

© 2022 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 25: 1-11, 2022.

<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.475>

La oxidasa alterna, una metaloproteína conservada en hongos

^{1a}Lucero Romero-Aguilar, ¹Oscar Ivan Luqueño-Bocado,
²Guadalupe Guerra-Sánchez, ¹Genaro Matus-Ortega y ^{1b}Juan Pablo Pardo

¹Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica. Avenida Universidad # 3000, Copilco, Cd. Universitaria, Alcaldía Coyoacán, 04510, Ciudad de México, México.

²Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala S/N, Alcaldía Miguel Hidalgo 11340, Ciudad de México, México.

E-mails: ^alusromaguila@bq.unam.mx, ^bjppardov@gmail.com

RESUMEN

La oxidasa alterna (AOX) es una metaloproteína monotópica que se encuentra unida a la cara interna de la membrana interna mitocondrial. Esta enzima cataliza la transferencia de electrones del ubiquinol al oxígeno con formación de agua como uno de los productos. Cuando la vía citocrómica se inhibe por la presencia de cianuro u otros agentes xenobióticos, la AOX permite el flujo de electrones del NADH al oxígeno y, por tanto, la actividad catabólica y anabólica del ciclo de Krebs. La AOX se encuentra en plantas, hongos, algunos protistas y metazoarios primitivos y se le ha atribuido la capacidad de conferir osmoprotección y resistencia al estrés oxidativo en las células. En esta revisión, se analiza la estructura de la enzima, se aborda su participación en la respuesta ante el estrés osmótico y oxidativo en hongos, su influencia en la síntesis de ATP y la regulación de su expresión genética.

Palabras clave: oxidasa alterna, estrés osmótico, hongos, *Ustilago maydis*, especies reactivas de oxígeno, basidiomiceto.

The alternative oxidase, a metalloprotein conserved in fungi

ABSTRACT

The alternative oxidase (AOX) is a monotopic metalloprotein attached to the inner surface of the inner mitochondrial membrane. This enzyme catalyzes the transfer of electrons from ubiquinol to oxygen, with the production of water. When the cytochrome pathway is inhibited by cyanide or other xenobiotic molecules, the AOX allows the flux of electrons from NADH to oxygen and thus, the catabolic and anabolic activity of the Krebs cycle. The AOX is found in plants, fungi, some protists and a few primitive metazoans. It has been proposed that this enzyme has important roles in the response against osmotic and oxidative stresses. In this review, we analyze the structure of the enzyme, address its participation in the responses of fungi to osmotic stress and analyze the influence of AOX on ATP synthesis.

Key words: alternative oxidase, osmotic stress, fungus, *Ustilago maydis*, reactive oxygen species, basidiomycete.

INTRODUCCIÓN

La cadena respiratoria clásica o cadena de transporte de electrones (CTE) consiste de cuatro grandes complejos proteicos, a saber: la NADH:ubiquinona oxidoreductasa o NADH deshidrogenasa (complejo I, CI), que transfiere los electrones del NADH a la ubiquinona (Q) y transloca 4 protones a través de la membrana interna mitocondrial (Figura 1). Los electrones del succinato, intermediario del ciclo de Krebs, llegan a la ubiquinona vía la succinato:ubiquinona oxidoreductasa (complejo II, CII) o succinato deshidrogenasa. Esta enzima no bombea protones a través de la membrana. Desde la poza de ubiquinona los electrones del ubiquinol (QH₂) se transfieren, a través de la ubiquinol:citocromo *c* oxidoreductasa (complejo III, CIII) y la citocromo *c* oxidasa (complejo IV, CIV), al oxígeno, generando agua. La transferencia de los electrones del ubiquinol al oxígeno se acopla con el transporte neto de 6 protones, 4 por el CIII y 2 por el CIV (Figura 1). El gradiente de protones resultante lo utiliza la FOF1-ATP sintasa (complejo V) para generar ATP (Grahl, Dinamarca, Willger, Goldman & Cramer, 2012). Adicionalmente, se encuentran dos acarreadores de electrones, la ubiquinona y el citocromo *c*. Hay organismos que tienen una o más NADH deshidrogenasas alternas (NDH2) y oxidasas alternas (AOX), que no transportan protones a través de la membrana interna mitocondrial. Las NDH2 son proteínas monotópicas de membrana, homodiméricas, insensibles a la

rotenona, pero sensibles a la flavona. Cuando el complejo I se inhibe con rotenona o con compuestos como la piericidina A, las NDH2 sustituyen la función del CI debido a que transfieren los electrones del NADH a la ubiquinona (Ecuación 1) y, de esta manera, permiten que la parte terminal de la cadena respiratoria (CIII y CIV) y el ciclo de Krebs sigan trabajando.

Ecuación 1



LA OXIDASA ALTERNA

La AOX es una metaloproteína monotópica anclada a la superficie interna de la membrana mitocondrial (Figura 2). La interacción del homodímero con la superficie interna de la bicapa lipídica se lleva a cabo a través de cuatro hélices alfa, sin que existan cruces transmembranales. La mayor parte de la proteína sobresale hacia la matriz mitocondrial (Figura 2 y Figura 3B) (Siedow, 2013). El monómero tiene una masa molecular de 32-40 kDa, dependiendo de la especie. El sitio activo consiste de un centro de diférrico, no hemo, coordinado por dos residuos de histidina y cuatro de glutamato (Figuras 3A y 3B). Estos seis residuos están conservados en todas las oxidasas alternas. En la Figura 3A se muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las AOX de un número reducido de hongos que son importantes como modelos de

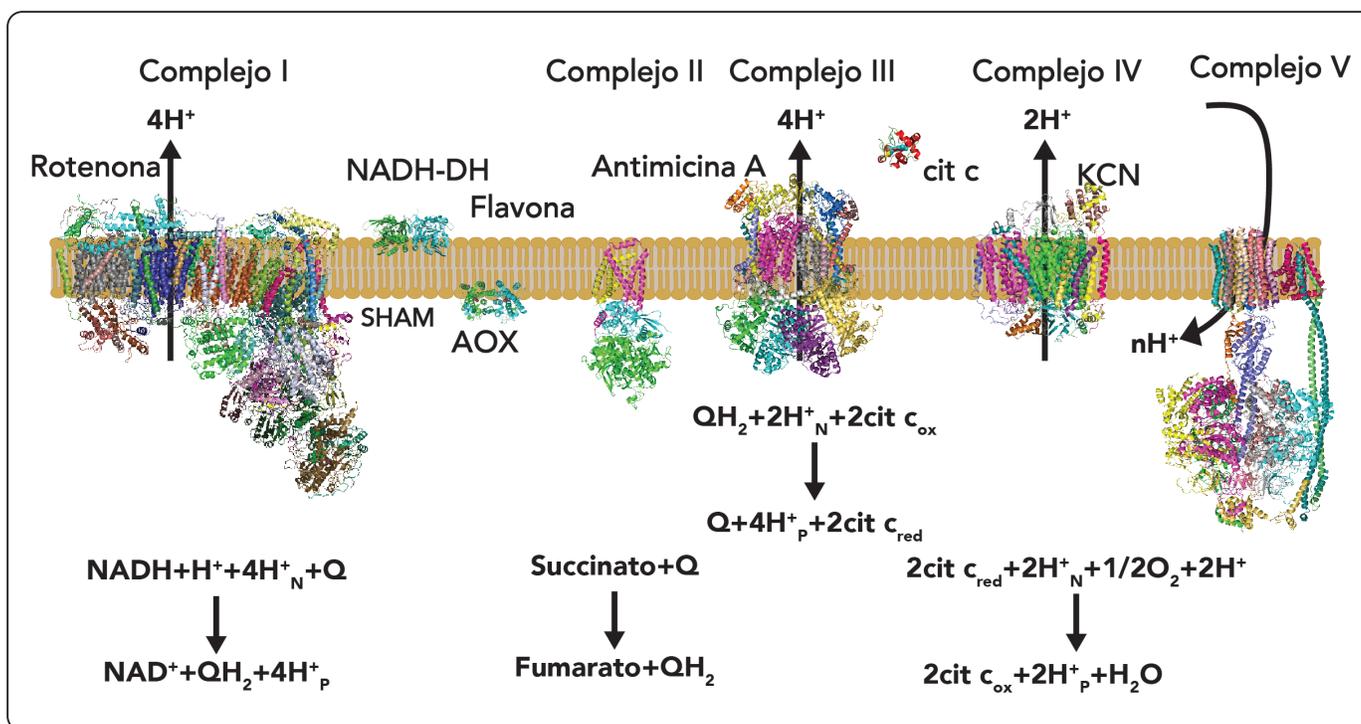


Figura 1. La cadena respiratoria clásica. Se muestran los 4 complejos proteicos que integran la cadena respiratoria clásica: la NADH:ubiquinona oxidoreductasa (complejo I), la succinato:ubiquinona oxidoreductasa (complejo II), la ubiquinol:citocromo *c* oxidoreductasa (complejo III) y la citocromo *c* oxidasa (complejo IV), así como los inhibidores de cada uno de los complejos respiratorios. El aceptor final de electrones en la cadena respiratoria es el oxígeno y uno de los productos es el agua. Figura, creatividad personal.

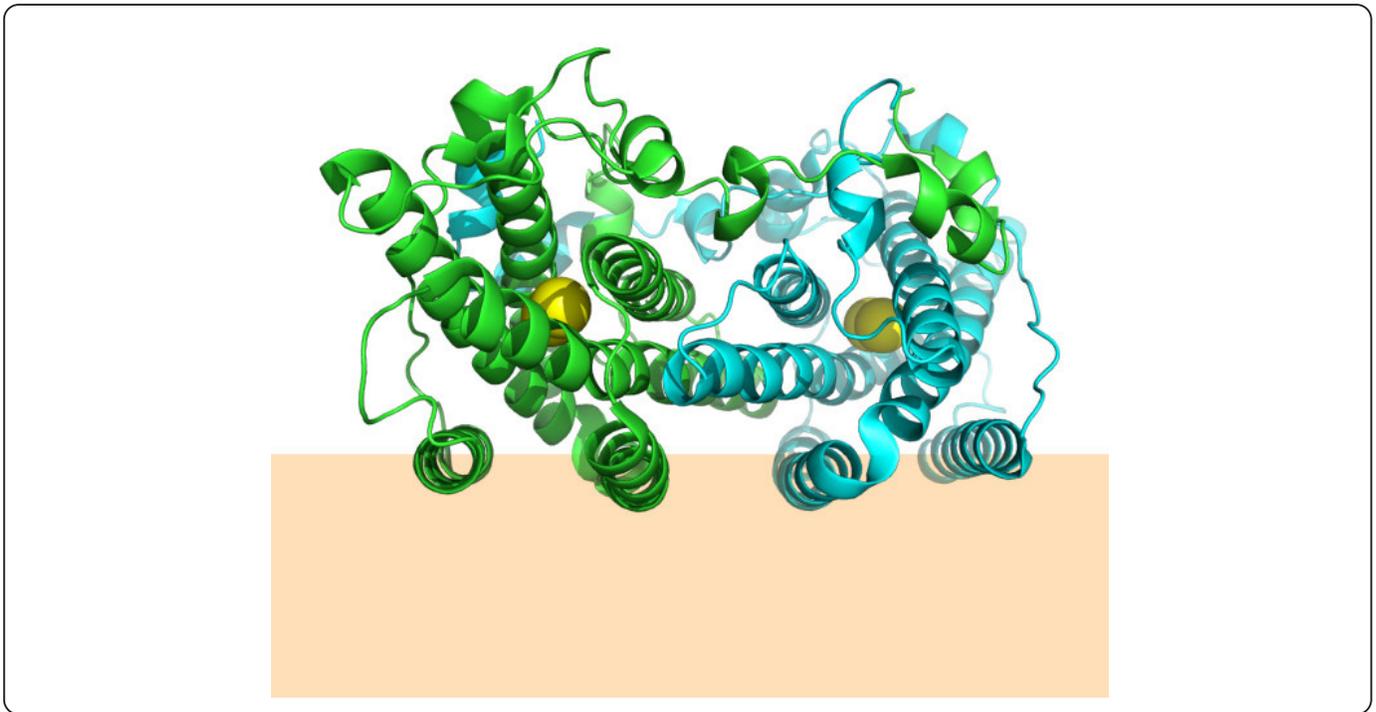


Figura 2. Modelo de unión del dímero de la oxidasa alterna a la membrana. Se muestran las 4 hélices alfa que interactúan con la superficie de la membrana interna mitocondrial. Uno de los monómeros se indica en verde y el otro en azul claro. Los centros diférricos están en amarillo. La membrana mitocondrial se representa en amarillo-café. La estructura fue elaborada con PyMOL (*PyMOL | Pymol.Org, n.d.*) (Delano, 2004). Figura, creatividad personal.

estudio: *Neurospora crassa*, *Candida albicans*, *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii* y *Picchia pastori*. Con un asterisco se indican los residuos conservados que participan en la coordinación de los iones Fe^{3+} (Figura 3A). En la Figura 3B se muestra la interacción de los cuatro residuos de glutamato y los dos de histidina con los iones Fe^{3+} y las distancias de interacción entre los diferentes átomos. La numeración se refiere a la AOX de *Trypanosoma brucei*, que es la única AOX que se ha cristalizado (Shiba *et al.*, 2013). De todos los residuos involucrados en la interacción con los iones Fe^{3+} , la His269 es la que se encuentra a mayor distancia del hierro (Figura 3B). Al igual que la acción conjunta de los complejos III y IV, la AOX reduce el oxígeno a agua con los electrones del QH_2 , pero sin bombeo de protones, como se muestra en la Ecuación 2 (Albury, Elliott & Moore, 2009; Moore *et al.*, 2013).

Ecuación 2



Esta ruta alterna libra a los complejos III y IV de la cadena respiratoria y es responsable de la respiración resistente al cianuro (CRR, *Cyanide-Resistant Respiration*, por sus siglas en inglés). La AOX es insensible a la antimicina A (inhibidor del CIII) y al cianuro (inhibidor del CIV), pero es sensible al ácido salicilhidroxámico (SHAM), al octil-galato

y a la ascofuranona (Grover & Laties, 1981). Al igual que la NADH deshidrogenasa alterna, la AOX es un homodímero que no genera fuerza protón-motriz, por lo que el cambio de energía asociada a la reacción que cataliza se libera en forma de calor. El gen que codifica para la AOX tiene localización nuclear y proviene del ancestro de la mitocondria, la alfa proteobacteria (Atteia *et al.*, 2004). A lo largo de la evolución, los organismos que no necesitaban la proteína fueron perdiendo el gen, como es el caso de los mamíferos, los invertebrados y los artrópodos (Tabla I) (Atteia *et al.*, 2004; Berthold, Andersson & Nordlund, 2000).

Se ha propuesto que la actividad de la AOX se ajusta a los requerimientos metabólicos y energéticos de la célula y a las condiciones de estrés en los que se encuentren los hongos, plantas, algunos metazoarios y bacterias (Dunn, 2018; Saha, Borovskii & Panda, 2016). Por ejemplo, con base en experimentos realizados en diferentes laboratorios, se muestra que su actividad se asocia con el mantenimiento de la homeostasis del estado redox y el de las especies reactivas de oxígeno (ROS), así como con la demanda energética de la célula (Albury, Elliott & Moore, 2010; Chaudhuri, Ott & Hill, 2006). En plantas es responsable del incremento de la temperatura en las flores, lo que favorece la volatilización de moléculas que atraen insectos para la polinización (Johnson, 2019; Zhu *et al.*, 2011); además, participa en la resistencia al estrés causado

A

A0A0D1C7C6_USTMA	206	LTSNDGAMTLQEMRAKGLSFGPDGWLNRMIPIE	*	SIAGVPGMVAATCRHLQSLRLMRD	265
Q01355_NEUCR	141	-----TTATSADKPLTEAQWLVRFIPE		SIAGVPGMVAGMLRHLHSLRRLKRDNG	190
O93853_CANAX	158	-----DQYKGTFRWEMTEEKWMTTRCI		PE SIAGVPGSVAGVVRHLHSLRMLTRDRA	207
Q8J018_YARLI	139	-----LPKFRMTTRQWLDRLRFLPE		SIAGVPGMVAGMIRHLHSLRALRRDRA	184
Q6BVC1_DEBHA	118	-----DGFKGTTRYEMTEPKWLTTRCI		PE SIAGVPGMVAAFIRHLHSLRLLRDRA	167
A4K8T8_PICPA	141	-----EKLTPATYQMTPEKWLTRFI		LE SIAGVPGSVASFLRHLQSLRLLRDRA	190
		:	*	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
A0A0D1C7C6_USTMA	266	WIHTMLEDAENR	**	MLLVALHLSGKPGLIARTFVLLAQGVFN	325
Q01355_NEUCR	191	WIETLLEESYNER		MHLTFMKM-CEPGLLMKTLILGAQGVFN	249
O93853_CANAX	208	WIETLHDEAYNER		MHLTFPIKI-GKPSWFTRSI IYIGQGVFT	266
Q8J018_YARLI	185	WIESLVEEAYNER		MHLTFIKL-QKPSVQMRGTLLIGQIIFYN	243
Q6BVC1_DEBHA	168	WIETLHDEAYNER		MHLTFIKL-GRPSWFTRSI IYIGQGVFN	226
A4K8T8_PICPA	191	FIQTLQDEAYNER		MHLTFLEI-GKPGPFMKVLLYASQGVFN	249
		:	*	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
A0A0D1C7C6_USTMA	326	GVL	*	EEAVLTYSLILEDLK-EGRLPEW--EDV	381
Q01355_NEUCR	250	GYL		EEAVHTYTRCIREIE-EGHLPKWSDEKFE	308
O93853_CANAX	267	GYL		EEAVRITYTHLIDEDDPNKLPDF--QKL	324
Q8J018_YARLI	244	GYL		EEAVITYTRCLEDID-AGRPLEL--ASME	299
Q6BVC1_DEBHA	227	GYL		EEAVSTYTHLLEELK-MGKLEF--DNIQ	283
A4K8T8_PICPA	250	GYL		EEAVTYTTCLEDIE-RGLLPDI--EHFK	305
		:	*	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
A0A0D1C7C6_USTMA	382	DEA	**	THRHINHTFASINS--DDPNPFALREPPA	438
Q01355_NEUCR	309	DEA		HARGVNHHTLSNLDQ-KEDPNPFVSDYKE	362
O93853_CANAX	325	DEA		KHREINHTFANLEQ-WQDRNPFALKIKDS	379
Q8J018_YARLI	300	DEA		KHCEVNHFTFNLHQ-TSDRNPFALVIDNG	353
Q6BVC1_DEBHA	284	DEA		KHREVNHTLANLHQ-KSDRNPFALVIGKT	338
A4K8T8_PICPA	306	DEA		KHREVNHTFANLKLDTDRNPFALQVDSV	362
		:	*	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

B

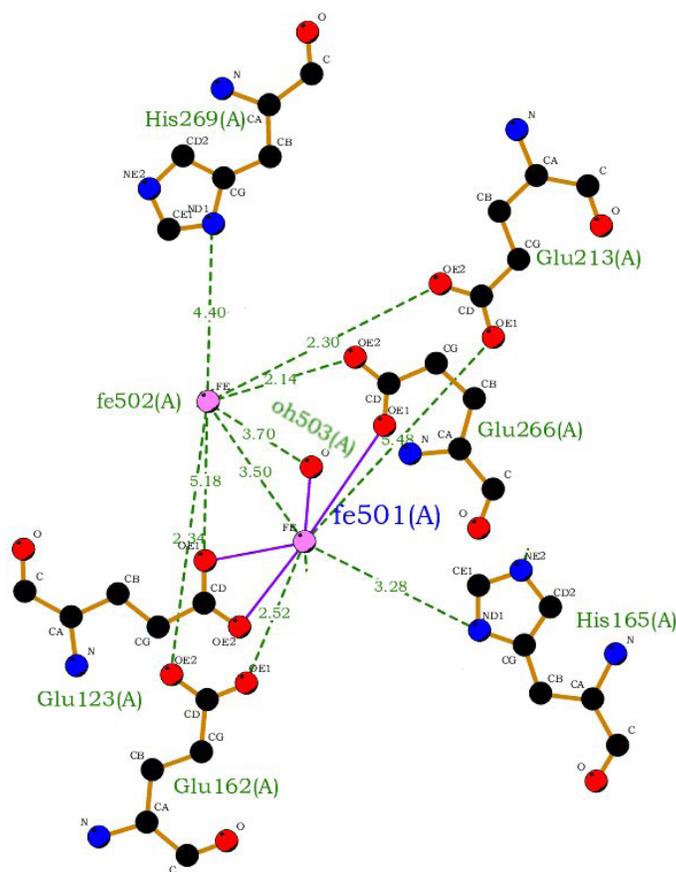


Figura 3. Alineamiento múltiple de la oxidasa alterna. USTMA: *Ustilago maydis*, NEUCR: *Neurospora crasa*, CANAX: *Candida albicans*, YARLI: *Yarrowia lipolytica*, DEBH: *Debaryomyces hansenii*, y PICPA: *Pichia pastori*. Se indica el número de identificación de Uniprot y en rosa se indican los aminoácidos conservados y que participan en la coordinación de los iones Fe³⁺ (A). Se muestra un diagrama en dos dimensiones de los residuos que interactúan con los dos iones Fe³⁺. La coordinación se lleva a cabo por dos residuos de histidina y cuatro de glutamato: Glu123, Glu 213, H165 y H269 son ligandos monodentados y Glu 162 y Glu 266 son dos ligandos bidentados. También se muestran las distancias de interacción entre los diferentes átomos. El diagrama fue construido con LigPlot (Laskowki & Swidenlls, 2011).

Tabla I. Representación de la AOX en los distintos reinos de los organismos vivos.

Reino	Organismos	Referencias
Planta	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	(Ordog, Higgins & Vanlerberghe, 2002; Saisho, et al., 1997; Kaye et al., 2019)
Monera	<i>Pelagibacter</i> ssp. <i>Vibrio fischeri</i>	(Dunn, 2018; McDonald, Vanlerberghe & Staples, 2009)
Hongos	<i>Neurospora crassa</i> <i>Hansenula anomala</i> <i>Ustilago maydis</i> <i>Debaryomyces hansenii</i>	(Juárez, Guerra, Martínez & Pardo, 2004; Veiga et al., 2003)
Protista	<i>Trypanosoma brucei brucei</i> <i>Cryptosporidium parvum</i>	(Chaudhuri et al., 2006) (Martins et al., 2011)
Animal	<i>Arctica islandica</i> <i>Geukensia demissa</i> <i>Euryurus leachii</i> <i>Pleuroloma flavipes butleri</i>	(McDonald et al., 2009)

por la producción excesiva de ROS debido a procesos como la invasión de patógenos, el envejecimiento y la maduración de los frutos (Neimanis, Staples, Huner & McDonald, 2013).

La actividad de la AOX también se ha relacionado con la resistencia a otros tipos de estrés, por ejemplo, cuando la cadena respiratoria se inhibe con cianuro o antimicina A. En esta condición, al ser una ruta alterna a la de la citocromo *c* oxidasa, la AOX permite el flujo de los electrones desde el NADH (vía CI) hacia al oxígeno (Figura 4), lo que a su vez permite la actividad del ciclo de Krebs y el flujo de los esqueletos de carbono. Puesto que la AOX cataliza la reducción del oxígeno sin bombeo de protones, la reacción no se asocia directamente con la síntesis de ATP (Attea et al., 2004). La inhibición de la AOX tiene efectos negativos sobre el proceso de diferenciación de patógenos como *Candida albicans*, *Cryptosporidium parvum*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum* y *Trypanosoma brucei* (Chaudhuri et al., 2006). Se ha propuesto que la AOX podría ser un blanco terapéutico para tratar enfermedades como la tripanosomiasis, ya que esta enzima no forma parte de la cadena respiratoria de los seres humanos (Ebiloma, Balogun, Cueto-Díaz, de Koning & Dardonville, 2019; Menzies, Tulloch, Florence & Smith, 2018; Tian, Lee, Woo & Chun, 2020; West, Cunningham, Pennicott, Rao & Ward, 2018).

EL EFECTO CRABTREE Y LA AOX

Se ha reportado una relación entre la presencia de la AOX en hongos y su capacidad de fermentación en condiciones aeróbicas y en presencia de una alta concentración de glucosa. A esta situación se la llama efecto Crabtree. Puesto que *Saccharomyces cerevisiae* produce etanol al cultivarse en presencia de O₂ y altas concentraciones de glucosa, se clasifica como Crabtree positivo. Otras levaduras, como *U. maydis*, son 100% respiratorias y,

por lo tanto, no fermentan. Finalmente, hay levaduras, como *Rhodotorula glutinis*, que tienen la capacidad de fermentación pero que, en presencia de oxígeno, ésta se inhibe; a estas últimas se les denomina Crabtree negativas. *S. cerevisiae* tiene otras características que la hacen única, como carecer de los genes que codifican para la AOX y el complejo I. Veiga y colaboradores analizaron 28 levaduras Crabtree negativas, de las cuales 24 tuvieron a la AOX, mientras que de las 12 levaduras Crabtree positivas sólo 2 la tuvieron (Veiga, Arrabaca & Loureiro-Dias, 2000). Por lo tanto, los autores concluyeron que hay una estrecha relación entre la capacidad que tiene una célula de fermentar en condiciones aeróbicas y la ausencia de la AOX.

LA AOX Y LA SÍNTESIS DE ATP

Se ha comprobado que la actividad de la AOX permite la síntesis de ATP cuando las células se encuentran en presencia de inhibidores del CIII o del CIV, como la antimicina A o el cianuro. En estas condiciones, en las que los componentes de la cadena respiratoria están inhibidos, no se modifica la concentración de ATP con respecto a la del control, que no tiene inhibidores, y esto se explica por la actividad de la AOX. En contraste, en presencia de SHAM y de la antimicina A, la concentración de ATP disminuye. Estos resultados refuerzan la idea de que la respiración resistente al cianuro (CRR) dada por la AOX permite la generación de ATP cuando la vía citocrómica está inhibida. Como se muestra en la Figura 4, la interacción funcional entre el CI y la AOX sería la responsable de la síntesis de ATP (Veiga et al., 2003).

En concordancia con la síntesis de ATP relacionada con la actividad de la AOX, en *Pichia membranaefaciens* y *Debaryomyces hansenii* la vía resistente al cianuro permite la generación del potencial eléctrico de la membrana interna

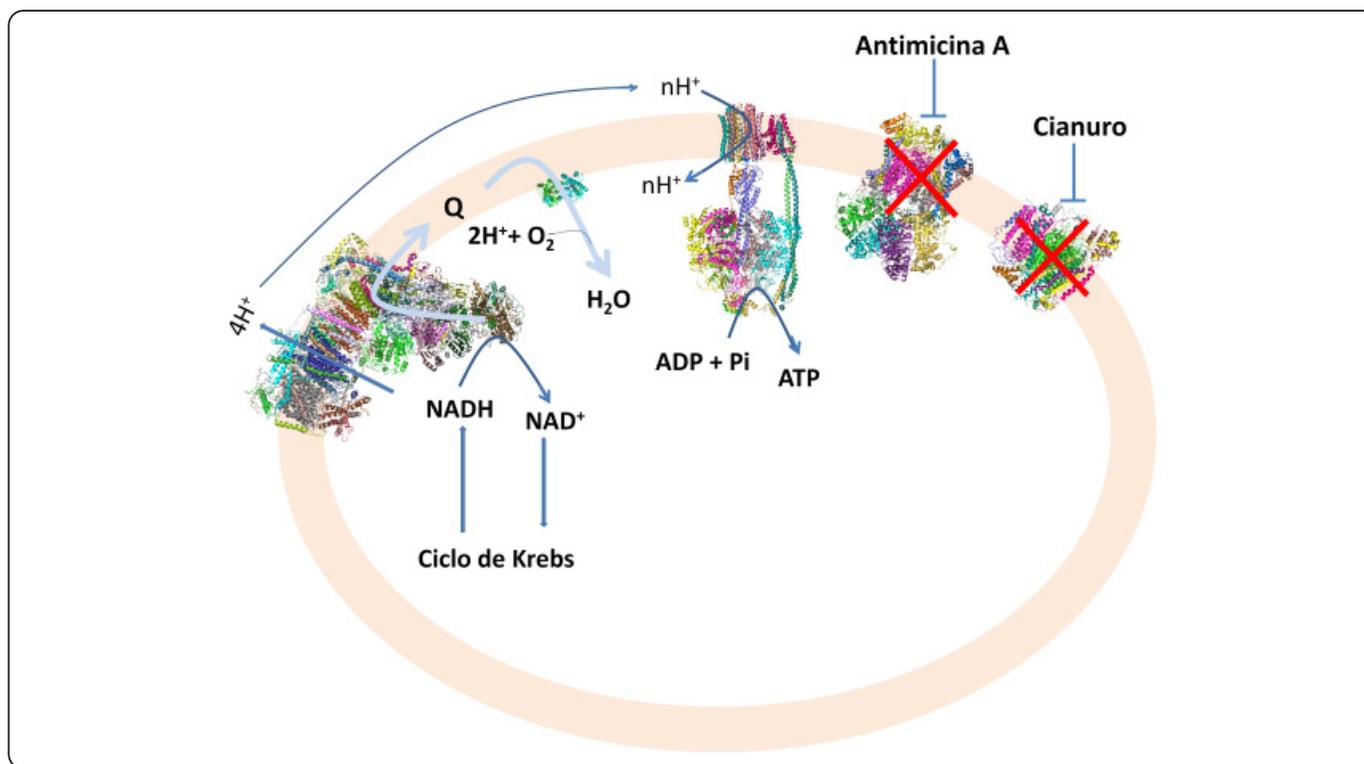


Figura 4. Flujo de los electrones a través de la AOX. Durante la inhibición de la CTE, la AOX permite el flujo de los electrones desde el NADH (Complejo I) hacia el oxígeno, por lo que la actividad del ciclo de Krebs y el flujo de los esqueletos de carbono puede continuar. Figura, creatividad personal.

mitocondrial. Cuando *P. membranaefaciens* se trata con antimicina A, el potencial de membrana, determinado como la media de la intensidad de fluorescencia (MFI) del fluoróforo Rh123, disminuye un 30% y en presencia de SHAM (3.2 mM), la reducción es del 40%, mientras que en presencia de ambos inhibidores (antimicina A y SHAM) se produce una disminución de la MFI del 62%. La capacidad de las mitocondrias de generar un potencial de membrana cuando las células se cultivan en presencia de cianuro o SHAM se refleja en un contenido similar de ATP, que apoya el argumento de que en presencia de la antimicina A existe una producción de ATP debido a la presencia de la AOX, que permite la generación de un gradiente de protones por el CI (Veiga *et al.*, 2003).

LA AOX Y SU RELACIÓN CON EL ESTRÉS

Una opinión muy generalizada es que la AOX protege contra diferentes tipos de estrés. Estos son variados y aparentemente sin relación entre ellos, e incluyen al osmótico, oxidativo, calórico, bajas temperaturas y desecación, entre otros. Dada la gran variedad de tipos de estrés, se desconoce el mecanismo molecular por medio del cual se lleva a cabo esta protección. A continuación, describimos algunos ejemplos del efecto del estrés sobre la expresión de la AOX y su probable función en las levaduras. En *D. hanseni*, la expresión de la AOX

aumenta cuando se cultiva en presencia de 1.5 a 2 M de NaCl (Veiga, Arrabaca & Loureiro-Dias, 2003a). Se considera que la AOX confiere protección frente al estrés osmótico, aunque se desconoce el mecanismo (Petrovic, 2006). La presencia de la AOX en *D. hanseni* no afecta la producción de biomasa cuando las células se cultivan en un medio con una alta concentración de sodio (García-Neto, Cabrera-Orefice, Uribe-Carvajal, Kowaltowski & Alberto Luévano-Martínez, 2017). Sin embargo, cuando la AOX se inhibe con SHAM, la biomasa que se obtiene es menor y hay un incremento en la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (García, Morales-Ríos, Cortés-Hernandez & Rodríguez-Zavala, 2006). Aunque este resultado sugiere la participación de la AOX en el crecimiento celular, no se descarta que la disminución en la producción de la biomasa se deba a un efecto tóxico del SHAM, que no está relacionado con su actividad como inhibidor de la AOX (Romero-Aguilar *et al.*, 2020).

También el estrés por temperatura induce la expresión de la AOX. En *D. hanseni*, las células cultivadas a 35 °C por un período de 4 horas expresan a la oxidasa, lo que mantiene la viabilidad (Veiga *et al.*, 2003). Un comportamiento similar se da en *P. membranaefaciens*: el tratamiento a 36 °C durante 4 horas induce a la AOX y la pierde a los 25 °C (Veiga *et al.*, 2003).

En *D. hansenii* y *P. membranifaciens* la respiración resistente a cianuro también se induce por agentes como la menadiona y el H_2O_2 , por lo que se ha sugerido que, en condiciones que favorecen el estrés oxidativo, la AOX disminuye la formación de ROS. Sin embargo, Veiga y colaboradores, en el 2003, utilizando SHAM, mostraron que en *D. hansenii* y en *P. membranifaciens* la vía alterna y la producción de ROS no están asociadas, es decir, la producción de ROS es igual en presencia o ausencia del inhibidor de la AOX (Veiga *et al.*, 2003).

En el patógeno oportunista *Candida albicans*, la AOX es codificada por dos genes nucleares: *AOX1a* y *AOX1b*. La *Aox1a* se expresa constitutivamente a bajas concentraciones mientras que la expresión de la *Aox1b* se induce por cianuro y agentes oxidantes como el H_2O_2 y el superóxido, producidos por el paraquat o la menadiona, o en respuesta al envejecimiento (Yan *et al.*, 2009). Un dato interesante es que la inducción de la respiración resistente a cianuro en *C. albicans* incrementa la resistencia a los azoles: ketoconazol, miconazol y fluconazol (Yan *et al.*, 2009). El mecanismo por medio del cual la AOX induce la resistencia a los azoles en *C. albicans* no es claro, ya que el mecanismo antifúngico de los azoles no se basa en la formación de ROS en la célula, sino en la inhibición de la síntesis de ergosterol, un componente esencial de la membrana plasmática. En contraste, en la cepa hospitalaria *Candida krusei*, la AOX no se relaciona con la resistencia a los azoles, pero sí con el estrés oxidativo inducido por agentes oxidantes, ya que la inhibición de la oxidasa por SHAM incrementa las concentraciones de ROS (Costa-de-Oliveira *et al.*, 2012).

NEUROSPORA CRASSA COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA AOX

Como se describió en el apartado anterior, las levaduras incrementan la expresión de la AOX cuando se encuentran en condiciones de estrés, aunque se desconoce, para la mayoría de los organismos, el mecanismo por medio del cual los diferentes estímulos aumentan la expresión de la AOX, así como los elementos que participan en este proceso. La excepción es el ascomiceto *Neurospora crassa*. Al igual que otros microorganismos, la inhibición de la vía citocrómica o la ausencia de cobre, ion necesario para la síntesis de la citocromo *c* oxidasa, inducen la síntesis de la AOX en *N. crassa*. También la expresión de la AOX depende de las condiciones de crecimiento. Cuando se cultiva a este microorganismo en un medio rico, el contenido del RNA mensajero (RNAm) para la AOX es bajo; sin embargo, cuando las células se cultivan en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas mitocondriales, como el cloranfenicol, o se trabaja con cepas que carecen del CIV, los niveles del RNAm de la AOX son altos, por lo que un punto de regulación de la AOX en *N. crassa* se realiza a nivel transcripcional (Nargang *et al.*, 2012; Qi *et al.*, 2016), que implica la presencia de factores de la transcripción y de

sistemas de transducción de señales específicos que participan en este proceso.

La expresión de la AOX en *N. crassa* está a cargo de al menos tres genes identificados: el *aod-1*, que corresponde al gen estructural de la AOX, y dos genes que codifican para factores de transcripción de la familia de dedos de zinc ($Zn(II)_2Cys_6$), que son el *aod-2*, y el *aod-5* (Chae *et al.*, 2007; Descheneau, Cleary & Nargang, 2005; Li *et al.*, 1996; Nargang *et al.*, 2012). Además de estos tres genes, hay otros que participan en esta regulación, como el *aod-4*, *aod-6* y *aod-7*, aunque su función e identidad no han sido esclarecidas. Las proteínas AOD-2 y AOD-5 actúan en conjunto al unirse al promotor del gen de la AOX (Figura 5) (Chae *et al.*, 2007). Sin embargo, estos dos factores de transcripción no son específicos de la AOX, ya que también están involucrados en la expresión de genes relacionados con la producción de energía y el metabolismo intermediario, por ejemplo, el del citocromo *c*, la fosfoenolpiruvato carboxinasa y la malato sintasa, entre otros (Qi *et al.*, 2016). Otro dato importante en la construcción del modelo del mecanismo molecular de la regulación de la expresión genética de la AOX es la sobreexpresión del RNAm de la AOX en la mutante que tiene defectos en el gen *flbA* (Bosnjak *et al.*, 2019). Este gen codifica para una proteína que estimula la actividad de GTPasa de la subunidad $G\alpha$ y, por tanto, promueve la hidrólisis del GTP en su sitio activo y su respectiva inactivación (Figura 5) (Nargang *et al.*, 2012; Qi *et al.*, 2016).

Otro mecanismo de regulación involucra a la mitocondria. Puesto que la AOX se expresa cuando se inhibe la cadena respiratoria de las mitocondrias, debe de existir una regulación retrógrada del gen de la AOX, que va de la mitocondria al núcleo, pero se desconoce la naturaleza de la vía y los factores que participan en esta regulación (Nargang *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2009).

Aunque el trabajo de Nargang y colaboradores (2012) es un gran avance en el conocimiento del sistema de transducción de señales que resulta en la expresión de la AOX, la Figura 5 muestra que todavía hay muchos espacios en blanco que necesitan ser llenados para tener el modelo completo, tanto para *N. crassa*, que es en donde se han realizado estos estudios, como para los demás organismos, en donde la ausencia de datos es notoria.

EL CASO DE LA AOX EN PATÓGENOS DE PLANTAS

Ustilago maydis y *Magnaporthe grisea* son patógenos de plantas. El primero infecta al maíz y actualmente se ha propuesto como una levadura con potencial biotecnológico, mientras que *M. grisea* infecta, además del maíz, a otros cereales de importancia agrícola, como el arroz, el trigo y la cebada. La cadena respiratoria de estos dos microorganismos contiene los cuatro complejos clásicos: I, II, III y IV, así como una glicerol fosfato deshidrogenasa y dos elementos alternos: 1) una o varias NADH deshidrogenasas, sensibles a flavona e insensibles a rotenona, y 2) una oxidasa alterna. A diferencia de otros hongos

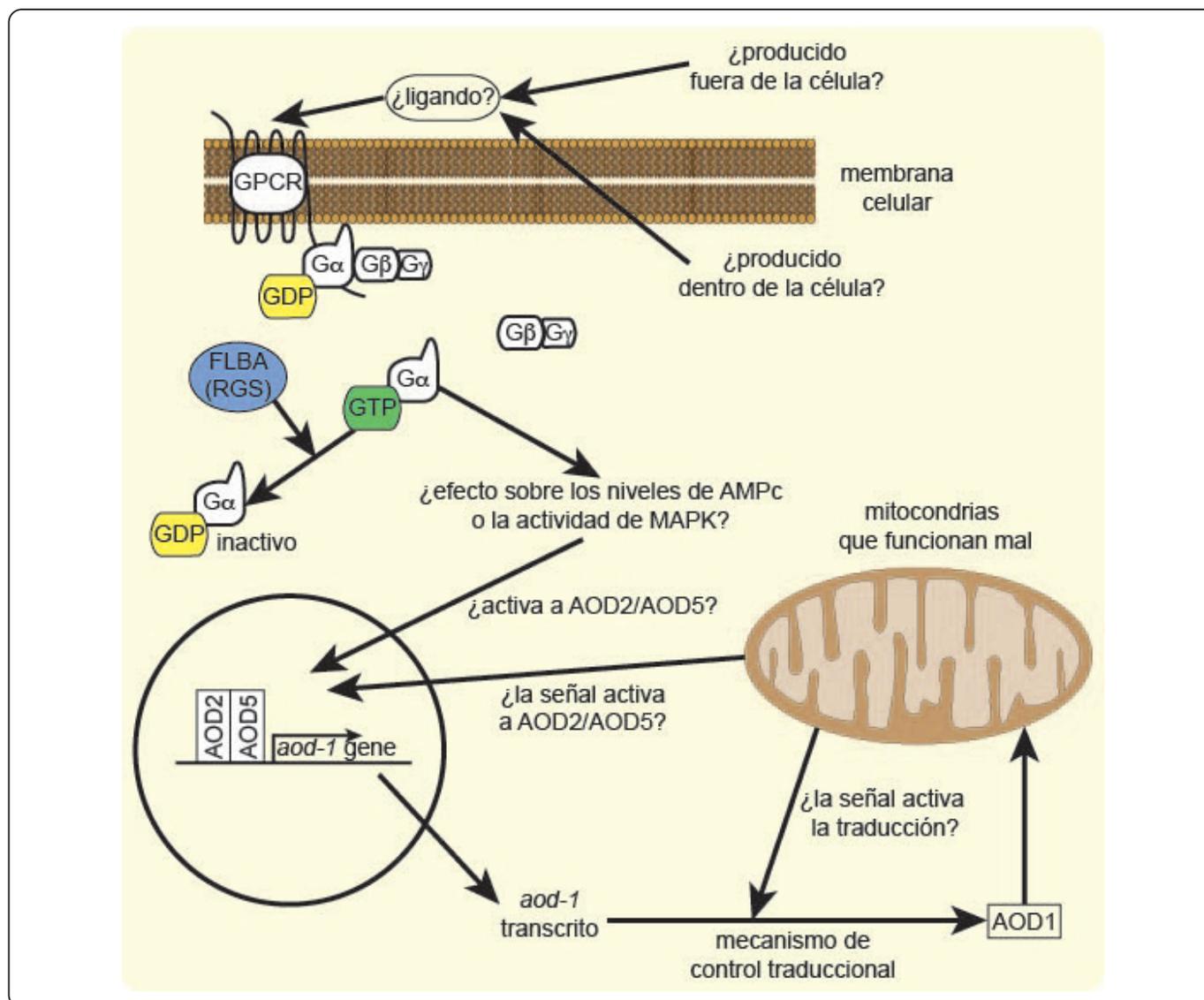


Figura 5. Modelo de la regulación de la expresión de la AOX en *N. crassa*. La proteína heterotrimérica $G\alpha\beta\gamma$ interactúa con el receptor de membrana GPCR. El GDP (amarillo) está unido a la subunidad $G\alpha$. Después de la unión de un ligando de origen desconocido, el GDP es intercambiado por GTP (verde), GTP- $G\alpha$ se disocia del receptor y de $G\beta\gamma$. En este estado activado GTP- $G\alpha$ actúa sobre un efector abajo, aunque se desconoce su blanco; posiblemente incremente la concentración del AMPc o la actividad de MAPK para activar los factores de transcripción AOD2/AOD5. En células cultivadas en condiciones de inducción, la actividad de GTP- $G\alpha$ podría tener un tiempo de vida corto, debido a que la proteína FLBA (azul) estimula la actividad de GTPasa de la $G\alpha$ y la regresa a su estado inactivo, unida al GDP. Sin embargo, en la mutante *flbA*, la actividad de GTP- $G\alpha$ persistiría por mucho más tiempo, activando la síntesis del RNAm de la AOX. Una señal independiente por un pobre funcionamiento mitocondrial podría activar directa o indirectamente la transcripción vía AOD2/AOD5. Otra señal, producida en condiciones de inducción, podría afectar la velocidad de la síntesis de la AOX1, la cual después es translocada al interior mitocondrial. Modificado de (Bosnjak *et al.*, 2019).

que tienen más de un gen para la AOX, en *U. maydis* y *M. grisea* hay un solo gen en el genoma; la proteína madura, sin la secuencia señal de localización mitocondrial, tiene una masa molecular de aproximadamente 40 kDa. Al igual que en otros hongos, la expresión de la AOX en *U. maydis* depende de la fase de crecimiento y de la fuente de carbono (Cárdenas-Monroy *et al.*, 2017). Las células cultivadas en presencia de glucosa expresan a

la AOX únicamente durante la fase estacionaria (cultivo líquido de 24 h), cuando la disponibilidad de nutrientes y oxígeno es baja. Otras fuentes de carbono (etanol y glicerol) inducen una menor expresión de la proteína en las dos fases de crecimiento, mientras que el lactato induce una mayor expresión durante la fase exponencial. La fuente de nitrógeno y el pH ácido no afectan la expresión de la proteína. La expresión de la AOX en

U. maydis se regula a nivel transcripcional (Cárdenas-Monroy et al., 2017), aunque no se descartan otros puntos de control, como el traduccional.

La expresión de la AOX en *M. grisea* también se dispara cuando el micelio llega o se aproxima a la fase estacionaria (Avila-Adame & Köller, 2002). La expresión diferencial de la AOX durante el crecimiento es frecuente en los hongos. Por ejemplo, en la fase exponencial, *Y. lipolytica* carece de la AOX, pero cuando las células se cosechan en la fase estacionaria, las levaduras presentan respiración resistente al cianuro (Medentsev & Akimenko, 1999). Sin embargo, a diferencia de la mayoría de los hongos en donde se ha propuesto que la AOX protege a las células contra las ROS (Neimanis et al., 2013; Xu et al., 2013) o el estrés osmótico (Petrovic, 2006) o el estrés por temperatura (Veiga et al., 2003), o que participa en la patogenicidad (Lin, Wu, Jamieson & Zhang, 2019), en *U. maydis* y en *M. grisea* la AOX no es esencial en ninguna de estas funciones. En *U. maydis*, la AOX no es esencial para el crecimiento vegetativo, el mantenimiento de la morfología celular típica, el crecimiento filamentosos, el proceso infeccioso en la planta de maíz y tampoco es esencial en la respuesta al estrés osmótico o por temperatura. Sin embargo, en presencia de inhibidores de la CTE como la antimicina A (Cárdenas-Monroy et al., 2017) o la azoxystrobin (Xu et al., 2013), la AOX permite el crecimiento celular. Estas dos excepciones a la regla general son importantes para una propuesta de la función de la AOX en la fisiología celular para cada microorganismo y en su ambiente natural.

CONCLUSIONES

La AOX es una metaloproteína adosada a la membrana interna mitocondrial que se encuentra en la mayoría de los hongos y plantas. Como resultado de los experimentos realizados en hongos y plantas, en condiciones que pueden ser extremas, como la presencia de 1 mM de cianuro, a la AOX se le han asignado diversos papeles. Sin embargo, es probable que su función específica esté relacionada con la especie, ya que hay microorganismos que en ausencia de esta enzima son más sensibles a diferentes tipos de estrés, mientras que en otros, la respuesta al estrés es independiente de la AOX. Estas discrepancias evidencian una brecha en la comprensión del papel fisiológico de la AOX para la gran mayoría de los hongos en su hábitat natural. Por lo tanto, es necesario profundizar en el estudio de la enzima para cada organismo. Finalmente, al no estar presente en los mamíferos, es un blanco terapéutico que puede ser utilizado para tratar enfermedades como la tripanosomiasis causada por *T. brucei*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Nacional Autónoma de México- Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación (PAPIIT-IA200321 e IV200519).

REFERENCIAS

- Albury, M. S., Elliott, C. & Moore, A. L. (2009). Towards a structural elucidation of the alternative oxidase in plants. *Physiologia Plantarum*, **137**(4), 316–327. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01270.x>
- Albury, M. S., Elliott, C. & Moore, A. L. (2010). Ubiquinol-binding site in the alternative oxidase: Mutagenesis reveals features important for substrate binding and inhibition. *Biochimica. Biophysica Acta*, **1797**(12), 1933–1939. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.013>
- Atteia, A., van Lis, R., van Hellemond, J. J., Tielens, A. G. M., Martin, W. & Henze, K. (2004). Identification of prokaryotic homologues indicates an endosymbiotic origin for the alternative oxidases of mitochondria (AOX) and chloroplasts (PTOX). *Gene*, **330**, 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.01.015>
- Avila-Adame, C. & Köller, W. (2002). Disruption of the alternative oxidase gene in *Magnaporthe grisea* and its impact on host infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, **15**(5), 493–500. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.5.493>
- Berthold, D. A., Andersson, M. E. & Nordlund, P. (2000). New insight into the structure and function of the alternative oxidase. *Biochimica. Biophysica Acta*, **1460**(2–3), 241–254. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(00\)00149-3](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(00)00149-3)
- Bosnjak, N., Smith, K. M., Asaria, I., Lahola-Chomiak, A., Kishore, N., Todd, A. T., Freitag, M. & Nargang, F. E. (2019). Involvement of a G Protein Regulatory Circuit in Alternative Oxidase Production in *Neurospora crassa*. *G3* (Bethesda, Md.), **9**(10), 3453–3465. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400522>
- Cárdenas-Monroy, C. A., Pohlmann, T., Piñón-Zárate, G., Matus-Ortega, G., Guerra, G., Feldbrügge, M. & Pardo, J. P. (2017). The mitochondrial alternative oxidase Aox1 is needed to cope with respiratory stress but dispensable for pathogenic development in *Ustilago maydis*. *PLOS ONE*, **12**(3), e0173389. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173389>
- Chae, M. S., Lin, C. C., Kessler, K. E., Nargang, C. E., Tanton, L. L., Hahn, L. B. & Nargang, F. E. (2007). Identification of an alternative oxidase induction motif in the promoter region of the aod-1 gene in *Neurospora crassa*. *Genetics*, **175**(4), 1597–1606. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.068635>
- Chaudhuri, M., Ott, R. D. & Hill, G. C. (2006). Trypanosome alternative oxidase: From molecule to function. *Trends in parasitology*, **22**(10), 484–491. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.08.007>
- Costa-de-Oliveira, S., Sampaio-Marques, B., Barbosa, M., Ricardo, E., Pina-Vaz, C., Ludovico, P. & Rodrigues, A. G. (2012). An alternative respiratory pathway on *Candida krusei*: Implications on susceptibility profile and oxidative stress. *FEMS Yeast Research*, **12**(4), 423–429. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2012.00789.x>

- Delano, W. (2004). Use of PyMOL as a communications tool for molecular science. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, Amer. Chemical Soc., 16th St, NW Washington, DC, **Volume 228**, p. U228–U230.
- Descheneau, A. T., Cleary, I. A. & Nargang, F. E. (2005). Genetic Evidence for a Regulatory Pathway Controlling Alternative Oxidase Production in *Neurospora crassa*. *Genetics*, **169(1)**, 123–135. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.034017>
- Dunn, A. K. (2018). Alternative Oxidase Activity Reduces Stress in *Vibrio fischeri* Cells Exposed to Nitric Oxide. *Journal of Bacteriologists*, **200(15)**, e00797-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00797-17>
- Ebiloma, G. U., Balogun, E. O., Cueto-Díaz, E. J., de Koning, H. P. & Dardonville, C. (2019). Alternative oxidase inhibitors: Mitochondrion-targeting as a strategy for new drugs against pathogenic parasites and fungi. *Medicinal Research Reviews*, **39(5)**, 1553–1602. DOI:10.1002/med.21560.
- García, J. J., Morales-Ríos, E., Cortés-Hernandez, P. & Rodríguez-Zavala, J. S. (2006). The inhibitor protein (IF1) promotes dimerization of the mitochondrial F1F0-ATP synthase. *Biochemistry*, **45(42)**, 12695–12703. <https://doi.org/10.1021/bi060339j>
- García-Neto, W., Cabrera-Orefice, A., Uribe-Carvajal, S., Kowaltowski, A. J. & Alberto Luévano-Martínez, L. (2017). High Osmolarity Environments Activate the Mitochondrial Alternative Oxidase in *Debaryomyces hansenii*. *PLOS One*, **12(1)**, e0169621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169621>
- Grahl, N., Dinamarco, T. M., Willger, S. D., Goldman, G. H. & Cramer, R. A. (2012). *Aspergillus fumigatus* mitochondrial electron transport chain mediates oxidative stress homeostasis, hypoxia responses and fungal pathogenesis. *Molecular Microbiology*, **84(2)**, 383–399. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08034.x>
- Kaye, Y., Huang, W., Clowez, S., Saroussi, S., Idoine, A., Sanz-Luque, E. & Grossman, A.R. (2019). The mitochondrial alternative oxidase from *Chlamydomonas reinhardtii* enables survival in high light. *The Journal of Biological Chemistry*, **294(4)**, 1380–1395. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004667>
- Grover, S. D. & Laties, G. G. (1981). Disulfiram inhibition of the alternative respiratory pathway in plant mitochondria. *Plant Physiology*, **68(2)**, 393–400. <https://doi.org/10.1104/pp.68.2.393>
- Johnson, K. L. (2019). Turning Up the Heat: The Alternative Oxidase Pathway Drives Thermogenesis in Cycad Cones. *Plant Physiology*, **180(2)**, 689–690. DOI:10.1104/pp.19.00443
- Juárez, O., Guerra, G., Martínez, F. & Pardo, J. P. (2004). The mitochondrial respiratory chain of *Ustilago maydis*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1658(3)**, 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.06.005>
- Laskowski, R. A. & Swindells, M. B. (2011, October 5). *LigPlot+ : Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery* (world) [Product-review]. ACS Publications; American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/ci200227u>
- Li, Q., Ritzel, R. G., McLean, L. L., McIntosh, L., Ko, T., Bertrand, H. & Nargang, F. E. (1996). Cloning and analysis of the alternative oxidase gene of *Neurospora crassa*. *Genetics*, **142(1)**, 129–140.
- Lin, Z., Wu, J., Jamieson, P. A. & Zhang, C. (2019). Alternative Oxidase Is Involved in the Pathogenicity, Development, and Oxygen Stress Response of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, **109(10)**, 1679–1688. <https://doi.org/10.1094/PHTO-01-19-0012-R>
- Martins, V. P., Dinamarco, T. M., Soriani, F. M., Tudella, V. G., Oliveira, S. C., Goldman, G. H., Curti, C. & Uyemura, S. A. (2011). Involvement of an alternative oxidase in oxidative stress and mycelium-to-yeast differentiation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryot Cell*, **10(2)**, 237–248. <https://doi.org/10.1128/EC.00194-10>
- McDonald, A. E., Vanlerberghe, G. C. & Staples, J. F. (2009). Alternative oxidase in animals: Unique characteristics and taxonomic distribution. *J. Exp. Biol.*, **212(Pt 16)**, 2627–2634. <https://doi.org/10.1242/jeb.032151>
- Medentsev, A. G. & Akimenko, V. K. (1999). Development and activation of cyanide-resistant respiration in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochemistry Biokhimiia*, **64(8)**, 945–951.
- Menzies, S.K., Tulloch, L.B., Florence, G. J. & Smith, T. K. (2018). The trypanosome alternative oxidase: a potential drug target? *Parasitology*, **145(2)**, 175–183. DOI: 10.1017/S0031182016002109.
- Moore, A. L., Shiba, T., Young, L., Harada, S., Kita, K. & Ito, K. (2013). Unraveling the heater: New insights into the structure of the alternative oxidase. *Annual Review of Plant Biology*, **64**, 637–663. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105432>
- Nargang, F. E., Adames, K., Rüb, C., Cheung, S., Easton, N., Nargang, C. E. & Chae, M. S. (2012). Identification of genes required for alternative oxidase production in the *Neurospora crassa* gene knockout library. *G3* (Bethesda, Md.), **2(11)**, 1345–1356. <https://doi.org/10.1534/g3.112.004218>
- Neimanis, K., Staples, J. F., Huner, N. P. & McDonald, A. E. (2013). Identification, expression, and taxonomic distribution of alternative oxidases in non-angiosperm plants. *Gene*, **526(2)**, 275–286. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.04.072>
- Ordog, S. H., Higgins, V. J. & Vanlerberghe, G. C. (2002). Mitochondrial Alternative Oxidase Is Not a Critical Component of Plant Viral Resistance But May Play a Role in the Hypersensitive Response. *Plant Physiology*, **129(4)**, 1858–1865. <https://doi.org/10.1104/pp.003855>
- Petrovic, U. (2006). Role of oxidative stress in the extremely salt-tolerant yeast *Hortaea werneckii*. *FEMS Yeast Research*, **6(5)**, 816–822. <https://doi.org/10.1111/j.1567->

- 1364.2006.00063.x
PyMOL | *pymol.org*. (n.d.). Retrieved March 14, 2022, from <https://pymol.org/2/>
- Qi, Z., Smith, K. M., Bredeweg, E. L., Bosnjak, N., Freitag, M. & Nargang, F. E. (2016). Alternative Oxidase Transcription Factors AOD2 and AOD5 of *Neurospora crassa* Control the Expression of Genes Involved in Energy Production and Metabolism. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, **7**(2), 449–466. <https://doi.org/10.1534/g3.116.035402>
- Romero-Aguilar, L., Cárdenas-Monroy, C., Garrido-Bazán, V., Aguirre, J., Guerra-Sánchez, G. & Pardo, J. P. (2020). On the use of n-octyl gallate and salicylhydroxamic acid to study the alternative oxidase role. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **694**, 108603. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108603>
- Saha, B., Borovskii, G. & Panda, S. K. (2016). Alternative oxidase and plant stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior*, **11**(12), e1256530. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1256530>
- Saisho, D., Nambara, E., Naito, S., Tsutsumi, N., Hirai, A. & Nakazono, M. (1997). Characterization of the gene family for alternative oxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, **35**(5), 585–596. <https://doi.org/10.1023/A:1005818507743>
- Shiba, T., Kido, Y., Sakamoto, K., Inaoka, D. K., Tsuge, C., Tatsumi, R., Takahashi, G., Balogun, E. O., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Saimoto, H., Moore, A. L., Harada, S. & Kita, K. (2013). Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**(12), 4580–4585. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218386110>
- Siedow, J. N. (2013). ATP Synthesis: Mitochondrial Cyanide-Resistant Terminal Oxidases. In W. J. Lennarz & M. D. Lane (Eds.), *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)* (pp. 145–148). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00285-1>
- Tian, F., Lee, S. Y., Woo, S. Y. & Chun, H. S. (2020). Alternative Oxidase: A Potential Target for Controlling Aflatoxin Contamination and Propagation of *Aspergillus flavus*. *Frontiers in Microbiology*, **11**, 419. DOI:10.3389/fmicb.2020.00419
- Veiga, A., Arrabaca, J. D. & Loureiro-Dias, M. C. (2000). Cyanide-resistant respiration is frequent, but confined to yeasts incapable of aerobic fermentation. *FEMS Microbiology Letters*, **190**(1), 93–97. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09268.x>
- Veiga, A., Arrabaca, J. D. & Loureiro-Dias, M. C. (2003a). Stress situations induce cyanide-resistant respiration in spoilage yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, **95**(2), 364–371. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01992.x>
- Veiga, A., Arrabaca, J. D., Sansonetty, F., Ludovico, P., Corte-Real, M. & Loureiro-Dias, M. C. (2003). Energy conversion coupled to cyanide-resistant respiration in the yeasts *Pichia membranifaciens* and *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, **3**(2), 141–148. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00189-7](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00189-7)
- West, R. A., Cunningham, T., Pennicott, L. E., Rao, S. P. S. & Ward, S. E. (2018). Toward More Drug Like Inhibitors of Trypanosome Alternative Oxidase. *ACS Infectious Diseases*, **4**(4), 592–604. <https://doi.org/10.1021/acscinfecdis.7b00218>
- Xu, T., Wang, Y.-T., Liang, W.-S., Yao, F., Li, Y.-H., Li, D.-R., Wang, H. & Wang, Z.-Y. (2013). Involvement of alternative oxidase in the regulation of sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* to the fungicides azoxystrobin and procymidone. *Journal of Microbiology*, **51**(3), 352–358. <https://doi.org/10.1007/s12275-013-2534-x>
- Yan, L., Li, M., Cao, Y., Gao, P., Cao, Y., Wang, Y. & Jiang, Y. (2009). The alternative oxidase of *Candida albicans* causes reduced fluconazole susceptibility. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **64**(4), 764–773. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp273>
- Zhu, Y., Lu, J., Wang, J., Chen, F., Leng, F. & Li, H. (2011). Regulation of thermogenesis in plants: The interaction of alternative oxidase and plant uncoupling mitochondrial protein. *Journal of Integrative Plant Biology*, **53**(1), 7–13.