



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Desarrollo de un método para la evaluación de la
respiración mitocondrial en tubos polínicos.**

TESIS

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

P R E S E N T A:

DIANA JAZMIN ORTIZ JIMENEZ



Ciudad Universitaria, CDMX, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado:

Presidente **Profesor: J. ELEAZAR MARTINEZ BARAJAS**

Vocal **Profesor: EUCLIDES AVILA CHAVEZ**

Secretario **Profesor: MANUEL GUTIERREZ AGUILAR**

1er suplente **Profesora: NURIA VICTORIA SANCHEZ PUIG**

2do suplente **Profesor: JAVIER OXOSCO MARIN**

Sitio donde se desarrolló el tema:

Lab 115 Departamento de Bioquímica

Edificio E, Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México,

Coyoacán, CDMX. C.P. 04510

México

Sustentante:
Diana Jazmín Ortiz Jiménez

Tutor:
Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar

Agradecimientos

Esta tesis se realizó con el apoyo del proyecto DGAPA-PAPIIT IA203419 “Regulación genética de la transición de la permeabilidad mitocondrial en *Arabidopsis thaliana*”

Se agradece el apoyo de la Dra. Sobeida Sánchez Nieto y el Dr. Felipe Cruz García por proporcionar materiales vegetales y reactivos necesarios para la culminación del presente estudio.

De igual forma, agradecimientos al estimado jurado, por su guía, tiempo y apoyo en la realización de este escrito, cada una de las aportaciones, observaciones y sugerencias fueron muy enriquecedoras.

Índice

Resumen	9
1. Introducción	10
1.1 La mitocondria y la respiración celular	10
1.2 La fosforilación oxidativa	11
1.3 Cadena transportadora de electrones mitocondrial	12
1.4 Cadenas respiratorias ramificadas: NADH deshidrogenasas y Oxidasas Alternas	14
1.5 Importancia de la Oxidasa Alterna	16
1.6 Inhibidores de la respiración celular	17
1.7 <i>Nicotiana tabacum</i> como modelo de estudio	19
1.8 Las mitocondrias de tubos polínicos	19
1.9 Respiración mitocondrial medida por oximetría	21
2. Planteamiento del problema	24
3. Hipótesis	25
4. Objetivos	25
4.1 Objetivo general	25
4.2 Objetivos particulares	25
5. Materiales y métodos	25
5.1 Material Vegetal	26
5.2 Soluciones de aislamiento, de medición y reactivos	26
6. Diseño experimental	29
6.1 Cosecha de polen	29

6.2 Germinación de tubos polínicos	30
6.3 Ensayo de consumo de oxígeno	30
6.4 Inmunodetección de AOX en tubos polínicos	36
7. Resultados	37
7.1 Cosecha, germinación y permeabilización de tubos polínicos	37
7.2 Respiración mitocondrial de tubos polínicos	39
7.3 Inmunodetección de AOX en tubos polínicos de <i>N. tabacum</i> .	41
8. Discusión	43
9. Conclusiones	48
10. Bibliografía	49
Anexos	53

Índice de Figuras y Tablas

Figura	Contenido	Página
1	Representación de los componentes clásicos en una cadena respiratoria.	18
2	Representación de la organización intracelular del tubo polínico.	20
3	Representación de las reacciones de óxido reducción involucradas en el oxímetro.	23
4	Ensayo de consumo de oxígeno. Estado 3 y estado 4.	32
5	Grafico del estado 3 y del estado 4.	33
6	Ensayo de consumo de oxígeno con Cianuro y SHAM.	34
7	Ensayo de consumo de oxígeno con Propilgalato y Cianuro.	35
8A	Flores maduras de <i>N. tabacum</i> .	38
8B	Contabilización de los tipos polínicos de <i>N. tabacum</i> .	38
8C	Tubos polínicos permeabilizados, teñidos con Azul de Evans.	38
9	Gráfico de la evaluación de la respiración mitocondrial sensible a Cianuro y a SHAM.	39
10	Gráfico de la evaluación de la respiración mitocondrial sensible a Cianuro y a Propilgalato.	41
11	Inmunodetección de AOX	42
12	Modelo de la estructura de la NtAOX, basado en el modelo de la AOX de <i>T. brucei</i> .	45

Definiciones de abreviaturas del presente texto

ADP: Adenosin difosfato.

AOX: Oxidasa alterna

ATP: Trifosfato de adenosina

CCP: Fenilhidrazonas de cianuro de carbonilo

DNA: ácido desoxirribunucleico

FADH₂: Flavín adenín dinucleótido

GOx: Glucosa Oxidasa

MES: ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico

NADH: Nicotin adenin dinucleótico

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

PG: Propilgalato

RCR: Relación del control respiratorio

RNA: ácido ribonucleico

SHAM: Acido salicilhidroxámico

Resumen.

Las mitocondrias son organelos responsables de múltiples procesos. Entre ellos destacan la síntesis de grupos hemo, aminoácidos y la degradación de ácidos grasos. Las mitocondrias también son responsables de la fosforilación oxidativa en los tejidos aeróbicos. En este proceso metabólico, las cadenas respiratorias clásicas y alternas de la membrana interna mitocondrial catalizan la oxidación de nutrimentos orgánicos y utilizan al oxígeno molecular como aceptor final de electrones.

En el presente trabajo se desarrolló un método para detectar y caracterizar una probable cadena respiratoria mitocondrial alterna en tubos polínicos de *N. tabacum*. Se realizaron ensayos de consumo de oxígeno para evaluar la respiración mitocondrial de los tubos polínicos en presencia de diferentes inhibidores de la cadena transportadora de electrones, además se realizó un Western Blot para la identificación de una posible oxidasa alterna. Los resultados indican que las mitocondrias de los tubos polínicos de *N. tabacum* expresan una oxidasa alterna. Por lo tanto, se logró desarrollar el método para la evaluación de la respiración mitocondrial en tubos polínicos, corroborando la presencia de una oxidasa alterna, la cual es relevante por su papel en la disminución de especies reactivas de oxígeno en condiciones como senescencia o en presencia de estrés abiótico o biótico.

1 Introducción

1.1 La mitocondria y la respiración celular.

Las mitocondrias son los organelos responsables de múltiples procesos entre los que destacan la síntesis de grupos hemo, el ciclo de la urea, la degradación de ácidos grasos y son fundamentales para la respiración celular y la fosforilación oxidativa en los tejidos aeróbicos. En los diferentes tipos de células, las mitocondrias varían en tamaño número y forma. Físicamente, las mitocondrias están constituidas por una doble membrana que envuelve a la matriz mitocondrial [Frey y Mannella, 2000]. La membrana externa forma pliegues y rodea completamente al orgánulo. Esta membrana es altamente permeable a iones y metabolitos gracias a porinas, las cuales permiten el transporte de moléculas cuya masa no excede los 5 kDa [Choudhary y cols., 2010]. Por otra parte, la membrana interna presenta invaginaciones denominadas crestas que le proporcionan una gran área superficial [Mannella y cols., 2013]. El compartimento interno de la mitocondria -la matriz- es una disolución acuosa muy concentrada con un elevado número de enzimas e intermediarios químicos implicados en el metabolismo energético [Nicholls y Ferguson, 2013]. Adicionalmente, cada mitocondria contiene sus propias moléculas de DNA, de RNA y sus propios ribosomas. El DNA mitocondrial codifica ciertas proteínas específicas de la membrana mitocondrial interna, pero la gran mayoría de proteínas mitocondriales

están codificadas por el DNA nuclear [Yan y cols., 2019; Pfanner y cols., 2019].

Las mitocondrias contienen enzimas que catalizan la oxidación de nutrimentos orgánicos y utilizan el oxígeno molecular (O_2) como aceptor final de electrones. Algunas de estas enzimas se encuentran en la matriz mitocondrial y otras embebidas en la membrana interna [Nicholls y Ferguson, 2013]. La energía química que se libera en las oxidaciones mitocondriales se utiliza para generar ATP, la principal molécula fisiológica cuya hidrólisis está asociada a la catálisis de procesos dependientes de energía [Walker, 2013].

1.2 La fosforilación oxidativa.

La fosforilación oxidativa es el proceso donde se produce la mayor cantidad de ATP en las células, necesario para el normal desarrollo de las funciones biológicas de los organismos. La fosforilación oxidativa ocurre específicamente en la membrana mitocondrial interna e involucra reacciones químicas (óxido-reducción) y de transporte de iones y moléculas [Nicholls y Ferguson, 2013].

La fosforilación oxidativa forma parte del catabolismo aerobio el cual utiliza al piruvato formado por la oxidación de glucosa como molécula inicial. El piruvato es condensado para formar Acetil-CoA. Esta molécula alimenta al ciclo de los ácidos tricarboxílicos o Ciclo de Krebs. Es en

esta serie de reacciones en donde se forman grandes cantidades de coenzimas reducidas (NADH y FADH₂) las cuales alimentan a la cadena respiratoria. Cabe mencionar que este proceso consta de dos partes que están acoplados entre sí: una oxidativa, que comprende una serie de reacciones de transferencia de electrones a partir de la oxidación de sustratos y una fosforilante, en donde el fosfato inorgánico (Pi) se esterifica al ADP para formar ATP.

La parte oxidativa está integrada por una serie de reacciones de oxido-reducción asociada a un conjunto de complejos proteicos llamados en conjunto cadena respiratoria o cadena transportadora de electrones. Los electrones son aceptados y transferidos secuencialmente por complejos de proteínas que están en la membrana interna mitocondrial.

1.3 Cadena transportadora de electrones mitocondrial.

La cadena respiratoria está formada por una serie de proteínas agrupadas en complejos con funciones de transporte de electrones. Diversos centros redox en subunidades formadores de cada complejo son capaces de experimentar cambios reversibles en su potencial. En forma adicional, tales subunidades son capaces de canalizar electrones a partir de la oxidación de moléculas orgánicas como la ubiquinona; dinucleótidos de nicotínamida como el NAD(P)H o estructuras proteicas como las flavoproteínas, las hierro-sulfoproteínas y los citocromos. La

presencia de estos componentes en la membrana interna mitocondrial permite ligar a los componentes de la cadena respiratoria en un ordenamiento secuencial que facilita la transferencia de electrones entre ellos, lo que determina una alta eficiencia del sistema y culmina cuando el aceptor final de electrones es reducido. En mamíferos, plantas y levaduras, tal aceptor final de electrones es el O₂.

En resumen, la cadena respiratoria está formada por:

- 4 complejos proteicos: los Complejos I, II, III y IV, embebidos en la membrana mitocondrial interna.
- 2 complejos accesorios: NADH deshidrogenasas y oxidasas alternas.
- 2 moléculas acarreadoras móviles: la Coenzima Q o Ubiquinona y el citocromo C que es una proteína periférica.
- La ATP sintasa que es el complejo V, cuya función es fosforilar al ADP para generar ATP.

En mitocondrias de plantas, la transferencia de electrones entre los complejos respiratorios proviene del NADH o del FADH₂ -que se forman en el Ciclo de Krebs- y donan sus electrones a nivel de los complejos respiratorios I y II, respectivamente. La transferencia de electrones entre los complejos está dada en función de los potenciales de óxido-reducción de los grupos prostéticos de los mismos. La transferencia se da del grupo con potencial más negativo al más positivo, de modo que

en condiciones fisiológicas se trata de un proceso espontáneo [Nicholls y Ferguson, 2013].

Los electrones del NADH y del FADH₂ entran a la cadena respiratoria y en forma adicional se disocian H⁺ a estas moléculas. De este modo, los e⁻ son “canalizados” de manera horizontal por lo complejos respiratorios, mientras que los H⁺ disociados son bombeados por las bombas primarias de los complejos respiratorios al otro lado de la membrana interna mitocondrial. Esto genera un gradiente en la concentración de H⁺ y una diferencial de cargas en ambos lados de la membrana interna mitocondrial. Esta dualidad de carga eléctrica está asociada a la generación de trabajo cuando transportadores u otras proteínas la utilizan para mantener el metabolismo y es conocida como la fuerza protón-motriz [Nicholls y Ferguson, 2013].

1.4 Cadenas respiratorias ramificadas: NADH deshidrogenasas y Oxidasas Alternas.

Las mitocondrias de plantas y algunas levaduras presentan vías de oxidación mitocondrial no dependientes de la citocromo oxidasa. A estas vías se les llama vías alternas. Entre estas destacan las NADH deshidrogenasas y las oxidasas alternas (AOX), que catalizan la oxidación de NADH y reducción de ubiquinonas y la oxidación del

ubiquinol y la reducción de O₂ a H₂O respectivamente [Wang, et al. 2011].

En *Arabidopsis thaliana*, se han descrito 7 NADH deshidrogenasas mitocondriales [Schertl y Braun, 2014]. Estas enzimas se sobreexpresan en condiciones de elevada luz y tal fenotipo ha sido asociado a un mecanismo de protección de flujo de electrones no acoplado a los componentes clásicos de la cadena respiratoria y con ello disminuir el estrés oxidante [Rasmusson AG1, Geisler DA, Møller IM., 2008]. En la levadura del pan *Saccharomyces cerevisiae* se han descrito tres NADH deshidrogenasas: una en la parte interna de la membrana interna mitocondrial, también conocida como Ndi1p, y dos en la parte externa de la membrana interna mitocondrial, también conocidas como Nde1p y Nde2p [Bunoust y cols., 2005].

La oxidasa alterna es una ubiquinol:O₂ óxidoreductasa y no es una bomba primaria, es decir, no genera un bombeo de protones asociado al flujo de electrones. Fisiológicamente, la AOX está vinculada a una reducción en el rendimiento energético de la fosforilación oxidativa. La AOX está codificada por una pequeña familia de genes nucleares, proteínas de membrana en el lado de la matriz interna, y que forma homodímeros. Muchos de los miembros de la familia de genes AOX contienen un regulador conservado, el cual confiere un estricto control bioquímico que vincula su actividad a las condiciones metabólicas en conflicto dentro de la mitocondria [Wang et al. 2011].

Debido a su naturaleza no conservadora de energía, se tiene interés por entender el metabolismo y el papel fisiológico de la respiración mediada por la AOX, además de su papel ya establecido para generar calor en tejidos termogénicos [Sánchez, 1980].

Actualmente no se cuenta con un modelo de alguna oxidasa alterna de plantas derivado de un cristal. Sin embargo, dada la elevada homología entre estas enzimas con el modelo de *Trypanosoma brucei* disponible en la literatura [Shiba y cols., 2013], es posible hacer inferencias tanto sobre su estructura como mecanismo [McDonald y cols., 2006].

Cabe mencionar que la AOX podría desempeñar una serie de roles para la optimización del metabolismo respiratorio, así como la integración de este metabolismo con otras vías metabólicas. Además, se piensa que la AOX puede actuar para amortiguar especies reactivas de oxígeno que se generan en la cadena transportadora de electrones [McDonald y cols., 2006].

1.5 Importancia de la Oxidasa Alterna.

Existen diversos artículos que describen la importancia del estudio de la AOX, de modo que a continuación se describen algunas.

Se ha buscado de qué forma se puede aumentar la productividad de las plantas, tomando como alternativa reducir los gastos por la respiración. Por lo tanto, si una fracción de la respiración fuera poco eficiente en

producir ATP, su eliminación podría tener un impacto positivo en la productividad. Es por ello que se ha prestado atención a la fracción de la respiración que es insensible al cianuro, la antimicina y otros inhibidores de la cadena transportadora de electrones por la vía de los citocromos [Sánchez, 1980].

Además, se ha encontrado una relación funcional muy estrecha entre la AOX y un solo proceso fisiológico: la termogénesis.

Así mismo, en algunas especies la oxidasa está relacionada con la producción de calor por los tejidos florales que, a su vez se vincula con la polinización. En estos casos se está cumpliendo una función importante en la reproducción [Sánchez, 1980]. En tal sentido, sería lógico proponer que la termogénesis en tejidos florales podría contribuir a la polinización favoreciendo la volatilización de compuestos aromáticos con potencial quimioattractor.

1.6 Inhibidores de la respiración celular.

El acoplamiento de los procesos de transporte de electrones y de síntesis de ATP pueden ser modificados por agentes químicos o bien por la alteración física de la membrana mitocondrial [Nicholls y Ferguson, 2013]. Entre las sustancias capaces de inhibir la fosforilación oxidativa están por una parte las que se denominan desacopladores o desacoplantes. Entre ellas se encuentran los fenoles sustituidos

(pentaclorofenol, dinitrofenol, etc), las fenilhidrazonas de cianuro de carbonilo (CCCP), los ácidos grasos de cadena larga y algunos antibióticos (valinomicina). Variados procesos físicos como el tratamiento con soluciones hipotónicas o la congelación pueden desacoplar el mecanismo de conservación de la energía [Beconi, 1981].

La fosforilación oxidativa puede ser inhibida también por antibióticos como la oligomicina y la rutamicina, las cuales se les denomina inhibidores de la transferencia de energía y que pueden afectar simultáneamente la respiración y la fosforilación.

El uso de una gran variedad de inhibidores específicos ha resultado de especial utilidad para el desarrollo de los conocimientos sobre la estructuración de la cadena respiratoria y hoy día es una práctica común en los estudios de respiración celular [Beconi, 1981].

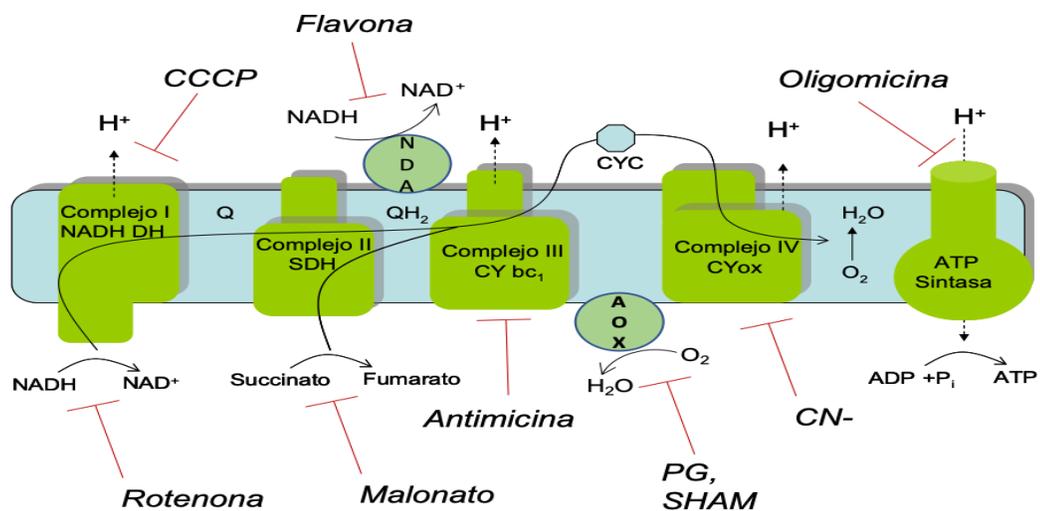


Figura 1. Representación de los componentes clásicos y alternos en una cadena respiratoria con sus respectivos inhibidores específicos. NDA: NADH deshidrogenasa alterna, AOX, oxidasa alterna.

1.7 *Nicotiana tabacum* como modelo de estudio.

Nicotiana tabacum es miembro de la familia *Solanaceae*, es uno de los modelos de estudio más importantes en plantas y presenta un alto valor agrícola y económico en todo el mundo [Wang and Bennetzen, 2015].

La planta del tabaco *N. tabacum* es utilizada en muchos laboratorios por su rápido crecimiento, su fácil reproducción y la posibilidad de generar plantas con mutaciones específicas considerando que su genoma se encuentra completamente secuenciado [Márton y cols., 1979; Sunderland and Wicks, 1971].

Adicionalmente, es relativamente fácil obtener células con alto contenido de mitocondrias entre las cuales destacan las raíces y los tubos polínicos [Taylor and Hepler, 1997].

Cabe mencionar que el progreso en tabaco se estima facilite los estudios genéticos, fisiológicos, de desarrollo y evolutivos en otras plantas, especialmente en cultivos que pertenecen a la misma familia taxonómica, tales como papa y tomate [Wang and Bennetzen, 2015].

1.8 Las mitocondrias de tubos polínicos.

Los tubos polínicos son gametofitos activos masculinos de las plantas con semillas, son los vectores portadores de las células espermáticas por lo que pueden ser considerados como células haploides

transportadoras de las células espermáticas, lo cual resulta de gran interés para estudios genéticos y moleculares.

Cabe mencionar que, los tubos polínicos experimentan un crecimiento llamado “crecimiento de la punta”, por consiguiente, estas células exhiben un comportamiento funcional altamente asimétrico, en procesos tales como flujo de iones, secreción y en arreglos citoesqueléticos, haciéndolos muy atractivos para estudios de biología celular [Malhó Rui, 2006].

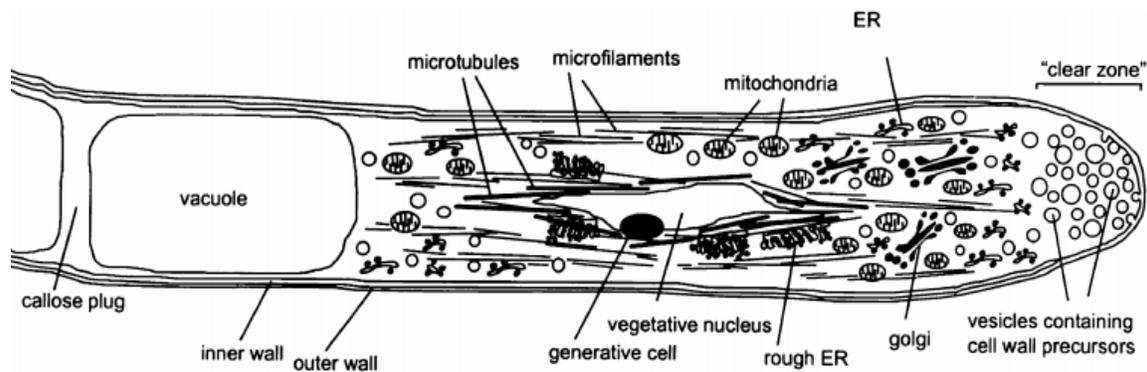


Figura 2. Representación de la organización intracelular del tubo polínico (Imagen tomada de Malhó Rui, 2006).

Ahora bien, las mitocondrias aparentemente se acumulan en el área subapical de la zona clara (Clear Zone, CZ); se piensa que la distribución bastante peculiar de los orgánulos es esencial en el funcionamiento del tubo de polen y aunque mucho es conocido de la estructura y dinámica del citoesqueleto de actina, aún falta un consenso sobre el mecanismo

para explicar la clasificación diferencial de orgánulos a lo largo del eje del tubo polínico [Colaco, R. y cols, 2012].

Es importante resaltar que, la mayoría de las vías de producción de energía aeróbica involucran el uso de un potencial electroquímico transmembranal mitocondrial, así que como se mencionó anteriormente, las mitocondrias son consideradas los principales orgánulos para la producción de energía en células eucariotas, y en células de rápido crecimiento como los tubos polínicos, lo deben de ser más. Se ha descrito que los tubos polínicos pueden tener hasta 20 veces más mitocondrias por células que otros tejidos vegetativos [Colaco, R. y cols, 2012].

1.9 Respiración mitocondrial medida por oximetría.

Las mediciones de la respiración celular proporcionan información importante sobre la capacidad respiratoria mitocondrial, la integridad mitocondrial y el metabolismo de energéticos. El dispositivo que permite esta medición es el oxímetro u oxígrafo, que es un sistema que permite la medición de consumo de oxígeno en una amplia gama de aplicaciones, desde estudios de mitocondrias y respiración celular, hasta mediciones de suspensiones aisladas de cloroplastos con concentraciones de oxígeno al 100%.

El primer diseño de este instrumento de medición data del año 1970 realizado por Tom Delieu y David Walkert, el disco del electrodo de oxígeno permanece sin grandes cambios. El instrumento consta de un cátodo de platino y un ánodo de plata colocado en un disco de resina epoxi y está preparado para su uso con una solución saturada de KCl al 50% debajo de una membrana politetrafluoroetileno (PTFE) permeable al oxígeno.

Cuando se aplica un pequeño voltaje a través de estos electrodos (con el platino negativo con respecto a la plata), la corriente que fluye al inicio es insignificante y el platino se polariza. A medida que este potencial aumenta a 700 mV, el oxígeno se reduce en la superficie del platino, inicialmente a peróxido de hidrógeno H_2O_2 , de modo que la polaridad tiende a descargarse a medida que los electrones se donan al oxígeno. La corriente que fluye está relacionada estequiometricamente con el oxígeno consumido en el cátodo.

Cuando se conecta a la unidad de control de electrodos, el equipo proporciona un método efectivo para detectar pequeños cambios en la concentración de oxígeno (Figura 3).

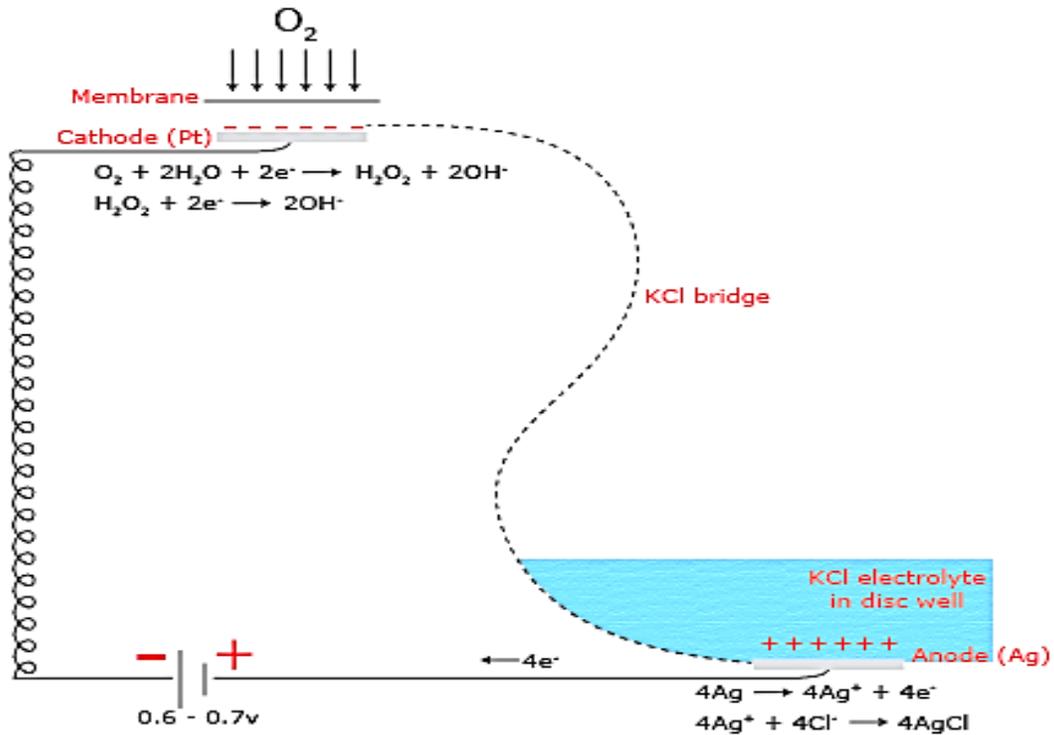


Figura 3. Se muestra de manera simplificada el funcionamiento del oxígrafo, con las reacciones de óxido reducción involucradas para la detección de oxígeno en el medio. (Imagen tomada de <http://www.hansatech-instruments.com/product/oxygraph-system/>, 2019).

Cabe mencionar que para hacer poder realizar mediciones confiables en el instrumento en necesario en primer lugar calibrar de acuerdo a las instrucciones del fabricante y posterior realizar el cálculo del control respiratorio [Flores Cesar, et. al., 2018].

El control respiratorio es la relación entre el de consumo de oxígeno con ADP y sin ADP (consumo de oxígeno con ADP/consumo de oxígeno sin ADP) el cual indica la función del grado de acoplamiento entre el transporte de electrones y la fosforilación, resultando un criterio muy sensible y en general el de elección para juzgar la integridad mitocondrial [Beconi, 1981].

2. Planteamiento del problema.

El estudio de la respiración celular es un tema interés para la comunidad científica, ya que es uno de los procesos metabólicos más importantes en los seres vivos, destacando a la mitocondria, la cual desarrolla un papel fundamental en este proceso que es la generación de energía en forma de ATP. Por lo tanto, en el siguiente escrito se desarrolla un método sencillo utilizando el oxímetro para la evaluación *in situ* de la cadena respiratoria mitocondrial en tubos polínicos de *N. tabacum*, estructura de interés ya que se sabe que este tejido tiene hasta 20 veces más mitocondrias por cada célula que otros tejidos y que *N. tabacum* es el modelo de estudio elegido por su rápido crecimiento y por la secuenciación completa de su genoma.

3. Hipótesis.

- Si los tubos polínicos presentan respiración insensible a cianuro, entonces su cadena respiratoria podría expresar una oxidasa alterna.

4. Objetivos de la investigación.

4.1 Objetivo general.

- Desarrollar un método para caracterizar la cadena respiratoria mitocondrial en tubos polínicos de *N. tabacum*.

4.2 Objetivos particulares.

- Determinar el consumo de oxígeno en las mitocondrias de los tubos polínicos en *N. tabacum* en estado basal.
- Determinar el consumo de oxígeno en las mitocondrias de los tubos polínicos en *N. tabacum* en presencia de inhibidores de la cadena respiratoria clásica y alterna.

5 Materiales y métodos.

En el siguiente apartado se describe el modelo de estudio utilizado:

5.1 Material vegetal.

Para el presente trabajo se utilizaron plantas de *N.tabacum* preacox amablemente donadas por el Dr. Felipe Cruz García. Una vez alcanzado el estado de floración se utilizó el polen maduro.

A continuación, se enlistan los reactivos empleados en el desarrollo experimental:

5.2 Soluciones de aislamiento, de medición y reactivos.

Agua MilliQ

Digitonina 20 mg/mL (Promega).

Dimetil sulfóxido (Sigma)

Azul de Evans al 1% (Sigma)

Soluciones "stock":

Succinato de sodio 0.5 M (Sigma)

Adenosin Difosfato 200 mM (Sigma)

Oligomicina 1 mg/mL (Sigma)

MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico) pH = 5.7

KCN 100mM (Sigma)

Ácido salicilhidroxámico (SHAM) 500 mM (Sigma)

Propil Galato 2 mM (Sigma)

Solución de Germinación (Buffer PG)

Sacarosa al 10%

CaCl₂ 200 μM

Ca(NO₃)₂ 100 μM

H₃BO₃ 1.6 mM

MES 15 mM pH= 5.7

Buffer del ensayo del tubo de Polen (Buffer PTA)

Manitol 330 mM

KH₂PO₄ 1 mM

EDTA 0.1 mM

MES 10 mM pH 5.7

Importante: Filtrar y esterilizar los buffer, conservar a temperatura ambiente.

Western Blot

- Anticuerpo dirigido a Oxidasa Alterna: AOX1/2 | Plant alternative oxidase 1 and 2 Catalogo: AS04 054. Marca Agrisera. Clonalidad: Policlonal, Reactividad: *A. thaliana*, *B. nana*, *B. napus*, *B. vulgaris*, *E. vaginatum*, *H. vulgare*, *L. luteus*, *N.tabacum*, *O. sativa*, *P.abies*, *P. sativum*, *S.tuberosum* y *T. aestivum*
- Determinación de proteína por el método de Lowry.

Desoxicolato (DOC) 0.15%

Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) 10%

NaOH 0.8 N

Reactivo de Folin-Ciocalteu

Solución de Carbonato-tartrato- cobre (CTC)

- Preparación geles de policrialamida – SDS

Solución de Acrilamida.

Solución de Bis-Acrilamida.

Solución Amortiguadora del gel:

Tris 3 M, pH 8.9-9.0

SDS 0.3%

HCl 1 N (para el ajuste de pH)

Buffer del cátodo:

Tris 0.1 M, pH 8.9-9.0

Tricina 0.1 M

SDS 0.1%

Buffer del ánodo:

Tris 0.2 M, pH 8.9

HCl 1N (para el ajuste de pH)

Solución digestora:

SDS 10%

Tris 100 mM, pH 6.8

Azul de bromo-fenol 0.6%

β -mercapto etanol 4%

Persulfato de amonio 10%

TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina).

Solución bloqueadora:

Leche Svelty al 5%

Buffer de lisis:

Tris HCl 10 mM pH 7.9

KCl 50 mM

EDTA 1 mM

DTT 1 mM

PMSF 1 mM

Tween 20 0.5%

Nonidet P40 0.5%

Equipo

Microscopio óptico.

Centrifuga para tubos Eppendorf

Agitador magnético de 60Hz

Micro imán para celda.

Hematocitómetro (cámara de Neubauer)

Micropipetas

Tubos Eppendorf de 1.5 mL

Sistema Hansatech Oxímetro Plus en Fase-Líquida (Hansatech Instruments)

Agitador orbital

Incubadora de temperatura controlada

Cámara de electroforesis

Transiluminador *Chemidor*

6 Diseño experimental del método.

6.1 Cosecha del polen.

La cosecha del polen comienza con el llenado de un tubo Eppendorf con 1.0 mL de buffer PG utilizando guantes en todo momento.

Posteriormente se seleccionan flores en buen estado de maduración (ver

Fig. 8) y se retiran los pétalos con la ayuda de tijeras y pinzas, a continuación, se sumergen las anteras en el tubo Eppendorf que contiene el buffer de PG. Se sacuden suavemente las anteras para resuspender los granos de polen en el buffer.

6.2 Germinación de tubos polínicos.

La germinación del tubo polínico comienza con la agitación suave del tubo Eppendorf con los granos de polen en el buffer PG. La agitación debe ser a 60 rpm en un agitador orbital a 28 °C durante 2 horas. Después de transcurrido el tiempo de agitación, se toman 20 µL de la suspensión y se colocan sobre el hematocitómetro. Se determina el número de células multiplicando por el factor 10,000, el cual es predeterminado para cada cámara. En seguida se lavan los tubos de polen dos veces en 1 mL de buffer PTA por centrifugación a 3000 rpm durante 20 s.

6.3 Ensayo del consumo de oxígeno.

En primer lugar, se debe calibrar el Sistema Hansatech Oxygraph Plus de fase líquida de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se continúa con un tubo Eppendorf, sin la adición de tubos polínicos, con presencia de buffer con succinato de sodio 10 mM, digitonina al 0.01% y ADP 200 µM, se debe registrar el consumo de oxígeno basal durante 120s. Posteriormente se adiciona buffer cbp 500 µL con 1×10^6 tubos polínicos

en la cámara del oxímetro. Se cierra la cámara con el tapón incluido, con cuidado de que no se generen burbujas de aire en el interior. Posteriormente se permite la permeabilización del tubo durante cinco minutos, de esa forma se obtiene la lectura correspondiente al consumo de oxígeno en condiciones fosforilantes (estado 3). La medición del consumo de oxígeno en estado 3 debe ser mayor a 2 minutos. Transcurrido este periodo se inyecta el volumen necesario para depositar 2 μg de oligomicina y se mide el consumo de oxígeno durante 1-2 minutos (estado 4). Tomando en cuenta estas mediciones, se calcula la Relación del Control Respiratorio (RCR) dividiendo el estado 3 entre el estado 4. En el caso de tubos polínicos acoplados, este debe ser mayor a 2. En la figura 4 se muestra de manera visual el procedimiento anteriormente descrito.

Ensayo del consumo de oxígeno. Estado 3 y Estado 4.

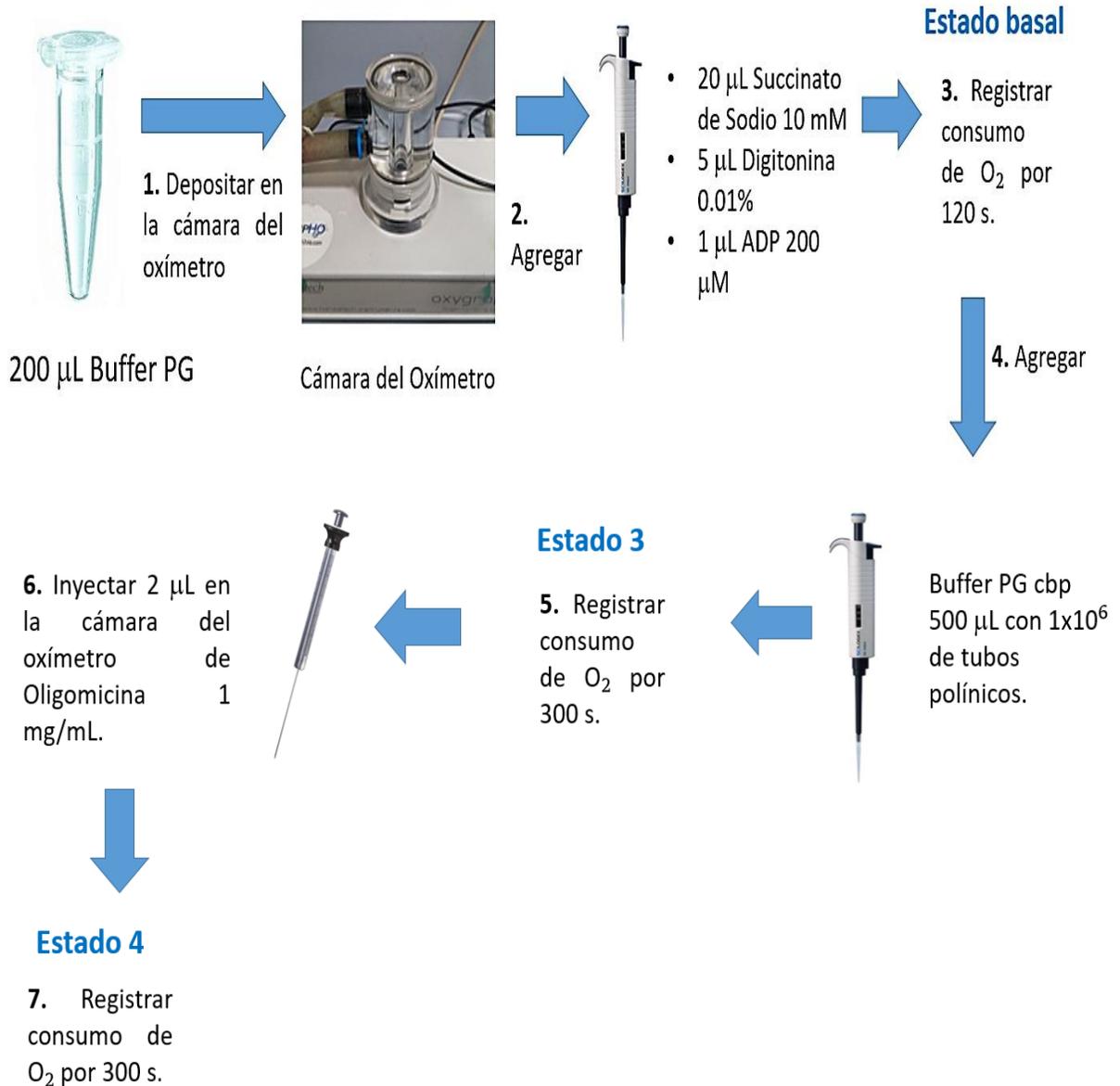


Figura 4. El diagrama muestra los pasos a seguir para la realización del ensayo de consumo de oxígeno, los pasos 5 y 7 muestran el estado 3 y el estado 4, respectivamente. Se debe notar que todas las adiciones son consecutivas. [Flores Herrera y cols., 2019].

Cabe mencionar que este procedimiento valida los ensayos de consumo de oxígeno, ya que como lo muestra Flores Herrera y cols., 2019, el control respiratorio es mayor a 2 siguiendo la metodología descrita.

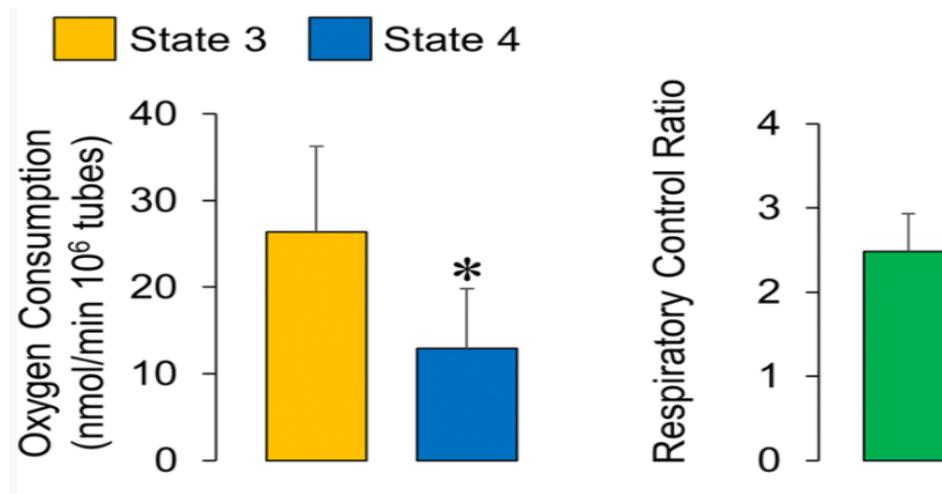


Figura 5. El gráfico que muestra el consumo de oxígeno. A la izquierda se muestran los registros del estado 3 y el estado 4 del ensayo de consumo de oxígeno. En el gráfico de la derecha se observan los tubos polínicos permeabilizados con Digitonina y el cálculo del control respiratorio mayor a 2. [Flores Herrera y cols., 2019].

Finalmente, se realizaron los ensayos de consumo de oxígeno con la adición de KCN 100 μ M y SHAM 500 μ M (figura 6) y por otra parte la adición de KCN 100 μ M y Propilgalato 2 μ M para inhibir la respiración mitocondrial (figura 7).

Ensayo del consumo de oxígeno. KCN y SHAM.

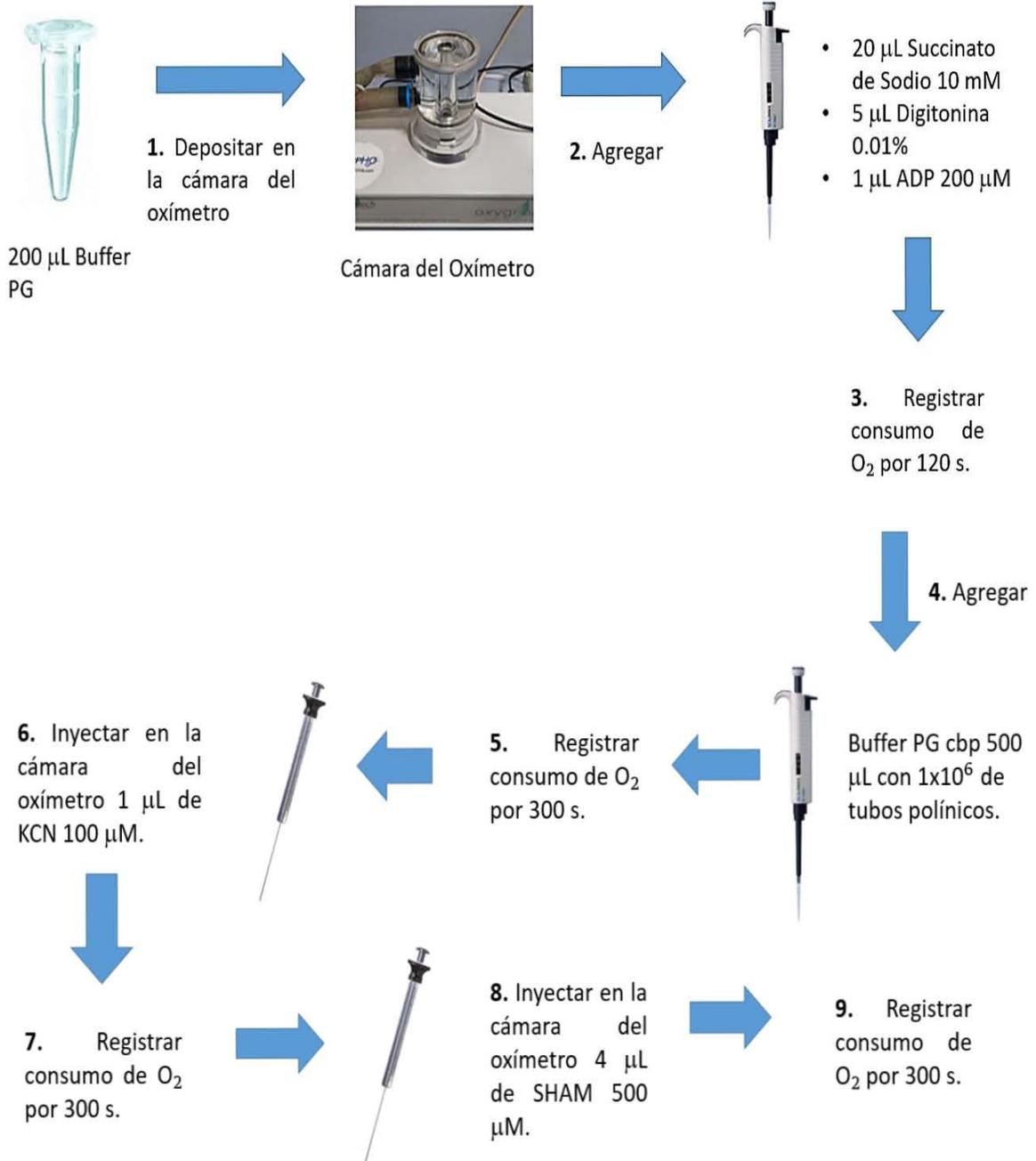


Figura 6. El Diagrama muestra la metodología para el ensayo de consumo de oxígeno en presencia de Cianuro y el Ácido Acetil Hidroxámico (SHAM).

Ensayo del consumo de oxígeno. Propilgalato y KCN.

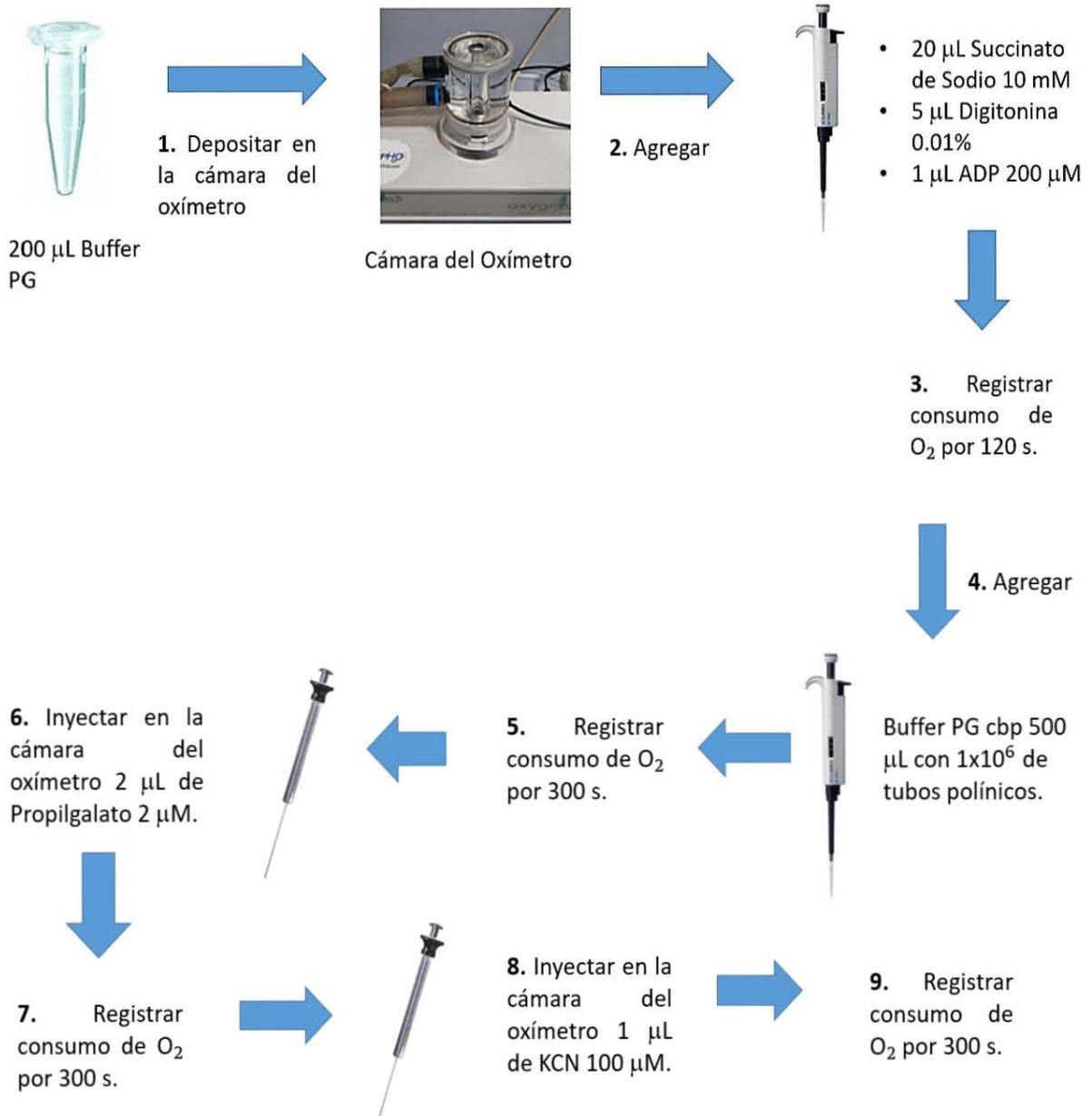


Figura 7. El Diagrama muestra la metodología para el ensayo de consumo de oxígeno en presencia de Propilgalato y Cianuro.

6.4 Inmunodetección de AOX en tubos polínicos.

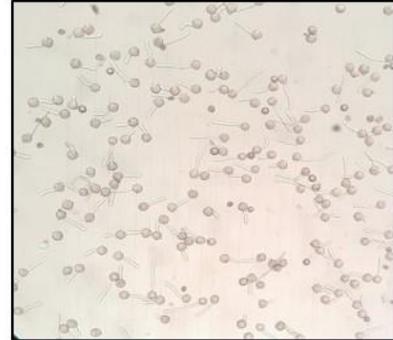
Adicional a estos ensayos de consumo de oxígeno, se tomó la decisión de realizar una prueba complementaria para corroborar el resultado obtenido hasta el momento, de modo que se corrió un Western Blot. Se comenzó por realizar la cosecha de polen y la germinación de tubos polínicos, una vez crecidos se hizo un lisado de proteína, que consiste en el rompimiento de membrana con el buffer de lisis previamente preparado y una sonicación, posteriormente se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Lowry, el objetivo fue tener la cantidad de proteína suficiente para el corrimiento de la electroforesis, en la cual se cargaron 20 μg de proteína, después se realizó la transferencia, para pasar al bloqueo, agregando solución bloqueadora (5%) en buffer TBS, terminada la incubación se procedió a agregar el anticuerpo dirigido a la oxidasa alterna (AOX1/2 | Plant alternative oxidase 1 and 2), mismo que se dejó durante toda una noche. Acto seguido se colocó el segundo anticuerpo y se finalizó con el revelado de la placa con quimioluminiscencia.

7 Resultados.

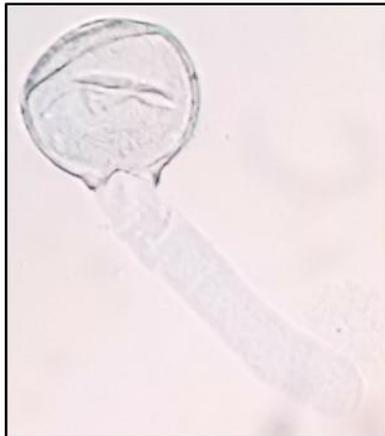
7.1 Cosecha, germinación y permeabilización de tubos polínicos.

Los experimentos de obtención y germinación de los granos de polen fueron llevados a cabo bajo las mismas condiciones reportadas en nuestro laboratorio por Flores-Herrera y cols., 2019. Inicialmente, los granos de polen de las flores maduras (Fig. 8A) fueron aislados, hidratados e incubados en el buffer PG durante 2 horas. Como se esperaba, los tubos polínicos emergieron y fueron contabilizados en la cámara de Neubauer (Fig. 8B). El número de células se determinó y ajustó para los experimentos de consumo de oxígeno.

Posteriormente, las muestras fueron lavadas dos veces con buffer PTA para eliminar el exceso de calcio. Los tubos de polen se permeabilizaron con Digitonina 0.01% (control) durante 5 minutos y se tiñó con una solución de Azul de Evans al 0.1%. Como era de esperarse, los tubos polínicos permeabilizados se tiñeron con la solución de Azul de Evans (Fig. 8C).

A**B****C**

Control



Digitonina



Figura 8. Se observa los tubos polínicos cosechados, contados y permeabilizados con digitonina. **A.** Granos de polen de flores maduras de *N. tabacum*. **B.** Germinación de tubos polínicos que fueron contabilizados en la cámara de Neubauer. **C.** Tubos polínicos permeabilizados con Digitonina teñidos con Azul de Evans.

7.2 Respiración mitocondrial de tubos polínicos.

Una vez validados los experimentos de permeabilización, se llevaron a cabo experimentos de consumo de oxígeno en los tubos polínicos permeabilizados (Fig. 8C). En condiciones control (en presencia de succinato y ADP) los tubos polínicos tuvieron un consumo basal de 21 ± 7 nmol/min* 10^6 tubos polínicos. Este valor disminuyó en forma significativa al adicionar CN^- . Sin embargo, la posterior adición de SHAM 2 mM no ocasionó una disminución significativa adicional a la registrada en presencia de CN^- (Figura 9).

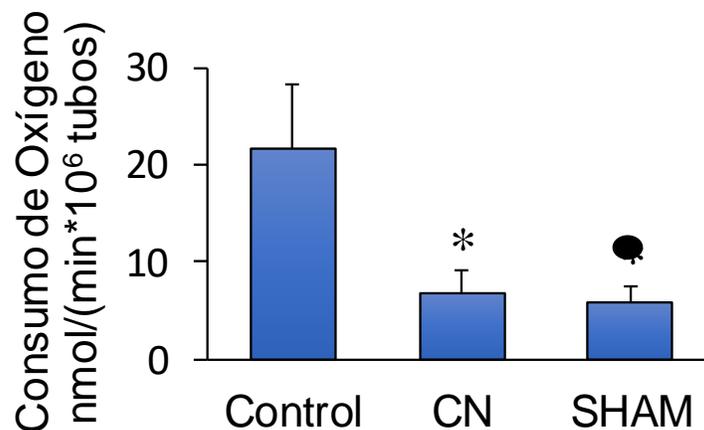


Figura 9. Evaluación de la respiración mitocondrial con cianuro y SHAM. El consumo basal de O_2 en el control respiratorio es de 21 ± 7 nmol/min* 10^6 tubos polínicos. * La posterior adición de cianuro indica un consumo de O_2 de 7 ± 2 nmol/min* 10^6 tubos polínicos. • Finalmente, la adición de SHAM resulta en un consumo de O_2 de 6 ± 1 nmol/min* 10^6 tubos polínicos. * $p < 0.05$ vs control.

Debido a que no se observaron efectos notorios con SHAM, se decidió utilizar otro inhibidor de AOX -propil galato- con la finalidad de verificar la eficacia del SHAM. (Figura 10).

Por lo tanto, se probó el efecto del propilgalato sobre la respiración mitocondrial (Fig. 10). Para ello se preparó un lote de tubos polínicos tratados con Digitonina 0.01% por cinco minutos dentro de la cámara del oxímetro, donde se agregó ADP y succinato para obtener la respiración del estado 3, y posteriormente se adiciono Propilgalato 0.5 mM. En estas condiciones se observó una reducción significativa en la velocidad de respiración posterior a la adición de propilgalato con respecto a la basal (control). La posterior adición de cianuro disminuye aún más la respiración por lo que la respiración mitocondrial se encuentra totalmente bloqueada en presencia de ambos inhibidores (Fig. 10).

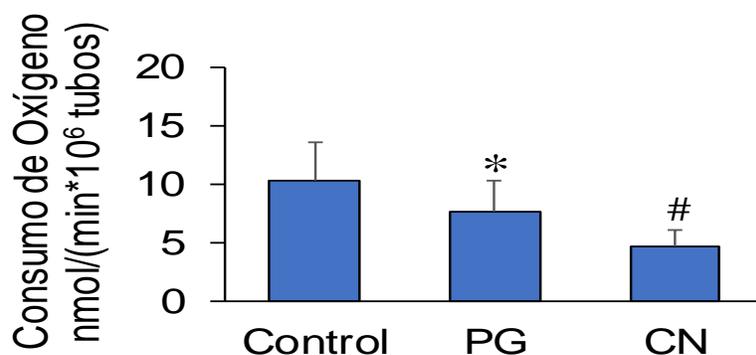


Figura 10. Evaluación de la respiración mitocondrial sensible a Propilgalato y Cianuro. El consumo basal de O₂ en el control respiratorio es de 10 ± 3 nmol/min*10⁶ tubos polínicos.* La posterior adición de Propilgalato 0.5 mM indica un consumo de O₂ de 7 ± 2 nmol/min*10⁶ tubos polínicos. # Finalmente, la adición de Cianuro 0.5 mM resulta en un consumo de O₂ de 4.7 ± 1 nmol/min*10⁶ tubos polínicos.*p<0.05 vs control. # p<0.05 VS Propilgalato.

7.3 Inmunodetección de AOX en tubos polínicos de *N. tabacum*.

Con la finalidad de evaluar la presencia de una AOX en tubos polínicos de *N. tabacum* a nivel proteína, se realizó un Western Blot, donde se utilizó un anticuerpo primario específico (*AOX1/2, Plant alternative oxidase 1 and 2*) para la AOX de *Arabidopsis thaliana*.

En primer lugar se puede apreciar el control de carga de los lisados realizados, identificados con los números 1,2 y 3, cuyo gel fue teñido con azul de coomassie, el resultado obtenido deja en evidencia que la cantidad de proteína es similar en los tres carriles (Figura 11.A). Por otro lado se observa el revelado del Western Blot, donde se identificó una banda monoreactiva a 37 kDa con el anticuerpo (*AOX1/2, Plant alternative oxidase 1 and 2*) contra AOX de *Arabidopsis t.* (Figura 11.B).

Estas observaciones corroboran la presencia de una AOX en las mitocondrias de los tubos polínicos de *N. tabacum*.

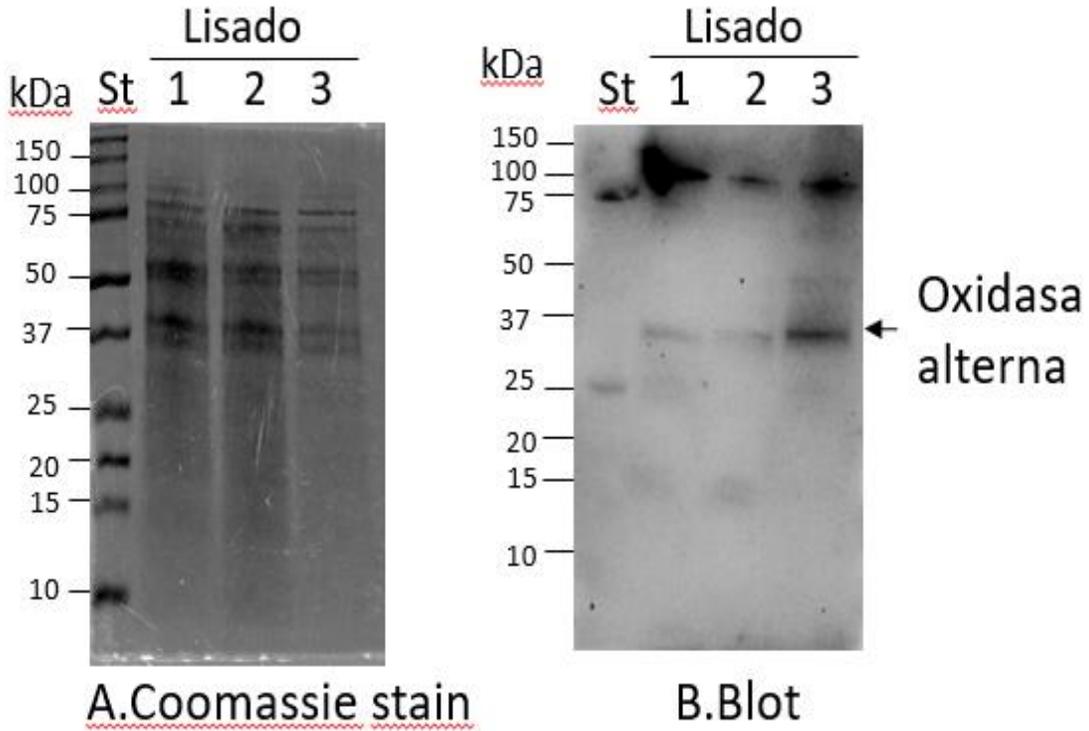


Figura 11. Inmunodetección de OAX en tubos polínicos de *N. tabacum*. **A.** Se observa el control de carga por triplicado, gel teñido con azul de Coomassie. **B.** Western Blot revelado con el anticuerpo *AOX1/2, Plant alternative oxidase 1 and 2 VS AOX* contra la AOX de *N. tabacum*, se aprecia una banda monoreactiva a 37 kDa.

8 Discusión.

En el presente trabajo se evaluó el papel de la mitocondria y en particular de la cadena respiratoria clásica y alterna en la respiración de los tubos polínicos de *N. tabacum* por el método de la oximetría.

La presencia de la oxidasa alterna en plantas es motivo de muchos trabajos y algunos de ellos han concluido que su papel es disminuir la emisión de especies reactivas de oxígeno en condiciones tales como senescencia o en presencia de estrés abiótico o biótico [McDonald y cols., 2006; Guerrero-Castillo y cols., 2011]. En este trabajo se continuo con la metodología descrita por Flores Herrera, 2019 para la medición de la respiración mitocondrial, donde se observó que la respiración de los tubos polínicos presenta un componente insensible a cianuro. Esta característica -aunada a la presencia reportada de una oxidasa alterna en hojas, raíces y células en suspensión de *N. tabacum*- fue lo que nos motivó a explorar la probable presencia y regulación química de una AOX en tubos polínicos [Dahal y cols., 2014; Wang y cols, 2011;]. En primer lugar se experimentó la inhibición de la respiración con SHAM, donde no observamos una inhibición significativa más allá de la registrada en presencia de cianuro; a pesar de que se tiene evidencia de que varios ácidos hidroxámicos sustituidos son inhibidores de la vía alternativa de la respiración [Beconi, 1981]. Este resultado inicialmente fue interpretado como que los tubos polínicos carecían de AOX y que la respiración residual registrada era debida a un sistema oxidativo no

mitocondrial (glucosa oxidasa, xantina oxidasa, NADPH oxidasa, etc.) [Marino y cols., 2012].

Sin embargo, este resultado se debe muy probablemente a que no se utilizó la concentración de SHAM suficiente para visualizar una inhibición, ya que se han reportado experimentos con inhibidores específicos de la cadena alternativa para dar más información sobre la actividad *in vivo* del camino alternativo. Un ejemplo, es el uso del ácido benzohidroxámico para inhibir la respiración de cortes de raíces de *Convolvulus arvensis* donde se observa una inhibición en un 21%. En raíces de especies de *Senecio*, cerca del 70% de la respiración total de la raíz fue sensible al ácido salicilhidroxámico (SHAM) [Beconi, 1981].

De modo que con la adición de un segundo inhibidor de la familia de los galatos (Propilgalato) pudimos detectar una disminución adicional significativa en la respiración insensible a CN⁻.

Cabe mencionar, que la prueba complementaria realizada, el Western Blot, se detectó una banda inmunoreactiva a 37 kDa contra la AOX de *N.tabacum*, en el revelado de la inmunodetección se pueden apreciar sutilmente otras bandas, lo cual, probablemente se deba a proteínas que presenten epítopes similares a la AOX de *N.tabacum* o bien a que posiblemente el proceso de desnaturalización de las proteínas no haya sido adecuado y se estén presentando agregados o dímeros de AOX de *N.tabacum*.

Los resultados obtenidos sugieren la presencia de una AOX en mitocondrias de tubos polínicos de *N. tabacum*. Una búsqueda en bases de datos indica que la proteína NP_001311725.1 codifica para una AOX *bona fide* en *N. tabacum* y que ésta presenta una pre secuencia mitocondrial y una alta homología con la AOX de *Trypanosoma brucei* reportada en la literatura [Shiba y cols., 2013; ver anexo].

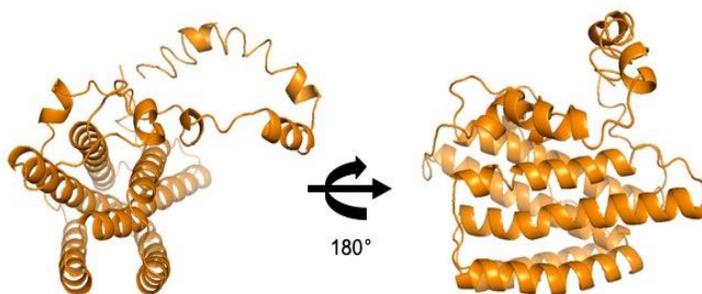


Figura 12. Modelo de la estructura de la NtAOX basado en el modelo de la AOX de *T. brucei*. El modelo fue generado con iTasser a partir del PDB 3VV9.

De acuerdo al modelo reportado por Shiba y colaboradores [Shiba y cols., 2013], la NtAOX presenta dos probables alfa hélices similares a las $\alpha 1$ y $\alpha 4$ responsables del probable anclamiento en la membrana interna mitocondrial. De forma adicional, presentan las hélices responsables de la probable dimerización de la enzima. Sin embargo, es necesario llevar a cabo un análisis más profundo, que incluya una evaluación del probable sitio de unión del sustrato e inhibidores y así poder determinar si NtAOX funciona como homodímero y si

NP_001311725.1 es responsable de la actividad sensible a propilgalato reportada en el presente trabajo.

Por lo tanto, los resultados señalan que la actividad respiratoria detectada aún en presencia de propilgalato podría ser debida a la expresión de otro tipo de oxidasas, por ejemplo, la glucosa oxidasa. [MANO, N.2019].

Cabe agregar que en una búsqueda en bases de datos, sugiere que la proteína HOTHEAD-like isoform X1 contiene una secuencia de la probable glucosa oxidasa *N. tabacum* XP_016491068.1 (Ver anexo).

Por otro lado, se sabe que la actividad de la oxidasa alterna *in vivo* en ausencia de estrés representa el 10-50% de la respiración total y esta porción se mantiene en el rango de temperatura normalmente encontrada durante el crecimiento de la planta [Del-Saz, et al, 2017]. En este caso, la contribución de la respiración mitocondrial por la AOX representa el 50% de la respiración mitocondrial y el 25% de la respiración total, lo cual, concuerda con reportes previos de la contribución de la respiración por la AOX.

Además, es importante mencionar que la inducción de la expresión y actividad de AOX en varias situaciones fisiológicas están relacionadas con la flexibilidad metabólica que permiten la producción de calor, la

tolerancia al estrés y el crecimiento (síntesis de esqueletos de carbono) en condiciones de equilibrio con la disponibilidad de recursos.

Tomando en cuenta lo anterior, sería importante considerar las condiciones ambientales o estrés ambiental en las que nuestro modelo de estudio se encuentra y por ende la cantidad de AOX que puede expresar.

Finalmente, la regulación de los sistemas de respiración en tubos polínicos de *N. tabacum* en respuesta a condiciones cambiantes de estrés abiótico será motivo de estudios posteriores.

9 Conclusiones.

- Se logró desarrollar un método para medir respiración mitocondrial en tubos polínicos.
- *N. tabacum* expresa una oxidasa alterna en las mitocondrias de tubos polínicos.
- *N. tabacum* presenta vías de consumo de oxígeno no mitocondrial.

10 Bibliografía.

- Beconi M. Actividad de oxidasa alternativa y respiración mitocondrial en plantas superiores. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 1981.
- Bunoust O, Devin A, Avéret N, Camougrand N, Rigoulet M. Competition of electrons to enter the respiratory chain: a new regulatory mechanism of oxidative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2005 Feb 4;280(5):3407-13.
- Choudhary OP, Ujwal R, Kowallis W, Coalson R, Abramson J, Grabe M. The electrostatics of VDAC: implications for selectivity and gating. *J Mol Biol*. 2010 Feb 26;396(3):580-92.
- Colaco R., Moreno N., and Feijó J., On the fast lane: mitochondria structure, dynamics and function in growing pollen tubes. *Journal of Microscopy*. March, 2012. Vol. 247, Pt 1 2012, pp. 106–118.
- Dahal K, Wang J, Martyn GD, Rahimy F, Vanlerberghe GC. Mitochondrial alternative oxidase maintains respiration and preserves photosynthetic capacity during moderate drought in *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol*. 2014 Nov;166(3):1560-74.
- Del-Saz, Néstor & Ribas-Carbo, Miquel & McDonald, Allison & Lambers, Hans & Fernie, Alisdair & Florez-Sarasa. An In Vivo Perspective of the Role(s) of the Alternative Oxidase Pathway. *Trends in Plant Science*. Nov 2017.

- Flores-Herrera C, Preciado-Linares G, Gonzalez-Vizueth I, Corona de la Peña N, Gutiérrez-Aguilar M. In situ assessment of mitochondrial calcium transport in tobacco pollen tubes. *Protoplasma*. 2019 Mar;256(2):503-509.
- Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci*. 2000 Jul;25(7):319-24.
- Guerrero-Castillo S, Araiza-Olivera D, Cabrera-Orefice A, Espinasa-Jaramillo J, Gutiérrez-Aguilar M, Luévano-Martínez LA, Zepeda-Bastida A, Uribe-Carvajal S. Physiological uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation. Studies in different yeast species. *J Bioenerg Biomembr*. 2011 Jun;43(3):323-31.
- Hansatech Instruments. Oxygraph + System. 2019 Sep 24. Sitio web: <http://www.hansatech-instruments.com/product/oxygraph-system/>
- LOIS H. M. HO et al. Characterization of the Regulatory and Expression Context of an Alternative Oxidase Gene Provides Insights into Cyanide-Insensitive Respiration during Growth and Development. *Plant Physiology*, [s. l.], v. 143, n. 4, p. 1519, 2007.
- Malhó, Rui. *The Pollen tube: a cellular and molecular perspective*. Berlin: Springer, 2006.
- Mannella CA, Lederer WJ, Jafri MS. The connection between inner membrane topology and mitochondrial function. *J Mol Cell Cardiol*. 2013 Sep;62:51-7.
- MANO, N. Engineering glucose oxidase for bioelectrochemical applications. *Bioelectrochemistry*, [s.l.], v. 128, p. 218–240, 2019.

- Marino D, Dunand C, Puppo A, Pauly N. A burst of plant NADPH oxidases. *Trends Plant Sci.* 2012 Jan;17(1):9-15.
- MÁRTON L, WULLEMS GJ, MOLENDIJK L, SCHILPEROORT RA. In vitro transformation of cultured cells from *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 1979; 277: 129–131.
- McDonald AE, Vanlerberghe GC. Origins, evolutionary history, and taxonomic distribution of alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics.* 2006 Sep;1(3):357-64.
- Nicholls DG, Ferguson SJ. *Bioenergetics (Fourth Edition)*, Academic Press, 2013.
- Pfanner N, Warscheid B, Wiedemann N. Mitochondrial proteins: from biogénesis to functional networks. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 May;20(5):267-284.
- Rasmusson AG, Geisler DA, Møller IM. The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria. *Mitochondrion.* 2008 Jan;8(1):47-60.
- Sánchez R. La respiración insensible al cianuro y su relación con la productividad de las plantas. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. 1980; 1(1): 109-116.
- Schertl P, Braun HP. Respiratory electron transfer pathways in plant mitochondria. *Front Plant Sci.* 2014 Apr 29;5:163.

- Shiba T, Kido Y, Sakamoto K, Inaoka DK, Tsuge C, Tatsumi R, Takahashi G, Balogun EO, Nara T, Aoki T, Honma T, Tanaka A, Inoue M, Matsuoka S, Saimoto H, Moore AL, Harada S, Kita K. Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Mar 19;110(12):4580.
- SUNDERLAND N., FRANCES M. WICKS, Embryoid Formation in Pollen Grains of *Nicotiana tabacum*, *Journal of Experimental Botany*, Volume 22, Issue 1, February 1971.
- Taylor LP, Hepler PK. POLLEN GERMINATION AND TUBE GROWTH. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1997 Jun;48:461-491.
- Walker JE. The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem Soc Trans*. 2013 Feb 1;41(1):1-16.
- Wang J, Rajakulendran N, Amirsadeghi S, Vanlerberghe C. Impact of mitochondrial alternative oxidase expression on the response of *Nicotiana tabacum* to cold temperature. *Physiologia Plantarum*. 2011 Feb; 142:339-351.
- Wang, Xuewen; Bennetzen, Jeffrey. Current status and prospects for the study of *Nicotiana* genomics, genetics, and nicotine biosynthesis genes. *Molecular Genetics & Genomics*. Feb 2015, Vol. 290 Issue 1, p11-21. 11p.
- Yan C, Duanmu X, Zeng L, Liu B, Song Z. Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination. *Cells*. 2019 Apr 25;8(4).

ANEXO

Análisis bioinformático sobre la presencia de una AOX en *Nicotiana tabacum*

Artículo: “A simple method for mitochondrial respiration and calcium uptake assessment in pollen tubes”

Para determinar *in silico* si existe una AOX en *N. tabacum*, se utilizó el programa programa BLAST para detectar proteínas similares a la oxidasa alterna de *T. brucei* [Shiba y cols., 2013]. La proteína resultante (NP_001311725.1) fue sometida a un análisis de alineamiento con Clustal Omega. La proteína NP_001311725.1 fue sometida a un análisis de probable estructura terciaria usando el programa iTasser.

Alternative oxidase [Trypanosoma brucei brucei]

GenBank: AAB46424.2

```
>AAB46424.2 alternative oxidase [Trypanosoma brucei brucei]
MFRNHASRITAAAAPWVLR TACRQKSDAKTPVWGHTQLNRLSFLETVPVPLRVSD
ESSEDRPTWSLP
DI
ENVAITHKKPNGLVDTLAYRSVRTCRWLFDTFSLYRFGSITESKVISRCLFLET
VAGVPGMVGMLRH
LS
SLRYMTRDKGWINTLLVEAENERMHLMTFIELRQPGLPLRVSIIITQAIMYLFLL
VAYVISPRFVHRF
VG
YLEEEAVITYTGVMRAIDEGRLRPTKNDVPEVARVYWNLSKNATFRDLINVIRA
DEAEHRVVNHTFAD
MH
EKRLQNSVNPFFVVLKKNPEEMYSNQPSGKTRTDFGSEGAKTASNVNKHV
```

Ubiquinol oxidase 1, mitochondrial [Nicotiana tabacum]

NCBI Reference Sequence: NP_001311725.1

```
>NP_001311725.1 ubiquinol oxidase 1, mitochondrial [Nicotiana
tabacum]
MMTRGATRMTRTVLGHMGPRYFSTAIFRNDAGTGVMSGAAGFMHGVPANPSEKAVVTWVRHFPVMGSR
SA*
SSMALNDKQHDKKAENGSA AATGGGDGGDEKSVVSYWGVQPSKVTKEDGTEWKWNC
FRPWETYKADLS
ID
LTKHHAPTTFLDKFAYWTVKSLRYPTDIFQRRYGC RAMMLETVA AVPGMVGMLLHCK
SLRRFEQSG
GW
IKTLLDEAENERMHLMTFMEVAKPNWYERALVFAVQGVFFNAYFVTYLLSPKLAHR
IVGYLEEEAIHS
YT
EFLKELDKGNIENVPAPAI AIDYWRLPKDSTLRDVVLVVRAD EAHHRDVNHFASDI
HYQGQQLKDSPA
PI
GYH
```

*Los residuos marcados en color rojo denotan la probable pre secuencia mitocondrial determinada con el programa Mitoprot.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment
NP = Nicotiana tabacum
AAB= Trypanosoma brucei

```
NP_001311725.1      MMTRGATRMTRTVLGHMGPRYFSTAIFRNDAGTGVMSGAAGFMHGVPANPSEKAVVTWVR      60
AAB46424.2         -----MFRNHASR-----ITAAAAPWVL      18
                               :***.*.                               *..**
```

```

NP_001311725.1      HFPVMGSRSASSMALNDKQHDKKAENGSAATGGGDDGDEKSVVSYWGVQPSKV---TKE      117
AAB46424.2          RTACRQKSDA-----K-----TPVWGHTQLNRLSFLETVPVPLRVSDSESE      60
                    :   .  .*                *                : . *      :. *..  * * : *  :..*

NP_001311725.1      DGETWKWNCFRPWETYNADLSIDLTKHHAPTFFLDKFAYWTVKSLRYPTDIFFQRRYG--      175
AAB46424.2          DRPTWSLP-----DIENVAITHKKPNGLVDTLAYRSVRTCRWLFDTFSLYRFGSI      110
                    *   * .                *:.      .*: . :*: :*: * : * : * * * : *

NP_001311725.1      -----CRAMMLETVAAVPGMVGMLLHCKSLRRFEQSGGWIKTLLDEAENERMHLMTFM      229
AAB46424.2          TESKVISRCLFLETVAVGVPGMVGGMLRHLSSLRYMTRDKGWINTLLVEAENERMHLMTFI      170
                    .*.:*****.***** * .*** : :. ***:*** *****:

NP_001311725.1      EVAKPNWYERALVFAVQGVFFNAYFVTYLLSPKLAHRIVGYLEEEAIHSYTEFLKELDKG      289
AAB46424.2          ELRQPLPLRVSIITQAIMYLFLLVAYVISPRFVHRFVGYLEEEAVITYTGMRAIDEG      230
                    *: :*.   * . : .*: : :   :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*:

NP_001311725.1      NIENV--PAPAIAIDYWRLPKDSTLRDVVLVVRADAEHHRDVNHFASDIHYQGQQLKDSP      347
AAB46424.2          RLRPTKNDVPEVARVYWNLSKNATFRDLINIRADEAEHRVNVNHTFADMHEKRLQNSVNP      290
                    .: . .   . * : * ** * * :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: : * : * . . *

NP_001311725.1      APIGYH-----                                     353
AAB46424.2          FVVLKKNPEEMYSNQPSGKTRTDFGSEGAKTASNVNKHV                             329
                    :   :

```

Un análisis de estructura secundaria con la suite “Swissprot” determinó que el modelo presentado en la Fig. 12 se adapta razonablemente a lo predicho por iTasser.

Secondary Structure:

```

Query 1      *      *      *      *      *      *
SSMALNDKQHDKKAENGSAATGGGDDGDEKSVVSYWGVQPSKVTKEDGTEWKWNCFRPWETYNADLSID 70
Helix 1      HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH 70
Sheet 1      EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE 70
Turns 1      T      TT      T      TT      T      T      TT      TT      T      T      70
Struc 1      TCHHHHTTTHHHHHCTTCCCCCTCCCHHHHEEEEEHTEHHHTTHHHEEEEEEEHEHHHEEEH 70

Query 71      *      *      *      *      *      *
LTKHHAPTFFLDKFAYWTVKSLRYPTDIFFQRRYGCAMMLETVAAVPGMVGMLLHCKSLRRFEQSGGW 140
Helix 71      HHHHH      HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH 140
Sheet 71      E      EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE 140
Turns 71      T      T      T      T      T      T      T      T      T      T      140
Struc 71      HHHHHCEEHHEEEEEHEEEEEEEEEETEEEEHHHHHEHEEEEEHHEEHHEHHHHHTETEE 140

Query 141     *      *      *      *      *      *
IKTLLDEAENERMHLMTFMEVAKPNWYERALVFAVQGVFFNAYFVTYLLSPKLAHRIVGYLEEEAIHSYT 210
Helix 141     HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH 210
Sheet 141     EEEE      EEEEEEE      EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE 210
Turns 141     TT      TT      T      T      T      T      T      T      T      T      210
Struc 141     EEEHHHHHHHHHHHEHHHHHHHTHHHEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEHHHHHHHEEEHHHHHHHEEE 210

Query 211     *      *      *      *      *      *
EFLKELDKGNIENVPAPIAIDYWRLPKDSTLRDVVLVVRADAEHHRDVNHFASDIHYQGQQLKDSPAPI 280
Helix 211     HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH 280
Sheet 211     EEEEE      EEEEEEE      EEEEEEEEE      EEEEEEEEE      EEEEEEEEE      EEEEE 280
Turns 211     TT      TTT      T      TT      TT      TT      TT      TT      TT      TT  280
Struc 211     HHHHHHTTHHHHHHHHEEEEECCCTTEEEEEEEHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHEEEEEHHHTCCCC 280

Query 281     GYH 283
Helix 281     283
Sheet 281     283
Turns 281     283
Struc 281     CCC 283

```

Total Residues: H: 225 E: 169 T: 34
Percent: H: 79.5 E: 59.7 T: 12.0

PREDICTED: protein HOTHEAD-like isoform X1 [Nicotiana tabacum]

NCBI Reference Sequence: XP_016491068.1

[Identical Proteins](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

```
LOCUS      XP_016491068          597 aa          linear   PLN 03-MAY-2016
DEFINITION PREDICTED: protein HOTHEAD-like isoform X1 [Nicotiana tabacum].
ACCESSION  XP_016491068
VERSION    XP_016491068.1
DBLINK     BioProject: PRJNA319578
DBSOURCE   REFSEQ: accession XM\_016635582.1
KEYWORDS   RefSeq.
SOURCE     Nicotiana tabacum (common tobacco)
ORGANISM   Nicotiana tabacum
           Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
           Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; Gunneridae;
           Pentapetalae; asterids; lamiids; Solanales; Solanaceae;
           Nicotianoideae; Nicotianeae; Nicotiana.
COMMENT    MODEL REFSEQ: This record is predicted by automated computational
           analysis. This record is derived from a genomic sequence
           (NW\_015804904.1) annotated using gene prediction method: Gnomon,
           supported by EST evidence.
           Also see:
               Documentation of NCBI's Annotation Process

           ##Genome-Annotation-Data-START##
           Annotation Provider      :: NCBI
           Annotation Status        :: Full annotation
           Annotation Version       :: Nicotiana tabacum Annotation Release
           100
           Annotation Pipeline     :: NCBI eukaryotic genome annotation
           pipeline
           Annotation Software Version :: 7.0
           Annotation Method        :: Best-placed RefSeq; Gnomon
           Features Annotated       :: Gene; mRNA; CDS; ncRNA
           ##Genome-Annotation-Data-END##
           COMPLETENESS: full length.
FEATURES   Location/Qualifiers
   source   1..597
            /organism="Nicotiana tabacum"
            /cultivar="TN90"
            /db_xref="taxon:4097"
            /chromosome="Unknown"
   Protein  1..597
            /product="protein HOTHEAD-like isoform X1"
            /calculated_mol_wt=65158
   Region   28..597
            /region_name="PLN02785"
            /note="Protein HOTHEAD"
            /db_xref="CDD:215420"
   Region   66..315
            /region_name="NADB_Rossmann"
            /note="Rossmann-fold NAD(P)(+)-binding proteins; cl21454"
            /db_xref="CDD:304358"
   Region   434..579
            /region_name="GMC_oxred_C"
            /note="GMC oxidoreductase; pfam05199"
            /db_xref="CDD:282984"
   CDS     1..597
            /gene="LOC107810756"
            /coded_by="XM_016635582.1:109..1902"
            /db_xref="GeneID:107810756"

ORIGIN
1 mavvggaaal plifkllls1 llcfnspsl tqaagkwvpw edrypfirea ssfssssna
61 nnnkaydyii vgggtagcpl aatlsqkfsv lllergvvpf ananvsfmqn fhialadtsp
121 ssasqyfvst dgvfnsrarv lgggtcinag fytragpsyi kkagwsklv nesypwiekq
181 ivhrpnlapw qravrdslle igispfngft ydhiygtkvg gtifdrfgr htaaellasa
241 npkklldvlv atvqkidfdt sgkkpravgv ifkdengqh kaflskrkgs eiiivsgaig
301 sphilm1sgi gpkaelekln ipvldnkfv gqgmsdnpln tifvptnrhv eqsliqtvgi
361 tkagvyieas sgfgqsgdsi rcnhgvasae igqlstippk qrtfeaeiay rrskkniphe
421 lfrggfilek iatplsrgni slvttnaddn psitfnfysh prdlkrcvdg irivekiaks
481 khftnytqcd ketldkllnm svqanvnlip khtntqslq qfckdtviti whyhggchvg
541 kviapyrvl  gvhrlrvidg stfeespgtn ppatvmmmgr ymgvkilrer lgrtagl

//
```