

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SUBSECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**Efecto del quitosano en la función
mitocondrial de *Rhizopus stolonifer***

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS QUIMICOBIOLOGICAS**

P R E S E N T A

Q.B.P. LEOBARDA ROBLES MARTÍNEZ

DIRECTOR INTERNO:

DRA. MARIA GUADALUPE GUERRA SÁNCHEZ

DIRECTOR EXTERNO:

DR. MIGUEL GERARDO VELÁZQUEZ DEL VALLE



MÉXICO, D.F.

2009

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Bioquímica Microbiana del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional bajo la asesoría de la Dra. María Guadalupe Guerra Sánchez y del Dr. Miguel Gerardo Velázquez del Valle del Centro de Desarrollo de productos Bioticos del Instituto Politécnico Nacional. Además de la colaboración con el Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez y el Dr. Oscar Flores de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Este trabajo fue financiado por CGPI con los números de proyectos 20080183 “Estudios de los mecanismos de acción del quitosano contra hongos fitopatógenos” además de los proyectos 20070822, 20080561 “La homeostasis del pH en micelios de *Ustilago maydis* (Cuitlacoche)” y por CONAyT con el proyecto 89675 y 59855.

La sustentante recibió becas proporcionadas por CONACYT (número de registro 217522) de enero del 2007 a diciembre del 2008 y el Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) de enero del 2007 a enero del 2009.

AGRADECIMIENTOS PROFESIONALES

Agradezco a mis directores

Dra. María Guadalupe Guerra Sánchez

Dr. Miguel Gerardo Velázquez del Valle

Por la confianza y apoyo que siempre me brindaron.

Agradezco a mis sinodales

Dra. Lourdes Villa Tanaca

Dra. Luz Irene Rojas Avelizapa

Dra. Enríqueta Amora Lazcano

Dra. Ana Niurka Hernández Lauzardo

Por dedicar parte de su tiempo y su entusiasta colaboración en la revisión y corrección de esta Tesis.

Agradezco al Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez y al Dr. Oscar Flores de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México por su apoyo técnico y la buena disposición para la realización del consumo de oxígeno y los complejos respiratorios, además de su apoyo intelectual y moral.

A María Esther Sánchez Espíndola por su amabilidad y su inestimable ayuda para la realización del estudio de microscopía electrónica y por hacer más ameno el trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas:

A mis padres y hermanos

Por la confianza, el apoyo, el estímulo constante y su inacabable paciencia en los momentos de desánimo, ya que todo lo que han hecho ha permitido que llegue hasta aquí, a ustedes les comparto este logro y espero jamás defraudarlos.

A mis compañeras (os) de laboratorio

Griselda, Selene, Oliver y en especial a Ariana, Verónica, Karina y Josam compañeros de laboratorio, por su inestimable ayuda a lo largo del tiempo, su estímulo constante y por haber hecho más llevadero el ambiente de trabajo consiguiendo con su cariño y buena plática que me sintiera como en casa.

A mis amigos

Por escucharme, apoyarme, aconsejarme y alentarme a seguir.

Y en especial al Dr. Juan Pablo, al Dr. Oscar y al M. en C. Genaro Matus por brindarme su amistad y enseñarme una visión diferente de la satisfacción del trabajo en el laboratorio.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	IV
RESUMEN.....	V
ABSTRACT.....	VI

I. INTRODUCCIÓN.....	
1.1 Enfermedades de los productos hortofrutícolas.....	1
1.2 <i>Rhizopus stolonifer</i> agente causal de pudriciones postcosecha.....	2
1.3 Estrategias generales de control de <i>Rhizopus stolonifer</i>	3
1.4 Quitosano y oligoquitosano, alternativas para inhibir a <i>Rhizopus stolonifer</i>	4
1.5 Mecanismos de acción del quitosano y el oligoquitosano.....	5
1.6 Mitochondria.....	7
1.6.1 Metabolismo intermediario: ciclo de los ácidos tricarbóxicos.....	8
1.6.2 Cadena de transporte de electrones: complejos respiratorios.....	11
1.6.2.1 El complejo I: la NADH deshidrogenasa de la cadena respiratoria.....	12
1.6.2.2 Otras NADH deshidrogenasas.....	13
1.6.2.3 El complejo II: La succinato deshidrogenasa de la cadena respiratoria.....	14
1.6.2.4 El complejo III: el citocromo bc1 de la cadena respiratoria.....	15
1.6.2.5 El complejo IV: el citocromo <i>c</i> oxidasa de la cadena respiratoria.....	15
1.6.2.6 El complejo V: la ATP sintetasa de la cadena respiratoria.....	16
II. ANTECEDENTES.....	18

III.	JUSTIFICACIÓN.....	21
IV.	OBJETIVO GENERAL.....	22
4.1	Objetivos particulares.....	22
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	
5.1	Material biológico.....	23
5.2	Solución de quitosano (QT) y de oligoquitosano (OQT).....	23
5.3	Medio de cultivo y condiciones de cultivo.....	23
5.4	Efecto del quitosano y oligoquitosano en el crecimiento micelial radial de <i>R. stolonifer</i>	23
5.5	Estudio microscópico de la germinación de las esporas de <i>R. stolonifer</i> en medio líquido.....	23
5.6	Microscopía de transmisión de electrones.....	24
5.7	Consumo de oxígeno de las células enteras.....	24
5.8	Consumo de oxígeno en células permeabilizadas con digitonina.....	24
5.9	Aislamiento de mitocondrias.....	25
5.10	Ensayos enzimáticos.....	25
5.11	Técnicas de electroforesis.....	26
5.12	Actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria.....	26
VI.	RESULTADOS.....	
6.1	Efecto del quitosano y el oligoquitosano en el crecimiento micelial.....	28
6.2	Efecto del quitosano y el oligoquitosano sobre la germinación de las esporas.....	29
6.3	Ultraestructura de las esporas germinadas.....	31
6.4	Consumo de oxígeno en las células control y en las células tratadas con el quitosano y el oligoquitosano.....	32
6.5	Determinación de los parámetros cinéticos para los sustratos respiratorios.....	40
6.6	Los complejos y los supercomplejos de la cadena respiratoria.....	41

VII.	DISCUSIONES.....	
	Efecto del quitosano y el oligoquitosano en la morfología y la ultraestructura.....	51
	Efecto del quitosano y el oligoquitosano en la fisiología.....	52
	Los complejos y los supercomplejos de la cadena respiratoria.....	55
VIII.	CONCLUSIONES.....	58
IX.	REFERENCIAS.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Efecto de la concentración del quitosano y el oligoquitosano sobre el crecimiento micelial radial de <i>Rhizopus stolonifer</i> a las 36 h.....	28
Figura 2	Germinación de las esporas de <i>Rhizopus stolonifer</i> en ausencia y presencia del oligoquitosano y el quitosano después de 3, 6 y 10 horas de incubación.....	30
Figura 3	Sección de una esporangiospora de <i>Rhizopus stolonifer</i> incubada durante 6 h en medio mínimo sintético.....	33
Figura 4	Sección de una esporangiospora de <i>Rhizopus stolonifer</i> incubada durante 12 h en medio mínimo sintético.....	34
Figura 5	Sección de una esporangiospora de <i>Rhizopus stolonifer</i> incubada durante 6 h en presencia del quitosano.....	35
Figura 6	Sección de una esporangiospora de <i>Rhizopus stolonifer</i> incubada durante 12 h en presencia del quitosano.....	36
Figura 7	Consumo de oxígeno de las células de <i>Rhizopus stolonifer</i> tratadas y no tratadas con el quitosano y el oligoquitosano a las 6 y 12h de cultivo.....	37
Figura 8	Consumo de oxígeno de las células control, las células cultivadas con el quitosano y el oligoquitosano al emplear (A) el NADH, (B) el succinato y (C) el glicerol 3-fosfato como sustratos exógenos.....	39
Figura 9	Consumo de oxígeno de las células control, las células cultivadas con el quitosano y el oligoquitosano al emplear (A) la antimicina A y (B) el cianuro como inhibidores.....	40
Figura 10	Cinéticas de la dependencia de la respiración al emplear (A) el NADH, (B) el succinato y (C) el glicerol 3-fosfato) en mitocondrias aisladas de <i>Rhizopus stolonifer</i> . Se muestran los valores de V_{max} y $K_{0.5}$ para cada sustrato.....	41

Figura 11	Electroforesis en condiciones nativas (BN-PAGE) de las mitocondrias de <i>Rhizopus stolonifer</i> solubilizadas con (A) el <i>n</i> -dodecil maltosido y (B) la digitonina.....	43
Figura 12	Electroforesis en condiciones nativas (BN-PAGE) de las mitocondrias de <i>Rhizopus stolonifer</i> solubilizadas con 2 mg de <i>n</i> -dodecil maltosido/mg de proteína. (A) Gel nativo teñido con azul de Coomassie. (B) Gel nativo revelado por la actividad de la NADH deshidrogenasa. (C) Gel nativo revelado por la actividad de la citocromo <i>c</i> oxidasa. (D) Gel nativo revelado por la actividad de la ATP –sintetasa.....	45
Figura 13	Electroforesis en condiciones nativas (BN-PAGE) de las mitocondrias de <i>Rhizopus stolonifer</i> solubilizadas con 2 mg de digitonina/mg de proteína. (A) Gel nativo teñido con azul de Coomassie. (B) Gel nativo revelado por la actividad de la NADH deshidrogenasa. (C) Gel nativo revelado por la actividad de la citocromo <i>c</i> oxidasa. (D) Gel nativo revelado por la actividad de la ATP-sintetasa.....	46
Figura 14	Electroforesis de segunda dimensión de los complejos y supercomplejos de las mitocondrias de <i>Rhizopus stolonifer</i> . (A-B) Electroforesis en condiciones nativas (BN-PAGE/BN-PAGE 0.02% DDM) revelados por la actividad de la NADH deshidrogenasa.	48
Figura 15	Electroforesis de segunda dimensión de los complejos y supercomplejos de las mitocondrias de <i>Rhizopus stolonifer</i> . (A-B) Electroforesis en condiciones desnaturalizantes BN-PAGE/SDS-PAGE-TRICINA) teñidos con azul de Coomassie.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Enfermedades postcosecha ocasionadas por hongos.....	1
Tabla 2	Efecto de la concentración del quitosano y el oligoquitosano sobre el crecimiento micelial de <i>Rhizopus stolonifer</i> R3.....	29
Tabla 3	Relación estequiométrica de los supercomplejos de las mitocondrias de <i>Rhizopus stolonifer</i> solubilizadas con la digitonina	47
Tabla 4	Actividad de los complejos respiratorios de las mitocondrias de las células de <i>Rhizopus stolonifer</i> cosechadas a las 12 h	50

RESUMEN

Rhizopus stolonifer es un hongo fitopatógeno que causa la pudrición blanda de frutas y vegetales de importancia económica. Para controlar las pudriciones postcosecha se emplean fungicidas químicos sintéticos. Estas medidas empiezan a erradicarse y se abren paso las alternativas naturales como el uso del quitosano. El quitosano presenta potencial para controlar enfermedades postcosecha. El mecanismo de acción de este polímero no está totalmente elucidado. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del quitosano (QT) y el oligoquitosano (OQT) en el crecimiento micelial, la germinación de las esporas y la actividad mitocondrial de *R. stolonifer*. Adicionalmente, se pusieron de manifiesto las características de los complejos respiratorios del hongo utilizando cultivos de 12 h de crecimiento. La caracterización de los complejos respiratorios reveló la presencia de la NADH-ubiquinona oxidorreductasa (complejo I), la citocromo *c* oxidasa (complejo IV) y la ATP-sintetasa (complejo V) además de la formación de los supercomplejos. La aproximación teórica de la estequiometría de los complejos para la formación de los supercomplejos se asemejó a los ya reportados para otros organismos. Adicionalmente, se determinaron dos vías alternas para la oxidación del NADH, la NADH deshidrogenasa externa y la lanzadera del glicerol 3-fosfato deshidrogenasa. Algunas de las enzimas del ciclo de Krebs fueron analizadas por reacciones directas o acopladas, y solo se detectó actividad para la isocitrato deshidrogenasa y la succinato deshidrogenasa. Se analizó el efecto del QT y el OQT manteniendo las mismas condiciones de cultivo. Los resultados indicaron que el QT de bajo peso molecular y el OQT inhibieron significativamente el crecimiento micelial a las concentraciones probadas (0.5, 1.0 y 2.0 mgmL⁻¹). La máxima inhibición se obtuvo con la concentración de 2 mgmL⁻¹ y el efecto fue similar con el QT y el OQT. Ambos compuestos incrementaron el consumo de oxígeno con mayor grado para el OQT. Con respecto a la actividad de la citocromo *c* oxidasa y la ATP-sintetasa, se estimularon al menos 2 veces en presencia del QT. Los patrones electroforéticos de los complejos mitocondriales de las células tratadas con el QT y el OQT no mostraron diferencia con los no tratados. La microscopia de transmisión de electrones mostró alteraciones en la ultraestructura como engrosamiento de la pared celular y el desprendimiento de la membrana plasmática de la pared celular, así como un aumento en el número de mitocondrias en las esporas cultivadas con el QT. Estos resultados demostraron que el QT y el OQT presentan actividad antifúngica, incrementan el consumo de oxígeno y afectan las actividades de algunas de las enzimas del ciclo de Krebs y de los complejos respiratorios.

ABSTRACT

Soft rot caused by *Rhizopus stolonifer* is the most economically important postharvest disease of fruit and vegetables during storage. Chitosan is a natural alternative by controlled postharvest disease. The mechanism of action is not clear. The aim of the present study was conducted to evaluate the effect of chitosan and oligochitosan on mycelia growth, germination of spore and mitochondrial activity in *R. stolonifer*. Additionally, the presence of the classic mitochondrial complexes were analyzed in 12 h grown cells. The characterization of respiratory complexes showed NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I), cytochrome *c* oxidase (complex IV) and ATP-synthetase (complexes V). Supercomplexes were identified and the theoretical stoichiometry was compared with other organisms. Two pathways to oxidized NADH was identify, an external NADH dehydrogenase and the shuttle of glycerol 3-phosphate dehydrogenase. Several enzymes of the Krebs cycle were analyzed, but just isocitrate dehydrogenase and succinate dehydrogenase were detected. The effect of chitosan and oligochitosan was analyzed in the same conditions as the controls. The results indicated that low molecular weight chitosan and oligochitosan inhibited significantly mycelia growth at all evaluated concentrations (0.5, 1.0 y 2.0 mgmL⁻¹). Chitosan and oligochitosan increased the oxygen consumption. The highest values were obtained with oligochitosan. About the activity for cytochrome *c* oxidase and ATP-synthetase activities those were stimulated at least 2-fold in presence of chitosan. The electrophoretic patterns of the mitochondrial complexes from the cells under chitosan or oligochitosan treatment did not show any change. Transmission electron microscopy revealed ultrastructural alterations as thickness cell wall, retrained membrane plasmatic and increased on the rate of mitochondria caused by chitosan in the sporangiospores of *R. stolonifer*. These results suggest that chitosan and oligochitosan showed that the antifungal activity increased significantly the oxygen consumption and the some activities of Krebs cycle and respiratory complexes.

I.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Enfermedades de los productos hortofrutícolas

Las frutas y los vegetales son una parte importante de la dieta humana debido principalmente a que proporcionan nutrientes esenciales como vitaminas y minerales así como antioxidantes que son necesarios para la salud. Al ser cosechados y no depender de la planta los productos hortofrutícolas pierden resistencia intrínseca y son más susceptibles de ser invadidos por microorganismos patógenos, principalmente hongos (Bautista-Baños & Barrera-Necha, 2001). Estos microorganismos son los principales agentes etiológicos de diversas enfermedades postcosecha en productos hortofrutícolas (tabla 1).

Tabla 1.- Enfermedades postcosecha ocasionadas por hongos.

Enfermedad	Especie
Verruga negra de los tubérculos de la papa	<i>Synchytrium endobioticum</i>
Tizón de los frutos de diversas variedades de chiles	<i>Phytophthora capsici</i>
Pudrición suave del camote	<i>Mucor racemosus</i>
Pudrición húmeda de los frutos de la fresa, del plátano y de otros frutos.	<i>Rhizopus stolonifer</i>
Pudrición de los frutos de la vid, de la fresa y de muchas otras plantas, y pudrición de las flores de cientos de plantas ornamentales	<i>Botrytis cinerea</i>
Pudrición suave de frutos cítricos	<i>Penicillium italicum</i>
Antracnosis del naranjo, del limonero, del aguacatero y de cientos de plantas más	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>

* Fuente: Herrera y Ulloa, 1998.

Cabe aclarar que la mayor destrucción producida por hongos se inicia durante la poscosecha, invadiendo las áreas con abolladuras o golpes y algunas especies penetran las estructuras del vegetal para producir la pudrición de frutas y verduras (González-Aguilar et al., 2005).

Las enfermedades postcosecha de estos productos generan graves pérdidas económicas, las cuales pueden alcanzar en algunos casos hasta el 30 % del producto cosechado (Boyette et al., 1994). Adicionalmente, los consumidores prefieren frutas y vegetales con buena calidad sanitaria por lo que se han desarrollado plaguicidas más eficientes y mejorado las condiciones de almacenamiento de los productos cosechados, sin embargo las pérdidas postcosecha persisten.

El uso de fungicidas en los productos cosechados ha incrementado la existencia de patógenos resistentes a los mismos. El problema se agrava debido a que no se desarrollan nuevos fungicidas que puedan sustituirlos, con la misma rapidez en que los hongos adquieren resistencia, además de la percepción fundada del consumidor de que los pesticidas son dañinos para salud y el ambiente. Teniendo en cuenta esto, una gran cantidad de fungicidas empleados para el control de las enfermedades en los productos cosechados se ha retirado del mercado y se ha optado por el desarrollo de métodos alternativos para controlar las enfermedades postcosecha (Wilson et al., 1991; Janisiewicz & Korsten, 2002; Spadaro & Gullino, 2004).

1.2.- *Rhizopus stolonifer* agente causal de pudriciones postcosecha

R. stolonifer (Ehrenb.: Fr.) Vuill es uno de los principales fitopatógenos que provocan enfermedades postcosecha, es el agente causal de la pudrición blanda de frutas y hortalizas ocasionando pérdidas importantes (Velázquez-del Valle et al., 2008). Este hongo pertenece a la Subdivisión: Zygomycotina, Clase: Zygomycetes, Orden: Mucorales, Género: *Rhizopus* y Especie: *Rhizopus stolonifer* (Agrios, 2001) y se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza sobreviviendo de manera saprofita en el suelo y en residuos orgánicos. Entre sus características particulares, se encuentran la formación de micelio aéreo cenocítico y la producción de esporangióforos que presentan en sus puntas esporangios esféricos donde se alojan a las esporangiosporas. A medida que los esporangios maduran, se ennegrecen dando al moho su color característico. Cuando los esporangios maduran sus paredes se rompen, liberando esporas que pueden germinar y producir un nuevo micelio. Las esporangiosporas de *R. stolonifer* presentan diferentes formas: globosas, elipsoidales y angulares con superficies lisas o estriadas (Hernández-Lauzardo et al., 2006; Schipper, 1984).

Las esporas de *R. stolonifer* pueden sobrevivir largos periodos sin agua y soportar temperaturas elevadas, germinando sobre tejidos vegetales dañados y su rápida velocidad de crecimiento le permite colonizar la superficie de los productos agrícolas y causar la enfermedad conocida como pudrición blanda (Agrios, 2001). Este proceso se lleva a cabo mediante la excreción de enzimas pécticas del hongo que degradan y disuelven las pectinas de la lámina media de las células vegetales (Barkai-Golan, 2001). La naturaleza constitutiva de las enzimas poligalacturonasa y pectin metil esterasas en cepas de *R. stolonifer* ha sido demostrada, ya que sus concentraciones se incrementaron en presencia de pectina (Blandino et al., 2001). La fisiología de esta enfermedad es poco conocida (Stange et al., 2001).

1.3.- Estrategias generales de control de *Rhizopus stolonifer*

Tradicionalmente se han empleado compuestos químicos sintéticos para controlar las pudriciones postcosecha causadas por este fitopatógeno. Adicionalmente, se han valorado otras opciones, entre ellas podemos mencionar los cambios físicos en el medio ambiente (bajas temperaturas o tratamientos de calor) empleo de atmósferas controladas y las radiaciones [gamma (γ) y luz ultravioleta (UV)].

Entre los principales fungicidas sintéticos que se han utilizado para controlar la pudrición blanda causada por *R. stolonifer* se encuentran el Dicloran, Iprodione, Fludioxonil y Tebuconazole (Adaskaveg et al., 2002). El dicloran en estudios *in situ* realizados en duraznos (*Prunus persica* Batsch) causó una reducción de la pudrición del 87 al 100% dependiendo de la variedad (Northover y Zhou, 2002). El Iprodione demostró una reducción del 59% de la pudrición en jitomate (Abdel-Mallek et al., 1995). El empleo de otros fungicidas (benomil, miclobutanil, etc.) ha generado resistencia del patógeno que se trata de controlar (Northover y Zhou, 2002).

Las alternativas naturales han cobrado auge debido a los efectos nocivos que han causado los métodos tradicionales en el control de las enfermedades postcosecha (Tripathi y Dubey, 2004). Entre las más importantes se encuentran el uso del quitosano y oligoquitosano.

1.4.-Quitosano y oligoquitosano, alternativas para inhibir a *Rhizopus stolonifer*

La quitina es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza siendo uno de los mayores componentes del caparazón de los crustáceos como cangrejos, camarones y langostas, así como de la pared celular de los hongos. La quitina desacetilada se conoce como quitosano, polímero constituido fundamentalmente por unidades de glucosamina (2-amino-2-desoxi-D-glucosa) con uniones β (1-4) (Sandford, 1986). Este biopolímero presenta propiedades policatiónicas que lo hacen funcionalmente importante para un gran número de aplicaciones biotecnológicas, además de ser biodegradable y no tóxico para el humano (Rabea et al., 2003).

Diversos estudios han demostrado la actividad antifúngica del quitosano y su capacidad para inducir resistencia en los productos agrícolas (Terry y Joyce, 2004; Capdeville et al., 2002; Janisiewicz & Korsten, 2002; Tripathi & Dubey, 2004). El empleo de este polímero como película comestible para conservar los frutos, es una alternativa viable a los métodos de conservación de los productos agrícolas durante la fase postcosecha (Hernández-Muñoz et al., 2006).

El efecto del quitosano en la inhibición del crecimiento micelial de *R. stolonifer* ha sido analizado en varias investigaciones (El Ghaouth et al., 1992a). En algunos estudios, se ha evidenciado que presenta efecto fungicida asociado al grado de desacetilación de la molécula (El Ghaouth et al., 1992b) y en otras investigaciones se ha demostrado que el quitosano de menor peso molecular es más efectivo para inhibir el crecimiento de *R. stolonifer* (Hernández-Lauzardo et al., 2008).

Por otra parte, se ha analizado su efecto en el control de la pudrición blanda y se observó que el quitosano retrasó el desarrollo de *R. stolonifer* en jitomates almacenados a 14°C durante 48, 72 y 96 h (Bautista-Baños y Bravo-Luna, 2004). Asimismo, el recubrimiento con quitosano en fresas y cerezas (*Rubus idaeus* L.) durante su almacenamiento, mostró no sólo reducción en la enfermedad, sino que provocó un incremento en la actividad de algunas enzimas relacionadas con la inducción de resistencia vegetal (quitinasas y β 1-3 glucanasas) (Zhang y Quantick, 1998).

En los últimos años diversos investigadores han reportado que el oligoquitosano, producto más soluble y de menor peso molecular obtenido por la hidrólisis del quitosano, presenta una actividad antifúngica superior al quitosano (Kim y Rajapakse, 2005) aunque en otros casos el resultado es inverso siendo esto dependiente del microorganismo empleado

(Kyoon et al., 2002; Seyfarth et al., 2008), además de que puede inducir una mayor respuesta de defensa en los vegetales (Rabea et al., 2003).

1.5.- Mecanismos de acción del quitosano y el oligoquitosano

Los mecanismos de acción del quitosano y el oligoquitosano no han sido del todo establecidos, aunque existen algunas hipótesis al respecto. En general, las diversas propuestas para explicar la actividad antimicrobiana de estos polímeros consideran como característica fundamental la naturaleza policationica de las moléculas, la cual está dada por los grupos NH_3^+ de la glucosamina, que le confiere importantes propiedades biológicas y fisiológicas (Hernández-Lauzardo et al., 2005; Je y Kim, 2006; Liu et al., 2004).

En condiciones de pH ácido, el quitosano se comporta como un polielectrolito lineal, con un pK alrededor de 6.5, por lo tanto a pH bajos los residuos de glucosamina están cargados positivamente debido a la protonación de sus residuos aminos, conteniendo una alta densidad de cargas positivas, lo que le permite unirse fuertemente a superficies cargadas negativamente (Kim y Rajapakse, 2005; Zakrzewska et al., 2007).

Se ha propuesto que las cargas positivas del quitosano y sus derivados interactúan con las cargas negativas de las membranas celulares de microorganismos generando cambios en la permeabilidad de las mismas y salida de constituyentes intracelulares (Rabea et al., 2003). En otros reportes se ha mostrado que el quitosano daña tanto a la pared celular como a la membrana celular pero no de manera simultánea, sino mediante dos etapas: una en la que la pared celular se separa de la membrana celular llevando a la destrucción de la membrana celular y la posterior salida de enzimas y nucleótidos de diferente localización celular (Chung & Chen, 2008).

Estudios realizados en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, reportaron que la parte externa de la membrana plasmática está enriquecida por los lípidos fosfatidilcolina, ergosterol y esfingolípidos, estos últimos son los principales lípidos de la membrana plasmática y están cargados negativamente, constituyendo la mayor parte de las cargas negativas de la membrana celular (Zakrzewska et al., 2005). El más abundante de los esfingolípidos es el manosil-diiinositolfosfato-ceramida, el cual presenta dos cargas negativas, sitios donde el quitosano podría unirse mediante sus grupos amino de los residuos de glucosamina. En otros estudios se ha observado, que el quitosano forma canales de transporte de moléculas en bicapas lipídicas

artificiales, lo que provee evidencia de que el quitosano y derivados pueden desorganizar a la membrana celular (Zakrzewska et al., 2007).

Por otro lado, destacan los resultados obtenidos con *Phytophthora capsici* tratado con quitosano y oligoquitosano donde se observó que éste último fue más efectivo que el quitosano inhibiendo el crecimiento micelial del hongo y también mediante estudios de ultraestructura se observó que el oligoquitosano causó distorsión y desorganización de la mayoría de las vacuolas y del material tubular además de la desaparición de los plasmalemasomas de las células apicales de las hifas (Xu et al., 2007). Los autores sugieren que la naturaleza policationica del oligoquitosano contribuye solo de manera parcial en su actividad antifúngica y que existen otros modos de acción de este compuesto incluyendo la desorganización del sistema de membranas internas de las células. Otros autores reportan haber observado los mismos cambios en otros hongos y han incentivado la importancia de la pared celular en los microorganismos (Vessentini et al., 2007) además de que proponen que el quitosano inicialmente se adhiere a la superficie de las células y posteriormente penetra mediante un proceso dependiente de energía y causa diversas afectaciones como la desorganización del citoplasma, retracción de membranas y pérdida del contenido celular (Palma-Guerrero et al., 2008). Recientemente se realizó microscopía de barrido y de transmisión de electrones a las esporas de *R. stolonifer* obtenidas de diferentes tratamientos con quitosano. Las imágenes muestran cambios en la ornamentación y en la profundidad de la crestas (Hernández-Lauzardo et al., 2008).

Hasta el momento, el efecto del quitosano ha sido abordado con estudios sobre la capacidad antifúngica, relacionado primordialmente con la inhibición del crecimiento y alteraciones en la organización de los organelos membranosos. De gran importancia resulta abordar el efecto del quitosano sobre la fisiología de las células con un enfoque a nivel de la función mitocondrial ya que de ello depende el adecuado balance entre la disposición y demanda de energía además del entendimiento de la acción del quitosano a nivel de este organelo tan importante para la sobrevivencia de la célula.

1.6.- Mitocondria

Las mitocondrias son organelos rodeados por un sistema de doble membrana que consiste en membrana interna y membrana externa las cuales están separadas por un espacio intermembranal (Cooper G. M. & Hausman R. E., 2007), es un organelo altamente dinámico, no solo con respecto a su morfología si no también considerando su distribución dentro de la célula. El movimiento de la mitocondria en la célula se debe a mecanismos que involucran al citoesqueleto (filamentos de actina, microtubulos), así como diversas proteínas motoras como las miosinas, las dineinas o kinesinas, además existe un cambio frecuente en la forma y talla debido a los eventos de fusión y fisión. En los hongos filamentosos, las mitocondrias se observan como pequeñas fibras que están distribuidas por toda la célula y orientadas a lo largo de la hifa. Los microfilamentos y los microtubulos participan en la posición y motilidad de las mitocondrias en los hongos. (Scheffler, 2001; Westermann & Prokisch, 2002).

Los mecanismos básicos y la morfogénesis mitocondrial y la motilidad se han conservado durante el proceso de evolución de las células eucariotes. En los últimos años, *Saccharomyces cerevisiae* se ha considerado como un organismo modelo para el estudio de este proceso. Sin embargo, diversos aspectos importantes del comportamiento de la mitocondria en hongos filamentosos no se pueden estudiar en las levaduras. Las razones son varias, primero, las mitocondrias son transportadas por diferentes sistemas del citoesqueleto. El transporte dependiente de microtubulos tiene mayor importancia en los hongos que en las células animales y ésta no está presente en las levaduras. Segundo, la herencia del DNA mitocondrial (mtDNA) está íntimamente ligada a la integridad del compartimento mitocondrial. La transmisión es uniparental en el cruce sexual en los hongos filamentosos, mientras que es biparental en las levaduras. Tercero, el movimiento de la mitocondria hacia el ápice de la hifa o la distribución de los organelos en las esporas no se puede estudiar en las levaduras (Westermann & Prokisch, 2002).

Las mitocondrias junto con los cloroplastos son únicas como organelos subcelulares ya que poseen su propio genoma. Aunque la mayoría de las ~1000 proteínas de la mitocondria son codificadas por el genoma nuclear, 13 proteínas son codificadas por el mtDNA circular y son absolutamente esenciales para la respiración y la fosforilación oxidativa. Con algunas excepciones, se puede considerar que existen los mismos genes del mtDNA en otros organismos y en el caso de las plantas y los hongos contienen algunos genes adicionales. Las 13 proteínas

codificadas por el mtDNA de mamíferos incluye siete subunidades (ND1, 2, 3, 4L, 5, 6) de la NADH-ubiquinona oxidoreductasa (complejo I), una subunidad de la ubiquinona citocromo *c* oxidoreductasa (complejo III), tres subunidades (COX1, 2, 3) de la citocromo oxidasa (complejo IV) y dos subunidades de la ATP sintasa (complejo V). Todas estas proteínas están embebidas en la membrana interna en asociación con otras subunidades de los complejos para el transporte de electrones. Por tanto, es posible encontrar a la mitocondria en distintos procesos como la replicación y reparación del DNA, la transcripción y síntesis de proteínas en la matriz. Todas las enzimas y factores requeridos tienen que ser importados desde el citosol (Scheffler, 2001).

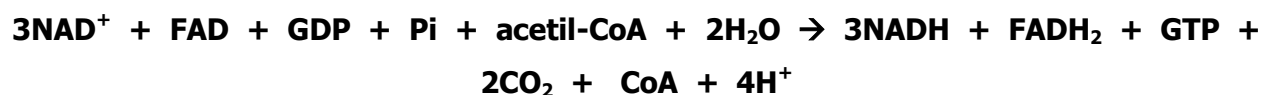
Al referirse a las mitocondrias es dispensable abordar dos componentes relacionados entre sí, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la cadena transportadora de electrones. El ciclo de Krebs produce una gran cantidad de NADH el cual debe ser reciclado. La cadena transportadora de electrones oxida el NADH, empleando oxígeno como el último aceptor de electrones.

1.6.1.- Metabolismo intermediario: ciclo de los ácidos tricarboxílicos

En la mitocondria se encuentra compartamentalizadas muchas de las diferentes reacciones metabólicas como el ciclo de Krebs, el ciclo de la urea, la oxidación de ácidos grasos, la biosíntesis del grupo hemo, entre otros (Scheffler, 2001).

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs es una vía metabólica esencial para canalizar la energía que provienen de los carbohidratos, los ácidos grasos y los aminoácidos hacia la síntesis de ATP, y para realizar diversas funciones biosintéticas. El ciclo consiste en una serie de ocho reacciones enzimáticas, en las que se oxidan una gran variedad de sustratos y los electrones se incorporan al NAD⁺ y al FAD, que alimentan la cadena respiratoria para la producción de ATP.

Una vuelta completa del ciclo produce dos moléculas de CO₂, tres de NADH, una de FADH₂ y un compuesto de alta energía (GTP o ATP). La reacción neta es:

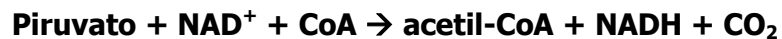


Es un ciclo anfibólico, es decir, participa tanto en procesos catabólicos como anabólicos. Asimismo, los intermediarios del ciclo de Krebs son una fuente importante de precursores biosintéticos, ya que los compuestos de carbono son utilizados como puntos de partida para la síntesis de biomoléculas importantes como lo son los aminoácidos, los nucleótidos y las porfirinas, según los requerimientos de la célula.

Las reacciones enzimáticas del ciclo de Krebs se producen en el interior de las mitocondrias a diferencia de la glucólisis que se produce en el citosol. En el ciclo existen tres pasos en los que la deshidrogenación de sustratos está acoplada a la formación de NADH. De isocitrato a α -cetoglutarato, de α -cetoglutarato a succinil CoA y de malato a oxaloacetato. La oxidación de 1 mol de NADH por la cadena respiratoria resulta en la producción de ATP.

La regulación de las reacciones enzimáticas del ciclo se llevan a cabo mediante la estimulación o inhibición de las enzimas por las concentraciones intracelulares de ATP/ADP o AMP, NADH/NAD⁺, succinil CoA/CoA y acetil CoA/CoA. Los pasos limitantes son la piruvato deshidrogenasa, la citrato sintasa, la isocitrato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa.

La piruvato deshidrogenasa cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato hasta acetil-CoA

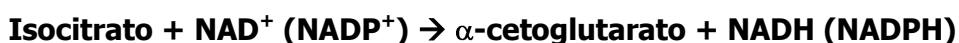


La citrato sintasa cataliza la condensación de la acetil-CoA con el oxaloacetato. Esta reacción es el punto en el cual los átomos de carbono provenientes de los carbohidratos, los ácidos grasos y los aminoácidos, alimentan el ciclo en forma de acetil-CoA. El flujo a través de esta enzima en mitocondrias intactas está regulado por cambios en las concentraciones de la acetil-CoA y es inhibida por concentraciones fisiológicas del NADH, el NADPH y la succinil-CoA (Williamson & Cooper, 1980).



La isocitrato deshidrogenasa cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato para formar α -cetoglutarato, produciendo el primer CO₂ y NADH del TCA. Las mitocondrias de las

levaduras, las plantas y los mamíferos presentan dos tipos de isocitrato deshidrogenasa, una depende de NAD^+ y la otra de NADP^+ . La IDH que depende de NAD^+ requiere de Mn^{+2} o Mg^{+2} como cofactor y se regula alostericamente por los nucleótidos de adenina y el NADH (Igamberdiev & Gardeström, 2003; Zhao & McAlister-Henn, 1996; Hathaway & Atkinson, 1963). En las levaduras, la reacción catalizada por esta enzima constituye un paso limitante del flujo a través del ciclo del TCA y es irreversible bajo condiciones fisiológicas (Barnes et al., 1972).



La α -cetoglutarato deshidrogenasa cataliza la descarboxilación oxidativa del α -cetoglutarato para formar succinil-CoA, que es un tioéster de alta energía, y se produce el segundo CO_2 y NADH del ciclo. La regulación de la KGDH es compleja, debido a que involucra las reacciones de ATP/ADP, NADH/NAD⁺ y la disponibilidad de sustratos en la mitocondria. Además la enzima se regula alostericamente por los nucleótidos de adenina y el Ca^{+2} , y también por la inhibición de los productos, en este caso por el NADH y la succinil-CoA. La KGDH es un punto de control importante en el metabolismo mitocondrial, y podría desempeñar un papel clave en el déficit bioenergético durante el estrés oxidativo, ya que cuando la KGDH se inhibe por dichas especies reactivas, la entrada del NADH a la cadena respiratoria se limita (Tretter & Adam-Vizi, 2005; Bunik, 2003; Nichols & Denton, 1995; Williamson & Cooper, 1980).



La malato deshidrogenasa cataliza la reacción final del TCA, regenerando el oxaloacetato. El grupo hidroxil del malato se oxida en una reacción dependiente de NAD^+ . El equilibrio de esta reacción se encuentra muy desplazado hacia la formación del malato en condiciones termodinámicas estándar. Sin embargo, en la célula intacta el oxaloacetato se consume continuamente debido a la reacción altamente exergónica de la CS, por lo que la concentración intracelular de oxaloacetato se mantiene en niveles muy bajos, lo que empuja la reacción de la MDH hacia la formación de oxaloacetato.



1.6.2.- Cadena de transporte de electrones: complejos respiratorios

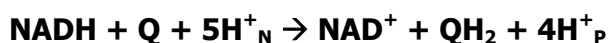
La cadena transportadora de electrones oxida el NADH, empleando oxígeno como el último aceptor de electrones. La compleja cadena transportadora de electrones (complejo I, III, IV y complejo II si se incluye la oxidación del succinato) está diseñada para hacer uso de la energía libre liberada por la oxidación de NADH. En primer lugar, la energía se emplea para la síntesis de ATP, la moneda energética de la célula, mediante la fosforilación oxidativa. La hipótesis quimiosmótica de Mitchell establece que los complejos de la cadena transportadora de electrones (excepto el complejo II) acoplan el transporte de electrones al bombeo de protones y que el gradiente de protones es empleado para la síntesis de ATP por medio del complejo V. Las bases de este principio se aplican a la fosforilación oxidativa en mitocondrias, a la fotosíntesis y reacciones asociadas en los cloroplastos y en organismos procarióticos capaces de usar la luz para dirigir la síntesis de ATP.

En bacterias, plantas y hongos se encuentran complejos con funciones similares a la cadena transportadora de electrones. En general, los complejos bacterianos tienen subunidades para los cuales sus ortólogos existen en la mitocondria de mamíferos pero los complejos de los mamíferos contienen subunidades adicionales.

La idea de una enzima limitante en la vía bioquímica como un mecanismo de control ha permitido formular la teoría de control de flujo o análisis del control metabólico. Su aplicación a la fosforilación oxidativa sugiere un mecanismo más complejo para el control. Para tener una idea de la complejidad se sabe que los niveles de NADH pueden dirigir el transporte de electrones, pero el NADH puede actuar como un inhibidor por feedback de la piruvato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa y con ello afectar la actividad del ciclo de Krebs. El transporte de electrones y bombeo de protones contra un gradiente ejerce presión que es disipado por la síntesis de ATP. El ADP, el ATP o ambos pueden ser efectores alostéricos del complejo IV (Scheffler, 2001).

1.6.2.1.- El complejo I: la NADH deshidrogenasa de la cadena respiratoria

La NADH-ubiquinona oxidorreductasa, también llamada NADH deshidrogenasa o complejo I, es el primer componente de la cadena respiratoria y cataliza la siguiente reacción:



En donde Q se refiere a la ubiquinona, H^+_{N} a los protones que se tomaron del lado negativo de la membrana (matriz) y H^+_{P} a los protones que se transportaron al lado positivo de la membrana (espacio intermembranal)

El complejo I está formado por aproximadamente 43 diferentes subunidades en las mitocondrias de los mamíferos, mientras que en *Neurosporas crassa* hay 35 y en las bacterias 14. La NADH deshidrogenasa de los eucariotes tiene una masa molecular de 1000 kDa que es aproximadamente el doble de la masa del complejo I de las bacterias (530 kDa).

En la construcción del complejo I de las mitocondrias intervienen tanto el genoma nuclear como el mitocondrial. Este último codifica para las siete subunidades hidrofóbicas de la membrana. Las subunidades codificadas por el genoma nuclear y mitocondrial se deben ensamblar para producir la forma activa del complejo I. Por tanto, las siete proteínas hidrofóbicas codificadas por el genoma mitocondrial junto con otras de origen nuclear se ensamblan para dar el dominio membranal, mientras que las subunidades restantes codificadas por el genoma nuclear se ensamblan para construir el dominio periférico. Finalmente, ambos subcomplejos se unen para dar lugar a la enzima activa.

Existe una gran cantidad de inhibidores que interactúan con el complejo I, algunos de origen natural, como los rotenoides y las piericidinas, y otros de origen sintético, como el amital y ciertos pesticidas. Estos compuestos poseen como características común una estructura con una "cabeza" cíclica (corresponde al anillo de la ubiquinona) y una cola hidrofóbica, que corresponde a las unidades de isopreno ([Pardo et al., 2001a](#)).

1.6.2.2.- Otras NADH deshidrogenadas

En las mitocondrias de las plantas y de los hongos, incluyendo las levaduras hay una vía alternativa para la respiración y transferencia de electrones directamente de la poza de ubiquinona al oxígeno, que rodea al complejo III y al citocromo *c* oxidasa, dos sitios de conservación de energía en la célula (Veiga et al., 2003). *Saccharomyces cerevisiae*, contienen al menos dos diferentes NADH:ubiquinona oxidorreductasas en la membrana interna mitocondrial; ambas son insensibles a la rotenona y no bombean protones a través de la membrana. Ninguna de ellas se encuentra en las mitocondrias de mamífero. Una de las enzimas, la NADH deshidrogenasa externa, tiene un sitio activo en el espacio intermembranal y está involucrada en la oxidación del NADH que se produce en el citosol; se considera que esta enzima tiene un papel fisiológico equivalente al de la lanzadera de malato/aspartato presente en los eucariontes superiores, pero que está ausente en *S. cerevisiae*.

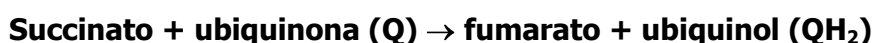
El sitio activo de la otra deshidrogenasa, la NADH deshidrogenasa interna, se localiza en la matriz mitocondrial. Esta enzima se encarga de oxidar al NADH que se produce en el ciclo de Krebs y como resultado de la actividad del alcohol deshidrogenasa mitocondrial. Su papel fisiológico es el de suplir al complejo I. A diferencia del complejo I clásico, estas enzimas son estructuralmente más sencillas, con una sola subunidad que tiene al FAD como grupo prostético unido no covalentemente; además, no presenta centro fierro azufre. La NADH deshidrogenasa interna se ha reportado en la mitocondrias de las plantas y de *N. crassa*. En la membrana interna mitocondrial de estos organismos, con la excepción de *S. cerevisiae*, coexisten la NADH deshidrogenasa interna insensible a rotenona. El significado fisiológico de la presencia de ambas vías no es claro, aunque la expresión de éstas está en función del estado metabólico del organismo. Por ejemplo, cuando se cosecha a la levadura *Candida utilis* en la fase logarítmica de crecimiento, sus mitocondrias carecen del complejo I y la actividad de NADH deshidrogenasa que presentan es insensible a rotenona, mientras que en la fase estacionaria, aparece el complejo I con sensibilidad a la rotenona.

En estas deshidrogenadas el transporte de electrones se realiza del NADH al grupo prostético FAD de la enzima, en un proceso en el que los dos electrones se transfieren simultáneamente, razón por la cual no se producen radicales libres del tipo de la semiflavona o semiquinona. Posteriormente los dos electrones pasan a la quinona que se encuentra en la membrana. La actividad de oxidorreducción de estas enzimas se lleva a través de la membrana,

por lo que su actividad no genera un gradiente de potencial electroquímico de protones (Pardo et al., 2001a).

1.6.2.3.- El complejo II: La succinato deshidrogenasa de la cadena respiratoria

El complejo II o succinato deshidrogenasa cataliza la oxidación del succinato a fumarato en el ciclo de Krebs y dona electrones a la ubiquinona en la membrana. La reacción de oxidorreducción no está acoplada con la translocación de protones a través de la membrana, por lo que se puede resumir en la siguiente ecuación:

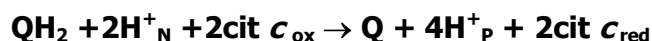


La enzima contiene un dominio periférico, expuesto a la matriz mitocondrial, y un dominio membranal que tiene el o los sitios de unión para la ubiquinona. La parte periférica está formada por dos subunidades. La primera de ellas, la subunidad A, es una flavoproteína que tiene el sitio de unión para el succinato y, como grupo prostético, un FAD unido covalentemente. La segunda proteína, la subunidad B, presenta tres centros fierro-azufre, denominados S1, S2 y S3. Los centro fierro-azufre que se localizan en el dominio periférico, así como el grupo prostético FAD, son esenciales para que se lleve a cabo el transporte de electrones dentro de la proteína durante la reacción de oxidorreducción.

El malonato y el oxaloacetato son potentes inhibidores que compiten con el sustrato dicarboxílico por la unión al sitio activo de la succinato quinona:oxidoreductasa (SQR), aunque la sensibilidad varía de manera importante entre las diferentes clases de SQR/QFR. Hay otros inhibidores que interfieren con la unión o el plegado de la quinona. Entre los más conocidos están el 2-treoniltrifluoroacetona (TTFA), el 5,6-dihidro-2metil-1,4 oxatina-3-carboxalida, el 2-n-heptil-4-hidroxiquinolina N-oxido (HQNO) y el 5,6-dihidro-2-metil-1,4-oxatin-3-carboxianilida (carboxina). La sensibilidad a estos inhibidores varía dependiendo del estado de oxidación de las enzimas (Pardo et al., 2001b).

1.6.2.4.- El complejo III: el citocromo bc1 de la cadena respiratoria

El complejo bc1 cataliza la transferencia de dos electrones del ubiquinol a dos moléculas de citocromo c, como se ven en la siguiente ecuación:



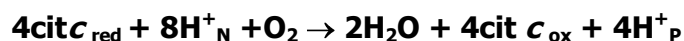
La reacción de oxidorreducción se acopla al bombeo de dos protones del lado negativo de la membrana al lado positivo (H^+ vectoriales), y la liberación de otros dos H^+ que provienen de la reacción de oxidorreducción del ubiquinol (H^+ escalares).

En algunas bacterias, como *Paracoccus denitrificans*, el complejo III está formado por 3 proteínas de membrana que constituyen la unidad funcional mínima. En contraste, además de las tres subunidades hidrofóbicas que tienen homología con las de bacterias, en las mitocondrias hay 8 subunidades adicionales, cuya función probablemente sea de tipo estructural. Independientemente del número de cadenas polipeptídicas que forman al complejo III, éste tiene cuatro grupos redox distribuidos en las tres subunidades hidrofóbicas que participan en la transferencia de los electrones (Pardo et al., 2001c).

Algunos de los inhibidores empleados son la estigmatellina, las hidroxiquinonas y el mixotiazol, que inhiben la oxidación del ubiquinol en el lado positivo de la membrana [P, el espacio intermembranal] (Rich et al., 1990; Bechmann et al., 1992; Gutierrez-Cirlos & Trumpower, et al 2002; Sun & Trumpower, 2003), la antimicina A, que bloquea la reoxidación del citocromo b en el lado negativo de la membrana [N, la matriz mitocondrial] (Trumpower & Edwards, 1979).

1.6.2.5.- El complejo IV: el citocromo c oxidasa de la cadena respiratoria

La citocromo c oxidasa cataliza la transferencia de los electrones al oxígeno, de acuerdo con la siguiente reacción:



Los cuatro electrones provienen de cuatro equivalentes de citocromo c en el lado positivo [P, el espacio intermembranal] de la membrana que, en forma secuencial, ceden sus electrones a la citocromo c oxidasa. Por cada molécula de oxígeno que se reduce se usan ocho H^+ del lado negativo [N, la matriz mitocondrial] de la membrana, cuatro de ellos se usan en la química de la

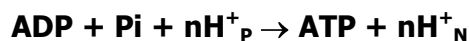
reducción del oxígeno y los otros cuatro se bombean al lado P de la membrana. Debido a que los H⁺ y los electrones que se usan para producir el agua vienen de lados opuestos de la membrana, la reacción química se asocia con la translocación neta de cuatro cargas a través de la membrana por cada molécula de oxígeno. Asimismo, la enzima bombea cuatro H⁺ electrogénicamente, lo que resulta en un total de 8 cargas que se transportan a través de la membrana y en la generación de un gradiente de potencial electroquímico de H⁺.

En las mitocondrias de mamíferos la enzima está formada por 13 subunidades, pero solamente la subunidad I está conservada en todas las oxidasas que usan cobre. Por otro lado, la subunidad II contiene el centro binuclear CuA que se encarga de recibir electrones del citocromo *c*. En ciertas bacterias, como *Paracoccus denitrificans*, las citocromo *c* oxidasas del tipo *aa3* son más sencillas, y algunas están formadas por cuatro subunidades. Se ha demostrado que la unidad catalítica mínima de la citocromo *c* oxidasa está formada por las subunidades I y II, las cuales contienen todos los centros redox que participan en la oxidación del citocromo *c* y en la reducción del oxígeno (Pardo et al., 2001d).

El cianuro ha demostrado ser un potente inhibidor de la reacción que cataliza la citocromo *c* oxidasa (Fukumori et al., 1981; Fukumori et al., 1987).

1.6.2.6.- El complejo V: la ATP sintetasa de la cadena respiratoria

La ATP sintetasa cataliza, en condiciones fisiológicas, la síntesis de ATP en un proceso que se acopla a la disipación del gradiente electroquímico de protones. La reacción se describe a continuación:



En donde n corresponde al número de protones que fluyen a través de la membrana por cada molécula de ATP que se sintetiza, y los subíndices P y N indican el lado positivo y negativo de la membrana, respectivamente.

Todas las ATP sintetasas están formadas por dos porciones, una soluble (F₁) y otra membranas (F₀). En el caso de la sintetasa de *E. coli*, la porción F₁ está constituida por las subunidades α (55 kDa), β (50 kDa), γ (31 kDa), δ (19 kDa) y ε (14 kDa), con una estequiometría α₃β₃γδ_ε. La porción F₀ en *E. coli* está formada por las subunidades a (30kDa), b

(17 kDa) y c (8 kDa) con una estequiometría $a_2b_2c_{12}$. La subunidad que confiere sensibilidad a la oligomicina (OSCP) corresponde a su subunidad δ de la enzima de *E. coli*.

En la región F_1 es en donde se lleva a cabo la hidrólisis del ATP, mientras que en la F_0 ocurre el transporte de H^+ . Hay seis sitios de unión para los nucleótidos en el hexámero $\alpha_3\beta_3$, todos ellos en las interfases entre las subunidades α y β . Los sitios catalíticos se encuentran predominantemente en las subunidades α . El papel de estos últimos en la hidrólisis del ATP o en la regulación de la actividad de la enzima está todavía en discusión. Por otro lado, tanto la síntesis de ATP como su hidrólisis se caracterizan por presentar una cooperatividad catalítica muy importante.

Como se mencionó, los sitios catalíticos de la ATP sintetasa trabajan de manera cooperativa y alternan, en forma secuencial, entre tres diferentes estados conformacionales con diferentes afinidades por los nucleótidos. Estos tres estados son el abierto (open, O), el laxo (loose, L) y el compacto (tight, T). De acuerdo con el modelo de Boyer, cuando el sitio se encuentra en la conformación O está vacío, mientras que en la forma L el sitio tiene ADP y fosfato inorgánico, y si adopta la conformación T hay una molécula de ATP fuertemente unida. La energía del gradiente de protones se utiliza para convertir al sitio T, con ATP fuertemente unido, en un sitio O, lo que conduce a la liberación del nucleótido. Simultáneamente, un sitio L con ADP y fosfato inorgánico se convierte en un T, lo que da lugar a la síntesis de una molécula de ATP en uno de los sitios activos de la enzima. Asimismo, un sitio O, con baja afinidad por los nucleótidos, se convierte en sitio L, listo para unir a los sustratos. A este modelo se le conoce con el nombre de mecanismo de sitios alternantes, y se basa en la transformación secuencial de la conformación estructural de los sitios, misma que se expresa en cambios en sus afinidades por los sustratos y los productos durante el ciclo catalítico (Pardo et al., 2001e).

II.- ANTECEDENTES

Con el objetivo de controlar las enfermedades postcosecha se buscan alternativas naturales que no afecten la salud del humano y al medio ambiente. Se ha demostrado que el quitosano presenta actividad antifúngica en contra del fitopatógeno postcosecha *Rhizopus stolonifer* (El Ghaouth et al., 1992a). Recientemente, Hernández-Lauzardo et al., (2008) estudiaron el efecto del quitosano con diferentes pesos moleculares sobre el desarrollo *in vitro* de *R. stolonifer*, los autores reportaron que el quitosano de bajo peso molecular fue más efectivo para inhibir el crecimiento micelial, mientras que el quitosano de alto peso molecular afecto la producción y germinación de las esporas.

A partir de los estudios que demostraron las distorsiones que genera el quitosano en las membranas internas y la desorganización de los organelos (Xu et al., 2007), se propone evaluar el efecto del quitosano a nivel de la mitocondria, organelo membranoso responsable de suministrar la energía necesaria para la actividad celular.

Debido a que el estudio de los parámetros bioenergéticos está muy limitado en células enteras debido a la poca permeabilidad de la membrana plasmática a los diferentes sustratos o inhibidores, la mayoría de los estudios se realizan en mitocondrias aisladas. Sin embargo, la desventaja que tiene la preparación de mitocondrias que se obtiene de células con una pared celular muy resistente es que las mitocondrias se dañan fácilmente, además de que se requiere de una gran cantidad de biomasa, por lo que la permeabilización celular es una alternativa para estudiar la actividad mitocondrial mediante el consumo de oxígeno. Así, la permeabilización de la membrana celular a componentes de bajo peso molecular permite la libre difusión de sustratos y productos además de que proporciona condiciones controladas para los análisis enzimáticos. Con esta técnica las enzimas se mantienen a concentraciones fisiológicas dentro de los límites de la célula, haciendo posible la restauración de las vías metabólicas. El método basado en la permeabilización con digitonina, ofrece una acción selectiva sobre la membrana celular y se ha utilizado en células de animales, de protozoarios y de hongos (Cordeiro & Ponces, 1995; Fiskum, 1985).

Por otra parte, la falta de información acerca de la actividad de las enzimas del ciclo de Krebs y de la composición de la cadena respiratoria de *Rhizopus* spp., hace necesario

determinar las características particulares de estos componentes en condiciones óptimas y posteriormente evaluar el posible daño ocasionado por el quitosano.

Las enzimas que constituyen al ciclo de Krebs se encuentran compartimentalizadas en la mitocondria, para estudiarlas se requiere aislarlas y posteriormente evaluar sus actividades en condiciones óptimas.

Los componentes de la cadena respiratoria en mamíferos están representadas básicamente por la presencia de complejo I, complejo II, complejo III, complejo IV y la ATP sintasa. Estos complejos en conjunto llevan a cabo la transferencia de electrones hasta el oxígeno, con la consecuente generación de la fuerza protón motriz útil para la producción de ATP. Una característica importante de las mitocondrias de plantas y de algunos hongos es la presencia de componentes alternativos para la transferencia de electrones que no están acoplados a la síntesis de ATP (Joseph-Horne et al., 2001). La presencia de una NADH deshidrogenasa alterna permite la oxidación del NADH sin tener que pasar los electrones por el complejo I y una oxidasa alterna que evita el paso de los electrones por el complejo III y el complejo IV pero que los dirige hacia el oxígeno.

El control del balance redox intracelular, que se refleja en la proporción de NADH/NAD⁺, es importante para mantener la oxidación de los sustratos celulares. Durante el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* se produce un exceso de NADH en el citoplasma debido a la formación de biomasa y de diferentes bioproductos. La síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y hasta de lípidos está asociado con la asimilación de NADH (Alberts et al., 1996). Así, en condiciones aerobias la cadena transportadora de electrones mitocondrial se encarga de oxidar el exceso de NADH citoplásmico. Como ya se mencionó el complejo I y las NADH deshidrogenasas alternas se encargan de oxidar el NADH, aunque esta oxidación también puede estar dada por sistemas de lanzaderas, como la lanzadera de glicerol 3-fosfato entre otras que también se consideran importantes para mantener el balance redox (de Vries & Marres 1987; Rigoulet et al., 2004; Larsson et al., 1998).

Como consecuencia de la resolución de las estructuras atómicas de los diversos complejos de la cadena respiratoria mitocondrial se han establecido dos modelos para el arreglo de los complejos en la membrana. Por una parte la organización azarosa de los complejos respiratorios y por otra la formación de un supercomplejo debido a asociaciones estables entre las diversos complejos (Bianchi et al, 2004).

A pesar de que los complejos respiratorios son totalmente funcionales de manera individual, recientemente, ha surgido evidencia de que los complejos se pueden ensamblar estequiométricamente en las mitocondrias de mamíferos, levaduras y en las membranas de las bacterias lo que sugiere un modelo de la cadena respiratoria basada en una conexión directa entre los complejos y no por medio de choques azarosos. Incluso existe evidencia de que el complejo V existe en su forma dimérica en la membrana mitocondrial. El papel de los supercomplejos en la cadena respiratoria es aumentar la catálisis, dirigir los sustratos y estabilizar al complejo I por medio del complejo III y IV (Schägger, 2001; Schägger & Pfeiffer, 2001; Bianchi et al, 2004).

Para referir el tamaño de los complejos y de los supercomplejos en la cadena respiratoria de diversas células, se utilizan mitocondrias aisladas que se someten a solubilización con diversos detergentes como digitonina y dodecil maltosido, y se realizan los perfiles electroforéticos de los diversos complejos revelados por su actividad ya que este tipo de procedimiento permite que se conserve su actividad lo más intacta posible. Por ende, se puede intentar establecer la organización de estos complejos y referirlo como una posible evidencia de lo que sucede *in vivo*.

Resulta evidente la importancia de la función de las mitocondrias para la viabilidad de los organismos, por lo que consideramos que el quitosano puede afectar la funcionalidad de éste organelo produciendo una inhibición en el desarrollo de los hongos fitopatógenos como es el caso de *Rhizopus stolonifer*, por lo que se propuso la realización del presente trabajo de investigación.

III.- JUSTIFICACIÓN

El quitosano es una alternativa natural que inhibe el desarrollo de diversos hongos, entre ellos a la especie *Rhizopus stolonifer* que causa la pudrición blanda en productos hortofrutícolas. El mecanismo de acción de este polímero no está totalmente establecido. Se considera que las cargas negativas de la membrana plasmática de los microorganismos alteran la permeabilidad y funcionalidad de la misma. Recientemente, se ha demostrado que este polímero puede afectar la organización celular interna, principalmente los sistemas endomembranales. Las mitocondrias son organelos membranosos encargados de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular y de oxidar metabolitos (ciclo de Krebs, β -oxidación de los ácidos grasos). Adicionalmente, las mitocondrias son el blanco de numerosas moléculas transductoras de señales que se generan en condiciones de estrés y que pueden causar el inicio del proceso de apoptosis celular. A la fecha, los sistemas mitocondriales de hongos filamentosos han sido poco estudiados y no encontramos reportes del efecto que puede tener el quitosano sobre la funcionalidad de estos organelos. Por lo anterior, en este trabajo se propone evaluar el efecto del quitosano y el oligoquitosano en el crecimiento micelial, la germinación de las esporas y la actividad mitocondrial de *R. stolonifer*

IV.- OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto del quitosano sobre la actividad mitocondrial de *Rhizopus stolonifer*.

4.1.- Objetivos Particulares

1. Evaluar el efecto del quitosano en el crecimiento micelial y en la germinación de las esporas de *R. stolonifer*.
2. Realizar el estudio microscópico de la ultraestructura de las esporas cultivadas en ausencia y presencia del quitosano.
3. Evaluar el consumo de oxígeno en células cultivadas en ausencia y presencia de quitosano empleando sustratos e inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial.
4. Caracterizar los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en mitocondrias aisladas de células cultivadas en ausencia y presencia de quitosano.
5. Determinar la actividad de algunas enzimas del ciclo de Krebs y de los complejos respiratorios en mitocondrias aisladas de células cultivadas en ausencia y presencia del quitosano.

V.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Material biológico. Se empleó la cepa de *Rhizopus stolonifer* R3 aislada de frutos de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) del tipo "Saladette" provenientes de Yautepec, Morelos (Hernández-Lauzardo et al., 2006).

5.2.- Solución de quitosano (QT) y de oligoquitosano (OQT). Se preparó una solución concentrada de quitosano (10 mg/mL) de bajo peso molecular (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en agua destilada con 1% de ácido acético (agitación vigorosa por 2 horas), ajustando el pH a 5.6 con NaOH. El volumen se ajustó con agua destilada y se esterilizó a 121 lb/15 min (Guerra-Sánchez et al., 2009). Se preparó una solución concentrada de oligoquitosano (40 mg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en agua destilada y se esterilizó por filtración (Xu, et al 2007a). Para los diferentes tratamientos del QT y el OQT se emplearon las concentraciones de 0.5, 1 y 2 mg/mL.

5.3.- Medio de cultivo y condiciones de cultivo. La cepa se mantuvo y propagó en medio papa dextrosa agar (PDA) a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Las esporas se recolectaron directamente de la placa con ayuda de una varilla acodada y agua destilada estéril. Para obtener esporas germinadas se utilizó medio mínimo líquido (10 g de glucosa, 3 g de NH_4NO_3 y 62.5 ml de solución de sales y elementos trazas) a pH 5.6, los matraces se incubaron a 28°C de tres hasta 24 h de acuerdo a las necesidades (Guerra et al., 2009).

5.4.- Efecto del quitosano y el oligoquitosano en el crecimiento micelial radial de *R. stolonifer*. Para estudiar el efecto del QT y el OQT en el micelio se utilizaron placas de medio mínimo sólido (1.5% agar); el QT y OQT se adicionaron al medio después de esterilizar. Discos de micelio (5 mm) del hongo cultivado en PDA por tres días se colocaron en el centro de la placa con los diferentes tratamientos. El testigo se realizó en placas con medio mínimo sólido. Todas las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 72 h. El crecimiento micelial se midió con un vernier digital cada 12 horas y se expresó como un promedio de los diámetros (mm). El análisis estadístico de los datos se realizó usando ANOVA (Sigma Stat versión 2.0).

5.5.- Estudio microscópico de la germinación de las esporas de *R. stolonifer* en medio líquido.

Se realizó la evaluación microscópica de la germinación de las esporas y se empleó la concentración de 1 mg mL^{-1} del QT y el OQT, respectivamente (Hernandez-Lauzardo et al. 2008). Alícuotas de 1 mL de una suspensión de esporas (1×10^6 esporas mL^{-1}) se colocaron en matraces con 50 mL de medio mínimo líquido con los diferentes tratamientos del QT y el OQT. Los matraces se incubaron a 28°C y durante los periodos de 3, 6, 10, 12 y 24 h se cosecharon la biomasa y se observó al microscopio de luz (40

aumentos). Se consideró una espora germinada cuando el largo del tubo germinal fue igual o excedió el largo de la espora (El Ghaouth et al, 1992a).

5.6.- Microscopía de transmisión de electrones. Después de 6 y 12 h de incubación de las esporas en ausencia y presencia de QT (1 mg/mL), se cosechó la biomasa por centrifugación y se colocó en 2 y 6 % de glutaraldehído disuelto en un regulador de fosfatos a 4°C por 24 h. Se lavó tres veces con el regulador de fosfatos más sacarosa y se colocaron 2h con 1% de tetróxido de osmio a 4°C. Las muestras se deshidrataron gradualmente con alcohol (10 – 90%) haciendo los cambios cada 10 min. seguido de tres deshidrataciones con alcohol absoluto. Después de colocaron en una mezcla de alcohol absoluto:óxido de propileno (relación 2:1, 1:1 y 1:2) por 20 min. Posteriormente, se colocaron en una mezcla de óxido de propileno:resina (relación 2:1, 1:1 y 1:2) por 1h, luego se dejó polimerizar en la resina (Epon) a 60°C. Se realizaron cortes de 70 nm que se colocaron en una rejilla de cobre, se contrastaron con acetato de uranilo acuoso y acetato de uranilo en etanol durante 15 min., respectivamente, haciendo lavados exhaustivos en cada cambio; finalmente se colocaron en plomo durante 20 min. y se observaron en un microscopio TEM JEOL-1010 a 60 kv.

5.7.-Consumo de oxígeno de las células enteras. El consumo de oxígeno se midió polarográficamente empleando un electrodo de oxígeno tipo Clark. Todos los experimentos se realizaron en una cámara de respiración empleando un regulador (medio de respiración) que consistió de 20 mM HEPES-KOH-pH 7.0, 5 mM K_2HPO_4 , 135 mM KCl y 5 mM $MgCl_2$. El volumen de reacción fue de 1.5 mL y se mantuvo a 25°C. Se emplearon inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial como la antimicina A (stock 0.1 mM disuelto en etanol) para inhibir al complejo III, el cianuro de potasio (stock 100 mM) para inhibir al complejo IV y el n-octil galato para inhibir a la oxidasa alterna; el consumo de oxígeno se expresó en $nmolO_2min^{-1}$. La sensibilidad a estos inhibidores se ensayó a diferentes concentraciones.

5.8.- Consumo de oxígeno en las células permeabilizadas con digitonina. El medio de respiración fue el mismo empleado en células enteras. La permeabilización de las células se realizó tratando a las células con 0.02% de digitonina (stock 10%). Las reacciones se iniciaron con la NADH (stock 82 mM) para la actividad de la NADH deshidrogenasa externa, el succinato (stock 820 mM) para la actividad del complejo II, el glicerol 3-fosfato (stock 1 M) para la actividad de la lanzadera glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, el malato + el piruvato (stock 1 M, respectivamente) para la actividad de la lanzadera aspartato-malato y el malato + el glutamato (stock 1 M, respectivamente) para la actividad de la lanzadera piruvato-malato. Se empleó la flavona para inhibir a la NADH deshidrogenasa externa y la rotenona para comprobar la integridad de la membrana mitocondrial por ser un inhibidor del complejo I; el consumo de oxígeno se expresó en $nmolO_2min^{-1}$. Para la dependencia de la respiración con respecto a los diversos sustratos se adicionaron a diferentes concentraciones. La actividad se expresó en $nmolO_2$

consumido $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de células sabiendo que la concentración de oxígeno disuelto en el agua a 25°C fue de $210 \text{ nmolO}_2 \cdot \text{mL}^{-1}$. Con estos datos se estableció la $K_{0.5}$ para los sustratos.

5.9.- Aislamiento de las mitocondrias. Las mitocondrias se aislaron de las células tratadas con el QT y el OQT (1 mgml^{-1}), respectivamente, y no tratadas cosechadas a las 6 y 12 horas según el caso. La biomasa de *R. stolonifer* se cosechó por centrifugación a $10\,000 \times g/10 \text{ min}$. El pellet se resuspendió en un volumen total de 25 mL en el regulador de sacarosa 400 mM, tris 10 mM, EDTA 1 mM y PMSF 1 mM, pH 7.0 con un volumen igual de perlas de vidrio (0.5 mm de diámetro) y se trataron con 5 ciclos de 1 minuto alternando el vortex y el frío en hielo. Después la mezcla se centrifugó ($3\,000 \times g/5 \text{ min}$) para remover las células rotas y las perlas de vidrio. El sobrenadante se separó y se centrifugó a $12\,000 \times g/15 \text{ min}$. El botón en el fondo del tubo corresponde a las mitocondrias, el cual se resuspendió en $100 \mu\text{L}$ de regulador. Todas las etapas se mantuvieron en frío. El contenido de proteína de la preparación mitocondrial se determinó precipitando la proteína y cuantificando por el método de [Lowry \(1951\)](#) con albúmina de suero bovino como el estándar.

5.10.- Técnicas de electroforesis. La electroforesis en condiciones nativas se realizó en geles azules de poliacrilamida (BN-PAGE) de acuerdo a la descripción de [Schägger & von Jagow \(1991\)](#). Los geles se hicieron en gradientes del 5-10% de poliacrilamida. El regulador del cátodo fue 50 mM tricina, 15 mM BisTris/HCl y 0.02% Coomassie blue G y el del ánodo fue de 50 mM BisTris/HCl pH 7.0; la corrida se realizó a 35 V durante 16 h a 4°C. Las mitocondrias de *R. stolonifer* se solubilizaron en presencia del detergente digitonina (stock 500 mg/mL) y del *n*-dodecil maltosido (stock 200 mg/mL), respectivamente. La relación de detergente/mg de proteína fue de 1, 2, 5, 7 y 10 para la digitonina y de 0.5, 1, 2, 5 y 7 para el dodecil maltosido en el regulador de ácido aminocaproico 1.5 M y BisTris 150 mM en un volumen final de $200 \mu\text{L}$. La muestra se incubó durante 90 min a 4°C y posteriormente se centrifugó a $33\,000 \times g/30 \text{ min}$; se colectó el sobrenadante y se resolvieron los complejos en la BN-PAGE. Mitocondrias de corazón de bovino se trataron de manera similar y se usaron como estándar. A partir de la BN-PAGE se realizó la electroforesis en segunda dimensión en condiciones nativas (2D-BN-PAGE) o desnataturalizantes (2D-SDS-PAGE). Para la 2D-BN-PAGE se cortó un carril de la BN-PAGE y se incubó en presencia de 0.02% de *n*-docecil matosido durante 30 min a temperatura ambiente; el segmento de gel se colocó en la parte superior de un gel de poliacrilamida en gradiente (5-10%). El regulador del catodo se suplemento con 0.02% de *n*-docecil maltosido. Para la 2D-SDS-PAGE, un carril de la BN-PAGE se incubó en presencia de 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% SDS, 10% glicerol, 0.02% azul de bromofenol y 2% de β -mercaptoetanol durante 15 min a 60°C; el segmento de gel se colocó en la parte superior de un gel de poliacrilamida (16%), la corrida se realizó a 35V durante 8 h a 4°C. Las proteínas en el gel se tiñeron con el colorante azul brillante de Coomassie G-125 en una solución que contenía 40% metanol, 10% ácido acético y 2% del colorante.

5.11.- Actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria. La actividad de NADH deshidrogenasa del complejo I se reveló incubando a los geles por 10 a 15 min en oscuridad en el regulador 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 con 1 mg MTT y 0.14 mM NADH. El MTT cambia su color cuando se reduce, de amarillo a violeta y precipita en el punto donde la reacción redox ocurre. La actividad de la citocromo c oxidasa del complejo IV se visualizó por la precipitación en el gel del 3,3'-diaminobencidina en el regulador de 50 mM fosfato-pH 7.0, 30 mg 3,3'-diaminobencidina, 0.2 mg citocromo c, 24 U/mL catalase y 75 mg sacarosa. La actividad de la ATP-sintetasa se visualizó por la precipitación del calcio en el regulador de 30 mM Tris-glicerol con 100 mM ATP y 500 mM CaCl₂.

5.12.- Ensayos enzimáticos. Todas las reacciones se realizaron a 25 °C en un espectrofotómetro empleando la preparación mitocondrial. Se empleó el mismo regulador para el consumo de oxígeno. A cada celda se le añadió 0.3 % de Tritón X-100 para romper a las mitocondrias y liberar las enzimas. Todas las actividades se realizaron en un volumen final de 1 mL. La actividad de la citrato sintasa se realizó en el medio de reacción que contenía 0.2 mM DNTB, 0.2 mM acetil-CoA y la proteína. La reacción inició al adicionar 0.4 mM CoA. Se midió la desaparición del DNTB a 412 nm ($\epsilon=13.60$ M/cm). La actividad de la isocitrato deshidrogenasa se realizó en el medio de reacción que contenía 10 mM isocitrato, 2 mM CaCl₂, 1 mM ADP y la proteína. La reacción se inició al agregar 1 mM NAD. Se midió la aparición del NADH a 340 nm ($\epsilon=6.3$ mM/cm). La actividad de la α -cetoglutarato deshidrogenasa se realizó en el medio de reacción que contenía 8 mM α -cetoglutarato, 1 mM TPP, 2 mM CaCl₂, 1 mM ADP, 2 mM NAD y la proteína. La reacción se inició al adicionar 0.4 mM CoA. Se midió la aparición de NADH a 340 nm. La actividad de la malato deshidrogenasa se realizó en el medio de reacción que contenía 1 mM de malato y proteína. La reacción inició al adicionar 10 mM de NAD. Se midió la aparición de NADH a 340 nm.

También se realizaron ensayos de la actividad de las NADH deshidrogenasas, el complejo I y el complejo II. La actividad de la NADH deshidrogenasa y el complejo I se realizó en el medio de reacción que contenía 50 μ M NADH, 50 μ M DCPIP y la proteína. La actividad de la succinato deshidrogenasa del complejo II se realizó en el medio de reacción que contenía 5 mM succinato, 50 μ M DCPIP y la proteína. Se midió la desaparición del DCPIP ($\epsilon=21$ mM/cm) a 600 nm.

Por otra parte, se determinó la actividad de la ATP sintetasa mediante un método colorimétrico con ELON; el volumen de reacción se ajustó a 1.25 mL con agua. El medio de reacción contenía 6 mM de Mg, 15 μ L del regulador Tris-HCl pH 8.0 y 300 μ g de proteína de la preparación mitocondrial; este tubo se mantuvo a 37°C por 3 minutos y la reacción se inició al adicionar 5 mM de ATP. Se tomaron alícuotas de 250 μ L al 1, 2, 4, 8 y 12 min. que se colocaron en un tubo con molibdato-H₂SO₄ durante 10 min, luego se adicionó ELON y se dejó actuar durante 20 min. Las muestras se leyeron a 660 nm. La curva estándar fue de 100, 250, 375, 500 y 750 μ mol de Pi. La actividad se reportó como μ mol de ATP

hidrolisado $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína. A la par se corrió una serie adicionada con 10 mM de azida de sodio para asegurar que la hidrólisis del ATP se debía a la ATP-sintetasa mitocondrial.

Finalmente, la actividad de la citocromo *c* oxidasa del complejo IV se determinó polarográficamente empleando la preparación mitocondrial. El volumen final fue de 1.5 mL y el regulador de respiración corresponde al empleado en los primeros experimentos de consumo de oxígeno. El medio de reacción contenía la proteína mitocondrial y la reacción se inició al adicionar 8 mM de TMPD (*N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine) + 8 mM de ascorbato.

VI.- RESULTADOS

6.1.- Efecto del oligoquitosano y el quitosano en el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer*

El crecimiento micelial de la cepa *R. stolonifer* mostró un claro retardo comparado con el testigo cuando creció en medio sólido en presencia del OQT y el QT, a las diferentes concentraciones probadas con respecto al testigo (figura 1). El desarrollo del testigo fue constante hasta que invadió toda la placa a las 36 h (figura 1). Se realizó la comparación del efecto del OQT y del QT con las diferentes concentraciones de los policones (tabla 2). El análisis estadístico de las repeticiones no mostró diferencias significativas al emplear uno u otro compuesto. El efecto fue dependiente de la concentración y la comparación del efecto del QT y del OQT con 2 mg/mL a las 36 h corresponde al 58.9 y 65.0 % respectivamente.

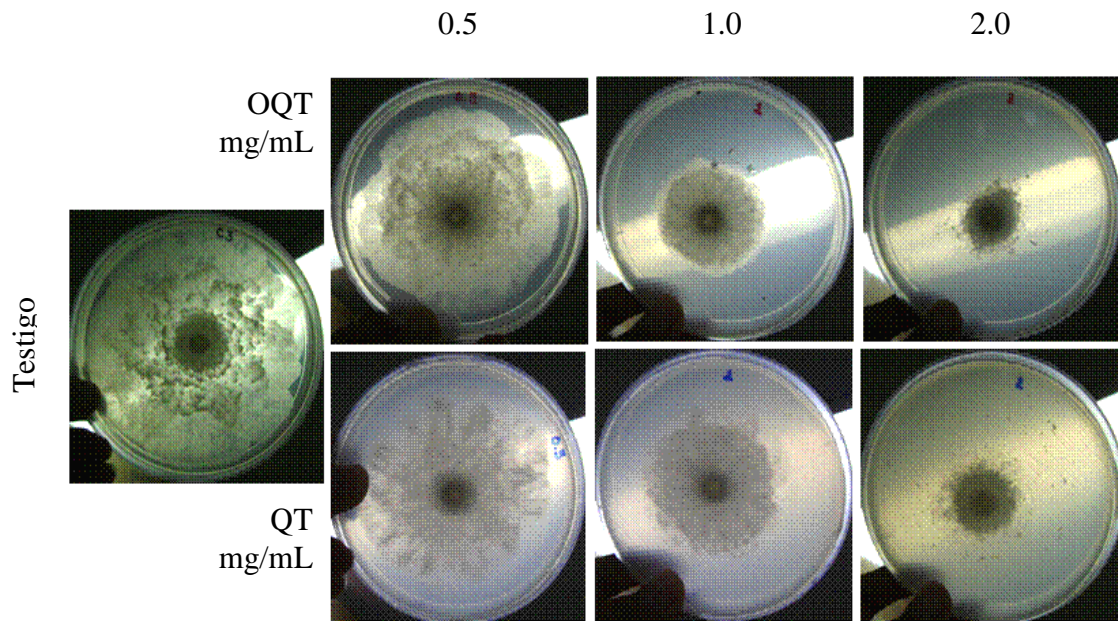


Figura 1. Efecto del oligoquitosano (OQT) y el quitosano (QT) sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* a las 36 h.

Tabla 2. Efecto del quitosano y el oligoquitosano sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer*

QT/OQT (mg/mL)	Crecimiento en milímetros	% de inhibición del crecimiento
Testigo	81.13 ± 2.84 a	0.0
QT 0.5	64.09 ± 2.79 b	21.0
OQT 0.5	61.75 ± 1.77 b	23.9
QT 1.0	41.46 ± 5.01 c	48.9
OQT 1.0	37.44 ± 3.27 cd	53.9
QT 2.0	28.39 ± 3.59 e	65.0
OQT 2.0	33.31 ± 2.22 de	58.9

* Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P < 0.001$). Cada valor representa la media de 5 repeticiones (n=5).

6.2.- Efecto del oligoquitosano y el quitosano sobre la germinación de las esporangiosporas de *R. stolonifer*

El desarrollo de la spora de *R. stolonifer* a las concentraciones probadas del OQT y el QT mostraron diferencias morfológicas con respecto al testigo. En la [figura 2](#) se muestra la afectación de la morfología de las esporas por efecto del OQT y el QT a la concentración de 1 mg/mL, respectivamente. Aunque la concentración de 2 mg/mL fue la que mejor efecto inhibitorio mostró en el crecimiento micelial, el efecto a nivel de la germinación de las esporas a la concentración de 1 y 2 mg/mL (imagenes no mostrada) fue similar por lo que todos los experimentos se realizaron a la concentración de 1 mg/mL.

La secuencia de la germinación fue la siguiente. En las primeras tres horas se presentó un aumento del tamaño de las esporas en todos los casos. A las seis horas las esporas testigo habían desarrollado un tubo germinal, mientras que las esporas en presencia del OQT y el QT estaban hinchadas, y solo algunas mostraban el botón del tubo germinal. A las diez horas una gran parte de las esporas testigo habían desarrollado como una hifa típica (delgada, hialina,

cenocítica y ramificada), mientras que las cultivadas con el OQT y el QT, respectivamente, presentaban deformación y prominencias en las pseudohifas. A partir de este periodo de tiempo no hubo variación en la morfología de las hifas en cualquiera de los casos, de hecho en el caso de las células testigo al final del experimento, la gran longitud y cercanía de las hifas provocó que se enredaran formando una compleja red de micelio (imágenes no mostradas), mientras que las células en presencia del QT y el OQT mantuvieron la morfología descrita previamente.

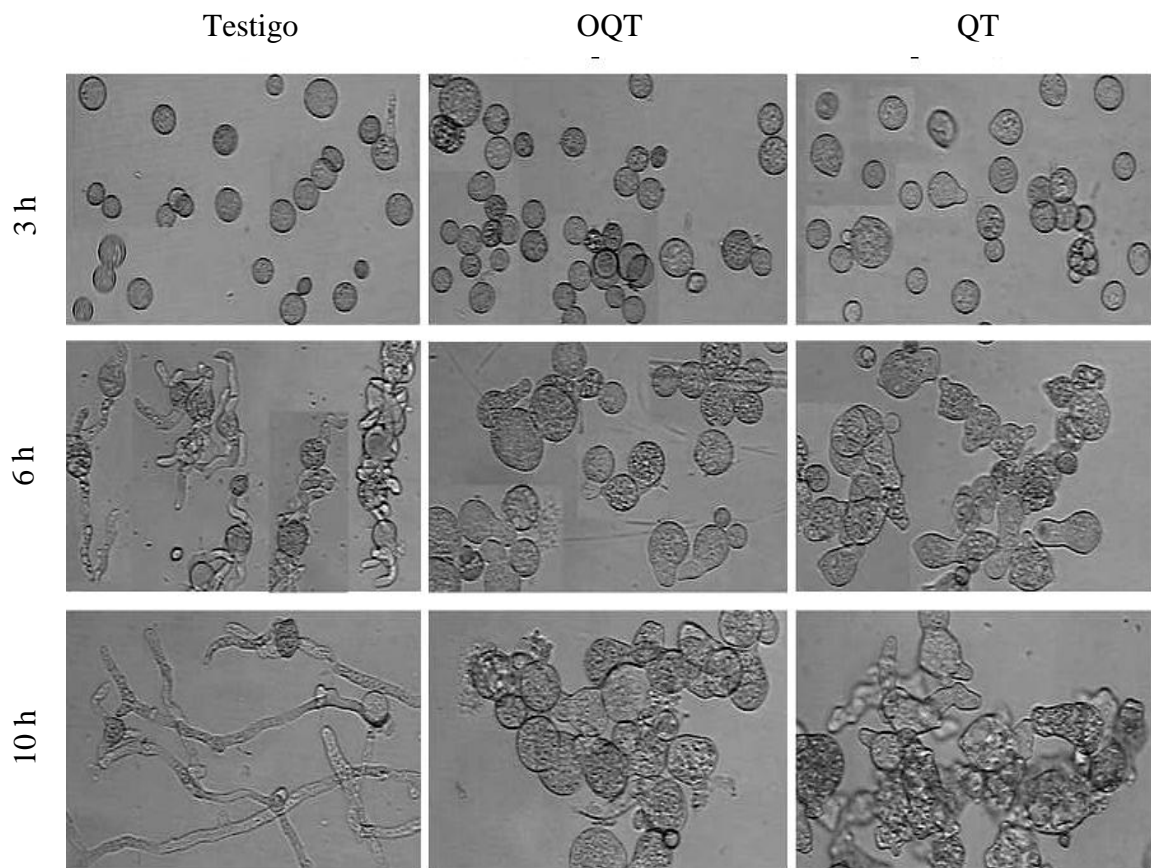


Figura 2. Germinación de las esporas de *Rhizopus stolonifer* en ausencia y presencia del oligoquitosano (OQT) y el quitosano (QT) a 1 mg/ml después de 3, 6 y 10 horas de incubación.

6.6.- Ultraestructura de las esporangiosporas germinadas de *R. stolonifer*

Como una opción para evaluar el efecto integral del policatión, se tomaron imágenes de microscopía de transmisión (TEM) de las esporas en proceso de germinación y como hifa.

Esporas testigo: la organización intracelular de las esporas incubadas durante seis (figura 3) y 12 horas (figura 4) sin tratamiento mostró la presencia de los organelos típicos. El núcleo, rodeado por una capa delgada de doble membrana sólo en algunos casos se le logró apreciar los poros nucleares (figura 3B y 4C). El nucléolo se distinguió como una zona densa dentro del núcleo (figura 3B y 4C). Las mitocondrias con crestas mitocondriales fueron claramente distinguibles y estaban distribuidas por todo el citoplasma (figura 3A, 3C, 4A y 4C). Algunas vacuolas, vesículas e inclusiones de lípidos se distinguieron en el citoplasma (figura 3C y 4C). La apariencia del citoplasma fue uniformemente granular y denso probablemente por la presencia de abundantes ribosomas (figura 3C). La membrana plasmática apenas distinguible entre el citoplasma y la pared celular interna (figura 3C y 4C). La pared de las esporas a las seis horas mostró dos capas; una capa externa de naturaleza opaca y gruesa con crestas típicas de la ornamentación de la espora, y una capa interna densa y delgada (figura 3B). Para las células a las 12 h fue evidente la ausencia de la pared celular externa (figura 4B).

Esporangiosporas tratadas con el QT (6 h): las esporas tratadas con el QT durante seis horas, no mostraron cambios en la ultraestructura y tampoco en la organización de los organelos. El cambio más notable comparado con el testigo del mismo tiempo fue un aumento en el número de las mitocondrias (figura 5C), esto se mantuvo constante de espora a espora. La apariencia del citoplasma fue similar al del testigo (figura 5C). La pared celular externa e interna y la membrana plasmática mostraron la misma apariencia que las esporas testigo (figura 5B). El ancho de la pared celular interna en las esporas sin tratamiento fue de 55 nm (figura 3B) y en las esporas tratadas con el QT fue de 46 nm (figura 5B), lo que representó un ligero adelgazamiento.

Esporangiosporas tratadas con el QT (12 h): los cambios en la ultraestructura de las células a las 12 h fueron notorios. El aumento de las mitocondrias se mantuvo igual que a las seis horas con el QT (figura 6C), su distribución se inclinó hacia el centro de la célula debido al desprendimiento de la membrana plasmática de la pared celular, aunque esto mostró

variaciones ligeras de espora a espora. El citoplasma se observó con áreas transparentes probablemente por disminución de los ribosomas (figura 6C). Las inclusiones de lípidos no fueron tan evidentes. Se observó un engrosamiento de la pared celular (figura 6B). El ancho de la pared celular de las células sin tratamiento fue de 56 nm (figura 4B) y en las esporas tratadas con el QT fue de 160 nm (figura 6B), lo que representó un engrosamiento de aproximadamente 3 veces comparada con el control.

6.3.- Consumo de oxígeno en las células testigo y en las células tratadas con el oligoquitosano y el quitosano

Como se mencionó anteriormente, la aparición del tubo germinal se presentó a las seis horas en las muestras del control no así en las células tratadas con el QT y el OQT. El consumo de oxígeno de las células testigo a las seis y 12 h de crecimiento fue similar (figura 3), lo que indicó que el consumo de oxígeno es constante una vez que se inicia la germinación. Esta misma tendencia se presentó en las células cultivadas con el QT y el OQT, respectivamente, lo que demostró la integridad de las células durante el experimento en presencia del polication. Sin embargo, a diferencia del testigo, el consumo de oxígeno por parte de las células tratadas con los policationes fue más rápido, indicado por la inclinación de la pendiente en el trazo polarográfico de la figura 3. En las células cultivadas con el OQT el oxígeno se agotó más rápido que en las células cultivadas con el QT. En las células testigo y con el QT fue necesario agregar glucosa como sustrato exógeno para activar la producción de compuestos reducidos y en consecuencia activar el consumo de oxígeno. Esto indica que el efecto del OQT y el QT a nivel de la fisiología de hongo fue contundente.

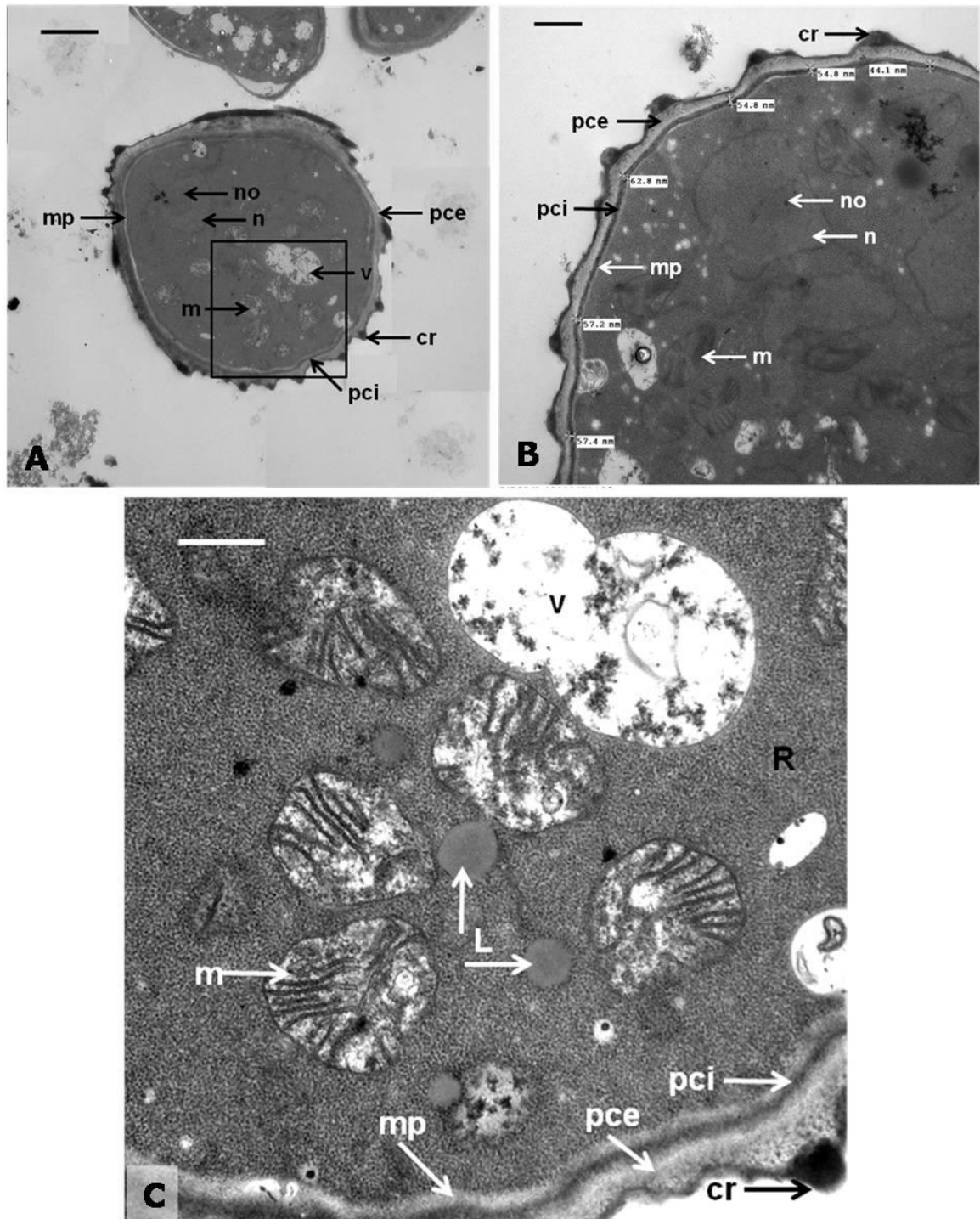


Figura 11. Sección de una esporangiospora de *Rhizopus stolonifer* incubada durante seis horas en medio mínimo sintético. (A - C) se muestra la pared celular externa (pce) con sus crestas (cr), la pared celular interna (pci), la membrana plasmática (mp), las mitocondrias (m), el núcleo (n), el nucléolo (no), las vacuolas (v), las inclusiones de lípidos (L) y los ribosomas (R). (B) medida del ancho de la pared celular interna. (C) acercamiento del recuadro de (A), mitocondrias intactas con crestas mitocondriales. Escala de la barra: A=2 μ m; B y C=500 nm.

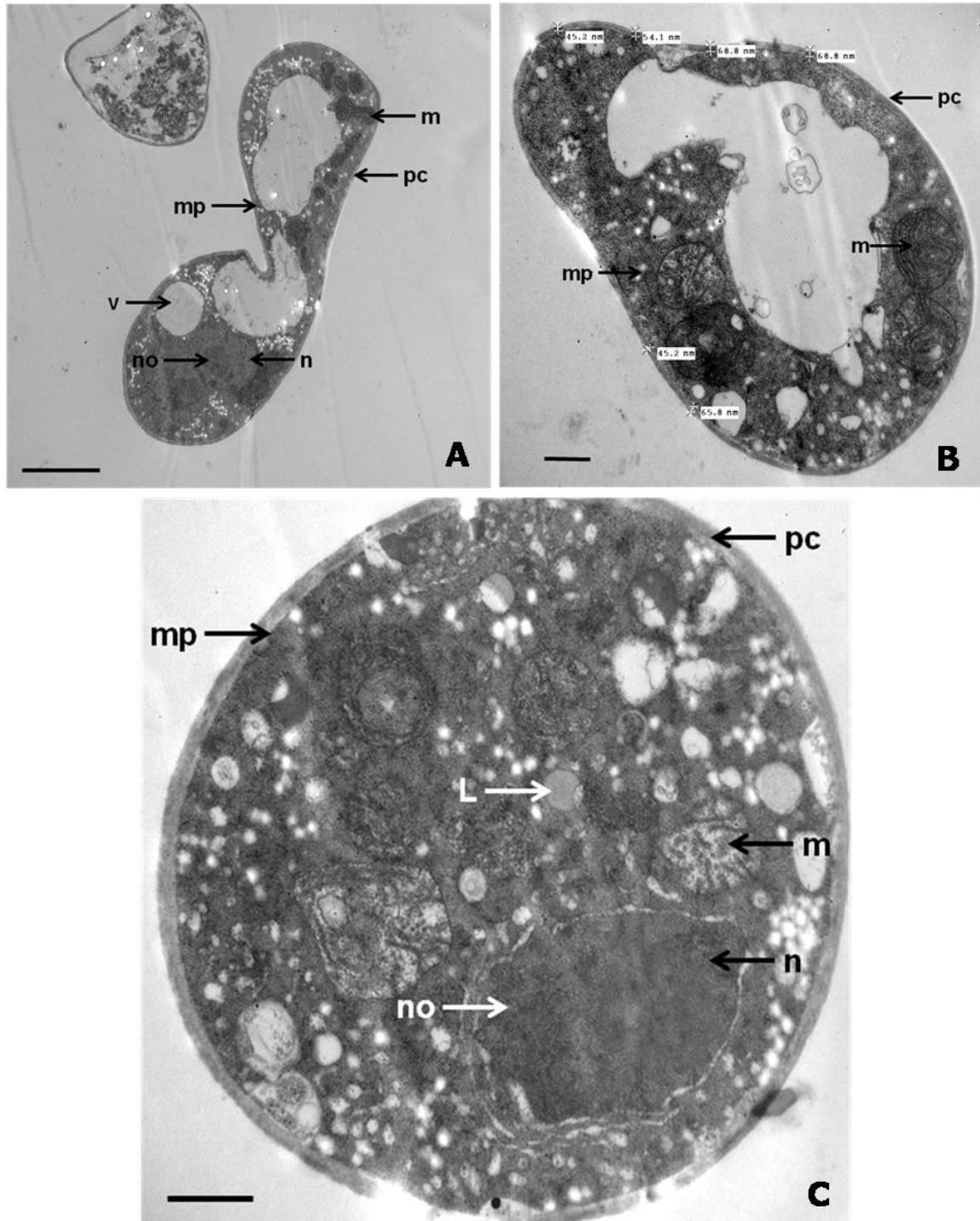


Figura 12. Sección de una esporangiospora de *Rhizopus stolonifer* incubada durante 12 h en medio mínimo sintético. (A - C) se muestra la pared celular (pc), la membrana plasmática (mp), las mitocondrias (m), el núcleo (n), el nucléolo (no), las vacuolas (v) y las inclusiones de lípidos (L). (B) medida del ancho de la pared celular. (C) mitocondrias intactas con crestas mitocondriales Escala de la barra: A=2 μ m; B y C=500 nm.

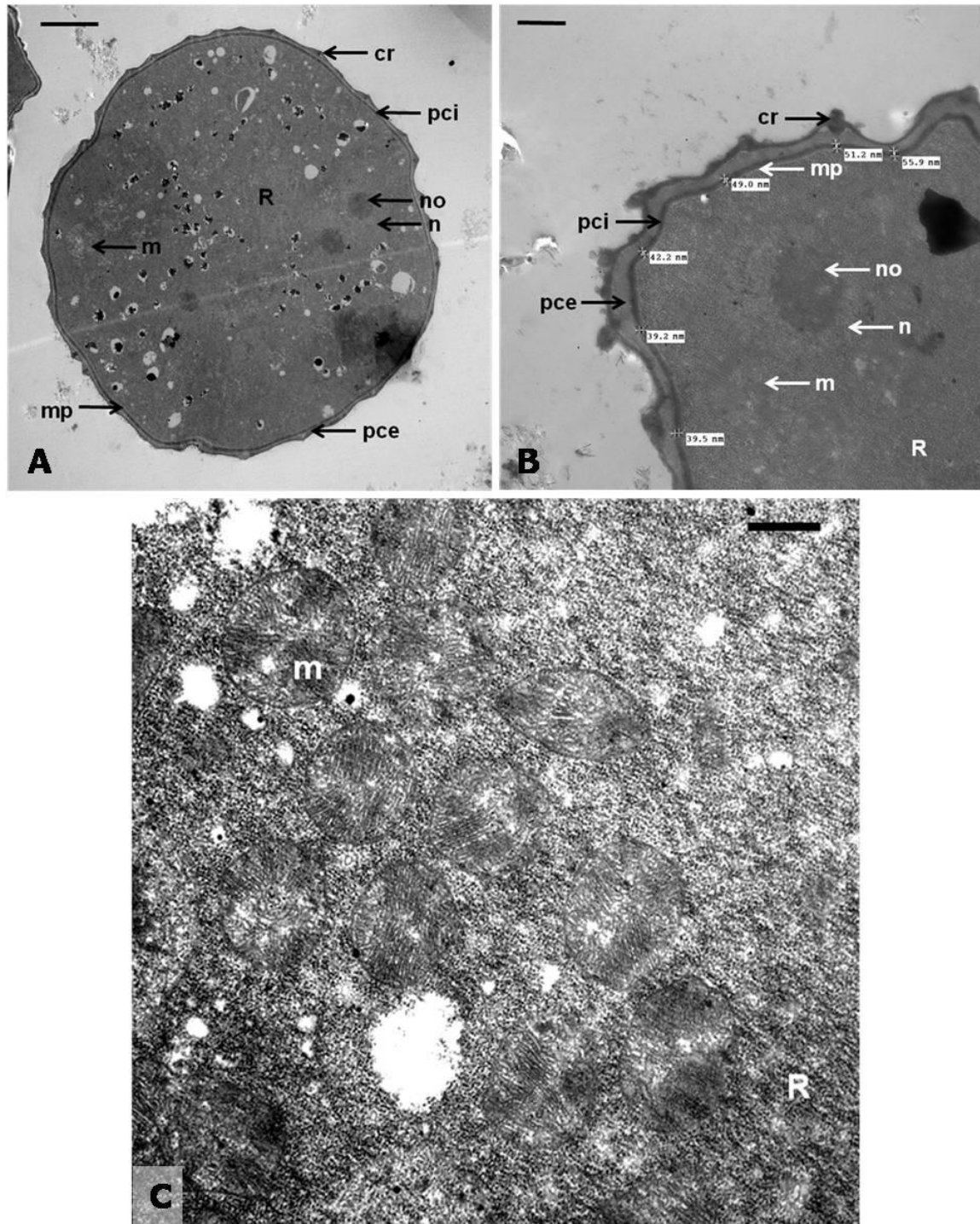


Figura 13. Sección de una esporangiospora de *Rhizopus stolonifer* incubada durante 6 h en presencia del quitosano. (A - C) se muestra la pared celular externa (pce) con sus crestas (cr), la pared celular interna (pci), la membrana plasmática (mp), las mitocondrias (m), el núcleo (n), el nucléolo (no), las vacuolas (v), las inclusiones de lípidos (L) y los ribosomas (R). (B) medida del ancho de la pared celular interna. (C) mitocondrias intactas con crestas mitocondriales. Escala de la barra: A=2 μ m; B y C=500 nm.

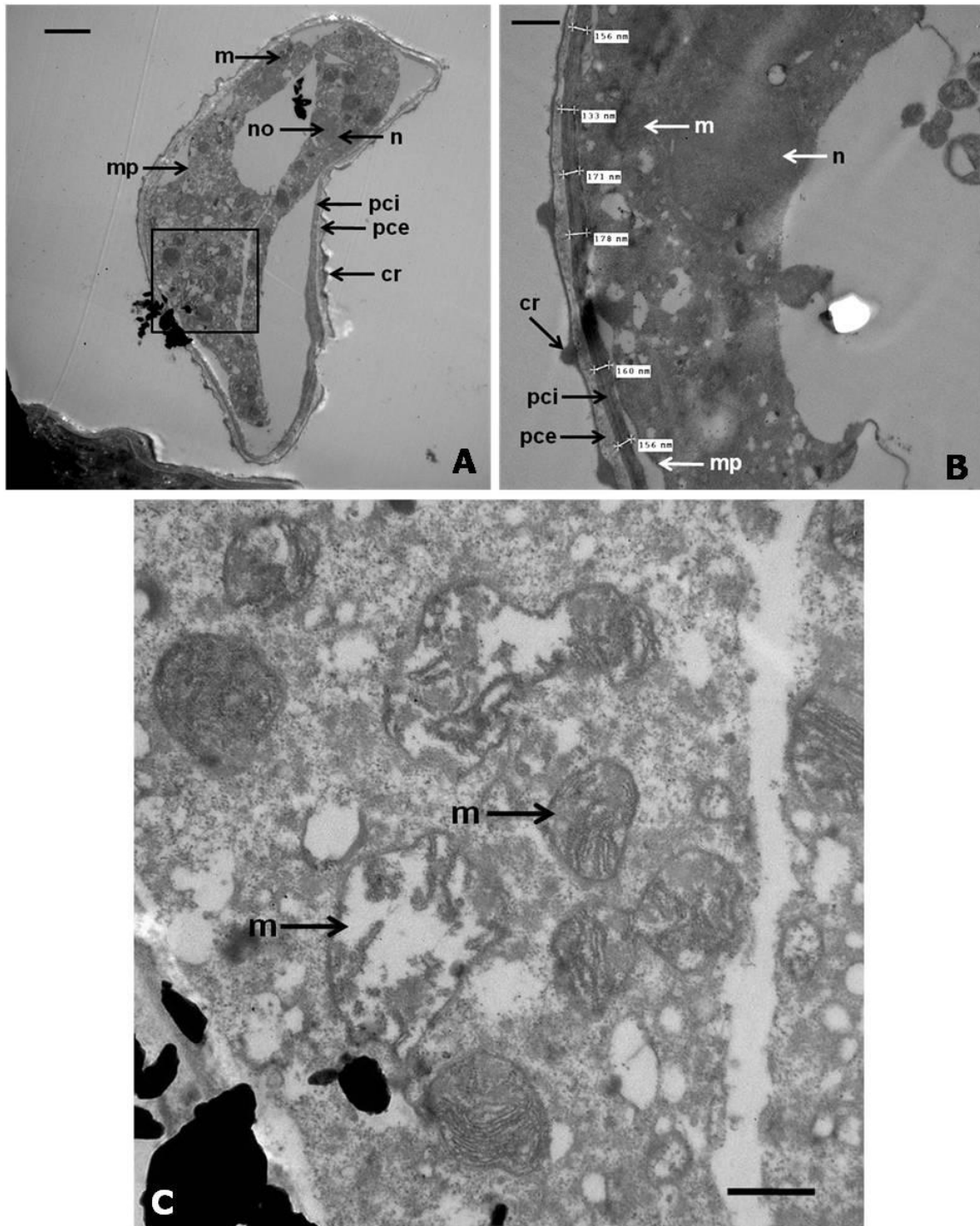


Figura 14. Sección de una esporangiospora de *Rhizopus stolonifer* incubada durante 12 h en presencia del quitosano. (A - C) se muestra la pared celular externa (pce), la pared celular interna (pci), la membrana plasmática (mp), las mitocondrias (m), el núcleo (n) y el nucléolo (no). (B) medida del ancho de la pared celular. (C) acercamiento del recuadro de (A), mitocondrias intactas con crestas mitocondriales Escala de la barra: A=2 μ m; B y C=500 nm.

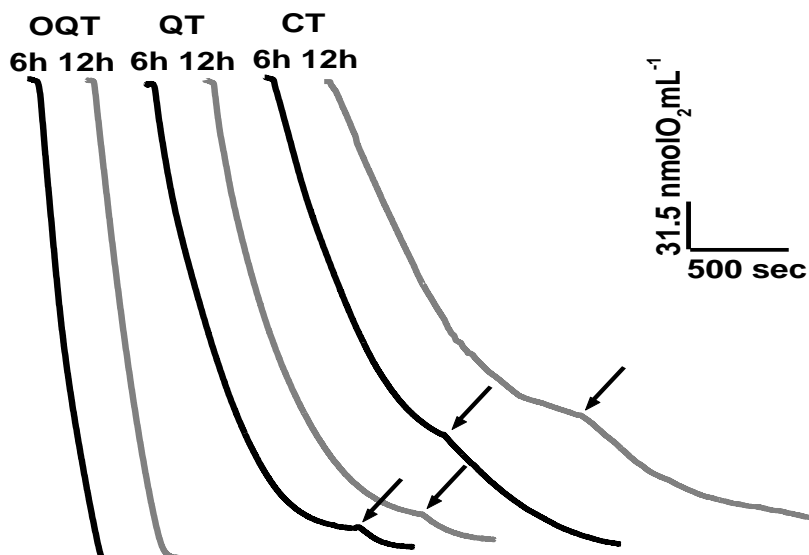


Figura 3. Consumo de oxígeno de las células de *Rhizopus stolonifer* tratadas y no tratadas con el oligoquitosano (OQT) y el quitosano (QT) a las 6 y 12h de cultivo. Las flechas indican adición de glucosa (10 mM).

Debido a que el consumo de oxígeno en las células se mantuvo similar en los diferentes tiempos, además del fácil manejo de las células germinadas a las seis horas, se puntualiza que los registros de consumo de oxígeno que se presentaron en este reporte corresponden a las células cosechadas a las seis horas, haciendo hincapié en que los registros a las 12 h fueron similares a los de las seis horas, además los parámetros cinéticos para los distintos sustratos e inhibidores se realizaron con células cosechadas a las seis horas.

Para analizar la funcionalidad de las mitocondrias tanto para las células tratadas y no tratadas con el QT, se utilizó a la digitonina para permeabilizar la membrana celular y permitir la entrada de los sustratos mitocondriales. La presencia de la digitonina produjo una disminución progresiva del consumo de oxígeno, lo que significó que la membrana plasmática comenzó a permeabilizarse (figura 4). El consumo de oxígeno no se activó con el piruvato, el malato y el glutamato ya sea solos o combinados (malato-glutamato, piruvato-malato). Este resultado fue similar tanto para las células control y las células cultivadas con el QT y el OQT, respectivamente.

En las células permeabilizadas de *R. stolonifer* se examinó si el NADH exógeno podía ser usado mediante una vía alterna. Como se muestra en los registros de la figura 4a, las

mitocondrias fueron capaces de oxidar el NADH exógeno. La presencia de la NADH deshidrogenasa alterna se evidenció al inhibir el consumo de oxígeno con la flavona, que es un inhibidor característico de las NADH deshidrogenasas alternas, mientras que con la adición de la rotenona, que es un potente inhibidor de las NADH deshidrogenasas del complejo I, no se observó ningún cambio en la pendiente de los trazos. Se descartó una posible permeabilización de la membrana mitocondrial por efecto de la digitonina debido a que al adicionar la rotenona no se afectó el consumo de oxígeno. Los registros obtenidos para las células cultivadas en ausencia y en presencia del QT y el OQT, respectivamente, exhibieron el mismo comportamiento lo que dejó de manifiesto que al menos la NADH deshidrogenasa alterna no se afectó por la exposición a los policationes.

Para establecer la presencia del complejo II, se suministró a las células permeabilizadas el succinato (figura 4b). Un cambio en la pendiente fue evidencia de la presencia de la succinato deshidrogenasa, enzima que pertenece al ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Así mismo, al agregar el glicerol 3-fosfato, el cambio en la pendiente indicó la presencia de la lanzadera de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa la cual mueve equivalentes reducidos desde el citosol a la matriz mitocondrial (figura 4c). Igualmente, los registros obtenidos para las células cultivadas con el QT y el OQT, respectivamente, exhibieron un ligero consumo de oxígeno al emplear el succinato y el glicerol 3-fosfato.

Para la evaluación del complejo III, se utilizó la antimicina A. La presencia de la antimicina A ocasionó descenso en el consumo de oxígeno tanto en las células control como en las células tratadas con los policationes de manera progresiva y constante (figura 5a). Sin embargo, se mantuvo una respiración residual que fue tratada con la adición de cianuro con el propósito de eliminar el paso de los electrones por otros citocromos hacia el complejo IV observándose la inhibición total del consumo de oxígeno, por lo que se confirmó la transferencia de los electrones por los citocromos adyacentes. La actividad del complejo IV se manifestó al inhibirse la transferencia de los electrones al oxígeno después de la adición del cianuro (figura 5b). Las células control disminuyeron el consumo de oxígeno más rápido que las tratadas con los policationes. Sin embargo, tanto para las células control y las células tratadas con los policationes, se observó un consumo de oxígeno residual. La adición del *n*-octil galato como inhibidor de la oxidasa alterna ocasionó un ligero cambio en la pendiente lo que demostró la presencia de esta enzima alterna en la cadena respiratoria de *R. stolonifer* con resistencia al cianuro.

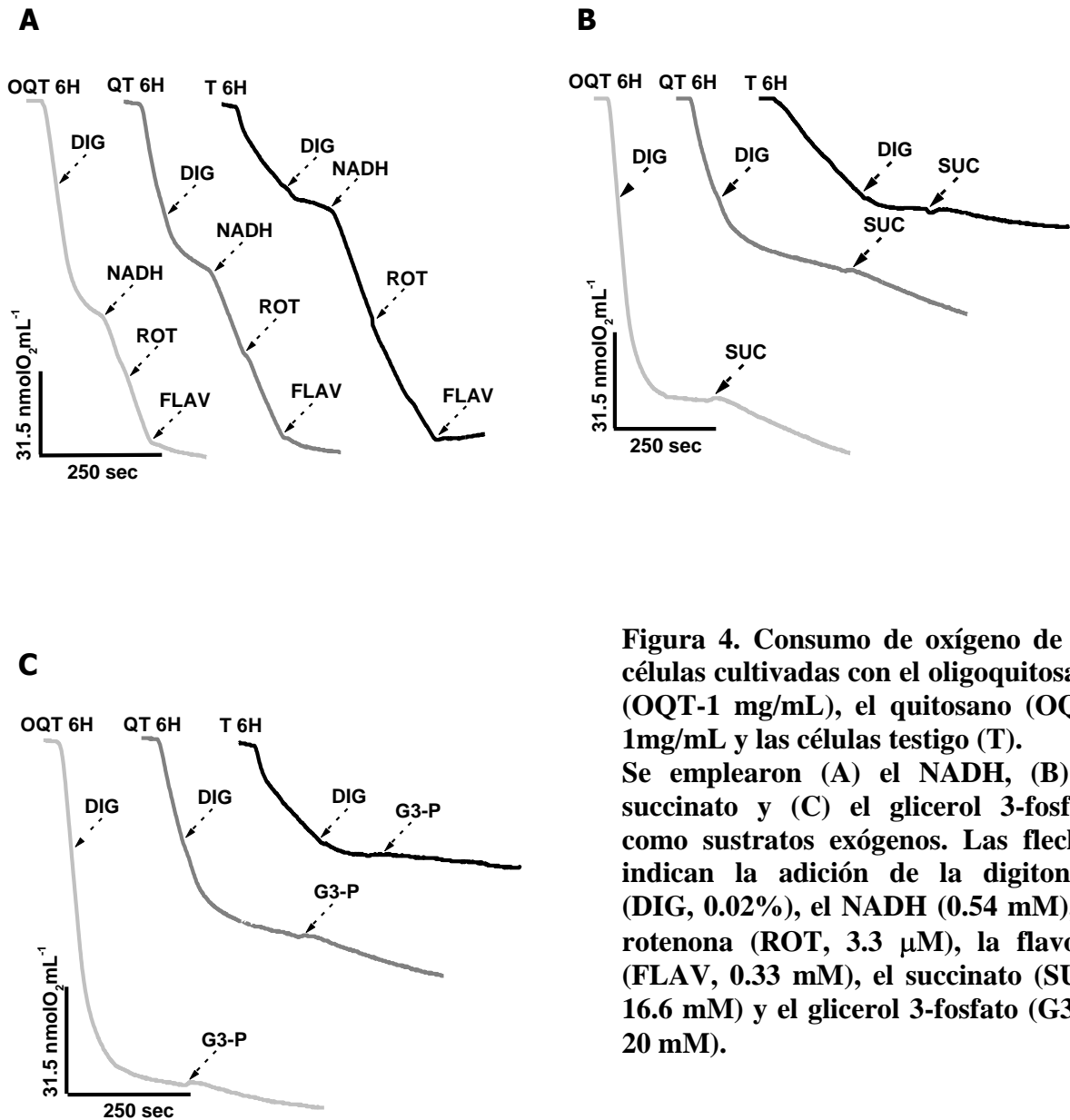


Figura 4. Consumo de oxígeno de las células cultivadas con el oligoquitosano (OQT-1 mg/mL), el quitosano (OQT-1mg/mL) y las células testigo (T).

Se emplearon (A) el NADH, (B) el succinato y (C) el glicerol 3-fosfato como sustratos exógenos. Las flechas indican la adición de la digitonina (DIG, 0.02%), el NADH (0.54 mM), la rotenona (ROT, 3.3 μ M), la flavona (FLAV, 0.33 mM), el succinato (SUC, 16.6 mM) y el glicerol 3-fosfato (G3-P, 20 mM).

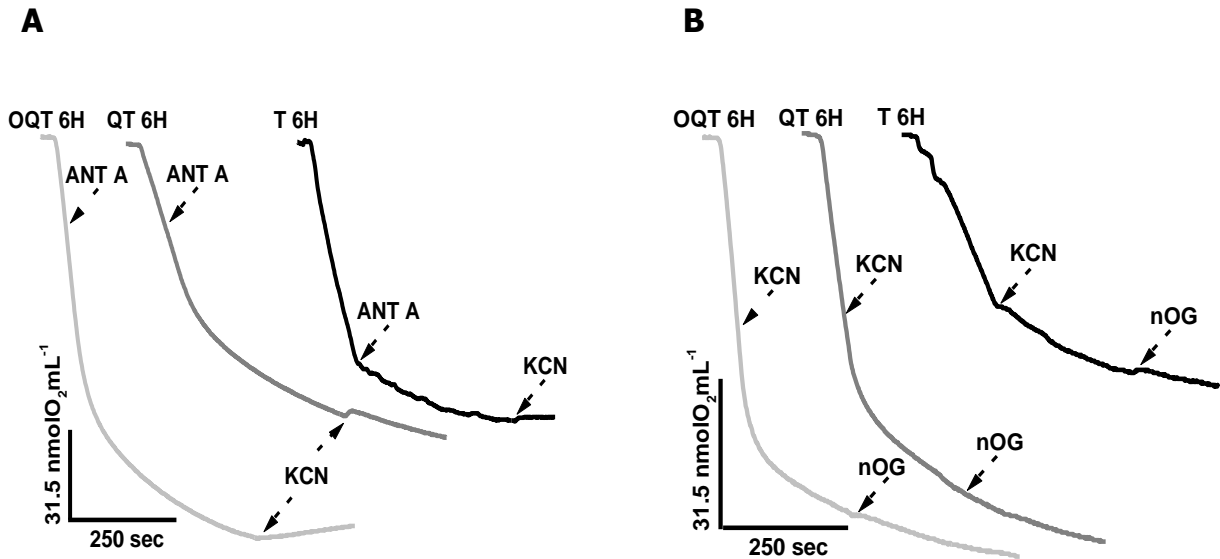


Figura 5. Consumo de oxígeno de las células cultivadas con el oligoquitosano (OQT), el quitosano (QT) y las células testigo (T). Se emplearon (A) la antimicina A y (B) el cianuro como inhibidores. Las flechas indican la adición de la antimicina A (ANT A, 1 μ M), el cianuro (KCN, 1 mM) y n-octil galato (nOG, 3.3 μ M).

6.4.- Determinación de los parámetros cinéticos para los sustratos respiratorios

La dependencia de la respiración con respecto a sustratos como el NADH, el succinato y el glicerol 3-fosfato, así como, la sensibilidad a inhibidores como la antimicina A y el cianuro se realizó exclusivamente en las células control. Los parámetros cinéticos (V_{max} , $K_{0.5}$ y K_i) se obtuvieron por medio de regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten, utilizando el programa Origin. En la [figura 6](#) se muestran las isotermas para los sustratos NADH, succinato y glicerol 3-fosfato que alimentan a la cadena respiratoria a nivel del complejo I, el complejo II y la lanzadera glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, respectivamente. Esta última, canaliza los electrones provenientes del citosol a nivel de la coenzima Q al igual que el complejo II, mientras que el NADH acarrea los electrones a través del complejo I que los dirige hacia la coenzima Q. La $K_{0.5}$ para el NADH fue de 0.65 mM ([figura 6a](#)) mientras que para el succinato ([figura 6b](#)) y el glicerol 3-fosfato ([figura 6c](#)) fueron de 4.4 y 26 mM, respectivamente, lo que indicó que la mitocondria emplea preferentemente el NADH como el donador de electrones seguido por el succinato y el glicerol 3-fosfato. Los ensayos de la sensibilidad de la respiración con la antimicina A mostró una K_i de $0.024 \pm 0.014 \mu$ M y para el cianuro una K_i de $100 \pm 12 \mu$ M.

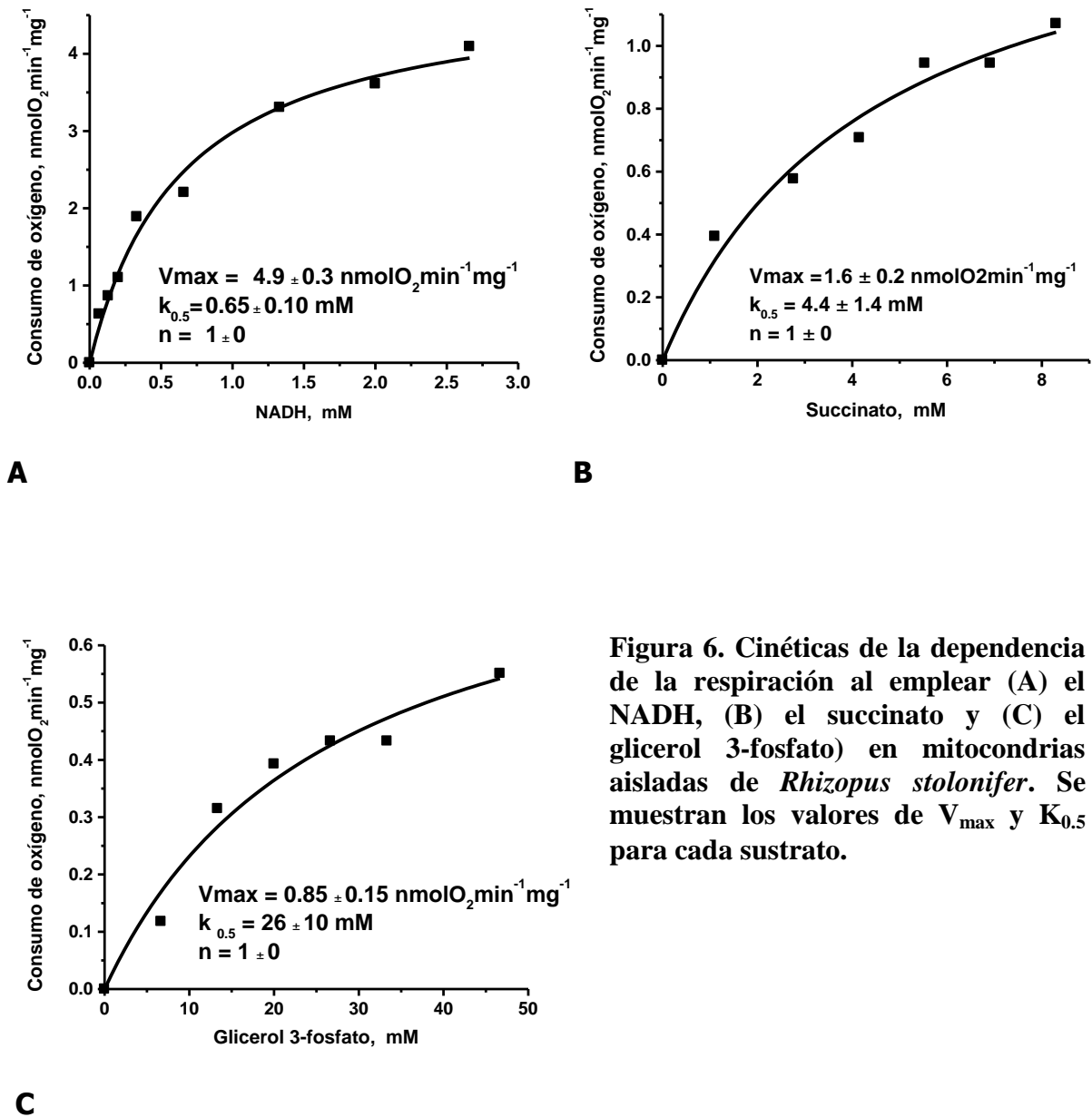


Figura 6. Cinéticas de la dependencia de la respiración al emplear (A) el NADH, (B) el succinato y (C) el glicerol 3-fosfato) en mitocondrias aisladas de *Rhizopus stolonifer*. Se muestran los valores de V_{\max} y $K_{0.5}$ para cada sustrato.

6.5.- Los complejos y los supercomplejos de la cadena respiratoria

Para el análisis de los complejos y los supercomplejos, las mitocondrias fueron solubilizadas con dos detergentes, el dodecil maltosido (DDM) y la digitonina (DIG), respectivamente. El DDM se empleó para visualizar a los complejos de la cadena respiratoria de manera individual y determinar el peso molecular aproximado mientras que el uso de la DIG como disolvente de lípidos moderado, permitió visualizar a los supercomplejos de la cadena respiratoria en geles nativos. Se empleó mitocondrias de células no tratadas cosechadas a la 6

h. El primer paso fue la solubilización de las mitocondrias con diferentes relaciones de los detergentes y la posterior tinción con azul de Coomassie para obtener el patrón de proteínas, en paralelo con la tinción de otro gel que se reveló por la actividad de NADH deshidrogenasa para ubicar al complejo I. Con este ensayo se determinó que la relación de 2 mg de detergente/mg de proteína fue la más apropiada para ambos detergentes ya que siendo el complejo I el componente más grande de la cadena respiratoria y el más susceptible a degradarse, bajo estas condiciones se mantuvo a buena concentración y con actividad apreciable, en comparación con las otras concentraciones, lo que indicó que la estructura se mantuvo integra (figura 7A y 7B).

Cabe señalar que se apreció la actividad de NADH deshidrogenasa por debajo de la banda etiquetada como complejo I, lo que sugirió que el complejo I se degradó en unidades que aun conservaron la actividad (figura 7A y 7B), además también hubo actividad de NADH deshidrogenasa por arriba de la banda correspondiente al complejo I, lo que exhibió la formación de supercomplejos (figura 7B).

Posteriormente se procedió a revelar la actividad de NADH deshidrogenasa, la succinato deshidrogenasa, la citocromo *c* oxidasa y la ATP-sintetasa directamente sobre los geles nativos. De esta manera se reveló la distribución y las asociaciones entre cada uno de los complejos respiratorios además de que se estableció la masa aparente respecto a las mitocondrias de corazón de bovino. El gel revelado por actividad de NADH deshidrogenasa de las mitocondrias solubilizadas con DDM mostró tres bandas con masas aparentes de 970, 700 y 440 kDa que se etiquetaron como "I" para indicar que se trataba del monómero del complejo I, "I_a y I_b" para identificar las unidades provenientes de la degradación del complejo I (figuras 8A y B). Con las mitocondrias solubilizadas con DIG y reveladas por la misma actividad se pudo apreciar una banda gruesa con una masa aparente de 860 kDa que se identificó como el monómero del complejo I, las bandas en la parte superior se etiquetaron con letras de la *c* a la *k*, que correspondieron al monómero del complejo I asociado con otros complejos de la cadena respiratoria en diferentes proporciones integrando los supercomplejos, además dos bandas por debajo de los 860 kDa con masas aparentes de 500 y 300 kDa que se identificaron como las unidades "I_a y I_b" provenientes de la degradación del complejo I. Adicionalmente, se apreció una banda de 90 kDa que se identificó como la NADH deshidrogenasa alterna (ND) aunque no se realizaron más experimentos para corroborar (figuras 9A y B).

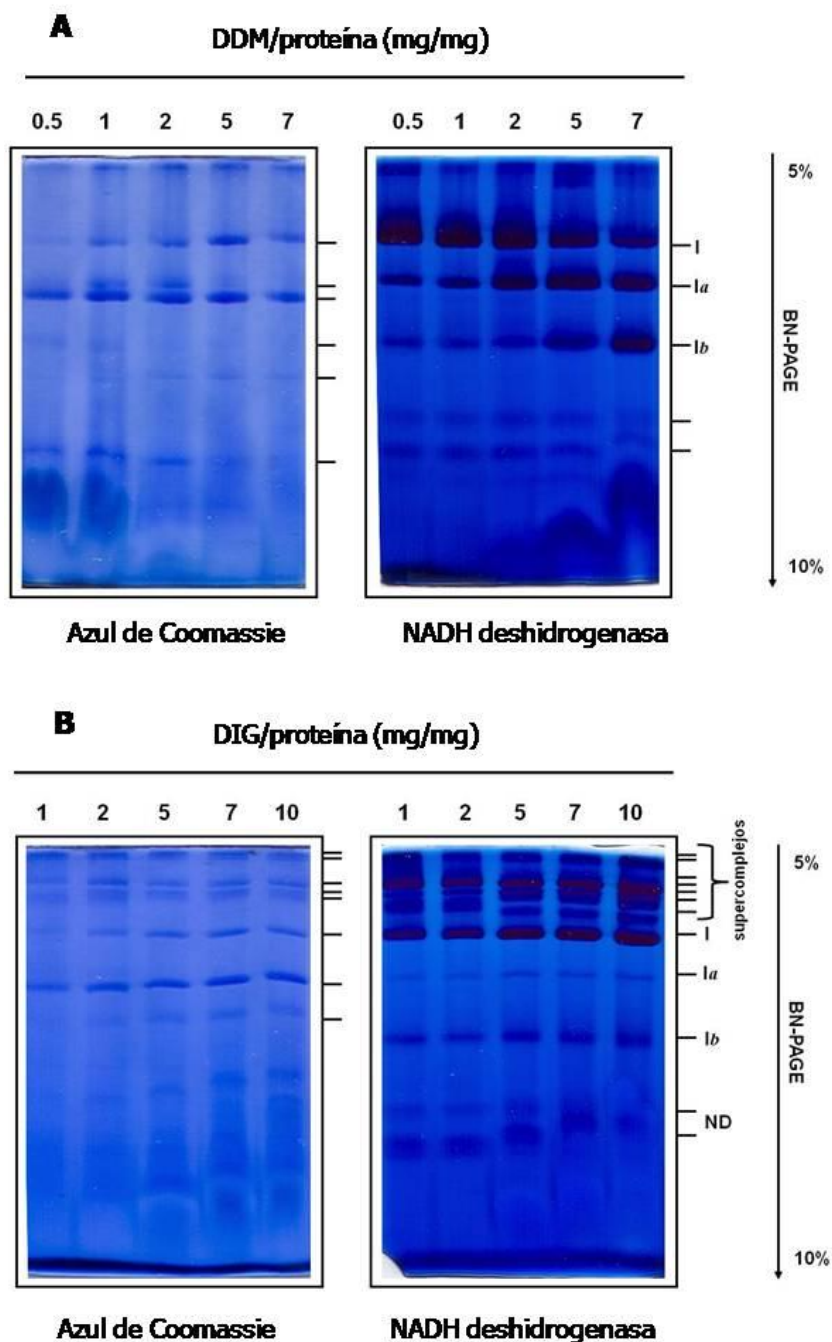


Figura 7. Electroforesis en condiciones nativas (BN-PAGE) de las mitocondrias de *Rhizopus stolonifer* solubilizadas con (A) el *n*-dodecil maltosido y (B) la digitonina. La presencia de las proteínas en el gel se determinó por tinción con el azul de Coomassie y por la actividad de las NADH deshidrogenasa como se describió.

DDM-*n*-dodecil maltosido, DIG-digitonina, I-monómero de complejo I, Ia y Ib-primera y segunda unidad del complejo I, ND-NADH deshidrogenasa alterna, BN-PAGE-gel nativo de poliacrilamida.

El monómero de la citocromo *c* oxidasa en las mitocondrias solubilizadas con el DDM presentó una masa aparente de 200 y 250 kDa (figuras 8A y C), mientras que en las mitocondrias solubilizadas con la DIG la actividad del monómero se localizó a los 200 kDa (figuras 9A y C). En la parte superior de este gel también se apreció la actividad de la citocromo *c* oxidasa y las bandas se etiquetaron con las letras *c, d, g, h, i, j* y *k* lo que indicó que formaba parte de los supercomplejos en asociación con el monómero del complejo I. Para el complejo V o ATP-sintetasa, la actividad en las mitocondrias solubilizadas con DDM se apreció en una banda con masa aparente de 620 kDa que correspondió al monómero de este complejo (figuras 8A y D), y en las mitocondrias solubilizadas con la DIG se evidenció dos bandas con masas aparentes de 600 y 1200 kDa que correspondieron al monómero y al dímero, respectivamente (figuras 9A y D). Debido a que la biomasa a las 6 h en las células tratadas con los policationes (1 mg mL^{-1}) es escasa, se resolvió cosechar a las células a las 12 h, el respectivo control se agregó al experimento. Para el control de 12 h no hubo cambios en la distribución del complejo I, la citocromo *c* oxidasa y la ATP-sintetasa. Las mitocondrias de *R. stolonifer* tratadas con los policationes presentaron el mismo perfil electroforético que las mitocondrias de células control, lo que indicó que la presencia del QT en la superficie celular, no afectó la integridad de la mitocondria (figuras 8 y 9).

Cuando las mitocondrias se solubilizaron con la DIG, y se revelaron las actividades de NADH deshidrogenasa y la citocromo *c* oxidasa se apreciaron bandas con actividad por arriba de los 860 kDa correspondiente al complejo I, lo que indicó la asociación estequiométrica de ambos complejos junto con el complejo III, para la formación de los supercomplejos. Aunque no fue posible establecer la posición del complejo III así como su peso molecular aproximado debido a que todavía no existe el método adecuado para su detección a nivel de gel, algunos reportes mediante estudios de cristalografía han mostrado la asociación de estos tres complejos. Se realizó una tabla con los valores de peso molecular calculados a partir de los geles y se hizo una aproximación estequiométrica de la asociación de los complejos; se tomó el valor de 500 kDa como el peso molecular del dímero del complejo III. Como se muestra en la tabla 3, el complejo I siempre estuvo presente en los supercomplejos y se asoció con el dímero del complejo III y/o con uno o más monómeros del complejo VI.

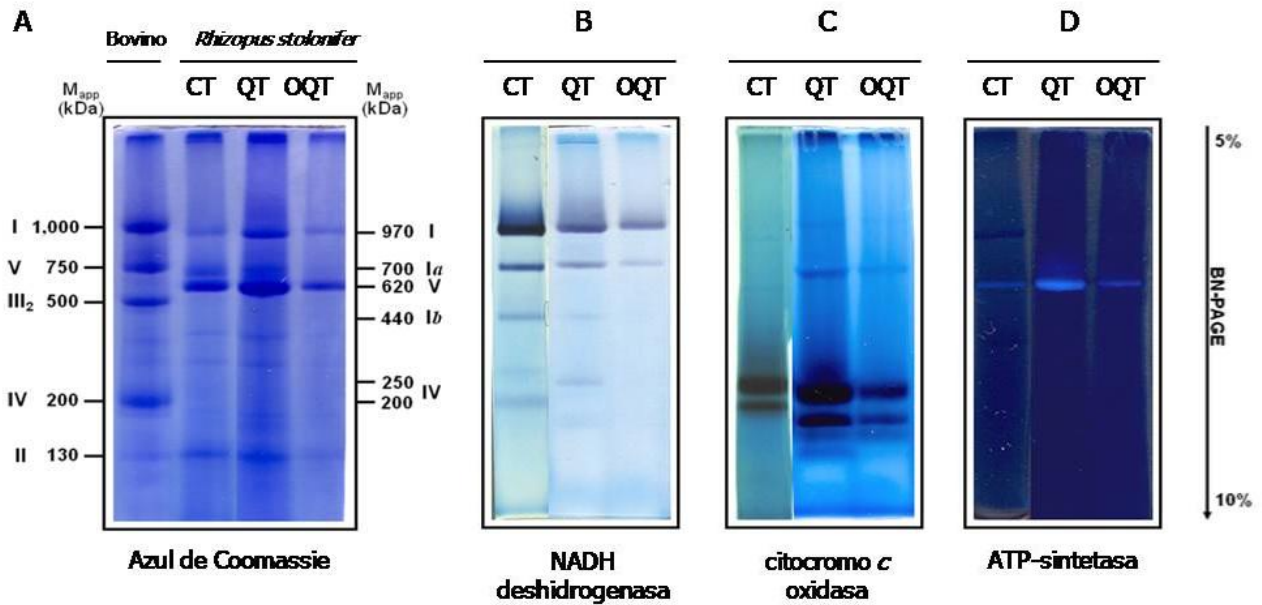


Figura 8. Electroforesis en condiciones nativas (BN-PAGE) de las mitocondrias de *Rhizopus stolonifer* solubilizadas con 2 mg de *n*-dodecil maltocido/mg de proteína. (A) Gel nativo teñido con azul de Coomassie donde se observa el patrón electroforético. (B) Gel nativo revelado por la actividad de la NADH deshidrogenasa, se muestra al monómero del complejo I y otras subunidades del complejo I etiquetadas como Ia y Ib. (C) Gel nativo revelado por la actividad de la citocromo *c* oxidasa, se muestra la posición del complejo IV. (D) Gel nativo revelado por la actividad de la ATP-sintetasa, se muestra al monómero de la ATP sintetasa. Bovino-mitocondrias de corazón de bovino, CT-control, QT-quitosano, OQT-oligoquitosano, II-monómero del complejo II, III₂-dímero del complejo III, BN-PAGE-gel nativo de poliacrilamida.

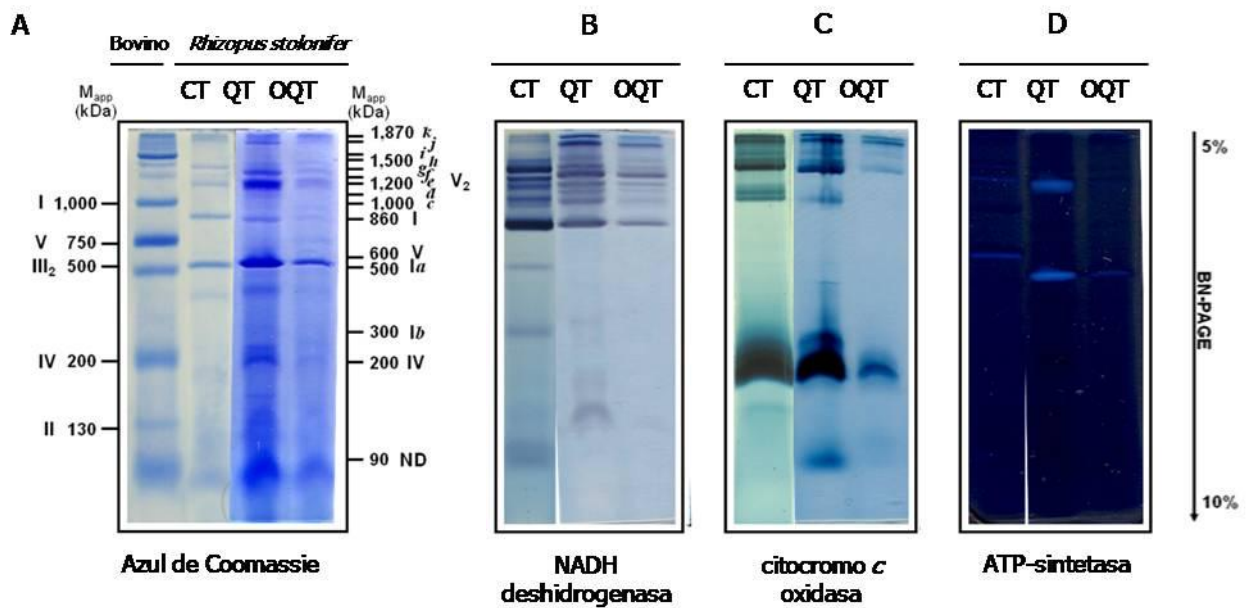


Figura 9. Electroforesis en condiciones nativas (BN-PAGE) de las mitocondrias de *Rhizopus stolonifer* solubilizadas con 2 mg de digitonina/mg de proteína. (A) Gel nativo teñido con azul de Coomassie donde se observa el patrón electroforético. (B) Gel nativo revelado por la actividad de la NADH deshidrogenasa, se identificó al monómero del complejo I, las unidades del complejo I etiquetadas como *Ia* y *Ib*, y los supercomplejos etiquetados de la *c* a la *j*. (C) Gel nativo revelado para demostrar la actividad de la citocromo *c* oxidasa, se muestran la posición del complejo IV y los supercomplejos etiquetados de la *c* a la *j*. (D) Gel nativo revelado para la actividad de la ATP-sintetasa, se muestra al monómero y al dímero de la ATP-sintetasa (V_2). Bovino-mitocondrias de corazón de bovino, CT-control, QT-quitosano, OQT-oligoquitosano, II-complejo II, III_2 -dímero del complejo III, ND-NADH deshidrogenasa alterna, BN-PAGE-gel nativo de poliacrilamida.

Tabla 3. Relación estequiométrica de los supercomplejos de las mitocondrias de *Rhizopus stolonifer* solubilizadas con la digitonina

<i>Complejo</i>	<i>Mw aparente</i>	<i>Estequiometria</i>
<i>I</i>	860	I
<i>II</i>	130	II
<i>III</i>	250	III
<i>IV</i>	200	IV
<i>V</i>	600	V

<i>Supercomplejo</i>	<i>Mw aparente</i>	<i>Posible estequiometria</i>
<i>III</i> ₂	500	III ₂
<i>c</i>	1000	I + IV
<i>d</i>	1100	I + IV
<i>e</i>	1200	I + III ₂
<i>V</i> ₂	1200	V ₂
<i>f</i>	1300	I + III ₂
<i>g</i>	1400	I + IV ₃
<i>h</i>	1500	I + III ₂ + IV
<i>i</i>	1560	I + III ₂ + IV
<i>j</i>	1780	I + III ₂ + IV ₂
<i>k</i>	1870	I + III ₄ I + IV ₅

I-monómero del complejo I; III₂-dímero del complejo III; IV-monómero del complejo, el subíndice indica el número de monómeros presentes.

Letras (*c-k*) indica la posición de los supercomplejos en el gel.

El complejo I de *R. stolonifer* presentó tendencia a disociarse y formar unidades de menor tamaño con actividad de NADH deshidrogenasa. Para corroborar esto, se realizó geles nativos de segunda dimensión (BN-PAGE/BN-PAGE) que demostraron que las unidades Ia y Ib identificadas en la primera dimensión provenían del complejo I, y que el complejo I fue parte de los supercomplejos. Con el gel revelado por actividad de NADH deshidrogenasa se ubicó al complejo I y nuevamente a las unidades Ia y Ib, confirmándose el complejo I presentaba inestabilidad y se desintegraba, además se localizó como integrante de los supercomplejos (figura 10A y B). En los geles de segunda dimensión desnaturizantes (BN-PAGE/SDS-PAGE) las bandas que se identificaron claramente fueron la subunidad de 75 kDa característica del complejo I en la forma de monómero y también cuando formaba supercomplejos, las subunidades α y β de la ATP-sintetasa como monómero y dímero (figura 11C y D). De manera conjunta, estos resultados manifiestan la presencia del complejo I, el complejo IV y la ATP-sintetasa, componentes característicos del proceso de fosforilación oxidativa.

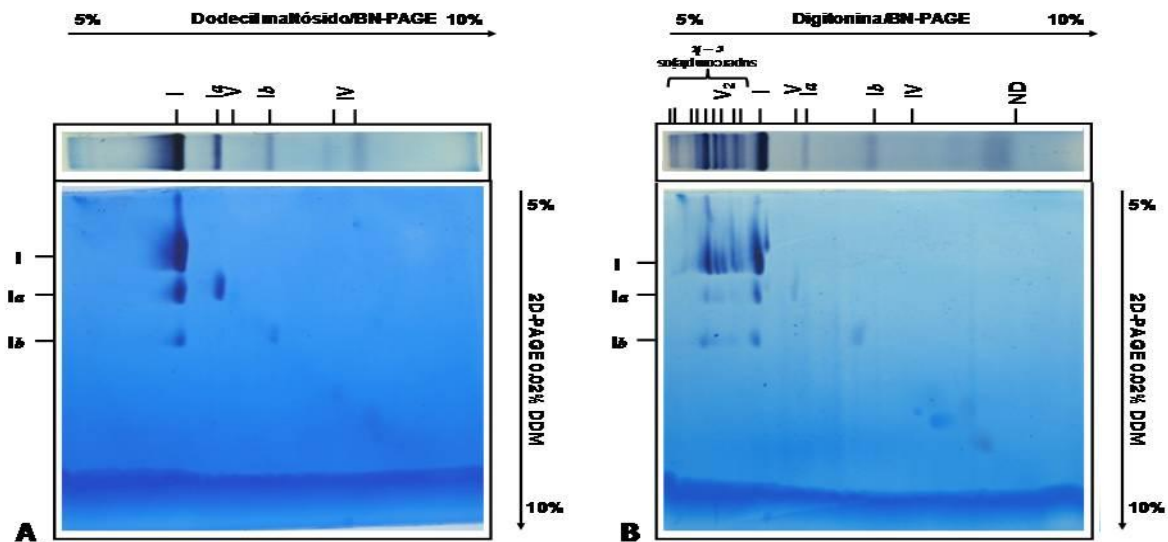


Figura 10. Electroforesis de segunda dimensión de los complejos y supercomplejos de las mitocondrias de *Rhizopus stolonifer*. (A-B) Electroforesis en condiciones nativas (BN-PAGE/BN-PAGE 0.02% DDM) revelados por la actividad de la NADH deshidrogenasa. (A) Se identificó al monómero del complejo I y la separación de las unidades Ia y Ib como parte del complejo I. (B) Se identificó al monómero del complejo I formando parte de los supercomplejos y a las unidades Ia y Ib como parte del complejo I.

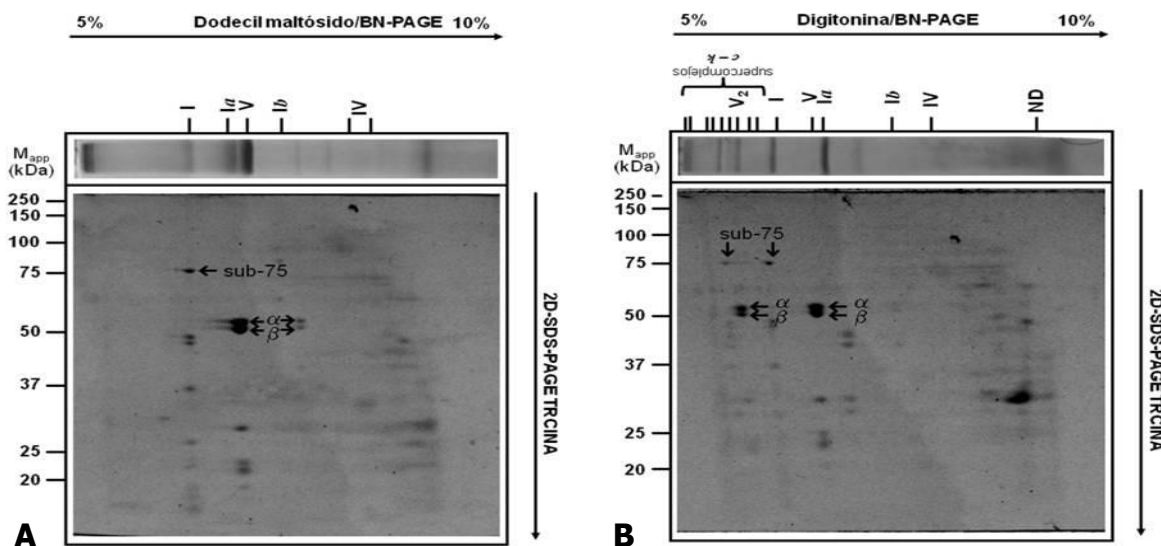


Figura 11. Electroforesis de segunda dimensión de los complejos y supercomplejos de las mitocondrias de *Rhizopus stolonifer*. (A-B) Electroforesis en condiciones desnaturalizantes BN-PAGE/SDS-PAGE-TRICINA) teñidos con azul de Coomassie. (A) Se identificó la subunidad de 75 kDa del monómero del complejo I y las subunidades α y β del monómero de la ATP-sintetasa. (B) Se identificó a la subunidad de 75 kDa del monómero del complejo I como parte de los supercomplejos y las subunidades α y β del monómero y dímero de la ATP-sintetasa.

La actividad enzimática de los complejos respiratorios y de las enzimas del ciclo de Krebs se realizó en mitocondrias aisladas de células cosechadas a las 12 h y las actividades se muestran en la [tabla 4](#). La actividad de NADH deshidrogenasa de las mitocondrias de las células tratadas con el QT fue similar al de las mitocondrias control lo que coincidió con el consumo de oxígeno ([figura 4A](#)), donde no se mostró afectada esta actividad. La actividad de la succinato deshidrogenasa apareció disminuida en las mitocondrias de células tratadas con el policatión, sin embargo, la enzima se pudo haber afectado por el proceso de aislamiento debido principalmente a que es una proteína periférica y por lo tanto, es más sensible al fraccionamiento. La actividad del complejo IV mostró un incremento de la actividad del doble en las mitocondrias de células tratadas comparada con las mitocondrias control. El aumento de la actividad apoya el consumo de oxígeno acelerado marcado en las células tratadas con el QT, ya que la citocromo *c* cataliza la transferencia de los electrones al oxígeno por lo que podría ser uno de las principales contribuyentes. La actividad de la ATP-sintetasa también aumento en las

mitocondrias de células tratadas, aproximadamente 2.7 veces comparadas con el control. Un aumento en el consumo de oxígeno y la actividad de la ATP-sintetasa sugieren la presencia de un mayor número células o mitocondrias. Sin embargo, la biomasa en las células tratadas no se incrementó de manera significativa hasta un tiempo de 24 h (dato no mostrado). Finalmente, de las enzimas del ciclo de Krebs solubles, solo fue posible evidenciar la actividad de la isocitrato deshidrogenasa. En las mitocondrias de las células tratadas con el policación la actividad de esta enzima fue 2.8 veces más alta que en las mitocondrias control, sin embargo, la presencia de las restantes enzimas del ciclo no fue posible determinarlas en las condiciones utilizadas ni en las esporas control ni en las tratadas con el QT.

Tabla 4. Actividad de los complejos respiratorios de las mitocondrias de las células de *Rhizopus stolonifer* cosechadas a las 12 h

<i>Complejo</i>	<i>Actividad enzimática (nmol X·min⁻¹·mg proteína⁻¹)</i>	
	<i>CT</i>	<i>QT</i>
NADH deshidrogenasa nmol DCPIP·min ⁻¹ ·mg proteína ⁻¹	0.154±0.054 ⁷	0.172±0.062 ³
Succinato deshidrogenasa nmol DCPIP·min ⁻¹ ·mg proteína ⁻¹	0.095±0.019 ²	0.022±0.014 ³
Citocromo <i>c</i> oxidasa nmol O ₂ ·min ⁻¹ ·mg proteína ⁻¹	28±15 ³	60±35 ³
ATP-sintetasa nmol Pi·min ⁻¹ ·mg proteína ⁻¹	287±22 ²	788±240 ²
<i>Enzima</i>		
Isocitrato deshidrogenasa nmol NADH·min ⁻¹ ·mg proteína ⁻¹	0.007±0.001 ²	0.020±0.008 ⁵

Superíndices indica las repeticiones

X = DCPIP, O₂, Pi, NADH;

CT-mitocondrias control; QT-mitocondrias de células tratadas con el quitosano

VII. DISCUSIÓN

Efecto del quitosano y el oligoquitosano en la morfología y la ultraestructura

La actividad antifúngica del quitosano y de algunos de sus derivados sobre el desarrollo de diversos hongos, principalmente fitopatógenos, se ha evidenciado en varios reportes donde se mostró que el crecimiento se rezagó o se inhibió significativamente (Ait Barka et al., 2004; Badawy & Rabea, 2008; Cheah et al., 1997; Eweis et al., 2006; Guo et al., 2006; Guo et al., 2008; Pacheco et al., 2008; Palma-Guerrero et al., 2008; Wu et al., 2005), además de los reportes donde se evaluó la inhibición del crecimiento y el desarrollo de las esporas de *R. stolonifer* por efecto del quitosano (Allan & Hadwiger, 1979; El Ghaouth et al., 1992a; Guerra-Sánchez et al., 2009; Hernández-Lauzardo et al., 2007; Hernández-Lauzardo et al., 2008). La aplicación del QT de bajo peso molecular en este trabajo, se justifica con los datos de reportes previos, donde se mostró que el QT de bajo peso molecular fue más efectivo en comparación con el QT de mediano y de alto peso molecular (Hernández-Lauzardo et al., 2008). El OQT presenta algunas ventajas con respecto al QT, como su alta solubilidad a pH neutro, la baja viscosidad, el pequeño tamaño de la cadena y el grupo amino libre en las unidades de D-glucosamina (Kim & Rajapakse, 2005), por lo que el uso de este compuesto ha comenzado a difundirse, sin embargo, los resultados llegan a ser contradictorios en algunos casos. Recientes reportes mostraron la baja actividad antifúngica del OQT comparado con el QT (Seyfarth et al., 2008), mientras que en otros el efecto fue inverso (Xu et al., 2007), lo que indicó que los resultados pueden variar dependiendo del microorganismo ensayado en conjunto con el tamaño y la concentración del compuesto. En este caso, el QT y el OQT exhibieron el mismo efecto en la inhibición del crecimiento micelial, en el desarrollo de las esporas y en los cambios morfológicos que provocaron en *R. stolonifer*, lo que sugirió que ambos compuestos se pueden emplear para el control de éste hongo fitopatógeno.

La acción del QT sobre las características morfológicas (Cheah et al., 1997, Park et al., 2008) y de la ultraestructura de diversos hongos expuestos a este polícatión (Palma-Guerrero et al., 2008; Vesentini et al., 2007) así como la acción del OQT (Xu et al., 2007) ha sido abordada con estudios de microscopía de transmisión y/o de barrido. El daño que se reporta abarca desde cambios en la forma del núcleo, condensación de la cromatina, condensación y vacuolización del

citoplasma, fragmentación e hinchamiento de algunos de los organelos membranosos, hasta una membrana plasmática apartada de la pared celular con algunas perturbaciones, el engrosamiento de la pared celular (Palma-Guerrero et al., 2008; Vesentini et al., 2007; Xu et al., 2007) y cambios en la morfología de las esporas de *R. stolonifer*, principalmente en la profundidad de las crestas que compone la ornamentación típica de la espora (Hernández-Lauzardo et al., 2008). La exploración de los cortes de las células de *R. stolonifer* tratadas con el QT durante 12 h mostró ligeros daños en la ultraestructura, un aumento de mitocondrias en el citoplasma y la presencia de la pared celular externa con sus crestas. Algunos trabajos reportan un aumento de la concentración de quitina en la pared celular de los hongos expuestos al QT, como una consecuencia del estrés tóxico o como un mecanismo de protección del protoplasto (Vesentini et al 2007). El engrosamiento de la pared celular interna de *R. stolonifer* puede ser una respuesta secundaria ante los defectos en la morfología o como un mecanismo de protección ante el stress que ocasiona la presencia del QT en la superficie celular; cabe destacar que este hongo presenta alto contenido de quitina y quitosano en la pared celular (Allan & Hadwiger, 1979; Ross, I.K. 2001) lo que podría contribuir a disminuir el efecto del QT a nivel de la ultraestructura en comparación con otros géneros. La propuesta es que la regulación de la actividad de enzimas glucanólíticas y de quitinasas que están involucradas en la remodelación de la pared celular durante la morfogénesis se vea afectada debido a la presencia de los policationes en la superficie celular (Adams, 2004). Efectos similares se han observado cuando las esporas de *R. stolonifer* se cultivaron en anoxia (Bussel et al., 1969), lo que podría indicar que aunque el cultivo se mantuvo en agitación el QT pudo haber limitado la disposición del oxígeno adhiriéndose a la superficie celular y la célula para contrarrestar el estrés aumento el número de mitocondrias en el citoplasma con el fin de mantener los procesos metabólicos indispensables para la síntesis de nuevas biomoléculas y la obtención de energía.

Efecto del quitosano y el oligoquitosano en la fisiología

La viabilidad de las células después del tratamiento con el QT y el OQT se confirmó con el consumo de oxígeno. Así se descartó la permeabilización de la membrana celular como un mecanismo de acción de estos policationes. La presencia de un mayor número de mitocondrias en las células tratadas con el QT, trae como consecuencia un aumento en los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial. Por otro lado, durante los experimentos de consumo de oxígeno de las células tratadas con el QT mostraron un aumento en la capacidad respiratoria. En

conjunto, estos resultados sugieren que las células aumentaron su capacidad de respiración por la generación de un mayor número de mitocondrias, esto como respuesta a la situación de estrés por la presencia del polícatión en la superficie celular. Aunque no fue posible respaldar los resultados obtenidos con el OQT mediante un estudio similar, la probabilidad de que el consumo acelerado de oxígeno se deba a un incremento en el número de mitocondrias es factible e incluso que el número de mitocondrias sea mayor ya que el oxígeno se agotó aproximadamente 3 veces más rápido en comparación con las células tratadas con el QT y hasta 6 veces más rápido que las células control.

Los transportadores de aniones de la membrana interna mitocondrial que se intentaron evidenciar corresponden a los transportadores de piruvato, de ácidos dicarboxílicos y de aspartato- glutamato que pueden acoplarse a alguna lanzadera para ser transportados a través de la membrana interna o para transportar equivalentes reducidos y electrones desde el citosol a la matriz mitocondrial y fomentar la actividad del ciclo de Krebs y la cadena respiratoria. En el caso de *Saccharomyces cerevisiae* se ha demostrado la existencia de estas y otras lanzaderas (Bakker et al., 2001; Palmieri et al., 2006), sin embargo, en el presente estudio al emplear sustratos como el piruvato, el malato y el glutamato no se registró cambios en el consumo de oxígeno. Se propusieron dos posibilidades; una, que la digitonina no solo permeabilizó la membrana plasmática sino también a la mitocondria o bien que las enzimas encargadas de acoplar el transporte de estos sustratos al interior de la mitocondria no estaban presentes. Posteriores experimentos confirmaron que la digitonina solo permeabilizó la membrana plasmática, entonces la ausencia de respuesta por parte de las células probablemente se deba a la falta de las enzimas. Otros sustratos probados en las células permeabilizadas fueron el succinato y el glicerol 3-fosfato. Un ligero consumo de oxígeno indicó que las mitocondrias podían transportar el succinato al interior y acoplarlo al ciclo de Krebs por medio del complejo II y a la cadena respiratoria, y por otro lado, que la mitocondria posee la lanzadera glicerol 3-fosfato deshidrogenasa que oxida de manera indirecta al NADH del citosol y transfiere los electrones a la cadena respiratoria. Aunque el número de mitocondrias fue mayor en las células tratadas con el QT durante 6 h, el consumo de oxígeno no fue mayor al emplear estos sustratos exógenos, lo que al integrarlo con la baja obtención de biomasa en estas condiciones indicó que la biosíntesis de biomoléculas para el crecimiento masivo del hongo esta suprimida y que solo las vías metabólicas necesarias para mantenerlo viable permanecen activas. En las células tratadas con los polícatiónes durante 12 h, el consumo de oxígeno al emplear el succinato y el

glicerol 3-fosfato fue ligeramente mayor (dato no mostrado), indicativo del aumento de mitocondrias y por lo tanto de un aumento en la concentración del transportador y la lanzadera, respectivamente, ya que la biomasa no se incrementó.

En *S. cerevisiae* (Overkamp et al., 2000; de Vries & Marres, 1987), *Neurospora crassa* (Duarte et al., 2003; Viderira & Duarte, 2002) entre otros hongos y levaduras además de las plantas (Melo et al., 1996) se ha demostrado la existencia de una proteína con actividad de NADH:ubiquinona oxidorreductasas que se ubica tanto al exterior como al interior de la matriz mitocondrial y que oxida el NADH producido en el citosol y el NADH intramitocondrial para acoplarlo a la cadena respiratoria (Pardo et al., 2001a; Kerscher, 2000). En *R. stolonifer* no hay reportes sobre la presencia de NADH deshidrogenasas alternas en la membrana de la matriz mitocondrial pero el NADH exógeno fue utilizado por las células permeabilizadas y se confirmó que se trató de una NADH deshidrogenasa externa por el comportamiento con los inhibidores. El consumo de oxígeno para las células control y las células tratadas con los policationes es similar, lo que al menos sugiere que la actividad de la NADH deshidrogenasa externa no se afectó por efecto de la presencia de los policationes.

Para evidenciar la presencia del complejo III y el complejo IV se realizó inhibiendo con la antimicina A y con el cianuro, respectivamente. Las células de *R. stolonifer* mostraron resistencia al cianuro, fenómeno observado en otros hongos filamentosos, en las levaduras, excepto en *S. cerevisiae*, y en las plantas principalmente. La resistencia al cianuro en estos organismos se debe a la presencia de una oxidasa alterna en la membrana interna mitocondrial que transfiere los electrones directamente al oxígeno sin tener que pasar por el complejo III y IV (Veiga et al 2003). En *Ustilago maydis* se ha reportado la presencia de una oxidasa alterna insensible al cianuro pero sensible al *n*-octil galato que transfiriere los electrones directamente al oxígeno (Juárez et al., 2006). En las células de *R. stolonifer* la adición de *n*-octil galato no causó ningún cambio en el consumo de oxígeno además el alineamiento del gen de la oxidasa alterna de *U. maydis* con el genoma de *R. orizae* no arrojó ningún dato lo que indicó que el complejo IV es resistente al cianuro. Esta particularidad del complejo IV de la cadena respiratoria de *R. stolonifer* es interesante ya que pocos organismos resisten la inhibición por cianuro al menos que posean la oxidasa alterna. En *U. maydis* con 1 mM KCN la inhibición del consumo de oxígeno fue del 80% y la respiración residual fue sensible a *n*-octil galato (Juarez et al., 2004),

mientras que *R. stolonifer* con 1 mM aun quedó respiración residual y no mostró sensibilidad al *n*-octil galato.

La actividad de NADH deshidrogenasa y la succinato deshidrogenasa no se afectó en las mitocondrias de células tratadas con el QT, por lo que su contribución al consumo acelerado de oxígeno es igual que en las mitocondrias control. Por otro lado, la actividad de citocromo *c* oxidasa fue del doble en las mitocondrias de células tratadas con el polication y debido a que es una de las entradas de protones y electrones para la matriz mitocondria además de ser la enzima encarga de entregar los electrones al oxígeno, su aportación sobre la velocidad en la que se reduce el oxígeno es crucial. La actividad de hidrólisis de ATP por la ATP-sintetasa de las mitocondrias de las células tratadas con el polication fue mayor. Partiendo de que la actividad de esta enzima *in vivo* es la síntesis de ATP, moneda energética de la célula, y tomando en cuenta que la biomasa no incrementa en las células con tratamiento, se deduce que el consumo de oxígeno esta desacoplado de la síntesis de ATP, por el hecho de que no se esta empleando para la síntesis de biomoléculas necesarias para la prolongación de la hifa o bien que el ATP que se esta generando sea empleado en la síntesis de la pared celular para mantener a la célula viable y mantener la integridad de la célula.

Los complejos y los supercomplejos de la cadena respiratoria

A la fecha, no hay ningún estudio sobre los componentes de la cadena respiratoria de *R. stolonifer*, hongo de importancia agrícola que ocasiona la pudrición blanda de los frutos carnosos (Agrios, 2001). La cadena respiratoria de este hongo mostró la presencia de los cuatro componentes clásicos, los complejos I al IV más la ATP-sintetasa, que se evidenciaron por la actividad enzimática, el consumo de oxígeno y/o la actividad en los geles nativos. También se puso en evidencia la lanzadera de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa y al menos un elemento alternativo, la NADH deshidrogenasa alterna. Una actividad respiratoria residual permaneció después de que la vía clásica de oxidación del quinol se inhibiera con antimicina A o cianuro. La actividad respiratoria residual con antimicina A puede atribuirse a la presencia de otros citocromos que pudieron transportar los electrones con distinta afinidad al oxígeno. La presencia de una oxidasa alterna responsable de la falta de inhibición por cianuro quedo descartada debido al comportamiento con el inhibidor *n*-octil galato y la ausencia del gen en el genoma de

R. orizae, por tanto, es posible que la citocromo *c* oxidasa de este hongo es particularmente resistente al cianuro.

Dos actividades de NADH deshidrogenasa se detectaron en las mitocondrias de *R. stolonifer*: a) una sensible a flavona, lo que sugirió que su sitio activo se localizaba hacia el citosol y que funciona como una NADH deshidrogenasa externa, y b) el complejo I clásico, indicado por la posición de la actividad en los geles nativos y la presencia de la subunidad de 75 kDa en los geles de segunda dimensión. La razón biológica de la coexistencia de ambas NADH deshidrogenasas no está del todo entendido y un caso aún más excepcional es el de la mitocondria de *S. cerevisiae* donde el complejo I no existe y la oxidación del NADH la realizan una NADH deshidrogenasa interna y dos externas (Joseph-Horne et al., 2001). Sin embargo, en el hongo filamentoso *N. crassa* también se ha reportado una NADH deshidrogenasa interna y una externa además del complejo I (Viderira & Duarte, 2002). En mitocondrias de plantas se han identificado dos NADH internas y externas y el complejo I (Rasmusson et al., 2004). Una propuesta para explicar el papel fisiológico de las NADH deshidrogenasas insensibles a la rotenona es oxidar el NADH en exceso del citosol o de la matriz mitocondrial, en condiciones donde la concentración de NAD⁺ reducido (NADH) es alta pero la necesidad de energía (ATP) es poca. Esta hipótesis incluye que la actividad de una NADH deshidrogenasa alterna puede compensar defectos del complejo I (Melo et al., 1996; Videira & Duarte, 2002). Otro reporte argumenta que las NADH deshidrogenasas están involucradas con el metabolismo celular, principalmente porque el transporte de equivalentes reducidos en las levaduras y en las células de mamíferos se realiza por diferentes lanzaderas en estos sistemas (Juarez et al., 2004; Kerscher, 2000). Las células de mamíferos poseen la lanzadera malato-aspartato y las levaduras en su lugar poseen la lanzadera de acetaldehído-etanol, malato-oxaloacetato y la NADH deshidrogenasa externa (Bakker et al., 2001), sin embargo, existe poca información de la presencia de lanzaderas en otros hongos. La importancia del complejo I en la cadena respiratoria mitocondrial es debido a que representa un sitio de regulación donde se refleja la demanda de energía en la célula (Videira, 1998), por lo que como en el resto de los eucariotes, los hongos filamentosos mantienen este complejo intacto.

La actividad de NADH deshidrogenasa y la del complejo IV en los geles nativos se observó en la parte superior del gel en un intervalo de 1000 a 1870 kDa, lo que fue indicativo de la presencia de supercomplejos. Los supercomplejos se han descrito tanto para las mitocondrias de células

de mamíferos como para las mitocondrias de hongos y bacterias (Schagger & Pfeiffer, 2000). La relación estequiométrica que adoptan los complejos para formar los supercomplejos se obtiene de los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial que se encuentra en diferente concentración ($\text{nmoles}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) en la membrana interna mitocondrial: el complejo I, 0.06-0.013; el complejo II, 0.19; el complejo III, 0.25-0.53; el complejo IV, 0.6-1; la ATP-sintetasa, 0.52-0.54; la ubiquinona, 6-8 y la citocromo *c* oxidasa, 0.8-1.02. Así el componente más abundante es la citocromo *c* oxidasa que se encuentra en una relación de 8 a 10 veces más que el complejo I, 3 a 5 veces más que el complejo II, y 2 veces más que el complejo III (Vázquez & Tuena, 2002). Las principales interacciones que se dan entre los complejos son, el monómero del complejo I con el dímero del complejo III (I_1III_2), el monómero del complejo I con *n* monómeros del complejo IV (I_1V_n), el dímero del complejo III con *n* monómeros del complejo IV (III_2V_n), el monómero I con el dímero del complejo III y *n* monómeros del complejo IV ($\text{I}_1\text{III}_2\text{V}_n$) (Schagger & Pfeiffer, 2000; 2001). Una de las razones fisiológica de estas interacciones está relacionada con la estabilización del complejo I (Stroh et al., 2004). El complejo I de los mamíferos está formado por el ensamble de 46 diferentes proteínas, incluyendo las siete proteínas que se codifican en el DNA mitocondrial que en conjunto da una masa aproximada de 1000 kDa (Carrol et al., 2003 & 2006; Schulte 2001), por ejemplo el complejo I de *N. crassa* lo conforman al menos 39 subunidades (Viderira, 1998). Una propuesta más reciente es que la organización en supercomplejos facilita la transferencia de los electrones hacia el oxígeno (Genova et al., 2008). La estequiometría teórica de los supercomplejos de *R. stolonifer* reveló interacciones similares a las ya reportadas.

VIII. - CONCLUSIONES

El efecto de ambos compuestos a la concentración de 2 mg/mL fue la que mostró mayor inhibición del crecimiento micelial, mientras que el proceso de germinación se afectó de manera similar tanto a la concentración de 1 y 2 mg/mL.

El efecto del quitosano en la ultraestructura de las esporas germinadas mostro engrosamiento de la pared celular, retracción de la membrana plasmática e incremento en el número de mitocondrias por célula.

El incrementó en el consumo de oxígeno en las células tratadas con el quitosano está relacionado con el aumento en el número de mitocondrias y por tanto, de los componentes respiratorios.

La cadena respiratoria de *R. stolonifer* presenta los complejos respiratorios clásicos además de la NADH deshidrogenasa alterna y la lanzadera glicerol 3-fosfato deshidrogenasa además de la formación de los supercomplejos y no se afectaron por la presencia del quitosano.

La actividad de la isocitrato deshidrogenasa, el complejo IV y la ATP-sintetasa se incrementaron en las células cultivadas con el quitosano.

IX. - REFERENCIAS

- Abdel-Mallek, A., Hemida, S.K. & Bagy, M.M.** 1995. Studies on fungi associated with tomato fruits and effectiveness of some commercial fungicides against three pathogens. *Mycopathologia*. 130:109-116
- Adams, D.J.** 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*. 150:2029-2035.
- Adaskaveg, J.E., Förster, H., and Sommer, N.F.** 2002. Principles of postharvest pathology and management of decays of edible horticultural crops. pp. 163-195. In: A. Kader (ed.) *Postharvest Tec Horticultural Crops*. University of California. Oakland, California, USA. 535 p.
- Agrios, G.N.** 2001. *Fitopatología*. Segunda edición. Noriega Editores, México. p 332-336.
- Ait Barka, E., Eullaffroy, P., Clément, C. & Vernet, G.** 2004. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Rep.* 22:608-614.
- Albers, E., Larsson, C., Lidén, G., Niklasson, C & Gustafsson, L.** 1996. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Appl Environ Microbiol.* 62:3187-3195.
- Allan, C. & Hadwiger, L.** 1979. The fungicidal effect of chitosan on fungi of vaying cell with competition. *Exp mycol* 3:285-287.
- Badawy, M.E.I. & Rabea, E.I.** 2008. Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. *Postharvest Biol Tec.*
- Bakker, B.M., Overkamp, K.M., van Maris A.J.A, Kötter, P., Luttik, M.A.H., van Dijken, J.P. & Pronk, J.T.** 2001. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* 25:15-37.
- Barkai-Golan, R.** 2001. Attack mechanisms of the pathogen. pp. 54-58. In: R. Barkai-Golan (ed.). *Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables: Development and Control*. Elsevier Science B. V. New York, USA. 418 p.
- Barkai-Golan, R. & Phillips, D.** 1991. Postharvest heat treatment of fresh fruits and vegetables for decay control. *Plant Dis* 75:1085-1089.
- Barkai-Golan, R., Padova, R., Ross, I., Lapidot, M., Davidson, H., & Copel, A.** 1993. Combined hot water and radiation treatments to control decay of tomato fruits. *Sci Hortic* 56:101-105.
- Barnes, L.D., McGuire, J.J. & Atkinson D.E.** 1972. Yeast diphosphopyridine nucleotide specific isocitrate dehydrogenase. Regulation of activity and unidirectional catalysis. *Biochem J.* 11:4322-4329.
- Bautista-Baños S. & Barrera-Necha L. L.** 2001. Tecnologías empleadas en el control de las enfermedades postcosecha de los productos hortofrutícolas. *Memoria de investigación*, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Pp.111-118.
- Bautista-Baños, S. & Bravo-Luna, L.** 2004. Evaluación del quitosano en el desarrollo de la pudrición blanda del tomate durante el almacenamiento. *Rev Iberoamer Tecnol. Postcosecha.* 1:63-67.
- Bazza-Zeinab, E.M., Farrag-Hala E.L., Fouly-MohieE.D., & Tablawy-Seham Y.M.** 2001. Inhibitory effect of gamma radiation and *Nigella sativa* seeds oil on growth, spore germination and toxin production of fungi. *Radiat Phys Chem.* 60:181-189.
- Bechmann, G., Weiss, H. & Rich, P.R.** 1992. Non-linear inhibition curves for tight-binding inhibitors of dimeric ubiquinol - cytochrome *c* oxidoreductases. Evidence for rapid inhibitor mobility. *Eur J Biochem.* 208-315-325.
- Bianchi, C., Genova, M-L., Parenti-Castelli, G & Lenaz, G.** 2004. The Mitochondrial Respiratory Chain Is Partially Organized in a Supercomplex Assembly. *J Biol Chem.* 279:36562–36569.
- Blandino, A., Dravillas, Kl., Cantero, D., Pandiella, S.S. & Webb C.** 2001. Utilization of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fangal strains. *Process Biochem* 37:497-503.

- Boyette, M. D., Ritchie D. F., Carballo S. J., Blankenship S. M. and Sanders D. C.** 1994. Chlorination and postharvest disease control. Publication AG-414-6. North Caroline Cooperative Extension service, USA.
- Bunik, V.I.** 2003. 2-Oxo acid dehydrogenase complexes in redox regulation. *Eur J Biochem.* 270:1036-1042.
- Buseel, J., Buckley, P.M., Sommer, N.F. & Kosuge, T.** 1969. Ultrastructure changes in *Rhizopus stolonifer* sporangiospores in response to Anaerobiosis. *J Bacteriol.* 98:774-783.
- Capdeville, G., De Wilson, C.L., Beer, S.V. & Aist, J.R.** 2002. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested Red Delicious apple fruit. *Phytopathology* 92:900-908.
- Carroll, J., Fearnley, I.M., Shannon, R.J., Hirst, J. & Walker, J.E.** 2003. Analysis of the Subunit Composition of Complex I from Bovine Heart Mitochondria. *Mol Cell Proteomics.* 2.2:117-126
- Carroll, J., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., Shannon, R.J., Hirst, J. & Walker J.E.** 2006. Bovine Complex I Is a Complex of 45 Different Subunits. *J Biol Chem.* 281:32724-32727.
- Cheah, L., Page, B. & Shepherd, R.** 1997. Chitosan coating for inhibition of sclerotinia rot of carrots. *J Crop Horticul S.* 24:89-92.
- Chung, Y-C. & Chen, C-Y.** 2008. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource Technol* 99:2806-2814.
- Cooper G. M. and Hausman R. E.** 2007. *The Cell A Molecular Approach.* Fourth edition. ASM Press, Washinton, D. C. USA p. 434.
- Cordeiro, C. & Ponces, A.F.** 1995. Digitonin Permeabilization of *Saccharomyces cerevisiae* cells for *in situ* enzyme assay. *Anal Biochem.* 229:145-148.
- de Vries, S & Marres, C.** 1987. The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *Biochim Biophys A.* 895:205-239.
- Duarte, M., Peters, M., Schulte, U & Videira, A.** 2003. The internal alternative NADH dehydrogenase of *Neurospora crassa* mitochondria. *Biochem. J.* 371:1005-1011.
- El Ghaouth, A., Arul, J. & Ponnampalam, R.** 1992b. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology* 82:398-402.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Asselin, A. & Benhamou, N.** 1992a. Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. *Mycol Res.* 96:769-779.
- Eweis, M., Elkholy, S.S. & Elsabee, M.Z.** 2006. Antifungal efficacy of chitosan and its thiourea derivatives upon the growth of some sugar-beet pathogens. *Int J Biol Macromol.* 38:1-8.
- Fiskum, G.** 1985. Intracellular levels and distribution of Ca²⁺ in digitonin-permeabilized cells. *Cell calcium.* 6:25-37.
- Fukumori Y, Watanabe K. & Yamanaka T.** 1987. Cytochrome aa₃ from the aerobic photoheterotroph *Erythrobacter longus*: purification, and enzymatic and molecular features. *J Biochem.* 102:777-84.
- Fukumori, Y., Nakayama, K. & Yamanaka, T.** 1981. Molecular and enzymatic properties of "cytochrome aa₃"-type terminal oxidase derived from *Nitrobacter agilis*. *J Biochem.* 89:265-73.
- Genova, M.L., Baracca, A., Biondi, A., Casalena, G., Faccioli, M., Falasca, A.I., Formiggini, G., Sgarbi, G., Solaini, G. & Lenaz, G.** 2008. Is supercomplex organization of the respiratory chain required for optimal electron transfer activity? *Biochimica et Biophysica Acta.* 1777:740-746.
- Gonzalez-Aguilar G., Gardea A. y Cuamea-Navarro F.** 2005. Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados. CIAD, CYTED, CONACYT y COFUPRO. Jalisco, México.

- Guerra-Sánchez M. G., Vega-Pérez J., Velázquez-del Valle M. G., y Hernández-Lauzardo A. N.** 2009. Antifungal activity and release of compounds on *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. by effect of chitosan with different molecular weights. *Pestic Biochem Phys.* 93: 18-22.
- Guo, Z., Chen, R., Xing, R., Liu, S., Yu, H., Wang, P., Li, C. & Li, P.** 2006. Novel derivatives of chitosan and their antifungal activities in vitro. *Carbohydr Res.* 341:351-354
- Guo, Z., Xing, R., Liu, S., Zhong, Z., Ji, X., Wang, L. & Li, P.** 2008. The influence of molecular weight of quaternized chitosan on antifungal activity. *Carbohydr Polym.* 71:694-697.
- Gutierrez-Cirlos, E.B. & Trumpower, B.L.** 2002. Inhibitory Analogs of Ubiquinol Act Anti-cooperatively on the Yeast Cytochrome *bc1* Complex. *J Biol Chem.* 277:1195-1202.
- Hathaway, J.A. & Atkinson, D.E.** 1963. The effect of adenylic acid on yeast nicotinamide adenine dinucleotide isocitrate dehydrogenase, a possible metabolic mechanism. *J Biol Chem.* 238:2875-2888.
- Hernández-Lauzardo A.N., Bautista-Baños S., Velázquez-del Valle M.G., and Trejo-Espino J.L.** 2006. Identification of *Rhizobium stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, causal agent of Rhizopus rot disease of fruits and vegetables. *Rev Mex Fitopat.* 24:65-69.
- Hernández-Lauzardo, A.N., Bautista-Baños, S. & Velázquez del Valle, M.G.** 2007. Prospectivas de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosechas hortofrutícolas. *Rev. Fitotec. Mex.* 30:119-123.
- Hernández-Lauzardo, A.N., Bautista-Baños, S., Velázquez del Valle, M.G., Rodríguez-Ambríz, S.L., Corona-Rangel, M.L., Solano-Navarro, A. & Bósquez-Molina, E.** 2005. Potencial del quitosano en el control de las enfermedades postcosecha. *Rev Mex Fitopat.* 23(2):198-205.
- Hernández-Lauzardo, A.N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M.G., Méndez Montealvo, M.G. Sánchez-Rivera, M.M. & Bello-Pérez, L.A.** 2008. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Carbohydr Polym.* 73:541-547.
- Hernández-Muñoz, P., Amemar, E., Ocio, M.J. & Gavara, R.** 2006. Effects of calcium dips and chitosan coatings on postharvest life of strawberries (*Fragaria x ananassa*). *Postharvest Biol Tec.* 39:247-253.
- Herrera, T. & Ulloa, M.** 1990. El reino de los hongos. México, Fondo de Cultura Económica
- Igamberdiev, A.U. & Gardeström, P.** 2003. Regulation of NAD- and NADP- dependent isocitrate dehydrogenases by reduction levels of pyridine nucleotides in mitochondria and cytosol of pea leaves. *Biochim Biophys Acta.* 1606:117-125.
- Janisiewicz, W.J. & Korsten, L.** 2002 Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu Rev Phytopathol.* 40:411-41.
- Je, J.Y. & Kim, S.K.** 2006. Chitosan Derivatives Killed Bacteria by Disrupting the Outer and Inner Membrane. *J Agric Food Chem.* 54:6629-6633.
- Joseph-Horne, T., Hollomon, D.W. & Wood, P.M.** 2001. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochimica et Biophysica Acta* 1504:179-195.
- Juárez, O., Guerra, G., Martínez, F. & Pardo, J.P.** 2004. The mitochondrial respiratory chain of *Ustilago maydis*. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1658:244-251.
- Juárez, O., Guerra, G., Velázquez, I., Flores-Herrera, O., Rivera-Pérez, R.E., Pardo, J.P.** 2006. The physiologic role of alternative oxidase in *Ustilago maydis*. *FEBS J.* 273:4603-4615.
- Kerscher S.J.** 2000. Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta.* 1459:274-283.
- Kim S. K. y Rajapakse N.** 2005. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydr Polym.* 62:357-368.

- Kyoon No, H., Young Park, N., Ho Lee, S. & Meyers, S.P.** 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol.* 74:65-72.
- Larsson, C., Pahlman, I-L., Ansell, R., Rigoulet, M., Adler, L. & Gustafsson, L.** 1998. The importance of the glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14:347-357.
- Liu, H., Du, Y., Wang, X. & Sun, L.** 2004. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *Int. J. Food Microbiol.* 95:147-155.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem.* 193:265-275.
- Marques, I., Dencher, N.A., Videira, A. & Krause, F.** 2007. Supramolecular Organization of the Respiratory Chain in *Neurospora crassa* Mitochondria. *Eukaryot Cell.* 6:2391-2405.
- Melo, A.M.P., Roberts, T.H. & Møller, I.M.** 1996. Evidence for the presence of two rotenone-insensitive NAD(P)H germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. *J Appl Microbiol.* 14:541-553.
- Morris, L.L.** 1982. Chilling injury of horticultural crops: An overview. *HortScience* 17:161-162.
- Nichols, B.J. & Denton, M.R.** 1995. Towards the molecular basis for the regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Mol Cell Biochem.* 149:203-212.
- Northover, J. & Zhou, T.** 2002. Control of Rhizopus rot of peaches with postharvest treatments of tebuconazole, fludioxonil, and *Pseudomonas syringae*. *Can J Plant Pathol.* 24:144-153.
- Overkamp, K.M., Bakker, B.M., Kötter, P., Tuijl, A. van., Vries, s. de., Dijken, J.P. van. & Pronk, J.T.** 2000. In vivo analysis of the mechanisms for oxidation of cytosolic NADH by *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J Bacteriol.* 182:2823-2830.
- Pacheco, N., Larralde-Corona, C-P., Sepulveda, J., Trombotto, S., Domard, A. & Shirai, K.** 2008. Evaluation of chitosans and *Pichia guilliermondii* as growth inhibitors of *Penicillium digitatum*. *Int J Biol Macromol.* 43:20-26.
- Palma-Guerrero, J., Jansson, H.B., Salinas, J. & Lopez-Llorca, L.V.** 2008. Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. *J Appl Microbiol.* 104:541-553.
- Palmieri, F., Agrimi, G., Blanco, E., Castegna, A., Di Noia, M.A., Vito, I., Lasorsa, F.M., Marobbio, C.M.T., Palmieri, L., Scarcia, P., Todisco, S., Voza, A., Walker, J.** 2006. Identification of mitochondrial carriers in *Saccharomyces cerevisiae* by transport assay of reconstituted recombinant proteins. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1757:1249-1262.
- Pardo, JP., Martínez, F. & Guerra, MG.** 2001e. La ATP sintetasa. *B.E.B.* 20:85-92.
- Pardo, JP., Martínez, F., Guerra, MG. & Velásquez, I.** 2001b. El complejo II: la succinato deshidrogenasa de la cadena respiratoria. *B.E.B.* 20:103-107.
- Pardo, JP., Martínez, F., Mendoza, G. & Velásquez, I.** 2001d. El complejo IV o citocromo C oxidasa de la cadena respiratoria. *B.E.B.* 20:144-151.
- Pardo, JP., Martínez, F., Rendón-Gómez, JL. & Flores-Herrera, O.** 2001c. El complejo III: el citocromo bc_1 de la cadena respiratoria. *B.E.B.* 20:137-143.
- Pardo, JP., Martínez, F., Velásquez, I. & Flores-Herrera, O.** 2001a. El complejo I de la cadena respiratoria y los factores que determinan la velocidad de la transferencia de los electrones. *B.E.B.* 20:93-102.
- Park, Yoonkyung, Kim, M-H., Park S-C., Cheong, H., Jang, M-K., Nah, J-W & Hahm, K-S.** 2008. Investigation of the Antifungal Activity and Mechanism of Action of LMWS-Chitosan. *J Microbiol Biotechnol.* 18:1729-1734.

- Rabea, E.I., Badawy, M.E-T., Stevens, C.V., Smagghe, G. & Steurbaut, W.** 2003. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules*. 4:1457-1465.
- Rasmusson, A.G., Soole, K.L. & Elthon, T.E.** 2004. Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. *Annu Rev Plant Biol*. 55:23–39.
- Rich, P.R., Jeal, A.E., Madgwick, S.A. & Moody, A.J.** 1990. Inhibitor effects on redox-linked protonations of the b haems of the mitochondrial *bc 1* complex. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1018-29-40.
- Rigoulet, M., Aguilaniu, H., Avéret, N., Bunoust, O., Camougrand, N., Grandier-Vazeille, X., Larsson, C., Pahlman, I-L., Manon, S. and Gustafsson L.** 2004. Organization and regulation of the cytosolic NADH metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem*. 256/257:73–81.
- Romanazzi, G., Nigro, F., Ipoolito, A.** 2003. Short hypobaric treatments potentiate the effect of chitosan in reducing storage decay of sweet cherries. *Postharvest Biol Technol*. 29:73-80.
- Romanazzi, G., Nigro, F., Ippolito, A.** 2001. Chitosan in the control of postharvest decay of some Mediterranean fruits. In: Muzarelli, r.A.A. (Ed.) *Chitin Enzymology*, 2001. Atec. Italy, pp. 141-146.
- Ross, I.K.** 2001. Fungal cell walls. *Encyclopedia of life sciences*. 1-7.
- Sandford, P.** 1986. Chitosan: Commercial uses and potential applications. pp. 51-69. In: G. Skjak-Braek, T. Anthosen, and P. Standford (eds.) *Chitin and chitosan, sources, Chemistry, Biochemistry. Physical Properties and applications*. Elsevier Applied Sciece. New York, USA. 835 p.
- Schägger, H. & von Jagow, G.** 1991. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*. 199:223-231.
- Schägger H.** 2001. Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life*. 52:119-128.
- Schägger, H. & Pfeiffer, K.** 2000. Supercomplexes in the respiratory chains yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J*. 19:1777-1783.
- Schägger, H. & Pfeiffer, K.** 2001. The Ratio of Oxidative Phosphorylation Complexes I–V in Bovine Heart Mitochondria and the Composition of Respiratory Chain Supercomplexes. *J Biol Chem*. 276:37861-37867.
- Scheffler, I. E.** 2001. Mitochondria make a come back. *Adv Drug Delivery Rev* 49:3–26.
- Schipper, M.A.** 1984. A revision of the genus *Rhizopus*. *Studies in Mycology*. Serie No. 25. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baarn, The Netherlands. 34 p.
- Schulte U.** 2001 Biogenesis of Respiratory Complex I. *J Bioenerg Biomembr*. 33:205-212.
- Seyfarth, F., Schliemann, S., Elsner, P. & Hipler, U-P.** 2008 Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and *N*-acetyl-d-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. *Int J Pharm*. 353:139–148.
- Spadaro, D. & Gullino, M.L.** 2004. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *Int J Food Microbiol*. 91:185– 194.
- Stange, R., Midland, S. Holmes, G., Sims, J. & Mayer, R.** 2001. Constituents from the periderm and outer cortex of *Ipomea batatas* L. with antifungal activity against *Rhizopus stolonifer*. *Postharvest Biol Tec*. 23: 85-92.
- Stevens, C., Khan, V.A., Lu, J.Y., Wilson, C.L., Pusey, P.L., Igwegbe, C.K., Kabwe, K. Mafolo, Y. & Liu, J.** 1997. Integration of ultraviolet (UV-C) light with yeast treatments for control of postharvest storage rots of fruits and vegetables. *Biol Control*. 10:98-103.
- Stroh, A., Anderka, O., Pfeiffer, K., Yagi, T., Finel, M., Ludwig, B. & Schägger, H.** 2004. Assembly of Respiratory Complexes I, III, and IV into NADH Oxidase Supercomplex Stabilizes Complex I in *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem*. 279:5000-5007.

- Sun, J. & Trumpower, B.L.** 2003. Superoxide anion generation by the cytochrome bc1 complex. *Arch Biochem Biophys.* 15:198-206.
- Terry, L.A. & Joyce, D.C.** 2004. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. *Postharvest Biol Tec.* 32:1-13.
- Tretter, L. & Adam-Vizi, V.** 2005. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philos T Roy Soc B.* 360:2335-2345.
- Tripathi, P. & Dubey, N.K.** 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biol Tec.* 32:235-245.
- Trumpower, B.L. & Edwards, C.A.** 1979. Purification of a Reconstitutively Active Iron-Sulfur Protein (Oxidation Factor) from Succinate. Cytochrome c Reductase Complex of Bovine Heart Mitochondria. *J Biol Chem.* 254:8697-8706.
- Vázquez, M.E. & Tuena de Gómez-Puyou, M.** 2002. Mitochondria. Una Mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos. Ed. Prado.
- Veiga, A. Arrabaca, J. & Loureiro-Dias, M.** 2003. Cyanide-resistant respiration, a very frequent metabolic pathway in yeas. *FEMS Yeas Res.* 3:239-245.
- Velázquez-del Valle M. G., Bautista-Baños S., Hernández-Lauzardo A. N., Guerra-Sánchez M. G. y Amora-Lazcano E.** 2008. Estrategias de control de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. agente causal de pudriciones postcosecha en productos agrícolas. *Rev Mex Fitopatol.* 26:49-55.
- Vesentini, D., Steward, D., Singh, A.P., Ball, R., Daniel, G. & Franich, R.** 2007. Chitosan-mediated changes in cell wall composition, morphology and ultrastructure in two wood-inhabiting fungi. *Mycol Res.* 111:875–890.
- Videira, A. & Duarte, M.** 2002. From NADH to ubiquinona in *Neurospora* mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta,* 1555:187-191.
- Videira, A.** 1998. Complex I from the fungus *Neurospora crassa*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1364:89–100.
- Westermann, B. & Prokisch, H.** 2002. Mitochondrial dynamics in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol.* 36:91–97.
- Williamson, J.R. & Cooper, R.H.** 1980. Regulation of the citric cycle in mammalian system. *FEBS Lett.* 117:73-85.
- Wilson, C.L., Wisniewski M.E., Biles, C.L., McLaughlin, R., Chalutz, E. & Droby, S.** 1991. Biological control of post-harvest diseases of fruits and vegetables: alternatives to synthetic fungicides. *Crop Prot.* 10:172-177.
- Wu, Y., Zivanovic, S., Draughon, F.A., Conway, W.S & Sams, C.E.** 2005. Physicochemical Properties and Bioactivity of Fungal Chitin and Chitosan. *J Agric Food Chem.* 53:3888-3894.
- Xu, J. Zhao, X., Han, X. & Du, Y.** 2007a. Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi *in vitro*. *Pestic Biochem Phys.* 87: 220-228.
- Zakrzewska, A., Boorsma, A., Brul, S. Hellingwerf, K.J. & Klis, F.M.** 2005. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to the plasma membrane-perturbing compound chitosan. *Eukaryot Cell.* 4:703-715.
- Zakrzewska, A., Boorsma, A., Delneri, D., Brul, S., Oliver, S.G. & Klis, F.M.** 2007. Cellular Processes and Pathway that protect *Saccharomyces cerevisiae* cells against the plasma membrane-perturbing compound chitosan. *Eukaryotic Cell.* 6:600-608.
- Zhang, D. & Quantick, P.C.** 1998. Antifungal effects of chitosan coating fresh strawberries and raspberries during storage. *J Horti Sci Biotechnol.* 73:763-767.
- Zhao, W.N. & McAlister-Henn, L.** 1996. Expression and gene disruption analysis of the isocitrate dehydrogenase family in yeast. *Biochemistry.* 35:117-125.