



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO EN EL  
METABOLISMO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL DE  
*Saccharomyces cerevisiae* DURANTE EL ENVEJECIMIENTO  
CRONOLÓGICO”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN QUÍMICO-FARMACOBIOLOGÍA

PRESENTA:

ROXANA AGUILAR TORAL

ASESOR D. C. CHRISTIAN CORTÉS ROJO  
CO-ASESOR D. C. CALDERÓN CORTÉS ELIZABETH

MORELIA MICH. JUNIO 2012



## DEDICATORIA

En primer lugar a **Dios** por prestarme la vida, ser mi confidente y permitirme cumplir las metas que me he propuesto.

A mis padres **Ofelia y Espiridión**, por brindarme la oportunidad de estudiar. Mamá y papá ustedes son mi fortaleza, la principal fuente de mi confianza y unos de los más maravillosos seres que conozco. De ustedes he aprendido que siempre hay que trabajar para lograr lo que quiero y que en ocasiones solo se debe tomar una decisión y mantenerse firme en ella. A ambos gracias por quererme, cuidarme, guiarme y estar presentes en mi vida, estoy consciente de que no ha sido fácil, pero eso me ha enseñado a no rendirme. Los Amo mucho.

**Papayito y mamá mu**, a ustedes porque son el pilar más sólido de nuestra familia, siempre han estado presentes en mi vida enseñándome tanto, me han hecho sentir protegida y querida; mamá aunque hace poco usted dejo de estar presente en cuerpo, sé que desde donde se encuentre me estará cuidando. Los quiero demasiado.

A mis hermanos **Juana y Marco**: Por la paciencia que me han tenido siempre, más cuando estoy estresada y por tolerarme. Hija tu siempre estas a mi lado cuidándome y haciéndome ver si cometo alguna equivocación, pero también para compartir nuestras tristezas, alegrías y aventuras, te agradezco por ser mi confidente, mi mejor amiga y mi hermana. Chaparro aun cuando tienes esa habilidad para alterarme, tú me has enseñado mucho y hacemos un estupendo equipo para molestar a nuestros papás. Admito que continúo aprendiendo de ambos y sé que mientras los tenga a ustedes nunca me sentiré sola pues ustedes alegran mi existencia, los Adoro.

También a **mi abuela Juana, a mis tíos, tías, primos y primas** deben saber que agradezco su apoyo y sus consejos, ustedes son muy importantes en mi vida y doy gracias a dios porque me dio esta gran familia, los quiero.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo se realizó con el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología mediante el proyecto 130638 de Ciencia Básica 2009 y el Apoyo a la Incorporación de nuevos PTC del Sistema de Mejoramiento del Profesorado (PTC-266)

## **AGRADECIMIENTOS**

Al **D.C. Christian Cortés Rojo**, por permitirme trabajar con usted, su asesoría, apoyo y disposición para compartir su conocimiento, así como los momentos compartidos en el laboratorio.

A mi co-asesor **D. C. Calderón Cortés Elizabeth** y a mis revisores **D. C. Godinez Hernández Daniel**, **D.C. Saavedra Molina Alfredo**, **D. C. Gauthereau Torres Marcia Yvette**, **D.C. Rodríguez Orozco Alain Raimundo** y **QFB. Pisano Báez Jaqueline**, por el apoyo prestado durante todo este proceso.

A **Maricela**, por todo este tiempo que hemos convivido, por ser mi amiga, tolerarme y siempre estar ahí, aun cuando salíamos muy tarde del laboratorio.

Desde luego a **Mirella** por muchos motivos, en especial la paciencia que tuviste al momento de capacitarme para los procedimientos a realizar y por brindarme tú amistad.

A la **Q.F.B. Mónica Clemente Guerrero** por todo el apoyo que me ha brindado durante todo este proceso y los momentos divertidos de plática.

Del IIQB a mis compañeros **Carlos, Pedro, Lucio, Ruth, Lorena, Claudia, Denia, Erika**; en especial a **Omar, Ana Gabriela, y Viridiana** por su ayuda, consejos y conversaciones que han hecho más amenas las horas pasadas en el laboratorio.

A mis amigas **María Karem, Irais, Edna y María de Jesús** por permitirme tratarlas, ser su amiga y siempre darme ese ánimo cuando lo he necesitado, también a **Edgar , Polo y Omar** que siempre me han hecho sonreír y me impulsan a seguir con mis sueños aunque en ocasiones parezcan una locura.

**A mi familia** que siempre me ha dado ánimo y me impulsa a seguir con mis sueños y cumplir mis metas.

Y muy especialmente a la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo** que me brindó la oportunidad de estudiar en sus aulas en mi formación académica.

## INDICE

RESUMEN .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	2
1.1 Envejecimiento .....	2
1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio .....	3
1.3 Membranas celulares .....	5
1.4 La mitocondria .....	6
1.4.1 Membranas mitocondriales .....	7
1.5 Metabolismo oxidativo en la mitocondria .....	8
1.6 Cadena de transporte de electrones .....	9
1.6.1 Complejos transportadores de electrones .....	11
1.6.2 Complejo I, Deshidrogenasa de NADH o NADH-UQ oxidorreductasa .....	11
1.6.3 Complejo II o Succinato Deshidrogenasa .....	12
1.6.4 Complejo III (Complejo Citocromo <i>bc</i> <sub>1</sub> , Ubiquinona: Citocromo <i>c</i> Oxidorreductasa) .....	12
1.6.5 Complejo IV (Citocromo <i>c</i> oxidasa, Ferrocitocromo-O <sub>2</sub> Oxidorreductasa .....	13
1.7 Potencial de membrana .....	13
1.8 Importancia del pH en los sistemas biológicos .....	15
1.9 Radicales libres y estrés oxidativo .....	16
1.10 Fosforilación oxidativa .....	18
1.10.1 Estructura y propiedades de la molécula de ATP .....	19
1.10.2 Estructura de la F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> ATP sintasa .....	19
1.10.3 Mecanismo de síntesis del ATP por la F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> ATP sintasa .....	20
1.10.4 Desacoplamiento e inhibición de la fosforilación oxidativa .....	23
1.11 Los Ácidos grasos y el envejecimiento .....	23
2. HIPÓTESIS .....	27
3. OBJETIVOS .....	27

3.1 Objetivo general.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
4.1 Reactivos .....	28
4.2 Cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	28
4.3 Manipulación del contenido de ácidos grasos .....	28
4.4 Aislamiento de mitocondrias de levadura .....	28
4.5 Medición del pH del medio .....	30
4.6 Inducción al estrés oxidativo .....	30
4.7 Ensayo de lipoperoxidación por el método del ácido tiobarbiturico .....	30
4.8 Determinación de la lipoperoxidación por un método polarografico .....	31
4.9 Actividad de la F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> ATPasa .....	31
4.10 Medición del potencial de membrana .....	32
4.11 Análisis de la composición de ácidos grasos mitocondrial .....	32
4.12 Análisis estadístico .....	33
5. RESULTADOS .....	34
5.1 Composición de ácidos grasos de <i>S. cerevisiae</i> .....	34
5.2 Influencia del C18:3 sobre los cambios de pH extracelular, el envejecimiento en el pH del medio.....	36
5.3 Niveles de peroxidación lipídica durante el envejecimiento .....	38
5.4 Efecto del C18:3 sobre el potencial de membrana mitocondrial de <i>S. cerevisiae</i> en relación al envejecimiento .....	47
5.5 Actividad de la ATPasa durante el envejecimiento .....	48
6. DISCUSIÓN .....	50

7. CONCLUSIÓN .....	58
8. BIBLIOGRAFÍA .....	59

## RESUMEN

Para investigar los cambios que suceden en la funcionalidad mitocondrial durante el envejecimiento celular, se evaluaron distintos parámetros de la función mitocondrial como lo son la medición de los niveles de lipoperoxidación, el potencial de membrana mitocondrial, la actividad de la  $F_0F_1$  ATPasa, durante el envejecimiento cronológico de células nativas (-C18:3) de *S. cerevisiae* y en células cuyas membranas fueron enriquecidas con ácido  $\alpha$ -linolénico (+C18:3). Así como el análisis de la composición de ácidos grasos mitocondriales y la medición del pH de los distintos medios.

El análisis de ácidos grasos mostro que el ácido  $\alpha$ -linolénico se convierte en el principal componente de ácidos grasos de la membrana mitocondrial, mostrando estos una mayor acidificación del medio de cultivo, lo cual ha sido considerado un marcador de envejecimiento en levaduras.

En los cultivos de 28 días no se observó peroxidación lipídica mostrando una resistencia a este parámetro en presencia de C18:3 por la modificación del método reportado por Buege y Aust. Mientras que al medir las primeras etapas (iniciación) de la lipoperoxidación por consumo de oxígeno, se vio una disminución mientras más envejecida estuviese la célula.

La hidrólisis del ATP por la  $F_1F_0$  ATPasa, se ve disminuida conforme más envejecida se encuentre la mitocondria sin haber diferencias en presencia o ausencia del ácido  $\alpha$ -linolénico.

Los resultados de la medición de potencial de membrana mitocondrial en presencia de glucosa fueron nulos en las células +C18:3, mientras que en las células -C18:3 de 28 días, si se detectó este parámetro.

En conjunto, estos datos muestran que la incorporación del C18:3 aumenta la tasa de envejecimiento cronológico de *S. cerevisiae* de manera paralela a una disminución en la funcionalidad mitocondrial atribuible a la pérdida del potencial de membrana. En tanto que las levaduras crecidas en medio Ylac su metabolismo energético mitocondrial se ve afectado sin importar la presencia o ausencia del ácido  $\alpha$ -linolénico.



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. ENVEJECIMIENTO

El proceso de envejecimiento es un fenómeno biológico, progresivo, endógeno, irreversible y perjudicial para el individuo (Hulbert *et al.*, 2007). Se define como un síndrome caracterizado por cambios deletéreos, progresivos e irreversibles que afectan a las Biomoléculas (DNA, lípidos y proteínas), células, tejidos y órganos del cuerpo, que conducen a la morbilidad y mortalidad. (Kirkwood, 1989). Cada especie tiene una velocidad característica de envejecimiento.

Según apunta una de las teorías del envejecimiento, los seres vivos han sido diseñados para reproducirse y posteriormente extinguirse, puesto que la evolución ha optado por favorecer la reproducción frente a la inmortalidad. (Peinado *et al.*, 2000). Las células tienen una capacidad proliferativa limitada, de forma que las células procedentes de individuos viejos se dividen un menor número de veces que las procedentes de embriones o de individuos jóvenes. (Peinado *et al.*, 2000)

La disminución progresiva de la funcionalidad mitocondrial, es característica del envejecimiento. En algunos estudios, se ha demostrado una correlación inversa entre la longevidad de diversas especies animales y el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana mitocondrial (Pamplona *et al.*, 2000), lo que sugiere que la proporción de ácidos poliinsaturados presentes en las membranas mitocondriales podría ser un factor que determina la longevidad, ya que las membranas con una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados son más susceptibles al daño oxidativo y a la formación de especies reactivas de oxígeno (Cortés Rojo *et al.*, 2009).

El envejecimiento se acompaña de enfermedades neurodegenerativas, vasculares, la enfermedad de Parkinson o la de Alzheimer, cuya incidencia

aumenta exponencialmente en función de la edad (Peinado *et al.*, 2000), lo cual está posiblemente relacionado con el hecho de que la capacidad de mantener la homeostasis se atenúa con la edad (Hulbert *et al.*, 2007).

## 1.2. *Saccharomyces cerevisiae* COMO MODELO DE ESTUDIO

Las levaduras son organismos eucariontes y unicelulares pertenecientes al reino Fungi (Helber Álvarez *et al.*, 2011), que ha contribuido al progreso científico por ser un buen modelo de estudio de los procesos bioquímicos y metabólicos básicos de las células eucariontes debido a que es uno de los organismos eucariontes más fáciles de manipular desde el punto de vista genético y bioquímico (Pelczar y cols, 1992). Las levaduras crecen como colonias cremosas similares a las bacterianas (Bonifaz, 2000). La mayoría son mesofílicas, con una temperatura máxima de crecimiento entre 24 y 48°C, toleran un rango de pH entre 3 y 10, pero prefieren un medio ligeramente ácido con un pH de 4.5 - 6.5 (Déak y Beuchat, 1996).

Dentro los hongos levaduriformes se encuentra el género *Saccharomyces*, cuya especie *cerevisiae* es un hongo ascomiceto (Helber Álvarez *et al.* 2011). Ha sido estudiado ampliamente dada su importancia en la industria panadera y vitivinícola, así como por la capacidad de producir etanol. (Folch-Mallol *et al.*, 2004). *S. cerevisiae* puede metabolizar la glucosa y la fructosa tanto por la vía respiratoria como por la vía fermentativa y es capaz de crecer en condiciones aerobias o anaerobias (González *et al.*, 2007). Suele crecer a pH ácido, entre 4.5 y 5 (Helber Álvarez *et al.*, 2011).

La reproducción de *Saccharomyces cerevisiae* puede ser tanto de forma sexual como asexual. En su reproducción asexual la levadura se divide por gemación y en la sexual por meiosis (Gonzalez y Valenzuela *et al.*, 2000).

Este microorganismo muestra 5 fases de crecimiento bien definidas cuando se cultiva en medios líquidos con glucosa como fuente de carbono: la fase lag (la célula se prepara para dividirse), la fase logarítmica (alcanza su máxima velocidad de replicación y se lleva a cabo el metabolismo fermentativo), el cambio diáuxico (al disminuir la glucosa, hay un periodo breve en el que no hay división y la célula cambia al metabolismo respiratorio), la fase postdiáuxica (usan como fuente de carbono el etanol producido en la fase logarítmica e incrementa su resistencia al estrés gradualmente) y la fase estacionaria (cuando los nutrientes se han agotado y no hay división celular, se acumulan carbohidratos de reserva, se alcanza el nivel máximo de resistencia al estrés y su pared celular se vuelve más gruesa) (Folch-Mallol *et al.*, 2004).

*S. cerevisiae* ofrece algunas ventajas como modelo biológico en investigación: por un lado la facilidad con que se obtienen grandes cantidades de este microorganismo y el hecho de que posee un ciclo de vida que al incluir una fase sexual permite abordar estudios con las herramientas que provee la genética formal, otra característica es el tamaño de su genoma, que por ser pequeño facilitó su secuenciación (Gonzales y Valenzuela *et al.*, 2000).

Asimismo su cultivo por periodos prolongados se ha considerado un modelo del proceso de envejecimiento de tejidos post-mitóticos de mamíferos (Cortés Rojo *et al.*, 2009).

*Saccharomyces cerevisiae* contiene en sus membranas únicamente ácidos grasos saturados y monoinsaturados (Cortés Rojo *et al.*, 2009). Los ácidos grasos monoinsaturados son el ácido palmitoléico (C16:1) y el ácido oleico (C18:1) que constituyen un 70-80% del total, el resto son los ácidos grasos saturados: ácido palmítico (C16:0) y ácido esteárico (C18:0) (Bossie y Martin, 1989). La levadura no sintetiza ácidos grasos poliinsaturados ya que no contiene las enzimas desaturasas necesarias para la formación de más de un doble enlace, como la desaturasa  $\Delta 12$ , que produce ácido linoleico (Cipack, 2008).

### 1.3. MEMBRANAS CELULARES

Las membranas sirven de barrera para la separación de los componentes acuosos con composiciones de soluto diferentes, como base estructural a la que se hayan unidas firmemente algunas enzimas y sistemas de transporte; son muy delgadas y flexibles (Lehninger, 1972), además ayudan en la interacción celular y en la transducción de energía (Karp, 2006).

Las membranas biológicas están constituidas por una bicapa de lípidos polares mixtos, con sus cadenas hidrocarbonadas orientadas hacia el interior y sus cabezas hidrofílicas orientadas hacia el exterior, con moléculas de proteínas globulares penetrando por cada lado de la membrana o extendiéndose enteramente por ella. No existe regularidad de largo alcance en el espaciado de las moléculas de proteína, algunas pueden estar organizadas en forma de complejos. Las membranas contienen entre un 50 y 60% de proteína y un 40-50 % de lípidos (Lehninger, 1972), y también contienen carbohidratos unidos en forma covalente con los componentes lipídicos y proteicos. Hay tres tipos principales de lípidos de membrana: fosfoglicéridos, esfingolípidos y colesterol (Karp, 2006).

La fluidez en la membrana es importante ya que ayuda en el movimiento, crecimiento, la división celular, la formación de uniones entre células, la secreción y la endocitosis (Karp, 2006). Con el paso del tiempo se observa una reducción de la fluidez de la membrana, debido a la alteración de su composición lipídica, (Chen, 1994) que tiende a aumentar hacia ácidos grasos poliinsaturados los cuales son muy peroxidables lo que contribuye a la rigidez de la membrana junto con un aumento en la proporción del colesterol, lo cual se correlaciona con la pérdida de su funcionamiento (Hulbert *et al.*, 2007).

#### 1.4. LA MITOCONDRIA

Las mitocondrias son fábricas de energía en la célula, donde los glúcidos, lípidos y ácidos se oxidan a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O por el oxígeno molecular y la energía liberada se transforma en energía del ATP (Lehninger, 1972), presentes en el citoplasma (Passarge, 2007) de todas las células aeróbicas eucariontes (Boveris *et al.*, 2000).

La cantidad de mitocondrias, el tamaño y la forma en las células eucarióticas varía enormemente, de acuerdo con su origen y estado metabólico (Whittaker, 1982; Voet y Voet, 2006). La forma de las mitocondrias varía de esférica a cilíndrica; las cilíndricas tienen de 2µm o más de diámetro y hasta 10 µm de longitud, mientras que las esféricas miden de 0.5 a 5 µm (Whittaker, 1982), pero la forma no es constante, se modifica continuamente en la célula (Nicholls, 1987) ya que son orgánulos muy dinámicos, pueden fusionarse para formar redes mitocondriales interconectadas o fragmentarse generando mitocondrias separadas, se cree que estos procesos son un sistema de control de acuerdo con las necesidades metabólicas de la célula (Braun y Westermann, 2011). Frecuentemente, se encuentran localizadas cerca de las estructuras que necesitan ATP o cerca de la fuente de combustible de la cual dependen (Whittaker, 1982; Lehninger, 1972).

La mitocondria posee dos membranas: una interna y otra externa. La membrana mitocondrial externa rodea a la mitocondria completa y sirve de límite exterior (Karp, 2006; Whittaker, 1982). El interior del orgánulo contiene una serie de hojas membranosas de doble capa, las crestas, que llegan hasta la membrana mitocondrial interna en el límite del organelo. Las crestas tienen una gran cantidad de superficie de membrana, es aquí donde se aloja la maquinaria necesaria para la respiración aeróbica y la formación de ATP.

Los avances en la microscopía electrónica han permitido observar que las crestas no son simples invaginaciones de la membrana interna. Ahora la mayoría de los estudiosos de la mitocondria están de acuerdo en que la membrana limitante interna y las membranas internas de las crestas poseen funciones distintas, aunque están unidas entre sí por conexiones estrechas (Karp, 2006).

Las dos membranas de la mitocondria generan la división de dos espacios acuosos, el compartimento interior, llamado matriz rodeado por la membrana interna y las crestas, tiene una consistencia gelatinosa, con menos del 50% de agua, por la elevada concentración de proteínas hidrosolubles, aquí se contiene enzimas del metabolismo oxidativo, ribosomas y varias moléculas de ADN (Voet y Voet, 2006). El segundo compartimento esta entre las membranas interna y externa, llamado espacio intermembranoso (Karp, 2006).

#### 1.4.1 MEMBRANAS MITOCONDRIALES

Las propiedades de las dos membranas mitocondriales son muy diferentes, principalmente en su permeabilidad (Whittaker, 1982). La membrana mitocondrial externa contiene porinas que son proteínas integrales, las cuales forman poros que permiten la difusión de moléculas de hasta 10 kDa (Voet y Voet, 2006). Cerca del 50% del peso de esta membrana lo constituyen los lípidos y contiene enzimas que participan en actividades como la oxidación de adrenalina, la degradación del triptófano y la elongación de los ácidos grasos (Karp, 2006).

La membrana interna es rica en fosfolípidos como la cardiolipina (Whittaker, 1982) y el fosfatidilglicerol, los cuales son característicos en las membranas plasmáticas bacterianas (Karp, 2006). Esta membrana está constituida alrededor de un 80% de proteína, incluyendo un gran número de enzimas y sistemas de transporte diferentes, mientras que el 20% restante son lípidos (Lehninger, 1972), por lo que solo es permeable a moléculas sin carga como O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O no disociados (Whittaker, 1982). Dada su impermeabilidad a las moléculas y iones contiene

además de las proteínas de la cadena respiratoria, proteínas transportadoras de membrana especiales para el ingreso de los mismos a la matriz (Voet y Voet, 2006).

Dentro de la mitocondria se llevan a cabo distintos procesos metabólicos como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la fosforilación oxidativa, la oxidación de ácidos grasos y el catabolismo de los aminoácidos, entre otros (Lehninger, 1972), cuya finalidad es proveer la energía necesaria para llevar a cabo funciones como biosíntesis, contracción muscular, mantener los gradientes iónicos, regulación de hormonas y neurotransmisores, así como la muerte celular mediante la apoptosis (Martínez-Abundis *et al.*, 2005; Boveris *et al.*, 2000).

Las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae* presentan algunas diferencias fisiológicas en comparación con las mitocondrias de mamífero, destacando la ausencia del complejo I, la presencia de una citocromo c peroxidasa que cataliza la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la constitución lipídica de las membranas mitocondriales, la cual está constituida como se mencionó anteriormente por los ácidos grasos palmitoléico (C16:1), ácido oleico (C18:1), ácido palmítico (C16:0) y ácido esteárico (C18:0) (Cortés Rojo *et al.*, 2006).

## 1.5. METABOLISMO OXIDATIVO EN LA MITOCONDRIA

Los primeros pasos del proceso oxidativo ocurren en el citosol por la vía catabólica de la glucólisis, donde se produce por cada molécula de glucosa oxidada una síntesis neta de dos moléculas de ATP dos de piruvato y dos de NADH (Koolman, 2005).

Estos dos últimos productos pueden procesarse de dos formas; en ausencia de oxígeno el piruvato y el NADH reaccionan mediante la acción de la enzima lactato deshidrogenasa para formar lactato (McGilvery, 1977) o etanol en las levaduras. El NAD<sup>+</sup> formado en esta reacción es necesario para la continuación de la glucolisis

(Koolman, 2005). En presencia de oxígeno pueden producirse 36 moléculas de ATP; cada molécula de piruvato se transporta a través de la membrana interna y hacia la matriz, donde sufre una reacción de descarboxilación perdiendo un CO<sub>2</sub>. Se forma un compuesto de dos carbonos llamado grupo acetilo que se une a la coenzima A para producir acetil-CoA y NADH, por acción de la enzima piruvato deshidrogenasa (Karp, 2006; Tortora *et al.*, 2007).

El ciclo del ácido cítrico o ácido tricarbóxico (ATC) está integrado por una serie de reacciones que oxidan el acetil-CoA a dos moléculas de CO<sub>2</sub> de una forma que conserva su energía para utilizarla en la producción de ATP (Voet y Voet, 2006). En el primer paso del ciclo del ATC se desprende la CoA del grupo acetilo. Se combina el grupo acetilo de dos carbonos con un oxalacetato de cuatro carbonos para formar el citrato de 6 carbonos (Tortora *et al.*, 2007). Durante el ciclo se regenera el oxalacetato y se liberan dos moléculas de CO<sub>2</sub> (uno a la vez) (Teijon, 2006). Es importante recordar ocurren cuatro reacciones en las que un par de electrones se transfiere de un sustrato a una coenzima receptora de electrones ya sea NAD<sup>+</sup> o FAD, produciendo tres moléculas de NADH y una molécula de FADH<sub>2</sub>, estas coenzimas contienen los electrones de alta energía, por lo que son oxidados seguidamente por la cadena de transporte de electrones (Devlin, 2004).

La mitocondria no es capaz de importar el NADH formado en el citosol por la glucólisis, éste tiene que entrar mediante la vía llamada lanzadera de malato-asparto o por la vía lanzadera de fosfato de glicerol, se utilizan estas coenzimas reducidas para producir ATP (Karp, 2006).

## 1.6. CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES

Aunque las mitocondrias muestran una variedad de funciones diferentes, no hay duda que la más importante es el transporte de electrones ligado a la síntesis de ATP (Whittaker, 1982).



Los electrones pasan a una serie de transportadores que constituyen la cadena transportadora de electrones, por medio de reacciones oxidación-reducción del FADH<sub>2</sub> o NADH, antes de reducir el O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O (Voet y Voet, 2006; Nicholls, 1987). A medida que los electrones pasan a lo largo de la cadena se libera energía de forma gradual, la cual se utiliza para la generación del ATP (Tortora *et al.*, 2007).

La cadena transportadora de electrones se compone de cinco clases de portadores de electrones unidos a la membrana: flavoproteínas, citocromos, átomos de cobre, ubiquinona y proteínas con hierro y azufre. Todos, excepto la ubiquinona, son grupos prostéticos (Karp, 2006).

La flavoproteínas: son polipéptidos unidos a uno o dos grupos prostéticos con dinucleótido de flavina adenina (FAD) o mononucleótido de flavina (FMN). Sufren reacciones de oxidoreducción reversibles, cada uno es capaz de aceptar y donar dos protones y dos electrones. Las principales flavoproteínas en la mitocondria son la deshidrogenasa de NADH y la deshidrogenasa de succinato. (Karp, 2006; Roskoski, 2003; Lehninger, 1972).

Citocromos: los citocromos solo se encuentran en células aeróbicas (Lehninger, 1972). Son proteínas que contienen hierro (grupo hemo). El átomo de hierro del grupo hemo es capaz de alternar entre los estados de oxidación de Fe<sup>3+</sup> y Fe<sup>2+</sup> (reducción), resultado de la aceptación y pérdida de un solo electrón, (Tortora *et al.*, 2007). Estos se clasifican de acuerdo a la estructura de su grupo prostético, en citocromos *a*, *b* y *c* (Nicholls, 1987).

Los átomos de cobre: se localizan en el complejo IV, aceptan y donan un solo electrón cuando alternan sus estados de oxidación Cu<sup>2+</sup> y Cu<sup>1+</sup> (Karp, 2006).

La ubiquinona (coenzima Q, Co Q, UQ o Q) es una molécula liposoluble que puede moverse desde las moléculas donadoras a lasceptoras durante el transporte de electrones (Roskoski, 2003) y contiene una cadena hidrofóbica larga compuesta de unidades isoprenoides de cinco carbonos. Puede aceptar y donar

dos electrones y dos protones (Karp, 2006) para formar ubiquinol (UQH<sub>2</sub>). Conecta los complejos I y II con el III (Nicholls, 1987).

Las proteínas hierro-azufre (Fe- S): contienen hierro unido a la a la apoproteína por medio del azufre inorgánico como parte del centro hierro-azufre, que pueden tener 2 o 4 átomos de hierro. El complejo es capaz de aceptar y donar un solo electrón (Nicholls, 1987).

A medida que los pares de electrones pasan de un portador al siguiente, pierden energía conforme se desplazan a lo largo de la cadena (Lehninger, 1972), ya que la transferencia de electrones de un reductor a un oxidante es exergónica (Roskoski, 2003). El aceptor final de esta cadena es el oxígeno que acepta los electrones con energía agotada y se reduce para formar agua (Karp, 2006). El proceso rinde 52,7 kcal de energía libre por átomo de oxígeno reducido (Lehninger, 1972).

#### 1.6.1. COMPLEJOS TRANSPORTADORES DE ELECTRONES

En algunos casos, la síntesis de ATP se realiza en complejos enzimáticos solubles, pero la mayoría lo hace en complejos enzimáticos ligados a membranas como la membrana de bacterias y cianofíceas, la membrana interna mitocondrial y la membrana tilacoide de los cloroplastos (Nicholls, 1987).

La cadena respiratoria está formada por tres bombas de protones que corresponden a los complejos I, III y IV, funcionan en paralelo si se consideran respecto al circuito de protones, mientras que respecto a la corriente eléctrica funcionan en serie, cada complejo es independiente dentro de la membrana mitocondrial interna. En total se bombean diez protones a través de la membrana (Nicholls, 1987; Devlin, 2004).

**1.6.2. COMPLEJO I, DESHIDROGENASA DE NADH O NADH-UQ OXIDORREDUCTASA:** cataliza la transferencia de un par de electrones del NADH a la ubiquinona para formar ubiquinol, con un potencial redox ( $\Delta E_h$ ) alrededor de

310 mV (Nicholls, 1987). En mamíferos es un conglomerado con forma de L que contiene por lo menos 43 subunidades diferentes y presenta una masa molecular de más de un millón de daltones. Siete de las subunidades (polipéptidos hidrófobos) cruzan la membrana, se codifican por genes mitocondriales y son homólogos de los polipéptidos bacterianos.

El complejo I incluye una flavoproteína con FMN que oxida al NADH por medio de la NADH deshidrogenasa, con seis o siete centros hierro-azufre distintos y dos moléculas unidas de ubiquinona. El paso de un par de electrones por el complejo I se acompaña del movimiento de cuatro protones de la matriz al espacio intermembranoso (Karp, 2006; Voet y Voet, 2006). El complejo I puede ser inhibido por rotenona o piricidina A (Nicholls, 1987).

#### **1.6.3. COMPLEJO II O SUCCINATO DESHIDROGENASA:**

El complejo II contiene la enzima succinato deshidrogenasa que cataliza la reacción de oxidación de succinato a fumarato en el ciclo de Krebs, transfiriendo dos electrones a FAD, formando FADH<sub>2</sub> que transfiere los electrones a la ubiquinona, a través de los tres grupos Fe-S ([2Fe-2S]-[4Fe-4S]-[3Fe-3S]). Este complejo está formado por cuatro polipéptidos, dos unidades hidrófobas ancladas a la membrana, dos subunidades hidrófilas, una subunidad contiene FAD y la otra subunidad contiene los centros Fe-S (Voet y Voet, 2006; Devlin, 2004). La transferencia de electrones a través del complejo II no se acopla a la traslocación de H<sup>+</sup> (Roskoski, 2003).

**1.6.4. COMPLEJO III (COMPLEJO CITOCROMO *bc*<sub>1</sub>, UBIQUINONA: CITOCROMO *c* OXIDORREDUCTASA):** cataliza la transferencia de electrones del ubiquinol al citocromo *c*. Por cada par de electrones que se transfiere al complejo III se bombean cuatro protones a través de la membrana, dos provienen de la molécula de ubiquinol que ingreso al complejo y dos provienen de la matriz y se transfieren hacia una segunda molécula de ubiquinol. Contiene dos citocromos tipo-*b* un citocromo C<sub>1</sub> cada uno de los cuales contiene un grupo hemo y un grupo

Fe-S. El citocromo *b* es el único polipéptido del complejo codificado en un gen mitocondrial (Karp, 2006; Voet y Voet, 2006).

El complejo es inhibido por Antimicina A, mixotiazol y estigmatelina (Nicholls, 1987).

**1.6.5. COMPLEJO IV (CITOCROMO C OXIDASA, FERROCITOCROMO-O<sub>2</sub> OXIDORREDUCTASA):** Representa el paso final del transporte de electrones, por la transferencia sucesiva de electrones del citocromo *c* reducido al oxígeno. Por cada molécula de oxígeno reducida se captan ocho protones de la matriz, de los cuales cuatro se consumen en la formación de dos moléculas de agua y el resto se traslocan a través de la membrana hacia el espacio intermembranal (Karp, 2006). En el complejo hay cuatro grupos redox: dos átomos de Cu<sup>+2</sup> que forman un sitio denominado Cu<sub>A</sub>, un grupo hemo *a* y un centro binuclear hemo *a*<sub>3</sub>-Cu<sub>B</sub>. Este complejo se inhibe por cianuro, azida, óxido nítrico y monóxido de carbono (Roskoski, 2003; Voet y Voet, 2006).

*Saccharomyces cerevisiae* no tiene complejo I, en su lugar contiene dos NADH: ubiquinona oxidoreductasa que son insensibles a rotenona y que se localizan en la membrana interna mitocondrial, una orientada hacia el lado del espacio intermembranal y que se encarga de oxidar el NADH del citosol y la otra orientada hacia el lado de la matriz para oxidar el NADH proveniente de este compartimiento. Por lo tanto, la mitocondria de la levadura solo tiene como sitios de acoplamiento el complejo III y el complejo IV (Grandier-Vazeille *et al.*, 2001).

## 1.7.POTENCIAL DE MEMBRANA

La diferencia de voltaje o potencial eléctrico entre dos puntos como sucede dentro y fuera de la membrana plasmática, es generado cuando hay un exceso de iones positivos en un punto, al igual que negativos en otro (Karp, 2006). Las

reacciones exergónicas del transporte de electrones proporcionan la energía que se utiliza para mover protones de la matriz hacia el espacio intermembranoso y el citosol (Roskoski, 2003). La traslocación genera y mantiene un gradiente electroquímico; ya que produce un voltaje por lo tanto un gradiente eléctrico, aumentando la cantidad de cargas positivas en el espacio intermembranoso y el citosol y mayor cantidad cargas negativas en la matriz. El otro gradiente lo constituye la diferencia de concentración de iones hidrógeno en ambos lados de la membrana, que genera un gradiente químico de pH ( $\Delta\text{pH}$ ), por la diferencia en la concentración de  $\text{H}^+$  (Karp, 2006).

Estos gradientes generan el potencial de membrana a través de la mitocondria acoplado a una serie de reacciones redox (Sakamuru *et al.*, 2012). Por su parte, el potencial de membrana plasmático es la fuerza impulsora para el transporte de cationes monovalentes alcalinos a través de los uniportadores específicos Trk 1p y Trk2p, el primero es de alta afinidad y el segundo de baja afinidad (Peña *et al.*, 2010).

El potencial de membrana lo utiliza la mitocondria para transportar algunos metabolitos en contra de gradientes tanto hacia el interior como el exterior de la mitocondria (Lehninger, 1972). Por otro lado, para que se mantenga la fuerza motriz de protones es necesario que la membrana mitocondrial interna permanezca impermeable a los protones de lo contrario el gradiente establecido se disipa en poco tiempo por el escape de protones de regreso a la matriz, conduciendo a la liberación de energía en forma de calor (Karp, 2006). En virtud de lo anterior y de que la energía presente en el gradiente electroquímico mitocondrial depende en parte del transporte de electrones a través de la cadena respiratoria y de la integridad de la membrana interna mitocondrial, esto hace que el potencial de membrana sea un parámetro utilizado para la evaluación de la función mitocondrial (Sakamuru *et al.*, 2012).

La disminución en el potencial de membrana mitocondrial se ha asociado con la disfunción de la mitocondria que podría conducir a la muerte celular

(Sakamuru *et al.*, 2012). La pérdida de potencial se también se puede deber a que en la mitocondria se puede abrir de forma transitoria un poro (MPTP, del inglés *Mitochondrial Permeability Transition Pore*) que de forma inespecífica deja salir iones y moléculas inferiores a 1.5 kDa, entre ellos  $\text{Ca}^{+2}$ , disipando el potencial de membrana y alterando la función de la  $\text{F}_1\text{F}_0$  ATP sintasa, la cual funciona gracias al gradiente de  $\text{H}^+$  en sentido de la síntesis de ATP, mientras que al disiparse el potencial de membrana, funciona en sentido inverso como una ATPasa (Peinado *et al.*, 2000). Además, la apertura del poro puede conducir a la sobreproducción de aniones superóxido (Veenman *et al.*, 2010).

Respecto a la regulación del MPTP, elevadas concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico y el estrés oxidativo, activan su apertura. La pérdida del potencial de membrana mitocondrial no sólo implica reducción de los mecanismos productores de energía, sino que ello redundaría en la pérdida de la homeostasis celular, que a su vez implica nuevos aumentos de  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico y, por consiguiente, la autoalimentación de un proceso que acaba provocando muerte celular mediante necrosis o apoptosis (Peinado *et al.*, 2000).

## 1.8. IMPORTANCIA DEL pH EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

El pH tiene un papel importante sobre la actividad enzimática ya que las enzimas poseen un pH característico al cual su actividad es máxima; por encima o por debajo de ese valor su actividad disminuye; esta relación depende del comportamiento ácido-base de la enzima y del sustrato.

Muchos tipos de reacciones que tienen lugar en las células, como la adición de agua a los grupos carbonilo, la hidrólisis de los ésteres carboxílicos y fosfóricos, la eliminación de agua de los enlaces dobles, y muchas reacciones de sustitución del tipo ácido-base.

Hay que considerar también que cada microorganismo tiene un rango de pH en el que puede vivir adecuadamente, fuera de este rango muere. Se a

descrito que como consecuencia del metabolismo microbiano, el pH del medio de cultivo tiende a bajar durante el periodo de incubación, es así como a un pH elevado (cerca de ocho), el crecimiento microbiano disminuye; sin embargo, parece no afectar las funciones metabólicas ni energéticas de las células (Lehninger, 1972, Helber Álvarez *et al.*, 2011).

Existen evidencias experimentales, en las cuales ha mutado la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando desaturasa  $\Delta 12$  y desaturasa  $\Delta 3$ , con el objetivo de que esta levadura produzca ácido linoleico y  $\alpha$ -linolénico. Los resultados de estos estudios han demostrado que *Saccharomyces cerevisiae* se vuelve más tolerante a pH alcalino (Yazawa Hisashi *et al.*, 2009).

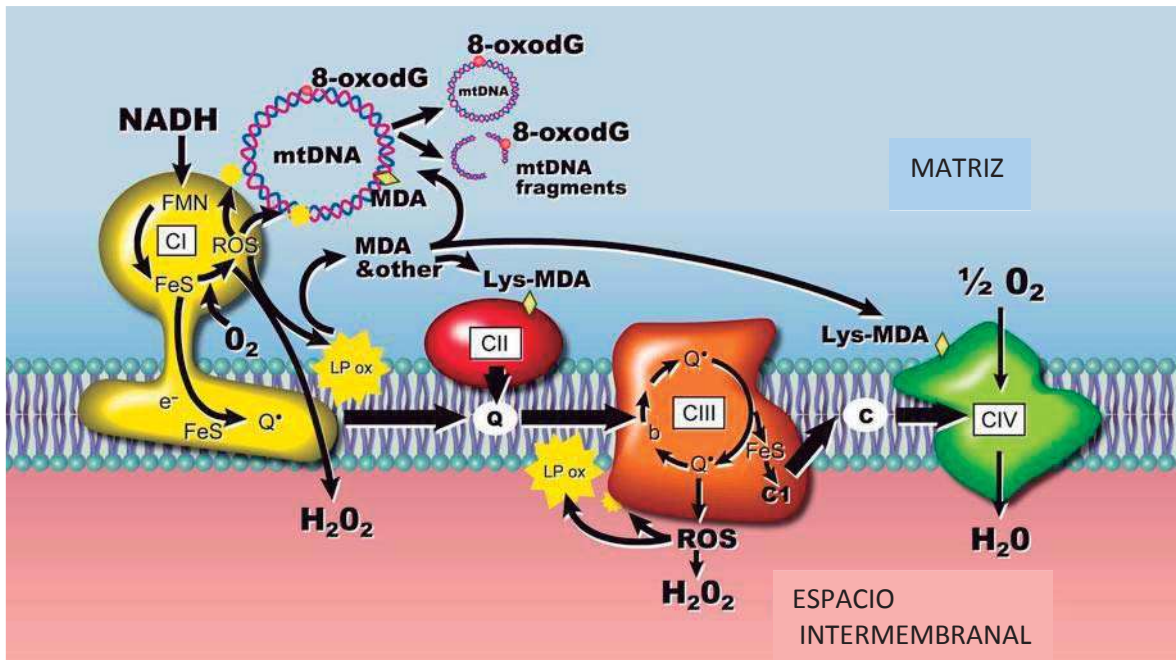
## 1.9. RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO

El daño oxidativo es un término usado para describir el ataque a las moléculas biológicas por radicales libres (Hulbert *et al.*, 2007).

En las células de los organismos aeróbicos la cadena transportadora de electrones (CTE) de la mitocondria es la más importante fuente generadora de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Cortés Rojo *et al.*, 2006; Avery *et al.*, 2001), principalmente en los complejos I y III (esquema 1), (Hulbert *et al.*, 2007) o por fuentes exógenas como infecciones virales, bacteriológicas o fúngicas (Keller *et al.*, 2000), así como por reacciones de hidroxilación y de hidrogenación (Lehninger, 1972), por medicamentos y metales pesados (Avery *et al.*, 2001). Esta producción de ROS, se debe a que la utilización y manejo del  $O_2$  en la célula no es perfecta, lo cual ocasiona una ruptura de la homeostasis, causando la muerte y por consiguiente determina la longevidad característica de cada especie en particular (Montgomery *et al.*, 2011).

Los radicales libres de oxígeno son átomos o moléculas que presentan un electrón desapareado, son especies de vida corta (milisegundos) (Cortés Rojo *et al.*, 2004), muy inestables y altamente reactivas frente a moléculas vecinas a las

que provocan daños oxidativos irreparables. Los que producen mayor toxicidad corresponden al ion superóxido ( $O_2^-$ ), el hidroxilo ( $OH^-$ ), el agua oxigenada ( $H_2O_2$ ), el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Estas moléculas pueden causar daño a células y tejidos al oxidar directamente a moléculas como los lípidos (principalmente ácidos poliinsaturados de las membranas), proteínas y ácidos nucleicos, en este último caso con el consiguiente riesgo de mutaciones (Peinado *et al.*, 2000). El daño depende en sí de la especie reactiva en cuestión, del tejido afectado, de las condiciones fisiológicas, de la edad, la dieta, entre otros factores. La mayor parte de este daño oxidativo se lleva a cabo en la mitocondria (Cardoso, 2002).



**ESQUEMA 1:** Muestra que los complejos mitocondriales I y III son los principales generadores de radicales libres. Imagen tomada de Hulbert *et al.* 2007.

Los radicales libres se generan en mayor cuantía conforme la tasa metabólica se eleva (mayor consumo de oxígeno). De hecho, las especies más longevas, por ejemplo el hombre, tienen una tasa metabólica más baja y muestran más elevadas sus defensas anti estrés que las especies menos longevas como el



ratón, la mosca de la fruta o el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Peinado *et al.*, 2000).

Estudios en ratas sometidas a restricción calórica han mostrado un aumento en la longevidad, lo cual se ha asociado a una menor producción de radicales libres.

El peróxido de hidrogeno y el anión superóxido se les conoce como ERO primarias, a partir de cuya acción sobre los ácidos grasos poliinsaturados de membrana se forman las ERO secundarias durante la peroxidación lipídica. También son responsables del daño a lípidos y otras biomoléculas como las proteínas (Montgomery *et al.*, 2011).

En la mitocondria, el superóxido generado durante la respiración, es convertido a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, debido a la presencia de las enzimas superóxido dismutasa dependientes de Mn<sup>+2</sup> y las superóxido dismutasa dependientes de Cu<sup>+2</sup> y Zn<sup>+2</sup> (Lehninger, 1972). Otros estímulos como la activación de macrófagos o la actividad de la NADPH oxidasa incrementan los niveles celulares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Cortés-Rojo, 2006).

La catalasa descompone el peróxido de hidrógeno formado a agua y oxígeno (Lehninger, 1972).

La defensa contra las ERO son los antioxidantes, los cuales se pueden definir como cualquier sustancia que, cuando están presentes en concentraciones bajas en comparación con el sustrato oxidable, retrasa o previene la oxidación de dicho sustrato (Hulbert *et al.*, 2007). Estos antioxidantes pueden ser de naturaleza no enzimática como el glutatión, tiorredoxina y enzimáticos como la superóxido dismutasa y peroxidasas (Avery *et al.*, 2001).

## 1.10.FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

En este proceso se sintetiza el ATP en la membrana interna de la mitocondria catalizado por la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>ATP sintasa que trabaja en sincronía estrecha con el Pi y portadores de ADP/ATP (Young *et al.*, 2003). La síntesis de ATP va

acompañada por el movimiento de  $H^+$  hacia el interior de la matriz mitocondrial (Lehninger, 1972), por lo que se usa el potencial electroquímico generado por el transporte de electrones de membrana para impulsar una bomba de protones reversible (Nicholls, 1987). El ATP tiene participación central en el metabolismo celular, proporcionando la energía química para realizar el trabajo químico, osmótico y mecánico (Roskoski, 2003).

#### 1.10.1 ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LA MOLÉCULA DE ATP

El trifosfato de adenosina (ATP) se encuentra en todas las células vivas: animales, vegetales y microbianas. Es un nucleótido que contiene adenina, una ribosa y los grupos fosfato unidos mediante un enlace éster a la posición 5' de la ribosa. (Lehninger, 1975). Posee dos enlaces de alta energía y cada uno es un anhídrido ácido simple del ácido fosfórico. El ATP es un metabolito polar cargado que no puede difundir a través de bicapas lipídicas; por lo que la membrana interna contiene varias proteínas de transporte o translocasas, las cuales intercambian ATP intramitocondrial por ADP extra mitocondrial (Roskoski, 2003).

Debido a que en una célula intacta los tres grupos fosfato están casi ionizados, se tiene cargas negativas alrededor de los fosfatos. Se generan complejos estables con cationes divalentes como el  $Mg^{+2}$ , pero este catión no solo forma complejos con el ATP sino que también puede formarlos con el ADP y el fosfato con diferente afinidad (Lehninger, 1975).

#### 1.10.2 ESTRUCTURA DE LA $F_1F_0$ ATP SINTASA

La  $F_1F_0$ ATP sintasa corresponde a un súper complejo ubicado en la membrana interna mitocondrial (Clémencion, 2012), el cual es un agregado de polipéptidos en forma de hongo formado por dos componentes principales: una cabeza  $F_1$  esférica (Karp, 2006) y soluble (Young *et al.*, 2003) y una sección basal, llamada  $F_0$ , incrustada en la membrana interna; se conectan mediante un tallo central y uno periférico, por lo que la enzima se llama ATPasa $F_0F_1$  (Roskoski, 2003).

La porción  $F_1$  es una molécula compleja, tiene la forma de la parte superior del hongo. En presencia de  $Mg^{2+}$  cataliza la hidrólisis lenta de ATP a ADP y fosfato, reacción que no es inhibida por la oligomicina (Roskoski, 2003). La porción  $F_1$  contiene cinco o seis clases de subunidades proteicas, con una estequiometría  $\alpha_3\beta_3\delta\gamma\epsilon$ , con pesos moleculares de alrededor de 60000, 57000, 36000, 12500 y 7500. Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  se disponen en forma alternada con la apariencia de gajos de naranja (Karp, 2006).

La porción  $F_1$  liga fuertemente al ATP pero no al fosfato. El antibiótico Aurovertina inhibe la unión del ADP con  $F_1$  (Lehninger, 1972).

La porción  $F_0$  es una molécula que consiste en tres polipéptidos diferentes con una estequiometría de  $ab_2c_{10-14}$ . Se cree que en mitocondrias de levadura y *E. coli* existen diez subunidades "c" en tanto que en cloroplastos hay catorce. La base  $F_0$  contiene un canal por el cual se conducen los protones desde el espacio intermembranal a la matriz. Esta fracción es inhibida con oligomicina, por lo que al unirse las fracciones  $F_0$  y  $F_1$  le confiere sensibilidad a la oligomicina (Karp, 2006; Lehninger, 1972).

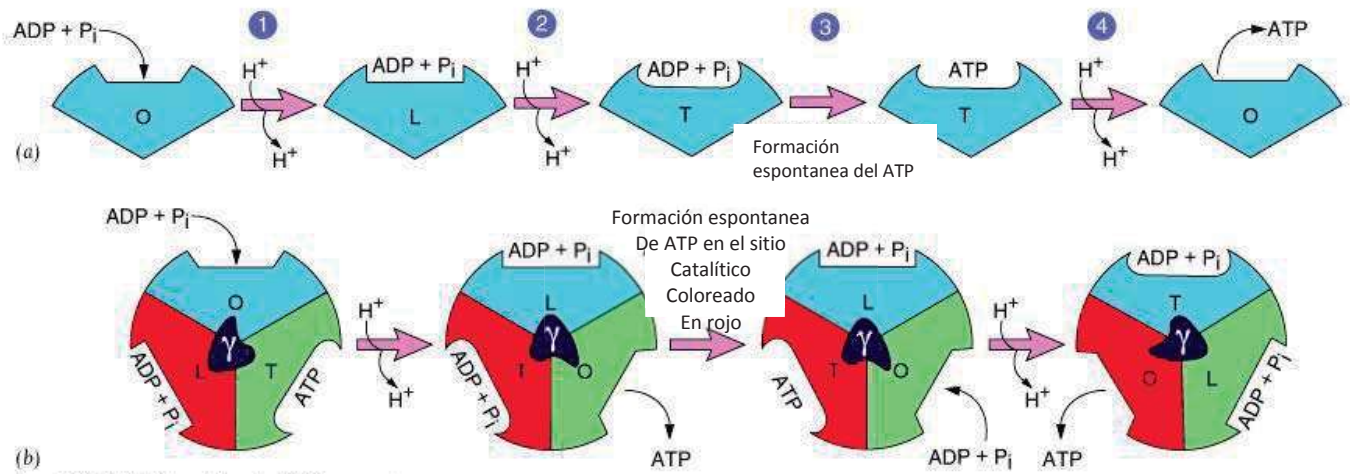
### **1.10.3 MECANISMO DE SÍNTESIS DEL ATP POR LA $F_1F_0$ ATP SINTASA.**

La hidrólisis/síntesis de ATP se lleva a cabo en la región  $F_1$  y en la  $F_0$  se efectúa el transporte de  $H^+$ , (Díaz Zagoya *et al.*, 2007). La energía liberada con el movimiento de los protones no se usa de forma directa para la fosforilación de ADP, lo que hace es cambiar la afinidad de unión del sitio activo por el producto ATP. Una vez que el ADP y el  $P_i$  se unen dentro del sitio catalítico de la ATP sintasa, los dos reactivos se condensan fácilmente y forman una molécula de ATP unida con firmeza sin ingreso de energía adicional, la energía se requiere para la liberación del producto que está unido al sitio catalítico (Karp, 2006).

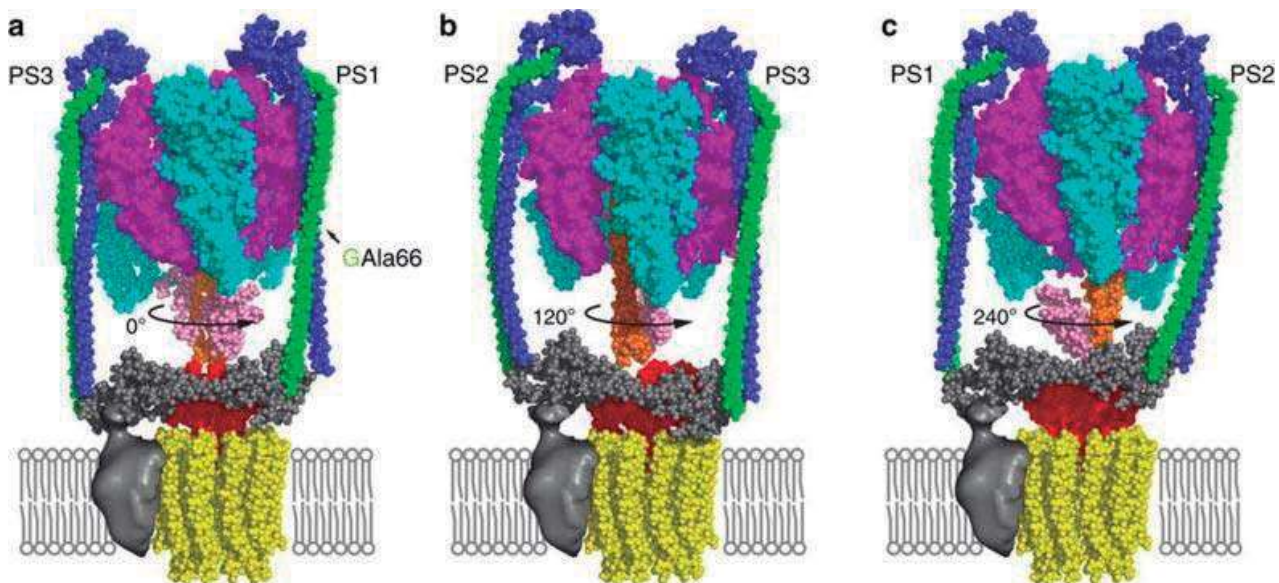
Los tres sitios catalíticos se encuentran predominantemente en las subunidades beta del complejo  $F_1$  los cuales trabajan de manera cooperativa y

van alternando en forma sucesiva con diferentes conformaciones lo que hace que tengan afinidades distintas por los sustratos y los productos. Es decir, cuando un sitio está en conformación Laxa o L, el ADP y el  $P_i$  están unidos débilmente, por lo que el segundo sitio estará en conformación ajustada o T (esquema 2), aquí los nucleótidos ( $ADP + P_i$  o producto ATP) están unidos fuertemente; el tercer sitio tendrá la conformación abierta u O que permite la liberación del ATP ya que su afinidad es muy baja por los nucleótidos por lo que se encuentra vacío (Karp, 2006; Díaz Zagoya *et al.*, 2007).

La síntesis/hidrólisis del ATP se acopla a la traslocación de protones a través de la rotación del tallo central (Stewart *et al.*, 2012), es decir, por catálisis rotatoria, en la que una parte de la ATP sintasa rota en relación con otra parte. Las subunidades alfa y beta giran en relación con el tallo central (Karp, 2006) que es altamente flexible y puede girar a lo largo del eje de rotación (Stewart *et al.*, 2012) y está impulsada por el movimiento de los protones a través de la membrana por el canal de la base  $F_0$ . De acuerdo con este modelo obtenido de bacterias, la energía almacenada en el gradiente de protones se traduce en energía mecánica de un tallo rotatorio, transformándose en energía química almacenada en el ATP.



**ESQUEMA 2:** Mecanismo de cambio de unión para la síntesis de ATP. (a): representación esquemática de los cambios en un solo sitio catalítico durante un ciclo de catálisis. Al principio su conformación está abierta (O) y los sustratos ADP y Pi entran al sitio. En el paso 1 el movimiento de protones por la membrana induce un cambio a la conformación laxa (L) en la que los sustratos se unen débilmente. El paso 2 es el movimiento de los protones adicionales que induce un cambio a la conformación ajustada (T), en la que es mayor la afinidad por los sustratos, haciendo que se unan con fuerza al sitio catalítico. En el paso 3 el ADP y Pi unidos con firmeza se condensan en forma espontánea para formar la molécula de ATP fuertemente unida; no se requiere ningún cambio de la conformación para este paso. En el paso 4, el movimiento de protones adicionales induce un cambio hacia la conformación abierta (O), en la que la afinidad por ATP disminuye permitiendo la liberación del producto. Una vez libre, el sitio catalítico queda disponible para la unión con los sustratos y se repite el ciclo. En (b), se muestran los cambios de los tres sitios catalíticos de la enzima al mismo tiempo. El movimiento de protones por la porción  $F_0$  de la enzima causa la rotación de la subunidad gamma asimétrica, la cual presenta tres caras diferentes a las subunidades catalíticas. A medida que la subunidad gira, provoca cambios en la conformación del sitio catalítico de la subunidad beta, lo que hace que el sitio catalítico pase de manera sucesiva por las conformaciones T,O y L. Tomado de Karp (2006).



**Esquema 3:** rotación pseudo-atómica modelo de la A-ATPasa de *T. thermophilus*. Imagen tomada de Stewart 2012.

#### 1.10.4 DESACOPLAMIENTO E INHIBICIÓN DE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

Los agentes desacoplantes permiten la continuación del transporte electrónico, pero eliminan indirectamente la conversión del ADP al ATP (Roskoski, 2003), ya que estimulan la velocidad de consumo de oxígeno de las mitocondrias en ausencia del ADP, además provocan un aumento de actividad hidrolítica sobre el ATP. Un ejemplo de estos compuestos es el 2,4-dinitrofenol (Karp, 2006).

Los inhibidores de la fosforilación oxidativa, impiden la estimulación de consumo de oxígeno por ADP y secundariamente eliminan la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi (Roskoski, 2003) ya que impiden el mecanismo de formación de ATP que utiliza el gradiente de protones. Producido por el transporte electrónico (Karp, 2006). Un ejemplo de este tipo de compuestos es el antibiótico oligomicina (Roskoski, 2003).

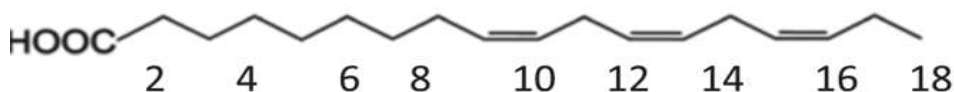
#### 1.11. LOS ÁCIDOS GRASOS Y EL ENVEJECIMIENTO

Los organismos tienen diversas composiciones de ácidos grasos en sus membranas (Hulbert, 2010). Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) son ácidos grasos dietéticos, principalmente suministrados por las verduras y los pescados. Se ha demostrado que tienen efectos benéficos sobre la salud humana, como el mejoramiento del funcionamiento del sistema cardiovascular, efectos antiproliferativos en células tumorales y propiedades anti-inflamatorias (Zhang *et al.*, 2011; Calder, 2012).

El ácido alfa linolénico (C18:3) es un ácido graso esencial que tiene tres dobles enlaces *cis* (esquema 4) y es sintetizado por plantas debido a que poseen la desaturasa  $\Delta 15$ , la cual no poseen los mamíferos ni la levadura, motivo por el cual no pueden sintetizarlo.

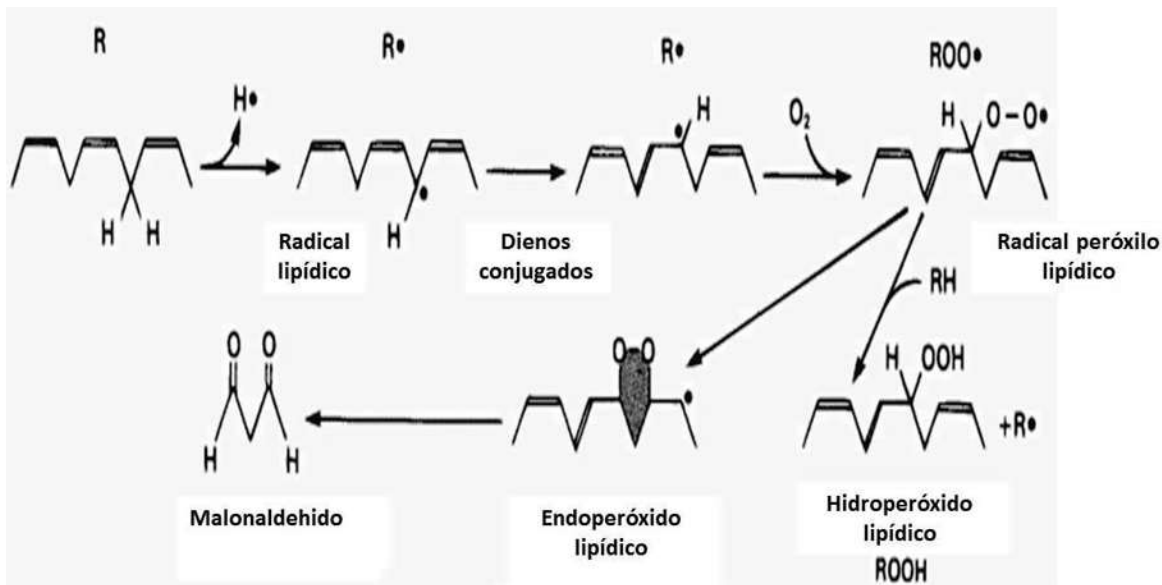
El C18:3 es precursor de otros AGPI de un número mayor de carbonos mediante varias reacciones que incluyen la elongación y la desaturación por las desaturasas  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$ . La acción de las elongasas y las desaturasas da lugar a la

formación de AGPI tales como el ácido eicosapentanoico (C20:5 (n-3)), y el ácido docosahexanoico (C22:6(n-3)) (Zhang *et al.*, 2011; Calder, 2012).



**ESQUEMA 4:** Estructura del ácido alfa linolénico (ácido cis, cis, cis-9, 12, 15 octadecatrienoico;  $\alpha$ -C18:3 9,12, 15). Imagen extraída de Zhang *et al.* 2011.

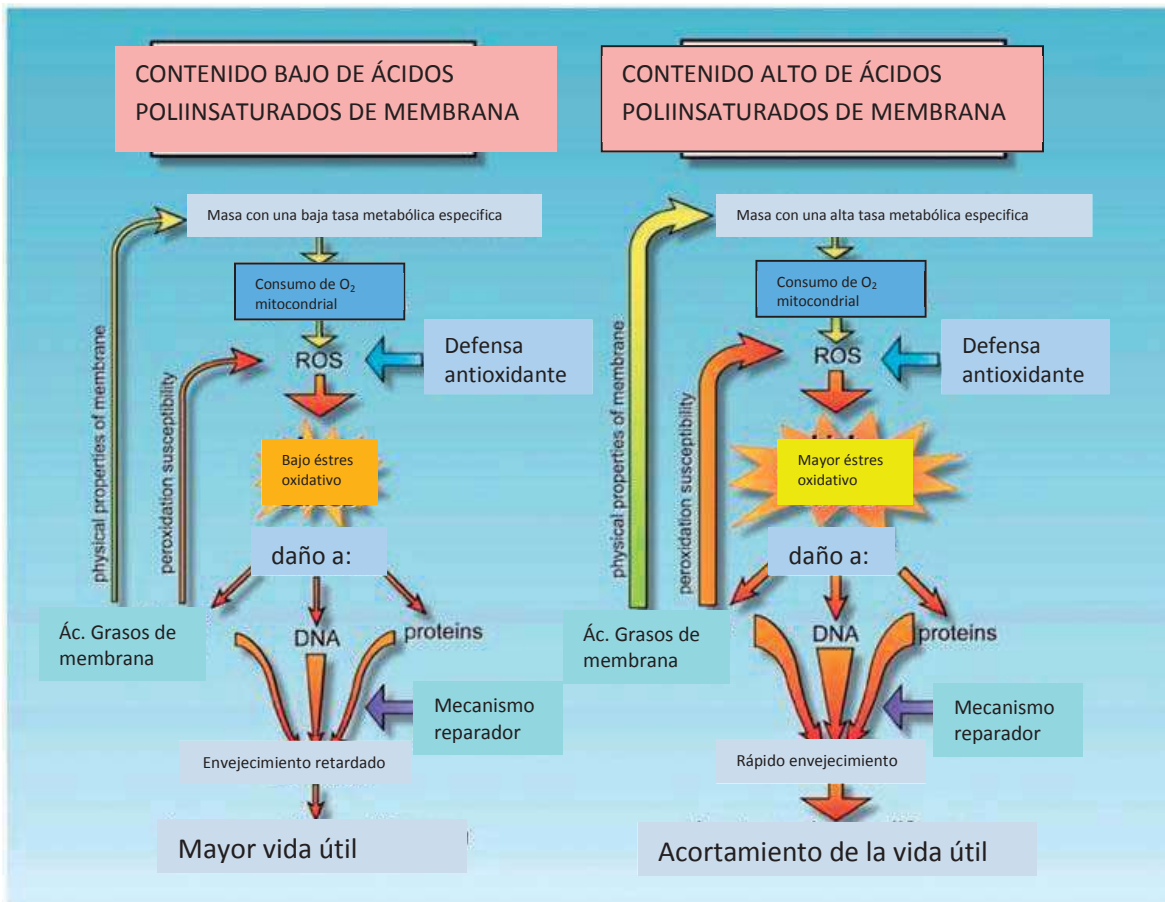
La peroxidación lipídica (esquema 5) se inicia cuando un radical libre (R •) con la energía suficiente ataca a uno de los enlaces C-H bis-alílicos de un lípido poliinsaturado (Hill *et al.*, 2010). A continuación, se elimina el hidrogeno bis-alílico con un electrón y en la cadena queda el carbono con un electrón no apareado (L•), convirtiendo el lípido en una molécula reactiva, capaz de combinarse con una molécula de oxígeno para convertirse en un radical peroxilo (LOO•). Estos lípidos pueden convertirse en un hidroperóxido lipídico (LOOH) mediante la eliminación del otro hidrogeno bis –alílico de otra cadena de ácido graso poliinsaturado produciendo otro radical lipídico (L•) para continuar el ciclo de peroxidación de lípidos. De esta manera, el ataque de las especies reactivas de oxígeno los ácidos grasos poliinsaturados de membrana puede dar lugar a la formación de aldehídos citotóxicos tales como el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), el malondialdehído (MDA) y la acroleína (Cipack *et al.*, 2008), los cuales a su vez pueden modificar proteínas y ADN para producir productos finales avanzados de lipoperoxidación" (ALE) (Hulbert, 2010).



ESQUEMA 5: proceso de la peroxidación lipídica. Imagen tomada y modificada de <http://www.benbest.com/lifeext/lipidmda.gif>

Por otro lado, la peroxidación de los ácidos grasos de membrana (lipoperoxidación) ha sido reportada como uno de los principales factores que afectan el funcionamiento de la CTE de mitocondrias sujetas a estrés oxidativo (Cortés Rojo *et al.*, 2006). El grado de insaturación de los ácidos grasos hace variar la susceptibilidad de la membrana a la peroxidación (esquema 6) de un modo directamente proporcional al número de dobles enlaces presentes en las colas de ácidos grasos (Hulbert, 2010). En relación con lo anterior, se ha observado que el aumento en el grado de insaturación de las membranas mitocondriales de la levadura incrementa la susceptibilidad de la CTE a la inhibición por ERO, lo cual a su vez tiene un efecto negativo en la célula ya que esto ha sido asociado con una mayor pérdida de viabilidad de la levadura en presencia de AGPI (Cortés Rojo *et al.*, 2009a, 2009b, 2011).





**ESQUEMA 6:** Importancia de la composición de los ácidos grasos de las membranas en la determinación de la longevidad. Muestra dos ejemplos con diferente composición lipídica en las membranas. El grosor de las flechas representa la intensidad relativa del proceso. Imagen tomada de Hulbert *et al.*, 2007.

En relación a lo anterior, en estudios realizados en abejas se ha observado una distinta longevidad de estas de acuerdo con su composición lipídica; viven más las que tienen una menor cantidad de ácidos poliinsaturados (Hulbert, 2010).

En otro estudio donde se comparó palomas y ratas se observó que las ratas tienen mayores tasas de formación de ERO y más daño oxidativo que las palomas. Asimismo, las palomas contienen una proporción menor de AGPI en sus membranas mitocondriales que las ratas. Por lo tanto, este estudio apoya la idea de que la composición de lípidos en la membrana mitocondrial es un factor determinante en la longevidad de las especies (Montgomery *et al.*, 2011).

## 2. HIPÓTESIS

La incorporación del ácido alfa- linolénico a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* disminuye la eficiencia del metabolismo energético mitocondrial durante el envejecimiento cronológico debido a un aumento en el daño oxidativo a lípidos.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar si el ácido linolénico disminuye la eficiencia de algunos parámetros del metabolismo energético mitocondrial y su relación con la peroxidación lipídica durante el envejecimiento cronológico de la levadura.

### 3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar si el crecimiento de *S. cerevisiae* con ácido linolénico aumenta los niveles de peroxidación lipídica en levaduras envejecidas cronológicamente.
2. Determinar si la incorporación del ácido linolénico a *S. cerevisiae* disminuye el potencial de membrana mitocondrial en el envejecimiento cronológico.
3. Analizar si la actividad de la ATPasa  $F_0F_1$  disminuye durante el envejecimiento cronológico en asociación a la presencia ácido linolénico.
4. Verificar si el envejecimiento cronológico en presencia de ácido linolénico está relacionado con una disminución en el pH extracelular.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. REACTIVOS

Los reactivos empleados fueron de grado reactivo, adquiridos de Sigma-Aldrich Química (St. Louis, MO USA y JT Baker (Center Valley, PA. USA) excepto la zymoliasa 20T, que fue adquirida de ICN Biomedicals. Inc (Aurora, OH. USA)

### 4.2. CULTIVO DE *Saccharomyces cerevisiae*

Se utilizó la cepa industrial diploide Yeast Foam de *Saccharomyces cerevisiae*. Se preparó un precultivo inoculando una asada en medio YPD líquido (extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2%) y se incubó a temperatura ambiente a 180 rpm durante 24 horas, Posteriormente, a partir del precultivo se sembró en medio YPD líquido y en medio YLAC líquido (ácido láctico 2%, extracto de levadura 1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1%, NaOH 0.5%, pH 5.0) a una densidad óptica (DO) de 0.03 a 600 nm medida en un espectrofotómetro UV/vis Perkin-Elmer Lambda 18 usando como blanco agua desionizada. Las células se cosecharon a los seis (células jóvenes) y veintiocho días (células envejecidas).

### 4.3. MANIPULACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS

El contenido de ácidos grasos de las membranas de la levadura se modificó por el método de Bossie y Martín (1989). Se adicionó a cada medio previo a la inoculación con *S. cerevisiae*, 1mM de ácido  $\alpha$ -linolénico (ácido cis, cis, cis-9, 12, 15 octadecatrienoico;  $\alpha$ -C18:3 ( $\Delta$ 9,12,15); pureza  $\geq$ 99%), disuelto en 5% del detergente IGEPAL CA-630.

### 4.4. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS DE LEVADURA

Las mitocondrias se aislaron de acuerdo con el método reportado por Guérin y cols (1979). Primero, se lavaron las células 3 veces con agua

desionizada, centrifugando a 5000 rpm por 5 minutos usando el rotor Beckman JA-10 de una centrífuga refrigerada Beckman Coulter Avanti J-E y se calculó el peso seco de las células mediante la relación: peso seco = peso húmedo/4. A continuación, las células se resuspendieron en medio SH (tris 0.1M,  $\beta$  mercaptoetanol 0.5M, pH 9.3 con NaOH), se incubaron a 170 rpm por 15 minutos a 32°C y se lavaron 3 veces con buffer de lavado (KCl 0.5M, tris 10mM, pH 7 con HCl).

Posteriormente, las células se resuspendieron en medio de digestión (sorbitol 1.35M, EGTA 1mM, fosfato disódico 30mM, fosfato monosódico 30mM, ácido cítrico 10 mM, pH 5.8). El volumen utilizado fue de 10 ml por gramo de peso seco de levaduras. Para romper la pared celular y obtener esferoplastos, se agregó la enzima zymoliasa a una concentración de 10 mg por gramo de peso seco, con lo que se obtuvo una concentración final de zymoliasa en el medio de 1mg/ml y se incubó durante 1 hr a temperatura ambiente. Después, se centrifugó en el rotor JA 20 a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

A continuación, los esferoplastos se lavaron 3 veces con medio de lavado de protoplastos (sorbitol 0.75M, manitol 0.4M, tris-maleico 10mM, albúmina sérica de bovino 0.2%, pH 6.8) a 12000 rpm, 10 minutos a 4°C en cada lavado y se resuspendió con una varilla.

Los esferoplastos se resuspendieron en un vaso de Potter con un volumen de 30 ml de medio de homogenización (manitol 0.6M, tris-maleico 10mM, EGTA 2mM, albúmina sérica de bovino 0.2%, pH 6.8) por cada 2.5 gramos de peso seco de levaduras. Se homogenizó manualmente 20 veces con un vástago de teflón apretado, sin hacer espuma. El homogenado se centrifugó a 2500 rpm 10 minutos, el sobrenadante se pasó a un tubo limpio y se centrifugó a 12000 rpm 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en medio de recuperación de mitocondrias (manitol 0.6M, tris-maleico 10mM, EGTA 2mM, pH 6.8) y se homogenizó con un vástago de vidrio flojo. Posteriormente, se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos, se desechó la pastilla y el sobrenadante se centrifugó

a 12000 rpm durante 10 minutos. El precipitado constituido por las mitocondrias aisladas, se resuspendió en aproximadamente 1 ml de medio de recuperación de mitocondrias. Las mitocondrias se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -80°C hasta que se usaron para los experimentos posteriores.

#### 4.5.MEDICIÓN DEL pH DEL MEDIO

Al momento de cosechar las células se colectó el medio de cada cultivo y se midió el pH en un potenciómetro HANNA Instruments pH 210.

#### 4.6.INDUCCIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO

Para inducir daño oxidativo se agregaron las mitocondrias a una concentración de 0.3mg/ml, la cual se determinó por el método de Biuret (Gornall *et al.* 1949), en buffer de fosfatos (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM pH 7.6 con NaOH) con FeSO<sub>4</sub> a concentraciones de 0, 25, 50 y 100 µM y se incubaron durante 30 minutos. Como control negativo de la lipoperoxidación, las mitocondrias se incubaron con 5µM del antioxidante lipofílico hidroxitolueno butilado (BHT) 15 minutos antes de adicionar el FeSO<sub>4</sub>.

#### 4.7.ENSAYO DE LIPOPEROXIDACIÓN POR EL MÉTODO DEL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO

Para determinar este parámetro se empleó una modificación del método reportado por Buege y Aust (1978), el cual mide la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS por sus siglas en inglés), entre las que se encuentra el malondialdehído, un producto de lipoperoxidación por radicales libres. Posterior a la incubación con FeSO<sub>4</sub>, se agregó a cada tubo 2 ml de solución ácida (ácido tricloroacético 15%, ácido tiobarbitúrico 0.375% y HCl 0,25 N) y se

calentaron en baño maría hirviendo. Después de 15 minutos, se sacaron los tubos, se enfriaron en hielo 5 minutos y se centrifugaron a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C. Por último se extrajo 1 ml del sobrenadante y se determinó espectrofotométricamente a 532 nm la concentración de TBARS usando el coeficiente de extinción molar del malondialdehído. Los resultados se expresaron en términos de en nmoles de TBARS/mg proteína.

#### 4.8.DETERMINACIÓN DE LA LIPOPEROXIDACIÓN POR UN MÉTODO POLAROGRÁFICO

El consumo de oxígeno asociado a la fase de iniciación de la lipoperoxidación se determinó usando un electrodo de oxígeno tipo Clark acoplado a un monitor de oxígeno biológico YSI modelo 5300, (YSI Inc, Yellow Springs OH, USA) y a una laptop con un software para la adquisición de datos. Se resuspendieron 125 mg de células en buffer de fosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50mM, pH 7.6 con NaOH) y se incubaron con KCN 0.4M para inhibir el consumo de oxígeno mitocondrial y citosólico. Después de 5 minutos se inició la determinación del consumo basal de oxígeno, y a los 5 min se adicionó  $\text{FeSO}_4$  a concentraciones de 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ . Posteriormente a los 8 minutos se adicionó el agente del antioxidante lipofílico hidroxitolueno butilado (BHT) 5  $\mu\text{M}$  y la determinación se detuvo 5 minutos después.

#### 4.9.ACTIVIDAD DE LA $F_1F_0$ ATPasa

Se determinó la actividad de la  $F_1F_0$  ATPasa midiendo la aparición de Pi sensible a oligomicina por el método de Fiske y Subbarow (1925). Se agregó 3mg/ml de proteína mitocondrial, en 300  $\mu\text{l}$  de agua ultrapura con 20 mM de tris-HCl (pH 8.5,  $\text{MgCl}_2$  5mM) para 1 ml de medio de reacción y se incubaron 30 minutos con 2mM de ATP para estimular la actividad de la  $F_1F_0$  ATPasa.

Después de este tiempo se detuvo la reacción con ácido tricloroacético al 30%, SDS al 10% y agua ultrapura para un volumen final de 2ml. A cada tubo se le adicionó molibdato de amonio al 5% disuelto en ácido sulfúrico 11.1% y solución de ELON (ácido p-metilaminofenolsulfonato) y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente Como control negativo se incubaron las mitocondrias con oligomicina 0.05mg/ml antes de adicionar el ATP. La actividad de la  $F_1F_0$ ATPasa se determinó espectrofotométricamente a 660 nm. Los resultados se expresaron en mmolPi/min x mg proteína.

#### 4.10.MEDICIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA

Para medir el potencial de membrana se utilizó el método modificado de Peña *et al* (1984), utilizando un espectrofluorómetro RF 5000U SHIMADZU.

Se agregaron 50  $\mu$ l de células resuspendidas en agua desionizada a una relación peso húmedo a volumen 1:1 en 1875  $\mu$ l de medio MES-TEA (ácido morfoetanol sulfónico 10 Mm, pH 6 con trietanolamina) y se agregaron 15  $\mu$ M de  $BaCl_2$  y 1  $\mu$ M de la cianina DiSC<sub>3</sub>(3) ( $\lambda_{ex}$  = 540nm y  $\lambda_{em}$  = 590nm) con agitación constante. La determinación se inició midiendo la fluorescencia basal y 10 segundos después se agregaron 20 mM de glucosa; a los 3 minutos se adicionó 15  $\mu$ M del desacoplante CCCP (carbonilcianuro p-triclorofenilhidrazona) para abatir selectivamente el potencial de membrana mitocondrial y 90 segundos después se adicionó 25 mM de KCl para abatir el potencial de membrana citosólico.

#### 4.11.ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS MITOCONDRIAL

Los ácidos grasos fueron extraídos de acuerdo con el método utilizado por Bligh y Dyer (1959). Las mitocondrias fueron resuspendidas en 1.5 ml de una

mezcla de cloroformo:metanol 1:2 (v/v), se homogenizó vigorosamente con un vástago de teflón. Después, se agregó 500 µl de cloroformo y 500 µl de agua y se agitó vigorosamente después de cada adición. Por último se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm, se extrajo la fase orgánica con una pipeta Pasteur y el cloroformo se evaporó con nitrógeno. Los metil ésteres de los ácidos grasos se prepararon mediante la combinación con trifluoruro de boro (BF<sub>3</sub>) al 14% en metanol durante 30 minutos a 92°C en baño de agua. A continuación, la muestra se enfrió a temperatura ambiente y los metil ésteres se extrajeron por agitación vigorosa con dos volúmenes de n-hexano (Morrison y Smith, 1964).

Después de la adición de un volumen de agua, se formó un sistema de dos fases que se centrifugó y se colectó la fase orgánica. Se evaporó el n-hexano bajo una corriente de nitrógeno y los ácidos grasos transesterificados se resuspendieron en 50 ml de n-hexano grado HPLC para su posterior análisis. Los metil ésteres se analizaron en un cromatógrafo de gases Clarus 500 Perkin-Elmer con una columna capilar Omegawax (0.25 mm de diámetro interno) 30m de longitud, un inyector capilar "Split/splitless" y un detector de ionización de flama (FID). Se utilizó nitrógeno de alta pureza como gas de acarreo.

#### 4.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como la media ± el error estándar de al menos tres experimentos independientes. Los niveles de significancia estadística de las diferencias entre las medias aritméticas ( $p \leq 0.001$  y  $p \leq 0.01$ ) se determinaron mediante la prueba de t de Student con el programa Sigma Plot Versión 10.0 (SPSS Inc).



## 5.RESULTADOS

### 5.1.COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE *S. cerevisiae*

Para corroborar la incorporación del C18:3 en las mitocondrias de *S. cerevisiae* de seis y veintiocho días, se analizó la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases.

La composición de ácidos grasos en mitocondrias aisladas de células crecidas durante 6 días en medio YPD en ausencia de C18:3 consiste en un 6.07% de ácido palmítico (C16:0), 41.96 % de ácido palmitoléico (C16:1), 4.15% de ácido esteárico (C18:0) y un 45.34% de ácido oleico. Las crecidas durante veintiocho días de la misma manera contienen un 6.65% de C16:0, 41.68% de C16:1, 4.63% de C18:0 y un 43.16% de C18:1 (tabla 1).

Los resultados en las mitocondrias provenientes de células crecidas en presencia de C18:3 durante seis días mostraron un 9.13% de C16:0, 22.87% de C16:1, 6.8% de C18:0, 27.07% de C18:1 y un 31.85% de C18:3; mientras que las de veintiocho días contienen un 14.21% de C16:0, 19.0% de C16:1, 7.75% de C18:0, 20.16% de C18:1 y 30.87% de C18:3. Por lo tanto, estos resultados demuestran que el C18:3 se incorpora a las membranas mitocondriales de la levadura y su proporción permanece constante a lo largo del envejecimiento.

Al comparar la composición de seis y veintiocho días de las células sin C18:3 (-C18:3) se observó una variación máxima de 2.18% en C18:1, mientras que en el resto de los ácidos no hay una variación mayor al 1%. En tanto que al realizar la misma comparación pero entre células +C18:3, se observó a los veintiocho días un aumento del 5.08% de C16:0, al igual que un 0.96% más de C18:0, en tanto una disminución del 3.87% en C16:1, así como una disminución del 6.91% de C18:1. Dado que los ácidos grasos monoinsaturados de la levadura aumentan la fluidez de la membrana, esto sugiere que posiblemente la fluidez de

las membranas de las mitocondrias de células +C18:3 disminuye durante el envejecimiento.

Comparando los resultados entre mitocondrias -C18:3 y +C18:3, se observó un aumento de 3.06% y 7.56% en el contenido de C16:0 a los seis y veintiocho días respectivamente en mitocondrias +C18:3. También se observó en mitocondrias +C18:3 un aumento en el contenido de C18:0 con porcentajes de 2.65% y 3.12%. En contraste, respecto a los ácidos grasos monoinsaturados, se observó en las mitocondrias +C18:3 una disminución en C16:1 de 19.09% y 22.68% al realizar la misma comparación, así como en C18:1 con 18.27% y 23%. La diferencia más notoria es en C18:3 con un aumento de más del 30%.

En la tabla 2 se muestra los resultados de ácidos grasos obtenidos de las mitocondrias provenientes de las células crecidas en el medio YLac. En mitocondrias -C18:3 se puede observar a los 6 días una composición de 5.82% de C16:0, 37.05% de C16:1, 4.55% de C18:0 y 50.54% de C18:1. Las mitocondrias +C18:3 mostraron un 9.77% de C16:0, un 28.36% de C16:1, 8.9% de C18:0, 38.40% de C18:1 y un 8.15% de C18:3. La composición de las mitocondrias -C18:3 a los veintiocho días fue de 9.32% de C16:0, 34.17% de C16:1, 5.64% de C18:0 y 45.33% de C18:1, mientras que los resultados en mitocondrias +C18:3 fueron 8.52% de C16:0, 16.87% de C16:1, 7.12% de C18:0, 25.85% de C18:1 y un 22.99% de C18:3.

Al comparar los ácidos grasos de mitocondrias -C18:3 de seis y veintiocho días, se observó una disminución en los ácidos grasos monoinsaturados a los veintiocho días y un aumento en el contenido de ácidos grasos saturados. En contraste en mitocondrias de células +C18:3 se observó un comportamiento inverso al observado en las células -C18:3.

Comparando las mitocondrias -C18:3 y +C18:3 en seis y veintiocho días se observó que en mitocondrias +C18:3 el C18:0 aumenta un 4.35% y 1.48% respectivamente, el C18:1 disminuye un 12.14% y un 19.48%, al igual que el

C16:1 pero con porcentajes de 8.69% y 17.3%, mientras que el C16:0 aumenta un 3.95% a los seis días y disminuye 0.8% a los veintiocho días. En el caso del C18:3 este aumenta 8.15% a los seis días y un 22.99% a los veintiocho.

% de ácidos grasos	YPD -C18:3 6 DÍAS	YPD +C18:3 6 DÍAS	YPD -C18:3 28 DÍAS	YPD +C18:3 28 DÍAS
<b>Palmítico (C16:0)</b>	6.07	9.13	6.65	14.21
<b>Palmitoléico (C16:1)</b>	41.96	22.87	41.68	19.0
<b>Esteárico (C18:0)</b>	4.15	6.8	4.63	7.75
<b>Oleico (C18:1)</b>	45.34	27.07	43.16	20.16
<b>Linoléico (C18:3)</b>		31.85		30.87

**TABLA 1:** Composición porcentual de ácidos grasos en mitocondrias aisladas de células crecidas en medio YPD durante seis y veintiocho días en presencia y ausencia de C18:3. n =3

% de ácidos grasos	YLAC -C18:3 6 DÍAS	YLAC+C18:3 6 DÍAS	YLAC -C18:3 28 DÍAS	YLAC+C18:3 28 DÍAS
<b>Palmítico (C16:0)</b>	5.82	9.77	9.32	8.52
<b>Palmitoléico (C16:1)</b>	37.05	28.36	34.17	16.87
<b>Esteárico (C18:0)</b>	4.55	8.9	5.64	7.12
<b>Oleico (C18:1)</b>	50.54	38.40	45.33	25.85
<b>Linoléico (C18:3)</b>		8.15		22.99

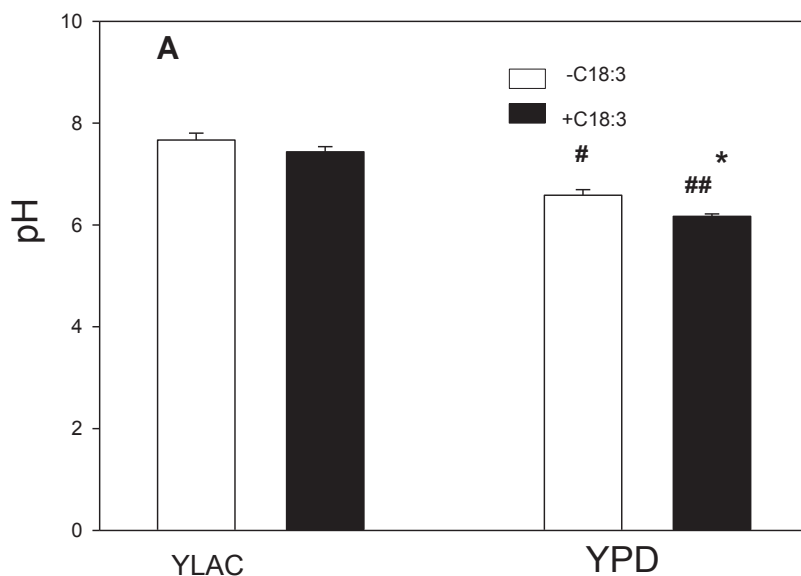
**TABLA 2:** Composición porcentual de ácidos grasos de mitocondrias aisladas de células crecidas en YLAC en presencia y ausencia de C18:3 por seis y veintiocho días. n = 3.

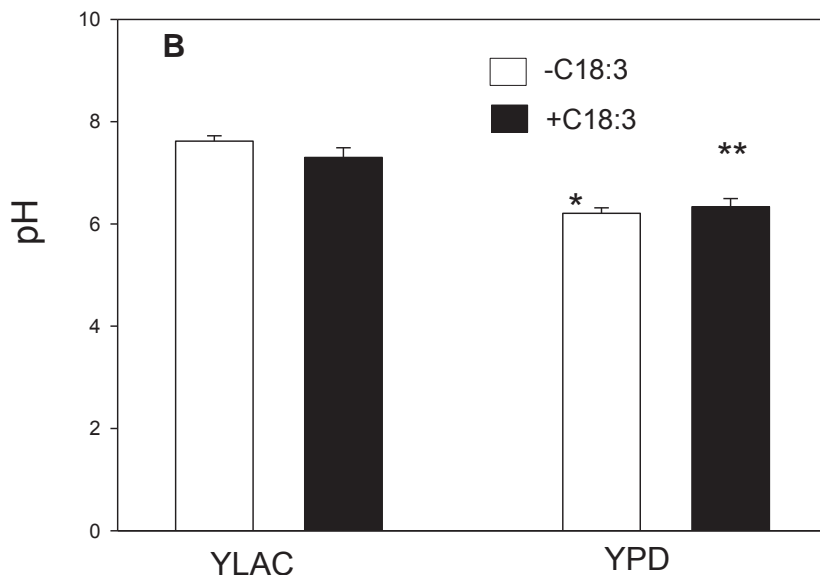
## 5.2. INFLUENCIA DEL C18:3 SOBRE LOS CAMBIOS DE pH EXTRACELULAR, EL ENVEJECIMIENTO EN EL pH DEL MEDIO

A consecuencia del metabolismo de su metabolismo oxidativo, el pH del medio donde crece *S. cerevisiae* tiende a bajar conforme envejece. Por el

contrario, a un pH elevado cercano a 8, se afecta su crecimiento. Por lo tanto, para determinar si la incorporación de C18:3 tiene un efecto en los cambios de pH asociados al envejecimiento, se determinó el pH del medio al final del crecimiento.

En la fig. 1 se puede observar en el panel A que existe una disminución significativa ( $p \leq 0.01$ ) de décimas de pH en el cultivo de células +C18:3 crecidas en YPD respecto al cultivo -C18:3. En los cultivos con YLac no se observaron diferencias debidas a la adición de C18:3; sin embargo, cuando se comparó el pH del medio Ylac este fue mayor que el del medio YPD. En el panel B se puede observar que a los 28 días ya no existen diferencias en el pH de los cultivos YPD debido a la adición de C18:3, en tanto que en comparación con los cultivos YLac, el pH de estos se mantiene incluso por una unidad arriba del pH de los medios YPD.





**FIGURA 1:** Muestra los cambios en el pH a los seis (panel A) y veintiocho días (panel B) en los distintos medios de crecimiento: Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el e.e. de  $n \geq 3$ . Se observaron diferencias significativas de \* $p \leq 0.01$  vs ypd -C18:3; #  $p \leq 0.001$  vs ylac -C18:3; ##  $p \leq 0.001$  vs ylac +C18:3 en el panel A y en el panel B de \* $p \leq 0.001$  vs ylac -C18:3; \*\*  $p \leq 0.001$  vs Ylac + C18:3.

### 5.3. NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

Para investigar si la incorporación de C18:3 incrementa la susceptibilidad de las mitocondrias a la peroxidación lipídica y explorar la influencia del envejecimiento en este parámetro, se midió la peroxidación en células y mitocondrias aisladas.

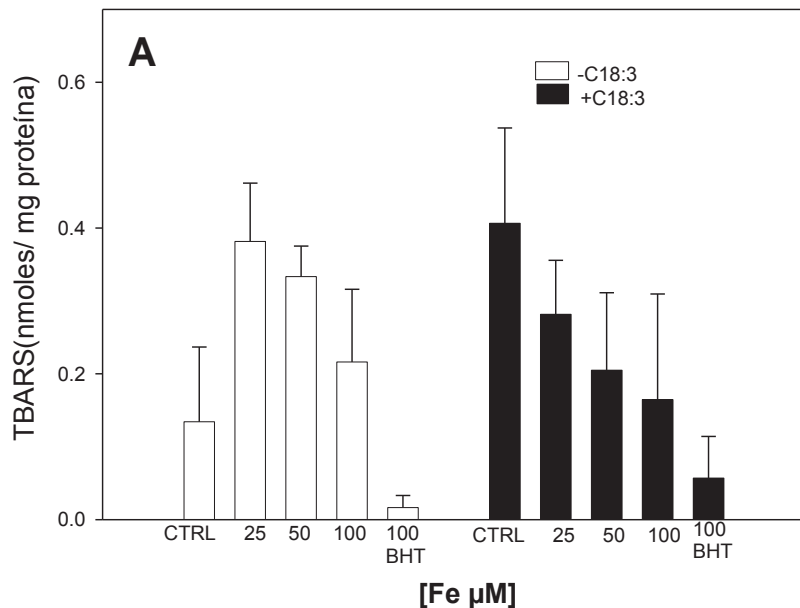
En el caso de mitocondrias aisladas (figs 2 y 3) se determinó la peroxidación lipídica por el método del TBA, el cual como ya se comentó anteriormente, mide la formación del malondialdehído, uno de los productos finales de la lipoperoxidación. Para confirmar la funcionalidad del método del TBA

se utilizó el ácido linolénico puro, en lugar de las mitocondrias (figura 4). Se observaron diferencias altamente significativas al comparar el control con los niveles de lipoperoxidación de  $\text{Fe}^{+2}$  50 $\mu\text{M}$  y diferencias significativas al compararlo con el BHT. También se muestran diferencias altamente significativas al comparar los niveles de  $\text{Fe}^{+2}$  50 $\mu\text{M}$  respecto a los del BHT mostrando un efecto protector a la lipoperoxidación. Los resultados solo se tomaron como una confirmación de que el método es funcional.

Los resultados de esta determinación (Figura 2) son mitocondrias de células crecidas en medio YPD a los seis (panel A) y veintiocho días (panel B) muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas al comparar los niveles de lipoperoxidación a todas las concentraciones de  $\text{Fe}^{+2}$  utilizadas respecto a su control tanto en mitocondrias -C18:3 (barras blancas) como en las +C18:3 (barras negras), ni tampoco al comparar los resultados entre las mitocondrias -C18:3 y +C18:3 a las mismas concentraciones de  $\text{Fe}^{+2}$ . No existe una diferencia significativa al comparar el resultado obtenido con  $\text{Fe}^{+2}$  100  $\mu\text{M}$  con su respectivo  $\text{Fe}^{+2}$  100  $\mu\text{M}$  + BHT. El mismo caso es para el panel B. La ausencia de lipoperoxidación en las células +C18:3 sugiere que no obstante la incorporación del C18:3 podría estar induciendo algún mecanismo protector contra el estrés oxidativo en los lípidos o la inducción de algún sistema enzimático que permita la detoxificación de los aldehídos generados como productos finales de la lipoperoxidación.

En mitocondrias aisladas de células -C18:3 crecidas en medio YLac (Figura 3, panel A), se observó que no hay diferencias significativas al comparar los niveles de lipoperoxidación del control con todas las concentraciones de  $\text{Fe}^{+2}$  incluido el tratamiento con el antioxidante lipofílico BHT. En contraste con lo anterior y lo reportado para mitocondrias de células +C18.3 crecidas en YPD, se observó que los niveles de lipoperoxidación en mitocondrias de células +C18:3 crecidas en YLac aumentaron de manera considerable de un modo dependiente

de la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  utilizada. Asimismo, se observó que la adición del BHT previno la lipoperoxidación inducida por 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ , lo cual corrobora que el aumento en este parámetro fue debido a la peroxidación lipídica y no a la reacción del ácido tiobarbitúrico con otras moléculas no relacionadas con dicho proceso. Sin embargo, en el mismo tipo de mitocondrias pero a 28 días de cultivo se observó que el  $\text{Fe}^{2+}$  no indujo ningún efecto a ninguna concentración. Esto permite sugerir que, a diferencia de lo observado en medio YPD, en las células crecidas en el medio YLac posiblemente no se inducen mecanismos de protección contra la lipoperoxidación a los 6 días y que esta inducción sea tardía lo que explicaría los niveles más bajos de lipoperoxidación a los 28 días, sensibiliza las membranas mitocondriales. Además, es de resaltar que en las mitocondrias – C18:3 de cualquier edad no se indujo la lipoperoxidación, lo cual podría atribuirse a que la composición nativa de ácidos grasos de la levadura le confiere una resistencia intrínseca a la lipoperoxidación.



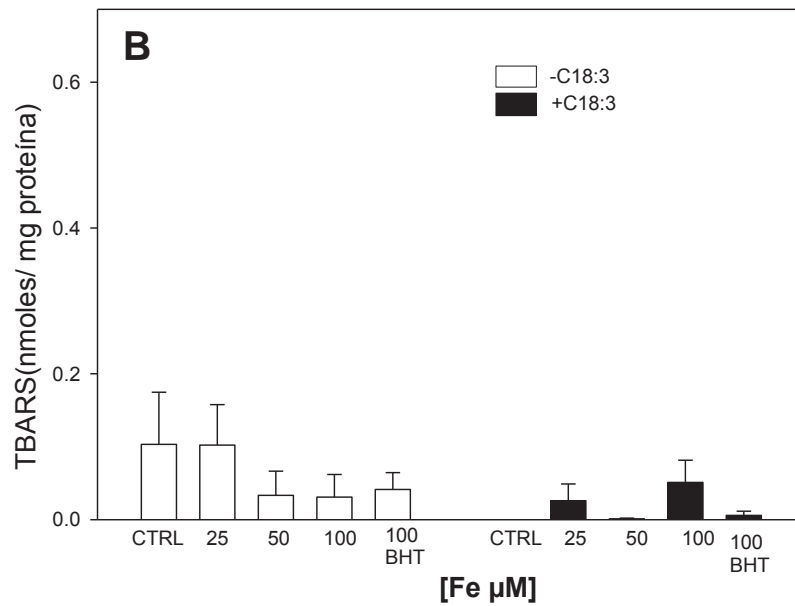
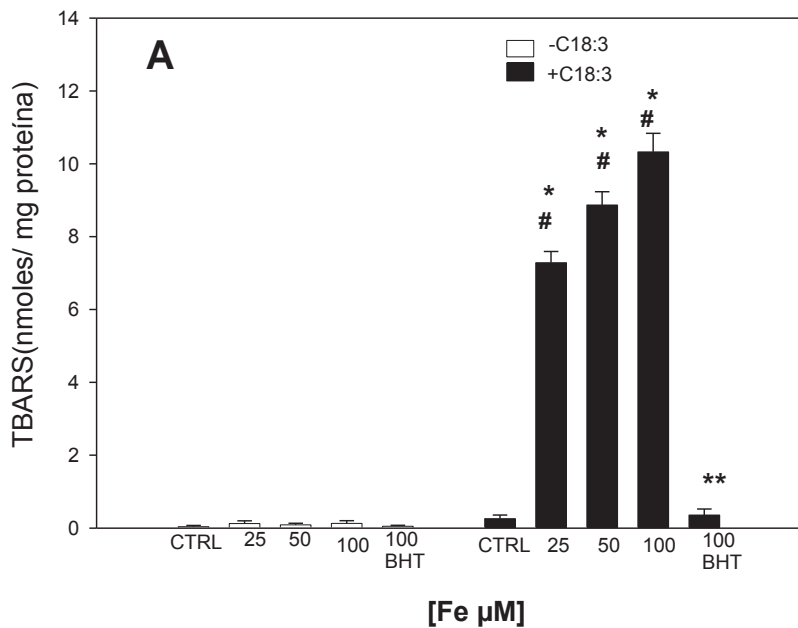
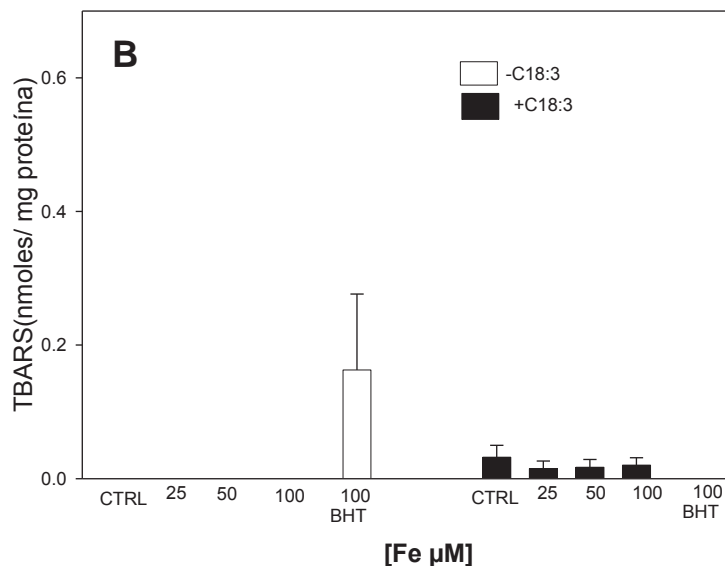


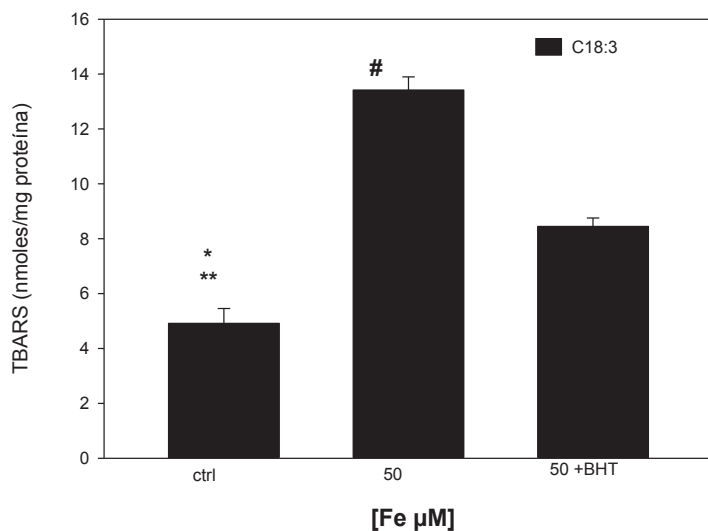
Figura 2: Efecto del  $\text{Fe}^{+2}$  en la lipoperoxidación de mitocondrias de seis (panel A) y veintiocho días (panel B) crecidas en medio YPD. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el e.e. de  $n \geq 3$ .







**Figura 3: Efecto del  $Fe^{+2}$  en la lipoperoxidación de mitocondrias crecidas en medio Ylac de seis (panel A) y veintiocho días (panel B).** Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el e.e. de  $n \geq 3$ . En el panel A se observaron la siguientes significancias \* $p \leq 0.001$  vs control; \*\*  $p \leq 0.001$  vs  $Fe^{+2}$  100 $\mu$ M; #  $p \leq 0.001$  vs la concentración correspondiente de  $Fe^{+2}$  sin C18:3.



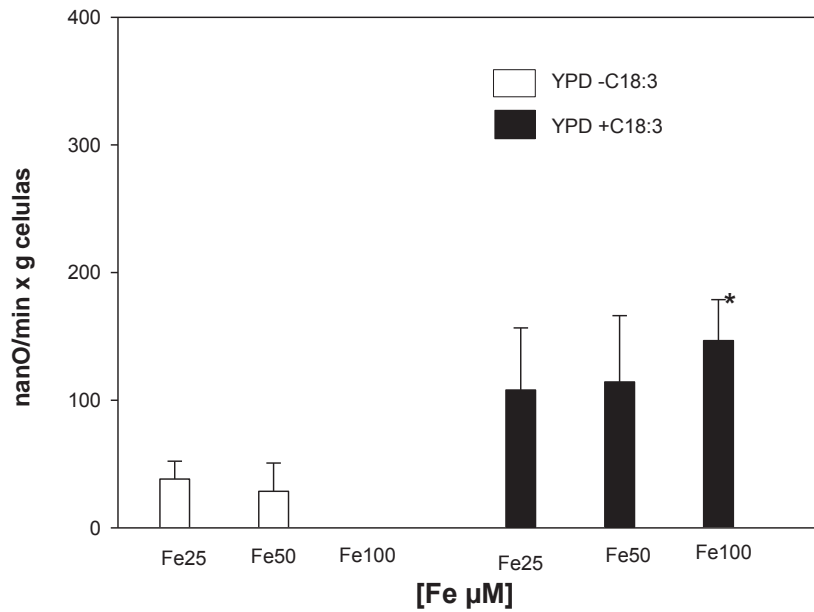
**Figura 4: Efecto del  $Fe^{+2}$  en la lipoperoxidación del ácido linolénico puro, confirmando la funcionalidad del método.** Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el e.e. de  $n = 3$ . Se observaron la siguientes significancias \* $p \leq 0.001$  vs  $Fe^{+2}$  50 $\mu$ M; \*\*  $p \leq 0.01$  vs  $Fe^{+2}$  50 $\mu$ M +BHT; #  $p \leq 0.001$  vs  $Fe^{+2}$  50 $\mu$ M +BHT.

La peroxidación lipídica se midió también en las células completas para confirmar los resultados anteriores determinando el consumo de oxígeno en presencia de las concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  utilizadas en los experimentos que se lleva a cabo en las primeras reacciones de peroxidación lipídica.

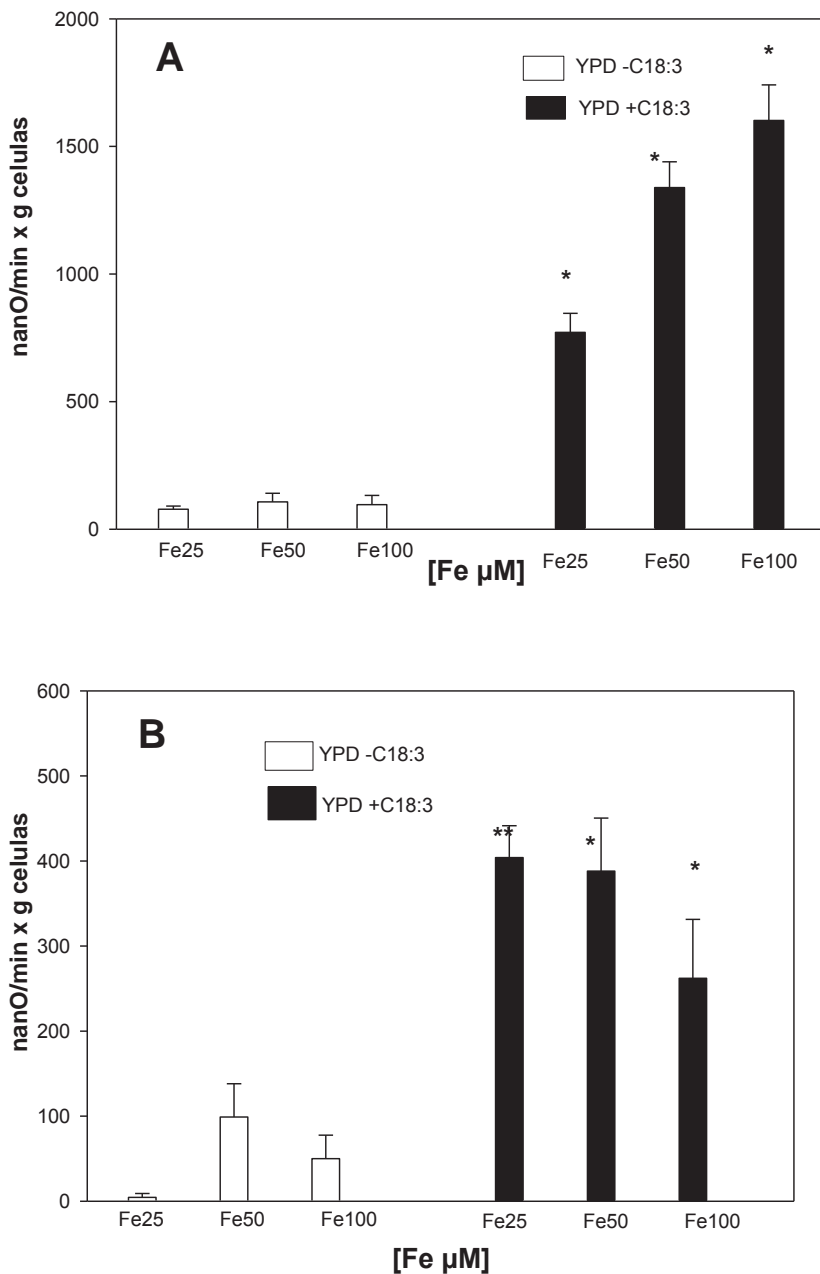
Para validar esta metodología se realizaron experimentos con células crecidas por 16 horas en medio YPD dado que anteriormente se demostró en esferoplastos que a dicho tiempo de crecimiento la incorporación de C18:3 causa sensibilización a la lipoperoxidación (Estrada-Villagómez, 2010). Los resultados obtenidos (Figura 5) muestran que el consumo de oxígeno atribuible a la lipoperoxidación fue mayor en células +C18:3.

En la fig. 6 se puede observar que la incorporación del C18:3 produjo un aumento notable en el consumo de oxígeno atribuible a la lipoperoxidación tanto a 6 (panel A) como a 28 días (panel B), la cual fue dependiente de la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  utilizada únicamente en células de 6 días. En contraste, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes mediciones realizadas en células -C18:3.

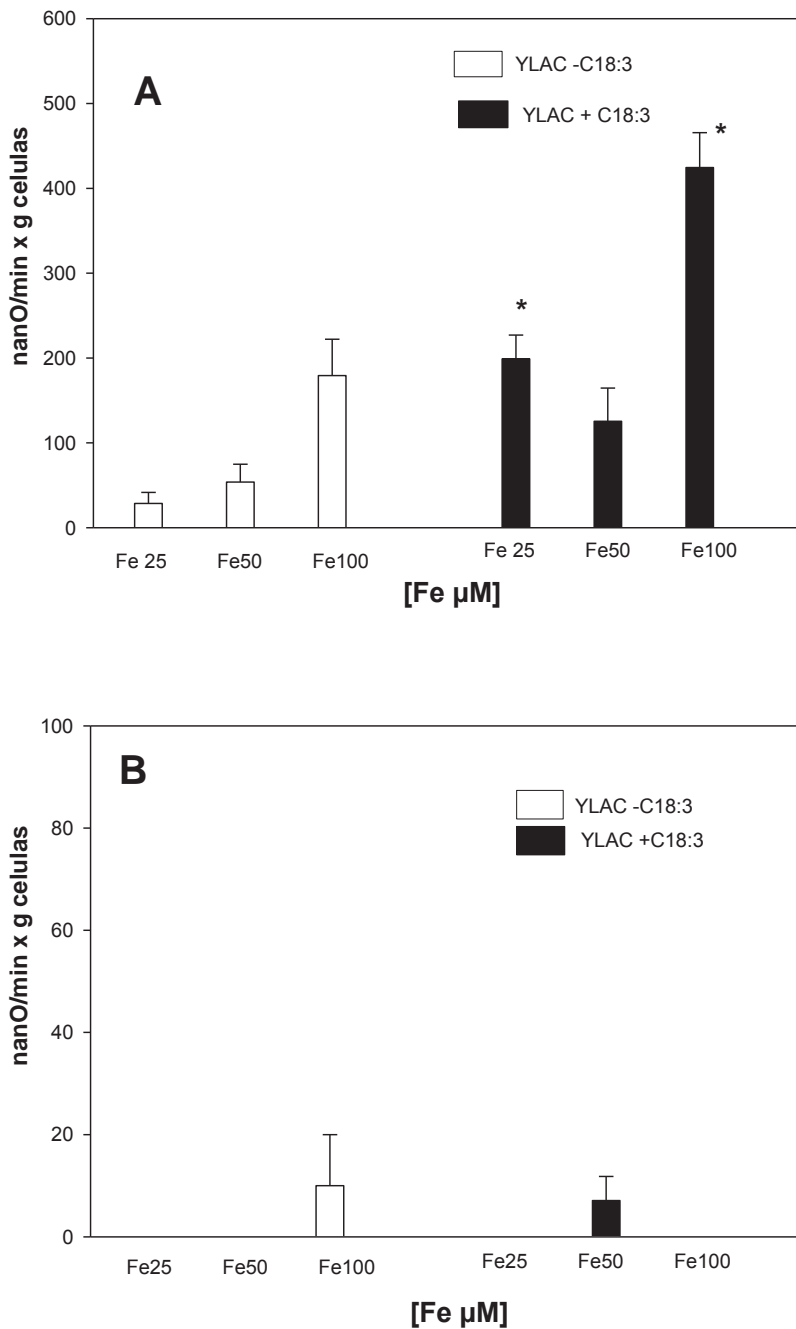
En la figura 7 se compararon las diferencias entre las células crecidas en medio YLac. A los seis días (panel A) se observó un aumento en los niveles de lipoperoxidación en células +C18:3 (barras blancas) a las concentraciones de 25 y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{+2}$  respecto a las concentraciones equivalentes en células -C18:3 (barras blancas). A los veintiocho días (panel B) no se detectó ninguna diferencia significativa al comparar los niveles de lipoperoxidación entre las células -C18:3 y +C18:3. Es de resaltarse que los resultados obtenidos en medio YLac concuerdan con los obtenidos en mitocondrias.



**Figura 5: Efecto del  $\text{Fe}^{+2}$  en la lipoperoxidación en células crecidas 16 horas en medio YPD:** Se observó una diferencia altamente significativa ( $p \leq 0.001$ ) al comparar la concentración de Fe 100  $\mu\text{M}$  en presencia de C18:3 con su equivalente sin C18:3. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el e.e. de  $n \geq 3$ .



**Figura 6: Efecto del  $Fe^{+2}$  en la lipoperoxidación en células crecidas en medio YPD de seis (panel A) y veintiocho (panel B) días:** Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el e.e. de  $n \geq 3$ . En el panel A se observa una diferencia significativa de \*  $p \leq 0.001$  vs la concentración correspondiente de  $Fe^{+2}$  sin C18:3. En el panel B las diferencias observadas son significativas a \*\*  $p \leq 0.001$  vs  $Fe^{+2}$  25  $\mu M$  sin C18:3; \*  $p \leq 0.01$  vs su concentración de  $Fe^{+2}$  respectiva sin C18:3.

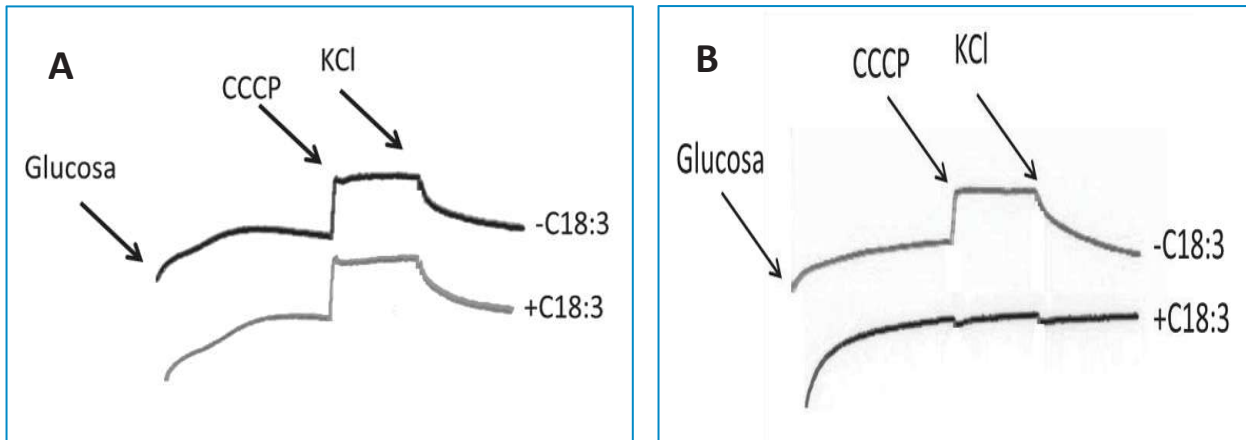


**Figura 7: Efecto del  $Fe^{+2}$  en la lipoperoxidación en células crecidas en medio YLAC durante seis (panel A) y veintiocho (panel B) días:** En el panel A se observó una diferencia \*  $P \leq 0.001$  vs su concentración equivalente sin C18:3. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el e.e. de  $n \geq 3$ .

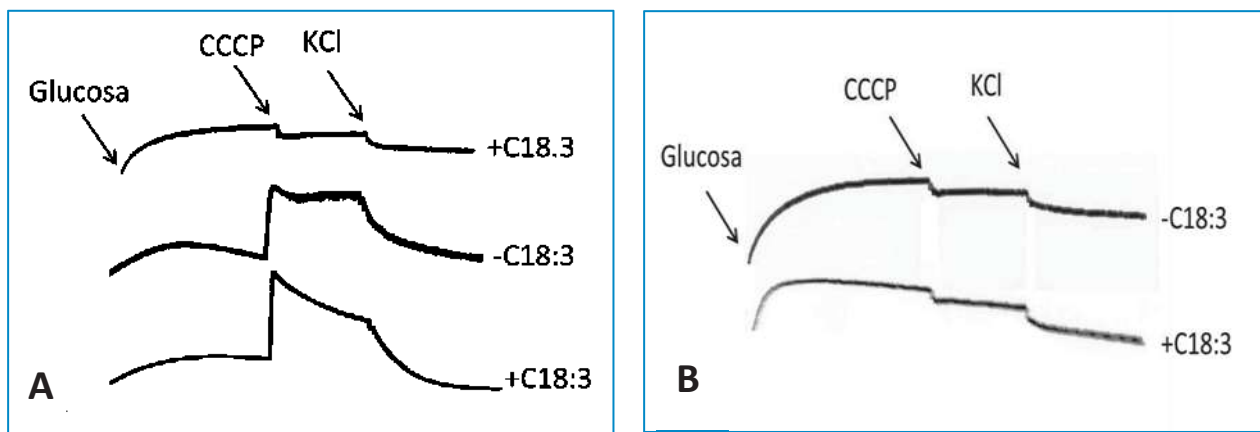
#### 5.4.EFECTO DEL C18:3 SOBRE EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL DE *S. cerevisiae* EN RELACIÓN AL ENVEJECIMIENTO

El potencial de membrana mitocondrial fue medido con la finalidad de dilucidar si la incorporación del C18:3 y el envejecimiento tienen un efecto negativo sobre este parámetro, el cual se determinó en células completas energizadas con glucosa midiendo los cambios de fluorescencia de la cianina (DiSC<sub>3</sub>(3)) inducidos por la adición del desacoplante CCCP a una concentración que abate selectivamente el potencial de membrana mitocondrial y por la adición de KCl, el cual disipa el potencial de membrana plasmático (Peña *et al.* 2010).

En la figura 8A se muestra que en células -C18:3 y +C18:3 de 6 días las adiciones de CCCP y KCl indujeron un incremento y una disminución en la fluorescencia de la cianina, lo cual es indicativo de la disipación del potencial de membrana mitocondrial y plasmático, respectivamente. Por lo tanto, estos resultados sugieren que a los 6 días de cultivo, las células pueden establecer los potenciales de membrana. Aun cuando la célula incorpora en sus membranas el ácido linolénico y esto puede sensibilizarla al estrés oxidativo que potencialmente se genera durante el envejecimiento. Mientras tanto, las células -C18:3 a los veintiocho días (panel B) son capaces aun de mantener los potenciales de membrana. En contraste, no se observó ningún potencial de membrana en las células +C18:3, lo cual sugiere que el metabolismo energético de la célula podría estar disminuido en estas células dada la dependencia de la ATP sintasa F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> por el potencial de membrana mitocondrial para funcionar en el sentido de la síntesis de ATP. En la figura 9 se observan los resultados de la medición del potencial de membrana mitocondrial de levaduras crecidas en medio YLAC. Se puede apreciar que a los seis días (panel A) hay potencial de membrana solo en células -C18:3. A los veintiocho días (panel B) no se observó potencial en ninguno de los cultivos. Lo anterior sugiere que el metabolismo de lactato durante el envejecimiento daña el metabolismo energético mitocondrial de una manera independiente de la composición membranal de ácidos grasos.



**FIGURA 8:** Potencial de membrana mitocondrial de levaduras crecidas en medio YPD durante seis (panel A) y veintiocho (panel B) días. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el e.e. de  $n \geq 3$ .



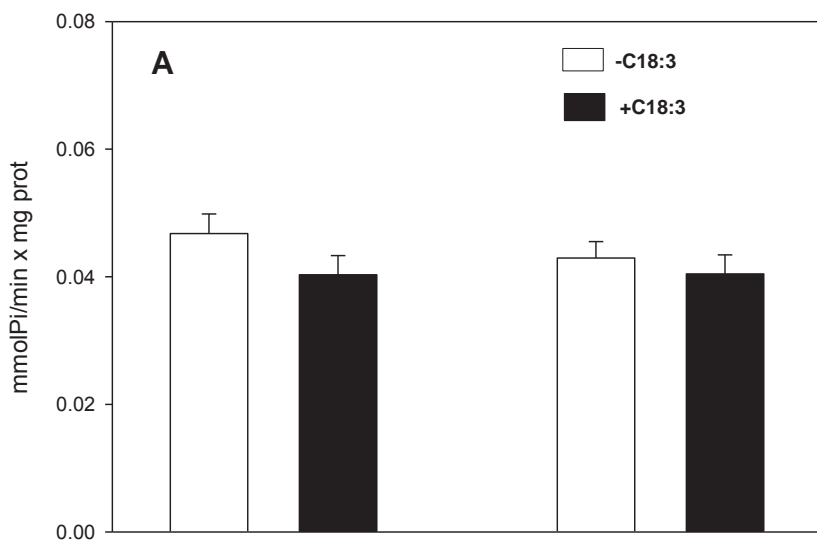
**FIGURA 9:** Potencial de membrana mitocondrial de levaduras crecidas en medio YLAC durante seis (panel A) y veintiocho (panel B) días. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el e.e. de  $n \geq 3$ .

### 5.5. ACTIVIDAD DE LA ATPasa DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

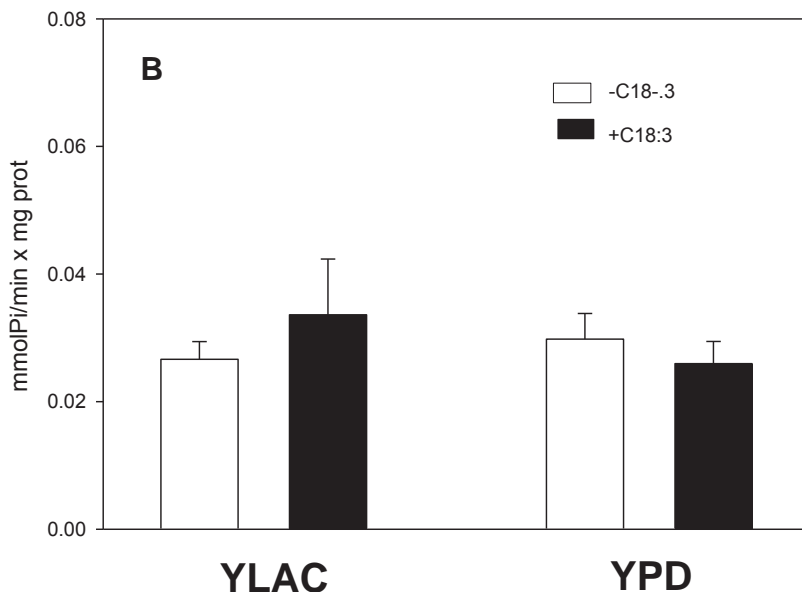
Con el fin de ahondar más en los efectos del envejecimiento y la incorporación de un ácido graso poliinsaturado en el metabolismo energético mitocondrial de la levadura, se analizó la actividad de la ATPasa  $F_0F_1$  en mitocondrias aisladas cultivos de *S. cerevisiae* de seis y veintiocho días. En los resultados obtenidos (Figura 10, panel A) se observó que no hay diferencias

significativas en la actividad entre las mitocondrias aisladas de células -C18:3 o +C18:3 a los seis (panel A) o a los 28 días (panel B).

No obstante lo anterior, es apreciable que conforme más envejecida la levadura, más disminuye la actividad ATPasa, lo cual podría estar relacionado con cambios en la fluidez de la membrana asociados a los cambios en la composición de ácidos grasos de membrana observados durante el envejecimiento (tablas 1 y 2).







**FIGURA 10: Medición de la actividad de la ATPasa durante el envejecimiento a los seis (panel A) y veintiocho días (panel B):** Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el e.e. de  $n \geq 3$ .

## 6. DISCUSIÓN

El envejecimiento es un proceso irreversible y progresivo que afecta a todos los organismos y conduce a la muerte. Este proceso se ha relacionado con la pérdida de la funcionalidad mitocondrial, afectando su metabolismo energético, lo que ocasiona la pérdida de la homeostasis, (Hulbert *et al.*, 2007; Kirkwood, 1989; Pamplona *et al.*, 2000). Se ha asociado al envejecimiento con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson, así como la hipertensión, (Peinado *et al.*, 2000).

Existen varios factores que intervienen y determinan la longevidad de los organismos, como la composición lipídica de sus membranas, la producción de especies reactivas de oxígeno, el medio ambiente, la dieta, entre otros.

En la mitocondria se llevan a cabo la mayoría de los procesos metabólicos que producen energía en forma de ATP, como son el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la fosforilación oxidativa, la oxidación de ácidos grasos y el catabolismo de aminoácidos (Lehninger, 1972). Al ser la mitocondria uno de los sitios principales de ataque por las ERO durante el envejecimiento, se decidió estudiar si la incorporación de un ácido graso poliinsaturado como el C18:3 puede inducir una disminución aun mayor del metabolismo energético en *Saccharomyces cerevisiae* durante el envejecimiento debido a que dicho ácido graso es más susceptible al estrés oxidativo que los ácidos grasos nativos de la levadura (Cortés-Rojo *et al.*, 2009, Bossie y Martin, 1989), por lo cual es de esperarse que las ERO sean más dañinas para este tipo de células y en contraste, se espera que los ácidos grasos nativos de la levadura puedan contribuir a una longevidad mayor debido a su más alta resistencia a las ERO y un menor daño a las estructuras mitocondriales que participan en el metabolismo energético. Asimismo, se decidió utilizar este microorganismo debido a que su cultivo por periodos prolongados se ha considerado un modelo del proceso de envejecimiento de tejidos post-mitóticos de mamíferos. Por estudios anteriores se conoce que su composición lipídica consiste en ácidos grasos saturados y monoinsaturados, así como que incorpora fácilmente a sus membranas ácidos grasos poliinsaturados si se le proporcionan (Hulbert *et al.*, 2007; Cortés-Rojo *et al.*, 2009; Bossie y Martin, 1989).

En este trabajo se creció la levadura a dos tiempos, seis y veintiocho días para tener un análisis de “células jóvenes” y células viejas”, respectivamente. Se enriquecieron las membranas celulares con la adición del C18:3 con la finalidad de estudiar que tan susceptibles vuelve a las membranas a la peroxidación lipídica durante el envejecimiento, así como para observar la influencia de la peroxidación de lípidos en procesos relacionados con la producción de energía en la mitocondria como lo son el potencial de membrana y la funcionalidad de la  $F_0F_1$ ATPasa.

Los resultados obtenidos mostraron una diferencia en la composición lipídica mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* (Tablas 1 y 2), ya que se comprobó que efectivamente el ácido adicionado se incorpora a sus membranas como se ha descrito en varios estudios (Cortes-Rojo *et al.*, 2009; Estrada Villagómez, 2010). En el medio YPD (Tabla 1) de las mitocondrias crecidas en presencia del C18:3, este se convirtió en el componente principal de los ácidos constituyentes de su membrana, mientras que en el medio YLac (Tabla 2), se observó una incorporación menor, pero que va en aumento con el tiempo de crecimiento. Tanto en YPD como en YLac se mostró una disminución en sus ácidos grasos C16:1 y C18:1, lo que se puede explicar debido a que la enzima desaturasa  $\Delta 9$  que los genera a partir de C16:0 y C18:0 respectivamente, se reprime en presencia de ácidos grasos poliinsaturados externos (Bossie y Martín, 1989).

La peroxidación lipídica se inicia por ERO (Hulbert, 2010) que se generan continuamente durante el metabolismo energético mitocondrial en la cadena transportadora de electrones principalmente en los complejos I y III en el caso de eucariontes superiores y el complejo III en el caso de *S. cerevisiae*, así como de fuentes citosólicas como las NADPH oxidasas, las ciclooxigenasas, o las óxido nítrico sintasas desacopladas (Cortes-Rojo *et al.*, 2006; Avery *et al.*, 2001; Hulbert *et al.*, 2007; Keller *et al.*, 2000) La lipoperoxidación da lugar a la formación de radicales lipídicos que continúan reaccionando hasta dañar otras biomoléculas, generando daños irreversibles en la integridad de la célula. Los ácidos saturados y monoinsaturados son resistentes a la peroxidación, por lo que disminuye la probabilidad de que se dañen otras biomoléculas diferentes a los lípidos debido a una menor formación de radicales lipídicos. (Hulbert, 2010; Cipack *et al.*, 2008; Cortes Rojo *et al.*, 2009, Hulbert *et al.*, 2007).

Se realizó el ensayo de peroxidación lipídica para observar si durante el envejecimiento las células que incorporaron el C18:3 a sus membranas se volvieron más susceptibles a este proceso mediante la utilización de  $Fe^{+2}$  el cual

genera una ERO con características de radical  $\text{OH}^\cdot$  que puede iniciar el proceso de lipoperoxidación (Cortés Rojo *et al.*, 2009). Esto se realizó tanto en células completas (Figuras 5, 6 y 7) como en mitocondrias aisladas de la levadura (Figuras 2 y 3), por métodos distintos. Para las mitocondrias aisladas se empleó un método por el cual se mide la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico como el malondialdehído, un producto final de la lipoperoxidación.

En la figura 2 y 3 (medio YPD y YLac respectivamente) se obtuvieron resultados que muestran una resistencia a la lipoperoxidación, tanto a los seis (panel A) como a veintiocho (panel B) en las mitocondrias -C18:3, lo que concuerda con el hecho de que la levadura contiene únicamente ácidos grasos saturados y monoinsaturados, los cuales son resistentes a la lipoperoxidación (Holman, 1954). Por otro lado, se esperaba que las mitocondrias aisladas en presencia de C18:3 mostraran una mayor susceptibilidad a la peroxidación lipídica, por la acumulación de ERO que se generan y acumulan a lo largo del envejecimiento, según lo mencionado en párrafos anteriores, pero dicho efecto únicamente se mostró en el medio YLac a los seis días (Figura 3, panel A), mientras que en medio YPD (figura 2) no ocurrió de esa manera, ni en YLac (Figura 3, panel B) para lo que hay varias explicaciones. Una posibilidad está relacionada con el hecho de que estudios recientes han mostrado que en *Saccharomyces cerevisiae*, la producción o adición de ácidos grasos poliinsaturados inicialmente la vuelve más sensibles a estas levaduras a la lipoperoxidación, pero con el paso del tiempo se vuelven más resistentes al estrés oxidativo, lo que indica una adaptación al estrés oxidativo causado por la presencia de ácidos grasos poliinsaturados, lo cual se ha atribuido en parte a un aumento en la actividad catalasa en condiciones aeróbicas, (Cipack *et al.*, 2008). Otra posibilidad es el hecho de que la levadura expresa tres peroxidasas de fosfolípidos dependientes de glutatión (*GPX1*, *GPX2* y *GPX3*) que protegen y reparan del daño a fosfolípidos de membrana al reducir los hidroperóxidos de lípidos esterificados que se producen durante la lipoperoxidación (Avery *et al.*,

2001). Por lo tanto, es posible que la expresión de este sistema este aumentado durante el envejecimiento, lo que explicaría el que no se detecte la lipoperoxidación, ya que no se llegarían a formar los productos que son medibles mediante este método.

En la peroxidación lipídica en células completas se midió el consumo de oxígeno ya que la lipoperoxidación requiere de esta molécula una vez formado el radical lipídico (iniciación) para formar el peroxilo (Hulbert, 2010). Por lo tanto, esto permitió analizar si se llevaba a cabo la etapa de iniciación de la lipoperoxidación, la cual no es inhibida por los sistemas antioxidantes endógenos de la levadura mencionados anteriormente.

Los resultados de la figura 5 muestran que en las células crecidas durante 16 horas en medio YPD, existe un aumento mayor en el consumo de oxígeno en las células +C18.3, lo cual es indicativo de que la primera fase de lipoperoxidación es más activa en estas células, lo que concuerda con los resultados reportados por Estrada-Villagómez (2010), en donde se observó un aumento en los niveles de lipoperoxidación en esferoplastos +C18.3 medido mediante el método del ácido tiobarbitúrico. Por otro lado, se observó en células +C18:3 de seis días (figura 6, panel A) un consumo de oxígeno mayor que en células -C18:3 que se interpretó como una mayor inducción de las primeras etapas de la lipoperoxidación, en tanto que a los veintiocho días (panel B) también se observó una tendencia similar aunque de menor magnitud. Un caso similar ocurrió en las células +C18:3 de seis días crecidas en medio YLac, aunque a los veintiocho días no se observó aumento en el consumo de oxígeno (panel B) en las células crecidas con C18:3 (barras negras) con respecto a los valores obtenidos en las células crecidas en ausencia de C18:3 (barras blancas).

Aquí cabe hacerse mención que no se observó ningún efecto protector al adicionar el BHT, lo cual puede deberse a que este antioxidante inhibe la producción de malondialdehído (Zhang, 1990), y dado que este método no detecta la producción de dicho producto, no era de esperarse efecto alguno.

Por otro lado, en estudios previos se ha observado que la adición del C18:3 aumenta la susceptibilidad de la cadena del transporte de electrones al estrés oxidativo (Cortés-Rojo *et al.*, 2009), por lo cual era de esperarse que el daño oxidativo inducido durante el envejecimiento generara un daño que afectara al potencial de membrana generado por el bombeo de H<sup>+</sup> por los complejos III y IV de la cadena de transporte de electrones.

Los resultados obtenidos a este respecto en las levaduras crecidas en medio YPD (figura 8) a los seis días (panel A) mostraron un potencial de membrana mitocondrial tanto en presencia como ausencia de C18:3, ya que se generó un aumento en el nivel de fluorescencia de la cianina en presencia de CCCP, mientras que a los veintiocho días (panel B) se mantuvo el potencial en células -C18:3 y desapareció en células +C18:3. Al comparar ambos paneles se observó una disminución del potencial conforme más envejecida están las células +C18:3, en tanto que las células -C18:3 se mantuvo el potencial. Estos datos concuerdan con los estudios de respiración hechos a las levaduras crecidas en las mismas condiciones, donde se observó que existe un menor daño mitocondrial en las células -C18.3 de seis días, la cuales consumen una mayor cantidad de oxígeno que las células +C18:3, las cuales consumen oxígeno en cantidades muy discretas. Asimismo, a los veintiocho días se observó que las células -C18:3 aun respiran pero a una magnitud menor que su contraparte de seis días, mientras que en las células +C18:3 se abatió totalmente el consumo de oxígeno (Cortés-Rojo *et al.*, 2011). En conjunto, estos resultados indican que la disminución en el potencial de membrana mitocondrial en células +C18:3 de 28 días está relacionado con una menor capacidad de transporte de electrones, lo cual a su vez podría estar relacionado a una disminución en la funcionalidad de los complejos respiratorios atribuible a un mayor daño lipoperoxidativo en las membranas donde dichas enzimas se encuentran embebidas.

Por otro lado, en los resultados de la medición del potencial de membrana mitocondrial en levaduras crecidas en medio YLAC (figura 9), se observó que a los

seis días (panel A) existe potencial en células -C18:3. A los veintiocho días (panel B), no se mostró potencial en ninguno de los dos cultivos. Este conjunto de resultados (figuras 8 y 9), concuerdan con los resultados mostrados en la tesis de licenciatura de Fernández Quintero (2012), ya que conforme avanza el tiempo se ven afectados los complejos II y III a los seis días en células +C18:3 y a los veintiocho días también se inhibe el complejo IV, lo cual como se mencionó anteriormente, podría afectar el bombeo de protones. En conjunto, se puede decir que la presencia del +C18:3 en las membranas mitocondriales disminuye la funcionalidad de los complejos respiratorios, lo cual se refleja en una disminución paralela en el potencial de membrana mitocondrial por la disminución en el bombeo de protones, dado que este último proceso depende del transporte de electrones. Esta disminución del potencial de membrana asociado a la disfunción de la cadena de transporte de electrones podría conducir a la muerte celular (Sakamuru *et al.*, 2012).

La pérdida de potencial de membrana aumentada en cultivos +C18.3 en YPD podría estar también relacionada con lo encontrado en otros estudios en donde se ha observado que la incorporación de ácidos grasos poliinsaturados como el C18:2 y el C18:3 generan una pérdida en la integridad de la membrana, así como un aumento en su permeabilidad mediante la apertura de poros que de forma inespecífica dejan salir de la mitocondria iones y moléculas como el  $\text{Ca}^{+2}$ , disipando el potencial de membrana y disminuyendo la síntesis de ATP, (Holwlell y Avery, 1997; Peinado *et al.*, 2000; Díaz Zagoya *et al.*, 2007)

La ATPasa  $\text{F}_1\text{F}_0$  es la principal fuente de ATP para los distintos procesos que requieren los eucariontes, la cual funciona en el sentido de la síntesis de ATP gracias al gradiente de  $\text{H}^+$  (Karp, 2006; Roskoski, 2003; Peinado *et al.*, 2000). Por lo tanto, la funcionalidad de la ATPasa  $\text{F}_1\text{F}_0$  junto con el potencial de membrana mitocondrial son dos de los principales factores que influyen la síntesis de ATP, razón por la cual se decidió determinar estos dos parámetros como una manera de evaluar el metabolismo energético mitocondrial.

Los resultados obtenidos respecto a la función de la ATPasa  $F_1F_0$  (Figura 10), muestran que no hay diferencias significativas, en la actividad entre las mitocondrias aisladas de células -C18:3 o +C18:3 a los seis (panel A) o veintiocho días (panel B).

La ausencia de potencial de membrana en las células +C18.3 de 28 días y la preservación de la función de la ATPasa  $F_1F_0$ , sugiere que estas células se encuentran en una situación de hidrólisis del ATP disponible, lo cual podría generar un mayor daño a la célula que intenta mantener su homeostasis y que contribuiría al fenotipo de envejecimiento aumentado. Se ha demostrado que la exposición de la ATPasa  $F_1F_0$  a ERO como el anión superóxido reduce su actividad, (Zhang *et al.*, 1990). Sin embargo, el anión superóxido no es un iniciador de la lipoperoxidación, lo cual sugiere que el superóxido podría interaccionar directamente con alguna de las polipéptidos de la enzima para alterar su actividad. Dado que la disminución de la actividad de la enzima debido al envejecimiento fue proporcional en todas las condiciones estudiadas, esto permite sugerir que la lipoperoxidación no fue el principal factor inhibitorio, sino posiblemente el daño directo a la enzima por alguna ERO.

Otra estimación que se realizó fue la medición del pH de los distintos medios de cultivo, ya que en algunos estudios se ha observado que como consecuencia del metabolismo el pH del medio tiende a bajar durante el cultivo y este es un factor que contribuye al envejecimiento de la levadura. Por otro lado, a un pH elevado cercano a ocho, el crecimiento disminuye, pero no parece afectar las funciones metabólicas ni energéticas de las células (Lehninger, 1972; Helber Álvarez *et al.*, 2011) haciendo que las células entren en la Fase  $G_0$  del ciclo celular. A este respecto, se observó que el pH de todos los cultivos crecidos en medio YLac fue más alto, lo cual indica que su baja su viabilidad puede corresponder a que las células en YLac entran a la fase  $G_0$ .



## 7.CONCLUSIÓN

La incorporación del ácido alfa linolénico en levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* disminuye el metabolismo energético mitocondrial durante el envejecimiento, probablemente por el daño a los lípidos de membrana, mientras que en las levaduras crecidas en medio Ylac disminuyen el metabolismo energético mitocondrial independientemente de la adición del ácido.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Avery Angela M and Avery Simon V. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* Expresses Three Phospholipid Hydroperoxid Glutathione Peroxidases. JBC. 276,(36): 33730-35.

Blum DJ., Ko YH., Pedersen PL. 2012. Mitochondrial ATP Synthase Catalytic Mechanism: a Novel Visual Comparative Structural Approach Emphasizes Pivotal Roles for Mg<sup>2+</sup> and P-loop Residues in Making ATP. Biochemistry. 51(7):1532-46.

Bonifaz A. Micología Médica Básica. 2ª Edición. Méndez Editores. México D.F.

Bossie MA, Martin CE. 1989. Nutritional Regulation of Yeast Delta-9 Fatty Acid Desaturase Activity. J Bacteriol. 171(12): 5409-13.

Calder Philip C. 2012. Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acids. J Nutr. 142(3):592S-599S.

Cardoso. Antioxidantes y calidad de vida. Octubre, 2002

Cipak Ana, Jaganjac Morana, Tehlivets Oksana, Kohlwein Sepp D. Zarkovic Neven. 2008. Adaptation to Oxidative Stress Induced by Polyunsaturated Fatty Acid in Yeast. Biochimica et Biophysica. 283-287.

Clémençon Benjamin. 2012. Yeast Mitochondrial Interactosome Model: Metabolon Membrane Proteins Complex Involved in the Channeling of ADP/ATP. Int J Mol SCI. 13(2): 1858-85.

Cortés Rojo Christian. 2009. Influencia de la peroxidación lipídica sobre la Susceptibilidad de la cadena de Transporte de Electrones al Daño por el Estrés Oxidativo: Estudios en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de doctorado. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. pp: 73.

Cortés-Rojo Christian, Calderón- Cortés Elizabeth, Clemente- Guerrero Mónica, Estrada- Villagómez, Manzo-Avalos, Mejía Zepeda, Boldogh Istvan y Saavedra- Molina Alfredo. 2009. Elucidation of the Effects of Lipoperoxidation on the Mitochondrial Electron Transport Chain Using Yeast Mitochondria with Manipulated Fatty Acid Content. *J. Bioenerg Biomembr.*41(1): 15-28.

Cortés Rojo Christian, Clemente Guerrero Mónica, Calderón Cortés Elizabeth, Manzo Ávalos Salvador, Uribe Salvador y Saavedra Molina Alfredo. 2006. La cadena del transporte de electrones de *Saccharomyces cerevisiae* es inhibida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sin la participación de la oxidación de lípidos. *Ciencia Nicolaita* No. 45. 55-70

Cortés- Rojo Christian, Estrada- Villagómez Mirella, Manzo-Ávalos Salvador y Saavedra- Molina Alfredo. 2009. Influencia de la Peroxidación de Lípidos sobre el Daño Oxidativo Mitocondrial y la Integridad de *Sacharomyces cerevisiae*. *Información tecnológica*. Vol. 20(2), 71-81.

Díaz Zagoya Juan, Juárez Oropeza Marco Antonio. 2007. *Bioquímica; Un Enfoque Básico Aplicado a las Ciencias de la Vida*. Editorial McGraw- Hill Interamericana. pp: 249-270

Déak T, Beuchat LR. 1996. *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. CRC Press, Boca Ratón, Florida. § Fleet GH. 1997. Wine. *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. Doyle MP *et al.*, eds. ASM Press, Washington pp. 671 – 694

Devlin Thomas M. 2004. *Bioquímica: Libro de Texto con Aplicaciones Clínicas*. Cuarta edición. Editorial REVERTE. Tema 3 pp 553

Estrada Villagoméz María Mirella. 2010. Influencia de la Lipoperoxidación sobre la Fase Final del Metabolismo Energético Mitocondrial de *Sacchaomyces cerecisiae*. Tesis de Maestría en Biología Experimental. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. pp:29,30,36.

Fernández Quintero Maricela. Efecto del Ácido alfa-Linolénico sobre la Actividad Enzimática de los Complejos de la Cadena Transportadora de Electrones durante el Envejecimiento Cronológico. Tesis de Licenciatura para Obtener el Título de QFB. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Junio del 2012.

Folch-Mallao Jorge Luis, Garay-Arroyo Adriana, Lledías Fernando, Covarrubias Robles Alejandra A. 2004 La respuesta al estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Revista Latinoamericana de Microbiología. Vol 46, No. 1-2. Pp. 24-26.

Gonzalez Alicia y Valenzuela Lourdes. 2000. *Saccharomyces cerevisiae*. Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado postal 70-242. México D.F. C. P. 04510

González Ramón, Barcenilla José María y Tabera Laura. 2007. Cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* con bajo rendimiento en etanol. Revista de Enología. No. 80. 16-21.

Grandier- Vazeille Xavier, Bathany Katell, Chaignepain Stéphane, Camougrand Nadine, Manon Stéphen and Schmitter Jean-Marie. 2001. Yeast Mitochondrial Dehydrogenases Are Associated in a Supramolecular Complex. *Biochemistry*, 40, 9758-9769.

Helber Álvarez Parada, Sánchez S. Norma Silvia, Peña Díaz Antonio. 2011. Cambios Metabólicos y Fisiológicos de *Saccharomyces cerevisiae* en Respuesta a Diferentes Valores del p H Externo. XVII Reunión Nacional de Bioenergética y Biomembranas. pp: 75

Hill Shauna, Hirano Kathleen, Shmanai Vadim V., Marbois Beth N., Vidovic Dragoslav, Bekish Andrei V., Kay Bradley, Tse Vincent, Fine Jonathan, Clarke Catherine F., Shchepin Mikhail S. 2010. Isotope-Reinforced Polyunsaturated

Fatty Acid Protect Yeast Cell from Oxidative Stress. Free Radical Biology and Medicine. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.10690

Holman, R. T. 1954. Autooxidation of Fats and Related Substances. En: Progress in Chemistry of Fats and Other lipids, edited by Holman RT, Lundberg WO, Malkin T. London: Pergamon. Vol. 2. pp: 51-98.

Howlett N. G. y Avery S. V. 1997. Inducción de Lipid Peroxidation During Heavy Metals Stress in *Saccharomyces cerevisiae* and Influence of Plasma Membrane fatty Acid Unsaturation. App Environ NG. 63(8):2971-2976.

Hulbert A. J. 2010. Metabolism and Longevity: Is There a Role for Membrane Fatty Acids?. Integrative and Comparative Biology, volume 50, number 5, pp. 808-817.

Hulbert A. J., Pamplona Reinald, Buffenstein Rochelie and Buttemer W. A. 2007. Life and Death: Metabolic Rate, Membrane Composition, and Life Span of Animals. Physiol Rev 87: 1175-1213.

Karp Gerald.2006. Biología Celular y molecular. Conceptos y experimentos. Cuarta edición. Editorial Mc Graw Hill. Pp: 130-232.

Keller, J. N ., Hanni, K. B., Markesbery, W. R. 2000. Possible involvement of proteasome inhibition in aging: implications for oxidative stress Mechanisms of Ageing and Development, 11361-70.

Kirkwood, T.B. 1989. Evolution and aging. Mutat Res 219:1-7.

Koolman Jan. 2005. Bioquímica: Texto y Atlas. Tercera Edición. Editorial Panamericana. pp 150.

Lehninger L. Albert. 1975. Bioenergética. Editorial Fondo Educativo Interamericano S.A. pp: 37-50

Lehninger L. Albert. 1972. Bioquímica: Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular. Quinta edición. Ediciones Omega.

McGilvery Robert W. 1977. Conceptos Bioquímicos. Editorial REVERTE pp 267

Montgomery Magdalene K. Hulbert A. J. Buttemer William A. 2011. The Long Life of Birds: The Rat- Pigeon Comparison Revisited. PLOS ONE. Volume:6, issue 8, e24138. 1-15.

Nicholls David G. 1987 Bioenergética: Introducción a la Teoría Quimiosmótica. Editorial Reverté. pp: 1-24, 71-101, 105-138.

Passarge Eberhard. 2007. Genética Texto y Atlas. Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana. pp: 130.

Peinado M.A., del Moral M.L., F.J. Esteban, Martínez Lara E., Siles E., Jiménez A., Hernández -Cobo R., Blanco S., Rodrigo J., Pedrosa J. A. 2000. Envejecimiento y neurodegeneración: bases moleculares y celulares. REV NEUROL; 31 (11): 1054-1065.

Pelczar, J. R., Reid, D. Y Chan, E. C.S. 1992. Microbiología. 4ª Edición. Editorial McGraw-Hill.

Peña Antonio, Sánchez Silvia, Calahorra Martha. 2010. Estimation of the Electric Plasma Membrane Potential Difference in Yeast with Fluorescent Dyes: Comparative Study of Methods. J Bioenerg Biomembr. 42:419-432.

Roskoski, Jr. Robert. 2003. Bioquímica. Editorial McGraw- Hill Interamericana. pp: 82,93, 127-140.

Sakamuru S, Li X, Attene-Ramos MS, Huang R, Lu J, Shou L, Shen M, Tice RR, Austin CP, Xia M. 2012. Application of Homogenous Membrane Potential Assess Mitochondrial Function. *Physiol Genomics*. Published March 20.

Stewart A. G, Lee L. K, Donohoe M, Chaston J. J, Stock D. 2012. The dynamic stator stalk of rotary ATPases. *Nat Commun*. 21;3-.687.

Teijón José María. 2006 .Fundamentos de Bioquímica Metabólica. Cuarta edición. Editorial REVERTE. Tema 28 pp 37, 423.

Veenman L, Alten J, Linnemannstöns K, Shandalov Y, Zeno S, Lakomek M, Gavish M, Kugler W. 2010. Potential involvement of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>- ATP (synth)ase and Reactive Oxygen Species in Apoptosis Induction by the Antineoplastic Agent Erucylphosphohomocholine in Glioblastoma Cell Lines-. A Mechanism for Induction of Apoptosis via the 18 kDa Mitochondrial Translocator Protein. 15(7): 753-68.

Voet D. y Voet J. 2006. Bioquímica. Tercera edición. Editorial Panamericana. pp:829- 877

Whittaker Peter A y MDanks Susan. 1982. Mitochondria: Estructura, Función y Formación. Editorial continental. pp:13-35;137-163

Yazawa Hisashi, Iwahashi Hitoshi, Kamisaka Yasushi, Kimura Kazuyoshi and Uemura Hirishi. 2009. Production of Polyunsaturated Fatty Acids in Yeast *Sacharomyces cerevisiae* and its Relation to Alkaline pH Tolerance. *Yeast*; 26: 167-184.

Young Ko H. Delannoy Michael, Hullahen Joanne, Chiu Wah and Pederse Peter L. 2003. Mtochodrial ATP Synthasome. Cristae –enriched Membranes and a

multiwall Detergent Screening Assay Yield Dispersed Single Complexes Containing the ATP Synthase and Carriers for Pi and ADP/ATP. J Biol Chem. 278(14): 12305-9.

Zhang W. Chakravaty B. Zheng F. Gu Z. Wu H. Mao J, Wakil SJ. Quijcho FA. 2011. Crystal Structure of FAS Thioesterase Domain with Polyunsaturated Fatty Acyl Adduct and Inhibition by Dihomo-gamma- linolenic acid. Proc Natl Acad Sci USA. 108(38):15757-62.

Zhang Yin, Olivier Marcillat, Giulivi Cecilia, Lars Ernster and Kelvin J. A, Davies. 1990. The Oxidative Inactivation of Mitochondrial Electron Transport Chain Components and ATPase. JBC. 265, (27); 16330-16336.