



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE QUÍMICO
FARMACOBIOLOGÍA**



**“COMPARACION DE LOS EFECTOS DEL RESVERATROL Y EL BHT EN EL
ENVEJECIMIENTO DE LA MUTANTE *GPX2Δ* DE *Saccharomyces cerevisiae*”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

P R E S E N T A

CLAUDIA GUADALUPE FLORES LEDESMA

Asesores de tesis:

Doctor en Ciencias Christian Cortés Rojo

Maestro en Ciencias Luis Alberto Madrigal Pérez

Morelia, Michoacán, Enero de 2015

Agradecimientos y Dedicatoria

Dad gracias en todo, porque esta es la voluntad de Dios para con vosotros en Cristo Jesús." 1 Tesalonicenses 5:18

Gracias Abba por que me ha prestado la vida, me ha bendecido y me ha guardado por sobre todas las cosas, por guiarme en el camino, fortalecerme en cada momento, y amarme incondicionalmente por que sin usted nada somos.

A mis padres J. Merced Flores y Ma. Guadalupe Ledesma muchas gracias por ser esos papis alentadores e inspiradores en todo momento, que con su amor, cariño, comprensión y paciencia me han formado, sin su apoyo no lo hubiese logrado jamás los amo con todo mi corazón y me hace muy feliz ser su hija.

A mis hermanos Alonso y Andy por ser esos hermanos maravillosamente divertidos y enfadosos con los que siempre podre contar y a los cuales no los cambiaria por nada, gracias por su apoyo, amor, paciencia y comprensión siempre serán mis niños.

A mis abuelitos que han sido como mis padres a los cuales amo con todo mi corazón, siempre estare agradecida con ustedes por todas sus enseñanzas y por ser un ejemplo de amor y perseverancia en mi vida.

A esa persona encantadora que hace demasiado felices mis días, que con amor y cariño me ha impulsado a ser mejor, gracias por ser parte de mi presente, espero seguir escribiendo miles de historias junto a ti Eduardo Montero.

A mis amigas Celeste, Lorena y Perla agradezco bastante haberlas encontrado en mi camino, es para mi una gran satisfacción haber vivido esta etapa junto a ustedes codo a codo desde el primer día al igual que Iroel, Fer y David que siempre nos cuidaron, nunca olvidare todos esos momentos de angustia y diversión cuando hacíamos tareas y bitácoras, cuando estudiábamos para los exámenes, cuando comíamos juntos y cuando nos regañaban en clase por no parar de reir muchas gracias por compartir lagrimas, tristesas y alegrías no solo fueron los mejores amigos que pude haber tenido si no que fueron personas maravillosas que me impulsaron a crecer, fueron mi familia gracias por todo.

Teresita tu fuiste la primer persona con la que viví en Morelia y esos 2 años juntas serán inolvidables nos convertimos en mejores amigas y se que nuestra amistad es para siempre, te amo mucho en el amor de Cristo.

Ara, Magda, Rox, Mary, Karemsita, Mayra, Xoch, Perla y Celeste vivir con ustedes este tiempo ha sido de lo mas divertido nunca olvidare todas nuestras chocoaventuras son geniales niñas gracias por su apoyo incondicional, siempre encontré en ustedes ese abrazo calido que de vez en cuando hace falta.

A mis amigos Diana, José, Kalid, Migue, Gaby, Yuli, Tita, Edgar, nunca los olvidare me hicieron reir bastante.

Verito, Wendy, Cecy, Jesus, Oscar, Gustavo gracias por creer en mi y brindarme su amistad.

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

Al M.C. Luis Alberto Madrigal Perez por su co-asesoria y apoyo.

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

A la M.C. Melina Canizal por haberme enseñado algunas técnicas que utilice en este proyecto, por su amistad y apoyo incondicional en este camino, te quiero mucho Mely.

A los miembros del comité tutorial, D.C. Rocio Montoya Perez, Q.F.B. Jaqueline Pisano Baez, D.C. Alfredo Saavedra Molina, D.C. Elizabeth Calderón Cortés, D.C. Alain Raimundo Rodríguez, por sus aportaciones para mejorar este trabajo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio de Bioquímica del I.I.Q.B.: Mary, Omar, Lucio, Clau, Mario, Rox, Fary, Andres, Wicho, Mau por formar parte de un gran equipo y por todos esos días de convivencia que ya extraño.

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).

INDICE

1.-RESUMEN.....	1
2.- INTRODUCCION.....	3
2.1 Envejecimiento.....	4
2.2 Teorías del Envejecimiento.....	4
2.2.1. Teorías genéticas.....	4
2.2.2. Teoría de la mutación somática.....	5
2.2.3. Teoría inmunológica.....	5
2.2.4. Teoría de los radicales libres.....	5
2.3 Teoría del Envejecimiento por Radicales Libres.....	5
2.4 La Mitocondria.....	7
2.4.1 Aspectos estructurales y fisiológicos.....	7
2.4.2 Membranas mitocondriales.....	8
2.4.3. Cadena Transportadora de Electrones.....	12
2.4.3.1 Complejos Transportadores de Electrones.....	13
2.4.3.1.1 Complejo I. NADH deshidrogenasa o NADH: ubiquinona oxidoreductasa.....	14
2.4.3.1.2 Complejo II. Succinato deshidrogenasa o Succinato: ubiquinona oxidoreductasa.....	14
2.4.3.1.3 Complejo III. Citocromo c reductasa o Ubiquinona: citocromo c oxidoreductasa.....	15
2.4.3.1.4 Complejo IV. Citocromo c oxidasa.....	16
2.4.3.2 F ₁ F ₀ -ATPsintasa.....	17
2.4.4 Fosforilación Oxidativa.....	18
2.5 Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y Estrés Oxidativo.....	19
2.6 La peroxidación de lípidos en el proceso del envejecimiento.....	22
2.7 El envejecimiento y el grado de insaturación de los ácidos grasos que componen las membranas.....	24
2.8 Acidos grasos.....	27
2.8.1 Ácido α -linolénico (ALA).....	27
2.8.2 Ácido graso Araquidónico (AA).....	28
2.9 Antioxidantes.....	29
2.10 Resveratrol.....	31
2.10.1 Propiedades químicas y físicas del Resveratrol.....	32
2.10.2 Resveratrol y el envejecimiento.....	32
2.10.3 Posibles mecanismos mediante los cuales actúa el resveratrol en el envejecimiento.....	33
2.11 Ácido ascórbico.....	34
2.11.1 Propiedades químicas y físicas del Ácido ascórbico.....	34
2.11.2 Ácido ascórbico y el envejecimiento.....	35

2.12	Butil Hidroxi Tolueno (BHT).....	36
	2.12.1 Características físicas y químicas del (BHT).....	36
	2.12.2 El BHT y el envejecimiento.....	37
	2.12.3 Posibles mecanismos mediante los cuales actúa el BHT en el envejecimiento.....	37
2.13	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
	2.13.1 Composición de ácidos grasos en las membranas biológicas de <i>S. cerevisiae</i>	39
	2.13.2 Cadena de transporte de electrones en <i>S. cerevisiae</i> ..	40
	2.13.3 Envejecimiento cronológico y replicativo en <i>S. cerevisiae</i> ..	42
	2.13.4 Isoformas de la glutatión peroxidasa de la levadura <i>S. cerevisiae</i>	43
	2.13.5 Fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa mitocondrial (Gpx2).....	43
3.	JUSTIFICACIÓN	45
4.	HIPÓTESIS	46
5.	OBJETIVO	46
	5.1 Objetivo general.....	46
	5.2 Objetivos específicos.....	46
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	47
	6.1 Reactivos.....	47
	6.2 Material biológico.....	47
	6.3 Siembra de células de <i>S. cerevisiae</i> e inducción del envejecimiento cronológico.....	47
	6.4 Manipulación del contenido de ácidos grasos de la levadura y tratamientos con resveratrol y BHT.....	47
	6.5 Evaluación del envejecimiento cronológico.....	48
	6.5.1 Determinación de la viabilidad celular por conteo en placa.	48
	6.6 Preparación de células para la peroxidación lipídica la respiración in situ y ensayos de potencial de membrana.....	48
	6.7 Determinación de la sensibilidad de la peroxidación lipídica	49
	6.8 Determinación del potencial de membrana mitocondrial en situ..	49
	6.9 análisis estadístico.....	49
7.	RESULTADOS	49
	7.1 Evaluación del efecto antioxidante de BHT vs. ácido ascórbico sobre el potencial de membrana mitocondrial de <i>S. cerevisiae</i> en relación al envejecimiento.....	50
	7.2 Peroxidación lipídica frente a la protección de antioxidantes.....	52
	7.3 Viabilidad celular.....	60
8.	DISCUSIÓN	63
9.	CONCLUSIÓN	66

10. REFERENCIAS.....	66
-----------------------------	-----------

“Respira”.....

1. RESUMEN

El daño oxidativo ha sido identificado como uno de los mecanismos más importantes que determinan la velocidad de envejecimiento de los organismos. En la levadura *S. cerevisiae*, los fosfolípidos de membrana son protegidos de la peroxidación por 3 isoformas de la enzima fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa (Gpx), de las cuales, la isoforma Gpx2 está presente en la membrana interna mitocondrial. Esto permite postular que Gpx2 podría ser crucial en la sobrevivencia de *S. cerevisiae* en cultivos envejecidos. Por otro lado, se ha descrito que el resveratrol, un fitoquímico presente en las uvas, es capaz de prolongar la longevidad en la levadura. Mientras que el ácido ascórbico tiene propiedades como agente antioxidante. Por lo tanto, los objetivos del presente trabajo fueron determinar si el resveratrol y el ácido ascórbico pueden tener un papel protector contra el envejecimiento de una mutante de Gpx2 en presencia de un ácido graso poliinsaturado y comparar sus efectos contra los del antioxidante lipofílico hidroxitolueno butilado (BHT). Se envejecieron cronológicamente células de *S. cerevisiae* de la cepa BY4741 y su mutante *Gpx2Δ* en ausencia o en presencia de los ácidos grasos C18:3 y C20:4 con los antioxidantes resveratrol, ácido ascórbico y BHT. Se evaluaron distintos parámetros como lo son: la sobrevivencia celular, el potencial de membrana mitocondrial y los de los niveles de lipoperoxidación. Se observó que sin la presencia de C20:4, el resveratrol protegió a la mutante *gpx2Δ* contra la pérdida de viabilidad en cultivos envejecidos hasta por 10 días, mientras que el BHT tuvo efectos contrarios. Además el BHT en presencia de C20:4 tuvo un efecto protector contra la peroxidación de lípidos. Por lo tanto, se sugiere que un mecanismo de acción del BHT para aumentar la longevidad en la levadura es la protección contra el daño de las membranas celulares.

Palabras clave: Envejecimiento, lipoperoxidación, Gpx2, Resveratrol

ABSTRACT

Oxidative damage has been identified as one of the most important mechanisms that determine the rate of aging of organisms. In the yeast *S. cerevisiae*, membrane phospholipids are protected from peroxidation 3 isoforms enzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPX), of which the Gpx2 isoform is present in the inner mitochondrial membrane. This allows postulate that Gpx2 could be crucial to the survival of *S. cerevisiae* in aged cultures. Furthermore, it has been described that resveratrol, a phytochemical in grapes, is able to extend longevity in yeast. While ascorbic acid has properties as agent antioxidant. Therefore, the objectives of this study were to determine whether resveratrol and ascorbic acid may have a protective role against aging Gpx2 a mutant in the presence of a polyunsaturated fatty acid compare their effects against the lipophilic antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT).

The chronologically aged cells of *S. cerevisiae* BY4741 strain and the mutant Gpx2Δ in the absence or presence of the fatty acids C18: 3 and C20: 4 with antioxidants resveratrol, ascorbic acid and evaluated BHT. Were evaluated various parameters such as: cell survival, mitochondrial membrane potential and lipoperoxidation. The levels observed in the absence of C20: 4, resveratrol gpx2Δ mutant protected against loss of viability in cultures aged up to 10 days, while the opposite effect was BHT. Moreover the presence of BHT in C20: 4 were protective effect against lipid peroxidation. Therefore, it is suggested that a mechanism of action of BHT to increase longevity in yeast is protection against damage cell membranes.

Keywords: Aging, lipoperoxidation, Gpx2, Resveratrol

2. INTRODUCCION

2.1 Envejecimiento

Desde el punto de vista fisiológico, se define envejecimiento como “un proceso biológico que da lugar a una serie de cambios fisiológicos, característicos de cada especie, que tienen como consecuencia una limitación de la capacidad de adaptación del organismo al ambiente. Este proceso se inicia con el nacimiento y tiene como resultado final la muerte del organismo” (Martínez, 2005).

En general, las diferentes definiciones de envejecimiento apuntan a que es un fenómeno biológico, progresivo, endógeno, irreversible y perjudicial para el individuo (Hulbert *et al.*, 2007), caracterizado por cambios deletéreos, progresivos e irreversibles que afectan a las biomoléculas (DNA, lípidos y proteínas), células, tejidos y órganos del cuerpo, que conducen a la morbilidad y mortalidad. (Kirkwood *et al.*, 1989). Las tasas de envejecimiento y la esperanza de vida máxima vienen determinadas de forma endógena por el genotipo de cada especie, observándose diferencias muy considerables entre ellas.

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

Existe una interrelación entre la generación de oxidantes, la protección antioxidante y la reparación del daño oxidativo. La expectativa de vida puede aumentar al disminuir el grado de los fenómenos oxidantes. Algunos investigadores han propuesto que esto podría lograrse con la mejora de los hábitos higiénico-dietéticos y con el aumento de las defensas antioxidantes (Céspedes-Miranda *et al.*, 2000). En el caso del ser humano, es sabido que las personas de edad avanzada comienzan a mostrar fragilidad en sus huesos y músculos así como problemas en el flujo sanguíneo y el mantenimiento de la presión arterial, disminución de la capacidad pulmonar o intolerancia a la glucosa, todos ellos sucesos representativos de la pérdida en el mantenimiento de la homeostasis (Panno *et al.*, 2009). Además, con el envejecimiento se pierden funciones neurológicas, manifestándose en aspectos como alteraciones sensoriales, visión y audición y pérdida de memoria, entre otros (Masoro y Austad *et al.*, 2010).

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

2.2 Teorías del Envejecimiento

Debido a la complejidad del proceso de envejecimiento, aún hoy no existe una clara explicación de cómo y por qué se produce. Así, el envejecimiento permanece como uno de los grandes desafíos de la ciencia, de tal modo que se considera que la teoría que valore la naturaleza multicausal de este fenómeno será la que conseguirá un acercamiento científico más racional (Strehler *et al.*, 1982). A lo largo de la historia reciente del ser humano, se han dedicado esfuerzos considerables a entender los mecanismos que llevan a semejante fallo en las funciones del organismo y muy diversas teorías han visto la luz, algunas de ellas en los últimos años.

Teorías de envejecimiento como las “Teorías genéticas”, “Teoría de la mutación somática”, “autoinmunidad” o la del “soma desechable” han propuesto diferentes causas del envejecimiento pero falta una mayor integración de todas ellas para generar un paradigma único.

2.2.1 Teorías genéticas

- Teoría de la regulación génica: De acuerdo con esta teoría, el envejecimiento es el desequilibrio entre los diferentes factores que permiten el mantenimiento de la fase de reproducción (Kanungo *et al.*, 1980).
- Teoría de la diferenciación terminal: Se hace especial hincapié en los efectos adversos del metabolismo sobre la regulación genética. (Cutler *et al.*, 1991).

- Teoría de la inestabilidad del genoma: se pone de relieve la inestabilidad del genoma como causa de envejecimiento, donde pueden producirse modificaciones tanto al nivel del DNA como al del RNA, afectando la expresión de los genes sobre el RNA y proteínas (Slagboom *et al.*, 1989; Mozzhukhina *et al.*, 1991).

Estas 3 teorías genéticas confieren al entorno celular el papel de ser el responsable de todos los daños provocados al azar en el DNA.

2.2.2. Teoría de la mutación somática

La causa fundamental del envejecimiento celular es una inestabilidad del genoma mitocondrial, por una falta de equilibrio entre la reparación mitocondrial y el efecto dañino de las especies reactivas del oxígeno (ERO) (Miquel *et al.*, 1984).

2.2.3. Teoría inmunológica

Esta teoría genética del envejecimiento propone que el genoma nuclear, actuando como un "reloj molecular" o "reloj celular" (Flodin *et al.*, 1984), es el responsable de programar los cambios que se irán presentando en el desarrollo de un organismo a lo largo de su vida, desde la concepción hasta el envejecimiento pasando por la madurez sexual (Makinodan *et al.*, 1980). Un aspecto importante son los cambios en la respuesta inmune con la edad creciente.

2.2.4. Teoría de los radicales libres

Postula que el envejecimiento resulta de los efectos perjudiciales fortuitos causados a tejidos por reacciones de radicales libres (Harman *et al.*, 1956). Estas reacciones pueden estar implicadas en los cambios producidos por el envejecimiento asociados con el medio ambiente, las enfermedades y con su proceso intrínseco.

La naturaleza multicausal del envejecimiento obliga a no desechar ninguna de sus teorías.

2.3 Teoría del envejecimiento por radicales libres

De todas estas teorías propuestas, la más aceptada hasta la fecha por la comunidad científica ha sido la "Teoría de envejecimiento por estrés oxidativo". Esta teoría se derivó de otra teoría propuesta a principios del siglo XX, cuando Rubner (1908) observó que, según aumentaba el tamaño de una especie, mayor era su esperanza de vida, relacionando de forma indirecta el tamaño de un

organismo con su tasa metabólica basal específica. Esta teoría pasó a llamarse “Teoría de envejecimiento de la tasa de vida” y sirvió de base para que, a partir de 1954, se comenzara a considerar a los radicales libres como moléculas potencialmente tóxicas para el organismo (Gerschman *et al.*, 1954). No obstante, fue dos años después cuando, por primera vez, se relacionó el estrés oxidativo con el envejecimiento (Harman *et al.*, 1956). De acuerdo con la “Teoría de envejecimiento de los radicales libres” propuesta por Harman, las especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas como resultado del funcionamiento normal de metabolismo aerobio de un organismo, tienen un papel fundamental en el proceso de envejecimiento dado que atacan a las moléculas de la célula (lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos) y generan un daño progresivo, acumulativo e irreversible que finalmente desemboca en la muerte de la célula con el consecuente daño en tejidos y órganos.

De acuerdo con la “Teoría mitocondrial del envejecimiento” (Miquel *et al.*, 1980), las ERO producidas por la cadena de transporte de electrones (CTE) en condiciones fisiológicas normales van a atacar a las moléculas que constituyen los orgánulos, principalmente aquéllos situados más próximos a los lugares de producción de ERO, como los lípidos de membrana y el ADN mitocondrial(mtDNA) (Richter, 1995; Shigenaga *et al.*, 1994), ligando así al envejecimiento celular a un daño producido por el estrés oxidativo a nivel mitocondrial. 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 destrucción celular que causa envejecimiento y es el estrés oxidativo el principal inductor de esas alteraciones (Céspedes-Miranda *et al.*, 2000).

Sohal y cols.(1990), demostraron que las mitocondrias de animales en edad avanzada producen mayor cantidad de ERO que los animales jóvenes. Además, 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 (Albarrán-Bravo *et al.*, 2009). 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, división, 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 (Cortés Rojo, 2005; Hulbert *et al.*, 2007).

Estudios recientes han desafiado esta teoría, demostrando que, en algunos casos, la longevidad se prolonga por la inactivación parcial de las defensas antioxidantes o por un aumento en la formación de ERO (Mesquita *et al.*, 2010).

Con el desarrollo de la vejez, las acciones de las ERO son mucho más perjudiciales debido a una disminución en los sistemas antioxidantes, por lo cual, existe una mayor probabilidad de que las ERO ejerzan su acción sobre sus moléculas blanco (Zorrilla-García *et al.*, 2002)

2.4 La mitocondria

2.4.1 Aspectos estructurales y fisiológicos

La mitocondria es un orgánulo cuyo papel va mucho más allá de la síntesis del ATP. La mitocondria integra los caminos metabólicos, regula la maquinaria epigenética, la expresión génica, y las vías de señalización (Núñez, 2012). Las mitocondrias realizan la descarboxilación oxidativa del piruvato, contienen 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; es por esto que se describe a las mitocondrias como las “fábricas de energía” de la célula (Voet y Voet, 2004).

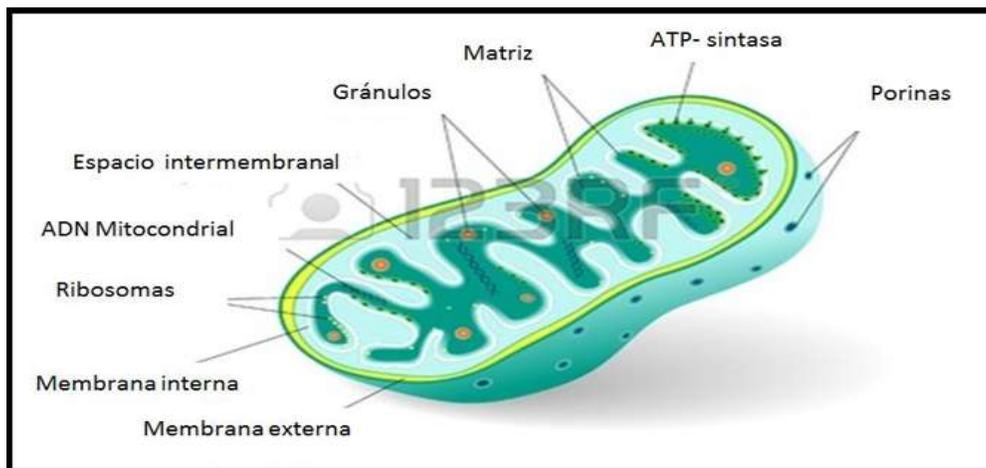
Las mitocondrias están presentes en el citoplasma de todas las células aeróbicas eucariontes (Boveris *et al.*, 2000), entre ellas, las de las plantas, los animales, los hongos, y los protistas (Campbell, 2005). El tamaño, número y forma de las mitocondrias varía de un tejido a otro, pero su estructura básica es la misma. La cantidad de mitocondrias, su tamaño y la forma varía enormemente de acuerdo con su origen y estado metabólico (Whittaker, 1982; Voet y Voet, 2006; Campbell, 2005)

Las mitocondrias presentan distintas morfologías dependiendo de la estirpe celular a la que pertenezcan (Núñez, 2012). La forma de las mitocondrias varía de esférica a cilíndrica; las cilíndricas tienen de 2 μm o más de diámetro y hasta 10 μm de longitud, mientras que las esféricas miden de 0.5 a 5 μm (Whittaker, 1982). Sin embargo, su forma no es constante, se modifica continuamente al ser orgánulos muy dinámicos, ya que pueden fusionarse para formar redes mitocondriales interconectadas o fragmentarse generando mitocondrias

separadas. Se cree que estos procesos son un sistema de control de acuerdo con las necesidades metabólicas de la célula (Braun y Westermann, 2011).

Las mitocondrias poseen su propio material genético y sus propios ribosomas, los cuales son más semejantes a los bacterianos que a los eucarióticos. El ADN mitocondrial sólo tiene información para la síntesis de sus propios ribosomas y para algunos de sus ARN de transferencia (Vázquez-Contreras, 2003). 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 (Cortés-Rojo, 2005). El resto de las proteínas involucradas en el ciclo de Krebs y en la fosforilación oxidativa, se sintetizan en el citoplasma y se transportan hasta la mitocondria para cumplir su función (Vázquez-Contreras 2003).

El número de mitocondrias varía por célula dependiendo de los requerimientos de energía. En promedio, hay unas 2000 mitocondrias por célula, (Lehninger, 2002) siendo los tejidos más ricos en mitocondrias el músculo cardíaco, el músculo esquelético y el cerebro (Núñez, 2012).

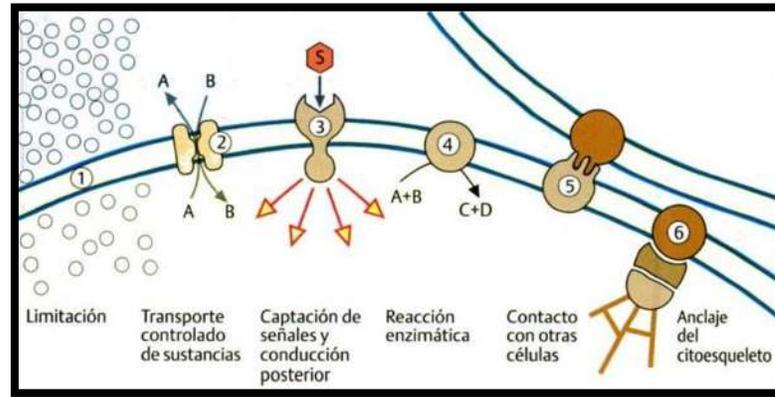


Esquema 1. Modelo tradicional de la mitocondria.

2.4.2 MEMBRANAS MITOCONDRIALES

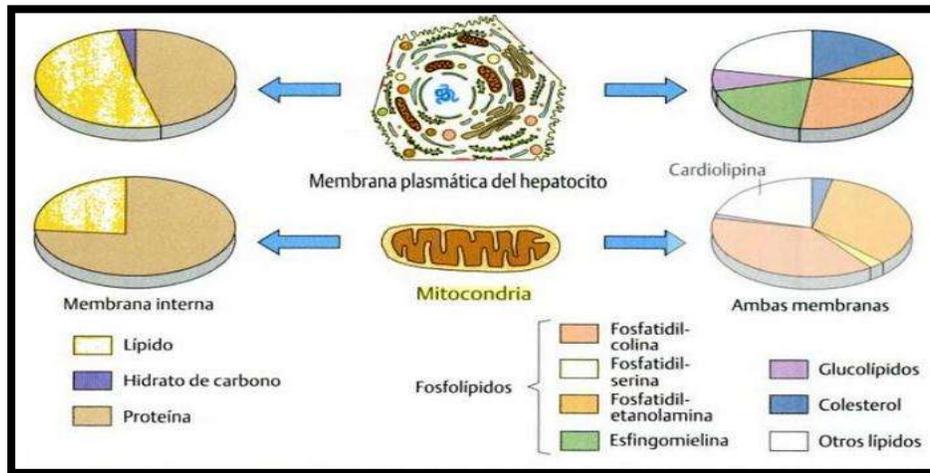
Las membranas y sus componentes tienen las siguientes funciones:

- Delimitación y aislamiento
- Transporte controlado de sustancias
- Captación de señales extracelulares
- Catálisis enzimática



Esquema 1.2. Funciones de la membrana. Tomado y modificado de (Koolman, 2004).

Las membranas biológicas están compuestas por lípidos, proteínas y carbohidratos; los componentes más abundantes son las proteínas en un 50% y 60% (Koolman, 2004) y un 40-50 % de lípidos (Lehninger, 1972), y también contienen carbohidratos unidos en forma covalente con los componentes lipídicos y proteicos. Hay tres tipos principales de lípidos de membrana: fosfolípidos, glucolípidos y colesterol (Koolman, 2004).



Esquema 1.3. Composición de las membranas. Tomado y modificado de (Koolman, 2004).

La mitocondria posee un sistema de doble membrana, una externa y una interna, que separan tres espacios bien definidos: el citosol, el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial. La membrana mitocondrial externa es lisa, de 6 a 7 nm de espesor, contiene porinas que son proteínas integrales, las cuales forman poros

que son permeables y permiten la difusión de moléculas de hasta 10 kDa (Voet y Voet, 2006). Gracias a esto, la membrana externa es permeable a pequeñas moléculas e iones. (Cortés-Rojo, 2005). La membrana externa posee receptores de importación capaces de reconocer secuencias de direccionamiento de las proteínas citosólicas destinadas a las mitocondrias, por ejemplo las ADN y ARN polimerasas mitocondriales que se translocan hacia el espacio intermembrana. También se observan elementos de translocación de proteínas o de complejos de importación sintetizados en el citoplasma (Lodish, 2006), al igual que contiene varias enzimas tales como la fosfolipasa A₂ la monoaminoxidasa (MAO), entre otras. 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 (Cano-Estrada *et al.*, 2011).

Por otro lado, la membrana interna se caracteriza por formar pliegues que se denominan crestas y que incrementan el área total de superficie interna. Estas crestas aparecen como estructuras lamelares o tubulares, cuyo número está relacionado con las demandas energéticas de la célula (Lodish, 2006). La membrana interna es rica en fosfolípidos como con la cardiolipina y el fosfatidilglicerol (Whittaker, 1982). Esta membrana está constituida alrededor de un 80% de proteína (Esquema 1.3), incluyendo un gran número de enzimas y sistemas de transporte diferentes, mientras que el 20% restante son lípidos (Lehninger, 1972). Esta membrana es impermeable a la mayoría de los solutos (Lehninger, 2002), con excepción del O₂, el CO₂ y el H₂O (Koolman, 2004).

La cardiolipina es un glicerofosfolípido dimérico de estructura inusual que posee 3 ácidos grasos en su estructura (Lecocq y Ballou, 1964). Esta presente mayoritariamente en la membrana mitocondrial interna y en sistemas membranosos que precisen un mantenimiento de un gradiente protónico que asegure el desarrollo de la fosforilación oxidativa (Schlame *et al.*, 2000). La cardiolipina se mantiene durante el ciclo vital de la mitocondria (Haines y Dencher, 2002), aunque hay estudios que han descrito que los niveles de cardiolipina se reducen durante el envejecimiento celular (Maftah *et al.*, 1994; Paradies y Ruggiero, 1991) y en respuesta a un estado de estrés oxidativo (Ames *et al.*, 1995). La cardiolipina parece jugar un papel fundamental tanto en la estructura como en la función mitocondrial: estabiliza la membrana mitocondrial interna (Haines y Dencher, 2002; Koshkin y Greenberg, 2002) y modula la actividad de varios complejos de la cadena respiratoria, así como los

transportadores de ATP/ADP, de fosfato y de piruvato (Gohil *et al.*, 2004; Schlame *et al.*, 2000). En la membrana interna hay numerosas proteínas transportadoras que son responsables de la importación y la exportación de importantes metabolitos como el ATP, el ADP, el piruvato, el Ca^{2+} y el fosfato (Voet y Voet, 2004). De manera general, la membrana mitocondrial interna contiene tres tipos de proteínas:

1. Las que llevan a cabo las reacciones de oxidación de la cadena respiratoria
2. Un complejo enzimático llamado F_1F_0 -ATPasa, que sintetiza el ATP en la matriz
3. Proteínas transportadoras específicas que regulan el paso de metabolitos dentro y fuera de la matriz (Koolman, 2004; Michael, 2006; Lehninger, 2002)

La mayoría de las moléculas que atraviesan la membrana mitocondrial interna lo hacen únicamente por la mediación de proteínas transportadoras específicas (Vázquez-Contreras, 2003). 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 (Cortés-Rojo, 2005).

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

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 (Cortés-Rojo, 2005).

La matriz mitocondrial, está delimitada por la membrana interna (Campbell, 2005), que contiene las enzimas solubles del ciclo del ácido cítrico y las enzimas que participan en la β -oxidación de los ácidos grasos (Michael, 2006). Contiene también el ADN mitocondrial, los ribosomas mitocondriales, los ARNt y varias enzimas requeridas para la expresión de genes mitocondriales (Der-Giezen, 2011). 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 (Cortés-Rojo, 2005). Los principales productos de la matriz son CO_2 y NADH reducido que es la fuente para la cadena de transporte de electrones de la membrana mitocondrial interna (Michael, 2006).

2.4.3 Cadena Transportadora de Electrones (CTE)

Las células han de realizar un trabajo para crecer y desarrollarse. Todas las células vivas llevan a cabo la respiración celular para obtener la energía necesaria para sus funciones (Chiva-Tomás, 2011). La capacidad de aprovechar la energía y canalizarla en trabajo biológico es una propiedad de los seres vivos. Las células utilizan la oxidación de los nutrientes como fuente de energía para la obtención de ATP, vinculando la oxidación de los equivalentes reducidos NADH y FADH_2 que contienen la mayor parte de la energía extraída de los alimentos con la fosforilación oxidativa, la cual emplea la energía liberada de la CTE que oxida estas coenzimas reducidas mediante la transferencia de electrones en una serie de pasos hasta el oxígeno, al tiempo que captura la energía libre de las reacciones de oxidación-reducción para impulsar la síntesis de ATP (Campbell, 2005; Devlin, 2004). Durante la oxidación de las coenzimas también se translocan protones desde la matriz hacia el espacio intermembranal a través de la membrana interna para formar un gradiente electroquímico que proporciona energía para la síntesis de ATP (Devlin, 2004).

La CTE está integrada por cinco clases de transportadores de electrones unidos a la membrana y proteínas que forman cuatro complejos enzimáticos (I, II, III, IV): flavoproteínas, citocromos, átomos de cobre, ubiquinona y proteínas con hierro y azufre. Todos, excepto la ubiquinona, son grupos prostéticos (Karp, 2006), estos se alternan entre estados reducidos y oxidados a medida que aceptan y donan electrones (Campbell, 2005). La ubiquinona (coenzima Q) y el citocromo c son dos moléculas móviles transportadoras de electrones, las cuales tienen una estructura más sencilla y sirven para conectar eléctricamente a los complejos respiratorios (Cano-Estrada *et al.*, 2011; Roskoski, 2003).

Los electrones extraídos de los alimentos y transferidos al NAD^+ durante la glucólisis, la oxidación β de ácidos grasos y el ciclo del ácido cítrico, se transfieren desde el NADH a las flavoproteínas, las cuales son polipéptidos unidos a uno o dos grupos prostéticos con dinucleótido de flavina adenina (FAD) o mononucleótido de flavina (FMN en el complejo I). Sufren reacciones redox reversibles y cada uno es capaz de aceptar y donar dos protones y dos electrones. Las principales flavoproteínas en la mitocondria son la deshidrogenasa de NADH y la

deshidrogenasa de succinato (Karp, 2006; Roskoski, 2003; Lehninger, 1972). En la siguiente reacción redox, la flavoproteína vuelve a su forma oxidada en tanto cede electrones a una proteína ferrosulfurada (Fe-S del complejo I), (Devlin, 2004). El complejo es capaz de aceptar y donar un solo electrón (Nicholls, 1987). La proteína con hierro-azufre luego cede los electrones a un compuesto llamado ubiquinona (coenzima Q, Co Q, UQ o Q), pequeña molécula hidrófoba y único miembro no proteico de la CTE (Campbell, 2005). La ubiquinona se mueve dentro de la membrana desde las moléculas donadoras a las aceptoras durante el transporte de electrones (Roskoski, 2003) y no reside en ningún complejo en particular. Puede aceptar dos electrones y dos protones (Karp, 2006) para formar ubiquinol (UQH₂). Conecta los complejos I y II con el III (Nicholls, 1987).

Los átomos de cobre se localizan en el complejo IV, aceptan y donan un solo electrón cuando alternan sus estados de oxidación Cu²⁺ y Cu¹⁺ (Karp, 2006). Los citocromos solo se encuentran en células aeróbicas (Lehninger, 1972). Son proteínas que contienen hierro coordinado en un grupo hemo. El átomo de hierro del grupo hemo es capaz de alternar entre los estados de oxidación de Fe³⁺ y Fe²⁺ (reducción), resultado de la aceptación y pérdida de un solo electrón. Estos se clasifican de acuerdo a la estructura de su grupo prostético, en citocromos *a*, *b* y *c* (Nicholls, 1987).

2.4.3.1 Complejos Transportadores de Electrones

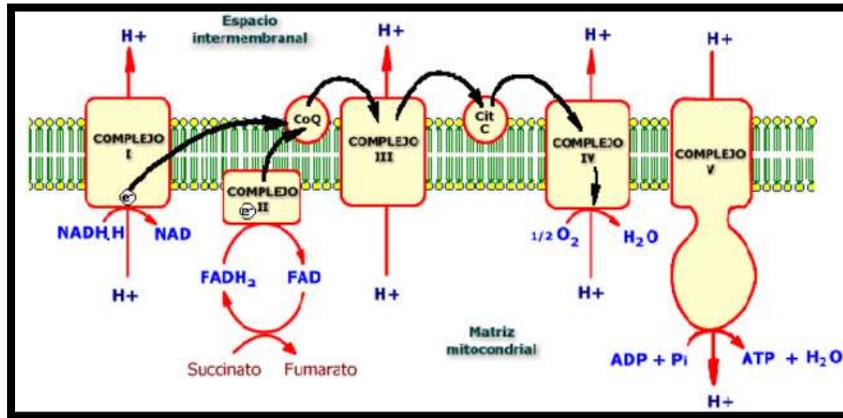
La CTE está formada por tres bombas de protones que corresponden a los complejos I, III y IV, funcionan en paralelo si se consideraran como un circuito de protones, mientras que respecto a la corriente eléctrica funcionan en serie. Originalmente, se creía que cada complejo es independiente dentro de la membrana mitocondrial interna. Sin embargo, evidencia reciente ha demostrado que los complejos se asocian entre sí con diferentes estequiometrias y combinaciones para formar súper complejos, lo cual se ha hipotetizado que podría suceder para modular la eficiencia del transporte de electrones en respuesta a las condiciones energéticas y el estado redox celular. En total se bombean diez protones a través de la membrana (Nicholls, 1987; Devlin, 2004).

La CTE es el núcleo central de la fosforilación oxidativa y consiste en cuatro complejos proteicos (Esquema 1.4):

- 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:citocromoc oxidoreductasa.

IV.-Complejo IV. Citocromo c oxidasa.



Esquema 1. 4 Representación de los complejos que integran a la CTE. Se indica la dirección del transporte de e^- a través de los complejos y de los H^+ desde la matriz al espacio intermembranal, y desde este nuevamente a la matriz a través de la F_1F_0 -ATPasa.

2.4.3.1.1 I.-Complejo I. NADH deshidrogenasa o NADH: ubiquinona oxidoreductasa:

El complejo I de mamíferos es un conglomerado con forma de L que tiene un peso de aproximadamente 1000 KDa, siendo el más grande de todos los complejos respiratorios (Devlin, 2004); está constituido por al menos 46 subunidades (39 están codificadas en el ADN nuclear y 7 por el ADN mitocondrial), un flavín mononucleótido (FMN) y 5 grupos hierro-azufre (Fe-S) (Monza, *et.al.*, 2008).

Los electrones son transferidos desde el NADH a la ubiquinona para formar ubiquinol, con un potencial redox de alrededor de 310 mV a través del FMN que es parte del Complejo I (Nicholls, 1987). 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 y de pH (Roskoski, 2003). El complejo I puede ser inhibido por rotenona o piericidina A (Chiva-Tomás, 2011; Nicholls, 1987).

2.4.3.1.2 Complejo II. Succinato deshidrogenasa o Succinato:ubiquinona oxidoreductasa.

El complejo II está formado por 4 subunidades polipeptídicas: dos unidades hidrófobas ancladas a la membrana y dos subunidades hidrófilas. Una subunidad contiene FAD y la otra subunidad contiene los centros Fe-S 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 (Voet y Voet, 2006; Devlin, 2004). 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 (Roskoski, 2003). El complejo II cataliza la reacción de oxidación de succinato a fumarato en el ciclo de Krebs, transfiriendo dos electrones al FAD, formando FADH₂, el cual transfiere los electrones del succinato a la ubiquinona, vía los tres centros Fe-S del complejo II (Devlin, 2004). La pequeña cantidad de energía libre es insuficiente para bombear protones a través de la membrana mitocondrial por lo que en las reacciones del complejo II no hay ganancia de energía libre. Este complejo enzimático es inhibido por la carboxina y la tenoiltrifluoroacetona (TTFA), así como por el malato, que actúa como inhibidor competitivo del succinato (Devlin, 2004).

2.4.3.1.3 Complejo III. Citocromo c reductasa o Ubiquinona: citocromo c oxidoreductasa

Es una lipoproteína multimérica transmembranal formada por dos monómeros idénticos de 11 cadenas polipeptídicas en mamíferos, mientras que en la levadura *S. cerevisiae* se compone de 9 subunidades proteicas diferentes. Tres de estas subunidades poseen los grupos prostéticos que participan en el transporte de electrones del complejo. Todas sus subunidades están codificadas en el genoma nuclear excepto el citocromo *b*, el cual está codificado en el genoma mitocondrial, el complejo III posee una masa de 250 kDa (Monza, 2008).

Las subunidades catalíticas del complejo III consisten de un citocromo tipo *b*, un citocromo *c*₁ y una proteína de Rieske o proteína Fe-S (Karp, 2006). 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 proteína de Rieske posee una agrupación de dos átomos de hierro y dos de azufre (Fe₂S₂) (Monza, 2008).

El complejo III cataliza la transferencia de electrones del ubiquinol (forma reducida de la ubiquinona CoQH₂ o UQH₂) al citocromo *c*. Por cada par de electrones que se transfiere al complejo III se bombean cuatro protones a través de la membrana, dos provienen de la molécula de ubiquinol que ingresó al

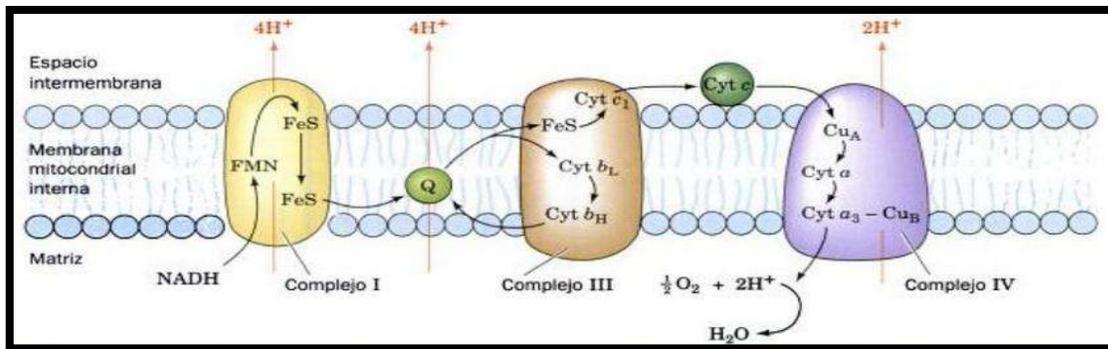
complejo y dos provienen de la matriz y se transfieren hacia una segunda molécula de ubiquinol (Devlin, 2004).

El complejo es inhibido por antimicina A, la ilicicolina H y la funiculosina, que actúan en el sitio de reducción del citocromo b_H (Nicholls, 1987), y por el mixotazol y la estigmatelina, que actúan en el sitio de reducción de la quinona (sitio Q_i) (Robinson *et al.*, 1993).

2.4.3.1.4 Complejo IV. Citocromo c oxidasa.

El complejo IV es un homodímero. El núcleo de la enzima está compuesto de tres subunidades mayores más hidrófobas; las subunidades I, II y III (Voet y Voet, 2009). Este complejo contiene 4 cofactores redox activos: dos átomos de Cu^{2+} que forman el sitio denominado Cu_A , un hemo tipo *a* y un centro binuclear hemo a_3-Cu_B (Roskoski, 2003). La enzima presenta tres centros metálicos redox inactivos (Mg^{2+} , Zn^{2+} y Na^+). El papel de los sitios metálicos inactivos en la catálisis se desconoce (Cortés Rojo, 2005).

Este es el paso final del transporte de electrones, por la transferencia sucesiva de electrones del citocromo *c* reducido al oxígeno. Por cada molécula de oxígeno reducida se captan ocho protones de la matriz, de los cuales cuatro se consumen en la formación de dos moléculas de agua y el resto se translocan a través de la membrana hacia el espacio intermembranal (Karp, 2006). En estudios espectroscópicos se ha observado que la transferencia electrónica del complejo IV es lineal dado que procede desde el citocromo *c* hasta el centro Cu_A , luego hasta el hemo *a* y por último hasta el hemo a_3 y el Cu_B ; estos grupos redox forman realmente un complejo binuclear simple (Voet y Voet, 2009). Este complejo se inhibe por cianuro, azida, óxido nítrico y monóxido de carbono (Roskoski, 2003; Voet y Voet, 2006).



Esquema 1.5 La cadena de transporte de electrones. El diagrama indica las vías de transferencia electrónica (negro) y la translocación de protones (rojo). Los electrones se transfieren entre los complejos I y III mediante la coenzima Q soluble

en la membrana y entre los complejos III y IV por la proteína citocromo c de la membrana periférica. El complejo II transfiere electrones desde el succinato hacia la coenzima Q. Tomado de (Koolman, 2004).

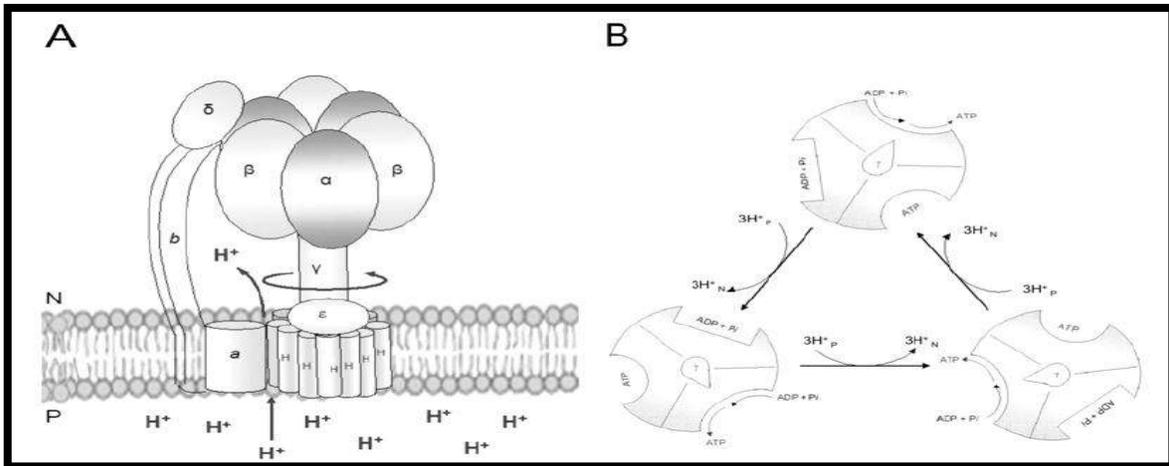
2.4.3.2 F_1F_0 -ATP sintasa

A la F_1F_0 -ATP sintasa se le representa como un motor molecular debido a su mecanismo catalítico (Esquema 1.5). También se encuentra anclada a la membrana mitocondrial interna. Es una proteína transmembranal multimérica en forma de hongo, con una masa molecular total de 450 KDa (Monza, 2008; Voet y Voet, 2009). Este complejo está formado por dos unidades funcionales: una cabeza F_1 esférica y soluble (Young *et al.*, 2003), la cual está involucrada en el movimiento de la enzima durante la catálisis y una sección basal, llamada F_0 , incrustada en la membrana interna. F_1 y F_0 se conectan mediante un tallo central y uno periférico, las cuales se mantienen estáticas durante la síntesis de ATP y a su vez mantienen fijas a las subunidades catalíticas (Estrada-Cano *et al.*, 2011).

- a. F_0 . Es una proteína transmembrana insoluble en agua que contiene hasta ocho tipos diferentes de subunidades. Contiene un canal protónico desde el espacio intermembranal a la matriz (Voet y Voet, 2009; Karp, 2006). En presencia de oligomicina, un antibiótico que se une a este canal, no ocurre el pasaje de H^+ , y por lo tanto se inhibe la síntesis de ATP (Monza, 2008).
- b. F_1 . Es una proteína de membrana periférica soluble en agua de cinco tipos diferentes de subunidades que se disocian con facilidad de F_0 por tratamiento con urea. Las subunidades α y β se disponen en forma alternada con la apariencia de gajos de naranja (Karp, 2006). Tiene forma de hongo en su parte superior. Contiene las unidades catalíticas de la ATPasa, que en presencia de Mg^{2+} cataliza la hidrólisis lenta que permite sintetizar el ATP a partir del ADP y P reacción que no es inhibida por la oligomicina (Voet y Voet, 2009; Roskoski, 2003; Monza, 2008). El antibiótico Aurovertina inhibe la unión del ADP con F_1 (Lehninger, 1972).

La síntesis de ATP está acoplada a un gradiente electroquímico de protones, que es generado por los complejos enzimáticos de la CTE durante la oxidación de

sustratos. Cuando los protones atraviesan la membrana por un conducto formado en el dominio F_0 (entre las subunidades a y c) provocan un giro de un anillo de proteolípidos formado por la subunidad c (Esq.1.5). Esta rotación hace girar al tallo central (subunidades g y ϵ) en movimientos de 120° , provocando cambios conformacionales consecutivos en las subunidades catalíticas (subunidades α y β) e induciendo la unión de sustratos ($ADP + P_i$), la síntesis de ATP y su liberación (2) (Estrada- Cano *et al.*, 2011).



Esquema 1.5 El mecanismo catalítico de la ATP sintasa. (A) Los protones atraviesan la membrana del lado P hacia el lado N a favor de su gradiente electroquímico, por un conducto formado entre las subunidades a y c , provocando un giro de 120° en la subunidad γ , que a su vez produce cambios conformacionales en las subunidades catalíticas. (B) Las tres subunidades catalíticas β adquieren conformaciones diferentes durante la síntesis de ATP: abierta, semiabierta y cerrada. Cuando la subunidad pasa del estado cerrado al abierto se libera una molécula de ATP, y a su vez se captan las moléculas de ADP y fosfato (2). Con estos sustratos, la subunidad β cambia a una conformación semiabierta, donde se lleva a cabo la reacción de formación del ATP, y posteriormente uno de los sitios catalíticos se abre para liberar el producto. Este ciclo se repite en forma alterna en las tres subunidades β de la ATP sintasa. Tomado de (Estrada- Cano *et al.*, 2011)

2.4.4 Fosforilación Oxidativa

Este proceso se define como la síntesis endergónica de ATP que se lleva a cabo en la membrana mitocondrial interna a partir de ADP y P_i , catalizado por la F_1F_0 -ATP sintasa translocadora de protones y conducida por el proceso de transporte de electrones (complejos I-IV) y el bombeo de protones (Young *et al.*, 2003; Devlin, 2004).

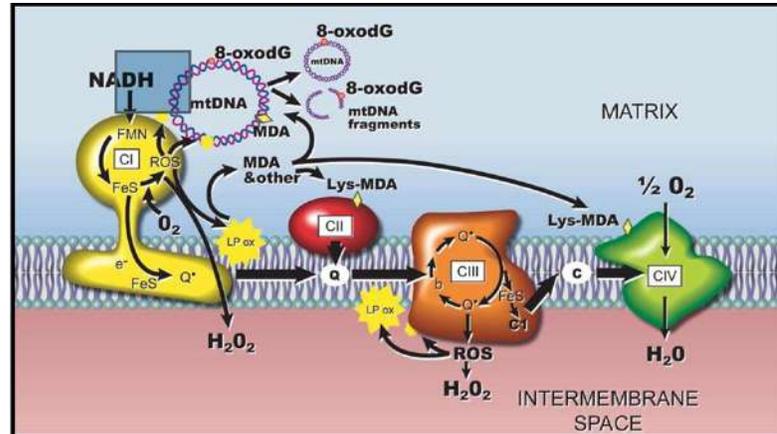
El ATP tiene un papel central que como fuente de energía para todos los procesos endergónicos celulares. Así, aquellos procesos endergónicos celulares que tengan mayor requerimiento de ATP serán los más afectados en el caso de producirse fallos en su producción. Los agentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa permiten la continuación del transporte electrónico, pero eliminan indirectamente la conversión del ADP al ATP (Roskoski, 2003), ya que estimulan la velocidad de consumo de oxígeno de las mitocondrias en ausencia del ADP, además provocan un aumento de actividad hidrolítica sobre el ATP por la reacción reversa de la F_1F_0 -ATP sintasa.

2.5 Especies reactivas de oxígeno (ERO) y estrés oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son un conjunto de especies químicas reactivas producidas en algunos procesos metabólicos en los que participa el oxígeno. La mitocondria, por tanto, no sólo es el principal foco de producción de ERO de la célula, sino que también resulta ser su primera y principal diana. La CTE de la mitocondria es el principal sitio de generación de ERO en las células aerobias eucariotes (Beckman y Ames, 1998). Alrededor del 2-6% del consumo de oxígeno se destina a la producción de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el 80% de éste se genera en la mitocondria a nivel de la CTE.

Las ERO se forman por varias fuentes extrínsecas e intrínsecas. Diversos factores tales como la presencia de inhibidores del transporte de electrones, aumentos en la concentración mitocondrial de calcio y de metales de transición, defectos genéticos de las proteínas que constituyen la CTE, entre otros, pueden generar una condición de estrés oxidativo en donde la producción de ERO sobrepasa la capacidad antioxidante de la célula (Halliwell *et al.*, 1992). 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. La generación de $O_2^{\bullet-}$ en el complejo III se debe a la fuga de electrones en el sitio quinol reductasa (Q_i) del complejo III, el cual está formado por dominios del citocromo *b* cerca del hemo b_H . La generación de ERO aumenta por inhibidores del sitio Q_i como la antimicina A, debido a la inhibición de la reoxidación de los grupos hemo del citocromo *b* que dan lugar a la aparición de reacciones colaterales al ciclo Q que están mejor favorecidas desde el punto de vista termodinámico que las reacciones catalizadas por el ciclo Q y que son responsables de la reducción parcial del O_2 a $O_2^{\bullet-}$ (Cortés Rojo *et al.*, 2009).

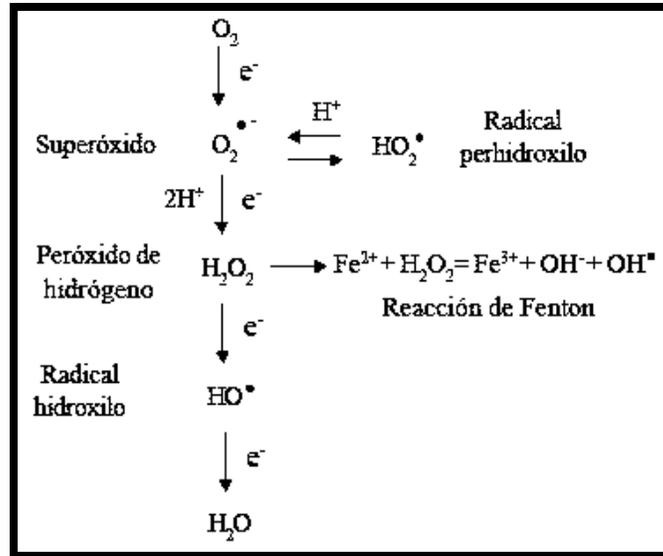
El $O_2^{\bullet-}$ generado puede liberarse al espacio intermembranal a través de poros en la membrana ya que no es capaz de atravesar las membranas biológicas mientras que el H_2O_2 sí es capaz de hacerlo (Cortés Rojo *et al.*, 2005)



Esquema 1.6 Diagrama de la CTE y la producción de ERO. El esquema muestra a los complejos I y III como los principales generadores de ERO, los cuales dañan lípidos, carbohidratos, proteínas y ADN mitocondrial, que se encuentran próximos a su lugar de liberación. Además, los productos de la peroxidación lipídica incluyen moléculas altamente reactivas que pueden propagar el daño oxidativo a lo largo de la membrana mitocondrial y a otras estructuras del orgánulo y la célula (Tomado de Hulbert *et al.*, 2007b).

Las ERO son compuestos que se derivan de la molécula de oxígeno O_2 por reducción química parcial. El oxígeno molecular en su forma más estable (O_2 , en esta forma se encuentra en el aire que nos rodea) se puede considerar como un radical libre pues tiene dos electrones no apareados, con giros paralelos y es un potente agente oxidante. Sin embargo, para oxidar una molécula no radical y aceptar un par de electrones, estos electrones deben de tener el mismo giro (paralelo) para ocupar los orbitales vacantes en el O_2 . Los electrones de un átomo o de una molécula no cumplen con este criterio puesto que tienen giro antiparalelo. Esta restricción de giro hace que el O_2 acepte sólo un electrón a la vez y explica porqué reacciona lentamente con la mayoría de las moléculas no radicales. Por el contrario, reacciona notablemente rápido con radicales por transferencia de un solo electrón (Halliwell y Gutteridge, 2006). Así, aunque el oxígeno molecular en su estado basal es poco reactivo, su reducción parcial genera ERO, incluyendo el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}). La primera reacción en la reducción parcial del oxígeno molecular es la adición de un electrón para formar $O_2^{\cdot-}$. Este puede ser protonado a pH bajo ($pK_a = 4.8$) para formar el radical perhidroxilo (HO_2^{\cdot}). El $O_2^{\cdot-}$ y HO_2^{\cdot} sufren una dismutación espontánea para producir H_2O_2 (Esquema 1.6). El H_2O_2 es estable y menos reactivo que el $O_2^{\cdot-}$. 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 (Cortés-Rojo, 2005)

El HO[•] es un oxidante muy fuerte y puede iniciar reacciones en cadena de radicales con una gran variedad de moléculas orgánicas, esto puede llevar a la peroxidación de lípidos, inactivación de enzimas, y degradación de ácidos nucleicos. La mayoría de las moléculas biológicas no son radicales y cuando un radical libre reacciona con un no radical, se forma un nuevo radical y sucede una reacción en cadena (Halliwell y Gutteridge, 2006).



Esquema 1.7 Química de las especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO normalmente son generadas por una reducción secuencial del oxígeno molecular. Tomado de (Deseikan *et al.*, 2005)

La producción de las ERO puede aumentar en casi cualquier situación patológica como la diabetes mellitus, aterosclerosis, el cáncer, las cataratas, insuficiencia renal aguda y crónica, en la diálisis, en la artritis, en la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la hipertensión arterial, enfermedades autoinmunes, la 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% (Albarrán-Bravo *et al.*, 2009). Las ERO que producen mayor toxicidad corresponden al anión superóxido (O₂^{•-}), el hidroxilo (HO[•]), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el óxido nítrico (NO[•]) y el peroxinitrito (ONOO[•]).

Para evitar los daños a biomoléculas por el estrés oxidativo y proteger los componentes celulares al mantener un adecuado ambiente redox, los organismos constantemente detectan y se adaptan a cualquier perturbación mediante distintos mecanismos de eliminación y transformación de las ERO por sistemas enzimáticos y no enzimáticos (Folch-Mallol *et al.*, 2004). Los sistemas

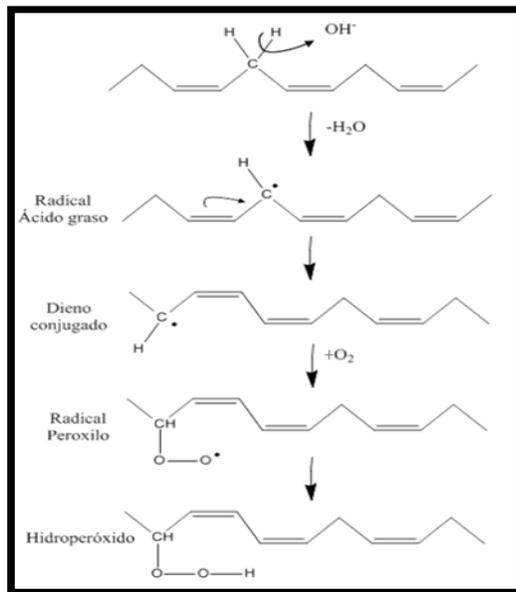
enzimáticos comprenden la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, la glutatión peroxidasa, entre otros (Robinson 1993). Las sustancias antioxidantes como el glutatión, las vitaminas C y E, los carotenoides, los flavonoides, las xantofilas y los licopenos se encargan de reducir las ERO. (Yazawa *et al.*, 2009; Avery *et al.*, 2001).

La alteración del balance en los mecanismos de producción y eliminación de las ERO, en favor de superproducción, origina el estado de estrés oxidativo en la célula. Además de provocar daños celulares, el estrés oxidativo influye en la regulación de ciertos genes involucrados en la aceleración de los procesos de envejecimiento, en la activación de rutas de apoptosis y de distintas respuestas de defensa frente al estrés oxidativo.

2.6 La peroxidación de lípidos en el proceso del envejecimiento

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 (Cortés Rojo, 2009). 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 (Esquema 1.8).

Este proceso es generalmente promovido por un radical hidroxilo, el cual extrae un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos metilénicos de la cadena hidrocarbonada de un ácido graso diénico, dando lugar a la formación de un radical lipídico, el cual rápidamente sufre un reordenamiento molecular, produciendo un dieno conjugado que reacciona con oxígeno molecular generando un radical hidroperoxilo, que a su vez extrae un átomo de hidrógeno de un carbono metilénico de otro ácido graso poliinsaturado para así formar nuevamente un radical lipídico, combinándose con otra molécula de oxígeno, continuando así una reacción en cadena (Rivera-Cabrera, 2005; Suwalsky, 2006; Adonis, 2002) (Esquema 1.8).



Esquema 1.8 Proceso de la peroxidación lipídica.

Como se ha comentado anteriormente, se han relacionado numerosos procesos de deterioro con el envejecimiento, como el ocasionado en el ADN mitocondrial, afectando directamente a la CTE. Es indiscutible que los radicales de oxígeno generados por el metabolismo celular, pueden atacar a todos los tipos de macromoléculas: proteínas, ácidos nucleicos y lípidos integrantes de las membranas, si bien es cierto que la peroxidación lipídica es cuantitativamente el proceso más importante. Este hecho es debido a la alta susceptibilidad a la oxidación de los ácidos grasos altamente insaturados.

Esta susceptibilidad viene determinada por dos factores fundamentalmente. El primero es que el oxígeno y muchos radicales libres son más solubles en las bicapas lipídicas que en medios acuosos (Moreau *et al.*, 2005). El segundo es que la presencia de dobles enlaces en la cadena carbonada de los ácidos grasos incrementa exponencialmente la susceptibilidad de éstos a ser dañados por ERO. El blanco principal de las ERO en los ácidos grasos son los carbonos con enlaces simples entre dos carbonos con dobles enlaces (Halliwell y Gutteridge, 2007). Por tanto, cuantos más dobles enlaces tenga un ácido graso, mayor será su susceptibilidad a ser dañado.

Durante el estrés oxidativo, uno de los principales blancos de daño son las colas hidrofóbicas insaturadas que componen a los lípidos de las membranas

mitocondriales. Por ejemplo, en partículas submitocondriales de corazón de bovino (Forsmark-Andréé *et al.*, 1997) y en sinaptosomas de rata (Cardoso *et al.*, 1999), 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. Asimismo, los complejos I y III de mitocondrias de corazón de ratas sujeto a un proceso de isquemia-reperfusión, 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 (Paradies *et al.*, 2002; Petrosillo *et al.*, 2003).

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 algunos procesos esenciales que dependen del funcionamiento de la CTE tales como la síntesis de ATP, el transporte de metabolitos e iones o el bombeo de protones (Nicholls y Ferguson, 2002), provocando como resultado final el colapso de la célula.

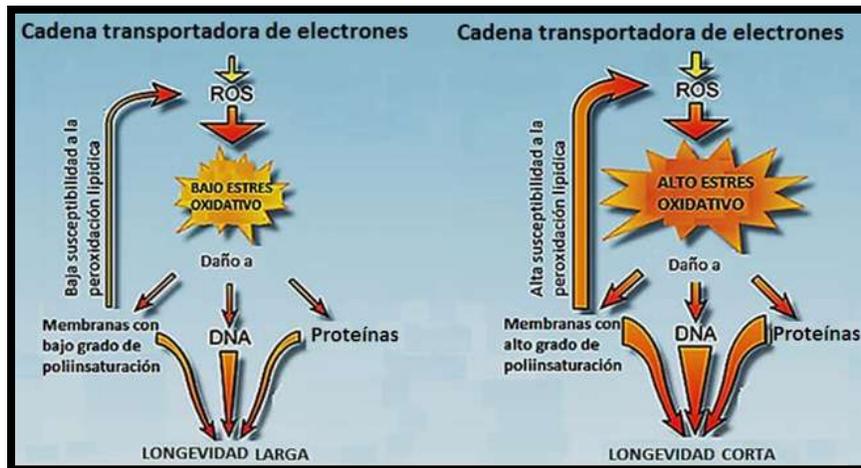
2.7 El envejecimiento y el grado de insaturación de los ácidos grasos que componen las membranas.

La teoría de los radicales libres del envejecimiento postula que la utilización de oxígeno durante el metabolismo oxidativo causa daño acumulativo que conduce al deterioro progresivo de las funciones celulares, la senescencia y la muerte (Harman, 1956; Hulbert *et al.*, 2007). Los estudios realizados en varios organismos, incluyendo seres humanos, han demostrado que la alteración en la función de los complejos de CTE se produce en paralelo al envejecimiento progresivo (Cooper *et al.*, 1992; Bowling *et al.*, 1993).

El aumento de la sensibilidad de la peroxidación de lípidos puede perjudicar el funcionamiento de la CTE y aumentar la generación de ERO durante el envejecimiento, varios estudios han demostrado que los productos finales de la peroxidación lipídica como malondialdehído y 4-hidroxinonenal disminuyen las actividades de todos los complejos CTE (Long *et al.*, 2009; Lashin *et al.*, 2005; Picklo *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1998; Kaplan *et al.*, 2007).

La susceptibilidad de las membranas biológicas a la peroxidación depende en gran manera del grado de insaturación de los lípidos que las componen, siendo mayor su susceptibilidad conforme aumenta el número de dobles enlaces (Pamplona *et al.*, 2000). Por lo tanto, 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. La preservación de la funcionalidad mitocondrial durante el estrés oxidativo se podría traducir en una mayor capacidad de la célula para sobrevivir a los efectos nocivos del estrés oxidativo.

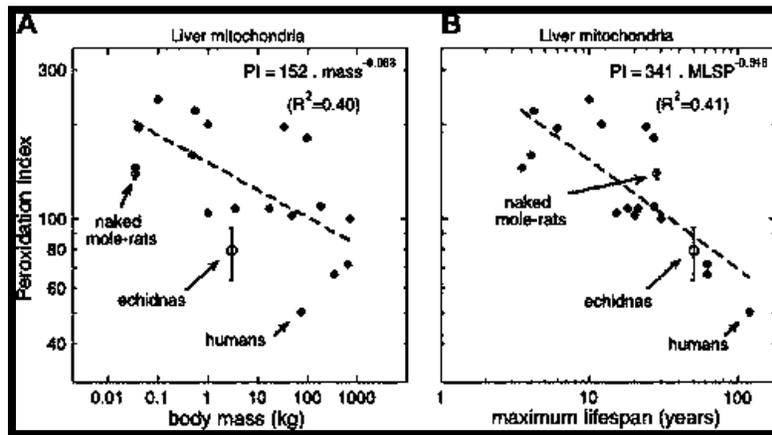


Esquema 1.9 Relación entre el grado de insaturación de los lípidos que componen de las membranas con la susceptibilidad a la lipoperoxidación en la determinación de la longevidad. Tomado y modificado de (Hulbert *et al.*, 2007).

Se ha determinado que el número total de dobles enlaces de los ácidos grasos (el índice de dobles enlaces) de membrana correlaciona negativamente con el tamaño corporal en los mamíferos (Coutre *et al.*, 1995). Después, se observó que las aves, que son mucho más longevas que los mamíferos, también tienen un menor índice de dobles enlaces que los mamíferos de igual tamaño corporal y tasa metabólica (Pamplona *et al.*, 1996). Por ejemplo, en una comparación entre 8 especies de mamíferos con máxima longevidad entre 3,5 y 46 años, se observó una correlación negativa entre la longevidad máxima y el índice de peroxidabilidad (PI, un parámetro que estima la susceptibilidad de una membrana a la peroxidación) de membranas mitocondriales de hígado. Esto se atribuyó a un menor contenido en la proporción de ácido docosahexaenóico (C22:6) (un ácido graso altamente peroxidizable) en los organismos con mayor longevidad máxima y viceversa (Pamplona *et al.*, 1998).

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

umenta el número de dobles enlaces por molécula. Por lo tanto, se hipotetizó que el bajo índice de dobles enlaces del corazón, el músculo esquelético, el riñón y el hígado de los animales longevos (Pamplona *et al.*, 2002) 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). Esto fue lo que se encontró cuando se estudió la intensidad de la peroxidación lipídica en estas especies (Esq. 1.10).



Esquema 1.10. Se muestra la correlación entre el índice de peroxidabilidad de fosfolípidos de mitocondrias de hígado con A) la masa corporal y B) la longevidad máxima de los mamíferos. Tomado de (Hulbert *et al.*, 2007).

Los productos de la peroxidación lipídica también pueden modificar covalentemente otros tipos de macromoléculas como las proteínas, causando alteraciones en su estructura y función. De acuerdo con esto, se ha observado que los niveles de malondialdehído-lisina y carboximetil-lisina, dos marcadores de daño lipoperoxidativo en proteínas, en mitocondrias de corazón son menores en los mamíferos y aves longevos, que tienen también un bajo grado de insaturación en sus ácidos grasos, que en los que envejecen rápidamente (Pamplona *et al.*, 2002). Este bajo grado de insaturación de los animales longevos no se debe a la dieta (un factor exógeno). Por el contrario, se trata de un parámetro regulado homeostáticamente a un nivel distinto en cada especie según cual sea su longevidad máxima (Pamplona *et al.*, 2002). Por otra parte, los análisis detallados de la composición en ácidos grasos indican que la causa principal del menor número de dobles enlaces de las especies longevas es la baja actividad delta-5 y delta-6 desaturasa (Pamplona *et al.*, 2002), que son limitantes para la biosíntesis de ácidos grasos muy insaturados de cadena larga como el ácido

araquidónico (con cuatro doble enlaces por molécula) y el ácido docosahexaenoico (con seis dobles enlaces) a partir de sus precursores menos insaturados.

Se ha observado que al aumentar experimentalmente el grado de insaturación de las membranas celulares se produce un aumento del daño oxidativo no sólo a lípidos sino también a proteínas y al ADN mitocondrial en cerebro de rata (Pamplona *et al.*, 2004). Estas evidencias sugieren que un PI bajo puede contribuir a extender la longevidad al disminuir la producción mitocondrial de ERO y los daños por la peroxidación lipídica. Otra línea de evidencia que también apoya el papel de la peroxidación lipídica en el envejecimiento es la acumulación en células post-mitóticas de individuos envejecidos de lipofuscina, un pigmento no degradable que es el resultado de la reacción entre los lípidos dañados oxidativamente y proteínas (Terman y Brunk, 2004), siendo su acumulación más rápida en organismos con longevidades más cortas (Nakano *et al.*, 1995).

2.8 Ácidos grasos

Los ácidos grasos son ácidos monocarboxílicos de cadena larga, que generalmente contienen un número par de átomos de carbono, normalmente entre 8 y 22. (Rodríguez *et al.*, 2005).

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

- Son necesarios para la estructuración y la correcta funcionalidad de las membranas celulares.
- 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.
- Son precursores de otros ácidos grasos tales como el ácido araquidónico (precursor de las prostaglandinas) (Brena, 2002).

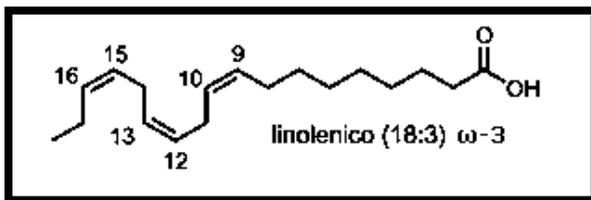
2.8.1 Ácido α -linolénico (ALA)

El ácido α -linolénico (ALA) es el ácido graso esencial primario o generador de la familia n-3. Cuenta con 18 átomos de carbono y posee tres dobles enlaces. (FAO y FINUT 2012) (Esquema 1.11). Se le considera un ácido graso

esencial que se requieren en la dieta, debido a que el cuerpo humano no lo produce. El ALA juega papeles importantes en la salud humana (Morris,2007).

El primer doble enlace del ALA se encuentra en el tercer átomo de carbono partiendo del extremo metilo de la cadena de ácidos grasos, de ahí el nombre de n-3. El ALA también puede ser desaturado y elongado para formar otros ácidos grasos n-3. El ALA se encuentra sobre todo en las plantas y presenta mayores concentraciones en algunas semillas y frutos secos y en algunos aceites vegetales (FAO y FINUT 2012). El cuerpo humano utiliza ALA para generar energía en forma de ATP, para la formación de cuerpos cetónicos y se almacena en el tejido adiposo para cubrir necesidades futuras de energía (Morris,2007).

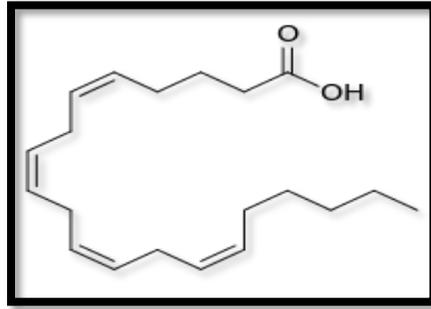
El ALA se incorpora en los triacilgliceroles (triglicéridos) y los fosfolípidos de las membranas de las células, en donde afecta la manera en que los nutrientes son transferidos dentro y fuera de la célula y como las células se comunican unas con otras (Morris,2007).



Esquema 1.11. Estructura química del ALA.

2.8.2 Ácido araquidónico (AA)

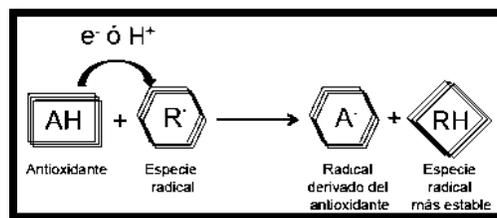
El ácido araquidónico (AA) o ácido eicosatetraenoico, es un ácido graso no esencial porque el organismo lo puede sintetizar a partir del ácido linoleico (poliinsaturado de la serie n-6). Es el ácido graso poliinsaturado más importante de la familia n-6 porque es el precursor principal de los eicosanoides derivados de dicha familia. El AA está formado por una cadena de 20 carbonos con cuatro dobles enlaces cis en las posiciones 5, 8, 11 y 14 (C₂₀:4 n-6 (5,8,11,14)) (Esquema 1.13). Es el precursor de los prostanoideos (prostaglandinas y tromboxanos) de la serie 2 y de los leucotrienos de la serie 4. (Rodríguez *et al.*, 2005).



Esquema 1.12. Estructura química del AA.

2.9 Antioxidantes

Para prevenir y proteger a los componentes celulares del daño inducido por los radicales libres, ERO y otras especies reactivas, los organismos aerobios han desarrollado un elaborado mecanismo de defensa denominado sistema de defensa antioxidante (Halliwell, 2006). Un antioxidante es aquella especie química que tiene como función retardar, prevenir o eliminar el daño oxidativo causado por las ERO en otras moléculas (Halliwell, 2006). Los sistemas antioxidantes trabajan mediante dos tipos de mecanismos que permiten eliminar los excesos de ERO, mediante la protección estequiométrica y la catalítica. La protección estequiométrica consiste en la neutralización por medio de moléculas pequeñas que inactivan una o dos moléculas de especies reactivas (Esq. 1.13). La protección catalítica se produce con enzimas que inhiben las reacciones de oxidación y evitan la formación de ERO (Lozada y García, 2009).



Esquema 1.13. Mecanismo antirradical de las moléculas antioxidantes. Tomado de (Casadevall, 2009).

Los sistemas antioxidantes o mecanismos de defensa que ha desarrollado los organismos para protegerse de los ataques oxidativos, pueden clasificarse en función de su origen en sistemas antioxidantes endógenos, enzimáticos, y no enzimáticos y sistemas antioxidantes exógenos, que se adquieren a través de la dieta.

Sistemas de defensa antioxidantes endógenos:

Sistemas enzimáticos

- Superóxido dismutasa (SOD) transforma el oxígeno en peróxido de hidrógeno (H_2O_2).
- Glutación peroxidasa (GPX): es una enzima dependiente de selenio que cataliza la reducción de hidroperóxidos, pueden actuar como aceptor del tert-butilhidroperóxido, el cumeno hidroperóxido y el hidroperóxido del ácido linoleico. También cataliza la reducción del H_2O_2 y de hidroperóxidos de lípidos utilizando el glutación reducido (GSH) como donador de electrones.
- Catalasa (CAT): es una enzima ampliamente distribuida en bacterias aerobias, plantas y animales, localizada en los peroxisomas y las mitocondrias, la cual convierte al H_2O_2 en O_2 y H_2O ; con donadores de hidrógeno como metanos, etanol y fenoles presenta actividad peroxidasa. (Céspedes *et al.*, 2000; Avery, 2001).

Sistemas no enzimáticos

- El tripeptido glutación (GSH) en su forma reducida, es el antioxidante que se encuentra en mayor concentración dentro de la célula. Actúa como cofactor de la GPx para detoxificar H_2O_2 y es capaz de interactuar directamente con las ERO.
- La bilirrubina y el ácido úrico se han propuesto como antioxidantes al unirse a metales e impedir reacciones tipo Fenton. El ácido úrico también es eficiente protegiendo contra el O_3 , el NO^* y las especies reactivas del nitrógeno (ERN).
- La histidina y otros compuestos de la misma familia que eliminan ERO por secuestro directo de radicales, uniéndose al H_2O_2 , eliminando O_2 o uniéndose metales de transición.
- La hormona melatonina, que atrapa una gran variedad de ERO además de estimular la síntesis de importantes enzimas antioxidantes (SOD, GPx) (Céspedes *et al.*, 2000; Avery, 2001).

Sistema de defensa antioxidante exógenos

- Proteínas: Un déficit de proteínas en la dieta provocaría una disminución en el aporte de aminoácidos como glutamina, cisteína y arginina constituyentes de las enzimas antioxidantes, lo que causaría una sobreproducción de radicales libres por disminución de estas enzimas.
- Lípidos: la ingesta de ácidos grasos ω -3 disminuye el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, ya que parecen actuar como inhibidores de la producción de las ERO aumentando la expresión de genes antioxidantes.
- Vitaminas: ciertas vitaminas inhiben la producción de óxido nítrico(NO) y otras actúan como secuestradoras de EROy reguladoras de la actividad de las enzimas antioxidantes. Destacan la vitamina E, que inhibe la formación de ERO inducida por radicales lipídicos y la vitamina C, una eficaz secuestradora de ERO.
- Fitoquímicos: carotenoides, licopenos, estilbenos (resveratrol), flavonoides, glucosinolatos.

2.10 Resveratrol

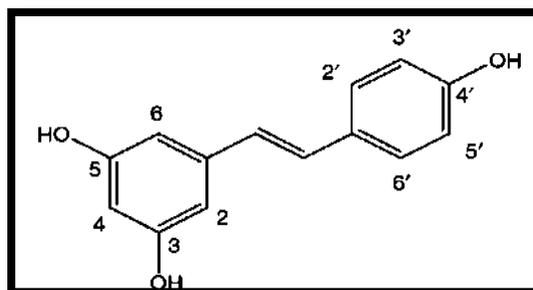
El resveratrol (5 - [(E) -2- (4-hidroxifenil) etenil] benceno-1,3-diol) es un fotoquímico del grupo de los polifenoles (flavonoides y catequinas), un tipo de fenol natural, y una fitoalexina presente en las uvas y en productos derivados como vino y mosto, también en frutos secos, oliva, *Poligonum cuspidatum*, frutos del bosque y en otros alimentos como las ostras, los cacahuates y las nueces, especialmente las raíces de la sanguinaria mayor japonesa. Se encuentra en más de 70 especies vegetales y se sintetiza en respuesta a situaciones de stress (p. ej., radiación ultravioleta o infecciones fúngicas) (Aggarwal y Shishodoa, 2006).

El resveratrol posee propiedades antioxidantes y antiinflamatorias y por lo tanto, puede tener un potencial en el tratamiento de diversas enfermedades como las cardiovasculares, cáncer, diabetes, enfermedad de Alzheimer y enfermedades autoinmunes. Por lo tanto, los alimentos y bebidas que contienen esta sustancia se consideran saludables o recomendables para la salud (Auriakson et al., 2008;

Baur *et al.*,2006; Blanchet *et al.*,2008; Dudley *et al.*,2008; Komina *et al.*, 2008; Millán *et al.*, 2007; Stefani *et al.*, 2007).

2.10.1 Propiedades químicas y físicas del Resveratrol

El resveratrol es un polvo de color blanquecino (a partir de MeOH) con un punto de fusión de 253-255 ° C, su fórmula molecular es C₁₄ H₁₂ O₃ y su peso fórmula es de 228.25g/ mol. (Aggarwal y Shishodoa, 2006). El esqueleto estructural esencial de la molécula se compone de dos anillos aromáticos unidos por un doble enlace estireno (Esq. 1.14).



Esquema 1.14. Estructura química del Resveratrol (Howitz K *et al.*,2003).

La presencia del doble enlace facilita las formas isoméricas del resveratrol *trans* y *cis*. El isómero *trans*-resveratrol ha demostrado ser la forma biológica más activa de resveratrol. Se ha reportado que el *trans*-resveratrol en forma de polvo es estable bajo condiciones de estabilidad acelerada de 75% de humedad y 40°C en presencia de aire (Aggarwal y Shishodoa, 2006).

2.10.2 El resveratrol y el envejecimiento

Diversos estudios han mostrado que el resveratrol promueve la supervivencia y la longevidad, lo cual ha abierto líneas de investigación sobre los efectos del resveratrol y moléculas relacionadas en la mitigación de enfermedades humanas relacionadas con la edad tales como la neurodegeneración, la carcinogénesis y la arteriosclerosis (Ferguson, 2001; Janget *et al.*,1997; Middleton, 2000).

El resveratrol prolonga significativamente la longevidad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Howitz *et al.*,2003). Estudios posteriores demostraron que el resveratrol también prolonga la longevidad del gusano *Caenorhabditis elegans* y la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Tissenbaum *et al.*,2001).

2.10.3 Posibles mecanismos mediante los cuales actúa el resveratrol en el envejecimiento

Son muy conocidas las propiedades de antioxidantes del resveratrol y desde hace tiempo, se descubrió que estepolifenolactúa probablemente estimulando una familia de genes denominados SIRT que silencian el ADN o parte de él a través de las acciones de las sirtuinas, las cuales son desacetilasas de histonas que previenen el envejecimiento celular. Se conocen actualmente 7 tipos de estos genes (SIRT1-SIRT7) (Sinclair *et al.*,2005;Mikhail *et al.*,2007;Pallàset *al.*,2008; Westphalet *al.*,1991).

Las sirtuinas son reguladores universales del envejecimiento de todos los organismos vivos, permiten que las células sobrevivan al daño y demoran el envejecimiento de la célula misma. Operan como guardianes de las células protegiendo sus estructuras y previniendo las enfermedades características del envejecimiento tales como las enfermedades neurodegenerativas, la diabetes, el fotoenvejecimiento, la arterioesclerosis y otras (Rampoldi *et al.*, 2010). Uno de los mecanismos de acción de estas proteínas es a través de la modulación de la acción del gen P53, denominado “*el guardián del genoma*”, que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 y resulta esencial para inducir la respuesta de la célula ante el daño del ADN. El camino hacia la apoptosis o la supervivencia de la célula, está regulado por un complejo mecanismo de activación o inhibición de las sirtuinas, las cuales actúan a través de la modulación de la acción del gen p53. Múltiples estudios comprueban el papel del resveratrol en estos mecanismos (Kruszewski *et al.*,2005;Rayalam *et al.*,2008; Yamamoto *et al.*,2007).

La acción de las sirtuinas se desarrolla sobre las proteínas histonas, que forman “carretes, bobinas o selenoides” donde se envuelven las cadenas de ADN. Las histonas protegen el ADN celular, su acción en la zona de los telómeros del cromosoma evita un rápido acortamiento de los mismos, lográndose de esta manera una mayor supervivencia de las células. (Mikhail *et al.*, 2007; Westphalet *al.*,1991). Estos “carretes o bobinas” protegen y controlan el acceso al propio ADN, evitando que se dividan los telómeros, ya que en cada división se pierden de 50 a 70 nucleótidos. El acortamiento de los telómeros es cada vez mayor a medida que se envejece, por lo que la protección del mismo juega un papel fundamental en el envejecimiento.

Inicialmente, se consideró la posibilidad de que la estimulación de SIRT1 podría simplemente representar un mecanismo de reparación oxidativa. Se desestimó esta explicación con base en tres observaciones.

- Una variedad compuestos protectores contra las acciones de los radicales libres, incluyendo antioxidantes, quelantes y atrapadores de radicales no lograron estimular a SIRT1.
- Entre los diversos polifenoles con capacidad antioxidante equivalente, se observó una diversa actividad estimulante de SIRT1 (Stojanovic *et al.*, 2001).
- El resveratrol puede estimular la actividad de las sirtuinas *in vivo*. (Howitz *et al.*, 2003)

Estos datos indican que el efecto del resveratrol sobre las sirtuinas puede ser más relevante que su actividad como antioxidante (Ferguson *et al.*, 2001; Middleton *et al.*, 2000).

2.11 Ácido ascórbico

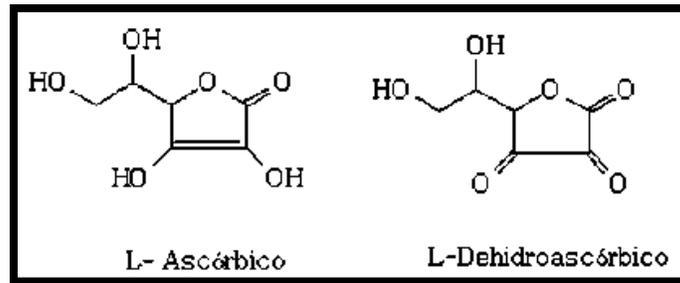
El ácido L-ascórbico o vitamina C ($C_6H_8O_6$), también conocido como ácido cevilámico o antiescorbútico, es la forma enol de la 2-ceto-1-gulofurano lactona. La vitamina C está presente en frutas (cítricos, fresas, melones, piña, plátanos y uvas), en vegetales (coles de brúcelas, espárragos y espinacas) y productos animales tales como carne, hígado y leche (Levine *et al.*, 1995).

La vitamina C Interviene en muchas reacciones metabólicas importantes. Es esencial para la formación de las encías y su deficiencia produce anemia, deficiencias en la cicatrización de heridas y susceptibilidad a las infecciones. También es importante en el metabolismo de carbohidratos y en el control de los procesos infecciosos (Arilla, 1995; Beyer *et al.*, 1994; Rose *et al.*, 1996)

2.11.1 Propiedades químicas y físicas del Ácido ascórbico

El ácido ascórbico es un cristal incoloro, inodoro, sólido, soluble en agua, con un ácido. Tiene características reductoras por sus grupos protonados. Es hidrosoluble y termolábil y se oxida en el aire con facilidad, su temperatura de fusión es de 189-192 °C. La mayoría de las reacciones metabólicas del ácido ascórbico se deben a su fuerte potencial reductor (Arilla, 1995). Su actividad antioxidante deriva del desplazamiento de ácido L-ascórbico a su forma oxidada L- dehidroascórbico (Esquema 1.16). Esto también habilita a la molécula para combatir radicales oxidativos ($O_2^{\cdot -}$ y OH^{\cdot}) y los radicales acuosos como el oxígeno singulete. (Arilla, 1995; Beyer *et al.*, 1994; Rock *et al.*, 1996). La vitamina C tiene dos valores de pKa y su grado de ionización va a influir en la forma antioxidante: entre más ionizado se encuentre mayor probabilidad tendrá de ser un

antioxidante. Las dos formas moleculares principales del ácido ascórbico se encuentran en equilibrio y ambas presentan actividad biológica (Arilla, 1995).



Esquema 1.15. Formas moleculares en equilibrio del ácido ascórbico. Tomado de (Arilla, 1995).

2.11.2 Ácido ascórbico y el envejecimiento

Son diversos los estudios científicos que demuestran cómo algunos nutrientes antioxidantes, entre los cuales destaca el ácido ascórbico, contribuyen a la defensa de algunas patologías degenerativas, neoplasias, enfermedades cardiovasculares, cataratas y envejecimiento cutáneo (Alessandrini, 2013).

El ácido ascórbico desempeña un papel esencial en la síntesis de colágeno en el organismo. Esto, aunado a sus propiedades como agente antioxidante, contribuye en la prevención de los daños a la piel provocados por la radiación solar o por la exposición a ciertos contaminantes atmosféricos. Por otro lado, el ácido ascórbico interviene en el proceso de transformación de la prolina en hidróxidoprolina, constituyente esencial del colágeno. El aumento local de esta vitamina significa por tanto favorecer de forma significativa la producción del colágeno; por consiguiente se verifica una mejora de la elasticidad cutánea y una mayor resistencia de la pared de los vasos capilares. Otra de las acciones del ácido ascórbico es neutralizar los radicales libres y regenerar la vitamina E: ambas acciones conducen a una disminución en la formación de los lipoperóxidos. Además, el ácido ascórbico aplicado localmente previene la formación de posibles tumores cutáneos debidos a los daños provocados en el ADN por los rayos UVB. (Alessandrini, 2013)

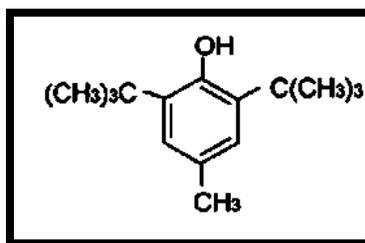
El ácido ascórbico disminuye de forma consistente con el paso del tiempo; de hecho, el envejecimiento cutáneo presenta una disminución de la microcirculación dérmica, con la consiguiente reducción en la aportación de sustancias nutritivas a las células y, por tanto, del mismo ácido ascórbico. (Riveros Rosas, 2003).

2.12 Butilhidroxitolueno (BHT)

Es un antioxidante sintético procedente de la industria petrolera, reciclado su uso como aditivo alimentario. Se utiliza prácticamente siempre mezclado con el butilhidroxianisol (BHA). Aparte de poseer actividad antioxidante, también posee actividad antiviral y antibiótica (Brooks, 2014).

2.12.1 Características físicas y químicas del BHT

El BHT tiene la fórmula molecular $C_{15}H_{24}O$, es un polvo sólido, cristalino, de color blanco y de olor suave con un punto de fusión de $68^{\circ}C$, un punto de ebullición $265^{\circ}C$ y una densidad de $1,01\text{ g/cm}^3$. Es soluble en lípidos.



Esquema 1.16. Estructura química del BHT. Tomado de (Brooks, 2014).

2.12.2 El BHT y el envejecimiento

En 1968, Harman probó el BHT y otras sustancias conocidas por inhibir las reacciones generadas por los radicales libres sobre el envejecimiento y la esperanza de vida. En determinados experimentos demostró que, si se administra a los ratones durante toda su existencia, el BHT permitía aumentar la duración de la misma entre un 30 y un 50%. Harman demostró así por tanto que sustancias antioxidantes potentes, como el BHT, protegían contra ciertos factores que podían repercutir en la esperanza de vida, como una susceptibilidad hereditaria al cáncer, una mala alimentación o incluso el efecto de las radiaciones (Harman, 1968).

El gran poder antioxidante del BHT le confiere así importantes propiedades «antiedad», lo que permite luchar contra los perjuicios de los rayos UV, el tabaco y las radiaciones ionizantes.

2.12.3 Posibles mecanismos mediante los cuales actúa el BHT en el envejecimiento

La mayoría de los antioxidantes utilizados en la actualidad, son compuestos fenólicos uno de los cuales es el BHT (Charley, 1998). El BHT es un donador de protones que no detiene la formación de los radicales que se generan en la oxidación, sino, al reaccionar con ellos los estabiliza y se producen radicales del antioxidante que son menos activos, es decir, se consumen en la reacción y por lo tanto la estabilidad del lípido siempre dependerá de la cantidad residual de aditivo presente (Belitz y Grosh, 1998).

El BHT inhibe la peroxidación de lípidos atrapando radicales peroxilo intermedios que promueven la fase de propagación de este proceso (Porter, 1986). El BHT tiene un efecto protector contra la inhibición inducida por la peroxidación lipídica en la CTE de mitocondrias de la levadura *S. cerevisiae* al proteger la actividad de los complejos III y IV contra los efectos dañinos del Fe^{2+} y prevenir el aumento en la formación de ERO (Cortés Rojo, 2009). Por lo tanto, dado que la inhibición de los complejos de la CTE y la consecuente formación de ERO juegan un papel importante en el envejecimiento, es probable que los efectos benéficos del BHT estén relacionados con una prevención del daño sobre la CTE y una inhibición de la formación de ERO.

2.13 *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, mejor conocida como “levadura de cerveza”, ha sido estudiado ampliamente dada su importancia en la industria panadera y vitivinícola a nivel industrial. Este microorganismo puede aislarse con gran facilidad de plantas y de la tierra (Bouza y Muñoz, 2004; Folch-Mallol *et al.*, 2004).

S. cerevisiae es un microorganismo unicelular, eucarionte perteneciente al reino Fungi, sub-reino Amastigomycota donde se agrupan aquellos hongos que producen esporas sexuales y asexuales y que son habitantes comunes de hábitats terrestres (Talaro, 1999). *S. cerevisiae* también es considerado un hongo dimórfico pues produce por gemación células esféricas individuales denominadas levaduras o en ausencia de nitrógeno, estructuras pseudohifales (Gimeno *et al.*, 1992). 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 (Roskoski *et al.*, 2003). 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 (Chiva-Tomás, 2011).

Las levaduras crecen como colonias cremosas similares a las bacterianas (Bonifaz, 2000). La mayoría son mesofílicas, con una temperatura máxima de crecimiento entre 24 y 48°C, toleran un rango de pH entre 3 y 10, pero prefieren un medio ligeramente ácido con un pH de 4.5 - 6.5 (Déak y Beuchat *et al.*, 1996). El genoma de *S. cerevisiae* es relativamente pequeño, 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 (Chiva-Tomás, 2011).

Las células de *S. cerevisiae* poseen casi todas las estructuras observadas en los eucariontes más complejos, incluyendo mitocondrias, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, membrana plasmática y lisosomas. Además, a diferencia de las células de mamíferos, poseen también vacuolas y una pared celular externa compuesta principalmente por glucano y manoproteínas (Winston, 1980; Valentin, 1987). También aparece en la pared una pequeña cantidad de quitina (2-4 %) localizada principalmente en las cicatrices que quedan tras la gemación (Watson, 2006).

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 (Cortés Rojo, 2005). *S. cerevisiae* es un microorganismo aerobio facultativo, por lo tanto, crece bajo condiciones anaerobias en presencia de una fuente de carbono fermentable, lo que permite obtener células de levadura que pueden crecer aún con mutaciones en el ADN mitocondrial que causen deficiencias respiratorias debido al daño a una o algunas funciones específicas (Contamine, 2000). De este modo, se puede determinar si la función mitocondrial se encuentra involucrada en algún fenómeno en particular. *S. cerevisiae* puede metabolizar la glucosa y la fructosa tanto por la vía respiratoria como por la vía fermentativa y es capaz de crecer en condiciones aerobias o anaerobias (González *et al.*, 2007).

Este microorganismo muestra 5 fases de crecimiento bien definidas cuando se cultiva en medios líquidos con glucosa como fuente de carbono:

- Fase lag (la célula se prepara para dividirse).
- Fase logarítmica (alcanza su máxima velocidad de replicación y se lleva a cabo el metabolismo fermentativo).
- Cambio diáuxico (al disminuir la glucosa, hay un periodo breve en el que no hay división y la célula cambia al metabolismo respiratorio).

- Fase postdiáuxica (usan como fuente de carbono el etanol producido en la fase logarítmica e incrementa su resistencia al estrés gradualmente).
- Fase estacionaria (cuando los nutrientes se han agotado y no hay división celular, se acumulan carbohidratos de reserva, se alcanza el nivel máximo de resistencia al estrés y su pared celular se vuelve más gruesa) (Folch-Mallol *et al.*, 2004).

Las células de levadura poseen una gran similitud con las células de mamífero tanto a nivel macromolecular como a nivel de orgánulos. Algunas proteínas de levadura han demostrado tener funcionalidad intercambiable con proteínas altamente homólogas humanas. Debido a estas similitudes es que se ha llegado a utilizar a la levadura como modelo de estudio para entender el mecanismo molecular hacia la resistencia al estrés oxidativo (Costa *et al.*, 2001).

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

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 (Céspedes-Miranda *et al.*, 2000).

S.cerevisiae contiene en sus membranas únicamente ácidos grasos saturados y monoinsaturados (Cortés Rojo *et al.*, 2009). Los ácidos grasos monoinsaturados son el ácido palmitoléico (C16:1) y el ácido oléico (C18:1) que constituyen un 70-80% del total, el resto son los ácidos grasos saturados ácido palmítico (C16:0) y ácido esteárico (C18:0) (Bossie y Martin, 1989). La levadura no sintetiza ácidos grasos poliinsaturados ya que no contiene las enzimas desaturasas necesarias para la formación de más de un doble enlace, como la desaturasa Δ^{12} , que produce ácido linoleico ni las elongasas y desaturasas Δ^6 y Δ^5 para producir ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga (Cipack, 2008). La ausencia de ácidos grasos poliinsaturados y la presencia exclusiva de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, hacen que las membranas de *S. cerevisiae* sean resistentes a la peroxidación de lípidos, ya que dicho tipo de ácidos grasos son resistentes a este proceso bajo condiciones de temperatura y presión normales.

Estudios anteriores han demostrado que las células crecidas en presencia de ácidos grasos poliinsaturados como el C18:3 los incorporan como su 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 ha demostrado que la incorporación de C18:3 aumenta la sensibilidad de las levaduras al estrés oxidativo al disminuir su viabilidad en presencia de inductores del estrés oxidativo como el Fe^{2+} o el H_2O_2 , lo cual da lugar 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 catalítico del complejo III (el ciclo Q) (Cortés Rojo *et al.*, 2009; Devlin, 2006).

2.13.2 Cadena de Transporte de Electrones en *Saccharomyces cerevisiae*

Las mitocondrias de *S. cerevisiae* tienen diferencias fisiológicas con las de otras especies utilizadas como modelo de estudio; en comparación con las mitocondrias de mamífero, las mitocondrias de *S. cerevisiae* carecen de complejo I sensible a rotenona, contienen una citocromo *c* peroxidasa que cataliza la reducción de H_2O_2 y su constitución de lípidos de membranas es muy simple en relación con eucariontes superiores (Cortés Rojo *et al.*, 2009).

- NADH deshidrogenasas externas e internas

Como se mencionó anteriormente; la CTE de *S. cerevisiae* carece de un complejo I sensible a rotenona. 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 intermembranal, y una NADH deshidrogenasa interna debido a la orientación de su sitio catalítico hacia la matriz mitocondrial (Cortés Rojo 2005, 2009). Por lo tanto, la mitocondria de la levadura solo tiene como sitios de acoplamiento el complejo III y el complejo IV (Grandier-Vazeille *et al.*, 2001).

- Complejo II.- Succinato: ubiquinona oxidoreductasa (succinato deshidrogenasa).

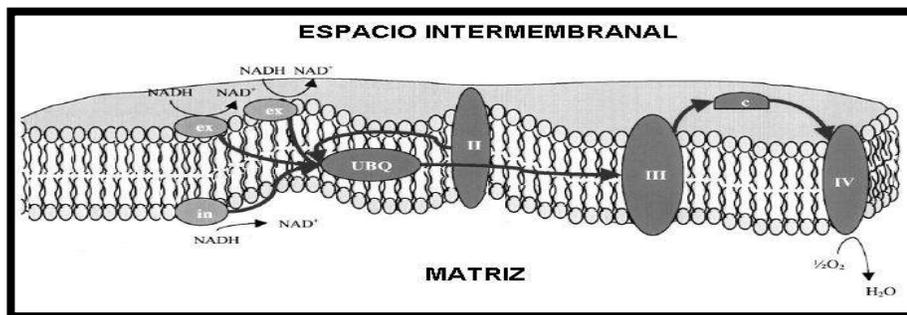
Tiene la misma estructura y funciones en mitocondrias de mamífero y levaduras.

- Complejo III.- Citocromo *c* reductasa, Ubiquinona: citocromo *c* oxidoreductasa o complejo citocromo *bc*₁

En *S. cerevisiae*, el complejo III se compone de 9 subunidades proteicas diferentes, mientras que el complejo de corazón de bovino contiene 11 (Beattie, 2002; Brandt *et al.*, 1994)

- Complejo IV. Citocromo c oxidasa

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 (Cortés Rojo, 2005; Voet y Voet, 2004).



Esquema 1.18 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 (Cortés Rojo, 2005).

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*₂, el citocromo *c* y la citocromo *c* peroxidasa (Chiva-Tomás, 2011).

Por otro lado, respecto al daño oxidativo en la CTE y en vista del menor grado de insaturación de los lípidos de membranas mitocondriales de *S. cerevisiae*, es factible suponer que el mecanismo de daño sobre la ETC por el estrés oxidativo en mitocondrias de levadura podría diferir de lo reportado en mitocondrias de rata, donde la lipoperoxidación y la pérdida de ubiquinona juegan un papel primordial (Forsmark-André *et al.*, 1997; Cardoso, 1999; Petrosillo *et al.*, 2003).

2.13.3 Envejecimiento cronológico y replicativo en *S. cerevisiae*

Los primeros estudios de envejecimiento en levadura datan de hace más de 50 años, cuando se demostró su capacidad finita de división (Kaeberlein *et al.*, 2007). En *S. cerevisiae* 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: Las levaduras entran en una fase estacionaria y se mantienen en dicha fase durante periodos variables, lo cual incrementa la edad cronológica sin variar el número de divisiones (Minois *et al.*, 2005).
- El envejecimiento replicativo se define como el número de células hijas que una célula madre puede generar durante toda su vida (Reverter-Branchat, 2007): Durante la vida reproductiva de la levadura se puede contar el número de células hijas que origina.

La supervivencia post-reproductiva es el tiempo que pasa desde la aparición de la última célula hija por gemación hasta la senescencia de la célula madre.

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 (Guarente y Kenyon, 2000).

Respecto al estudio del papel de la peroxidación de lípidos en el envejecimiento y el daño en la CTE, *S. cerevisiae* representa un modelo ideal de estudio debido a que:

- i) Es un modelo ampliamente aceptado para estudiar procesos fundamentales de envejecimiento compartidos con los eucariontes superiores (Bitterman *et al.*, 2003; Piper, 2006; Kaeberlein *et al.*, 2007).
- ii) *S. cerevisiae* es intrínsecamente resistente a la peroxidación lipídica debido a sus membranas están constituidas solamente por saturado y ácidos grasos monoinsaturados (Tuller *et al.*, 1999), que son resistentes a la peroxidación lipídica a temperatura ambiente (Yin *et al.*, 2011).

- iii) Algunos parámetros de funcionalidad ETC como la respiración y el potencial de membrana, así como la generación de ROS, puede medirse in situ en esta levadura mediante el uso de sustratos adecuados, inhibidores de los complejos de ETC y fluoróforos permeables (Avéret *et al.*, 1998; Peña *et al.*, 2010).
- iv) En forma nativa, *S. cerevisiae* no lo hacen contiene ácidos grasos poliinsaturados n-3 o n-6, lo que permite descartar la influencia de la relación n-3/n-6 en el envejecimiento de este microorganismo.
- v) El grado de insaturación de sus membranas puede ser fácilmente manipulado a través de la adición de ácidos grasos poliinsaturados libres al medio de cultivo.

2.13.4 Isoformas de la glutatión peroxidasa de la levadura *S. cerevisiae*

El análisis genético del envejecimiento ha mostrado que más de una veintena de genes juegan un papel determinante en la vida replicativa de la levadura. Estos genes participan en diversos procesos: control metabólico, resistencia al estrés, regulación de la cromatina y estabilidad genética. Además, algunos de estos genes tienen funciones en más de uno de estos procesos, lo que sugiere un cierto papel interactivo.

La acumulación de ERO en las células induce daño tóxico como ya se ha mencionado anteriormente y con el tiempo conduce a la muerte celular. Por lo tanto, los organismos han desarrollado un número de sistemas antioxidantes para protegerse del estrés oxidativo. La glutatión peroxidasa (GPX) es una de las enzimas más representativa de estos sistemas antioxidantes (Tsuzi, 2004). GPx cataliza la reducción de H₂O₂ y de hidroperóxidos lipídicos a H₂O y sus alcoholes correspondientes usando glutatión como agente reductor (Inoue, 1999; Carmel-Harel, 2000).

2.13.5 Fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa mitocondrial (Gpx2)

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene tres isoformas de la fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa: Gpx1, GPx2, y GPX3 (Ukai, 2011).

Gpx2 es una proteína periférica ubicada en la superficie de la membrana externa de la mitocondria en el lado citoplasmático, así como en la superficie de la membrana interna en el lado de la matriz (Ukai, 2011). En mamíferos, la Gpx4 es un ortólogo de GPX2. La Gpx4 de mamíferos actúa como una fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa en la mitocondria (Tanaka, 2005). Por lo tanto,

es posible que el papel de Gpx2 sea proteger la integridad de la membrana mitocondrial mediante la prevención de la peroxidación de fosfolípidos cuando las células de levadura están expuestas a ácidos grasos poliinsaturados.

Teniendo en cuenta la localización de Gpx2 en la superficie exterior de la membrana de las mitocondrias, la pérdida de Gpx2 podría influir en la función del factor (s) que participan en la fusión de las mitocondrias, tal como el complejo Fzo1-Mgm1-Ugo1 (Wong, 2003; Sesaki, 2003, 2004), dando lugar a una pérdida de la función mitocondrial y a un aumento en la formación de ERO. Además, si Gpx2 funciona como un antioxidante para reducir los hidroperóxidos de fosfolípidos en la membrana mitocondrial, su pérdida puede reducir la integridad de la membrana mitocondrial y disminuir la eficiencia del acoplamiento de la fosforilación oxidativa.

A pesar de que Gpx2 muestra actividad peroxidasa *in vitro* (Ohdate, 2010; Tanaka, 2005), y que es un antioxidante, las células mutantes *Gpx2Δ* no demuestran ningún fenotipo obvio en términos de estrés oxidativo (Inoue, 1999), excepto cuando las células son expuestas a ácidos grasos poliinsaturados (Avery y Avery 2001). Se le ha conferido un papel a Gpx2 en el proceso de esporulación, ya que la pérdida de Gpx2 disminuye la eficiencia de la esporulación de las células diploides (Ukai, 2011).

3. JUSTIFICACIÓN

La mitocondria se ha convertido en un potencial blanco terapéutico debido a que las principales enfermedades crónico-degenerativas de mayor costo socioeconómico, como la diabetes o la hipertensión, están asociadas a una disminución de diversas funciones mitocondriales atribuidas a un aumento en el estrés oxidativo y daño en lípidos y proteínas (Cortés-Rojo y Rodríguez-Orozco, 2011). Lo anterior ha dado lugar a una búsqueda intensa de antioxidantes que puedan atenuar o prevenir el daño mitocondrial asociado al estrés oxidativo provocado por la presencia de lípidos peroxidables. En este sentido, en nuestro grupo de trabajo, hemos reportado recientemente que el aumento en el grado de insaturación de las membranas mitocondriales, disminuye la sobrevivencia cronológica de la levadura debido a un incremento en la sensibilidad a la peroxidación lipídica en asociación con un daño en la función de la CTE y un incremento en la generación de ERO (Aguilar-Toralet *et al.*, 2014), lo cual está en concordancia con las teorías acerca del papel del grado de insaturación de las membranas mitocondriales en el envejecimiento de eucariontes superiores que se mencionaron anteriormente.

En virtud del papel de la peroxidación de lípidos en la velocidad del envejecimiento de los organismos, la participación de Gpx2 en la reparación de fosfolípidos peroxidados de membrana y la influencia positiva del resveratrol en la longevidad, es de nuestro interés, investigar si el resveratrol puede disminuir el envejecimiento cronológico de *S. cerevisiae* al proteger las membranas contra la peroxidación lipídica en una cepa mutante del gen Gpx2 y comparar sus efectos con los del antioxidante lipofílico BHT.

4. HIPÓTESIS

El tratamiento con resveratrol disminuye el envejecimiento cronológico de la mutante *Gpx2Δ* a niveles similares que el antioxidante BHT debido a una disminución en la peroxidación de lípidos y a la preservación de la función mitocondrial.

5. OBJETIVO

5.1 Objetivo General

Evaluar si el resveratrol y el BHT atenúan el envejecimiento cronológico de la mutante *Gpx2Δ* de *S. cerevisiae*, al prevenir la pérdida de la función mitocondrial y la peroxidación de lípidos.

5.2 Objetivos específicos

- 1) Determinar si el tratamiento con resveratrol o BHT disminuye el envejecimiento cronológico de la mutante *Gpx2Δ* de *S. cerevisiae*.
- 2) Explorar si el resveratrol o el BHT inhiben la peroxidación de lípidos en cultivos envejecidos de la cepa *Gpx2Δ* de *S. cerevisiae*.
- 3) Comparar los efectos del resveratrol y el ácido ascórbico sobre la función mitocondrial de células envejecidas de la cepa *Gpx2Δ* de *S. cerevisiae*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Reactivos

Los reactivos utilizados fueron de grado reactivo, de la más alta pureza, adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO. USA).

6.2 Material biológico

Se utilizó la cepa nativa "BY4741" de *Saccharomyces cerevisiae*. La mutante *Gpx2Δ* de *S. cerevisiae* (Mat α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YBR244w::kanMX4), fue obtenida por la interrupción del gen *Gpx2* con un cassette de resistencia a kanamicina. Ambas cepas fueron obtenidas de Euroscarf (Frankfurt, Alemania). Para seleccionar las células que no sufren reversión espontánea de la mutación, se agregaron 300 μ L del antibiótico G418 (Sigma-Aldrich) por cada 100 mL del medio en cultivos con *Gpx2Δ*.

6.3 Siembra de células de *S. cerevisiae* e inducción del envejecimiento cronológico

Las células de la levadura BY4741 y la cepa mutante *Gpx2Δ* de *S. cerevisiae* 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 18 horas fueron sembradas, a partir del precultivo se sembró en medio YPD líquido en 15 ml a una densidad óptica (DO) de 0.03 a 600 nm medida en un espectrofotómetro UV/vis Perkin-Elmer Lambda 18, usando como blanco agua. Una vez alcanzada la fase estacionaria, las células se mantuvieron en el medio de cultivo hasta por 30 días para inducir envejecimiento cronológico (Butner *et al.*, 2009).

6.4 Manipulación del contenido de ácidos grasos de la levadura y tratamientos con resveratrol, ácido ascórbico y BHT.

El contenido de ácidos grasos de las membranas de ambas cepas fue modificado mediante la metodología descrita por Cortés-Rojo *et al.*, (2009). Se adiciono a cada medio previo a la inoculación de las cepas 1 mM de ácido α -linolénico (ácido *cis,cis,cis*-9,12,15-octadecatrienoico, α -C18:3(Δ 9,12,15); pureza \geq 99%, adquirido de Sigma Chemical 1mM de ácido araquidónico (AA) (ácido C20:4(5,8,11,14) adquirido de Sigma Chemical disueltos en 5% del

detergentelgepal CA-630 (Sigma Chemical), previo a la inoculación del El BHT, el Resveratrol y el ácido ascórbico, que se agregarán antes de la inoculación con las células a concentraciones de 15 μ M, 50 μ M y 1 μ M, respectivamente.

6.5 Evaluación del envejecimiento cronológico

6.5.1 Determinación de la viabilidad celular por conteo en placa

La viabilidad de las células de *S. cerevisiae* se determinó mediante el conteo de colonias crecidas en placas de YPD sólido a una dilución 10^3 . Primero, se realizó una dilución con 1900 μ l de agua y 100 μ l de medio de cultivo inoculado, 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:

$$\text{Número de células}/\mu\text{L de medio} = (\text{promedio del número de células que se contaron en la cámara de Neubauer})(25 \text{ campos de la cámara})(\text{dilución})/(\text{volumen de la cámara } 0.1 \text{ mm}^3) = \text{cel}/\text{mm}^3$$

Las diluciones 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 1000 μ L. Posteriormente, se realizaron las diluciones seriadas desde 10^1 hasta 10^3 , colocando primero en cada tubo el volumen de medio estéril (900 μ L) y a continuación el volumen de medio inoculado correspondiente en la primera dilución y (100 μ L) tomando la correspondiente alícuota de la dilución anterior para realizar las diluciones posteriores. Después la dilución 10^3 se sembró en medio 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 (Aguilar-Toralet *al.*, 2014).

6.6 Preparación de células para las determinaciones de peroxidación lipídica y ensayos de potencial de membrana

Las células procedentes de cultivos envejecidos se lavaron tres veces por centrifugación durante 5 minutos a 5000 rpm a una temperatura de 25°C con agua desionizada y se suspendieron a una proporción de 1:1 de peso:volumen. Las

células se utilizaron inmediatamente para la determinación de la peroxidación lipídica y los ensayos de potencial de membrana (Aguilar-Toral *et al.*, 2014).

6.7 Determinación de la sensibilidad de la peroxidación lipídica

La sensibilidad de las células a la peroxidación lipídica se estimó midiendo el consumo de oxígeno que ocurre en la etapa de iniciación de la peroxidación de lípidos cuando los radicales lipídicos (R^{\bullet}) formados por la reacción de los radicales libres con los ácidos grasos; reaccionan con O_2 para producir radicales lipoperóxido ($2R^{\bullet} + O_2 \rightarrow 2ROO^{\bullet}$) (Halliwell y Chirico, 1993).

La tasa de consumo de oxígeno se registró polarográficamente con un electrodo de tipo Clark conectado a un monitor de oxígeno biológico YSI5300, (Yellow Springs, OH) y un computador para la adquisición de datos. Se resuspendieron 31.5 mg de células (peso húmedo) en un volumen de 2.5 mL de solución 10 mM de MES (pH 6,0 con trietanolamina). Esta mezcla se realizó en una cámara cerrada con agitación constante y se agregó 1 μ g de antimicina A y 0.4 M KCN para inhibir el consumo de oxígeno de otras fuentes como la CTEoenzimas citosólicas con grupos hemo, respectivamente (Marca y Nicholls, 2011). Después de 3 minutos, se inició la determinación del consumo basal de oxígeno y a los 3 min se adicionó $FeSO_4$ a concentraciones de 25, 50 y 100 μ M para inducir la peroxidación. La determinación se detuvo a los 4 minutos de la adición de $FeSO_4$ (Aguilar-Toral *et al.*, 2014).

6.8 Determinación del potencial de membrana mitocondrial *in situ*

Se agregaron 50 μ L de células resuspendidas en agua desionizada a una relación peso húmedo a volumen 1:1 en 1876 μ L de medio MES-TEA (pH 6 con trietanolamina) y se agregaron 15 μ M de $BaCl_2$, 20 mM de glucosa y 1 μ M de la cianina DiSC₃(3) ($\lambda_{ex} = 555$ nm y $\lambda_{em} = 572$ nm) con agitación constante. La determinación se inició midiendo la fluorescencia basal y a los 3 minutos se adicionó 15 μ M del desacoplante CCCP (carbonilcianuro p-triclorofenilhidrazona) para abatir selectivamente el potencial de membrana mitocondrial y 3 minutos después se adicionó 25 mM de KCl para abatir el potencial de membrana citosólico y la fluorescencia se midió por 3 minutos más.

6.9 Análisis Estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de al menos tres experimentos independientes. El nivel de significancia estadística de la

media aritmética ($p \leq 0.001$) se determinó mediante la prueba de t de Student con el programa Sigma Plot Versión 10.0 (SPSS Inc).

7. RESULTADOS

7.1 Comparación de los efectos del BHT y el ácido ascórbico sobre el potencial de membrana de células envejecidas de *S. cerevisiae*

Con el objetivo de estudiar los efectos dañinos del aumento de insaturación de los ácidos grasos de membrana en la función mitocondrial de células envejecidas y el posible efecto protector de los antioxidantes, se determinaron los potenciales de membrana mitocondrial y citosólico en células completas energizadas con glucosa midiendo los cambios de fluorescencia de la cianina (DiSC₃(3)) inducidos por la adición del desacoplante CCCP a una concentración que abate selectivamente el potencial de membrana mitocondrial y por la adición de KCl, el cual disipa el potencial de membrana plasmático (Peña *et al.*, 2010).

A partir de los 6 días de envejecimiento, se observó una marcada disminución del potencial de membrana mitocondrial (Figura 1A) en presencia de C18:3 y un efecto protector parcial por el BHT a los 6 días y un efecto total a los 12 días. En contraste, a partir del día 18, el efecto del BHT fue muy discreto, siendo casi nulo a los 21 días. Asimismo, el efecto protector del ácido ascórbico fue muy discreto a casi cualquier edad de los cultivos.

Respecto al potencial de membrana citosólico (Figura 1B), se observa que no hubo efecto alguno a los 6 días por ningún tratamiento; sin embargo, a partir de los 6 días se empieza a detectar una caída en este parámetro a partir de los 12 días de cultivo. El BHT y el ácido ascórbico ejercieron un efecto protector a los 12 días pero a los 18 días, dicho efecto fue menor y a partir de los 21 días se perdió en su totalidad. Estos resultados sugieren que la presencia de ácidos grasos poliinsaturados en la levadura afecta diferencialmente a los potenciales de membrana mitocondrial y citosólico y que los antioxidantes tienen un efecto protector que se limita a prácticamente los primeros 12 días de cultivo.

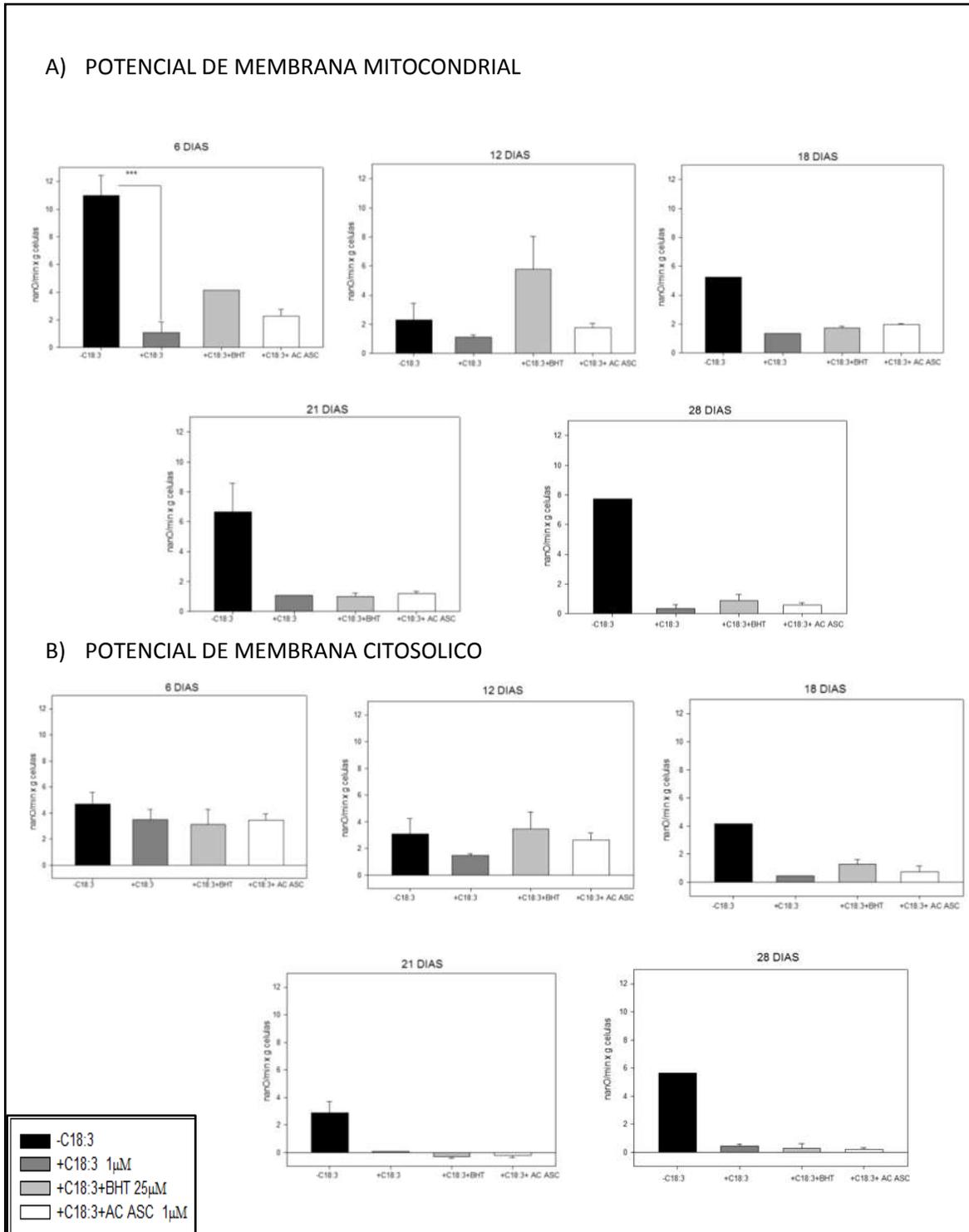


Figura 1. Potencial de membrana mitocondrial (A) y citosólico (B) de levaduras crecidas en medio YPD con los tratamientos antioxidantes BHT y Ac. Ascórbico durante el envejecimiento cronológico. Los resultados se expresaron como la media \pm el e.e. de $n \geq 3$. En el panel A 6 días de envejecimiento se observa una diferencia significativa de $***p \leq 0.001$ vs -C18:3.

7.2 Peroxidación lipídica frente a la protección de antioxidantes

La sensibilidad a la peroxidación lipídica se midió en células completas determinando el consumo de oxígeno debido a las etapas iniciales de la peroxidación de lípidos inducida por 25, 50 y 100 μM de Fe^{2+} . Asimismo, con el objetivo de observar un efecto aún más claro en este parámetro, se utilizó la cepa mutante en *Gpx2p* y en presencia de un ácido graso más insaturado como lo es el ácido araquidónico.

Los resultados obtenidos muestran que el consumo de oxígeno atribuible a la lipoperoxidación fue mayor en células +C20:4 desde los 10 días de envejecimiento hasta el final del experimento (Figs. 2-8). En los días 10 y 15 (Figs. 4 y 5), se observó una mayor sensibilidad de la mutante *Gpx2Δ* tratada con Fe^{2+} , pero a partir del día 20 no se observaron diferencias aparentes entre la cepa control y la mutante. De manera notable, se observa que el BHT protegió de la inducción de la peroxidación en la mutante *Gpx2Δ* a niveles de la cepa parental BY4741 a cualquier concentración de Fe^{2+} en los cultivos donde se detectó inducción de la peroxidación. (Figs. 4-8). En contraste, no se observó de manera clara un efecto protector por el resveratrol excepto en el día 15, en el cual, el consumo de oxígeno fue ligeramente menor en las células envejecidas con resveratrol.

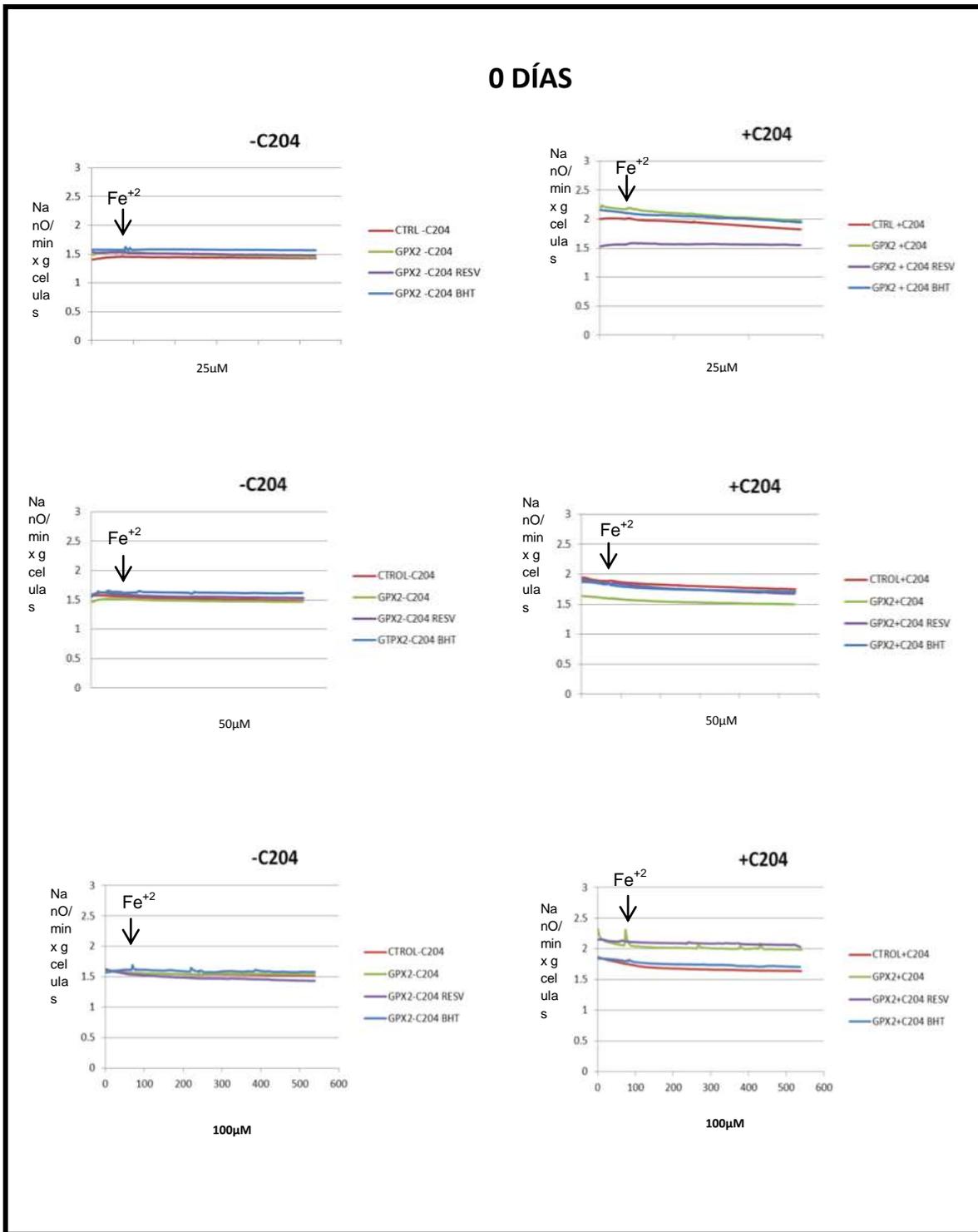


FIGURA 2. Efectos del BHT y el resveratrol en la sensibilidad a la peroxidación de lípidos inducida por Fe²⁺ en la mutante *Gpx2Δ* y su cepa parental BY4741 envejecidas durante 0 días en ausencia (-C20:4) o presencia (+C20:4) de ácido araquidónico. Los resultados son representativos de $n \geq 3$.

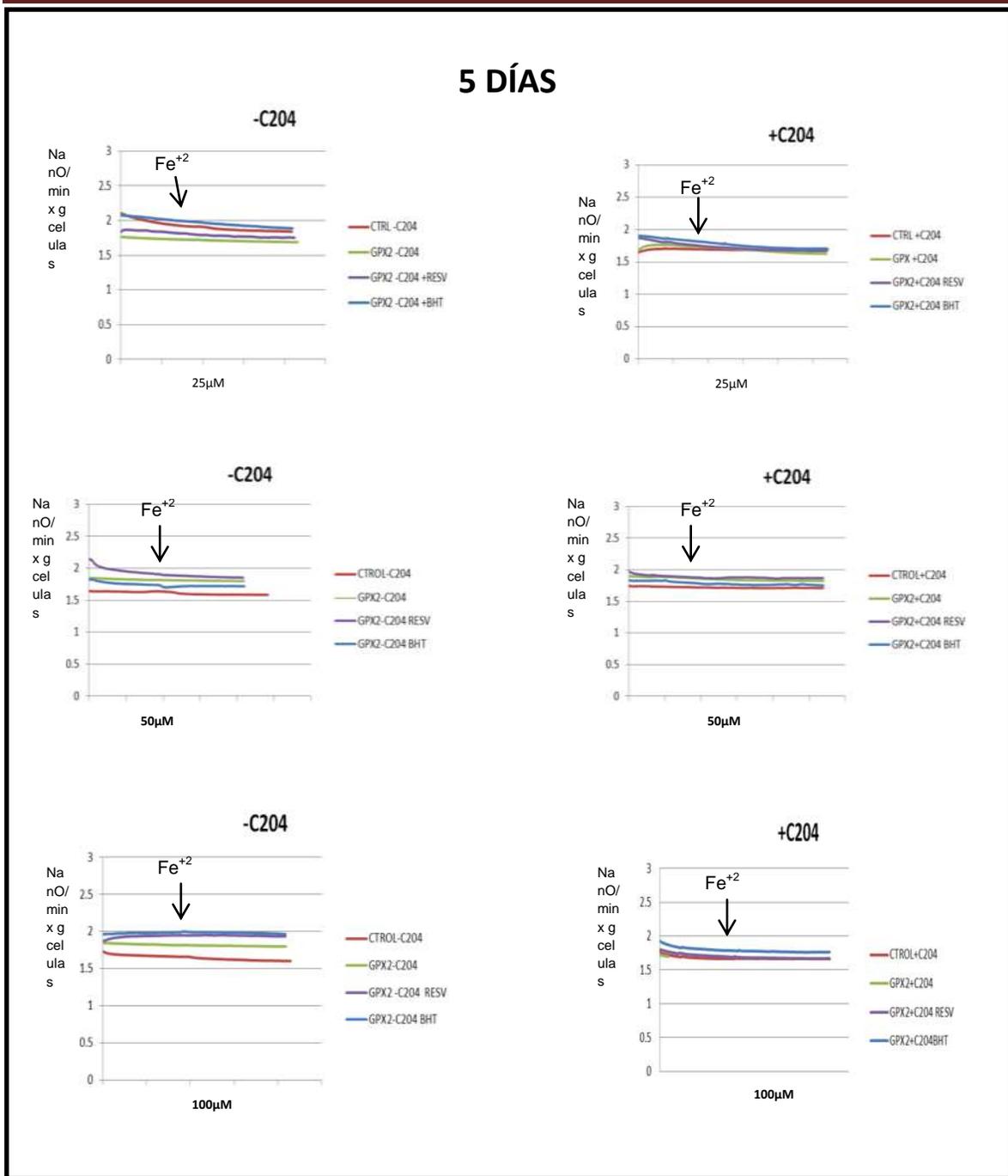


FIGURA 3. Efectos del BHT y el resveratrol en la sensibilidad a la peroxidación de lípidos inducida por Fe⁺² en la mutante *Gpx2Δ* y su cepa parental BY4741 envejecidas durante 5 días en ausencia (-C20:4) o presencia (+C20:4) de ácido araquidónico. Los resultados son representativos de $n \geq 3$.

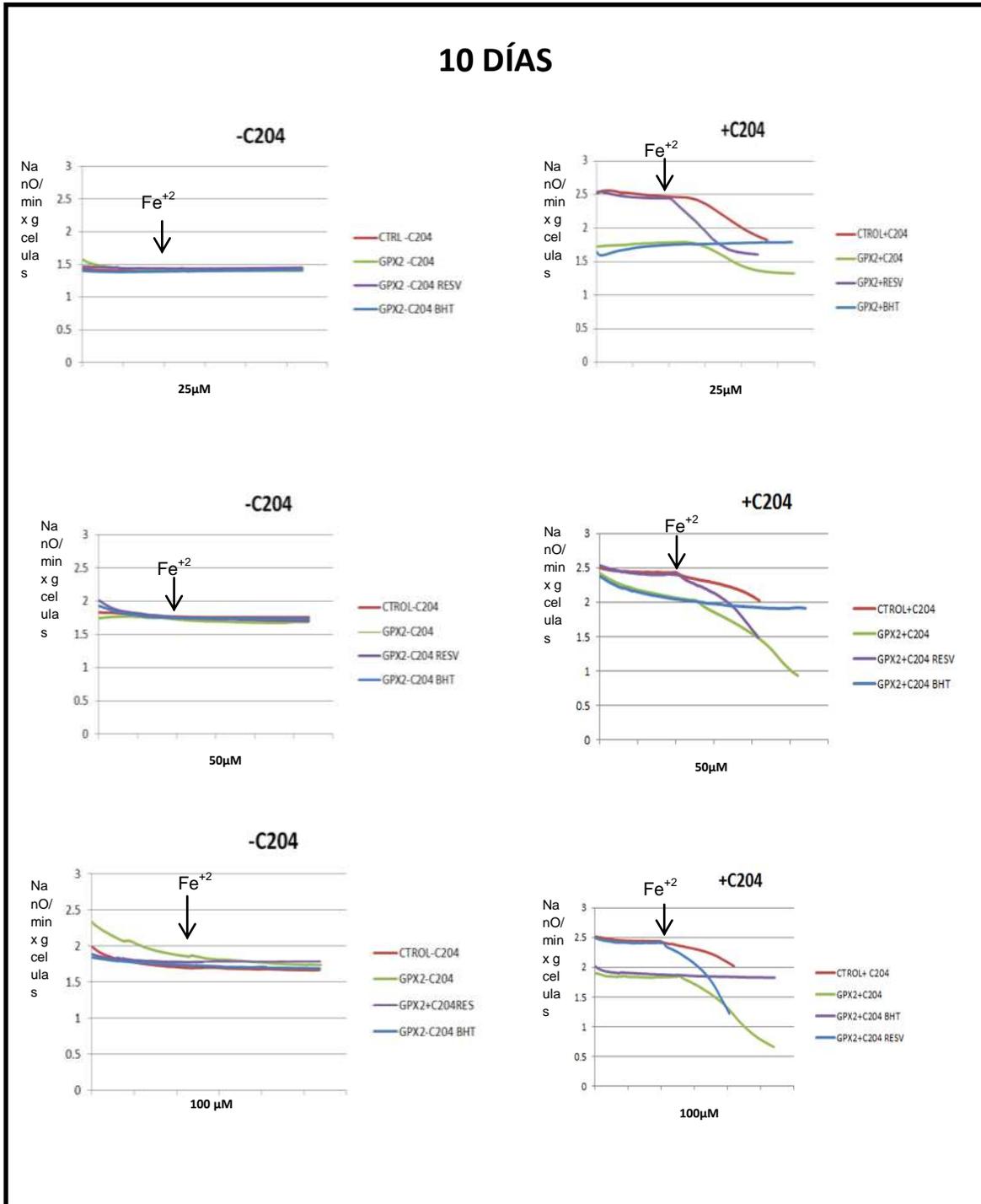


FIGURA 4. Efectos del BHT y el resveratrol en la sensibilidad a la peroxidación de lípidos inducida por Fe²⁺ en la mutante *Gpx2Δ* y su cepa parental BY4741 envejecidas durante 10 días en ausencia (-C20:4) o presencia (+C20:4) de ácido araquidónico. Los resultados son representativos de n ≥ 3.

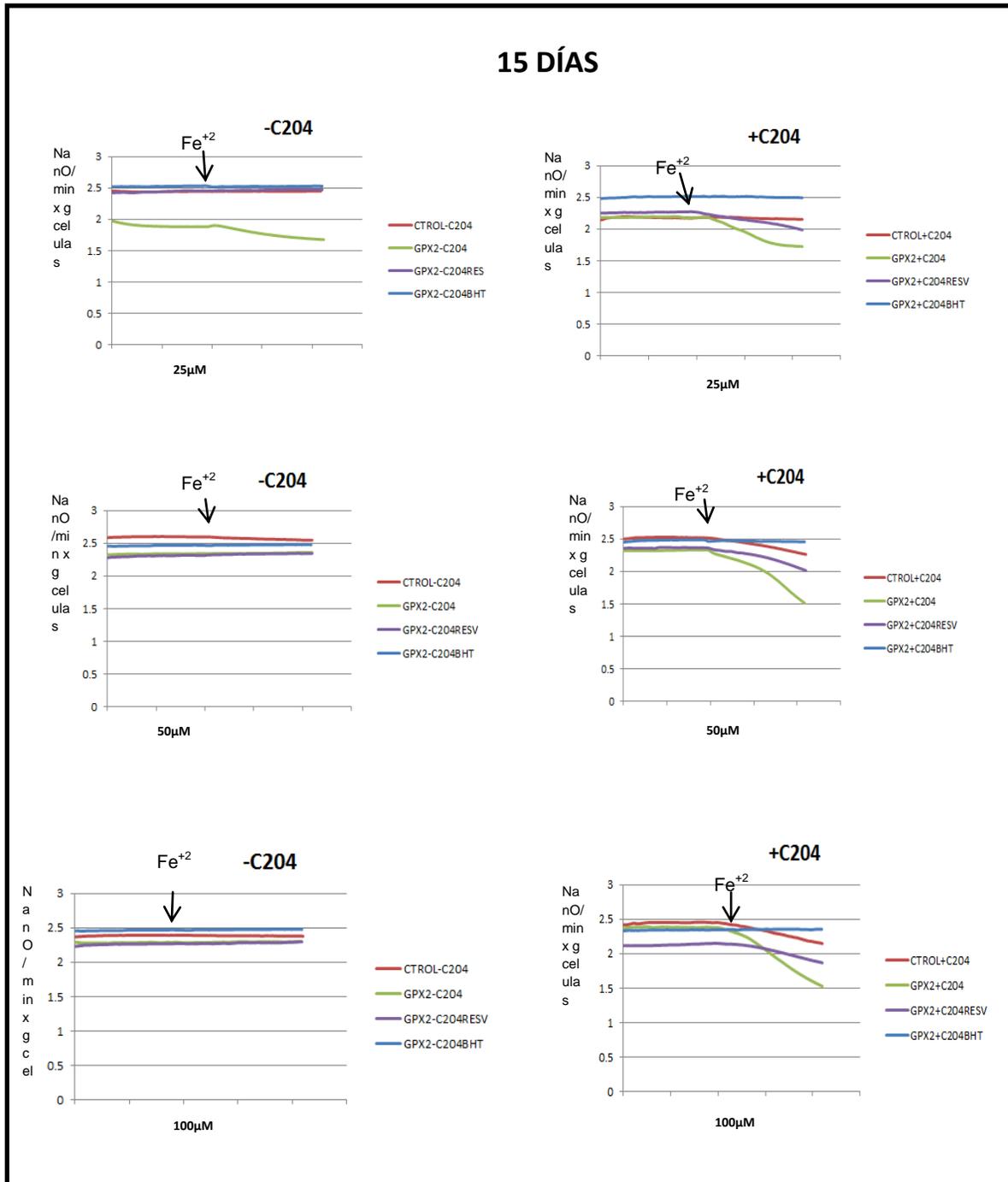


FIGURA 5. Efectos del BHT y el resveratrol en la sensibilidad a la peroxidación de lípidos inducida por Fe²⁺ en la mutante *Gpx2Δ* y su cepa parental BY4741 envejecidas durante 15 días en ausencia (-C20:4) o presencia (+C20:4) de ácido araquidónico. Los resultados son representativos de $n \geq 3$.

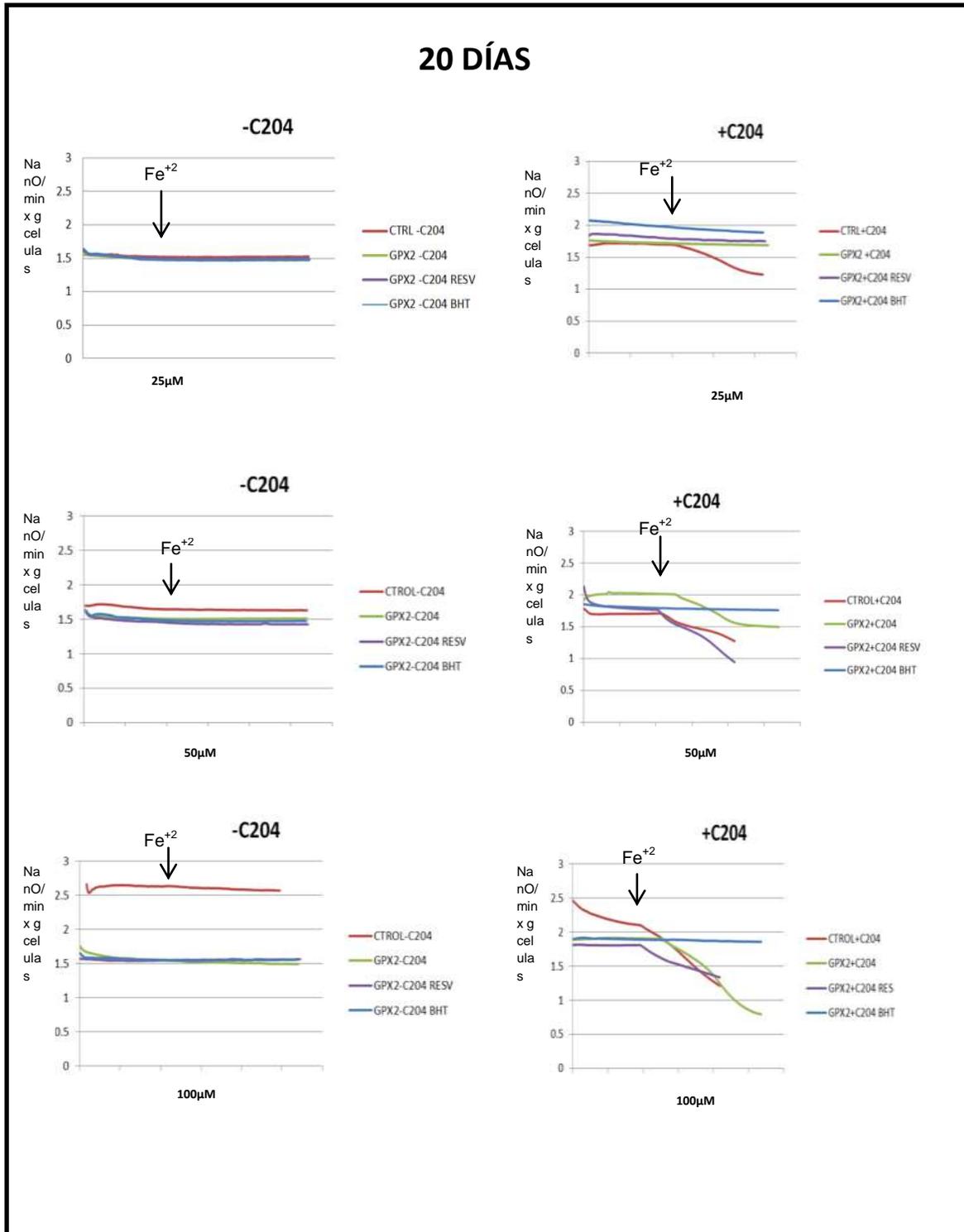


FIGURA 6. Efectos del BHT y el resveratrol en la sensibilidad a la peroxidación de lípidos inducida por Fe²⁺ en la mutante *Gpx2Δ* y su cepa parental BY4741 envejecidas durante 20 días en ausencia (-C20:4) o presencia (+C20:4) de ácido araquidónico. Los resultados son representativos de n ≥ 3.

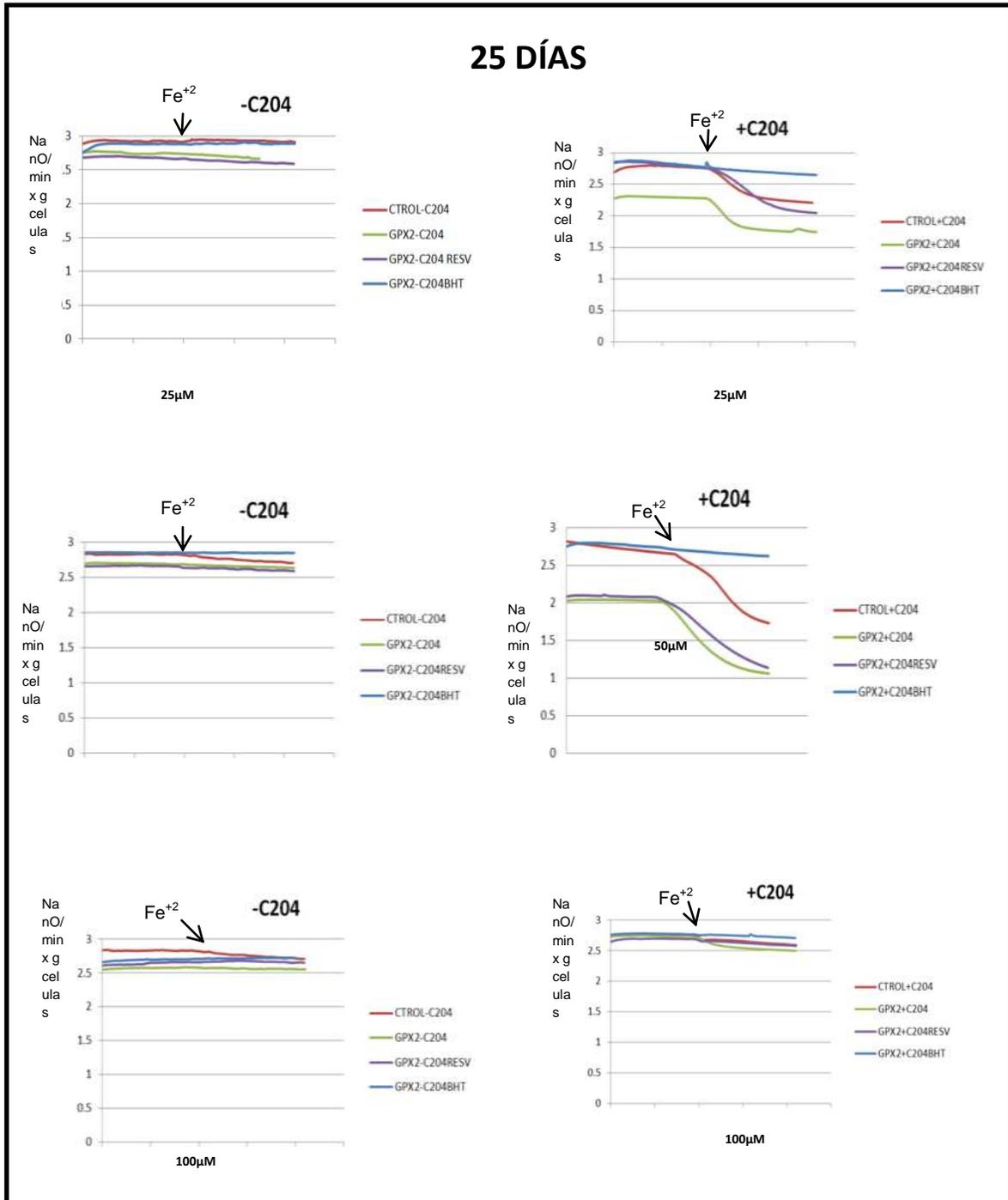


FIGURA 7. Efectos del BHT y el resveratrol en la sensibilidad a la peroxidación de lípidos inducida por Fe^{+2} en la mutante *Gpx2Δ* y su cepa parental BY4741 envejecidas durante 25 días en ausencia (-C20:4) o presencia (+C20:4) de ácido araquidónico. Los resultados son representativos de $n \geq 3$.

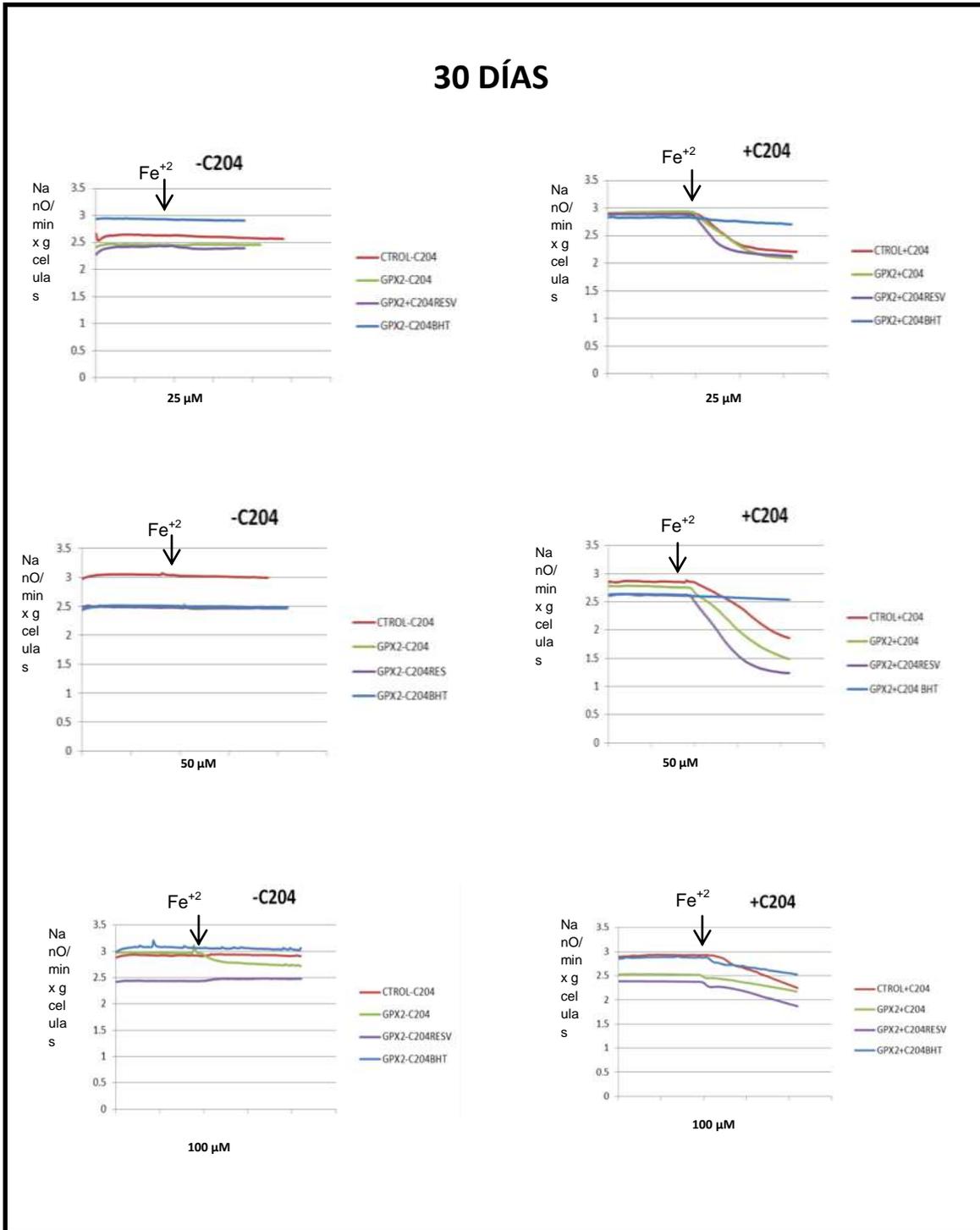


FIGURA 8. Efectos del BHT y el resveratrol en la sensibilidad a la peroxidación de lípidos inducida por Fe^{+2} en la mutante *Gpx2Δ* y su cepa parental BY4741 envejecidas durante 30 días en ausencia (-C20:4) o presencia (+C20:4) de ácido araquidónico. Los resultados son representativos de $n \geq 3$.

7.3 Viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó a diferentes tiempos de la fase estacionaria con el objetivo de evaluar el grado de envejecimiento cronológico de la levadura y los efectos del C20:4 y los antioxidantes.

En las células –C20:4, se observa una disminución gradual en la pérdida de viabilidad de todos los tratamientos (Figura 9). En contraste, se observa una disminución más marcada de la viabilidad en las células +C20:4a entre los 10 y 15 días de cultivo (Figura 10). En las células –C20:4 (Figura 9) la viabilidad de la mutante *Gpx2Δ* se encuentra a la par de la cepa control hasta los 10 días de envejecimiento (líneas morada y negra, respectivamente) y a partir del día 15 se hace evidente la necesidad de protección ante la mutación. De los antioxidantes administrados se encontró que el resveratrol es el único capaz de proteger ante un ambiente de envejecimiento cronológico (línea verde), mientras que es aparente que la adición del BHT induce toxicidad en la cepa mutante desde el 5^o día de envejecimiento. Mientras tanto, se observa que en la cepa control +C20:4 (línea negra), existe un re-crecimiento de las células a los 10 días de envejecimiento, pero antes y después de ese tiempo, la pérdida de viabilidad celular es similar a lo observado en las células *Gpx2Δ* (línea morada) y *Gpx2Δ* + resveratrol (línea verde) con C20:4. Asimismo, se observó un efecto protector del BHT a los 5, 15 y 20 días de envejecimiento (línea azul).

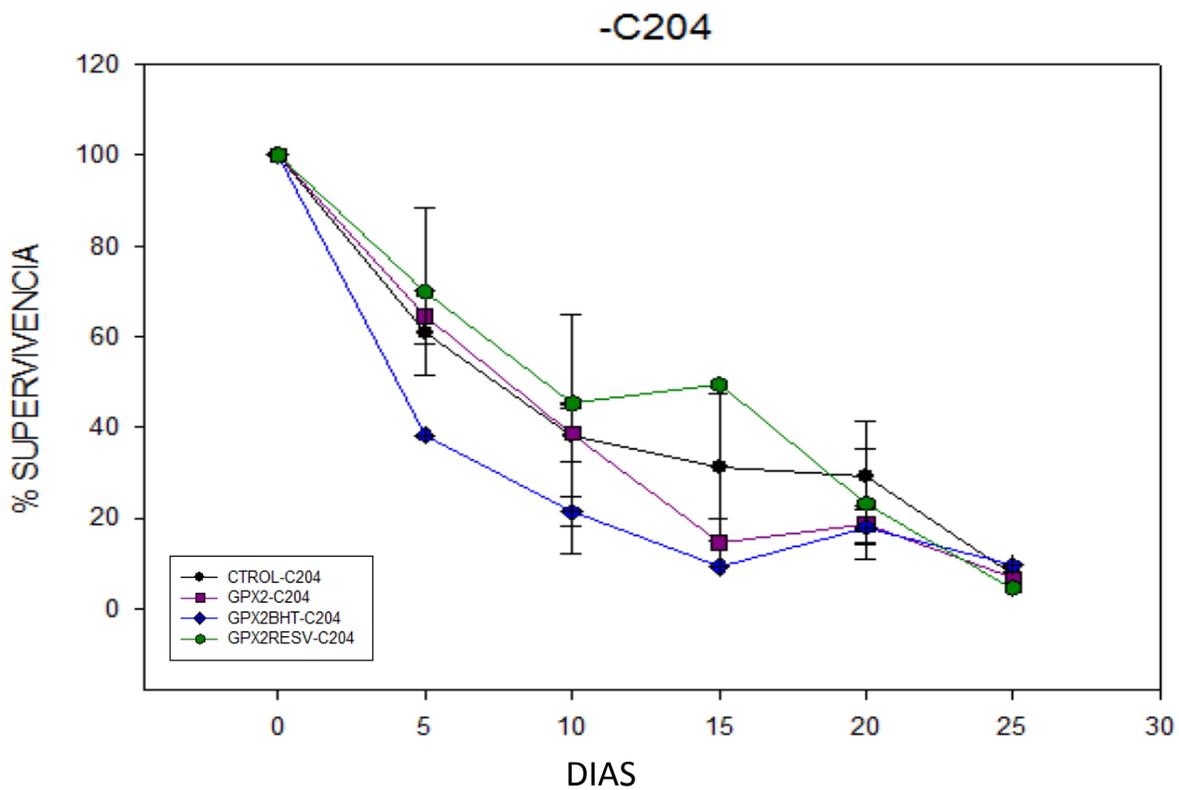


FIGURA 9. Efectos del resveratrol y el BHT en el envejecimiento cronológico de la cepa control BY4741 y la mutante *Gpx2Δ* en ausencia de ácido araquidónico (-C20:4). Los resultados se expresan como la media \pm el e.e. de $n \geq 3$.

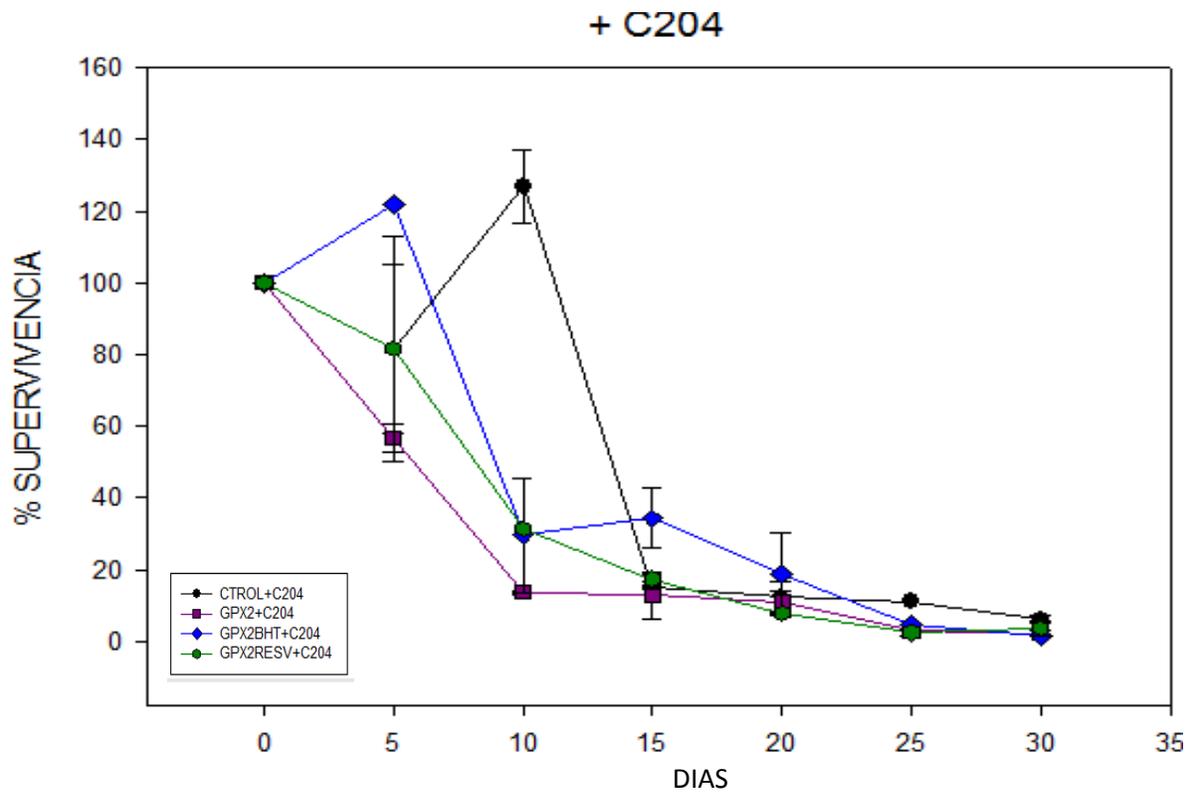


FIGURA 10. Efectos del resveratrol y el BHT en el envejecimiento cronológico de la cepa control BY4741 y la mutante *Gpx2Δ* en presencia de ácido araquidónico (+C20:4). Los resultados se expresan como la media \pm el e.e. de $n \geq 3$.

8. DISCUSIÓN

El envejecimiento es un proceso irreversible y progresivo que afecta a todos los organismos y conduce a la muerte. Este proceso se ha relacionado con la pérdida de la funcionalidad mitocondrial, afectando su metabolismo energético, lo que ocasiona la pérdida de la homeostasis, (Hulbert *et al.*, 2007; Kirkwood, 1989; Pamplona *et al.*, 2000). Se ha asociado al envejecimiento con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson, así como la hipertensión (Peinado *et al.*, 2000). Por ello, cada vez más investigadores se enfocan alabúsqueda de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para retardar el daño celular en el envejecimiento, como es el caso de los antioxidantes resveratrol, BHT y ácido ascórbico.

Existen varios factores que intervienen y determinan la longevidad de los organismos, como la composición lipídica de sus membranas, la producción de especies reactivas de oxígeno, el medio ambiente, la dieta, entre otros. A este respecto, se ha observado que el daño mitocondrial por ERO es un componente importante en el desarrollo de las principales enfermedades crónico-degenerativas de mayor costo socioeconómico en el mundo (Cortés-Rojo y Rodríguez-Orozco 2011), por lo cual, se hacen esfuerzos cada vez mayores para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que ayuden a disminuir el daño mitocondrial por ERO e impedir o retrasar el desarrollo de dichas enfermedades. *Saccharomyces cerevisiae* representa un modelo sencillo para evaluar posibles estrategias que protejan a la mitocondria del daño por ERO, debido a que comparte muchas características fisiológicas y bioquímicas de células de organismos superiores.

S. cerevisiae, cuenta con tres isoformas de la enzima Gpx (Gpx1p, Gpx2p y Gpx3p) que son necesarias para la resistencia de la levadura a ácidos grasos poliinsaturados (Avery y Avery 2001). En el caso de Gpx2p, se ha propuesto que esta isoforma protege la integridad de la membrana mitocondrial mediante la prevención de la peroxidación de fosfolípidos. Por lo tanto, la mutación de este gen podría tener efectos negativos en el envejecimiento de *S. cerevisiae* debido a que su pérdida podría incrementar el daño en las membranas mitocondriales y comprometer la funcionalidad mitocondrial de la levadura. Dado los efectos benéficos del resveratrol en la longevidad de la levadura (Howitz *et al.*, 2003), se decidió probar la eficacia del resveratrol para contrarrestar los efectos deletéreos de los ácidos grasos poliinsaturados en la supervivencia y, a través de la protección contra la peroxidación de lípidos exacerbada en la mutante *Gpx2Δ*.

La composición lipídica de *S. cerevisiae* consiste en ácidos grasos saturados y monoinsaturados y puede incorporar en sus membranas ácidos grasos poliinsaturados proporcionados en el medio de cultivo (Hulbert *et al.*, 2007; Cortés-Rojo *et al.*, 2009; Bossie y Martin, 1989). En este trabajo, se decidió incorporar los ácidos grasos C18:3 y C20:4 ya que en nuestro grupo de trabajo, se ha demostrado previamente que la adición de C18:3 da lugar a daño en la CTE en células envejecidas cronológicamente, afectando de manera especial al complejo III, lo que provoca disminución en la eficiencia del metabolismo energético mitocondrial durante el envejecimiento y reducción de la longevidad debido a una mayor sensibilidad de los lípidos de membrana al daño oxidativo.

En conjunto, se puede decir que la presencia del +C18:3 y/o +C20:4 en las membranas mitocondriales disminuye la funcionalidad de los complejos respiratorios, lo cual se refleja en una disminución paralela en el potencial de membrana mitocondrial por la disminución en el bombeo de protones como se observó en la Figura 1, dado que este último proceso depende del transporte de electrones. Esta disminución del potencial de membrana asociado a la disfunción de la cadena de transporte de electrones podría conducir a la muerte celular (Sakamuru *et al.*, 2012). Por esta razón, se esperaba que el resveratrol ejerciera una protección sobre *S. cerevisiae*. Sin embargo, para el caso del envejecimiento acelerado en presencia de ácidos grasos poliinsaturados, esto no fue observado (Figura 10), mientras esto sí ocurrió en células en ausencia del mismo (Figura 9). Esto último podría estar relacionado con la estimulación por el resveratrol de la actividad de las sirtuinas (Howitz *et al.*, 2003), previniendo el envejecimiento celular causado por radicales libres (Sinclair *et al.*, 2005). En contraste, el antioxidante lipofílico (BHT), el cual se ha reportado que ejerce un efecto protector contra la inhibición de la CTE inducida por la peroxidación lipídica, protegió de la peroxidación lipídica y la pérdida de viabilidad aumentada en la mutante *Gpx2Δ*. Por lo tanto, una interpretación de estos datos podría ser que el resveratrol protege de otros componentes del envejecimiento no relacionados con la peroxidación lipídica, lo cual concuerda con la noción de otros autores de que el envejecimiento es un fenómeno multifactorial muy complejo que no tiene una explicación única (Hulbert *et al.*, 2007).

Se observó que las células con C18:3 pierden el potencial de membrana mitocondrial desde los 6 días del envejecimiento y que el BHT, a diferencia del ácido ascórbico, protegió de este fenómeno a los 6 y 12 días de envejecimiento (Fig. 2). Esto corrobora que al menos en células con ácidos grasos poliinsaturados, predominan los efectos de la peroxidación de lípidos en los efectos dañinos del envejecimiento en la viabilidad y el funcionamiento mitocondrial, lo cual a su vez explica porque los antioxidantes de naturaleza hidrofílica como el resveratrol y el

ácido ascórbico no tuvieron un efecto protector. La protección del BHT en células con ácidos grasos poliinsaturados podría deberse a que el BHT integrado en la membrana celular y la mitocondrial podría proteger de la peroxidación lipídica, coadyuvando de esta manera en la translocación de H^+ necesaria para la fosforilación oxidativa. A los 18 días se observó una disminución mayor en el potencial de membrana en todos los tratamientos (Fig. 2), lo que sugiere que a este tiempo se acelera el envejecimiento, lo cual concuerda con la pérdida de viabilidad celular acelerada observada a partir de los 15 días en las Figuras 9 y 10. Esto confirma que existe una relación clara entre el mantenimiento de las funciones mitocondriales y la sobrevivencia en el envejecimiento, por lo cual, esto podría ser un factor más importante que otros fenómenos reportados en el envejecimiento tales como el daño en el ADN o el acortamiento de los telómeros (Hulbert et al. 2007). La peroxidación de lípidos da lugar a la formación de radicales lipídicos que continúan reaccionando hasta dañar otras biomoléculas, generando daños irreversibles en la integridad de la célula. Los ácidos saturados y monoinsaturados que constituyen la membrana de la levadura son resistentes a la peroxidación, incluso a concentraciones elevadas de agentes oxidantes fuertes, por lo que disminuye la probabilidad de que se dañen otras biomoléculas diferentes a los lípidos debido a una menor formación de radicales lipídicos (Hulbert, 2010; Cipack et al., 2008; Cortes Rojo et al., 2009; Hulbert et al., 2007). Se realizó el ensayo de peroxidación lipídica en la cepa parental BY4741 y la cepa mutante *Gpx2Δ* para observar si durante el envejecimiento, las células que incorporaron el C20:4 a sus membranas se vuelven más susceptibles a este proceso mediado de Fe^{+2} , el cual genera ERO con características de radical OH^{\bullet} que puede iniciar el proceso de peroxidación lipídica (Cortés Rojo et al., 2009).

La peroxidación lipídica se midió por el método polarográfico mediante la cuantificación del consumo de oxígeno ya que la lipoperoxidación requiere de esta molécula una vez formado el radical lipídico (iniciación) para formar el radical peroxilo (Hulbert, 2010). Por lo tanto, esto permitió analizar si se llevaba a cabo la etapa de iniciación de la lipoperoxidación, la cual no es inhibida por los sistemas antioxidantes endógenos de la levadura mencionados anteriormente. Adicionalmente, el efecto del resveratrol y el BHT contra la peroxidación lipídica se evaluó en un modelo que ha perdido su defensa antioxidante endógena en un ambiente oxidado inducido por la presencia C20:4.

Los resultados de la figura 4 muestran que a partir del día 10 de envejecimiento, exhiben un mayor consumo de oxígeno cuando contienen C20:4, lo cual es indicativo de que la primera fase de lipoperoxidación es más activa en estas células, lo que concuerda con los resultados reportados por Estrada-Villagómez 2010 y Aguilar-Toral et al., 2014, en donde se observó un aumento en los niveles

de lipoperoxidación en esferoplastos +C18.3 medido mediante el método del ácido tiobarbitúrico. Asimismo, en los 10 y 15 días, se observó que la sensibilidad a la peroxidación de lípidos, es decir, la tasa de consumo de oxígeno por la peroxidación de lípidos, fue mayor en las células *Gpx2Δ* que en la cepa parental BY4741, lo que sugiere que la enzima *Gpx2* es necesaria para la protección de la integridad de las membranas mitocondriales en fases intermedias del envejecimiento.

Respecto al efecto de los antioxidantes, se observó de manera interesante que a los 15 días (Fig. 5) el BHT sustituye la función de protección de la integridad de membrana de la levadura, siendo corroborado por la supervivencia de este único sistema aun por encima del control BY4741 (Fig. 10). Esto podría estar asociado a una mejora de la función mitocondrial asociada a la protección de las membranas por el BHT, ya que se ha reportado anteriormente que el BHT puede proteger las actividades de los complejos III y IV de los efectos dañinos de la peroxidación de lípidos en la levadura. (Cortés Rojo, 2009).

9. CONCLUSIÓN

La mutación del gen *Gpx2* de *S. cerevisiae* incrementa el daño en las membranas mitocondriales comprometiendo la funcionalidad de la levadura, el tratamiento con resveratrol protege de la senescencia celular en un ambiente sin estrés oxidativo mientras que en un medio oxidado solo es preventivo en etapas tempranas no logrando igualar los niveles similares de protección brindados por el BHT en ambos sistemas, el envejecimiento se ve marcado a partir del día 15 de edad celular asociado probablemente al daño causado por la peroxidación de lípidos de membrana.

10. REFERENCIAS

- Aggarwal Bharat B. y Shishodoo Shishir. (2006). Resveratrol in Health and Disease. CRC Press. London, New York. Págs. 1- 20.
- Aguilar-Toral R., Fernández-Quintero M., Ortiz-Avila O., Hernández de la Paz L., Calderón-Cortés E., Raimundo Rodríguez-Orozco A., Saavedra-Molina A., Calderón-Torres M., y Cortés-Rojo C. (2014). Characterization of the effects of a polyunsaturated fatty acid (PUFA) on mitochondrial bioenergetics of chronologically

aged Yeast. *J BioenergBiomembr.* 10.1007/s10863-014-9550-3.

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.

Alessandrini A. Vitamina C: Uso tópico y envejecimiento cutáneo. Sociedad Española de Medicina Estética. [en línea]. 2 de Marzo de 2013. [fecha de consulta: 13 de Diciembre]. http://www.seme.org/area_pro/textos_articulo.php?id=28

Ames B.N, Shigenaga M.K, and Hagen T.M. (1995). Mitochondrial decay in aging. *BiochimBiophysActa*1271: 165-170.

Arilla E. Enfermedades nutricionales y desequilibrios metabólicos. (1995). Impacto de la nutrición en la biología humana. *Consideraciones evolutivas, bioquímicas y epidemiológicas.* Universidad de Alcalá de Henares, 1995; 135-146.

Aurielson N. Q., Gomez B., Morales W.M, Rosivaldo Borges.(2008). A theoretical antioxidant pharmacophore for resveratrol. *European Journal of Medicinal Chemistry* XXX:1-6.

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

Barja G. (2005). Radicales libres de origen mitocondrial y longevidad. *An. R. Acad. Nac. Farm.,* 71: 783-798

Baur JA, Sinclair DA. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discover;* 5(6):493-506.

Beattie, D.S. (2002). Bioenergetics and oxidative metabolism. En: *Textbook of Biochemistry with clinical correlations.* 5ª Edición. (Devlin, T.M. Ed.). USA. Wiley-Liss. 13, 537-596.

Belitz H. Grosh W. (1998). *Química de los alimentos.* Acribia S.A., Zaragoza

Beyer RE. (1994). The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme, *Q. J BioenergBiomembr,* 26: 349-358.

Blanchet J, Longpré F, Bureau G, Morissette M, DiPaolo T, Bronchti G, Martinoli M.(2008). Resveratrol, a red wine polyphenol, protects dopaminergic neurons in MPTP-treated mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology&Biological Psychiatry;* 32:1243-1250.

- Bonifaz A. Micología Médica Básica. 2ª Edición. Méndez Editores. México D.F.
- Bossie MA, Martin CE. (1989). Nutritional Regulation of Yeast Delta-9 Fatty Acid Desaturase Activity. *J Bacteriol.* 171(12): 5409-13.
- Bouza E. y Muñoz P. (2004). *Saccharomyces cerevisiae*: el fin de la inocencia. *ProScience*, S. A. Sociedad Española Quimioterapia. RevEspQuimioterap, Vol. 17 (Nº 3): 227-231
- Bowling AC, Mutisya EM, Walker LC, Price DL, Cork LC, Beal MF. (1993). Age-dependent impairment of mitochondrial function in primate brain. *J Neurochem* 60(5):1964–1967
- Brandt, U., Uribe, S. Schägger, H. y Trumpower, B. (1994). Isolation and characterization of *QCR10*, the nuclear gene encoding the 8.5-kDa subunit 10 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome bc1 complex. *J. Biol. Chem.* 29, 12947-12953.
- 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.
- Brooks A. IEET. [En línea]. 12 de Enero de 2014. [Fecha de consulta: 9 Diciembre 2014]. Disponible en: <http://ieet.org/index.php/IEET/more/brooks20140112>
- Cano-Estrada A. and González- Halphen D. (2011). F_1F_0 –ATP sintasa y sus diferencias estructurales. *REB* 30 (3): 98-108.
- Cardoso. Antioxidantes y calidad de vida.(2002).
- Cardoso, S.M., Pereira, C. y Oliveira, C.R. (1999). Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* 26, 3-13.
- Carmel-Harel, O. and Storz, G. (2000). *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 439–461.
- Casadevall Ugartondo V. (2009). Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Universidad de Barcelona. Facultad de Farmacia departamento de Fisiología. pp 14-30.
- Campbell N, J. B. (2005). Biología. en Campbell. Madrid España: Editorial Panamericana. pp 580-622.

- 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.
- Cipak A., Jaganjac M., Tehlivets O., Kohlwein S. D., Zarkovic N. (2008). Adaptation to Oxidative Stress Induced by Polyunsaturated Fatty Acid in Yeast. *Biochimica et Biophysica.* 283-287.
- Charley H. Tecnología alimentos VI. Limusa S.A. México D.F (1998)
- Chen J, Schenker S, Frosto TA, Henderson GI. (1998). Inhibition of cytochrome c oxidase activity by 4-hydroxynonenal (HNE). Role of HNE adduct formation with the enzyme subunits. *BiochimBiophys. Acta* 1380(3):336–344
- Contamine, V. y Picard, M. (2000). Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 281-315.
- Cortés-Rojo C. (2005). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Tesis Maestría. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. pp 6-20.
- 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.
- 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.
- Cooper JM, Mann VM, Schapira AH .(1992). Analyses of mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial DNA deletion in human skeletal muscle: effect of ageing. *J NeurolSci* 113(1):91–98
- Coutre, P. y Hulbert, A. J. (1995): Membrane fatty acid composition of tissues is related to body mass of mammals. *J. Membr. Biol.* 148: 27-39.
- Cutler RG. (1991). Recent progress in testing the longevity determinant and dysdifferentiation hypotheses of aging. *GerontolGeriatr*, 12:75-98.

- Déak T, Beuchat LR. (1996). Handbook of Food Spoilage Yeasts. CRC Press, Boca Raton, Florida. § Fleet GH. 1997. Wine. Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. Doyle MP *et al.*, eds. ASM Press, Washington pp. 671 – 694
- Der-Giezen M. (2011). Mitochondria and the Rise of Eukaryotes. *BioScience*. 61(8):594-601.
- Devlin T.M.(2004). Bioquímica. Editorial Reverté. 1ª edición. Barcelona España pp. 561-580.
- Dudley J., Das S, Mukherjee S, Dipak K. Das. (2008). Resveratrol, a unique phytoalexin present in red wine, delivers either survival signal or death signal to the ischemic myocardium depending on dose. *Journal of Nutritional Biochemistry XX*.
- Estrada- Cano A., González-Halphen D. (2011) F1F0-ATP sintasa y sus diferencias estructurales. *Rev. 30(3): 98-108*.
- FAO y FINUT (2012). Grasas y ácidos grasos en nutrición humana. Granada, España.
- Ferguson, L. R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat. Res.* 475, 89–111
- Flodin NW. (1984). The senescence of postmitotic mammalian cells: a cell-clock hypothesis. *Mech Ageing Dev*;27(1):15-27.
- Freshney, R. (1987). Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, Alan R. Liss, Inc., New York. pp.117.
- Folch-Mallol J. L., Garay-Arroyo A., Lledias F. and Covarrubias-Robles A. 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev Latinoam Microbiol.* 46(1):24-46.
- Forsmark-Andréé, P., C.P. Lee, G. Dallner y L. Ernster. (1997). Lipid peroxidation and changes in the ubiquinone content and the respiratory chain enzymes of submitochondrial particles. *Free Radic. Biol. Med.*: 22(3), 391-400.
- Gerschman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Dwyer, P. y Fenn, W.O. (1954). Oxygen poisoning and X-irradiation: A mechanism in common. *Science*. 119:623-626.
- Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A. y Fink, G.R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* 68, 1077-1090.
- Grandier- Vazeille Xvier, Bathany Katell, Chaignepain Stéphane, Camougrand Nadine, Manon Stéphen and Schmitter Jean-Marie. (2001). Yeast Mitochondrial

- Dehydrogenases Are Associated in a Supramolecular Complex. *Biochemistry*, 40, 9758-9769.
- Guarente, L & Kenyon, C. (2000). Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature*, 408 (6809), pp. 255-262.
- Gohil VM, Hayes P, Matsuyama S, Schagger H, Schlame M, and Greenberg ML. (2004).Cardiolipin biosynthesis and mitochondrial respiratory chain function are interdependent. *J BiolChem*279: 42612-42618.
- Haines TH and Dencher NA. (2002).Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS Lett*528: 35-39.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. (2006). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4.Oxford University Press. New York, USA. pp 888.
- Harman D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11(3):298–300
- Hofmann B, H.J. Hecht, L. Flohé.(2002). Peroxiredoxins, *Biol. Chem.* 383 347–364.
- Howitz K, Bitterman K, Cohen H, Lamming D, Lavu S, Wood J, Zipkin R, Chung P, Kisielewski P, Zhang L, Scherer B & Sinclair D.(2003).Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* Lifespan.*Nature*. 10.1038
- 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.
- Inoue Y, Matsuda T., Izawa S, Kimura A. (1999).Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 274:27002–27009.
- Jang, M.(1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*.275, 218–220
- Kaerberlein M, Burtner R C, Kennedy K B. (2007).Recent Developments in Yeast Aging.*PLoS Genet.* 3(5): e84.

- Karp Gerald. (2006). *Biología Celular y molecular. Conceptos y experimentos.* Cuarta edición. Editorial Mc Graw Hill. pp: 130-232.
- Kanungo MS. (1980). *Biochemistry of aging.* New York: Academic Press.
- Kaplan P, Tatarkova Z, Racay P, Lehotsky J, Pavlikova M, Dobrota D.(2007). Oxidative modifications of cardiac mitochondria and inhibition of cytochrome c oxidase activity by 4-hydroxynonenal. *Redox Rep* 12(5):211–218.
- Kirkwood, T. 1.-7. (1989). Evolution and aging. *Mutat; Res* 219:1-7.
- Kirkwood T, Holliday R.(1979) The evolution of ageing and longevity. *Proc R Soc London B*;205:531-46.
- Kruszewski M, Szumiel I.(2005). Sirtuins (hystonedeacetylases III) in the cellular response to DNA damage-Facts and hypotheses. *DNA Repair*, 4:1306-1313.
- Koolman, K.-H. R. (2004). *Bioquímica texto y atlas.* en *bioquímica texto y atlas.* Madrid España: Editorial Panamericana. pp 2010-2014
- Komina O, Wesierska-Gadek J. (2008). Action of resveratrol alone or in combination with roscovitine, a CDK inhibitor, on cell cycle progression in human HL-60 leukemia cells. *Biochemical Pharmacology* XXX :1-9.
- Koshkin V y Greenberg ML. (2002). Cardiolipin prevents rate-dependent uncoupling and provides osmotic stability in yeast mitochondria. *Biochem J* 364: 317-322.
- Lecocq J y Ballou CE.(1964). On the Structure of Cardiolipin. *Biochemistry* 155: 976-980.
- Lehninger L. Albert. (1972). *Bioquímica: Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular.* Quinta edición. Ediciones Omega. pp 625-650.
- Lehninger D, Michael N, Cox M. (2002). *Principles of Biochemistry.* Fourth Edition. pp. 659-670.
- Levine M, Dhariwal KR, Welch RW.(1995). Determination of optimal vitamin C requirements in humans. *Am J Clin Nutr*, 62: 1347S- 1356S.
- Lodish H. (2006). *Biología celular y molecular.* Médica Panamericana Eds., Madrid. pp. 513-634.
- Long J, Liu C, Sun L, Gao H, Liu J. (2009). Neuronal mitochondrial toxicity of malondialdehyde: inhibitory effects on respiratory function and enzyme activities in rat brain mitochondria. *Neurochem Res* 34(4):786–794.

- Lozada S. M., García L.(2009). Estrés oxidativo y antioxidantes: como mantener el equilibrio. *Rev. Asoc. Colomb Dermatol*; 17:172-9.
- Maftah A, Ratinaud MH, Dumas M, Bonte F, Meybeck A, and Julien R. (1994). Human epidermal cells progressively lose their cardiolipins during ageing without change in mitochondrial transmembrane potential. *MechAgeingDev*77: 83-96.
- Martínez Martín M. Vejez y envejecimiento. Universidad Autónoma de Madrid. [en línea]. 1 de Septiembre de 2005. [fecha de consulta: 11 de Diciembre]. https://www.uam.es/personal_pdi/elapaz/mmmartin/2_asignatura/temas/unidad1/2/tema2.pdf
- Makinodan T, Kay MMB.(1980). Age influence on the immune system. *Adv Immunol*;29:287
- Masoro, E. y. (2010). Handbook of the biology of Aging. En *Handbooks of Aging* New York: Academic Press. pp. 105-120.
- 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 H₂O₂ and superoxide dismutase activity. *PNAS*.107 (34):15123-15128.
- Michael H. R. W. P. (2006). Histología texto y atlas color con biología celular y molecular . (págs. 59-61). Madrid España : Editorial Panamericana.
- Middleton, E. Jr, Kandaswami, C. &Theoharides, T. C. (2000).The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52, 673–751
- Millán F, Quecedo E, Gimeno E. (2007).Antioxidantes orales. *Piel*; 22(2):95-99
- Miquel J, Fleming JE.(1984). A two-step hypothesis on the mechanism of in vitro cell aging cell differentiation followed by intrinsic mitochondrial mutagenesis. *Exp Gerontol*;19:31-6
- Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson J (1980). Mitochondrial role in cell aging. *ExpGerontol*, 15:575-591.
- Mikhail V. Blagosklonny.(2007). An anti-aging drug today: from senescence- promoting genes to anti-aging pill. *Drug Discovery Today*; 12(5/6):218-224.
- Mitchell, P., and Moyle, J. (1967). Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature* 213, 137-139.
- Monza J., Borsani O., Batista L. and Signorelli S. 2008. Cadena Respiratoria. pp. 1-8.

- Morris D. H. (2007). Metabolismo del ácido alfa-linolénico. Winnipeg, MB: Consejo Canadiense de Linaza. pp.1-3.
- Mozzhukhina TG, Chabanny EL, Levitsky EL, Litoshenko AY. (1991). Age-related changes of supernucleosomal structures and DNA-synthesizing properties of rat liver chromatin. *Gerontology*; 37:181-6.
- Nicholls D. (1987). Bioenergética: Introducción a la Teoría Quimiosmótica. Editorial Reverté. pp: 1-24, 71-101, 105-138.
- Nicholls, D. y Ferguson S.J. (2002). *Bioenergetics* 3. London, UK Academic Press. 5, 89-156
- Núñez J. M. (2012). La mitocondria en el centro del universo celular. En G. F. J, *Mensaje Bioquímico* (págs. 65 – 81). México, DF.
- Ohdate T, Kita K, Inoue Y. (2010) Kinetics and redox regulation of Gpx1, an atypical 2-Cys peroxiredoxin, in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 10 (787–790).
- Pallàs M, Verdaguer E, Tajés M, Gutierrez J-Cuesta and Camins A. (2008). Recent Patents on CNS Drug Discovery; 3:61-69.
- Pamplona, R.; Prat, J.; Cadenas, S.; Rojas, C.; Pérez-Campo, R.; López-Torres, M. y Barja, G. (1996). Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from longevous species: the pigeon and human case. *Mech. Ageing Dev.* 86: 53-66.
- Pamplona, R. y otros seis autores. (2000). Low fatty acid unsaturation: A Mechanism for Lowered Lipoperoxidative Modification of Tissue Proteins in Mammalian Species with Long Life Spans. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 55(6), 286-291 (2000).
- Pamplona, R.; Barja, G. y Portero-Otín, M. (2002). Membrane Fatty Acid unsaturation, Protection against Oxidative Stress, and Maximum Life Span. A homeoviscous-longevity adaptation. *Ann New York Acad. Sci.* 959: 475-490.
- Pamplona, R.; Portero-Otín, M.; Sanz, A.; Requena, J. y Barja, G. (2004): Modification of the longevity-related degree of fatty acid unsaturation modulates oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in liver and brain. *ExperGerontol.* 39: 725-733.
- Paradies, G., G. Petrosillo, M. Pistolese y F.M. Ruggiero (2002). Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene*: 286(1), pp135-141.
- Parrella, E y Longo, VD. (2010). Insulin/IGF-1 and related signaling pathways regulate aging in nondividing cells: from yeast to the mammalian brain. *The Scientific World Journal*, 10, pp. 161-77.

- Panno, J. (2009). *New biology. Aging: Modern theories and therapies*. New York.
- Passarge Eberhard. (2007). *Genética Texto y Atlas*. Tercera. Editorial Médica Panamericana. pp: 130.
- Peinado M.A., del Moral M.L., F.J. Esteban, Martínez Lara E., Siles E., Jiménez A., Hernández -Cobo R., Blanco S., Rodrigo J., Pedrosa J. A. (2000). Envejecimiento y neurodegeneración: bases moleculares y celulares. *Rev. Neurol*; 31 (11): 1054-1065.
- Petrosillo, G., F.M. Ruggiero, N. Di Vennosa y G. Paradies. (2003). Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin. *FASEB J.*: 17(6), 714-716.
- Peña A, Sánchez S, Calahorra M. (2010). Estimation of the Electric Plasma Membrane Potential Difference in Yeast with Fluorescent Dyes: Comparative Study of Methods. *J BioenergBiomembr.* 42:419-432.
- Porter NA. (1986). Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids. *AccChem Res.* 1986;19:262–268.
- Rampoldi R. (2010). El resveratrol: estimulante de las sirtuinas, enzimas protectoras del envejecimiento celular. *Tendencias en Medicina*. pp. 76-81
- Rayalam S, Yang J, Ambati S, Della-Fera M and Baile C. (2008). Resveratrol induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *PhytotherapyResearch*; 22:1367-1371.
- 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>.
- Richter, C. (1995). Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27:647-653
- 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.
- Riveros Rosas H. Vitaminas en los cosméticos. ¿Cómo vez?.[en línea]. 21 de Febrero de 2003. [fecha de consulta: 10 de Diciembre]. Disponible: http://laguna.fmedic.unam.mx/~adh/sobretiros/vitaminas_cosméticos.pdf

- Robinson, N.C. (1993). Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 25, 153-163.
- Rock CL, Jacob RA, Bowen PE.(1996).Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E and the carotenoids. *J Am DietAssoc*; 96: 693-702.
- Rodríguez-C.M., Tovar R A, Prado M., Torres N. (2005).Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. *Revista de Investigación Clínica*. Vol.57:3. 457-472
- Rose RC. Intestinal absorption of water- soluble vitamins. (1996).*ProcSocExpBiol Med*; 212: 191-198.
- Roskoski, Jr. Robert.(2003). Bioquímica.Editorial McGraw- Hill Interamericana. pp: 82,93, 127-140.
- Sesaki H, Jensen R.E. (2004).Ugo1p links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion, *J. Biol. Chem.* 279 28298–28303.
- Sesaki H, Southard S.M., Yaffe M.P., Jensen M.P. (2003). Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane, *Mol. Biol. Cell* 14 2342–2356.
- Sinclair DA.(2005).Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. *MechAgeign Dev*;126(9):987-1002.
- Schlame M, Rua D, and Greenberg ML. (2000).The biosynthesis and functional role of cardiolipin.*Prog Lipid Res* 39: 257-288.
- Shigenaga,M.K., Hagen,T.M. y Ames,B.N. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging.*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:10771-10778.
- Slagboom PE, Vug J.(1989). Genetic instability and aging: theories, facts, and future perspectives. *Genome*, 31:373-85.
- Stefani M, Markus MA, Lin RC, Pineses M, Dawes IA, Moris BJ. (2007). The effect of resveratrol on cell model of human aging. *Ann N Y Acad. Sci*; 5.
- Strehler, B. (1977). Time, cells, and aging. En B. Strehler, *Time, cells, and aging* New York: Academic Press. pp. 5-20.
- Strehler B. (1982). Ageing: concepts and theories. *Lectures on gerontology*:1-7.

- Stojanovic, S., Sprinz, H. & Brede, O. (2001). Efficiency and mechanism of the antioxidant action of transresveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 391, 79–89
- Tanaka T, Izawa S, Inoue Y. (2005) GPX2, encoding a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homologue, codes for an atypical 2-Cys peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 280: 42078–42087.
- Talaro, K.P. y Talaro, A. (1999). Eucaryotic cells and microorganism. En: Foundations in microbiology. Editorial Mc-Graw-Hill. 3a edición. pp.124-160.
- Tissenbaum, H. A. y Guarente, L.(2001). Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 410, 227–230
- Tsuzi D, Kazuhiro Maeta, Yoshifumi Takatsume, Shingo Izawa, Yoshiharu Inoue. (2004). Regulation of the yeast phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase GPX2 by oxidative stress is mediated by Yap1 and Skn7. *FEBS* 565: 148–154.
- Ukai Y, Tomoyuki Kishimoto, Takumi Ohdate 1, Singo Izawa 2, Yoshiharu Inoue. (2011). Glutathione peroxidase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is distributed in mitochondria and involved in sporulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 411: 580–585
- Valentin, E., Herrero, E., Rico, H., Miragall, F. y Sentandreu, R. (1987). Cell wall mannoproteins during the population growth phases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 148, 88-94.
- Vázquez-Contreras E. (2003). Bioquímica y Biología molecular en línea. Instituto de Química UNAM. Última actualización: 17 de Septiembre de 2003. Consultado: 8 de Diciembre de 2014. URL: <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/cadena.html>
- Veenman L, Alten J, Linnemannstöns K, Shandalov Y, Zeno S, Lakomek M, Gavish M, Kugler W. (2010). Potential involvement of F₀F₁-ATP (synth)ase and Reactive Oxygen Species in Apoptosis Induction by the Antineoplastic Agent Erucylphosphocholine in Glioblastoma Cell Lines-. A Mechanism for Induction of Apoptosis via the 18 kDa Mitochondrial Translocator Protein. *15(7)*: 753-68.
- Voet D. and Voet G.J.. (2004). *Bioquímica*. Médica Panamericana. Montevideo, Uruguay. pp. 829-840
- Voet D. y Voet G. J. 2006. Bioquímica. Tercera edición. Editorial medica panamericana. Buenos Aires. pp. 193.

- Voet D. y 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.
- Watson E. (2006). Biología Molecular del gen. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana. pp. 738-739.
- Westphal C.H, Dipp M.A and Guarente L. (1991). A therapeutic role for sirtuins in diseases of aging?. *TRENDS in Biochemical Sciences* Vol. 32 N° 12.
- Whittaker P. A y MDanks S. (1982). Mitocondria: Estructura, Función y Formación. Editorial continental. pp:13-35;137-163
- Winston, F.(1980). Yeast as a model eucaryotic cell..En *Microbiology* 2ª Edición. (Davis, B.D., Dulbeco, R., Ersen, H.N. y Ginsberg, H.S. Eds.). Lippincott. USA. 5, 229-236.
- Wood, J.D., Enser, M., Richardson, R.I. & Whittington, F.M. (2008). Fatty acids in meat and meat products. In Chow, C.K., ed. *Fatty Acids in Foods and their Health Implications* pp. 87-107. CRC Press, London, UK.
- Wong E.D., Wagner J.A, Scott S.V., V. Okreglak, T.J. Holewinske, A. Cassidy- Stone. (2003). GTPase Mgm1p the intramitochondrial dynamin-related is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion, *J. Cell Biol.* 160 303–311.
- Yamamoto H, Schoonjans K and Auwerx J.(2007). Sirtuin Functions in Health and Disease. *Molecular Endocrinology*; 21(8):1745-1755.
- Yazawa H., Iwahashi H., Kamisaka Y., Kimura K. and Uemura H. 2009. *Wiley Inter Science*. 26:167-184.
- Zorrilla-García A. E .(2002). El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Biomed.* 21(3):178-185.

