



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**

**EFFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE  
EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO  
FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

**PRESENTA**

**MARICELA FERNÁNDEZ QUINTERO**

**ASESOR DE TESIS:**

**D.C. CHRISTIAN CORTÉS ROJO**

**COASESOR DE TESIS:**

**D.C. ALFREDO SAAVEDRA MOLINA**



**MORELIA MICHOACÁN, AGOSTO 2012.**

# *Dedicatoria*

*A mi mami Raquel Quintero, por haberme dado la vida, por su apoyo incondicional, amor y comprensión, por ser mi amiga y creer en mí.*

*A mi padre Gerardo Fernández, por su apoyo y amor.*

*A mis hermanos Alejandra, Gerardo y Emanuel y a mi cuñada Blanca.*

*A mis bebés Emanuel y Cristofer por alegrar cada uno mis días.*

## **Agradecimientos**

Al D.C. Christian Cortés Rojo por su gran apoyo, asesoría y permitirme formar parte de su gran equipo de trabajo.

Al D.C. Alfredo Saavedra Molina por su coasesoría y por brindarme el espacio para realizar mi proyecto.

A la M.C. María Mirella Estrada Villagómez por haberme enseñado las técnicas que utilice en este proyecto, por su amistad y apoyo incondicional durante y después de este trabajo.

A los miembros del comité tutorial por sus aportaciones para mejorar este trabajo.

A la Q.F.B. Mónica Clemente Guerrero por su apoyo y consejos brindados durante este tiempo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio de Bioquímica del I.I.Q.B.: Lucio, Omar, Pedro, Carlos, Ana, Ruth, Lorena por ser el mejor grupo de trabajo, por los grandes momentos de convivencia y alegría compartidos.

A mis grandes amigos y compañeros de la Facultad de Químico Farmacobiología: Mary Chuy, Arbey, Edna, Gaby, Mayra, Jano, Miguel, Magaly, Edgar.

A Alan, Liz Villafuerte, Rosa Torres y Saúl Aguilar por ser más que mis compañeros de trabajo mis amigos y por apoyarme para concluir este proyecto en mi vida.

A Heriberto por seguir brindándome tu apoyo, amistad y cariño durante estos años.

A Roxy por ser mi amiga, hermana, compañera de cuarto, de trabajo, de vida, por aguantarme durante este tiempo.

A Karem, Magui, Ara, Claudia y Celeste por esos maravillosos momentos que me brindaron.

Y a mi novio Moisés Domínguez Flores por apoyarme, quererme y estar conmigo en esta última etapa de mi proyecto.

A la Q.F.B. Sandra Suárez, M.C. Eréndira Solache, M.C. Gabino Estévez, D.C. Álvaro Rodríguez Barrón, profesores de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por sus enseñanzas.

## **AGRADECIMIENTOS**

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

# ÍNDICE

<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	1
1.2. La mitocondria.....	3
1.3. La cadena respiratoria de transporte de electrones .....	8
1.3.1. Complejo I. NADH deshidrogenasa.....	10
1.3.2. Complejo II. Succinato: ubiquinona oxidoreductasa.....	12
1.3.3. Complejo III. Citocromo c reductasa.....	13
-Coenzima Q.....	15
-El ciclo Q.....	15
1.3.4. Complejo IV. Citocromo c oxidasa .....	17
1.3.5. Citocromo c.....	19
1.4. Especies reactivas de oxígeno (ERO) y estrés oxidativo.....	20
1.5. La mitocondria como la principal fuente de ERO.....	23
1.6. La peroxidación de lípidos (lipoperoxidación).....	25
1.7. Teoría del envejecimiento por radicales libres.....	27
1.8. El envejecimiento y el grado de insaturación de los ácidos grasos que componen las membranas.....	29
1.9. <i>S. cerevisiae</i> como modelo de estudio en el envejecimiento.....	31
1.10. Ácido $\alpha$ -linolénico.....	32
<b>2. Justificación</b> .....	34
<b>3. Hipótesis</b> .....	34
<b>4. Objetivos</b> .....	35

4.1. Objetivo general.....	35
4.2. Objetivos específicos.....	35
<b>5. Material y Métodos.....</b>	<b>35</b>
5.1. Reactivos.....	35
5.2. Material Biológico.....	35
5.3. Siembra de Células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e inducción del envejecimiento cronológico.....	36
5.4. Manipulación del contenido de ácidos grasos de la levadura.....	36
5.5. Evaluación del envejecimiento cronológico.....	36
5.5.1. Determinación de la viabilidad celular en placa.....	36
5.6. Aislamiento de mitocondrias de <i>S. cerevisiae</i> .....	37
5.7. Determinación de la actividad de los complejos respiratorios.....	38
I. Actividad del Complejo II (Succinato deshidrogenasa).....	39
II. Actividad del Complejo III (Succinato citocromo c oxidorreductasa).....	39
III. Actividad del Complejo IV (citocromo c oxidasa).....	40
5.8. Procesamiento estadístico.....	40
<b>6. Resultados.....</b>	<b>40</b>
6.1. Efecto de la adición de C18:3 en el envejecimiento cronológico.....	41
6.2. Efecto de la composición de ácidos grasos sobre la actividad enzimática de la CTE.....	43
6.2.1. Influencia de la composición de ácidos grasos sobre la actividad enzimática del complejo II.....	43
6.2.2. Influencia de la composición de ácidos grasos sobre la actividad enzimática del complejo III.....	45

6.2.3. Influencia de la composición de ácidos grasos sobre la actividad enzimática del complejo IV.....	47
<b>7. Discusión.....</b>	<b>49</b>
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>52</b>
<b>9. Referencias.....</b>	<b>53</b>

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. *Saccharomyces cerevisiae***

*Saccharomyces cerevisiae* es un organismo eucarionte que mide alrededor de 5µm de diámetro; este habitante común de hábitats terrestres es un hongo Ascomiceto unicelular que produce esporas sexuales y asexuales (47).

El genoma de *S. cerevisiae* es relativamente pequeño y compacto, con poco ADN repetitivo y algunos intrones. Las cepas haploides contienen aproximadamente entre 12 y 13 Mb de ADN nuclear distribuidos en 16 cromosomas lineales (con una longitud que varía entre 200 y 2200 kb). Contiene aproximadamente unos 6000 genes (12).

A pesar de su simplicidad, las células de *S. cerevisiae* tienen todas las características fundamentales observadas en las células eucariontes de los microorganismos más complejos, poseen un núcleo definido con muchos cromosomas lineales condensados para formar cromatina y su citosol tiene un espectro completo de orgánulos celulares y de estructuras membranosas incluyendo mitocondrias, retículo endoplasmático liso y rugoso, aparato de Golgi y lisosomas. Además, a diferencia de las células de mamíferos, poseen también vacuolas y una pared celular externa compuesta principalmente por β-glucanos (50-75%) y manoproteínas (25-50%) que forman una red de microfibras. También aparece en la pared una pequeña cantidad de quitina (2-4 %) localizada principalmente en las cicatrices que quedan tras la gemación (13,55).

La pared celular y la membrana plasmática tienen un espacio de separación entre ellas llamado periplasma. En *S. cerevisiae*, estas capas constituyen el 15 % del volumen total de la célula, cuyo papel principal es proporcionar una barrera con el exterior y controlar la permeabilidad. La pared celular tiene un espesor entre 100 y 200 nm y constituye entre el 15 y el 25% de la masa seca de la célula (12).

La membrana plasmática mide unos 7 nm de grosor, constituye una barrera estable e hidrofóbica entre el citosol y el medio externo de la célula. Como en otras membranas, la membrana plasmática de las levaduras está formada principalmente por lípidos y proteínas (11).

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE  
EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

---

*S. cerevisiae* es un microorganismo aerobio facultativo y se reproduce principalmente en forma asexual por división vegetativa bajo buenas condiciones nutricionales, puede dividirse cada 90 minutos por gemación; esta multiplicación celular por brote permite el nacimiento de entre 20 a 25 nuevas células hijas a partir de una sola célula madre (46). Si las condiciones ambientales son adversas (carencia de nutrientes, bajo pH y temperatura, etc.), la levadura puede entrar en un proceso de reproducción sexual o esporulación (12).

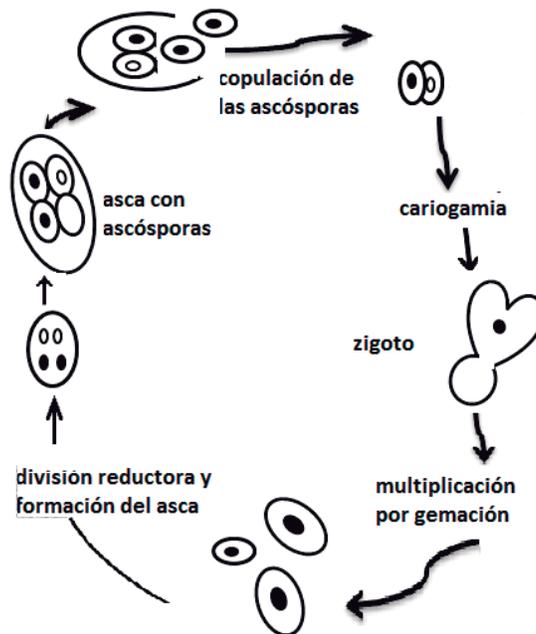
*S. cerevisiae* muestra 5 fases de crecimiento bien definidas en medios líquidos con glucosa como fuente de carbono: 1) la fase lag, 2) la fase logarítmica, 3) el cambio diáuxico, 4) la fase postdiáuxica y 5) la fase estacionaria.

La fase lag es un periodo de adaptación en el cual la célula se prepara para dividirse. Durante la fase logarítmica las células alcanzan su máxima velocidad de duplicación y llevan a cabo un metabolismo fermentativo del que se produce etanol. Al disminuir la concentración de glucosa, las células atraviesan por el cambio diáuxico, un periodo breve de tiempo en el cual no hay división y la célula cambia de un metabolismo fermentativo a uno respiratorio (56). En la fase postdiáuxica las células usan como fuente de carbono el etanol producido durante la fase logarítmica e incrementan gradualmente su resistencia al estrés, en tanto que la fase estacionaria se presenta cuando los nutrientes del medio se han agotado y no hay división celular. En esta fase, las células acumulan carbohidratos de reserva como trehalosa y glucógeno, alcanzan el máximo nivel de resistencia a estrés y su pared celular se vuelve más gruesa y resistente a la digestión por liticasa (22).

A continuación se muestra el ciclo biológico de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 1):

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

---



Esquema.1.1. Ciclo biológico de *S. cerevisiae*. Tomado y modificado de (47).

Algunas de las ventajas de trabajar con *S. cerevisiae* son:

- ✚ Es un organismo no patógeno.
- ✚ Tiene un genoma 200 veces menor que el de mamíferos ( $3.5 \times 10^9$  pb en mamíferos y  $1.4 \times 10^7$  pb en la levadura).

Puede ser modificado genéticamente por tecnologías de ADN recombinante (13).

## 1.2. La mitocondria

La mitocondria es un orgánulo cuya función es fundamentalmente energética ya que interviene en la respiración celular aerobia, en ella se llevan a cabo las reacciones del ciclo de Krebs, de la cadena respiratoria, de la oxidación de ácidos grasos y en general, las reacciones propias de los procesos catabólicos (55).

El tamaño, número y forma de las mitocondrias varía de un tejido a otro, pero su estructura básica es la misma. El número y tamaño de las mitocondrias guarda estrecha relación con las necesidades energéticas de la célula (17). Las mitocondrias

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE  
EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

---

se presentan como bastones, gránulos o filamentos, siendo la primera la forma más común. Su tamaño varía ampliamente según la especie y el tipo celular, pudiendo oscilar entre 0,2 y 10  $\mu\text{m}$  (55).

En la mitocondria ocurre la etapa final de la oxidación de los nutrientes. Contiene, como demostraron A. Lehninger y E. Kennedy en 1948, la piruvato deshidrogenasa, las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, las enzimas que catalizan la oxidación de los ácidos grasos y las enzimas y proteínas redox que intervienen en el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. Estos procesos generan la mayor parte de la energía celular en condiciones aeróbicas. Por ello se le describe como la “planta de energía” de la célula (18).

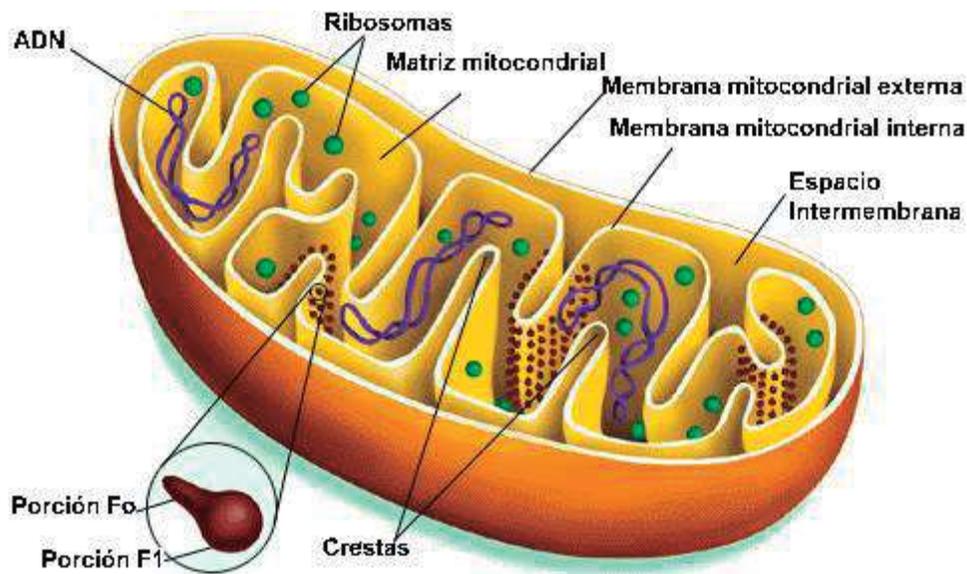
El modelo típico de la mitocondria consiste en dos membranas concéntricas con propiedades y funciones biológicas marcadamente diferentes:

- 1.- la membrana mitocondrial externa, que es lisa y está en contacto con el medio citosólico;
- 2.- la membrana mitocondrial interna que delimita un espacio central denominado matriz mitocondrial y presenta múltiples invaginaciones denominadas crestas, las cuales son más abundantes en mitocondrias de células con intensa actividad respiratoria (9).

Sin embargo, el modelo anterior es inexacto debido a que imágenes obtenidas mediante tomografía microscópica electrónica de mitocondrias de hígado de rata muestran que las crestas no están formadas por los plegamientos de la membrana mitocondrial interna, sino que son cisternas con un diámetro de 30-40 nm aproximadamente con forma tubular o aplanada, conectadas entre sí y a su vez también conectadas a la superficie periférica de la membrana mitocondrial interna mediante estructuras tubulares de 28 nm de diámetro aproximadamente, siendo la superficie de la membrana interna y las crestas una superficie continua (13).

***EFEECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

---



Esquema 1.2. Modelo tradicional de la mitocondria. Tomado de (18).

Las crestas permiten aumentar la superficie para realizar diversas reacciones y se encuentran tapizadas de pequeños salientes llamados partículas elementales, que corresponden a moléculas de ATP sintasa (20).

Además, existen sitios de contacto de aprox. 14 a 40 nm entre las membranas mitocondriales interna y externa a lo largo de la periferia de la mitocondria; esto sugiere que los sitios podrían representar ensamblajes macromoleculares para el transporte de metabolitos, iones y proteínas a través de las membranas externa e interna (13).

La membrana externa es permeable a pequeñas moléculas e iones. La permeabilidad de esta membrana se atribuye a la presencia de una proteína transmembrana llamada porina la cual forma canales o poros. La función de esta proteína es formar un canal acuoso para el movimiento de metabolitos de naturaleza aniónica de hasta 10.000 Da (fosfato, ADP, ATP, piruvato) hacia adentro y afuera de la mitocondria. (13, 50). Otro componente de la membrana externa es la translocasa de membrana externa (TOM, del inglés Translocator of Outer Membrane), el cual es un complejo proteico cuya función es permitir el movimiento de proteínas sintetizadas en el citosol; este complejo en *S. cerevisiae* está constituido por las proteínas Tom 20 y Tom 70 que funcionan como receptores de los péptidos señal de las pre-proteínas a importar, y las proteínas Tom 22, Tom 40 y Tom 50. (10,13).

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE  
EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

---

En contraste, la membrana interna, que tiene una proporción más alta en proteínas, es prácticamente impermeable a sustancias polares e iónicas. El agua, el CO<sub>2</sub> y el O<sub>2</sub> son de las pocas moléculas que pueden atravesar libremente la membrana mitocondrial interna. La mayoría de las moléculas que atraviesan la membrana mitocondrial interna lo hacen únicamente por la mediación de proteínas transportadoras específicas (50). Esto permite el establecimiento del potencial transmembranal y evita pérdidas en el mismo debidas a la tendencia termodinámica de los iones a igualar las cargas eléctricas y su concentración en ambos lados de la membrana (13).

La membrana mitocondrial interna cuenta con otra característica particular, la presencia casi exclusiva de cardiolipina; este fosfolípido tiene un papel muy importante en la mitocondria optimizando la actividad de algunos complejos de la cadena respiratoria y algunos acarreadores iónicos. La membrana mitocondrial interna aloja a la ATP sintasa y a los complejos proteicos que componen la cadena transportadora de electrones (CTE) (13).

La matriz contiene una amplia variedad de enzimas solubles, incluyendo las que son necesarias para la oxidación del piruvato y los ácidos grasos y para el ciclo de Krebs. Contiene también el ADN mitocondrial, los ribosomas mitocondriales, los ARNt y varias enzimas requeridas para la expresión de genes mitocondriales (18). Además, en la matriz mitocondrial hay numerosas enzimas implicadas en la biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos y algunas enzimas involucradas en los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo tales como la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD) o las del sistema de tioredoxina (13).

Las mitocondrias poseen su propio material genético y sus propios ribosomas, los cuales son más semejantes a los bacterianos que a los eucarióticos. En particular, es de destacar que aunque pueden presentarse algunas copias en forma lineal, el ADN mitocondrial es generalmente circular y se presenta en pequeños acúmulos puntiformes de 4-5 copias que se conocen como “nucleoides” (55). El ADN mitocondrial sólo tiene información para la síntesis de sus propios ribosomas y para

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE  
EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

---

algunos de sus ARN de transferencia (50). En cuanto a las proteínas, codifica para 7 de las 49 subunidades del complejo I, el citocromo *b* del complejo III y las subunidades I, II y III del complejo IV de la cadena de transporte de electrones (13). El resto de las proteínas involucradas en el ciclo de Krebs y en la fosforilación se sintetizan en el citoplasma y se transportan hasta la mitocondria para cumplir su función (50).

La distribución de las mitocondrias dentro de las células es generalmente bastante uniforme y existen en promedio unas 2000 mitocondrias por célula, de tal manera que podemos encontrar algunas excepciones como las células musculares las cuales tienen abundantes mitocondrias debido a que desarrollan trabajos muy intensos para lo cual requieren un alto grado de energía (50).

La mitocondria es capaz de dividirse en un proceso que se asemeja ligeramente a la mitosis, con formación de una pared a partir de la membrana interna, perpendicular al eje mayor del organelo. El número de mitocondrias se controla por autofagia lisosomal, que comienza por la formación de envolturas de retículo plasmático alrededor de la mitocondria senescente; luego un cierto número de vesículas proveniente del Aparato de Golgi se unen a la vacuola autofágica, liberando, gracias al pH ácido, hidrolasas previamente vinculadas a receptores de manosa-6-fosfato; así comienza la degradación mitocondrial (40).

Las mitocondrias de *S. cerevisiae* tienen diferencias fisiológicas con las de otras especies utilizadas como modelo de estudio; en comparación a las mitocondrias de rata las mitocondrias de *S. cerevisiae* tienen la ausencia del complejo I, la presencia de una citocromo *c* peroxidasa que cataliza la reducción de  $H_2O_2$  y la constitución lipídica de las membranas mitocondriales (14).

En el espacio intermembranal de las mitocondrias de *S. cerevisiae*, se encuentra la actividad de adenilato cinasa del orgánulo, esta enzima cataliza la reacción de dos moléculas de ADP para producir ATP y AMP en músculo. Son componentes de este compartimiento también el citocromo *b*<sub>2</sub>, el citocromo *c* y la citocromo *c* peroxidasa (12).

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE  
EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

---

En *S. cerevisiae*, alrededor del 12% del volumen total de la célula está ocupado por mitocondrias y su número y estructura sufren extensas modificaciones dependiendo de los cambios en el ciclo de vida y del estado fisiológico (13).

### **1.3. La cadena respiratoria de transporte de electrones**

Todas las células vivas llevan a cabo la respiración celular para obtener la energía necesaria para sus funciones. Usualmente se usa glucosa como materia prima, la cual se metaboliza a bióxido de carbono y agua, produciéndose energía (12).

La respiración celular es una serie de reacciones mediante las cuales la célula degrada moléculas orgánicas y produce energía, con la participación del O<sub>2</sub> como aceptor final de los electrones provenientes de las oxidaciones de los nutrientes y la consecuente generación de ATP a partir de ADP más fosfato (Pi) (18).

La mayor parte de la energía libre que se produce durante la oxidación de la glucosa a CO<sub>2</sub> es retenida en las coenzimas reducidas FADH<sub>2</sub> y NADH generadas en la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico, estas durante la respiración liberan electrones, que se transfieren por una serie de transportadores en la cadena de transporte de electrones (CTE) hacia el O<sub>2</sub> (8).

La CTE es una parte fundamental de la fosforilación oxidativa y consiste en cuatro complejos proteicos independientes:

- I.-Complejo I. NADH deshidrogenasa o NADH: ubiquinona oxidoreductasa.
- II.-Complejo II. Succinato deshidrogenasa o Succinato: ubiquinona oxidoreductasa.
- III.-Complejo III. Citocromo *c* reductasa o Ubiquinona: citocromo *c* oxidoreductasa
- IV.-Complejo IV. Citocromo *c* oxidasa.

El aislamiento de proteínas mitocondriales con propiedades específicas de transferencia de electrones, por Green y sus colaboradores, proporcionó el concepto de “complejos” de la cadena respiratoria (9).

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE  
EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

---

Estos complejos están integrados en la membrana mitocondrial interna; tres de esos complejos (I, III y IV) funcionan como bombas redox de electrones, acoplado el transporte de electrones a la translocación vectorial de protones (11). La CTE también está constituida por dos moléculas móviles transportadoras de electrones: la ubiquinona (coenzima Q) y el citocromo *c*, las cuales tienen una estructura más sencilla y sirven para conectar eléctricamente a los complejos respiratorios (10, 46).

Los complejos de la CTE están formados por numerosos polipéptidos que contienen una serie de cofactores redox unidos a las proteínas como las flavinas (FMN o FAD en los complejos I y II), los centros de hierro-azufre (en los complejos I, II y III) y los grupos hemo (en los complejos II, III y IV) (46).

Cada complejo acepta o dona electrones a la coenzima Q y el citocromo *c*. Cada acarreador de la CTE puede recibir electrones de un donador y subsecuentemente pueden donarlos al siguiente acarreador de la cadena, finalmente se combinan con el aceptor final de electrones, el oxígeno molecular, que al reducirse origina agua (18, 27, 40).

Con la excepción de la coenzima Q, todos los miembros de esta cadena son proteínas (18).

Los transportadores electrónicos y los complejos están organizados en “ensamblajes” con interacciones específicas proteína-proteína, que son efectivas para la transferencia rápida de electrones gracias a la limitación de las distancias intermoleculares entre ellas (9). Una mitocondria individual de hígado contiene cerca de 10.000 ensamblajes de complejos respiratorios, mientras que una de corazón presenta cerca del doble. Los complejos I, III y IV interaccionan para formar supercomplejos con una composición estequiométrica definida en mitocondrias de levaduras, plantas superiores y mamíferos (13).

### **1.3.1. Complejo I.- NADH deshidrogenasa (NADH: ubiquinona oxidoreductasa).**

El complejo I de mamíferos tiene un peso de aproximadamente 1000 KDa, siendo el más grande de todos los complejos respiratorios; está constituida por al menos 46 subunidades (39 están codificadas en el ADN nuclear y 7 por el ADN mitocondrial), un flavín mononucleotido (FMN) y 5 grupos fierro-azufre (Fe-S) (13, 35).

La NADH deshidrogenasa tiene forma de L, con el brazo largo como una proteína de membrana integral hidrofóbica, donde se encuentra la maquinaria de bombeo de protones, y el brazo corto constituido por un dominio globular hidrofílico situado en la matriz mitocondrial, que contiene la subunidad de unión al NADH y el centro activo de la enzima, constituido por una flavina y 9 centros hierro-sulfurados (17).

La función de este complejo es catalizar la transferencia de dos electrones del NADH y transferirlos a la ubiquinona (Q). El producto reducido, el ubiquinol (QH<sub>2</sub>) puede difundir libremente por la membrana. Al mismo tiempo el Complejo I transloca cuatro protones a través de la membrana mitocondrial interna desde la matriz hacia el espacio intermembranal produciendo así un gradiente de protones (46).

El flujo de electrones ocurre de la siguiente forma:

1.- El NADH es oxidado a NAD<sup>+</sup>, reduciendo al FMN a FMNH<sub>2</sub> en un único paso que implica a dos electrones. 2.- El siguiente transportador de electrones es un centro Fe-S que sólo puede aceptar un electrón y transferirlo a la ubiquinona generando una forma reducida denominada semiquinona (QH<sup>•</sup>). 3- Esta semiquinona vuelve a ser reducida con el otro electrón que quedaba generando el QH<sub>2</sub> (12).

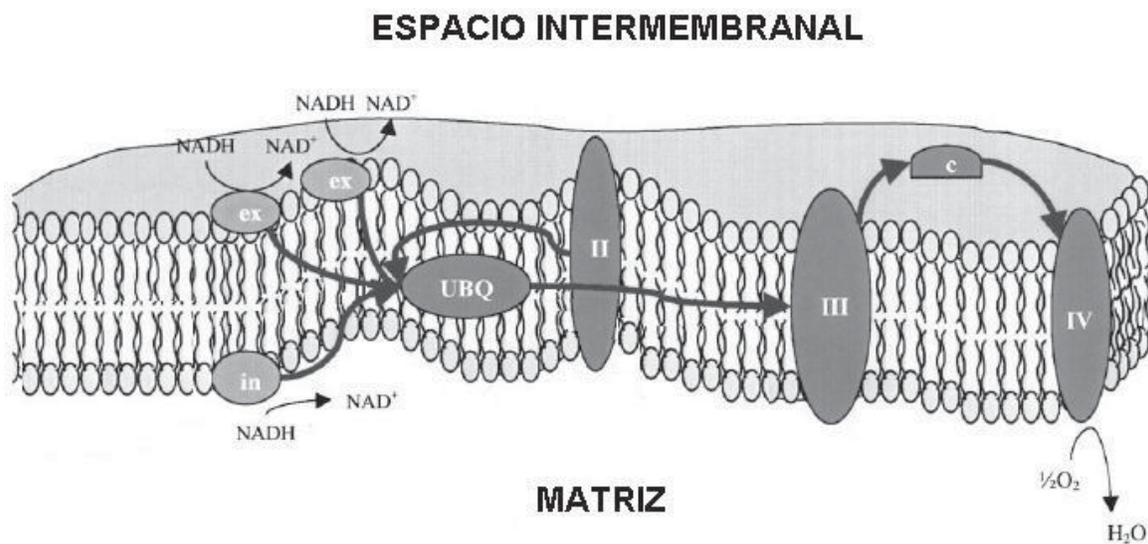
Este proceso supone cerca del 40% del gradiente de protones transmembrana generado en la oxidación del NADH por la CTE (13).

Existen varios inhibidores que pueden bloquear el flujo de electrones a través de diferentes transportadores del complejo I: la rotenona y la piericidina inhiben del flujo de electrones en este complejo (12). La rotenona actúa bloqueando la transferencia de equivalentes de reducción desde los centros hierro-azufre hasta la ubiquinona, posiblemente actuando como análogo de la misma (10).

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

La cadena respiratoria de *S. cerevisiae* carece de un complejo I. En su lugar, los equivalentes reductores son transferidos hacia la CTE mediante tres NADH deshidrogenasa alternas (NDE): dos NADH deshidrogenasas externas debido a la orientación de su sitio catalítico hacia el espacio intermembranar, y una NADH deshidrogenasa interna debido a la orientación de su sitio catalítico hacia la matriz mitocondrial (13, 15).

A diferencia del complejo I, la NADH deshidrogenasa interna no transloca protones, solo oxida el NADH producido en la matriz por el ciclo de Krebs o por la alcohol deshidrogenasa mitocondrial y transporta los electrones hacia el ubiquinol. El NADH citosólico de la levadura es canalizado por la porina de la membrana externa mitocondrial hacia las NADH deshidrogenasa externas, las cuales transfieren los electrones del NADH hacia la CTE motivo por el cual estas enzimas se consideran como el equivalente de la lanzadera aspartato-malato de mitocondrias de mamíferos (15).



**Esquema 1.3. Representación de la CTE de *S. cerevisiae***; ex, NADH deshidrogenasas externas; in, NADH deshidrogenasa interna; UBQ, poza de ubiquinol:ubiquinona; c, citocromo c. Tomado de (13).

**1.3.2. Complejo II.- Succinato: ubiquinona o xidoreductasa (succinato deshidrogenasa).**

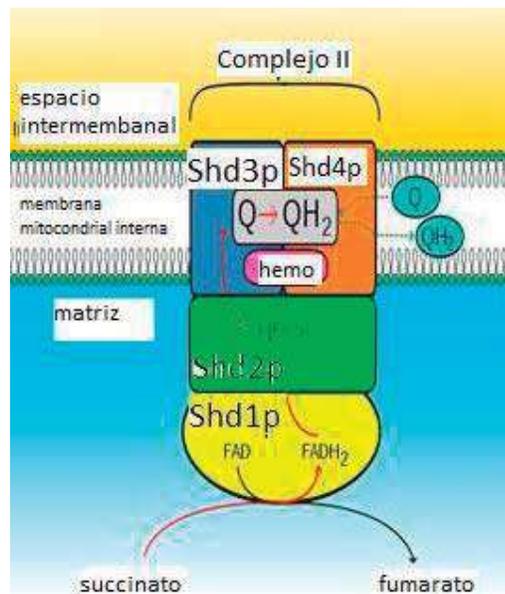
El complejo II es el otro punto de entrada de electrones a la CTE así como la única enzima que también participa en el ciclo de Krebs y que está asociada a la membrana (46). En su participación en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos interviene en la transferencia de electrones desde el succinato hasta el FAD, formando FADH<sub>2</sub>, mientras que en su papel dentro de la cadena de transporte electrónico transfiere los electrones del FADH<sub>2</sub> a la ubiquinona (10).

En comparación al NAD<sup>+</sup> que difunde libre en la matriz mitocondrial, el FAD no existe libre en disolución; por lo cual el complejo II contiene una molécula de FAD. La tenoiltrifluoroacetona (TTFA) bloquea la transferencia de electrones a través del complejo II posiblemente mediante interacciones débiles con el hierro del último componente del complejo, un centro hierro-sulfurado. También a través de los equivalentes de reducción entrantes vía el complejo II, se produce un flujo reverso de electrones hacia el complejo I (9).

- **Estructura**

El complejo II tiene una estructura heterotetramérica formada por 4 subunidades, denominadas Sdh1p, Sdh2p, Sdh3p y Sdh4p codificadas por genes nucleares, que la hace ser la única enzima de la cadena respiratoria en la que ninguna de sus subunidades se encuentra codificada en el ADN mitocondrial. Las subunidades Sdh1p y Sdh2p forman un dímero catalítico que contiene el sitio activo, FAD y 3 grupos Fe-S ([2Fe-2S], [4Fe-4S] y [3Fe-4S]). Las subunidades Sdh3p y Sdh4p son proteínas integrales de membrana que contienen un hemo b<sub>562</sub> y los sitios de reducción de ubiquinona. El dímero catalítico puede oxidar succinato y reducir aceptores artificiales de electrones (13, 35).

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****



**Esquema 1.4. Estructura de la succinato deshidrogenasa. Tomado y modificado (35).**

Este complejo enzimático es inhibido por la carboxina y la tenoiltrifluoroacetona, así como por el malato, que actúa como inhibidor competitivo del sustrato succinato (19).

**1.3.3. Complejo III.- Citocromo c reductasa, Ubiquinona:citocromo c oxidoreductasa o complejo citocromo bc1**

El complejo III, es el tercer complejo de la CTE que interviene en la respiración celular y la generación de adenosin trifosfato (ATP) mediante la fosforilación oxidativa (7).

Este complejo recibe electrones de los Complejos I y II; a través del QH<sub>2</sub> y los transfiere a dos moléculas de citocromo c, que es un transportador de electrones hidrosoluble. Al mismo tiempo, transloca dos protones a través de la membrana por los dos electrones transportados desde el ubiquinol (7).

Estructuralmente, es una lipoproteína multimérica transmembranal formada por dos monómeros idénticos de 11 cadenas polipeptídicas en mamíferos, mientras que en *S. cerevisiae* se compone de 9 subunidades proteicas diferentes. Tres de estas subunidades poseen grupos prostéticos codificadas tanto por el genoma nuclear como

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE  
EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

---

por el mitocondrial (concretamente, este último almacena la secuencia del citocromo *b*). El complejo III posee una masa de 250 kDa. (13, 35).

La subunidad citocromo *b* alberga dos grupos hemo tipo *b* ( $b_L$  y  $b_H$ ); mientras que la subunidad citocromo  $c_1$  tiene un grupo hemo tipo *c* ( $c_1$ ), y la ferrosulfoproteína de Rieske ( $Fe_2S_2$ ) posee una agrupación de dos átomos de hierro y dos de azufre en el que se sustituyen dos residuos de cisteína por dos de Histidina (35).

El citocromo *b* es una proteína integral de membrana, dihémica, de carácter hidrófobo, con una masa de alrededor de 48 kDa. Su estructura secundaria consta de 9 hélices, 8 de las cuales son transmembranales. La hélice restante es lo suficientemente hidrofílica para residir en el lado positivo de la membrana interna mitocondrial. Los 2 grupos hemo que contiene la proteína están unidos a ella mediante 4 histidinas. Los hemos se denominan hemo de bajo potencial ( $b_L$  o  $b_{566}$ ) y hemo de alto potencial ( $b_H$  o  $b_{562}$ ). Respecto a su orientación espacial, el hemo  $b_L$  se encuentra cerca de la superficie positiva de la membrana, mientras que el hemo  $b_H$  se encuentra cerca del centro de la bicapa lipídica (2).

El citocromo  $c_1$  es una proteína de carácter ácido, cuya función es conducir los electrones desde un ambiente hidrofóbico hacia la proteína soluble citocromo *c*. La proteína se ancla a la superficie electropositiva de la membrana por medio de una hélice hidrofóbica localizada en su extremo C-terminal, y además, posee una serie de hojas  $\beta$ -plegadas en la región hidrofóbica (13).

El flujo de electrones en el complejo III puede ser bloqueado, por los inhibidores antimicina A, ilicicolina H y funiculosina, que actúan en el sitio de reducción de la quinona (sitio  $Q_i$ ) (44). La antimicina inhibe la transferencia electrónica al unirse al sitio  $Q_i$  y bloquear la transferencia de electrones desde el hemo de alto potencial  $b_H$  a la ubiquinona (14). Los inhibidores del sitio de oxidación del ubiquinol (sitio  $Q_o$ ) son el mixotiazol, el cual inhibe parcialmente la oxidación del ubiquinol en un electrón, y la estigmatelina, la cual la inhibe completamente.

### **Coenzima Q**

Dentro del complejo III se ha propuesto un ciclo de transporte de electrones, denominado ciclo Q, donde coexisten distintas formas de la ubiquinona. La ubiquinona (2,3-dimetoxi-5-metil-6-multiprenil-1,4-benzoquinona) también conocida como coenzima Q es una benzoquinona liposoluble con una cadena lateral isoprenoide insaturada, es difundible y puede moverse desde las moléculas donadoras a lasceptoras del transporte de electrones, por lo que es un componente móvil (10, 46).

El ubiquinol es el producto de la reducción en dos electrones de la ubiquinona. La principal función biológica de la ubiquinona es el transporte de electrones entre sistemas transmembranales como los de la cadena respiratoria mitocondrial, donde funciona como acarreador de electrones desde los complejos I y II hacia el III. En su estado reducido la ubiquinona funciona como un potente antioxidante, protegiendo a fosfolípidos, proteínas de membrana y ADN del estrés oxidativo (13).

### **\*\*\* El Ciclo Q**

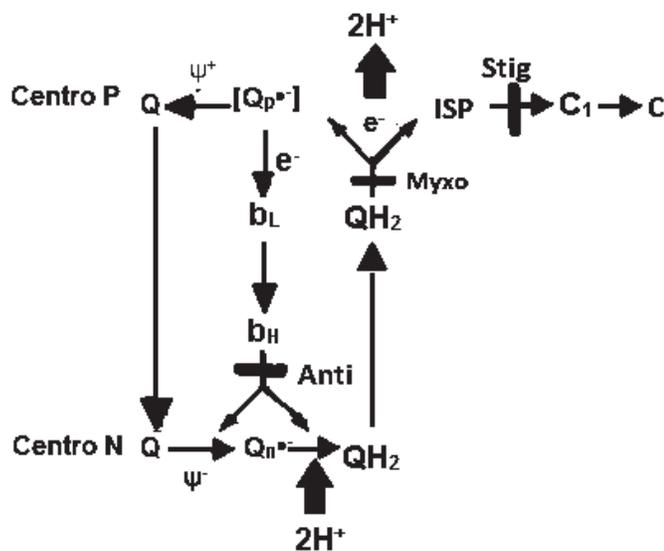
El ciclo Q es el mecanismo por el cual el complejo III transfiere electrones desde el ubiquinol hacia el citocromo *c* y acopla este proceso a la translocación de protones a través de la membrana interna mitocondrial. Los detalles del proceso de transporte electrónico son complejos; a grandes rasgos, el ubiquinol cede dos electrones, uno al centro de Rieske, que lo cede a su vez a un citocromo *c* para actuar como transportador hacia el complejo IV, mientras que el otro es reciclado a través del ciclo Q vía los citocromos  $b_{566}$  y  $b_{560}$  y de semiquinonas. Este ciclo permite el bombeo de protones al citosol (10, 13).

Para describir la transferencia de electrones en el ciclo Q es necesario distinguir dos sitios de oxidación y reducción de ubiquinona que se encuentran orientados de manera opuesta respecto a la membrana interna. El primero de ellos, llamado sitio quinol oxidasa ( $Q_O$ ) o sitio Qp debido a su proximidad al lado electropositivo de la membrana, está formado por la interacción de la proteína de Rieske y la vecindad del hemo  $b_L$  del citocromo *b*. Los inhibidores de este sitio incluyen a la estigmatelina, hidroxiquinonas y metoxiacrilatos como el mixotiazol y el metoxiacrilato estilbeno. El

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE  
EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

segundo sitio es conocido como sitio quinol reductasa (Q<sub>i</sub>) o sitio Q<sub>n</sub>, por su cercanía con el lado electronegativo de la membrana. Estudios con el inhibidor clásico del sitio Q<sub>i</sub> antimicina A, han revelado que el sitio Q<sub>i</sub> se encuentra próximo al hemo *b<sub>H</sub>* del citocromo *b* y está rodeado por las hélices A, D y E de dicha proteína (13,19).

Las reacciones del ciclo Q ocurren en la siguiente secuencia: en la primera reacción del ciclo Q, el ubiquinol es oxidado en el sitio Q<sub>O</sub> donde se transfieren dos electrones, uno hacia el grupo Fe-S de la proteína de Rieske y el otro al hemo *b<sub>L</sub>* (12). Posteriormente, el dominio extrínseco de la proteína de Rieske gira hacia las inmediaciones del citocromo *c*<sub>1</sub> para permitir la transferencia del electrón del grupo Fe-S reducido al hemo *c*<sub>1</sub> oxidado. Al mismo tiempo, dos protones son liberados del sitio Q<sub>O</sub> hacia el lado negativo de la membrana. El otro electrón proveniente de la oxidación de la ubiquinona, es transferido del hemo *b<sub>L</sub>* al hemo *b<sub>H</sub>*, en tanto que este último, reduce una molécula de ubiquinona a ubisemiquinona en el centro Q<sub>i</sub>. En la segunda fase de reacciones, otra molécula de ubiquinona es oxidada en el centro Q<sub>O</sub>, se liberan dos protones y se reduce una molécula de ubiquinol (19).



**Esquema 1.5. El ciclo Q.** Explica la transferencia de electrones a través del complejo citocromo *bc*<sub>1</sub>. QH<sub>2</sub> es el ubiquinol reducido, Q<sup>•-</sup><sub>P</sub> es la semiquinona formada en el centro Q<sub>O</sub> y Q<sup>•-</sup><sub>n</sub> es la semiquinona formada en el centro Q<sub>i</sub>. ISP es la proteína de Rieske. También se indican los sitios de unión de los inhibidores mixotiazol (Myxo), estigmatelina (Stig) y Antimicina (Anti). Tomado de (19).

El resultado neto del ciclo Q es la oxidación de dos moléculas de ubiquinol, el bombeo de 4 protones hacia el espacio intermembranal, la reducción de una molécula de ubiquinol y el consumo de dos protones del lado de la matriz (13, 30).

#### **1.3.4. Complejo IV. Citocromo c oxidasa**

En este complejo, se produce la reducción tetravalente del oxígeno molecular a agua. Esta enzima terminal de la CTE cataliza la transferencia de cuatro electrones provenientes de 4 moléculas de citocromo c reducido y se transfieren a una molécula de oxígeno molecular ( $O_2$ ), produciendo dos moléculas de agua ( $H_2O$ ) y consumiendo cuatro protones. La energía libre disponible de esta reacción está acoplada a la translocación de 4 protones adicionales al espacio intermembrana (10,13).

La citocromo oxidasa une al oxígeno en un centro bimetálico especial, que se localiza entre un átomo de hierro ligado a un grupo hemo y a un átomo de cobre; el oxígeno se mantiene unido hasta que se captan un total de 4 electrones; solo entonces los 2 átomos de la molécula de oxígeno son liberados como 2 moléculas de agua (7).

La citocromo c oxidasa, está ampliamente distribuida en la naturaleza; se cree que es la responsable del consumo de más del 90% del oxígeno en los animales aerobios. Presenta gran afinidad por el oxígeno, por lo que se piensa que está adaptada a condiciones de escasez del mismo. Las unidades catalíticas del complejo están codificadas por el ADN mitocondrial, mientras que las estructurales lo están por el nuclear (10).

- **ESTRUCTURA**

El complejo IV es un homodímero, en el cual, la estructura por difracción de rayos X de mitocondrias de corazón de bovino, revela que 10 de sus subunidades son proteínas transmembrana que contienen un total de 28 hélices  $\alpha$  extendidas en la membrana. El núcleo de la enzima está compuesto de sus tres subunidades mayores y más hidrófobas; las subunidades I, II y III (7, 53).

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE  
EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

---

Este complejo contiene 4 cofactores redox activos: dos átomos de  $\text{Cu}^{2+}$  que forman el sitio denominado  $\text{Cu}_A$ , un hemo tipo *a* y un centro binuclear hemo  $a_3$  y un átomo de cobre conocido como  $\text{Cu}_B$ . El centro  $\text{Cu}_A$  que se une a la subunidad II, se ubica a 8 Å arriba de la superficie de la membrana. Sus dos iones cobre se unen por un puente con los átomos de azufre de dos residuos de Cys. Los otros dos grupos redox  $\text{Cu}_B$  y los citocromos *a* y  $a_3$  se unen a la subunidad I y se ubican -13Å por debajo de la superficie de la membrana. En estudios espectroscópicos se observó que la transferencia electrónica del complejo IV es lineal dado que procede desde el citocromo *c* hasta el centro  $\text{Cu}_A$ , luego hasta el hemo *a* y por último hasta el hemo  $a_3$  y el  $\text{Cu}_B$ ; estos grupos redox forman realmente un complejo binuclear simple (16, 53).

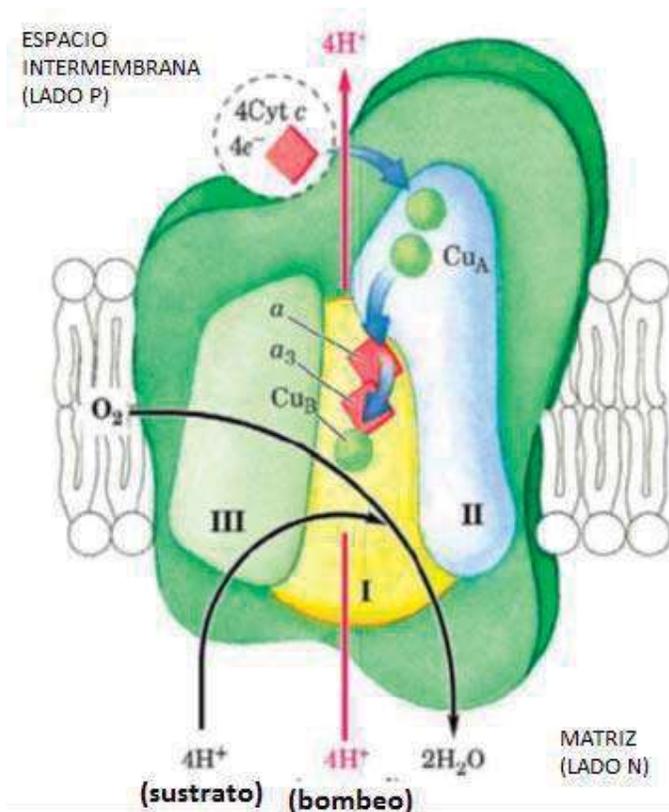
La enzima presenta tres centros metálicos redox inactivos ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$ ). Durante el ciclo catalítico, el  $\text{Cu}_A$  recibe los electrones provenientes del citocromo *c* desde afuera de la membrana, y a través del hemo *a*, son dirigidos hacia el sitio activo binuclear de unión al  $\text{O}_2$  hemo  $a_3$ - $\text{Cu}_B$ . El papel de los sitios metálicos inactivos en la catálisis se desconoce (13).

La citocromo *c* oxidasa para el caso de *S. cerevisiae* está formada por 7 subunidades polipeptídicas, mientras que en los tejidos animales mamíferos está conformada por 13 subunidades que se encuentran alrededor de las tres subunidades principales formando una Y invertida. Las subunidades I, II y III están codificadas por el genoma mitocondrial, en tanto que las subunidades restantes están codificadas en el ADN nuclear (13, 53).

La reducción del oxígeno a  $2\text{H}_2\text{O}$  por la citocromo *c* oxidasa tiene lugar en el complejo binuclear  $a_3$ - $\text{Cu}_B$  y requiere el ingreso casi simultaneo de cuatro electrones (53).

El complejo IV es inhibido por cianuro, azida ( $\text{N}_3^-$ ) y monóxido de carbono. El cianuro y la azida se unen fuertemente a la forma oxidada del hemo  $a_3$  ( $\text{Fe}^{+3}$ ) e impiden la transferencia de electrones desde el hemo *a* al centro binuclear. Por el contrario el monóxido de carbono se une a la forma reducida del hemo  $a_3$  ( $\text{Fe}^{+2}$ ) competitivamente con el oxígeno con lo que impide la transferencia de electrones al  $\text{O}_2$  (19).

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****



**Esquema 1.6. Flujo de electrones a través del complejo IV.** La transferencia electrónica comienza cuando dos moléculas de citocromo c reducidas donan un electrón cada una al centro binuclear Cu<sub>A</sub>. A continuación los electrones pasan a través del hemo a al centro Fe-Cu (citocromo a<sub>3</sub> y Cu<sub>B</sub>). El oxígeno se une ahora al hemo a<sub>3</sub> y se reduce a su forma peroxi gracias a los electrones del centro Fe-Cu. La aportación de dos electrones adicionales del citocromo c convierte al O<sub>2</sub> en dos moléculas de agua, consumiendo cuatro protones “sustrato” de la matriz. Simultáneamente, se bombean cuatro protones más desde la matriz por un mecanismo todavía desconocido. Tomado y modificado de (41).

### **1.3.5. Citocromo c**

El citocromo c es un transportador electrónico hidrosoluble que está presente en todos los organismos que contienen una cadena respiratoria mitocondrial, incluyendo plantas, animales y microorganismos (7).

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE  
EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

---

El citocromo *c* es una proteína monomérica esencial para el transporte de electrones; su papel en la CTE es transferir los electrones entre los complejos III y IV (7, 52). El citocromo *c* puede abandonar el espacio intermembranal e interactuar con componentes citosólicos, de esta manera estimulando el curso final de la fase de degradación apoptótica (13).

La proteína es esférica, de aproximadamente 104 a 113 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 13000 Da y como centro activo tiene un grupo prostético hemo *c* unido covalentemente. El carácter hidrofóbico del entorno del grupo hemo hace que el potencial redox del citocromo *c* sea más positivo (7).

El citocromo *c* contiene un grupo hemo constituido por un anillo porfirínico que contiene un átomo de fierro y está coordinado al nitrógeno de una histidina y a un átomo de azufre de una metionina. A diferencia del hemo de la hemoglobina, el átomo de fierro del citocromo *c* es reversiblemente transformado mediante oxido-reducciones en su forma férrica ( $Fe^{3+}$ ) y ferrosa ( $Fe^{2+}$ ). Es capaz de moverse a lo largo de la membrana para hacer colisiones efectivas entre estos dos complejos, gracias a que se une débilmente a la cara externa de la membrana interna mitocondrial por fuerzas electrostáticas (7, 13).

*S. cerevisiae* en condiciones aerobias contiene dos formas de citocromo *c*: iso-1-citocromo *c* e iso-2-citocromo *c*, los cuales se encuentran en una proporción del 95 y 5% respectivamente (13).

#### **1.4. Especies reactivas de oxígeno (ERO) y estrés oxidativo**

El  $O_2$  es uno de los gases más importantes de la Tierra. Constituye el 21% de la atmósfera, 89% del peso del agua de mar y al menos 47% de la corteza terrestre (20).

Los organismos aerobios deben mantener un medio redox adecuado para que se produzcan las reacciones de oxidación-reducción durante el metabolismo. Sin embargo, la reducción incompleta del  $O_2$  durante la respiración permite la formación de ERO (11).

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE  
EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

---

Las ERO son moléculas muy reactivas entre las que se encuentran los iones de oxígeno, los radicales libres y los peróxidos. Su gran reactividad se debe a que poseen electrones desapareados que les hace reaccionar con otras moléculas orgánicas en procesos de oxido-reducción (31).

El  $O_2$  posee dos electrones no apareados, cada uno localizado en un orbital p; los electrones no apareados poseen giros paralelos, de tal manera que para que el  $O_2$  oxide otro átomo o molécula, éste tendría que aceptar un par de electrones con giro (spin) contrario o aceptar un solo electrón a la vez. Si un solo electrón se adiciona al  $O_2$ , éste se localizará en uno de los orbitales p y el producto será el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (20).

El  $O_2^{\cdot-}$  tiene una vida media corta y es poco reactivo. Su inestabilidad se debe a que la reacción de dismutación del  $O_2^{\cdot-}$  a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es muy favorable. Esta dismutación puede ser espontánea o catalizada por el enzima superóxido dismutasa. Aunque la mayoría del peróxido de hidrógeno producido en células eucariontes proviene de la reacción de dismutación, éste también puede formarse a partir de la reducción directa del oxígeno con dos electrones (7).

A través de la reducción directa del  $O_2$ , con la adición de un electrón más al superóxido  $O_2^{\cdot-}$  se produce el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Al contrario del  $O_2^{\cdot-}$ , el  $H_2O_2$  no es un radical libre, es una molécula mucho más estable y es un oxidante débil (20). En contraste con la impermeabilidad de las membranas biológicas al  $O_2^{\cdot-}$ , el  $H_2O_2$  puede difundir a través de ellas. La reacción del  $H_2O_2$  con algunos metales de transición como el hierro o el cobre reducidos ( $Fe^{2+}$  o  $Cu^+$ ) a través de la reacción de Fenton da lugar a la formación del radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ) el radical libre con la mayor reactividad conocida (13).

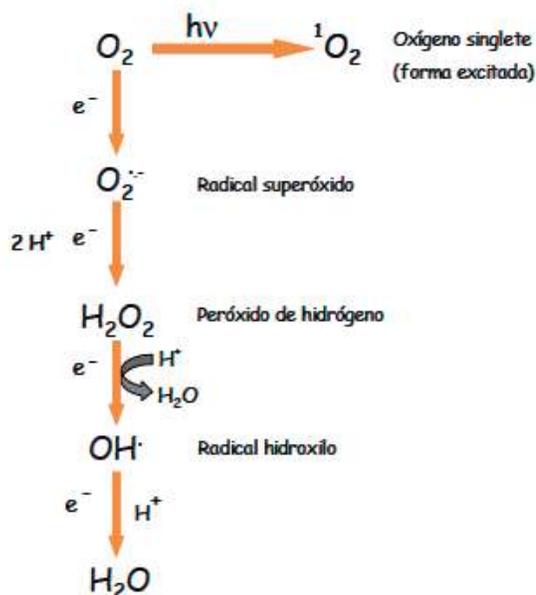


El radical hidroxilo es considerado uno de los radicales más dañinos para la célula, es una molécula extremadamente reactiva y tóxica. Puede reaccionar con

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

---

ácidos grasos poliinsaturados produciendo los radicales alcoxil (RO-) y peroxil (ROO-) (7).



**Esquema 1.8. Reducción secuencial de la molécula de oxígeno para producir ERO. Tomado de (49).**

La producción de las ERO puede aumentar en casi cualquier situación patológica como la diabetes mellitus, arterioesclerosis, el cáncer, las cataratas, insuficiencia renal aguda, crónica y diálisis, artritis, Parkinson, enfermedad de Alzheimer, hipertensión arterial, enfermedades autoinmunes, cirrosis, insuficiencia hepática y hepatopatía alcohólica por mencionar algunas. En un individuo sano hay una producción celular baja pero continua de ERO de alrededor del 0.5% (2).

Las ERO son altamente electrófilas y atacan continuamente sitios de alta densidad o inestabilidad electrónica causando daños a macromoléculas como el ADN, ARN, proteínas, y los dobles enlaces en los ácidos grasos poliinsaturados, alterando su estructura y, por tanto, sus funciones normales dentro de la célula desorganizando procesos y tejidos (10).

Las ERO se generan endógenamente en las células, no sólo como consecuencia de la reducción incompleta del oxígeno a agua durante la respiración, sino también en

otros procesos metabólicos como la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, por exposición a fuentes de radiación ionizante, luz, drogas y químicos de reciclaje redox o a metales pesados e incluso por sistemas enzimáticos que las sintetizan como producto de su catálisis como por ejemplo. la familia de enzimas NADPH oxidasas (11). A pesar de las condiciones prooxidantes de la vida aeróbica los organismos son capaces de mantener un ambiente redox intracelular reducido. Sin embargo, si la concentración de las ERO sobrepasa la capacidad celular para eliminarlas, se produce un estado de estrés oxidativo. Para contender con el estrés oxidativo y proteger los componentes celulares al mantener un adecuado ambiente redox dada la inherente exposición a las ERO, los organismos constantemente detectan y se adaptan a cualquier perturbación mediante distintos sistemas defensivos antioxidantes conformados por sistemas enzimáticos y no enzimáticos (20).

Los sistemas enzimáticos más importantes son las isoformas de la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa, entre otros (41).

Dentro de los antioxidantes exógenos o no enzimáticos se encuentran las vitaminas E y C, lobetacarotenos, los flavonoides y los licopenos, los cuales se incorporan al organismo mediante la dieta (56).

### **1.5. La mitocondria como la principal fuente de ERO**

La principal fuente de ERO en células no fagocíticas es la mitocondria. Datos cuantitativos, obtenidos de mitocondrias aisladas, sugieren que alrededor del 2-6% del consumo de oxígeno se destina a la producción de  $O_2^{\bullet-}$ , y el 80% de éste se genera en la mitocondria a nivel de la CTE (2). El  $O_2$  actúa como aceptor final de los electrones el complejo IV. Sin embargo, en condiciones fisiológicas, la reducción incompleta del oxígeno puede darse a nivel de los complejos I y III, que pueden catalizar transferencias de uno o dos electrones, con la consiguiente generación de ERO (17).

La inhibición química de los complejos I y III causa un incremento muy marcado en la formación de ERO por lo cual, cualquier alteración en la función de la CTE puede ser dañina para la célula (14).



### **1.6. La peroxidación de lípidos (lipoperoxidación)**

Los lípidos poliinsaturados son las macromoléculas más susceptibles al daño oxidativo por ERO. El radical  $O_2^{\cdot-}$  y el  $H_2O_2$ , aunque carecen de la reactividad necesaria para atacar a los lípidos, en presencia de metales de transición generan un daño importante en las membranas a través de la formación de radicales  $OH^{\cdot}$ . La peroxidación lipídica altera las membranas biológicas provocando un aumento del orden y viscosidad, así como descensos en su resistencia eléctrica. También facilita el intercambio de fosfolípidos entre las monocapas e incrementa los entrecruzamientos con proteínas, lo que disminuye la movilidad lateral (15).

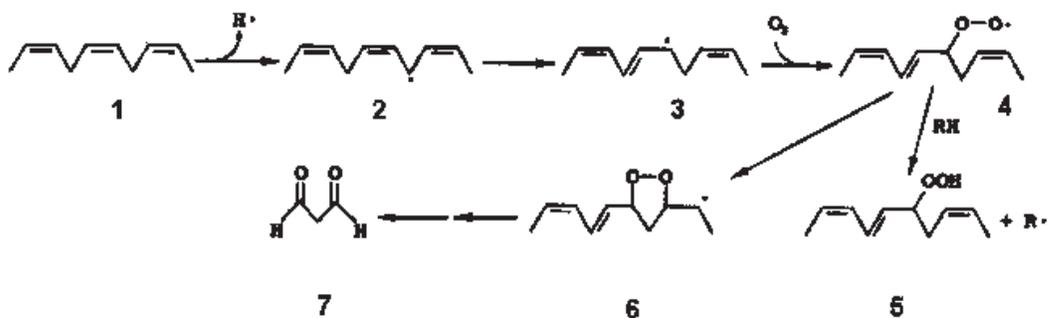
La acción de las ERO sobre los lípidos tiene lugar fundamentalmente sobre los ácidos grasos poliinsaturados, lo que provoca su peroxidación generando pérdida de la flexibilidad y de las funciones secretoras así como la ruptura de los gradientes iónicos transmembrana (16).

La lipoperoxidación es una consecuencia natural de los procesos metabólicos en la célula, que ocurre tanto en plantas como en animales. Involucra reacciones de iniciación, propagación, y terminación, la formación y propagación de radicales de lípidos, el consumo de oxígeno, un rearrreglo de los dobles enlaces de los lípidos insaturados y la eventual destrucción de los lípidos de la membrana, produciendo una gran variedad de productos de degradación, incluyendo alcoholes, cetonas, aldehídos y otros. El mecanismo de la lipoperoxidación se ilustra en la siguiente figura. Inicia con la remoción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso insaturado (1), lo que da por resultado la formación del radical lipídico (2). El rearrreglo de las dobles ligaduras produce dienos conjugados (3). El ataque por oxígeno molecular produce un radical peroxilo (4), el cual puede remover un átomo de hidrógeno de un lípido adyacente para formar un hidroperóxido lipídico (5), o un endoperóxido lipídico (6) que a su vez conduce generalmente a la formación de malondialdehído (MDA) como producto de degradación en ácidos grasos insaturados que contengan al menos tres dobles enlaces metilénicos interrumpidos (7). La medición o cuantificación del malondialdehído

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

---

(MDA), se ha usado como un indicador de la lipoperoxidación y ésta a su vez se ha usado como un parámetro indicador de estrés oxidativo en células y tejidos (43).



**Esquema 1.10. Proceso de la peroxidación lipídica. Tomado de (43).**

Los productos finales del proceso de peroxidación lipídica entre los que se incluyen los hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos, pueden difundir lejos del lugar donde se originaron y causar edema celular e influir en la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis. Estos productos pueden alterar la actividad de la fosfolipasa e inducir la liberación del ácido araquidónico y la subsecuente formación de prostaglandinas y distintos endoperóxidos (37).

La incorporación de C18:3 aumenta la sensibilidad de las mitocondrias de lipoperoxidación, que se explica en vista de que la sensibilidad de los ácidos grasos a la peroxidación depende del número de dobles enlaces contenidos en la cola hidrófoba; a mayor número de dobles enlaces mayor susceptibilidad a la peroxidación (16).

Durante el estrés oxidativo, uno de los principales blancos de daño oxidativo por ERO son las colas hidrofóbicas insaturadas que componen a los lípidos de las membranas mitocondriales. El estrés oxidativo inducido por la generación de radical hidroxilo favorece la peroxidación de lípidos de membrana produciéndose una disminución en el contenido de ubiquinona, lo que limita tanto el flujo de electrones entre los complejos I, II y III así como sus actividades catalíticas. Los complejos I y III

sufren una disminución en su actividad asociada con una disminución en el contenido de cardiolipina, por lo que los daños en estos complejos son atribuidos a la oxidación de este fosfolípido (38).

Por lo tanto, la peroxidación de las membranas mitocondriales afecta a los componentes proteicos de la CTE que se encuentran embebidos en ellas, lo cual podría inhibir la síntesis de ATP, el transporte de metabolitos e iones o el bombeo de protones provocando el colapso de la célula. De acuerdo a lo anterior, la vulnerabilidad de la CTE a la inhibición por el ataque de ERO podría ser atenuada al disminuir el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas lipídicas (16).

La composición de los ácidos grasos de las membranas celulares juega un papel muy importante en la peroxidación lipídica y puede intervenir en la determinación de la longevidad máxima. Así, un menor grado de insaturación de los ácidos grasos en las membranas, particularmente en la membrana mitocondrial interna, podría ser ventajoso y resultar en una disminución en su sensibilidad a la peroxidación lipídica (15).

Diversas investigaciones han identificado a la peroxidación de lípidos como el principal factor en el daño de la CTE por ERO. El incremento en la formación mitocondrial de ERO puede resultar de los efectos de las ERO sobre los ácidos grasos de membrana a través de alteraciones en la CTE (16).

### **1.7. Teoría del envejecimiento por radicales libres**

El envejecimiento es la acumulación progresiva de cambios con el tiempo que reducen la capacidad del individuo para enfrentarse al estrés disminuyendo así sus posibilidades de supervivencia (25).

En 1956 Harman propuso la teoría del envejecimiento por radicales libres en, en la cual sugiere que los radicales libres producidos en la mitocondria durante la respiración aerobia causan daño oxidativo que se acumula, y resulta en una pérdida gradual de los mecanismos homeostáticos, en una interferencia de patrones de expresión génica y pérdida de la capacidad funcional de la célula y tejidos, lo que conduce al envejecimiento y a la muerte (2, 11).

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

---

Existe una interrelación entre la generación de oxidantes, la protección antioxidante y la reparación del daño oxidativo. La expectativa de vida puede ser aumentada al disminuir el grado de los fenómenos oxidantes. Esto se ha propuesto por algunos investigadores que se lograría con la mejoría de los hábitos higiénico-dietéticos y con el aumento de las defensas antioxidantes (11).

Las ERO generadas pueden producir daño tanto a la membrana interna de la mitocondria como a los componentes de la CTE o al ADN mitocondrial, lo que incrementa más la producción de ERO y consecuentemente más daño a la mitocondria e incremento del estrés oxidativo por aumentar la producción de oxidantes (10). Esto produce cambios con el tiempo, se compromete la formación de ATP y la síntesis de proteínas. Existen múltiples evidencias que corroboran la importancia de la disfunción mitocondrial en la patogénesis de la destrucción celular que causa envejecimiento, y es el estrés oxidativo el principal inductor de esas alteraciones (11).

Miquel y colaboradores propusieron en 1980 la teoría mitocondrial, que liga al envejecimiento celular a un daño producido por el estrés oxidativo a nivel mitocondrial. Esta teoría sugiere que la senescencia es el resultado del daño ocasionado por las ERO específicamente al genoma mitocondrial en células post-mitóticas (49).

Sohal y colaboradores en 1990, demostraron que las mitocondrias de animales en edad avanzada producen mayor cantidad de ERO que los animales jóvenes. Es decir, existe una relación inversa entre la producción mitocondrial de peróxido de hidrógeno y la longevidad en los mamíferos. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la velocidad en la generación de oxidantes por las mitocondrias, es un factor crítico en el envejecimiento. (2).

Al parecer, además de que la velocidad en la producción de oxidantes por la mitocondria es un factor determinante en el proceso del envejecimiento, el daño oxidativo sobre la mitocondria está involucrada también en la pérdida de funciones celulares (respiración, metabolismo, etc.). También, se ha observado que la actividad respiratoria de las mitocondrias de hígado, músculo y cerebro de rata disminuye

conforme avanza la edad, así como también el potencial de membrana mitocondrial (13, 27).

Existen numerosas evidencias que sustentan las teorías del envejecimiento, aunque la mayoría no son mutuamente excluyentes; es más, todas o algunas pueden operar de forma simultánea. La opinión dominante entre los gerontólogos es que el envejecimiento es un fenómeno multicausal; lo que no excluye la existencia de una causa fundamental que tenga una expresión pleiotrópica, es decir, que pueda producir numerosos cambios secundarios y terciarios (11).

Estudios recientes han desafiado esta teoría, demostrando que, en algunos casos, la longevidad se ve reforzada por la inactivación de las defensas de estrés oxidativo o se correlaciona con un aumento, en lugar de disminuir las especies reactivas del oxígeno y el daño oxidativo (33).

Con el desarrollo de la vejez, las acciones de las especies reactivas de oxígeno y de otras ERO son mucho más perjudiciales, porque con el envejecimiento los sistemas antioxidantes se ven disminuidos y por tanto existe una mayor probabilidad de que las especies radicales ejerzan su acción sobre sus moléculas blancos (57).

Existen numerosas enfermedades asociadas con la edad que están involucradas al estrés oxidativo por ERO, como lo son el cáncer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Lou Gering, cataratas, diabetes mellitus, la hipertensión, enfermedades cardiovasculares, la esclerosis lateral amiotrófica entre muchas otras.(2, 57).

#### **1.8. El envejecimiento y el grado de insaturación de los ácidos grasos que componen las membranas.**

Además de la producción mitocondrial de ERO, existe un segundo parámetro relacionado con el estrés oxidativo que también se correlaciona con la longevidad máxima: el grado de insaturación de los ácidos grasos presentes en las membranas celulares. Estudios anteriores demuestran que el número total de dobles enlaces de los

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE  
EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

---

ácidos grasos correlacionaba negativamente con el tamaño corporal en los mamíferos (4).

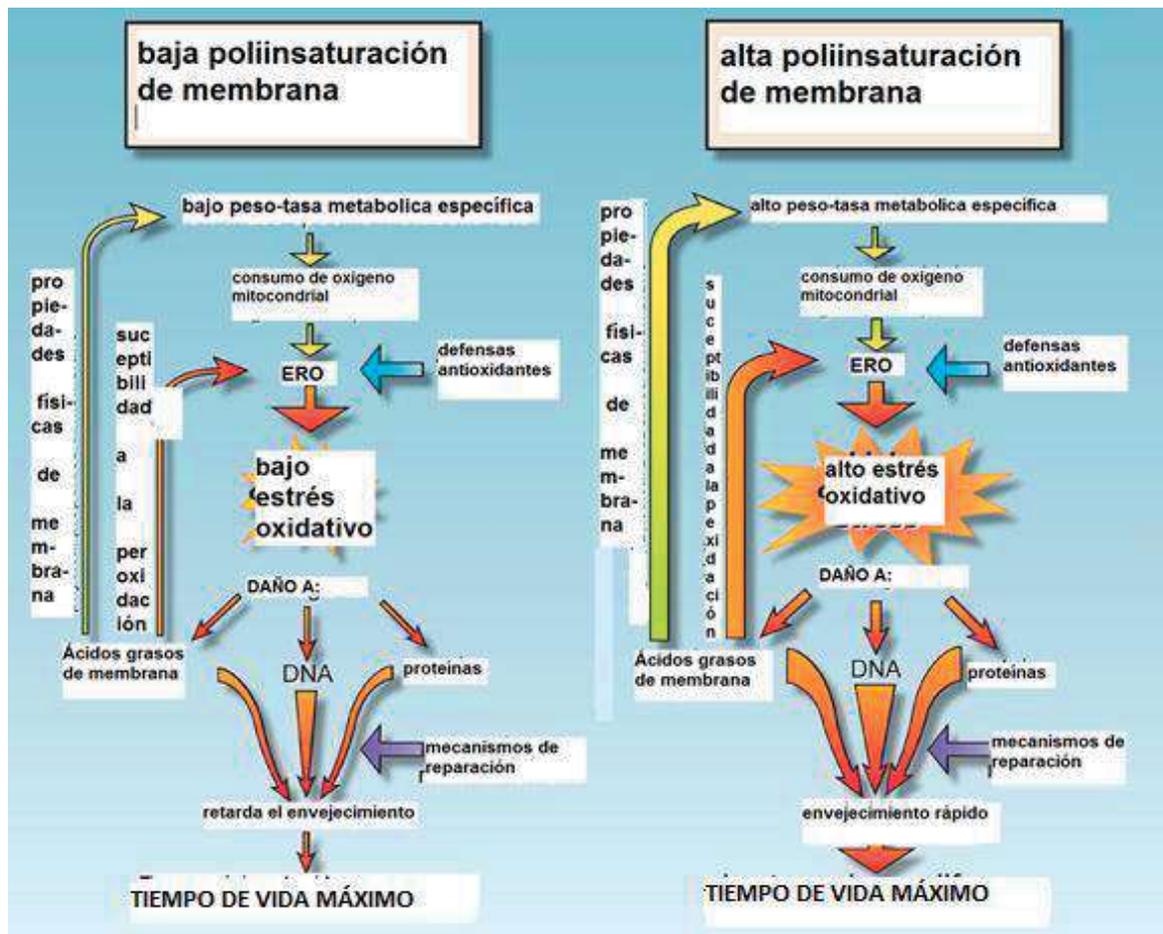
Las aves tienen en sus membranas un índice de insaturación inferior en sus lípidos que los mamíferos; esta insaturación inferior en las aves está relacionada con una longevidad mayor, una menor tasa metabólica y menor producción de ERO mitocondrial en las aves en comparación con los mamíferos de tamaño similar (26).

Los ácidos grasos insaturados son las macromoléculas más sensibles al daño inducido por los radicales libres que existen en las células, debido a la presencia de electrones muy inestables junto a sus dobles enlaces. Además, su sensibilidad a la peroxidación lipídica aumenta exponencialmente conforme sube el número de dobles enlaces por molécula (27).

Por lo tanto, el bajo índice de dobles enlaces en músculo cardíaco, en el músculo esquelético, en el riñón y en el hígado de los animales longevos protegería a sus tejidos frente a la peroxidación lipídica de forma constitutiva tanto si tienen tasas metabólicas bajas (como los mamíferos de gran tamaño corporal) o altas (como las aves). Este bajo grado de insaturación de los animales longevos no se debe a la dieta (un factor exógeno), se trata de un parámetro regulado homeostáticamente a un nivel distinto encada especie según cual sea su longevidad máxima (4).

Un menor grado de insaturación de los ácidos grasos que componen las membranas mitocondriales aumenta el tiempo de vida máximo de las especies animales debido que son más resistentes al estrés oxidativo por ERO preservando las funciones mitocondriales en el envejecimiento. De igual manera, los animales que tienen un índice peroxidación de lípidos menor tienen una mayor longevidad en comparación a los animales con un índice de peroxidación mayor (26).

**EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae***



**Esquema 1.11.** Muestra la relación que tiene el grado de insaturación de los lípidos que componen de las membranas celulares con la susceptibilidad a la lipoperoxidación y la esperanza de vida de la célula. Tomado y modificado de (27).

**1.9. *S. cerevisiae* como modelo de estudio en el envejecimiento.**

Los primeros estudios de envejecimiento en levadura datan de hace más de 50 años, cuando se demostró su capacidad finita de división (28).

*S. cerevisiae* se ha convertido en un modelo de estudio en el que se han descrito dos tipos de envejecimiento, el cronológico y el replicativo. El envejecimiento cronológico se define como la capacidad de un cultivo de mantener su viabilidad en el transcurso de la fase estacionaria, mientras que el envejecimiento replicativo se define como el número de células hijas que una célula madre puede generar durante toda su vida (42).

Los dos modelos de envejecimiento en levadura han contribuido de manera importante al descubrimiento de diversos genes e intervenciones no genéticas que alteran la longevidad, así como de una variedad de vías de señalización que también participan en el envejecimiento de seres vivos más complejos (23).

Las levaduras también han facilitado el estudio de varios procesos celulares relacionados con el envejecimiento, por ejemplo, el estrés oxidativo, común en los organismos y que específicamente en el humano provoca un desequilibrio relacionado con varias enfermedades, como la arteriosclerosis, el Parkinson y el Alzheimer. Además, aunque resulte sorprendente, una gran variedad de estudios han demostrado que desde las levaduras hasta el humano, el envejecimiento comparte vías moleculares similares (39).

Las mitocondrias de la levadura *S. cerevisiae* representan un modelo ideal para la investigación del envejecimiento porque las membranas de levadura son resistentes a la lipoperoxidación permitiendo la investigación de los efectos del estrés oxidativo ocasionado por las ERO en la CTE, la sensibilidad de la levadura a la lipoperoxidación se puede aumentar mediante la manipulación del contenido de ácido graso membranas (16).

### **1.10. Ácido $\alpha$ -linolénico**

El Ácido  $\alpha$ -linolénico (C-18:3) es un ácido graso esencial poliinsaturado de cadena larga (6).

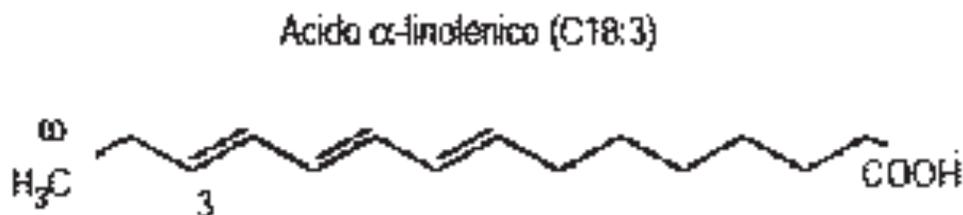
Los ácidos grasos poliinsaturados esenciales son de vital importancia debido a:

- 1) Son necesarios para la estructuración y la correcta funcionalidad de las membranas celulares.
- 2) Son indispensables para el crecimiento de los tejidos y los órganos internos, destacando el sistema nervioso, la piel, la retina y los tejidos vinculados con la reproducción.

**EFFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE  
EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae***

---

3) Son precursores de otros ácidos grasos tales como el ácido araquidónico (precursor de las prostaglandinas) (6).



**Esquema 1.11. Estructura del ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3). Tomado de (45).**

### **1.9. Composición de ácidos grasos en las membranas biológicas de *S. cerevisiae*.**

La membrana de *S. cerevisiae* está constituida principalmente de ácidos grasos monoinsaturados como el ácido oleico (C18:1, 40.9%) y ácido palmitoleico (C16:1, 23.5%) y en menor proporción de los ácidos grasos saturados ácido palmítico (C16:0, 21.7%) y ácido oleico (C18:1, 13.9%). Estudios anteriores han demostrado que las células crecidas en presencia de C18:3, convierten este ácido graso en el principal constituyente (92.9%) de las membranas en general, incluyendo la mitocondrial, mientras que la concentración de ácidos grasos saturados C16:0 y C18:0 disminuye a 2.9% y 2.2% respectivamente; y en el caso de los ácidos grasos monoinsaturados, solo se detecta una concentración de 0.72% de C16:1 y 1.15% de C18:1. Asimismo, se demostró que la incorporación de C18:3 aumento la sensibilidad de las levaduras al estrés oxidativo al disminuir su viabilidad en presencia de  $Fe^{2+}$ , un generador de ERO, lo cual fue asociado a una mayor sensibilidad de los complejos III y IV de la  $F_1F_0$  ATP sintasa al estrés oxidativo debido a un daño atribuido a la peroxidación de los lípidos de membrana, lo cual a su vez fue asociado con una mayor producción de ERO en el complejo III debido a un defecto en la transferencia de electrones hacia el citocromo *b* durante el ciclo Q (14, 16).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Diversos estudios han mostrado una correlación inversa entre la longevidad de diversas especies animales y el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana mitocondrial (34, 37), lo cual ha llevado a sugerir que la proporción de ácidos grasos poliinsaturados presentes en las membranas mitocondriales podría ser uno de los principales factores que determina la longevidad y que lo anterior podría estar relacionado con un aumento en la susceptibilidad de las membranas mitocondriales al daño oxidativo y una mayor formación de ERO. Sin embargo, estos estudios han sido correlativos y existe controversia al respecto, dado que se ha propuesto que el uso arbitrario de sustratos para medir la producción de ERO, la relación de ácidos grasos n-3/n-9 y las diferencias en peso corporal entre las especies estudiadas podrían tener un peso más importante en la longevidad que el grado de insaturación de las membranas mitocondriales. Asimismo, se ha propuesto que la producción de ERO mitocondrial detectada en modelos experimentales de envejecimiento procede del daño en las membranas durante el proceso de preparación de las células y no por la fuga de electrones debido al daño en la CTE (48). Un modelo que permitiría sortear las controversias anteriormente señaladas es la levadura *S. cerevisiae*, ya que su cultivo por periodos prolongados se ha considerado un modelo del proceso de envejecimiento de tejidos post-mitóticos de mamíferos. Asimismo, debido a que sus membranas consisten únicamente de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, los cuales son resistentes a la peroxidación, y a que su composición puede ser fácilmente enriquecida con ácidos grasos poliinsaturados, esto permite discriminar los procesos asociados con el envejecimiento que son dependientes de la presencia de ácidos grasos poliinsaturados susceptibles a la peroxidación de aquellos que son independientes del daño oxidativo en lípidos de membrana (37).

## **3. HIPÓTESIS**

El aumento en el grado de insaturación de las membranas de *S. cerevisiae* acelera su envejecimiento cronológico en asociación con una disminución de la funcionalidad de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar si la incorporación de un ácido graso poliinsaturado a las membranas de *S. cerevisiae* acelera su envejecimiento cronológico en asociación con una disminución en la actividad de los complejos de la CTE.

### **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Verificar si la incorporación del C18:3 acelera el envejecimiento cronológico de *S. cerevisiae*.

2. Evaluar si el C18:3 disminuye la actividad de los complejos de la CTE durante el envejecimiento cronológico.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1. Reactivos**

Los reactivos utilizados fueron de grado reactivo, adquiridos de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO. USA.), excepto por la zymoliasa 20T, que fue adquirida de ICN Biomedicals. Inc (Aurora, OH. USA).

### **5.2. Material Biológico**

Se utilizó la cepa diploide industrial “Yeast Foam” de tipo silvestre de *Saccharomyces cerevisiae*.

### **5.3. Siembra de Células de *S. cerevisiae* e inducción del envejecimiento cronológico**

Las células de la levadura fueron crecidas con una asada en medio YPD (Extracto de levadura 1%, Peptona 2% y Dextrosa 2%) en condiciones aeróbicas a 28-30°C en agitación orbital constante a 180 rpm; a las 24 horas fueron resembradas en 500 y 1000 ml a una densidad óptica (DO) de 0.03 a 600 nm en medio YLAC (0.12% de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% de extracto de levadura, 2% de DL-lactato, pH 5.0 con NaOH) y en medio YPD (Extracto de levadura 1%, Peptona 2% y Dextrosa 2%). Una vez alcanzada la fase estacionaria, las células fueron mantenidas en su medio de cultivo durante 6 (células “jóvenes”) y 28 (células “envejecidas”) días.

### **5.4. Manipulación del contenido de ácidos grasos de la levadura**

El contenido de ácidos grasos de *S. cerevisiae* fue modificado mediante la metodología descrita por Cortés-Rojo et al. (15, 16), mediante la adición de 1 mM de ácido  $\alpha$ -linolénico (ácido *cis,cis,cis*-9,12,15-octadecatrienoico,  $\alpha$ -C18:3<sup>9,12,15</sup>, pureza  $\geq 99\%$ , adquirido de Sigma Chemical) disuelto en Igepal CA-630 previo a la inoculación del medio YLac y YPD como se ha descrito anteriormente.

### **5.5. Evaluación del envejecimiento cronológico**

**5.5.1. Determinación de la viabilidad celular en placa.** La viabilidad de las células de *S. cerevisiae* se determinó mediante el conteo de colonias crecidas en placas de YPD sólido a diluciones seriadas de 10<sup>1</sup> hasta 10<sup>7</sup>. Primero se realizó una dilución con 1950  $\mu$ l de agua y 50  $\mu$ l de medio de cultivo inoculado (YPD y YLac control y con ácido linolénico), se cargó una alícuota de la dilución en una cámara de Neubauer y se cuantificó el total de levaduras en cuatro de las cinco cuadrículas de la cámara. Posteriormente se calculó la cantidad de medio inoculado que se colocaría en cada dilución con la razón:

$$\text{Número de células}/\mu\text{l de medio} = \text{número de células en dilución } 1:40 \times 40 \times 100$$

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE  
EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

---

Las diluciones seriadas se realizaron a partir de un volumen del cultivo equivalente a 8 millones de células. La cantidad de medio estéril a agregar a cada dilución se calculó restando el volumen del medio inoculado para completar 1000µl. Posteriormente se realizaron las diluciones seriadas desde  $10^1$  hasta  $10^7$ , colocando primero en cada tubo el volumen de medio estéril y a continuación el volumen de medio inoculado correspondiente en la primera dilución y tomando la correspondiente alícuota de la dilución anterior para realizar las diluciones posteriores. Después las diluciones se sembraron en medio nutriente sólido YPD (extracto de levadura 0.1%, peptona 0.2%, agua destilada al 9%, agar bacteriológico 0.2%, solución de dextrosa 20%, pH 6.5) y se colocaron en una incubadora durante 3 días a 28°C; todo este proceso se realizó en condiciones estériles. Por último, se cuantificó el número de colonias crecidas en cada caja.

#### **5.6. Aislamiento de mitocondrias de *S. cerevisiae*.**

Las mitocondrias se aislaron de acuerdo con el método reportado por Guérin (24). Las células se lavaron 3 veces con agua desionizada a 5000 rpm por 5 min a 25 °C utilizando el rotor JA-10 de una centrifuga Beckman-Coulter Avanti J-E. El peso seco de las células se calculó mediante la relación: peso seco=peso húmedo/4. Después se resuspendieron en medio SH (Tris 0.1 M, β-mercaptoetanol 0.5 M, pH 9.3 con NaOH) con agitación constante y moderada a 70rpm durante 15 minutos a 30°C para posteriormente lavarlas 3 veces por centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente con medio de lavado KCl-Tris (KCl 0.5M, tris 10 mM, pH 7 con HCl).

Las células se resuspendieron en medio de digestión (sorbitol 1.35 M, EGTA 1 mM, fosfato disódico 30 mM, fosfato monosódico 30 mM, ácido cítrico 10 mM, pH 5.8) a razón de 10 mL por cada gramo de peso seco de levaduras. Para el rompimiento de la pared celular se agregó 10 mg por cada gramo de peso seco de la enzima zymoliasa 20T (ICN Biomedicals Inc; Aurora, OH. USA) y se incubaron aproximadamente 60 minutos a temperatura ambiente. La formación de esferoplastos se evaluó midiendo la disminución de la DO a 600 nm. contra agua en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 18. La incubación con la zymoliasa se detuvo en el momento en que la densidad óptica de una dilución de las células con agua 1:100 fue igual a la D.O. de

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE  
EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

---

una dilución 1:1000 determinada al inicio de la incubación. Los esferoplastos (células sin pared celular) fueron lavados 3 veces con buffer de lavado de protoplastos (sorbitol 0.75 M, manitol 0.4 M, Tris-maléico >10 mM, albúmina sérica de bovino 0.2%, pH 6.8) mediante centrifugación por 10 minutos a 12000 rpm a 4°C utilizando el rotor JA-20 de la centrifuga Beckman Coulter Avanti J-E. Los esferoplastos se rompieron por un proceso mecánico utilizando el precipitado del último lavado para resuspenderlo en un vaso de Potter con un volumen de 30 mL de medio de homogenización (Manitol 0.6 M, tris-maleico 10mM, EGTA 2 mM, albúmina sérica de bovino 0.2%, pH 6.8) por cada 2.5 g de peso seco de levaduras, homogenizando manualmente 20 veces con un vástago de teflón apretado evitando la formación de burbujas.

Posteriormente, el homogenado se centrifugó a 2500 rpm por 10 min a 4°C; el sobrenadante obtenido se centrifugó a 12000 rpm 10 min. para después resuspender el precipitado en poco volumen de medio de recuperación de mitocondrias (Manitol 0.6 M, tris-maleico 10mM, EGTA 2 Mm, pH 6.8) utilizando un homogenizador de vidrio con vástago flojo. A continuación se centrifugó a 2500 rpm 10 minutos 4°C descartando la pastilla y centrifugando nuevamente a 12000 rpm. El precipitado obtenido fueron las mitocondrias aisladas, las cuales se resuspendieron y homogenizaron con un pincel en un poco de buffer de recuperación de mitocondrias. Por último se tomaron alícuotas de 200 µl y se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior utilización.

### **5.7. Determinación de la actividad de los complejos respiratorios**

Se determinó espectrofotométricamente la actividad enzimática de los complejos de la CTE de acuerdo con la metodología descrita por Cortés-Rojo (17). Las mitocondrias se permeabilizaron mediante su resuspensión en un volumen de 2 ml de buffer de rompimiento de mitocondrias (0.1 M KCl, 0.01M MgCl<sub>2</sub>, 0.01 M trizma base pH 7.5) al cual se le adicionó 20µl del detergente Triton X-100 al 1%; esta solución se agitó durante 3 ciclos de 5 segundos en un vortex. Posteriormente, esta solución se centrifugó a 12400 rpm por 15 min a 4° C y se resuspendió en amortiguador de fosfato de potasio 50 mM a pH 7.6. La concentración de proteína fue determinada por el método de Biuret modificado (22) utilizando como estándar albúmina bovina sérica.

### **I. Actividad del Complejo II (Succinato deshidrogenasa).**

La actividad enzimática de este complejo fue medida monitoreando la reducción secundaria del colorante 2,6, diclorofenilindofenol (2,6 DCPIP) (16), en una mezcla de reacción con amortiguador de fosfato de potasio 50 mM a pH 7.6, 80  $\mu$ M de 2,6 DCPIP y 0.3 mg/ml de proteína mitocondrial en un volumen final de 1 ml. Las mitocondrias fueron incubadas a temperatura ambiente 5 min. antes del ensayo con 1  $\mu$ g de antimicina A y 0.75 mM de KCN para inhibir las actividades complejo III y del complejo IV, respectivamente. La reacción fue iniciada por la adición de 10  $\mu$ l de succinato 10 mM y el cambio en la absorbencia fue medido en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18 a 600. La velocidad de reducción del 2,6 DCPIP fue calculada de la pendiente del trazo de absorbencia usando el coeficiente de extinción molar de  $21\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para el 2,6 DCPIP. La actividad enzimática fue calculada substrayendo la tasa de reducción inespecífica del DCPIP en ausencia de succinato a la tasa de reducción del DCPIP estimulada con succinato.

### **II. Actividad del Complejo III (succinato citocromo c oxidorreductasa).**

La actividad de este complejo fue determinada a temperatura ambiente evaluando la reducción del citocromo c sensible a antimicina A en una mezcla de reacción que contenía amortiguador de fosfato de potasio 50 mM a pH 7.6, 1.5 mg de citocromo c de corazón de bovino y 0.1 mg/ml de proteína mitocondrial en un volumen de 1 ml. Las mitocondrias se incubaron 5 min. antes del ensayo con 0.75 mM de KCN para inhibir la actividad del complejo IV. La reacción fue iniciada por la adición de 10 mM de succinato. Después de 90 segundos, la reacción fue detenida por la adición de 1  $\mu$ g de antimicina A. El cambio en la absorbencia fue medido en un espectrofotómetro de Perkin Elmer Lambda 18 a 550 nm. La velocidad de reducción de citocromo c se calculó a partir de las pendientes de los trazos de absorbencia usando el coeficiente de extinción molar de  $19.1\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  del citocromo c. La reducción de citocromo c sensible a antimicina se calculó restando la actividad en presencia de succinato y antimicina a la actividad estimulada únicamente con succinato.

### **III. Actividad del Complejo IV (citocromo c oxidasa).**

La actividad del complejo IV fue monitoreada espectrofotométricamente a temperatura ambiente mediante la oxidación del citocromo c reducido en una mezcla de reacción que contenía amortiguador de fosfato de potasio 50 mM a pH 7.6, 0.75 mg de citocromo c reducido con ditionita y 0.03 mg/ml de proteína mitocondrial en un volumen de 1 ml. Las mitocondrias se incubaron 5 min. antes del ensayo con 10  $\mu$ l antimicina A 1  $\mu$ g para inhibir la actividad del complejo III. La reacción fue iniciada por la adición del citocromo c reducido e inhibida por la adición de 0.75 mM de KCN. El cambio en la absorbencia fue medido en un espectrofotómetro Perkin- Elmer Lambda 18 a 550 nm. La oxidación del citocromo c sensible a cianuro fue calculada restando la actividad en presencia de cianuro y citocromo c a la actividad estimulada únicamente con citocromo c.

#### **5.8. Procesamiento estadístico**

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de al menos tres experimentos independientes. La significancia estadística de las diferencias entre las medias ( $p \leq 0.001$ ,  $p \leq 0.01$  y  $p \leq 0.05$ ) se determinaron mediante la prueba t de Student con el programa de computadora Sigma Plot Versión 10.0 (SPSS Inc).

## **6. RESULTADOS**

Para incrementar la susceptibilidad de *S. cerevisiae* hacia el estrés oxidativo, las células fueron enriquecidas con ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3) para estimular su incorporación en los lípidos de membrana y aumentar el grado de insaturación de la misma. En un estudio paralelo, se determinó que el crecimiento con C18:3 en medio YPD induce una incorporación de este ácido graso en las membranas mitocondriales de 31.85 y 30.87% a los 6 y 28 días de envejecimiento, respectivamente, mientras que en medio YLAC, la incorporación de C18:3 fue de 8.15 y 22.99% a los 6 y 28 días, respectivamente (1).

### **6.1. Efecto de la adición de C18:3 en el envejecimiento cronológico.**

Con el objetivo de conocer el efecto de la incorporación del C18:3 sobre el envejecimiento cronológico de la levadura, se evaluó la viabilidad celular en los medios de cultivo líquidos YPD y YLac a través del conteo de colonias crecidas en placas de YPD sólido durante 6 y 28 días de envejecimiento.

En el panel A de la figura 1 se observa la viabilidad de las células a 6 días en ausencia de C18:3 (barras blancas) donde la viabilidad en YPD es un 26% mayor en comparación a las células crecidas en YLac. Asimismo, se observa una notoria disminución en la viabilidad si se compara la viabilidad en YPD con C18:3 y sin C18:3, ya que la viabilidad celular en presencia de C18:3 (barras negras) es un 39% menor en comparación a las células control sin C18:3 (barras blancas). Hay también un decremento mucho más marcado en la viabilidad celular en medio YLac con C18:3 (barras negras) con respecto de la viabilidad en YLac sin C18:3 (barras blancas).

Un comportamiento muy parecido al anterior se observó en las células con C18:3 a los 28 días de envejecimiento (figura 2 barras blancas), donde se aprecia una viabilidad celular nula a los 28 días de envejecimiento en YLac de 28 días. En YPD las células control crecieron en un 86.5% más que las células con C18:3. Estos resultados sugieren que el hay una mayor susceptibilidad al envejecimiento cronológico debido a un mayor grado de insaturación de los lípidos y que el la presencia de un sustrato respiratorio en el medio YLac incrementa la tasa de envejecimiento cronológico.

En los paneles A y B se observa una notoria y esperada disminución en la viabilidad celular en los cultivos de 28 días en comparación de los de 6 días en virtud de que 28 días se consideró que los cultivos presentan un envejecimiento avanzado. Nótese que las escalas de los gráficos son diferentes, la escala en el panel B se redujo con el fin de facilitar la observación de la diferencia en la viabilidad si se comparan entre sí las barras de dicho panel.

**EFFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae***

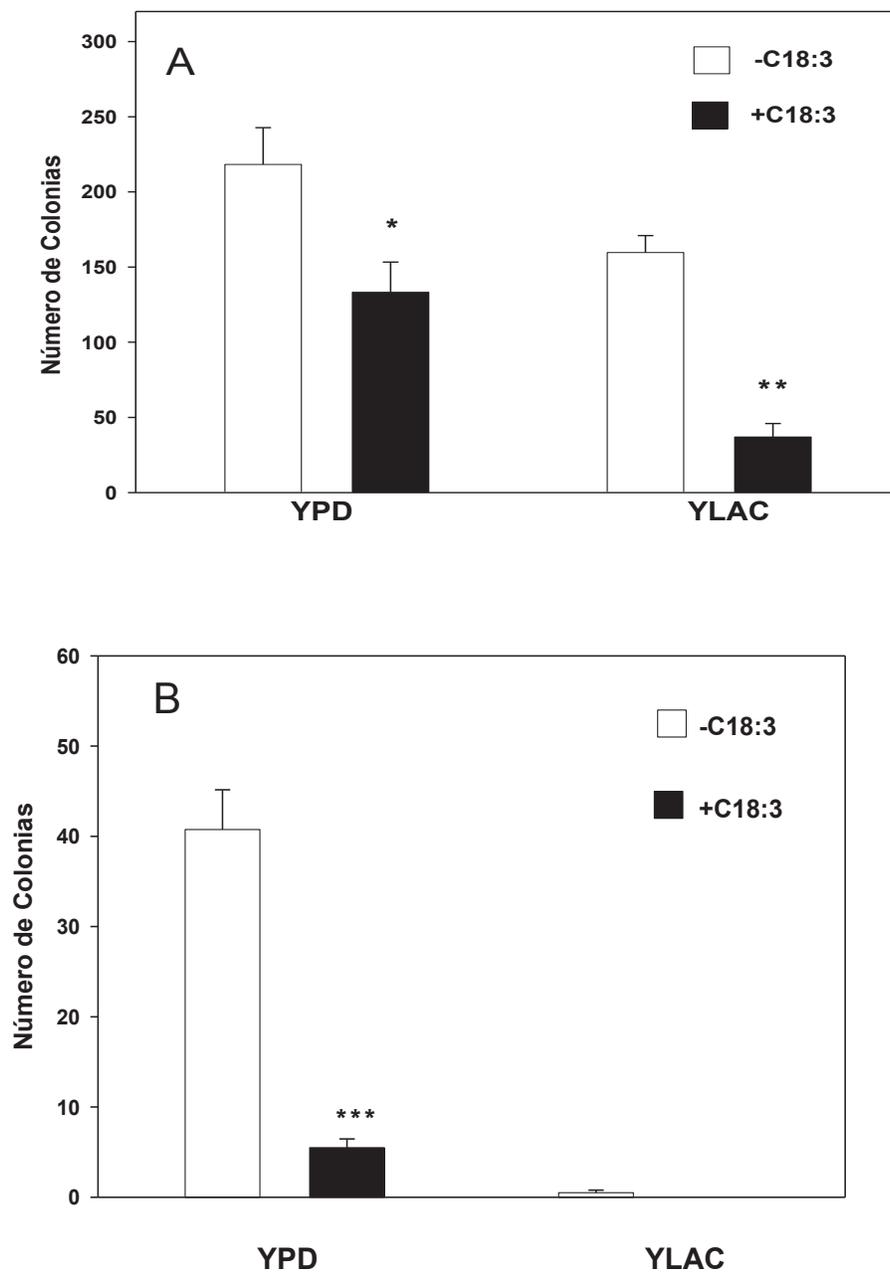


Figura 1. Efecto del ácido linolénico sobre la viabilidad con C18:3 (barras negras) y sin C18:3 (barras blancas) a los 6 (panel A) y 28 días de envejecimiento cronológico (panel B). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de  $n \geq 3$  \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  con respecto a su control.

## **6.2. Efecto de la composición de ácidos grasos sobre la actividad enzimática de la CTE.**

Con la finalidad de determinar si un mayor envejecimiento cronológico de la levadura puede estar acompañado de una disminución paralela de la funcionalidad de la CTE, se evaluó la actividad enzimática de los complejos de la CTE en mitocondrias aisladas.

### **6.2.1. Influencia de la composición de ácidos grasos sobre la actividad enzimática del complejo II.**

Se determinó cuantitativamente el efecto de la incorporación de un ácido graso poliinsaturado en las membranas de la levadura con respecto a la actividad del complejo II durante el envejecimiento cronológico. En mitocondrias con C18:3 con 6 días de envejecimiento (panel A barras negras), la actividad enzimática del complejo II disminuyó un 78% en el medio YPD con respecto a las mitocondrias de células sin C18:3 (panel A, barras blancas). En el medio YLac la inhibición fue del 75% en mitocondrias con C18:3 respecto a su control sin C18:3. La actividad enzimática del complejo II de mitocondrias de levaduras crecidas en YLac disminuyó considerablemente en un 75% tanto en mitocondrias con C18:3 como en mitocondrias sin C18:3 en comparación con las mitocondrias de células crecidas en medio YPD.

Por otra parte, en mitocondrias de levaduras envejecidas en medio YPD sin C18:3 de 28 días (panel B barras blancas) la actividad del complejo II fue un 75% mayor que las mitocondrias de células con C18:3 (panel B, barras negras), al igual que las mitocondrias sin C18:3 de células crecidas en YLac, las cuales presentaron un 51% más actividad enzimática que las mitocondrias con C18:3 (panel B, barras negras). Notablemente, no hubo diferencias significativas entre las mitocondrias de levaduras envejecidas tanto en YPD como en YLac con C18:3 (panel B, barras negras).

En conjunto, los resultados anteriores muestran que hay una inhibición del complejo II debido a un aumento en los niveles de insaturación de los ácidos grasos de membrana que convierten a la CTE de la mitocondria en un blanco importante del

**EFFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae***

estrés oxidativo, lo que podría estar asociado a un envejecimiento cronológico más acentuado.

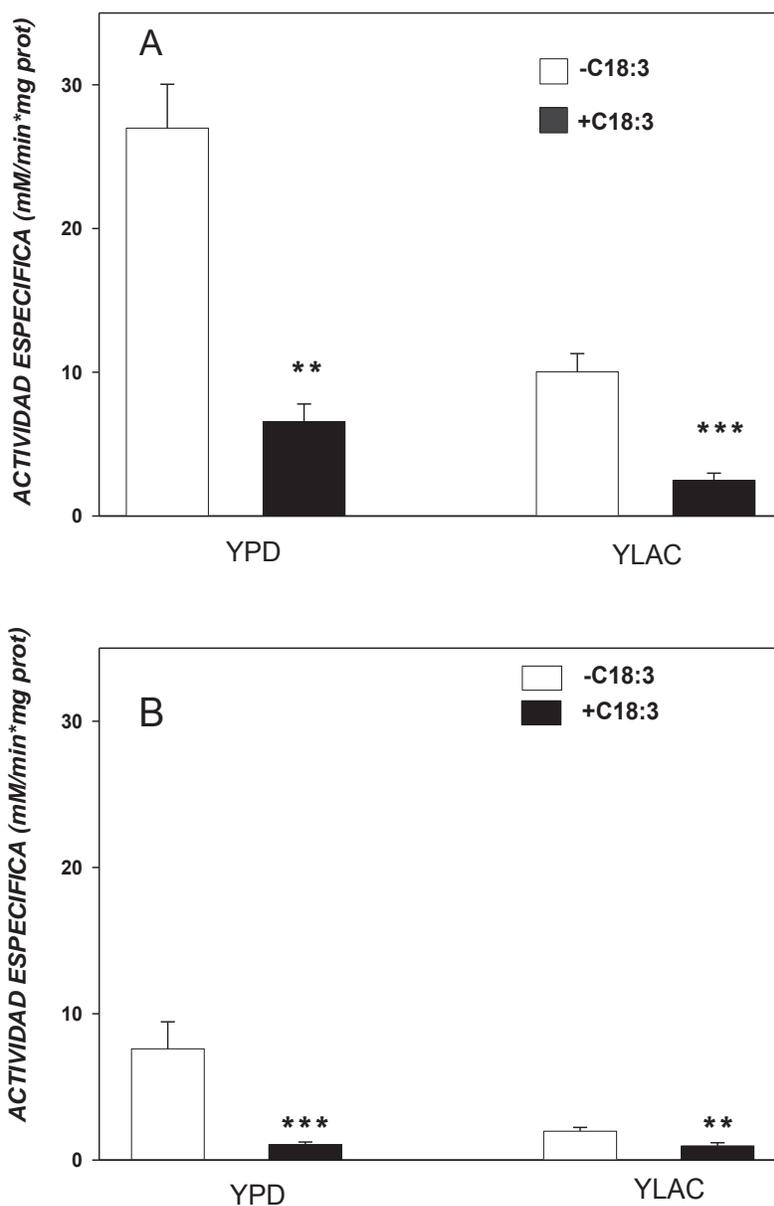


Figura 2. Efecto del ácido linolénico sobre la actividad enzimática del complejo II de mitocondrias de células con C18:3 (barras negras) y sin C18:3 (barras blancas) a los 6 (panel A) y 28 días de envejecimiento cronológico (panel B). Los resultados se expresan

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE  
EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

---

como la media  $\pm$  el error estándar de  $n \geq 3$  \*\* $P < 0.01$  y \*\*\* $P < 0.001$  con respecto a su control.

**6.2.2. Influencia de la composición de ácidos grasos sobre la actividad enzimática del complejo III.**

Para conocer el efecto de la adición del C18:3 sobre la actividad del complejo III durante el envejecimiento cronológico, se evaluó la reducción del citocromo *c* sensible a antimicina A.

En el panel A de la Fig. 3 se observa que en las mitocondrias de 6 días de envejecimiento en medio YPD con C18:3 la actividad enzimática del complejo III disminuye hasta en un 80% respecto a las mitocondrias sin C18:3. Por su parte, ocurre lo mismo en las mitocondrias provenientes de las células envejecidas con YLac, en donde se observa una disminución de un 94% en mitocondrias con C18:3 respecto a las que no contienen el ácido graso.

De igual manera, en las mitocondrias aisladas de levaduras envejecidas durante 28 días, se puede apreciar una disminución de la actividad del complejo III en YPD con C18:3 de un 94% respecto a su respectivo control sin C18:3. Mientras tanto, en las mitocondrias de células envejecidas en YLac la actividad del complejo III de las mitocondrias sin C18:3 es un 97% superior a las mitocondrias con C18:3 envejecidas en el mismo medio.

Estos resultados sugieren que el mayor daño a nivel de la CTE durante el envejecimiento cronológico ocurre en el complejo III, lo cual podría tener una relación directa con el envejecimiento cronológico aumentado en los cultivos con C18:3 debido a que la contribución de este complejo a la generación del potencial de membrana mitocondrial podría verse disminuida, lo cual podría tener un efecto deletéreo en los procesos fisiológicos relacionados con este parámetro y la sobrevivencia de la célula (p. ej., la homeostasis iónica).

**EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae***

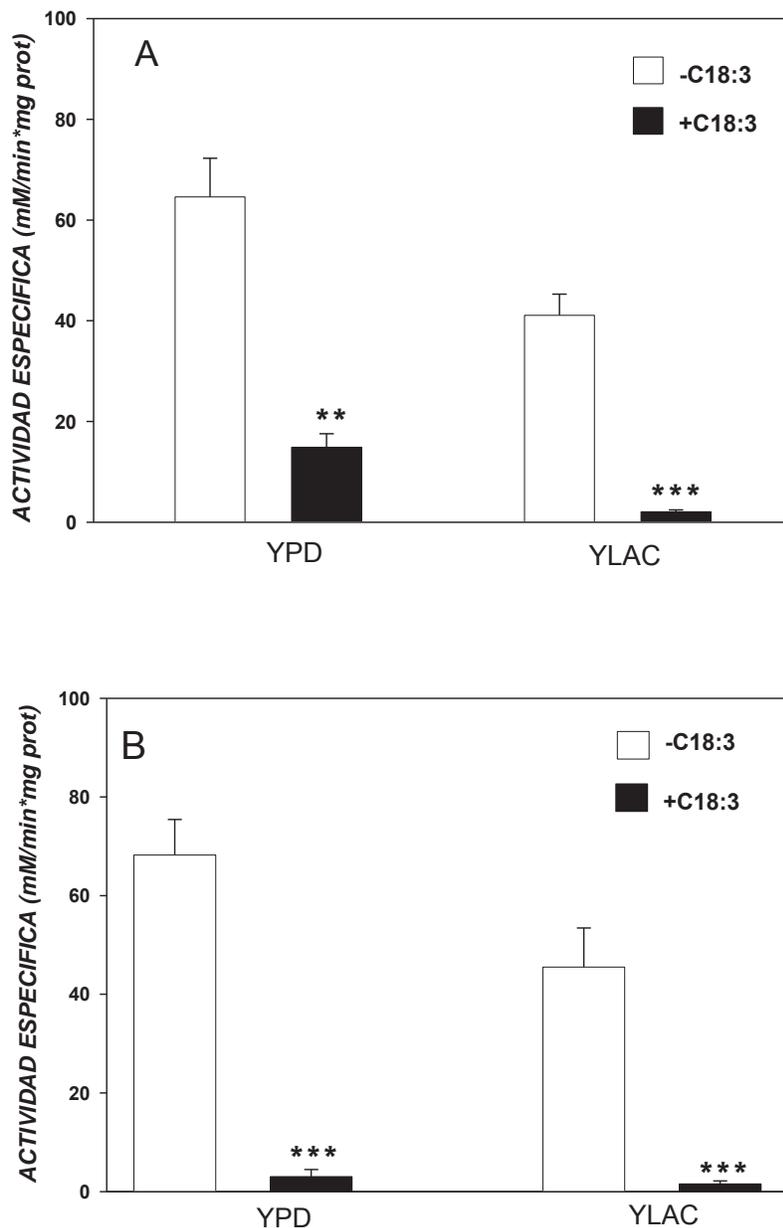


Figura 3. Efecto del ácido linolénico sobre la actividad enzimática del complejo III de la cadena de transporte de electrones con C18:3 (barras negras) y sin C18:3 (barras blancas) a los 6 (panel A) y 28 días de envejecimiento (panel B). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de  $n \geq 3$  \*\* $P < 0.01$  y \*\*\* $P < 0.001$  con respecto a su control.

### **6.2.3. Influencia de la composición de ácidos grasos sobre la actividad enzimática del complejo IV.**

Con el objetivo de determinar si la incorporación del C18:3 altera la actividad de la citocromo *c* oxidasa durante el envejecimiento cronológico, se determinó la oxidación del citocromo *c* reducido con ditionita, sensible a KCN de mitocondrias aisladas de células envejecidas durante 6 y 28 días en presencia y ausencia de C18:3 en un medio con un sustrato fermentable (YPD) y uno respiratorio (YLac).

En el panel A se muestra la actividad del complejo IV en mitocondrias de células de 6 días de envejecimiento. No hubo diferencias significativas entre las actividades de las mitocondrias aisladas en medio YPD y YLac sin C18:3 (Figura 4 barras blancas). En contraste, en presencia C18:3 (barras negras, panel A) las mitocondrias de células envejecidas en YLac mostraron una inhibición del 50% en comparación a las YPD. En cuanto a las mitocondrias de células envejecidas en medio YPD la actividad enzimática en ausencia de C18:3 (barras blancas) fue un 72% mayor que la de las mitocondrias con C18:3 (barras negras). Un comportamiento similar se observó en las mitocondrias de células envejecidas en YLac ya que la actividad del complejo en presencia de C18.3 fue un 84% menor (barras negras) con respecto a las YLac sin C18.3 (barras blancas).

La citocromo *c* oxidasa de mitocondrias de 28 días (Panel B), presentó un 9% de inhibición en medio YPD con C18:3 (barras negras) en comparación a las mitocondrias en medio YPD sin C18:3 (barras blancas). En contraste con los resultados de 6 días en medio YLac y con C18.3 (barras negras) la actividad enzimática aumentó en un 40% en comparación al control (barras blancas YLac), no habiendo una diferencia significativa en este aumento. Referente a la actividad con respecto a los medios de cultivo en las mitocondrias sin C18:3 (barras blancas), hubo una inhibición de un 37% en mitocondrias YLac en comparación a las YPD; mientras que en las YLac y YPD con C18:3 (barras negras) no hubo diferencia significativa en la actividad del complejo IV entre ambos medios. Es de resaltarse también que a los 28 días, la actividad del complejo IV disminuyó notoriamente bajo todas las condiciones estudiadas respecto a los cultivos de 6 días (Fig. 4); sin embargo, en ningún caso, la actividad de este complejo tendió a la inhibición total como se observó en el complejo III (Fig. 3).

**EFEECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae***

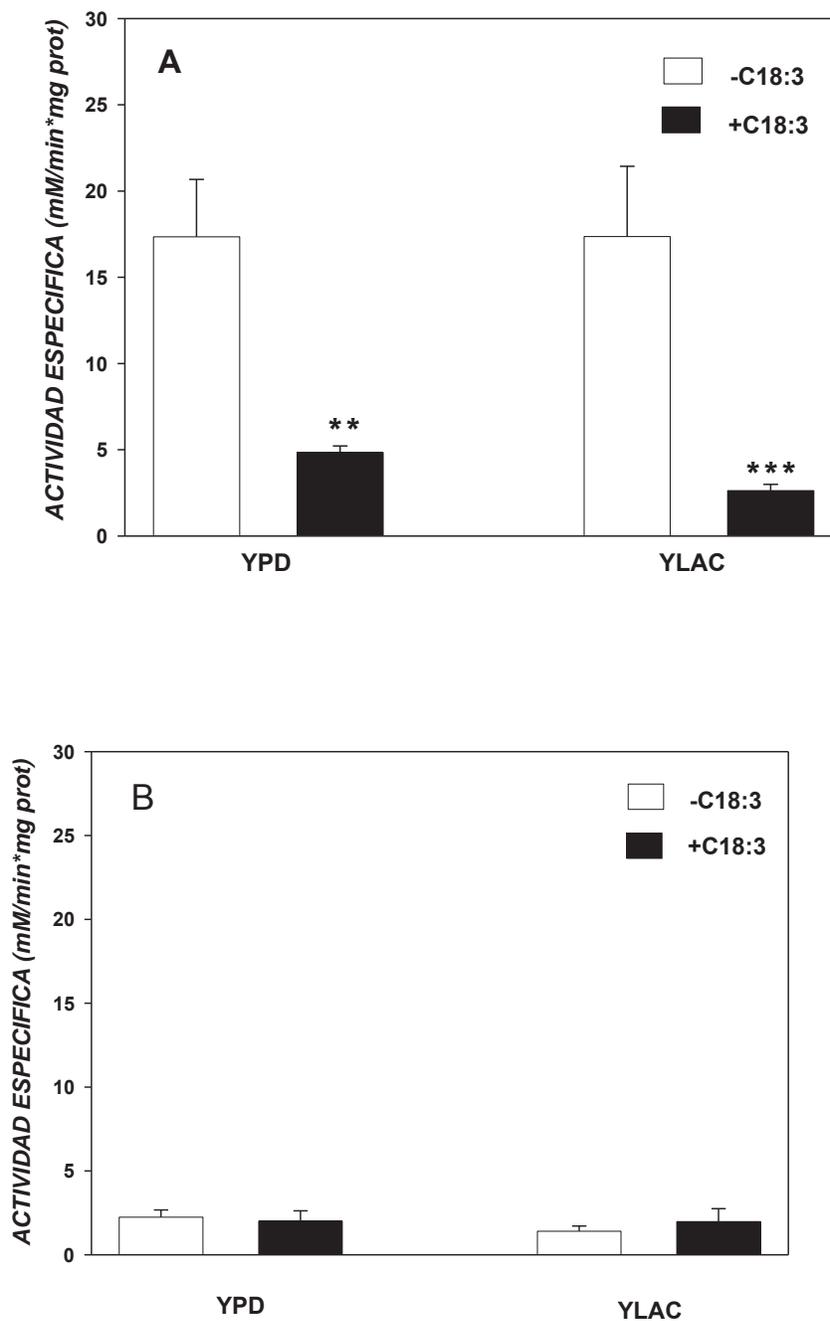


Figura 4. Efecto del ácido linolénico sobre la actividad enzimática del complejo IV de la CTE con C18:3 (barras negras) y sin C18:3 (barras blancas) a los 6 (panel A) y 28 días de envejecimiento (panel B). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de  $n \geq 3$  \*\* $P < 0.01$  y \*\*\* $P < 0.001$  con respecto a su control.

## **7. DISCUSIÓN**

La mitocondria es un orgánulo muy susceptible al daño oxidativo con consecuencias desastrosas para la célula, debido a que es la principal fuente de ATP y de formación de ERO. Asimismo, la disfunción mitocondrial está ampliamente relacionada con el envejecimiento.

Las mitocondrias de *S. cerevisiae* están compuestas nativamente por ácidos grasos saturados y monoinsaturados, siendo estos últimos los principales componentes de la membrana cuando la levadura crece en una fuente de carbono no fermentables (12).

Los resultados de este trabajo de investigación muestran que un aumento en el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana da lugar a cambios importantes en las actividades de la CTE durante el envejecimiento cronológico.

El grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas mitocondriales se correlaciona positivamente con la vulnerabilidad de las membranas a la peroxidación (14). Los datos mostrados en la figura 1 muestran un mayor envejecimiento cronológico en presencia de C18:3, lo cual podría estar relacionado con una mayor sensibilidad a la lipoperoxidación observada en mitocondrias con C18:3, mientras que el menor envejecimiento observado en células sin C18:3 podría estar relacionado con la sensibilidad nula de las mitocondrias cuyas membranas están constituidas por ácidos grasos monoinsaturados (1). Por lo tanto la longevidad de la célula se ve ampliamente favorecida en membranas compuestas por ácidos grasos con menor número de dobles enlaces y por tanto con menor daño oxidativo membranar por ERO, mientras que en las que la composición lipídica de las membranas es mayoritariamente por ácidos grasos poliinsaturados hay un acortamiento en el promedio de vida celular por el incremento en la peroxidación lipídica y un mayor estrés oxidativo.

Los datos anteriores en cuanto a la viabilidad celular en placa podrían estar relacionados con los resultados descritos por Cortés-Rojo C. (14), en los cuales se demostró que la incorporación de C18:3 aumentó la sensibilidad de las levaduras al

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE  
EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

---

estrés oxidativo, por lo cual, una mayor sensibilidad al estrés oxidativo podría estar relacionada con un envejecimiento cronológico aumentado en las células C18:3.

Es de notarse que la viabilidad celular se ve favorecida en medio YPD (figura 1), lo cual podría explicarse con los resultados de la medición del pH de los medios de cultivo YPD y YLac obtenidos por Aguilar Toral (1), en los cuales el pH en medio YLac fue varias unidades más básico que el pH en medio YPD durante el transcurso del envejecimiento, ya que se ha sugerido que un pH alcalino inhibe el crecimiento de cultivos de *S. cerevisiae* al detener el ciclo celular en la fase G<sub>0</sub> (1).

Existen reportes que indican que la cardiolipina es uno de los fosfolípidos esenciales para el funcionamiento de los complejos III y IV (21, 44). Además, se ha demostrado que la peroxidación de los lípidos de membrana afecta las actividades de dichos complejos (38). A partir de estos datos y lo comentado anteriormente acerca de una mayor sensibilidad a la lipoperoxidación demostrada en las células envejecidas con C18:3 (1), se puede sugerir que la inactivación aumentada de dichos complejos en células envejecidas con C18:3 se puede atribuir a la lipoperoxidación.

La actividad del complejo II en presencia de ácido  $\alpha$ -linolénico tanto en medio YPD como en medio YLac de mitocondrias a los 6 y 28 días de envejecimiento (Figura 2) se vio ampliamente mermada en comparación a las mitocondrias control. La oxidación de grupos tiol que son esenciales para la actividad del complejo II podría ser una explicación a la inactivación del complejo II por el estrés oxidativo causado al cambiar la composición de la membrana por ácidos grasos poliinsaturados. En un estudio llevado a cabo en la mitocondria de levadura, el reductor de grupos -SH el  $\beta$ -mercaptoetanol revirtió la inhibición de la actividad del complejo II inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (17). Otra posible explicación es un daño aumentado en los tres clusters hierro-azufre del complejo II, dado que este tipo de grupos prostéticos pueden ser dañados por la sobreproducción de ERO.

Una mayor disminución en la actividad enzimática inducida por la adición del C18:3 fue observada en el complejo III a 6 y 28 días de envejecimiento (Figura 3). Este efecto podría atribuirse a una disfunción en el ciclo Q, ya que un estudio previo de

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE  
EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

---

la actividad del complejo III de levadura con C18:3 demostró que era el segmento más sensible de la CTE a los efectos dañinos del estrés oxidativo relacionados con la peroxidación de lípidos al ocasionar un defecto en la transferencia de electrones durante el ciclo Q entre el citocromo *b* y la subunidad de Rieske (16).

La alta susceptibilidad de la actividad del complejo III en comparación con los otros complejos probablemente no se deba a alteraciones estructurales de las subunidades del complejo dado que se ha reportado que la lipoperoxidación no induce cambios en la movilidad electroforética o pérdida específica de subunidades de la proteína según lo reportado por Reinheckel et al. 1995. Por lo que la pérdida de actividad podría deberse a la alteración específica de los centros redox en las proteínas de la cadena respiratoria, probablemente por los cambios en las interacciones proteína-fosfolípidos.

La peroxidación lipídica afecta la conformación del citocromo *b* y al mismo tiempo, la transferencia de electrones en el citocromo *b* puede afectar el movimiento de la subunidad extrínseca de la entre el sitio Q<sub>o</sub> y el citocromo *c*<sub>1</sub>, lo que llevaría a una disminución de la reducción catalítica del citocromo *c*. La disminución en la transferencia de electrones al citocromo *b* y el deterioro del movimiento de la proteína de Rieske llevaría a la fuga de electrones derivados de la oxidación quinol por la proteína de Rieske, dando lugar a un aumento en la formación de ERO en el sitio Q<sub>o</sub> del complejo III (16).

En la figura 4, panel B, no se observaron diferencias en la sensibilidad del complejo IV entre mitocondrias envejecidas durante 28 días sin C18: y con C18:3, esto podría estar relacionado con el hecho de que la adición de C18:3 vuelve a los lípidos mitocondriales inicialmente más susceptibles al estrés oxidativo por el ataque de las ERO pero a los 28 días se observó una resistencia aumentada a la peroxidación de lípidos (1), por lo cual podría suceder una adaptación al estrés oxidativo del complejo IV en mitocondrias de 28 días por la presencia de C18:3. En esta figura también se observa que el medio en el que crecen las levaduras no influye en este caso en la actividad enzimática del complejo IV situación que si ocurre con los complejos II y III.

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE  
EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

---

En mitocondrias sin C18:3, el complejo IV fue la enzima que presentó una mayor disminución en su actividad durante el envejecimiento, lo cual sugiere que en ausencia de peroxidación de lípidos, este complejo podría ser el paso limitante de la CTE en el envejecimiento y podría estar involucrado en el envejecimiento de la levadura con composición nativa de ácidos grasos.

Se ha sugerido que la mayor susceptibilidad a la lipoperoxidación en los organismos con la esperanza de vida más corta da lugar a un deterioro acelerado de la función mitocondrial, poniendo en peligro el funcionamiento adecuado de la célula y predispone al envejecimiento precoz. (34, 37). Lo anterior está de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, por lo cual sería interesante estudiar si la protección de las actividades de los complejos respiratorios mediante la inhibición de la lipoperoxidación podría disminuir o retrasar la aparición de las características fenotípicas del envejecimiento en organismos superiores de estudio tales como la rata.

En resumen, los resultados muestran una mayor preservación de las actividades de los complejos II y III de la CTE de la levadura con composición nativa de ácidos grasos durante el envejecimiento cronológico, mientras que la adición de C18:3 da lugar a probables daños en la CTE, afectando más marcadamente al complejo III y reduciendo su longevidad.

## **8.-CONCLUSIONES**

Los ácidos grasos saturados y monoinsaturados que contiene de manera nativa las membranas de *S. cerevisiae* extienden su longevidad y conservan la función de la CTE, lo cual podría estar relacionado con el hecho de que cuanto mayor grado de insaturación tienen los ácidos grasos de las membranas celulares, aumenta la sensibilidad al ataque de ERO afectando con ello la longevidad de las células. Asimismo, en el medio de cultivo YLac la disminución de la actividad enzimática y la viabilidad celular durante el envejecimiento cronológico se ve afectada en comparación a las levaduras que crecen en YPD independientemente de la adición C18:3.

## **9. REFERENCIAS**

1. Aguilar Toral, R. Efecto del ácido alfa-linolénico en el metabolismo energético mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* durante el envejecimiento cronológico. Tesis de Licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología. Universidad Michjoacna de San Nicolás de Hidalgo. Junio de 2012.
2. Albarrán-Bravo S., Pérez-Gallardo R., Calderón-Cortés E., Cortés-Rojo C., Manzo-Ávalos S., Clemente-Guerrero M., Mercado-Camargo R. and Saavedra-Molina A. 2009. Restricción calórica: efectos sobre el estrés oxidativo y nitrosativo a nivel mitocondrial. *Ciencia Nicolaita*. 51: 123-132.
3. Alberts B. and Bray D. 2006. Introducción a la biología celular. 2da edición. Editorial Médica Panamericana. pp. 864.
4. Barja G. 2005. Radicales libres de origen mitocondrial y longevidad. *An. R. Acad. Nac. Farm.*, 2005, 71: 783-798.
5. Bracesco N., Salvo V.A., Rocha S. Dell M. Carrau F. and Nunes E. 2007. Exploración del efecto protector frente a radicales libres de derivados de la uva (*Vitis vinifera* L. Cv. Tannat) en *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Argentina de Microbiología*. Vol. 39.
6. Brena J. T. 2002. Efficiency of conversion of [alpha]-linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 5(2): 127-132.
7. Bustamante Z., García R., Martínez G. and Paz C.L. 2002. Aplicación de bioinformática en el estudio del citocromo c de *Saccharomyces cerevisiae*. Facultad de Bioquímica y Farmacia-UMSS. pp. 1-11.
8. Burtner C. R., Murakami C. J., Kennedy B. K. and Kaeberlein M. A molecular mechanism of chronological aging in Yeast. 2009. *Cell Cycle*. 8 (8): 1256-1270.
9. Campbell P. 2006. Bioquímica ilustrada: bioquímica y biología molecular en la era posgenómica. Quinta edición. Ed. Elsevier masson. Barcelona España. pp. 47.
10. Cano-Estrada A. and González- Halphen D. 2011.  $F_1F_0$  –ATP sintasa y sus diferencias estructurales. *REB* 30 (3): 98-108.
11. Céspedes-Miranda E., Rodríguez-Capote K., Llópiz-Janer N. and Cruz Martí N. 2000. Un acercamiento a la teoría de los radicales libres y el estrés oxidativo en el envejecimiento *Rev Cubana Invest Biomed*. 19(3):186-190.

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE  
EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

---

12. Chiva-Tomás R. 2011. Mecanismos moleculares y bioquímicos implicados en la adaptación de *Saccharomyces cerevisiae* a las bajas temperaturas de fermentación. Tesis Doctorado. Departamento de Bioquímica y Biotecnología. Facultad de Enología. Universidad Rovira y Virgili. pp. 11.
13. Cortés-Rojo C. 2005. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Tesis Maestría. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. pp.6-20.
14. Cortés-Rojo, C., Estrada-Villagómez M., Manzo-Avalos, S. and Saavedra-Molina, A. 2009. Influence of Lipoperoxidation over Mitochondrial Oxidative Damage and Integrity of *Saccharomyces cerevisiae*. Información tecnológica. 20 (2): 71-81.
15. Cortés-Rojo C. 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 doctorado. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. pp. 3-18.
16. Cortés-Rojo C., Calderón-Cortés E, Clemente-Guerrero M, Estrada-Villagómez M, Manzo-Avalos S, Mejía-Zepeda R, Boldogh I, Saavedra-Molina A. Elucidation of the effects of lipoperoxidation on the mitochondrial electron transport chain using yeast mitochondria with manipulated fatty acid content. J Bioenerg Biomembr. 2009 41(1):15-28.
17. Cortés-Rojo, C., Calderón-Cortés, E., Clemente-Guerrero, M., Manzo-Avalos, S., Uribe, S. Boldogh, I. and Saavedra-Molina, A. 2007. Electron transport chain of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria is inhibited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at succinate-cytochrome c oxidoreductase level without lipid peroxidation involvement. *Free Radic Res.* 41: 1212-1223.
18. Der-Giezen M. 2011. Mitochondria and the Rise of Eukaryotes. BioScience. 61(8):594-601.
19. Devlin T. 2006. Bioquímica. Cuarta edición Editorial Reverté S.A. Barcelona. pp. 572.
20. Folch-Mallol J. L., Garay-Arroyo A., Lledías F. and Covarrubias-Robles A. 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Rev Latinoam Microbiol. 46(1):24-46.
21. Fry M. and Green D.E. 1980. Ion-transport chain of cytochrome oxidase: the two chain-direct coupling principle of energy coupling. Proc Natl Acad Sci USA. 77(11): 6391–6395.

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE  
EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

---

22. Gornall, A.G., Bardawill, C.J. y David, M.M. 1949. determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177, 751-765.
23. Guarente, L & Kenyon, C, 2000. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature*, 408 (6809), pp. 255-262.
24. Guérin, B., Labbe, P. and Somlo, M. 1979. Preparation of yeast mitochondria *Saccharomyces cerevisiae* with good P/O and respiratory control ratios. *Methods Enzymol.* 55. pp. 149-159.
25. Harman, D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11: 298-300.
26. Hulbert A. J. 2003. Life, death and membrane bilayers. *J Exp Biol.* 206. 2303-2311.
27. Hulbert A. J., Pamplona R., Buffenstein R. and Buttemer W. A. 2007. Life and Death: Metabolic Rate, Membrane Composition and Life Span of Animals. *Physiol Rev* 87: 1175–1213.
28. Kaeberlein, M, Burtner, CR y Kennedy, BK, 2007. Recent developments in yeast aging. *PLoS Genetics*, 3 (5), p. e84.
29. Leiva M. 2006. Cadena Respiratoria Mitocondrial. Fosforilación Oxidativa. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Médicas. pp. 1-13.
30. J., Stryer L. and L. J. 2008. Bioquímica. Sexta edición. Editorial Reverté. Barcelona, España. pp. 514.
31. Martínez- Sánchez G. 2005. Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Rev Cubana Farm.* 39(3).
32. Martínez-Pastor M. 2011. Análisis de la función y la regulación de la mitocondria de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en respuesta a estrés osmótico. Tesis doctoral. Universidad politécnica de Valencia. pp 15-23.
33. Mesquita A., Weinberger M., Silva A., Sampaio-Marques B., Almeida B., Leão C., Costa V., Rodrigues F., Burhans W. C., and Ludovico P. 2010. Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and superoxide dismutase activity. *PNAS.* 107 (34):15123-15128.
34. Montgomery MK, Hulbert AJ, Buttemer WA. 2011. The Long Life of Birds: The Rat-Pigeon Comparison Revisited. *PLoS ONE* 6 (8): e24138. doi: 10.1371/journal.pone.0024138.

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE  
EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

---

35. Monza J., Borsani O., Batista L. and Signorelli S. 2008. Cadena Respiratoria. pp. 1-8.
36. Nicholls D. G. 1987. Bioenergética. Introducción a la teoría quimiosmótica. Editorial Reverté S.A. de C.V. Barcelona. pp. 124-130.
37. Pamplona, R. y otros seis autores; Low fatty acid unsaturation: a mechanism for lowered lipoperoxidative modification of tissue proteins in mammalian species with long life spans. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci*: 55(6), 286-291 (2000).
38. Paradies, G., G. Petrosillo, M. Pistolese y F.M. Ruggiero; Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene*: 286(1), 135-141 (2002).
39. Parrella, E y Longo, VD, 2010. Insulin/IGF-1 and related signaling pathways regulate aging in nondividing cells: from yeast to the mammalian brain. *TheScientific World Journal*, 10, pp. 161-77.
40. Pascuzzo-Lima C. 2001. La mitocondria: Aspectos estructurales, funcionales y patológicos. Caracas. pp. 1.
41. Radoslawka K. and Mazurkiewicz A. 2004. Formation and detoxification of reactive oxygen species. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 22(3): 183-186.
42. Reverter-Branchat G. 2007. Estudio del daño oxidativo en proteínas y efecto de la restricción calórica en el envejecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. Universidad de Lleida. Departamento de Ciencias Médicas Básicas. URL: <http://www.ecologia.unam.mx/adriana/GalerasRevRLM04.pdf>.
43. Rivera-Cabrera F. 2005. Parámetros indicadores de inducción y protección al daño por frío (DPF) en frutos de limón 'Mexicano' (*Citrus aurantifolia* S.). Universidad Autónoma Metropolitana. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Doctorado en Biología Experimental. México D.F. pp 12-14.
44. Robinson, N.C. 1993. Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 25, 153-163.
45. Rodríguez-Cruz M., Tovar A.R., Del Prado M. and Torres N. 2005. Molecular mechanisms of action and health benefits of polyunsaturated fatty acids. *Rev. invest. clín.* 57(3): 457-472.
46. Roskoski R. 2003. Bioquímica. Mc Graw Hill Interamericana. pp 76-77, 127-135.
47. Schelegel-Hans S. 1997. Microbiología General. Editorial Omega. Barcelona. pp. 185-186.

***EFECTO DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
LOS COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DURANTE  
EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae****

---

48. Spiteller, G. Rejuvenation Res. 2010, 13(1): 91-103.
49. Valdivieso-Ugarte M. 2006. Obtención y caracterización de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* superproductoras de glutatión. Tesis doctorado. Universidad de Granada. pp 3-23.
50. Vázquez-Contreras E. 2003. Bioquímica y Biología molecular en línea. Instituto de Química UNAM. Última actualización: 17 de Septiembre de 2003. Consultado: 23 de Enero de 2012. URL: <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/cadena.html>
51. Velásquez-Rodríguez C. 2000. Papel de las especies reactivas del oxígeno en la arteriosclerosis. *Iatreia*. 13(3):185-189.
52. Voet D. and Voet G. J. 2006. Bioquímica. Tercera edición. Editorial medica panamericana. Buenos Aires. pp. 193.
53. Voet D., Voet G. J. and Pratt C. 2009. Fundamentos de bioquímica: La vida a nivel molecular. 2da edición. 2da reimpresión. Editorial médica panamericana. Buenos Aires. pp 564-565.
54. Waggoner B. 2001. Eukaryotes and Multicells: Origin. *Encyclopedia of life sciences*. pp. 1-9.
55. Watson E. Biología Molecular del gen. 2006. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana. pp. 738-739.
56. Yazawa H., Iwahashi H., Kamisaka Y., Kimura K. and Uemura H. 2009. *Wiley InterScience*. 26:167-184.
57. Zorrilla-García A. E .2002. El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Biomed*. 21(3):178-185.