857-862
47. Medentsev, A.G. y Akimenko, V.K. (1999). Development and activation of cyanide-resistant respiration in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochemistry (Moscow)* **64**, 945-951
48. Medentsev, A.G., Arinbasarova, A.Y. y Akimenko V.K. (1999). Regulation and physiological role of cyanide-resistant respiration in fungi and plants. *Biochemistry (Moscow)* **64**, 1457-1472
49. Meeuse, B.J.D. (1975). Thermogenic respiration in aroids. *Annu.Rev. Plant Physiol.* **26**, 117-126
50. Millar, A.H., Wiskich, J.T., Whelan, J. y Day, D.A. (1993). Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett.* **329**, 259-262
51. Millenaar, F.F., Benschop, J.J., Wagner, A.M., y Lambers, H. (1998). The role of the alternative oxidase in stabilizing the in vivo reduction state of the ubiquinone pool and the activation state of the alternative oxidase. *Plant Physiol.* **118**, 599-607
52. Miroux, B., Frossard, V., Raimbault, S., Ricquier, D., Bouillaud, F. (1993). The topology of the brown adipose tissue mitochondrial uncoupling protein determined with antibodies against its antigenic sites revealed by a library of fusion proteins. *EMBO J.* **12**, 3739-45
53. Moore, A.L., y Siedow, J.N. (1991). The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochi. Biophys. Acta* **1059**, 121-140
54. Navet, R., Douette, P. Puttine-Marique, F., Sluse-Goffart, C.M., Jarmuszkiewicz, W., y Sluse, F.E. (2005). Regulation of uncoupling protein activity in phosphorylating potato tuber mitochondria. *FEBS Lett.* **579**, 4437–42
55. Nicholls, D.G., y Ferguson, S.J. (2002). *Bioenergetics* (3<sup>a</sup> ed.) Capítulo 5, Academic Press
56. Nicholls, D.G. y Locke, R.M. (1984). Thermogenic mechanisms in brown fat. *The American Physiol. Soc.* **64**, 1-64

57. Odds, F.C. (1985). Morphogenesis in *Candida albicans*. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **12**, 45-93
58. Osyczka, A., Moser, C.C., y Dutton, P.L. (2005). Fixing the Q cycle. *Trends in Biochemical Science*, **30**, 176-182
59. Peña, A., Piña, M. Z., Escamilla, E., y Piña, E. (1977). A novel method for the rapid preparation of coupled yeast mitochondria. *FEBS Lett.* **80**, 209–213
60. Petronilli, V., Cola, C., y Bernardi, P. (1993). Modulation of the mitochondrial cyclosporine A-sensitive permeability transition pore. II. The minimal requirements for pore induction underscore a key role for transmembrane electrical potential, matrix pH, and matrix  $Ca^{2+}$ . *J. Biol. Chem.* **268**, 1011-1016
61. Pérez-Campo, F.M. y Domínguez, A. (2001). Factors affecting the morphogenetic switch in *Yarrowia lipolytica*. *Curr. Microbiol.* **43**, 429-433
62. Pérez-Vázquez, V., Saavedra-Molina, A., y 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
63. Popov, V.N., Simonian, R.A., Skulachev, V.P., y Starkov, A.A. (1997). Inhibition of the alternative oxidase stimulates  $H_2O_2$  production in plant mitochondria. *FEBS Lett.* **415**, 87-90
64. Ricquier, D., y Kader, J.-C. (1976). Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **73** 577–583
65. Ricquier, D., y Bouillaud, F. (2000). The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem. J.* **345**, 161–179
66. Ruiz-Herrera, J., y Sentandreu, R. (2002). Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Arch. Microbiol.* **178**, 477-483
67. Ruiz-Herrera, J., León, C.G., Guevara-Olvera, L., y Cárabez-Trejo, A. (1995). Yeast-mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis*. *Microbiology* **141**, 695-703
68. Schonbaum, G.S., Bonner, W.D., Storey, B.T., y Bahr, J.T. (1971). Specific inhibition of the cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hydroxamic acids. *Plant Physiol.* **47**, 124-128
69. Siedow, J.N., y Umbach, A.L., (2000). The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 432–439
70. Storey, B.T. (1976). The respiratory chain of plant mitochondria. XIII: Point of interaction of the alternative oxidase with the respiratory chain. *Plant Physiol.* **58**, 521-525

71. Szabo, R. (1999). Dimorphism in *Yarrowia lipolytica*: filament formation is suppressed by nitrogen starvation and inhibition of respiration. *Folia Microbiol.* **44**, 19-24
72. Szabo, R., y Štofániková, V. (2002). Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Lett.* **206**, 45-50
73. Trumpower, B.L. (1990). The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc<sub>1</sub> complex. *J. Biol. Chem.* **265**, 11409-12
74. Umbach, A.L., y Siedow, J.N. (2000). The cyanide-resistant alternative oxidases from the fungi *Pichia stipitilis* and *Neurospora crassa* are monomeric and lack regulatory features of the plant enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **378**, 234-245
75. Uribe, S., Ramírez, J., y Peña, A. (1985). Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. *J. Bacteriol.* **161**, 1195-2000
76. Vanlerberghe, G.C., y McIntosh, L. (1992). Coordinate Regulation of Cytochrome and Alternative Pathway Respiration in Tobacco. *Plant Physiol.* **100**, 1846-51
77. Veiga, A., Arrabaça, J.D., Sansonetty, F., Ludovico, P., Côrte-Real, M., y Lourerio-Dias, M.C. (2003). Energy conversion coupled to cyanide-resistant respiration in the yeast *Pichia membranifaciens* and *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res.* **3**, 141-148
78. Velours, J., Rigoulet, M., y Guerin, B. (1977). Protection of yeast mitochondrial structure by phosphate and other proton donating anions. *FEBS Lett.* **81**, 18-22
79. Walker, J.E. (1992). The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Q. Rev. Biophys.* **25**, 253-324
80. Wikstrom, M. (1998). Proton translocation by bacteriorhodopsin and heme-copper oxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 480-488
81. Xia, D., Yu C.A., Kim H., Xia, J.Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L., y Deisenhofer, J. (1997). Crystal structure of the cytochrome bc<sub>1</sub> complex from bovine heart mitochondria. *Science*, **277**, 60-66
82. Yao, N., Eisfelder, B.J., Marvin, J., y Greenberg, J.T. (2004). The mitochondrion: an organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **40**, 596-610