

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS  
DE HIDALGO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

**INFLUENCIA DE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA  
MEMBRANAL DE *Saccharomyces Cerevisiae* SOBRE  
LOS EFECTOS DEL IÓN  $Fe^{2+}$  SOBRE LA FUNCION  
MITOCONDRIAL**

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO PROFESIONAL DE  
**QUÍMICO – FARMACOBIOLOGA**

PRESENTA:

**MARIA MIRELLA ESTRADA VILLAGÓMEZ**

ASESORES:

**D.C. ALFREDO SAAVEDRA MOLINA  
M.C. CHRISTIAN CORTÉS ROJO**

MORELIA, MICHOACÁN., AGOSTO DE 2007.



*“Sólo puedo crecer hasta donde yo pueda saltar, sólo puedo llegar hasta donde pueda buscar, sólo puedo penetrar hasta donde quiera ver y sólo puedo ser lo que pueda soñar”*

*Karen Ravin*

***“Bueno es ir a la lucha con determinación, abrazar a la vida y vivir con pasión, perder con clase y vencer con osadía, por que el mundo pertenece a quien se atreve y la vida es mucho para ser insignificante”***

***Chaplin***

## DEDICATORIA

A **Dios** por la bendición de haberme permitido llegar hasta este momento de mi vida.

A mis **padres** que con su sabiduría y fortaleza me inspiraron para ser lo mejor que puedo ser.

**Araceli:** por el amor y el entusiasmo que como madre me diste durante este y todos los proyectos de mi vida.

**Leonel:** por el amor y apoyo incondicional que me entregaste durante este largo camino, gracias por estar siempre conmigo.

A mis **hermanos Omar y Laura:**

**Omar:** por tu apoyo que como hermano me brindas siempre y por todo el amor que me entregas.

**Laura:** por siempre estar conmigo apoyándome y preocupándote por mí.

A el **QFB. Gerardo Morán López** por la amistad y apoyo brindado siempre.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Alfredo Saavedra Molina** por su asesoría y apoyo en todo momento durante la realización de este trabajo y por darme la oportunidad de realizarlo.

Al **MC. Christian Cortés Rojo** por la asesoría, apoyo, consejos y sobre todo por la amistad brindada durante la realización de este trabajo. Pero sobre todo por ser parte importante de este proyecto.

A mis sinodales y revisores: **DC. Rosalío Mercado Camargo, MC. Elizabeth Calderón Cortés, MC. Héctor Urquiza Marín y DC. Carlos Sosa Aguirre.**

A la **QFB. Mónica Clemente Guerrero** por el apoyo técnico brindado en el transcurso del desarrollo de esta tesis.

A **Elizabeth, Alma y Alberto** por el apoyo y las sugerencias brindadas en la realización de algunos experimentos.

A mi amiga **Rosalía** por su amista y apoyo incondicional durante toda la carrera y por compartir juntas este camino.

A mis amigos **Alma, Paty, Rubí, Mary, Martha, Bricia, Mónica, Cristina y Luis Felipe** por su amistad.

A **Víctor** por ser parte importante de mi vida y por tu amistad incondicional.

A la **Facultad de Químico-Farmacobiología**, por haber sido el pilar de esta formación académica, así como al **Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas** de la UMSNH por esta oportunidad.

A fondos mixtos **CONACYT-Gobierno de Michoacán (64277)**.

---

---

**ÍNDICE**

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
1.1. Importancia de las levaduras.....	2
1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	3
1.2.1. Fisiología de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	5
1.3. La mitocondria.....	5
1.3.1. Cadena respiratoria.....	8
1.3.2. Estados respiratorios de las mitocondrias.....	10
1.3.3. Desacoplantes de la cadena respiratoria.....	13
1.4. Radicales libres.....	14
1.5. Estrés oxidativo.....	16
1.6. Ácidos grasos.....	17
1.6.1. Ácido linolénico.....	18
1.6.2. Daño membranal.....	19
1.7. Agentes oxidantes.....	21
1.7.1. Ácido ascórbico.....	21
1.7.2. Ión Ferroso.....	21
<b>2. HIPÓTESIS.....</b>	<b>24</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
3.1. Objetivo general.....	24
3.2. Objetivos específicos.....	24
<b>4. MATERIALES y MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
4.1. Reactivos.....	25
4.2. Aislamiento de esferoplastos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	25
4.3. Incorporación de ácidos grasos en <i>S. cerevisiae</i> .....	26
4.4. Inducción del estrés oxidativo.....	26
4.5. Medición del consumo de oxígeno.....	27
4.6. Ensayo de lipoperoxidación.....	27
4.7. Viabilidad celular.....	28
4.7.1. Ensayo con Azul de Tripano.....	28
4.8. Células petite.....	29
4.9. Procesamiento estadístico.....	29

---

---

---

---

5. RESULTADOS.....	30
5.1. Efecto del ión Ferroso sobre la respiración mitocondrial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	30
5.2. Efecto del sistema Ascorbato/ $\text{Fe}^{2+}$ y la composición lipídica sobre los niveles de lipoperoxidación.....	34
5.3. Efecto del grado de insaturación de los ácidos grasos sobre la viabilidad de los esferoplastos de <i>S. cerevisiae</i> bajo condiciones de estrés oxidativo.....	36
5.4 Efecto del estrés oxidativo causado por el ión $\text{Fe}^{2+}$ sobre la viabilidad celular.....	39
5.5 Viabilidad celular dependiente de la función mitocondrial.....	41
6. DISCUSIÓN.....	46
7. CONCLUSIONES.....	49
8. BIBLIOGRAFÍA.....	50

## RESUMEN

En los organismos aerobios, las especies reactivas del oxígeno (ERO) se producen principalmente a nivel de la cadena respiratoria mitocondrial, causando daño en los componentes de la misma. Este aspecto es de importancia debido a su participación en algunas patologías. De especial interés en la disfunción mitocondrial por el estrés oxidativo es la lipoperoxidación de los lípidos de las membranas mitocondriales en las que se encuentran embebidos los componentes del transporte de electrones. Las membranas mitocondriales de *Saccharomyces cerevisiae* están compuestas por lípidos monoinsaturados, lo cual las hace particularmente resistentes a la lipoperoxidación. Asimismo, la composición lipídica de las membranas de la levadura puede ser manipulada mediante la adición de lípidos poliinsaturados al medio de cultivo. Estas propiedades de la levadura permiten estudiar el papel de la composición lipídica de las membranas mitocondriales en los efectos del estrés oxidativo sobre la funcionalidad mitocondrial.

Al ser modificada la composición lipídica membranal de las células de *Saccharomyces cerevisiae* con ácido linolénico, se observó que el aumento en la susceptibilidad de las membranas lipídicas al tratamiento con  $\text{Fe}^{2+}$  se vio reflejada en niveles más altos de lipoperoxidación. Lo anterior podría estar relacionado con un incremento en la sensibilidad de la función mitocondrial y la viabilidad celular hacia los efectos dañinos del estrés oxidativo inducido por el  $\text{Fe}^{2+}$ . Relacionándose esto con el aumento en los niveles de lipoperoxidación.



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 . Importancia de las levaduras

Las levaduras han servido al hombre durante siglos para fermentar jugos, frutas, pan o elaborar muchos alimentos nutritivos; en la actualidad se han utilizado en la síntesis de algunas vitaminas, grasas y proteínas [32].

Las levaduras son los microorganismos más importantes y más ampliamente utilizados en la industria. La producción de células de levaduras y de alcohol por levaduras, son dos procesos industriales muy diferentes. Difieren en que el primero requiere la presencia de oxígeno para tener la máxima producción de material celular y por tanto es un proceso aeróbico, mientras que la fermentación alcohólica es anaeróbica y sólo tiene lugar en ausencia de oxígeno [32].

Las levaduras también han contribuido al progreso científico por ser un buen modelo para el estudio y aclaración de los procesos bioquímicos y metabólicos básicos de las células eucariontes. Tal elección no es sorprendente ya que las levaduras se pueden obtener en grandes cantidades y son fáciles de manipular [1]. Es posible alterar la levadura genéticamente, en el laboratorio utilizando métodos de intercambio genético para producir cepas con propiedades deseadas, a partir de dos cepas parentales distintas [32].

Las levaduras más importantes desde el punto de vista industrial son las cepas cerveceras y panaderas de la especie *Saccharomyces cerevisiae* [32], constituyendo una de las levaduras que más abundan en la naturaleza (suelo, agua, frutas, zumos), por lo que muchos de los procesos eucarióticos pueden ser estudiados en esta levadura por técnicas biológicas (genéticas, fisiológicas) que no son posibles en organismos eucariontes pluricelulares. Estos procesos incluyen división celular, metabolismo del ARN<sub>m</sub>, localización de proteínas, diferenciación celular y las funciones de oncogenes [2]; además, *Saccharomyces cerevisiae* es el primer eucarionte que tiene completamente secuenciado su genoma [3], que es 200 veces mayor que el de los mamíferos

---

---

---

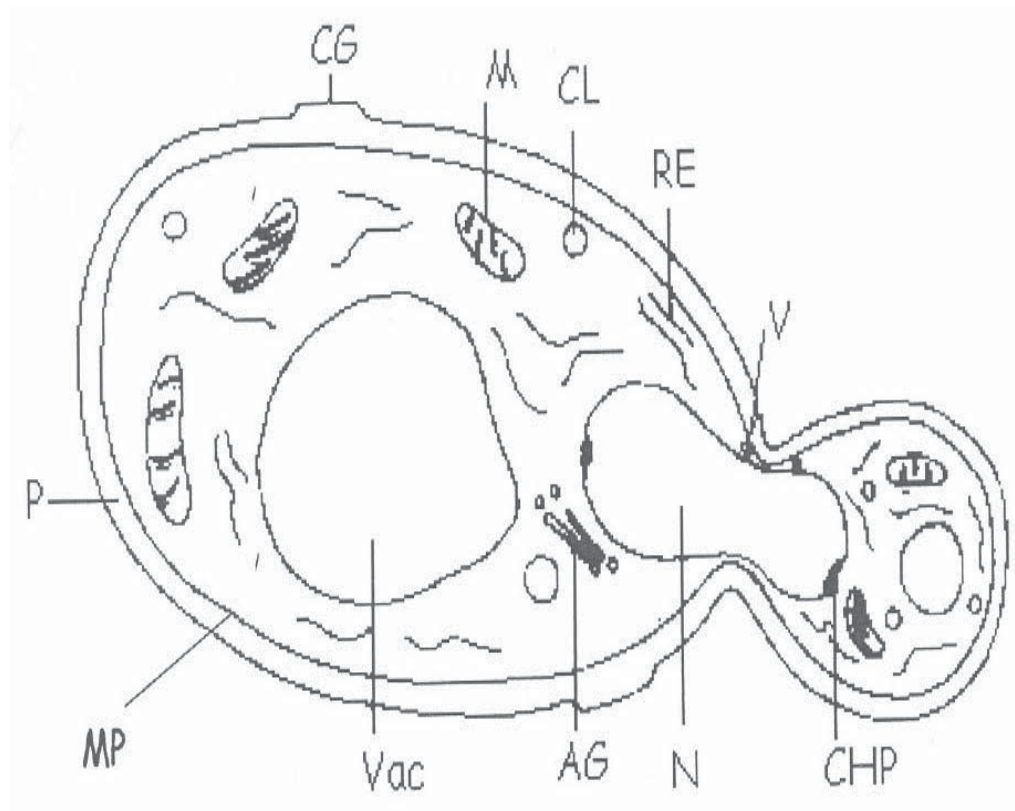
( $3.5 \times 10^9$  pb en mamíferos y  $1.4 \times 10^7$  pb en la levadura), por lo que fue secuenciado rápida y recientemente publicada en 1996 [9].

## 1.2. *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo unicelular eucarionte perteneciente al reino Fungi, sub-reino Amastigomycota donde se agrupan aquellos hongos que producen esporas sexuales y asexuales (hongos perfectos) y que son habitantes comunes de hábitats terrestres. Dentro del sub-reino amastigomycota, *S. cerevisiae* está comprendida dentro de la división Ascomycota por su capacidad de producir ascoesporas durante su ciclo de vida sexual [4]. *S. cerevisiae* ha sido considerada como un hongo dimórfico pues produce por gemación células esféricas individuales denominadas levaduras o en ausencia de nitrógeno, estructuras pseudohifales [5].

Las estructuras que forman las células de la levadura *S. cerevisiae* son básicamente las mismas que forman las de otros eucariontes, tales como: cápsula, pared celular, membrana citoplasmática, núcleo, vacuolas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, lisosomas, mitocondrias unidas formando una red [6] y a diferencia de las células de los mamíferos, poseen una pared celular externa compuesta principalmente por glucano y manoproteínas [7], (esquema 1).

Microscópicamente *S. cerevisiae* es de forma esférica a ovoide y mide aproximadamente de 3 a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro. Macroscópicamente en medio sólido, produce colonias pastosas, opacas y generalmente llegan a medir de 0.5 a 3 nm de diámetro, son de color crema, ligeramente elevadas, lisas y plegadas [8]. La levadura se desarrolla mejor en medios de cultivo con reacción ácida a un pH que oscila entre 3.5 y 3.8 en donde se inhiben casi todas las bacterias vecinas y a una temperatura óptima de 30°C.



**Esquema 1. Estructura general de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en proceso de gemación.** (P) pared; (MP) membrana plasmática; (V) vacuola; (CG) cicatriz gemante; (M) mitocondria; (CL) cuerpo lipídico; (AG) aparato de Golgi; (RE) retículo endoplásmico; (V) vesícula; (CHP) corpúsculo huso polar, (N) núcleo. Tomado y adaptado de: *The Biology of the Cellular Cycle*. J.M. Mitchison, 1962. [65].

*Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo aerobio facultativo, por lo tanto, crece bajo condiciones anaerobias en presencia de una fuente de carbono fermentable, lo que permite obtener células de levadura que pueden crecer aún con mutaciones en el ADN mitocondrial que causen deficiencias respiratorias debido al daño a una o algunas funciones específicas [10]. De este modo, se puede determinar si la función mitocondrial se encuentra involucrada en algún fenómeno en particular.

### **1.2.1. Fisiología de *Saccharomyces cerevisiae***

En *S. cerevisiae*, se pueden encontrar diferentes reacciones fisiológicas, aspectos morfológicos y mecanismos de reproducción [1].

Los procesos de generación de energía, a través del catabolismo de moléculas de glucosa, son aeróbico o anaeróbico; así, las levaduras como *S. cerevisiae* tienen la capacidad de llevar a cabo dos formas diferentes de metabolismo: la fermentación y la respiración [14].

Cuando el oxígeno está ausente, da como resultado una reducida producción celular, pero significantes cantidades de alcohol (etanol); por otra parte, cuando el oxígeno está presente, las levaduras crecen eficientemente en glucosa como sustrato, habiendo gran producción celular y generándose CO<sub>2</sub> [13]. Por lo tanto, la velocidad de crecimiento depende de la presencia de O<sub>2</sub> y también determina los diferentes tipos de metabolismo [14].

### **1.3. La mitocondria**

Las mitocondrias son orgánulos citoplásmicos presentes en las células eucariontes [15]. Las mitocondrias son las centrales energéticas de la célula, ya que por medio de reacciones acopladas de oxidación y reducción, captan la energía contenida en las moléculas combustibles y producen otras formas de energía química [16]. Su número por célula es relativamente constante y característico para cualquier tipo de célula determinado, pero puede cambiar con el estado de desarrollo o con la actividad funcional. Las mitocondrias se

---

---

---

---

dividen por fisión, después de que ha tenido lugar la división celular. Con frecuencia, las mitocondrias se encuentran en las proximidades de las estructuras que necesitan del ATP, o cercanas a una fuente de combustible, de la que dependen. A menudo, también se encuentran localizados en posición adyacente a las gotitas de grasa citoplasmática, que actúa como fuente de ácidos grasos, combustible para la oxidación. Las mitocondrias pueden constituir una fracción relativamente grande de volumen citoplasmático; por ejemplo, en células hepáticas se eleva a cerca de 22% [33].

Las mitocondrias son estructuras de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de grosor, con forma distintiva filamentosa o granular. El modelo típico de la mitocondria consiste en dos membranas, una externa que es lisa y otra interna que presenta numerosas invaginaciones conocidas como crestas (que se proyectan hacia el interior de la mitocondria y que, a menudo, llegan casi hasta el otro lado de la misma [25]), con lo que se forman dos compartimentos, uno externo que corresponde a un espacio limitado por dos membranas denominado espacio intermembranal y otro espacio interno, limitado solamente por la membrana interna llamado matriz mitocondrial [17]. Sin embargo, la aparición de técnicas de microscopía electrónica en tres dimensiones ha probado que el modelo anterior es inexacto [18].

Las imágenes obtenidas mediante tomografía microscópica electrónica de mitocondrias de hígado de rata muestran que las crestas no están formadas por los plegamientos de la membrana interna mitocondrial, sino que son cisternas con un diámetro aproximado de 30-40 nm con forma tubular o aplanada, las cuales están conectadas entre sí y a la superficie periférica de la membrana interna mitocondrial mediante estructuras tubulares de aproximadamente 28 nm de diámetro, siendo la superficie de la membrana interna y las crestas una superficie continua [19]. Además, existen sitios de contacto entre las membranas mitocondriales interna y externa a lo largo de la periferia de la mitocondria. Dichos sitios tienen un tamaño aproximado de 14-40 nm y esto sugiere que los sitios podrían representar ensamblajes macromoleculares para el transporte de metabolitos, iones y proteínas a través

---

---

de las membranas externa e interna. Esta idea se ve reforzada por el hecho de que las membranas en los sitios de contacto no se encuentran fusionadas [20].

La membrana interna esta formada por aproximadamente un 70% de proteínas y un 30% de lípidos, lo cual hace que tal vez sea la membrana biológica con mayor abundancia de proteínas [25]. En cambio, la membrana externa está compuesta por alrededor del 30-40% de lípidos y el resto de proteínas [22]. Un gran grupo de proteínas completamente diferentes están unidas a la membrana externa, entre las que se encuentran las enzimas de la oxidación de los aminoácidos, las de la elongación de los ácidos grasos, las de la biosíntesis de los fosfolípidos de la membrana y las de las hidroxilaciones enzimáticas [25]. Su principal componente incluye a una proteína de 283 residuos de aminoácidos denominada canal aniónico dependiente del voltaje (VDAC por sus siglas en ingles) o porina, cuya función es formar un canal acuoso para el movimiento de metabolitos de naturaleza aniónica (P. Ej: fosfato, ADP, ATP, piruvato) hacia adentro y afuera de la mitocondria. El VDAC se une de manera reversible a cinasas como glicerol cinasa y la hexocinasa [23,24].

Las mitocondrias de tejidos tales como corazón y riñón, que tienen ritmos respiratorios elevados, poseen numerosas crestas, y de aquí que el área superficial de la membrana interna sea relativamente grande; en correspondencia, tienen un número elevado de conjuntos respiratorios. Las mitocondrias de células con ritmos respiratorios bajos como el hígado, poseen menos crestas, un área superficial menor y menos conjuntos respiratorios [33].

En *S. 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 [21].

---

---

La membrana interna mitocondrial es libremente permeable a el  $O_2$ , el  $CO_2$  y el  $H_2O$  [26], a diversas moléculas neutras pequeñas, tales como la urea, el glicerol y a ácidos grasos de cadena corta. No es permeable a los cationes  $Na^+$ ,  $K^+$  o  $Mg^{2+}$ , ni a los aniones  $Cl^-$ ,  $Br^-$  o  $NO_3^-$ , ni a los azúcares tales como la sacarosa, ni a la mayor parte de los aminoácidos [33]. Esto permite el establecimiento del potencial transmembranal ( $\Delta\Psi$ ) y evita pérdidas en el mismo, debidas a la tendencia termodinámica de los iones a igualar las cargas eléctricas y su concentración en ambos lados de la membrana. Otra particularidad de la membrana interna mitocondrial es la presencia exclusiva de cardiolipina. Este fosfolípido tiene un papel importante en la mitocondria optimizando la actividad de algunos complejos de la cadena respiratoria y algunos acarreadores iónicos [27,28]. Esta membrana aloja a la ATP sintetasa y a los complejos proteicos que componen la cadena transportadora de electrones.

Por su parte, la matriz mitocondrial contiene una gran cantidad de enzimas solubles, que participan en fenómenos metabólicos de gran importancia, como son el ciclo de Krebs y la oxidación de los ácidos grasos. También en la matriz mitocondrial se encuentra el ADN mitocondrial y la maquinaria necesaria para la replicación, la transcripción y la síntesis de algunas proteínas mitocondriales (ribosomas, ARN de transferencia) [29]. Además, la matriz mitocondrial contiene numerosas enzimas implicadas en la biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos [21] y algunas enzimas involucradas en los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo tales como la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD) [30] o las del sistema de tioredoxina [31].

### **1.3.1. Cadena respiratoria**

La cadena respiratoria es un ensamblaje de más de 20 captadores de electrones que se encuentran principalmente asociados, ya sea de manera covalente o no covalente, a estructuras proteicas oligoméricas que forman grandes complejos enzimáticos embebidos de manera parcial en la membrana interna de la mitocondria. Se presume que los transportadores adyacentes de

---

---

---

---

la cadena están orientados de modo que sus grupos prostéticos puedan establecer contacto mediante movimientos vibratorios o rotatorios limitados [33]. Tres de estos complejos (I, III y IV) funcionan como bombas redox de electrones, acoplando el transporte de electrones a la traslocación vectorial de protones [35].

El modo en que los complejos respiratorios se encuentran organizados a nivel molecular ha sido tema de debate, ya que se han planteado dos modelos: uno donde los componentes de la cadena respiratoria son libres de difundir lateral e independientemente uno del otro en el plano de la membrana y donde la transferencia de electrones está acoplada a colisiones entre los componentes [36,37]. El otro modelo propone que los componentes respiratorios están organizados como un ensamblaje macromolecular ordenado [38].

Los complejos I, II, III y IV aceptan electrones desde un transportador electrónico relativamente móvil y pasan los electrones a otro transportador móvil. Estos transportadores móviles son el NADH, el succinato, la coenzima Q y el citocromo c. La energía liberada por las acciones de los complejos I, III y IV impulsan la síntesis de ATP por el complejo V, denominado complejo ATP sintasa [25].

El complejo I y el complejo II reciben electrones de la oxidación del NADH y del succinato, y los pasa a un transportador electrónico lipídico, la coenzima Q, que se desplaza libremente a través de la membrana. El complejo III oxida la forma reducida de la coenzima Q y reduce a su vez el citocromo c, un transportador electrónico proteico que también puede desplazarse por el interior de la membrana interna. Por ultimo, el complejo IV acopla la oxidación del citocromo c con la reducción del O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O. El bombeo de protones por las proteínas respiratorias crea un gradiente electroquímico, que establece un potencial eléctrico. La porción F<sub>0</sub> del complejo se extiende a través de la membrana interna y posee un canal específico para el regreso de los protones a la matriz mitocondrial. La energía libre que se libera cuando el H<sup>+</sup> pasa por este canal para regresar a la matriz, se aprovecha para impulsar la síntesis de

---

---



---

---

ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico, catalizada por el componente  $F_1$  del complejo [25].

Lo que se suele medir normalmente en la relación P/O, es el número de moléculas de ATP sintetizadas por par de electrones transportados a través del transporte electrónico [25].

### 1.3.2. Estados respiratorios de las mitocondrias

La fosforilación oxidativa solo puede producirse en presencia de cantidades adecuadas de sustratos. Se controla por la disponibilidad del sustrato. Estos sustratos incluyen el ADP, el  $P_i$  y el  $O_2$ , y metabolitos oxidables que pueden generar transportadores electrónicos reducidos como el NADH y/o  $FADH_2$  [11].

La dependencia de la fosforilación del ADP revela una característica general importante de este proceso: la respiración está estrechamente acoplada con la síntesis de ATP. No solo existe una dependencia absoluta de la síntesis de ATP con respecto al flujo continuo de electrones de los sustratos hasta el oxígeno, sino que el flujo electrónico en las mitocondrias normales se produce tan solo cuando se sintetiza también ATP. Este fenómeno regulador, es denominado control respiratorio [11].

En la mayor parte de las células aerobias, la concentración de ATP supera a la de ADP entre 4 y 10 veces. Si las demandas energéticas hacen que se consuma el ATP de manera rápida, la acumulación resultante de ADP estimulará la respiración, con la consiguiente activación de la resíntesis de ATP. El control respiratorio se demuestra valorando la utilización de oxígeno en las mitocondrias aisladas (esquema 2). En ausencia de adición de sustrato o ADP, la captación de oxígeno causada por la oxidación de los sustratos endógenos es lenta (estado 4 de la respiración). Sin embargo, si se añade ADP, la captación de oxígeno se produce con una velocidad muy superior (estado 3 de la respiración), hasta que todo el ADP añadido se ha convertido

---

---

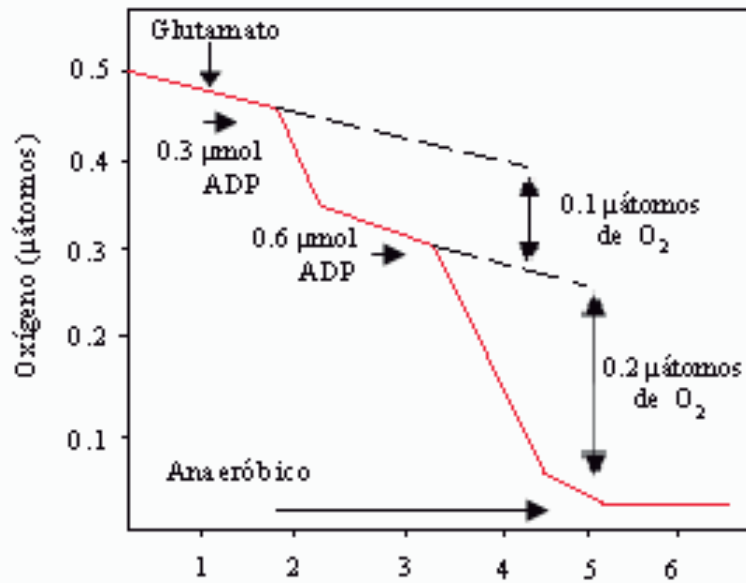
---

---

en ATP, con lo que la captación de oxígeno regresa a la situación basal. Esta estimulación de la respiración es estequiométrica, es decir, la adición del doble de ADP hace que aumente al doble la cantidad de oxígeno a la velocidad aumentada [11].

El mantenimiento del control respiratorio depende de la integridad estructural de la mitocondria. La ruptura del orgánulo hace que el transporte electrónico se desacople de la síntesis de ATP. En estas condiciones, la captación de oxígeno se produce con una velocidad elevada, incluso en ausencia de adición de ADP. La síntesis de ATP está inhibida, a pesar de que los electrones pasen por la cadena respiratoria y se utilicen para reducir el O<sub>2</sub> a agua [25].

Un parámetro que refleja la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial es el cociente respiratorio. Este valor se obtiene dividiendo la velocidad de respiración en el estado U entre la velocidad en el estado 4. Si la velocidad en estado 4 aumenta de tal modo que se aproxime a la velocidad en el estado U, el cociente respiratorio puede disminuir hasta un valor de 1 y ello es indicativo de un aumento en la permeabilidad de los protones a través de la membrana interna mitocondrial. En las mitocondrias recién aisladas con cuidado, el cociente respiratorio de la captación de oxígeno en presencia o ausencia de ADP añadido, las velocidades de captación de O<sub>2</sub> puede ser de hasta 10. En cambio, en las mitocondrias envejecidas o rotas pueden dar cocientes de tan solo 1, indicativos de una ausencia de acoplamiento. La adición de un desacoplador, estado U de la respiración de las mitocondrias, estimula la utilización del oxígeno, incluso en ausencia de adición de ADP [25].

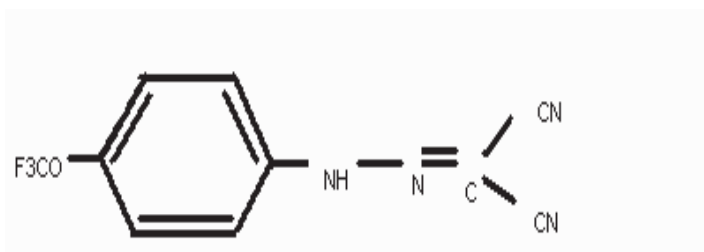


**Esquema 2. Captación de oxígeno en mitocondrias cuidadosamente preparadas. Tomado y modificado de Mathews [25].** La adición de sustrato exógeno oxidable (glutamato) estimula la respiración tan solo ligeramente, a no ser que se añada también ADP. La segunda adición es el doble de cantidad que la primera, para demostrar que la captación es estequiométrica. La captación lenta de oxígeno al comienzo se debe a los sustratos endógenos de la mitocondria. El ADP estimula la respiración hasta que todo el ADP se ha convertido en ATP. La captación de oxígeno se registra en  $\mu\text{átomos}$ , ya que un par de electrones reduce un átomo de O y no una molécula de  $\text{O}_2$ .

### 1.3.3. Desacoplantes de la cadena respiratoria

La fosforilación oxidativa puede dissociarse de la respiración por un grupo de agentes químicos específicos, entre los que se encuentran el 2,4-dinitrofenol (DNP) y la trifluorocarbonilcianuro fenilhidrazona (FCCP). En presencia de estos agentes la respiración de un tejido puede continuar normalmente o aún estimularse, pero no tiene lugar la fosforilación oxidativa acoplada del ADP al ATP. Por esta razón estos agentes se llaman agentes desacoplantes o protonóforos o desacopladores [25,33]. La mayor parte son sustancias liposolubles que contienen un anillo aromático y un grupo ácido ionizable. Estos agentes no desacoplan la fosforilación glucolítica ni afectan otras reacciones celulares, solo la fosforilación oxidativa. Los agentes desacoplantes se han transformado en herramientas muy importantes en el estudio de las transformaciones energéticas celulares [33].

Debido a su lipofilicidad, estos desacoplantes pueden atravesar la membrana protonados o no, dependiendo de la carga del interior, que en la matriz mitocondrial es negativa y positiva en el espacio intermembranal debido al  $\Delta pH$  generado por el gradiente de protones. La carga negativa de la matriz atraerá a la especie protonada del desacoplante dejando en el interior el protón y retornando al exterior para adquirir un nuevo protón estableciendo un corto circuito de protones que descarga la energía del gradiente, lo que estimula la respiración e inhibe la síntesis del ATP [47].



Esquema 3. Molécula del desacoplante FCCP. Tomado y modificado de Mathews [25].

---

---

## 1.4. Radicales libres

Un radical libre es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados ya sea por pérdida o ganancia de ellos. La presencia de electrones desapareados modifica la reactividad química de un átomo o de una molécula y los hace extremadamente inestables y reactivos, que su correspondiente no radical [34].

La mayoría de los radicales libres de interés para la biología o la medicina son los derivados del oxígeno o Especies Reactivas del Oxígeno (ERO); entre ellos están los singuletes delta y sigma del oxígeno ( $^1O_2$ ), el radical superóxido ( $O_2\bullet^-$ ) y el radical hidroxilo ( $OH\bullet$ ) [34].

El radical libre  $O_2\bullet^-$  es producto de la reducción parcial de oxígeno y posee un electrón desapareado en el orbital  $\pi 2p$ , por lo que es más reactivo que el oxígeno. En la mayoría de los casos es precursor del  $H_2O_2$  gracias a la actividad de la enzima superóxido dismutasa, la cual convierte el  $O_2\bullet^-$  en  $H_2O_2$  [39]. El  $O_2\bullet^-$  tiene una amplia actividad y versatilidad desde el punto de vista de su reactividad en los sistemas biológicos, porque actúa como agente reductor donando electrones, pero puede tener carácter como ligando, base, oxidante o reductor [40].

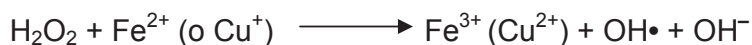
El  $H_2O_2$  puede atravesar las membranas biológicas y difundir a cierta distancia de donde es generado y es removido por la enzima catalasa y la glutatión peroxidasa que lo convierten en  $H_2O$  y  $O_2$  [25].

Otro generador del radical  $O_2\bullet^-$  son las oxidasas, que se forma a partir de una reducción de un electrón del  $O_2$ . El peróxido de hidrógeno que se forma a partir de una reducción de dos electrones y el radical hidroxilo por la reducción de tres electrones. Además, algunas enzimas como la xantina oxidasa y las aminoácido oxidasas generan  $H_2O_2$  como producto de su acción [25].

---

---

El peróxido de hidrógeno es el precursor del radical hidroxilo, considerado la ERO más dañina; el radical hidroxilo (OH•) es generado en los sistemas biológicos mediante la reacción de Fenton o como resultado de la radiación ionizante y representa el mutágeno más activo de dicha radiación. La reacción de Fenton consiste en la conversión de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a OH• catalizada por metales de transición en estado reducido (por ej. Fe<sup>2+</sup>).



El radical hidroxilo daña a las proteínas de varias formas y daña a las membranas iniciando el proceso de oxidación lipídica de los ácidos grasos en los lípidos de las membranas, también daña a los ácidos nucleicos, produciendo la ruptura de las cadenas de polinucleótidos y cambiando la estructura de las bases de DNA.

El superóxido tiene una toxicidad relativamente baja, sin embargo, como contiene electrones desapareados, se combina con facilidad con otro radical libre, el óxido nítrico (NO•), un agente biológico de señalización que se produce en muchos tejidos animales. El producto es el peroxinitrito (OONO<sup>-</sup>), que se considera también una especie reactiva de nitrógeno [25]. El óxido nítrico es un segundo mensajero intracelular y participa en la regulación de la presión sanguínea; pero cuando se produce en exceso, puede ocasionar daño tisular en varias enfermedades incluso choque séptico [34].

El metabolismo celular normal produce ERO en cantidades muy elevadas; se calcula que del oxígeno respirado, del 1-3% es usado para formar radical superóxido y se calcula que la producción de superóxido en el ser humano es de unos 0.02 picomoles por célula por día, 0.15 moles en todo el cuerpo. Se ha calculado que entre un 1-2% de todos los electrones que entran en la cadena respiratoria no llegan nunca a la citocromo oxidasa, sino que se desprenden de los complejos I, III y IV, principalmente de los centros hierro-azufre, y llevan a cabo reducciones de un electrón a superóxido [25].

---

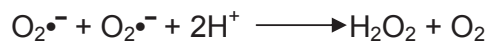
---

## 1.5. Estrés oxidativo

El término estrés oxidativo describe un desbalance entre la producción de especies oxidantes y las defensas antioxidantes. El estrés oxidativo puede ser el resultado de la pérdida de antioxidantes y/o el incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) [41], en la cual existe daño celular, que llega a ser muy severo y puede conducir a muerte celular [42].

En las células y en los organismos en condiciones naturales, se mantiene en equilibrio la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes, de manera que la toxicidad del oxígeno sólo se produce en estados patológicos o en el envejecimiento. Existen sistemas protectores en las células que evitan el incremento excesivo de especies oxidantes indeseables [34]. Dentro de estos sistemas protectores está la protección no enzimática que proporcionan los compuestos antioxidantes, entre los que se encuentran el glutatión, el ácido úrico y las vitaminas C y E. Estos compuestos pueden eliminar las ERO antes de que puedan producir daños, o pueden evitar que se disperse el daño oxidativo. La vitamina E es una familia de compuestos de los cuales el más común es el  $\alpha$ -tocoferol, que constituyen el principal compuesto antioxidante liposoluble que desempeña una función importante en la prevención de daño de las membranas. El  $\beta$ -caroteno y otros compuestos carotenoides relacionados con la vitamina A, son antioxidantes liposolubles. La vitamina C es un antioxidante importante debido a su hidrosolubilidad y su fácil oxidación a ácido deshidroascórbico [25].

Entre los mecanismos enzimáticos, la primera línea de defensa es la superóxido dismutasa (SOD), una familia de metaloenzimas que catalizan una dismutación. En este caso, una molécula de superóxido se oxida y otra se reduce.



---

---

El peróxido de hidrógeno se metaboliza por la catalasa. La catalasa cataliza la siguiente reacción:



Dentro de los eritrocitos se encuentra la glutatión peroxidasa, una enzima que acopla la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a agua, con la oxidación del glutatión.



En algunos casos, la producción de ERO no es un fenómeno indeseable si no forma parte del funcionamiento normal de una célula. Así, por ejemplo, determinados leucocitos contribuyen a la defensa frente a agentes infecciosos mediante la fagocitosis, seguido de una explosión respiratoria estimulando la producción de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  [25].

## 1.6. Ácidos grasos

Los ácidos grasos son componentes importantes de la dieta de los animales superiores y del hombre. Constituye no sólo un aporte energético considerable sino que además tienen varias funciones metabólicas específicas [49]. Dentro de las funciones de los ácidos grasos se encuentran la de componentes de las membranas celulares, hormonas, vitaminas liposolubles, aislantes térmicos y reguladores biológicos como las prostaglandinas [25].

Las levaduras generalmente abundan en ácidos grasos. Un total de 33 ácidos grasos, desde el C8 al C26 se han detectado en *S. cerevisiae*, teniendo una preponderancia de los ácidos grasos monoinsaturados C16:1 Y C18:1.

Con solo pocas excepciones, los ácidos grasos son compuestos de cadena recta de tres a dieciocho carbonos [50]. Los ácidos grasos insaturados tienen al menos un doble enlace. Todos los dobles enlaces de los ácidos oleico, linoleico y linolénico, tienen la configuración *cis*, la cual tiene la disposición de los ácidos grasos saturados [48]. Estos ácidos grasos tienden a ser líquidos a temperatura corporal, se absorben con facilidad, mientras que los



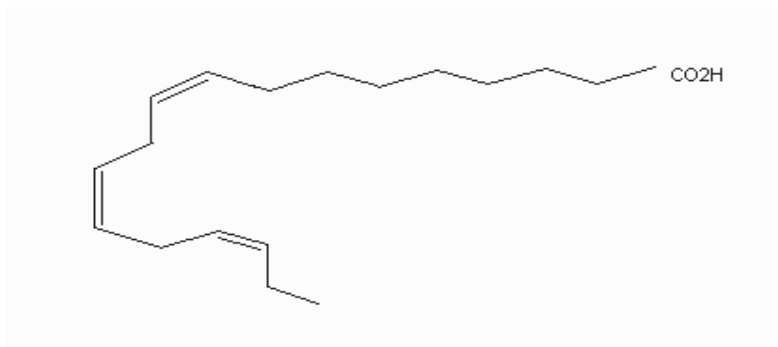
---

---

lípidos que contienen mayoritariamente ácidos grasos saturados, como los ácidos palmítico y esteárico, se dirigen y absorben más lentamente [25].

### 1.6.1. Ácido linolénico

El ácido linolénico es un ácido graso poliinsaturado de 18 carbonos y 3 dobles enlaces (esquema 4). Es un ácido esencial para la salud y nutrición del ser humano. Es altamente inestable y por lo tanto oxidable [48].



Esquema 4. Molécula del ácido Linolénico. Tomado y modificado de Fox [48].

El ácido linolénico forma parte de la familia de ácidos  $\omega$ -3 [58] y el más importante de esta familia, es un ácido graso 18:3c $\Delta$ 9,12,15. Los datos actuales sugieren que el ácido linolénico y otros ácidos grasos  $\omega$ -3 actúan compitiendo de alguna manera con el ácido araquidónico (20:4c $\Delta$ 9, 12, 15, 18), que es el precursor principal de las prostaglandinas y los tromboxanos [25], así como son necesarios para la estructura de las membranas de las células dado que son insaturados. También ayuda a mantener las membranas flexibles, a conservar las capas de la piel e intervienen en el metabolismo del colesterol [58].

Los ácidos  $\omega$ -3 tienen varios efectos biológicos que los hacen útiles en la prevención y tratamiento de las condiciones crónicas como la diabetes tipo-2, enfermedades del hígado, artritis reumatoide, presión alta de la sangre, enfermedades coronarias, embolias y ciertos tipos de cáncer [58].

---

---

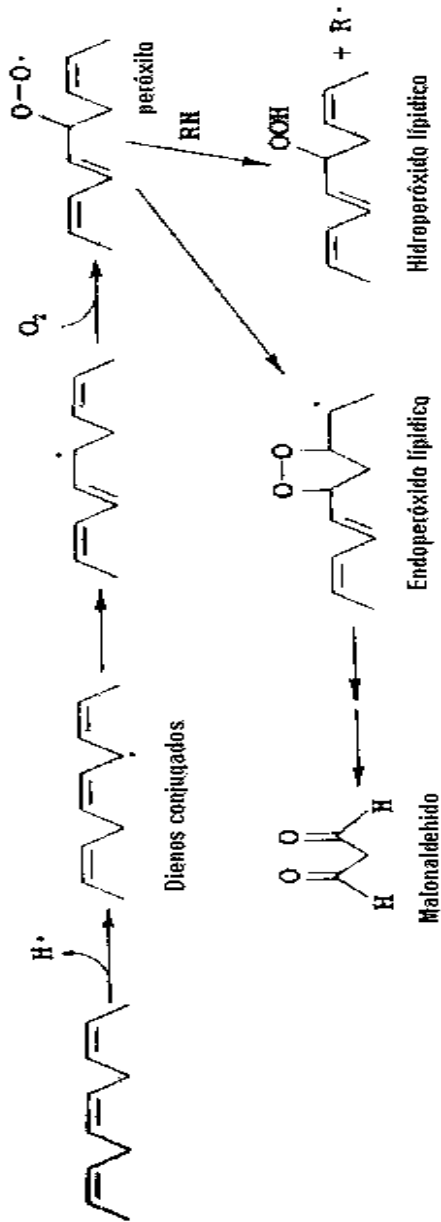
### 1.6.2. Daño membranaral

Los lípidos de membrana son un blanco importante durante el estrés oxidativo debido a los dobles enlaces presentes en sus cadenas hidrofóbicas, las cuales le confieren propiedades importantes a la membrana para su funcionamiento [39].

Los radicales libres inician y causan la peroxidación de los lípidos (triglicéridos, fosfolípidos, lipoproteínas), particularmente aquellos que componen las membranas celulares. Los radicales libres ataca a las moléculas de los lípidos insaturados que contienen la agrupación  $-CH=CH-$ , dando radicales alílicos ( $-CH=CH-CH^*$ ) y radical hidroperoxilo ( $HO_2^*$ ) que es la forma protonada del radical anión superóxido. Los radicales alílicos reaccionan con el  $O_2$  dando radicales  $-CH=CH-CH(O-O^*)-$ , que a su vez generan nuevamente radicales  $-CH=CH-CH$ ; juntamente con los hidroperóxidos  $-CH=CH-CH(O-OH)-$ , y así sucesivamente, de manera que una molécula de radical causa la destrucción de un gran numero de moléculas de lípido insaturado (Esquema 5).

Como productos finales de la lipoperoxidación resulta una variedad de productos de alta y diversa toxicidad ( $H_2O_2$ , epóxidos, aldehídos, cetonas, ésteres, etc.) [44].

Los factores que influyen en la magnitud de la peroxidación lipídica son: La naturaleza cualitativa y cuantitativa del agente iniciador, los contenidos de la membrana en ácidos grasos poliinsaturados y su accesibilidad, la tensión de oxígeno, la presencia de hierro, el contenido celular de antioxidantes (beta carotenos, alfa tocoferoles, glutatión) y la activación de enzimas que pueden hacer terminar la cadena de reacción como es el caso de la glutatión peroxidasa (GSH-Prx) [43].



Esquema 5. Reacciones del proceso de lipoperoxidación. Tomado y modificado de Buege [45].

## 1.7. Agentes oxidantes

Los reactivos capaces de cambiar sus niveles de oxidación formales incorporando más electrones sufren reducción. Muchos reactivos de oxidación contienen un metal de transición con dos o más estados de oxidación relativamente estables, como por ejemplo el hierro [48].

### 1.7.1. Ácido ascórbico

La vitamina C ha demostrado tener efectos antioxidantes a dosis bajas pero inversamente en altas dosis se convierte en un pro-oxidante (esquema 6) [52]. El ácido ascórbico interacciona con iones. Estas interacciones implican reacciones redox, un ejemplo de estas son las reacciones de la reducción del  $\text{Fe}^{3+}$  al  $\text{Fe}^{2+}$ . La interacción incontrolada entre la vitamina C y las sales de hierro conducen a la tensión oxidativa. Los estudios han destacado la inducción de úlceras gástricas en ratas por la inyección del hierro ferroso y del ácido ascórbico [52].

### 1.7.2. Ión Ferroso

En seres humanos, el sulfato ferroso induce daño oxidativo en los individuos sanos. La exposición con hierro induce la peroxidación de lípidos en ratas [52].

Los metales de transición tienen estados de oxidación que varían y por lo tanto, pueden catalizar reacciones de oxidación y de reducción. En la sangre el hierro que circula está unido firmemente a la proteína transferrina, que reduce su potencial de reducción y su reactividad con el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El ácido ascórbico puede entonces reciclar el  $\text{Fe}^{3+}$  al  $\text{Fe}^{2+}$  que facilita la generación adicional del  $\cdot\text{OH}$  por los ciclos subsecuentes de Fenton [52].

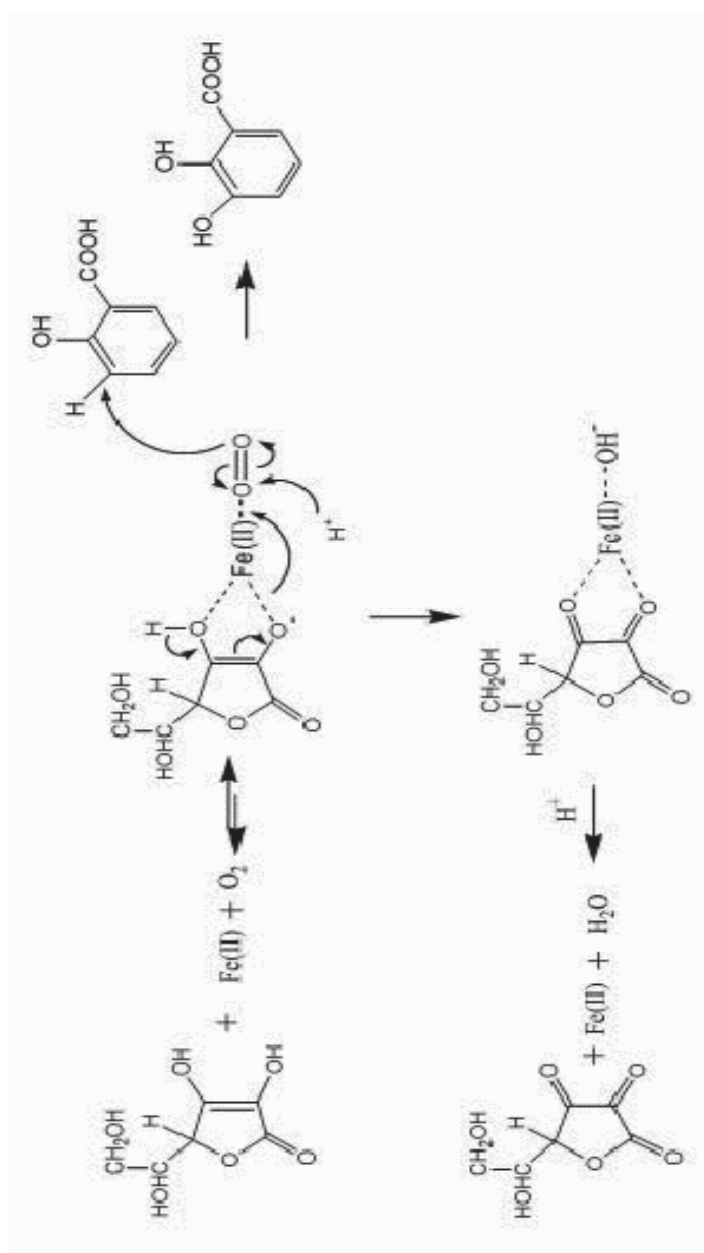


Fig. 6. Oxidación del ácido ascórbico. Tomado de Fisher [52].

En estudios anteriores, el  $\text{Fe}^{2+}$  a una concentración de 1 mM causa el 50% de la inhibición en el consumo de oxígeno con los sustratos (piruvato, succinato, 2-quetoglutarato con malonato, 3-hidroxiacetato), excepto con el ascorbato, pero no tiene efecto en la fosforilación oxidativa. Solo el  $\text{Fe}^{3+}$  a concentraciones de 0.25 a 0.5 mM inhibe la fosforilación oxidativa. Por ello, se concluye que el  $\text{Fe}^{2+}$  no tiene un efecto inhibitorio en la utilización de la energía por la mitocondria [53]. En la mitocondria, una sobrecarga del ión ferroso está asociada con el aumento en el consumo de oxígeno, debido a la inducción del proceso de la lipoperoxidación catalizada por el ión ferroso a una concentración de 0.1  $\mu\text{M}$  [54]. El ubiquinol tiene un efecto protector contra la oxidación de lípidos y proteínas, inducidas por el ascorbato y el sistema  $\text{ADP}/\text{Fe}^{3+}$  en partículas submitocondriales [55].

## 2. HIPÓTESIS

El índice de insaturación de los lípidos membranales causa aumento en la sensibilidad de las células hacia estrés oxidativo afectando directamente la función mitocondrial.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del estrés oxidativo sobre el funcionamiento mitocondrial y la viabilidad celular variando el índice de insaturación de los ácidos grasos que componen sus membranas.

### 3.2. Objetivo específicos

- Determinar el efecto del estrés oxidativo sobre la respiración mitocondrial.
- Determinar el nivel de lipoperoxidación de los esferoplastos bajo condiciones de estrés oxidativo.
- Determinar si el índice de insaturación de las membranas disminuye la resistencia de *Saccharomyces cerevisiae* hacia los efectos perjudiciales del  $\text{Fe}^{2+}$  sobre la viabilidad celular.

---

---

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Reactivos

Los reactivos utilizados fueron de grado reactivo, adquiridos de Sigma Chemical (St. Louis, MO. E.U.A.), excepto por la Zymoliasa 20T, que fue adquirida de ICN Biomedicals. Inc (Aurora, OH. E.U.A.) y el sulfato ferroso 7-hidrato, de J.T. Baker.

### 4.2. Aislamiento de esferoplastos de *Saccharomyces cerevisiae*

Los esferoplastos se aislaron de acuerdo con el método reportado por Guérin y cols. a partir de la cepa industrial Yeast Foam [56]. Se hizo un precultivo en 100 ml de medio YLac (ácido láctico 2%, extracto de levadura 1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1%, NaOH 0.5%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.12%, pH 5.0) con una asada y se incubó a 28-30°C a 150 rpm. A las 24 hrs se re-sembró en 500 ml del mismo medio para tener una densidad óptica de 0.03 a 600 nm. A las 16 hrs el cultivo tuvo una densidad óptica de 3.5-4.0. Se calculó el peso seco obtenido de levaduras mediante la siguiente relación: peso seco = peso húmedo/4.

Las levaduras se lavaron por centrifugación utilizando un rotor Beckman JA-10 de una centrifuga Beckman J2-MC a 5000 rpm por 3 veces, resuspendiéndose en agua destilada. Las levaduras se resuspendieron en medio SH (Tris 0.1 M,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.5 M, pH 9.3 con NaOH) y se dejaron incubar a 32°C a 170 rpm. A los 15 minutos se centrifugaron a 5000 rpm por 5 minutos, y se lavaron 3 veces con medio de lavado (KCl 0.5M, tris 10 Mm, pH 7 con HCl).

A continuación, 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 de medio de digestión fue de 10 ml por cada gramo de peso seco de levaduras. Para la obtención de los esferoplastos se

---

---



---

---

agregó la enzima zymoliasa a razón de 10 mg por cada gr de peso seco, de tal modo que se obtuvo una concentración de 1 mg/ml de medio.

La formación de esferoplastos se evaluó midiendo la disminución de la D.O. al momento de poner la zymoliasa. Se hizo una lectura de la D.O. a 600 nm contra agua de una alícuota diluida 1:1000 (valor considerado como inicial). A los 20, 30 y 40 min, de incubación con la zymoliasa, se evaluó la D.O. de alícuotas diluidas a solo 1:100. La incubación con la zymoliasa se detuvo cuando la D.O. 1:100 fue igual a la D.O. inicial.

Con el fin de eliminar la actividad de la zymoliasa, se centrifugaron los esferoplastos en el rotor Beckman JA-20 de una centrífuga Beckman J2-MC a 2500 rpm por 5 minutos 3 veces con el buffer para protoplastos (sorbitol 0.75 M, manitol 0.4 M, Tris-maléico 10 mM, albúmina sérica de bovino 0.2%, pH 6.8). Cada resuspensión se realizó con una varilla de teflón. Terminados los lavados, se resuspendió en buffer para esferoplastos (sorbitol 1 M, NaCl 1.7 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, EGTA 0.5 mM, albúmina sérica de bovino 0.1%, pH 6.8) en un volumen aproximado de 5 ml.

#### **4.3. Incorporación de ácidos grasos en *S. cerevisiae***

La composición de los ácidos grasos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* fue manipulada mediante la adición de 1mM de ácido linolénico (C18:3) disuelto en IGEPAL CA-630 a un cultivo de *S. cerevisiae* con una D.O. de 0.03 a 600 nm en medio YLac, el cual se incubó durante 16 hr a 28-30 °C a 150 rpm. Posteriormente, los esferoplastos se aislaron por el procedimiento descrito anteriormente.

#### **4.4. Inducción de estrés oxidativo**

Para establecer condiciones de estrés oxidativo, se incubó la proteína de esferoplastos (0.3 mg/ml) en medio de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 M, MgSO<sub>4</sub> 2

---

---

---

---

mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM, EGTA 0.5 mM, a pH 6.8) con concentraciones de 50, 100, 200 y 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$  durante 30 minutos a una temperatura de 4°C. Alternativamente los esferoplastos fueron incubados con una combinación de Ascorbato y  $\text{Fe}^{2+}$ , agregándose el Ascorbato al doble de la concentración utilizada de  $\text{Fe}^{2+}$ . Después de la incubación, el  $\text{Fe}^{2+}$  y el Ascorbato fueron removidos del medio centrifugando la solución de esferoplastos a 2500 rpm por 10 minutos a 4°C y resuspendiendo la proteína en medio  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  fresco.

#### 4.5. Medición del consumo de oxígeno

La síntesis de ATP se cuantifica como incorporación de fosfato al ADP y los pares electrónicos como captación de oxígeno en  $\mu\text{átomos}$  reducidos de agua. Esta captación de oxígeno se mide como la velocidad de consumo de oxígeno de los esferoplastos preincubados con o sin oxidante, según corresponda y se determinó con un electrodo de oxígeno de registro [25] tipo Clark acoplado a un monitor biológico de oxígeno YSI 5300 y a un graficador. La actividad máxima de la cadena respiratoria fue obtenida mediante la adición de 5  $\mu\text{M}$  del desacoplante FCCP (Trifluorocianilcianuro fenilhidrazona).

#### 4.6. Ensayo de lipoperoxidación

El método más frecuente para evaluar lipoperoxidación, por su simplicidad y bajo costo, es la medición de malondialdehido como sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico (TBARS) [46]. Para la determinación de niveles de oxidación lipídica se utilizó una modificación del método del ácido tiobarbitúrico (TBA) reportada por Buege y Aust [57]. El fundamento de la técnica de TBARS es hacer reaccionar la muestra a analizar con ácido tiobarbitúrico en medio ácido, adicionándole un cromógeno, que posteriormente se mide mediante absorción o fluorescencia. El malondialdehido producto de la lipoperoxidación por radicales libres durante la reacción en medio ácido principalmente y su concentración es proporcional a la absorción [46]. En si, la lipoperoxidación, es la medida de la formación de sustancias reactivas al ácido

---

---

---

---

tiobarbitúrico, resultado de la inhibición de las actividades del NADH y la succinato oxidasa [55].

Después de la preincubación con el  $\text{FeSO}_4$ , se agregó a cada tubo 2 ml de la solución ácida compuesta por ácido tricloroacético 15%, TBA 0.375% y HCl 0.25 N. Posteriormente, se calentaron los tubos en baño María hirviendo y a los 15 minutos, los tubos fueron enfriados en hielo y después centrifugados a 5000 rpm por 15 minutos. Por último, se extrajo el sobrenadante y se leyó su absorbencia a 532 nm en un espectrofotómetro UV/vis Perkin-Elmer Lambda 18. Los resultados fueron expresados como nanomolas de TBARS/mg de proteína y fueron calculados en base al  $\epsilon$  de malondialdehído de  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### **4.7. Viabilidad celular**

Una célula viable se define como aquella que es capaz de dividirse y dar lugar a una descendencia; y el método usual para una determinación de células viables se basa en contar el número de la muestra que es capaz de formar colonias sobre un medio sólido adecuado. En este procedimiento, se supone que cada célula viable puede formar una colonia. Para obtener el número adecuado de células, casi siempre se diluye la muestra. Lo más frecuente es realizar diluciones decimales de la muestra, realizándose las diluciones seriadas hasta llegar a la dilución deseada [60].

##### **4.7.1. Ensayos con Azul de Tripano**

La viabilidad de las células de levadura y de los esferoplastos fue determinada evaluando la incorporación del colorante azul de tripano al interior de las células. Los esferoplastos y las células fueron tratados como se indica en inducción del estrés oxidativo, excepto que las incubaciones con los oxidantes se hicieron hasta por 6 horas y se omitieron los lavados. Después de cada preincubación se tomó una alícuota de 25  $\mu\text{l}$  y se colocó en un portaobjetos

---

---

---

---

adicionando 25  $\mu$ l del colorante azul de tripano; la suspensión se observó al microscopio con objetivo seco fuerte y se contaron las células/esferoplastos viables y no viables por campo hasta 100 células/esferoplastos.

#### **4.8. Obtención de células petite**

Para obtener células de levadura carentes de mitocondrias funcionales (células petite), se hizo un precultivo en 100 ml de medio YPD (extracto de levadura 0.1%, peptona 0.2%, agua destilada 9%, agar bacteriológico 0.2% y solución dextrosa al 20%, pH 6.5) con una asada y se incubó a 28-30°C. A las 24 hrs. se resembró en 250 ml de medio YPD para tener una densidad de 0.03 a 600 nm, se agregó 10  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio [59] y se dejó crecer el cultivo por 16 h. Los esferoplastos fueron aislados por el método descrito anteriormente [56].

#### **4.9. Procesamiento estadístico**

Los resultados se expresaron como la medida  $\pm$  el error estándar de al menos 5 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 de computadora Sigma Plot Versión 9 (SPSS Inc).

---

---

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Efecto del ión $\text{Fe}^{2+}$ sobre la respiración mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*

Se midió la velocidad de consumo de oxígeno (velocidad de respiración) dependiente de cianuro como una manera de medir la funcionalidad de la cadena respiratoria mitocondrial de las células de la levadura sin pared celular (esferoplastos). La velocidad de respiración se determinó después de preincubar los esferoplastos durante 15 minutos con el ascorbato y  $\text{FeSO}_4$  para determinar cómo afecta el estrés oxidativo la cadena respiratoria. En estado 4, se observó un aumento de aproximadamente el 33% con las dos concentraciones de ascorbato/ $\text{Fe}^{2+}$  utilizadas (Fig. 1, barras blancas).

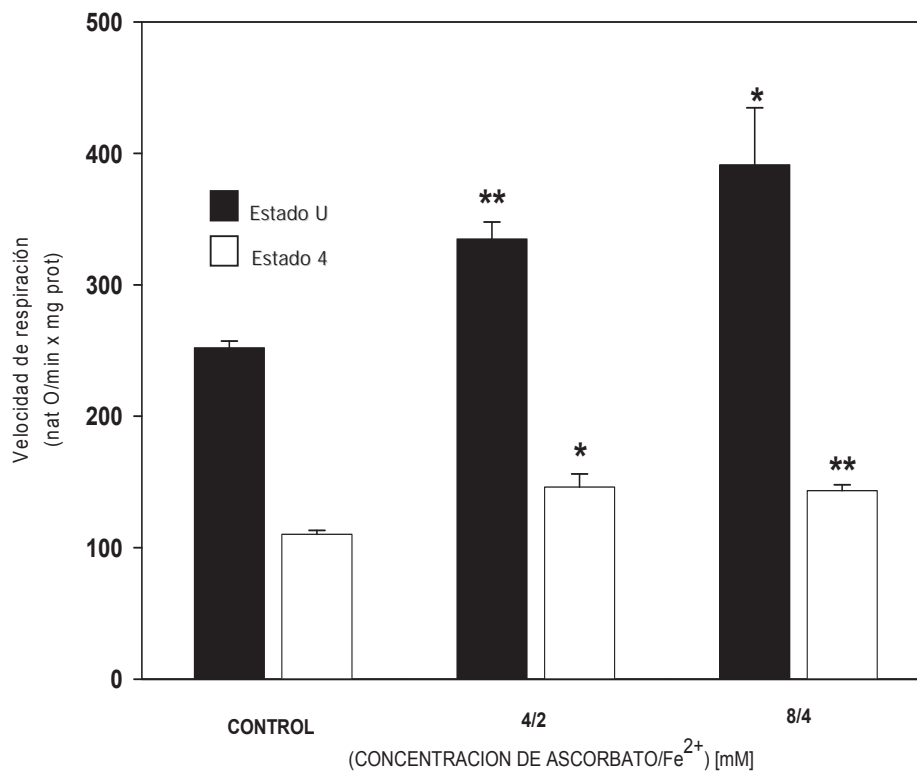
La adición de un agente desacoplante como el FCCP abate el  $\Delta\Psi$ ; esto hace que la cadena respiratoria se estimule al máximo para reestablecer el  $\Delta\Psi$  debido al  $\Delta\text{pH}$  generado por el gradiente de protones [35]. A esta condición se le conoce como estado desacoplado o estado U, permitiendo estudiar la actividad de la respiración mitocondrial al máximo. En el estado U, el tratamiento con ascorbato/ $\text{Fe}^{2+}$  (Fig. 1, barras negras), provocó un aumento de 15% y 30% en la respiración, con 4/2mM y 8/4 mM, respectivamente.

En virtud de la inhibición nula observada en el tratamiento con ascorbato/ $\text{Fe}^{2+}$ , se decidió determinar los efectos del  $\text{Fe}^{2+}$  por separado, debido a que este ión puede favorecer el estrés oxidativo al estimular la formación de una especie química de naturaleza semejante al radical  $\text{OH}^{\cdot}$  [12]. La velocidad de respiración de los esferoplastos incubados con concentraciones crecientes de  $\text{Fe}^{2+}$  (50-400 $\mu\text{M}$ ) en el estado 4 se mantuvo constante (Fig. 2, barras blancas). Para comprobar que la resistencia aparente a los efectos del  $\text{Fe}^{2+}$  fue debida a la constitución monoinsaturada de ácidos grasos de la levadura (C16:1, C18:1 principalmente) [12], se realizó el mismo experimento en esferoplastos a los cuales se les incorporó el ácido graso triinsaturado, ácido linolénico (C18:3). Como se observa (figura 2, barras negras) bajo éstas

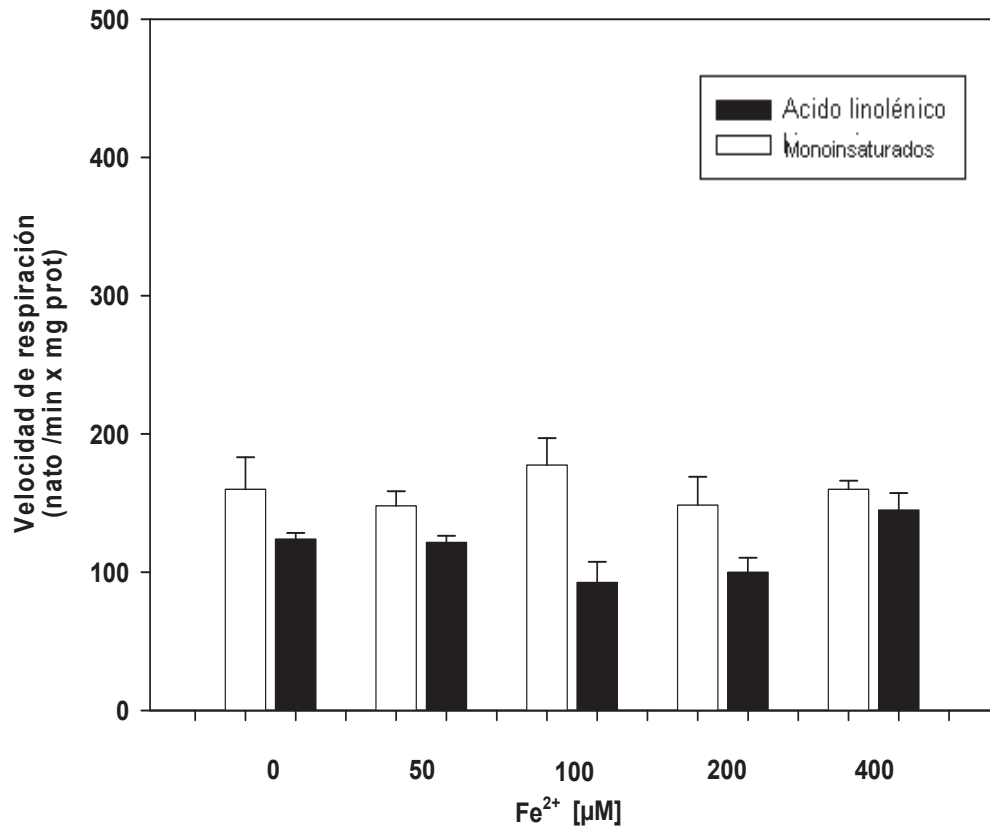
---

---

condiciones tampoco se observó un cambio significativo en la velocidad de respiración en estado 4 a todas las concentraciones probadas de  $\text{Fe}^{2+}$ .

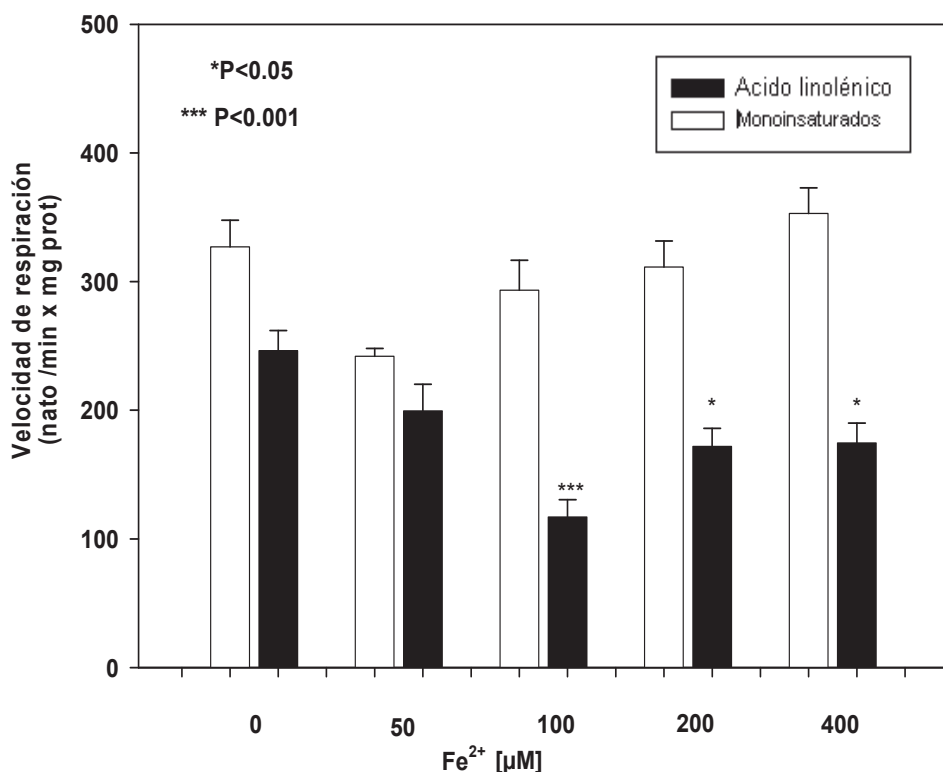


**Figura 1. Efecto del sistema ascorbato/ $\text{Fe}^{2+}$  sobre la velocidad de consumo de oxígeno.** Los esferoplastos se incubaron a las diferentes concentraciones indicadas de  $\text{Fe}^{2+}$  y ascorbato, lo cual se realizó como se indica en materiales y métodos, previo al ensayo de oximetría. Los resultados fueron expresados como la velocidad de respiración en nat O/min mg prot. ( $n = 3 \pm e.e.$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  comparado con la actividad del control.



**Figura 2. Efecto del Fe<sup>2+</sup> sobre la velocidad de respiración en el estado 4.** Los esferoplastos se incubaron 15 minutos a las diferentes concentraciones indicadas de Fe<sup>2+</sup>, previo al ensayo de oximetría, el cual se realizó como se indica en materiales y métodos. Los resultados fueron expresados como la velocidad de respiración en nat O/min. mg. prot. n = 7 ± e.e.

En los esferoplastos monoinsaturados la velocidad de respiración en el estado U (barras blancas, figura 3), solo fue inhibida en aprox. 20% con 100 $\mu$ M de Fe<sup>2+</sup>, mientras que a concentraciones mayores no se apreció un cambio significativo. En los esferoplastos modificados con ácido linolénico (barras negras, figura 3), se observó una disminución significativa del 50% (\*\*P<0.001) en la velocidad de respiración a 100  $\mu$ M de Fe<sup>2+</sup>. En los tratamientos con 200 y 400  $\mu$ M, la velocidad de respiración disminuyó 35% (\*P<0.05). Estos resultados sugieren que la sensibilidad de la cadena respiratoria mitocondrial hacia el estrés oxidativo depende del grado de insaturación de los lípidos de la levadura.



**Figura 3. Efecto del Fe<sup>2+</sup> sobre la velocidad de respiración en el estado U.** Los esferoplastos se incubaron 15 minutos a las diferentes concentraciones indicadas de Fe<sup>2+</sup>, previo al ensayo de oximetría, el cual se realizó como se indica en materiales y métodos. Los resultados fueron expresados como la velocidad de respiración en nat O/min mg prot. n = 7  $\pm$  e.e. \*P<0.05, \*\*\*P<0.001 comparado con la actividad del control.



---

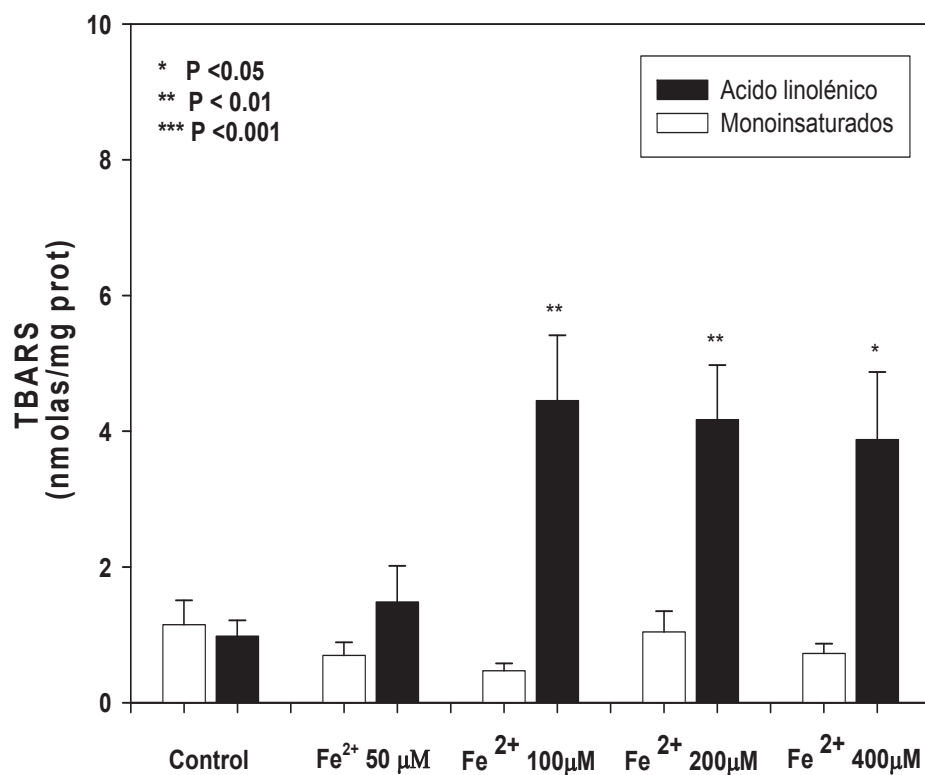
---

## 5.2. Efecto del ión $\text{Fe}^{2+}$ y la composición lipídica sobre los niveles de lipoperoxidación

Con el propósito de investigar si la incorporación de ácido linolénico sensibiliza a la levadura hacia los efectos del estrés oxidativo sobre los lípidos de membrana, se midieron los niveles de oxidación lipídica en esferoplastos monoinsaturados (sin adición de ácido linolénico) y con ácido linolénico.

En los esferoplastos monoinsaturados (Figura 4, barras blancas), los niveles de lipoperoxidación se mantuvieron constantes a todas las concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  utilizadas (50-400 $\mu\text{M}$ ). En contraste, los niveles de lipoperoxidación de los esferoplastos con ácido linolénico (Figura 4, barras negras) aumentaron un 30% con 50 $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ . Los máximos niveles de lipoperoxidación se obtuvieron a partir de una concentración 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  observándose un aumento del 250% (\*\*P<0.001), 230% (\*\*P<0.01) y 200% (\*P<0.05) con las concentraciones 100 $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  y 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ , respectivamente.

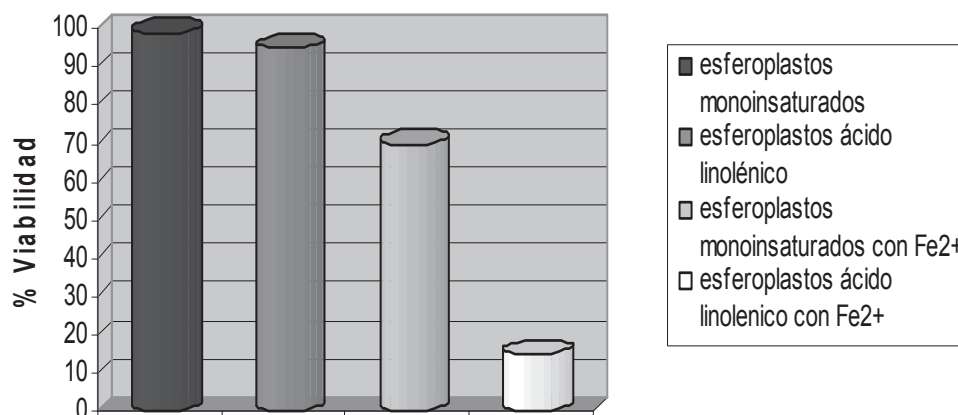
Estos resultados indican que el aumento en los niveles de insaturación de los ácidos grasos membranales sensibilizan a la célula hacia los efectos nocivos del estrés oxidativo, lo cual sugiere que dicha sensibilización podría estar involucrada en la mayor susceptibilidad de la respiración hacia el efecto del estrés oxidativo en esferoplastos con ácido linolénico.



**Figura 4. Efecto del Fe<sup>2+</sup> en los niveles de lipoperoxidación en esferoplastos.** Se trataron los esferoplastos normales y modificados con ácido linolénico incubándolos por 15 minutos a diferentes concentraciones de Fe<sup>2+</sup> como se indica en materiales y métodos. n = 7 ± e.e. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 comparado con el control.

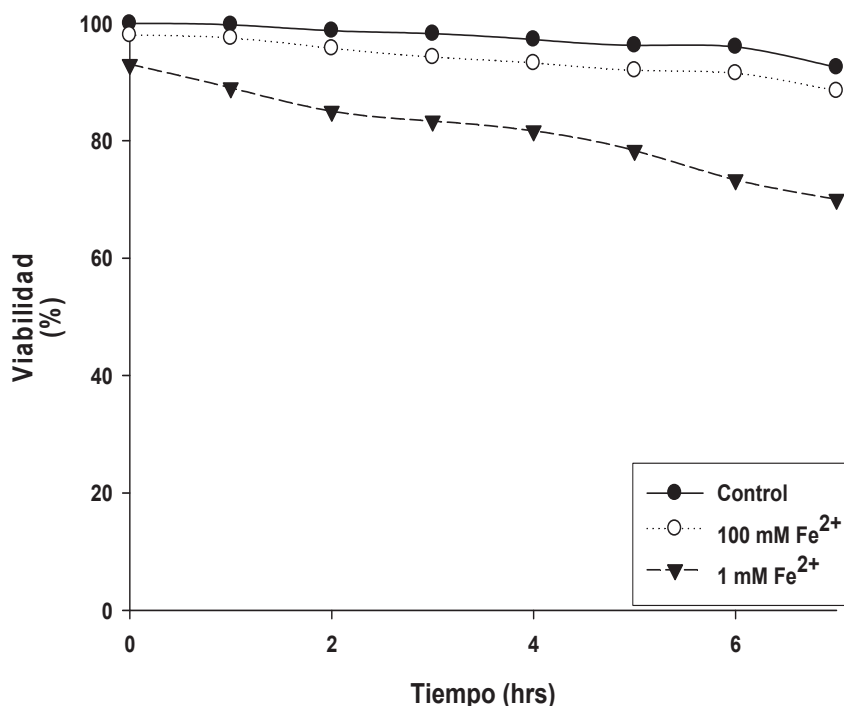
### 5.3. Efecto del grado de insaturación de los ácidos grasos sobre la viabilidad de esferoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* bajo condiciones de estrés oxidativo.

Con el objetivo de estudiar la influencia del aumento en los niveles de oxidación de lípidos sobre la integridad celular, se midió la viabilidad celular midiendo la incorporación del colorante azul de tripano en esferoplastos normales (composición lipídica monoinsaturada) y esferoplastos con ácido linolénico (composición lipídica triinsaturada) tratados con 1 mM de  $\text{Fe}^{2+}$  durante una hora (Fig. 5). La viabilidad sin oxidante (control), fue de 99% y 95% para los esferoplastos monoinsaturados y con ácido linolénico, respectivamente. El tratamiento con  $\text{Fe}^{2+}$  disminuyó en un 30% la viabilidad en los esferoplastos monoinsaturados, mientras que en los esferoplastos con ácido linolénico el mismo tratamiento disminuyó de manera dramática dicho parámetro en un 85%



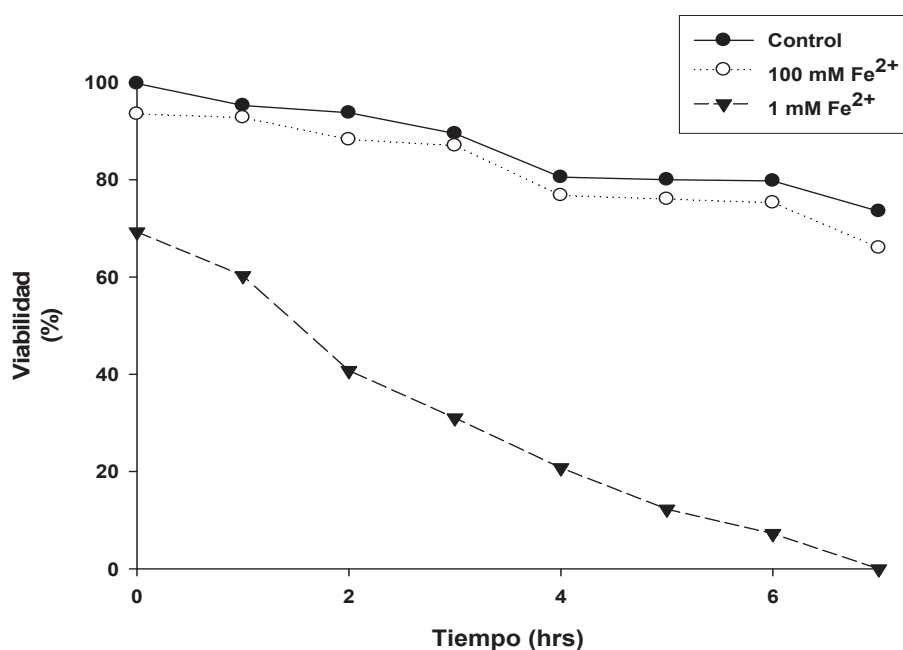
**Figura 5. Comparación del daño provocado sobre la viabilidad celular en esferoplastos normales y con ácido linolénico.** Los esferoplastos se incubaron 1 hora con  $\text{Fe}^{2+}$  1mM. Posteriormente, fueron teñidos con Azul de Tripano y las células por campo fueron observadas al microscopio, como se indica en materiales y métodos.  $n = 3 \pm e.e.$

Para conocer la influencia del tiempo de incubación con  $\text{Fe}^{2+}$  sobre la viabilidad celular, se probaron concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  de 100  $\mu\text{M}$  y 1mM con incubaciones hasta de 7 horas. La viabilidad de los esferoplastos monoinsaturados control (sin oxidante) se mantuvo constante a través de las 7 horas de incubación (Fig. 6, círculos negros). Cuando los esferoplastos fueron tratados con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ , el porcentaje de viabilidad obtenida a través del tiempo de incubación fue de 89%, (Fig. 6, círculos blancos), mientras que con el tratamiento con 1 mM de  $\text{Fe}^{2+}$  la viabilidad disminuye a solo 70% después de las 7 horas de incubación.(Fig. 6, triángulos negros invertidos).



**Figura 6. Efecto del  $\text{Fe}^{2+}$  sobre la viabilidad en esferoplastos monoinsaturados.** Los esferoplastos se incubaron durante 7 hrs. sin oxidante (control) y con las concentraciones indicadas de  $\text{Fe}^{2+}$ . Se hicieron lecturas cada hora; cada muestra fue teñida con 1 gota de Azul de Tripano y los esferoplastos fueron observados al microscopio, como se indica en materiales y métodos. n = 7

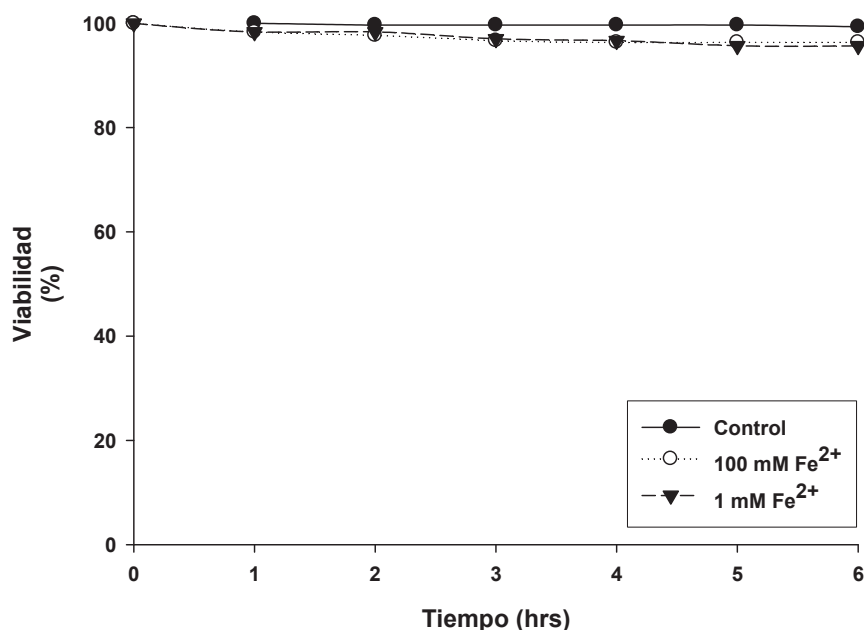
Se observaron efectos más pronunciados en esferoplastos que tienen incorporado el ácido linolénico (Fig. 7). En el tratamiento control existe una pérdida lenta de la viabilidad, obteniéndose un valor final a las 7 horas del 74% (Fig. 7, círculos negros). Cuando los esferoplastos fueron tratados con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ , se observó un comportamiento similar, disminuyendo la viabilidad a las 7 horas a un 60% (Fig. 7, círculos blancos). Cuando los esferoplastos fueron incubados con 1 mM de  $\text{Fe}^{2+}$ , se observó una pérdida más rápida de la viabilidad que fue total a las 7 horas de incubación. Por lo tanto, los resultados anteriores indican que el aumento en el índice de insaturación de los lípidos de membrana, y por lo tanto, una mayor susceptibilidad a la lipoperoxidación, vuelven a la célula más susceptible al daño oxidativo.



**Figura 7. Efecto del  $\text{Fe}^{2+}$  sobre la viabilidad de esferoplastos modificados con ácido linolénico.** Los esferoplastos modificados con ácido linolénico se incubaron durante 6 horas, sin oxidante (control) y con las concentraciones indicadas de  $\text{Fe}^{2+}$ , haciéndose una lectura cada hora. Cada muestra fue teñida con 1 gota de Azul de Tripano y los esferoplastos fueron observados al microscopio, como se indica en materiales y métodos.

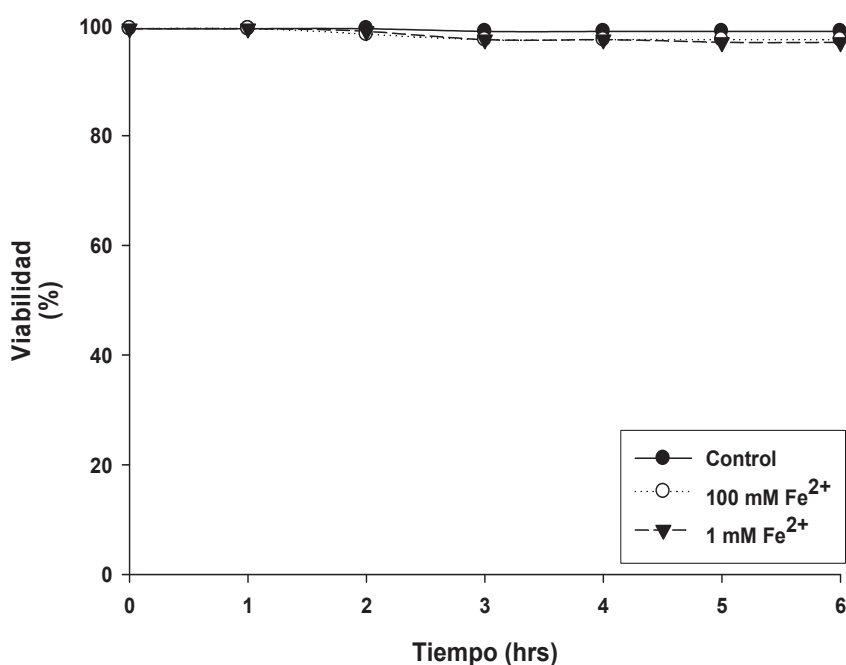
#### 5.4. Efecto del estrés oxidativo causado por el ión $\text{Fe}^{2+}$ sobre la viabilidad celular

En las células completas la pared celular podría funcionar como una barrera protectora contra la acción de los oxidantes añadidos de manera exógena. Para comprobar esta hipótesis, se midió el % de viabilidad de células de la levadura normales y con ácido linolénico sometidas al tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  y 1 mM de  $\text{Fe}^{2+}$  (figura 8). La viabilidad del control se mantuvo hasta el 99%, durante las 6 horas de incubación (figura 8, círculos negros). Los efectos con  $\text{Fe}^{2+}$  fueron mínimos ya que la viabilidad de las levaduras en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  se mantuvo hasta un 96% (figura 8, círculos blancos) y con el tratamiento con 1mM de  $\text{Fe}^{2+}$  se mantuvo hasta un 95% (figura 8, triángulos negros invertidos).



**Figura 8. Efecto del  $\text{Fe}^{2+}$  sobre la viabilidad de la levadura con ácidos grasos monoinsaturados.** Las levaduras se incubaron sin oxidante (control) y con  $\text{Fe}^{2+}$  a las concentraciones indicadas hasta 6 hrs, haciéndose una lectura cada hora. Cada muestra fue teñida con 1 gota de Azul de Tripano y las células fueron observadas al microscopio, como se indica en materiales y métodos.  $n = 7$ .

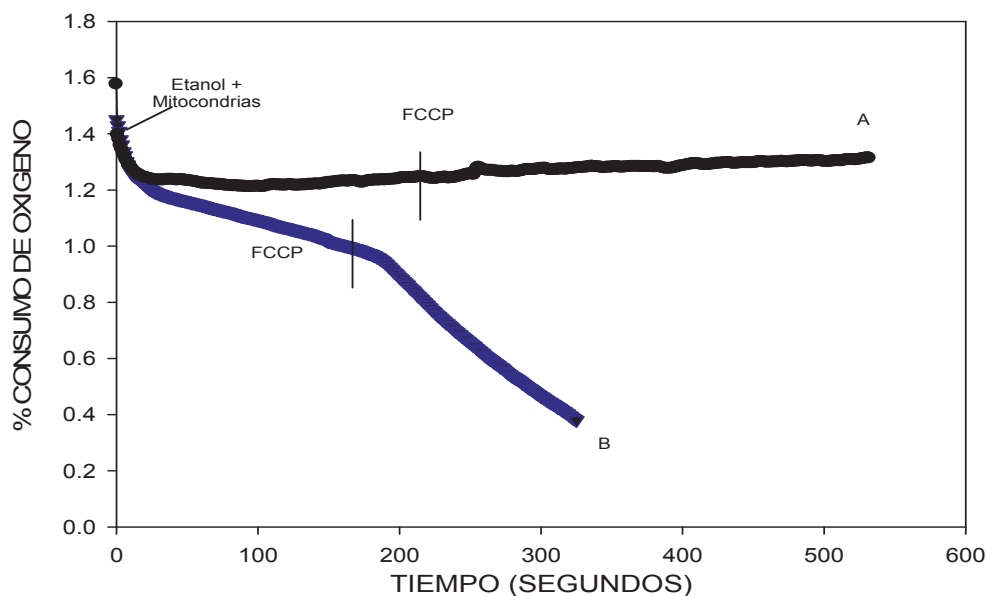
Asimismo, en levaduras con ácido linolénico, la viabilidad de las células sin oxidante (control) después de 6 horas se mantuvo en 99% (Figura 9, círculos negros). No se registro una pérdida de la viabilidad significativa con el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  (Figura 9, círculos blancos) o 1mM de  $\text{Fe}^{2+}$  (Figura 9, triángulos negros invertidos), ya que la viabilidad fue del 98% y 97%, respectivamente. Por lo tanto, estos resultados indican que la pared celular funciona como una barrera protectora contra la acción dañina del  $\text{Fe}^{2+}$ , sin importar el grado de insaturación de las membranas lipídicas.



**Figura 9. Efecto de  $\text{Fe}^{2+}$  sobre la viabilidad en levaduras modificadas con ácido linolénico.** Las levaduras se incubaron sin el oxidante (control) y con  $\text{Fe}^{2+}$  a las concentraciones indicadas hasta 6 hrs. Cada muestra fue teñida con 1 gota de azul de Tripano y las células fueron observadas al microscopio, haciéndose una lectura cada hora, como se indica en materiales y métodos.  $n = 7$ .

### 5.5. Viabilidad celular dependiente de la función mitocondrial

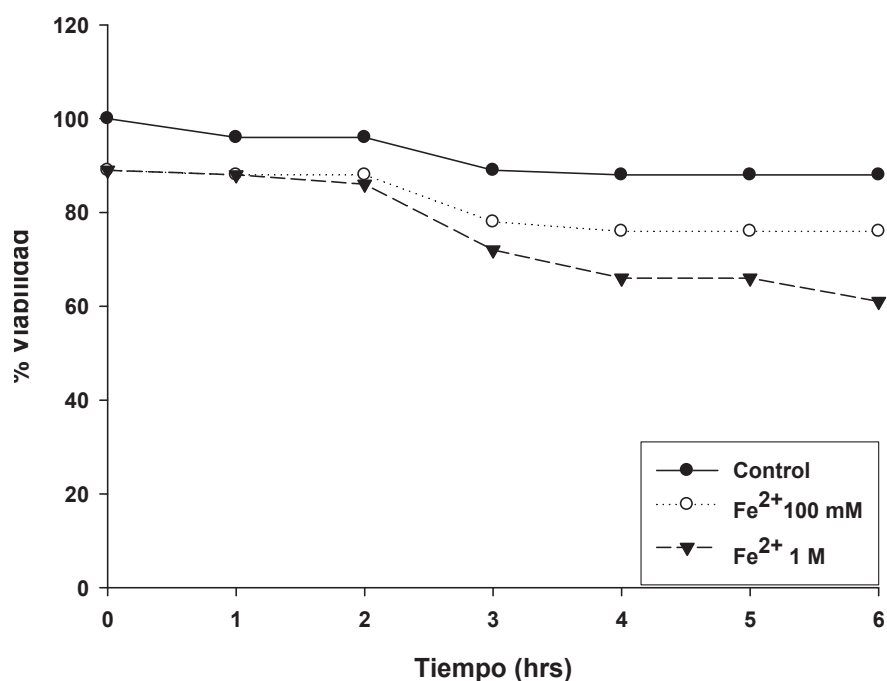
Se estudió cual es el papel de la función mitocondrial en la pérdida acelerada de la viabilidad de los esferoplastos con ácido linolénico en presencia de  $\text{Fe}^{2+}$ . Para cumplir con este objetivo, se obtuvieron esferoplastos con mitocondrias no funcionales (esferoplastos petite), para lo cual se le agregó a un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* 10  $\mu\text{g/ml}$  de bromuro de etidio. Para comprobar la pérdida de la función mitocondrial, se midió el consumo de oxígeno mitocondrial sensible a cianuro en los estados 4 y U. En la figura 10, se observa un trazo normal de oximetría de esferoplastos con mitocondrias funcionales donde se puede apreciar una primera fase lenta de consumo de oxígeno (estado 4) y posteriormente una fase acelerada de consumo de oxígeno estimulada por la adición del desacoplante FCCP (estado U). En contraste, se puede observar que en los esferoplastos petite el consumo de oxígeno es nulo incluso en presencia de FCCP. Este resultado corrobora la pérdida de la función mitocondrial en los esferoplastos petite.



**Figura 10. Comparación de la respiración entre esferoplastos normales y esferoplastos petite.** Se midió la velocidad de respiración en estado 4 y estado desacoplado (FCCP) de los esferoplastos con mitocondrias funcionales y con mitocondrias petite como se indica en materiales y métodos. Los resultados fueron expresados como la velocidad de respiración en  $\text{nat O/min mg prot.}$   $n = 2 \pm \text{e.e.}$  (A) Esferoplastos con mitocondrias petite, (B) esferoplastos normales.



La viabilidad de los esferoplastos monoinsaturados petite en el tratamiento control (sin oxidante) disminuyó paulatinamente a 88% (Fig. 11, círculos negros). Cuando los esferoplastos se trataron con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ , la viabilidad disminuyó casi con la misma velocidad que el control a 76% y mientras que con 1 mM se observa una pérdida de la viabilidad mas acelerada, a partir de las 2 horas de incubación llegando al 61% a las 6 horas de incubación.



**Figura 11. Efecto del  $\text{Fe}^{2+}$  sobre la viabilidad de esferoplastos petite con ácidos grasos monoinsaturados.** Los esferoplastos petite se incubaron sin el oxidante (control) y con  $\text{Fe}^{2+}$  a las concentraciones indicadas de  $\text{Fe}^{2+}$  hasta 6 horas. Las muestras fueron tenidas con Azul de Tripano y fueron observadas al microscopio, como se indica en materiales y métodos.  $n = 7 \pm \text{e.e.}$

---

---

En los esferoplastos petite con ácido linolénico, la viabilidad resultó más afectada que en esferoplastos normales, ya que en el tratamiento control la viabilidad disminuyó a un 13% (figura 12, círculos negros). El perfil de la pérdida de viabilidad durante el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  fue prácticamente semejante al obtenido en el control, llegándose a las 6 horas a un valor final de viabilidad del 6%, mientras que en el tratamiento con 1 mM de  $\text{Fe}^{2+}$  se observó una pérdida instantánea y drástica del 84% de la viabilidad (figura 12, triángulos invertidos negros) perdiéndose el 97% de este parámetro, después de las 6 horas de incubación.

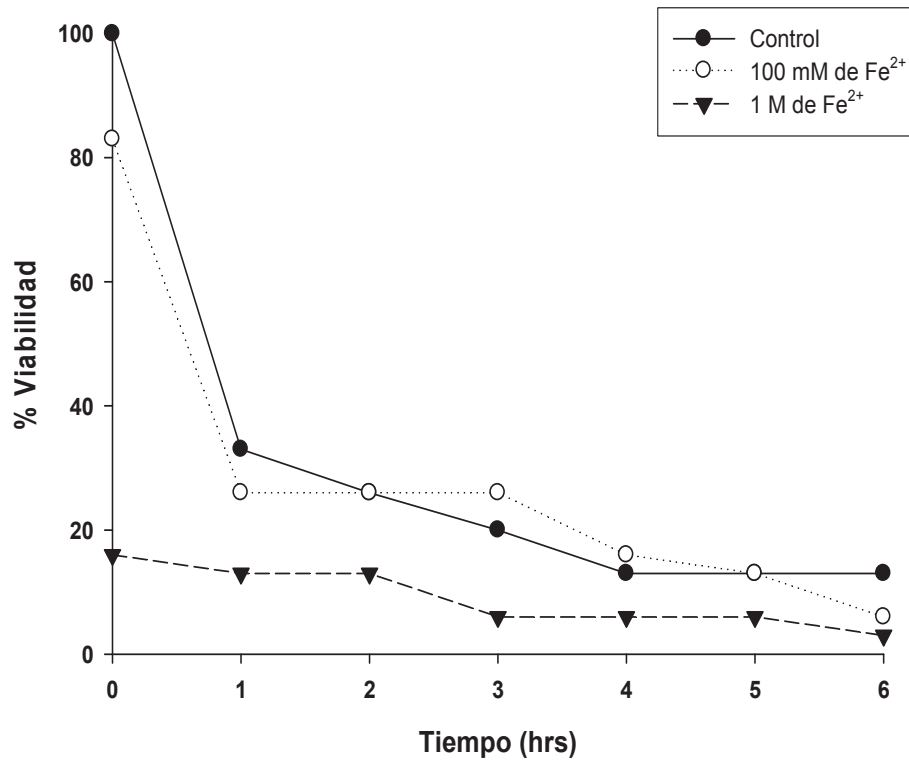
Para poder obtener alguna conclusión acerca del papel de la función mitocondrial sobre la pérdida de la viabilidad, se re-graficaron los resultados anteriores comparando las diferencias observadas en la viabilidad entre los esferoplastos con mitocondrias funcionales y los esferoplastos petite sin adición de ácido linolénico (figura 13) y adicionados con ácido linolénico (figura 14). En conjunto, se puede apreciar que cuando la composición de ácidos grasos de las membranas es la nativa (ácidos grasos monoinsaturados, figura 13), la pérdida de la viabilidad celular a partir de las 3 horas de incubación con las concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  probadas es aproximadamente el doble cuando se pierde la función mitocondrial (triángulos negros y blancos). Cuando la insaturación de los ácidos grasos de membrana fue mayor con el ácido linolénico (Figura 14), la pérdida de la función mitocondrial (triángulos negros y blancos) hace que la viabilidad disminuya drásticamente en la primera hora de incubación en alrededor de un 80% con las dos concentraciones probadas de  $\text{Fe}^{2+}$ , mientras que al término del tratamiento (6-7 horas), casi todas las células han perdido su viabilidad. En contraste, cuando la función mitocondrial es normal (figura 10), la pérdida de viabilidad es lenta a 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ , Sin embargo, a 1 mM de  $\text{Fe}^{2+}$  la velocidad con que se pierde la viabilidad es similar a la observada en esferoplastos petite con una concentración 10 veces menor de  $\text{Fe}^{2+}$ .

En conjunto, estos resultados sugieren que el aumento en la sensibilidad de la levadura hacia la oxidación de lípidos disminuye la resistencia de la célula

---

---

contra el estrés oxidativo y que la función mitocondrial es necesaria para llevar a cabo dicha resistencia.



**Figura 12. Viabilidad de esferoplastos petite modificados con ácido linolénico.** Los esferoplastos petite se incubaron sin el oxidante (control) y con Fe<sup>2+</sup> a las concentraciones indicadas de Fe<sup>2+</sup> hasta 6 horas. Las muestras fueron tenidas con Azul de Tripano y fueron observadas al microscopio, como se indica en materiales y métodos. n = 7 ± e.e.

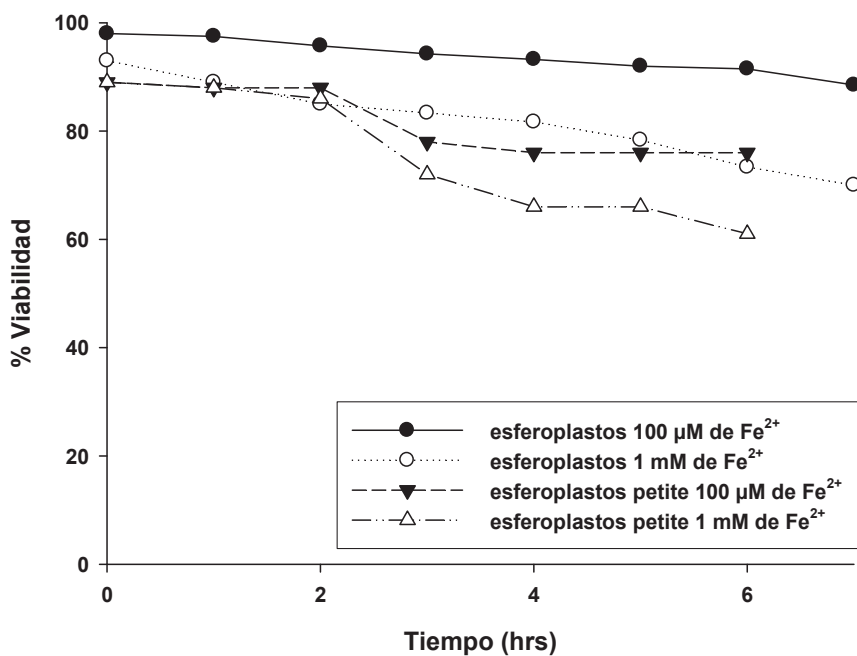


Figura 13. Comparación de la viabilidad de esferoplastos normales y esferoplastos petite monoinsaturados bajo el efecto de  $Fe^{2+}$ .

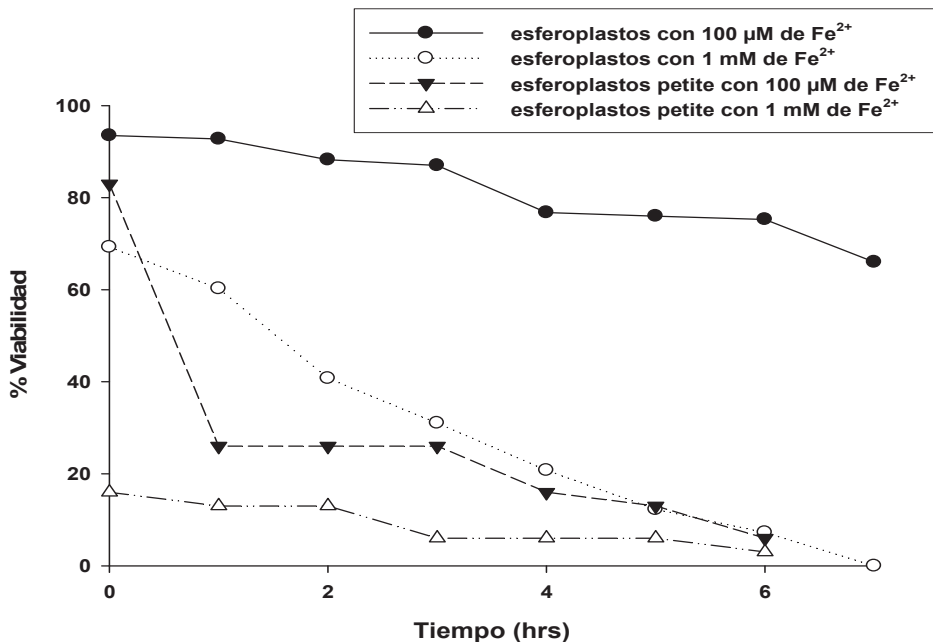


Figura 14. Comparación de la viabilidad de esferoplastos monoinsaturados y esferoplastos petite con ácido linolénico bajo el efecto de  $Fe^{2+}$ .

## 6. DISCUSIÓN

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene como característica fundamental que sus membranas tienen una composición lipídica que consta principalmente de ácidos grasos monoinsaturados y saturados, ver Tabla 1 [67], lo cual las hace resistentes a la lipoperoxidación [51]. Surge de aquí el interés por realizar modificaciones en su composición lipídica para estudiar el efecto del aumento en la susceptibilidad de los lípidos hacia la oxidación sobre el funcionamiento *in situ* de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria y su relación con la pérdida de viabilidad de la célula. Se realizó la modificación de la composición lipídica con el ácido linolénico, ya que es un ácido graso de 18 carbonos y 3 insaturaciones. Es altamente inestable y por lo tanto, oxidable [58], siendo esto de especial interés ya que una de las condiciones generadoras de estrés oxidativo es que la presencia de ácidos grasos C18:2 y C18:3, está generalmente asociada a condiciones de estrés específicas de la levadura [51].

Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> micromolar	% Viabilidad celular	
	Monoinsaturada	18:3
5*	88	63
40**	11	0

Tabla 1. Efecto del Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> en viabilidad de células de *S. cerevisiae* previos al crecimiento no aumentando y aumentando la composición PUFA en el medio de crecimiento. \* determinada después de 60 minutos, \*\*determinada después de 5 minutos. tomado y modificado de Howlett [67].

El grado de insaturación de los lípidos que componen las membranas mitocondriales entre diferentes especies ha sido correlacionado con su susceptibilidad a la lipoperoxidación [62], al poseer la levadura de *S. cerevisiae* principalmente ácidos grasos C16:1 y C18:1, puede disminuir la tendencia hacia la lipoperoxidación, ya que la presencia de dobles enlaces es una característica indispensable para iniciar dicho proceso. Es por ello que para modificar la composición lipídica se agrego el ácido linolénico, esto permitió la

---

---

lipoperoxidación de los lípidos membranales causando daño de manera irreversible en la actividad de la cadena de transporte de electrones por ser susceptibles al estrés oxidativo, la mitocondria es el principal generador de radicales libres en la célula [39].

En relación a lo anterior, existe evidencia de que el estrés oxidativo mitocondrial juega un papel clave en algunas condiciones patológicas. Ejemplo de ello son las miopatías de origen mitocondrial [68], algunos tipos de cáncer [69], la infección por hepatitis B [70] y el daño por isquemia-reperfusión [71]. Por lo tanto un menor grado de insaturación (monoinsaturada) hace mas resistente a la mitocondria (medida como consumo de oxígeno) y a la célula (medido como viabilidad) hacia el daño oxidativo.

Cuando a los esferoplastos se les midió el consumo de oxígeno sometidos a estrés oxidativo con el sistema ascorbato/ $\text{Fe}^{2+}$ , se observó (Fig. 1) que la velocidad de respiración, en el estado U, aumenta conforme aumenta la concentración del sistema oxidante, Esto probablemente se debe a la reacción que se lleva a cabo entre el ascorbato y el ión  $\text{Fe}^{2+}$ , la cual utiliza oxígeno para la formación del radical hidroxilo. [52]. En otro estudio, una concentración de 1mM de  $\text{Fe}^{2+}$  causa el 50% de inhibición del consumo de oxígeno excepto en presencia de ascorbato [53]. Por esta razón, se omitió el uso de ascorbato en los subsecuentes experimentos.

En seres humanos el sulfato ferroso induce daño oxidativo catalizando reacciones redox, por ejemplo la reacción de Fenton para producir radical hidroxilo, el cual es un fuerte oxidante de lípidos y proteínas. [52]. La velocidad de respiración en el estado U en esferoplastos monoinsaturados, se mantuvo constante a través de todas las concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  usadas, indicando que la función mitocondrial no se afectó por el estrés oxidativo. La velocidad de respiración de los esferoplastos con ácido linolénico disminuyó en el tratamiento con  $\text{Fe}^{2+}$  100  $\mu\text{M}$  hasta un 50%, indicando que bajo estas condiciones la mitocondria se convierte en un blanco importante del estrés oxidativo En los tratamientos con  $\text{Fe}^{2+}$  200 y 400  $\mu\text{M}$ , la velocidad de respiración disminuyó un 35%, esto probablemente sea debido a que en la

---

---

---

---

mitocondria una sobrecarga del ión ferroso está asociada con el aumento en el consumo de oxígeno por las reacciones redox que cataliza este ión [53].

En *Saccharomyces cerevisiae* el bromuro de etidio causa mutaciones espontáneas en el ADN mitocondrial (mutación petite) convirtiendo a una célula con respiración competente en una célula deficiente en la respiración [61]. Para comprobar que los resultados se debían al efecto del ión  $\text{Fe}^{2+}$  sobre la función mitocondrial, se realizaron los ensayos en esferoplastos petite (Fig. 10), en los cuales la respiración mitocondrial estaba ausente, indicando que la respiración medida por el oxímetro se debe al metabolismo oxidativo de la mitocondria.

En la figura 4 (barras blancas) muestra que en los esferoplastos monoinsaturados, la lipoperoxidación fue mínima, mientras que en los esferoplastos que fueron modificados en su composición lipídica con ácido linolénico (figura 4, barras negras) los niveles de lipoperoxidación aumentaron significativamente al ser tratados con el  $\text{Fe}^{2+}$  de una manera dependiente de la concentración del ión. El grado de insaturación de los lípidos que componen las membranas mitocondriales entre diferentes especies se ha correlacionado con su susceptibilidad a la lipoperoxidación [62]. Un ejemplo es que la variación en el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas entre diferentes especies de organismos multicelulares es de importante influencia en los niveles de lipoperoxidación y se postula que esto podría tener un papel importante que determinaría el periodo de vida de cada especie [63]. La composición de ácidos grasos en las mitocondrias de levadura consiste principalmente de ácidos grasos monoinsaturados C16:1 (palmitoléico) y C18:1 (oleico) [66], mientras que las mitocondrias de rata contienen principalmente ácido araquidónico C20:4 y ácido docosahexanóico 22:6 [62,64]. Los niveles de lipoperoxidación están asociados al grado de insaturación de los ácidos grasos, es por ello que las levaduras tienen una mayor resistencia a la lipoperoxidación que los mamíferos.

La levadura con ácidos monoinsaturados en su composición lipídica membranal es más resistente a la lipoperoxidación que en las levaduras a las que se les modificó su composición de ácidos grasos, por generar condiciones

---

---

---

---

de estrés oxidativo generalmente asociado a condiciones de estrés, por lo tanto al haber condiciones de lipoperoxidación la célula se vuelve mas susceptible a los daños causados por el ión  $Fe^{2+}$ , afectando de manera considerable la viabilidad, en la figura 7, se observo que el daño oxidativo es dependiente de la concentración y de la composición de ácidos grasos. Esto nos muestra que la mitocondria también posee un papel protector contra el daño por las especies reactivas del oxígeno, en el cual se hace notar que las células sin mitocondrias (petite) son hipersensibles al estrés oxidativo inducido por químicos [72], figura 11, se muestra como se vio afectada la viabilidad de los esferoplastos (petite) monoinsaturados, en donde las mitocondrias se afectaron por el daño oxidativo y mas aun cuando se modifico la composición lipídica de los esferoplastos (petite) con el ácido linolénico, figura 12, en donde se afectaron aun mas por no tener mitocondrias funcionales, esto por estar dañadas las membranas de las levaduras en su composición por ser el lugar donde se encuentra el ADN mitocondrial y la maquinaria necesaria para la replicación, [29].



## 7. CONCLUSIÓN

Un aumento en el grado de insaturación de los lípidos membranales de *S. cerevisiae*, al incorporar el ácido linolénico vuelve mas susceptible a los esferoplastos de la lipoperoxidación causada por el daño oxidativo, de igual manera se ve afectada la cadena respiratoria, comprobándose esto con la falta de respiración de los esferoplastos con mitocondrias petite, siendo la viabilidad dependiente de la función mitocondrial.

---

---

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- 1- Pelczar, J.R., Reid, D. y Chan, E.C.S (1992). Microbiología. 4ª Ed. Editorial McGraw-Hill. Capítulo: 16
  - 2- Davis, B. D. Dulbecco, R., Eisen, H. N. y Ginsbarg, H.S. (1990). Microbiology. 4ª Ed. Editorial J.B. Lippincott Company. Capítulos: 3,11,43,47.
  - 3- Atlas, R. A. (1988). Microbiology Fundamentals and applications. 2ª Ed. Editorial MacMillan. Capítulo: 11.
  - 4- Talaro, K.P. y Talaro A. 1999. Eucaryotic cells and microorganism. En: Foundations in microbiology. 124-160. 3ª edición. Editorial Mc-Graw-Hill.
  - 5- Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A. y Fink, G.R. 1992. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. Cell 68, 1077-1090.
  - 6- Whittaker, P.A. y Danks S.M. (1982). Mitocondria: Estructura, función y formación. Editorial C.E.C.S.A. Capítulo: 1.
  - 7- 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.
  - 8- Joklik, W. K. Willet, H. P., Amos, D.B. y Wilfert, C.M. (1994). Zinsser Microbiología. 20ª Ed. Editorial Médica Panamericana. Capítulo: VI.
  - 9- Ostergaard, S., Olsson, L. y Nielsen, J. 2000. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64, 34-50.
  - 10- Contamine, V. y Picard, M. 2000. Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a pléthora of nuclear genes in the budding yeast Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64, 281-315.
  - 11- Vázquez, M. E. y Gómez, P. M. Mitocondria. Una mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos. Ed. Prado 2002. México D.F.
  - 12- Hunter, F.E., Gebicki, J.M., Hoffsten, P.E. y Scout A. Swelling and lysis of rat mitochondria induced by ferrous ions\*. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 238. No 2. 1963. 828-835.
  - 13- Madigan, M. T., Martinko, J.M. y Parker, J. (1997). Brock Biology of Microorganisms. 8ª Ed. Editorial Prentice may. Capítulos: 4,10.
- 
-

- 
- 
- 14- Bugeja, V.C. y Carter, B.L.A. (1982). Sizer at Bud Initiation for Wild-Type and Petite Yeast Cells. *J. Bacteriol.* 151: 1051-1052.
  - 15- Gómez-Lojero, C. y Gutiérrez-Cirlos, M.E.B. La mitocondria: un ensayo histórico de un organelo transductor de energía. En: mitocondria, una mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos. (Vázquez Memije, M.E. y Tuena de Gómez-Pouyou, M.M. Eds). México. Editorial Prado, 2002. 1,1-20.
  - 16- Lehninger, A.L. *The mitochondrion*. NY. USA. W.A. Benjamin Publ. 1964.
  - 17- Medina, J.M. Oxidación biológica y cadena respiratoria. En: elementos de bioquímica. (Herrera, H. Ed) Mexico. Interamericana McGraw-Hill, 1995. 10, 253-284.
  - 18- Frey, T.G. y Manella, C.A. 2000. The internal structure of mitochondrial. *Trends Biochem. Sci.* 25, 319-324.
  - 19- Manella C.A. 1994. The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope. *Microsc. Res. Tech.* 27, 278-283.
  - 20- Perkins, G. 1997. Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J. Struct. Biol.* 119, 260-272.
  - 21- Guérin, B. Mitochondria. En: *The yeast*. 2ª Edición. (Rose, A.H. y Harrison, J.S. Eds.) USA. Academic Press. 1989. 11, 541-600.
  - 22- Beattie, D.S. Bioenergetics and oxidative metabolism. En: *Textbook of Biochemistry with clinical correlations*. 5ª edición. (Devlin, T.M. Ed.). USA. Wiley-Liss 2002. 13, 537-596.
  - 23- Blachly-Dyson, E. Song, J., Wolfgang, W.J., Colombini, M. y Forte, M. 1997. Multicopy suppressors of phenotypes resulting from the yeast VDAC encode a VDAC-like protein. *Mol. Cell Biol.* 17, 5727-57-38.
  - 24- Le Mellay, V., Troppmair, J., Benz R. y Rapp, U.L. 2002. Negative regulation of mitochondrial VDAC channels by C-Raf *BMC Cell Biol.* 3, 14-25.
  - 25- Mathews, C.K., van Holde, K.E., Ahern, K.G. *Bioquímica*. 3ª Edición. Pearson Educacion S.A. Madrid, 2002. 15, 584-620.
  - 26- Voet, D. y Voet, J.G. 1995. *Biochemistry*. 2ª Edición. USA. John Wiley &
- 
-

- 
- Sons. 20, 563-593.
- 27- Hoch, F.L. 1992. Cardiolipins and biomembrane function. *Biochem. Biophys. Acta* 1113, 71-73.
- 28- Robinson, N.S. 1993. Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase. *J. Biomembr.* 25, 153-163.
- 29- González-Halphen, D. y Vázquez-Acevedo, M. La cadena respiratoria mitocondrial: un enfoque estructural. En: una mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos. (Vázquez Memije, M.E. y Tuena de Gómez-Pouyou). M. Eds.). México. Editorial Prado, 2002, 8, 65-88.
- 30- 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.
- 31- Pedrajas, J.R., Kismidou, E., Miranda-Vizuetta, A., Gustafsson, J-A., Wright, A.P.H. y Spyrou, G. 1999. Identification and characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274, 6366-6373.
- 32- Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker J. Brock *Biología de los microorganismos*. 8ª edición. Printice Hall, 1999. 12, 456., 18, 776.
- 33- Lehninger, A.L. *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular*. 5ª reedición. Ediciones Omega, Barcelona 1972. 17 385, 403-407. 18, 417-422.
- 34- Zentella, P. M. y Saldaña B.Y. *Papel fisiológico de los radicales libres*. Departamento de bioquímica., Facultad de Medicina. UNAM.
- 35- Nicholls, D.G. y Ferguson, S.J. 2002 *Bioenergetics 3*. London, UK Academic Press., 5, 89-156.
- 36- Gupte, S.S y Hackenbrock, C.R. 1998. Multidimensional diffusion modes and collision frequencies of cytochrome c with its redox partners. *J. Biol. Chem.* 263, 5241-5247.
- 37- Gupte, S.S y Hackenbrock, C.R. 1998. The role of cytochrome c diffusion in mitochondrial electron transport. *J. Biol. Chem.* 263, 5248-5253.
- 38- Boumans, H., Grivell, L.A., y Berden, J.A. 1998. The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit. *J. Biol. Chem.* 273, 4872-4877.
- 39- Beckman, K.B. y Ames, B.N. 1998 The free radical theory of aging matures. *Phys. Rev.* 78, 547-581.
-

- 
- 
- 40- Chance, B., Sies, H., y Boveris. A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59. 527-605.
  - 41- Halliwell, B. 1992. Free radicals, antioxidants and human disease. Where we are now? *J. Lab. Clin. Med.* 119, 598-605.
  - 42- Halliwell, B. 1995. Antioxidants; Elixirs of life or tonics for tired sheep? *The Biochemist*, Feb/Mar: 3-6.
  - 43- Rangon V, Bulkley GB. Prospects for treatment of free radicals-mediated tissue injury. *Br Med Bull* 1993;49:700-18.
  - 44- Ballester, M. Antioxidantes, radicales libres y salud. Un enfoque químico-orgánico-físico. Vol. 107. 1996. No. 13. 509-514.
  - 45- Buege, J.A. y Aust, S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods. Enzymol.* 52. 302-310.
  - 46- Chihuailaf, R., Contreras P, Wittwer F. Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación en salud animal. Vol. 33. 2002. No. 3:265-283.
  - 47- Vázquez, M. E., y Tuena de Gómez M. Mitocondria. Una mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos. *Prado.* 5, 111-112.
  - 48- Fox, M. A. y Whitesell J.K. *Química Orgánica.* 2ª Edición. Pearson Educación. 3, 106.
  - 49- Sanhueza, C.J., Nieto, K.S. y Valenzuela, B.A. Acido linoleico conjugado: un acido graso con isomeria trans potencialmente beneficioso. *Rev. Chil. Nutr.*, Ago 2002. Vol 29. No 2, 98-105:
  - 50- Morrison, R. T. y Boyd R. N. *Química Organica.* 5ª edición. Pearson Educación. 37, 1243.
  - 51- Rattray, J. B. M., Schibeci A. and Kidby D. K. Lipids of yeasts. *American Society of Microbiology. Bacteriological Reviews*, Septiembre 1975, 197-231.
  - 52- Fisher., A. y Naughton, D.P. Iron supplements: the quick fix with long-term consequences. *Nutrition Journal* 2004, 3: 2.1-5.
  - 53- Cederbaum, A. I. y Wainio, W. W. Binding of iron copper to bovine heart mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 247, No 14, 4604-4614.
  - 54- Masini. A., Trento. T., Ceccarelli-Stanzani. D. and Ventura Ezio. The effect of ferric iron complex on isolated rat liver mitochondria. I.
- 
-

- 
- 
- Respiratory and electrochemical responses. *Biochemica et Biophysica Acta* 810 (1985) 20-26.
- 55- Forsmark-Andrée, P., Lee, C. P., Dallner, G. and Ernster, L. Lipid Peroxidation and change in the ubiquinone content and the respiratory chain enzymes of submitochondrial particles. *Free Radical Biology and Medicine*. Vol. 22. Nº 3. 391-400, 1997.
- 56- 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.
- 57- Buege, J.A. y Aust, S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods. Enzymol.* 52, 302-310.
- 58- [www.flaxcouncil.ca/spanish/pdf/FP\\_spanish\\_Chptr%202.pdf](http://www.flaxcouncil.ca/spanish/pdf/FP_spanish_Chptr%202.pdf)
- 59- Demasi, A. P. D., Pereira, G. A.G. y Netto, L. E. S Cytosolic thioredoxin peroxidase I is essential for the antioxidant defense of yeast with dysfunctional mitochondria. *FEBS*, 2001. 430-434.
- 60- Brock. *Biología de los microorganismos*. 10ª edición. Addison Wesley.
- 61- Clark-Walker, G.D. y Gabor, G.L. 1975. Complementation in cytoplasmic petite mutants of yeast to form respiratory competent cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72, 372-375.
- 62- Pamplona, R., Prat, J., Cardenas, S., Rojas, C., Perez-Campo, R. Lopez-Torres, M. y Barja, G. 1996. Low fatty acid insaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondrial from long-liver species: the pigeon and human case. *Mech. Ageing Develop.* 86: 53-56.
- 63- Hulbert, A.J. 2005. On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *ELSEVIER. J. Theor. Biol.* 234, 277-288.
- 64- [http://mips.gst.de/proj/eurofan/eurofan\\_2/n4/tables/Table10.htm](http://mips.gst.de/proj/eurofan/eurofan_2/n4/tables/Table10.htm)
- 65- Mitchison, J.M. *The Biology of the Cellular Cycle*. 1962.
- 66- Página web del European Functional Analysis Projects: [http://mips.gsf.de/proj/eurofan/eurofan\\_2/n4/tables/Table10.html](http://mips.gsf.de/proj/eurofan/eurofan_2/n4/tables/Table10.html)
- 67- Howlett, N.G. y Avery, S.V. Induction of lipoperoxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. *Applied Environmental Microbiology*. 1997. Vol. 63. No. 8. 2971-2976.
- 
-

- 
- 
- 68- Fisher, N. y Meunier, B. 2001. Effects of mutations in mitochondrial cytochrome b in yeast and man. Deficiency, compensation and disease. *Eur. J. Biochem.* 268, 1155-1162.
- 69- 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, 47629-47635.
- 70- Lee, Y.I., Hawang, J.M., Im, J.H., Lee, Y.I., Kim, N.S., Kim, D.G., Yu, D.Y., Moon, H.B. y Park, S.K. 2004. Human hepatitis B. virus-X protein alters mitochondrial function and physiology in human liver cells. *J. Biol. Chem.* 279, 15460-15471.
- 71- Petrosillo, G. Ruggiero, F.M., Di Vennosa, N. y Paradies, G. 2003. Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat liver heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin. *FASEB J.* 17, 714-716.
- 72- Breitenbach, M., Madeo, F., Laun, P., Heeren G., Jarolim, S., Fröhlich, Kai-Uwe., Wissing, S. y Pichova, A. 2003. 4 yeast as a model for ageing and apoptosis research. *Current Genetics.* 3, 1 – 38.