219
2ej

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"OXIDACION DE SUSTRATOS Y FOSFORILACION OXIDATIVA EN MITOCONDRIAS DE *Euglena gracilis*"

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A :

AIDA URIBE MEDINA

MEXICO, D. F. 1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**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 está 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.

# I N D I C E


| | | Pag. |
|---|---|---|
| **I INTRODUCCION** | | |
| 1.1 | Estructura Mitocondrial. | 1 |
| 1.2 | Funciones Mitocondriales. | 4 |
| 1.3 | Glucólisis. | 6 |
| 1.4 | Ciclo de Krebs. | 7 |
| 1.5 | Cadena de Transporte de electrones y Síntesis de ATP. | 12 |
| 1.6 | Control Respiratorio. | 19 |
| 1.7 | ADP/O | 20 |
| 1.8 | Biología de *Euglena*. | 21 |
| **II ANTECEDENTES** | | 40 |
| 2.1 | Ciclo de Krebs en *Euglena*. | 42 |
| 2.2 | Fosforilación Oxidativa en *Euglena*. | 50 |
| 2.2.1 | Ruta de la citocromo oxidasa sensible a CN | 55 |
| 2.2.2 | Ruta de la citocromo oxidasa resistente a CN | 55 |
| 2.2.3 | Oxidación del NADH exógeno | 56 |
| 2.2.4 | Oxidación del succinato | 57 |
| 2.2.5 | Oxidación del lactato | 59 |
| 2.2.6 | Inhibidores | 61 |

**III MATERIALES Y METODOS.**


| | | |
|---|---|---|
| 3.1 | Medio de cultivo. | 64 |
| 3.2 | Mantenimiento del cultivo. | 66 |
| 3.3 | Obtención de Mitocondrias de *Euglena gracilis* | 67 |
| 3.4 | Medición del consumo de oxígeno. | 69 |
| 3.5 | Oxidación de sustratos. | 69 |
| 3.6 | Síntesis de ATP. | 70 |
| 3.7 | Potencial de membrana. | 72 |
| 3.8 | Hinchamiento. | 73 |
| 3.9 | Estado Redox de los piridín nucleótidos. | 73 |
| 3.10 | Determinación de proteína. | 74 |


**IV RESULTADOS Y DISCUSION.**


| | |
|---|---|
| 4.1 Curva de crecimiento | 75 |
| 4.2 Consumo de Oxígeno | 78 |
| 4.3 Constantes de Michaelis-Menten | 81 |
| 4.4 Inhibición de la Oxidación de Sustratos | 86 |
| 4.5 Constantes de Inhibición | 93 |
| 4.6 Control Respiratorio y ADP/O | 108 |
| 4.7 Síntesis de ATP | 112 |
| 4.8 Potencial de Membrana | 115 |
| 4.9 Hinchamiento | 118 |
| 4.10 Estado Redox de los Piridín Nucleótidos | 120 |

| | | |
|---|---|---|
| V | CONCLUSIONES. | 124 |
| VI | PERSPECTIVAS. | 128 |

**VII APENDICES.**


| | | |
|---|---|---|
| A | Centrifugación Diferencial | 130 |
| B | Método Polarográfico | 131 |
| C | Espectrofotómetro | 135 |
| D | Espectrofotómetro de Doble haz | 139 |
| E | Fluorescencia | 141 |
| F | Determinación de Proteína | 144 |

**BIBLIOGRAFIA.** 145

ELECTROMICROGRAFIA EN BARRIDO

Euglena gracilis.

## ABREVIATURAS

| | |
|---|---|
| ACoA | Acetil coenzima A |
| ADP | Adenosín 5'difosfato |
| AMP | Adenosín 5'monofosfato |
| ATP | Adenosín 5'trifosfato |
| BSA | Seroalbúmina de bovino delipidada |
| CCCP | Carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona |
| CN | Cianuro |
| CR | Control respiratorio |
| DH | Deshidrogenasa |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNP | Dinitrofenol |
| DPA | Difenilamina |
| DTT | Ditiotreitol |
| EDTA | Acido etilendiamino tetraacético |
| EGTA | Acido etilenglicol bis-(ß-aminoetil éter)-N,N,N,N tetraacético |
| $F_1F_0$ | Complejo ATPasa/ATPsintetasa |
| $F_1$ | Porción periférica ,catalítica del complejo ATPasa/ATPsintetasa |
| $F_0$ | Porción membranal , canal de $H^+$ del complejo ATPasa/ATPsintetasa |
| $FAD^+$ | Flavín adenín dinucleótido (forma oxidada) |
| FADH | Flavín adenín dinucleótido (forma reducida) |
| FMN | Flavín mononucleótido |
| GABA | Acido aminobutírico |

| | |
|---|---|
| GDH | Glutamato deshidrogenasa |
| GDP | Difosfato de guanosina |
| GTP | Trifosfato de guanosina |
| HEPES | Acido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico |
| HK | Hexoquinasa |
| HQNO | 2-heptil-4-hidroxiquinolina-N-oxido |
| IDH | Isocitrato deshidrogenasa |
| Km | Constante de Michaelis-Menten |
| LDH | Lactato deshidrogenasa |
| M | Molar |
| mM | Milimolar |
| μM | Micromolar |
| MDH | Malato deshidrogenasa |
| MOPS | Acido 3-(N-morfolino) propanosulfónico |
| $NAD^+$ | Nicotinamida adenin dinucleótido (forma oxidada) |
| NADH | Nicotinamida adenín dinucleótido (forma reducida) |
| NADPH | Nicotinamida adenin dinucleótido de fosfato (forma reducida) |
| nm | Nanómetros |
| α-KGDH | α-cetoglutarato deshidrogenasa |
| PCA | Acido perclórico |
| PDH | Piruvato deshidrogenasa |
| PDHOR | Piruvato deshidrogenasa oxido reductasa |
| Pi | Fosfato inorgánico |
| PSM | Partículas submitocondriales |
| RNAm | Acido ribonucleíco mensajero |
| RNAt | Acido ribonucleico de transferencia |

| | |
|---|---|
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SHAM | Acido salicilhidroxámico |
| SDH | Succinato deshidrogenasa |
| TCA | Acido tricloro acético |
| TMPD | Tetrametil-p-fenilenediamina |
| TPP | Tiamina pirofosfato |
| Tris | Hidroximetil amino metano |
| UDPG | Uridín difosfato de glucosa |
| Vmax | Velocidad máxima |

# I INTRODUCCION

Todos los organismos requieren de un suministro de energía para llevar a cabo las reacciones sintéticas y las actividades necesarias para vivir. Las moléculas orgánicas pueden ser utilizadas para el crecimiento o almacenadas en forma de reserva alimenticia y como fuente de energía química que será utilizada por el proceso de la respiración llevado a cabo en las mitocondrias de células eucariontes.

## 1.1 ESTRUCTURA MITOCONDRIAL.

Las mitocondrias son las centrales energéticas de todas las células eucariontes, utilizan la energía obtenida de la reducción del oxígeno con el potencial reductor de las oxido reductasas que darán su energía para la síntesis de ATP.

En su morfología (Fig.1) las mitocondrias presentan una membrana externa, una membrana interna (plegada formando crestas) en la cual tienen lugar las fases terminales de la oxidación y la matriz mitocondrial la cual contiene enzimas de importancia para oxidación de piruvato, ácidos grasos y ciclo de Krebs (Lehninger, 1985)

La membrana mitocondrial externa contiene numerosas copias de una proteína transportadora llamada porina que forma grandes canales acuosos a través de la bicapa lipídica; es una red permeable a todas las moléculas de menos de 10,000 daltons, incluídas las proteínas pequeñas.

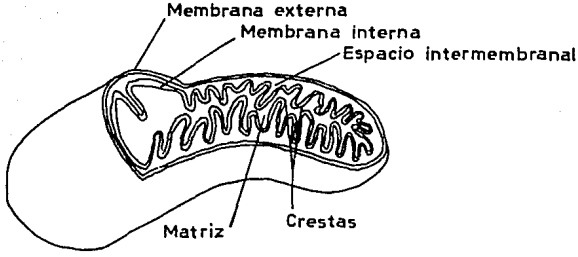



**Fig.1.** Esquema de la mitocondria y sus componentes. Aquí las moléculas orgánicas se degradan en energía que se vuelve a empaquetar en unidades más pequeñas apropiadas para la mayoría de los procesos celulares.

Esta membrana contiene enzimas como: Acil-coenzima A sintetasa, la NADH citocromo $b_5$ reductasa, glicerofosfato acil transferasa, fosfolipasa $A_2$ y una ferrosulfoproteína entre otras; es rica en colesterol y fosfatidil inositol (De Pierre y Ernster, 1977).

La topología transversal de las enzimas de la membrana interna es importante debido a que encara dos procesos metabólicos importantes para la fisiología celular, por el lado de la matriz, el ciclo de Krebs, y por el lado citosólico la glucólisis y muchos procesos biosintéticos.

La membrana mitocondrial interna tiene una relación lípido-proteína alta (4:1 por peso lo que corresponde a una molécula de proteína por cada 15 de fosfolípido) se han encontrado 60 proteínas diferentes, contiene enzimas que intervienen en el transporte de electrones y fosforilación oxidativa así, como otros sistemas de transporte. En ella se localizan la SDH, los citocromos b, c, $c_1$, a y $a_3$ asociados al transporte de electrones y ATPasas asociadas a los mecanismos de síntesis de ATP. La cardiolipina se encuentra en alta proporción, es un fosfolípido que constituye más del 10% del contenido lipídico de la membrana y que posiblemente contribuye a su impermeabilidad a iones como: $H^+$, $K^+$, $Na^+$, $Cl^-$ para el transporte de los cuales se requiere de permeasas (Alberts, *et al* 1986).

Esta membrana está plegada en numerosas crestas que aumentan su superficie total. Contiene tres tipos principales de proteínas: las que catalizan las reacciones

de oxidación de la cadena respiratoria, un complejo enzimático llamado ATP sintetasa que cataliza la producción de ATP en la matriz y proteínas específicas de transporte que regulan el paso de metabolitos hacia la matriz y hacia el exterior.

Entre las enzimas de la matriz se hallan las que metabolizan el piruvato y los ácidos grasos para producir ACoA, y los que oxidan el ACoA en el ciclo de Krebs. Los productos finales principales son el $CO_2$ y el NADH (fuente principal de electrones para el transporte a lo largo de la cadena respiratoria). También en la matriz existen varias copias idénticas del genoma de ADN mitocondrial, ribosomas y ARNt y varias enzimas necesarias para la expresión genética. (Karp, 1984).

**1.2 FUNCIONES MITOCONDRIALES**

El metabolismo de las mitocondrias desempeña importantes procesos bioquímicos: obtener energía química a partir de la oxidación de los elementos nutritivos ricos en energía y convertir las moléculas nutrientes en precursores de los sillares de las macromoléculas de la célula, síntesis de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, polisacáridos y otros, para degradación de biomoléculas.

En ciertas condiciones, las mitocondrias emplean una fracción del total de la energía respiratoria para fines diferentes de la fosforilación del ADP; como el transporte de iones a través de la membrana en contra de gradientes de concentración. Existen en la membrana mitocondrial sistemas

de transporte específicos para el ADP, ATP, Pi, piruvato, citrato, succinato, α-KG y malato; así como para los aminoácidos aspartato y glutamato (Fiskum y Lenhinger, 1980). Son sistemas activos debido a que solo en presencia de energía obtenida de la fosforilación oxidativa transportan metabolitos en contra de gradientes de concentración.

En cuanto a la acumulación de $Ca^{2+}$ las mitocondrias de los tejidos animales pueden acumularlo en contra del gradiente en un proceso energeticamente acoplado con el transporte de electrones (Fiskum y Lenhinger, 1980).

Por cada par de electrones que pasa desde el NADH hasta el oxígeno se acumulan 6 iones de $Ca^{2+}$ procedentes del medio, 2 por cada centro de conversión de energía.
Los iones $Mn^{2+}$, $Fe^{2+}$ y $Sr^{2+}$ se acumulan de modo similar en las mitocondrias, no así el $Mg^{2+}$.

Utilizan tanto los ácidos grasos provenientes del torrente sanguíneo unidos a seroalbúmina o de la hidrólisis de lípidos intracelulares como el piruvato producido en el citosol por glucólisis. Estos compuestos son activados por esterificación con coenzima A para formar ésteres acílicos de la coenzima A en la membrana mitocondrial externa y se convierte en ésteres O-acil grasos de carnitina que son transportados a través de la membrana mitocondrial interna hasta la matriz en donde son transformados en ésteres de acilgraso de coenzima A. Las etapas subsiguientes de la oxidación forman ésteres de coenzima A. Las eliminaciones

oxidativas de ACoA de los acil-CoA grasos saturados de cadena larga recibe el nombre de ß-oxidación, rindiéndo en cada ciclo un AcilCoA y un éster de CoA de un ácido graso con dos átomos de carbono menos.

Los electrones producidos en dos etapas de deshidrogenación, ($FADH_2$, NADH) fluyen hacia el oxígeno a través de la cadena respiratoria acompañados de la fosforilación oxidativa del ADP; así, el ACoA se oxida hasta $CO_2$ y $H_2O$ al incorporarse en la síntesis del citrato al ciclo de Krebs. (Stryer, 1975).

Los ácidos grasos y el piruvato se encuentran en la célula como sustancias de reserva; las grasas almacenan ácidos grasos y el glucógeno almacena glucosa la cual será posteriormente transformada en piruvato.

### 1.3 GLUCOLISIS

En la glucólisis la glucosa es degradada en el citosol a dos moléculas de piruvato las cuales conservan la mayor parte de la energía total de la oxidación de la glucosa, con la generación de dos moléculas de ATP.

### 1.4 CICLO DE KREBS

La respiración puede ser definida como la transferencia termodinámicamente espontánea de equivalentes reductores a partir de un reductor a un oxidante vía una serie de componentes redox unidos ya sea a la membrana celular (bacterias) o a membranas internas de ciertos organelos

(mitocondria) (Alberts, *et al* 1986). Este proceso va acompañado por un cambio en la energía libre el cual depende de la diferencia de potencial redox del donador y el aceptor.

El ciclo de Krebs (descubierto en 1937) es responsable aproximadamente en dos terceras partes de la oxidación total de los compuestos de carbono en la mayoría de las células. Sus principales productos finales son $CO_2$ , NADH y $FADH_2$. Los dos últimos transportan sus electrones hasta la cadena respiratoria, al final de la cual estos electrones son utilizados para reducir $O_2$ a $H_2O$.(Lenhinger, 1985).

El ciclo empieza (Fig.2), con la condensación del carbono del metilo del grupo acetilo del AcetilCoA con el grupo carbonilo del oxaloacetato; esta reacción es catalizada por la enzima citrato sintetasa, se cree que el citril CoA es un intermediario transitorio en la reacción de la citrato sintetasa, este se forma sobre el sitio activo de la enzima y se experimenta una hidrólisis con formación de CoA-SH libre y de citrato, que se liberan del centro activo.

De citrato a isocitrato la reacción es catalizada por la aconitasa, esta contiene dos átomos de hierro y azufre ácido lábil; promueve la adición reversible de agua al enlace doble del cis-aconitato, unido a la enzima de dos formas diferentes, una que conduce al citrato y otra al isocitrato.

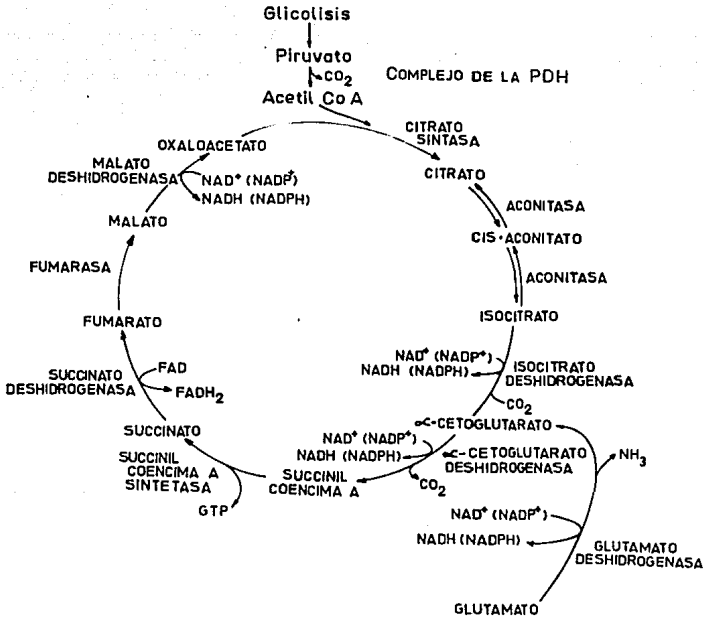



**Fig.2.** Ciclo de Krebs.
Oxidación del piruvato hasta oxigeno. En cada paso interviene una enzima específica asociada a la generación de NADH y $FADH_2$. (Avers, 1982).

En la siguiente etapa se deshidrogena el isocitrato y se desprende $CO_2$ para formar α-cetoglutarato; por medio de la reacción catalizada por la isocitrato deshidrogenasa, una dependiente de $NAD^+$ (mitocondria) y otra de NADP (mitocondria y citosol), predominando la primera.

In vitro la enzima necesita de $Mg^{2+}$ o $Mn^{2+}$ para su actividad y ésta es parcialmente inactiva en presencia de ADP.

El α-cetoglutarato se descarboxila y forma succinil CoA y $CO_2$ por la acción del complejo de la α-cetoglutarato deshidrogenasa. Este complejo esta formado por tres enzimas análogas a las del sistema del piruvato; así, como una enzima unida al TPP, $Mg^{2+}$, CoA, $NAD^+$, $FAD^+$ y ácido lipoíco. Pero no posee un mecanismo regulador tan completamente elaborado como lo es el de la PDH.

El producto siguiente es el succinil CoA (de elevado contenido energético); en las células este pierde su grupo CoA por una reacción acoplada en la que la ruptura del enlace tioéster va acompañada de la fosforilación del GDP a GTP.

La enzima que cataliza la reacción es la succinil CoA, hay formación de succinato libre y provoca la formación del grupo fosfato terminal de energía elevada en el GTP, a partir del GDP y Pi; a expensas de la energía libre liberada en la ruptura del Succinil CoA.

En esta reacción se conserva la energía libre y tiene una etapa intermedia en la que la molécula de la enzima se

fosforila en un resto de histidina del sitio activo. Este grupo fosfato, se transfiere del GDP formando GTP; esta formación acoplada del GTP se lleva a cabo debido a la energía libre de la descarboxilación oxidativa del α-cetoglutarato y es una fosforilación a nivel de sustrato acoplada al transporte de electrones.
El GTP formado por la sintetasa del Succinil CoA transfiere su grupo fosfato terminal al ADP para formar ATP mediante la acción reversible de la difosfoquinasa de nucleósido.

En la etapa siguiente el succinato se deshidrogena y forma fumarato por la succinato deshidrogenasa la cual contiene un dinucleótido de flavina y otro de adenina. Este grupo prostético funciona como aceptor de hidrógeno.
La succinato deshidrogenasa (inhibida competitivamente por malonato) se halla unida a la membrana mitocondrial interna; contiene un $FAD^+$ y dos centros ferrosulfurados, uno que contiene 2 y otro 4 átomos de hierro los cuales cambian de valencia Fe(II) a Fe(III) y así se transportan electrones.

La hidratación reversible del fumarato a malato está catalizada por la fumarasa, esta enzima, hidrata el doble enlace en posición trans del fumarato; consta de 4 subunidades las cuales son cadenas polipeptídicas y no necesita de una coenzima.

En la última reacción del ciclo de Krebs el malato es oxidado por la malato deshidrogenasa dependiente de $NAD^+$ la cual se encuentra localizada en la matriz mitocondrial y cataliza la deshidrogenación del malato generando una

molécula de oxaloacetato finalizando así el ciclo.

Del ciclo de Krebs se eliminan 2 átomos de carbono en forma de $CO_2$ y se regenera una molécula de oxaloacetato, además, de la eliminación de 4 pares de átomos de hidrógeno por deshidrogenación enzimática; 3 pares reducen 3 moléculas de $NAD^+$ a NADH y un par reduce el $FAD^+$ de la succinato deshidrogenasa a $FADH_2$ (Stryer, 1975).

Los 4 pares de electrones de los átomos de hidrógeno circulan a través de la cadena de transporte electrónico hasta el oxígeno molecular con la formación de 4 moléculas de $H_2O$, 3 de ATP, 3 de NADH y 2 de $FADH_2$. Como subproducto del ciclo se formó una molécula de GTP.

Las etapas de deshidrogenación antes mencionadas proporcionan poder reductor a la cadena respiratoria en forma de NADH y $FADH_2$.

Este ciclo está regulado, por la síntesis del citrato desde oxaloacetato y ACoA por lo que se considera un importante punto de control, la IDH estimulada alostéricamente por ADP aumenta la afinidad por sus sustratos. Si se une $NAD^+$, $Mg^{2+}$ y ADP es mutuamente cooperativa; el NADH inhibe a la IDH desplaza directamente $NAD^+$, también es sensible a ATP y el tercer sitio de control en el ciclo es la α-cetoglutarato deshidrogenasa inhibible por succinil CoA y NADH (Stryer,1975).

Aunque el ciclo de Krebs forma una parte muy importante del metabolismo aeróbico ninguna de las reacciones que conducen a la producción de NADH y $FADH_2$ utiliza

directamente el oxígeno molecular . Esta es función exclusiva de la serie final de reacciones catabólicas que tienen lugar en la membrana mitocondrial interna.

**1.5 CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES Y SINTESIS DE ATP.**

A la transferencia de electrones y los complejos respiratorios, (Fig.3) está acoplada la translocación vectorial de protones a través de la membrana esto permite crear un potencial electroquímico que puede ser utilizado para sintetizar ATP de acuerdo con el mecanismo quimiosmótico de Mitchell (Nicholls, 1982).

Las reacciones de los complejos repiratorios son medidas por moléculas pequeñas y difusibles como flavinas, centros Fe-S, complejos Fe-hemo (de los citocromos) y complejos Cu.

Las reacciones de transferencia de electrones en la membrana tienen características que las hacen distinguirse de otros procesos celulares que involucren cambios redox. Primero ocurren rapidamente en un rango amplio de distancias moleculares (>>10Å), segundo los eventos de transferencia de electrones son frecuentemente acompañados por cambios pequeños en la estructura de los sitios redox; finalmente, muchos complejos transferidores de electrones son bombas de iones (por ejemplo; citocromo C oxidasa).

Los pares de electrones procedentes de los intermediarios del ciclo de Krebs y de otros sustratos, son transportados a lo largo de la cadena respiratoria hasta el oxígeno, último aceptor de electrones en la respiración. Este proceso de transporte electrónico genera gran cantidad de energía la cual se utiliza para la conversión de ADP + Pi en ATP y es llamado fosforilación oxidativa.

Según la hipótesis quimiosmótica los intermediarios químicos de alta energía son substituidos por una conexión entre procesos químicos y de transporte.(Mitchell,1975).

Cuando los electrones de alta energía de los hidrógenos del NADH y el FADH son transportados a lo largo de la cadena de transporte electrónico , la energía liberada, cada vez que pasan de ciertas moléculas portadoras a la siguiente es utilizada para bombear protones a través de la membrana interna, desde la matriz hasta el espacio intermembranal. Esto crea un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna, y el reflujo de protones a favor de este gradiente es utilizado a su vez para impulsar, a través de una enzima ligada a la membrana, la ATP sintetasa, la conversión de ADP + Pi en ATP, completando el proceso de la fosforilación oxidativa.

El ADP es llevado a la matriz mitocondrial por un sistema de transporte de intercambio ADP-ATP, por cada molécula de ADP introducida una molécula de ATP es desplazada hacia afuera a favor del gradiente electroquímico.

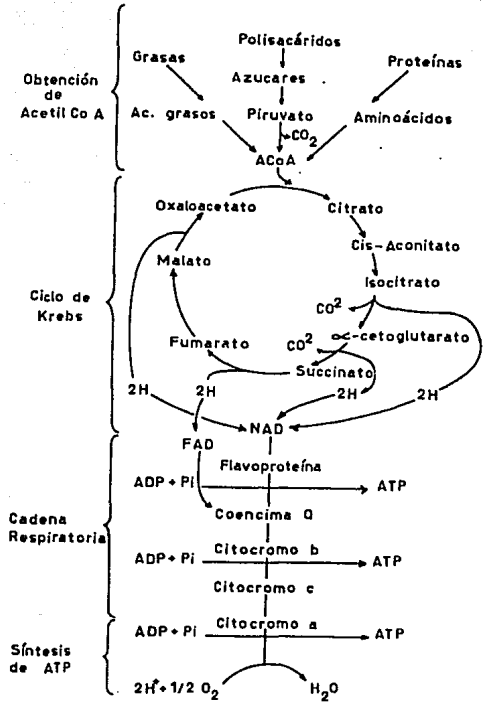



**Fig.3.** Las etapas de obtención de energía de las sustancias de reserva son: Glucólisis, degradación a constituyentes simples y solubles; Ciclo de Krebs, oxidación hasta $CO_2$ con formación de equivalentes reductores NADH y $FADH_2$; Cadena respiratoria, transferencia de electrones desde los equivalentes reductores hasta el oxígeno molecular y Síntesis de ATP. (Avers,modificado 1982).

Otra función del gradiente consiste en el bombeo de $Ca^{2+}$ desde el citosol (la concentración se tiene que mantener en un cierto valor <10 $\mu M$) ya que pequeñas alteraciones de la concentración citosólica de $Ca^{2+}$ son señales que regulan varios procesos celulares.

Cuanto mayor sea la cantidad de energía del gradiente electroquímico utilizada para transportar iones y moléculas hacia el interior de la mitocondria menor será la que quede disponible para impulsar la síntesis de ATP a través de la ATP sintetasa. Esta enzima también llamada ATPasa $F_1F_0$ está compuesta por dos sectores, el $F_1$ se proyecta hacia la matriz desde la membrana interna y se halla unida mediante la porción $F_0$ inmersa en la membrana interna.

La última oxidación se realiza a través de una vía que utiliza los intermediarios del transporte electrónico, los cuales captan la energía a medida que es liberada y la emplean para impulsar la reacción ADP + Pi = ATP + $H_2O$ (Nicholls,1982).

Las moléculas que deben ser oxidadas , son hidrógenos en vez de hidratos de carbono y la vía indirecta implica la separación de los átomos de hidrógeno en protones y electrones, y los protones van hacia el ambiente acuoso donde permanecen hasta que los electrones alcanzan a la citocromo oxidasa que promueve su transferencia hasta el oxígeno el cual es el aceptor electrónico final de la cadena respiratoria.

Las moléculas que transfieren electrones y las moléculas de enzima que sintetizan el ATP promueven la entrada de piruvato, fosfato y ADP y la salida de ATP durante la fosforilación que ocurre durante la oxidación.

La mayor parte de los pares de electrones que se incorporan a la cadena respiratoria proceden de las deshidrogenasas que utilizan los nucleótidos de piridina, $NAD^+$ y NADP como aceptores de electrones.(Lenhinger,1985).

La cadena de transporte de electrones consta de deshidrogenasas unidas a piridín nucleótidos, a flavín nucleótidos, citocromos o complejos I, II, III, IV, (Fig.4.)

El complejo I constituído por la NADH ubiquinona oxidoreductasa, está formado por 25 polipéptidos diferentes, además de FMN, ferrosulfoproteínas, ubiquinona o coenzima Q y fosfolípidos.

Su función es transportar electrones del NADH a la coenzima Q, que es el único componente de la cadena que no se encuentra covalentemente unido a otra proteína y funciona como acarreador móvil de electrones entre las flavoproteínas y los citocromos. El transporte de electrones inducido por este complejo es inhibido por rotenona, piericidina A, barbitúricos, demerol y mercuriales, estos actuán impidiendo la reducción de la coenzima Q y la oxidación de las proteínas ferrosulfuradas (Martínez y Chávez,1988).

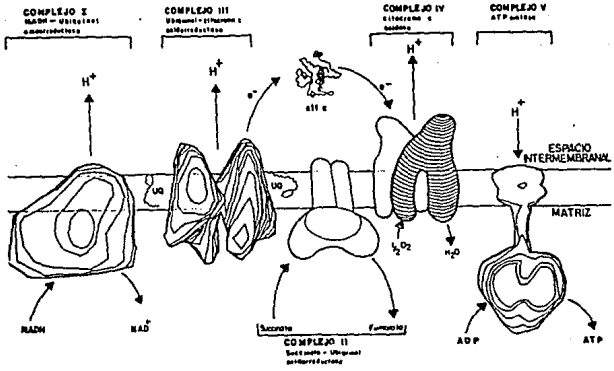



Fig.4. Distribución de los complejos respiratorios dentro de la membrana interna mitocondrial los cuales intervienen en el transporte de electrones. (González-Halphen,1990).

El complejo II está formado por la succinato-ubiquinona oxido-reductasa. Su principal componente es la succinato deshidrogenasa, la cual participa en el ciclo de Krebs. La enzima contiene un $FAD^+$ unido covalentemente y dos centros FeS, la otra subunidad solo contiene un centro FeS. La función de este complejo es transportar electrones del succinato a la ubiquinona, aunque también los puede ceder a otros aceptores artificiales como el ferricianuro y el metasulfato de fenacina.

La ubiquinona: citocromo c oxidoreductasa, conforma el complejo III. Formado de 10 polipéptidos, tres de los cuales están asociados a los centros redox, estos son los hemos $b_{562}$, $b_{566}$ y c. La función de este complejo es la transferencia de electrones de la dehidroubiquinona al citocromo c. Se han propuesto dos mecanismos de translocación de protones, el ciclo de la coenzima Q y el ciclo del citocromo b.

Este complejo es inhibido por antimicina, HQNO, mixotiazol y 2,3 dimercaptopropanol (Martínez y Chávez,1988).

EL citocromo b localizado en la parte media de la bicapa membranal, la porción catalítica del citocromo $c_1$ se encuentra del lado citosólico de la membrana, el citocromo c tiene una localización periférica.

La citocromo oxidasa constituye el complejo IV, es una enzima compuesta por los citocromos a (lado citoplásmico) y $a_3$ (matriz), esta cede electrones al oxígeno molecular. Se

estima que la reacción de la citocromo oxidasa utiliza el 90% del consumo total de oxígeno de la mayoría de las células. La citocromo oxidasa es una proteína integral formada de 6 subunidades. Este complejo es inhibido por CN, $N_3$, CO, $CO_4$, SH; el cianuro y la azida reaccionan con la forma férrica de este transportador, mientras que el CO inhibe la forma ferrosa.

La síntesis de ATP, (Fig.3) se lleva a cabo durante el transporte de electrones desde el NADH hasta el oxígeno molecular, esta acoplado a la translocación de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal de las mitocondrias. Esta translocación es llevada a cabo por tres de los complejos de la cadena respiratoria (I, III y IV) los cuales son sitios generadores de $\mu H^+$. (Mitchell, 1975).

Algunas sustancias químicas llamadas agentes desacoplantes impiden la fosforilación del ADP a ATP al desacoplar reacciones entre el transporte de electrones y la síntesis de ATP. Estos aumentan la permeabilidad de la membrana interna con respecto del $H^+$. Por ejemplo el 2,4 dinitrofenol y el CCCP son sustancias lipofílicas capaces de unir $H^+$ a un lado de la membrana y transportarlos hacia el lado en que la concentración de $H^+$ es inferior.

**1.6 CONTROL RESPIRATORIO (CR).**

Como se mencionó anteriormente las mitocondrias en el último paso consumen oxígeno durante el transporte de electrones.

La presencia de ADP y el Pi en concentraciones limitantes en el medio de respiración induce una estimulación en el consumo de oxígeno (edo.3). Esta estimulación se debe a la fosforilacion del ADP en la mitocondria e induce un incremento en la oxidación de sustratos, con el consecuente incremento de coenzimas reducidas para la cadena de transporte de electrones, que son capaces de generar el potencial electroquímico para sintetizar ATP a partir de ADP adicionado (Martínez y Chávez,1988).

La estimulación del consumo de oxígeno determina cuando el ADP es transformado en ATP, lo que sugiere que el ADP es un regulador de la cadena de transporte de electrones; después el transporte de electrones regresa a su estado basal y hay poco consumo de oxígeno a este estado de la respiración se la denomina edo.4.

El control respiratorio es un parámetro que nos permite conocer el estado de acoplamiento entra la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa.

### 1.7 ADP/O

Es un parámetro más para determinar la capacidad que tienen algunos sustratos para permitir la síntesis de ATP en las mitocondrias. La cantidad de ATP sintetizado que puede ser apoyada por un sustrato dependerá de las coenzimas que participan en su oxidación (Martínez y Chávez,1988).

Se determina por medio de la aceleración de la respiración en estado 3 obtenida cuando se mide una pequeña alicuota de ADP que es agregada a las mitocondrias.

Casi la mayoría del ADP agregado se fosforila a ATP, la relación ATP/ADP es tipicamente 100:1 cuando se recupera el estado 4, la ADP/O se obtiene de los mismos trazos que son utilizados para calcular el CR, la relación de nmolas de ADP agregado/nátomos de oxígeno consumido.

Por sustratos que reducen $NAD^+$ (malato, isocitrato, α-cetoglutarato) el valor teórico es 3, lo que significa que por cada oxígeno consumido se sintetizan tres moléculas de ATP; mientras que para sustratos que reducen al $FAD^+$ (succinato) el valor de ADP/O teórico es de 2 (Hatefi,1985).

### 1.8 BIOLOGIA DE *Euglena*

*Euglena gracilis* es un organismo muy interesante por su origen y características animales, de plantas superiores y algunas exclusivas del grupo, como la de obtener enérgía por medio de fermentación de ésteres de cera; además, presenta una amplia capacidad adaptativa en cuanto a metabolismo, puede llevar a cabo la fotosínteis y crecer heterotróficamente en la obscuridad usando como sustratos acetato, succinato, G+M, glucosa e incluso etanol; en ambos casos varía la forma de moléculas orgánicas utilizadas y la serie de factores de crecimiento requeridos; incluso las diferentes cepas de *Euglena gracilis* se diferencian entre sí ya que algunas tienen la capacidad de crecer en hidratos de

carbono y otras no (todas en acetato),tienen necesidades orgánicas variadas (aminoácidos, purinas, pirimidinas, factores de crecimiento, etc.) incluso cuando se desarrollan heterotróficamente presentan una amplia capacidad sintética, por lo cual todavía necesitan incorporar nutrientes inorgánicos (Buetow, 1968; 1989).

En los últimos años se han efectuado un gran número de investigaciones protozoológicas, dirigidas en parte al conocimiento directo de estos organismos y sobre todo al estudio de fenómenos biológicos generales por ser un excelente material a nivel celular teniendo la ventaja de poder obtener un gran número de células idénticas e incluso en el mismo estadio de crecimiento.

Los estudios con cultivos axénicos han tenido mucha importancia en el entendimiento de los sistemas bioquímicos que utilizan los protozoos para las interconversiones entre moléculas orgánicas, a fin de obtener energía y los tipos de moléculas requeridas para las reacciones sintéticas como: síntesis de proteínas, fotosíntesis, hidratos de carbono, ciclo de los ácidos tricarboxílicos, ciclo del glioxilato, oxidación de ácidos grasos, etc. (Sleigh, 1986).

*Euglena gracilis*, (Fig.5) proporciona un modelo experimental muy interesante para el estudio de muy diversas funciones, en este caso mitocondriales.

**Fig.5.** Electromicrografía en transmisión de *Euglena gracilis*, mostrando algunas de sus estructuras, en células crecidas en ausencia de luz. Obtenida por Armando Zepeda R. y Rodrigo Velázquez E. en el Depto. de Microscopía Electrónica del Inst. Nal. de Cardiología "Ignacio Chávez".

El género *Euglena* presenta una distribución muy amplia encontrandose en muy diversos habitats: agua dulce, salobre, ácida, alcalina, en condiciones aerobicas, anaerobicas; existen formas solitarias, coloniales "palmelas" y parásitas (Vickermann y Cox, 1967; Buetow, 1968).

Los Euglénidos son un grupo taxonómicamente problematico por el hecho de presentar características animales y vegetales por lo que, han sido ubicados tanto en el Reino Animal como en el Vegetal.

Desde el punto de vista botánico pertenecen a la división Euglenophyta (del griego eu-verdadero, glene-globo ocular y phiton-planta), clase Euglenophyceae (Margulis,1981) al igual que en la clasificación de Whittaker y Margulis 1978. Se sugiere que de aquí derivaron algas como las Clorophytas y Charophytas las cuales a su vez dieron origen a Traqueofitas y Briofitas respectivamente. (Whittaker, 1978).

La propuesta actual de ubicación taxonómica de éste grupo (Margulis *et al*, 1990) es la siguiente:

Reino Protoctista

Phylum Euglenida

Clase Euglenophyceae

Según Levine y col. la clasificación es la siguiente:

Reino Protista

Phylum Sarcomastogophora

Subphylum Mastigophora

Clase Phytomastigophorea

orden Euglenida

Suborden Euglenina

Los zoólogos los han ubicado en el Phylum Protozoa, clase Phytomastigophorea.

Esta clasificación es difícil ya que como se mencionó anteriormente presentan características de animales (Fig.6) presentan en la parte anterior por donde entra el alimento una invaginación que consiste de un canal estrecho que se expande posteriormente en un reservorio en donde se vacía la vacuola contráctil.

*Euglena gracilis* presenta dos tipos de flagelos (Fig.7) unidos a los blefaroplastos en la base del reservorio, uno interno que no emerge del reservorio usualmente unido al fotoreceptor y el cual probablemente contribuye a la transmisión de señales, y otro que se extiende más allá de la abertura anterior siendo el responsable del movimiento; este es helicoidal ; puede desplazarse a lo largo del flagelo en ambos sentidos, pero es mucho más frecuente que las ondas de movimiento se originen en la base del flagelo que en su extremo (Sleigh,1986). Este flagelo presenta una hilera de filamentos delgados (microfilamentos) los cuales modifican el movimiento del agua que es producido por la ondulación flagelar.

Presentan una mancha ocular o estigma con un pigmento llamado astaxantina como el que se encuentra en crustáceos (Buetow,1968).

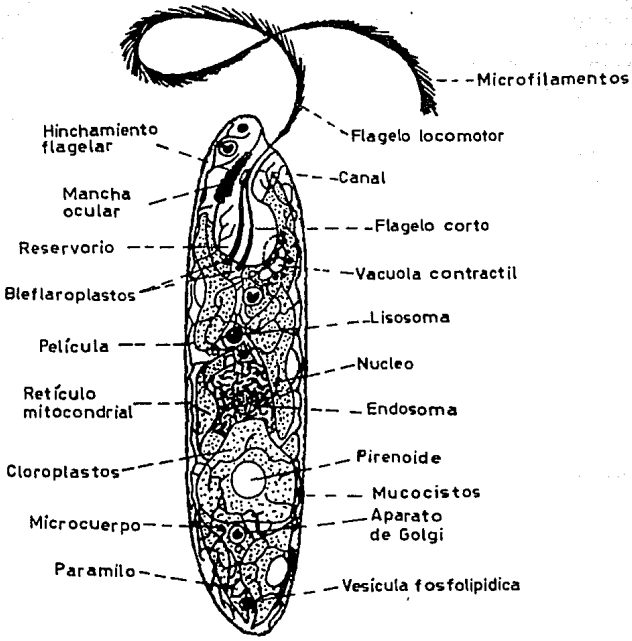



**Fig.6.** Esquema de *Euglena* indicando sus estructuras características (Buetow, modificado 1968).

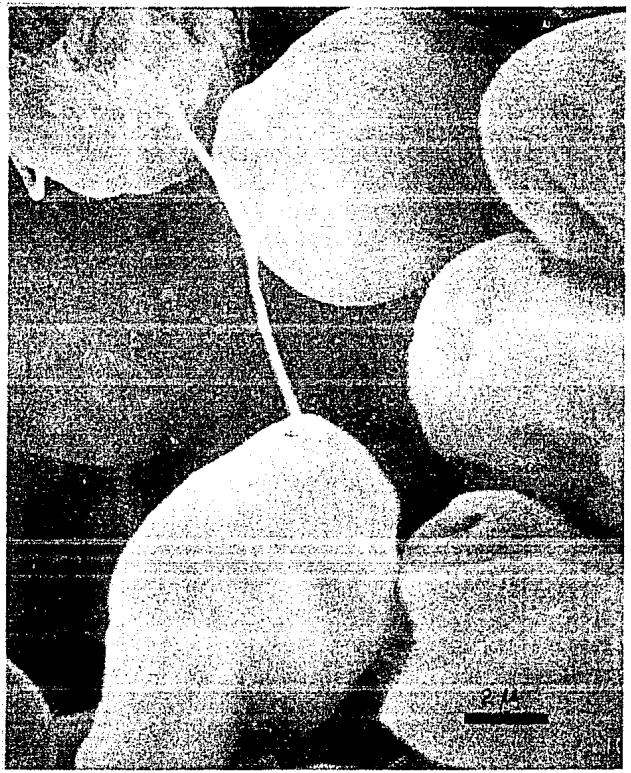



Fig.7. Electromicrografía en barrido. Se observa el flagelo locomotor de *Euglena gracilis*, el cual sale del reservorio, de células de un cultivo en ausencia de luz. Obtenida por Armando Zepeda R. y Rodrigo Velázquez E. en el Depto. de Microscopia Electrónica del Inst. Nal. de Cardiología "Ignacio Chávez".

Como todos los protozoarios excepto amibas poseen una membrana celular externa relativamente rígida denominada película la cual presenta estrias en espiral (Fig.8), abajo de estas se localizan los microtúbulos paralelos; su relativa flexibilidad o elasticidad parece tener alguna relación con la orientación de las estriaciones de la película. Esta presenta un mecanismo contráctil, citoplásmico esencialmente ameboide.

Leedale en 1969, propuso que la película era de origen proteíco tal vez queratina o elastina.

Se han encontrado fosfatasas ácidas en la película (Sommer y Blum, 1965).

Adyacentes a la película se encuentran mucocistos los cuales secretan material mucoide o mucílago el cual tiene la función de lubricar entre los surcos o estrias de las ondulaciones durante las contracciones , fenómeno muy similar en diatomeas para adeherirse al sustrato. (Vickermann y Cox, 1967; Buetow, 1968; 1982).

Nakano *et al*, 1987 al aislar la película y analizarla mostraron un alto contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos de 68.7%, 17.9% y 13.5% respectivamente. La composición de aminoácidos es alta, prolina (13.91%), valina (10.85%) y alanina (11.54%) este contenido, contribuye a la flexibilidad y elasticidad de las células de *Euglena*.
La composición de los lípidos polares de la película es muy similar a la encontrada en biomembranas de otros organismos

**Fig.8.** Micrografía electrónica en barrido. Se observan claramente las estriaciones de la película o membrana externa celular de *Euglena gracilis*. Células crecidas en ausencia de luz. Obtenida por Armando Zepeda R. y Rodrigo Velázquez E. en el Depto. de Microscopia Electrónica del Inst. Nal. de Cardiología "Ignacio Chávez".

La proporción de proteína a lípidos es de 3.8 en *Euglena* mientras que las proporciones en membranas celulares eucariontes varía entre 1.0 y 2.0.

Otra característica única es su contenido relativamente alto de carbohidratos. La pentosa y la metilpentosa componen el 80% del total de los azúcares; esto difiere de otras biomembranas de organismos en donde el mayor componente es la hexosa. Solo presenta un aminoazúcar, la glucosamina; la galactosamina es un componente común en muchas biomembranas pero está ausente en la película de *Euglena gracilis*.

En cuanto a las mitocondrias, éstas varían en cantidad según el volumen del citoplasma, tamaño y estructura, presentan una superficie irregular (Leedale *et al*, 1969). La mitocondria está limitada por dos membranas de 60 Å aproximadamente (Gibbs, 1960) las cuales contienen enzimas que intervienen en el ciclo de Krebs y la fosforilacion oxidativa.

La membrana interna está rodeada por una zona cristalina.

La membrana externa es irregular (Leedale *et al*, 1965) y por micróscopia electrónica se sabe que existen dos formas de mitocondrias según las condiciones de crecimiento del cultivo y la fuente de carbono; una grande en forma de red (grande) filamentosa y ramificada que recibe el nombre de retículo mitocondrial el cual ocupa del 15 al 16% del volumen total de la célula, esta puede ser temporal (Calvayrac *et al*.,1972.,1974., Ledoight *et al*., 1972.,

Lefort-tran, 1975) y otra pequeña y redonda (distribuídas en toda la célula).

Otros microrganismos presentan retículo mitocondrial *Microsomas pusilla*, *Trachelomonas*, *Menoideum* y *Rhabdmonas*, *Chlamydomonas* y *Chlorella*, hongos, levaduras y plantas.

Osafune *et al.*, 1987 observó cambios dinámicos en la morfología del condrioma de *Euglena gracilis* crecida en la obscuridad y en fase estacionaria; una forma reticular, granular y otra intermedia entre ambas y que esto dependía aparentemente del ciclo celular, fuente de carbono y presencia o ausencia de inhibidores.

En cuanto a la división de la mitocondria se han propuesto dos modelos, uno propone que durante la división celular todo el condrioma se divide y otro que se fragmenta previamente en muchas mitocondrias las cuáles se reparten en las células hijas (Buetow, 1989).

Brandes *et al.*, 1964 reportó que por estudios citoquímicos algunas mitocondrias muestran actividad de la fosfatasa ácida y que los sitios de reacción invariablemente aparecen como agrupaciones separadas de la zona cristalina, de la matriz o de ambas.

Existen diferentes tipos de mitocondrias según las condiciones de crecimiento del cultivo y la fuente de carbono. Cuando a *Euglena gracilis* se le mantiene en ayuno, sin fuente de carbono muchas de las mitocondrias quedan encapsuladas en una como membrana que es comparable con vacuolas autofágicas encontradas en células de organismos.

Al igual que las plantas poseen cloroplastos (Fig.9) crecidas en presencia de luz, realizan fotosíntesis usando agua y $CO_2$ como sustratos y liberando $O_2$; sin embargo, no son capaces de crecer sólo por fotosíntesis necesitan vitaminas como B12, aminoácidos y una fuente de carbono (Calvayrac, 1970).

Los cloroplastos son muy similares a los que se presentan en las algas verdes; excepto por la membrana que los cubre: doble en algas verdes y triple en *Euglena gracilis*. Poseen clorofila a y b , ß-carotenos y derivados carotenoides (aloxantina, anteroxantina, astaxantina) (Buetow, 1968).

A diferencia de animales y plantas ; *Euglena gracilis* forma paramilo, (Fig.5) un polímero glucosídico con enlaces ß-1-3 entre los monosacáridos. Se ha observado que al crecerlas sin fuente de carbono aumenta considerablemente la cantidad de paramilo (Malkoff y Buetow, 1964) y es utilizado en periódos de obscuridad (Cook, 1966). Presentan tetralosa como segundo carbohidrato de reserva (Miyatake *et al.*, 1984).

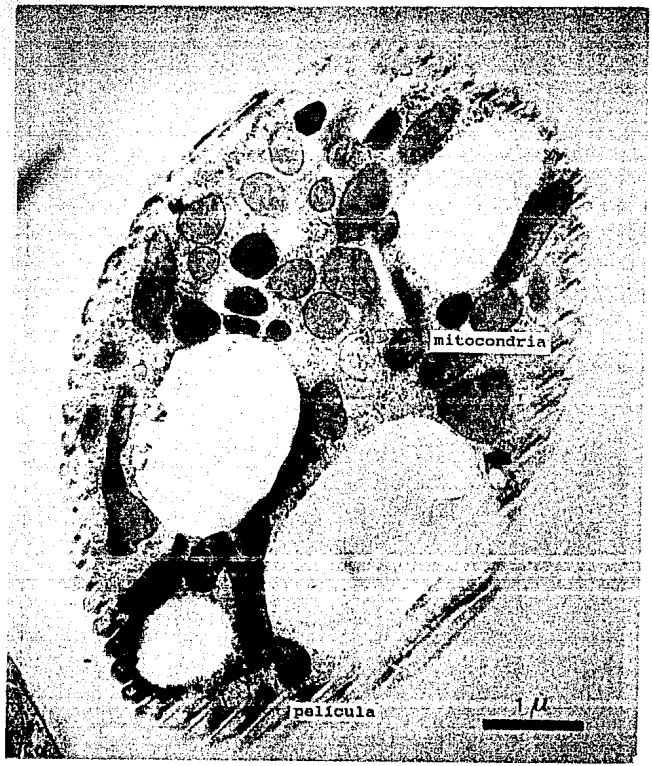


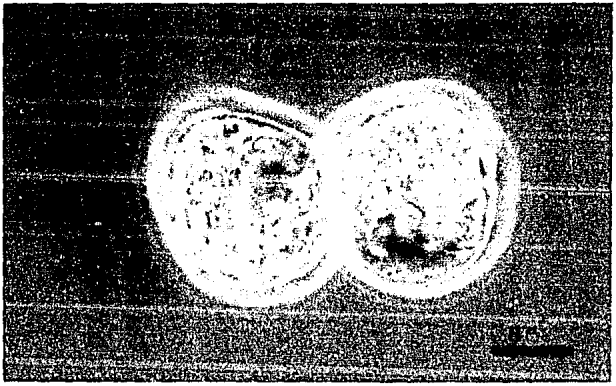

**Fig.9.** Electromicrografía en transmición. Observándose claramente los cloroplastos de *Euglena gracilis* crecida en presencia de luz en un medio de cultivo Cramer-Myers. Obtenida por Armando Zepeda R. y Rodrigo Velázquez E. en el Depto. de Microscopia Electrónica del Inst. Nal. de Cardiología "Ingacio Chávez".

En cuanto a la reproducción no es de tipo sexual y no se presenta meiosis. Su reproducción es asexual por fisión longitudinal binaria con división simetrogénica (Fig.10); es decir que produce células hijas en imagen especular; el tiempo varía de 10-14 hrs. dependiendo de la fuente de carbono (Sleigh, 1986).

Se ha observado la formación del huso mitótico, pero no forma placa ecuatorial metafásica y los cromosomas que carecen de centrómeros se desplazan hacia los polos de manera autónoma. Antes de que haya división los flagelos se desplazan al mismo extremo; después se divide el genoma y por último la célula se divide longitudinalmente.

Para su crecimiento el rango de pH del medio de cultivo puede variar de 2.8 a 7.8; pero el pH óptimo depende de la fuente de carbono del cultivo (Cook, 1968). Sobrevive a condiciones extremas de anoxia o altos niveles de radiación ionizante (Buetow, 1989) y algunos de estos organismos son capaces de soportar altas concentraciones de metales pesados (Danforth, 1953).

Son resistentes a cadmio $5x10^{-4}M$ y cobre, este mecanismo de resistencia está basado en la exclusión celular que parece estar relacionada con la disminución del material orgánico (Bariaud y Mestre, 1984), este material puede detoxificar también cobalto y zinc externamente.



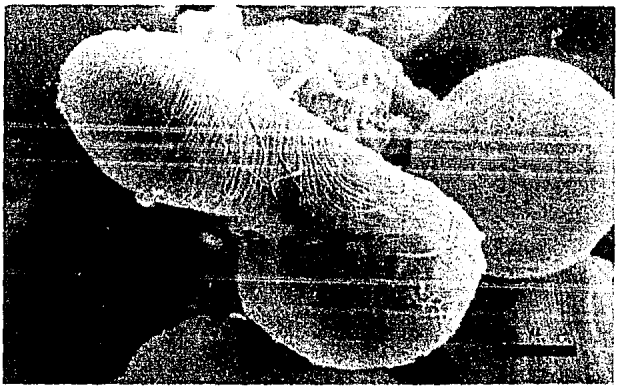


**Fig.10.** Reproducción asexual de *Euglena gracilis* por fisión longitudinal binaria con división simetrogénica, de células crecidas en ausencia de luz.
**A.** Fotomicrografía en contraste de fases.
**B.** Micrografía electrónica en barrido.
Obtenida por Armando Zepeda R. y Rodrigo Velázquez E. en el Depto. de Microscopia Electrónica del Inst. Nal. de Cardiología "Ignacio Chávez".

En *Euglena gracilis* el mecanismo de tolerancia al cadmio puede no ser explicado por detoxificación del cadmio externo, pero está asociado con la disminución de captación de cadmio por las células (Bariaud, 1982). Por otra parte, el cadmio provoca cambios en la ultraestructura de las mitocondrias dañando algunas de las enzimas involucradas en la respiración (Duret *et al.*, 1986). También se han reportado (Kahn, 1974) cultivos de células resistentes a dinitrofenol (DNP), aumentando esta resistencia si son crecidas en presencia de arsenato, se mencionan que ésta adaptación es similar a la que se observa en *Tetraymena pyriformis* en cuanto a su resistencia a cianuro, por otra parte tambiém son resistentes a CCCP y "1799" (Khan, 1974).

En el medio de cultivo se requiere de azufre en forma de sales de sulfato como en plantas ya que en animales se necesitan formas reducidas; hierro a bajas concentraciones $5x10^{-7}$M; zinc el cual es muy importante ya que la densidad final de las poblaciones es función lineal de la cantidad inicial de zinc entre 0-15$\mu$g/l (Buetow,1989).

Wacker en 1962, señala que la síntesis de proteínas disminuye por deficiencia de zinc.(Wacker, 1962).

En cuanto al nitrógeno se requiere de sales de amonio o algunos aminoácidos, observándose gránulos de polifosfato en el citoplasma cuando no hay síntesis de plástidos por lo que es posible que al igual que las bacterias heterótrofas lo utilicen como fuente de energía y los requerimientos de oxígeno son muy importantes para un cultivo óptimo.

Si carecen de fuente de carbono la actividad de las enzimas disminuye, hay una vacuolizacón en el retículo endoplásmico y se formam citolisosomas los cuales rodean a la membrana. Estos cambios van acompañados de una disminución en el RNA, proteínas y capacidad oxidativa (Blum y Buetow, 1963).

Necesita de otros minerales traza, pero en mucho menor proporción que los ya antes mencionados, como cobre, molibdato, manganeso, boro y cobalto entre otros.

En cuanto al requerimiento vitamínico, la vitamina $B_{12}$ (cianocobalamina) es muy importante, su ausencia reduce la cantidad de ribonucleótidos, propicia un desbalance en el crecimiento del cultivo, retarda la citocinesis y cariocinesis en la división de cloroplastos y mitocondrias, conduciendo a un incremento en el número de estos organelos por célula. Por otra parte la deficiencia de $B_{12}$, no parece afectar la respiración en *Euglena* por lo menos a nivel de consumo de oxígeno (Seeger, 1991).

Las células que son crecidas en deficiencia de $B_{12}$ muestran una mayor acumulación de paramilo y carotenos que en células normales (Buetow, 1968).

La vitamina $B_1$ (tiamina) al ser deficiente, causa efectos pero no tan obvios como la $B_{12}$.

En el metabolismo de *Euglena* se han encontrado enzimas de la glucólisis, aldolasas clase I y II; la primera se encuentra en animales, plantas y protozoarios, la II en hongos, bacterias y algas verde azules.

En *Euglena gracilis* y *Chlamydomonas reinhardi* se encuentran ambos tipos (Buetow, 1982; 1989).

De la ruta del glicolato, solamente se ha descrito la glicolato deshidrogenasa (Lord y Merret, 1971), primer enzima de la vía en algas verdes y en plantas está presente la glicolato oxidasa.

En *Euglena* hay síntesis de ácidos grasos pero a diferencia de los mamíferos no incorporan malonil CoA a los ácidos grasos y esta síntesis es sensible a avidina.

La síntesis de paramilo, durante la fase exponencial de crecimiento en la obscuridad se observan en las células zonas blanquecinas que son sitios de síntesis y almacen de paramilo (Fig.5).

Todas las enzimas de la ruta oxidativa de la pentosa fosfato están presentes al igual que las del ciclo del glioxilato y probablemente ciclo de Calvin, pero a diferencia de plantas superiores no se forma sacarosa como producto principal fotosintético debido a la ausencia de las enzimas que transforman fructuosa 6-fosfato en UDPG.

En la relación con la fijación heterotrófica de $CO_2$, Lynch y Calvin en 1953, reportaron en *Euglena gracilis* la capacidad de producir ácido málico, cítrico, aspártico y glutámico (productos típicos de fijación de carbono no fotosintética) además, tiene la capacidad de formar varios compuestos fosforilados que son productos típicos de la fotosíntesis, esta capacidad no se encuentra en otros micoorganismos.

Este género lleva a cabo la fermentación de ceras en condiciones de anaerobiosis o creciendo en sustratos que no estimulen el consumo de oxígeno como la glucosa, a diferencia del acetato y el etanol que si lo estimulan, en cuyo caso, convierten el paramilo en ésteres de cera sintetizando ATP (Inui *et al*, 1982).

## II ANTECEDENTES.

Por muchos años se ha estudiado a la mitocondria de *Euglena* ya que presenta algunas funciones similares a las descritas en mitondrias de mamíferos y plantas superiores,en cuanto a la obtención de energía: Ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa.

Danforth en 1953, fue el primero en demostrar la existencia del ciclo de Krebs en *Euglena*, al igual que la oxidación de diversos sustratos, a diferentes valores de pH. Así, el etanol, acetato y lactato fueron oxidados a pH 7, mientras que el succinato, fumarato y malato fueron oxidados en medio ácido, demostrando que las mitocondrias de *Euglena* eran capaces de oxidar de 6 a 9 intermediarios del ciclo de Krebs.

Actualmente existen investigaciones sobre la actividad de las enzimas involucradas en el ciclo de Krebs y algunas han sido aisladas y purificadas (Buetow, 1989)

Sin embargo, no se conocen los mecanismos que regulan la actividad de estas enzimas en la vía. Exceptuando el complejo de la PDH, la α-KGDH y la sintetasa del Succinil CoA, las cuales son substituídas por la PDOR dependiente de NADP, α-cetoglutarato descarboxilasa dependiente de TPP y una succinato semialdehído deshidrogenasa respectivamente.

En las mitocondrias de *Euglena* se han reportado además del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, la síntesis aeróbica de lípidos (Grobovsky *et al.*, 1979), β-oxidación de ácidos grasos (Graves y Becker, 1974), activación (Saidha et

*al.*, 1985) y reducción (Brunold y Schiff, 1983) de los sulfatos, metabolismo del propionato por la ruta del lactato (Yokota *et al.*, 1982), síntesis de aminoácidos (Oda, 1982; Isegawa *et al.*, 1984), hidrólisis de fosfato inorgánico (Miyatake y Kitaoka 1981), actividad de la adenilato cinasa (Calvayrac, 1985) ciclo del glioxilato (Yokota *et al.*, 1985) y síntesis de paramilo y tretalosa como carbohidratos de reserva en condiciones heterótrofas (Miyatake *et al.*, 1986).

Por otra parte, si las células son crecidas en presencia de lactato como fuente de carbono acumulan una gran cantidad de paramilo en la fase exponencial del crecimiento y éste disminuye en la fase estacionaria.

Se sabe que el calcio es un importante regulador del metabolismo intramitocondrial en mamíferos, ya que actúa so bre las enzimas que son el punto de control del ciclo de Krebs, PDH, IDH y α-KGDH (Handsford, 1985, Moreno-Sánchez *et al.*, 1988 y Moreno-Sánchez *et al.*, 1990).

Sin embargo, Tamponnet (1989) reportó un sistema análogo en *Euglena gracilis* al sistema antiport $Ca^{2+}/Na^{2+}$ encontrado en mitocondrias de mamíferos, lo que sugiere que hay cierta sensibilidad a calcio y captación de éste.

En *Euglena* la fototaxis ha sido estudiada con varias concentraciones de $Ca^{2+}$, las cuales son capaces de modificar la velocidad y orientación de la célula (Meyer y Hildebrand, 1988).

## 2.1 CICLO DE KREBS EN *Euglena*

El complejo de la PDH no ha sido detectado en mitocondrias de *Euglena gracilis*, (Inui *et al.*, 1984). La enzima que substituye este complejo es la PDHOR la cual es extremadamente sensible a oxígeno, y el piruvato como sustrato no es oxidado, en presencia de oxígeno este inhibe la actividad de la enzima in situ, in vitro, y restablece la actividad un 90%. En anaerobiosis la enzima no es sensible a altas concentraciones de piruvato. Esta parece ser la clave para regular en la mitocondria la síntesis de ácidos grasos y la fermentación de ésteres de cera en condiciones anaerobias.

La enzima tiene un centro fierro-azufre que contiene TPP, sin embargo, no presenta un grupo prostético lipoil.

La actividad de la enzima disminuye en células crecidas en un medio deficiente de tiamina y aumenta incubándola con fierro ó añadiendo un agente reductor como el DTT en atmósfera de argón o en 2-mercaptoetanol.

Su actividad no aumenta al agregarle TPP y $MgCl_2$ a diferencia de la α-KGDH. La PDHOR fue aislada y purificada a 30°C por Inui (1987, 1990). Es una proteína homodimérica de un peso molecular de 309,000 Da, tiene una actividad de 0.6 $\mu moles/mg^{-1}/min^{-1}$.

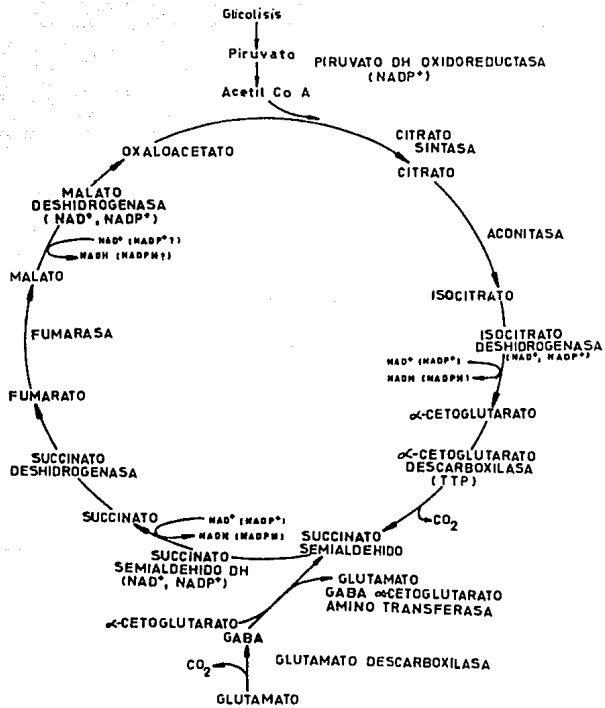



Fig.11. Ciclo de Krebs en *Euglena gracilis*. (Buetow,1989).

El piruvato sufre una descarboxilación a acetaldehido y posteriormente se oxida para formar acetato y finalmente producir AcetilCoA, ésto ocurre en levaduras y en *Euglena* o bien, el piruvato pasa por una carboxilación oxidativa directa a AcetilCoA en una sola reacción como sucede en mamíferos.

Se ha reportado (Yokota *et al.*, 1982b; Inui *et al.*, 1982 y 1984b) en la mitocondria de *Euglena* un complejo de la PDH dependiente de lipoato, CoA y NAD; este complejo está ampliamente distribuído en animales, plantas y algunos microrganismos. Se ha demostrado la presencia de otra PDH pero, dependiente de NADP, metilviológeno y $FAD^+$ como aceptores de electrones. Esta enzima es fuertemente inhibida por oxígeno y presenta algunas propiedades semejantes a la Piruvato Sintetasa presente en bacterias anaerobias.
Se ha considerado de importancia en la fermentación de ésteres de cera.

Citrato sintetasa. Cataliza la reacción de oxaloacetato a citrato, y se encuentra localizada en la matriz mitocondrial y los glioxixomas de *Euglena gracilis*; participa en el ciclo del glioxilato (Graves *et al.*, 1972; Collins y Merret 1975). Aislada y purificada (Cannons y Merrett, 1984), está formada de una subunidad con un peso molecular de 44,000 Da similar a la de otros eucariontes.

Aconitasa. Involucrada en la conversión de citrato a isocitrato localizada en la membrana interna de la mitocondria y detectada tanto en mitocondrias como en partí-

culas submitocondriales (Bégin-Heick, 1973); en mitocondrias y glioxixomas (Cook y Carver, 1966. Còok, 1968). Esta enzima es inactivada en presencia de sacarosa, y a bajas concentraciones de AMP, ADP y ATP.

Isocitrato Deshidrogenasa. Lleva a cabo la conversión de isocitrato a α-cetoglutarato, se sabe que existen dos formas que son dependientes de NADP las cuales se encuentran localizadas en citoplasma y mitocondrias con Km de 7-20μM y 17-130μM respectivamente, estas requieren para una mayor actividad de $Mn^{2+}$ y $Mg^{2+}$ (Oda *et al.*, 1981) y la dependiente de $NAD^{+}$ sólo se encuentra en mitocondria con Km de 0.41mM (Collins y Merrett, 1975). En *Euglena gracilis* sólo está presente la forma dependiente de $NAD^{+}$.

En mitocondrias de animales y plantas el α-cetoglutarato es convertido a succinato vía de la succinil CoA catalizado por el complejo multienzimático de la α-KGDH (Zubay, 1988). La conversión de succinil CoA a succinato por la sintetasa del succinil CoA en una reacción en que la energía del enlace tioéster y la enérgia química es usada para fosforilar GDP en animales y ADP en plantas (Richter,1978). En *Euglena gracilis* no existe este complejo, la enzima es substituída por la α- cetoglutarato descarboxilasa (Fig.11), dependiente de TPP (parcialmente purificada, pH 7, 35-40°C) presenta alta especificidad por su sustrato y no es inhibida en presencia de oxaloacetato o piruvato; su localización es en la mitocondria exclusivamente (Shigeoka *et al.*, 1986) requiere de $MgCl_2$,

NADP y mercaptoetanol para su activación. El valor de Km para α-KG es de 33μM, TPP 56μM, $MgCl_2$ 93μM y NADP 38μM. La enzima tiene un peso molecular aproximado de 248,000 Da y está compuesta de 4 subunidades idénticas con un peso de 62,000 Da cada una. No es estimulable su actividad por adición de ADP, AMP o ATP. El mercurio, niquel y cobre inhiben la actividad de la enzima pero no así la presencia de oxígeno.

La succinato semialdehido deshidrogenasa ($NAD^+$ y NADP). La actividad de la forma dependiente de NADP es 8-9 veces mayor que la dependiente de $NAD^+$ ,aislada y purificada, pm 150,000 Da (Tokunaga *et al.*, 1976) la cual es activada fuertemente por potasio pero no por sodio y ambas son inhibidas por zinc (10μM). El valor de Km para el succinato semialdehído fue de $1.66 \times 10^{-4}$M. Esta enzima forma parte de la lanzadera del GABA ya que contribuye a la asimilación de glutamato, que solo como fuente de carbono soporta el crecimiento de *Euglena* (Kempner y Miller, 1965). Por lo tanto, la adición de este al cultivo incrementa la actividad de la enzima.

Glutamato deshidrogenasa. La forma dependiente de NADP está localizada en la matriz mitocondrial en mamíferos y *Tetrahymena pyriformis* (Smith *et al.*, 1975); la dependiente de $NAD^+$ en mitocondrias y cloroplastos de plantas superiores (Douce, 1985) su actividad no ha sido reportada en *Euglena gracilis*, pero sí la dependiente de NADP en citosol (Chaudhary *et al.*, 1984).

La oxidación es pobre sólo con glutamato pero al añadirle malato aumenta considerablemente la actividad por la lanzadera del GABA (al igual que con TPP) que une al ácido glutámico al ciclo de Krebs. Esta oxidación esta acoplada a la fosforilación produciendo P:O de 2.3-2.5 (Moreno-Sánchez y Raya, 1987) y de 2.5-2.8 (Merret, 1987). En hongos la enzima se presenta en el citoplasma y juega un papel en la asimilación de amonio (Miflin, 1984).

Es fotoestimulable y tal vez juegue un papel importante en la asimilación de $NH_4$ y la fotoregulación de esta síntesis ocurre durante el desarrollo de los cloroplastos .

LANZADERA DEL GABA

En *Euglena gracilis* el ácido aminobutírico en el metabolismo del glutamato involucra tres enzimas (Fig.11): glutamato descarboxilasa, GABA-α-cetoglutarato aminotransferasa y succinato semialdehído deshidrogenasa, unidas al glutamato en el ciclo de Krebs.

Las mitocondrias de cerebro (Salganicoff y DeRobertis, 1965); e hígado de rata (Brand *et al.*, 1974) son permeables al GABA. En estos tejidos la primera enzima de la lanzadera es la glutamato descarboxilasa, la cual está localizada en el citosol, las otras dos enzimas se encuentran en la mitocondria (Salganicoff y DeRobertis, 1965).

En *Euglena* las tres enzimas se encuentran localizadas en la mitocondria (Tokunaga *et al.*, 1979)

Succinato deshidrogenasa. Localizada en la membrana

interna de la mitocondria, su actividad depende de los nutrientes y la fuente de carbono del medio de cultivo. Es inhibida en presencia de cicloheximida pero no por cloranfenicol lo cual sugiere que es sintetizada en el citoplasma (Davis y Merret, 1974). Crecidas en glutamato aumenta la actividad de la enzima dependiente de NADP.
En células crecidas en glutamato-malato como fuente de carbono el valor de la Km es de 1.4mM y Vmax 0.47$\mu$mol $min^{-1}$ $mg^{-1}$ (Sharpless and Butow, 1970).
Esta enzima disminuye su actividad en presencia de oxígeno (Blum,1963; Begin-Heick,1973).

Fumarasa. Se encuentra localizada en la matriz mitocondrial, aislada (Tokunaga *et al.*, 1979) y purificada por Shibata *et al.*, (1985) consta de dos subunidades de 60,000 Da cada una, y la actividad es mayor en células crecidas fotoautotróficamente. La fumarasa que presentan las células de *Euglena* es muy lábil, se estabiliza por fierro y reactivos sulfhidrilos (Susuki y Tamura, 1979), la enzima es sensible a cicloheximida. Las células crecidas heterotróficamente en la obscuridad muestran un incremento en la actividad de la enzima al ser iluminadas o por la adición de etanol o malato (Buetow, 1989).

Malato deshidrogenasa. Cataliza la reacción de malato a oxaloacetato. Se han reportado dos formas una mitocondrial y otra citoplásmica. La forma dependiente de $NAD^+$ se encuentra en la matriz y está presente exclusivamente en animales (Zubay, 1988) y en plantas (Ritcher, 1978). En *Euglena* la

forma dependiente de $NAD^+$ ha sido aislada y purificada; además, se han reportado 2 isozimas una en citosol y otra en peroxixomas pero con propiedades distintas.

La forma dependiente de NADP se encuentra en matriz en un 42% y un 50% en el espacio intermembranal; localizada en cloroplastos de plantas superiores (Slack, 1969; Ting y Rocha, 1971).

Davis y Merret en 1974, reportaron una MDH en peroxixomas de *Euglena* mostrando una fuerte inhibición por oxaloacetato. En *Euglena gracilis* se encuentran las dos formas, y se localizan en mitocondria (69,000 Da) y citoplasma (72, 400 daltones) (Peak *et al*, 1972). Isegawa (1984), y Miyatake (1985a), encontraron una forma en matriz y la otra en el espacio intermembranal, con un peso molecular aproximado de 71,000 Da.

La actividad de la MDH mitocondrial y la localizada en peroxixomas aumenta pero no así la que se localiza en el citoplasma.

En un cultivo de *Euglena* crecido heterotróficamente, se encontró que en el citoplasma de las células existe un complejo multienzimático que consiste de fosfoenolpiruvato carboxilasa, AcetilCoA carboxilasa y malato deshidrogenasa, las cuales están involucradas en el metabolismo de lípidos (Wolpert y Ernst-Fonberg, 1975). La MDH de este complejo muestra propiedades distintas de las otras isoenzimas.

La actividad de la enzima citoplásmica aumenta en relación con el crecimiento de la población.

La actividad de la enzima mitocondrial aumenta el doble por la adición de glutamato y en un 50% al añadirle etanol o succinato; sugiriendo que los intermediarios del ciclo de Krebs regulan esta actividad.

La cicloheximida pero no el cloranfenicol inhiben la síntesis de estas enzimas; y esto sugiere que son sintetizadas en el citoplasma.

Se ha propuesto, (Isegawa *et al.*, 1984; Miyatake *et al.*, 1985b) que la NAD-MDH participa en la lanzadera del malato entre el citoplasma y la mitocondria y en que opere el ciclo de Krebs en la mitocondria.

Yokota y col (1985) reportaron el papel fisiológico de la NADP-MDH localizada en el espacio intermembranal (51%) y en matriz (42%).

Se ha observado que la oxidación del malato es resistente a antimicina de un 30-50% (Sharpless y Butow, 1970).

## 2.2 FOSFORILACION OXIDATIVA EN *Euglena*

Buetow y Buchanan (1964), fueron los primeros en investigar la fosforilación oxidativa en mitocondrias de *Euglena gracilis*, las mitocondrias no estaban acopladas, sin control respiratorio (CR) y con P:O (moléculas de ATP sintetizado por cada ngátomos de oxígeno consumido) de 1 para láctico y succinato y de 2 para malato-glutamato y α-KG como sustratos.

La mitocondria aislada de células de *Euglena* Fig.12,. oxida una gran variedad de sustratos, incluyendo NADH extramitocondrial (Buetow y Buchanan, 1965; Sharpless y Butow, 1970; Collins *et.al.*, 1975; Kümmel y Brinkmann, 1988), lactato (Price, 1962, Rutner y Price, 1964; Sharpless and Butow, 1970; Lord y Merret, 1971; Collins *et al.*, 1975; Calvayrac et al. 1978; Tokunaga, 1979; Isegawa, 1984; Buetow, 1989), Succinato ( Buetow y Buchanan, 1965; Sharpless y Butow, 1970a, b; Khan, 1974; Datta y Khan 1977; Tokunaga *et.al.*, 1976; Kümmel y Brinkmann, 1988; y Moreno-Sánchez y Raya, 1987), Glutamato + Malato (Buetow y Buchanan, 1965; Khan, 1974; Datta y Khan, 1977 y Moreno-Sánchez y Raya, 1987), Isocitrato, (Cook y Heinrick, 1968; Graves *et.al.*, 1972; Collins y Merret, 1975; y Oda *et.al.*, 1981), Acetato (Danfort, 1957; y Cook y Heinrich, 1965), Etanol (Buetow, 1961; y Sharpless y Butow, 1970b), Glicolato (Lord y Merret, 1971), GABA (Tokunaga *et al.*, 1976), succinato semialdehído (Tokunaga *et al.*, 1976), entre otros y han sido reportadas pero, no la caracterización cinética de las enzimas involucradas en la oxidación de estos sustratos.

Presentan una respiración endógena independiente del pH y de la fuente de carbono del cultivo (Danforth, 1953) además de la habilidad de usar sustratos exógenos excepto acetato. Esto sugiere que compensan sintetizando altos niveles de enzimas responsables de la respiración endógena.

**Fig.12.** Electromicrografía en transmisión. Mitocondrias aisladas de *Euglena gracilis*, obtenidas por sonicación de células crecidas en Glutamato+Malato como fuente de carbono en ausencia de luz. Obtenidas por Armando Zepeda R. y Rodrigo Velázquez E. en el Depto. de Microscopía Electrónica del Inst. Nal. de Cardiología "Ignacio Chávez".

La habilidad de usar acetato como sustrato parece ser una propiedad inducible en *Euglena* (Cook y Heinrich, 1965).

La oxidación de algunos sustratos es sensible a rotenona, antimicina, amital, cianuro, y oligomicina. Sin embargo, esta sensibilidad es parcial, lo cual sugiere la existencia de una ruta alterna (Sharpless y Butow, 1970), similar a la que se encuentra en mitocondrias de plantas superiores, bacterias, algas, levaduras y otros microorganismos (Henry y Nyns, 1975); además, de la ruta clásica de la citocromo oxidasa inhibible por rotenona, antimicina y cianuro.

Se ha reportado, la presencia de una enzima llamada rodanasa, la cual cataliza la formación de tiocianato y tiosulfato, localizada en el citoplasma de *Euglena*, su función fisiológica parece ser la detoxicación del medio por el cianuro liberado de la cianocobalamina esencial para el crecimiento de *Euglena*. (Watanabe *et al.*, 1985).

Recientemente, Brönstrop y col. (1989), purificaron la citocromo oxidasa de *Euglena gracilis* la cual consta de 15 subunidades polipeptídicas, que presentan marcadas diferencias con respecto a otras oxidasas; en cuanto a actividad óptica y estructura primaria, probada con citocromo c de caballo no presentó actividad, pero con $C_{558}$ de *Euglena* la actividad fue normal. La actividad de esta citocromo oxidasa fue estudiada en función de la concentración de citocromo $c_{558}$ en presencia de TMPD y ascorbato.

El alto peso molecular de 320 kDa puede explicarse por el bajo contenido de hemo a de la enzima purificada de *Euglena* (6nmol/mg) con respecto de otras citocromo oxidasas purificadas.

El polipéptido I (42 kDa) probablemente corresponda a la subunidad I en otros eucariontes ya que el peso molecular y la hidrofobicidad son similares. El polipéptido II (33kDa) difiere ligeramente del peso molecular de la subunidad II de otras oxidasas, la subunidad III de otros eucariontes es similar al polipéptido III de *Euglena* (32 kDa).

Presenta una cinética monofásica obtenida con el citocromo $c_{558}$ indicando la presencia de un sólo sitio catalítico en el citocromo c de *Euglena*, con una Km de ≈ 1$\mu$M.

No sólo la citocromo oxidasa, sino también el citocromo c difieren marcadamente de las moléculas correspondientes en levaduras y eucariontes.

Se ha demostrado que la expresión funcional de la cadena alterna depende de la fuente de carbono del cultivo en procariontes (Escamilla *et al.*, 1987).

En *Euglena gracilis* la respuesta insensible a CN y estimulable por AMP también depende de la fuente de carbono (Sharpless y Butow, 1970). Esta cadena alterna de transporte de electrones es capaz de oxidar NADH, succinato, y lactato estimulables por AMP, insensibles a antimicina y cianuro pero, sensibles a DPA (Sharpless y Butow, 1970a,b; Collins *et al.*, 1975a,b; Calvayrac *et al.*, 1978; Moreno-Sánchez y

Raya, 1987).

La cadena alterna puede ser inducida en células crecidas en presencia de antimicina (Sharpless y Butow 1970), o con etanol o lactato (Calvayrac, 1970; 1971; 1978) como fuente de carbono, pero no en células crecidas en glutamato-malato.

Se han propuesto varias rutas para la oxidación de sustratos.

2.2.1 Ruta de la citocromo oxidasa sensible a CN.

La cadena sensible a cianuro es similar a la encontrada en mitocondrias de plantas y animales, debido a que ambas presentan sensibilidad a este inhibidor, y es responsable de la transferencia de electrones desde el NADH endógeno y succinato (Buetow, 1989).

2.2.2 Ruta de la citocromo oxidasa resistente a CN.

Estimulada por AMP y sensible a SHAM (ruta de la oxidasa alterna) para el transporte de electrones desde el succinato y no acoplada a fosforilación.
Existe una ruta de la oxidasa alterna resistente a CN y estimulable por AMP. (Buetow, 1989)

La respiración en tejidos de mamíferos es extremadamente sensible a CN (Zubay, 1988) a diferencia de los tejidos de plantas superiores los cuales muestran una respiración residual en presencia de antimicina, CN, azida, y CO. Estos 3 últimos inhibidores a altas concentraciones inhiben a la citocromo oxidasa completamente (Siedow, 1982;

Douce, 1985). También, hay una ruta insensible a CN en hongos, protozoarios y algas (Lloyd, 1974).

En *Euglena gracilis* esta oxidasa alterna no esta identificada (Rustin *et al.*, 1986). En *Euglena gracilis* esta oxidasa alterna no está identificada (Rustin *et al.*, 1986)

2.2.3 Oxidación de NADH exógeno.

Esta característica es sumamente importante, a diferencia de las mitocondrias de animales las cuales no lo oxidan, pero similar a la de plantas superiores (Siedow 1982; Douce 1985; Moller y Lin 1986) y algunos microorganismos (Lloyd, 1974).

Se ha propuesto que en presencia de CN el NADH es oxidado por la ruta insensible a CN estimulable por AMP y otra ruta no estimulable por AMP, pero a diferencia de la oxidación de succinato esta sí está acoplada a la fosforilación (P:O=1) (Sharpless y Butow, 1970).

La fosforilación en el sitio entre la flavoproteína y la ubiquinona en la vía principal de transferencia de electrones demostró ser inhiblible por CCCP (Bonsel y Calvayrac, 1978).

La vía insensible a CN es inhibible por SHAM en mitocondrias de *Euglena* (Bonsel y Calvayrac, 1978) y en plantas (Douce, 1985).

Sin embargo otros autores, han reportado que el SHAM no afecta el consumo de oxígeno (Kümmel y Brinkmann, 1988).

Se han propuesto (Buetow, 1989) 3 rutas para la oxidación de NADH exógeno, (Fig.13):

1) Sensible a rotenona (a diferencia de plantas superiores), involucrando a la oxidasa alterna,
2) Sensible a rotenona, antimicina y CN,
3) Sensible a rotenona y CN, pero resistente a antimicina, la cual involucra a un citocromo tipo b diferente del citocromo tipo b de la cadena clásica, que se salta el sitio de inhibición por antimicina.

En presencia de rotenona y antimicina el CN inhibe el 100% el consumo de oxígeno con NADH como sustrato. La Ki de rotenona con NADH como sustrato es de 1.15μM.

En plantas superiores ha sido caracterizada la enzima NADH deshidrogenasa sensible a EGTA (1 mM).

2.2.4 Oxidación del Succinato

Se ha reportado que altas concentraciones de CN (mM) y antimicina no bloquean completamente la oxidación de succinato en mitocondrias de *Euglena gracilis* (Buetow y Buchanan, 1965) por lo tanto, esto sugiere la presencia de una ruta alterna resistente a ambos inhibidores, similar a la encontrada en mitocondrias de plantas (Raison y Smillie, 1969).

Resulta interesante que el desarrollo de la ruta resistente a CN en *Euglena gracilis* es inducible por antibióticos. Sin embargo, algunos de estos como el bromuro de etidio bloquean funciones en ribosomas de cloroplastos, otros inhiben la síntesis de DNA.

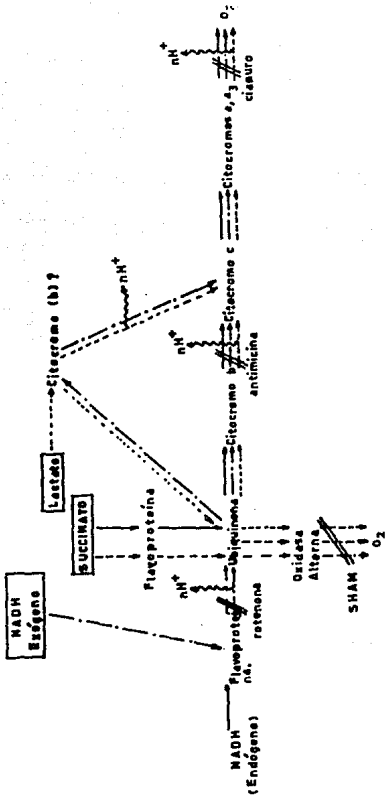



**Fig.13.** Esquema postulado de las múltiples vías de transferencia de electrones en la mitocondria de *Euglena*. De acuerdo con la hipótesis de la teoría quimiosmótica la transferencia de electrones va acompañada de una traslocación neta de protones ($nH^+$) del exterior al interior de la membrana interna mitocondrial, generando un potencial electroquímico para la síntesis de ATP. (Buetow, 1989).

La oxidación de succinato por esta vía (Fig.13), insensible a CN y antimicina es estimulada por AMP, ADP, ATP, GMP e IMP, pero no está acoplada a la fosforilación. El succinato como fuente de carbono no estimula la respiración endógena y su energía la obtienen de procesos anaeróbicos como la fermentación de ésteres de cera (característica exclusiva de *Euglena*).

2.2.5 Oxidación de Lactato

Price en 1962, fue el primero en demostrar la oxidación de lactato en extractos celulares, aparentemente esta oxidación depende de la presencia de zinc en el medio de cultivo, por otra parte, obtuvo evidencia de 2 LDH dependientes de NAD; una insoluble la cual no disminuye su actividad por deficiencia de zinc (L-LDH), y una soluble que muestra particularidades a la falta de zinc (D-LDH).

En 1971 Lord y Merret y en 1975 Collins y Merret, observan la oxidación de D-lactato en células de *Euglena* crecidas en presencia de luz. Estas presentaron una inhibición por CN (1mM) sólo de 10%.

Tokunaga *et al* (1979), reporta la actividad de LDH-$NAD^+$ en una fracción de sobrenadante (100,000xg)

La oxidación de lactato está acoplada a 2 sitios de fosforilación (Sharpless y Butow 1970a,b), un sitio acoplado a la cadena que va del citocromo $aa_3$ hasta el oxígeno y el segundo sitio con un flujo de electrones desde el citocromo b al citocromo c. De acuerdo con el descubrimiento de Rutner y Price (1964) los electrones desde el D-lactato entran

principalmente a la cadena de transporte de electrones de *Euglena* a nivel de la ubiquinona.

Se han propuesto (Buetow, 1989) diversas vías de oxidación de lactato en mitocondrias de *Euglena* Fig.13:

1) El lactato como sustrato entra mediado por un citocromo tipo b el cual transfiere electrones al citocromo c acoplado a la fosforilación y continúa por la cadena clásica de transporte de electrones, por esto la oxidación es parcialmente insensible a antimicina.
Involucra a la oxidasa alterna y es sensible a SHAM y CN.

2) Probablemente los electrones que llegan a este citocromo tipo b sean transferidos a la ubiquinona y continuen la ruta clásica sensible a antimicina y CN,

3) Resistente a antimicina (50-90%) pero sensible a CN.

4) Insensible a CN involucrando a la oxidasa alterna (Calvayrac y Butow 1971; Collins y Merret 1975; Calvayrac et al., 1978).

La oxidación por vía alterna, propone un citocromo tipo "b" que brinca la inhibición por antimicina pero siguen siendo 2 sitios de acoplamiento.(Buetow, 1989).

1) cadena normal --------- 2 ATP sensible a antimicina
2) por aa vía cit b? ----- 2 ATP insensible a antimicina
3) vía oxidasa alterna --- 0 ATP " "

submitocondriales de plantas (Grover *et al.*, 1981). Su efecto inhibidor involucra la formación de mezclas bisulfuro y grupos sulfidrilos suprimiendo el paso de electrones hasta el oxígeno.

Se ha identificado (Kolner y Alexander, 1986) que inhibe la oxidación de malato y la cadena alterna en un sitio de baja afinidad posiblemente el complejo I de la cadena respiratoria ; no inhibe lipoxigenasas como el SHAM. En preparaciones de músculo de corazón de rata inhibe la succinato deshidrogenasa, pero no en mitocondrias de hígado. Recientemente, Jay (1991) demostró la inhibición por disulfiram (60$\mu$M) de la actividad de la succinato oxidasa y la succinato deshidrogenasa en PSM de corazón de res, la cual se revierte por DTT, estos resultados están en términos de una modificación en los grupos -SH localizados en el sitio activo de la SDH.

Por los antecendentes antes mencionados es evidente que el estudio del metabolismo energético, la caracterización enzimática, la utilización de sustratos, la capacidad adaptativa, etc. de *Euglena*, es de gran importancia para el entendimiento de las funciones metabólicas de este protozoario así como de su capacidad adaptativa en el transcurso de la evolución en relación con las características metabolicas de otros organismos.

2.2.6 Inhibidores.

El propil-galato es un inhibidor de la ruta insensible a CN y sensible a SHAM en un rango de concentración para ejercer su efecto de 2-5$\mu$M, ( lo que equivale de 10 a 50 veces la concentración de ácido hidroxámico que se requiere para inhibir esta vía en mitocondrias de plantas) (Siedow y Girvin,1980) y no inhibe el consumo de oxígeno en crecida en lactato, pero sí se inhibe en anaerobiosis prolongada con este inhibidor (Carre *et al.*, 1988).

La difenilamina (DPA), áctua entre la región de succínico y las NADH deshidrogenasas, y el primer citocromo que compone la cadena de transporte de electrones en mitocondrias de plantas superiores, en estas inhibe la cadena alterna y la fosforilación oxidativa (Ki $2.7 \times 10^{-4}$ M).

La respiración insensible a antimicima se inhibe por DPA completamente ya que inactiva a la succinato oxidasa , sugiriendo un camino alterno (Baker, 1963). Parece que el efecto de inhibición está relacionado con la solubilidad del DPA en lípidos.

El SHAM, quela metales como fierro principalmente en estado férrico. En 1971 Schonbaum, mencionó la inhibición (1mM) de la cadena alterna (insensible a antimicina y CN) por este ácido hidroxámico en mitocondrias de plantas. La Ki aparente del SHAM en mitocondrias de plantas es de 150nM. (Rich *et al.*, 1978).

El disulfiram quela metales pesados y es un potente inhibidor de la cadena alterna en mitocondrias y partículas

Con el objeto de tratar de caracterizar el flujo de electrones tanto por la vía clásica como por la alterna, mediante la sensibilidad de la mitocondria de Euglena a diversos inhibidores en relación con la oxidación de sustratos, al igual que la relativa capacidad de los diversos sustratos para llevar a cabo la fosforilación oxidativa y algunas reacciones dependientes de energía.
Por lo que el objetivo de este trabajo fué determinar la oxidación de diversos sustratos en mitocondrias aisladas de *Euglena gracilis* en relación con las distintas vías de transportadores de electrones.

## III MATERIALES Y METODO.

Se utilizó la cepa de *Euglena gracilis*, la cual presenta las siguientes características; el tiempo generacional de 10-14 horas, depende de la fuente de carbono (Buetow *et al.*, 1968), tendencia a blanquearse entre 34-35°C (Hutner *et al.*, 1956), crecimiento nulo en galactosa como fuente de carbono (Cook, 1968), por sus características es relacionada con la cepa Z.

### 3.1 MEDIO DE CULTIVO.

Las células de *Euglena gracilis* fueron sembradas como Moreno-Sánchez y Raya (1987); y Devars *et al.*,1992 en un medio acídico organotrófico descrito por Hutner (Hutner *et al.*, 1956), modificado por Schiff, 1971, el cual contiene:

| | Concentración final(%) ( 1 litro) |
|---|---|
| $CaCO_3$ | 0.02 |
| Fuente de carbono | |
| ácido L-glutámico | 0.5 |
| ácido DL-málico | 0.2 |
| Minerales | |
| $MgSO_4$ | 0.05 |
| $(NH_4)2HPO_4$ | 0.02 |
| $KH_2PO_4$ | 0.08 |
| $ZnSO_4$ | $9x10^{-3}$ |

| | |
|---|---|
| $MnSO_4$ | $8x10^{-3}$ |
| $Na_2MoO_4$ | $2x10^{-3}$ |
| $CoCl_2$ | $1.6x10^{-4}$ |
| $CuSO_4$ | $3.9x10^{-4}$ |
| $H_3BO_4$ | $2.8x10^{-4}$ |
| NaI | $1.2x10^{-5}$ |
| $FeCl_3$ | $0.05x10^{-2}$ |

Vitaminas

| | |
|---|---|
| Disulfuro de Tiamina ($B_1$) | $10x10^{-3}$ |
| Clorhidrato de Piridoxal ($B_6$) | $0.1x10^{-3}$ |
| Cianocobalamina ($B_{12}$) | $10x10^{-2}$ |

El pH inicial del medio de cultivo fue ajustado a 3.5

El medio de cultivo sin vitaminas se esterilizó por 35 min a una presión de 20 libras a 120°C.

Las vitaminas $B_6$ y $B_{12}$ fueron añadidas como neurobión (MERCK) en polvo, que junto con la $B_1$ se esterilizaron por filtración con una membrana millipore de 0.22μm. Posteriormente se agregaron al medio de cultivo fresco en el momento de sembrar.

El paso de células a medio de cultivo fresco, como la toma de muestras de células se realizó en una campana de flujo laminar VECO.

### 3.2 MANTENIMIENTO DEL CULTIVO.

Cultivos axénicos de *Euglena gracilis* fueron mantenidos en la obscuridad en medio de Hutner, a temperatura ambiente (20-25$^{o}$C), con agitación constante en un agitador orbital (61 rev/min).

Se realizó una curva de crecimiento en matraces de 1 litro tomando muestras de cultivos durante 6 días consecutivos los cuales se contaron para conocer la cantidad de células por mililitro y el tiempo en que el cultivo se encontraba en la fase exponencial (log) y estacionaria.

Posteriormente, una alicuota de cultivo de 100-150ml de cálulas fue colectada en la fase logarítmica de crecimiento y transferida a 1 litro de medio de Hutner fresco se incubaron 3 1/2 días (Fase log).

Se realizó un contéo de células en la cámara de Neubauer diluyendo e inmovilizando con 5% de HCl (concentración final). La viabilidad de las células fue determinada por exclusión de 0.01% de azul de metileno (Carre et al., 1988). Para obtener una población inicial con una densidad de $0.2x10^{6}$ células por mililitro.

Se cosecharon las células en la fase logarítmica de crecimiento por centrifugación diferencial.

### 3.3 OBTENCION DE MITOCONDRIAS DE *Euglena gracilis*.

Se sigue el método descrito por Moreno-Sánchez y Raya (1987), el cual consiste en romper las células por sonicación y recuperar las mitocondrias por centrifugación diferencial, con algunas modificaciones (ver diagrama).

Las células se centrifugaron (IEC Centra 8R) a 1780 xg durante 13min, se resuspendieron en un medio estándar que contiene Sacarosa 250mM, HEPES 10mM y EGTA 2mM (SHE) a pH 7.4 para centrifugar a 327xg durante 5 min.

Posteriormente, se lavan con medio de SHE y albúmina bovina delipidada (sigma) al 0.1% (SHEA) dos veces, centrifugando a 327xg durante 5 min cada vez.

Se realizó un contéo en la cámara de Neubauer, para sonicar de 1-1.5x$10^9$ células (se rompen del 60-80% de células) en 30-40ml de medio SHEA en un sonicador SONIPREP 150 (10-12$\mu$icrones de amplitud) en un baño con hielo por 2 intervalos de 15 s cada uno. Posteriormente, se centrifugó a 581xg durante 10 min, el sobrenadante que contenía a las mitocondrias se centrifugó 10 min a 8714xg en una centrífuga SORVALL.

El paquete mitocondrial (0.5gr peso húmedo) obtenido se resuspende en medio de SHEA a un volumen aproximado de 5ml para incubar con ADP 1mM y 0.25% de albúmina delipidada por un lapso de 10 min. Trascurrido el tiempo de incubación se centrifugó a 8714xg durante 10min y el sobrenadante se resuspendió en aproximadamente 1 ml de SHEA (11-20mg/ml de proteína mitocondrial)

**Aislamiento de Mitocondrias de *Euglena gracilis***

Colectar las células en fase logarítmica de crecimiento.
Centrifugar 10min. 1780xg

↓

Lavar las células en un medio de Sacarosa 250mM, HEPES 10mM, EGTA 2mM (SHE) pH 7.4.
Centrifugar 5min. 327xg

↓

Lavar las células en medio SHE y albúmina delipidada 0.1% (SHEA) 2 veces

↓

Conteo en cámara de Neubauer

↓

Sonicar 1-1.5x$10^9$ células en 30-40ml de medio SHEA (10-12 $\mu$ de amplitud) durante 2 intervalos de 15" cada uno en un baño de hielo.

↓

Centrifugar 10 min a 581xg

↓

Centrifugar el sobrenadante 10 min a 8714xg.

↓

Resuspender el paquete mitocondrial e incubarlo con 1mM de ADP y 0.25% de albúmina delipidada durante 10min.

↓

Centrifugar 10min a 8714xg

↓

Resuspender en aproximadamente 1 ml de SHEA.

### 3.4 MEDICION DEL CONSUMO DE OXIGENO.

La velocidad del consumo de oxígeno con diversos sustratos en mitocondrias de *Euglena gracilis* se midió con un electrodo tipo Clark (YSI modelo 53) a 30° C en 1.9 ml de medio estándar conteniendo 120mM de KCl, 20mM de MOPS, 2mM de EGTA y 5mM de Pi a pH 7.2 (KMEP).

La solubilidad del oxígeno en el agua a una temperatura de 30°C se consideró de 400 ngátomos $O_2$/ml a una altitud de 2240.

### 3.5 OXIDACION DE SUSTRATOS.

La oxidación de sustratos se llevó a cabo: incubando las mitocondrias (1 mg/ml) en medio KMEP por 4 minutos, posteriormente, se añadieron los diversos sustratos 10mM de L-láctico, 10mM de succinato, 10mM de α-cetoglutarato, glutamato y malato 7.5mM y 15mM respectivamente y 0.1mM de NADH y se dejó que consumieran oxígeno por un periódo de 4-5 minutos cada trazo con los distintos sustratos.

El Control Respiratorio (CR) se calculó a partir de los trazos de oxidación de sustratos, se obtuvo del cociente de la velocidad respiratoria en presencia de 0.4mM de ADP y la velocidad de la respiración endógena en ausencia de ADP.

La relación ADP/O también se obtuvo a partir de los trazos de oxidación de sustratos en presencia de ADP e indica la relación entre el ADP (nmolas) añadido y el oxígeno consumido (nátomos).

Los valores de la constante de Michaelis-Menten (Km) (concentración de sustrato la que una enzima determinada llega a la mitad de su Vmax) para los diversos sustratos se obtuvieron de las dobles recíprocas de las gráficas obtenidas de la oxidación de sustratos.

Los valores de las constantes de inhibición (Ki) se determinaron calculando la inversa de la velocidad del consumo de oxígeno; la concentración del sustrato se mantiene constante y se determina el efecto que sobre la velocidad ejerce el incremento de la concentración del inhibidor.

**3.6 SINTESIS DE ATP.**

La síntesis de ATP fue determinada por método enzimático después de la extracción con ácido perclórico ($HClO_4$), Khym,1975.

Se prepararon viales conteniéndo 1.8ml de medio estándar KMEP en un baño a 30°C, 1mg/ml de proteína mitocondrial y los diversos sustratos a las concentraciones ya mencionadas para la oxidación de sustratos .

Se incubaron las mitocondrias 2 min y se les agregó 1mM de ADP después de transcurridos 2 min se detuvo la reacción adicionando 3% (v/v) de ácido perclórico agitando.

Se tomaron alicuotas de 1.8ml y se centrifugaron por 2min en una centrifuga clínica a 3500rpm ULTRACOM ROTO-UNI II

De aquí se toman fracciones de 1.6ml aproximadamente y para remover el perclorato de potasio se extrajo con 1ml de mezcla 1:1 de Tri-n-octilamina y 1,1,2 Triclorotriflouroetano (Freón-amina cuaternaria ) a temperatura ambiente.

Cada uno de los tubos se agitó durante 30 s y se observaron 3 fases, se tomó una alicuota de la fase más superficial de 0.6ml la cual se congela; para posteriormente realizar la determinación de la cuantificación de ATP formado por método enzimático.

La determinación enzimática (Williamson y Corkey, 1969) se realizó en un espectrofotómetro de doble haz. En un medio el cual contenían 1.8ml de HEPES 100mM, glucosa 10mM, 0.2mM de NADP, 2mM de $MgCl_2$, 5 unidades de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides* (Boehringer, Sigma tipo XXIII) y 0.2ml de extracto obtenido del método de extracción con ácido perclórico.

Se midió la formación de NADPH a una longitud de onda de 340nm, absorbancia de 0.2, velocidad de 100s/pulg a 30°C.

La reacción se siguió por 2 min. Posteriormente se le añadió hexoquinasa de levadura en suspensión (Boehringer), transcurridos de 4-6min se les agregó 0.02mM de ATP.

### 3.7 DETERMINACION DEL POTENCIAL DE MEMBRANA.

Las mitocondrias (1 mg/ml) se incubaron durante 7-8 min. en 3 ml de medio estándar KMEP , anadiéndo cada uno de los diferentes sustratos a las concentraciones indicadas en la medición del consumo de $O_2$, se registró la absorbencia con safranina 10 $\mu$M a 30$^{o}$C. La diferencia de absorbancia con safranina de 533 menos 511 nm fue medida en un espectrofotómetro de doble haz con oxigenación y agitación constantes.

El cambio en la señal de absorbancia de la safranina es considerado como un reflejo del cambio en la magnitud del potencial de membrana (Akerman y Wikstrom,1976).

Se determinó el potencial de membrana cuantitativamente con Tetrafenilfosfonio ($TPP^{+}$). Las mitocondrias (1mg/ml) se incubaron en 1 ml de medio KMEP, este contenía 2$\mu$M [$^{3}$H]-$TPP^{+}$ (aproximadamente 20,000 cpm/nmol) a 30$^{o}$C.

Después de 2 min se adicionó el sustrato oxidable; 1 min después, la suspensión mitocondrial fué centrifugada en una microfuga durante 1 min. Las alícuotas del precipitado y el sobrenadante fueron contadas por radioactividad. Se realizó una corrección como sugiere Rottenberg (1984). El potencial de membrana fue calculado usando la ecuación de Nernst.

Posteriormente se agregó CN para observar su efecto inhibitorio con los diferentes sustratos y CCCP para colapsar totalmente el potencial (hace más permeable la membrana interna respecto a $H^{+}$).

### 3.8 HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL.

Se midió en un espectrofotómetro de doble haz a una longitud de onda de 540 nm, y un delta de absorbencia de 0.5.

Las mitocondrias (1mg/ml) se incubaron en 1.9ml de medio KMEP a 30°C, posteriormente se añadieron los sustratos a las concentraciones mencionadas anteriormente, las mitocondrias se hinchan lentamente al agragarles el sustrato, se les añadió 300 nmolas de ADP en consecuencia las mitocondrias se contraen. Para obtener un máximo de hinchamiento mitocondrial se agregó al final de cada ensayo valinomicina (0.45nmolas/mg de proteína) lo que produce un incremento en la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial al potasio, con la consecuente entrada de agua y el aumento del volumen mitocondrial.

### 3.9 ESTADO REDOX DE LOS PIRIDIN NUCLEOTIDOS.

Las mediciones de formación de NAD(P)H (incremento en la fluorescencia) se realizaron en un fluorómetro AMINCO SPF-500, a una longitud de onda de emisión de 460 nm y una longitud de onda de exitación de 340nm, ángulo de 90°, velocidad de 9.99 s/pulgada a 30°C, con oxigenación y agitación constante.

Las mitocondrias (1mg/ml) en 1.9ml de medio KMEP y se preincubaron durante 8-10 min, posteriormente se añadieron los diversos sustratos a las concentraciones utlilizadas en ensayos anteriores,se anadió CCCP 4μM para ver oxidación

total y rotenona 0.05mM, antimicina 0.01mM, mixotiazol 0.01mM, HQNO 0.01mM, y DPA 0.25mM al final de cada registro con el fin de ver la reducción total de los sustratos añadidos.

### 3.10 DETERMINACION DE PROTEINA.

La proteína mitocondrial fue estimada por el método de biuret (Gornall *et al.*,1949) en presencia de 1% (p/v) de desoxicolato de sodio y utilizando albúmina como estándar..

La turbidez ocasionada por el paramilo fue eliminada centrifugando los tubos después de 20 min de añadido el reactivo de biuret a 327 xg durante 5 min a 4°C en una centrífuga IEC-CENTRA 8R.

Los inhibidores rotenona, antimicina, oligomicina, HQNO, SHAM (SIGMA), disulfiram (INC), fueron disueltos en DMSO, DPA (ALDRICH) en etanol, y mixothiazol (SIGMA) en metanol. El CCCP fué disuelto en DMSO.

## IV RESULTADOS y DISCUSION.

Los resultados de este trabajo ayudan a proponer las distintas vías de oxidación de sustratos, así, como algunas características particulares del metabolismo mitocondrial en *Euglena gracilis*.

### 4.1 CURVA DE CRECIMIENTO.

Las células crecidas en medio de Hutner y como fuente de carbono glutamato + malato presentan una curva de crecimiento con un comportamiento logístico como se observa en la Fig.14, las células empiezan su crecimiento en el día cero (al transferirlas a medio de cultivo fresco) con una población inicial de 0.2 x $10^6$ células por mililitro, a las 24 hrs se observa una fase de latencia inicial (I) de multiplicación lenta (0.77 células por mililitro), esta fase va seguida de una fase exponencial de crecimiento (II) a las 48 y 72 hrs, 2.73 y 4.5 células/mililitro respectivamente, después una fase de disminución de la velocidad (III) en donde hay una máxima de población, seguida de una fase lenta (IV) en la que se observa una meseta a las 120 hrs (5.7 células/mililitro) la cual puede prolongarse según el cultivo; en esta fase las células empiezan a enquistarse y la población comienza a disminuir.

La pendiente de la curva en la fase de crecimiento exponencial o la población máxima varía de acuerdo con la temperatura, disponibilidad de algunos factores, etc.

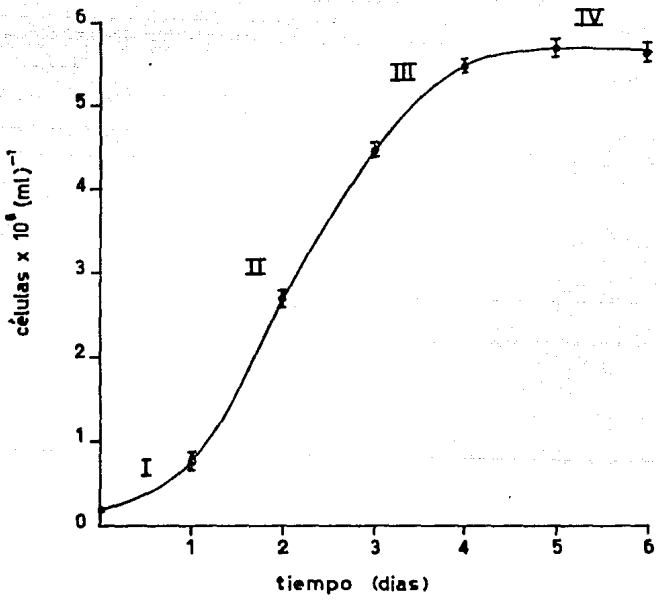



**Fig.14.** Curva de crecimiento de una población de *Euglena gracilis*, mostrando las diferentes etapas;crecidas en cultivo con G+M como fuente de carbono, temperatura ambiente, agitación constante y en ausencia de luz.

El enquistamiento conduce a una retracción de la célula y una degradación quizá de los componentes celulares, entre los que se incluyen mitocondrias y gránulos de reserva principalmente (Sleigh,1986), se forma la pared del quiste y deja de apreciarse cualquier tipo de metabolismo y movimiento citoplásmico, por lo tanto, el organismo entra en un periódo de vida latente. Se ha mencionado que los quistes son capaces de soportar muy altas o bajas temperaturas, presiones, desecación y carencia de oxígeno. (Sleigh, 1986). Las muestras y el conteo de células se realiza como se indica en métodos.

Las células se recolectaron a los 3 1/2 días en la fase logarítmica o exponencial de crecimiento (fase log) ya que en este periódo su actividad metabólica es mayor; transcurrido ese tiempo las células comienzan a formar estructuras de resistencia (quistes) en los cuales la película que cubre a la célula es más difícil de romper y el metabolismo está disminuído.

**4.2 CONSUMO DE OXIGENO.**

El consumo de oxígeno en las mitocondrias aisladas de *Euglena gracilis* fue estimado por la adición de diversos sustratos NADH 1mM, Glutamato + Malato (G+M) 7.5 y 15mM, α-cetoglutarato 10mM, succinato 10mM y lactato 10mM, comparado con datos previamente reportados por otros autores, como se muestra en la Tabla.I en donde algunos valores son muy semejantes a los obtenidos y otros diferentes quizá debido al proceso de obtención de la preparacion mitocondrial y al medio de cultivo en que fué crecido el organismo.

La velocidad del consumo de $O_2$ fue calculada de los trazos de oximetría restando el consumo de oxígeno de las mitocondrias sin sustrato (respiración endógena) y calculando la estimulación por el sustrato.

El malato 15mM y el etanol 0.23M como sustratos no estimularon el consumo de oxígeno (datos no mostrados) a diferencia de lo reportado por Buetow, 1961 y Wilson 1958, los cuales si observaron una estimulación por etanol.

Por otra parte, la carencia de la habilidad en la preparación mitocondrial de oxidar malato es sorprendente, ya que se ha reportado que este sustrato puede apoyar la fosforilación oxidativa (Buetow y Buchanan, 1965; Tokunaga, *et al.*, 1976; Gómez-Silva *et al.*, 1985 y Kümmel y Brinkman, 1988) y síntesis de proteínas (Delorme, 1986) en mitocondrias de *Euglena*.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



**Tabla I.** Oxidación de sustratos (estado 4) en mitocondrias aisladas de *Euglena gracilis*. Los valores representan la media ± error estándar con el número de preparaciones usadas indicadas entre paréntesis.

| SUSTRATOS | ngátomos O $min^{-1}$ $mg^{-1}$ | |
|---|---|---|
| G+M (7.5mM,15mM) | 60 ± 2 (10) | Este trabajo |
| | 38 | Tokunaga *et al.*, 1976 |
| | 46-65 | Moreno-Sánchez y Raya, 1987 |
| α-cetoglutarato (10mM) | 50 ± 4 (10) | Este trabajo |
| | 18 | Tokunaga *et al.*, 1976 |
| | 37 | Kümmel y Brinkmann, 1988 |
| NADH (1mM) | 41 ± 1 (20) | Este trabajo |
| | 62 | Sharpless y Butow, 1970 |
| | 47 | Kümmel y Brinkmann, 1988 |
| Succinato (10mM) | 76 ± 2 (20) | Este trabajo |
| | 72 | Buetow y Buchanan, 1964 |
| | 78-122 | Sharpless y Butow, 1970 |
| | 35 | Tokunaga *et al.*, 1976 |
| | 19 | Calvayrac *et al.*, 1979 |
| | 88 | Moreno-Sánchez y Raya, 1987 |
| | 60 | Kümmel y Brinkmann, 1988 |
| Lactato (10mM) | 90 ± 6 (34) | Este trabajo |
| | 125 | Sharpless y Butow, 1970 |
| | 91 | Buetow y Buchanan, 1964 |
| | 34 | Tokunaga *et al.*, 1976 |
| | 70 | Calvayrac *et al.*, 1978 |
| | 52 | Kümmel y Brinkmann, 1988 |
| Sin sustrato añadido | 21 ± 1 (20) | Este trabajo |

Lactato > Succinato > NADH ≈ G+M ≈ αKG

Quizá la obtención de mitocondrias por sonicación o la incubación de estas en un medio conteniendo 2mM de EGTA induce una disminución de la actividad de la malato oxidasa, como lo reporta Kümmel y Brinkman (1988).

El glutamato tampoco estimula el consumo de oxígeno (dato no mostrado). Así, el requerimiento de glutamato para la oxidación de malato en estas preparaciones mitocondriales indican que el glutamato produce α-cetoglutarato vía una transaminación con oxaloacetato (Shigeoka, 1992).

El sustrato que fue oxidado más activamante fue el lactato (Tabla I) este sustrato también es oxidado por bacterias, levaduras, hongos, y plantas superiores en los cuales varía el isómero oxidado ya sea D o L, o ambos.

El NADH también fué oxidado a diferencia de animales pero muy similar a la oxidación que se presenta en plantas.

La diferencia en la proporción de oxidación entre los diferentes sustratos no se debió a una baja concentración de sustrato ya que se usaron concentraciones saturantes de 4 a 10 veces el valor de la Km (Tabla II).

Por otra parte, la menor velocidad de oxidación del NADH, α-KG y G+M comparadas con la velocidad de oxidación del lactato y succinato no se debe a una menor afinidad por el primer grupo de sustratos.

### 4.3 CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN (Km)

Los valores de Km para los diversos sustratos se muestran resumidos en la Tabla II comparados con datos anteriormente reportados por otros autores.
Estos valores se obtuvieron a partir de las gráficas de Lineweaver-Burk de las dobles recíprocas obtenidas de las gráficas de velocidad inicial contra concentración de sustrato (Figs. 15, 16 y 17).

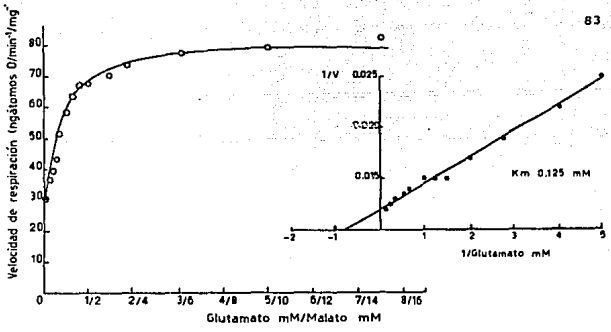
En todos los casos, la velocidad inicial (medida cuando muy poco del sustrato adicionado ha reaccionado) creció al aumentar la concentración del sustrato hasta el punto donde la enzima se satura y no es afectada por incrementos ulteriores en la concentración de sustrato, como sucede en las Figs 15, 16 y 17.

Con todos los sustratos, algunos como el G+M (Fig.15A y B), succinato (Fig.17A) y lactato (Fig.17B) alcanzan una velocidad inicial mayor que el α-KG y el NADH Figs.16A y 16B respectivamente.

En todos los casos con un aumento posterior de la concentración de sustrato la velocidad de la reacción llega a ser independiente de la concentración del sustrato y se observa una forma asintótica de la curva aproximándose a una velocidad constante y por lo tanto, la enzima ya está saturada con el sustrato.

**Tabla II.** Constante de Michaelis-Menten para diversos sustratos (edo.4) en mitocondrias aisladas de *Euglena gracilis*. Las condiciones experimentales descritas en material y métodos. Los valores de Km se obtuvieron a partir de las dobles recíprocas de la concentración de sustrato contra la velocidad del consumo de $O_2$. Los valores representan la media ± error estándar de 3 preparaciones usadas.

| SUSTRATO | Km (mM) | |
|---|---|---|
| Glutamato | 0.12 ± 0.06 | Este trabajo |
| Malato | 2.5 ± 0.15 | Este trabajo |
| α-cetoglutarato | 0.1 ± 0.05 | Este trabajo |
| | 0.033 | Buetow, 1989 |
| NADH | 0.27 ± 0.07 | Este trabajo |
| | 0.14 | Datta y Khan, 1977 |
| Succinato | 0.55 ± 0.05 | Este trabajo |
| | 1.4 | Sharpless y Butow, 1970 |
| | 0.6 | Datta y Khan, 1977 |
| Lactato | 0.52 ± 0.04 | Este trabajo |



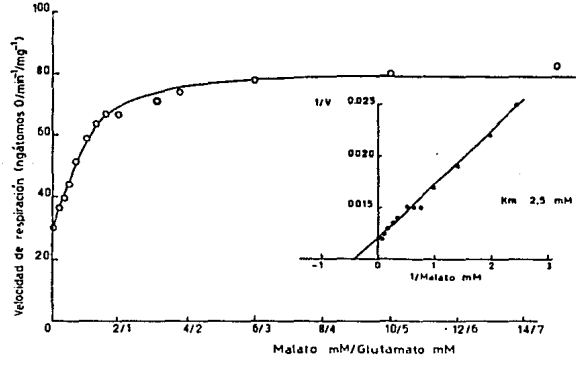
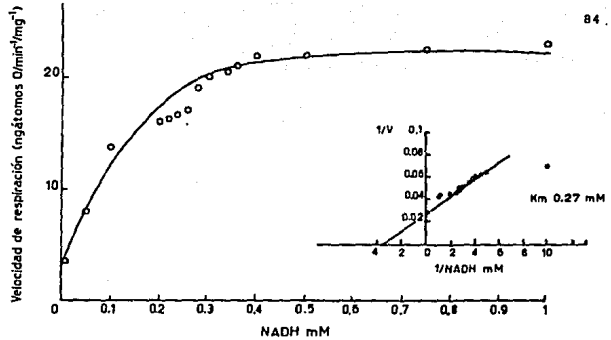




**Fig.15.** Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de una reacción catalizada por una enzima. De esta representación se obtienen los valores de Km (Constante de Michaelis-Menton). A.Glutamato + Malato (G+M), B. Malato + Glutamato (M+G) como sustratos en mitocondrias aisladas de *Euglena gracilis*.



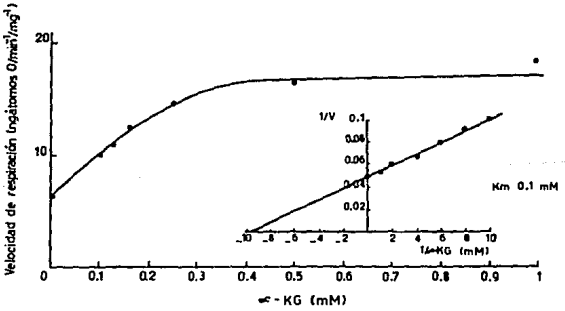
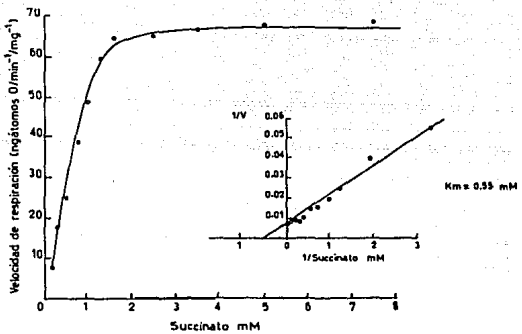




**Fig.16.** Valores de Km. **A.** α-cetoglutarato. **B.** NADH. como sustratos en mitocondrias aisladas de *Euglena gracilis*.



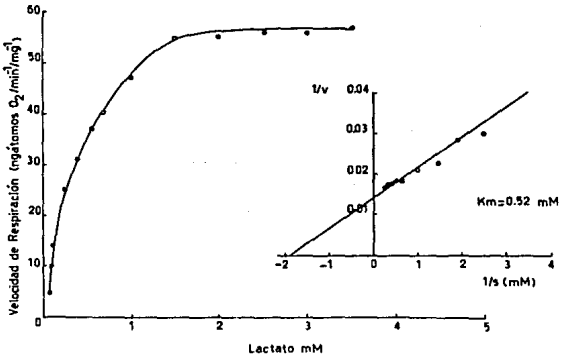




**Fig.17. Valores de Km. A. Succinato. B. Lactato.**

Todas las enzimas mostraron efecto de saturación, pero varía ampliamente con respecto a la concentración de sustrato que se necesita.

## 4.4 INHIBICION DE LA OXIDACION DE SUSTRATOS.

La sensibilidad de la oxidación de los diferentes sustratos a diversos inhibidores se muestra en la Tabla III.

Como sucede en mitocondrias de mamíferos, la oxidación de G+M es inhibida por rotenona, lo que sugiere su entrada a la cadena por una flavoproteína conectada al sitio I y el paso de electrones a la citocromo oxidasa, la cual no presenta una inhibición total con CN (90%). Sin embargo, la sensibilidad a antimicina es sólo parcial como ya se había reportado (Sharpless y Butow, 1970b), lo que sugiere que la vía por la cual se oxida este sustrato se brinca el sitio de inhibición por antimicina, tal vez mediante la participación de un citocromo tipo "b" que es componente de la vía alterna.

La insensibilidad de éstos inhibidores puede interpretarse en términos de una cadena respiratoria alterna (Sharpless y Butow,1970a; Buetow,1989).

**Tabla III.** Inhibición del consumo de $O_2$ con diversos sustratos en mitocondrias de *Euglena gracilis*.
Las mitocondrias fueron incubadas con los inhibidores indicados por 4 min antes de la adición de 1mM NADH, 10mM succinato, 10mM L-lactato, 7.5mM de glutamato + 15mM de malato (G+M), y 10mM de α-cetoglutarato. Los datos mostrados representan la media ± error estándar de 6 preparaciones usadas.

| INHIBIDOR | SUSTRATO | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | G+M | α-KG | NADH | Succinato | Lactato |
| | % de Inhibición | | | | |
| Rotenona (0.05mM) | 100±0 | 100±0 | 96±4 | 7±3 | 34±1 |
| Antimicina (0.01mM) | 50±3 | 100±0 | 94±2 | 97±2 | 14±6 |
| Mixothiazol (0.01mM) | 100±0 | 100±0 | 100±0 | 100±0 | 72±3 |
| HQNO (0.01mM) | 100±0 | 100±0 | 100±0 | 100±0 | 78±2 |
| Cianuro (0.1mM) | 90±0 | 0±0 | 62±5 | 100±0 | 66±3 |
| DPA (0.25mM) | 100±0 | 100±0 | 87±2 | 77±3 | 83±8 |
| Disulfiram (0.5mM) | 100±0 | 100±0 | 45±2 | 29±4 | 9±2 |
| SHAM (0.5) | 0±0 | 35±3 | 14±1 | 4±2 | 2±1 |
| Oligomicina (0.1mM) | 100±0 | 100±0 | 83±6 | 83±4 | 9±6 |

Sin embargo, el mixotiazol y el HQNO, inhibidores específicos del citocromo b en mamíferos (Von Jagow, 1986), bloquean la oxidación de estos sustratos. Es interesante el caso de los sistemas respiratorios de bacterias en donde se ha descrito una vía insensible a antimicina pero sensible a HQNO, por la quinol oxidasa alterna.

La oxidación de G+M ocurre preferentemente por la vía clásica de transporte de electrones pero quizá una pequeña parte de la oxidación de estos sustratos se vaya por una vía alterna.

La inhibición de la oxidación del lactato por antimicina, CN y HQNO sugieren que este sustrato es preferentemente oxidado por la vía alterna, el lactato probablemente dona sus electrones a la cadena por un citocromo tipo "b" componente de la vía alterna, el cual transfiere electrones al citocromo c acoplado a la fosforilación ya que la sensibilidad a CN es mayor que su sensibilidad a antimicina. Se ha observado (Sharpless y Butow, 1970a) que el D-lactato es más sensible a antimicina, y el L-lactato parcialmente sensible pero si fosforilan.

La oxidación de NADH exógeno (Tabla III), fue sensible a rotenona a diferencia de plantas, (Kümmel y Brinkman, 1988), sensible a antimicina, pero sólo parcialmente sensible a CN, ya que en presencia de este inhibidor es oxidado por la vía insensible a CN (Sharpless y Butow, 1970a; Buetow, 1989).

La oxidación de α-cetoglutarato, fue sensible a rotenona, antimicina, mixotiazol y HQNO, pero totalmente insensible a CN. este último efecto pudo haber sido un artefacto de la técnica ya que los cetoácidos reaccionan muy fácilmente con el cianuro formando cianhidrínas. Por otra parte, la oxidación de este sustrato fué completamente inhibida con azida de sodio 100μM (dato no mostrado), por lo tanto, la oxidación de este sustrato sigue la vía clásica.

El patrón de inhibición de la oxidación de succinato insensible a rotenona, sensible a antimicina y cianuro sugieren que éste sustrato es oxidado por la vía clásica de transporte de electrones.

Una sensibilidad similar con antimicina y cianuro en la oxidación del succinato fue previamente reportada (Sharpless y Butow, 1970a), al igual que una oxidación del sustrato insensible a estos dos inhibidores puede ser inducida en mitocondrias de células crecidas en presencia de succinato y antimicina o sólo con etanol como fuentes de carbono (Sharpless y Butow,1970b).

Con el fin de inhibir la vía alterna, se usaron diversos inhibidores de la respiración insensible a CN.

El DPA fué un inhibidor efectivo de la oxidación de sustratos Tabla III. Actúa entre la región del succínico, las NADH deshidrogenasas y el primer citocromo que compone la cadena de transporte de electrones. Este es utilizado como inhibidor específico de la vía alterna en mitocondrias de plantas (Baker, 1963).

El efecto del DPA sugiere la innibición de ambas vías de transporte de electrones: una inhibición específica de la vía alterna la cual muestra un efecto parcial y sin efecto en la oxidación de sustratos como el succinato preferentemente oxidado por la vía sensible a CN.

Un efecto del DPA en ambas vías durante la oxidación del succinato, fue previamente reportado (Sharpless y Butow, 1970b). Parece ser que su efecto está relacionado con la solubilidad de el DPA en los lípidos.

La respiración insensible a antimicina se inhibe por DPA (Baker, 1963), en mitocondrias de plantas superiores, en *Euglena gracilis* sucede lo mismo si las mitocondrias son incubadas con ambos inhibidores durante 4 min, en la oxidación de lactato, la cual se inhibe un 100% (dato no mostrado).

El Disulfiram, es un inhibidor de la respiración insensible a CN en mitocondrias aisladas de plantas (Grover,1981). Este inhibió totalmente la oxidación de G+M y α-cetoglutarato, pero no así la oxidación de NADH, succinato, y casi nada la oxidación de lactato.

Este patrón de inhibición no corelaciona con el efecto específico de la vía insensible a CN, pero sugiere un efecto no específico posiblemente unido a la reacción del disulfiram con los grupos tioles en el sistema de transporte del sustrato, en la deshidrogenación (La Noue, 1979. y Chávez *et al.*, 1989) ó quizá inhiba un sitio de baja afinidad posiblemente el complejo I de la cadena

respiratoria.

El SHAM, de acuerdo con lo ya reportado por Kümmel y Brinkmann (1988); Schonbaum (1971). no tiene efecto en la oxidación de sustratos en la mitocondria de *Euglena*. Se ha mencionado (Buetow, 1989) que la oxidación por la vía insensible a CN es estimulable por AMP. En estas preparaciones mitocondriales no encontramos esta estimulación con ninguno de los sustratos ensayados.

Como se sabe la cadena respiratoria puede ser inhibida por diversos compuestos y ésta inhibición nos ha dado información muy valiosa acerca del orden de los distintos componentes de la vía.

El $Zn^{2+}$ (10$\mu$M) no bloquea la oxidación de G+M, sucinato y lactato en estado 4 en un medio de consumo de oxígeno en ausencia de EGTA (dato no mostrado), pero si bloquea totalmente la oxidación de estos sustratos en estado 3.
Por otra parte, el $Zn^{2+}$ es utilizado como un fuerte bloqueador del citocromo O en bacterias (Kita *et al.*, 1986) pero no bloqueó la oxidación de succinato y lactato.

La oligomicina inhibió fuertemente la oxidación de todos los sustratos excepto el lactato. Es un inhibidor clásico tanto de la ATPasa (Stryer, 1975) por lo que podría indicar que la oxidación de lactato no está acoplada a la fosforilación. Sin embargo, la síntesis de ATP determinada en este trabajo indica lo contrario ver adelante Tabla V, por lo que el efecto de la oligomicina podría no ser específico para la oxidación de lactato.

Un inhibidor puede interferir en la entrada del sustrato alterando la permeabilidad, disminuyendo los mecanismos de transporte, o reduciendo el total de energía potencial disponible para bloquear ya sea vías enzimáticas o interfiriendo en los procesos de acoplamiento.

## 4.5 CONSTANTES DE INHIBICION

Los valores de las constantes de inhibición se determinaron calculando la inversa de la velocidad del comsumo de oxígeno contra concentración de inhibidores determinándose el efecto que ejerce sobre esta velocidad los diversos inhibidores, como se muestra en las Figs. 18-29. Los valores de las distintas Ki aparentes se muestran resumidos en la Tabla IV.

Con G+M como sustratos se probó unicamente el DPA, el cual presentó una inhibición del 100% a 0.25mM (Fig.18) se observó sólo una pendiente con una Ki de 0.035mM.
En las Ki aparentes obtenidas con succinato como sustrato probando antimicina (Fig.19), cianuro (Fig.20), oligomicina (Fig.21) se observó sólo una pendiente indicando un sólo componente, de 0.032mM, 35μM y 21.5μM respectivamente. Con este sustrato el DPA (Fig.22) inhibe el 100% a una concentración de 0.05mM y se observan dos pendientes, una positiva y otra en la cual el componente tiene una constante de inhibición de 0.315mM.

En el caso del lactato con todos los inhibidores probados se observan 2 pendientes excepto con antimicina (Fig.24) en donde hay sólo una pendiente con un valor de Ki 44μM. A 70μM no hay una inhibición del 100%, como se observa en la Tabla III. la antimicina (10μM) sólo inhibe un 14% la oxidación del lactato.

**Tabla IV.** Constantes de Inhibición (Ki) para diversos sustratos (estado 4) en mitocondrias aisladas de *Euglena gracilis* colectadas en fase log. Las mitocondrias 1mg/ml fueron incubadas en presencia de las concentraciones indicadas del inhibidor. Los valores de Ki se calcularon en el intersecto del eje de las abcisas para cada region recta de la línea. La concentración del sustrato se mantiene constante, como se describe en materiales y métodos.

| INHIBIDOR | SUSTRATO (μM) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | G+M | Succinato | Lactato | |
| | | | $Ki_1$ | $Ki_2$ |
| Rotenona | — | — | 7.3 | 96 |
| Antimicina | — | 32 | 44 | |
| Cianuro | — | 35 | 5 | 42.5 |
| DPA | 35 | 220 | 30 | 120 |
| Oligomicina | — | 215 | 22 | 110 |

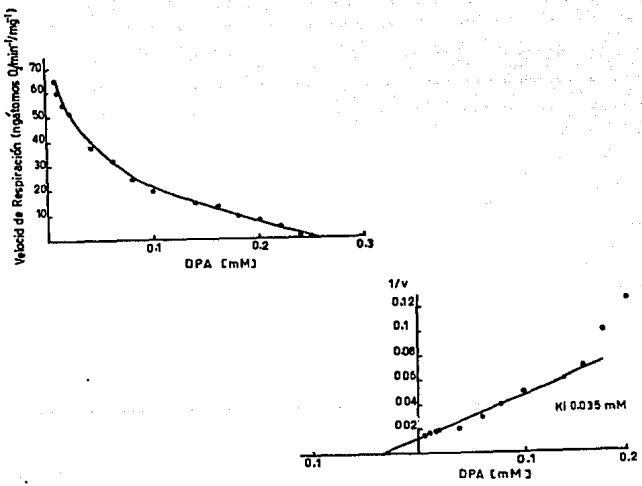



**Fig.18.** Efecto de la concentración de DPA sobre la velocidad de consumo de oxígeno con G+M (7.5mM + 15mM). Las mitocondrias aisladas de *Euglena gracilis* fueron incudabas en presencia del inhibidor. La velocidad neta fue calculada restando la respiración en ausencia del inhibidor. De esta representación se obtienen los valores de la Constante de Inhibición (Ki) como se indica en materiales y métodos.

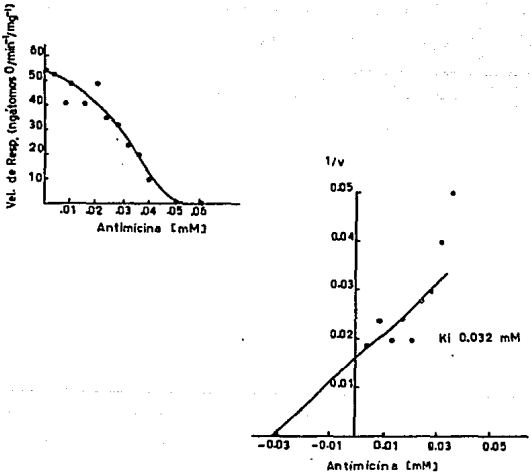



**Fig.19.** Valor de la Ki para Antimicina sobre la deshidrogenasa succínica. Las condiciones experimentales como se describen en materiales y métodos.

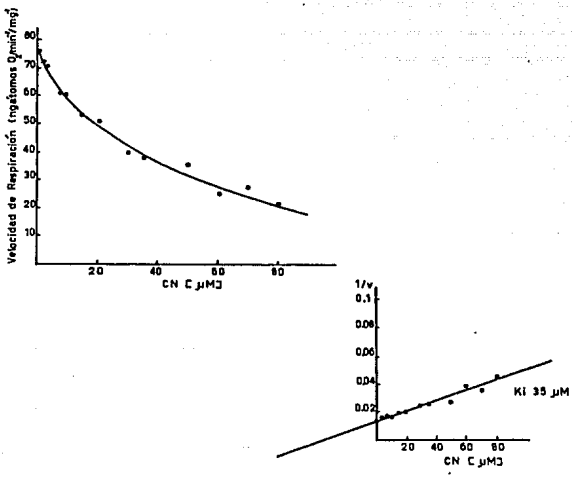
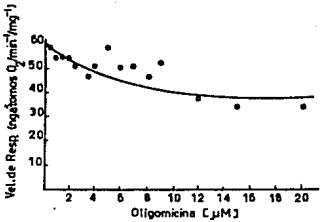



**Fig.20.** Valor de la Ki para Cianuro sobre la deshidrogenasa succínica. Las condiciones experimentales como se describen en materiales y métodos.



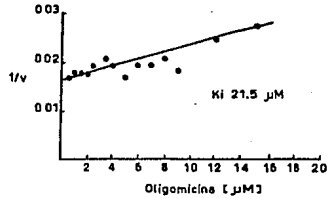




**Fig.21.** Valor de Ki para Oligomicina sobre la deshidrogenasa succínica. Las condiciones experimentales como se describen en materiales y métodos.

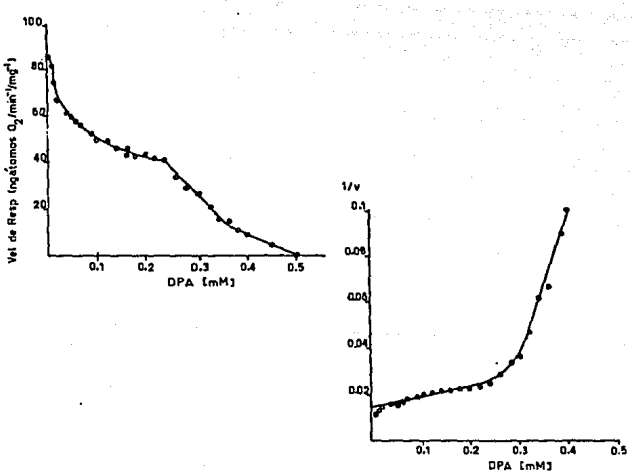



**Fig.22.** Valor de Ki para Difenilamina (DPA) sobre la deshidrogenasa succínica. Las condiciones experimentales como se indica en materiales y métodos.

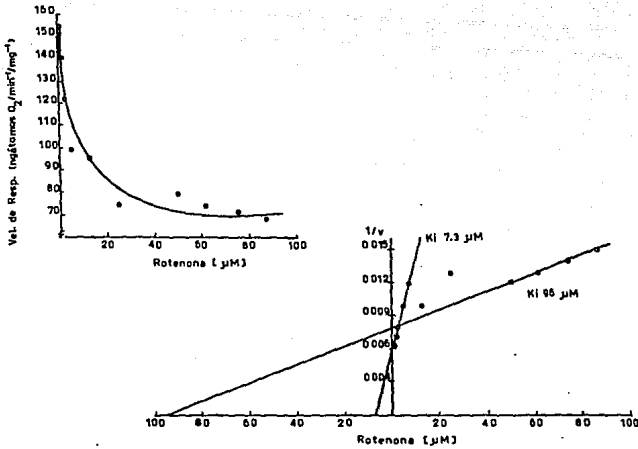



**Fig.23.** Valor de Ki para Rotenona sobre la actividad de la deshidrogenasa láctica. Las condiciones experimentales como se indica en materiales y métodos.

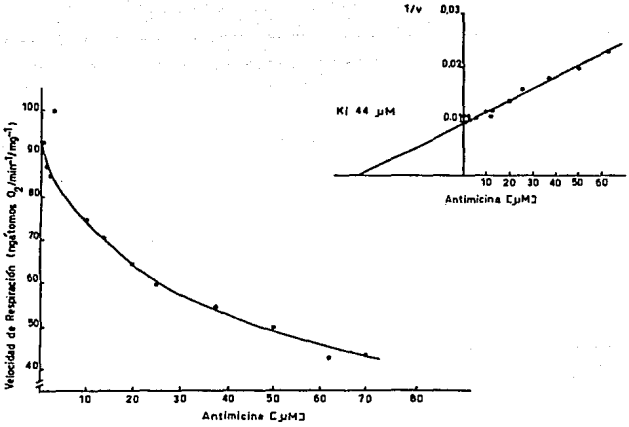



Fig.24. Valor de Ki para Antimicina sobre la actividad de la deshidrogenasa láctica. Las condiciones experimentales como se indica en materiales y métodos.

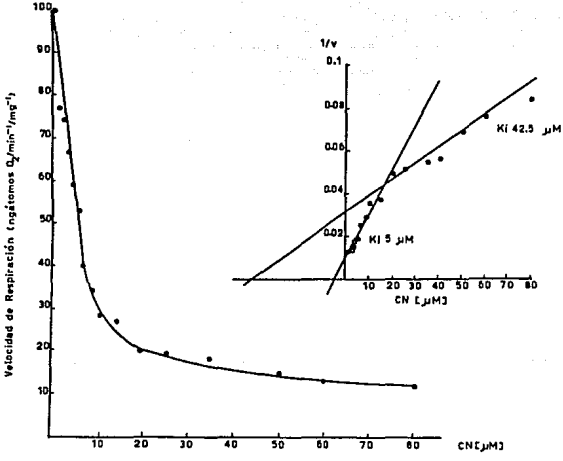
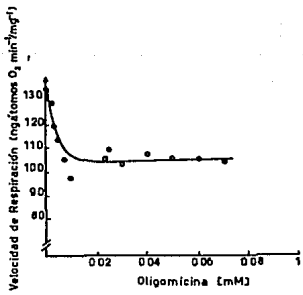



**Fig.25.** Valor de Ki para Cianuro sobre la actividad de la deshidrogenasa láctica. Las condiciones experimentales como se indica en materiales y métodos.



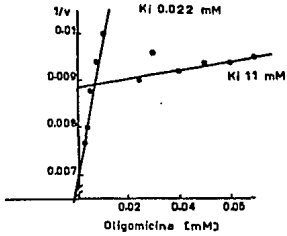




**Fig.26.** Valor de Ki para Oligomicina sobre la deshidrogenasa láctica. Las condiciones experimentales como se indica en materiales y métodos.

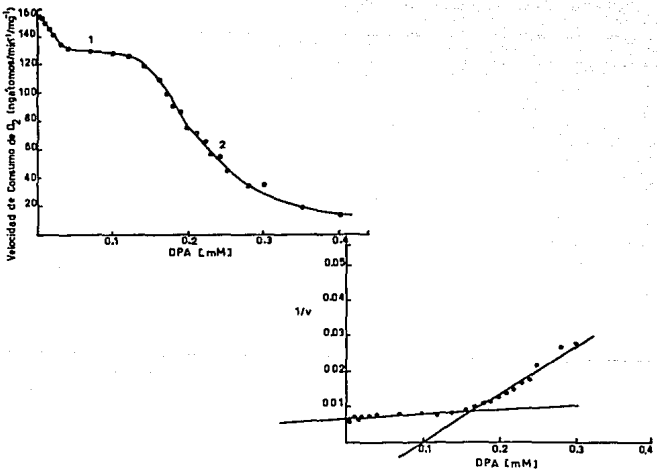



**Fig.27.** Valores de Ki para DPA sobre la actividad de la deshidrogenasa láctica. Las condiciones experimentales como se indica en materiales y métodos.

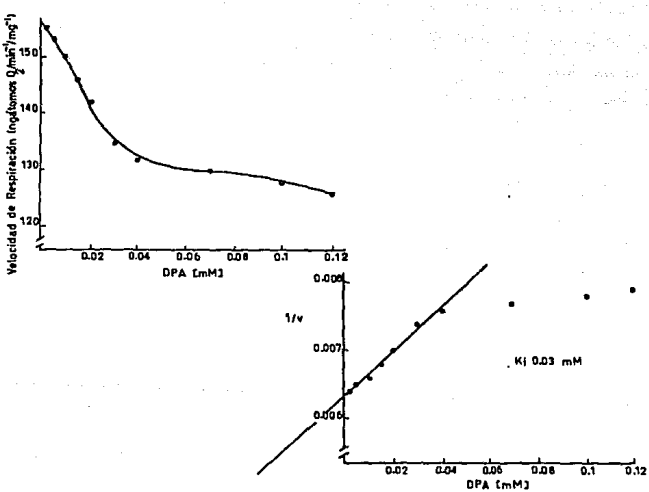



**Fig.28.** Valor de Ki a concentraciones bajas de DPA sobre la actividad de la deshidrogenasa láctica, primera serie de puntos tomados de la gráfica de la fig.27. Las condiciones experimentales como se indica en materiales y métodos

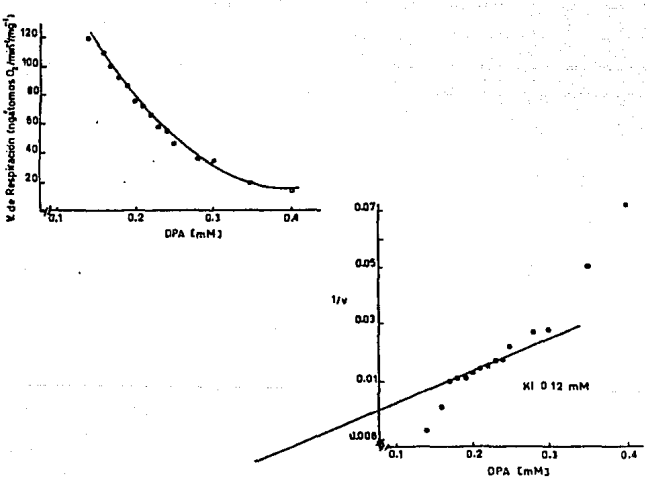



**Fig.29.** Valor de Ki a concentraciones altas de DPA sobre la actividad de la deshidrogenasa láctica, segunda serie de puntos tomados de la gráfica de la fig.27. Las condiciones experimentales como se describen en materiales y métodos.

En las Figs. 23, 25, 26, 27 con lactato se observa claramente que son bifásicas, sugiriendo la presencia de dos componentes con distintas sensibilidades a rotenona (Fig.23) Ki 7.3μM y 96μM; a cianuro (Fig.25) 5μM y 42.5μM; oligomicina (Fig.26) 0.022mM y 11mM, con DPA (Fig.27) se ven también 2 componentes en la gráfica los cuales se dividieron en dos para observarlos más claramente, la primera parte que consta de los 10 primeros puntos (Fig.28) con una Ki de 0.03mM y la segunda pate con los puntos restantes de la Fig.29 con una Ki de 0.12mM.

La inhibición de las enzimas involucradas en la oxidación de los diversos sustratos implica una disminución en la velocidad de una reacción en particular y su importancia metabólica.

Estos resultados nos pueden indicar acerca de las distintas sensibilidades de los sustratos hacia los inhibidores, lo cual nos ayudaría a tener evidencias sobre la vía alterna, y quizá sólo estemos bloqueando una de las vías y no ambas ó sólo uno de los componentes.

En la inhibición influyen factores como el pH, fuerza iónica, temperatura, amortiguadores y la pureza de la preparación.

**4.6 CONTROL RESPIRATORIO Y ADP/O**

El control respiratorio (Fig.30) muestra que en la preparación mitocondrial hay acoplamiento entre la respiración y la fosforilación oxidativa con todos los sustratos, por lo tanto, esta preparación tiene la capacidad de permitir la síntesis de ATP.

El G+M tuvo una ADP/O de 2.9 y el control respiratorio más alto en comparación con los demás sustratos probados (Tabla V) e incluso en relación con lo observado en mitocondrias de mamíferos.

Los datos se resumen en la Tabla V., este proceso (control respiratorio) fue bloqueado por oligomicina y carboxiatractilósido inhibidores específicos de la ATP sintetasa y el traslocador de ATP/ADP respectivamente.

El AMP (1mM n=7), no estimuló el consumo de oxígeno en estas mitocondrias con ninguno de los sustratos ensayados. A diferencia de lo reportado por Sharpless y Butow (1970) los cuales observan una estimulación por AMP con succinato como sustrato.

Los valores de ADP/O correlacionan con los valores previamente reportados para G+M (Tokunaga *et al.*,1976; Gómez-Silva *et al.*,1985 y Moreno-Sánchez y Raya, 1987), α-KG (Buetow y Buchanan, 1965 y Tokunaga *et al.*, 1976), NADH (Sharpless y Butow,1970a), succinato (Sharpless y Butow, 1970a y Tokunaga *et al.*,1976) y lactato (Sharpless y Butow, 1970a).

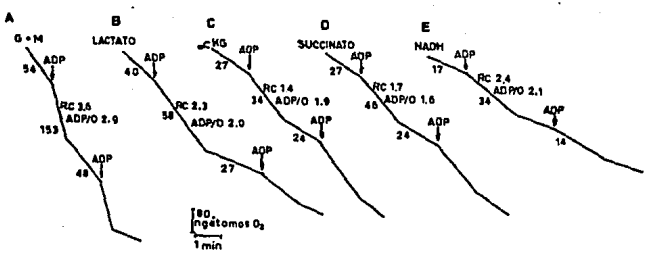



**Fig.30.** Estado 3 de la respiración probado en diversos sustratos.

Las mitocondrias fueron incubadas (1mg/ml) en un medio KMEP, a la concentración de sustratos descrito en métodos. Donde se indica 720 (A), 450 (B), 300 (C,E) y 250 (D) nmol de ADP fueron adicionadas. Los números a la izquierda de los trazos indican la velocidad del consumo de $O_2$ en ngátomos O/min/mg.
Las ADP/O indican la cantidad total de ADP adicionado en nmolas en relación con la cantidad total de consumo de $O_2$ en ngátomos inducidos por la adición de ADP.

**Tabla V.** Control Respiratorio y ADP/O con diversos sustratos en mitocondrias de *Euglena gracilis*.La velocidad de respiración del edo.3 (estimulada por ADP) fue determinada en las condiciones experimentales descritas en material y métodos. El control respiratorio fue calculado de la velocidad del edo.3 entre el edo.4 obtenido de la primera adición de ADP. Los valores representan la media ± error estándar con el número de preparaciones usadas indicadas entre paréntesis.

| SUSTRATO | Consumo de $O_2$ estado 3 (ngátomos O2/min-1/mg-1) | ADP/O | CR |
|---|---|---|---|
| G + M | 150±2(11) | 2.9±0.3 | 3.6±0.4 |
| α-cetoglutarato | 34±2(4) | 1.9±0.4 | 1.4±0.1 |
| NADH | 33±1(6) | 2.3±0.6 | 2.4±0.1 |
| Succinato | 40±2(6) | 1.6±0.2 | 1.7±0.5 |
| lactato | 56±2(7) | 2±0.1 | 2.3±0.2 |

Los altos valores de control respiratorio con todos los sustratos claramente indican un perfeccionamiento en el método de obtención de mitocondrias acopladas de *Euglena* por sonicación (Moreno-Sánchez y Raya, 1987); es la sonicación suave el paso crítico en el perfeccionamiento de este procedimiento de extracción de mitocondrias.

Hay que hacer notar que la respiración en estado 4 fué más alta cuando se agregaba el sustrato después de incubar a las mitocondrias durante 4 min (Tabla.I.), que en presencia del sustrato cuando este era incubado por 4min. Estas observaciones sugieren que como sucede en mitocondrias de mamíferos, la oxidación de sustratos en la mitocondria de *Euglena* está probablemente sujeta a la modulación por adenina, piridín nucleótidos o el $Ca^{2+}$ que se encuentra en la matriz.

**4.7 SINTESIS DE ATP.**

Una determinación directa de la síntesis de ATP fue confirmada con los 5 sustratos los cuales llevan a cabo la fosforilación oxidativa. (Tabla VI).

Las velocidades de síntesis de ATP no correlacionan estrictamente con las velocidades de consumo de $O_2$ (Tabla V). Sin embargo, si es confiable realizar comparaciones del efecto de inhibidores sobre el consumo de $O_2$ y síntesis de ATP.

Sólo la síntesis de ATP apoyada por lactato fué parcialmente resistente a antimicina (Tabla VI) similar a la velocidad en estado 3 con lactato ya que la velocidad fué parcialmente inhibida por antimicina (68 ± 1% n=3), pero esta fue completamente inhibida con 10$\mu$M de mixotiazol y HQNO (datos no mostrados).

La respiración en estado 3 fue completamente bloqueada por 0.01mM de CN o 0.25mM de DPA con lactato.

Por otra parte, este dato nos da una idea de que el lactato es oxidado a través de una vía insensible a antimicina que tiene dos sitios de conservación de energía, mientras que los otros sustratos utilizados estimularon la fosforilación oxidativa usando la vía sensible a antimicina.

La oxidación de G+M y NADH en ausencia de ADP fue parcialmente resistente a antimicina (Tabla II).

Entonces el flujo de electrones se va por la vía alterna pudiendo parecer incapaz de generar un gradiente de $H^+$ de una suficiente magnitud para la síntesis de ATP.

**Tabla VI.** Fosforilación Oxidativa con diversos sustratos en mitocondrias *Euglena gracilis*. La síntesis de ATP fue determinada enzimáticamente como se discribe en material y métodos. Las concentraciones indicadas de los inhibidores se añadieron al medio de incubación antes de la adición de mitocondrias. Los valores indican la media ± error estándar de 4 preparaciones usadas.

| | Síntesis de ATP | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Inhibidor** | **G+M** | **α-KG** | **NADH** | **Succinato** | **Lactato** |
| | nmolATP/ $min^{-1}$/ $mg^{-1}$ | | | | |
| | 228±12 | 140±8* | 200±6 | 198±18 | 245±5** |
| Rotenona (0.05mM) | 17 | 10 | 11 | 176(2) | 199 |
| Antimicina (0.01mM) | 17 | 6 | 35 | 41(2) | 130 |
| Cianuro (0.1mM) | 65 | 0 | 70 | 35 | 47 |
| Oligomicina (0.01mM) | 48(2) | 0 | 32(2) | 43(2) | 39(2) |

* $P < 0.001$ para α-KG *versus* ningún otro sustrato
** $P < 0.05$ para lactato *versus* G+M, NADH o succinato

La alta velocidad de la fosforilación oxidativa se logró con lactato sugiriendo que este sustrato puede proveer directamente la unión entra la glucólisis y la cadena respiratoria para proveer de energía suficiente a las células de *Euglena* crecidas en la obscuridad.

El piruvato es oxidado a ACoA sólo bajo condiciones anaeróbicas por una PDOR-NADP sensible a $O_2$ (Inuí *et al.*, 1985; Inui *et al.*, 1990).

**4.8 POTENCIAL DE MEMBRANA.**

Las mitocondrias de *Euglena gracilis* son capaces de generar un potencial de membrana con todos los sustratos (Fig.31) como se muestra con la prueba semicuantitativa de safranina (Akerman, 1976).

El CN no colapsa completamente el potencial de membrana generado por la oxidación de G+M, succinato y lactato. Esto sugiere, de acuerdo con un trabajo previo (Moreno-Sánchez y Raya, 1987), que la respiración resistente a CN puede o es capaz de generar un potencial de membrana sensible a desacoplantes.

Sin embargo, una correlación estricta entre la respiración resistente a CN y el potencial de membrana resistente a este inhibidor no fué encontrada para NADH y succinato (Tabla III y Fig.31 C,D); la razón de esta discrepencia no se conoce. Tampoco sucede con α-KG por que sí colapsa el potencial pero no inhibe el consumo de oxígeno.

La señal de absorbencia con safranina alcanza un máximo con la adición de los sustratos (Fig.31) disminuyendo después. Esta disminución espontánea del potencial de membrana fué quizás por un ligero desacople inducido por la entrada de colorante (Rottenberg, 1984). Se utilizó la relación de 10nmol de safranina por mg de proteína como se sugiere para mitocondrias de mamíferos (Akerman, 1976).

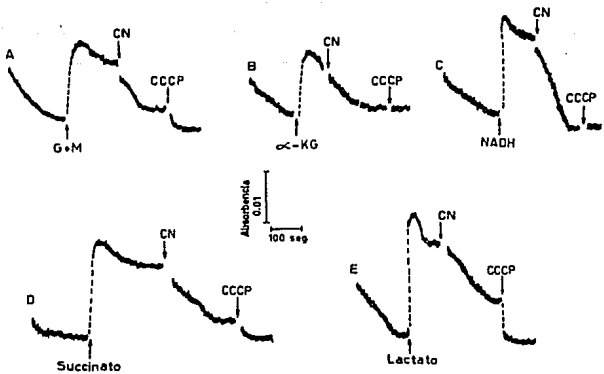



**Fig.31.** Generación del Potencial de Membrana con diversos sustratos.

Las mitocondrias (1mg/ml) fueron incubadas como se describe en métodos con 10μM de safranina. Después de 8 min. los sustratos fueron adicionados y se registró la absorbancia a 511-533. La concentración de sustratos se indica en la Tabla I. 100μM de CN y 1μM de CCCP.

Para medir el potencial de membrana cuantitativamente dependiente de la oxidación de sustratos se usó $^{3}H$-$TPP^{+}$. El $TPP^{+}$ es una determinación más fiel del potencial que la safranina ya que éste se incorpora como respuesta al gradiente electroquímico a la membrana mitocondrial y con safranina podrían existir ciertas variaciones sobre todo si hay una alto contenido de lípidos en la preparación ya que en vez de fijarse a la membrana mitocondrial lo hace a los lípidos contaminantes.

Los valores obtenidos mediante ésta técnica con los diferentes sustratos son 99, 96, 83, 77, y 70 mV para succinato, lactato, G+M, NADH y α-KG, respectivamente.

Estos valores de potencial de membrana se obtuvieron después de la unión inespecífica de $TPP^{+}$, como se indica para mitocondrias de hígado de rata. La posibilidad de la unión inespecífica es grande por lo tanto, los valores pueden ser no estimados.

**4.9 HINCHAMIENTO.**

La adición de varios sustratos induce un incremento en el volumen intramitocondrial (Fig.32) el cual fué más prolongado con α-KG (Fig.32 D),pero no tan prolongado con los otros sustratos, G+M, NADH, succinato y lactato.

Con la adición de ADP las mitocondrias se contraen y y esta respuesta es sensible a oligomicina con G+M (Fig.32B) y con todos los sustratos usados (datos no mostrados).
La contracción inducida por ADP fue también probada con sustrato no adicionado (Fig.32C) y fue fosfato dependiente indicando que esta fosforilación oxidativa es un proceso que involucra un cambio en el volumen mitocondrial. Esta observación fué reportada hace varios años en mitocondrias de mamíferos (Packer, 1967).

Además, la adición de un ionóforo de $K^+$ la valinomicina induce un incremento en el hinchamiento (permeabilidad a $K^+$) el cual fué significativo con G+M, NADH, succinato y lactato y negligible en ausencia de estos sustratos (Fig.32 C). esto indica que los cambios en el volumen de la matriz fueron dependientes de energía y en donde también los movimientos de $K^+$ están involucrados.

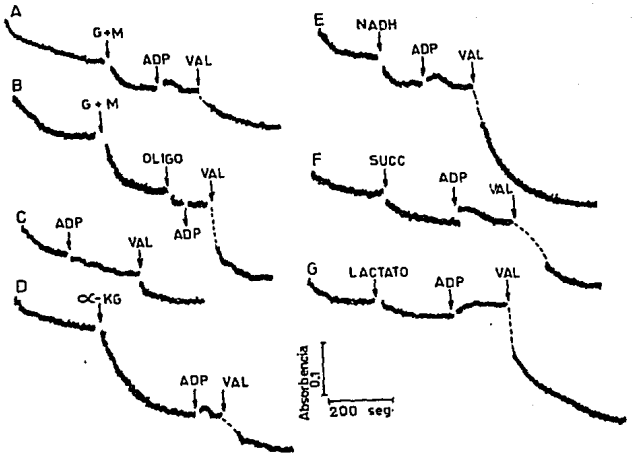



**Fig.32.** Hinchamiento.

Las mitocondrias fueron incubadas (1 mg/ml) en 2 ml de medio KMEP descrito en métodos. **A** y **B** 7.5mM de glutamato + 15mM de malato (G+M), **D**. 10mM de α-KG, **E**. 1mM de NADH, **F**. 10mM de succinato y **G**. 10mM de lactato, 300nmol de ADP, 0.45 nmol de valinomicina (VAL) y 0.01mM de oligomicina (oligo).

**4.10 PIRIDIN NUCLEOTIDOS**

Se pretende inicialmente la caracterización de reacciones que involucran la oxidación de lactato y el estado redox del NAD(P)H intramitocondrial.

Los patrones de oxido-reducción de NAD(P)H fueron observados con G+M: la adición de un desacoplante (CCCP) entre la síntesis de ATP y el transporte de electrones, induce una rápida oxidación. Sin embargo, DPA, rotenona, mixotiazol y HQNO producen una reducción total (Fig. 33 A,B,J,K).

Con lactato como sustrato, el CCCP induce más extensamente la oxidación de NAD(P)H la cual fue parcialmente bloqueada por rotenona (Fig.33C), y mixotiazol (Fig.33H). Sin embargo, el DPA (Fig.33E) y el HQNO (Fig.33I) lo redujeron totalmente.

El incremento en fluorescencia inducido por antimicina con lactato (Fig.33 D) no se relacionó con la reducción de NAD(P)H.

La adición de antimicina en mitocondrias incubadas en ausencia de sustrato (Fig.33 G) también indujo un incremento en la fluorescencia.

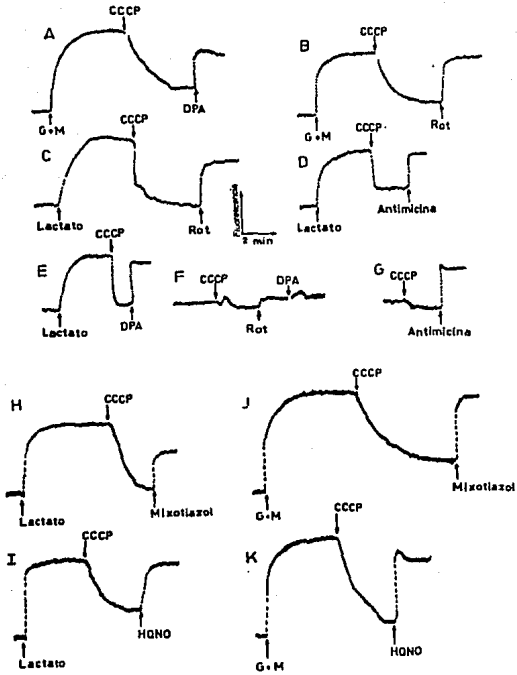



**Fig.33.** Estado Redox de los Piridín Nucleótidos en preparaciones distintas de mitocondrias aisladas de *Euglena gracilis* oxidando lactato y G+M. La fluorescencia de la suspensión mitocondrial fué medida como se describe en métodos. Las mitocondrias (1mg/ml) fueron incubadas en 2ml de medio KMEP durante 8-10min después de la adición de los sustratos indicados, 4μM CCCP, 12.5μM rotenona (Rot), 0.25mM DPA y 10μM antimicina. No se adicionó sustratos en los trazos **F** y **G**.

Estos datos de la Fig. 33 C, E, H, I, sugieren que la oxidación de lactato está asociada con la formación de NAD(P)H. Sin embargo, la actividad de la lactato oxidasa fue detectada en preparaciones frescas de partículas submitocondriales (obtenidas por sonicación y centrifugación diferencial a 105,000 x g), hay que hacer notar que la actividad de esta lactato oxidasa baja casi un 80% en muestras de preparaciones congeladas; aunque esto requiere de más caracterización, parece ser que la lactato oxidasa está localizada en la membrana mitocondrial interna.

Price en 1962 describe una D-LDH en extractos celulares dependiente de zinc la cual no tienen como requerimiento esencial el NAD en *Euglena;* la localización subcelular de ésta actividad de la enzima fué identificada en una fracción mitocondrial (Graves, 1972; Collins y Merret, 1975), en la cual también se observó que el CN (1mM) sólo inhibe un 10% la oxidación de D-lactato.

Por otra parte, resulta interesante una D-LDH dependiente de flavín directamente unida a la cadena respiratoria, también descrita en *E.coli* y algunas bacterias.

La presencia de la actividad de la lactato oxidasa en mitocondrias de *Euglena* sugiere una unión evolutiva entre cadenas respiratorias de bacterias y *Euglena*.

La actividad de la citocromo oxidasa de mitocondria de *Euglena gracilis*, fue medida con citocromo c de caballo ésta no mostró diferencia alguna entre este citocromo y el citocromo c de levadura, pero sí varia utilizando citocromo

c de *Euglena* dependiendo del medio de cultivo usado (Calvayrac *et al.*, 1978).

Se confirmó, de acuerdo a datos ya reportados (Devars *et al.*, 1992) que la adición de citocromo c de caballo o de levadura (10 μM) no estimulan la actividad de la citocromo oxidasa de *Euglena*.

La actividad de ésta oxidasa fue de 267 ± 2 (15) ngátomos de $O_2/min^{-1}/mg^{-1}$, con el número de preparaciones indicado entre paréntesis. Esta aumentó casi al doble en preparaciones de partículas submitocondriales 488 ± 3 (10), ambas fueron sensibles a CN y azida de sodio (dato no mostrado).

## V CONCLUSIONES.

La realización del presente trabajo nos permite concluir lo siguiente:

Las mitocondrias aisladas de *Euglena* presentan acoplamiento entre la respiración y la síntesis de ATP por los altos valores de CR y ADP/O obtenidos con los diferentes sustratos utilizados.

Por otra parte, la oxidación de estos sustratos presenta sensiblilidad parcial a diversos inhibidores (Tabla III), tanto de cadena clásica como rotenona, antimicina y CN y algunos de cadena alterna reportados para *Euglena* y para mitocondrias de plantas, esto con el fin de corroborar la presencia de una o varias vías alternas de oxidación de sustratos.

Aunque la mitocondria de *Euglena* muestra algunas de las reacciones dependientes de energía encontradas en mitocondrias de mamíferos se observaron algunas diferencias interesantes.

*Euglena* presenta una cadena respiratoria insensible a CN y sería interesante demostrar que esta vía es capaz de apoyar reacciones dependientes de energía.

Sería muy importante contar en esta investigación con un inhibidor específico de la respiración insensible a CN y de la vía alterna, pero no se ha descrito ninguno.

Los datos de la Tabla III. indican que la antimicina o la baja concentración de CN sólo como inhibidor de la citocromo oxidasa no afectan la oxidasa alterna, para la cual no se ha encontrado un inhibidor específico.

El SHAM no inhibe de manera específica y eficiente la respiración insensible a CN en *Euglena*, pero si la inhibe en algunos eucariontes inferiores (Henry y Nyns, 1975).

Se observó que la vía alterna es capaz de llevar a cabo una pequeña síntesis con 100μM de CN, en este caso el CN puede actuar como un bloqueador del flujo de electrones por la vía clásica y en cambio incrementa la utilización de rutas alternas insensibles. Sin embargo, se puede observar un remanente por que la concentración de CN no inhibe la oxidasa alterna.

El HQNO, mixotiazol y DPA inhiben la vía alterna pero también parecen tener efecto al bloquear la respiración sensible a CN.

La combinación de dos inhibidores para el estudio de la vía alterna en reacciones dependientes de energía puede ser útil.

Es muy importante el análisis de la cinética con inhibidores respiratorios ya que reveló la efectividad de cada uno de estos con los distintos sustratos sugiriendo que existe una ramificación en el sistema respiratorio.

El mantenimiento de un pequeño potencial de membrana en presencia de CN con G+M (Moreno-Sánchez y Raya, 1987) fue confirmado en éste estudio y ampliado a los otros sustratos. Esta observación sugiere que el citocromo o , la oxidasa alterna pueden ser una bomba de protones en la mitocondria de *Euglena*.

Una demostración directa de la fosforilación oxidativa llevada a cabo por el lactato resultó insensible a antimicina (sensible a HQNO) lo que confirma que este sustrato es oxidado por la vía alterna y que esta vía no presenta aparentemente una ramificación en la citocromo oxidasa (Sharpless y Butow, 1970b; y Buetow. D. 1989). Asi, como se había postulado por Sharpless y Butow (1970) la mitocondria de *Euglena* parece tener dos vías alternas, una vía insensible a CN en la cual hay una pequeña síntesis de ATP y una vía alterna lactato-dependiente que es capaz de llevar a cabo reacciones dependientes de energía.

La medición del consumo de oxígeno y el potencial de membrana sugieren que el succinato es preferentemente oxidado por la vía clásica de transporte de electrones en tanto que los demás sustratos probados alimentan también la vía alterna.

La vía alterna involucra un citocromo tipo "b" (Buetow.D.1989), insensible a antimicina que se manifiesta en la oxidación de lactato y G+M; y una oxidasa alterna insensible a CN durante la oxidación de NADH y lactato principalmente.

Resulta interesante, la presencia de una lactato oxidasa en particulas submitocondriales de *Euglena* ya que indican que la lactato deshidrogenasa es un componente integral de la cadena respiratoria, estas características son importantes ya que son similares a las características descritas para la oxidación de lactato en sistemas respiratorios de bacterias.

Esto implica que puede existir una proximidad taxonómica y evolutiva entre algunas bacterias y las mitocondrias de *Euglena*. Una comparación entre la LDH de mitocondrias de *Euglena* y bacterias puede proveer una evidencia de su relación filogenética.

## VI PERSPECTIVAS.

Pienso que la investigación que se ha realizado ha permitido tener una mayor comprensión de la oxidación de los diferentes sustratos en mitocondrias aisladas de *Euglena gracilis*, algo con respecto a su regulación, la capacidad de la mitocondria de sintetizar ATP y otros procesos dependientes de energía. Sin embargo, queda un amplio campo por investigar:

Caracterizar las vías alternas mediante la medición de citocromos, espectros diferenciales, creciendo a las células en diferentes fuentes de carbono ya que parece que estas vias alternas son inducibles.

Quizás un aspecto más interesante en la composición de los citocromos es la existencia de varias oxidasas terminales con diferente sensibilidad por el oxígeno y diferente sensibilidad a diversos inhibidores.

Definir la composición de la(s) cadena(s) de transporte de electrones, en donde, sería de gran ayuda contar con inhibidores específicos.

Relación entre la composición de los citocromos y su eficiencia para formar gradientes de $H^+$

Caracterización de la oxidación del Lactato ya que es el sustrato que se oxida a mayor velocidad y es poco sensible a diferentes inhibidores.

Aislar y purificar la Lactato Deshidrogenasa mitoconrial de *Euglena gracilis* ya que parece indicar que es un componente integral de la cadena respiratoria con el fin de encontrar alguna relación entre esta enzima y la cadena respiratoria de bacterias.

Caracterización de las mitocondrias de células crecidas en presencia de Hg, Cd y Plomo, que es uno de los principales contaminantes ambientales y observar la capacidad adaptativa de las células a ambiemtes adversos.

Comenzamos a caracterizar al organismo, su metabolismo, capacidad adaptativa a muy diversas fuentes de carbono, pero queda mucho por descubrir acerca de aspectos importantes en bioenergética y su regulación.

**APENDICE A.**

**Centrifugación Diferencial.**

Se le llama centrifugación diferencial al proceso físico que aplica la fuerza centrífuga para separar organelos de acuerdo, con el coeficiente de sedimentación de cada uno. Los organelos más densos sedimentan primero. La porción de sobrenadante de cada centrifugación se somete nuevamente a una fuerza centrífuga mayor, obteniéndose la separación de los diversos componentes celulares, en orden decreciente de su densidad.

El coeficiente de una partícula depende del tamaño, forma, densidad de la partícula y de la viscosidad del medio.

Si se somete a una célula a la acción de una fuerza centrífuga adecuada, sus organelos se distribuirán en diferentes capas dentro de la célula dependiendo de su coeficiente de sedimentación. Las mitocondrias sedimentan aproximadamente a 10.000xg, núcleos 1000xg, microsomas 105,000xg (120min) , retículo y ribosomas 105,000xg (20min).

La centrifugación debe realizarse a una temperatura ligeramente superior al punto de congelación para impedir que los sistemas enzimáticos funcionen, lo que lesionaría los organelos durante su separación.

El control de la pureza de las fracciones obtenidas debe realizarse al microscopio electrónico o por métodos bioquímicos.

**APENDICE B.**

**Método Polarográfico.**

Este método de análisis está basado en las curvas corriente-voltaje que salen de un (micro)electrodo. La difusión es el paso determinante de la velocidad en la descarga de iones. Lo sobresaliente del método es que produce una corriente de electrólisis restrictiva que es directamente proporcional a la concentración de la especie electrolizable y un potencial de media onda, el potencial en que la corriente ha alcanzado la mitad de su valor restrictivo, que es característico de cada especie.

Un electrodo se considera que está polarizado cuando adopta un potencial aplicado sobre él con muy poco o sin cambio de la corriente (Willard, et al.1975).

La velocidad de difusión de especies iónicas particulares es proporcional a la diferencia entre estas dos concentraciones, y está dada por la ley de Fick:

$$\frac{\delta c}{\delta t} = \frac{AD}{d}(C-Co)$$

En donde A= área expuesta de la superficie del electrodo

D= coeficiente de difusión del ión

$\delta$= espesor de la capa de difusión alrededor del microelectrodo.

Conforme la región alrededor del microelectrodo empieza a agotarse de iones electroactivos, esto es, conforme Co se aproxima a cero, la velocidad de difusión se vuelve proporcional a la concentración en la masa de la solución, C

Esta es otra propiedad característica de un electrodo completamente polarizado, y sirve como la base para el analisis cuantitativo.

Cuando se establece el equilibrio en un microelectrodo, la velocidad de descarga de los iones por la corriente será igual a la velocidad de difusión del electrodo.

La influencia de la temperatura sobre la corriente de difusión es muy marcada, particularmente conforme el coeficiente de difusión de muchos iones cambia de 1-2% alrededor de 25°C, la cual es la temperatura estándar escogida para el trabajo polarográfico. Esto, implica que la temperatura de la solución, en la celda polarográfica debe de ser controlada para que exista una variación solo de 0.5°C o menos (Willard *et al.*,1975).

La sonda sensible a $O_2$ es una celda electrolítica con cátodo de oro (o platino) separado de un ánodo de plata montados en una base de la celda rodeada por una cubierta de agua. El ánodo está electricamente conectado al cátodo por un gel electrolítico, y el sistema químico total se encuentra aislado del medio ambiente por una fina membrana permeable al $O_2$ (frecuentemente de teflón), bajo esta se pone KCL saturado que actúa como electrolito (Whittaker,1982).

El electrodo de platino está polarizado a -0.6V respecto al electrodo de plata y el $O_2$ reducido en el electrodo de platino .

$$O_2 + 2H^+ + 2\hat{e} \quad H_2O$$

$$H_2O_2 + 2H^+ + 2\hat{e} \quad 2\ H_2O$$

El oxígeno, en la muestra, se difunde a través de la membrana, se reduce en el cátodo con formación del producto de oxidación en el ánodo de plata (Fork,1972a).
La corriente resultante es proporcional a la cantidad de oxígeno reducido.

La unidad analizadora opera en un margen de 0.2 a -0.8V; éstos incluyen a los halógenos y al $SO_2$, y el $H_2S$ contamina los electrodos.

Una medida eléctrica de oxígeno es posible ya que esta disminuye en el cátodo negativo de platino, probablemente por la reacción:

$$O_2 + 2H_2O + 4e = 4OH^-$$

El ánodo de plata y KCl como soporte electrolítico; la reacción en el ánodo es:

$$4Ag + 4Cl^- = 4AgCl + 4e$$

En consecuencia se toman 4 electrones (e) del electrodo de platino, provocando una corriente que fluye del electrodo Ag/AgCl. La magnitud de la corriente es directamente proporcional a la concentración del oxígeno en solución. Es posible hacer mediciones hasta que todo el oxígeno sea utilizado.

El resultado de la corriente de flujo es proporcional a la concentración de oxígeno en la muestra (Fork,1972b).

El polarograma de corriente contra fuerza electromotriz tiene una meseta plana, las variaciones de voltaje aplicadas al electrodo no producen variaciones en la corriente de flujo.

El voltaje varía si una larga resistencia existe en el circuito, ya que los cambios de corriente producidos por el oxígeno evolucionan con la muestra y tienen un cambio en el potencial del electrodo de platino. Para evitar la resistencia del electrodo de referencia se propuso una resistencia de 100 ohms y, el voltaje es mediado a través de un amplificador (Douglas y Donald,1988).

Kouchkovsky encontró que el logaritmo del radio de corriente de flujo por mol disuelto de oxígeno aumenta linealmente con el recíproco de la temperatura absoluta (Q alrededor de 2.8).

**APENDICE C.**

**Espectrofotómetro.**

Proporciona la relación o una función de la relación, de la potencia radiante de dos haces con una función del espectro de la longitud de onda. Estos dos haces pueden separarse en tiempo, espacio o ambos.

Los componentes principales son : una fuente de energía radiante, filtro para el aislamiento de una banda de energía radiante, un sistema óptico para producir un haz paralelo a la luz filtrada para el pasaje a través de una celda de absorción (celda), un detector para la energía radiante no absorbida y medidores de lectura asociados.
Se usa un prisma o emparrillado como aparato dispersor para el aislamiento de una banda espectral deseada de energía radiante. Las fuentes son importantes desde el punto de vista de su rango y su distribución espectral relativa dentro de este rango, su estabilidad y su temperatura de operación (Willard, et al.1975).

Cuando la energía radiante incidente está instrumentalmente restringida a un rango de frecuencias absorbidas por el ión o molécula, el cambio de porcentaje en respuesta para un cambio de concentración dada, se hace mayor. El receptor no se limita al rango de luz visible sino que permite el ultravioleta y cercanos al infrarrojo.

La función de la fuente de luz es la de proveer luz incidente de suficiente intensidad para la medición.

Para trabajar en las regiones visibles cerca del infrarrojo y el ultravioleta, la fuente más común es la lámpara incandescente encerrada en vidrio, de filamento de tungsteno (emite su principal porción de energía en la región cercana al infrarrojo del espectro).

Las características de un aparato de dispersión son ; la anchura del paso de la banda, la longitud de onda de la banda del centro y su transmitancia en el pico de la banda.

La selección del filtro es un compromiso entre la transmitancia de la cresta y la anchura del paso de la banda; la primera debe ser muy alta y la segunda tan angosta como sea posible.

Los filtros de vidrio usuales tienen anchuras de paso relativamente amplias 35-50μu y su transmitancia del 5-2%.

La acción del filtro es la absorción de la energía no deseada, se debe considerar el calor de dispersión así como la resistencia al cambio en sus características espectrales después de largos periódos de uso.

La acción de un prisma es dispersar un haz policromático de radiación dentro de un espectro y depende de la variación del índice de refracción con la longitud de onda.

Como se usa en los espectrómetros la luz de la fuente es dirigida a través de una lente convergente hacia una abertura de entrada en el punto focal de la lente, de ahí pasa a un prisma y a una segunda lente convergente.

Aquí es muy importante mencionar la ley de Lambert y Beer: "La concentración de una substancia es directamente proporcional a la cantidad de energía radiante absorbida e inversamente proporcional al logaritmo de la energía radiante transmitida" (Kaplan y Pesce,1991).

La absorbancia es directamente proporcional al paso de la energía radiante a través de la célula.

La relación matemática entre la absorbancia de la energía radiante, concentración de una solución y el paso de la luz se muestra por la ley de Lambert-Beer:

$$A = a\ b\ c$$

a = coeficiente de extinción molar

b = paso de la luz en la solución en cm

c = concentración de la muestra

La transmitancia de una muestra en solución es definida como la proporción de la luz incidente que atraviesa la muestra. Usualmente, se describe como porcentaje (%T). Este concepto es importante por que es sólo la luz transmitida la que puede ser medida.

La disminución en el porcentaje de transmitancia varia inversa y logaritmicamente con la concentración, por lo que es más conveniente utilizar la absorbencia, que es directamente proporcional a la concentración, pero es importante tener en cuenta que la absorbencia no es una medida cuantitativa directa pero sólo se obtiene por un cálculo matemático de la transmitancia (Kaplan y Pesce,1991).

La relación entre absorbencia y el porcentaje de transmitancia es una escala lineal de 0 a 100%, mientras que la escala de absorbencia es logarítmica y va de infinito a cero.

La dispersión del vidrio es aproximadamente 3 veces la del cuarzo, y es el material de elección para la porción visible del espectro.

Entre más sensible sea el aparato de medición para la radiación emergente, más angosta será la abertura de la banda y más puro el haz emergente de radiación hasta cierto punto.

**APENDICE D.**

**Espectrofotómetro de doble haz.**

En un espectrofotómetro de doble haz, se toman dos haces equivalentes de fuente de la luz y, por medio de un espejo giratorio y un interruptor de luz, cada haz atraviesa el sistema monocromador-detector en ciclos alternados. Se coloca la muestra en un haz, en tanto se deja vacío el haz de referencia o contiene un blanco de referencia o solución. En tanto haya más del 95% de radiación incidente que sea absorbida por la muestra o solvente, el instrumento es efectivamente inactivo y la traza del espectro no significa nada. Esto debe tomarse en cuenta para hacer la selección de solventes, concentraciones y espesor de las celdas (Willard *et al.*,1975).

El amplificador se ajusta a la frecuencia del cortado del haz de luz; las señales de frecuencias diferentes no son amplificadas. La señal resultante, activa un mecanismo autoregulador que mueve un prisma óptico o colector-obturador que está montado en el trayecto del haz de referencia, reduciéndo así su energía hasta que ambos haces están nuevamente balanceados. El atenuador óptico está ligado mecanicamente a una pluma registradora que se mueve sobre el papel conforme se está buscando el equilibrio. Por lo tanto, el registro trazado es la transmitancia relativa de la muestra.

La exactitud y reproducibilidad de la lectura del espectro depende de la velocidad y sensibilidad del detector y amplificador.

Un sistema de registro, no intenta alcanzar una ecualización física de las intensidades del haz de muestra y de referencia. Las señales de los haces se separan después de la amplificación, generalmente por microinterruptores operados dsde el mango del motor que impulsa al espejo giratorio. La frecuencia de cortado se arregla para incluir un intervalo oscuro entre cada periódo de iluminación de la rejilla de salida. Las dos señales separadas, amplificadas independientemente una de la otra, se rectifican para corriente directa y se alimentan hacia un potenciómetro registrador. El potencial del haz de referencia, se coloca a través de todo el alambre cursor, y la señal del haz de muestra se alimenta hacia un contactor variable. Por esto la proporción de transmitancia se alcanza automaticamente y es continuamente registrada.

Una característica importante es que el ajuste automático de la velocidad de exploración sea inversamente proporcional a la velocidad del cambio de la transmitancia con la longitud de onda. Esto permite un fiel registro cuando se encuentra una porción compleja del espectro o cuando el nivel de la energía que llega al detector es reducido como en el análisis diferencial.

**APENDICE E.**

**Fluorescencia.**

Es el fenómeno mediante el cual una molécula puede liberarse de su exceso de energía después de la absorción de radiación electromagnética y se caracteriza por tener un tiempo de vida del orden de $10^{-4}$ a $10^{-8}$ segundos. La radiación excitante y remitida puede caer en las regiones visibles, ultravioleta, o más regiones energéticas del espectro.

Este proceso se caracteriza por dos espectros, uno de excitación y otro de emisión.

La distribución espectral de la radiación de fluorescencia es una característica física y absoluta de una sustancia determinada.

La excitación consiste en exponer a una especie a la radiación en la porción del espectro donde la molécula es capaz de absober energía. En donde un cuanto de luz que golpea a una molécula, es absorbido aproximadamente en $10^{-15}$ segundos.

Si la energía de la molécula aumenta lo suficiente, se llevará a cabo una transición electrica hacia un estado electrónico superior.

Por lo tanto, la excitación se lleva a cabo en el nivel vibracional más bajo del estado electrónico normal (G o $S_o$).

En el estado basal cada electrón está acoplado con otro; es decir, en cada orbita existen dos electrones, con spins opuestos los cuales se anulan.

La energía radiante de cierta frecuencia es obsorbida dentro de una banda de absorción normal de una molécula en donde uno de los electrones acoplados se eleva a un estado excitado y estas transiciones son responsables del espectro de excitación (Willard *et al.*,1975).

En cuanto a la emisión, el estado excitado persiste por un tiempo finito de orden de $10^{-8}$ a $10^{-4}$. Durante este intervalo, cualquier energía absorbida en exceso se disipa rapidamente. La disipación de la energía vibracional puede involucrar la transferencia de energía por colisiones entre moléculas hasta alcanzar el nivel vibracional más bajo del estado excitado, en este punto, la posibilidad para que el electrón regrese a su estado basal es muy alta y si su energía no ha tenido mayor disipación con otras moléculas después de un lapso de tiempo los electrones regresan a su estado basal, y durante esta transición se libera energía que desencadena la emisión fluorescente.

El primer requisito para la fluorescencia es el de disponer de una estructura absorbente. La fluorescencia puede expresarse generalmente en moléculas que contienen dobles ligaduras de conjunción múltiple , con alto grado de estabilidad de resonancia, y tener cuando menos un grupo donante de electrones.

La magnitud de la fluorescencia total dependerá de la cantidad de fluoróforos en solución, y sigue la ley de Beer, la cual establece que en una solución de una sustancia absorbente, la absorbancia es directamente proporcional a la

concentración; y sólo se cumple para soluciones diluídas del orden de unas partes por millón o menos, la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la concentración (Kaplan y Pesce,1991).

La sensibilidad de la fluorescencia tiene cuando menos dos ordenes de magnitud mayores que la espectrometría de absorción, por abajo de $10^{-4}$ $\mu$g/ml y es lineal arriba de 10 $\mu$g/ml o más alto.

El Fluorómetro consta de tres partes básicas:una fuente de energía radiante con la cual se irradia a la muestra, un portamuestra y un detector para medir la fluorescencia.

La selección de la longitud de onda de excitación se realiza con un filtro primario en el haz incidente antes de la celda de muestra, para compensar en forma parcial la relativamente débil fluorescencia de muchas muestras se conectan en paralelo dos fotoceldas o se emplea un espejo reflectante para aumentar la fuerza de la señal. Actualmente se usan los tubos fotomultiplicadores.

En una posición en ángulos rectos con respecto al haz incidente y con rejillas los detectores ven sólo el líquido iluminado y no las caras iluminadas de las celdas, lo que minimiza la reflexión de cualquier radiación excitante intensa. Para proteger a los detectores de la radiación dispersada se colocan filtros secundarios para que absorban radiación dispersada primaria, pero que transmitan la luz fluorescente.

**APENDICE F.**

**Determinación de proteína. (BIURET)**

Cuando hay una reacción de biuret se forma un complejo Cu-proteína que se detecta por un aumento en la absorbancia 545 nm (violeta).

El cobre se pone en forma de sulfato, y el color es más intenso a medida que se aumenta la concentración de cobre.
El hidroxido de sodio previene la formación del complejo de hidroxido de cobre.

El alcalí acelera la reacción y a muy bajas concentraciones desarrolla color en días, por arriba del 2%.
El tartrato es un agente estabilizante de los reactivos que contienen cobre, su acción es lenta y hay que esperar a que se desarrolle color, su efecto no depende de su concentración sino de su relación con el cobre.
La temperatura no tiene efecto en la reacción por que aumenta la escala con aumento de los 10°C.

Una de las propiedades importantes es que los reactivos de biuret estabilizados con tartrato no desarrollan turbidez en la mezcla de reacción (Gornal *et al.*,1949).
Con ioduro de potasio, hay una autoreducción del cobre y el complejo proteína-tartrato no se forma.

Se selecciona un blanco y estándares de albúmina.

**BIBLIOGRAFIA.**

**Akerman**, K.E.O. y Wikstrom, M.K.F. (1976). FEBS. Lett. 68, 191-197.

**Alberts**, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Watson, D.J. (1986). Biología Molecular de la Célula. Omega. Barcelona. 1170.

**Avers**, J.C. (1983). Biología Celular. Gpo. Ed. Iberoamérica. México. 123-160.

**Baker**, E.J. (1963). Arch. Biochem. Biophys. 103. 148.

**Bariaud**, A. y Mestre J.C. (1984). Bull. Environ. Toxicol. Springer-Verlag New York Inc. 32, 597-601.

**Begin-Heick**, N. (1973). J. Biochem. 134. 607.

**Blum**,J.J. y Buetow,D.E. (1963). Exp.Cell.Res. 29, 407-421

**Bomsel**, J.L. y Calvayrac, R. (1978). En "Plant Mitochondria" Elsevier, Amsterdan. 299-306

**Brandes**, D., Buetow, D.E., Bertini, F., y Malkoff, D.B. (1964) Exp. Mol. Pathol. 3, 583-609.

**Brandt**, J.T., Martin, A.P., Lucas, F.V. y Vorbeck, M.L. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 1097-1103.

**Brönstrop**, U. y Hachtel, W. (1989), Journal. Biochem. Biophis. 21:3, 359-373.

**Brunold**, C. y Schiff, J.A. (1976). Plant Physiol. 57, 430-436.

**Buetow**, D.E. (1961). Nature. 190, 1196.

**Buetow**, D.E. (1968). Morphology and Ultrastructure of *Euglena* en: The Biology of *Euglena* (D.E.Buetow,ed). Vol.I. Academic Press. N.Y. 109-184.

**Buetow**, E.D. (1989). "The Mitochondrion", en Buetow, E.D. (Ed.), The Biology of *Euglena*, Vol IV, Academic Press, N.Y. 247-314.

**Buetow**, E.D. y Buchanan, J.P. (1964). Experimental Cell Research. 36. 204.

**Calvayrac**, R. (1970). Arch. Mikrobiol. 73. 308.

**Calvayrac**, R. (1971). Arch. Mikrobiol. 80. 62.

**Calvayrac**, R., Butow, R.A. y Lefort-Tran, M. (1972) Exp. Cell Res. 71, 422-432.

**Calvayrac**, R., Laval-Martin, D., Hubert,M., Best-Belpomme, M. y Villaume, M. (1985) Comp. Bichem. Physiol. 813, 1009-1017

**Calvayrac**, R., Levy, M., Vazart, J., Briand, J. y Claisse, M. (1978). Biol. Cell. 31, 141.

**Calvayrac**,R., Bertaux,O., Lefort-Tran,M. y Valencia,R. (1974). Protoplasma. 80, 355-370.

**Cannons**, C.A. y Merret, J.M. (1984). Biochem. 142. 597.

**Capaldi**, R.A. (1982). Biochim. Biophys. Acta. 694, 291-306.

**Carre**, I., Bomsel, J.L. y Calvayrac, R. (1988). Plant. Sci. 54, 193-202.

**Chaudhary**, M., Fayyaz, A. y Merret, J.M. (1984). Planta. 162. 518-523.

**Chaudhary**, M., Fayyaz, A., Cannons, C.A. y Merret, J.M. (1984). Plant. Science. Letters. 34. 89.

**Chávez**, E., Zazueta, C. y Bravo, C. (1989). J. Bioenerg. Biomemb. 21, 335-345.

**Collins**, N. y Merret, J.M. (1975). J. Biochem. 148. 321.

**Collins**, N., Brown, H.R. y Merret, J.M. (1975) J. Biochem. 150. 373.

**Cook**, J.R. (1968). The cultivation and growth of Euglena, en: Buetow, E.D. (Ed.), The Biology of *Euglena*, Vol. I, Academic Press, N.Y. 244-314.

**Cook**, J.R. y Carver, M. (1966). Plant. Cell. Phisyol. 7, 377-383.

**Cook**, J.R. y Heinrich, B. (1965). J. Protozool. 12, 581-584.

**Danforth**, W. (1953). Arch. Biochem. Biophys. 46. 164.

**Danforth**, W. F. (1968). Respiration, en: Buetow, E.D. (Ed.), The Biology of *Euglena*, Vol. II. Academic Press, N.Y. 55-71.

**Danforth**, W.F. y Wilson, B.W. (1957). J. Protozool. 4, 52-55

**Datta**, B.D. y Khan, S.J. (1977). J. Protozool. 24(1). 187.

**Davis**, B. y Merret, J.M. (1974). Plant. Physiol. 53. 575.

**De Pierre y Ernest** (1977). Annu. Rev. Biochem. 46, 201-262.

**Delorme**, E., Gómez-Silva, B., Stern, I.A. y Schift, A.J. (1986). Plant. Cell. Physiol. 27(1), 177-182.

**Devars**, S., Torres-Márquez, E., González-Halphen,D., Uribe, A. y Moreno-Sánchez, R. (1992). Plant Sci. 82, 37-46.

**Dockerty**, A. y Merret, J.M. (1979). Plant Physiol. 63. 468.

Douce,R. (1985). "Mitochondria in Higher Plants: Structure, Function and Biogenesis". Academic Press. Orlando Florida.

**Douglas**, A.S. y Donald, M.W. (1988). Química Analítica. McGraw Hill. Interamericana. España.

**Duret**, S., Bonaly, J., Bariaud, A., Vnnereau, A. y Mestre, J.C. (1986). Enviromental Research. 39, 96-103.

**Fiskum**, G. y Lenninger, A.L. (1980). Fed. Proc. 39-7: 2432-2436

**Fork**, C.D. (1972). Methods Enzymol. 24, 113-122.

**Fork**, C.D. (1972). Oxygen Electrode. Methods Enzymol. 24, 113-122.

**Gibbs**, S.P. (1960). J. Ultrastruc. Res. 4, 127.

**Gómez-Silva**, B., Stern, I.A., Saidha, T. y Schift, A.J. (1985). Plant. Physiol. 120, 431-440.

**González-Halphen**, D.(1990). Ciencia. 41, 133-152.

**Gornall**, G.A., Bardawill, J.C. y David, M.M. (1949). J. Biol. Chem. 77, 751-766.

**Graves**, L.B. Jr., y Becker, W.M. (1974) J. Protozol. 19, 527-532.

**Grobovsky**, L.V. Hershenson, S., y Ernst-Fonberg, M.L. (1991) FEBS Lett. 102, 261-264.

**Grover**, D.S. y Laties, G.G. (1981). Plant Phisiol. 68. 393.

**Handsford**, G.R. (1985). Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 102, 1-72.

**Hatefi** (1985). Annu. Rev. Biochem. 54, 1015.

**Henry**, M.F. y Nyns, E.D.J. (1975). 4, 1-65.

**Hutner**, H.S. y Bach, K.M. (1956). J. Protozool. 3. 101.

**Inui**, H., Miyatake, K., Nakano, Y. y Kitaoka, S. (1984). J. Biochem. 96, 931.

**Inui**, H., Miyatake, K., Nakano, Y. y Kitaoka, S. (1990). Arch. Biochem. Biophys. 280(2),292.

**Inui**, H., Miyatake, K., Nakano, Y. y Kitaoka,S.(1982). FEBS. Lett. 150(1). 89.

**Inui**, H., Miyatake, K., Nakano, Y. y Kitaoka,S.(1985). Arch. Biochem. Biophys. 237(2). 423.

**Inui**, H., Ono, K., Miyatake, K., Nakano, Y. y Kitaoka, S. (1987). J. Biol. Chem. 262(19). 9130.

**Isegawa**, Y., Nakano, Y. and Kitaoka, S. (1984). Agric. Biol. Chem. 48(2). 549.

**Jay**,D. (1991). J. Bioenerg. Biomemb. 23(2), 335-343.

**Kaplan**, A.L. Ph.D. y Pesce, J.A. Ph.D. (1991). Clinical Chemistry. The C.V. Mosby Company. St. Louis Missouri. 51-73

**Karp**, G. (1984). Cell Biology. Mc Graw-Hill Book Company. 2a. Edition, New York. 309-348.

**Kempner**, E.S. y Miller, J.H. (1965). Biochemistry. 4, 2735-2739.

**Kempner**, E.S. y Miller, J.H. (1965) Biochim. Biophys. Acta. 104, 11-17.

**Khan**, S.J. (1974). Arch. Biochem. Biophys. 164. 266.

**Khym**, J.X. (1975). Clin. Chem. 21, 1245-1252.

**Kita**, K., Konishi, K. y Anraku, Y. (1986). Methods Enzymol. 126, 94-113.

**Kitaoka**, S., Nakano, Y., Miyatake, K. y Yokota, A. (1989). Enzymes and their functional location, en: Buetow, E.D. (Ed.), The Biology of *Euglena*, Vol, IV, Academic Press. N.Y. 1-136.

**Kline**, E.S., Brandt, R.B., Laux, J.E., Spainhour, S.E., Higgins, E.S., Rogers, K.S., Tinsley, S.B. y Waters, M.G. (1986). Arch. Biochem. Biophys. 246, 673-680.

**Kümmel**, W.U. y Brinkmann, K. (1988). Planta. 176. 261.

**La Noue**, K.F. y Schoolwerth, A.C. (1979). Annu. Rev. Biochem. 48, 871-922.

**Ledoight**, G., Calvayrac, R., Orcival-Lafont, A.M. y Pineau, B. (1972). Planta. 103, 254-262.

**Leedale**, F.G. (1969). Cytobiologie. 1(3). 195.

**Lefort-Tran**, M. (1975) Colloq. Int. C.N.R.S. 240, 297-308.

**Lenhinger**, L.A. (1985). Bioquímica. Omega. Barcelona. 1117.

**Levine**, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, E.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., y Wallace, F.G. (1980). A newly revised Classification of the Protozoa. J. Protozool. 27(1) 37-58.

**Lloyd**, D. (1974). "The Mitochondria of Microorganisms". Academic Press. London.

**Lord**, M.J. y Merret, J.M. (1971). J. Biochem. 124, 275-281.

**Lynch**, V.H. y Calvin, M. (1953). Ann. N.Y. Acad. Sci. 56, 890.

**Malkoff**, B.D. y Buetow, E.D. (1964). Exp. Cell. Res. 35, 58-68.

**Margulis**, L. (1986). "El origen de la célula".Reverté. España. 140.

**Margulis**, L., Corliss, J., Melkonian, M. y Chapman, D. (1990). Handbook of Protoctista. Jones y Bartlett. Pub. Boston. 914.

**Martínez**, M.F. y Chávez, E. (1988) Cadena de Transporte de Electrones y Fosforilación Oxidativa, en:Díaz-Zagoya, C.J. y Hicks, J.J. Bioquímica e Inmunología. Fac. Medicina. UNAM.

**Merret**, M.J. (1987). En "Plant Mitochondria: Structural, Functional and Physiological Aspects". Plenum. New York. 203-206.

**Meyer**, R. y Hildebrand, E.J. (1988). Photochemestry and Photobiology,B: Biology 2. 443-453.

**Mitchell**, P. (1975). FEBS. Lett. 56, 1-6.

**Miyatake**, K., Enamoto, T. y Kitaoka, S. (1984a). Agric. Biol. Chem. 48, 2857.

**Miyatake**, K., Ito, T. y Kitaoka, S. (1984b). Agric. Biol. Chem. 48, 2139.

**Miyatake**, K., Washio, K., Yokota, A., Nakano, Y., y Kitaoka, S. (1986) Agric. Biol. Chem. 50, 2651-2653.

**Miyatake**, K., y Kitaoka, S. (1981) Agric. Biol. Chem. 45, 1727-1729.

**Moller**, I.M. y Lin, W. (1986). Annu. Rev. Plant. Physiol. 37, 309-334.

**Moreno-Sánchez**, R. y Raya, J.C. (1987). Plant Science. 48. 151.

**Moreno-Sánchez**, R., Espinosa-García, M.T. y Raya, J.C. (1988). 297-304.

**Moreno-Sánchez**, R., Hogue, B. y Hansford, G.R. (1990). J. Biochem. 268, 421-428.

**Nakano**, Y., Urade, Y., Urade, R. y Kitaoka, S. (1987). J. Biochem. 102, 1053-1063.

**Nicholls**, D.G. (1982). Bioenergetics. An Introduction to the Chemiosmotic Theory. Academic Press, London. 190.

**Oda**, Y., Miyatake, K., Nakano, Y., y Kitaoka, S. (1981) Agric. Biol. Chem. 45, 2610-2621.

**Oda**, Y., Nakano, Y., y Kitaoka, S. (1982) Arch. Microbiol. 132, 22-25.

**Osafune**, T., Tukada, S., Sumida, S., Ehara, T y Hase, E. (1987). J. Biggins, ed. Vol.4,pp.9. 609-612. Martinus Nijhoff Dordrecht.

**Packer**, L. (1967). Methods Enzymol. 10, 685-689.

**Padovan**, C.A., Dry, B.I.y Wiskich, T.J. (1989). Plant. Physiol. 90, 928-933.

**Peak**, J.M.,Peak, G.J. y Ting, P.I. (1972). Biochimica et Biophysica Acta. 284. 1.

**Price**, C.A. (1962) J. Biochem. 82, 61-66.

**Raison**, J.K. y Smillie, R.M. (1969). Biochim. Biophys. Acta. 180, 500-508.

**Rich**, R.P., Wiegand, K.N., Blum, H., Moore, L.A., y Booner, D.W. (1978). Biochimica et Biophysica Acta. 525. 325.

**Rihter**, G. (1978). "Plant Metabolism". Thieme,Stuttgart.

**Rottenberg**, H. (1984). J. Membrane. Biol. 81, 127-138.

**Rustin**, R., Alin, M.F. y Lance, C. (1986). Biochem. Biophys. Res. Commun. 135, 677-682.

**Rutner**, A.C. Y Price, C.A. (1964). Int. Congr. Biochem., 6th, New York. 32, 331. (Abstr).

**Saidha**, T., Stern, A.I., Lee. D.H. y Schiff, J.A. (1985) J. Biochem. 232, 357-365.

**Salganicoff**, L. y DeRobertis, E. (1965) J. Neurochem. 12, 287-309.

**Schift**, J.A., Lyman, H. y Russell, G.K. (1971). Methods. Enzymol. 23, 101.

**Schonbaum**, G.R., Bonner, W.D., Storey, B.T. y Barh, J.T. (1971). Plant. Physiol. 47, 124-128.

**Seeger**, W.J. y Carell, E.F. (1991). Science. 79, 143-148.

**Sharpless**, K.T. y Butow, A.R. (1970a). J. Biol. Chem. 245(1). 50.

**Sharpless**, K.T. y Butow, A.R.(1970b). J. Biol. Chem. 245(1). 58.

**Shibata**, H., Gardiner, W.E. y Schwartzbach, S.D. (1985). J. Bacteriol. 164, 762.

**Shigeoka**, S. y Nakano, Y. (1991). Arch. Biochem. Biophys. 288, 22-28.

**Shigeoka**, S., Hanaoka, T., Kishi, N. y Nakano, Y. (1992). J. Biochem. 282, 319-323.

**Shigeoka**, S., Onishi, T., Maeda, K., Nakano, Y. y Kitaoka, S. (1986). FEBS. Lett. 195(1,2). 43-47.

**Siedow**, J.N. y Girvin, M.E. (1980). Plant Physiol. 65, 669-674.

**Slack**, C.R., Hatch, M.D. y Goodschild, D.J. (1969). J. Biochem. 114, 489-498.

**Sleigh**, A.M. (1986) Protozoología. Blume, Madrid. 379.

**Smith**, E.L., Austen, B.M., Blumenthal, K.M. y Nyc,J.F. (1975) Academic Press. New York. 2, 293-367

**Sommer**, J.R. y Blum, J.J. (1965). Exp. Cell. Res. 39, 504-527.

**Stryer**, L. (1975) Biochemistry. Freeman and Company, San Fco. 233-241.

**Susuki**, S. y Tamura, T. (1979). Proc. Annu. Meet. Agric. Chem. Soc. Japan. 220.

**Tamponnet**, C., Barbotin, J-N. y Calvayrac, R. (1989). Appl. Microbiol. Biotechnol. 32. 211.

**Ting**, I.R, y Rocha, V. (1971). Arch. Biochem. Biophys. 147, 156-164.

**Tokunaga**, M., Nakano, Y. y Kitaoka, S. (1976). Agric. Biol. Chem. 40(7). 1439.

**Tokunaga**, M., Nakano, Y. y Kitaoka, S. (1976). Biochim. Biophys. Acta. 429. 55.

**Tokunaga**, M., Nakano, Y. y Kitaoka, S. (1979). J. Protozool. 26(3). 471.

**Vickermann**, K. y Cox, F.E.G. (1967). The Protozoa. John Murray Albemarle Street London. 55.

**Von Jagow**, G. y Link, T.A. (1986). Methods Enzymol. 126, 253-271.

**Wacker**, W.E.C. (1962). Biochemistry. 1, 859-865.

**Watanabe**, F., Nakano, Y. y Kitaoka, S. (1985). Agric. Biol. Chem. 49(7) 2203-2204.

**Watanabe**, K., Nakano, Y. y Kitaoka, S. (1987). Arch. Microbiol. 149, 30-35.

**Whittaker**, A.P. y Danks, M.S. (1982). Mitocondria: estructura, función y formación. CECSA. México D.F. 87-89.

**Whittaker**, H.R. y Margulis, L.(1978). "Protist Classification and the Kingdoms of Organisms". BioSistems. 10. 3.

**Willard**, H.H., Merrit,JR. L.L. y Dean, A.J. (1975). Métodos Instrumentales de Análisis. Comp. Ed. Cont. 463-494, 829-866

**Williamson**, J.R. y Corkey, B.E. (1969). Methods Enzymol. 13, 434-513.

**Wilson**, B.W. y Danforth, W.F. (1958). J. Gen. Microbiol. 18, 535-542.

**Wolper**, J.S. y Ernest-Fonberg, M.L. (1975a). Biochemistry. 14, 1095-1103.

**Yamauti**, J., Yoshimura, S., Takagahara, I., Fujii, K., Tai, A., Yamashita, J. y Horio, T. (1981). J. Biochem. 90, 941-955.

**Yokota**, A., Haga,S., y Kitaoka,S. (1985) J. Biochem. 227, 211-216.

**Yokota**, A., Hosotani, K. y Kitaoka, S. (1982). Arch. Biochem. Biophys. 213(2). 530.

**Zubay**,G. (1988) "Biochemistry" 2nd edition. MacMillan New York.

*Plant Science*, 82 (1992) 37–46
Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd.



# Cyanide-sensitive and cyanide-resistant respiration of dark-grown *Euglena gracilis*

Silvia Devars, M. Eugenia Torres-Márquez, Diego González-Halphen[a], Aída Uribe, and Rafael Moreno-Sánchez

*Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano No. 1, México D.F. 14080 and [a]Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (México)*

(Received August 26th, 1991; revision received November 19th, 1991; accepted November 21st, 1991)

The rate of endogenous respiration of *Euglena gracilis* Klebs grown in the dark in the presence of different carbon sources, both in late logarithmic and early stationary phases, was studied. Different sensitivity of endogenous respiration to cyanide was observed for each growth condition. However no significant difference in the ratio of cytochrome *o* to $aa_3$ was found. Inhibition constants for cyanide of endogenous and tetramethylphenylenediamine-stimulated respiration were also of a similar magnitude. The rate of respiration of isolated mitochondria was inhibited by cyanide to a different extent depending on the oxidizable substrate used. It is suggested that the sensitivity of endogenous respiration to cyanide in *Euglena gracilis* cells is related to the cytoplasmic availability of substrate generated by the particular growth conditions.

*Key words: Euglena gracilis;* cyanide resistant respiration; cytochrome *o*

## Introduction

*Euglena gracilis* possesses both autotrophic and heterotrophic characteristics which place this protist near the earliest phylogenetic branching of a wide variety of eukaryotes including plants, animals, fungi, ciliates and amoebas [1]. Several studies have focussed on the development of chloroplasts [2–5] whereas others have dealt with mitochondrial metabolism [6,7]. Euglena cells grown in the dark lack chlorophyll and the development of proplastids into chloroplasts does not take place. However, these cells retain functional mitochondria [3–5] allowing the study of mitochondrial metabolism in situ. In fact, *Euglena* has been regarded as an hepatic cell model [8]. The use of unicellular organisms in studies of intermediary metabolism avoids the damage that could result when tissue-forming cells are separated. Moreover, axenic *Euglena* cultures are inexpensive and high yields of biological material can be obtained.

Mitochondria isolated from *Euglena gracilis* exhibit oxidative phosphorylation [10–18] with several substrates. However phosphorylation as well as respiration are partially insensitive to cyanide, rotenone and antimycin, depending on the substrate used [7,10,11,19,20]. Thus, it has been suggested that *Euglena* mitochondria possess an alternate respiratory chain [11]. The alternate pathway seems to oxidize NADH, succinate and lactate [7], is stimulated by AMP and is blocked by diphenylamine [20]. A *b*-type cytochrome, probably *o*, is involved [11]; this pathway also appears to generate an uncoupler-sensitive membrane potential [18].

Endogenous respiration of *Euglena* cells can be modified by the prevailing culture conditions such as pH, temperature, oxygen concentration, carbon source, and culture age [9,21–25].

*Correspondence to:* Rafael Moreno-Sánchez, Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano No. 1, México D.F. 14080, Mexico.

0168-9452/92/$05.00 © 1992 Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd.
Printed and Published in Ireland

The question arises as to whether the alternate respiratory chain plays a role in the cellular energy balance of *Euglena gracilis* grown in the dark, since it has been reported that cyanide-resistant respiration can be differentially induced by varying the carbon source in the culture medium [20].

In the present study the cyanide resistant respiration of *Euglena gracilis* cells grown in the dark with different carbon sources was determined in late logarithmic and early stationary growing phases. The different cyanide sensitivities of the endogenous cell respiration were compared with respect to different affinities for the inhibitor and cytochrome *o* and $aa_3$ content.

## Materials and Methods

### *Cell cultures*

Samples of wild type *Euglena gracilis* (a strain similar to Z, see Ref. 18) cultured in darkness for 4 years were reactivated by 3–6 transfer cycles in the corresponding medium. The cells were grown axenically in the dark, with gentle orbital agitation at 61 rev./min, at room temperature (20–25°C) in: (1) peptone plus acetate (p + a) medium of initial pH 6.8 containing 0.1% (w/v) of each of the following components: bacteriological peptone, meat peptone, and sodium acetate; (2) the acidic organotrophic medium described by Hutner et al. [26] as modified by Schiff et al. [27] of initial pH 3.5, which contained glutamate plus malate (g + m) as carbon source; and (3) the lactate (lac) medium in which glutamate + malate of the (g + m) medium [26,27] were replaced by 36 mM DL-lactic acid. In these media cells were harvested after the culture reached the late logarithmic (3 days) or early stationary (5 days) phase of growth. A resting medium [2] containing 1% mannitol of initial pH 6.8 in which there was no cell division was also used: an aliquot of 100 ml of cells growing on (g + m) medium for 3 days was mixed aseptically with 500 ml of resting medium, and the cells were kept for 4 more days before harvesting.

Cultures were started with an inoculum of cells (5–10%, v/v) in the exponential phase of growth containing $0.2 \times 10^6$ cells/ml for (g + m) and (lac) media and $0.07 \times 10^6$ cells/ml for (p + a) medium. At the early stationary phase the densities reached were: $5 \pm 0.27 \times 10^6$ (7) cells/ml for (g + m) medium, $3.07 \pm 0.19 \times 10^6$ (9) cells/ml for (lac) medium and $1.3 \pm 0.14 \times 10^6$ (3) cells/ml for (p + a) medium. Values are means ± standard errors and the number of experiments is given in parentheses. Similar cell densities were obtained in cultures of 100 ml (used for whole cells experiments) or 1 l (used to isolate mitochondria). Cells transferred from (g + m) medium to resting medium reached a density of approximately $1 \times 10^6$ cells/ml after 2 days and remained constant thereafter. Cells were harvested, washed by centrifugation at $1000 \times g$ for 10 min in potassium phosphate at pH 7.0 [28] and kept in the dark, when used for oxygen consumption measurements, or in a medium containing 250 mM sucrose, 10 mM *N*-(2-hydroxyethyl) piperazine-*N*-(2-ethane) sulfonic acid (HEPES) and 2 mM ethyleneglycol-bis-(β-aminoethylether)-*N'*,*N'*,*N'*,*N'*-tetraacetic acid (EGTA), pH 7.4 (SHE medium), when cells were used to isolate mitochondria. All these manipulations were done in dim green light (a fluorescent white light wrapped with green transparent paper) at room temperature.

Cells were counted in a Neubauer chamber after dilution and immobilization in the presence of 0.5% HCl (final concentration). Cell viability, as determined by 0.01% methylene blue exclusion [29], was always 92–98% after harvesting and decreased to 90–92% after 4 h.

### *Determination of chlorophyll*

The method of Arnon [30] was adapted to intact cells. Approximately 0.3 ml of cell suspension was mixed with 5.6 ml of 80% aqueous acetone. The mixture was vigorously stirred for 2 min and centrifuged at 2000 rev./min for 5 min. The absorbance of the supernatant fluid was directly measured at 645, 652, and 662 nm, and calculations were made using the extinction coefficients reported by Arnon [30]. The content of chlorophyll was $< 1$ μg and 120–160 μg for $10^7$ dark and light-grown cells, respectively. Electron microscopy of dark-grown cells confirmed the absence of well defined chloroplasts, although proplastids were observed (not shown).

*Oxygen consumption measurements*

Oxygen uptake of Euglena (5–7 × $10^6$ cells) was measured with a Clark-type electrode (YSI model 53) at 30°C in 3 ml of a medium containing 120 mM KCl, 20 mM 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS), 2 mM $MgCl_2$, 2 mM K-phosphate and 2 mM EGTA, pH 7.2. Solubility of oxygen was taken to be 400 ng atom $O_2$/ml at 30°C and at an altitude of 2240 m. Cells were kept in the dark until use, but the measurement of $O_2$ uptake was done under exposure to ambient light.

Cells grown under illumination (0.0025 W/cm$^2$) on Cramer-Myers medium [31] and harvested at the exponential phase (3–4 days) showed an oxygen uptake of 100–200 ng atoms oxygen/min per $10^7$ cells when respiration was measured in the dark. Exposure of these cells to light (0.0056 W/cm$^2$ induced an active oxygen production of 300 ng atoms oxygen formed/min per $10^7$ cells. In contrast, cells grown in the dark were unable to produce oxygen and the rate of oxygen uptake was not significantly modified by illumination (not shown). Thus, the presence of proplastids in dark-grown *Euglena* cells [3,32] apparently did not affect the measurement of the rate of respiration.

*Preparation of mitochondria*

Mitochondria were prepared as previously described [18] except that SHE medium was used containing 0.5% (w/v) albumin and sonication was carried out at 10–12 μW (40% of maximal power).

*Cytochrome oxidase activity*

Oxygen uptake of mitochondrial preparations (0.5–1.5 mg protein) was measured in 2 ml of a medium containing 250 mM sucrose, 20 mM MOPS, 2 mM EGTA, 7 mM ascorbate, 4.8 μM horse cytochrome *c*, 5 μM antimycin A, 1 μM carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) and 0.7 mM TMPD, pH 7.4. The rate of oxygen uptake under these conditions was considered to be a measure of cytochrome c oxidase activity after subtraction of the oxygen uptake resistant to 10 mM sodium azide [33].

*Difference spectra in the presence of carbon monoxide*

Carbon monoxide difference spectra of dithionite reduced mitochondria were obtained in SHE medium diluted 1:1 (v/v) with glycerol, using identical samples thermostated at 25°C. The experimental sample was bubbled with carbon monoxide under dim light for 30 s to reveal the cytochrome $aa_3$ signal, or for 16 min to fully reveal the signal of cytochrome *o*; difference spectra were measured between the untreated and CO-treated samples. The overlapping of the cytochrome $aa_3$ signal and that of cytochrome *o* was eliminated by bubbling carbon monoxide in the reference cuvette for 30 s. The contents of cytochromes *o* and $aa_3$ were estimated using the millimolar extinction coefficients reported for bacteria [34]: ε (428.5–445 nm) = 148/mM per cm for cytochromes ($a + a_3$) and ε (418–430 nm) = 160/mM per cm for cytochrome *o*.

*Protein determination*

Mitochondrial protein was measured by the biuret method [35]. Turbidity, presumably due to remaining paramylum found in some preparations, was eliminated by centrifugation of the colored solutions at 1500 rev./min for 5 min at 4°C before determining absorbance.

## Results and Discussion

The rate of endogenous respiration of dark-grown *Euglena* cells was stimulated by the artificial electron donor tetramethylphenylenediamine (TMPD) (Fig 1). The TMPD-stimulated respiration was blocked by cyanide, but only partially affected by the alternate respiratory chain inhibitor DPA (diphenylamine) [20,36]. This pattern of inhibition by cyanide and DPA was similar for cells grown in glutamate + malate (g + m) or peptone + acetate (p + a) media (Fig. 1). Respiration was also stimulated by the uncoupler CCCP (5–20 μM), but a stable steady state rate was not attained. Interestingly, the rate of endogenous respiration showed a different sensitivity to cyanide depending on the growth medium. Figure 1 shows that endogenous respiration is not affected in (g + m) cells whereas in (p + a) cells it is inhibited 60% by 0.1 mM cyanide.

The rates of endogenous and TMPD-stimulated

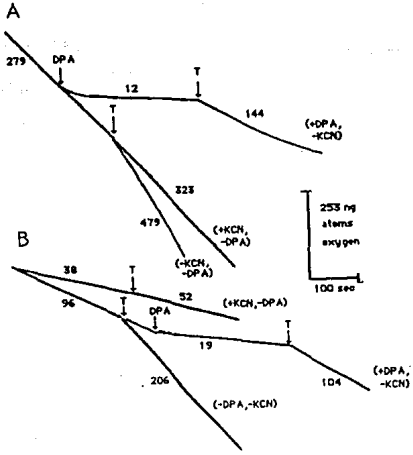



**Fig. 1.** Endogenous respiration of dark-grown *Euglena* cells. *Euglena gracilis* was grown in the dark in glutamate + malate (A) or peptone + acetate (B) media for 5 days as described under Methods. An aliquot of cells ($3 \times 10^6$ for g + m cells and $6 \times 10^6$ for p + a cells) was incubated in 3 ml of the medium detailed under Methods for measuring oxygen uptake. Where indicated 1 mM DPA or 0.2 mM TMPD (T) were added; KCN (0.1 mM) was added in the incubation medium before the reaction started by the addition of cells where indicated.

**Table I.** Respiration of *Euglena* cells grown in the dark with different media (ng atoms oxygen/min per $10^7$ cells). *Euglena* cells were grown in the indicated medium; endogenous and TMPD stimulated oxygen uptake were measured as described under Methods. The values obtained from cells maintained in resting (mannitol) medium for 4 days were placed between logarithmic (L) and stationary (S) phases because the cell number did not change under these conditions. The data shown represent mean ± standard error with the number of cell preparations in parentheses.

| Culture medium | – TMPD | | + TMPD (0.2 mM) | |
|---|---|---|---|---|
| | L | S | L | S |
| (g + m) | 207 ± 10 (4)[a] | 260 ± 17 (7)[a,b] | 362 ± 76 (4) | 480 ± 42 (6)[c,f,g] |
| Lactate | 181 ± 30 (5) | 149 ± 29 (8) | 330 ± 46 (5) | 299 ± 30 (8)[d,f] |
| (p + a) | 168 ± 36 (5) | 138 ± 27 (4) | 234 ± 24 (4) | 300 ± 75 (4)[e,g] |
| Mannitol | 141 ± 16 (6)[b] | | 245 ± 18 (3)[c,d,e] | |

Comparison of values with the same letter were significantly different; other comparisons were not analyzed. [a]$P < 0.005$; [b]$P < 0.005$; [c,f,g]$P < 0.005$; [d,e]$P < 0.05$ (student $t$ test for unpaired samples).

respiration of *Euglena* cells grown or maintained in 4 different media are shown in Table I. No significant difference in the rate of endogenous respiration was found between the logarithmic and the stationary phases for (p + a) or lactate cells; in (g + m) cells a slight increase was found for the stationary phase. Cells from mannitol medium showed an endogenous respiration similar to that attained by lactate or (p + a) cells in the stationary phase, but lower than that observed in (g + m) cells (Table I). A diminished respiratory activity was observed in the stationary phase for cells grown in ethanol or lactate media [8], when respiration was measured in the culture flask. Presumably, in this latter case the inhibition in respiratory activity was due to some factors present in the culture medium when the stationary phase was reached.

The addition of TMPD induced an increase in the rate of endogenous respiration in all types of cells (Table I). As the redox potential of TMPD is relatively high (+260 mV), it is expected that cytochrome *c* is primarily reduced by TMPD. Hence the stimulation of endogenous respiration by TMPD may reflect cytochrome *c* oxidase activity; the high sensitivity of TMPD-stimulated respiration to cyanide supports this notion (Fig. 1). However, other variables such as substrate availability may also affect the final absolute value of TMPD-stimulated respiration. Cytochrome *o* might be also reduced by TMPD as reported for bacterial cytochrome *o* with a redox potential of +125 mV [37].

A different sensitivity of endogenous respiration to cyanide was found in cells from different growth media. The data are summarized in Table II. A highly cyanide-resistant endogenous respiration in cells from lactate, (g + m), and mannitol media was obtained; respiration of (g + m) cells was the most resistant to cyanide. In contrast, endogenous respiration from (p + a) cells was more sensitive to cyanide (50% inhibition). This could indicate that endogenous respiration in (p + a) cells is supported both by the cytochrome *c* oxidase pathway and a cyanide-resistant pathway, whereas in cells from the other media respiration is mainly supported by the cyanide-resistant pathway. Interestingly, titration of endogenous and TMPD-stimulated respiration in (p + a) cells with cyanide revealed two components with different sensitivity to cyanide (Fig. 2).

TMPD-stimulated respiration was very sensitive to 0.1 mM cyanide (Table II). This is in agreement with a preferential stimulation of cytochrome *c* oxidase by TMPD, since this enzyme is expected to be completely inhibited ($K_i$ = 4–14 μM, Fig. 2) at

**Table II.** Inhibition of $O_2$ consumption in *Euglena* (values given in %)[a]

| Culture medium | – TMPD | | + TMPD (0.2 mM) | |
|---|---|---|---|---|
| | KCN 0.1 mM | DPA 1 mM | KCN 0.1 mM | DPA 1 mM |
| *g + m* | | | | |
| L[b] | 6 ± 3 (5) | 94 ± 2 (3) | 80 ± 1 (3) | 62 ± 9 (4) |
| S | 3 ± 2 (5) | 89 ± 4 (3) | 84 ± 6 (4) | 42 ± 7 (5) |
| *Lactate* | | | | |
| L | 17 ± 10 (5) | 87 ± 3 (4) | 83 ± 5 (5) | 46 ± 12 (4) |
| S | 17 ± 6 (6) | 82 ± 4 (6) | 88 ± 5 (5) | 48 ± 5 (6) |
| *p + a* | | | | |
| L | 45 ± 5 (5) | 92 ± 4 (3) | 68 ± 12 (3) | 51 ± 11 (3) |
| S | 52 ± 4 (4) | 84 ± 4 (4) | 87 ± 4 (4) | 45 ± 13 (4) |
| Mannitol | 11 ± 4 (3) | 92 ± 4 (3) | 76 ± 4 (3) | 35 ± 7 (3) |

Assays were performed as indicated in Fig. 1.

[a]Mean ± standard error is shown for the number of preparations in parentheses.

[b]L = logarithmic phase; S = stationary phase.

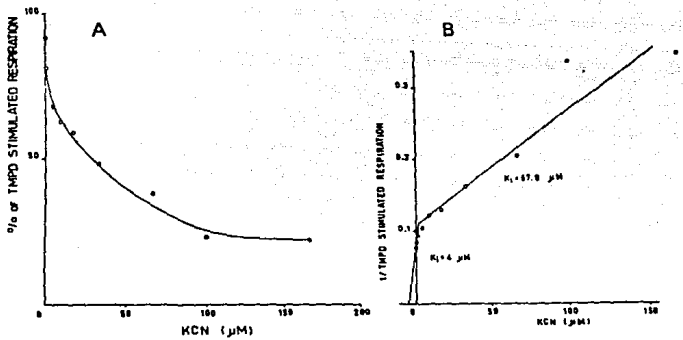



**Fig. 2.** Inhibition of TMPD-stimulated respiration by cyanide. Respiration of (p + a) cells ($6 \times 10^6$/3 ml) collected in the stationary phase was stimulated by 0.2 mM TMPD in the presence of the indicated cyanide concentrations as described in Fig. 1. Net rates of TMPD-stimulated respiration were calculated after subtraction of respiration in the absence of TMPD and of TMPD autooxidation ($O_2$ consumption in the absence of cells). The inhibition constants ($K_i$) shown were calculated from the intercepts of the abscissa axis for each straight portion of the line.

the concentration of cyanide used. The remaining TMPD-stimulated respiration insensitive to cyanide (approximately 20%) might be the result of some TMPD-dependent reduction of the alternate pathway or simply the stimulation of the alternate pathway when the main pathway is blocked by cyanide.

A different pattern of inhibition was obtained with DPA (Table II). Endogenous respiration was severely inhibited in all types of cells whereas TMPD-stimulated respiration was 50% inhibited. Thus, 1 mM DPA appeared to inhibit cytochrome *c* oxidase, as well as the alternate pathway.

Dixon plots obtained for cyanide inhibition were clearly biphasic, suggesting the presence of two components with distinct sensitivities to cyanide in both endogenous (not shown) and TMPD-stimulated respiration of (p + a) (Fig. 2) and (g + m) cells (not shown). The calculated inhibition constants are presented in Table III. This pattern of inhibition suggests an ability of TMPD to reduce an alternate oxidase in addition to cytochrome oxidase either directly or through cytochrome *c*. The calculated values of $K_i$ for cyanide were similar for (g + m) and (p + a) cells

**Table III.** Inhibition constants $K_i$ for the effect of cyanide on cellular respiration of *Euglena* (μM). Assays were performed as indicated in Materials and Methods and in Fig. 2. The $K_i$ values were calculated as indicated in Fig. 2 for low (1) and high (2) cyanide concentrations. The values are the means of two different cell preparations.

| Culture medium | – TMPD | | + TMPD (0.2 mM) | |
|---|---|---|---|---|
| | (1) | (2) | (1) | (2) |
| (g + m) | 34 | 300 | 10 | 46 |
| (p + a) | 42 | 502 | 9 | 82 |

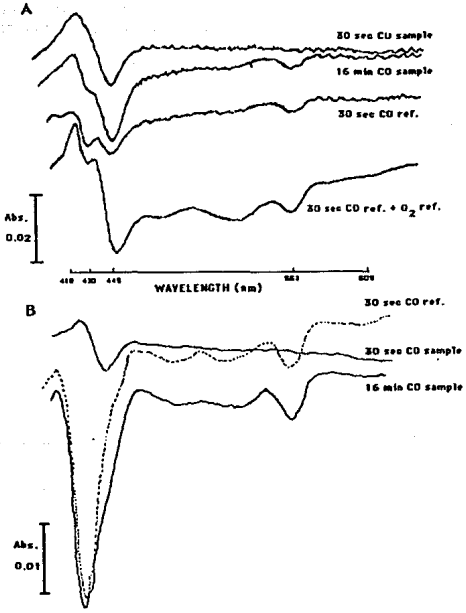



Fig. 3. Carbon monoxide difference spectra of reduced *Euglena* mitochondria. Mitochondria isolated from (g + m) cells at stationary (A) or logarithmic (B) growth phase were suspended at 3 mg (B) or 4 mg protein (A) per ml in SHE medium diluted 1:1 with glycerol and were reduced by addition of solid sodium dithionite. CO was bubbled for 30 s or 16 min in the sample cuvette or 30 s in the reference (ref) cuvette followed by $O_2$ as indicated.

(see Table III); thus, the different cyanide sensitivities of endogenous respiration (Table II) cannot be explained in terms of distinct affinities for cyanide, nor by differential accessibility to the inhibitor. Other possible interpretations for a biphasic Dixon plot are: the presence of a heterogenous population of the enzyme; product(s) accumulation; or a tightly bound inhibitor [38]. None

of these interpretations would appear suitable for cytochrome *c* oxidase, as a similar $K_i$ value for cyanide has been reported for particulate or isolated enzyme from several sources [39], product inhibition is negligible and endogenous inhibitors have not been found. However, studies of the kinetics of the isolated enzyme from *Euglena* should further clarify this point.

Dixon plots obtained for DPA inhibition of endogenous respiration showed only one component with a $K_i$ of 0.15 mM and 0.2 mM for (g + m) and (p + a) grown cells, respectively (data not shown).

An alternative explanation for the different sensitivities of endogenous respiration to cyanide could be based on different contents of cytochromes $aa_3$ and *o*. Therefore, mitochondrial fractions were isolated from cells grown in (g + m) and (p + a) media and cytochromes $aa_3$ and *o* were spectrophotometrically quantitated. Difference spectra of dithionite-reduced mitochondria upon reaction with carbon monoxide for short times (30 sec) showed a signal characteristic of cytochromes $aa_3$: a peak at 418 nm, and a trough at 445 nm (Fig. 3); for unknown reasons the trough at 603 nm was only rarely detected. At longer times of reaction with carbon monoxide a shoulder at 430 nm was revealed and a trough at 561 nm appeared. This was strongly indicative of a slow carbon monoxide reacting *b* type cytochrome, i.e. cytochrome *o*, presumably the postulated alternate oxidase associated to the cyanide-resistant respiration [11,20].

The quantitation of cytochrome $aa_3$ was estimated from the signal obtained after a 30 s reaction with carbon monoxide. This signal was sometimes lost or masked at longer reaction times, especially when the signal of cytochrome *o* was high (Fig. 3B). The content of cytochrome *o* was estimated from the spectrum obtained at long times (16 min) of reaction with CO. This last spectrum contained the signals of the two cytochromes; thus to obtain the signal corresponding solely to cytochrome *o*, carbon monoxide was blown into the reference cuvette for 30 s. The content of cytochrome *o* estimated from this corrected signal was similar to that estimated from the 16 min CO signal (Fig. 3B). The further oxygenation of the CO-treated reference cuvette restored the $aa_3$ cytochrome signal (Fig. 3A).

A lower cytochrome *o*/cytochrome $aa_3$ ratio could explain a greater sensitivity to cyanide. The spectrophotometric determination of the contents of these two cytochromes (Fig. 3) showed that in mitochondria from (p + a) cells the contents of cytochromes *o* and $aa_3$ were only 60% of those determined in mitochondria from (g + m) cells (Table IV). Moreover, the polarographic determination of the cytochrome *c* oxidase activity (cytochrome $aa_3$) in mitochondria from (p + a) cells was also 65% of that obtained in mitochondria from (g + m) cells: 235 ± 23 (3) and 361 + 34 (4) ng atoms $O_2$/min per mg, respectively. Thus, a correlation between total oxidase content and rates of endogenous and TMPD-stimulated respiration (Table I) could be established. However the similar cytochrome *o*/cytochrome $aa_3$ ratio found in both types of cells (Table IV) indicated that the cyanide sensitivity of endogenous respiration was not related to the predominance of one respiratory pathway.

Cytochrome *c* oxidase activity of *Euglena* mitochondria has been reported to be negligible when measured with horse cytochrome *c* and variable with exogenous *Euglena* cytochrome *c* depending on the culture medium used [15]. We have confirmed that addition of horse or yeast cytochrome *c* (up to 10 μM) did not stimulate the activity of cytochrome *c* oxidase in Euglena mitochondria. Thus, the values of cytochrome *c* oxidase activity for mitochondria from (g + m) and (p + a) cells might change in the presence of exogenous *Euglena* cytochrome *c*.

**Table IV.** Relative content of cytochromes *o* and $aa_3$ in isolated mitochondria (pmol/mg protein). Assays were performed as indicated in Methods and in the legend of Fig. 3. Mitochondria were isolated from logarithmic phase cells. The values are means ± standard errors of 3 cell preparations.

| Culture | *o* | $aa_3$ | *o*/$aa_3$ |
|---|---|---|---|
| (g + m) | 65 ± 14 | 30 ± 7 | 2.5 ± 0.8 |
| (p + a) | 38 ± 11 | 17 ± 4 | 2.4 ± 0.5 |

The different cyanide sensitivity of endogenous respiration could be alternatively explained by the oxidation of different substrates in the various types of cells. There are several reports [10–14, 16–18,40,41] indicating different respiratory inhibitor sensitivities and P/O ratios (phosphate esterified into ATP per oxygen consumed) in isolated mitochondria from *Euglena* depending on the substrate oxidized. This has been interpreted as a distinct pathway of electron transport with preference for oxidation of some substrates [7,10,11,18,20]. Therefore the rate of respiration of mitochondria isolated from logarithmic (g + m) cells was measured with different substrates. It was found that oxygen consumption was inhibited 100 ± 0 (4), 90 ± 0 (3), 66 ± 3 (4) and 62 ± 5% (4) by 0.1 mM cyanide with succinate, glutamate + malate, lactate or NADH as oxidizable substrate, respectively. This suggests that lactate and NADH are oxidized both by the cyanide-sensitive and cyanide-resistant pathway whereas succinate and glutamate + malate would be oxidized by the cyanide-sensitive pathway.

In conclusion, a systematic characterization of oxygen consumption in *Euglena gracilis* cells grown with several carbon sources was undertaken in this study. A different sensitivity to cyanide was found in cells grown in different media. This difference was not related to the content of the main and alternate oxidase, nor to a distinct affinity for the inhibitor. Based on the present and previous studies it is proposed that the different cyanide sensitivities may be due to the cytoplasmic substrates made available to the mitochondria in each medium used for cell growth.

The spectroscopic determination of cytochrome *o* performed in this work revealed that *Euglena* can provide another biological source for isolation of an alternate oxidase. In some yeast an alternate oxidase is expressed only when exposed to antimycin and cyanide [42,43], an alternate oxidase was also induced in *Euglena* cells grown in the presence of antimycin [11]. However, as shown in this work, the alternate oxidase of *Euglena* mitochondria is naturally occurring and the amount of cytochrome *o* can be manipulated by changing the growth medium.

## References


1 R.R. Whittaker and L. Margulis, Protist classification and the kingdoms of organisms. BioSystems, 10 (1978) 3–18.

2 A.W. Holowinsky and J.A. Schiff, Events surrounding the early development of *Euglena* chloroplasts. Induction by preillumination. Plant Physiol., 45 (1970) 339–347.

3 T. Osafune, S.Klein and J.A. Schiff, Events surrounding the early development of *Euglena* chloroplasts. J. Ultrastruct. Res., 73 (1980) 77–90.

4 M. Edelman and Z. Kahana, Chloroplast protein synthesis, in: D.E. Buetow (Ed.), The Biology of *Euglena*, Vol. IV. Academic Press, New York, 1989, pp. 335–350.

5 R.B. Hallick and D.E. Buetow, Chloroplast DNA, in: D.E. Buetow (Ed.), The Biology of Euglena, Vol IV, Academic Press, New York, 1989, pp. 351–414.

6 S.Kitaoka, Y. Nakano, K. Miyatake and A. Yokota, Enzymes and their functional location, in: D.E. Buetow (Ed.), The Biology of Euglena, Vol. IV, Academic Press, New York, 1989, pp. 1–136.

7 D.E. Buetow, The mitochondrion, in: D.E. Buetow (Ed.), The Biology of *Euglena*, Vol. IV, Academic Press, New York, 1989, pp. 247–314.

8 F. Thuillier-Bruston, J. Briand and D. Laval-Martin, Effects of a first exposure to ethanol on the composition of neutral and polar lipids in *Euglena gracilis*, taken as a hepatic model. Biochem. Med. Metabol. Biol., 44 (1990) 159–174.

9 J.R. Cook, The cultivation and growth of *Euglena*, in: D.E. Buetow (Ed.), The Biology of Euglena, Vol. I, Academic Press, New York, 1968, pp. 244–314.

10 D.E. Buetow and P.J. Buchanan, Oxidative phosphorylation in mitochondria isolated from *Euglena gracilis*. Biochim. Biophys. Acta, 96 (1964) 9–17.

11 T.K. Sharpless and R.A.Butow, Phosphorylation sites, cytochrome complement and alternate pathways of coupled electron transport in *Euglena gracilis* mitochondria. J. Biol. Chem., 245 (1970) 50–57.

12 J. Kahn, Physiological adaptation of *Euglena gracilis* to uncouplers and inhibitors of oxidative phosphorylation. Arch. Biochem. Biophys., 164 (1974) 266–274.

13 N. Collins, R.H. Brown and M.J. Merrett, Oxidative phosphorylation during glycollate metabolism in mitochondria from phototrophic *Euglena gracilis*. Biochem. J., 150 (1975) 373–377.

14 M. Tokunaga, Y. Nakano and S. Kitaoka, Preparation of physiologically intact mitochondria from *Euglena gracilis*. Agric. Biol. Chem., 40 (1976) 1439–1440.

15 R. Calvayrac, M. Levy, J. Vazart, J. Briand and M. Claisse, Activite cytochrome oxydases des mitochondries d'Euglena gracilis Z: Comparison de l'oxydation du ferrocytochrome C-558 de ferrocytochromes C de mamiferes. Biol. Cell., 31 (1978) 141–148.

16 M. Chaudhary, A. Fayyaz and M.J. Merrett, Glycollate-pathway enzymes in mitochondria from phototrophic,

organotrophic and mixotrophic cells of *Euglena gracilis*. Planta, 162 (1984) 518–523.
17 B. Gomez-Silva, A.I. Stern, T. Saidha and J.A. Schiff, Oxidative phosphorylation coupled to respiration in highly purified intact *Euglena* mitochondria. J. Plant. Physiol., 120 (1985) 431–440.
18 R. Moreno-Sánchez and J.C. Raya, Preparation of coupled mitochondria from *Euglena* by sonication. Plant Sci., 48 (1987) 151–157.
19 J.K. Raison and R.M. Smillie, Respiratory cytochromes of *Euglena gracilis*. Biochim. Biophys. Acta, 180 (1969) 500–508.
20 T.K. Sharpless and R.A. Butow, An inducible alternate terminal oxidase in *Euglena gracilis* mitochondria. J. Biol. Chem., 245 (1970) 58–70.
21 B.W. Wilson and W.F. Danforth, The extent of acetate and ethanol oxidation by *Euglena gracilis*. J. Gen. Microbiol., 18 (1958) 535–542.
22 B.W. Wilson, D.E. Buetow, T.L. Jahn and B.H. Levedahl, A differential effect on cell growth and respiration. Exp. Cell Res., 18 (1959) 454–465.
23 D.E. Buetow, Ethanol stimulation of oxidative metabolism in *Euglena gracilis*. Nature, 190 (1961) 1196.
24 J.R. Cook and B. Heinrich, Glucose vs. acetate metabolism in *Euglena*. J. Protozool., 12 (1965) 581–584.
25 W.F. Danforth, Respiration, in: D.E.Buetow (Ed.), The Biology of *Euglena*. Vol. II. Academic Press, New York, 1968, pp. 55–71.
26 S.H. Hutner, M.K. Bach and G.I.M. Ross, A sugar containing basal medium for vitamin B-12 assay with *Euglena*: application to body fluids. J. Protozool., 3 (1956) 101–105.
27 J.A. Schiff, H. Lyman and G.K. Russell, Isolation of mutants from *Euglena gracilis*. Methods Enzymol., 23 (1971) 143–162.
28 B. Davis and M.J. Merrett, The effect of light on the synthesis of mitochondrial enzymes in division synchronized *Euglena* cultures. Plant Physiol., 53 (1974) 575–580.
29 I. Carre, J.L. Bomsel and R. Calvayrac, Decay of cytochromes and appearance of a cyanide-insensitive electron transfer pathway in *Euglena gracilis* grown in anoxia. Plant Sci., 54 (1988) 193–202.
30 D.I. Arnon, Copper enzymes in isolated chloroplasts. Plant Physiol., 24 (1949) 1–15.
31 M. Cramer and S. Myers, Growth and photosynthetic characteristics of *Euglena gracilis*. Arch. Mikrobiol., 17 (1952) 384–402.
32 Y. Ben-Shaul, J.A. Schiff and H.T. Epstein, Studies of chloroplast development in Euglena. VII:fine structure of the developing plastid. Plant Physiol., 39 (1964) 231–240.
33 R. Moreno-Sánchez, B.A. Hogue, C. Bravo, A.H. Newman, A.S. Basile and P.K. Chiang, Inhibition of substrate oxidation in mitochondria by the peripheral-type benzodiazepine receptor ligand AIIN 086. Int. J. Biochem., 41 (1991) 1479–1484.
34 L. Smith, Bacterial cytochromes and their spectral characterization. Methods Enzymol., 53 (1979) 202–212.
35 A.G. Gornall, C.J. Bardawill and M.M. David, Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem., 177 (1949) 751–766.
36 E.J. Baker, Diphenylamine inhibition of electron transport in plant mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 103 (1963) 148–155.
37 K. Kita, K. Konishi and Y. Anraku, Purification and properties of two terminal oxidase complexes of *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. Methods Enzymol., 126 (1986) 94–113.
38 I.H. Segel, Enzyme Kinetics, Wiley, New York. 1975.
39 D.F. Wilson and M. Erecinska, Ligands of cytochrome c oxidase. Methods Enzymol., 53 (1978) 191–201.
40 D.B. Datta and J.S. Kahn, Some biochemical properties of mitochondria isolated from *Euglena gracilis*. J. Protozool., 24 (1977) 187–192.
41 A. Yokota, Y. Nakano and S. Kitaoka, Some biochemical properties of mitochondria isolated from *Euglena gracilis*. Agric. Biol. Chem., 42 (1978) 121–125.
42 D.L. Edwards, E. Rosenberg and P.A. Maroney, Induction of cyanide-insensitive respiration in *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem., 249 (1974) 3551–3556.
43 N. Minagawa and A. Yoshimoto, The induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. J. Biochem., 101 (1987) 1141–1146.

**PLANT SCIENCE** *International Journal of Experimental Plant Biology*

Chief Editors J.A. Schiff (Waltham, MA) and J.H. Weil (Strasbourg)

**Professor Jerome A. Schiff**
**Chief Editor**
**Plant Science**
**Institute for Photobiology**
**Brandeis University**
**Waltham, MA 02254-9110 U.S.A.**

May 7, 1992
JAS-1785

Dr. Rafael Moreno-Sanchez
Pathology Department, MS 435
Hahnemann University
Broad and Vine Street
Philadelphia, Pennsylvania 19102

Dear Dr. Moreno-Sanchez:

Your paper, "Energy-dependent reactions supported by several substrates in coupled Euglena gracilis mitochondria," by Aida Uribe and Rafael Moreno-Sanchez, has been read by two reviewers familiar with the field; their comments are enclosed. I have also been over one of the manuscript copies and have indicated numerous changes. As both reviewers indicate, malate is used efficiently by Euglena mitochondria (another example is in the enclosed reprint of Delorme et al. where malate is an efficient substrate for driving another energy-requiring process, protein synthesis). The failure to use malate is very strange and should be discussed. Is it used in the presence of glutamate? Is glutamate necessary for its utilization? Does sonication, perhaps, selectively affect malate utilization? Also the point made by reviewer 2 in his comment 1 is important and will have to be dealt with; it would be highly desirable to have state 3 values to support the nature of the respiratory pathways. The other comments of the reviewers are also important.

Double space everything in the manuscript (including Table headings) to facilitate editing. Spell out all abbreviations at first use! What is "u" for sonication? Explain. G and time needed for centrifugation second line, page 6. Indicate which instruments were used for measurement of volume changes and pyridine nucleotides. Is the E. coli data bottom of page 8 from the present work? So indicate. Page 11, line 5, adenylate kinase has been demonstrated and localized in Euglena mitochondria (see enclosed reprint, Saidha et al.). At bottom of page 17, I think you mean an evolutionary link between certain bacteria and Euglena mitochondria! (The mitochondria of eucaryotic cells are thought to have arisen from endosymbiotic invasion of bacteria)--the rest of the Euglena cell (outside of the chloroplasts and mitochondria) would have other affinities, to the Protozoa (not to the bacteria). The Tables and Figure legends need some work. In Figure 1, what are the numbers to the left of the traces? Indicate in Figure legend. Indicate in all legends (Figure and Table) that concentrations given are final concentrations. The reaction volume is

**PLANT SCIENCE** *International Journal of Experimental Plant Biology*

Chief Editors. J.A. Schiff (Waltham, MA) and J.H. Weil (Strasbourg)

**Professor Jerome A. Schiff**
**Chief Editor**
**Plant Science**
**Institute for Photobiology**
**Brandeis University**
**Waltham, MA 02254-9110 U.S.A.**

May 7, 1992
JAS-1785

Dr. Rafael Moreno-Sanchez
Pathology Department, MS 435
Hahnemann University
Broad and Vine Street
Philadelphia, Pennsylvania 19102

Dear Dr. Moreno-Sanchez:

Your paper, "Energy-dependent reactions supported by several substrates in coupled Euglena gracilis mitochondria," by Alda Uribe and Rafael Moreno-Sanchez, has been read by two reviewers familiar with the field; their comments are enclosed. I have also been over one of the manuscript copies and have indicated numerous changes. As both reviewers indicate, malate is used efficiently by Euglena mitochondria (another example is in the enclosed reprint of Delorme et al. where malate is an efficient substrate for driving another energy-requiring process, protein synthesis). The failure to use malate is very strange and should be discussed. Is it used in the presence of glutamate? Is glutamate necessary for its utilization? Does sonication, perhaps, selectively affect malate utilization? Also the point made by reviewer 2 in his comment 1 is important and will have to be dealt with; it would be highly desirable to have state 3 values to support the nature of the respiratory pathways. The other comments of the reviewers are also important.

Double space everything in the manuscript (including Table headings) to facilitate editing. Spell out all abbreviations at first use! What is "u" for sonication? Explain. G and time needed for centrifugation second line, page 6. Indicate which instruments were used for measurement of volume changes and pyridine nucleotides. Is the E. coli data bottom of page 8 from the present work? So indicate. Page 11, line 5, adenylate kinase has been demonstrated and localized in Euglena mitochondria (see enclosed reprint, Saidha et al.). At bottom of page 17, I think you mean an evolutionary link between certain bacteria and Euglena mitochondria! (The mitochondria of eucaryotic cells are thought to have arisen from endosymbiotic invasion of bacteria)--the rest of the Euglena cell (outside of the chloroplasts and mitochondria) would have other affinities, to the Protozoa (not to the bacteria). The Tables and Figure legends need some work. In Figure 1, what are the numbers to the left of the traces? Indicate in Figure legend. Indicate in all legends (Figure and Table) that concentrations given are final concentrations. The reaction volume is

needed in Figure 3 since ADP is given in nmol. In all Tables, what are the numbers in parenthesis; indicate in each table. "Mg" should read "mg protein" in all cases. Means ± S.E. are shown in Table II? So indicate. The concentrations of substrates are needed in heading of Table III (or refer to Table I?).

Please make the changes indicated above, on the manuscript copies and in the reviewers' comments and respond to any queries. Return two clean copies of a suitably-revised manuscript together with two sets of xeroxed figures; I have retained your high quality illustrations here.

Sincerely,

Jerome A. Schiff

JAS/aeb
Enclosures

# PLANT SCIENCE

**referee evaluation sheet**

**Professor Jerome A. Schiff**
Chief Editor
Plant Science
Institute for Photobiology
Brandeis University
Waltham, MA 02254-9110 U.S.A.
Fax: (617) 736-2669

Dear

The following paper has been submitted for publication and we would be grateful for your critical evaluation, which will be regarded as confidential. Please mark the appropriate box and kindly type your specific comments. If you recommend acceptance of the manuscript, either without change or with modifications, please state in a few words why you think this paper should be published in Plant Science. The author(s) may receive an anonymous copy of your evaluation. If you are unable to review this paper within three weeks, please return it at once. If corrections are not necessary on the manuscript copy, you may telefax your review to me and return the manuscript by mail. Many thanks for your attention in this matter.

Date of dispatch: [illegible]

Deadline for return: [illegible]

Sincerely yours ....., Editor

Date: 4/2/92

---

Author(s): [illegible] and Rafael Moreno-Sanchez

Title: Energy-dependent reactions supported by several substrates in coupled [illegible] Euglena mitochondria

Editor MS number: [illegible]
Referee number*: [illegible]

- ☐ outside the scope of this journal
- ☐ accept without change
- ☒ accept after minor revision
- ☐ too long - needs condensing
- ☐ reconsider after extensive revision
- ☐ reject (give reasons)
- ☐ other (please specify)

*Authors should refer to this referee number when answering comments made by each reviewer.

---

COMMENTS (please continue on separate sheet if necessary)

See attached

Aida Uribe and Rafael Moreno-Sanchez, JAS-1785, Referee #1

This is another interesting paper from Moreno-Sanchez and colleagues on Euglena mitochondria. Oxidative phosphorylation was measured with several substrates in assays displaying the highest respiratory control values so far attained with these mitochondria. These substrates also are shown to support the formation of a membrane potential, swelling and $Ca^{2+}$ uptake essentially for the first time with these organelles. Further, the rather "unusual" utilization of lactate is shown to be, at least as far as its oxidation is concerned, similar to lactate oxidation in bacterial systems. In sum, this paper contains considerable amounts of new data. Thus, this paper warrants publication in Plant Science, but the authors should consider the following:

1. Shouldn't the title read "Energy-producing reactions..." rather than "Energy-requiring reactions..."?
2. Page 8, lines 9-10 down: say that malate alone did not stimulate $O_2$ uptake. What explains this result? Malate has been shown to stimulate the uptake of $O_2$ by isolated Euglena mitochondria by several laboratories previously (see ref. 10 for further references).
3. Page 13, lines 6 and 8 down: Fig. 2 rather than Fig. 3?
4. Page 17, lines 10-13 down: On the basis of data published by others, these two pathways already have been postulated previously (see ref. 10). The data in the present paper further support this postulate.
5. Table 1 legend, lines 5-6 down: What is the meaning of the numbers in parentheses, i.e., 10, 20 and 34, following the means $\pm$ S.E. (n=6).

Several corrections throughout the text are noted in red ink.

# PLANT SCIENCE

referee evaluation sheet

Professor Jerome A. Schiff
Chief Editor
Plant Science
Institute for Photobiology
Brandeis University
Waltham, MA 02254-9110 U.S.A.
Fax: (617) 736-2689

Dear

The following paper has been submitted for publication and we would be grateful for your critical evaluation, which will be regarded as confidential. Please mark the appropriate box and kindly type your specific comments. If you recommend acceptance of the manuscript, either without change or with modifications, please state in a few words why you think this paper should be published in Plant Science. The author(s) may receive an anonymous copy of your evaluation. If you are unable to review this paper within three weeks, please return it at once. If corrections are not necessary on the manuscript copy, you may telefax your review to me and return the manuscript by mail. Many thanks for your attention in this matter.

Date of dispatch: [illegible]

Deadline for return: [illegible]

Sincerely yours ..... Editor

Date: [illegible]

---

Author(s): [illegible]

Title: [illegible]-dependent reactions supported by several substrates in coupled [illegible]

Editor MS number: [illegible]
Referee number*:

- ☐ outside the scope of this journal
- ☐ accept without change
- ☐ accept after minor revision
- ☐ too long - needs condensing
- ☒ reconsider after ~~extensive~~ revision
- ☐ reject (give reasons)
- ☐ other (please specify)

*Authors should refer to this referee number when answering comments made by each reviewer.

---

COMMENTS (please continue on separate sheet if necessary)

Comments - Referee 2, JAS-1785, A. Uribe and R. Moreno-Sanchez

1. Conclusions are made about the presence and absence of different pathways of respiration based on the effects of various inhibitors on the oxidation of a number of substrates by isolated mitochondria (Table I). However, the conditions used to monitor the inhibitor effects were not optimal. Respiration was apparently measured under state 4 conditions (the medium contained EGTA and phosphate, but lacked magnesium and ADP), so that the observed respiration would represent the basal or uncoupled rates. This is supported by the lack of an effect of oligomycin on lactate oxidation (Table I) and the respiratory control values observed with ADP and reported in Figure 1 and Table II. If sweeping conclusions are to be made about pathways of respiration solely on the basis of inhibitor studies, then at least optimal conditions should be employed to measure the respiration (state 3). The authors indicate some results obtained under state 3 conditions (p.12), but a complete list of findings should be incorporated into or substituted for Table I, and discussed, before suggesting which respiratory pathway may be utilized for a given substrate.

2. All genus and species names of organisms mentioned in the text should be underlined or italicized.

3. Malate did not stimulate respiration by isolated mitochondria (p.8). This is contrary to results reported by others (ref. 15, for example), but no explanation is offered.

4. For the determination of the redox state of pyridine nucleotides is there a reference for the fluorescence technique used? Also, with lactate as substrate, the text (bot. p.14) states that CCCP induces pyridine nucleotide oxidation which "was not blocked by rotenone or antimycin". However, Figure 4 C,D, indicates substantial reduction in the presence of these compounds?

5. Other corrections and suggested changes are indicated directly on the manuscript.

1310

**Hahnemann University**

June 5, 1992

Professor Jerome A. Schiff
Chief Editor
Plant Science
Institute for Photobiology
Brandeis University
Waltham, MA 02254-9110

Dear Professor Schiff:

This letter is in reference to the manuscript entitled "Energy-dependent reactions supported by several substrates in coupled Euglena mitochondria", which was submitted for publication in Plant Science, Physiology and Biochemistry section. The manuscript was returned with the comments of two reviewers who raised several questions and considered that the paper should be revised. We have tried to answer the various points that were raised and also made the necessary corrections. These are as follows:

First referee:

1.- We consider that the title, as stands, better reflects the work done in this study. ATP synthesis, swelling and Ca2+ uptake are energy-dependent reactions rather than energy-producing reactions.

2.- The inability of our mitochondrial preparation to use malate is certainly intriguing, as pointed out by the reviewers. Enclosed you will find, for your analysis, an original experiment where the addition of malate did not stimulate O2 uptake of Euglena mitochondria. This experiment was repeated in at least 5 different mitochondrial preparations. We have now tried to explain this observation on p. 8, last 5 lines, and p. 9, first paragraph, as suggested by both referees.

3.- The error on p. 14, lines 12 and 14 has been corrected.

4.- We agree with the referee and have modified the statement on p. 19, line 7, accordingly.

5.- The meaning of the numbers in parentheses in the legend of Table I has been clarified.

Second referee:

1.- We agree with the referee that state 3 conditions are more appropiate in studies of respiratory pathways that can generate a H+ gradient and support ATP synthesis. We also studied the effect

of several inhibitors on substrate oxidation in state 3 conditions and found that, with the exception of lactate, respiration was extremely sensitive to the inhibitors tested i.e. no stimulation of O2 uptake by ADP in the presence of inhibitor. These results, together with those of Table I (in state 4 conditions), led us to conclude that lactate was oxidized through an alternate pathway with phosphorylating capacity, as previously postulated in references 3 and 10. The oxidation of the other substrates appeared to support ATP synthesis only through the antimycin-sensitive pathway, although some electron flux could be drained through a non-phosphorylating alternate pathway. Thus, we feel that the data obtained from both state 3 and state 4 conditions are useful in the interpretation of the effect of inhibitors on substrate oxidation.

A more complete list of findings on inhibition of state 3 respiration and further discussion on this point has been incorporated on p. 13, lines 6-20, as suggested by the referee. Addition of $Mg2+$ was not required to induce state 3 respiration, which indicated the presence of an intramitochondrial $Mg2+$ pool.

2.- This point has been corrected.

3.- See point 2 of first referee.

4.- The interpretation of Figure 4C,D has been modified on p. 16, lines 8-14, according to the referee. We have also enclosed a Figure with some of the data not shown in the paper, for your analysis.

We have updated the references cited concerning information about bacterial lactate dehydrogenase and cytochrome o. Accordingly, the text on p. 16, last 3 lines and p. 17, 1st. paragraph has been slightly changed, and last paragraph on p. 18 has been added. The numbering of the references has been changed by the addition of references No. 16, 24,25,36,41-43, and 47. We have also made the changes indicated on the returned manuscript copies. With the exception of these changes, the text remains the same.

We thank both editor and reviewers for their input in this work. We feel that the paper is strengthened by their comments and suggestions. We hope that in its present form the manuscript is acceptable for publication.

Sincerely yours,

Rafael Moreno-Sanchez, Ph. D.

**PLANT SCIENCE**

*International Journal of Experimental Plant Biology*

Chief Editors: J.A. Schiff (Waltham, MA) and J.H. Weil (Strasbourg)

Professor Jerome A. Schiff
Chief Editor
Plant Science
Institute for Photobiology
Brandeis University
Waltham, MA 02254-9110 U.S.A.

June 17, 1992
JAS-1785

Dr. Rafael Moreno-Sanchez
Department of Pathology
Hahnemann University
Broad & Vine Streets
Philadelphia, Pennsylvania 19102

Dear Dr. Moreno-Sanchez:

It is a pleasure to inform you that your interesting paper, "Energy-dependent reactions supported by several substrates in coupled Euglena gracilis mitochondria," by Aida Uribe and Rafael Moreno-Sanchez, has been accepted for publication in Plant Science. Your manuscript has been forwarded to the press where it will be scheduled for publication in due course. I enclose a reprint order form which should be completed by you and returned to the address indicated on the form.

Sincerely,

Jerome A. Schiff

JAS/aeb
Enclosure

PSL3473
/RB

*Plant Science*, (1992)
Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd.

INCORPORATE PROOFS

# Energy-dependent reactions supported by several substrates in coupled *Euglena gracilis* mitochondria

Aida Uribe[a] and Rafael Moreno-Sánchez[b]

[a]*Departamento de Bioquimica, Instituto Nacional de Cardiologia, Juan Badiano 1, Mexico, D.F. 14080 (México) and* [b]*Pathology Department, Hahnemann University, Broad and Vine, Philadelphia, PA 19102 (USA)*

(Received April 2nd, 1992, revision received June 12th, 1992; accepted June 17th, 1992)

The ability of glutamate + malate, 2-oxoglutarate, NADH, succinate and DL-lactate to support oxidative phosphorylation, the formation of membrane potential, swelling and $Ca^{2+}$ uptake in *Euglena* mitochondria was studied. Oxidative phosphorylation was supported by the five substrates assayed with the appropriate ADP:O ratios and high respiratory control values. Oxidative phosphorylation supported by lactate was resistant to antimycin, but sensitive to 2-heptyl-4-hydroxyquinoline-*N*-oxide (HQNO), myxothiazol and cyanide. Respiration and membrane potential resistant to cyanide were observed with lactate and, to a lesser extent, with glutamate + malate. A similar pattern of inhibition, confirmed in this study, has been described for oxidation of D-lactate in bacterial systems. Oxidation of lactate induced an increase in matrix NAD(P)H; however the retention of lactate oxidase activity in submitochondrial particles suggested that, similar lactate oxidation in bacterial systems, NAD(P) was not an essential requirement in this reaction. Substrate oxidation induced swelling whereas ATP synthesis caused shrinkage. $Ca^{2+}$ uptake was only partially inhibited by ruthenium red and was completely abolished by an uncoupler.

*Key words: Euglena gracilis*; mitochondria; respiration; membrane potential; $Ca^{2+}$ transport

## Introduction

Isolated mitochondria from the protist *Euglena gracilis* can oxidize a variety of substrates comprising succinate [1–8], 2-oxoglutarate [1,4,6,7], external NADH [1–5,7], glutamate and malate [1,4,5,8] and other metabolites not commonly used by other kinds of mitochondria such as lactate [1–3,6,7], succinate semialdehyde [6] and γ-aminobutyric acid (GABA) [6]. A modified Krebs cycle has been described in *Euglena* mitochondria [9,10], where 2-oxoglutarate decarboxylase [9,11] and succinate semialdehyde dehydrogenase [9,12,13] substitute for the absence of 2-oxoglutarate dehydrogenase and succinyl-CoA synthase [9]. GABA is oxidized through the so-called GABA shunt [13], whereas the oxidation of lactate has been suggested to occur through a lactate dehydrogenase directly connected to the respiratory chain at the level of an antimycin-insensitive cytochrome b [3,10].

The finding that *Euglena* mitochondria, isolated from cells grown with ethanol or succinate + antimycin [3], but also from a medium with glutamate + malate [2], showed an antimycin and cyanide-insensitive respiration led to the suggestion that these mitochondria contained an alternate respiratory chain [2,3]. A *b*-type cytochrome, presumably cytochrome *o*, able to react with carbon monoxide [2,3], appeared to be related to the alternate oxidase. The cyanide-insensitive pathway was stimulated by AMP [3], blocked by diphenylamine [3] and was able to generate a small, uncoupler-sensitive, membrane potential [8]; the cyanide-insensitive pathway also appeared to be present in an AMP-insensitive form [2,3]. Based on studies of antimycin and cyanide inhibition, a respiratory chain with two terminal oxidases and

*Correspondence to:* Rafael Moreno-Sanchez, Ph.D. Hahnemann University, Pathology Department, MS 435, Broad and Vine St., Philadelphia, PA 19102, USA.

A.S.A.P.

separate routes for oxidation of NADH, succinate and lactate was proposed [2,3,10]. The use of other specific inhibitors of cytochrome b such as myxothiazol and 2-heptyl-4-hydroxyquinoline-*N*-oxide (HQNO) [14] would appear to be useful in the further characterization of cyanide-insensitive respiration of *Euglena* mitochondria.

Oxidative phosphorylation and respiratory control have been shown with some substrates in *Euglena* mitochondria [6,8,15]. A previous study showed that *Euglena* mitochondria generate a membrane potential and accumulate $Ca^{2+}$ when using glutamate + malate [8]. The question arises to as whether these energy-dependent processes can be supported by the different substrates oxidized by *Euglena* mitochondria.

In this work a systematic, comparative study of the oxidation of substrates and its sensitivity to different inhibitors was carried out in *Euglena* mitochondria. Also, the relative capacities of different substrates to support oxidative phosphorylation and other energy-dependent reactions was examined.

## Materials and Methods

### *Cell culture and growth conditions*

Stock cultures of wild-type *E. gracilis* Klebs (a Z-like strain) kept in the dark for more than 4 years were activated as indicated previously [8,16]. Cells were grown in the dark on an acidic organotrophic medium with glutamate + malate as carbon source [17] for 4 days in Erlenmeyer flasks at room temperature (20–25°C) and gentle stirring (60 rpm). Cells were harvested by centrifugation at 1000 × *g* for 10 min and washed once in a medium containing 250 mM sucrose, 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (Hepes) and 2 mM ethylene glycol bis(β-aminoethylether) *N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA), at pH 7.4. Cell number was determined with a Neubauer chamber; cell viability was determined by exclusion of 0.01% methylene blue [18] and was always >96%.

### *Preparation of mitochondria*

The procedure previously described [8] was used with the following modifications: (1) the sonication of the cell suspension was made at 40–50% of maximal power and (2) the mitochondrial pellet was incubated with 0.25% (w/v) fatty acid free albumin + 1 mM ADP for 10 min on ice before the final centrifugation step.

### *Oxygen consumption*

Mitochondria were incubated in 1.9 ml of a standard medium containing 120 mM KCl, 20 mM 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS), 5 mM phosphate and 2 mM EGTA (pH 7.2) at 30°C. Oxygen consumption was measured with a Clark-type electrode; the solubility of oxygen was taken to be 400 ng atoms/ml at 30°C and 2240 m altitude.

### *Determination of ATP synthesis*

Mitochondria were incubated in 2 ml of standard medium with the substrates indicated in the Results section. After 2 min, 1 mM ADP was added. The reaction was stopped 2 min later by the addition of 3% (w/v) perchloric acid; the sample was then centrifuged in a clinical centrifuge at 3000 × *g* for 5 min; the pH of the supernatant fraction was neutralized (and perchlorate extracted) with a 1:1 mixture of tri-*n*-octylamine and 1,1,2-trichlorotrifluoroethane according to Khym [19]. ATP was determined enzymatically [20] with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from Leuconostoc mesenteroides, which was found to give reproducible results.

### *Determination of membrane potential*

Mitochondria (3 mg protein) were incubated in 3 ml of standard medium with 10 μM safranine at 30°C. The absorbance difference of safranine at 511 – 533 nm was measured in an Aminco DW2c double beam spectrophotometer under continuous gassing with 100% $O_2$ and gentle stirring. The change in the absorbance signal of safranine is considered to reflect changes in the magnitude of membrane potential [21].

Membrane potential was also quantitatively determined by measuring tetraphenylphosphonium ($TPP^+$) distribution. Mitochondria (1 mg protein) were incubated in 1 ml of standard medium that contained 2 μM [$^3$H]$TPP^+$ (~20 000 counts/min per nmol) at 30°C. After 2 min ox-

idizable substrate was added as indicated in Results; 1 min later, the mitochondrial suspension was centrifuged in a microfuge at 4–8°C for 1 min. Aliquots of the pellet and supernatant fractions were counted for radioactivity. After correction for binding as suggested by Rottenberg [22], the membrane potential was calculated using the Nernst equation.

*Intramitochondrial volume changes*

Light scattering of mitochondrial suspensions (1 mg protein/ml) was measured at 540 nm in an Aminco DW2c spectrophotometer in 2 ml of standard medium at 30°C. A decrease in the absorbance signal reflects swelling whereas increase in the signal indicates shrinkage.

*Redox state of pyridine-nucleotides*

The fluorescence of a mitochondrial suspension illuminated at 333 nm was measured at 460 nm in an SPF-Aminco spectrofluorometer thermostated at 30°C, under gentle stirring and continuous gassing with 100% $O_2$.

*$Ca^{2+}$ transport*

Mitochondria (2 mg protein) were incubated in 3 ml of a medium containing 100 mM sucrose, 1 mM K-phosphate, 10 mM tris Hepes, 0.2 mM ADP, 5 $\mu$M oligomycin and 50 $\mu$M $^{45}CaCl_2$ (1000 counts/min per nmol) (pH 7.3), for 2 min at 25°C with an oxidizable substrate as indicated in Results. $Ca^{2+}$ uptake was determined by filtration as described previously [8].

*Determination of protein*

Mitochondrial protein was determined by the biuret method [23] in the presence of 1% (w/v) sodium deoxycholate and using bovine serum albumin as standard. The turbidity observed in the reaction tube, presumably originated from paramylum, was removed by centrifugation of the colored solutions at 1500 rev./min for 5 min at 4°C, before measuring the absorbance.

*Chemicals*

Rotenone, antimycin, oligomycin, 2-heptyl-4-hydroxyquinoline-*N*-oxide (HQNO), 2-salicylhydroxamic acid (SHAM) and carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) were from Sigma Chemical and were dissolved in dimethylsulfoxide. Diphenylamine (DPA) (Aldrich) and myxothiazol (Sigma) were dissolved in ethanol; disulfiram (ICN) was dissolved in dimethylsulfoxide.

## Results and Discussion

*Respiration and oxidative phosphorylation*

The rate of oxygen uptake of *Euglena* mitochondria was stimulated by addition of several substrates (Table I). Malate (15 mM) alone or ethanol (0.23 M) did not stimulate $O_2$ uptake (not shown). The lack of ability of the present mitochondrial preparation to oxidize malate is surprising, since it has been reported that this substrate can support oxidative phosphorylation [1,6,7,15] and protein synthesis [24] in *Euglena* mitochondria. The preparation of mitochondria by sonication perhaps selectively affected malate utilization, or the incubation of mitochondria in a medium containing 2 mM EGTA induced a diminution of the malate oxidase activity, as noted by Hummel and Brinkmann [7]. Glutamate alone was also unable to stimulate $O_2$ uptake (not shown). Thus, the requirement of malate for the oxidation of glutamate in the present mitochondrial preparation indicated that glutamate produced 2-oxoglutarate via transamination with oxaloacetate [25].

The sensitivity of substrate oxidation to several respiratory inhibitors is shown in Table I. Antimycin and cyanide did not completely block the oxidation of glutamate + malate and lactate. The insensitivity to these inhibitors has been interpreted in terms of an alternate respiratory chain [2,3,10]. Moreover, myxothiazol and HQNO, other specific inhibitors of mammalian cytochrome *b* [14], effectively blocked lactate and glutamate + malate oxidation. Interestingly, an antimycin-insensitive but HQNO sensitive alternate quinol oxidase has been described in bacterial respiratory systems [26–28]. In the present study, it was confirmed in experiments with inside-out membrane vesicles of *E. coli* that the oxidation of D-lactate, succinate were resistant to 20 $\mu$M antimycin (1 ± 0.5% and 3 ± 7% inhibition, respectively; $n = 3$), but were partially inhibited by 50

**Table I.** Inhibition of substrate oxidation in *Euglena* mitochondria. Mitochondria were incubated with the indicated inhibitors for 4 min prior to the addition of (final concentrations) 7.5 mM glutamate + 15 mM malate (G + M), 10 mM 2-oxoglutarate (2-OG), 1 mM NADH, 10 mM succinate, or 10 mM DL-lactate. The rates of $O_2$ uptake in the absence of inhibitors were respectively (ng atoms $O_2$/ mg protein × min): 60 ± 2 ($n$ = 10), 50 ± 4 ($n$ = 10), 41 ± 1 ($n$ = 20), 76 ± 2 ($n$ = 20) and 90 ± 6 ($n$ = 34). The rate of $O_2$ in the absence of inhibitors and added substrates was 22 ± 2 ($n$ = 34). The data shown below represent the mean ± S.E. of 6 mitochondrial preparations.

| Inhibitor | Substrate (% Inhibition) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | G + M | 2-OG | NADH | Succinate | Lactate |
| Rotenone (0.05 mM) | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 96 ± 4 | 7 ± 3 | 34 ± 1 |
| Antimycin (0.01 mM) | 50 ± 3 | 100 ± 0 | 94 ± 2 | 97 ± 2 | 14 ± 6 |
| Myxothiazol (0.01 mM) | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 72 ± 3 |
| HQNO (0.01 mM) | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 78 ± 2 |
| Cyanide (0.1 mM) | 90 ± 0 | 0 ± 0 | 62 ± 5 | 100 ± 0 | 66 ± 7 |
| DPA (0.25 mM) | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 87 ± 2 | 77 ± 3 | 83 ± 8 |
| Disulfiram (0.5 mM) | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 45 ± 2 | 29 ± 4 | 9 ± 2 |
| SHAM (0.5 mM) | 0 ± 0 | 35 ± 3 | 14 ± 1 | 4 ± 2 | 2 ± 1 |
| Oligomycin (0.1 mM) | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 83 ± 6 | 83 ± 4 | 9 ± 6 |

μM HQNO (35 ± 5% and 42 ± 6% inhibition, respectively; $n$ = 3). In addition, the bacterial alternate oxidases are also sensitive to cyanide [26,29] but they are less sensitive than cytochrome $aa_3$ [28,30].

Hence, the pattern of inhibition of lactate oxidation by antimycin, HQNO and cyanide would appear to suggest that, although a fraction of electron flux went through the cyanide-sensitive pathway, this substrate was preferentially oxidized by the alternate pathway. Following the same rational, the oxidation of glutamate + malate seemed to occur through the cyanide-sensitive pathway, with a small fraction going to the alternate pathway.

The oxidation of external NADH was sensitive to antimycin but only partially inhibited by cyanide, supporting the notion that external NADH was also oxidized by the alternate pathway [2,3,10]. The cyanide-insensitivity of 2-oxoglutarate oxidation may be an artifact resulting from a spurious reaction between cyanide and 2-oxoglutarate [31]. The pattern of inhibition of succinate oxidation by rotenone, antimycin and cyanide indicated that this substrate was oxidized through the main respiratory chain. A similar sensitivity of succinate oxidation to antimycin and cyanide was previously reported [2]; an antimycin- and cyanide-insensitive succinate oxidation could be induced in mitochondria from cells grown with succinate in the presence of antimycin or ethanol as carbon source [3].

Several postulated inhibitors of cyanide-insensitive respiration were also tested. DPA [3] was an effective blocker of substrate oxidation (Table I). Considering that inhibition of one route should enhance flux through an alternate route, the effect of DPA suggested that this inhibitor blocked both the main and the alternate pathway: a specific inhibition of the alternate pathway by

DPA would be expected to show partial or no effect on the oxidation of those substrates (succinate) preferentially oxidized by the cyanide-sensitive pathway. An effect of DPA on both pathways during succinate oxidation was also previously found [3].

Disulfiram, an inhibitor of cyanide-insensitive respiration in plant mitochondria [32], was a strong inhibitor of the oxidation of 2-oxoglutarate and glutamate + malate and a weak inhibitor of the oxidation of succinate and lactate. This pattern of inhibition did not correlate with a specific effect on the cyanide-resistant pathway, but rather suggests a nonspecific effect possibly linked to a reaction of disulfiram with essential thiol groups in the substrate transport system or in dehydrogenation [33,34]. According to reported data [7], SHAM [35] had no effect on substrate oxidation by *Euglena* mitochondria. $Zn^{2+}$ (10 $\mu$M), a strong inhibitor of bacterial cytochrome *o* [26], did not block the oxidation of glutamate + malate, succinate and lactate in a medium lacking EGTA (not shown).

Oligomycin showed a potent inhibitory effect on substrate oxidation with the exception of lactate; this effect would appear not to be related to inhibition of endogenous oxidative phosphorylation since lactate was able to support ATP synthesis at high rates in the present mitochondrial preparation (see below).

Oxidative phosphorylation was observed with all the substrates assayed with the appropiate ADP/O ratios and high respiratory control values (Fig. 1). These data are summarized in Table II. This process was blocked by oligomycin and carboxyatractyloside, specific inhibitors of the ATP synthase and the ATP/ADP translocase, respectively (not shown). AMP (1 mM; $n = 7$) also stimulated oxygen uptake by an oligomycin-sensitive mechanism (not shown), indicating the presence of an active adenylate kinase [36] (and endogenous ATP) in the present mitochondrial preparation. The ADP/O ratios obtained correlated well with values previously reported for glutamate and malate [6,8,15], 2-oxoglutarate [1,6], external NADH [2], succinate [2,6] and lac-

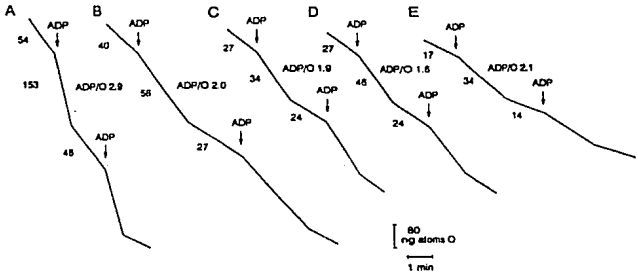



**Fig. 1.** State 3 respiration supported by several substrates. Mitochondria (1 mg protein/ml) were incubated in 1.9 ml of the standard medium described in Methods with the following substrates (final concentrations): 7.5 mM glutamate + 15 mM malate (A), 10 mM DL-lactate (B), 10 mM 2-oxoglutarate (C), 10 mM succinate (D) and 1 mM NADH (E). Where indicated 720 (A), 450 (B), 300 (C,E) or 250 (D) nmol ADP was added. The numbers to the left of the traces indicate the rate of $O_2$ uptake in ng atoms/mg protein × min. The ADP/O ratios indicate the total amount of added ADP in nmol in relation to the total amount of $O_2$ uptake in ng atoms induced by the addition of ADP.

**Table II.** Energy coupling in *Euglena* mitochondria. The rate of state 3 (ADP-stimulated) respiration was determined in the experimental conditions described in Fig. 1. The respiratory control values (RC) shown were calculated from the ratio between the rates of state 3 and state 4 respiration obtained with the first addition of ADP. The rates of state 4 repiration obtained in these conditions before the addition of ADP were (ng atoms $O_2$/mg protein × min): 56 ± 3 (11), 27 ± 2 (4), 20 ± 4 (6), 25 ± 5 (6) and 42 ± 4 (7) for G+M, 2-OG, NADH, succinate and lactate, respectively. The values shown represent the mean ± S.E. with the number of preparations in parentheses.

| Substrate | Rate of state 3 respiration (ng atoms $O_2$/ mg protein × min) | ADP/O | RC |
|---|---|---|---|
| Glutamate + malate | 150 ± 2 (11) | 2.9 ± 0.3 (11) | 3.6 ± 0.4 (11) |
| 2-Oxoglutarate | 34 ± 2 (4) | 1.9 ± 0.4 (4) | 1.4 ± 0.1 (4) |
| NADH | 33 ± 1 (6) | 2.3 ± 0.6 (6) | 2.4 ± 0.1 (6) |
| Succinate | 40 ± 2 (6) | 1.6 ± 0.2 (6) | 1.7 ± 0.5 (6) |
| Lactate | 56 ± 2 (7) | 2 ± 0.1 (7) | 2.3 ± 0.2 (7) |

tate [2]. The high respiratory control values achieved with all the substrates assayed clearly indicated an improvement in the method for obtaining well-coupled *Euglena* mitochondria by sonication [8]; it is thought that a more gentle sonication was the critical step in the improvement of this procedure.

Note that the rate of state 4 respiration was higher in the absence than in the presence of adenine nucleotides with glutamate + malate or lactate as oxidizable substrate (see Figs. 1A,B). Moreover, the preincubation of mitochondria for 4 min in an EGTA-containing medium before the addition of oxidizable substrate, in comparison to a protocol with no preincubation (Fig. 1), induced a higher rate of state 4 respiration (see legend of Table I for values). These observations suggest that, similar to mammalian mitochondria, substrate oxidation in *Euglena* mitochondria is probably subject to modulation by adenine and pyridine nucleotides and matrix $Ca^{2+}$.

A direct determination of ATP synthesis confirmed that the five substrates assayed supported oxidative phosphorylation (Table III). However, for as yet unexplained reasons, the rates of ATP synthesis did not strictly correlate with the rates predicted by the $O_2$ uptake data (the rate of state 3 respiration × the ADP/O ratio; see Table II).

**Table III.** Oxidative phosphorylation in *Euglena* mitochondria. The rate of ATP synthesis was determined enzymatically as described in the Methods section. The indicated concentrations of the inhibitors were present in the incubation medium before the addition of mitochondria. Other experimental details were described in Tables I and II.

| Inhibitor | ATP Synthesis | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Glutamate + malate | 2-OG | NADH | Succinate | Lactate |
| (nmol ATP formed/ mg prot. × min) | 228 ± 12 (4) | 140 ± 8 (4)[a] | 200 ± 6 (4) | 198 ± 18 (4) | 245 ± 5 (4)[b] |
| Rotenone (0.05 mM) | 17 | 10 | 11 | 176 (2) | 199 |
| Antimycin (0.01 mM) | 17 | 6 | 35 | 41 (2) | 130 |
| Cyanide (0.1 mM) | 65 | 0 | 70 | 35 | 47 |
| Oligomycin (0.01 mM) | 48 (2) | 0 | 32 (2) | 43 (2) | 39 (2) |

[a] $P < 0.001$ for 2-oxoglutarate versus any other substrate.
[b] $P < 0.05$ for lactate versus G+M, NADH or succinate.

Despite this caveat, we believe that the data of Tables II and III are sufficiently reliable to make comparisons of the effects of inhibitors on $O_2$ uptake and ATP synthesis.

Only ATP synthesis supported by lactate was resistant to antimycin (Table III). Similarly, the rate of state 3 respiration supported by lactate was partially inhibited by antimycin (68 ± 1%, $n = 3$), but completely (100%) abolished by 10 μM HQNO or myxothiazol; state 3 respiration supported by the other substrates was completely (100%) inhibited by antimycin and also by HQNO and myxothiazol (not shown). State 3 respiration was completely blocked by 0.1 mM cyanide or 0.25 DPA with lactate or any other of the substrates used (not shown) Thus, these data support the notion [3,10] that lactate is oxidized through an antimycin-resistant pathway which still preserves two sites of energy conservation, whereas the other substrates stimulate oxidative phosphorylation using the antimycin-sensitive pathway. As the oxidation of glutamate + malate and NADH in the absence of ADP was partially resistant to antimycin (see Table I), then the electron flux drained through the alternate pathway would appear unable to generate a $H^+$ gradient of a sufficient magnitude to drive ATP synthesis. In addition, the high rate of oxidative phosphorylation attained with lactate suggests that this substrate might provide the direct link between glycolysis and the respiratory chain for an efficient energy supply in dark-grown *Euglena* cells; pyruvate is oxidized to acetyl-CoA only under anaerobic conditions by an $O_2$-sensitive NADP-pyruvate oxidoreductase [37,38].

*Membrane potential*

*Euglena* mitochondria were able to generate a membrane potential with all of the substrates assayed (Fig. 2), as shown with the semiquan-

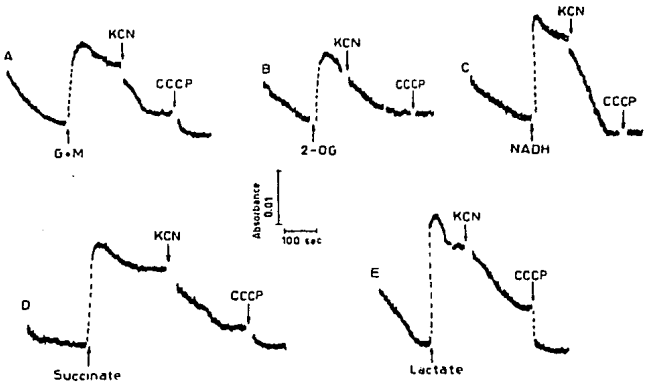



Fig. 2. Generation of membrane potential by several substrates. Mitochondria (1 mg protein/ml) were incubated as described in Methods with 10 μM safranine. After 8 min, the indicated substrates were added and the absorbance difference at 511–533 nm was measured. Additions (final concentrations): 7.5 mM glutamate + 15 mM malate (G + M), 10 mM 2-oxoglutarate (2-OG), 1 mM NADH, 10 mM succinate, 10 mM DL-lactate, 0.1 mM KCN, 1 μM CCCP.

titative probe safranine [21]. Remarkably, the addition of cyanide did not completely collapse the membrane potential generated by oxidation of glutamate + malate, succinate or lactate. This suggests, in agreement with previous work [8], that the cyanide-resistant respiration can generate a small, uncoupler-sensitive membrane potential. However, a strict correlation between cyanide-resistant respiration and cyanide-resistant membrane potential was not found for NADH and succinate (see Table I and Figs. 2C and 2D). The reason for this discrepancy is unknown. Note that the safranine absorbance signal reached a maximum with the addition of substrate (Fig. 2), decreasing to a lower steady state thereafter. This spontaneous diminution of membrane potential was indicative of a slight uncoupling effect induced by the uptake of dye [22]. We used a relation of 10 nmol safranine per 1 mg protein, as suggested for mammalian mitochondria [21]; clearly the effect of different safranine/protein ratios on the increase of the absorbance signal has to be explored in *Euglena* mitochondria.

A more quantitative determination of membrane potential was carried out using the distribution of [$^3$H]TPP$^+$. In preliminary experiments the values of membrane potential obtained with different substrates were as follows: 99, 96, 83, 77 and 70 mV for 10 mM succinate, 10 mM lactate, 7.5 mM glutamate + 15 mM malate, 1 mM NADH and 10 mM 2-oxoglutarate, respectively. These values of membrane potential were obtained after correction for unspecific binding of TPP$^+$, as indicated for rat liver mitochondria [22]. The possibility remains that a greater unspecific binding of TPP$^+$ occurs in *Euglena* mitochondria and hence the values of membrane potential may be underestimated.

*Energy-dependent swelling and shrinkage*

The addition of various substrates induced an increase in intramitochondrial volume (Fig. 3), which was extensive with 2-oxoglutarate but small with the other substrates. The addition of ADP prompted an oligomycin-sensitive shrinkage (Fig. 3B) with all the substrates used. This ADP-induced shrinkage was also energy (Fig. 3C, no added substrate) and phosphate-dependent (not shown), indicating that oxidative phosphorylation was the process involved in this change of mitochondrial volume. This observation was reported several years ago for mammalian mitochondria [39], but probably because of the lack of a well-coupled preparation this observation had not been previously confirmed for *Euglena* mitochondria. The further addition of the $K^+$ ionophore valinomycin induced an increase in swelling ($K^+$ uptake) which was significant with glutamate + malate, NADH, succinate and lactate and negligible in the absence of added substrates (Fig. 3C). This indicated that the changes of matrix volume were energy-dependent and that $K^+$ movements were involved.

*Redox state of pyridine-nucleotides*

In an initial attempt to characterize the reactions involved in the oxidation of lactate, the redox state of intramitochondrial NAD(P)H was measured. The expected pattern of oxidation-reduction of NAD(P)H was observed with glutamate + malate as substrate: the addition of the uncoupler CCCP induced a fast oxidation whereas DPA and rotenone yielded full reduction (Figs. 4A,B). With lactate, CCCP induced a more extensive NAD(P)H oxidation which was partially blocked by rotenone (Fig. 4C) or myxothiazol (not shown), whereas DPA (Fig. 4E) and HQNO (not shown) fully restored the reduction. The increase in fluorescence induced by antimycin (Fig. 4D) was not related to NAD(P) reduction, since the addition of antimycin to mitochondria incubated with no added substrates (Fig. 4G) or to a cuvette with no mitochondria also induced an increase in fluorescence.

Thus, the data of Fig. 4 suggest that the oxidation of lactate is associated with the formation of NAD(P)H. However, lactate oxidase activity was detected in fresh preparations of submitochondrial particles (prepared by sonication and centrifugation at 105 000 × *g*) but not in frozen samples (data not shown); although this requires further characterization, it seems that lactate oxidase is localized in the mitochondrial inner membrane and that it does not have an essential requirement for pyridine nucleotides. Price [40] described a zinc-dependent, particulate D-lactate dehydro-

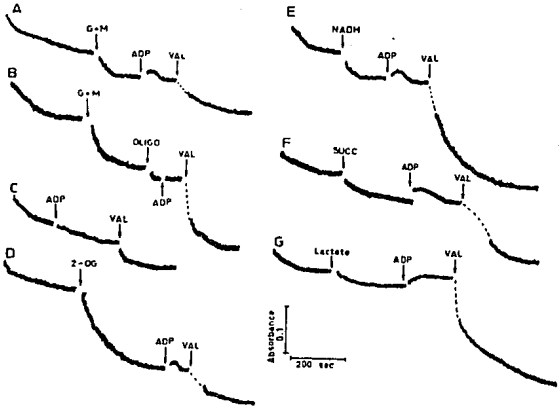



Fig. 3. Intramitochondrial volume changes in *Euglena* mitochondria. The light scattering of the mitochondrial suspension (1 mg protein/ml) was measured in 2 ml of standard medium as described under Methods. Where indicated the following additions were made (final concentrations): 7.5 mM glutamate + 15 mM malate (G + M), 10 mM 2-oxoglutarate (2-OG), 1 mM NADH, 10 mM succinate (succ), 10 mM DL-lactate, 300 nmol ADP, 0.45 nmol valinomycin (val) per mg protein, 0.01 mM oligomycin (oligo).

genase with no essential requirement for NAD in cell extracts of *Euglena* cells; the subcellular localization of this activity was identified in the mitochondrial fraction [41]. Interestingly, a flavin-dependent D-lactate dehydrogenase directly linked to the respiratory chain has been described in *E. coli* and other bacteria [42]. In inside-out *E. coli* membrane vesicles, D-lactate oxidation can generate a $H^+$ gradient [43] and support oxidative phosphorylation (22 ± 2 nmol ATP/ mg protein × min, $n = 4$, this study). Thus, the presence of lactate oxidase activity in *Euglena* mitochondria suggests an evolutionary link between the bacterial and *Euglena* respiratory chains.

*$Ca^{2+}$ uptake*

$Ca^{2+}$ uptake was supported by all the substrates assayed with the exception of 2-oxoglutarate (Table IV). In agreement with previous work [8], $Ca^{2+}$ uptake was collapsed by an uncoupler and only partially inhibited by ruthenium red, a strong inhibitor of this reaction in mammalian mitochondria [44]. Moreover, the $Ca^{2+}$ release induced by carboxyatractyloside, a well-described reaction in mammalian mitochondria that involves a cyclosporine-sensitive $Ca^{2+}$ pore [45] and references therein), appears not to be present in *Euglena* mitochondria (E. Chavez, pers. commun.). Thus, these data suggest that $Ca^{2+}$

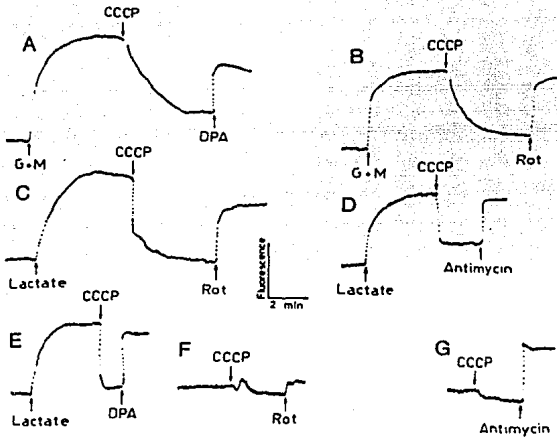



**Fig. 4.** Redox state of pyridine-nucleotides in *Euglena* mitochondria oxidizing lactate. The intrinsic fluorescence of the mitochondrial suspension was measured as described under Methods. Mitochondria (1 mg/ml) were incubated in 2 ml of standard medium for 8–10 min before the addition of the indicated substrates. Additions (final concentrations): 7.5 mM glutamate + 15 mM malate (G + M), 10 mM lactate, 4 μM CCCP, 12.5 μM rotenone (Rot), 0.25 mM diphenylamine (DPA), 10 μM antimycin. No addition of substrate was made for experiments F,G.

**Table IV.** $Ca^{2+}$ uptake by *Euglena* mitochondria. The values shown represent mean ± S.E. for 3 mitochondrial preparations. Other experimental details were described under Methods.

| Substrate | nmol/mg protein |
|---|---|
| 7.5 mM glutamate + 15 mM malate | 47 ± 2 |
| 10 mM 2-oxoglutarate | 4 ± 1 |
| 1 mM NADH | 35 ± 3 |
| 10 mM succinate | 54 ± 2 |
| 10 mM lactate | 60 ± 3 |
| 10 mM lactate + 5 μM ruthenium red | 36 ± 1 |
| 10 mM lactate + 5 μM CCCP | 4 ± 0 |

transport in *Euglena*-mitochondria lack some of the properties present in mammalian mitochondria.

## Conclusions

We have further characterized some of the energy-dependent reactions in *Euglena* mitochondria. A tight coupling between respiration and ATP synthesis can be achieved in these mitochondria as shown by the high respiratory control values and ADP/O ratios obtained with the different substrates used.

Although *Euglena* mitochondria show the same energy-dependent reactions found in mammalian mitochondria, they exhibited some interesting differences. *Euglena* mitochondria have a cyanide-resistant respiratory chain and a relevant question that arises is whether this pathway can support any of the energy-dependent reactions described. A helpful tool in that investigation would be the use of a specific inhibitor for the alternate or the cyanide-sensitive pathway. The data of Table I indicates that such an inhibitor may be antimycin, or a lower cyanide concentration (<0.1 mM) for sole inhibition of cytochrome c oxidase without affecting the alternate oxidase; a specific inhibitor for the alternate oxidase was not found.

It seemed clear that the alternate pathway did not support oxidative phosphorylation since 0.1 mM cyanide blocked this reaction; however it remains to be shown whether this cyanide concentration is not inhibitory for the alternate oxidase. HQNO, myxothiazol and DPA inhibited the alternate pathway but they also appeared to block the cyanide-sensitive respiration. The combination of two inhibitors for the study of the role of the alternate pathway in the energy-dependent reactions could be another useful approach.

The maintenance of a small membrane potential in the presence of cyanide [8] was confirmed in this study and extended to other substrates. This observation suggests that cytochrome o, the alternate oxidase [2,3,16], may be a $H^+$ redox pump in *Euglena* mitochondria; indeed, the bacterial cytochrome o has been shown to have $H^+$ pumping capability [46,47].

The direct demonstration of oxidative phosphorylation supported by lactate which was antimycin-resistant (and HQNO-sensitive) confirmed that this substrate was oxidized by an alternate pathway that did not bypass cytochrome *c* oxidase [3,10]. Thus, as previuosly postulated [3,10], *Euglena* mitochondria seem to have two alternate pathways: a cyanide-resistant pathway which appears not to support ATP synthesis and a lactate-dependent alternate pathway which is able to support several energy-dependent reactions.

The presence of lactate oxidase activity in submitochondrial particles indicated that lactate dehydrogenase was an integral component of the respiratory chain. Interestingly, these characteristics are strikingly similar to those described for the oxidation of lactate in bacterial respiratory systems. This implies that a close taxonomical and evolutionary link between some bacteria and *Euglena* mitochondria might exist. A comparison of the isolated lactate dehydrogenase from *Euglena* mitochondria and bacteria might provide evidence of a phylogenetic relationship.

## References


1 D.E. Buetow and P.J. Buchanan, Oxidative phosphorylation in mitochondria isolated from *Euglena gracilis*. Biochim. Biophys. Acta, 96 (1965) 9–17.
2 T.K. Sharpless and R.A. Butow, Phosphorylation sites, cytochrome complement and alternate pathways of coupled electron transport in *Euglena gracilis* mitochondria. J. Biol. Chem., 245 (1970) 50–57.
3 T.K. Sharpless and R.A. Butow, An inducible alternate terminal oxidase in *Euglena gracilis* mitochondria. J. Biol. Chem., 245 (1970) 58–70.
4 J.S. Khan, Physiological adaptation of *Euglena* uracilis to uncouplers and inhibitors of oxidative phosphorylation. Arch. Biochem. Biophys. 164 (1974) 266–274.
5 D.B. Datta and J.S. Khan, Some biochemical properties of mitochondria isolated from *Euglena gracilis*. J. Protozool., 24 (1977) 187–192.
6 M. Tokunaga, Y. Nakano and S. Kitaoka, Preparation of physiologically intact mitochondria from *Euglena gracilis*. Agric. Biol. Chem., 40 (1976) 1439–1440.
7 W.V. Kümmel and K. Brinkmann, The oxidation of exogenous NADH by mitochondria of *Euglena gracilis*. Planta, 176 (1988) 261–268.
8 R. Moreno-Sánchez and J.C. Raya, Preparation of coupled mitochondria from *Euglena* by sonication. Plant Sci., 48 (1987) 151–157.
9 S. Shigeoka, T. Onishi, K. Maeda, Y. Nakano and S. Kitaoka, Occurrence of thiamin pyrophosphate-dependent 2-oxoglutarate decarboxylase in mitochondria of *Euglena gracilis*. FEBS Lett., 195 (1986) 43–47.
10 D.E. Buetow, The Mitochondrion, in: D.E. Buetow (Ed.), The Biology of *Euglena*, Vol. IV, Academic Press, New York, 1989, pp. 247–314.
11 S. Shigeoka and Y. Nakano, Characterization and molecular properties of 2-oxoglutarate decarboxylase from *Euglena gracilis*. Arch. Biochem. Biophys., 288 (1991) 22–28
12 M. Tokunaga, Y. Nakano and S. Kitaoka, Separation and properties of the NAD-linked and NADP-linked isozymes of succinic semialdehyde dehydrogenase in *Euglena gracilis*. Z. Biochim. Biophys. Acta., 429 (1976) 55–62.
13 M. Tokunaga, Y. Nakano and S. Kitaoka, Subcellular

localization of the GABA-shunt enzymes in *Euglena gracilis* strain Z. J. Protozool., 26 (1979) 471–473.
14 G. Von Jagow and T.A. Link, Use of specific inhibitors on the mitochondrial $bc_1$ complex. Methods Enzymol., 126 (1986) 253–271.
15 B. Gómez-Silva, A.I. Stern, T. Saidha and J.A. Schiff, Oxidative phosphorylation coupled to respiration in highly purified intact *Euglena* mitochondria. J. Plant Physiol., 120 (1985) 431–440.
16 S. Devars, M.E. Turres-Marquez, D. Gonzalez-Halphen, A. Uribe and R. Moreno-Sanchez, Cyanide-sensitive and cyanide-resistant respiration of dark-grown *Euglena gracilis*. Plant Sci., 82 (1992) 37–46.
17 S.H. Hutner and K.M. Bach, A sugar-containing basal medium for vitamin B12-assay with *Euglena*, application to body fluids. J. Protozool., 3 (1956) 101–112.
18 I. Carre, J.L. Bomsel and R. Calvayrac, Decay of cytochromes and appearance of a cyanide-insensitive electron transfer pathway in *Euglena gracilis* grown in anoxia. Plant Sci., 54 (1988) 193–202.
19 J.X. Khym, An analytical system for rapid separation of tissue nucleotides at low pressures on conventional anion exchangers. Clin. Chem., 21 (1975) 1245–1252.
20 J.R. Williamson and B.E. Corkey, Assays of intermediates of the citric acid cycle and related compounds by fluorometric enzyme methods. Methods Enzymol., 13 (1969) 434–513.
21 K.E.O. Akerman and M.K.F. Wikstrom, Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential. FEBS Lett., 68 (1976) 191–197.
22 H. Rottenberg, Membrane potential and surface potential in mitochondria. J. Membrane Biol., 81 (1984) 127–138.
23 A.G. Gornall, C.J. Bardawill and M.M. David, Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem., 77 (1949) 751–766.
24 E. Delorme, B. Gomez-Silva, A.I. Stern and J.A. Schiff, Protein synthesis linked to respiration and phosphorylation in intact *Euglena* mitochondria. Plant Cell Physiol., 27 (1986) 177–182.
25 S. Shigeoka, T. Hanaoka, N. Kishi and Y. Nakano, Effect of L-glutamate on 2-oxoglutarate decarboxylase in Euglena gracilis. Biochem. J., 282 (1992) 319–323.
26 K. Kita, K. Konishi and Y. Anraku, Purification and properties of two terminal oxidase complexes of *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. Methods Enzymol., 126 (1986) 94–113.
27 E.M. Barnes and H.R. Kaback, Mechanisms of active transport in isolated membrane vesicles. J. Biol. Chem., 246 (1971) 5518–5522.
28 J.C. Willison and P. John, Mutants of Paracoccus denitrificans deficient in c-type cytochromes. J. Gen. Microbiol., 115 (1979) 443–450.
29 R.K. Poole, Bacterial cytochrome oxidases. Biochim. Biophys. Acta, 726 (1983) 205–243.
30 W. De Vrij, B. van den Burg and W.N. Konings, Spectral and potentiometric analysis of cytochromes from *Bacillus subtilis*. Eur. J. Biochem., 166 (1987) 589–595.
31 E.C. Slater, Phosphorylation coupled with the oxidation of alfa-ketoglutarate by heart-muscle sarcosomes. Biochem. J., 59 (1955) 392–405.
32 D.S. Grover and G.G. Laties, Disulfiram inhibition of alternative respiratory pathway in plant mitochondria. Plant. Physiol., 68 (1981) 393–400.
33 K.F. La Noue and A.C. Schoolwerth, Metabolite transport in mitochondria. Annu. Rev. Biochem., 48 (1979) 871–922.
34 E. Chavez, C. Zazueta and C. Bravo, Extensive $Ca^{2+}$ release from energized mitochondria induced by disulfiram. J. Bioenerg. Biomemb., 21 (1989) 335–345.
35 G.R. Schonbaum, W.D. Bonner, B.T. Storey and J.T. Bahr, Specific inhibition of the cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hydroxamic acids. Plant Physiol., 47 (1971) 124–128.
36 T. Saidha, A.I. Stern, D.H. Lee and J.A. Schiff, Localization of a sulphate-activating system within *Euglena* mitochondria. Biochem. J., 232(1985) 357–365.
37 H. Inui, K. Miyatake, Y. Nakano and S. Kitaoka, The physiological role of oxygen-sensitive pyruvate dehydrogenase in mitochondrial fatty acid synthesis in *Euglena gracilis*. Arch. Biochem. Biophys., 237 (1985) 423–429.
38 H. Inui, K. Miyatake, Y. Nakano and S. Kitaoka, Pyruvate:NAD$^+$ oxidoreductase from *Euglena gracilis*: Mechanism of $O_2$-inactivation of the enzyme and its stability in the aerobe. Arch. Biochem. Biophys., 280 (1990) 292–298.
39 L. Packer, Energy-linked low amplitude mitochondrial swelling. Methods Enzymol., 10 (1967) 685–689.
40 C.A. Price, A zinc-dependent lactate dehydrogenase in *Euglena gracilis*. Biochem. J., 82 (1961) 61–66.
41 L.B. Graves, R.N. Trelease, A. Grill and W.M. Becker, Localization of glyoxylate cycle enzymes in glyoxysomes in *Euglena*. J. Protozool., 19 (1972) 527–532.
42 E.I. Garvie, Bacterial lactate dehydrogenases. Microbiol. Rev., 44 (1980) 106–139.
43 W.W. Reenstra, L. Patel, H. Rottenberg and H.R. Kaback, Electrochemical proton gradient in inverted membrane vesicles from *Escherichia coli*. Biochemistry, 19 (1980) 1–9.
44 T.E. Gunter and D.R. Pfeiffer, Mechanisms by which mitochondria transport calcium. Am. J. Physiol. 258 (1990) C755–C786.
45 E. Chavez, R. Moreno-Sanchez, C. Zazueta, H. Reyes-Vivas and D. Arteaga, Intramitochondrial $K^+$ as activator of carboxyatractyloside-induced $Ca^{2+}$ release. Biochim. Biophys. Acta, 1070 (1991) 461–466.
46 K. Carter and R.B. Gennis, Reconstitution of the ubiquinone-dependent pyruvate oxidase system of *Escherichia coli* with the cytochrome o terminal oxidase complex. J. Biol. Chem., 260 (1985) 10986–10990.
47 A. Puustinen, M. Finel, M. Virkki and M. Wikstrom, Cytochrome o(bo) is a proton pump in Paracoccus denitrificans and *Escherichia coli*. FEBS Lett., 249 (1989) 163–167.