



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

**INFLUENCIA DE LA LIPOPEROXIDACIÓN SOBRE LA  
FASE FINAL DEL METABOLISMO ENERGÉTICO  
MITOCONDRIAL DE *Saccharomyces cerevisiae***

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA:

**Q.F.B. MARIA MIRELLA ESTRADA VILLAGÓMEZ**

ASESOR: D.C. ALFREDO SAAVEDRA MOLINA

CO-ASESOR: D.C. CHRISTIAN CORTÉS ROJO

MORELIA, MICHOACÁN., NOVIEMBRE DE 2010.



## *Dedicatoria*

*A Dios, por darme la dicha de llegar a cumplir una meta más en mi vida.*

*A mis padres, Leonel y Araceli, por ser la fuente de inspiración en mi vida y por acompañarme como siempre durante este recorrido, aunque sé que a veces no es nada fácil. Gracias por creer en mí. ¡Los amo con todo mi corazón!*

*A mis hermanos, Laura y Omar, por su amor y apoyo incondicional durante todo este tiempo.*

*A mis angelitos Zeltzin y David por alegrar mi existencia, ser la luz de mi vida y por ser mi alegría al final del día.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al **D.C. Alfredo Saavedra Molina**, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y su siempre incondicional apoyo para poder cumplir con este proyecto.

Al **D.C. Christian Cortes Rojo**, por estar siempre presente, por la asesoría y por compartir conmigo sus conocimientos durante este proyecto.

A los miembros del comité tutorial: **D.C. Alfredo Saavedra Molina, D.C. Christian Cortés Rojo, D.C. Daniel Godínez Hernández, D.C. Salvador Manzo Avalos, Gustavo Santoyo Pizano, D.C. Ernesto García Pineda** por las aportaciones y asesoría durante todo el tiempo en que se realizó este trabajo.

Un agradecimiento especial a la **Q.F.B. Norma S. Sánchez, D.C. Martha Calahorra y el D.C. Antonio Peña** del **Departamento de Genética Molecular en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma de México** por la asesoría, las facilidades prestadas y el apoyo para la realización de experimentos fundamentales en este trabajo, gracias por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo durante mi pequeña estancia en su laboratorio; así como al **D.C. Ricardo Mejía Zepeda de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores-Iztacala de la Universidad Autónoma de México**, por el apoyo brindado para la realización de una parte importante de este trabajo.

A la **D.C. Elizabeth Calderón Cortes**, por el invaluable apoyo brindado durante todos esos momentos de estrés y aprendizaje, pero sobre todo por su amistad durante todos estos años.

A la **Q.F.B. Mónica Clemente Guerrero** por el apoyo brindado para la realización del trabajo y los buenos momentos compartidos en el laboratorio.

Al **D.C. Jesús Campos García, M.C. Alma L. Díaz Pérez, D.C. José López Bucio, D.C. Alfonso Méndez Bravo, M.C. Randy Ortiz Castro, D.C. Alfonso Méndez Bravo, M.C. Alberto Flores García, el D.C. Homero Reyes de la Cruz y al D.C. Carlos Cervantes Vega** por las facilidades técnicas para la realización de este proyecto.

A mis compañeros del laboratorio de Bioquímica y del I.I.Q.B: **Ruth, Ana, Lorena, Roxana, Maricela, Amira, Luis Octavio, Iván, Antonio de Jesús, Omar, Viridiana, Alberto, Mauricio, Areli y Cesar** por haber formado un maravilloso grupo de trabajo, por los momentos de alegría y dicha que compartimos.

A mis amigos de la maestría: **Maurino, Ramón, René, Ana, Rosa Maria, Teresa, Xóchitl, César, Morayna, Julio, Rocío, Javier y Luis José**, por su amistad y por los momentos recorridos durante este camino.

A **Paty, Mary, Alma, Rubí, Cristina y Selene** por ser mis amigas, su apoyo, comprensión y por formar parte de mi vida y a **Martha**, porque aun después de tantos años sigues brindándome tu amistad sincera.

A mi boddy **Brisia, Mónica, Claudia y Luis Felipe** por su lealtad, por sus buenos deseos siempre, por impulsarme a crecer cada vez más y por compartir con ustedes las mejores experiencias de mi vida.

Al **Q.F.B. Gerardo Moran López y a su familia** por su amistad y buenos consejos, durante tantos años.

A la **D.C. Rosa Elva Norma del Rio Torres** por el apoyo y entusiasmo brindado para culminar este proyecto.

A la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo** y en particular al **Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas** por mi formación académica.

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1. Metabolismo energético.....	3
1.2. La mitocondria.....	4
1.3. La fosforilación oxidativa y la F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPasa.....	5
1.4. La mitocondria y su relación con el estrés oxidativo.....	10
1.5. Los lípidos como componentes de las membranas celulares y su relación con la lipoperoxidación.....	12
1.6. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo biológico de estudio.....	15
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	17
<b>3. OBJETIVO</b>	
3.1. Objetivo general.....	17
3.2. Objetivos específicos.....	17
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
4.1. Materiales.....	18
4.2. Cultivo de <i>S. cerevisiae</i> y aislamiento de esferoplastos y mitocondrias.....	18
4.3. Manipulación de la composición de ácidos grasos en <i>S. cerevisiae</i> .....	20
4.4. Extracción y análisis de lípidos.....	20
4.5. Obtención de células petite.....	21
4.6. Inducción de estrés oxidativo.....	21
4.7. Determinación de los niveles de lipoperoxidación.....	22
4.8. Eflujo de K <sup>+</sup> y bombeo de H <sup>+</sup> .....	23
4.9. Actividad de la ATPasa mitocondrial.....	23
4.10. Determinación <i>in situ</i> del potencial de membrana mitocondrial.....	24
4.11. Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata.....	24
4.12. Determinación del $\Delta\Psi$ de mitocondrias de rata.....	25
4.13. Procesamiento estadístico.....	25
<b>5. RESULTADOS</b>	
5.1. Composición de ácidos grasos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	26

5.2.	Influencia de la composición de ácidos grasos sobre la lipoperoxidación inducida por Fe <sup>2+</sup> .....	29
5.3.	Influencia de la lipoperoxidación sobre el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ).....	32
5.4.	Influencia de la lipoperoxidación sobre algunas funciones celulares dependientes de ATP.....	36
5.5.	Papel de la lipoperoxidación en la inhibición de la actividad de la F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPasa por Fe <sup>2+</sup> .....	39
5.6.	Papel de la lipoperoxidación en la inhibición del $\Delta\Psi$ mit inducido por Fe <sup>2+</sup> en mitocondrias de hígado de rata.....	42
6.	<b>DISCUSIÓN</b> .....	46
7.	<b>CONCLUSIÓN</b> .....	54
8.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	55

## **RESUMEN**

La mitocondria es el principal sitio de síntesis de ATP mediante el acoplamiento del transporte de electrones y el bombeo de protones por la cadena transportadora de electrones (CTE) para generar la fuerza protomotriz, la cual impulsa la síntesis de ATP por la ATP sintasa. Las ERO generadas durante este proceso o las producidas por las fuentes extramitocondriales, pueden oxidar principalmente a los lípidos de membrana mitocondrial (lipoperoxidación) y provocar un daño en la CTE que incrementa la formación de ERO. Estudios recientes han demostrado que la disminución en el grado de insaturación de los lípidos de membrana reduce la susceptibilidad de la CTE al estrés oxidativo al disminuir el daño sobre la membrana mitocondrial. En relación a lo anterior, el incremento en la resistencia de los lípidos membranales a la peroxidación podría también proteger de los efectos dañinos del estrés oxidativo a otras funciones mitocondriales involucradas en la fase final del metabolismo energético mitocondrial tales como, el establecimiento del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_{mit}$ ) y el funcionamiento de la ATPasa  $F_1F_0$ , dando como resultado una mejor preservación de funciones celulares dependientes de ATP. Para comprobar esta hipótesis, en el presente estudio se evaluó la contribución de la lipoperoxidación en la disminución del potencial de membrana mitocondrial, en el daño sobre la actividad de la ATPasa mitocondrial y en dos funciones dependientes de ATP como lo son la expulsión de  $K^+$  y  $H^+$ . Para demostrar esta hipótesis se utilizó como modelo de estudio a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, debido a que la composición nativa de sus ácidos grasos de membrana consiste de ácidos grasos resistentes a la lipoperoxidación y a que dicha composición puede ser manipulada mediante la adición de ácidos grasos susceptibles a este proceso. En células nativas (-C18:3) se observó una mayor resistencia del  $\Delta\Psi_{mit}$  y de la actividad de la ATPasa mitocondrial a los efectos oxidantes del ion  $Fe^{2+}$ , y una preservación del flujo de  $K^+$  de membrana citosólica y de la expulsión de  $H^+$  a concentraciones en el rango micromolar bajo de  $Fe^{2+}$ . En contraste, el  $\Delta\Psi_{mit}$  y la actividad ATPasa de células con ácido linolénico (+C18:3) fueron más susceptibles al tratamiento

con  $\text{Fe}^{2+}$ , mientras que en este tipo de células la expulsión de  $\text{H}^+$  y el transporte de  $\text{K}^+$  se vieron afectados bajo condiciones basales debido posiblemente a cambios en la fluidez de la membrana que comprometieron dichas actividades. En conjunto estos resultados comprueban la hipótesis de que la resistencia a la lipoperoxidación protege la fase final del metabolismo energético mitocondrial del estrés oxidativo.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Metabolismo energético.**

Los organismos obtienen su energía a partir de la oxidación de compuestos orgánicos (proteínas, grasas y carbohidratos), los cuales se transforman a moléculas más pequeñas en un proceso conocido como metabolismo intermedio, el cual es el conjunto de reacciones bioquímicas acopladas para la obtención de energía para realizar trabajo mecánico, el transporte activo de moléculas contra un gradiente de concentración y la biosíntesis de moléculas complejas. Las moléculas dentro de la célula se degradan a acetilCoA y una pequeña cantidad de ATP y NADH durante la glucólisis, mientras que las moléculas de acetil-CoA se metabolizan en las mitocondrias y los NADH se oxidan en la cadena de transporte de electrones (CTE) para proporcionar energía metabólica para la síntesis de ATP (Voet y Voet, 2006).

El ATP es el intermediario de alta energía que constituye la principal moneda de energía celular. El ATP consta de una porción adenosina, al que se encuentran unidos secuencialmente tres grupos fosforilo ( $-PO_3^{2-}$ ), mediante un enlace fosfodiéster, seguidos de dos enlaces fosfoanhídrido. El adenosina difosfato (ADP) y el 5'-adenosina monofosfato (AMP) tienen una estructura similar pero presentan solo dos y una unidad fosforilo, respectivamente (Melo y Cuamatzi, 2006). La hidrólisis del ATP en condiciones fisiológicas tiene un valor de  $\Delta G$  aproximadamente igual a  $-50 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , (Voet y Voet, 2006). Casi cualquier trabajo celular depende de la disponibilidad del ATP, como por ejemplo la síntesis de péptidos (Toshinobu y Kuniki, 2010), el movimiento flagelar en organismos unicelulares (Christen *et al.*, 1987), la contracción muscular en organismos pluricelulares (Regnier *et al.*, 1998), el movimiento de los cromosomas durante la mitosis (Cande y Wolniak, 1978) y el transporte de iones a través de las membranas celulares a través de sus transportadores (Peña *et al.*, 1972; Peña, 1975).

## **1.2. La mitocondria.**

Las mitocondrias son pequeños orgánulos de alrededor de 1µm de longitud y aproximadamente 0.5µm de diámetro que varían de manera considerable en tamaño y forma, dependiendo de su origen y de su estado metabólico. La mitocondria está constituida por una membrana externa lisa y una membrana interna con pliegues, las cuales delimitan el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial. La membrana externa es bastante permeable debido a la presencia de las porinas, las cuales son proteínas que forman poros no específicos que permiten la difusión libre de moléculas de hasta 10 kDa y contiene los receptores de las proteínas de importación (Vazquez y Tuena, 2002).

La membrana interna contiene aproximadamente 75 % en peso de proteínas y es considerablemente más rica en proteínas que la membrana externa. Es permeable al O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y completamente impermeable a la mayoría de los iones y presenta una gran variedad de invaginaciones que forman las crestas mitocondriales, en donde se encuentran alojados los complejos proteicos que participan en la fosforilación oxidativa y proteínas de transporte que controlan el paso de metabolitos como ATP, ADP, Ca<sup>2+</sup>, piruvato y fosfato (Voet y Voet, 2006). Por su parte, la matriz mitocondrial es un espacio que contiene una gran cantidad de enzimas solubles que participan en fenómenos metabólicos de gran importancia tales como el ciclo de Krebs y la oxidación de ácidos grasos (Lehninger y Kennedy, 1948) y enzimas implicadas en la biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos (Guerin, 1989), alguna enzimas de defensa como la superóxido dismutasa (van Loot *et al.*, 1986) o las del sistemas de tiorredoxina (Pedrajas *et al.*, 1999). En la matriz mitocondrial también se encuentra el ADN mitocondrial (ADNmt) y la maquinaria necesaria para la replicación, transcripción y la síntesis de proteínas (Vazquez y Tuena, 2002).

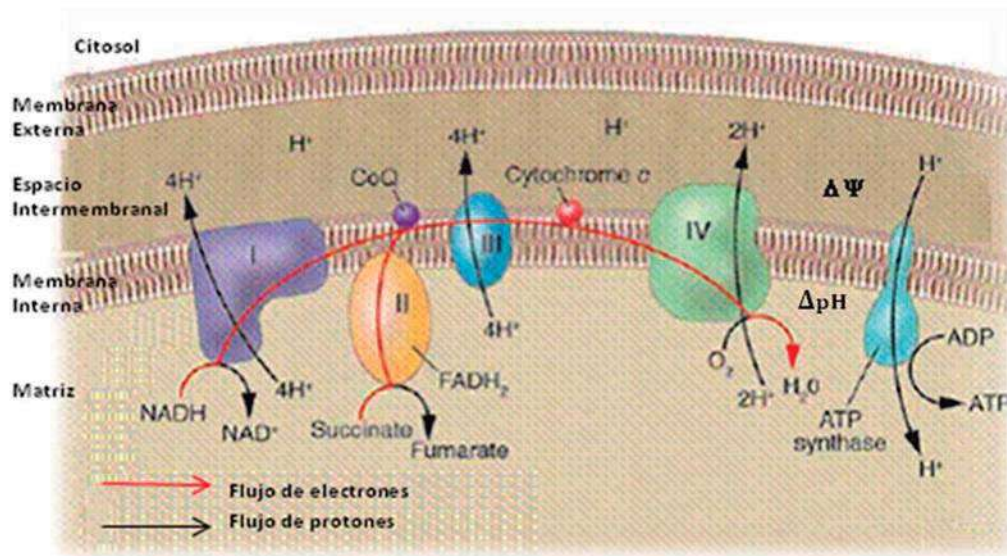
En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* alrededor del 12% del volumen total de la célula está ocupado por mitocondrias y su número sufre extensas modificaciones dependiendo de los cambios

en los ciclos de vida y del estado fisiológico. Ejemplo de ello son las levaduras, creciendo de manera aerobia en altas concentraciones de azúcar; bajo estas condiciones las mitocondrias representan únicamente del 3-4% del volumen celular, en tanto que sus crestas son raras y posicionadas de manera irregular [Guérin, 1989].

### **1.3. La fosforilación oxidativa y la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa.**

La cadena transportadora de electrones está compuesta de cuatro complejos proteicos (tres en *S. cerevisiae*; Bruinenberg *et al.*, 1985; van Dijken y Scheffers, 1986) alojados en la membrana interna mitocondrial. Contiene además ubiquinona (Q) y citocromo *c*, las cuales son moléculas acarreadoras de electrones ubicadas en la membrana interna y el espacio intermembranal, respectivamente.

Los complejos I (NADH:ubiquinona oxidorreductasa) y complejos II (succinato:ubiquinona oxidorreductasa) catalizan la transferencia de electrones a la ubiquinona (Q) a partir de donadores electrónicos diferentes, el NADH y el FADH<sub>2</sub> respectivamente. El complejo III (ubiquinol:citocromo *c* oxidorreductasa) transporta los electrones desde el ubiquinol al citocromo *c*. El complejo IV (citocromo *c* oxidasa) oxida al citocromo *c* y transfiere los electrones al oxígeno, el cual funciona como aceptor final de electrones en la cadena (Witting y Schägger, 2009). El transporte de electrones está acoplado a la translocación de H<sup>+</sup> de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal por los complejos I, III y IV, lo que da lugar a la generación de una fuerza protón motriz ( $\Delta p$ ), que consta del potencial de membrana eléctrico ( $\Delta\Psi$ ) y del gradiente de pH ( $\Delta pH$ ) a través de la membrana interna mitocondrial. La  $\Delta p$  se utiliza para la síntesis de ATP por la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintasa (Saraste, 1999) (Esquema 1). El  $\Delta\Psi$  es necesario para el transporte iónico y el importe de proteínas (Legros *et al.*, 2002).



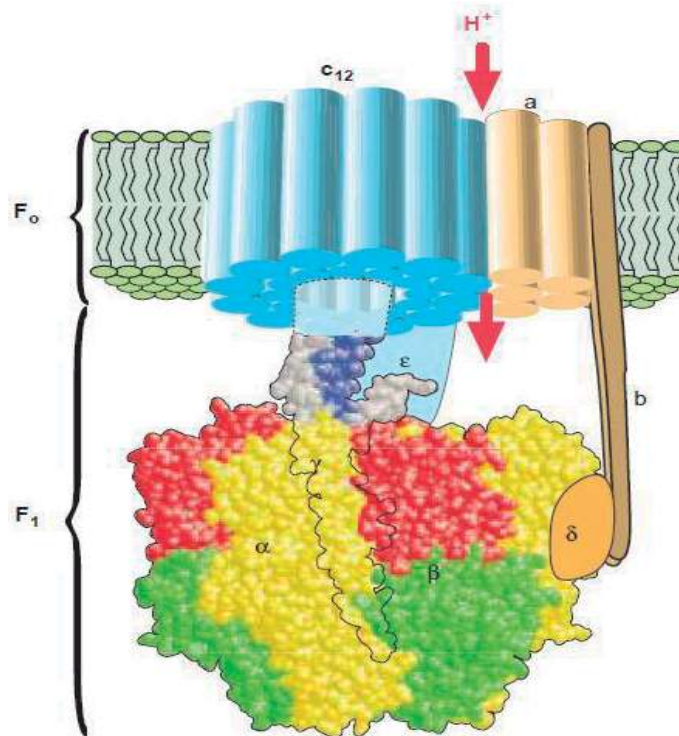
**Esquema 1. Componentes de la cadena transportadora de electrones.** NADH:ubiquinona oxidoreductasa (I), succinato:ubiquinona oxidoreductasa (II), ubiquinona:citocromo c oxidoreductasa (III), citocromo c oxidasa (IV), coenzima Q o ubiquinona (CoQ), citocromo c. El NADH y el succinato se oxidan en los complejos I y II, respectivamente; los electrones provenientes de estas oxidaciones se transportan hacia el oxígeno. El transporte de electrones se acopla a un bombeo de protones hacia el espacio intermembranal, el cual genera la fuerza protomotriz ( $\Delta P$ ) cuya energía se utiliza para la síntesis de ATP. Modificado de Nussbam, 2005.

*Saccharomyces cerevisiae* carece del complejo I, pero cuentan con dos deshidrogenasas NADH externas (Nde1p y Ned2p) y una NADH deshidrogenasa interna (Ndip) (Bunoust *et al.*, 2005). En los mamíferos, el NADH producido en el citosol puede ser utilizado en las mitocondrias únicamente por la lanzadera de aspartato-malato. En contraste, el NADH citosólico de la levadura es canalizado por la porina de la membrana externa mitocondrial hacia Nde1p y Ned2p, los cuales transfieren los electrones del NADH hacia la CTE. Por esta razón, estas enzimas han sido consideradas como el equivalente fisiológico de la lanzadera aspartato-malato de mitocondrias de mamíferos (Overkamp *et al.*, 2000). La Ndip oxida el NADH producido en la matriz mitocondrial en el ciclo de Krebs o por la alcohol deshidrogenasa mitocondrial; por esta razón se le considera la contraparte fisiológica del complejo I (De Vries y Marres, 1987).

El  $\Delta\Psi$  mantenido por la respiración se requiere para el importe de proteínas, la biogénesis mitocondrial y la viabilidad celular (Baker y Schatz, 1991). Sin embargo en levaduras y células humanas que carecen de ADNmit, el potencial de membrana se mantiene por la hidrólisis de ATP (Buchet y Godinot, 1998; Kominsky *et al.*, 2002).

La  $F_1F_0$ -ATPasa funciona como tal cuando el valor de  $\Delta p$  tiende a 0; esta enzima funciona en el sentido de síntesis de ATP una vez que se establece la  $\Delta p$ . Esta última condición ocurre *in vivo* debido a que el ATP es consumido continuamente por las reacciones dependientes de ATP y la  $\Delta p$  se mantiene continuamente gracias al funcionamiento de la CTE (Nicholls y Ferguson, 2002).

La  $F_1F_0$ -ATP sintasa está presente en la mayoría de los organismos procariontes y eucariontes (Sabbert *et al.*, 1997). La estructura de la enzima consta de dos segmentos funcional y estructuralmente diferentes: un segmento hidrofóbico ( $F_0$ ) y un segmento hidrofílico ( $F_1$ ) (Esquema 2). Los dos segmentos están mecánicamente unidos por un tallo central (rotor),  $c_n\epsilon\gamma$  (Shu *et al.*, 2010). La estructura cristalina de la  $F_1$  mitocondrial reveló una estructura hexagonal de las subunidades  $\alpha\beta$  (Abrahams *et al.*, 1994). La unidad  $F_0$  esta embebida en la membrana interna y convierte la  $\Delta P$  en rotación mecánica del “rotor”, por lo tanto causa un cambio conformacional de “corona”  $(\alpha\beta)_3$  en la  $F_1$  que conduce a la síntesis de ATP (Senior *et al.*, 2002). Existe una relación fundamental entre la velocidad de rotación, la concentración de sustrato y la  $\Delta P$ , de tal modo que para que la célula mantenga la concentración de ATP según los requerimientos de la célula, la ATP sintasa debe responder al aumento de ADP y fosfato ( $P_i$ ) intracelulares (Fillingame, 1997).



**Esquema 2. Esquema de la estructura de las fracciones  $F_1F_0$ .** La  $F_1F_0$ ATP sintasa mitocondrial convierte la energía eléctrica, en el canal de  $H^+$ , en energía mecánica en  $\gamma\epsilon$  que actúa como un resorte de torsión que con las hélices paralelas del dímero b unidas por la  $\delta$  y al canal de la a, constituyen un resorte en forma paralelogramo la bisagra del  $\beta$  y que hace la transformación a energía química formando el ATP. Imagen tomada de Oster y Hongyun, 1999.

Una descripción más detallada de la  $F_1F_0$  se describe a continuación:

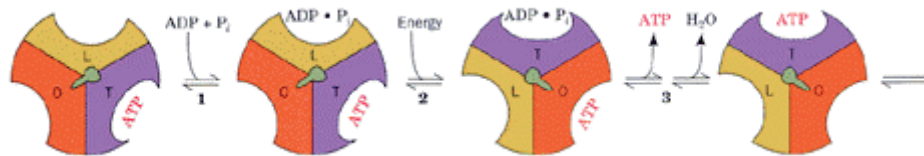
Las subunidades de  $F_1$  fueron llamadas en orden decreciente según el peso molecular ( $\alpha_3, \beta_3, \gamma, \delta, \epsilon$ ).

- Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , son homólogos una de la otra, mirando hacia la membrana y van alternadas alrededor del anillo y se arreglan como los gajos de una naranja alrededor de la subunidad  $\gamma$  (Esquema 2).
- La subunidad  $\gamma$  es la que ejerce la función rotatoria alrededor de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Noji, 1997) (Esquema 2).
- El  $Mg^{2+}$  se une con los nucleótidos de adenina en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ .

Las subunidades de  $F_0$  fueron llamadas en orden decreciente según el peso molecular (a, b, c, de, F6, A6L, f, g).

- Todas las subunidades forman parte del canal de  $H^+$  y en la unión con el segmento  $F_1$ .
- Además de tener un polipéptido llamado OSCP, que es sensible a oligomicina.
- La subunidad c tiene como función conducir los  $H^+$  a través de la membrana.

El mecanismo de cambio de unión propuesto por modelo Paul Boyer propone que la rotación es impulsada por el flujo de  $H^+$  a través de  $F_0$  y de esta forma las subunidades  $\beta$  presentan cambios secuenciales, ya que interactúan con el eje de rotación. Cada una de las tres subunidades  $\beta$  se encuentra en un estado diferente del ciclo catalítico en cualquier momento (Esquema 3) (Boyer et al, 1973; Boyer y Kohlbrenner, 1981).



**Esquema 3. Mecanismo de cambio de unión dependiente de energía para la síntesis de ATP por la ATP sintasa traslocadora de protones.** La subunidad  $F_1$ , presenta tres protómeros  $\alpha\beta$  que interactúan: O, conformación abierta, tiene poca afinidad por los ligandos; L tiene una unión laxa con los ligandos; T tiene una unión firme con los ligandos y actividad catalítica. La síntesis de ATP se produce en tres pasos. 1) Unión de ADP y  $P_i$  al sitio L. 2) Cambio conformacional dependiente de energía que convierte los sitios de unión L a T, T en O y O en L. 3) Síntesis de ATP en el sitio T y liberando el ATP del sitio O. Imagen tomada de Voet y Voet, 2006. (Según Cross, 1980).

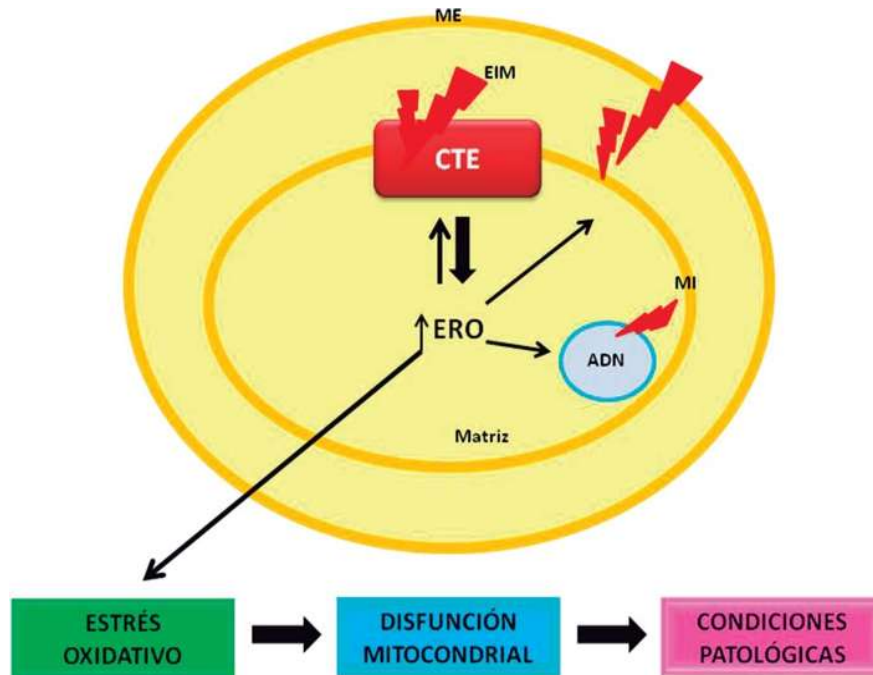
La síntesis e hidrólisis siguen la misma vía de reacción. El ATP es consumido si el rotor se mueve  $120^\circ C$  en contra de las manecillas del reloj; por el contrario, se sintetiza una molécula de ATP si se mueve  $120^\circ C$  en sentido a las manecillas del reloj. La hidrólisis catalizada por la  $F_1$  es también fisiológicamente importante ya que es esencial para varios procesos celulares vitales en

función del mantenimiento del  $\Delta\Psi$  a través de la membrana interna mitocondrial (Lefebvre *et al.*, 2003).

Por otro lado, la  $F_1F_0$ -ATP sintasa mitocondrial de la levadura es un complejo de al menos 17 subunidades (Velours y Arselin, 2000), de las cuales 5 se encuentran en la fracción  $F_1$ , mientras que el resto forma parte de la fracción  $F_0$ . Tres de las subunidades de  $F_0$  (Atp6, Atp8 y Atp9) son codificadas por el genoma mitocondrial (Contamine y Picard, 2000). En un estudio realizado por análisis proteómico se identificaron dos proteínas novedosas, la Sue y Sug, las cuales no son fundamentales para que lleve a cabo la actividad la enzima, sin embargo es necesaria para el ensamble de la enzima (Arnold *et al.* 1998; Paumard *et al.* 2002).

#### **1.4. La mitocondria y su relación con el estrés oxidativo.**

La mitocondria es un sitio importante de producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Debido a que algunos electrones pueden escapar de los sitios catalíticos de la CTE y reducir parcialmente al oxígeno dando lugar a la formación de ERO, como el radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) o el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) (Turrens, 2003). Diversos factores tales como la presencia de inhibidores (p. ej. Antimicina A) y desacoplantes (p.ej., carbonilcianuro triclorofenilhidrazona [CCCP]) de la CTE, un aumento en la concentración de metales de transición, defectos genéticos de las proteínas que constituyen la CTE, entre otros y generar una condición de estrés oxidativo resultado de un incremento en la producción de ERO en el cual existe daño celular, que llega a ser muy severo y conducir a la muerte celular (Halliwell, 1992) (Esquema 4).



**Esquema 4. Esquema representativo de la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondrial.** La sobreproducción de ERO puede conducir a un daño en las proteínas, el ADN y las membranas que afecta la capacidad de la mitocondria para sintetizar ATP y poder llevar a cabo sus funciones metabólicas, lo que puede contribuir en el desarrollo de algunas condiciones patológicas. ME: membrana externa; EIM: espacio intermembranal; MI: membrana interna; CTE: cadena transportadora de electrones; ERO: especies reactivas de oxígeno. Imagen modificada de Murphy, 2009.

El estudio de los mecanismos por lo que el estrés oxidativo causa disfunción mitocondrial se ha convertido en un importante tema de estudio, debido a que participa en una amplia variedad de desórdenes, como el daño hepático por el virus de la hepatitis B (Lee et al, 2004), el daño por isquemia reperusión (Lucas y Szwedra, 1998), el cáncer (Guo y Lemire, 2003), la diabetes (Green et al, 2004), enfermedades neurodegenerativas como enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson (Kwong et al., 2006; Sen et al., 2006), además que se ha relacionado con el envejecimiento (Beal, 1992; Diplock, 1994; Götz et al, 1994).

La mitocondria es una fuente de iones Fe y  $H_2O_2$  que pueden estimular el daño en los lípidos de las membranas mediante la generación del radical  $\bullet OH$  por la reacción de Fenton (Fenton, 1894;

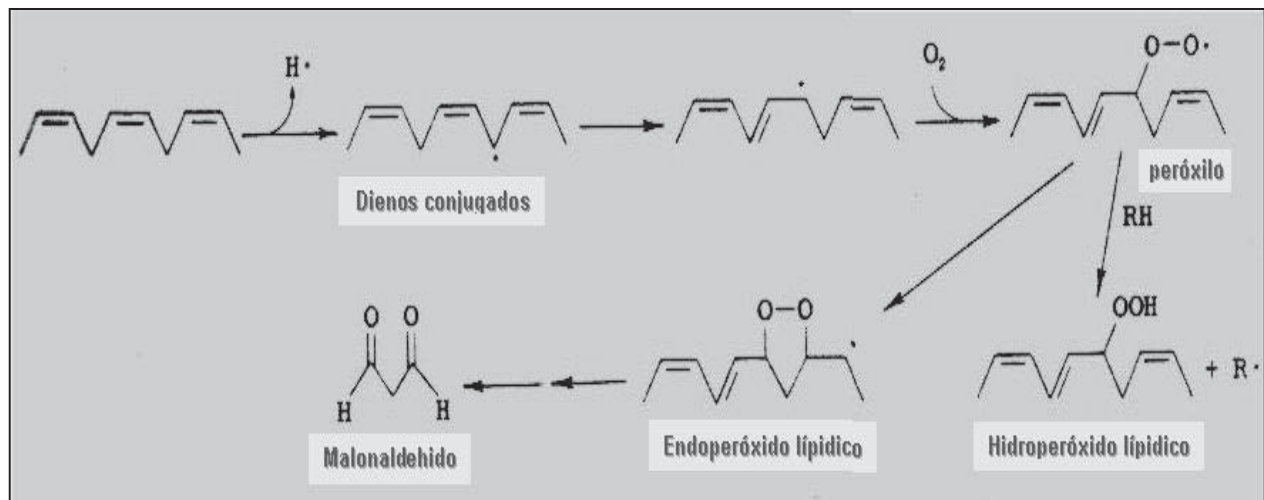
Fenton, 1899). Asimismo, el Fe en estado reducido ( $\text{Fe}^{2+}$ ), pueden dar lugar a la formación de un fuerte agente oxidante con características de radical  $\bullet\text{OH}$  (North *et al.*, 1992). La mitocondria es una fuente importante de Fe debido a que en este orgánulo se lleva a cabo casi la totalidad de la síntesis de los centros FeS y la incorporación de Fe en la protoporfirina IX, el cual es el paso final para la síntesis de grupos hemo (Kwok y Kosman, 2005).

### **1.5. Los lípidos como componentes de las membranas celulares y su relación con la lipoperoxidación**

Las membranas juegan un papel central dentro de la función y estructura de todas las células procariontes y eucariontes, están compuestas por una bicapa lipídica, compuesta por más de 200 diferentes especies de lípidos (Myher *et al.*, 1989) y cuya composición varía de acuerdo al tipo de célula y su función. Muchas de las funciones celulares y la actividad de las proteínas membranales son reguladas por cambios en la composición lipídica membranal (Spector y Yorek, 1985), lo que significa que los cambios en los lípidos de membrana pueden alterar la conformación, distribución y función de las proteínas membranales. Asimismo, se ha demostrado que es la introducción de un doble enlace a una cadena del ácido graso es el principal responsable de la fluidez de la membrana a temperaturas fisiológicas y la introducción de más dobles enlaces en la cadena del ácido graso tiene un efecto sobre la fluidez de membrana (Brenner, 1984).

Los lípidos poliinsaturados de las membranas son las más biomoléculas más susceptibles al daño por la mayoría de las ERO. El daño en los lípidos que forman parte de las membranas celulares altera su cohesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica (Yu, 1994; Bandyopadhyay *et al.* 1999). Los ácidos grasos poliinsaturados son los más sensibles al ataque por las ERO, mientras que los ácidos grasos saturados y monoinsaturados son esencialmente resistentes a la lipoperoxidación

(Holman, 1954). Por ejemplo, el ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6 n-3), un ácido graso omega-3 que tiene seis dobles enlaces, es extremadamente susceptible a la lipoperoxidación y es ocho veces más propenso a la lipoperoxidación que el ácido linoleico, que solo tiene dos enlaces dobles, mientras que el DHA es 320 veces más susceptible a la lipoperoxidación que el ácido oleico, un ácido graso monoinsaturado (Holman, 1954). En función de lo anterior, los lípidos insaturados de la membrana interna mitocondrial constituyen el principal blanco de la ERO generadas en los complejos de la CTE.



**Esquema 5. Reacciones del proceso de lipoperoxidación.** Tomado y modificado de Buege y Aust, 1978.

El proceso de lipoperoxidación (Esquema 5) comienza con la extracción de un átomo de hidrógeno de un carbono adyacente al doble enlace formando un radical lipídico (fase de iniciación). Los dobles enlaces sufren rearrreglos para formar dienos conjugados que reaccionarán con el oxígeno para formar un radical peróxido que es muy reactivo, el cual puede sustraer un átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado adyacente, iniciando una serie de reacciones en cadena (fase de propagación), ya sea para formar un hidroperóxido lipídico o un endoperóxido lipídico. Los hidroperóxidos y endoperóxidos se pueden fragmentar en una amplia gama de

reactivos intermediarios, como alcanos, alquenos, hidroxialcanos y malondialdehído (MDA) (Buege y Aust, 1978). Estos compuestos pueden causar un daño secundario a proteínas y al ADN (Halliwell y Gutteridge, 1989).

La lipoperoxidación inactiva a enzimas unidas a las membranas biológicas y disminuye la fluidez de las mismas (Rice-Evans y Burdon, 1994). De acuerdo con lo anterior, diversos estudios han identificado a la lipoperoxidación como la causa principal de disfunción mitocondrial durante el estrés oxidativo. Por ejemplo, la exposición de partículas submitocondriales de corazón de bovino (Forsmark-André *et al.*, 1997) o sinaptosomas de rata (Cardoso *et al.*, 1999) a un sistema de generación de  $\cdot\text{OH}$ , disminuyó las actividades de los complejos II, III y IV de la CTE y las concentraciones de Q y citocromos  $c+c_1$ ; estos efectos fueron asociados a un aumento en los niveles de lipoperoxidación. Asimismo, en mitocondrias de cerebro de rata tratadas con  $\text{Fe}^{2+}$ , el aumento en la lipoperoxidación provocó una disminución en el contenido de cardiolipina, un aumento en la proteínas carboniladas y una pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Sen *et al.*, 2006). La pérdida de cardiolipina ha sido correlacionada con una labilidad estructural de los complejos de la CTE y una deficiencia funcional del complejo III y IV (Pfeiffer, *et al.*, 2003). Asimismo, en un estudio realizado en mitocondrias de corazón de rata se encontró que la lipoperoxidación inhibe la respiración mitocondrial vinculada al NADH (Humphries y Szweda, 1998). En otro estudio, se demostró que la incorporación de C22:4 aumenta los niveles de lipoperoxidación y la producción de ERO en una línea inmortalizada de colonocitos de rata sujetos a un tratamiento con butirato (Ng *et al.*, 2005). Uno de los productos finales de la lipoperoxidación, el MDH se añadió exógenamente a mitocondrias de cerebro de rata y se observó una disminución de la actividad de los complejos I y II de la CTE y la actividad de la ATPsintasa mitocondrial (Long *et al.*, 2009).

En el caso del envejecimiento, se ha encontrado que las especies animales con mayores longevidades tienen un contenido de ácidos grasos con un nivel de insaturación menor que el de las

especies menos longevas. Asimismo, la generación mitocondrial de ERO es menor en la especies con mayor longevidad. Por lo tanto, se ha propuesto que un menor grado de insaturación lipídica podría disminuir la susceptibilidad a la lipoperoxidación y contribuiría a preservar la función mitocondrial (Pamplona *et al.*, 2000).

### **1.6. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico de estudio**

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo unicelular eucarionte que posee casi todas las estructuras subcelulares, incluyendo las mitocondrias, observadas en los organismos eucariontes más complejos (Whittaker y Danks 1982; Valentin *et al.*, 1987). Durante varios siglos, *S. cerevisiae* se ha utilizado en la producción de alimentos y bebidas alcohólicas. *S. cerevisiae* es un microorganismo aerobio facultativo que puede crecer bajo condiciones anaerobias con una fuente de carbono fermentable (Madigan *et al.*, 1999).

Los fosfolípidos mayoritarios encontrados en levadura con fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina (PE), y fosfatidilserina (PS). Además, las membranas mitocondriales contienen al fosfolípido complejo cardiolipina, el cual, es específico en este compartimiento (Contamine y Picard, 2000).

Una particularidad de *S. cerevisiae* es que es incapaz de sintetizar ácidos grasos poliinsaturados (Johnson y Brown, 1972), por lo tanto tiene una composición membranar de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, donde del 70-80% lo constituyen los ácidos monoinsaturados: ácido palmítico (C16:0) y ácido esteárico (C18:0). Los ácidos grasos monoinsaturados son sintetizados a partir de sus precursores acil-CoA por la desaturasa del retículo endoplásmico Ole1p, la cual introduce un doble enlace entre los carbonos 9 y 10 de la cadena hidrocarbonada de los

ácidos grasos saturados (Bossie y Martín, 1989). Además, *S. cerevisiae* puede importar del medio de cultivo una amplia variedad de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, lo cual produce cambios radicales en la composición de los grupos acilo de los lípidos de membrana al disminuir o inhibir la desaturasa Ole1p y el reemplazo de las especies monoinsaturadas nativas con los ácidos grasos suplementados en el medio de cultivo (Martín *et al.*, 2007).

En concordancia con lo anterior, en estudios llevados a cabo en esferoplastos de *S. cerevisiae* se encontró que el enriquecimiento de las membranas con ácido linolénico (C18:3) disminuye la resistencia de la respiración mitocondrial y la integridad celular hacia los efectos dañinos del estrés oxidativo, mientras que los ácidos grasos de la levadura nativa (los cuales contienen ácidos grasos saturados resistentes a la lipoperoxidación) aumentan la resistencia de dichos parámetros al daño oxidativo (Cortés-Rojo *et al.*, 2009c). En otro estudio realizado en mitocondrias de *S. cerevisiae* se demostró que la disminución en el grado de insaturación de los lípidos de membrana reduce la susceptibilidad de la CTE al estrés oxidativo al disminuir el daño sobre la membrana mitocondrial (Cortés-Rojo *et al.*, 2009b). Con base a todo lo anterior y en vista de que *S. cerevisiae* es resistente a la lipoperoxidación y la susceptibilidad a la lipoperoxidación puede aumentar al manipularse la composición de los ácidos grasos membranales, resulta *S. cerevisiae* un modelo ideal para dilucidar los efectos de la lipoperoxidación sobre la fase final del metabolismo energético mitocondrial por el estrés oxidativo.

## **2. HIPÓTESIS.**

La resistencia a la lipoperoxidación protege la fase final del metabolismo energético mitocondrial del estrés oxidativo.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar si una menor susceptibilidad a la lipoperoxidación protege la fase final del metabolismo energético mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* bajo condiciones de estrés oxidativo.

### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Aumentar la sensibilidad de *S. cerevisiae* hacia la lipoperoxidación.
2. Determinar el efecto de la lipoperoxidación sobre el establecimiento del potencial de membrana mitocondrial de *S. cerevisiae*.
3. Evaluar la influencia de la lipoperoxidación sobre algunas funciones dependientes de ATP.
4. Estudiar la sensibilidad de la actividad ATPasa mitocondrial a la lipoperoxidación.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Materiales**

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico, adquiridos de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO USA). La Zimoliasa 20T, fue adquirida de ICN Biomedicals. Inc (Aurora, OH. USA) y el sulfato ferroso 7-hidrato, de J.T. Baker. Todos los demás reactivos fueron de alta pureza.

### **4.2. Cultivo de *S. cerevisiae* y aislamiento de esferoplastos y mitocondrias**

Se utilizó la cepa industrial Yeast Foam de *Saccharomyces cerevisiae*. Se inoculó en 100 mL de medio YPD líquido (Extracto de levadura 1%, Peptona 2% y Dextrosa 2%) a una densidad óptica de 0.03 con una asada y se incubó a 28 °C con agitación orbital a 180 rpm. A las 24 h se re-sembró en medio YPD a una densidad óptica de 0.03 a 600 nm, y las células se cosecharon las 16 h.

Para el aislamiento de los esferoplastos (Guérin *et al.* 1979), las células se lavaron 3 veces con agua desionizada mediante centrifugación a 5000 rpm utilizando un rotor Beckman JA-10 de una centrifuga Beckman Coulter Avanti J-E. A continuación, las células se resuspendieron en agua a una proporción de 0.5 g mL<sup>-1</sup> y su peso seco se calculó mediante la relación: peso seco= peso húmedo/4. Posteriormente, las células se resuspendieron en medio SH (Tris 0.1 M, β-mercaptoetanol 0.5 M, pH 9.3 con NaOH) y se dejaron incubar a 32°C. Después de 15 min., las células se lavaron 3 veces por centrifugación a 5000 rpm con medio de lavado (KCl 0.5M, tris 10mM, pH 7 con HCl) y se resuspendieron en medio de digestión (sorbitol 1.35 M, EGTA 1 mM, fosfato disódico 30 mM, fosfato monosódico 30 mM, ácido cítrico 10 mM, pH 5.8). El volumen del medio de digestión fue de 10 ml por cada gramo de peso seco de levaduras. Para el rompimiento de la pared celular se agregó la enzima zimoliasa 20T (ICN Biomedicals Inc; Aurora, OH. USA) a razón de 10 mg por cada gr de peso seco. La formación de esferoplastos se evaluó midiendo la disminución de la DO a 600 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. La incubación

con la zimoliasa se detuvo en el momento en que la densidad óptica (DO) D.O. de una dilución de las células con agua 1:100 fue igual a la D.O. de una dilución 1:1000 determinada al inicio de la incubación. Con el fin de eliminar la actividad de la zimoliasa, los esferoplastos se lavaron 3 veces con buffer para protoplastos (sorbitol 0.75 M, manitol 0.4 M, Tris-maléico 10 mM, albúmina sérica de bovino 0.2%, pH 6.8) mediante centrifugación a 2500 rpm por 5 minutos utilizando el rotor JA-20 de una centrífuga Beckman Coulter Avanti J-E. Cada resuspensión se realizó con una varilla de teflón. Terminados los lavados, se resuspendió en buffer para esferoplastos (sorbitol 1M, NaCl 1.7mM, MgSO<sub>4</sub> 2mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, EGTA 0.5mM, albúmina sérica bovina 0.1%, pH 6.8) en un volumen aproximado de 5 ml.

Las obtener las mitocondrias, se centrifugaron los esferoplastos a 12000 rpm por 10 min, en un rotor JA-20 en una centrífuga Beckman Coulter Avanti J-E. Posteriormente, se lavó tres veces con medio de protoplastos (Sorbitol 0.75 M, manitol 0.4, tris-maleico 10 Mm, albumina sérica de bovino 0.2%, pH 6.8), centrifugando a 12000 rpm por 10 min en cada lavado. Cada resuspensión se realizó con verilla de teflón. Los esferoplastos se rompieron por un procedimiento mecánico. Se desecho el sobrenadante del último lavado y se resuspendió el precipitado en un vaso de Potter con un volumen de 30 mL de medio de homogenización (Manitol 0.6 M, tris-maleico 10 mM, EGTA 2 mM, albúmina sérica de bovino 0.2%, pH 6.8) por cada 2.5 g de peso seco de levaduras. Se homogenizó manualmente 20 veces con un vástago de teflón apretado, tratando de no hacer espuma. El homogenizado se centrifugó a 2500 rpm por 10 min. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 12000 rpm por 10 min.

El precipitado se resuspendió en medio de recuperación de mitocondrias (Manitol 0.6, tris-maleico 10 mM, EGTA 2 mM, pH 6.8), se homogenizó en un homogenizador de vidrio con vástago flojo, se centrifugó a 2500 rpm, se descartó la pastilla y el sobrenadante fue centrifugado a 12000 rpm. El precipitado obtenido fueron las mitocondrias aisladas, las cuales se resuspendieron en el

tubo de centrífuga sin agregar más medio de recuperación y una vez resuspendidas, se homogenizaron con el homogenizador Dounce. Por último, las mitocondrias se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

La concentración de proteína de esferoplastos y mitocondrias se determinó por el método de Biuret modificado (Gornall *et al.*, 1949) utilizando como estándar albúmina bovina sérica.

#### **4.3. Manipulación de la composición de ácidos grasos en *S. cerevisiae***

El contenido de ácidos grasos de la levadura fue modificado con el método de Bossie y Martin (1989), el cual consiste en la adición de 1 mM de ácido  $\alpha$ -linolénico (ácido cis,cis,cis-9,12,15 octadecatrienoico,  $\alpha$ -C18:3 9,12,15, pureza  $\geq 99\%$ , adquirido de Sigma Chemical) disuelto en 5% de Igepal CA-630 previo a la inoculación del medio YPD con *S. cerevisiae* como se describió anteriormente.

#### **4.4. Extracción y análisis de lípidos**

Los lípidos fueron extraídos por el método reportado por Bligh y Dyer (1959). Las células y las mitocondrias fueron resuspendidas en 1.5 ml de una mezcla cloroformo:metanol 1:2 (v/v). Esta mezcla fue homogenizada vigorosamente con un vástago de teflón. Después, se agregó 500  $\mu\text{L}$  de cloroformo y 500  $\mu\text{L}$  de agua y se agitó vigorosamente después de cada adición. Por último, se centrifugó durante 5 min a 3000 rpm, la fase orgánica se extrajo con una pipeta Pasteur y el cloroformo se evaporó con nitrógeno. Los metil ésteres de los ácidos grasos se prepararon mediante la combinación con trifluoruro de boro ( $\text{BF}_3$ ) al 14% en metanol durante 30 min a  $92^{\circ}\text{C}$  en baño de agua. A continuación, la muestra se enfrió a temperatura ambiente y los metil ésteres se

extrajeron por agitación vigorosa con dos volúmenes de n-hexano (Morrison y Smith (1964)). Después de la adición de un volumen de agua, se formó un sistema de dos fases que se centrifugó y se colectó la fase orgánica. Se evaporó el n-hexano bajo una corriente de nitrógeno y los ácidos grasos transesterificados se resuspendieron en 50 mL de n-hexano grado HPLC para su posterior análisis. Los metil ésteres se analizaron en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 500 controlado por computadora, equipado con un inyector capilar “split/splitless” y detector de ionización de llama. La separación se realizó en una columna capilar Omegawax (0.25 mm de diámetro interno) de 30 metros de longitud. Se utilizó nitrógeno de alta pureza como gas de acarreo. La composición de ácidos grasos y su concentración se determinaron por comparación de los tiempos de retención con estándares y la intensidad de los picos, respectivamente.

#### **4.5. Obtención de células petite**

Para obtener células de levadura carentes de mitocondrias funcionales (células petite), se realizó un precultivo en 100 ml de medio YPD con una asada y se incubó a 28°C con agitación a 180 rpm. A las 24 hrs. se resembró en 250 ml de medio YPD a una D.O. de 0.03 a 600 nm, se agregó 10 µg/ml de bromuro de etidio (Demasi *et al.*, 2001) y se dejó crecer el cultivo por 16 h. Las levaduras se cosecharon como se describió anteriormente.

#### **4.6. Inducción de estrés oxidativo**

Para establecer condiciones de estrés oxidativo, las levaduras, los esferoplastos o las mitocondrias (0.3 mg/ml) se incubaron en medio de fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 7.6 con NaOH) con Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a las concentraciones descritas en cada pie de figura de durante 30 minutos a una temperatura de 4°C. El hierro en estado reducido (Fe<sup>2+</sup>) puede estimular la formación de una

especie con características de radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) en suspensiones celulares con solución amortiguadora de fosfatos que es capaz de iniciar el proceso de lipoperoxidación y su propagación mediante la reacción del  $\text{Fe}^{2+}$  con los lipoperóxidos generados por la auto-oxidación de los radicales lipídicos para generar radicales alcoxilo (North *et al.*, 1992). El  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$  se agregó de una solución stock con una concentración de  $12.5 \mu\text{M}$  acidificada con 4 gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  para mantener al Fe en estado reducido. Para los experimentos de protección con un agente antilipoperoxidante, las células, esferoplastos o mitocondrias se incubaron con 5 mM del antioxidante hidrofóbico hidroxitolueno butilado (BHT) 15 min previo al tratamiento con el  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$ . Los controles fueron tratados de la misma manera excepto que se omitió la adición de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$ .

#### **4.7. Determinación de los niveles de lipoperoxidación**

Los niveles de peroxidación lipídica fueron determinados mediante una modificación del método del ácido tiobarbitúrico (TBA) reportada por Buege y Aust (1978). Los esferoplastos fueron tratados como se indicó anteriormente y se mezclaron con 2 ml de una solución ácida compuesta por ácido tricloroacético 15%, TBA 0.375% y HCl 0.25 N. Esta mezcla se calentó en baño de agua hirviendo durante 15 min, se enfrió en hielo y después se centrifugó a 7500 rpm por 15 min. Se extrajo el sobrenadante y se leyó su absorbencia a 532 nm en un espectrofotómetro UV/vis Perkin-Elmer Lambda 18 contra un blanco que contenía todos los reactivos excepto las muestras biológicas. Los resultados fueron expresados como nanomoles de sustancias reactivas al TBA (TBARS) producidas por mg de proteína y fueron calculados en base al coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de malondialdehído.

#### **4.8. Eflujo de K<sup>+</sup> y bombeo de H<sup>+</sup>**

La salida de K<sup>+</sup> de la célula y el bombeo de H<sup>+</sup> se midieron con electrodos específicos para cada ión. Las células (150 mg de peso húmedo) se trataron con Fe<sup>2+</sup> como se describió anteriormente y se suspendieron en medio MES-TEA (10 mM de ácido morfoetanol sulfónico, pH 6 con trietanolamina) en un volumen final de 10 mL con agitación constante. Las determinaciones se iniciaron con la adición de 20 mM de glucosa y se evaluaron los cambios en el pH del medio con respecto del tiempo. Para la determinación del flujo de K<sup>+</sup> y cambio en el pH extracelular se adicionó 20 mM de KCl y evaluaron los cambios en la concentración en el medio (Peña et al., 2009).

#### **4.9. Actividad de la ATPasa mitocondrial**

Las mitocondrias se incubaron durante 30 min con Fe<sup>2+</sup> en 1 mL de medio de reacción (20mM de Tris-HCl, 5mM de MgCl, pH 8.5). Después del tiempo de incubación, se añadió 2mM de ATP durante 30 min para estimular la actividad de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa. La reacción se detuvo con ácido tricloroacético (TCA) al 30% y SDS al 10% para tener un volumen final de 2 mL. Posteriormente, se determinó la concentración de fosfato inorgánico (Pi) liberado por la actividad ATPasa por el método de Fiske y Subbarow (1925). A todas las muestras, incluyendo los blancos, se les adicionó una solución de molibdato de amonio-sulfato y solución ELON (ácido *p*-metilaminofenolsulfonato) y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y se determinó la concentración de fosfato inorgánico de la mezcla a 660 nm en un espectrofotómetro UV/vis Perkin-Elmer Lambda 18 contra un blanco que contenía todos los reactivos excepto la proteína mitocondrial. Como control negativo se incubaron las mitocondrias con 0.05 mg/mL de oligomicina (Inhibidor de la ATPasa), para restar el valor obtenido a los tratamientos para descartar el Pi proveniente de otras fuentes. Los resultados fueron expresados como porcentaje de actividad de la ATPasa mitocondrial.

#### **4.10. Determinación *in situ* del potencial de membrana mitocondrial**

El potencial de membrana mitocondrial se evaluó bajo condiciones *in situ* mediante una modificación del método descrito por Peña *et al.*, (1984) siguiendo los cambios de fluorescencia de la cianina 3,3-dipropiltiocarbocianina, DisC<sub>3</sub>(3) en un espectrofluorómetro Shimadzu RF-5000U a una  $\lambda_{em}$  540 y una  $\lambda_{ex}$  590 nm con agitación constante. Las levaduras (25 mg de peso húmedo) se incubaron en un volumen de 2 mL de 10 mM de MES-TEA con Fe<sup>2+</sup> durante 30 min. Después del tiempo de incubación se añadió a la mezcla 1  $\mu$ M de cianina. Después de 10 segundos de iniciada la lectura, se añadió 20 mM de glucosa y a los 3 min se añadió 15  $\mu$ M de CCCP (carbonilcianuro-*p*-triclorofenilhidrazona) para abatir el potencial de membrana mitocondrial y por último, después de 1 min más se añadió 25 mM de KCl para abatir el potencial de membrana citoplásmico.

#### **4.11. Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata**

El aislamiento de mitocondrias se realizó de acuerdo al método modificado por Saavedra-Molina y Devlin (1997). Todo el procedimiento se realizó a 4°C. Se utilizaron ratas Wistar de aproximadamente 200 g. Se sacrificó la rata por decapitación, se extrajo el hígado y se fragmento en pedazos que se homogenizaron en un tubo de homogenización a 1500 rpm con un vástago de teflón. El homogenizado se centrifugó a 2500 rpm por 10 min en un rotor JA-20 de una centrifuga Beckman Coulter Avanti J-E. Se desechó el precipitado y el sobrenadante se centrifugó a 7500 rpm durante 10 min. Todo esto se realizó en medio de aislamiento con manitol 220 mM, sacarosa 70 mM, MOPS 2 mM y EGTA 1 mM, pH 7.4. Posteriormente, se resuspendió cuidadosamente el precipitado en el mismo medio pero sin EGTA y se centrifugó a 9000 rpm por 10 min. La concentración de proteína se determinó por el método modificado de Biuret (Gornall *et al.*, 1949) utilizando como estándar albúmina bovina sérica.

#### **4.12. Determinación del $\Delta\Psi$ de mitocondrias de rata**

El potencial de membrana mitocondrial se evaluó midiendo los cambios de fluorescencia de la safranina O (Colonnas *et al.*, 1973). Las mitocondrias se resuspendieron en un medio con Hepes 10 mM, KCl 100 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 mM y  $\text{MgCl}_2$  3mM, pH 7.4 con  $\text{Fe}^{2+}$  durante 30 min. Los cambios de la fluorescencia de la safranina se siguieron a una  $\lambda_{\text{em}}$  495 y una  $\lambda_{\text{ex}}$  586 nm en un espectrofluorómetro Shimadzu RF5000U. Después de 10 segundos de iniciada la lectura, se añadió 10 mM de succinato y a los 3 min se añadió 5  $\mu\text{M}$  de CCCP (carbonilcianuro-*p*-trichlorofenilhidrazona) para abatir el potencial de membrana mitocondrial.

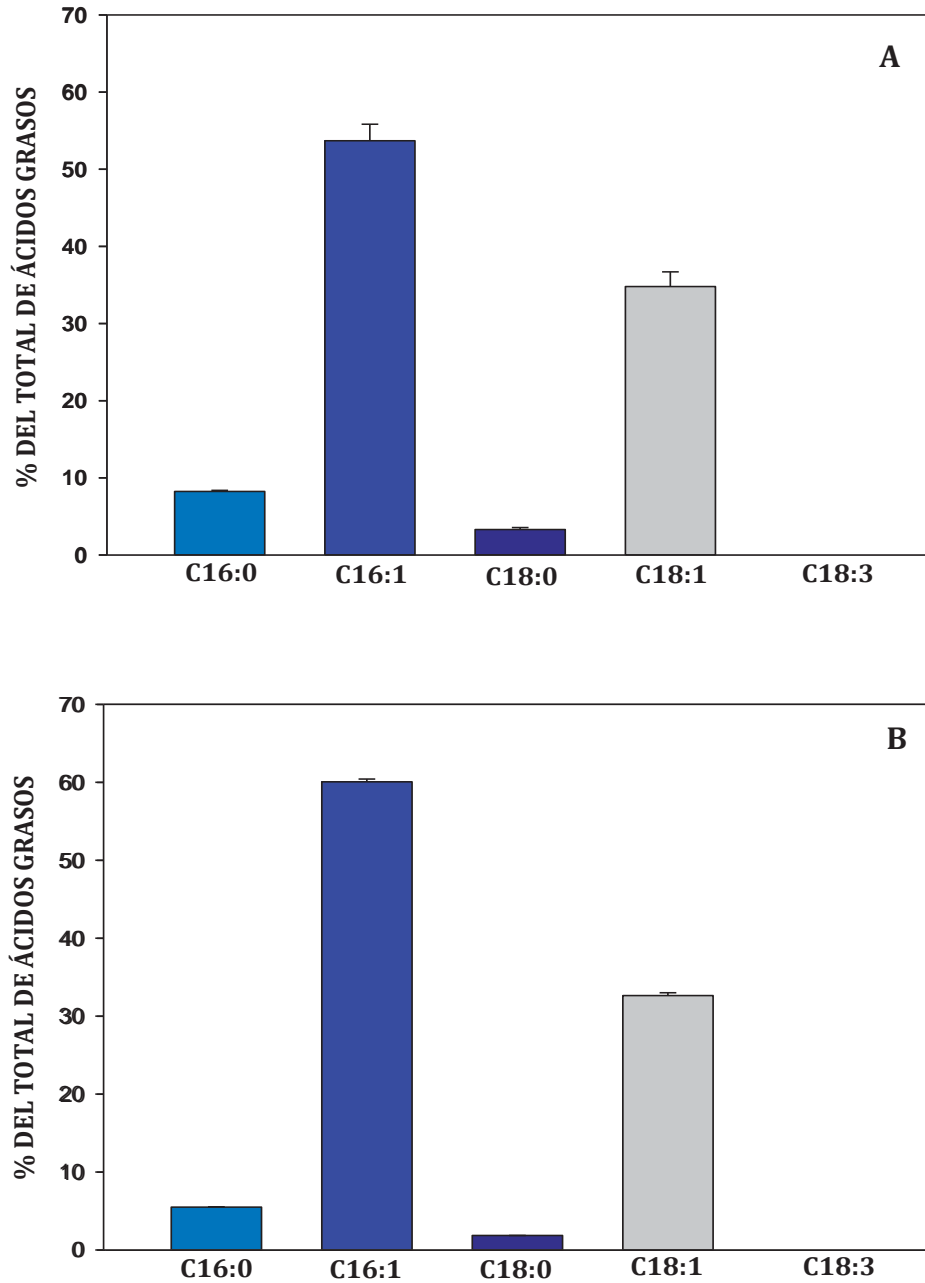
#### **4.13. Procesamiento estadístico**

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de al menos 3 experimentos. Los niveles de significancia ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.05$ ) se determinaron mediante la prueba *t* de Student con el programa Sigma Plot Versión 10 (SPSS Inc).

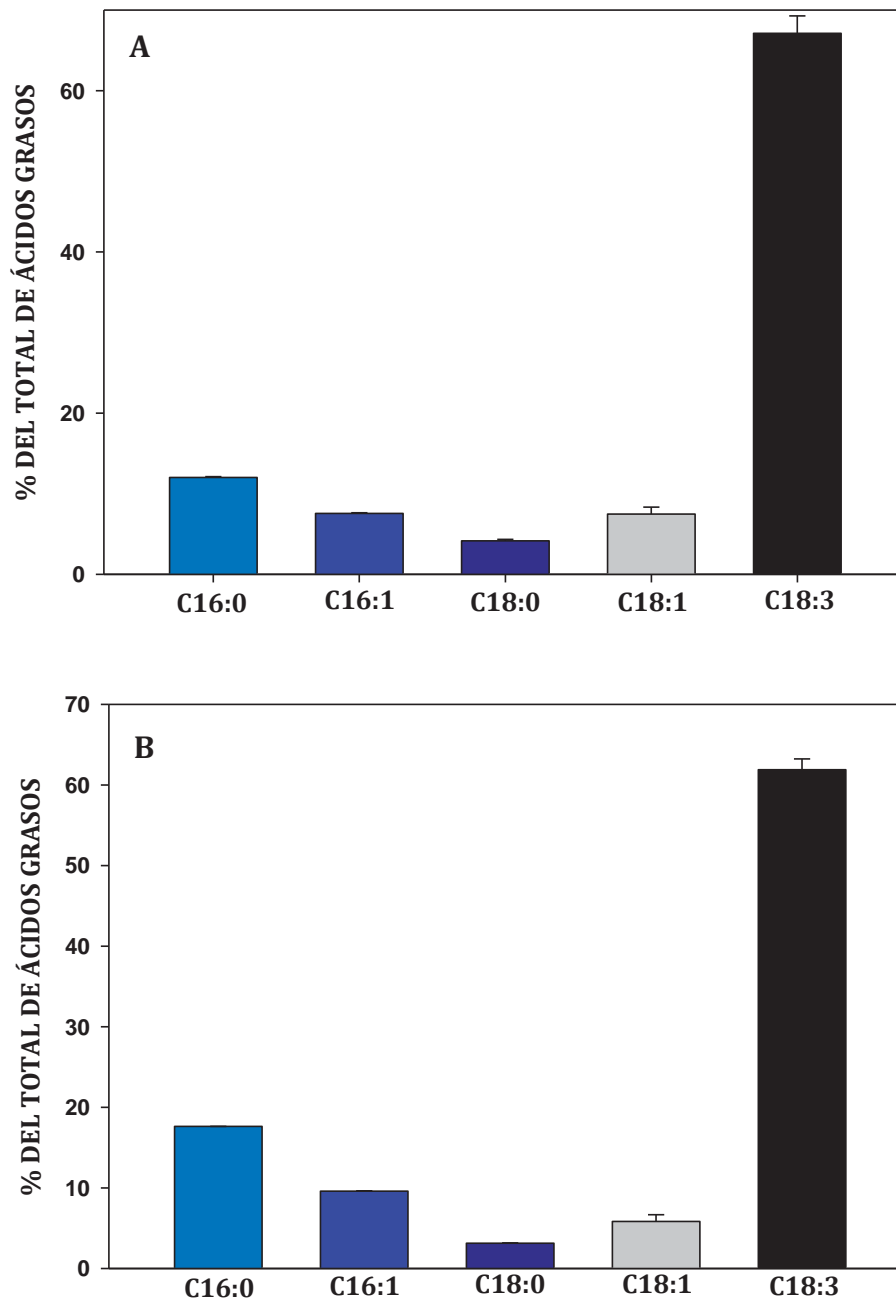
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Composición de ácidos grasos de *Saccharomyces cerevisiae*

Con el objetivo de conocer la composición de ácidos grasos de las células y las mitocondrias de *S. cerevisiae* y verificar la incorporación del ácido linolénico (C18:3), se analizaron la composición y la cantidad de ácidos grasos de células y mitocondrias por cromatografía de gases. La composición porcentual de los ácidos grasos de la levadura cultivada en ausencia de C18:3 (-C18:3) (Figura 1, panel A), consiste de un 8.2% de ácidos palmítico (C16:0), 3.3% de ácido esteárico (C18:0), 53.7% de ácido palmitoleico (C16:1) y 34.8% de ácido oleico (C18:1). La composición de mitocondrias aisladas de células -C18:3 (Figura 1, panel B) consiste de un 5.5% de C16:0, 1.8% de C18:0, 60.1% de C16:1 y 32.6% de C18:1. Por otro lado, se observó que la composición porcentual de ácidos grasos de las levaduras crecidas en presencia de 10 mM de ácido linolénico (+C18:3) (Figura 2, panel A) consiste de un 68% de C18:3 y en comparación con las levaduras -C18:3, se observó un aumento del 12.5% y 4.3% en los niveles de C16:0 y C18:0, respectivamente. Por el contrario, la cantidad de C16:1 y C18:1 disminuyó hasta 7.7% y 7.5%, respectivamente. La composición de mitocondrias +C18:3 (Figura 2, panel B) consistió mayoritariamente de C18:3 (63%). En comparación con las levaduras -C18:3, la cantidad de C16:0 y C18:0 en levaduras +C18:3 aumento 17.6% y 3.5%, respectivamente. Por el contrario, la cantidad de C16:1 y C18:1 disminuyó hasta 9.6% y 6.3%, respectivamente.



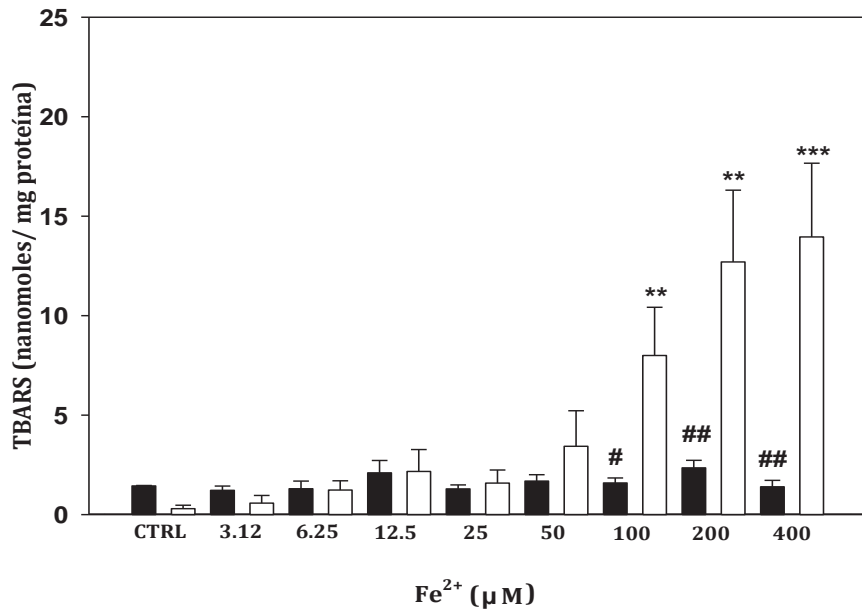
**Figura 1. Composición porcentual de ácidos grasos en levaduras (panel A) y en mitocondrias (panel B) crecidas en ausencia de ácido linolénico (-C18:3).** Los lípidos fueron extraídos y analizados de homogenados de levaduras y mitocondrias como se describe en materiales y métodos. Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  el error estándar de los porcentajes de cada ácido graso.



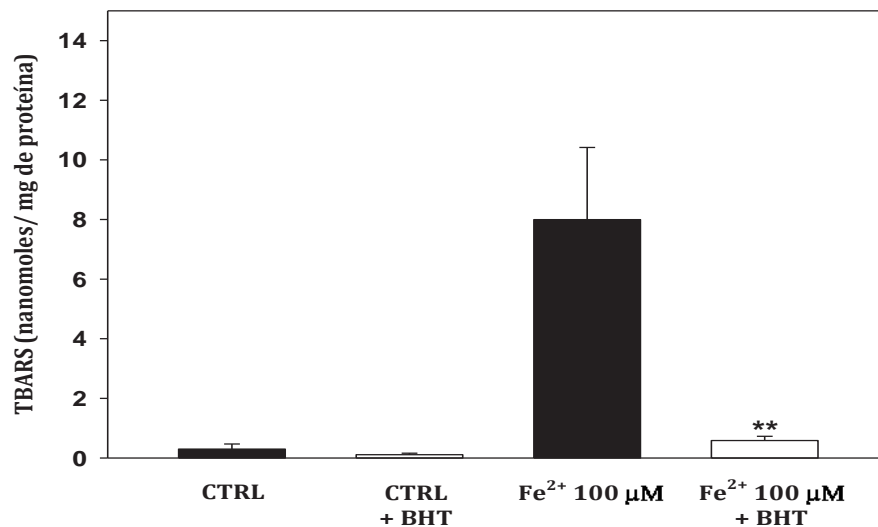
**Figura 2. Composición porcentual de ácidos grasos en levaduras (panel A) y en mitocondrias (panel B) crecidas en presencia de de C18:3 (+C18:3).** Los lípidos fueron extraídos y analizados de homogenados de levaduras y mitocondrias como se describe en materiales y métodos. Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  el error estándar de los porcentajes de cada ácido graso.

## **5.2. Influencia de la composición de ácidos grasos sobre la lipoperoxidación inducida por Fe<sup>2+</sup>**

Con el propósito de investigar si la incorporación de C18:3 incrementa la sensibilidad de la levadura a la lipoperoxidación, se midieron los niveles de peroxidación de lípidos en esferoplastos tratados durante 30 minutos con concentraciones crecientes de Fe<sup>2+</sup>. En los esferoplastos -C18:3 (Figura 2, barras negras), los niveles basales de TBARS se mantuvieron constantes a todas las concentraciones de Fe<sup>2+</sup> utilizadas. En contraste, los niveles de lipoperoxidación en los esferoplastos +C18:3 (Figura 2, barras blancas) aumentaron 340% (\*\*p<0.01), 420% (\*\*p<0.01) y 900% (\*\*p<0.001) a concentraciones de 100µM, 200 µM y 400 µM de Fe<sup>2+</sup>, respectivamente. Estos resultados indican que la incorporación de +C18:3 aumenta la sensibilidad de la levadura a la lipoperoxidación. La preincubación de los esferoplastos +C18:3 con 5 µM del agente anti-lipoperoxidante BHT durante 15 min previo al tratamiento con Fe<sup>2+</sup>, inhibió el aumento en los niveles de lipoperoxidación obtenidos con concentraciones arriba de 100 µM de Fe<sup>2+</sup> y no ejerció ningún efecto a concentraciones donde no se indujo la lipoperoxidación. (Fig. 4, barras blancas).



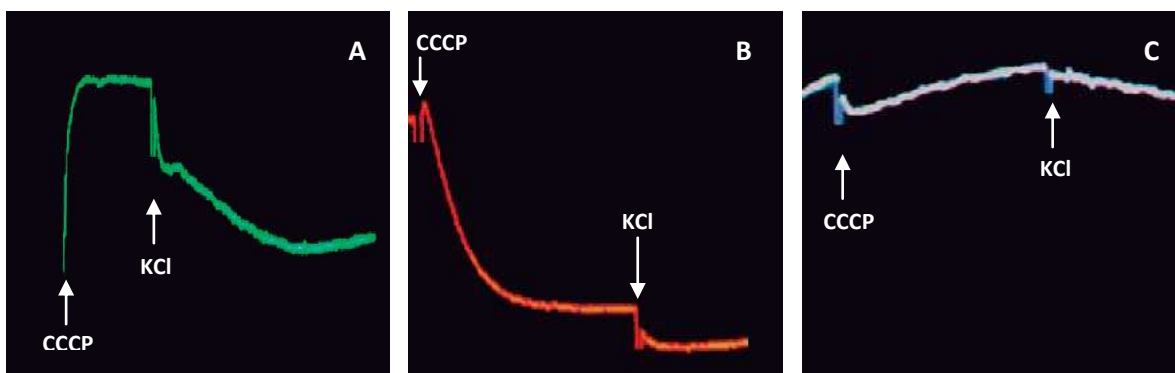
**Figura 3. Efecto del Fe<sup>2+</sup> sobre los niveles de lipoperoxidación en esferoplastos sin (barras negras) y con (barras blancas) C18:3.** Los esferoplastos fueron tratados durante 30 minutos a 4°C, con las concentraciones indicadas de Fe<sup>2+</sup>, como se describe en materiales y métodos. \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001 comparado con el control; #*p*<0.05, ##*p*<0.01, en comparación con esferoplastos -C18:3 a la misma concentración de Fe<sup>2+</sup>. Los datos se expresan como el promedio ± el error estándar de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) con una n=6.



**Figura 4. Efecto protector del BHT contra el daño lipoperoxidativo inducido por Fe<sup>2+</sup> en esferoplastos +C18:3.** Los esferoplastos fueron pre-incubados con 5μM de BHT durante 15 minutos previo al tratamiento con 100μM de Fe<sup>2+</sup>. \*\**p*<0.01, comparado con el control tratado con BHT. Los datos se expresan como el promedio ± el error estándar de n=6.

### 5.3. Influencia de la lipoperoxidación sobre el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ )

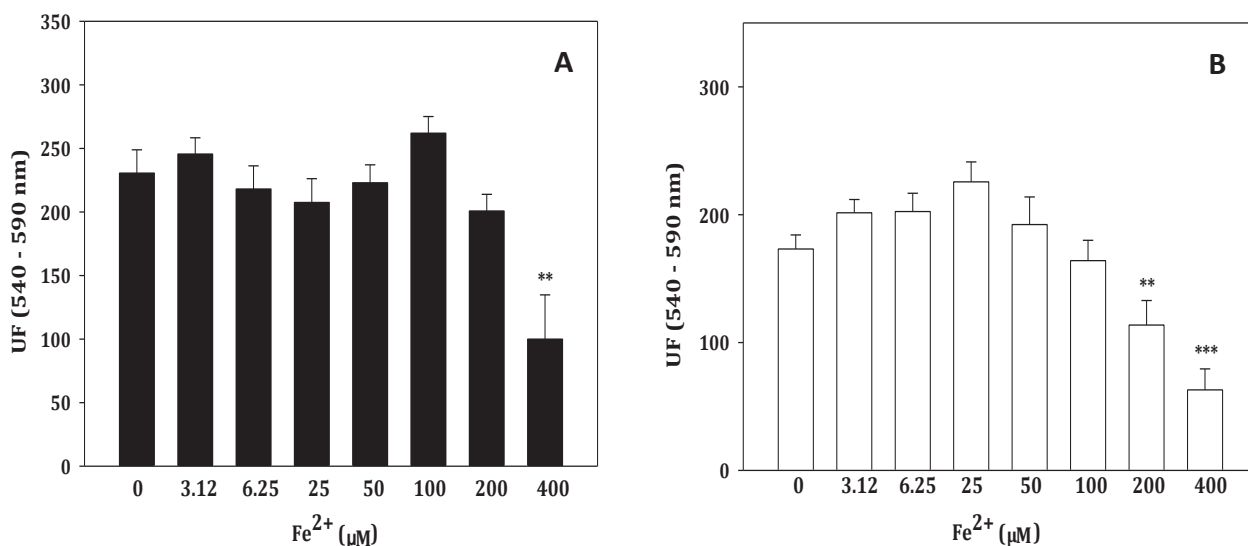
Con el propósito de investigar si la lipoperoxidación compromete el establecimiento del potencial de membrana mitocondrial durante el estrés oxidativo se evaluaron los cambios de la fluorescencia de la cianina DiSc<sub>3</sub>(3) en respuesta al desacoplante CCCP a una concentración que disipa solo el  $\Delta\Psi_{mit}$  de suspensiones celulares como una manera de evaluar *in situ* dicho parámetro. En la figura 5A, se muestra un trazo representativo del  $\Delta\Psi_{mit}$  en levaduras -C18:3, en donde se observa que la adición de CCCP produce un incremento de la fluorescencia de la cianina y el cual es indicativo del abatimiento del  $\Delta\Psi_{mit}$  y la salida del colorante hacia la membrana plasmática. Para corroborar que el cambio en las propiedades espectrales de la cianina en respuesta al CCCP fue debido al desacoplamiento del  $\Delta\Psi_{mit}$ , se incubaron las células con los inhibidores del complejo III y IV, antimicina A y KCN, respectivamente. En la figura 5B, se muestra que bajo estas condiciones el CCCP no induce ningún cambio en la fluorescencia de la cianina. Este mismo comportamiento se observó en células petite, las cuales carecen de función mitocondrial debido a mutaciones en el ADN<sub>mit</sub> producidas por la adición de bromuro de etidio (figura 5C). Estos resultados indican que el cambio en la fluorescencia de la cianina observado tras la adición de CCCP es debido al abatimiento en el  $\Delta\Psi_{mit}$ .



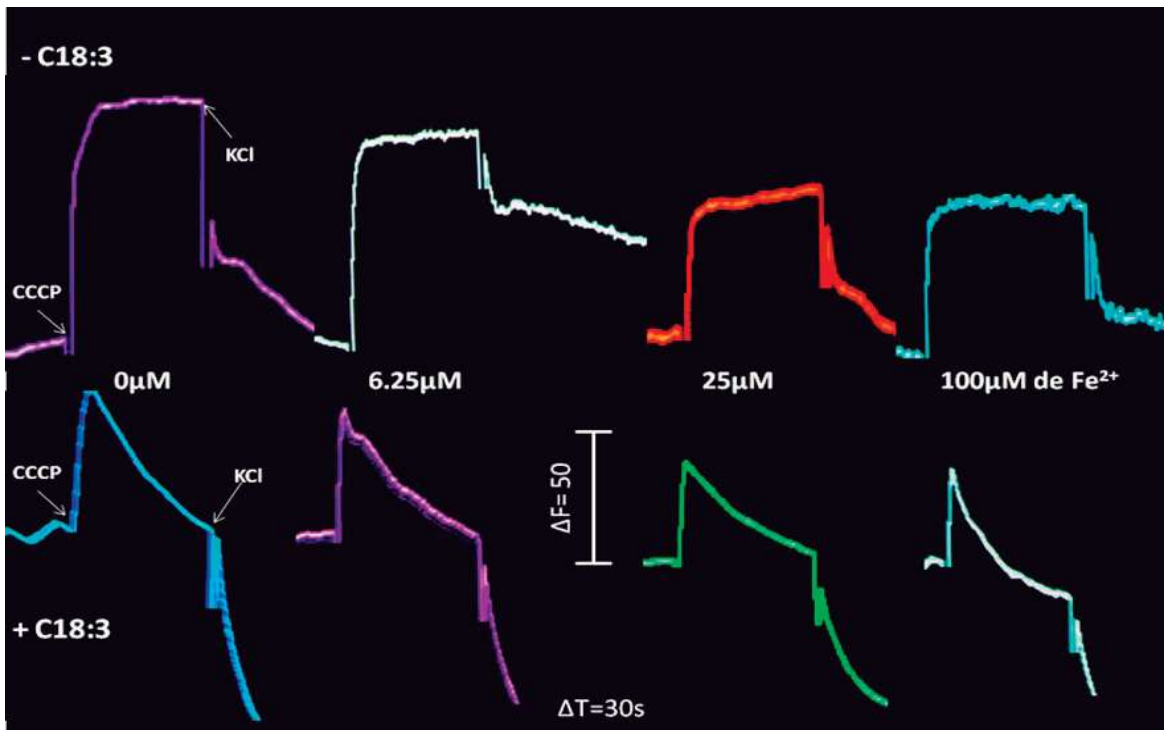
**Figura 5. Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_{mit}$ ) en levaduras de *S. cerevisiae*.** Panel A: células control; Panel B: células tratadas con 1 $\mu$ g de antimicina A y 0.75 mM de KCN; Panel C: levaduras petite. Gráficas representativas de n=3.

En la figura 6A, se observan las cuantificaciones de los cambios de la fluorescencia de la cianina en células tratadas con concentraciones crecientes de  $\text{Fe}^{2+}$ . No se observaron cambios significativos en la fluorescencia en levaduras -C18:3, hasta una concentración de 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ , mientras que a 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  se observó una disminución del 60% (\*\* $p < 0.01$ ). La figura 7 muestra los trazos representativos de las cuantificaciones mostradas en la figura 6.

La cuantificación de los cambios de la fluorescencia en las células +C18:3 se muestran en la figura 6B. Se observó una disminución en el  $\Delta\Psi_{\text{mit}}$  del 42% (\*\* $p < 0.01$ ) y 70% (\*\* $p < 0.001$ ), a 200  $\mu\text{M}$  y 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ , respectivamente, lo que sugieren que la incorporación del C18:3 aumenta la sensibilidad del  $\Delta\Psi$  al estrés oxidativo. La figura 7 muestra los trazos representativos de las cuantificaciones mostradas en la figura 6.

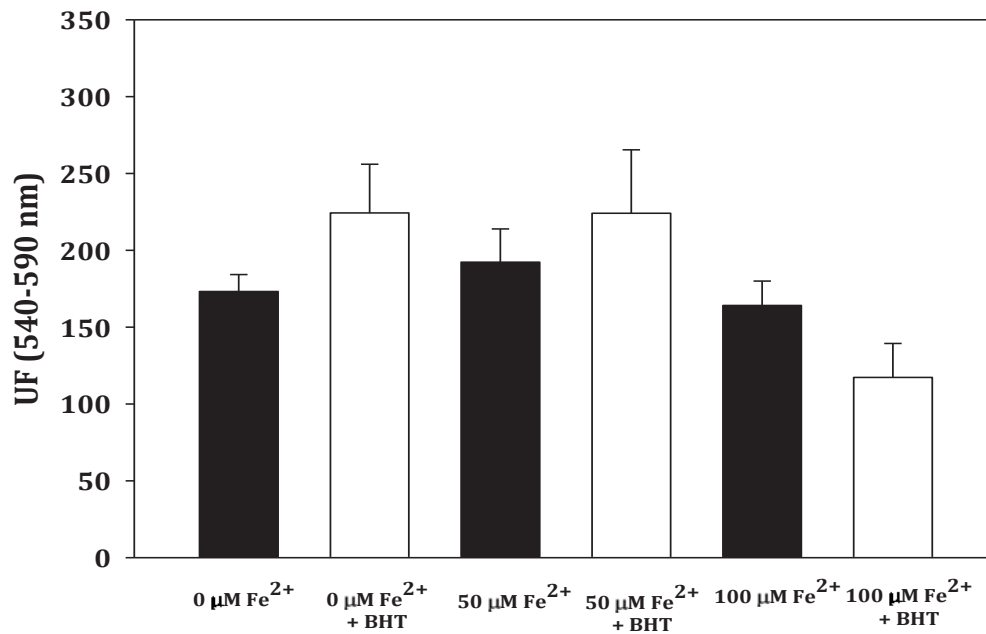


**Figura 6. Efecto del  $\text{Fe}^{2+}$  sobre el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ ) de *S. cerevisiae*.** Las células (25 mg de peso húmedo) fueron tratadas durante 30 minutos a 4°C, con las concentraciones indicadas de  $\text{Fe}^{2+}$ , como se describe en materiales y métodos. El potencial de membrana se determinó observando los cambios en la fluorescencia de 1  $\mu\text{M}$  de DiSC<sub>3</sub>(3) a 540-590nm. Panel A: células -C18:3; Panel B: células +C18:3\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  comparado con el control. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  el error estándar. n=10. UF: Unidades de Fluorescencia.

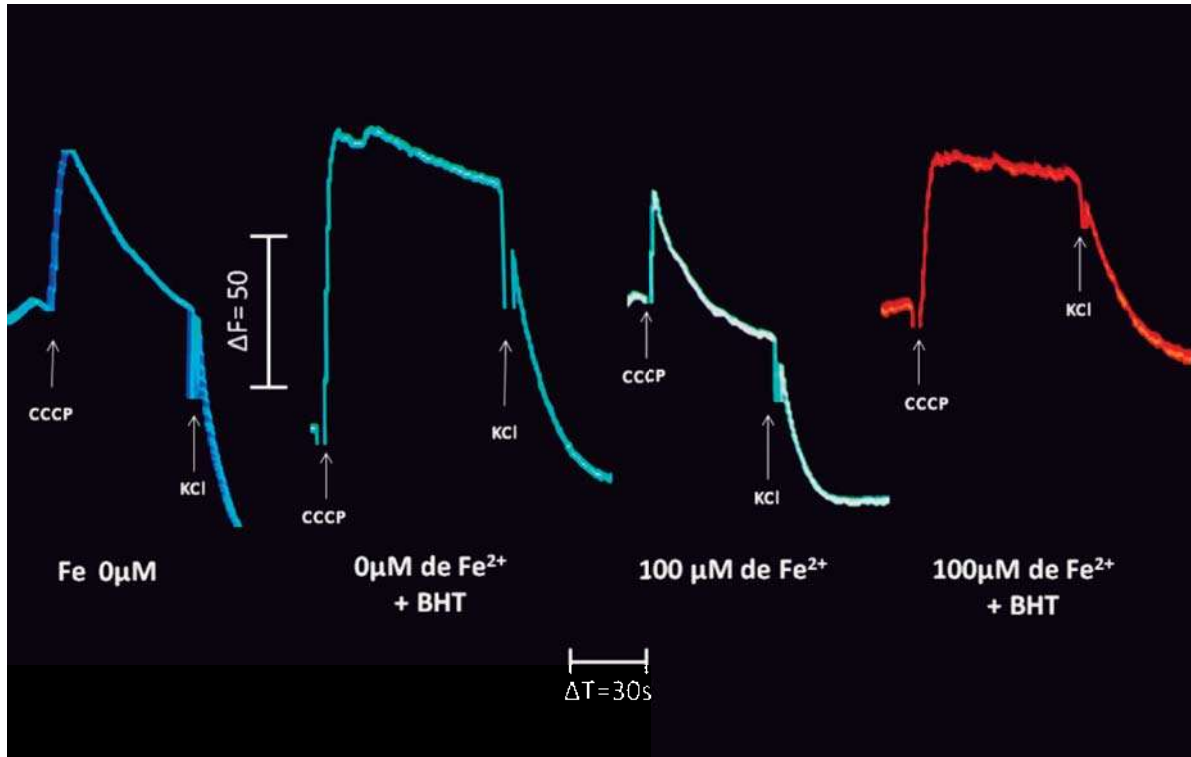


**Figura 7. Efecto del  $Fe^{2+}$  en el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_{mit}$ ) de *S. cerevisiae*.** Las células (25 mg de peso húmedo) fueron tratadas durante 30 minutos a 4°C, con las concentraciones indicadas de  $Fe^{2+}$ , como se describe en materiales y métodos. El potencial de membrana se determinó observando los cambios en la fluorescencia de  $1\mu M$  de DiSC<sub>3</sub>(3) a 540-590 nm; después de 10 segundos de inicia la lectura las mitocondrias se energizaron con 20 mM de glucosa, con  $15\mu M$  de CCCP se abatió el  $\Delta\Psi_{mit}$  y el  $\Delta\Psi$  citoplásmico se disipó con 25mM de KCl. Gráficas representativas de n=6.

Para comprobar el papel de la lipoperoxidación sobre la sensibilidad mayor del  $\Delta\Psi_{mit}$  de células +C18:3 al estrés oxidativo, se trataron las levaduras con  $5\mu M$  BHT durante 15 min antes del tratamiento con  $Fe^{2+}$ . La Figura 8, muestra que el BHT no tuvo ningún efecto protector sobre la pérdida del  $\Delta\Psi_{mit}$  (barras blancas), lo que sugiere que la lipoperoxidación no participa en la pérdida  $\Delta\Psi_{mit}$  en las levaduras +C18:3. La figura 9 muestra unos trazos representativos de las cuantificaciones de la figura 8.



**Figura 8. Efecto del BHT sobre el  $\Delta\Psi_{mit}$  de células de *S. cerevisiae* tratadas con  $Fe^{2+}$ .** Las células se pre-incubaron con 5  $\mu M$  de BHT durante 15 minutos previo al tratamiento con 50 y 100  $\mu M$  de  $Fe^{2+}$ , como se describió en materiales y métodos. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  el error estándar con una  $n=3$ . UF: Unidades de Fluorescencia.

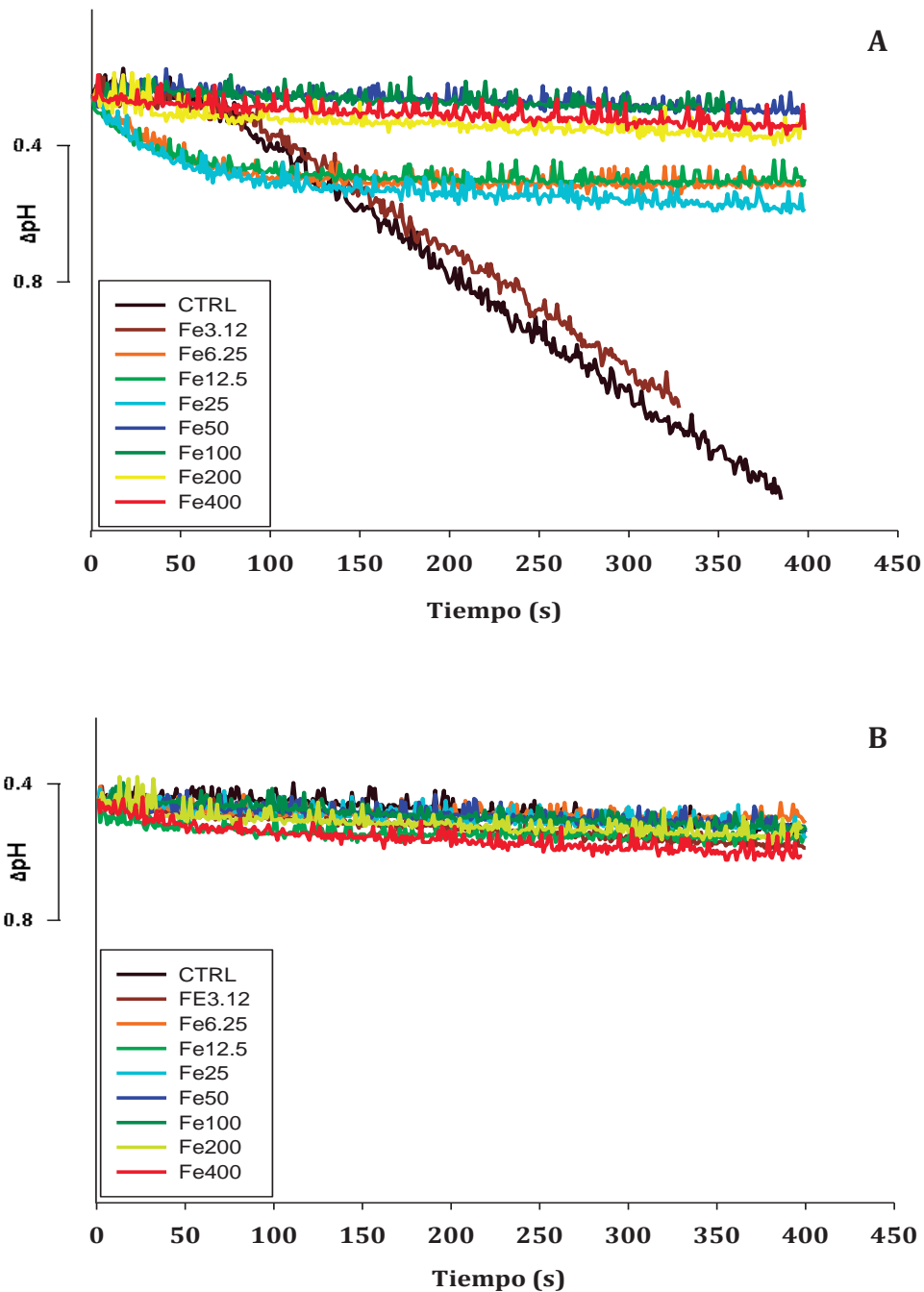


**Figura 9. Efecto del BHT sobre el  $\Delta\Psi_{mit}$  de células +C18:3 tratadas con  $Fe^{2+}$ .** Las células +C18:3 (25 mg de peso húmedo) se pre-incubaron con 5 $\mu$ M de BHT durante 15 minutos previo al tratamiento con 0 y 100 $\mu$ M de  $Fe^{2+}$ , como se describe en materiales y métodos. El potencial de membrana se determinó observando los cambios en la fluorescencia de 1 $\mu$ M de DiSC<sub>3</sub>(3) a 540-590nm;}, después de 10 segundos de inicia la lectura las mitocondrias se energizaron con 20 mM de glucosa, con 15 $\mu$ M de CCCP se abatió el  $\Delta\Psi_{mit}$  y el  $\Delta\Psi$  citoplásmico se disipó con 25mM de KCl. Gráficas representativas de n=4.

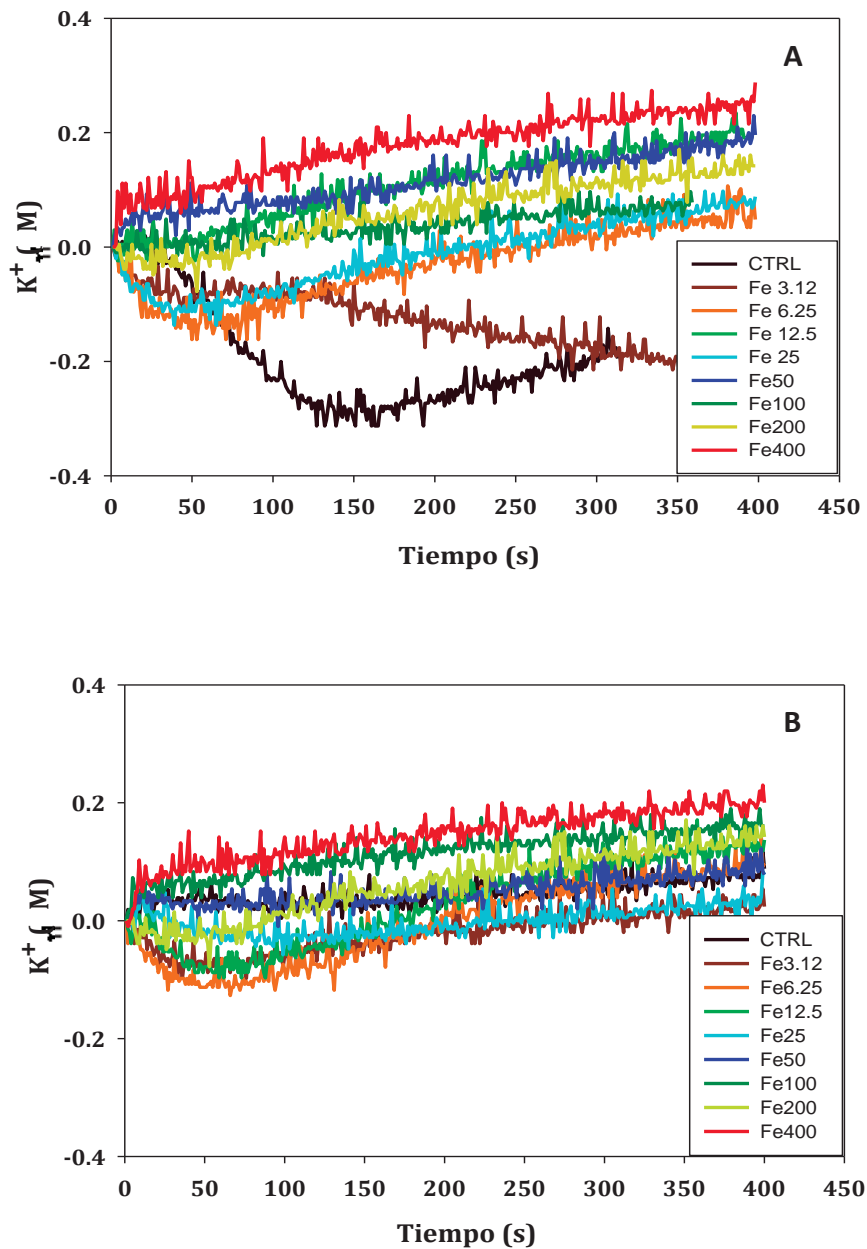
#### **5.4. Influencia de la lipoperoxidación sobre algunas funciones celulares dependientes de ATP.**

Con la finalidad de investigar si la incorporación de ácido linolénico afecta algunas de las funciones dependientes de ATP en condiciones de estrés oxidativo, se evaluó la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática midiendo el cambio de pH del medio. De forma paralela, se evaluó el flujo de K<sup>+</sup> debido a que es una actividad que responde a los cambios de pH extracelular (González-Hernández *et al.*, 2004). En levaduras -C18:3 (Figura 10A) se observa que la actividad de la ATPasa-H<sup>+</sup> acidifica el medio hasta la concentración de 25 μM de Fe<sup>2+</sup>, mientras que a concentración entre 50 μM y 400 μM de Fe<sup>2+</sup> no se observó ningún cambio en esta medición. El flujo de K<sup>+</sup> de las levaduras -C18:3 (Figura 11A), no se afectó hasta concentraciones de 25 μM de Fe<sup>2+</sup> y a concentraciones mayores se inhibe totalmente la expulsión de K<sup>+</sup> hacia el medio de incubación.

En la figura 10B, se observó una nula actividad de ATPasa-H<sup>+</sup> en levaduras +C18:3, aun bajo condiciones control (0 μM de Fe<sup>2+</sup>). Respecto al flujo de K<sup>+</sup> en células +C18:3, se observó solo la expulsión de este catión incluso bajo condiciones control (Figura 11B). Estos resultados sugieren que la incorporación del ácido linolénico a las membranas de *S. cerevisiae* podría alterar el arreglo molecular de los lípidos de membrana plasmática, lo que podría afectar la actividad de la ATPasa-H<sup>+</sup>.



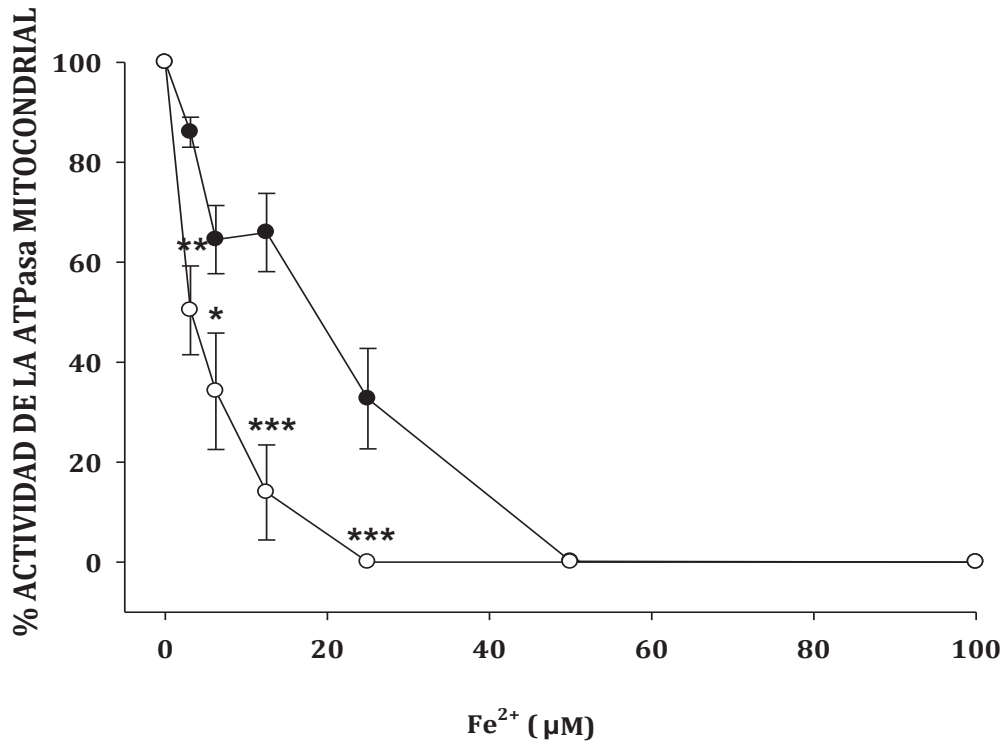
**Figura 10. Influencia del  $\text{Fe}^{2+}$  sobre los cambios de pH extracelular.** Las levaduras (150mg de peso húmedo) fueron tratadas durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , con las concentraciones indicadas de  $\text{Fe}^{2+}$ , como se describe en materiales y métodos. Los trazos se iniciaron después de la adición de 20mM de glucosa y los cambios de pH fueron registrados con un electrodo para pH. Los resultados son representativos de  $n=2$ . Panel A: células -C18:3; Panel B. células +C18:3.



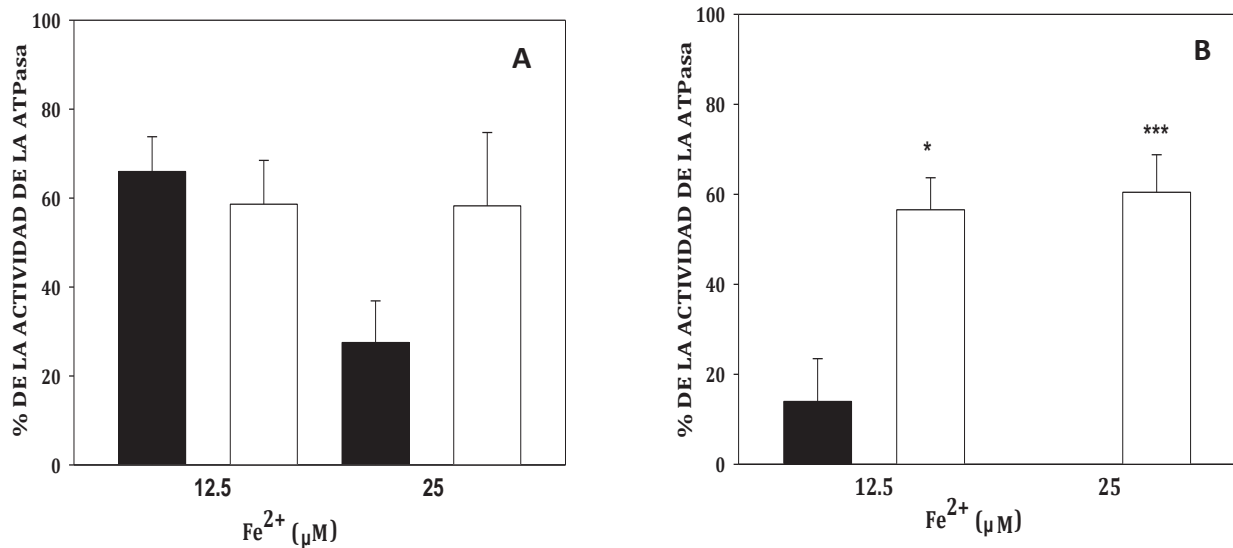
**Figura 11. Influencia de la lipoperoxidación sobre el eflujo de K<sup>+</sup>.** Las levaduras (150mg de peso húmedo) fueron tratadas durante 30 minutos a 4°C, con las concentraciones indicadas de Fe<sup>2+</sup>, como se describe en materiales y métodos. Los trazos se iniciaron después de la adición de 20mM de glucosa y el eflujo de K<sup>+</sup> fue registrado con un electrodo selectivo de K<sup>+</sup>. Los resultados son representativos de n=2. Panel A: células -C18:3; Panel B. células +C18:3.

### **5.5. Papel de la lipoperoxidación en la inhibición de la actividad de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa por Fe<sup>2+</sup>.**

Con el objeto de elucidar el papel de la lipoperoxidación sobre la inhibición de la actividad de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa por Fe<sup>2+</sup>, se evaluó la actividad de esta enzima midiendo la concentración de fosfato inorgánico producto de la hidrólisis del ATP en mitocondrial aisladas de levaduras incubadas durante 30 minutos a concentraciones crecientes de Fe<sup>2+</sup>. En la figura 12 se observa una mayor sensibilidad al Fe<sup>2+</sup> en mitocondrias +C18:3 a todas las concentraciones utilizadas y una inhibición total de la actividad a concentraciones más mayores del catión. Estos resultados indican que la incorporación de C18:3 aumenta la sensibilidad de la actividad de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa al Fe<sup>2+</sup>, debido al incremento en los niveles de lipoperoxidación. Para comprobar esta hipótesis, se evaluó la actividad de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa en mitocondrias +C18:3 tratadas con 5 μM de BHT durante 15 min antes del tratamiento con Fe<sup>2+</sup>. En la figura 13A, se observa que el BHT no protegió de la inhibición por 12.5 y 25 μM de Fe<sup>2+</sup> en las mitocondrias -C18:3. En contraste, en la figura 13B, barras blancas, el BHT protegió la actividad de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa en mitocondrias +C18:3 hasta un 54% y 60%, de la inhibición a las mismas concentraciones de Fe<sup>2+</sup>. Estos resultados indican que una parte importante de la inhibición de la actividad F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa por Fe<sup>2+</sup> es atribuible a la lipoperoxidación en mitocondrias +C18:3.



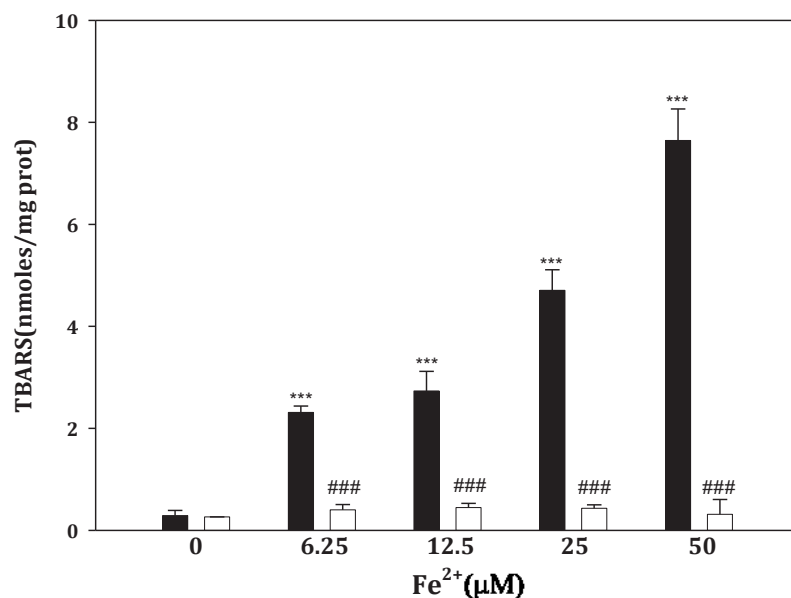
**Figura 12. Efecto del Fe<sup>2+</sup> sobre la actividad de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa.** Las mitocondrias fueron tratadas durante 30 minutos a 4°C, con las concentraciones indicadas de Fe<sup>2+</sup>, como se describe en materiales y métodos. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001 en comparación con la actividad en mitocondrias -C18:3. Los datos se expresan como el promedio ± el error estándar, n=5. Círculos negros: mitocondrias -C18:3; Círculos blancos: mitocondrias +C18:3.



**Figura 13. Efecto del BHT en la actividad de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa mitocondrial de mitocondrias expuestas a Fe<sup>2+</sup>.** Las mitocondrias -C18:3 (panel A) o +C18:3 (panel B) fueron pre-incubados con 5 μM de BHT durante 15 minutos previo al tratamiento con Fe<sup>2+</sup>. Barras negras: mitocondrias con Fe<sup>2+</sup>; barras blancas: mitocondrias con Fe<sup>2+</sup> + BHT. \**p*<0.05, \*\*\**p*<0.001 en comparación con la actividad en mitocondrias no pre-incubadas con BHT. Los datos se expresan como el promedio ± el error estándar (n=3).

## **5.6. Papel de la lipoperoxidación en la inhibición del $\Delta\Psi_{mit}$ inducido por $Fe^{2+}$ en mitocondrias de hígado de rata.**

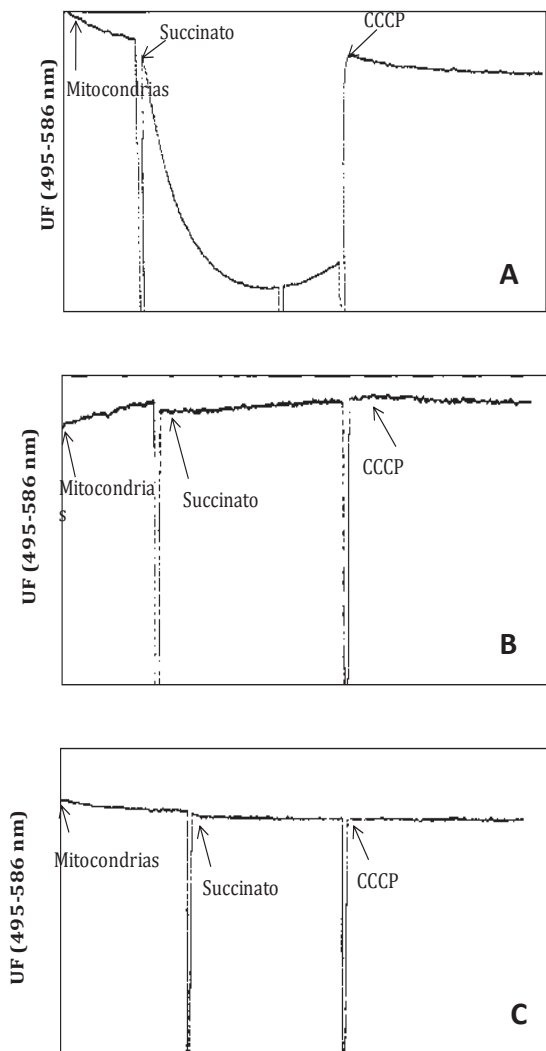
Con el objetivo de comparar los resultados obtenidos en mitocondrias de levadura con los efectos del  $Fe^{2+}$  en un modelo biológico que sea naturalmente sensible a la lipoperoxidación, se evaluaron los efectos del  $Fe^{2+}$  en el  $\Delta\Psi$  en mitocondrias de hígado de rata, ya que este roedor contiene una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas mitocondriales (Pamplona et al., 1998). En primer término, se midieron los niveles de lipoperoxidación en mitocondrias tratadas durante 30 minutos con concentraciones crecientes de  $Fe^{2+}$ . Se observó un aumento en los niveles de lipoperoxidación (Figura 14, barras negras) de 200% (\*\* $p < 0.001$ ), 270% (\*\* $p < 0.001$ ), 490% (\*\* $p < 0.001$ ) y 810% (\*\* $p < 0.001$ ), a las concentraciones de 6.25  $\mu M$ , 12.5  $\mu M$ , 25  $\mu M$  y 50  $\mu M$  de  $Fe^{2+}$ , respectivamente. En la figura 14, barras blancas, se muestra que el BHT inhibió por completo el aumento en los niveles de lipoperoxidación observados a todas las concentraciones de  $Fe^{2+}$  utilizadas (\*\* $p < 0.001$ ) en este ensayo y no ejerce ningún efecto sobre los niveles basales de éste parámetro.



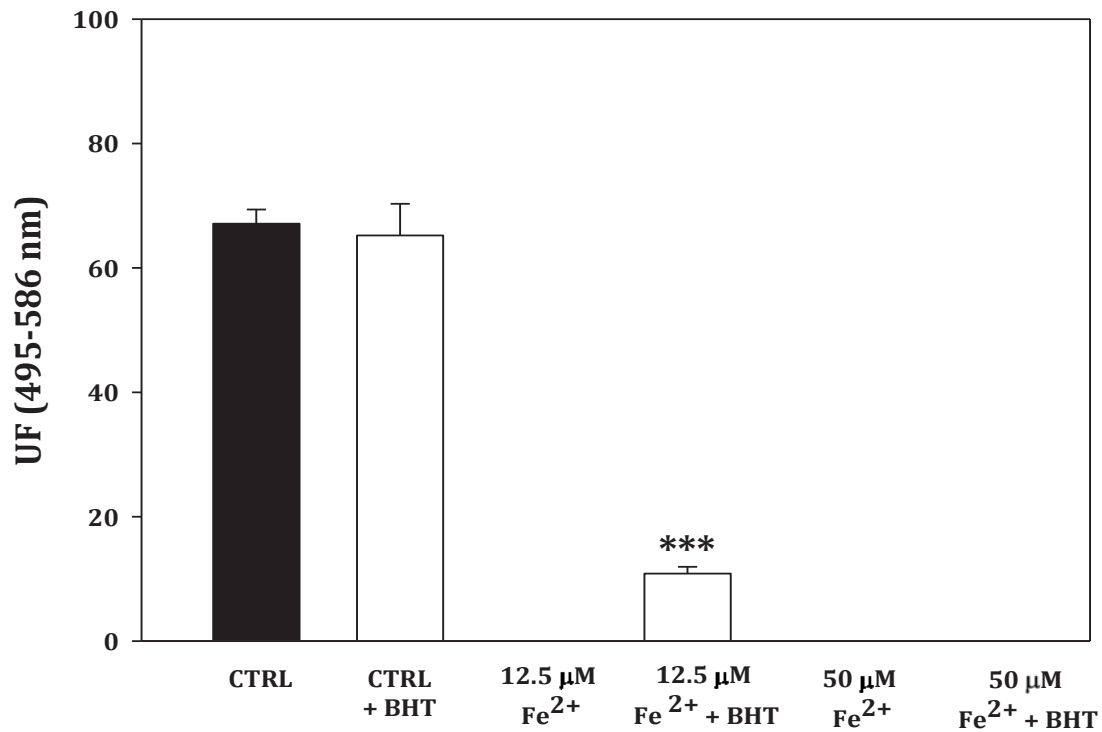
**Figura 14. Efecto del Fe<sup>2+</sup> sobre los niveles de lipoperoxidación (barras negras) y efecto protector del BHT (barras blancas) en mitocondrias de hígado de rata.** las mitocondrias fueron tratadas durante 30 minutos a 4°C, con las concentraciones indicadas de Fe<sup>2+</sup> y para probar el efecto protector del BHT las mitocondrias fueron pre-incubadas con 5μM de BHT durante 15 minutos previo al tratamiento con Fe<sup>2+</sup>, como se describe en materiales y métodos. \*\*\**p*<0.001 comparado con el control. ###*p*<0.001 comparado con mitocondrias sin BHT (barras negras) a la misma concentración de Fe<sup>2+</sup>. Los datos se expresan como el promedio ± el error estándar de n=7.

Se evaluó el efecto del Fe<sup>2+</sup> sobre el potencial de membrana de las mitocondrias de hígado de rata midiendo los cambios en la fluorescencia de la safranina. En la figura 15A, se muestra un trazo representativo del ΔΨ de mitocondrias de hígado de rata, en el cual se observa una disminución en la fluorescencia de la safranina debido a que la mitocondria se energizó con succinato y el ΔΨ<sub>mit</sub> se abatió después de la adición de CCCP, lo cual corrobora que los cambios observados en la fluorescencia son debidos al ΔΨ establecido por la CTE. En la figura 15, paneles B y C, se observa que los tratamientos con 12.5 μM y 50 μM de Fe<sup>2+</sup>, respectivamente, inhibieron por completo el ΔΨ.

Para evaluar el papel de la lipoperoxidación en el resultado anterior, se trataron las mitocondrias con 5  $\mu\text{M}$  de BHT durante 15 min antes del tratamiento con  $\text{Fe}^{2+}$ . En la figura 16 se muestra que el BHT no altera la medición del  $\Delta\Psi$  (barras blancas). El BHT fue capaz de proteger en un 19% la inhibición por 12.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ . Estos resultados corroboran la conclusión obtenida con mitocondrias de la levadura +C18:3 acerca de que la lipoperoxidación es parcialmente responsable de la inhibición del  $\Delta\Psi_{\text{mit}}$  por  $\text{Fe}^{2+}$ .



**Figura 15. Efecto del  $\text{Fe}^{2+}$  sobre el  $\Delta\Psi$  de mitocondrias de hígado de rata.** Las mitocondrias (0.3 mg de proteína) fueron tratadas durante 30 minutos a 4°C, como se describe en materiales y métodos. El potencial de membrana se determinó utilizando 1.6  $\mu\text{M}$  de safranina como indicador fluorescente, los cambios se siguieron a una longitud de onda de 495-586nm. Se energizaron las mitocondrias con 10  $\mu\text{M}$  de succinato, el  $\Delta\Psi_{\text{mit}}$  se abatió con 5  $\mu\text{M}$  de CCCP. En el panel A, control. Panel B, mitocondrias tratadas con 12.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  y panel C, mitocondrias tratadas con 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ . Gráficas representativas de n=5.



**Figura 16. Efecto protector del BHT contra el daño inducido por Fe<sup>2+</sup> sobre el potencial de membrana de mitocondrias de hígado de rata.** Las mitocondrias se pre-incubaron con 5 μM de BHT durante 15 minutos previo al tratamiento con 12.5 y 50 μM de Fe<sup>2+</sup>, como se describió en materiales y métodos. Los datos se expresan como el promedio ± el error estándar de n=3. UF: Unidades de Fluorescencia.

## 6. DISCUSIÓN

Los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas biológicas constituyen el principal blanco de las ERO. La lipoperoxidación puede inducir un daño irreversible en la fluidez de la membrana y su plasticidad, lo que conduce a un daño irreversible en la integridad de la célula (Cortes-Rojo *et al.*, 2009). El estudio de la lipoperoxidación ha adquirido una alta relevancia debido a que este proceso ha sido relacionado con el desarrollo de varias condiciones patológicas, neurodegenerativas y hasta en el envejecimiento (Floyd *et al.*, 2001; Pamplona *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 1998; Practicò, *et al.*, 2000). Diversos estudios han identificado a la peroxidación de los lípidos mitocondriales como el principal factor que determina el daño en la CTE. En específico, se ha identificado a la pérdida ubiquinona y cardiolipina, así como el daño en el citocromo b del complejo III como los principales eventos que afectan el transporte de electrones durante la lipoperoxidación (Forsmark-Andréé *et al.*, 1997; Sen *et al.*, 2005, Cortés-Rojo *et al.* 2009b) a nivel de los complejos I, III y IV y en otras proteínas mitocondriales como el translocador ADP/ATP, el translocador de fosfatoy la ATP sintasa (Paradies *et al.*, 2000; Luo y Shi, 2005; Cortés-Rojo *et al.*, 2009b). Con base a lo anterior, en este trabajo se decidió estudiar la influencia de la lipoperoxidación sobre el potencial de membrana mitocondrial, la actividad de la  $F_1F_0$ ATPasa y algunas funciones celulares dependientes de ATP para corroborar si una mayor resistencia a la lipoperoxidación protege dichos procesos de los efectos deletéreos del estrés oxidativo. Se utilizó como modelo de estudio a *Saccharomyces cerevisiae* debido a que la presencia exclusiva de ácidos grasos saturados y monoinsaturados (Ratray *et al.*, 1975) hace a esta levadura resistente a la lipoperoxidación y a que la composición de ácidos grasos de membrana puede ser manipulada para disminuir la resistencia a la lipoperoxidación. En el presente trabajo se enriquecieron las membranas celulares a través de la adición del ácido graso triinsaturado, ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3) al medio de cultivo. Este ácido graso, forma parte de la familia de ácidos  $\omega$ -3 y es una grasa esencial para la salud y nutrición del ser humano y su incorporación se lleva a cabo a través de la ingesta de alimentos y aceites de origen

vegetal (Brouwer *et al*, 2004). Es altamente inestable debido a su fácil oxidación [Fox y Whitesell 2002]. Es precursor de los ácidos de cadena más larga de la serie  $\omega$ -3 tales como el ácido eicosapentanoico (C25:5), el ácido docosahexanoico (C22:6) y el ácido docosapentanoico (C22:5), los cuales se sintetizan a partir del C18:3 mediante su elongación y desaturación por desaturasas  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$  (Cho *et al.*, 1999). El C18:3 se encuentra presente en los organismos en un bajo porcentaje en las mitocondrias de hígado de diferentes especies multicelulares (Pamplona *et al.*, 2000), pero en *S. cerevisiae* no se encuentran presentes ni este ácido graso ni sus productos de elongación.

La adición de C18:3 produjo cambios dramáticos en la composición de ácidos grasos de la levadura, ya que este ácido graso, se convirtió en el componente mayoritario tanto en células como en las mitocondrias (Figura 2 paneles A y B, respectivamente). En contraste, los ácidos grasos monoinsaturados, que son los componentes mayoritarios en las levaduras y mitocondrias nativas, se convirtieron en los ácidos grasos minoritarios en levaduras y mitocondrias. En *S.cerevisiae*, la desaturasa  $\Delta^9$  es la encargada de catalizar la formación del doble enlace entre el carbono 9 y 10 de los ácidos grasos saturados, C16:0 y C18:0, para dar los correspondientes ácidos grasos monoinsaturados, C16:1 y C18:1 (Bossie y Martín, 1989). La presencia de un ácido graso poliinsaturado, en este trabajo el C18:3, reprime al gen *OLE1* que codifica la desaturasa  $\Delta^9$  y provoca el remplazo de los ácidos grasos monoinsaturados nativos por los ácidos grasos suplementados (Martín *et al.*, 2007), lo cual explica la disminución de los ácidos grasos monoinsaturados y la acumulación de los sustratos para la desaturasa

El enriquecimiento con C18:3 aumentó de manera considerable la sensibilidad de los esferoplastos a la lipoperoxidación inducida por  $Fe^{2+}$  (Figura 2, barras blancas), mientras que los esferoplastos -C18:3 muestran resistencia a la lipoperoxidación (Figura 2, barras negras), incluso a la concentración más elevada de  $Fe^{2+}$  (400 $\mu$ M). Estos resultados están en concordancia con el trabajo pionero de Holman, en el cual se demostró que los ácidos grasos saturados y

monoinsaturados son resistentes a la lipoperoxidación y su sensibilidad a este proceso incrementa exponencialmente conforma aumenta el número de enlaces dobles (Holman, 1954). Los ácidos grasos que contienen más de un doble enlace, separado por un grupo metileno (por ejemplo el C18:3), se autooxidan rápidamente a temperatura ambiente a través de la formación de radicales dienilo conjugados debido a que estos últimos son estabilizados por resonancia, mientras que los ácidos grasos monoinsaturados sufren autooxidación únicamente a temperaturas elevadas debido a la imposibilidad de formar radicales dienilo conjugados (Porter, 1986). Lo anterior explica, la resistencia a la lipoperoxidación en las levaduras -C18:3 y el aumento en la sensibilidad a este proceso en las levaduras +C18:3.

En un estudio previo se observó que la incorporación del C18:3 aumenta la sensibilidad de la CTE al estrés oxidativo (Cortés-Rojo *et al.*, 2009b); esto podría estar relacionado con una menor capacidad de las células +C18:3 en comparación con las células -C18:3 para establecer el  $\Delta\Psi_{mit}$  a concentraciones por arriba de 200  $\mu\text{M}$  (Figura 6). El efecto protector nulo del BHT sobre la inhibición del  $\Delta\Psi_{mit}$  por  $\text{Fe}^{2+}$  podría sugerir que la lipoperoxidación no participa en la disminución en la capacidad de la CTE para establecer el  $\Delta\Psi_{mit}$  (Figura 8). Sin embargo, una explicación alternativa es que el BHT se haya acumulado en la membrana plasmática y que no se haya acumulado en la mitocondria para ejercer un efecto protector. Esta hipótesis concuerda con los resultados mostrados en la figura 9, donde se observa que cuando las levaduras +C18:3 fueron tratadas con el BHT previo al tratamiento con  $\text{Fe}^{2+}$ , la cianina se acumula en la membrana plasmática, mientras que en células sin BHT se observa una salida gradual de la cianina de la membrana plasmática. Además, el papel de la lipoperoxidación sobre la disminución del  $\Delta\Psi_{mit}$  por la exposición a  $\text{Fe}^{2+}$  pudo ser confirmado en mitocondrias de hígado de rata, ya que la pre-incubación con BHT protegió de la inhibición de este parámetro (Figura 16).

En diferentes sistemas *in vivo* la lipoperoxidación altera la permeabilidad membranal, el  $\Delta\Psi$  y el gradiente iónico (Halliwell y Gutteridge, 1989; Lehotsky *et al.*, 1999). En concordancia con lo anterior, la incorporación de C18:3 en las membranas mitocondriales de *S. cerevisiae* aumentó la sensibilidad de la  $F_1F_0$ -ATPasa al tratamiento con  $Fe^{2+}$  (Figura 12, círculos blancos). El papel de la lipoperoxidación en la pérdida de esta actividad fue confirmado por la recuperación de más del 60% de la actividad a concentraciones que inhibieron totalmente a la enzima, mientras que en mitocondrias -C18:3 el BHT no ejerció ningún efecto. En un estudio realizado en esferoplastos C18:3 y +C18:3 (Estrada, 2007) se observó que las concentraciones de  $Fe^{2+}$  que afectan la respiración mitocondrial concuerdan con las concentraciones de  $Fe^{2+}$  a las cuales se inhibió el  $\Delta\Psi_{mit}$ . Asimismo, existen varios estudios en mamíferos donde se ha demostrado que el  $Fe^{2+}$  afecta la actividad de la CTE, el  $\Delta\Psi_{mit}$  y la actividad de la ATPasa, concomitante con un aumento en los niveles de lipoperoxidación (Masini *et al.*, 1985; McKnight y Hunter, 1966; Cederbaum y Wainio, 1971; Zhang *et al.*, 1990).

El fosfolípido cardiolipina estabiliza una amplia variedad de proteínas de la membrana interna mitocondrial entre las que se encuentra la  $F_1F_0$ ATP sintasa (Eble *et al.*, 1990; Schlame *et al.*, 1993). Por lo tanto, es probable que la oxidación de cardiolipina aumente la sensibilidad de la  $F_1F_0$ -ATPasa en las mitocondrias +C18:3.

Por otro lado, la entrada de glucosa a la levadura activa a la ATPasa- $H^+$  de la membrana plasmática (Serrano, 1980). En un estudio realizado en *S. cerevisiae* se observó que el potencial de la membrana plasmática contribuye en la organización de la misma y que un daño en la síntesis de ATP mitocondrial afecta la actividad de la ATPasa- $H^+$  de la membrana plasmática (Grossmann *et al.*, 2007). En relación a lo anterior, no se pudo comprobar la relación entre el daño en la producción de ATP en la mitocondria por la lipoperoxidación y la disminución en la actividad de la ATPasa- $H^+$  debido a que posiblemente la incorporación del C18:3 provocó un cambio en el arreglo de la

membrana plasmática que se ve reflejado como una inactivación de la ATPasa-H<sup>+</sup> (figura 10B). La levadura capta K<sup>+</sup> a través de la  $\Delta P$  generada por la ATPasa-H<sup>+</sup> (Peña, 1975). El K<sup>+</sup> es un componente indispensable para todas las formas celulares y todas dependen de la captación y eventualmente de la liberación de K<sup>+</sup> para crecer y mantenerse. Además, el K<sup>+</sup> estimula la respiración (Rothstein y Demis, 1953) y la fermentación (Peña 1975) y modula el pH interno en las levaduras (Calahorra *et al.*, 1998). En las levaduras +C18:3 se observó una expulsión del K<sup>+</sup> a todas las concentraciones de Fe<sup>2+</sup> utilizadas (Figura 11B), lo cual podría ser una respuesta adaptativa de la levadura para establecer un  $\Delta\Psi$  mediante el eflujo de K<sup>+</sup> en respuesta a la pérdida de la actividad ATPasa-H<sup>+</sup>. Se ha observado que en la levadura el transporte de K<sup>+</sup> se lleva a cabo en una relación estequiométrica de 1:1 de entrada de K<sup>+</sup> y salida de H<sup>+</sup> al medio durante la fermentación (Conway y Malley, 1946). En función de lo anterior y a que la actividad de la ATPasa-H<sup>+</sup> fue nula en células +C18.3, esto podría explicar también, la salida del K<sup>+</sup> detectada en estas células incluso en condiciones control. En contraste, en las levaduras -C18:3 (Figura 11A) se observó que a partir de 50  $\mu\text{M}$  de Fe<sup>2+</sup> hay una expulsión de K<sup>+</sup> y esto concuerda con el hecho de que la actividad de la ATPasa-H<sup>+</sup> funciona de manera normal hasta concentraciones menores de 50 $\mu\text{M}$  de Fe<sup>2+</sup> (Figura 10A). Muchos agentes catiónicos, a concentraciones variables, pueden producir el eflujo de K<sup>+</sup> en levaduras, produciendo un incremento en el  $\Delta\Psi$  plasmático, una desorganización de la membrana plasmática y una disfunción de los transportadores de esta membrana (Peña *et al.*, 2009). Una situación similar podría aplicar también a los resultados encontrados en el presente trabajo, ya que el Fe<sup>2+</sup> podría afectar también los transportadores de K<sup>+</sup> (Trk1p y Trk2 [Gaber *et al.*, 1988; Ko *et al.*, 1991]). En concordancia con la pérdida de funciones de membrana plasmática en células +C18:3, en un estudio previo se observó que la incorporación de ácidos grasos C18:2 y C18:3 inducen una pérdida de la integridad membranal y una permeabilización de la membrana plasmática en presencia de Cu<sup>2+</sup> (Avery *et al.*, 1996; Howlell y Avery, 1997), lo que resultó en un deterioro en la función membranal asociado con salida de K<sup>+</sup> (Avery *et al.*, 1996; Gadd, 1993.). Asimismo, se ha

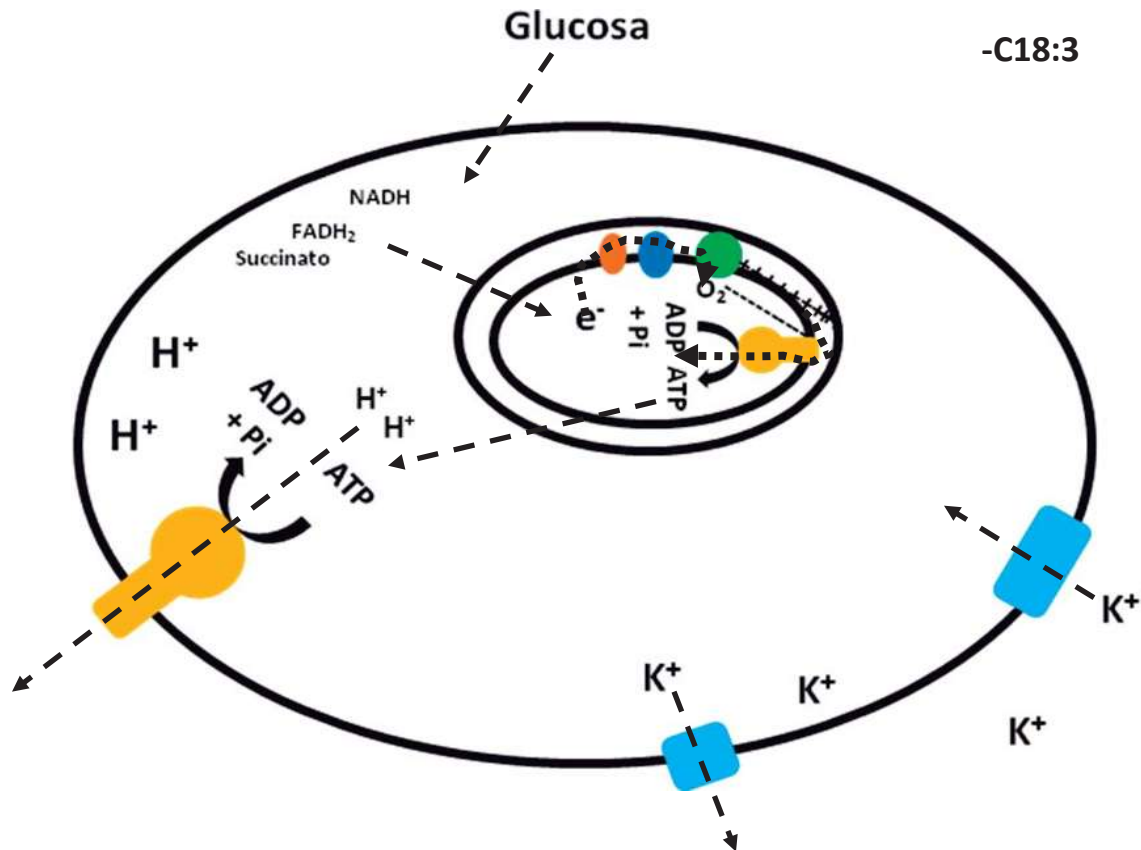
observado un aumento en la permeabilidad de las membranas de levaduras +C18:3 bajo condiciones de estrés oxidativo inducido por Fe<sup>2+</sup> (Cortes *et al.*, 2009c).

El grado de insaturación de los lípidos membranales entre las diferentes especies ha sido correlacionado con su susceptibilidad a la lipoperoxidación (Pamplona, 2000). Debido a lo anterior, fue útil el uso de mitocondrias de hígado de rata como modelo de estudio de forma comparativa debido a la alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados en este mamífero, lo cual explica las diferencias encontradas respecto a la lipoperoxidación entre las mitocondrias de hígado de rata (Figura 14, barras negras) y los esferoplastos de la levadura -C18:3 (Figura 3, barras negras).

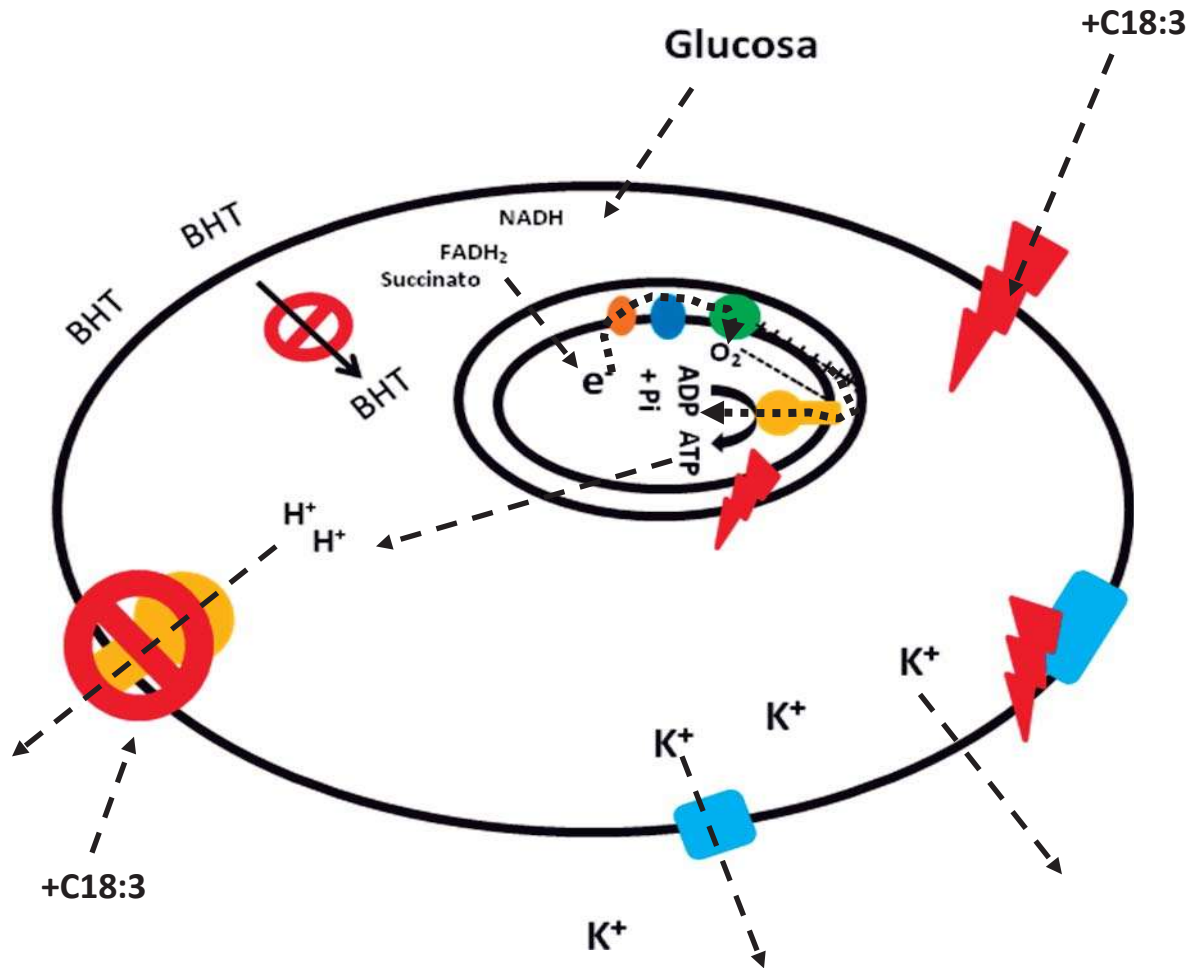
En la figura 17 se propone un modelo que explica el efecto del Fe<sup>2+</sup> sobre la fase final del metabolismo energético mitocondrial, así como algunas funciones dependientes de ATP, tomando en cuenta los resultados encontrados en el presente trabajo en levaduras -C18:3. En condiciones de nula lipoperoxidación, el  $\Delta\Psi_{mit}$  producido por el metabolismo de la glucosa se lleva a cabo hasta concentraciones de 400  $\mu\text{M}$  de Fe<sup>2+</sup>. Sin embargo, la síntesis de ATP por la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>ATP sintasa se realiza hasta concentraciones de 25  $\mu\text{M}$  de Fe<sup>2+</sup>. El ATP producido por esta enzima es utilizado por la célula para impulsar la ATPasa-H<sup>+</sup> para bombear protones hacia el medio extracelular y mantener en conjunto con el flujo de K<sup>+</sup> el pH de la célula y el gradiente electroquímico membranal, funciones que se realizan hasta concentraciones menores de 12.5  $\mu\text{M}$  de Fe<sup>2+</sup>.

En la figura 18 se propone un modelo que explica el papel adicional de la lipoperoxidación sobre el daño por Fe<sup>2+</sup> a la fase final del metabolismo energético mitocondrial, así como algunas funciones dependientes de ATP, tomando en cuenta los resultados encontrados en el presente trabajo en levaduras +C18:3. El  $\Delta\Psi_{mit}$  se inhibe a partir de una concentración de 200  $\mu\text{M}$  de Fe<sup>2+</sup>. La síntesis de ATP por la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>ATP sintasa, se inhibe a partir de una concentración menor de 3.25  $\mu\text{M}$  de Fe<sup>2+</sup>. El papel de la lipoperoxidación en la inhibición del  $\Delta\Psi_{mit}$  por Fe<sup>2+</sup> no se pudo elucidar probablemente debido a que el BHT no entro hasta la mitocondria, quedándose acumulado en la

membrana plasmática. Asimismo la actividad de la ATPasa-H<sup>+</sup> fue nula, debido posiblemente a un cambio importante en la fluidez membranal debido a la incorporación del C18:3 a las membranas de la levadura.



**Figura 17.** Modelo para explicar el mecanismo mediante el cual la resistencia a la lipoperoxidación en levaduras -C18:3 protege el establecimiento del potencial de membrana mitocondrial, la actividad de la ATPasa mitocondrial y algunas funciones dependientes de ATP de los efectos del estrés oxidativo.



**Figura 18.** Modelo para explicar el mecanismo mediante el cual la lipoperoxidación aumenta la sensibilidad del potencial de membrana mitocondrial, la actividad de la ATPasa mitocondrial y algunas funciones dependientes de ATP al estrés oxidativo.

## **7. CONCLUSIÓN**

Una mayor resistencia a la lipoperoxidación protege la fase final del metabolismo energético mitocondrial del daño por el estrés oxidativo.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

Abraham, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R. y Walter, J.E. 1994. Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*. **370**:621-628.

Avery, S.V., Howlett, N.G. y Radice, S. 1996. Copper toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: dependence on plasma membrane fatty acid composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3960-3966.

Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A. y Schagger, H.. 1998. *EMBO J.* **17**:7170-7178

Baker, K.P. y Schatz, G. 1991. Mitochondrial proteins esencial for viability mediate protein import into yeast mitochondrial. *Nature*. **349**:205-208.

Beal, M.F. 1992. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann Neurol.* **31**:119-130.

Bligh, E.G. y Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *J. Biochem. Phys.* **38(8)**:911-917.

Bossie, M.A. y Martin, C.E. 1989. Nutritional regulation of yeast Δ-9 fatty acid desaturase activity. *J. Bact.* **171 (12)** 6409-6413.

Boyer, P.D., Cross, R.L. y Momsen, W. 1973. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **70**:2837-2839.

Boyer, P.D. y Kohlbrenner, W.E. 1981. In *Energy Coupling in photosynthesis*, Eds. Selman, B.R. y Selman-Reimer, S. Elsevier, NY. 231-241.

Brenner, R.R. 1984. Effect of unsaturated fatty acids on membrane structure and enzyme kinetics. *Prog. Lipid. Res.* **23**:69-96.

Brouwer, I.A., Katan, M.B. y Zock, P.L. 2004. Dietary alpha-linolenic acid is associated with reduced risk of fatal coronary heart disease, but increased prostate cáncer risk: a meta-analysis. *J. Nutr.* **134(4)**:919-922.

Bruinenberg P.M., Jonker, J. van Dijken, J.P. y Scheffers, W.A. 1985. *Arch. Microbiol.* **142**: 302-306.

Buchet, K. y Godinot, C. 1998. Functional F<sub>1</sub>-ATPase esencial in maintaining growth and membrane of human mitochondrial DNA depleted rho degrees cells. *J. Biol.Chem.* **273**:22983-22989.

Buege, J.A. y Aust, S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods. Enzymol.* **52**, 302-310.

- Bunoust, O., Devin, A., Avéret, N., Camougrand, N. y Rigoulet, M. 2005. Competition of electron to enter the respiratory chain: a new regulatory mechanism of oxidative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **280**:3407-3413.
- Cande, W.Z y Wolniak, S.M. 1978. Chromosome movement in lysed mitotic cells is inhibited by vanadate. *J. Cell. Biol.* **79**(2): 573-580.
- Calahorra, M. Martínez, G.A. Hernández-Cruz, A. y Peña, A. 1998. Influence of monovalent cations on yeast cytoplasmic and vacuolar pH. *Yeast.* **14**:501-515.
- Cardoso, S.M. Pereira, C. y Oliveira, C.R. 1999. Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* **26**(1):3-13.
- Cederbaum, A.I. y Wainio, W.W. 1971. Binding of iron and copper to bovine heart mitochondrial. II Effect on mitochondrial metabolism. *J. Biol. Chem.* **247**(14):4604-4614.
- Christen, R., Gatti, J.L. y Billard, R. Trout sperm motility. The transient movement of trout sperm is related to changes in the concentration ATP following the activation of the flagellar movement. *Eur. J. Biochem.* **166**: 667-671.
- Colonnas, R., Massari, S. y Azzone, G.F. 1973. The Problem of Cation-Binding Sites in the Energized Membrane of Intact Mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **34**: 577-585.
- Contamine, V. y Picard, M. 2000. Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiol and Molec Biol Reviews.* **64**:281-315.
- Conway, E.J. y Malley, O. 1946. The nature of the cation exchanges during yeast fermentation, with formation of 0.02N-H ion. *Biochem. J.* **40**:59-67.
- Cortés Rojo, C. (a). 2009. Influencia de la peroxidación lipídica sobre la susceptibilidad de la cadena transporte de electrones al daño por el estrés oxidativo: Estudios en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Doctorado. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. pp. 74.
- Cortés-Rojo, C., Calderón, C.E., Clemente G, M., Estrada V.M., Manzo, A.S., Mejía, Z.R., Boldogh, I. y Saavedra, M.A. (b). 2009. Elucidation of the effects of lipoperoxidation on the mitochondrial electron transport chain using yeast mitochondria with manipulated fatty acid content. *J. Bioenerg Biomembr.* **41**:15-28.

Cortés-Rojo, C., Estrada V.M., Manzo, A.S. y Saavedra, M.A. (c). Influencia de la peroxidación de lípidos sobre el daño oxidativo mitocondrial y la integridad de *Saccharomyces cerevisiae*. Información tecnológica 20(2): 71-81.

de Vries, S. y Marres, C.A. 1987. The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. Biochim Biophys Acta. 895(3):205-239.

Demasi, A. P., Pereira, G. A. y Netto, L. E. 2001. Cytosolic thioredoxin peroxidase I is essential for the antioxidant defense of yeast with dysfunctional mitochondria. FEBS. 509 (3):430-434.

Diplock, A.T. 1994. Antioxidants and disease prevention. Mol. Aspects. Med. 15:293-376.

Eble, K. S., Coleman, W. B., Hantgan, R. R. y Cunningham, C. C. 1990. Tightly associated cardiolipin in the bovine heart mitochondrial ATP synthase as analyzed by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy. J. Biol. Chem. 265:19434-19440.

Estrada, V.M.M 2007. Influencia de la composición lipídica membranal de *Saccharomyces cerevisiae* sobre los efectos del ión Fe<sup>2+</sup> sobre la función mitocondrial. Tesis de licenciatura. Facultad de Químico-Farmacobiólogo. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. pp. 32-35.

Fenton, H.J.H. 1894. Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. J. Chem. Soc. 65:899.

Fenton, H.J.H. 1899. Oxidation of certain organic acids in the presence of ferrous salts. Proc. Chem. Soc. 15:224.

Fillingame, R.H. 1997. Coupling H<sup>+</sup> transport and ATP synthesis in F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthases: glimpses of interacting parts in a dynamic molecular machine. J. Exp. Biol. 200:217-224.

Fiske, C.A. y Subbarow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. J Biol Chem. 66:375-400.

Floyd, R.A., West, M. Hensley, K. 2001. Oxidative biochemical markers; clues to understanding ageing in long-lived species. Exp. Gerontol. 36:619-640.

Forsmark-Andrée, P., Lee, C. P, Dallner, G. y Ernster, L. 1997. Lipid Peroxidation and change in the ubiquinone content and the respiratory chain enzymes of submitochondrial particles. Free Radical Biology and Medicine. 22(3):391-400.

Fox, M. A. y Whitesell J.K. Química Orgánica. 2ª Edición. Pearson Educación. 3, 106.

Gaber, R.F., Styles, C.A. y Fink, G.R. 1988. TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 8:2848-2859.

- Gadd, G.M. 1993. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol.* **124**:25-60.
- González, H.J.C., Cárdenas, M.C.A. y Peña, A. 2004. Sodium and potassium transport in the halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast.* **21**:403-412.
- Götz, M.E., König, G., Riederer, P. y Youdim, M.B.H. 1994. Oxidative stress: free radical production in neural degeneration. *Pharmacol Ther.* **63**:37-122
- Gornall, A.G., Bardavill, C.J. y David, M.M. 1949. Determination of serum protein by means of Biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **177**: 751-760.
- Guo, J. y Lemire, B.D. 2003. The ubiquinone-binding site of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate-ubiquinone oxidoreductase is a source of superoxide. *J. Biol. Chem.* **278(48)**:47629-47635.
- Green, K., Brand, M.D. y Murphy, M.P. 2004. *Diabetes.* **53**:110-118
- Grossmann, G., Opekarová, M., Malinsky, J., Weig-Meckl, I. y Tanner, W. 2007. Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO J.* **26**:1-8.
- Guérin, B. 1989. *Mitochondria. The Yeast.* 2<sup>a</sup> ed. USA. Academic Press. 11: 541-600.
- Guérin, B., Labbe, P. y Somlo, M. 1979. Preparation of yeast mitochondria *Saccharomyces cerevisiae* with good P/O and respiratory control ratios. *Methods. Enzymol.* **55**: 149-159.
- Halliwell, B. 1992. Reactive oxygen species and central nervous system. *J. Neurochem.* **59**:1609-1623.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radical, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**:1-14.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. 1989. *Free radical in biology and medicine.* Clarendon Press, Oxford.
- Holman, R.T. 1954. Autoxidation of fats and related substances. En: *Progress in Chemistry of Fats and Other Lipids*, edited by Holman RT, Lundberg WO, Malkin T. London: Pergamon. Vol. 2. pp. 51-98.
- Howlett, N.G. y Avery, S. V. 1997. Induction of lipid peroxidation during heavy metals stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. *App Environ NG.* **63(8)**:2971-2976.

- Humphries, K.M. y Szweda, L.I. 1998. Selective inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry*. **37**:15835-15841.
- Johnson, B. y Brown, C.M. 1972. A posible relationship between the fatty acid composition of yeasts and the "petite" mutation. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* **38**:137-144.
- Kominsky, D.J., Brownson, M.P., Updike, D.L. y Thorsness, P.E. 2002. Genetic and biochemical basis for viability of yeast lacking mitochondrial genomes, *Genetic*. **162**:1595-1604.
- Kwong, J.Q., Beal, M.F. y Manfredi, G. 2006. The role of mitochondrial in inherited neurodegenerative diseases. *J. Neurochem.* **97**:1659-1675.
- Ko, C.H., Buckley, M.A. y Gaber, R. 1990. TRK2 is required for low-affinity K<sup>+</sup> transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **25**:305-312.
- Lee, Y.I., Hwang, J.M., Im, J.H., Lee, Y.I., Kim, D.G., Yu, D.Y., Moon, H.B. y Park, S.K. 2004. *J. Biol. Chem.* **279**:15460-15471.
- Lefebvre, L.L., Balguerie, A., Duvezin, C.S., Giraud, M.F., Sionimski, P.P. y Di Rago, J.P. 2003. F<sub>1</sub>-catalysed ATP hydrolysis is required for mitochondrial biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* growing under conditions where it cannot respire. *Molecular Microbiology*. **47**(5): 1329-1339.
- Legros, F., Lombes, A., Frachon, P. y Rojo, M. 2002. Mitochondrial fusion in human cell is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol. Biol. Cell.* **13**:4343-4354.
- Lehninger, A. y Kennedy, E.P. 1948. The requirements of the fatty acid oxidase complex of rat liver. *J. Biol. Chem.* **173**:753-771.
- Long, J., Liu, C., Sun, L. Gao, H. y Liu J. 2006. Neuronal Mitochondrial toxicity of malondialdehyde: inhibitory effects on respiratory function and enzyme activities in rat brain mitochondrial. *Neurochem Res.* **34**:786-794.
- Lucas, D.T., Szweda, L.I. 1998. Cardiac reperfusion injury: aging, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**(2):510-514.
- Luo, J. y Shi, R. 2005. Acroline induced oxidative stress in brain mitochondria. *Neurochem. Int.* **46**:243-252.

- Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker J. 1999. Brock Biología de los microorganismos. Printice Hall. 8ª edición.
- Martin, C.E., Oh, C. y Jiang, Y. 2007. Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast. *Biochim. Biophys.* 1771(3):271-285.
- Masini, A., Trenti, T., Ceccarelli-Stanzani, D. y Ventura, E. The effect of iron complexo n isolated rat liver mitochondria. I. Respiratory and electrochemical responses. *Bioch. Biophysica.* **810**:20-26
- McKnight, R.C. y Hunter, J.E. 1966. Mitochondrial membrane ghosts produced by lipid peroxidation induced by ferrous ion. II. Composition and enzymatic activity. *J. Biol. Chem.* 241(12):2757-2765.
- Morrison, W.R. y Smith, L.M. 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lip. Res.* **5**:600-608.
- Myher, J. J. Kuksis, A. y Pind, S. 1989. Molecular species of glycerophospholipids and sphingomyelins of human erythrocytes: improved method of analysis. *Lipids* **24**:396-407.
- Nicholls, D.G. y Ferguson, S.J. 2002 *Bioenergetics 3*. London, UK Academic Press., 5,89-156.
- Ng, Y., Barhoumi, R., Tjalkens, R.B., Fan, Y.Y., Kolar, S., Wang, N., Lupton, J.R. y Chapkin, R.S. 2005. The role of docosahexaenoic acid in mediating mitochondrial membrane lipid oxidation and apoptosis in colonocytes. *Carcinogenesis.* 26(11):1914-1921.
- Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. y Kinosita, K. 1997. Direct observation of rotation of F<sub>1</sub>-ATPase. *Nature.* **386**:299-302.
- North, J., Spector A. y Buettner G. 1992. Detection of lipid radicals by electron paramagnetic resonance spin trapping using intact cells enriched with polyunsaturated fatty acid. *J. Biol. Chem.* 267 (9): 5743-5746.
- Overkamp, K.M., Bakker, B.M., Kötter, P., van Tuijl, A, de Vries, S., van Dijken, J.P. y Pronk, J.T. 2000. In vivo analysis of the mechanisms for oxidation of cytosolic NADH by *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J Bacteriol.* 182(10):2823-2830.
- Oster, G. y Wang, H. 1999. ATP synthase: two motors, two fuels. *Structure.* 7(4):67-72.
- Pamplona, R., Portero, O.M., Riba, D., Ruiz, C., Prat, J., Bellmunt, J.P. y Barja, G. 1998. Mitochondrial membrane peroxidizability index is inversely related to maximum life span in mammals. *J. Lip Res.* **39**:1989-1994.

Pamplona, R. Portero, O.M., Riba, D., Requena, J.R., Thorpe, S.R., López, T.M. y Barja, G. 2000. Low fatty acid unsaturation: a mechanism for lowered lipoperoxidative modification of tissue proteins in mammalian species with long life spans. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **55(6)**:286-291.

Pamplona, R. Portero, O.M., Sanz, A., Requena, J.R., y Barja, G. 2004. Modification of the longevity-related degree of fatty acid unsaturation modulates oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in liver and brain. *Exp. Gerontol.* **39**:725-733.

Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese M. y Ruggiero, F.M. 2000. The effect of reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain on the cytochrome c oxidase activity and on the cardiolipin content in bovine heart submitochondrial particles. *FEBS. Lett.* **466**:323-326.

Paumard, P., Vaillier, J., Coulary, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D.M., Brethes, D., di Rago, J.P. y Velours, J. 2002. *EMBOJ.* **21**:221-230.

Practicò, D. y Delanty, N. 2000. Oxidative injury in disease of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. *Am. J. Med.* **109**:577-585

Peña, A., Cinco, G., Gómez-Puyou, A. y Tuena de Gómez, M. 1972. Effects of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **153**:413-425.

Peña, A. 1975. Studies in the mechanism of K<sup>+</sup> transport in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* **167**:397-407.

Peña, A., Uribe, S., Pardo, J.P. y Borbolla, M. 1984. The use of a cyanine dye measuring membrane potential in yeast. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **231(1)**:217-225.

Peña, A., Calahorra, M., Michel, B., Ramírez, J. y Sánchez N. 2009. Effects of amiodarone on K<sup>+</sup>, internal pH and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **9**:832-848.

Peña, A., Sánchez, N. y Calahorra, M. 2010. Estimation of the electric plasma membrane potential difference in yeast with fluorescent dyes: comparative study of methods. *J. Bioenerg Biomembr.* **42(5)**:419-432.

Pedrajas, J.R., Kosmidou, E., Miranda-Vizueté, A., Gustafsson, J.A., Wright, A.P.H. y Spyrou, G. 1999. Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **274**: 6366-6373.

Pfeiffer, K., Gohil, V., Stuart, R.A., Hunte, C., Brandt, U., Greenberg, M.L., Schagger, H. 2003. Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* **278**:52873-52880.

- Porter, N.A. 1986. Mechanisms for the oxidation of polyunsaturated lipids. *Acc. Chem. Res.* **19**:262-268.
- Rattray, J. B. M., Schibeci A. and Kidby D. K. 1975. Lipids of yeasts. *Am. Soc. Microb. Bact. Rev.* **39(3)**:197-231.
- Regnier, M., Lee, D.M. y Homsher, E. 1998. ATP analogs and muscle contraction: mechanics and kinetics of nucleoside triphosphate binding and hydrolysis. *Biophys. J.* **74**: 3044-3058.
- Rice-Evans, C.A. y Burdon, R.H. 1994. Free radicals damage and its control. 1<sup>a</sup> ed. Elsevier Science B.V. Amsterdam. pp 392.
- Romero, F.J., Bosch-Morell, F., Romero, M.J. Jareño, E.J. Romero, B. Martin, N. y Romá, J. 2005. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ. Health. Perspect.* **106**:1229-1234.
- Rothstein, A. y Demis, C. 1953. The relationship of the cell surface to metabolism. The stimulation of fermentation by extracellular potassium. *Arch. Biochem. Biophys.* **44**:18-29.
- Saavedra, M. A. y Devlin, T. M. 1997. The effect of extra- and intramitochondrial calcium on citrulline synthesis. *Amino Acids.* **12**: 293-298.
- Sabber, D., Engelbrecht, S. y Junge, W. 1997. Functional and idling rotatory motion within F<sub>1</sub>-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:4401-4405.
- Saraste, M. 1999. Oxidative phosphorylation at the *fin de siècle*. *Science.* **283**: 1488-1493.
- Schlame, M., Brody, S. y Hostetler, Y. 1993. Mitochondrial cardiolipin in diverse eukaryotes. Comparison of biosynthetic reactions and molecular acyl species. *Eur. J. Biochem.* **212**:727-735.
- Sen, T., Sen, N., Tripathi, G, Chatterjee, U. y Chakrabarti, S. 2006. Lipid peroxidation associated cardiolipin loss and membrane depolarization in rat brain mitochondrial. *Neurochem. Int.* **49**:20-27.
- Senior, A.E., Nadanaciva, S. and Weber, J. 2002. The molecular mechanism of ATP synthesis by F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP synthase. *Biochim. Biophys.* **1553**:188-211.
- Serrano, R. 1980. Effect of ATPase inhibitors on the proton pump of respiratory-deficient yeast. *Eur. J. Biochem.* **105**:419-424.
- Spector, A.A. y Yorek, M.A. 1985. Membrane lipid composition and cellular function. *J. Lipid Res.* **26**:1015-1035.

- Toshinobu, A., y Kuniki, K. 2010. New L-amino acid ligases catalyzing oligopeptide synthesis from various microorganisms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74 (8): 1572-1577.
- Turrens, J.F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species *J Physiol.* 552(2):335-344.
- Valentin, E., Herrero, Rocio, H., Miragall, F. y Sentadreu, R. 1987. Cell wall mannoproteins during the population growth phases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 148, 88-94.
- Vazquez, M. M. y Tuena de P. M. 2002. Mitocondria. Una mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos. Ed Prado.
- van Dijken, J.P. y Scheffers, W.A., 1986. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 199-225.
- van Loon, A.P.G.M., Pesold-Hurt, B. y Schatz, G. 1986. A yeast mutant lacking mitochondrial manganese-superoxide dismutase is hypersensitive to oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:3820-3824.
- Velours, J. and Arselin, G. 2000. The *Saccharomyces cerevisiae* ATP synthase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32:383-390
- Voet, D. y Voet, J. 2006. *Bioquímica*. 3ª edición. Ed. Medica Panamericana.
- Whittaker, P.A. y Danks S.M. (1982). *Mitocondria: Estructura, función y formación*. Editorial C.E.C.S.A.
- Wittig, I. y Schägger, H. 2009. Native electrophoretic techniques to identify protein-protein interactions. *Proteomics.* 9(23):5214-5223.
- Zhang, Yin. Marcillat, O., Giulivi, C., Ernster, L. y Davies, K.J.A. 1990. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J. Biol. Chem.* 27: 16330-16336.