



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
Instituto de Fisiología Celular

REGULACIÓN DEL CANAL INESPECÍFICO MITOCONDRIAL DE
Saccharomyces cerevisiae

PAPEL DE LOS ANÁLOGOS DE LAS QUINONAS.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

HELGA MARICRUZ LÓPEZ CARBAJAL

Tutor:

Dr. Salvador Uribe Carvajal. Instituto de Fisiología Celular

MÉXICO, D. F. AGOSTO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A Dios, quien siempre es fiel.

A mis padres, quienes siempre me han invitado a ir más allá de mis metas y me han apoyado en todo. Por su amor incondicional y por cada plática que me ha ayudado a crecer. Los amo mucho.

A Héctor y a Rocío, porque su felicidad es también mía. Gracias por escucharme y aconsejarme, estando a su lado todo marcha bien. Los quiero mucho hermanitos.

A Orlando, mi relampamigo, con quien aprendí que para ser feliz hay que saltar.

Este logro también es suyo.

Agradecimientos

A mi tutor, el Dr. Salvador Uribe Carvajal, por brindarme un lugar en su laboratorio, por la paciencia y por todo su apoyo. Por ser un gran ejemplo como investigador y como persona. Gracias por brindarme una visión del amor a la ciencia y un grupo de trabajo que ama lo que hace. Lo admiro mucho.

A mi comité tutorial: el Dr. Salvador Uribe Carvajal, la Dra. Irma Romero Álvarez y el Dr. Diego González Halphen. Y a mis sinodales, el Dr. Edmundo Chávez Cossío, el Dr. Horacio Reyes Vivas, el Dr. Antonio Peña Díaz, el Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco y la Dra. Xóchitl Pérez Martínez, por el tiempo que dedicaron a mi aprendizaje, por cada comentario y pregunta que me ayudó a comprender e interesarme más en mi trabajo.

Al Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar, por confiarme la continuación de su proyecto y apoyarme con cada duda que tuve.

A mis padres, por todas las veces que me acompañaron al laboratorio en horas inusuales, en domingos y días festivos.

A Orlando, por apoyarme en la realización de mi tesis; ayudarme a vencer los obstáculos y enseñarme a reír en los momentos difíciles.

A mis compañeros del lab. 305 oriente, Mónica Rosas, Alfredo Cabrera, Daniela Araiza, Natalia Chiquete, Juan Espinasa, Sergio Guerrero y Emilio Montes, por todos los días compartidos en el laboratorio, en seminarios, en congresos y enseñarme lo que la dedicación y esfuerzo pueden lograr.

A mis amigos de la H. Facultad de Ciencias: Eli, Lina, Diana y Ricardo, por seguir aquí conmigo y por todas nuestras charlas.

A todos mis amigos de Pumas Son Casino y de Pumitas. Orlando, Maryana, Chucho, José Juan, Lux, Rubens, Lorz, Luiz y todos los demás! por todas esas horas en las islas, en el jardín de las ardillas, en los ensayos, en casa de Saydi o donde sea que pudiéramos estar disfrutando de lo que nos gusta y nos une a todos. Por darle sazón a esta etapa de mi vida. Los quiero mucho ¡Rueda, rueda!

A Rebeca Montiel, quien ha dedicado su tiempo y esfuerzo a Pumas Son Casino, familia en la que he encontrado grandes amigos y grandes alegrías. Gracias Beka.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN	
Las cadenas respiratorias mitocondriales.....	9
La fosforilación oxidativa y la teoría quimiosmótica.....	13
La mitocondria: Principal sitio de generación de especies reactivas de oxígeno.....	15
La transición de la permeabilidad y los canales inespecíficos mitocondriales.....	18
El papel del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en la transición de la permeabilidad.....	22
El papel de la traslocasa de adenín nucleótidos (ANT) en la transición de la permeabilidad.....	23
La Ciclofilina D.....	24
El papel de los canales inespecíficos mitocondriales en la apoptosis.....	25
Los canales inespecíficos mitocondriales como mecanismos para evitar la formación de EROs.....	27
ANTECEDENTES	
La levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio.....	29
La cadena respiratoria de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
El canal inespecífico mitocondrial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (_{sc} MUC).....	30
El flujo de electrones del complejo I como facilitador de la formación del MUC de mamíferos (_m MUC) y su regulación por análogos de quinonas.....	34
HIPÓTESIS.....	38
OBJETIVOS	
General.....	38

Particulares.....	38
MATERIALES Y MÉTODOS	
Material biológico y reactivos.....	39
Condiciones de crecimiento.....	39
Obtención de las mitocondrias.....	40
Consumo de oxígeno.....	40
Potencial transmembranal ($\Delta\Psi$).....	40
Hinchamiento mitocondrial.....	41
RESULTADOS	
Efecto de distintos análogos de quinonas sobre el s_c MUC con etanol como sustrato respiratorio.....	42
Efectos de la decilubiquinona sobre el s_c MUC.....	42
Efectos de la Q_6 y la Q_{10} sobre el s_c MUC.....	46
Efecto de la decilubiquinona sobre el s_c MUC con succinato como sustrato respiratorio.....	48
Competencia entre análogos de quinonas sobre el s_c MUC.....	52
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIONES	58
BIBLIOGRAFÍA	59

ABREVIATURAS

ANT	Translocasa de adenín nucleótidos
BSA	Albúmina sérica bovina
CCCP	Carbnilcianin m-clorofenilhidrazona
CR	Control respiratorio
CRC	Capacidad de retención de calcio
CsA	Ciclosporina A
CypD	Ciclofilina D
DQ	Decilubiquinona
ERO	Especies reactivas de oxígeno
MES	2- [N-morfolino] ácido etanosulfónico
_m MUC	Canal inespecífico mitocondrial de mamíferos
MUC	Canal inespecífico mitocondrial
Q ₁	Quinona 1
Q ₆	Quinona 6
Q ₁₀	Quinona 10
PiC	Acarreador mitocondrial de fosfatos
_{Sc} MUC	Canal inespecífico mitocondrial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TP	Transición de la permeabilidad
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje

RESUMEN

La transición de la permeabilidad mitocondrial (TP) es el cambio súbito de la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial como respuesta a distintos factores (calcio, estrés oxidativo, depleción de nucleótidos de adenina, fosfato, entre otros). La TP está determinada por la apertura de un canal inespecífico (MUC, por sus siglas en inglés) cuya identidad molecular aún es controversial, sin embargo, la investigación de distintos grupos ha permitido proponer como componentes del MUC a distintas proteínas, como la traslocasa de adenín nucleótidos, el acarreador de fosfatos, la porina mitocondrial, la ciclofilina D y proteínas de la familia Bcl-2, además de algunas enzimas como la hexocinasa. Se ha detectado la presencia del MUC en distintas especies, incluyendo a *Saccharomyces cerevisiae* ($_{sc}$ MUC).

La consecuencia principal de la apertura del MUC es que la membrana mitocondrial interna deja de representar una barrera para los protones, llevando a la disipación de la fuerza protón-motriz y por tanto al desacoplamiento de la fosforilación oxidativa; las moléculas de bajo peso molecular se equilibran a través de la membrana interna, conduciendo a un aumento en el volumen mitocondrial que puede derivar en la ruptura de la membrana externa y en la liberación de moléculas del espacio intermembranal, como factores pro-apoptóticos. En este sentido, se ha observado que la apertura del MUC se encuentra estrechamente relacionada a la muerte celular por apoptosis y necrosis después de un periodo de isquemia-reperusión en mamíferos. También se ha propuesto que el MUC se encuentra involucrado en la desintoxicación de cationes, el control de especies reactivas de oxígeno y la regulación de la síntesis de ATP.

Se ha propuesto que el MUC de mamíferos ($_{m}$ MUC) puede ser regulado a través del flujo de electrones provenientes del complejo I, y se ha comprobado el efecto regulatorio de distintos análogos de las quinonas. En este trabajo se determinó el efecto de la decilubiquinona, Q_6 y Q_{10} en el $_{sc}$ MUC, midiendo sus efectos sobre el consumo de oxígeno, el potencial transmembranal y el hinchamiento mitocondrial, utilizando etanol o succinato como sustrato respiratorio. Los resultados sugieren que el estado de óxido reducción de los piridín nucleótidos juega un papel en la regulación del $_{sc}$ MUC. Por otro lado, los experimentos de competencia con Q_1 y DQ sugieren que existe un sitio específico de unión de las quinonas al $_{sc}$ MUC para que lleven a cabo su función regulatoria.

INTRODUCCIÓN

Las cadenas respiratorias mitocondriales

La primera observación de una mitocondria fue en 1840. Los primeros experimentos sobre los mecanismos de respiración y caracterización de la citocromo c oxidasa fueron reportados alrededor de 1930 por Warburg. Lenhinger y Kennedy descubrieron en 1949 que las mitocondrias son el sitio en donde se realiza la fosforilación oxidativa, el ciclo de Krebs y la oxidación de ácidos grasos. El fraccionamiento subcelular y la centrifugación diferencial fueron desarrolladas en el mismo periodo por Claude y deDuve, quienes demostraron junto con Hogeboom y Hotchkiss que la respiración tiene lugar dentro de la mitocondria. En 1952 Palade y Sjöstrand presentaron las primeras imágenes de la mitocondria en alta resolución y mostraron que estos organelos tienen una membrana externa y una interna que se encuentra plegada formando crestas (Nelson y Cox 2013).

La membrana mitocondrial externa es permeable a pequeñas moléculas e iones, ya que está constituida por 40% de lípidos y 60% de copias de una proteína denominada porina o canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), que permite el transporte pasivo de moléculas citosólicas con un peso de hasta 10,000 Da. Por otro lado, posee enzimas que convierten sustratos lipídicos a formas que van a ser metabolizadas en la matriz, receptores de importación y translocación de proteínas (Lodish 2006); también posee proteínas que pueden establecer uniones dependientes de ATP y proteínas de la familia Bcl-2 (Alberts y cols. 2002).

La membrana mitocondrial interna es impermeable a la mayoría de las moléculas pequeñas e iones; las únicas que pueden atravesar la membrana son aquellas para las que existen transportadores específicos. Posee 80% de proteínas y 20% de lípidos. Se caracteriza por la formación de crestas, las cuales incrementan el área total de la superficie interna. Estas crestas aparecen como estructuras lamelares o tubulares, cuyo número está relacionado con las demandas energéticas de la célula (Lodish 2006). La membrana interna aloja los componentes de la cadena respiratoria y a la ATP sintasa (Fig. 1). En condiciones aeróbicas la fosforilación oxidativa genera la mayor parte de la energía celular.

En la matriz mitocondrial se encuentran la piruvato deshidrogenasa, las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, las enzimas que catalizan la oxidación

de los ácidos grasos y las enzimas de la oxidación de aminoácidos, así como el DNA mitocondrial, y distintas moléculas como ATP, ADP, P_i, Mg²⁺, Ca²⁺ y K⁺.

Durante los años siguientes al descubrimiento de la fisiología de las mitocondrias, la investigación se orientó al estudio de la respiración con partículas submitocondriales y con mitocondrias intactas, obteniéndose información acerca de la composición, cinética y sitios de acoplamiento de la cadena respiratoria. De la membrana interna mitocondrial se pueden aislar más de veinte transportadores de electrones distintos asociados a numerosos péptidos. Con la excepción de la coenzima Q, todos los miembros de esta cadena son proteínas. Estas proteínas pueden funcionar como enzimas como en el caso de varias deshidrogenasas, pueden contener hierro como parte de su centro hierro-azufre o pueden contener cobre, como en el caso de los citocromos a y a₃. Estos péptidos y moléculas se han asociado en cuatro complejos enzimáticos (Tabla 1). También está la ATP sintasa o complejo V que sintetiza ATP mediante la fosforilación oxidativa, sin embargo, éste no es propiamente un componente de la cadena transportadora de electrones.

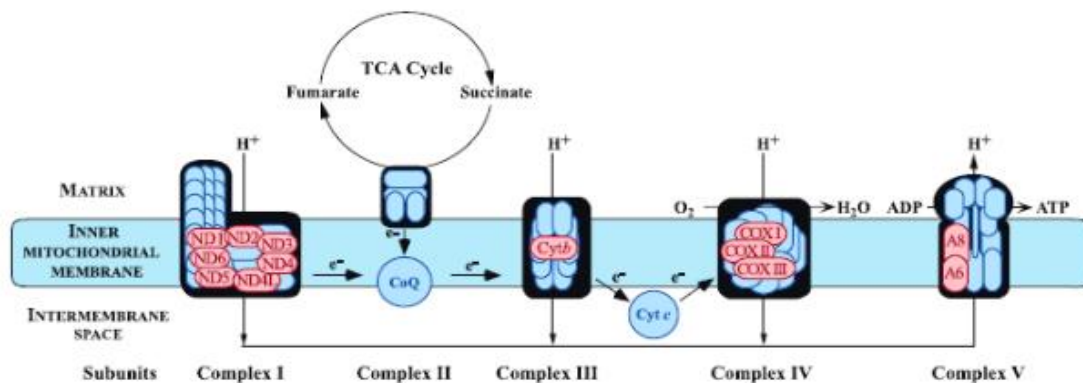


Fig. 1. Esquema de la cadena respiratoria. Las subunidades codificadas por el ADN mitocondrial aparecen en rojo y las codificadas por el ADN nuclear en azul. Al tiempo que los electrones fluyen a través de la cadena de transporte electrónico, hay bombeo de protones desde la matriz al espacio intermembranal mediante los complejos I, III y IV. De ahí, los protones pasan de nuevo a la matriz mitocondrial a través del complejo V, produciendo ATP (DiMauro 2004).

Cada complejo acepta o dona electrones a acarreadores o transportadores móviles como la coenzima Q y el citocromo c. Cada acarreador de la cadena de transporte de electrones puede recibir electrones de un donador y subsecuentemente puede donarlos al siguiente acarreador de la cadena de acuerdo con su potencial redox (E°); los electrones tenderán a fluir espontáneamente desde un transportador

con un valor de E° más negativo hacia otro con E° más positivo. Finalmente se combinan con el oxígeno y protones formando agua. La mayoría de estos electrones proviene de la acción de enzimas deshidrogenasas que son donados por distintas vías catabólicas a los aceptores universales de electrones: 1) Los nucleótidos de nicotinamida (NAD^+ o NADP^+) y 2) Los nucleótidos de flavina. Por ejemplo, la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico generan una cantidad sumamente baja de energía en forma de ATP mediante fosforilaciones a nivel sustrato. Sin embargo, seis pasos de deshidrogenación (uno en la glucólisis, otro en la reacción de la piruvato deshidrogenasa y cuatro más en el ciclo de Krebs) reducen, en total, 10 moles de NAD^+ a NADH y dos moles de FAD a FADH_2 , por mol de glucosa. La reoxidación de estos equivalentes reductores genera la mayor parte de la energía necesaria para la síntesis de ATP.

Tabla 1. Complejos respiratorios mitocondriales.

Complejo	Masa (kDa)	No. Subunidades	Grupos prostéticos	Reacciones del complejo
I NADH deshidrogenasa	980	46	FMN, 7 centros Fe-S	<p>1. Transferencia exergónica de un ion hidruro desde el NADH y un protón desde la matriz a la ubiquinona (CoQ).</p> $\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{CoQ} \longrightarrow \text{NAD}^+ + \text{CoQH}_2$ <p>2. La transferencia endergónica de 4 protones desde la matriz al espacio intermembrana cada 2 electrones transferidos.</p> $\text{NADH} + 5\text{H}^+_{\text{N}} + \text{CoQ} \longrightarrow \text{NAD}^+ + \text{CoQH}_2 + 4\text{H}^+_{\text{P}}$
II Succinato-CoQ reductasa	100	5	FAD, cyt b ₅₆₀ , 3 centros Fe-S	<p>El FAD es reducido a FADH₂ durante la oxidación del succinato a fumarato. El FADH₂ es luego reoxidado por transferencia de electrones a través de una serie de 3 centros Fe-S a la CoQ, generando CoQH₂ :</p> $\text{FAD} \longrightarrow \text{FeS}_{\text{centro 1}} \longrightarrow \text{FeS}_{\text{centro 2}} \longrightarrow \text{FeS}_{\text{centro 3}} \longrightarrow \text{CoQ}$
III CoQ-cit c reductasa	240	11	Cit b, cit c ₁ , Fe-S	<p>1. Acepta electrones de la CoQH₂ que se generó por la transferencia de electrones en los complejos I y II.</p> <p>2. Acopla la transferencia de electrones de QH₂ al citocromo c con el transporte de cuatro protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranal mediante el ciclo Q:</p> $\text{QH}_2 + 2 \text{cit } c_1 \text{ (oxidados)} + 2 \text{H}^+_{\text{N}} \longrightarrow \text{Q} + 2 \text{cit } c_1 \text{ (reducidos)} + 4 \text{H}^+_{\text{P}}$
IV Citocromo oxidasa	204	13	Cit a, cit a ₃ , Cu _A , Cu _B	<p>1. Acepta los electrones del cit c y los transfiere al oxígeno para realizar la siguiente reacción irreversible:</p> $\text{O}_2 + 4 \text{H}^+ + 4 \text{e} \longrightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$ <p>2. El O₂ reacciona en un centro binuclear que consiste en hemo a₃ y Cu_B. Por cada dos electrones que pasan a través del complejo IV se transfieren 2 H⁺ hacia el espacio intermembranal.</p>

Nelson y Cox 2013

La fosforilación oxidativa y la teoría quimiosmótica

La fosforilación oxidativa es la síntesis de ATP asociada al flujo de electrones de la cadena respiratoria. El mecanismo de la fosforilación oxidativa fue motivo de gran controversia. Hubo muchas teorías sobre el mecanismo del acoplamiento entre una reacción exergónica (oxidación de NADH y reducción de O₂) y una reacción endergónica (condensación de ADP y P_i). Los resultados obtenidos durante el estudio de la cadena respiratoria sugerían la presencia de compuestos altamente energéticos como intermediarios entre el transporte de electrones y la síntesis de ATP. En la vía glucolítica, por ejemplo, el gliceraldehído 3-fosfato se oxida a 1,3 difosfoglicerato; cuando este compuesto transfiere el P_i activado al ADP, tiene lugar la síntesis de ATP. Esta idea dio origen a la hipótesis del acoplamiento químico propuesta por Slater en 1953, según la cual, a partir de la energía química liberada de la transferencia de electrones a través de la cadena respiratoria, se produce algún intermediario químico de alta energía que podría ser utilizado para la síntesis de ATP. Sin embargo, nunca se logró identificar el compuesto de alta energía. Por otro lado, en 1964 Paul Boyer formuló la hipótesis del acoplamiento conformacional, que propone que el transporte de electrones permite cambios y estarían asociadas a la ATPsintetasa, de modo que su “desactivación” conduce a la síntesis de ATP, sin embargo, esta propuesta encontró poco apoyo experimental.

Peter Mitchell (1961) propuso la teoría quimiosmótica, que indica que la transferencia de electrones a través de la cadena respiratoria está acompañada por el bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal, generando una diferencia en la concentración de protones a través de la membrana. El medio presente en la matriz mitocondrial se alcaliniza respecto al medio presente en el espacio intermembranal. Según la teoría quimiosmótica esta energía denominada fuerza protón-motriz, se utiliza para la síntesis de ATP catalizada por F₁ cuando los protones retornan pasivamente a la matriz mitocondrial a través del poro de protones del componente F_o de la ATPsintetasa (Fig. 2). La fosforilación oxidativa requiere que la membrana mitocondrial interna esté íntegra; los compuestos que aumentan su permeabilidad disipan el gradiente electroquímico y permiten que el transporte de electrones continúe, pero inhiben la síntesis de ATP, es decir “desacoplan” el transporte de electrones de la fosforilación oxidativa.

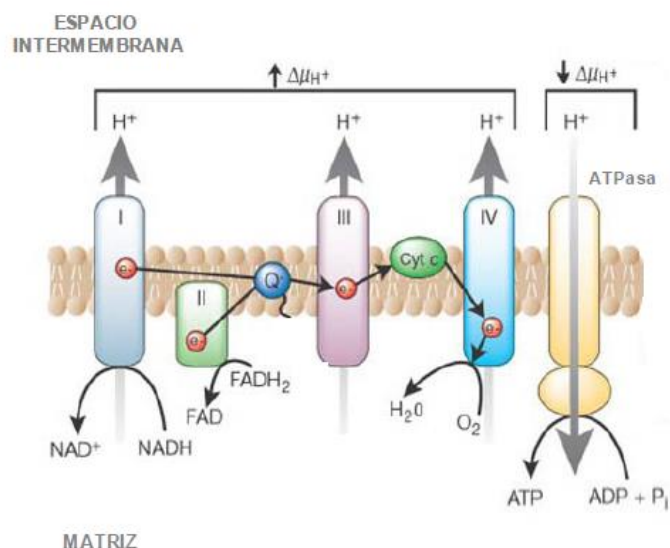


Fig. 2. Síntesis de ATP durante la fosforilación oxidativa. En la cadena transportadora de electrones mitocondrial, el complejo I recibe los electrones del NADH, mientras que el complejo II los recibe del succinato. Estos electrones se transfieren a la CoQ que los cede al complejo III. Desde este complejo los electrones son cedidos al citocromo c y al complejo IV, que a su vez cataliza la reducción del oxígeno molecular a agua (Brownlee, 2001).

En 1960, Racker y colaboradores lograron aislar a la ATPasa de partículas submitocondriales, y demostraron que se encuentra conformada por dos subunidades capaces de reconstituir la fosforilación oxidativa en partículas que carecían de ella. La ATP-sintasa es un complejo enzimático localizado en la membrana mitocondrial interna, formada por dos componentes principales llamados fracción F_1 y fracción F_0 (por su sensibilidad a oligomicina). La fracción F_1 es una proteína periférica de membrana que se encuentra dirigida hacia la matriz mitocondrial, está constituida por nueve subunidades: tres subunidades α y tres subunidades β que se encuentran sobre un tallo constituido por las subunidades, δ , γ y ϵ . Tiene varios sitios de unión a ADP. Este complejo se encuentra anclado mediante la subunidad γ a la fracción F_0 , que es una proteína integral de membrana formada por distintos tipos de subunidades que forman un canal a través del cual pasan los protones.

El mecanismo de catálisis rotacional, propuesto por Boyer, predice que los tres dímeros $\alpha\beta$ del complejo F_1 forman un hexámero y que las subunidades β son las subunidades catalíticas, mientras que las subunidades γ y ϵ están unidas al anillo c y giran con él (Fig. 3). Cada rotación de 120° de la subunidad induce cambios conformacionales en los centros catalíticos de la subunidad β , provocando la alteración de los centros de fijación de los nucleótidos, que van alternando entre tres estados que difieren por su asociación a la subunidad γ .

- Conformación L. Laxa, con sitios de unión para ADP y P_i .
- Conformación T. Unión tensa, permite la formación de enlace fosfodiéster entre el ADP y P_i , formándose ATP. Tiene mayor afinidad para ATP; el sustrato y el producto se encuentran en condiciones cercanas a la equimolaridad.
- Conformación O. Abierto. Deja libre al ATP.

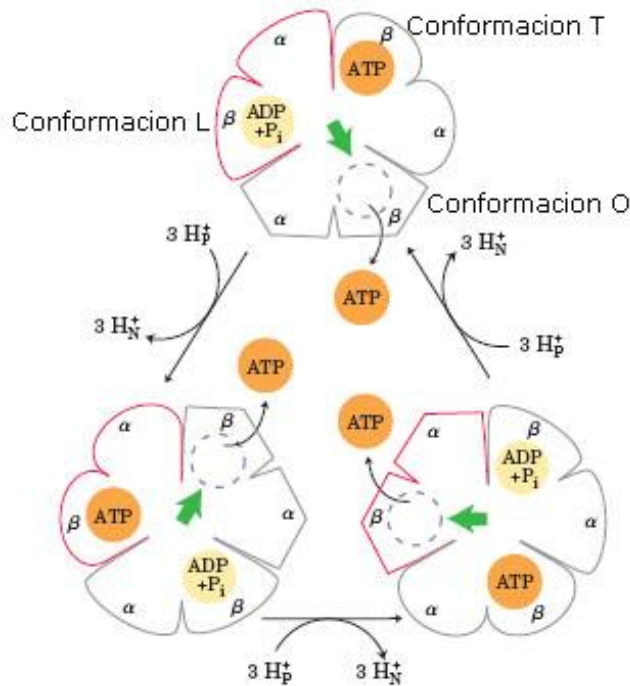


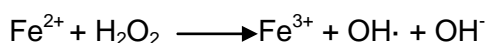
Fig. 3. Mecanismo de catálisis rotacional. El complejo F_1 tiene tres sitios distintos de unión de nucleótidos de adenina, uno por cada par de subunidades α y β . En un momento determinado, uno de ellos está en la conformación β -ATP (conformación T), un segundo está en la conformación β -ADP (conformación L) y un tercero está en la conformación β -vacía (conformación O). La fuerza protón-motriz hace que la subunidad γ (eje central, flecha verde) gire, produciendo un cambio conformacional en el que los tres sitios alternan su conformación (Nelson y Cox 2013).

Los dímeros $\alpha\beta$ son asimétricos presentando una conformación diferente en cada estado. Las tres subunidades β interactúan de tal modo que cuando una adopta la conformación O, otra adopta la conformación L y la otra la conformación T. Una rotación completa de la subunidad permite la síntesis de tres moléculas de ATP. La interconversión de los estados es mediada por protones y permite una producción continua de ATP. El paso dependiente de energía no es la síntesis de ATP sino su liberación de un lugar de unión que se produce por la rotación de γ , impulsando los cambios conformacionales de los dímeros $\alpha\beta$ para comenzar un nuevo ciclo.

La mitocondria: Principal sitio de generación de especies reactivas de oxígeno.

La aerobiosis marcó una ventaja en los organismos eucariontes debido a que los combustibles que aportan energía son oxidados con gran eficiencia en la mitocondria utilizando oxígeno como último aceptor de electrones. En el metabolismo anaerobio, una molécula de glucosa produce dos moléculas de ATP y dos moléculas de lactato o piruvato, mientras que en el metabolismo aerobio el piruvato continúa

oxidándose hasta CO₂ y H₂O produciendo de 36 a 38 moléculas de ATP por molécula de glucosa. Es evidente el aumento de la eficiencia del metabolismo aerobio, sin embargo, el oxígeno puede llegar a ser una especie altamente tóxica, ya que de él pueden derivar especies reactivas de oxígeno (ERO), que son mayoritariamente un subproducto de la fosforilación oxidativa y participan en el daño a las biomoléculas (lípidos, proteínas, ADN). Este tipo de daño se conoce como estrés oxidativo. A partir del oxígeno molecular se produce una serie de intermediarios reactivos hasta su completa reducción a H₂O. Entre ellos los más destacables son el anión superóxido (O₂⁻), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el radical hidroxilo (OH[·]). Pese a que el O₂⁻ y el H₂O₂ son moléculas poco reactivas, son las precursoras del OH[·] que es una molécula con una alta capacidad oxidativa mediante la reacción de Fenton:



En la célula existen cuatro sitios importantes de generación de especies reactivas de oxígeno (EROs): 1) el metabolismo peroxisomal, donde se forma H₂O₂, 2) Las reacciones microsomales del citocromo P₄₅₀ que cataliza el metabolismo de compuestos xenobióticos por óxido-reducciones, formándose O₂, 3) Las células fagocíticas que atacan a los patógenos con una mezcla de EROs y otros oxidantes pudiendo dañar tejidos aledaños, 4) La cadena respiratoria mitocondrial, la cual se considera como el sitio de mayor producción de EROs.

Las determinaciones de EROs se realizan a menudo de forma indirecta, valorando la generación de productos finales de la reacción de las EROs con componentes celulares, como los lípidos, proteínas o ADN (Freeman y Crapo 1982; Pryor y Godber 1991). La mayoría de métodos de determinación de ROS se basan en reacciones con varias moléculas “detectoras” que son modificadas por oxidación para generar luminiscencia o señales fluorescentes (Thannickal y Fanburg 2002).

Enfocándonos a la producción de EROs en la cadena respiratoria, se ha descrito que durante la síntesis de ATP se puede llevar a cabo la reducción univalente de O₂ dando como resultado la formación del radical superóxido (O₂^{·-}). Se han identificado a los complejos I y III como los máximos productores de ERO en la mitocondria (Fig. 4) (Chance y cols. 1979; Forman y Boveris 1982). La formación del superóxido depende de la velocidad del flujo de los electrones a través de los centros catalíticos de los complejos I y III. Si el flujo es lento ($\Delta\psi$ elevado), los centros redox se encuentran en estado reducido, por lo que el oxígeno tiene más posibilidad de captar

un electrón y formarse el anión superóxido. Se sabe que en el complejo III la formación de la semiquinona juega un papel clave en la generación del anión superóxido (Raha y Robinson 2000), que es favorecida por el tiempo en el que el CoQ permanece como ubisemiquinona. La generación de EROs se acelera por inhibidores del complejo III que actúan sobre puntos diferentes de éste, como por ejemplo la antimicina, debido al estancamiento de los electrones en el ciclo Q. La formación de O_2^- puede ocurrir también por el flujo reverso de los electrones desde el complejo II hacia el complejo I, cuando el sustrato oxidado es el succinato. Para que ésto ocurra es necesario un elevado potencial de membrana (Turrens y Boveris 1980; Liu y cols. 2002) y es inhibido por la adición de ADP o desacoplantes químicos. Se desconoce el sitio exacto de producción de EROs en el complejo I; sin embargo, se ha propuesto que la generación de O_2^- se da principalmente en el lado matricial de la membrana interna mitocondrial (St-Pierre y cols. 2002; Miwa y cols. 2003).

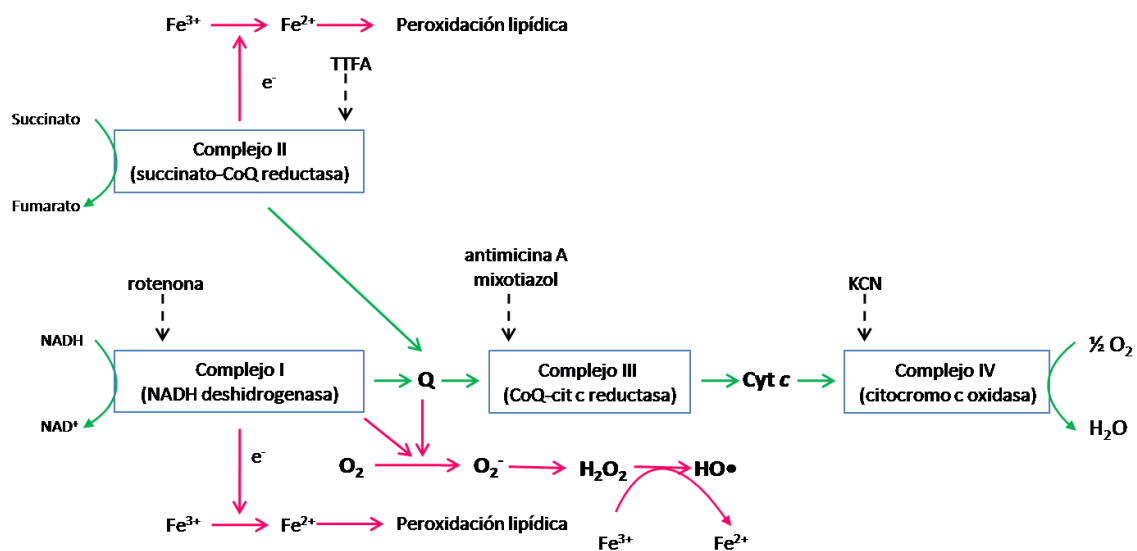


Fig 4. Formación de EROs en los complejos I y III de la cadena respiratoria mitocondrial. En flechas verdes se indica el transporte de electrones en condiciones fisiológicas. Un elevado potencial conduce a la inhibición del transporte de los electrones por la cadena respiratoria llevando a la formación de EROs, marcado en flechas rosas. Modificado de: Singh, K. 1998.

Los lípidos son oxidados en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica, que afecta principalmente a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados. Este proceso lleva a la degradación de los lípidos que dan origen a una amplia variedad de compuestos citotóxicos, como los aldehídos 4-hidroxi 2-nonenal (4-HNE) y malondialdehído (MDA). En la mitocondria este proceso puede llevar a la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial y, por tanto, a la inducción de la apoptosis.

La transición de la permeabilidad y canales inespecíficos mitocondriales

En condiciones fisiológicas, la membrana interna mitocondrial es impermeable a la mayoría de iones y metabolitos, y la regulación de su flujo a través de la membrana es esencial tanto para la regulación metabólica como para la conservación de energía, por lo que los compuestos que entran o salen de la mitocondria son transportados mediante acarreadores específicos estrechamente controlados. Chappel y Crofts (1965) descubrieron que las mitocondrias energizadas expuestas a altas concentraciones de calcio experimentan un hinchamiento masivo que puede ser revertido mediante su quelación. Originalmente se propuso que este hinchamiento podría representar una permeabilización inespecífica de la membrana interna mitocondrial a través de fosfolipasas sensibles a calcio conduciendo a la hidrólisis de los enlaces éster de los fosfolípidos en la membrana (Gunter y Pfeiffer 1990). Este evento se ha denominado “transición de la permeabilidad” y puede inducirse por diferentes estímulos: isquemia en los mamíferos; un cociente alto de ATP/ADP en *S. cerevisiae*; o la presencia de agentes patógenos en plantas. En 1979 Hunter y Haworth postularon que dicha permeabilidad inespecífica de la membrana es causada por la apertura de un canal proteico transmembranaral denominado poro de transición de la permeabilidad (PTP) o canal inespecífico mitocondrial (MUC) (Haworth y Hunter 1979; Hunter y Haworth 1979).

En mitocondrias aisladas, la consecuencia principal de la apertura de este canal es que la membrana mitocondrial interna se vuelve permeable a los protones, colapsando la fuerza protón-motriz y desacoplando la fosforilación oxidativa. El MUC mide 2.8 nm de diámetro (Massari y Azzone 1972) y deja pasar solutos con una masa molecular de hasta 1.5 kDa (Bernardi y cols. 1994). Esto da lugar al abatimiento de los gradientes mitocondrial y citosólico, causa hinchamiento mitocondrial, ruptura de la membrana mitocondrial externa y liberación del Ca^{2+} matricial. El hinchamiento mitocondrial se da principalmente por la presión oncótica de la matriz mitocondrial. También se ha descrito depleción del glutatión reducido, del NADPH, generación de anión superóxido y liberación de proteínas del espacio intermembranaral.

En cuanto a la estructura del MUC, es un complejo multi-proteico que podría establecerse en puntos de contacto entre la membrana interna y externa (Manon y cols. 1998) o exclusivamente en la membrana interna mitocondrial (Shoshan-Barmatz y cols. 2006). No se sabe qué proteínas lo formen o si este canal se encuentra

permanentemente formado, o se genera en respuesta a condiciones específicas. Sin embargo, podemos considerar eventos claves para su regulación como:

1. Despolarización de la membrana (pérdida del potencial fisiológico ~200mV).
2. pH matricial. El MUC se encuentra cerrado a un pH neutro o ácido debido a la protonación reversible de residuos de histidina y/o la interacción entre la ciclofilina matricial y la ANT. La alcalinización permite la apertura del MUC con un efecto máximo a pH 7.3
3. Cationes divalentes que actúan en al menos dos sitios diferentes, uno externo que al ocuparse por cualquier metal divalente, incluyendo el Ca^{2+} , disminuye la posibilidad de apertura del canal; y un sitio interno cuya ocupación por Ca^{2+} incrementa la probabilidad de apertura, pero la unión de otros cationes divalentes (como Sr^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+}) lo cierran (Bernardi y Petronilli 1996).
4. La oxidación de un tiol específico que aumenta la posibilidad de apertura (cisteína 56 del dímero de ANT), dentro de los valores fisiológicos del potencial de membrana. Es la interconversión ditiol-disulfuro ($\text{HS-SH} \longrightarrow \text{S-S}$) de cisteínas vecinas que afectan los estados de apertura y cierre, asociándose una mayor posibilidad de apertura con la forma oxidada (S-S) (Lê Quôc y Lê Quôc 1985; Bernardi y cols. 1994). El estado redox de este ditiol se encuentra en equilibrio con el glutatión matricial.
5. Estado de oxidación/ reducción de los piridín nucleótidos (NADH/NAD⁺ y NADPH/NADP⁺).
6. Metabolitos: La glucosa y la creatina inhiben la transición de la permeabilidad, presumiblemente a través de acción sobre la hexocinasa y la creatina cinasa. La ubiquinona 0 y decilubiquinona también inhiben la transición de la permeabilidad. Los ácidos grasos de cadena larga, como los gangliósidos y las ceramidas, favorecen la transición de la permeabilidad.
7. Factores pro y anti-apoptóticos de la familia Bcl-2.

El modelo hipotético clásico para la formación del MUC propone como componentes a la translocasa de adenín nucleótidos (ANT) en la membrana mitocondrial interna y al canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) o porina, en la membrana mitocondrial externa. Otras proteínas que se han considerado son la hexocinasa (HKII) (unida a VDAC del lado citosólico de la MEM), la ciclofilina D (Cyp-D) (en la matriz mitocondrial), la creatina kinasa (mtCK) (espacio intermembranal), y el receptor periférico de benzodiazepinas (PBR) (membrana mitocondrial externa) (Fig. 5) (Zamzami y Kroemer 2001).

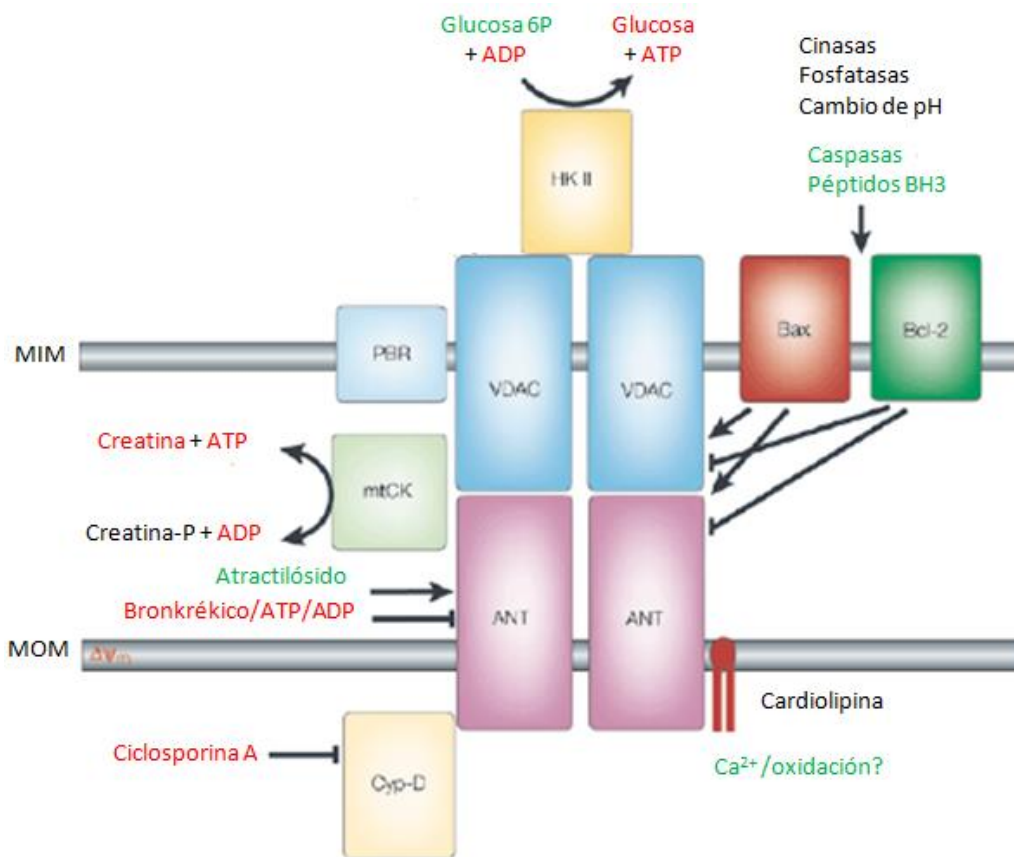


Fig. 5: Estructura del canal inespecífico mitocondrial con sus componentes: La traslocasa de adenín nucleótidos (ANT) en la membrana interna mitocondrial, el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) y el receptor periférico de benzodiazepinas (PBR) en la membrana externa mitocondrial. Factores apoptóticos como Bax y Bcl-2 y otras proteínas como la hexocinasa en citosol, la creatinina cinasa mitocondrial en espacio intermembranal (mtCK) y la cilofilina D (Cyp-D) en la matriz, están involucrados en la regulación del MUC. Se desconoce la estequiometría exacta y los sitios de unión de estos componentes. También se muestran algunos de los moduladores de su actividad, en rojo se encuentran los agentes que inhiben la apertura del MUC y su blanco regulatorio, mientras que en verde se muestran aquellos agentes que lo inducen. OMM es membrana externa mitocondrial, MIM es membrana interna mitocondrial y $\Delta\Psi$ es potencial transmembranal (Zamzami y Kroemer 2001).

Se han identificado MUC's en diferentes especies como mamíferos, peces, invertebrados, plantas y levaduras (Tabla 2). La modulación de estos canales entre las diferentes especies es variable, sugiriendo que es resultado de las condiciones específicas del medio en que se desarrolla cada organismo. El estudio de la estructura, papel fisiológico y regulación de los MUC's de cada organismo puede ayudar a comprender la evolución de estos canales (Uribe-Carvajal y cols. 2011). Su estudio se ha logrado gracias a que la transición del MUC entre el estado cerrado/abierto se puede modular mediante una gran variedad de factores y drogas que son específicos para cada uno de sus componentes proteicos descritos anteriormente (tabla 3).

Tabla. 2. Existencia de MUC's en distintas especies de eucariontes.

Reino	Especie	Nombre común	Referencia
Animalia	<i>Danio rerio</i>	Pez cebra	Azzolin y cols. (2010)
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trucha arcoíris	Krumschnabel y cols.(2005)
	<i>Lepidophthalmus louisianensis</i>	Camarón fantasma	Han y cols.(2009)
	<i>Lampetra fluviatilis</i>	Lamprea de río	Savina y cols.(2006)
Plantae	<i>Zinnia elegans</i>	Zinia	Yu y cols.(2002)
	<i>Solanum tuberosum</i>	Papa	Arpagaus y cols.(2002)
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Arabidopsis	Scott y cols.(2007)
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Tabaco	Lin y cols.(2006)
	<i>Triticum spp</i>	Trigo	Curtis y cols.(2002)
	<i>Avena sativa</i>	Avena	Virolainen y cols.(2002)
Fungi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levadura del pan	Jung y cols.(1997)
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	D. hansenii	Cabrera-Orefice y cols.(2010)

De: Uribe-Carvajal y cols. 2011

Tabla 3. Efectores del canal inespecífico mitocondrial.

Mecanismo	Activador	Inhibidor
Cambios en la unión de la Ciclofilina D a MUC	Estrés oxidativo (en reperfusión, por t-butilhidroperóxido o diamina) o tioles vecinos reactivos (óxido de fenilarsina) que entrecruzan a la Cys ₁₆₀ con Cys ₂₅₇ de la ANT. Incremento en el volumen matricial Agentes caotrópicos	CsA y algunos análogos SfA (inhibe actividad PPIasa de la ciclofilina D pero no se une a ésta.
Efecto a través de cambios en la unión de nucleótidos a la ANT.	Agentes tioles que atacan Cys ₁₆₀ de ANT (eosina maleimida, óxido de fenilarsina, arsenito). Estrés oxidativo (en reperfusión, por t-butilhidroperóxido o diamina) que oxidan el glutatión y entrecruzan la Cys ₁₆₀ con Cys ₂₅₇ de la ANT a su conformación "c" como el carboxiatractilósido. Depleción de adenín nucleótidos Altas concentraciones matriciales de P _i y PP _i Despolarización/Desacoplamiento Ácidos grasos de cadena larga	Incremento en potencial transmembranal que induce conformación "m" de ANT como el ácido bongkrékico y ADP

Efecto sobre el sitio de unión del calcio al MUC	pH básico	Bajo pH Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Sr ²⁺ , Ba ²⁺
Otro mecanismo de acción	Algunos análogos de quinonas (decilubiquinona, ubiquinona 10) que probablemente actúan a través de su unión al complejo I. Peroxinitrito e hidroxinonanal, que pueden modificar covalentemente los componentes del MUC, por ejemplo, de la ANT. Lonidamina	Algunos análogos de quinonas (ubiquinona 0, 2,5-hidroxi-6-undecil-1,4-benzoquinona). Ro 68-3400 que puede unirse a la ANT y PiC. Fenilglioxal que modifica las argininas de un componente del MUC. Monobromobimano y NEM que inducen modificaciones en grupos tioles.

El papel del VDAC en la transición de la permeabilidad.

El canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) o porina mitocondrial es la proteína más abundante en la membrana externa de la mitocondria y está constituido por tres genes (VDAC 1, 2 y 3) que exhiben homología estructural y funcional. La conformación del VDAC depende del voltaje. Bajos voltajes ($\pm 10\text{mV}$) inducen el estado abierto, siendo un canal amplio que permite el paso de moléculas de hasta 5 kDa y presenta mayor afinidad por aniones. Al incrementar el potencial sobre 30 mV se induce su estado cerrado y el VDAC se vuelve permeable a moléculas de 1.5 kDa y es más selectivo para cationes. Respecto a su estructura, la propuesta más aceptada es que este canal es un barril tipo β (Forte y cols. 1987) con un sensor de voltaje que le permite modificar su estado de permeabilidad hacia aniones o cationes (Tikunov y cols. 2010). Este sensor de voltaje estaría constituido por una α -hélice en el extremo N-terminal, que le permite modificar su estado de permeabilidad hacia aniones o cationes, al presentar residuos cargados que interactúan con los sitios opuestos dentro del poro para inducir ya sea el estado abierto o cerrado. Se cree que el estado fisiológico del VDAC es entrecerrado, en el cual interactúa con proteínas del citoesqueleto y con enzimas glucolíticas, también se ha sugerido su participación en la liberación del citocromo c, por lo que se propone que el VDAC tiene un papel en la regulación del metabolismo y de la apoptosis (Pedersen 2008).

Se ha propuesto que el VDAC participa en la formación del canal inespecífico mitocondrial. Se demostró que el VDAC es modulado por NADH, Ca^{2+} y glutamato, los cuales también modulan el MUC (Bernardi y cols. 2006). Al incorporar el VDAC en bicapas de fosfolípidos se forman canales de 2.5 a 3nm, cuyas propiedades electrofisiológicas son parecidas a las del MUC (Szabó y Zoratti 1993). Por otro lado, mediante cromatografía de afinidad, con CyP-D como ligando, el VDAC puede ser purificado y reconstituido, y es sensible a CsA (Crompton y cols. 1998). La idea de que el VDAC es un componente del MUC se reforzó mediante experimentos de hinchamiento mitocondrial con distintos inhibidores, el inhibidor Ro 68-3400 tiene alta afinidad para el VDAC (Cesura y cols. 2003). Finalmente, se ha visto que el MUC es regulado por cationes a nivel del VDAC, por ejemplo, dos Glu localizados en dos diferentes asas del VDAC donde interactúa el Ca^{2+} (Gutiérrez-Aguilar y cols. 2007).

El papel de la translocasa de adenín nucleótidos (ANT) en la transición de la permeabilidad.

La translocasa de adenín nucleótidos (ANT) transporta a la matriz mitocondrial el ADP citosólico y hacia el citosol el ATP recién sintetizado. Es un homodímero de subunidades de 30 kDa con un sitio de unión al ATP o al ADP que alterna hacia el interior y el exterior. El lado de la membrana interna es el sitio m y el del lado citoplásmico es el sitio c. Este intercambio mueve una carga negativa por ciclo de transporte y se impulsa por potencial de membrana (Nelson y Cox 2013). La ANT pertenece a la familia de acarreadores mitocondriales, caracterizada por la firma PX(D/E)XX(K/R) (Pebay-Peyroula y cols. 2003).

La apertura del MUC es susceptible a los ligandos de ANT (Haworth y Hunter 1980; Panov y cols. 1980). Los sustratos de la ANT (ADP, dADP, ATP) interactúan específicamente con el MUC. Los que se unen al sitio m (ácido boncrékico) inhiben el MUC, mientras que los que se unen al sitio c (atractilósido y fosfato piridoxal) lo activan (de Macedo 1993) (Lê Quôc y Lê Quôc 1988).

Mediante sistemas reconstituidos se ha estudiado si el ANT provee por sí mismo la estructura del canal en la membrana interna. Cuando el ANT es incorporado en liposomas, en altas concentraciones de calcio cambia de un antiportador selectivo a no selectivo. Al igual que en el MUC, en estas condiciones el calcio actúa reversiblemente (Brustovetsky y Klingenberg 1996). El grupo de Bernardi propuso que

la modulación del MUC se da a través de un cambio en el potencial de superficie, provocado por el cambio de conformación de la ANT, el cual sería capaz de abrir el canal. Por otro lado, existe evidencia de que el ANT no es esencial para la formación del MUC, ya que mutantes carentes del acarreador exhiben transición de la permeabilidad dependiente de Ca^{2+} y sensible a CsA.

La ciclofilina D

Haworth y Hunter en 1979 (Haworth y Hunter 1979; Hunter y Haworth 1979) propusieron que la TP se encontraba regulada por un canal lo que fue considerado seriamente hasta que se demostró que esta TP es inhibida por la ciclosporina A (CsA). Los efectos biológicos de este inmunosupresor están mediados por su unión a las ciclofilinas, que poseen actividad peptidil-prolil-*cis-trans*-isomerasa. La mitocondria posee solamente una ciclofilina matricial, la ciclofilina D (CyD). Se propuso que la CsA inhibe el MUC por la unión de la ciclofilina D (Connern y Halestrap 1996). La actividad peptidil-prolil-*cis-trans*-isomerasa es inhibida como resultado de la unión de la CsA, sin embargo, es muy probable que esta actividad no sea esencial para la regulación del canal, debido a que otros compuestos que inhiben por completo la actividad peptidil-prolil-*cis-trans*-isomerasa no son capaces de prevenir la apertura del MUC (Nicolli y cols. 1993).

Se ha sugerido que la apertura irreversible de este canal lleva a la autofagia, apoptosis (Kroemer y cols. 1997) o necrosis, y que opera en condiciones patológicas (Gunter y Pfeiffer 1990; Richter 1993). En los mamíferos y plantas la apertura de este canal lleva a muerte celular por cuatro mecanismos: disminución de los niveles de ATP, incremento del calcio citosólico, liberación de factores apoptóticos (caspasas) y liberación de citocromo *c* (Fontaine y cols. 1998a). Por otro lado, se ha propuesto que el MUC puede funcionar bajo condiciones fisiológicas (Ilichas y Mazat 1998) y su apertura puede ser transitoria (Hüser y Blatter 1999). La transición de la permeabilidad mitocondrial de *S. cerevisiae* probablemente funcione como una válvula de escape del excedente de energía, disminuyendo el anabolismo y deteniendo el crecimiento. Además, el desacoplamiento aumentaría la actividad de la cadena respiratoria previniendo la producción de EROs (Gutiérrez-Aguilar 2010).

El papel de los canales inespecíficos mitocondriales en la apoptosis.

La mayoría de los estímulos que conducen a la apoptosis convergen en la mitocondria y provocan una permeabilización de su membrana externa. Con la permeabilización se libera una serie de proteínas que activan a las caspasas (Amarante y Green 1999; Susin y cols. 1999; Hengartner 2000). Éstas inducen la mayoría de los acontecimientos proteolíticos de la apoptosis y son consideradas como responsables finales de la muerte celular. Actualmente se reconocen dos vías que permiten la activación de las caspasas. Una es iniciada por señales externas que activan un receptor de muerte en la superficie celular (vía extrínseca). La otra es disparada por cambios en la integridad mitocondrial (vía intrínseca) (Hengartner 2000; Thorburn 2004).

Respecto a la vía intrínseca, la mitocondria además de ser la principal fuente de EROs (potentes activadores de la apoptosis), contiene factores proapoptóticos, que en última instancia conducirán a la muerte celular. Para las mitocondrias de mamíferos, existen dos mecanismos principales para la liberación de factores apoptóticos desde el espacio intermembranal: El primero involucra proteínas de la familia Bcl-2 que se sintetizan justamente en la membrana de la mitocondria e incluye proteínas con actividad proapoptótica y antiapoptótica que promueven o bloquean la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, respectivamente (Shimizu y cols. 2004). Las proteínas proapoptóticas, como Bax, interaccionan con la membrana externa permitiendo la formación de canales al oligomerizarse e interaccionar con lípidos capaces de adquirir curvaturas negativas mientras que las proteínas antiapoptóticas inhiben los cambios conformacionales que permiten la formación de dichos canales (Antonsson y cols. 2001; Basañez y cols. 2002).

La permeabilización de la membrana interna mitocondrial mediante la apertura del canal inespecífico mitocondrial es el segundo mecanismo de apoptosis. La permeabilización induce la muerte celular mediante la liberación de proteínas activadoras de las caspasas, la liberación de moléculas involucradas en muerte celular independiente de caspasas, y la pérdida de funciones mitocondriales esenciales (Green y Kroemer 2004).

Anteriormente se pensaba que la apoptosis era un proceso que sólo se presentaba en el reino animal, ya que no se habían encontrado genes análogos que codificaran para factores apoptóticos en los genomas de organismos unicelulares. Sin

embargo, se descubrió un tipo de muerte celular similar a la apoptosis mediante experimentos en los cuales se expresaron heterológamente factores pro y anti apoptóticos de animales en *S. cerevisiae*. Estas proteínas no son exclusivas para esta levadura, se ha descubierto que *Y. lipolytica* contiene los mismos factores apoptóticos que *S. cerevisiae*, además de que se pueden encontrar proteínas involucradas con la formación del MUC (tabla 4) (Kovaleva y cols. 2010)

Tabla 4. Componentes que podrían encontrarse involucrados en la formación de MUC y factores apoptóticos en *Y. lipolytica* y *S. cerevisiae*.

Proteína	Genes	Grado de homología con <i>S. cerevisiae</i>
Citocromo c	CYC1	70-80% con dos isoformas de cyt c.
Porina mitocondrial	OR YALI0F17314g	42% con porina mitocondrial
Ciclofilina D	CRP6	46%
Translocasa de adenín nucleótidos	YIAAC1, AAC2, AAC3 OR YALI0F04059g	70-80% con las tres isoformas. 60%
Metacaspasa 1	OR YALI0D05071g	66%
Endonucleasa G	OR YALI0F31603g	49% (Nma11p en <i>S. cerevisiae</i>).
Proteasa HtrA	OR YALI0E31273g	30%
Rad9p	ALG2	42%
Alg2p	OR YALI0A09020g	30%
Ysp1p		

De: Kovaleva y cols. 2010.

En estudios realizados con proteoliposomas, se ha observado que los miembros de la familia Bcl-2 pueden interactuar con proteínas asociadas a la formación del MUC (VDAC, ANT), modulando su actividad e inhibiendo su conductancia, mientras que Bax puede inducirla (Marzo y cols. 1998; Shimizu y cols. 2004). También pueden interactuar con moléculas del metabolismo intermediario, como por ejemplo la hexoquinasa (Harris y Thompson 2000). Estos resultados sugieren que posiblemente exista una relación entre la regulación de la apoptosis y las demandas metabólicas de la célula.

Respecto al citocromo c, existen tres propuestas principales acerca de cómo se fuga hacia el citoplasma. Se propone que se libera a través de los poros que se forman mediante la asociación de los miembros de la familia Bcl-2 con la membrana externa. El segundo modelo propone la ruptura de la membrana mitocondrial externa

como consecuencia del hinchamiento mitocondrial por la apertura del MUC. En el tercer modelo el citocromo *c* se fuga por el MUC (Martinou y Green 2001). Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes. Una vez en el citoplasma, el citocromo *c* interacciona con las proteínas Apaf-1 y caspasa-9 en presencia de ATP, constituyendo el apoptosoma, un complejo catalítico que inicia la activación en cascada de caspasas.

Con la permeabilización también se liberan otras proteínas mitocondriales que son efectores de muerte celular independientes de caspasas, capaces de traslocarse al núcleo y promover directamente la fragmentación del DNA (p.ej. AIF o *apoptosis inducing factor*, y Endo G) (van Gurp y cols. 2003).

Los canales inespecíficos mitocondriales como mecanismos para evitar la formación de EROs.

En las últimas décadas, se ha buscado una explicación acerca de cómo se regula el consumo de oxígeno y la fosforilación oxidativa:

- Chance y Williams (1955) propusieron que el consumo de oxígeno depende de los procesos que utilizan ATP.
- Erencinksa y Wilson (1982) propusieron que la actividad de la citocromo *c* oxidasa no se encuentra en equilibrio termodinámico, por lo que en ésta recaería el control del flujo respiratorio.
- Kunz y cols. (1981) proponen que la regulación de la actividad de la translocasa de adenín nucleótidos (ANT) podría controlar la tasa de consumo de oxígeno (JO_2).
- Hansford (1985) propuso el aporte de equivalentes reductores provenientes de la actividad de las deshidrogenasas matriciales como un punto de regulación.
- Halestrap (1989) propuso que los cambios en el volumen mitocondrial pueden modular la actividad de la cadena respiratoria.

Groen y cols. (1982) introdujeron el concepto de control metabólico mitocondrial y definieron el estado 4 como aquel en que la mitocondria consume oxígeno lentamente, controlado por la entrada pasiva de H^+ a la matriz mitocondrial. En esta condición, el consumo de ATP es lento y la relación ATP/ADP es elevada. En el estado 3 la relación ATP/ADP disminuye, hay producción de ADP y el consumo de oxígeno aumenta (Chance 1955). El cociente estado 3/estado 4 es el control

respiratorio, e indica que la mitocondria es capaz de catalizar la fosforilación oxidativa. Sin embargo, bajo condiciones no fosforilantes (estado 4) se observa inhibición de la respiración debido al potencial transmembranal, ocasionando la producción de ERO. Con el fin de evitar la producción de ERO, existen mecanismos que permiten un alto consumo de oxígeno en estas condiciones. El desacoplamiento fisiológico juega un papel importante en la regulación metabólica y en procesos como la apoptosis, pues disocia la respiración de la fosforilación oxidativa. Este proceso ocurre mediante dos mecanismos: i) disipadores del gradiente de protones como los canales inespecíficos mitocondriales (MUC's) (conocido en mamíferos como poro de la transición de la permeabilidad, PTP), y las proteínas desacoplantes (UCP's); ii) enzimas redox que no bombean protones, como las oxidoreductasas alternativas y el slipping (Guerrero-Castillo y cols. 2011).

Las enzimas redox que no bombean protones (NADH deshidrogenasas tipo 2 y oxidasas alternas) se encuentran en plantas y organismos unicelulares con cadenas alternas. El *slipping* es la variación de la estequiometría protón/electrón de un complejo respiratorio (Fig. 4).

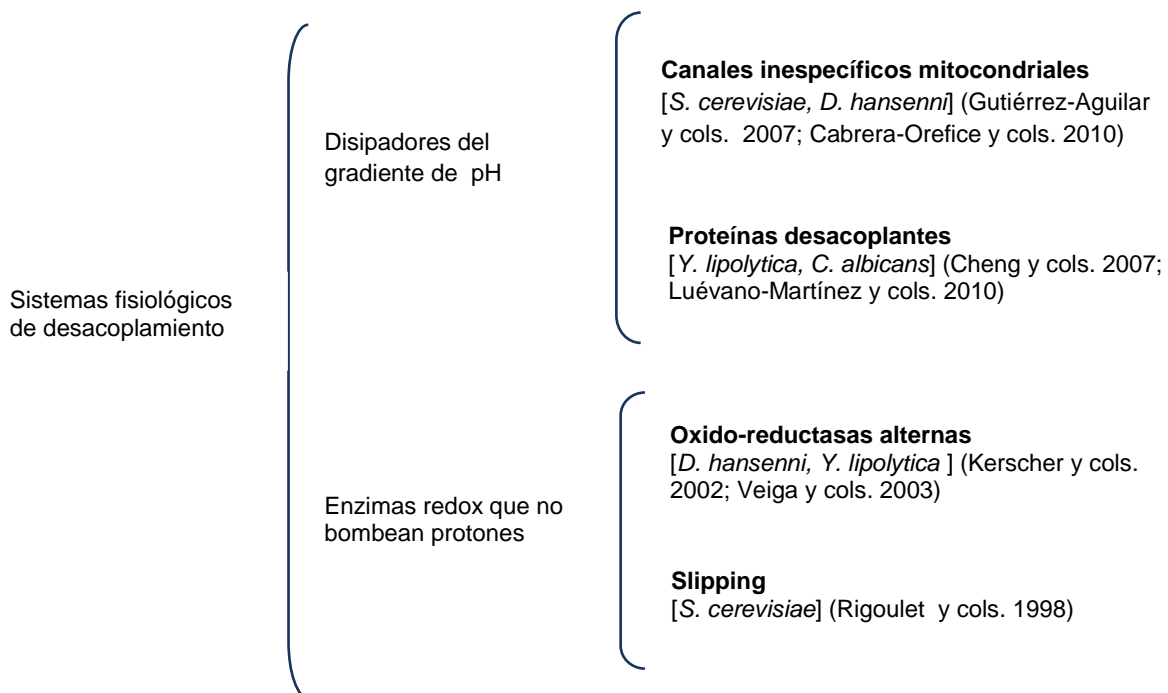


Fig. 4. Sistemas fisiológicos de desacoplamiento. La tasa de consumo de oxígeno se puede acelerar de manera independiente de la síntesis de ATP, mediante la depleción del gradiente de pH o por la reducción no productiva de oxígeno. Tomada de: Guerrero-Castillo y cols. 2011.

ANTECEDENTES

La levadura Saccharomyces cerevisiae como modelo de estudio.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 5) es un eucarionte simple cuyo genoma puede ser fácilmente manipulado. En 1996, su genoma fue secuenciado y fue el primero entre los eucariontes. Algunas de las propiedades que permiten que esta levadura sea adecuada para estudios biológicos incluyen su rápido crecimiento, las células dispersas, la facilidad de réplicas en placas y aislamiento de mutantes, un sistema genético bien definido, y un sistema de transformación de DNA altamente versátil, además de ser una levadura no patógena. Es útil en bioenergética por ser aerobio facultativo, capaz de crecer sin fosforilación oxidativa (Sherman 2002).

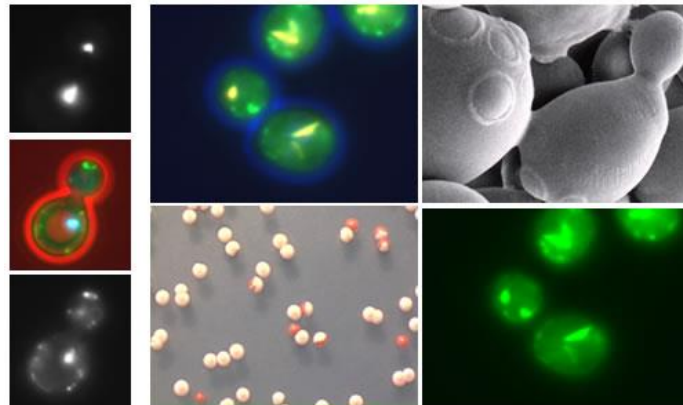


Fig. 5. Imágenes de la levadura *S. cerevisiae*. **De:** University of Kent Biosciencias.

En: <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/2004/bossie/mfyg.html>

La levadura contiene 16 cromosomas que van desde 200 a 2200 kb. Puede ser haploide o diploide. La secuencia haploide total de DNA cromosómico es de 12052 kb y tiene un total de 6183 ORFs de más de 100 aminoácidos, 3.8% contienen intrones. Contiene aproximadamente 5750 genes que codifican para proteínas y se ha caracterizado la función de al menos 30% de ellos. Contiene 262 genes de ARNt, de los cuales 80 tienen intrones. El DNA mitocondrial codifica para los componentes de la maquinaria de traducción mitocondrial y aproximadamente el 15% de las proteínas mitocondriales. Las mutantes carentes de DNA mitocondrial presentan deficiencias respiratorias, sin embargo, son viables y conservan mitocondrias, aunque morfológicamente anormales (Sherman 2002). En *S. cerevisiae* se demostró la existencia de un MUC y se caracterizó el papel de ANT, VDAC y PiC.

La cadena respiratoria de *Saccharomyces cerevisiae*.

La cadena respiratoria de *S. cerevisiae* carece de complejo I. Sin embargo, contiene tres NADH deshidrogenasas alternas que alimentan la cadena respiratoria, una unida a la parte interna membrana interna (N1dp) y dos a la parte externa (Nde1p y Nde2p); además contiene una alcohol deshidrogenasa matricial (Adh3), una glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa que reduce dihidroxiacetona fosfato a glicerol-3- fosfato, y la succinato deshidrogenasa o complejo II. Cuenta con las bombas primarias del complejo III, complejo IV y con la ATP sintasa o complejo V (Fig. 6).

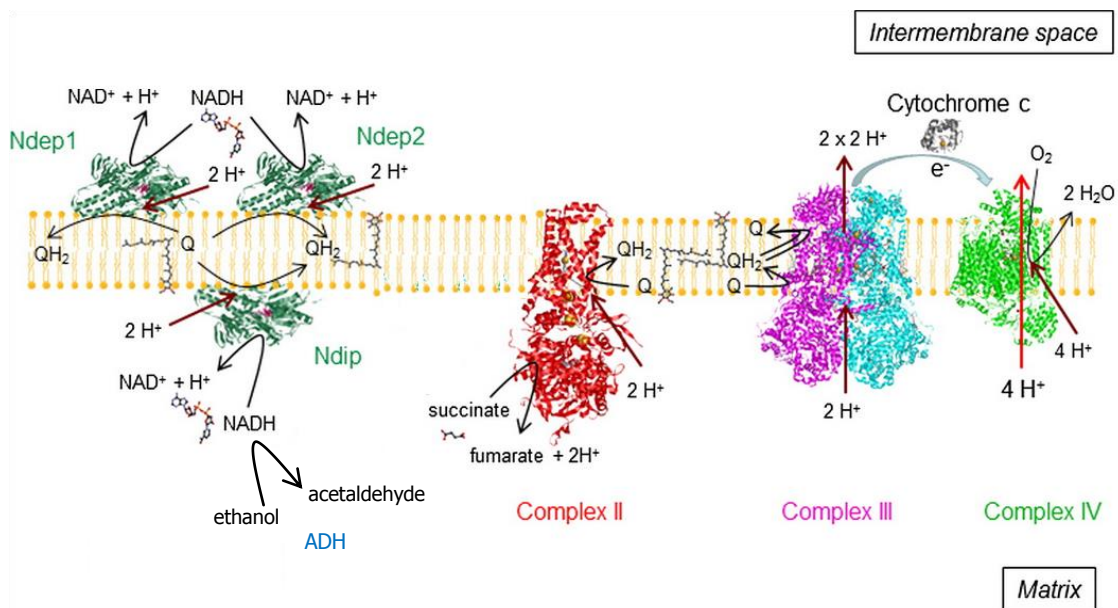


Fig 6. Esquema parcial de la cadena respiratoria de *S. cerevisiae*. Esta levadura no presenta complejo I, en su lugar tiene dos NADH deshidrogenasas externas (Nde1p y Nde2p) y una interna (Ndi1p). El complejo II es la succinato deshidrogenasa. Q es quinona, QH₂ es quinol. Las flechas rojas indican los protones translocados a través de la membrana durante la actividad de los complejos respiratorios III y IV. ADH es la alcohol deshidrogenasa matricial.

El canal inespecífico mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* (*scMUC*).

Distintos estudios intentaron demostrar la existencia de un MUC en levaduras con resultados contradictorios e inciertos antes de lograr evidencia concreta. La primera evidencia acerca de la existencia de un canal inespecífico fue obtenida por De Chateaubodeau y cols. (1974; 1976) que estudiaron el transporte de fosfato a través de la membrana interna mitocondrial en una cepa Yeast Foam (PS194), observando hinchamiento mitocondrial al añadir una suspensión de mitocondrias en un medio isosmótico con potasio y fosfato en presencia de valinomicina.

Velours (1977) demostró la existencia de un sistema capaz de transportar moléculas relativamente grandes y neutras en una cepa industrial. Guérin y cols. (1994) demostraron hinchamiento mitocondrial inducido por la estimulación en la respiración en una solución isoosmótica de gluconato y potasio en una cepa industrial, sin embargo, este hinchamiento no se inhibió con fosfato. Jung y cols. (1997) observaron la permeabilidad a manitol inducida por la respiración. Estos autores estimaron que el tamaño de este canal es cerca de 1100 Da. Roucou y cols. (1997) distinguieron entre el transporte de K^+ inducido por la respiración y el transporte de cloruro de potasio de acuerdo con su distinta sensibilidad al fosfato. También se probaron moléculas neutras como el manitol y gluconato. Por otro lado, diversos autores demostraron la existencia de un sistema que también conducía al hinchamiento mitocondrial y a la estimulación de la respiración en presencia de ATP y de otros nucleótidos trifosfatos (GTP, CTP) hidrolizables; sin embargo, los resultados dependieron de la cepa utilizada. Otra diferencia fue la distinta sensibilidad a decavanadato y fosfato. El decavanadato es un inhibidor competitivo que se une a enzimas con sitios de unión a nucleótidos e inhibe el canal a bajas concentraciones (10 μ M) que no interfieren con la actividad de la ANT y la F_0F_1 -ATPasa/ ATP sintasa.

Szabo y cols. (1995) aplicaron la técnica de patch-clamp en mitocondrias aisladas de levadura y observaron un canal con múltiples niveles de conductancia (100-600 pS) y que no era inhibido por la CsA, ADP o protones. Estos autores tampoco observaron hinchamiento relacionado con el calcio ni fueron concluyentes respecto a la existencia del YMUC. Sin embargo, Lohret y Kinally mediante patch-clamp describieron un canal en mitocondrias de levadura con múltiples conductancias de 1-1,5 nS y concluyeron que este canal representaba el MUC en levaduras. Ballarin y Sorgato (1995), también utilizaron la técnica de patch-clamp en mitoplastos de levadura y describieron un canal de baja conductancia que permanece abierto en presencia de ATP.

Estos resultados permitieron establecer que la permeabilidad de la membrana interna por ATP y la estimulación de la respiración se debía a la inducción de un canal inespecífico denominado como YMUC (Yeast mitochondria unselective channel), y que puede ser inducido de distintas maneras (Figura 7).

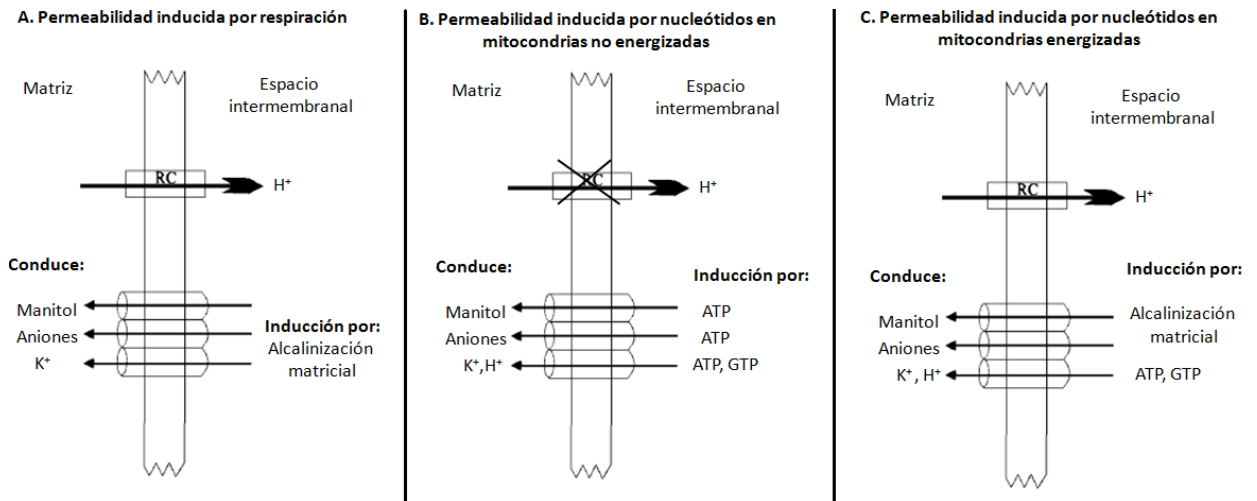


Fig. 7. Mecanismos para inducir el YMUC. A) En presencia de sustratos respiratorios y en ausencia de fosfato, el YMUC es activado por la alcalinización matricial vía el intercambiador K/H. Esta ruta es principalmente catiónica y se inhibe a bajas concentraciones de fosfato (0.5-1 mM), mientras que la ruta aniónica y neutral (transporte de manitol, por ejemplo) requiere altas concentraciones de fosfato (5-10 mM) para ser inhibida. B) En ausencia de sustrato respiratorio hay activación del YMUC por nucleótidos trifosfatos hidrolizables, conduciendo a hinchamiento mitocondrial en presencia de sales. Bajo condiciones ligeramente hipotónicas, el hinchamiento no requiere presencia de sales. Hay transporte de protones, pero solo en cepas de laboratorio. El Mg²⁺ inhibe específicamente el transporte de aniones. El decavanadato y altas concentraciones de fosfato previenen esta inducción por nucleótidos. C) En presencia de un sustrato respiratorio y bajas concentraciones de fosfato (0.5-1 mM), se requieren los nucleótidos para activar la ruta catiónica: las cargas positivas colapsan el potencial transmembranal y estimulan la cadena respiratoria. Las rutas aniónica y neutral son activadas por alcalinización de la matriz. Bajo condiciones hipotónicas, el manitol es transportado por el YMUC. El decavanadato y altas concentraciones de fosfato previenen esta inducción por nucleótidos.

Modificado de: (Manon y cols. 1998)

El canal inespecífico mitocondrial de *S. cerevisiae* (_{sc}MUC) se ha podido estudiar aprovechando que es un organismo de fácil manipulación y aerobio facultativo. En nuestro laboratorio se está trabajando para comprender la estructura y regulación del _{sc}MUC y se ha establecido que puede considerarse como un modelo para la comprensión de ciertos aspectos del MUC de otras especies (Gutiérrez Aguilar y cols. 2011). El _{sc}MUC presenta similitudes y diferencias en cuanto a la estructura y regulación con el MUC de los mamíferos (_mMUC) (Tabla 5 y Fig. 8).

Tabla 5. Efectores de la regulación del m MUC y sc MUC

Efector	Blanco	m MUC	sc MUC
Alquilaminas	VDAC/ANT	Inhibe	Inhibe
Atractilósido	ANT	Induce	Inhibe
Ciclosporina A	Cyc D	Inhibe	Sin efecto
Ácido bonkrékico	ANT	Inhibe	Induce
ATP		Inhibe	Induce
ADP	ANT	Induce	Inhibe
Pi		Induce	Inhibe
Ca ²⁺	Desconocido	Induce	Inhibe
Mersalil	PiC		Induce
Decavanadato	VDAC		Inhibe
Octilguanidina	VDAC		Inhibe

De: (Gutiérrez Aguilar 2011).

Respecto a las similitudes entre el sc MUC y m MUC se sabe que ambos canales son principalmente aniónicos y permiten el transporte no selectivo de moléculas de hasta 1.5 kDa. Entre las diferencias más notables se encuentra la regulación de ambos canales por ciclosporina A (CsA), por Ca²⁺, ATP, ADP y Pi. El sc MUC es inducido por la adición de ATP e inhibido por la adición de ADP o Pi; mientras que el m MUC es regulado de manera contraria, es inhibido por ATP e inducido por ADP o Pi (Castrejón y cols. 1997; Halestrap y Pasdois 2009). En el caso del Ca²⁺, se ha observado que es capaz de inducir la TP en mamíferos, mientras que inhibe la TP en *S. cerevisiae*, sin embargo, en presencia de un ionóforo de calcio (ETH129) el sc MUC es capaz de experimentar una TP debida a la rápida entrada del catión a la matriz mitocondrial (Yamada y cols. 2009), cualquier efecto (positivo o negativo) se incrementa por Pi. Finalmente, la CsA actúa inhibiendo al m MUC a través de la ciclofilina D (Baines y cols. 2005), mientras que el sc MUC (YMUC) es insensible a la CsA por carecer de una ciclofilina D membranal, a pesar de que *S. cerevisiae* expresa una ciclofilina matricial involucrada en el plegamiento de proteínas sensibles a CsA.

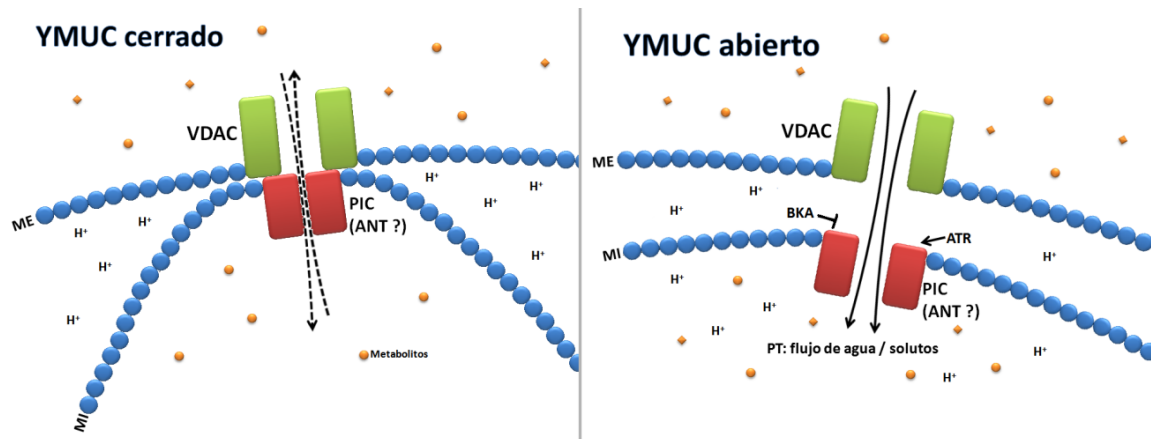


Fig. 8 YMUC en estado cerrado y abierto. En verde el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en la membrana mitocondrial externa. En rojo la translocasa de adenín nucleótidos (ANT) y el acarreador de fosfatos (PiC) en la membrana mitocondrial interna. Las flechas indican el paso de agua y solutos a través de las membranas mitocondriales: cuando el YMUC se encuentra cerrado, el paso de solutos se encuentra regulado, pero con el YMUC abierto este flujo de solutos es inespecífico, hay hinchamiento mitocondrial y pérdida del potencial transmembranal por la fuga de protones a través del YMUC.

Respecto a la estructura, se propone el VDAC, PiC y ANT, proteínas que tienen otros roles metabólicos, tienen además un papel regulatorio o estructural en el $_{sc}MUC$ (Fig. 8). Sin embargo, en diversos experimentos con mutantes nulas, el canal inespecífico se sigue detectando (Roucou y cols. 1997a). Entre las proteínas mutadas figura Por1; este canal permeabiliza la membrana externa a iones y metabolitos (de Pinto 2003). A pesar de que la eliminación de esta proteína no es letal, esta delección lleva a una reducción considerable en la internalización de sustratos respiratorios como el NADH; sin embargo, se ha registrado permeabilidad residual en este tipo de levaduras.

El flujo de electrones del complejo I como facilitador de la formación del MUC de mamíferos ($_{m}MUC$) y su regulación por análogos de quinonas.

Fontaine y cols. (1998) propusieron el flujo de electrones provenientes del complejo I como facilitador de la formación del canal inespecífico mitocondrial de mamíferos ($_{m}MUC$). Utilizando distintos sustratos respiratorios demostraron que la transición de la permeabilidad inducida por pulsos de calcio es más rápida al utilizar sustratos para el complejo I que para el complejo II. Estos resultados fueron apoyados mediante experimentos que sugerían una mayor despolarización en mitocondrias energizadas con sustratos para el complejo I. Se comparó también la despolarización inducida al aumentar la concentración de FCCP y de KCN⁻ en condiciones de $_{m}MUC$ abierto (inducido con por calcio) y con el $_{m}MUC$ cerrado (inhibido por CsA) para

determinar si el efecto de los sustratos del complejo I sobre la apertura del canal sólo depende de un cambio en el umbral del voltaje o también dependen de la tasa de electrones a través del complejo I, observándose una inducción de la despolarización mediada por calcio con la adición de FCCP en las mitocondrias energizadas con glutamato/malato/piruvato (Fontaine y cols. 1998a).

Se estudió el efecto de análogos de las quinonas sobre el m MUC, en mitocondrias aisladas de hígado de rata midiendo su eficacia sobre la capacidad de retención de calcio en mitocondrias y para inducir la apertura del MUC, comparando sus efectos con los de la CsA. Para cada compuesto se utilizó la concentración que causara el efecto máximo (Walter y cols. 2002). Con base en los resultados se ha demostrado que existen tres clases distintas de quinonas:

Clase I. Inhibidoras. Incrementan la retención de calcio de manera sigmoidea, a diferentes concentraciones óptimas; algunas, a concentraciones más altas disminuyen su eficacia y comienzan a inducir la TP (Fontaine y cols. 1998b; Walter y cols. 2002). La inhibición por parte de las quinonas del grupo I no se limita a la TP inducida por calcio o por fosfato; también se observa con otros inductores, como el atractilato, estrés oxidativo y despolarización mitocondrial.

Clase II. Activadoras. Inducen la TP ante una concentración de calcio menor a la requerida en ausencia de estos compuestos. Los efectos son más simples que en el grupo I, causando una disminución monotónica (creciente) en la capacidad de retención de calcio (Fontaine y cols. 1998b; Walter y cols. 2002).

Clase III. Inactivas. Compiten con las del grupo I ó II (Walter y cols. 2002), sugiriendo que existe un sitio común de unión para las quinonas involucrado con la regulación del MUC (Fontaine y cols. 1998b).

Se han identificado 18 quinonas que tienen efecto sobre el m MUC han sido identificadas entre más de 70 análogos de quinonas. Se probaron algunas en las que el carbono 6 del anillo de benzoquinona estaba sustituido con diferentes cadenas laterales y los radicales de los carbonos 2, 3 ó 5 se perdieron total o parcialmente (Fontaine y cols 1998b). El hecho de que se requieran características químicas específicas para la regulación del MUC y su modulación, ha llevado a proponer que las quinonas se unen a un sitio específico en el MUC, volviéndolo más o menos sensible al calcio. Para comprobar esto se estudiaron los efectos de combinaciones de

quinonas, demostrando que todas comparten un sitio de unión y compiten de acuerdo con sus afinidades por ese sitio (Fig. 9) (Walter y cols. 2002).

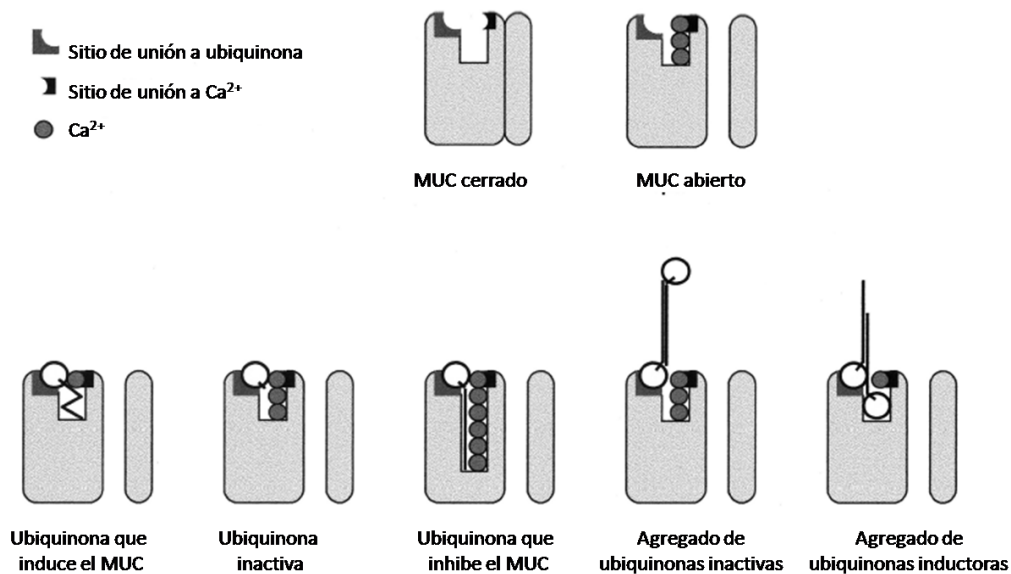
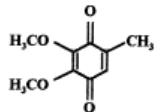
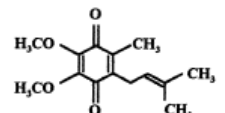
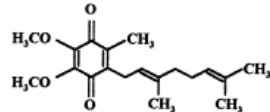
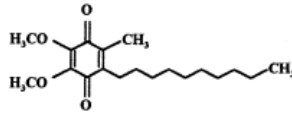


Fig 9. Modelo de la regulación del MUC por análogos de quinonas. Se requiere menor concentración de calcio para abrir el MUC en presencia de una quinona activadora (grupo II), mientras que se requiere mayor cantidad de calcio en presencia de quinonas inhibidoras e inactivas (grupo I y III). Este modelo también puede explicar el comportamiento bifásico de algunas quinonas. Debido a su alta hidrofobicidad, tenderían a acumularse en las membranas mitocondriales, y sólo una pequeña porción sería soluble en agua donde las quinonas se organizan en estados monoméricos. El espacio abierto entre los rectángulos denota el estado abierto del MUC. Modificado de: Walter y cols. 2002.

Por otro lado, se han probado los efectos de distintos análogos de quinonas en diferentes líneas celulares, y se ha demostrado que tienen efecto sobre la viabilidad celular al tener propiedades pro o antioxidantes y ser capaces de generar ERO. En el caso de las quinonas inhibidoras o de clase I, son capaces de prevenir la muerte inducida por la apertura del m MUC sólo si no son tóxicas *per se*. Sin embargo, los efectos son variados y diferentes según la línea celular que se utilice (Tabla 6).

En este trabajo estudiamos la posibilidad de que el complejo I no esté jugando un papel como facilitador de la apertura del MUC utilizando a *S. cerevisiae* como modelo de estudio, ya que esta levadura carece de complejo I.

Tabla 6. Efecto de análogos de quinonas sobre la capacidad de retención de calcio, el $mMUC$, su efecto en la producción de ROS y toxicidad en distintas líneas celulares

Análogo de quinona	Estructura	Línea celular	Efecto sobre la CRC	Efecto sobre el $mMUC$	Efecto oxidante	Tox*	Referencia
Q₀		U937	Disminuye	Activador	Prooxidante	+	Devun y cols. 2010
		Hepatocitos	Aumenta	Inhibidor			Devun y cols. 2010
		Clona-9	Aumenta	Inhibidor	Prooxidante	+	Devun y cols. 2010
		MH1C1	Disminuye	Activador	Antioxidante	--	Devun y cols. 2010
		RLM	Aumenta	Inhibidor			Walter y cols. 2002
Q₁		U937	Sin efecto	Sin efecto	Prooxidante	+	Belliere y cols. 2012
		Hepatocitos	Sin efecto	Sin efecto			Devun y cols. 2010
		Clona-9	Disminuye	Activador	Prooxidante	+	Devun y cols. 2010
		MH1C1	Sin efecto	Sin efecto	Antioxidante	--	Devun y cols. 2010
		RLM	Sin efecto	Sin efecto			Fontaine y cols. 1998b
Q₂		U937	Aumenta	Inhibe	Prooxidante	--	Belliere y cols. 2012
		Hepatocitos	Aumenta**	Inhibidor***			Devun y cols. 2010
		Clona-9	Sin efecto	Sin efecto	Prooxidante	nd	Devun y cols. 2010
		MH1C1	Sin efecto	Sin efecto	Antioxidante	nd	Devun y cols. 2010
		RLM	Aumenta**	Inhibidor***	Nd	nd	Walter y cols. 2002
DQ		Hepatocitos	Aumenta**	Inhibidor***			Devun y cols. 2010
		Clona-9	Aumenta	Inhibidor	Antioxidante	--	Devun y cols. 2010
		MH1C1	Aumenta	Inhibidor	Antioxidante	--	Devun y cols. 2010
		RLM	Aumenta	Inhibidor	Nd	Nd	Walter y cols. 2002;
							Fontaine y cols. 1998b

U937. Linfoblastos (de linfomas histiocíticos) permeabilizados. Clona-9. Hepatocitos no cancerosos permeabilizados de rata. MH1C1. Hepatocitos cancerosos permeabilizados de rata. Hepatocitos permeabilizados de rata. RLM. Mitocondrias de hígado de rata *Toxicidad: Causa muerte celular ** A bajas concentraciones aumenta la capacidad de retención de calcio (CRC), no obstante, a altas concentraciones, la disminuye *** A bajas concentraciones, inhibe la apertura del $mMUC$ mientras que a altas concentraciones, lo induce.

HIPÓTESIS

Si distintos análogos de las quinonas regulan el canal inespecífico mitocondrial de mamífero, entonces estos deben tener efectos similares sobre el canal inespecífico mitocondrial de la levadura.

OBJETIVOS

General

Determinar si existe un efecto de análogos de las quinonas sobre el canal inespecífico mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*.

Particulares

1. Determinar los efectos de análogos de quinonas sobre el $_{sc}MUC$.
2. Determinar la existencia de algún sitio de interacción de los análogos de quinonas al $_{sc}MUC$.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estrategia

Se investigó el posible efecto regulatorio de algunos análogos de quinonas sobre el s_c MUC, mediante la utilización de una cepa industrial. Las mitocondrias se sometieron en condiciones experimentales para activar el s_c MUC y se añadieron diferentes concentraciones de distintos análogos de quinonas para analizar su efecto sobre la actividad respiratoria, el potencial transmembranal y el hinchamiento mitocondrial. Se utilizaron etanol o succinato como sustrato respiratorio.

Material biológico y reactivos

Se utilizó la cepa industrial *La Azteca*, la cual se adquirió periódicamente. Los reactivos utilizados fueron de grado analítico, el sulfato de amonio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, ácido succínico, se adquirieron en J.T. Baker. El MES, manitol, albúmina, safranina-o, glucosa, la decilubiquinona, Q_6 , Q_{10} y Q_1 se adquirieron de Sigma-Aldrich, Co.

Condiciones de crecimiento

Medio de cultivo

Se cultivaron 40 grs. de levadura *La Azteca* en un litro de medio Klöett, que contiene:

Reactivo	g/L
K_2HPO_4	2
$(NH_4)_2SO_4$	6
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.513
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.382
Bactopeptona	5
Extracto de levadura	2.5
Lactato	7.2 (ml/L)
Glucosa	40

Crecimiento de las levaduras

Las levaduras cultivadas se dejaron crecer durante 8 horas en medio Kloett a 30°C; después se lavaron con agua destilada y se ayunaron durante 16 horas antes de la obtención de las mitocondrias (Pérez-Vázquez 2003).

Obtención de las mitocondrias

Las células cultivadas en medio Kloett se cosecharon después de 16 hrs. de ayuno; se lavaron y resuspendieron en 5 mM de MES, 0.6 M de manitol, 0.1% de BSA (ajustado a pH 6.8 con trietanolamina). Las células se rompieron con un homogenizador de células Bead Beater (Biospec Products, OK, USA) con perlas de vidrio de 0.45 mm, dando pulsos 3 veces por 25 s con descansos de 40 s. Para el aislamiento de mitocondrias el homogenado fue centrifugado diferencialmente según Peña y cols. (1977). La concentración de proteínas se determinó por el método de Biuret (Gornal 1949).

Consumo de oxígeno

Se midió el consumo de oxígeno en estado 4 y en estado 3 (Fig. 10) en un oxímetro con electrodo tipo Clark (YSI modelo 1500), con una cámara de 1 ml, a 30°C. Las mitocondrias (0.5 mg de proteína/ml) se añadieron al medio de reacción, que contenía: manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 (ajustado con TEA), KCl 20 mM, MgCl₂ 50 μM, y análogos de las quinonas en distintas concentraciones (≈10-100μM). La inducción del s_c MUC se logró utilizando 0.4 mM de fosfato. Como sustratos respiratorios se utilizó etanol 2 μL/mL o succinato 10 mM.

Potencial transmembranal

El potencial transmembranal ($\Delta\Psi$) se determinó durante el estado 4 (Fig. 10) utilizando un espectrofotómetro Aminco DW2 en modo dual a 511 y 533 nm. Como cromóforo se utilizó anaranjado de safranina 10 μM. La mezcla de reacción fue manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 (ajustado con TEA), KCl 20 mM, MgCl₂ 50 μM, PO₄⁻ 0.4 mM. Para promover el colapso del potencial se añadió CCCP 6μM. Se añadió etanol 4

$\mu\text{L}/\text{mL}$ o succinato 10 mM como sustrato respiratorio. Se adicionaron análogos de quinonas en concentraciones crecientes ($\approx 10\text{-}100\mu\text{M}$).

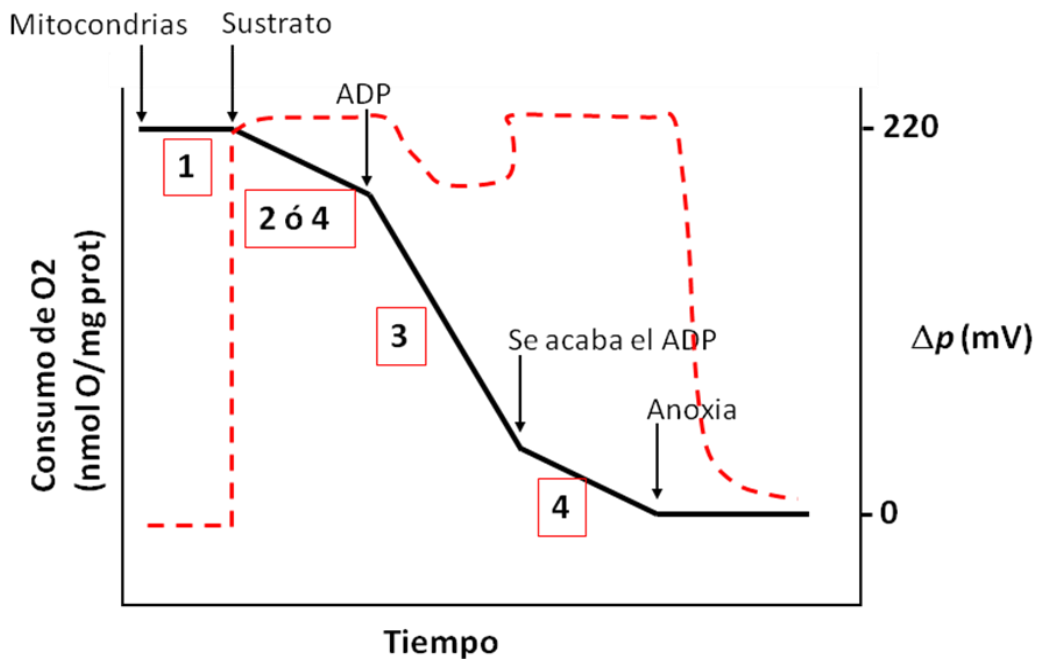


Fig. 10: Ejemplo de registro del consumo de oxígeno (JO_2) (línea continua) y del potencial transmembranal (línea punteada) de una muestra de mitocondrias aisladas en un medio isotónico con sustrato y 4 mM de fosfato. La adición de un sustrato causa un aumento en el consumo de oxígeno y en el potencial transmembranal (estado 2 ó 4). La adición de ADP causa disminución del potencial transmembranal y acelera la tasa de respiración en estado 4 (estado 3). Una vez agotado el ADP el consumo de oxígeno decae (estado 4) y el potencial transmembranal aumenta. La respiración en estado 4 suele ser superior a la tasa de respiración basal debido a la hidrólisis de parte del ATP formado en estado 3. En anoxia, la respiración cesa por completo y el potencial transmembranal se abate.

Hinchamiento mitocondrial

El hinchamiento mitocondrial se evaluó mediante el cambio de absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Aminco DW2000 en modo split. La mezcla de reacción fue manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 (ajustado con TEA), KCl 20 mM, MgCl_2 50 μM , PO_4^- 0.4 mM. Se añadió etanol 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y succinato 10 mM como sustrato. Se adicionaron análogos de quinonas en concentraciones crecientes ($\approx 10\text{-}100\mu\text{M}$).

RESULTADOS

Efecto de distintos análogos de quinonas sobre el s_c MUC con etanol como sustrato respiratorio.

Una característica común del s_c MUC, tanto en las cepas industriales como en las cepas de laboratorio, es la capacidad del fosfato para regular su apertura. En nuestro laboratorio se comprobó que una concentración de fosfato 0.4 mM mantiene la apertura del s_c MUC, mientras que a fosfato 4 mM el s_c MUC se mantiene cerrado (Castrejón y cols. 1997). Aprovechamos esta característica para investigar el efecto de distintas quinonas (decilubiquinona, con una cadena lineal de diez átomos de carbono, y Q_6 , Q_{10} y Q_1 donde el número del subíndice indica cuántas unidades isoprenoides hay en la cadena lateral) sobre la apertura del s_c MUC, midiendo sus efectos sobre la respiración, el potencial transmembranal y el hinchamiento mitocondrial al utilizar etanol como sustrato respiratorio.

Efectos de la decilubiquinona sobre el s_c MUC

La decilubiquinona (DQ) inhibe la velocidad de consumo de oxígeno en estado 4 en mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae* incubadas con poco fosfato y las acopla.

El consumo de oxígeno está regulado principalmente por el potencial transmembranal, si es elevado, el consumo de oxígeno será lento; a esta condición se le conoce como estado 4. Cuando se abate el potencial transmembranal, la cadena respiratoria aumenta su actividad y se acelera el consumo de oxígeno. En mitocondrias aisladas de hígado de rata, la decilubiquinona tiene efectos inhibitorios sobre la apertura del m MUC (Fontaine y Bernardi 1999). Se evaluó el efecto de este análogo de quinona sobre el s_c MUC midiendo la respiración con etanol en mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae* en estado 4. El fosfato 0.4 mM en el medio causó un incremento de 60% en la velocidad respiratoria mitocondrial respecto a las mitocondrias incubadas en fosfato 4 mM (Fig. 11 A), indicando la apertura del s_c MUC. En presencia de diferentes concentraciones de DQ (0 a 50 μ M) y bajo fosfato (s_c MUC abierto) la velocidad de consumo de oxígeno disminuyó paulatinamente. El aumento en el consumo de oxígeno en estado 3 sugiere que la DQ no actúa inhibiendo la cadena respiratoria (Fig. 11 B).

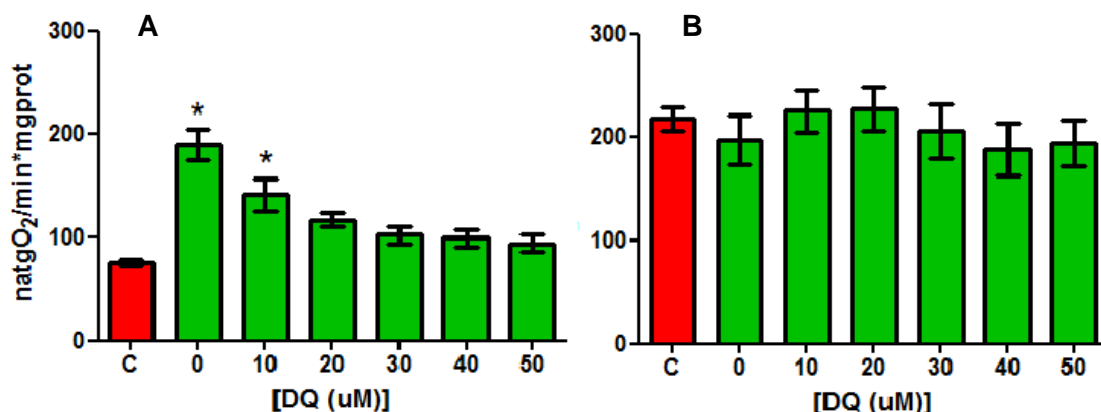


Figura 11. Efecto de la decilubiquinona sobre la tasa de consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae*. Condiciones experimentales: Barras rojas: Fosfato 4mM sin DQ. Barras verdes: Fosfato 0.4 mM y distintas concentraciones de DQ. Medio de reacción: Manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA, KCl 20mM, MgCl₂ 50μM, etanol 2μL/mL y distintas concentraciones de DQ. A) Consumo de oxígeno en estado 4. B) Consumo de oxígeno en estado 3. En B 500μM ADP. Mitocondrias: 0.5 mg prot/ml. * Diferencias significativas de C vs 0μM DQ y C vs 10μM DQ. P=0.05%, prueba de Tukey.

El cociente entre el estado 3 y el estado 4 se denomina CR (control respiratorio) e indica la capacidad de la mitocondria de sostener gradientes transmembranales. Constituye un indicador de la eficiencia de la fosforilación oxidativa. Un CR de 2 indica que las mitocondrias se encuentran acopladas, mientras que un CR de 1 indica desacoplamiento. En este experimento, cuando el s_c MUC se encuentra cerrado, el CR es cercano a 3; cuando se encuentra abierto el CR es cercano a 1. Las distintas concentraciones de DQ (a partir de 20μM), aumentaron la relación 3/4, indicando que la DQ acopla a la mitocondria (Tabla 7). Estos resultados sugieren que la DQ actúa como un inhibidor del s_c MUC.

Tabla 7. En mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae* incubadas con 0.4 mM de fosfato, la decilubiquinona aumenta el CR. Condiciones experimentales como en la Fig. 11. El experimento se llevó a cabo a 30°C. El consumo de oxígeno en estado 3 y 4 se encuentran expresadas en natgO₂ (min*mg prot)⁻¹. Los resultados están expresados como valores promedio ± SD (n=3).

[Pi] (mM)	[DQ] (uM)	Estado 4	Estado 3	CR
4	0	75 ± 5	217 ± 20	2.87
0.4	0	189 ± 25	197 ± 41	1.04
0.4	10	141 ± 26	225 ± 35	1.59
0.4	20	116 ± 11	227 ± 35	1.95
0.4	30	102 ± 14	205 ± 45	2.01
0.4	40	99 ± 13	188 ± 43	1.90
0.4	50	94 ± 13	193 ± 38	2.05

La DQ evita la depleción del potencial transmembranal en mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae*.

Un potencial transmembranal ($\Delta\Psi$) elevado indica que la cadena respiratoria se encuentra en reposo, y que el s_c MUC se encuentra cerrado. En fosfato 4 mM las mitocondrias presentan un $\Delta\Psi$ estable sensible a CCCP (Fig. 2, trazo a). En fosfato 0.4 mM las mitocondrias son incapaces de mantener el $\Delta\Psi$ (Fig. 12); sin embargo, en presencia de diferentes concentraciones de DQ paulatinamente se establece un $\Delta\Psi$. (Fig. 12, trazos g, a y b), a 50 μ M se observó un efecto máximo (Fig. 12, trazo c), sugiriendo que la DQ es un inhibidor del s_c MUC.

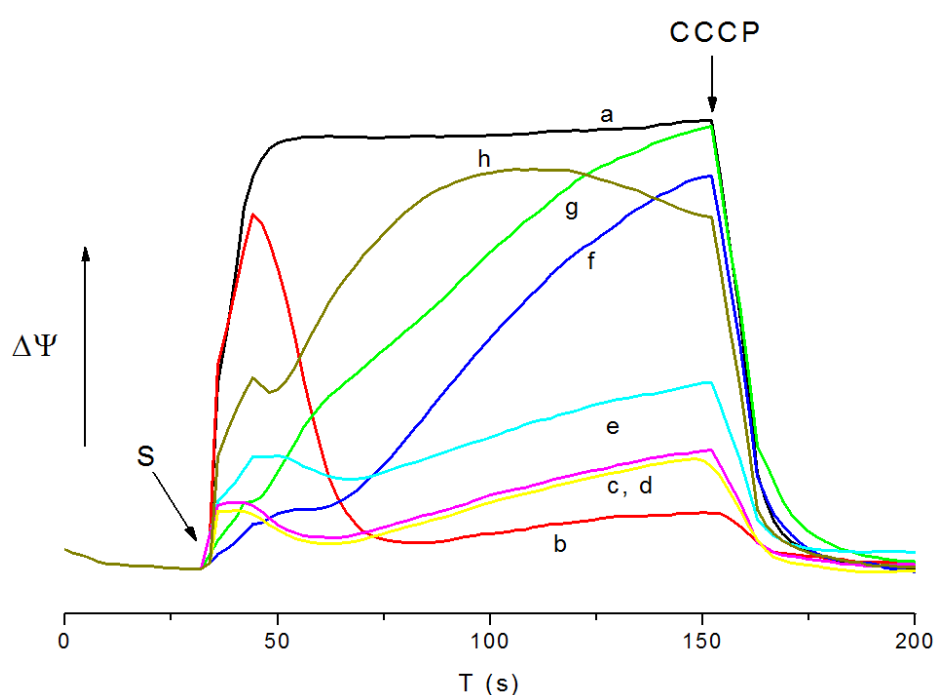


Fig.12. En mitocondrias de *S. cerevisiae* respirando con etanol, la DQ evita la depleción del $\Delta\Psi$.

Medio de reacción: Manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA, KCl 20 mM, fosfato y DQ en distintas concentraciones. Etanol 2 μ L/mL (S). CCCP 6 μ M. Su adición está indicada por las flechas. Mitocondrias: 0.5 mg de proteína/ml. Condiciones experimentales: **a)** Fosfato 4mM sin DQ. **b-h)** Fosfato 0.4 mM y distintas concentraciones de DQ: **b)** Sin DQ **c)** 10 μ M DQ **d)** 20 μ M DQ **e)** 30 μ M DQ **f)** 40 μ M DQ **g)** 50 μ M DQ **h)** 100 μ M DQ.

La DQ inhibe el hinchamiento en mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae*.

Aprovechando que las mitocondrias se comportan como osmómetros, es decir, cuando aumenta la concentración de solutos en su interior captan agua para compensar el aumento en la presión osmótica y si pierden osmolitos, exportan agua y se contraen; se puede usar este indicador para evaluar la apertura del s_cMUC , ya que la mitocondria hinchada disminuye su absorbencia a 540 nm. En presencia de fosfato 4 mM no se observó hinchamiento mitocondrial (Fig. 13, trazo a), mientras que en presencia de fosfato 0.4 mM la absorbencia disminuyó, reflejando la apertura del s_cMUC (Fig. 13, c). Con diferentes concentraciones de DQ, el cambio de la absorbencia disminuyó hasta comportarse como el control (Fig. 13, trazos d-h).

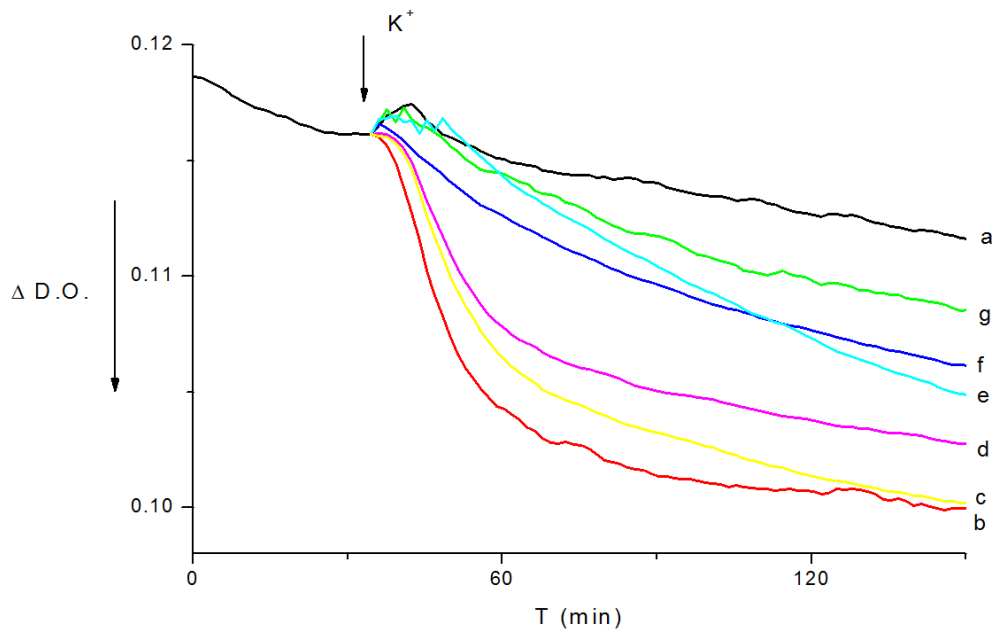


Figura 3. Efecto de la DQ sobre el hinchamiento en mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae* con etanol como sustrato respiratorio. Medio de reacción: Manitol 0.3 M, MES 2.5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA, etanol 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, DQ en distintas concentraciones. La flecha indica la adición de KCl 20 mM. Mitocondrias: 0.5 mg prot/ml. Condiciones experimentales: a) Fosfato 4mM sin DQ. b-g) Fosfato 0.4 mM y distintas concentraciones de DQ: b) Sin DQ c) 10 μM DQ d) 20 μM DQ e) 30 μM DQ f) 40 μM DQ g) 50 μM DQ.

Efectos de la Q₆ y la Q₁₀ sobre el *sc*MUC

La Q₆ y la Q₁₀ no tienen efecto sobre el consumo de oxígeno en estado 4 en mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae*.

En un medio con fosfato 0.4 mM se observó aumento en el consumo mitocondrial de oxígeno (más de 200%) respecto al control (barras rojas). No se observaron diferencias significativas en las mitocondrias incubadas con Q₆ o Q₁₀ (Fig. 14 pánels A y B), sugiriendo que estas quinonas no actúan sobre el *sc*MUC.

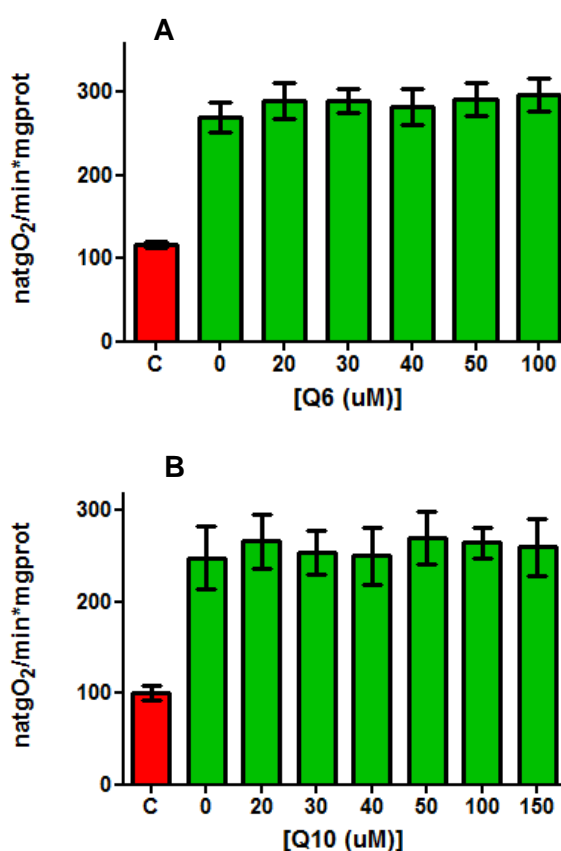


Figura 14. Efecto de la Q₆ y Q₁₀ sobre la tasa de consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae*. Consumo de oxígeno en estado 4 en presencia de Q₆ (A) y Q₁₀ (B). Condiciones experimentales: Barras rojas: Fosfato 4mM sin Q. Barras verdes: Fosfato 0.4mM y distintas concentraciones de Q. Medio de reacción: Manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA, KCl 20 μM, MgCl₂ 50 μM, etanol 2 μL/mL y diferentes concentraciones de Q₆ y Q₁₀. Mitocondrias: 0.5 mg prot/ml.

El control respiratorio fue cercano a 3. La Q₆ (tabla 8) y la Q₁₀ (tabla 9) no actúan sobre el *sc*MUC, por lo que podemos considerarlas como quinonas del grupo III; es decir, que no tienen efecto (Walter y cols. 2002). En los mamíferos, la Q₁₀ es una quinona que pertenece al grupo I y a altas concentraciones (a partir de 100μM) pertenece al grupo II (Walter y cols. 2002).

Tabla 8. En mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae* incubadas con 0.4 mM de fosfato, la Q_6 no tiene efecto sobre el CR. Condiciones experimentales como en la Fig. 14. Temperatura 30°C. El consumo de oxígeno en estado 3 y 4 se encuentra expresado en natgO_2 ($\text{min} \cdot \text{mg prot}^{-1}$). CR es el cociente de estado 3/estado 4. Los resultados están expresados como valores promedio \pm SD ($n=3$).

[Pi] (mM)	[Q_6] (μM)	Estado 4	Estado 3	CR
4	0	115 \pm 4	331 \pm 17	2.86
0.4	0	269 \pm 24	225 \pm 7	1
0.4	20	288 \pm 30	238 \pm 28	1
0.4	30	289 \pm 20	229 \pm 13	1
0.4	40	282 \pm 30	246 \pm 30	1
0.4	50	290 \pm 28	233 \pm 1	1
0.4	100	295 \pm 28	241 \pm 30	1

Tabla 9. En mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae* incubadas con 0.4 mM de fosfato, la Q_{10} no tiene efecto sobre el CR. Condiciones experimentales como en la Fig. 14. Temperatura 30°C. El consumo de oxígeno en estado 3 y 4 se encuentra expresado en natgO_2 ($\text{min} \cdot \text{mg prot}^{-1}$). CR es el cociente de estado 3/estado 4. Los resultados están expresados como valores promedio \pm SD ($n=3$).

[Pi] (mM)	[Q_{10}] (μM)	Estado4	Estado 3	CR
4	0	100 \pm 14	273 \pm 34	2.71
0.4	0	248 \pm 5	212 \pm 44	1
0.4	20	266 \pm 51	214 \pm 47	1
0.4	30	253 \pm 41	200 \pm 34	1
0.4	40	250 \pm 53	194 \pm 34	1
0.4	50	269 \pm 49	210 \pm 36	1
0.4	100	264 \pm 29	206 \pm 30	1
0.4	150	259 \pm 53	195 \pm 34	1

La Q_6 y la Q_{10} no previenen la depleción de $\Delta\Psi$ en mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae*.

En fosfato 4mM y con etanol como sustrato, las mitocondrias presentaron un $\Delta\Psi$ estable (Fig. 15, trazos a de ambos paneles). Con fosfato 0.4 mM no se estableció $\Delta\Psi$ (Fig. 15, trazos de ambos paneles). Las concentraciones de Q_6 (Fig. 15, panel A) y de Q_{10} (Fig. 15, panel B), no previnieron la depleción de $\Delta\Psi$ en bajo fosfato.

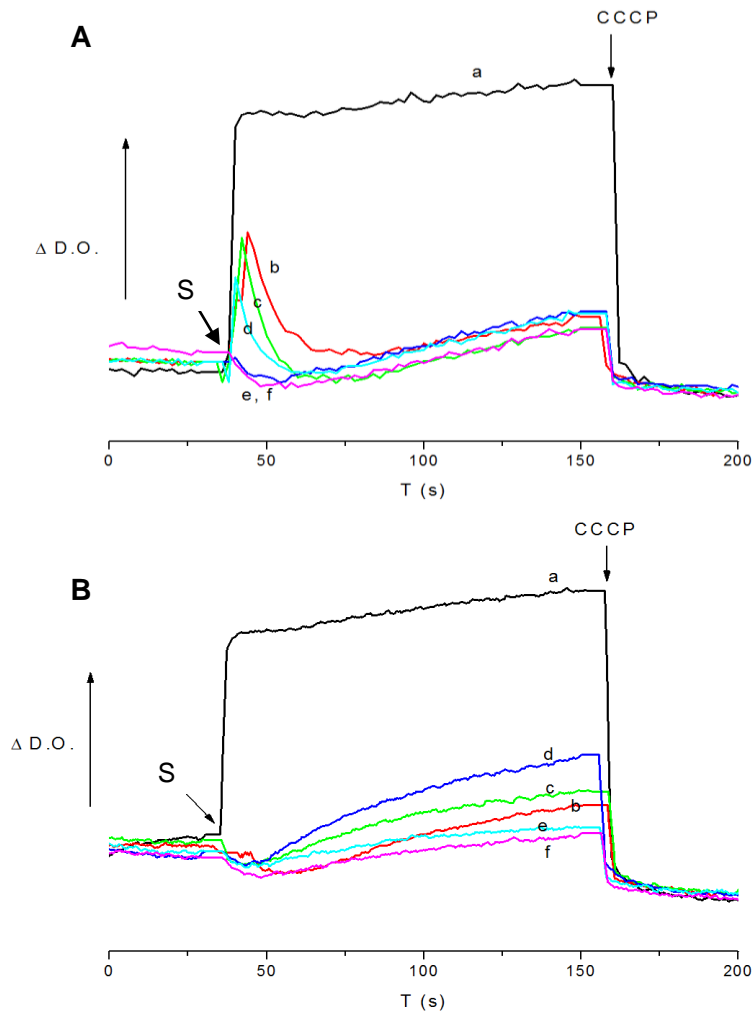


Fig. 15. Efecto de la Q₆ (panel A) y la Q₁₀ (panel B) sobre el $\Delta\Psi$ mitocondrial de *S. cerevisiae*. Medio de reacción: Manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA, KCl 20 mM, fosfato y Q₆ (panel A) o Q₁₀ (panel B) en distintas concentraciones. Etanol 2 $\mu\text{L/mL}$ (S). CCCP 6 μM . Su adición está indicada por las flechas. Mitocondrias: 0.5 mg prot./ml. a) Fosfato 4 mM sin Q. b-f) Fosfato 0.4 mM y distintas concentraciones de Q b) Sin Q c) 100 μM Q d) 50 μM Q e) 30 μM Q f) 10 μM Q.

Efecto de la DQ sobre el $s_c\text{MUC}$ con succinato como sustrato respiratorio.

Con el fin de investigar si los efectos de los análogos de quinonas observados en mitocondrias con etanol como sustrato respiratorio se observan también con otros sustratos respiratorios, y analizar la posibilidad de que el estado de óxido-reducción de los piridín nucleótidos sea un efector del $s_c\text{MUC}$ se utilizó succinato. La entrada de estos sustratos en la cadena respiratoria es diferente: el etanol permea la membrana mitocondrial interna y es oxidado por la alcohol deshidrogenasa matricial utilizando NAD^+ como aceptor de electrones, el NAD^+ reducido dona sus electrones directamente a la NADH deshidrogenasa interna (N1dp), mientras que el succinato es oxidado directamente por la succinato deshidrogenasa, reduciendo FAD^+ (Fig. 6).

Con succinato como sustrato, no hay aceleración en el consumo de oxígeno en estado 4 en mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae* y la decilubiquinona (DQ) no tiene efecto.

Al utilizar succinato como sustrato respiratorio, no se observó aceleración del consumo de oxígeno en estado 4 (Fig. 16 A, barras azules). Tomando en cuenta que dicha aceleración es un indicador de la apertura del MUC, estos resultados son interesantes, pues sugieren que el s_c MUC se encuentra cerrado cuando el sustrato es succinato. Se utilizó una concentración de 0.1 mM de fosfato para lograr que el CR fuera igual a 1 (Tabla 10). El aparente desacoplamiento de las mitocondrias se debió a la falta de aceleración del consumo de oxígeno en estado 3 (Fig. 16 B, barras azules), y no a la aceleración del consumo de oxígeno en estado 4 cuando el canal se encuentra abierto. Las distintas concentraciones de DQ no afectaron el estado 4 pero permitieron una modesta aceleración del estado 3 y un pequeño aumento del CR. Las mitocondrias control (C) tienen un CR cercano a 2 (Tabla 10).

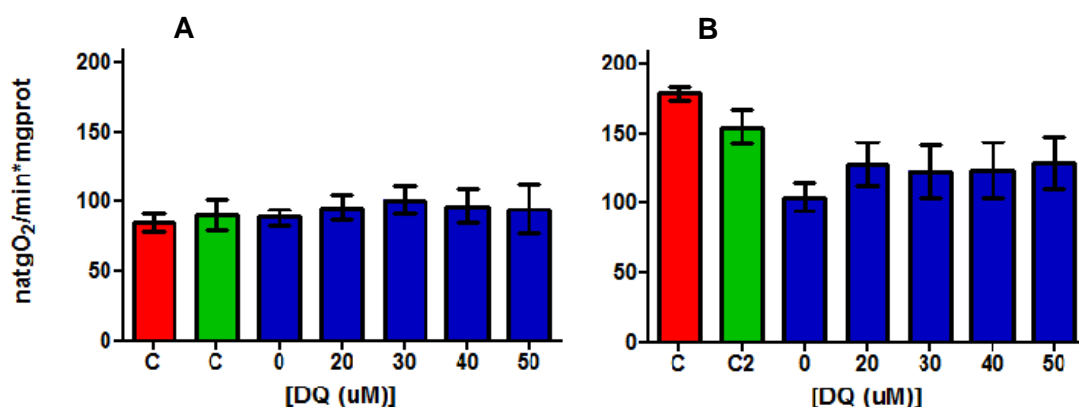


Fig. 16. Efecto de la DQ sobre la tasa del consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae* con succinato como sustrato respiratorio. A. Consumo de oxígeno en estado 4. B. Consumo de oxígeno en estado 3. Medio de reacción: Manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA, KCl 20 mM, MgCl₂ 50 μM, succinato 10 mM como sustrato respiratorio, distintas concentraciones de fosfato y DQ. En B además, ADP 500 μM. Mitocondrias: 0.5 mg prot/ml. Condiciones experimentales: Barras rojas: 4mM de fosfato sin DQ. Barra verde: Fosfato 0.4mM. Barras azules: Fosfato 0.1 mM y DQ indicada.

Tabla 10. Con succinato como sustrato y fosfato 0.4 mM la DQ no tiene efecto sobre el CR. Condiciones como en Fig.16. Temperatura 30°C. Consumo de oxígeno en estado 3 y 4 expresado en natgO_2 ($\text{min} \cdot \text{mg prot}$)-1. CR es el cociente de estado3/estado 4. Los resultados están expresados como valores promedio \pm SD (n=3).

[Pi] (mM)	[DQ] (μM)	Estado 4	Estado 3	CR
4	0	85 \pm 11	178 \pm 8	2.10
0.4	0	90 \pm 19	154 \pm 21	1.71
0.1	0	88 \pm 10	104 \pm 16	1.17
0.1	20	95 \pm 16	127 \pm 27	1.33
0.1	30	100 \pm 17	122 \pm 32	1.22
0.1	40	96 \pm 21	123 \pm 34	1.28
0.1	50	94 \pm 29	128 \pm 32	1.36

Con succinato como sustrato, no hay abatimiento de $\Delta\Psi$ en mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae*.

Al utilizar succinato no se observó depleción del potencial transmembranal en mitocondrias incubadas con fosfato 4 mM, 0.4 mM y 0.1 mM (Fig. 17, trazo a, b y c, respectivamente); se estableció un $\Delta\Psi$ estable y sensible a CCCP.

Estos resultados nuevamente sugieren que el $s_c\text{MUC}$ se encuentra cerrado cuando el sustrato es succinato.

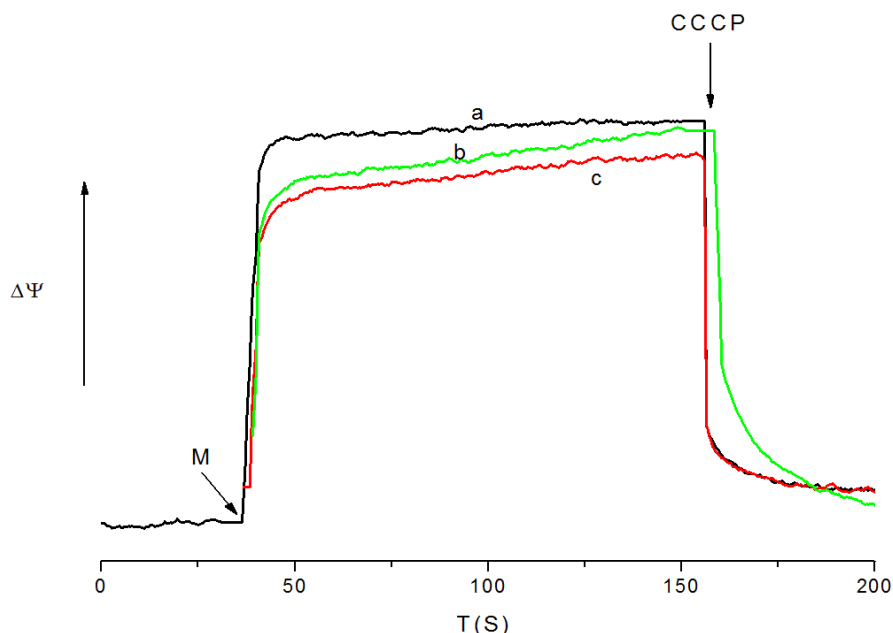


Figura 17. Efecto de la DQ sobre el $\Delta\Psi$ en mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae* con succinato como sustrato respiratorio. Medio de reacción: Manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA, KCl 20 mM. Succinato 10mM. Mitocondrias: 0.5 mg prot/ml. El $\Delta\Psi$ se abatió con CCCP 6 μM . Condiciones experimentales: a) Fosfato 4mM sin DQ b) Fosfato 0.4mM sin DQ c) 0.1mM de fosfato sin DQ.

Con succinato como sustrato, no hay hinchamiento en mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae*.

Al incubar a las mitocondrias con 4 mM de fosfato con succinato como sustrato no se observó hinchamiento mitocondrial tras la adición de K^+ ; al disminuir los niveles de fosfato a 0.4 mM y 0.1 mM se observó una pequeña disminución de la absorbancia (Fig. 18, trazo b y c); al comparar este efecto con las mitocondrias que usan etanol como sustrato respiratorio con 0.4 mM de fosfato (Fig. 18, trazo d) nuevamente queda en evidencia la importancia del sustrato utilizado.

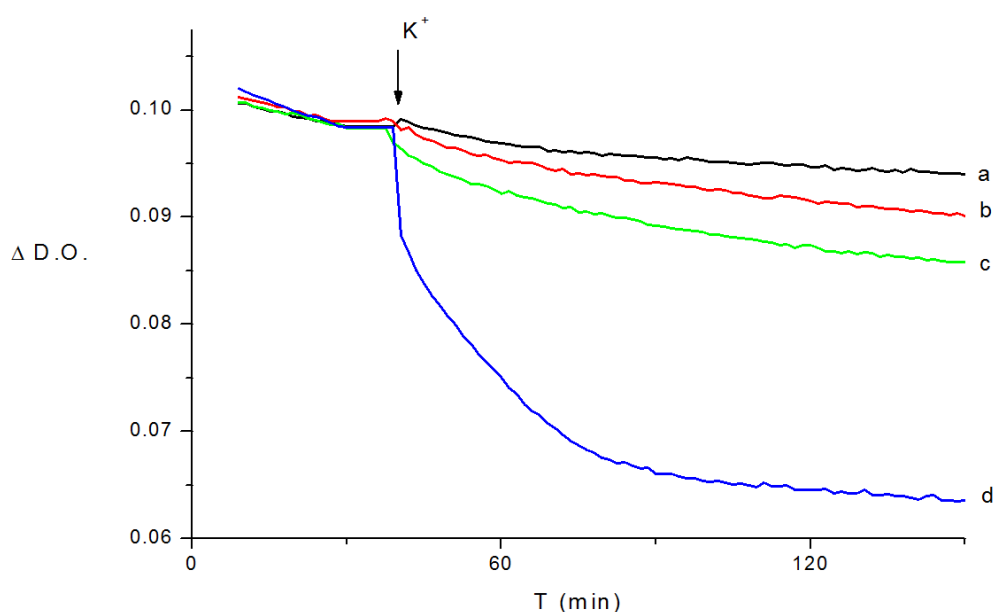


Fig. 18. En presencia de succinato, la DQ inhibe el hinchamiento en mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae*. Medio de reacción: Manitol 0.3 M, MES 2.5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA, succinato 10 mM, DQ en distintas concentraciones. KCl 20 mM. Mitocondrias: 0.5 mg prot/ml. Condiciones experimentales: a) Fosfato 4 mM sin DQ. b) Fosfato 0.4 mM sin DQ c) Fosfato 0.1 mM sin DQ d) Etanol como sustrato respiratorio, fosfato 0.4 mM sin DQ.

Los datos de oximetría, potencial transmembranal e hinchamiento mitocondrial sugieren que además de la concentración de fosfato, el sustrato está jugando un papel activo en la apertura del canal, y nos permite proponer que el estado de óxido-reducción de los piridín nucleótidos tiene un papel importante en la regulación del s_cMUC , el cual se modifica cuando el etanol es el sustrato utilizado por la mitocondria.

La competencia entre análogos de quinonas sobre el $\Delta\psi$ de *S. cerevisiae*.

Walter y cols. (2002) demostraron que las quinonas inactivas (grupo III) son capaces de competir con quinonas inhibitoras o activadoras contrarrestando su efecto. Por ejemplo, este grupo caracterizó a la Q_1 como una quinona que no modifica la capacidad de retención de calcio en mitocondrias aisladas de hígado de rata, y a la OH-DQ (hidroxi-decilubiquinona) como una quinona activadora (grupo I). Al incubar a las mitocondrias con $60 \text{ nmol} \times \text{mg de proteína}^{-1}$ de calcio (cantidad insuficiente para abrir el $\Delta\psi$) y con OH-DQ se observa apertura del $\Delta\psi$ seguida mediante hinchamiento mitocondrial; este efecto es prevenido por la Q_1 , condición en la que se deja de observar hinchamiento mitocondrial.

Utilizando etanol como sustrato, decidimos averiguar si en *S. cerevisiae* se observa este fenómeno de competencia. Primero investigamos a qué grupo pertenece la Q_1 al medir sus efectos sobre el potencial transmembranal. Al incubar a las mitocondrias en un medio con 0.4 mM de fosfato observamos que la Q_1 no tiene efecto para restablecer el potencial transmembranal (Fig. 21, panel A trazos c-f).

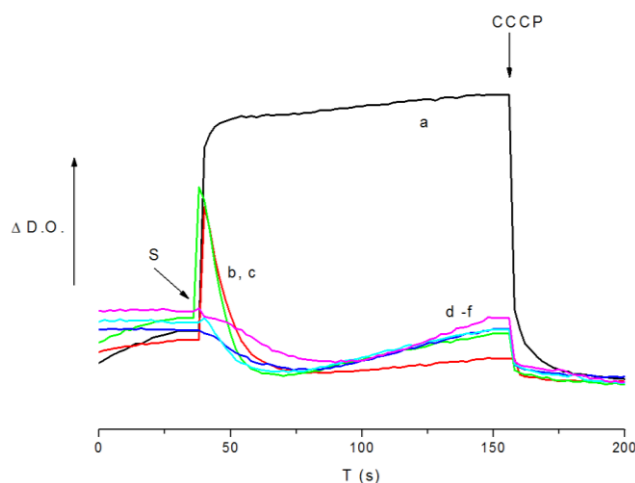


Figura 21. Efecto de la Q_1 sobre el $\Delta\psi$ de *S. cerevisiae* en mitocondrias aisladas con etanol como sustrato respiratorio. Medio de reacción: Manitol 0.6 M , MES 5 mM , pH 6.8 ajustado con TEA, KCl 20 mM , MgCl_2 $50 \mu\text{M}$. Se incubaron las mitocondrias con Q_1 en distintas concentraciones. Mitocondrias: $0.5 \text{ mg de proteína/ml}$. Se adicionó etanol $2 \mu\text{l/mL}$ como sustrato respiratorio (S). El potencial transmembranal se abatió tras la adición de CCCP $6 \mu\text{M}$. Su adición está indicada por las flechas. Condiciones experimentales: Panel A. a) 4 mM de fosfato sin Q_1 b-f) 0.4 mM de fosfato con distintas concentraciones de Q_1 : b) Sin Q_1 c) $25 \mu\text{M}$ Q_1 d) $50 \mu\text{M}$ Q_1 e) $100 \mu\text{M}$ Q_1 f) $200 \mu\text{M}$ Q_1

Estos resultados sugieren que la Q_1 es una quinona inactiva en *S. cerevisiae*. Decidimos entonces investigar el efecto de la incubación de Q_1 y DQ, quinona inhibidora del $_{sc}MUC$, sobre el potencial transmembranal en mitocondrias aisladas. Al incubarse a las mitocondrias con 0.4 mM de fosfato y 50 μ M de DQ se estableció un $\Delta\Psi$ estable y sensible a CCCP, cuando además se incubaron con distintas concentraciones de Q_1 el $\Delta\Psi$ disminuyó de acuerdo con la concentración de Q_1 utilizada, a mayor concentración de Q_1 menor potencial transmembranal (Fig. 22, trazos c-f).

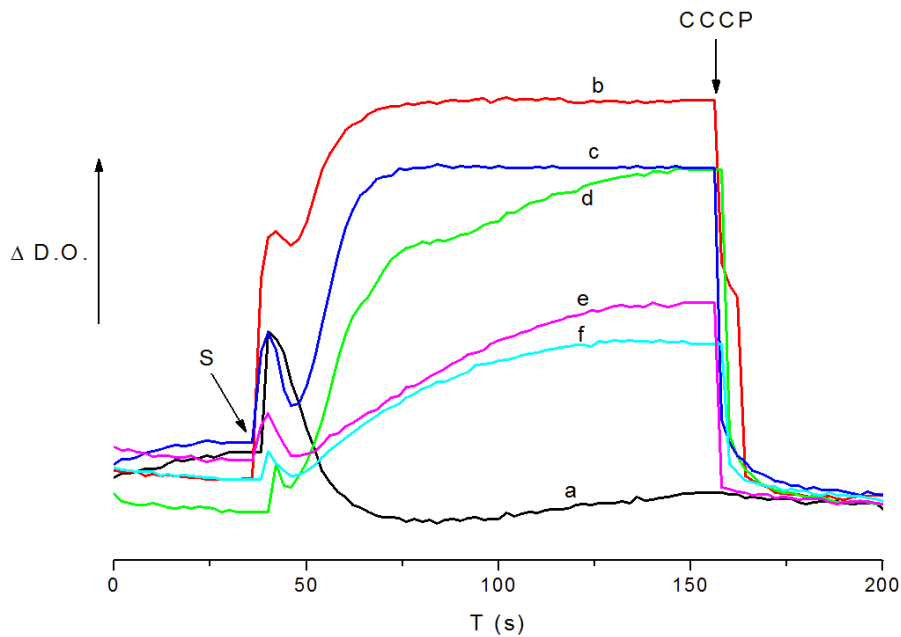


Figura 22. Efecto de la Q_1 sobre el $\Delta\Psi$ de *S. cerevisiae* en mitocondrias aisladas con etanol como sustrato respiratorio. Medio de reacción: Manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA, KCl 20 mM, $MgCl_2$ 50 μ M. Etanol 2 μ l/mL (S). Se incubaron las mitocondrias con DQ y Q_1 en distintas concentraciones. Mitocondrias: 0.5 mg de proteína/ml. El potencial transmembranal se abatió tras la adición de CCCP 6 μ M, su adición está indicado por flechas. Condiciones experimentales: **a)** Fosfato 0.4 mM sin DQ y Q_1 **b-f)** Fosfato 0.4mM, 50 μ M de DQ y distintas concentraciones de Q_1 : **b)** Sin Q_1 **c)** 25 μ M Q_1 **d)** 50 μ M Q_1 **e)** 100 μ M Q_1 **f)** 200 μ M Q_1 .

Este experimento muestra que una quinona inactiva desplaza los efectos de una quinona inhibidora, sugiriendo que ambas tienen al menos un sitio de unión específico en el $_{sc}MUC$ a través del cual pueden regular la apertura o cierre del canal.

DISCUSIÓN

La regulación del canal inespecífico mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* por los análogos de quinonas.

Las quinonas son compuestos orgánicos que constan de un anillo de ciclohexanodiona y una cadena lateral isoprenoide (Nelson y Cox 2013). La cadena lateral permite diferenciar entre las distintas quinonas de acuerdo con el número de carbonos o isoprenos que contenga. En este trabajo se utilizó la Q₁ (o quinona Ub5, una unidad de isopreno), la Q₆ (o quinona Ub30, seis unidades de isopreno), la Q₁₀ (o Ub50, 10 unidades de isopreno) y la decilubiquinona, que es una quinona con 10 átomos de carbono en una cadena lineal (Fig. 23).

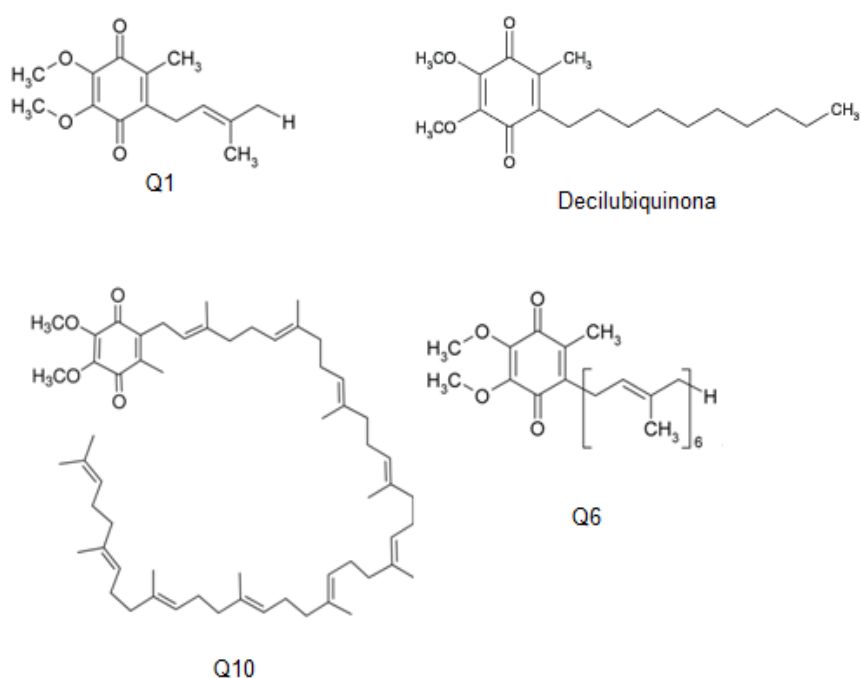


Fig. 23. Estructura química de cada una de las quinonas utilizadas en esta tesis. Cada quinona está compuesta por un anillo de ciclohexadiona en conformación *para*-benzoquinona y una cadena hidrocarbonada larga, en caso de la Q₁, Q₆ y Q₁₀ en unidades de isopreno. La DQ no contiene unidades isoprenoides.

Las quinonas se encuentran ampliamente distribuidas en los organismos y son uno elemento móvil de la cadena respiratoria. Las características hidrofóbicas de estas moléculas determinan su alta movilidad dentro de la membrana mitocondrial (Alberts y cols 2002). La ubiquinona está localizada en un punto de convergencia de los donadores de electrones como el NADH, el succinato, el glicerol fosfato y la colina.

El NADH transporta electrones desde las deshidrogenasas solubles de la matriz mitocondrial y las flavoproteínas embebidas en la membrana interna (Nelson y Cox 2013). La ubiquinona transfiere electrones y protones entre proteínas dentro de la bicapa lipídica de la membrana. Los grupos carbonilo de la forma oxidada de la molécula se reducen, aceptando cada uno de ellos un electrón y un protón, de modo que cada una de las dos funciones cetona se transforman en función alcohol. La forma reducida de la molécula se denomina ubiquinol (Nelson y Cox 2013).

El aumento en el consumo de oxígeno en estado 4, el hinchamiento mitocondrial y el abatimiento del potencial transmembranal son los indicadores que se utilizan para definir la apertura del canal inespecífico mitocondrial. Este trabajo demostró que la decilubiquinona (DQ) inhibe la apertura de este canal y disminuye el consumo de oxígeno en estado 4, inhibe el hinchamiento mitocondrial y evita el abatimiento del potencial transmembranal cuando se induce la apertura del s_c MUC (Fig. 11 y 12). El aumento en el consumo de oxígeno en estado 3 indica que la inhibición del s_c MUC no está directamente relacionada con la inhibición de la cadena respiratoria; el aumento gradual en el CR y en el potencial transmembranal sugiere que este compuesto podría i) Cerrar parcialmente el s_c MUC proporcionalmente a la concentración de DQ utilizada ii) Cerrar completamente el s_c MUC en una subpoblación de mitocondrias de la muestra utilizada iii) Inhibir parcialmente unos canales y totalmente otros en una subpoblación de mitocondrias, ya que no se logra restablecer por completo las propiedades de las mitocondrias incubadas en fosfato 4 mM.

Se propuso que la inhibición por quinonas puede tener lugar a través de sitios específicos de unión al m MUC, mientras que las quinonas inactivas tendrían una baja afinidad por ellos y las quinonas endógenas serían ligandos del canal, que lo estabilizan en la conformación cerrada a través de su interacción con el complejo I (Fontaine y cols., 1998; Fontaine y cols., 1999; Walter y cols., 2002).

Los resultados obtenidos en este trabajo mediante los experimentos de competencia sugieren que en *S. cerevisiae* sí existe un sitio específico de interacción. No obstante, nuestros resultados indican que las quinonas endógenas no participan en la regulación del s_c MUC, pues la Q_6 (quinona endógena en *S. cerevisiae*) no tuvo efectos sobre la regulación del canal. Por tanto, se sugiere que la regulación del s_c MUC a través de los análogos de las quinonas ocurre en un lugar distinto al los sitios de unión que tienen en los complejos respiratorios y deshidrogenasas para llevar a cabo la fosforilación oxidativa. Para encontrar este posible sitio de interacción se

podrían realizar experimentos de competencia, utilizando alguna quinona inactiva o del grupo III más algún agente inhibidor del scMUC del que se conozca su sitio específico de interacción. Por ejemplo, se podría utilizar un agente como el decavanadato que inhibe la apertura del MUC, y ver si sus efectos son contrarrestados por alguna quinona. Si el efecto de inhibición del decavanadato no es contrarrestado, podría ser evidencia de que las quinonas tienen un sitio específico de unión que no es el VDAC. Para descartar el PiC se podría utilizar mersalil, que inhibe el transporte de fosfato.

El posible papel del estado de óxido-reducción de los piridín-nucleótidos como efector del canal inespecífico mitocondrial de *S. cerevisiae*.

Se ha establecido que las concentraciones de fosfato y de K^+ regulan el canal inespecífico mitocondrial de *S. cerevisiae*: el K^+ es capaz de inducir la depleción del potencial transmembranal y disminuir el CR (Castrejón y cols. 1997), mientras que el fosfato puede proteger a las mitocondrias de este efecto. Las concentraciones altas de fosfato (4 mM) protegen a las mitocondrias del efecto de la adición de K^+ (20mM), evitando el abatimiento del potencial transmembranal y la disminución del CR, mientras que una baja concentración de fosfato (0.4mM) no protege a las mitocondrias, se bate el potencial transmembranal y disminuye del CR (Castrejón y cols. 1997). Se sabe que en las mitocondrias de levadura hay dos mecanismos para la captación de K^+ , el primero se activa por el pH ácido y ausencia de Mg^+ , y el segundo se activa con un pH alto y la adición de ATP exógeno (Guerin y cols. 1994). La salida del K^+ de la mitocondria se lleva a cabo por medio de un antiportador K^+/H^+ dependiente del gradiente de pH (Chávez y cols., 1977; Mitchell y Moyle 1969).

En este trabajo los experimentos se realizaron en condiciones en las que el K^+ y fosfato determinaron la conformación abierta o cerrada del canal, es decir, como control del canal cerrado se utilizó Pi 4mM y como control del canal abierto se utilizó Pi 0.4 mM. De acuerdo con lo esperado, al utilizar KCl 20 mM y Pi 0.4 mM en el medio de reacción, se observó un aumento en el consumo de oxígeno, abatimiento del potencial transmembranal e hinchamiento mitocondrial cuando se utilizó etanol como sustrato respiratorio, indicando la apertura del canal. Sin embargo, al utilizar succinato como sustrato respiratorio, no se observó la apertura del canal en presencia de KCl 20 mM y Pi 0.1 mM: hubo leve hinchamiento mitocondrial (comparado con el hinchamiento en mitocondrias con etanol como sustrato respiratorio), no se abatió el potencial transmembranal ni se aceleró el consumo de oxígeno en estado 4. Aunque el CR disminuyó a 1, condición en la que se considera que las mitocondrias están

desacopladas, esta disminución se debió a la falta de aceleración en el consumo de oxígeno en estado 3, sugiriendo que la falta de fosfato no permite el acoplamiento del potencial transmembranal a la síntesis de ATP. Para verificar esta hipótesis se puede realizar un experimento en el cual se mida estado 4 y estado U (desacoplado) en lugar de estado 3, un estado U/4 cercano a 2 nos indicaría que las mitocondrias no se encuentran desacopladas.

En conjunto, estos resultados sugieren que las diferencias observadas de acuerdo al sustrato utilizado se deben al estado de óxido-reducción de los piridín nucleótidos, y se puede proponer que juega un papel en la regulación del s_c MUC además del papel del fosfato y el K^+ . En este sentido, distintos autores han manipulado el estado redox del NADPH utilizando distintos reductores y oxidantes, y han observado que la oxidación del NAD(P)H estimula la liberación de calcio, mientras que se inhibe por su reducción, sugiriendo que el estado redox del NAD(P)H puede estar relacionado con la regulación del MUC. Además, su oxidación favorece la aparición de EROs, sugiriendo que tiene un papel central en la defensa contra el estrés oxidativo (Vercesi 1984; Hunter y Haworth 1979; Zago y cols. 2000).

Se ha demostrado que el NADPH tiene un efecto reductor mediante la glutatión reductasa y mantiene la funcionalidad de las enzimas que remueven el H_2O_2 (Hoek y Rydstrom 1988; Kowaltowski y Vercesi 2000) La enzima glutatión reductasa cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) por oxidación del NADPH + H^+ para dar lugar a dos moléculas de glutatión reducido (GSH) y NAD(P) $^+$. El papel principal de esta enzima citosólica es mantener las concentraciones intracelulares de GSH para la reducción de los grupos tiol (-SH) de las proteínas:



Se ha demostrado que la transición de permeabilidad se inhibe con reductores de tioles, mientras que los oxidantes la promueven, por lo que los antioxidantes y reductores pueden regular la transición de permeabilidad al controlar los niveles mitocondriales de GSH o mediante cambios directos en el potencial redox de los grupos tiol del MUC (Le Quoc y cols. 1976; Harris y Baum 1980).

Existen dos pozas de grupos tioles en la membrana que regulan la transición de permeabilidad (Costantini y cols. 1996). Ésta ocurre cuando los grupos tioles de la membrana interna mitocondrial se encuentran oxidados, produciendo cambios

conformacionales e induciendo la apertura del MUC. No se ha determinado qué proteínas participan, pero seguramente la ANT se encuentra involucrada. En este sentido, Vercesi (1984) demostró la participación del ANT y la oxidación de los tioles en el mecanismo de liberación de calcio estimulado por NADP. Además, el residuo de Cys 56 de la ANT se oxida en mitocondrias aisladas y las células son sometidas a una transición de permeabilidad.

El efecto indirecto antioxidante de las transdeshidrogenasas pudo evolucionar como una defensa en contra del estrés oxidativo, ya que los potenciales altos favorecen la formación de EROs (Korshunov 1997); se acompañan de bajas tasas respiratorias, que estimulan la generación de EROs. Entonces, la protección ideal contra el estrés oxidativo se obtendría bajo condiciones de ligero desacoplamiento, cuando la reacción catalizada por la NADP transdeshidrogenasa se encuentra generando NADPH pero la generación de EROs disminuye notablemente (Korshunov 1997; Kowaltowski y Vercesi 2000). *S. cerevisiae* carece de actividad transdeshidrogenasa (Bruinenberg 1985; van Dijken y Scheffers 1986), sin embargo, es capaz de transferir equivalentes reductores hacia la mitocondria a través de distintos mecanismos: Anaeróbicamente, se puede reoxidar el NADH es mediante la producción de glicerol y en la fermentación (van Dijken y Scheffers 1986; Albers y cols. 1998). Aeróbicamente, existen distintos sistemas para conducir el NADH citosólico hasta la cadena transportadora de la levadura. Los sistemas más importantes al respecto parecen ser las dos NADH deshidrogenasas alternas (Luttik y cols. 1998; Small WC, McAlister-Henn 1998) y la lanzadera de glicerol-3-fosfato (Larsson y cols. 1998).

CONCLUSIONES

- Algunos análogos de las quinonas son efectores del canal inespecífico mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*.
- La decilubiquinona inhibe la apertura del s_c MUC.
- La Q₆ y la Q₁₀ son inactivas.
- La regulación del s_c MUC varía de acuerdo con los sustratos respiratorios.
- El estado de óxido-reducción de los piridín nucleótidos parece ser un efector del s_c MUC.
- Hay al menos un sitio específico de interacción quinonas/ s_c MUC.

PERSPECTIVAS

- Probar otros análogos de las quinonas, analizando si existe especificidad estructural en el sitio de interacción quinonas/_{sc}MUC.
- Buscar el sitio de interacción quinonas/_{sc}MUC mediante las mutantes carentes de VDAC y PiC.
- Medir el estado de óxido-reducción de los piridín nucleótidos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P (2002). Molecular biology of the cell. España.
- Albers, E., Lidén, G., Larsson, C. y Gustafsson, L. (1998) "Anaerobic redox balance and nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*." Recent Res Dev Microbiol **2**: 253–79
- Amarante, G. P., Green, D.R. (1999). "The regulation of apoptotic cell death." Braz J Med Biol Res **32**: 1053-61.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B. y Martinou, J.C. (2001). "Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells." J Biol Chem **276**(15): 11615-23.
- Baines, C. P., Kaiser, R. A., Purcell, N. H., Blair, N. S., Osinska, H., Hambleton, M. A., Brunskill, E. W., Sayen, M. R., Gottlieb, R. A., Dorn, G. W., Robbins, J. y Molkentin, J. D. (2005). "Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death." Nature **434**(7033): 658-62.
- Ballarin, C., Sorgato, M.C. (1995). "An electrophysiological study of yeast mitochondria. Evidence for two inner membrane anion channels sensitive to ATP." J Biol Chem **270**(33): 19262-8.
- Basañez, G., Sharpe, J.C., Galanis, J., Brandt, T.B., Hardwick, J.M. y Zimmerberg, J. (2002). "Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature." J Biol Chem **277**(51): 49360-5.
- Bernardi, P., Broekemeier, K.M. y Pfeiffer, D.R. (1994). "Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane." J Bioenerg Biomembr **26**(5): 509-17.

- Bernardi, P., Krauskopf, A., Basso, E., Petronilli, V., Blachly-Dyson, E., Di Lisa, F., Forte, M.A. (2006). "The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target." FEBS J **273**(10): 2077-99.
- Bernardi, P., Petronilli, V. (1996). "The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal." J Bioenerg Biomembr **28**(2): 131-8.
- Bruinenberg, P.M., Jonker, J., van, Dijken, J.P. y Scheffers, W.A. (1985). "Utilization of formate as an additional energy source by glucose-limited chemostat cultures of *Candida utilis* CBS 621 and *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066. Evidence for the absence of transhydrogenase activity in yeasts " Arch Microbiol **142**: 302-06
- Brustovetsky, N., Klingenberg, M. (1996). "Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca²⁺." Biochemistry **35**(26): 8483-8.
- Cabrera-Orefice, A., Guerrero-Castillo, S., Luévano-Martínez, L.A., Peña, A., Uribe-Carvajal, S. (2010). "Mitochondria from the salttolerant yeast *Debaryomyces hansenii* (halophilic organelles?)." J Bioenerg Biomembr **42**: 11–19.
- Castrejón, V., Parra, C., Moreno, R., Peña, A. y Uribe, S. (1997). "Potassium collapses the deltaP in yeast mitochondria while the rate of ATP synthesis is inhibited only partially: modulation by phosphate." Arch Biochem Biophys **346**(1): 37-44.
- Cesura, A. M., Pinard, E., Schubel, R., Goetschy, V., Friedlein, A., Langen, H., Polcic, P., Forte, M.A., Bernardi, P. y Kemp, J.A. (2003). "The voltage-dependent anion channel is the target for a new class of inhibitors of the mitochondrial permeability transition pore." J Biol Chem **278**(50): 49812-8.
- Connern, C. P., Halestrap, A.P. (1996). "Chaotropic agents and increased matrix volume enhance binding of mitochondrial cyclophilin to the inner mitochondrial membrane and sensitize the mitochondrial permeability transition to Ca²⁺." Biochemistry **35**: 8172-80.
- Costantini, P., Chernyak, B.V., Petronilli, V. y Bernardi, P. (1996) "Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites." J Biol Chem **271**: 6746-51.
- Crompton, M., Virji, S. y Ward, J.M. (1998). "Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore." Eur J Biochem **258**(2): 729-35.
- Chance, B., Williams, G.R. (1955). "Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization." J Biol Chem **217**(1): 383-93.
- Chance, E. B., Sies, H. y Boveris, A. (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." Physiol Rev **59**: 527-605.
- Chappell, J. B., Crofts, A.R. (1965). "Calcium ion accumulation and volume changes of isolated liver mitochondria: calcium ion-induced swelling." Biochem J **95**: 378–86.

- Cheng, S., Clancy, C.J., Zhang, Z., Hao, B., Wang, W., Iczkowski, K.A., Pfaller, M.A., Nguyen, M.H. (2007). "Uncoupling of oxidative phosphorylation enables *Candida albicans* to resist killing by phagocytes and persist in tissue." Cell Microbiol **9**: 492–501.
- Danial, N. N., Korsmeyer, S. J. (2004). "Cell death: critical control points." Cell **116**(2): 205-19.
- de Chateaubodeau, G., Guerin, M. y Guerin, B. (1974). "Studies on anionic transport in yeast mitochondria and promitochondria. Swelling in ammonium phosphate, glutamate, succinate and fumarate solutions." FEBS Lett **46**(1): 184-7.
- de Chateaubodeau, G. A., Guérin, M. y Guérin, B. (1976). "Permeability of yeast mitochondrial internal membrane: structure-activity relationship." Biochimie **58**(5): 601-10.
- de Macedo, D. V., Nepomuceno, M.E. y Pereira-da-Silva, L. (1993). "Involvement of the ADP/ATP carrier in permeabilization processes of the inner mitochondrial membrane." Eur J Biochem **215**: 595–600.
- de Pinto, V., Messina, A., Accardi, R., Aiello, R., Guarino, F., Tomasello, M. F., Tommasino, M., Tasco, G., Casadio, R., Benz, R., De Giorgi, F., Ichas, F., Baker, M. y Lawen, A. (2003). "New functions of an old protein: the eukaryotic porin or voltage dependent anion selective channel (VDAC)." Ital J Biochem **52**(1): 17-24.
- DiMauro, S. (2004). "Mitochondrial diseases." Biochim Biophys Acta **1658**(1-2): 80-8.
- Erecińska, M., Wilson, D.F. (1982). "Regulation of cellular energy metabolism." J Membr Biol **70**(1): 1-14.
- Fontaine, E., Bernardi, P. (1999). "Progress on the mitochondrial permeability transition: Regulation by complex I and ubiquinone analogs." Journal of bioenergetics and biomembranes **31**: 335-45.
- Fontaine, E., Eriksson, O., Ichas, F. y Bernardi, P. (1998a). "Regulation of the Permeability Transition Pore in Skeletal Muscle Mitochondria. Modulation by electron flow through the respiratory chain complex I." The Journal of Biological Chemistry **273**: 12662-68.
- Fontaine, E., O., Ichas, F. y Bernardi, P. (1998b). "A Ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore." The Journal of Biological Chemistry **273**: 25734-40.
- Forman, H. J., Boveris, A. (1982). "Superoxide radical and hydrogen peroxide in mitochondria." Free Radicals in Biology **5**: 65-90.
- Forte, M., Adelsberger-Mangan, D. y Colombini, M. (1987). "Purification and characterization of the voltage-dependent anion channel from the outer mitochondrial membrane of yeast." J Membr Biol **99**(1): 65-72.
- Freeman, B. A., Crapo, J.D. (1982). "Biology of disease: free radicals and tissue injury." Lab Invest **47**(5): 412-26.

- Gornal, A. G., Bardavill, C.J. y David, M.M. (1949). "Determination of serum proteins by means of the biuret reaction." J. Biol. Chem **177**: 751-60.
- Green, D. R., Kroemer G. (2004). "The pathophysiology of mitochondrial cell death." Science **305**(5684): 626-9.
- Groen, A. K., Wanders, R.J., Westerhoff, H.V., van der Meer, R. y Tager, J.M. (1982). "Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration." J Biol Chem **257**(6): 2754-7.
- Guérin, B., Bunoust, O., Rouqueys, V. y Rigoulet, M. (1994). "ATP-induced unspecific channel in yeast mitochondria." J Biol Chem **269**(41): 25406-10.
- Guerrero-Castillo, S., Araiza-Olivera, D., Cabrera-Orefice, A., Espinasa-Jaramillo, J., Gutiérrez-Aguilar, M., Luévano-Martínez, L.A., Zepeda-Bastida, A. y Uribe-Carvajal, S. (2011). "Physiological uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation. Studies in different yeast species." J Bioenerg Biomembr **43**(3): 323-31.
- Gunter, T. E., Pfeiffer, D.R. (1990). "Mechanisms by which mitochondria transport calcium." Am J Physiol **258**(5 Pt 1): C755-86.
- Gutiérrez-Aguilar, M., Pérez-Martínez X., Chávez, E. y Uribe-Carbajal, S. (2010). "In *Saccharomyces cerevisiae*, the phosphate carrier is a component of the mitochondrial unselective channel." Archives of biochemistry and Biophysics **494**: 184-91.
- Gutiérrez-Aguilar, M., Pérez-Vázquez, V., Bunoust, O., Manon, S., Rigoulet, M. y Uribe, S. (2007). "In yeast, Ca²⁺ and octylguanidine interact with porin (VDAC) preventing the mitochondrial permeability transition." Biochim Biophys Acta **1767**: 1245-51.
- Gutiérrez Aguilar, M. (2011). Caracterización de la transición de la permeabilidad mitocondrial en *Saccharomyces cerevisiae*. Instituto de Fisiología Celular. Mexico, Universidad Nacional Autónoma de México. **Doctorado**: 183.
- Halestrap, A. P. (1989). "The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism." Biochim Biophys Acta **973**(3): 355-82.
- Halestrap, A. P., Pasdois, P. (2009). "The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease." Biochim Biophys Acta **1787**(11): 1402-15.
- Hansford, R. G. (1985). "Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism." Rev Physiol Biochem Pharmacol **102**: 1-72.
- Harris, E.J. y Baum, H. (1980). "Production of thiol groups and retention of calcium ions by cardiac mitochondria." Biochem J **186**: 725-32.
- Harris, M. H., Thompson, C.B. (2000). "The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability." Cell Death Differ **7**(12): 1182-91.

- Haworth, R. A., Hunter, D. R. (1979). "The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site." Arch Biochem Biophys **195**(2): 460-7.
- Haworth, R. A., Hunter, D. R. (1980). "Allosteric inhibition of the Ca²⁺-activated hydrophilic channel of the mitochondrial inner membrane by nucleotides." J Membr Biol **54**(3): 231-6.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." Nature **12**(407): 770-76.
- Hüser, J., Blatter, L.A. (1999). "Fluctuations in mitochondrial membrane potential caused by repetitive gating of the permeability transition pore." Biochem J **43** (Pt 2): 311-7.
- Hunter, D. R., Haworth, R.A. (1979). "The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms." Arch Biochem Biophys **195**: 453–9.
- Hoek, J.B. y Rydstrom, J. (1988). "Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase." Biochem J **254**: 1-10.
- Ichas, F., Mazat, J.P. (1998). "From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state." Biochim Biophys Acta **1366**(1-2): 33-50.
- Jung, D. W., Bradshaw, P.C. y Pfeiffer, D.R. (1997). "Properties of a cyclosporin-insensitive permeability transition pore in yeast mitochondria." J Biol Chem **272**(34): 21104-12.
- Kerscher, S., Droese, S., Zwicker, K., Zickermann, V. y Brandt, U. (2002). "Yarrowia lipolytica, a yeast genetic system to study mitochondrial complex I." Biochim Biophys Acta **1555**: 83–91.
- Korshunov, S.S., Skulachev, V.P. y Starkov, A.A. (1997). "High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria." FEBS Lett **416**: 15-18.
- Kovaleva, M. V., Sukhanova, E. I., Trendeleva, T. A., Popova, K.M., Zylkova, M.V., Uralskaya, L.A. y Zvyagilskaya, R.A. (2010). "Induction of permeability of the inner membrane of yeast mitochondria." Biochemistry (Mosc) **75**(3): 297-303.
- Kroemer, G., Zamzami, N., y Susin, S.A. (1997). "Mitochondrial control of apoptosis." Immunol Today **18**(1): 44-51.
- Kunz, W., Bohnensack, R., Böhme, G., Küster, U., Letko, G., Schönfeld, P. (1981). "Relations between extramitochondrial and intramitochondrial adenine nucleotide systems." Arch Biochem Biophys **209**(1): 219-29.
- Larsson, C., Pählman, I.L., Ansell, R., Rigoulet, M., Adler, L. y Gustafsson, L. (1998) "The importance of the glycerol-3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*" Yeast **14**: 347–57

- Le Quoc, D., Le Quoc, K. and Gaudemer, Y. (1976). "Energy-dependent variation of thiol groups reactivity or accessibility in rat liver mitochondria, revealed by measurements of labelled thiol reagents incorporation." Biochem Biophys Res Commun **68**: 106-13.
- Lê Quốc, K., Lê Quốc, D. (1985). "Crucial role of sulfhydryl groups in the mitochondrial inner membrane structure." J Biol Chem **260**(12): 7422-8.
- Lê Quốc, K., Lê Quốc, D. (1988). "Involvement of the ADP/ATP carrier in calcium-induced perturbations of the mitochondrial inner membrane permeability: importance of the orientation of the nucleotide binding site." Arch Biochem Biophys **265**(2): 249-57.
- Liu, Y., Fiskum, G. y Schubert, D. (2002). "Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain." J Neurochem **80**(5): 780-7.
- Lodish, H. (2006). Biología celular y molecular. Madrid.
- Luévano-Martínez, L. A., Moyano, E., de Lacoba, M.G., Rial, E. y Uribe-Carvajal, S. (2010). "Identification of the mitochondrial carrier that provides *Yarrowia lipolytica* with a fatty acid-induced and nucleotide-sensitive uncoupling protein-like activity." Biochim Biophys Acta **1797**: 81–88.
- Luttik, M.A.H., Overkamp, K.M., Kötter, P., de Vries, S., van Dijken, J.P. y Pronk, J.T. (1998). "The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH" J Biol Chem **273**: 24529–34
- Manon, S., Roucou, X. , Guerin, M. , Rigoulet, M. y Guerin, B. (1998). "Characterization of the yeast mitochondria unselective channel: a counterpart to the mammalian permeability transition pore?" J Bioenerg Biomembr **30**(5): 419-29.
- Martinou, J. C., Green, D.R. (2001). "Breaking the mitochondrial barrier." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(1): 63-7.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jürgensmeier, J.M., Susin, S.A., Vieira, H.L., Prévost, M.C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J.C. y Kroemer, G. (1998). "Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis." Science **281**(5385): 2027-31.
- Massari, S., Azzone, G.F. (1972). "The equivalent pore radius of intact and damaged mitochondria and the mechanism of active shrinkage." Biochim Biophys Acta **283**(1): 23-9.
- Meunier, B., Fisher, N., Ransac, S., Mazat J. P. y Brasseur, G. (2012). "Respiratory complex III dysfunction in humans and the use of yeast as a model organism to study mitochondrial myopathy and associated diseases." Biochim Biophys Acta.
- Mitchell, P. (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism." Nature **191**: 423-27.

- Miwa, S., St-Pierre, J., Partridge, L. y Brand, M.D. (2003). "Superoxide and hydrogen peroxide production by *Drosophila* mitochondria." Free Radic Biol Med **35**(8): 938-48.
- Nelson, D., Cox, M. (2013). Lenhinger Principles of Biochemistry Nueva York.
- Nicolli, A., Petronilli, V. y Bernardi, P. (1993). "Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by matrix pH. Evidence that the pore open-closed probability is regulated by reversible histidine protonation." Biochemistry **32**(16): 4461-5.
- Nordström, K. (1968). "Yeast growth and glycerol formation. II. Carbon and redox balance." J Inst Brew **74**: 429–32.
- Panov, A., Filippova, S. y Lyakhovich, V. (1980). "Adenine nucleotide translocase as a site of regulation by ADP of the rat liver mitochondria permeability to H⁺ and K⁺ ions." Arch Biochem Biophys **199**(2): 420-6.
- Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trezeguet, V., Lauquin, G. J. y Brandolin, G. (2003). "Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside." Nature **426**(6962): 39-44.
- Pedersen, P. L. (2008). "Voltage dependent anion channels (VDACs): a brief introduction with a focus on the outer mitochondrial compartment's roles together with hexokinase-2 in the "Warburg effect" in cancer." J Bioenerg Biomembr **40**(3): 123-6.
- Peña, A., Pina, M. Z., Escamilla, E. y Pina, E. (1977). "A novel method for the rapid preparation of coupled yeast mitochondria." FEBS Lett **80**(1): 209-13.
- Pérez-Vázquez, V., Saavedra-Molina, A. y Uribe, S. (2003). "In *Saccharomyces cerevisiae*, cations control the fate of the energy derived from oxidative metabolism through the opening and closing of the yeast mitochondrial unselective channel." J Bioenerg Biomembr **35**(3): 231-41.
- Pryor, W. A., Godber, S.S. (1991). "Noninvasive measures of oxidative stress status in humans." Free Radic Biol Med **10**(3-4): 177-84.
- Raha, S., Robinson, B. H. (2000). "Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing." Trends Biochem Sci **25**(10): 502-8.
- Richter, C. (1993). "Pro-oxidants and mitochondrial Ca²⁺: their relationship to apoptosis and oncogenesis." FEBS Lett **1**(2): 104-7.
- Rigoulet, M., Devin, A., Espié, P., Guérin, B., Fontaine, E., Piquet, M.A., Nogueira, V. y Leverve, X. (1998). "Flux-force relationships in intact cells: a helpful tool for understanding the mechanism of oxidative phosphorylation alterations?" Biochim Biophys Acta **1365**(1-2): 117-24.
- Roucou, X., Manon, S. y Guerin, M. (1997a). "Conditions allowing different states of ATP- and GDP-induced permeability in mitochondria from different strains of *Saccharomyces cerevisiae*." Biochim Biophys Acta **1324**(1): 120-32.

- Roucou, X., Manon, S. y Guérin, M. (1997b). "Modulation of the electrophoretic ATP-induced K(+)-transport in yeast mitochondria by delta pH." Biochem Mol Biol Int **43**(1): 53-61.
- Sherman, F. (2002). "Getting started with yeast." Methods Enzymol **350**: 3-41.
- Shimizu, S., Narita, M. y Tsujimoto, Y. (2004). "Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC." Nature **399**: 483-87.
- Shoshan-Barmatz, V., Israelson, A., Brdiczka, D. y Sheu, S. S. (2006). "The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death." Curr Pharm Des **12**(18): 2249-70.
- Small, W.C., McAlister-Henn, L. (1998). "Identification of a cytosolically directed NADH dehydrogenase in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*." J Bacteriol **180**:4051-55
- St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J. y Brand, M.D. (2002). "Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain." J Biol Chem **277**(47): 44784-90.
- Susin, S. A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E. y Brothers, G.M. (1999). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis inducing factor." Nature **397**: 441-46.
- Szabó, I., Báthori, G., Wolff, D., Starc, T., Cola, C. y Zoratti, M. (1995). "The high-conductance channel of porin-less yeast mitochondria." Biochim Biophys Acta **1235**(1): 115-25.
- Szabó, I., Zoratti, M. (1993). "The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. I. Binary structure and voltage dependence of the pore." FEBS Lett **30**(2): 201-5.
- Thannickal, V. J., Fanburg, B.L. (2002). "Reactive oxygen species in cell signaling." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**(6): L1005-28.
- Thorburn, A. (2004). "Receptor-induced cell killing." Cell Signal **16**: 139-44.
- Tikunov, A., Johnson, C. B. , Pediaditakis, P. , Markevich, N. , Macdonald, J. M. , Lemasters, J. J. y Holmuhamedov, E. (2010). "Closure of VDAC causes oxidative stress and accelerates the Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition in rat liver mitochondria." Arch Biochem Biophys **495**(2): 174-81.
- Turrens, J. F., Boveris, A. (1980). "Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria." Biochem J **191**(2): 421-7.
- Uribe-Carvajal, S. (2011). "Mitochondrial Unselective Channels throughout the eukaryotic domain." Mitochondrion **11**(3): 382-90.
- van Dijken, J.P. y Scheffers, W.A. (1986). "Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts." FEMS Microbiol Rev **32**: 199-224

- van Gorp, M., Festjens, N., van Loo, G., Saelens, X. y Vandenabeele, P. (2003). "Mitochondrial intermembrane proteins in cell death." Biochem Biophys Res Commun **304**(3): 487-97.
- Veiga, A., Arrabaça, J.D., Sansonetty, F., Ludovico, P., Côrte-Real, M. y Loureiro-Dias, M.C. (2003). "Energy conversion coupled to cyanide-resistant respiration in the yeasts *Pichia membranifaciens* and *Debaryomyces hansenii*." FEMS Yeast Res **3**(2): 141-8.
- Velours, J., Rigoulet, M. y Guerin, B. (1977). "Protection of yeast mitochondrial structure by phosphate and other H⁺-donating anions." FEBS Lett **81**(1): 18-22.
- Vercesi, A.E. (1984). "Possible participation of membrane thiol groups on the mechanism of NAD(P)⁺-stimulated Ca²⁺ efflux from mitochondria." Biochem Biophys Res Commun **119**: 305-10.
- Walter, L., Miyoshi, H., Leverage, X., Bernard, P., Fontaine, E. (2002). "Regulation of the Mitochondrial Permeability Transition Pore by Ubiquinone Analogs. A Progress Report." Free radical research **36**(4): 405-412.
- Yamada, A., Yamamoto, T., Yoshimura, Y., Gouda, S., Kawashima, S., Yamazaki, N., Yamashita, K., Kataoka, M., Nagata, T., Terada, H., Pfeiffer, D. R. y Shinohara, Y. (2009). "Ca²⁺-induced permeability transition can be observed even in yeast mitochondria under optimized experimental conditions." Biochim Biophys Acta **1787**(12): 1486-91.
- Zago, E.B., Castilho, R.F. and Vercesi, A.E. (2000). The redox state of endogenous pyridine nucleotides can determine both the degree of mitochondrial oxidative stress and the solute selectivity of the permeability transition pore. FEBS Lett. **478**: 29-33.
- Zamzami, N., Kroemer, G. (2001). "The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens." Nat Rev Mol Cell Biol **2**: 67-71.