



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

Programa de Doctorado Institucional en Ciencias Biológicas
Opción Biología Experimental

**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
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA
M. C. CHRISTIAN CORTÉS ROJO

TUTOR;
D.C. ALFREDO SAAVEDRA MOLINA

MORELIA, MICH. JUNIO DE 2009

"Respetar las advertencias es caminar a la vida, no hacer caso de la corrección es perder su camino"

(Proverbios. 10.17)

"El que aprecia que lo corrijan ama el saber; el que aborrece la reprensión es un tonto. Pon todo tu celo en instruirte, abre tus oídos a las palabras sabias. Compra la verdad, no la revendas; adquiere la sabiduría, la instrucción y la inteligencia"

(Proverbios. 12.1, 23.12, 23.23)

"Cuando hables, procura que tus palabras sean mejores que tu silencio"

(Proverbio Indio)

DEDICATORIA

A **Dios Nuestro Señor**, creador con su infinito poder de todas las maravillas de la Naturaleza. A El porque me permitió llegar a este momento de mi vida y me guío por este largo camino. Por su infinitas Sabiduría y Misericordia gracias.

Con especial amor, agradecimiento y admiración a mis amados Padres **Mario y Yolanda** por todo su amor, comprensión y ayuda. No podría pedir mejores Padres.

Gracias **Mamá**, por todos tus desvelos, tus atenciones de Madre, tu amor, tu constante preocupación por nosotros. Porque no me imagino como podría tener una mejor Madre. No alcanzarían todas las palabras ni todas las páginas para describir todo mi agradecimiento y amor hacia ti.

Gracias **Papá**, porque siempre has estado con nosotros en todo momento. Y porque en las malas a pesar de lo negro que pueda verse el panorama, tu nunca has desfallecido y con tu ejemplo nos impulsas a seguir luchando. No pasa un día en que no seas un ejemplo de como debe de ser un excelente Padre.

A mis hermanos **Mario, Brigitte y Diana**, por todo lo que hemos vivido juntos desde que éramos unos niños. Mi eterno agradecimiento y cariño para ustedes.

A mi tía **Teresa**, mi prima **Jessica** y Mi abue **Rita**, por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas.

A **Elizabeth** por todo su amor y su valía demostrados durante este camino que hemos recorrido juntos. Eres un verdadero tesoro que me gustaría conservar por el resto de mis días.

Al **Dr. Saavedra** y a **Moni** por todo su apoyo y amistad durante esta etapa de mi vida. Dios los bendiga y les colme de bendiciones.

A la **Idefix** y a la **Bolita** por su compañía y porque me ponen de buen humor en los días negros con sus ocurrencias.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Fco. Alfredo Saavedra Molina** y a **Mónica Clemente Guerrero** por su asesoría y apoyo brindados durante la realización de este trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial, **Dra. Emma Bertha Gutiérrez-Cirlos Madrid, Dr. Rafael Villalobos Molina, Dr. Ernesto García Pineda, Dr. Víctor Manuel Baizabal Aguirre, Dr Rafael Salgado Garciglia y Dr. Héctor Riveros Rosas** por toda su atención y tiempo prestado para la realización de este trabajo. Gracias por sus aportaciones y correcciones que enriquecieron de sobremanera el presente trabajo.

En especial a la **Dra. Emma Bertha Gutiérrez-Cirlos Madrid** y al **Dr. Ricardo Mejía Zepeda de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores-Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México** por la asesoría técnica y apoyo para la realización de experimentos claves para la culminación de este trabajo.

Al **Dr. Istvan Boldogh de la University of Texas Medical Branch, en Galveston TX., University of Texas**, por su apoyo y las sugerencias recibidas para la realización de este trabajo, así como al **Dr. Leopoldo Aguilera Aguirre**.

Al **M.C. Héctor Urquiza Marin** por todo el apoyo y amistad otorgados.

Al **Dr. Jesús Campos García** y a su técnica académica, la **M.C. Alma Laura Díaz Pérez**, por las facilidades otorgadas en su laboratorio para la realización de este proyecto, así como al **M.C. Alberto Flores García**.

A **Mirella Estrada Villagómez** por ser mi “brazo” durante la realización de este trabajo y por su amistad brindada durante estos años.

A todos mis compañeros y amigos del IIQB, **Edgar, Areli, Luz María, Dr. Salvador Manzo, Dr. Daniel Godínez, Leopoldo, Ana, Sacnité, Viridiana, Patricia, Georgina, Rocío, Ruth, Christian, José Luis, Alma y Alberto**.

A mis amigos de la Escuela de QFB **Giovanni, Nicolás, Servando, Martha, Jaime y Juan Manuel** con quienes he pasado momentos memorables y que continúan brindándome su amistad.

A la Sra. **Angela Briz** por su apoyo en los momentos difíciles.

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

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo económico recibido con la beca no. **167064**; Proyecto Fondos Mixtos CONACYT-Gobierno del Estado de Michoacán (64277); CIC-UMSNH (2.16).

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1.- INTRODUCCION	3
1.1 Importancia de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria en la supervivencia de la célula.....	3
1.2 Particularidades de la CTE de <i>S. cerevisiae</i>	4
1.3 El estrés oxidativo en la mitocondria y el papel del complejo III en la producción de especies reactivas del oxígeno.....	7
1.4 La lipoperoxidación y la disrupción de los centros redox de los complejos respiratorios en la disfunción de la CTE y la producción de ERO.....	9
1.5 La mitocondria como una fuente rica en inductores de la lipoperoxidación.	11
1.6 La importancia del grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas mitocondriales y su susceptibilidad a la lipoperoxidación.....	12
1.7 La mitocondria de la levadura <i>S. cerevisiae</i> como un modelo ideal para evaluar los efectos de la lipoperoxidación en la CTE.....	14
1.8 La levadura <i>S. cerevisiae</i> como modelo ideal para el estudio de la generación mitocondrial de ERO.....	16
1.9 El papel de la lipoperoxidación en la sensibilidad de la CTE al estrés oxidativo y la producción de ERO.....	18
2.- HIPOTESIS	20
3.- OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo general.....	21
3.2 Objetivos específicos.....	21
4.- RESULTADOS	22
Capítulo 1.....	22
Capítulo 2.....	33
Capítulo 3.....	47
4.1 Resultados adicionales.....	59
4.1.1. Efecto del H ₂ O ₂ en los niveles de lipoperoxidación en mitocondrias con C18:3.....	59
4.1.2 .Influencia de la incorporación del C18:3 sobre el efecto del H ₂ O ₂ en la	60

actividad de los complejos de la CTE.....	
4.1.3. Efecto protector de agentes antioxidantes sobre la inhibición de la CTE por H ₂ O ₂ y Fe ²⁺	61
4.1.4. Influencia de la incorporación de C18:3 sobre la producción de O ₂ ^{•-} bajo condiciones de estrés oxidativo por H ₂ O ₂	64
4.1.5. Efecto del H ₂ O ₂ y la lipoperoxidación sobre la disponibilidad mitocondrial de Fe en estado libre.	65
5.- DISCUSION	68
6.- PERSPECTIVAS	84
7. - BIBLIOGRAFIA	85

RESUMEN

La cadena de transporte de electrones (CTE) de la mitocondria juega un papel crucial en la generación de la energía necesaria para todas las funciones vitales de la célula. Al mismo tiempo, la CTE es una de las principales fuentes generadoras de especies reactivas de oxígeno (ERO) en la célula y es una fuente rica de hierro (Fe) y H_2O_2 , las cuales son especies potencialmente tóxicas. Dado que los lípidos de membrana son el blanco primario de las ERO, la hipótesis de este trabajo es que la peroxidación de los lípidos (lipoperoxidación) mitocondriales puede aumentar la sensibilidad de la CTE al daño oxidativo, debido a que algunos de los complejos que la conforman requieren de interacciones específicas fosfolípidos-proteína para su adecuado funcionamiento. El daño en dichas interacciones podría dar lugar a un aumento en la formación de ERO debido a la liberación del Fe de los grupos prostéticos de la CTE y a que podría alterarse el flujo de electrones y provocar la reducción parcial del oxígeno. Para comprobar esta hipótesis, en el presente trabajo se estudió el efecto del estrés oxidativo en la actividad de los complejos de la CTE de mitocondrias de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual se utilizó como modelo de estudio debido a que su composición de ácidos grasos la hace resistente a la lipoperoxidación y a que puede ser fácilmente manipulada para aumentar su susceptibilidad a ese proceso. Lo anterior permite discernir los efectos que son atribuibles a la lipoperoxidación de aquellos provocados por la interacción directa de las ERO con la CTE. El enriquecimiento con ácido linolénico (C18:3) aumentó la sensibilidad de a la lipoperoxidación. La lipoperoxidación aumentó la sensibilidad de la CTE al estrés oxidativo debido a un aumento en la sensibilidad de los complejos III y IV. En ausencia de lipoperoxidación, el β -mercaptoetanol y el manitol protegieron la actividad de los complejos de la CTE de la inhibición inducida por H_2O_2 y Fe^{2+} , respectivamente. En el complejo III, la lipoperoxidación afectó la reducción del citocromo *b*, lo cual fue relacionado con un aumento en la formación de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). La lipoperoxidación no afectó la concentración de citocromos; en contraste, en ausencia de lipoperoxidación, la concentración de citocromos *c+c₁* disminuyó por el estrés oxidativo. Asimismo, la lipoperoxidación aumentó la disponibilidad de Fe libre mitocondrial. En conjunto, los datos confirmaron la hipótesis de que la lipoperoxidación aumentó la sensibilidad de la CTE al estrés oxidativo, dando lugar a una mayor producción de ERO debido al daño en el complejo III y a la liberación de Fe de las pozas mitocondriales.

ABSTRACT

The electron transport chain (ETC) of mitochondrion plays a key role in the generation of the energy needed for vital processes of the cell. As well, the ETC is the main source of reactive oxygen species (ROS) and is a rich source of iron (Fe), which is potentially toxic due to its prooxidant properties. ETC functionality can become affected through the direct attack of ROS over complexes that comprise ETC. Since membrane lipids are the primary target of ROS, the hypothesis of this work is that lipoperoxidation can augment the sensitivity of ETC to oxidative damage since some ETC complexes require specific phospholipid-protein interactions for their adequate functioning. The damage in such interactions could lead to an increase in the ROS generation due to Fe release from prosthetic groups of ETC and altered electrons flow through ETC causing partial oxygen reduction. To test this hypothesis, in the present work it was studied the effect of oxidative stress on the activity of the ETC complexes from mitochondria of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. This microorganism was used as a model of study because of its resistance to lipoperoxidation, attributable to its native fatty acid composition. In fact, fatty acid composition can be easily manipulated to augment sensitivity of yeast to lipoperoxidation, which allows discriminating the effects that are attributable to lipoperoxidation from those provoked by direct interaction between ROS with ETC components. The enrichment with linolenic acid (C18:3) increased the sensitivity of spheroplasts and mitochondria to lipoperoxidation. Lipoperoxidation increased the sensitivity of ETC to oxidative stress and this was associated with an increase in the sensitivity of complexes III and IV. In the absence of lipoperoxidation, both β -mercaptoethanol and mannitol revert and protect, respectively, the activity of ETC complexes from the inhibition induced by H_2O_2 and Fe^{2+} . In complex III, lipoperoxidation altered succinate-dependent cytochrome *b* reduction, which was related to an increase in superoxide radical production ($O_2^{\bullet-}$). Lipoperoxidation did not affect cytochromes content; in contrast, the concentration of cytochromes *c+c₁* was diminished by oxidative stress. Also, lipoperoxidation increased the availability of mitochondrial free iron. Taken together, the data confirms the hypothesis that lipoperoxidation increased the sensitivity of ETC to oxidative stress, giving rise to a higher ROS production due to damage in complex III and the release of Fe from mitochondrial pools.

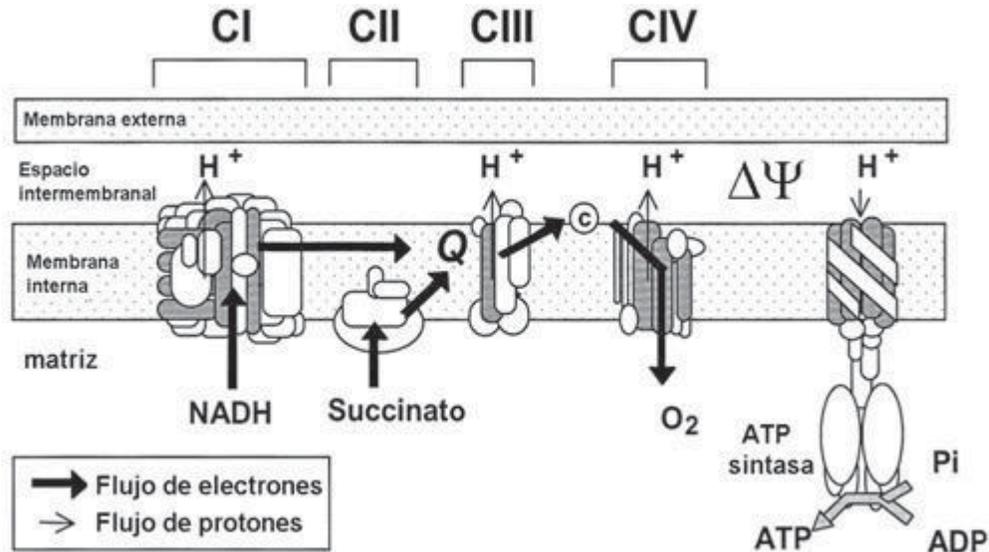
1.- INTRODUCCION

1.1 Importancia de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria en la supervivencia de la célula. Las células de los organismos vivos utilizan el ATP como fuente universal de energía para llevar a cabo una multitud de reacciones bioquímicas que son fundamentales para la supervivencia de las células y de los organismos. Casi cualquier trabajo celular se lleva a cabo gracias a la energía aportada por el ATP. Por ejemplo, el trabajo mecánico como la contracción muscular en los organismos pluricelulares (Regnier *et al.* 1998) y el movimiento flagelar en los organismos unicelulares (Christen *et al.* 1987), el movimiento de los cromosomas durante la mitosis (Cande y Wolniak 1978) y el transporte de sustancias a través de las membranas celulares (Ames 1998), dependen de la disponibilidad de ATP. Para el trabajo químico, el ATP aporta la energía química necesaria para la síntesis de biomoléculas mediante el acoplamiento de su hidrólisis (un proceso exergónico) con reacciones que se llevan a cabo de manera no espontánea (procesos endergónicos). Además del papel propiamente energético del ATP, también controla diversas reacciones metabólicas al inactivar enzimas por cambios conformacionales inducidos por fosforilación (Peña *et al.* 1979). Asimismo, el ATP sirve como molécula de señalización en plantas y animales (Gordon 1986, Chivasa *et al.*, 2005)

Dada la importancia del ATP en los seres biológicos, la mitocondria juega un papel crucial en la supervivencia de los organismos eucariontes debido a que ese orgánulo es la principal fuente de generación de ATP. La energía necesaria para su síntesis es producida por la cadena de transporte de electrones (CTE) de la mitocondria. La CTE es un ensamble de cuatro complejos enzimáticos (tres en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* debido a la ausencia del complejo I [de Vries y Grivell 1988]) embebidos en la membrana interna de la mitocondria (Esquema 1). Tres de esos complejos (I, III y IV) funcionan como bombas redox de electrones, acoplando el transporte de electrones a la translocación vectorial de protones. El transporte de electrones entre los complejos es facilitado por unos acarreadores de electrones (ubiquinona y citocromo *c*) que sirven para conectar eléctricamente a los complejos respiratorios (Nicholls y Ferguson 2002).

En la CTE se oxidan sustratos reducidos tales como el NADH o el succinato y los electrones provenientes de estas reacciones de oxidación son transportados a través de los complejos de la CTE hasta el O₂, el cual funciona como aceptor final de electrones en los

organismos aerobios. Este transporte está acoplado a una translocación vectorial de protones hacia el espacio intermembranar, generando una diferencia de pH y de cargas eléctricas (el potencial electroquímico, $\Delta\Psi$) a través de la membrana interna de la mitocondria. El ATP se sintetiza en la ATP sintasa a partir de ADP y fosfato inorgánico aprovechando la energía generada por el $\Delta\Psi$ (Saraste 1999).



Esquema 1. Componentes de la cadena de transporte de electrones. NADH:ubiquinona oxidoreductasa (CI), succinato:ubiquinona oxidoreductasa (CII), ubiquinona:citocromo *c* oxidoreductasa (CIII), citocromo *c* oxidasa (CIV), ubiquinona (Q), citocromo *c* (c). El NADH y el succinato son oxidados en los complejos I y II, respectivamente, y los electrones derivados de estas oxidaciones son transportados hacia el O₂. El transporte de electrones está acoplado a la translocación de protones la cual genera el potencial electroquímico ($\Delta\Psi$) cuya energía es aprovechada por la ATP sintasa para la síntesis de ATP. En *S. cerevisiae*, el complejo I está ausente. Tomado y modificado de Rötig y Munnich 2003.

1.2 Particularidades de la CTE de *S. cerevisiae*. En la mayoría de los animales y hongos utilizados como modelos biológicos de estudio, el complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa) constituye el único punto de entrada de los electrones provenientes del NADH a la CTE. Esta enzima acopla la transferencia de electrones del NADH a la ubiquinona con la translocación de protones a través de la membrana interna mitocondrial. Está constituida por 46 subunidades, 8 centros Fe-S y un FMN. La actividad del complejo I se inhibe en presencia de los inhibidores rotenona y piericidina (Matsuno-Yagi y Yagi 2001).

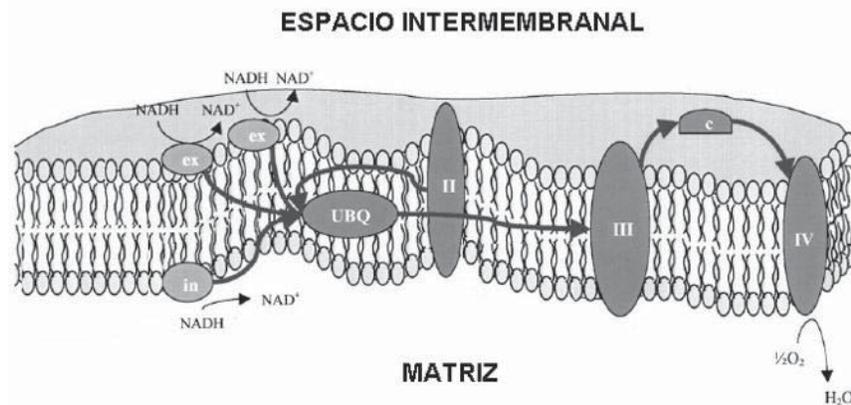
En contraste, las mitocondrias de la levadura *S. cerevisiae* carecen de complejo I. En su lugar, los equivalentes reductores son transferidos hacia la CTE mediante tres NADH deshidrogenasas alternas (NDE): Nde1p, Nde2p y Ndip (Esquema 2). A Nde1p y Nde2p se les denomina NADH deshidrogenasas externas debido a la orientación de su sitio catalítico hacia el espacio intermembranal, mientras que Ndip es considerada una deshidrogenasa interna debido a la orientación de su sitio catalítico hacia la matriz mitocondrial (Bunoust *et al.* 2004). Estas enzimas alternas están constituidas por una sola subunidad, contienen FAD como único grupo prostético y son insensibles a los inhibidores clásicos del complejo I. La principal diferencia funcional de las NDE respecto al complejo I es que el transporte de electrones hacia el ubiquinol no está acoplado a la translocación de protones (Joseph-Horne *et al.* 2001).

En los organismos que carecen de NADH deshidrogenasas alternas (p. ej., los mamíferos), el NADH producido en el citosol puede ser utilizado en la mitocondria únicamente por un proceso indirecto el cual se lleva a cabo por la lanzadera de aspartato-malato. En contraste, el NADH citosólico de la levadura es canalizado por la porina de la membrana externa mitocondrial hacia Nde1p y Nde2p, las cuales transfieren los electrones del NADH hacia la CTE. Por esta razón, estas enzimas han sido consideradas como el equivalente fisiológico de la lanzadera aspartato-malato de mitocondrias de mamíferos (Overkamp *et al.* 2000). Ndip oxida el NADH producido en la matriz por el ciclo de Krebs o por la alcohol deshidrogenasa mitocondrial; por esta razón se le considera la contraparte fisiológica del complejo I (De Vries y Marres, 1987).

A diferencia de otros hongos, la levadura se encuentra inusualmente adaptada al crecimiento anaerobio y por implicación, a la producción citosólica de NADH (Joseph-Horne *et al.* 2001). Incluso bajo condiciones totalmente aeróbicas, la producción citosólica de NADH es importante debido a que la levadura tiene una fuerte tendencia hacia la fermentación alcohólica, de tal modo que la fermentación más que la respiración es la modalidad predominante del metabolismo mientras haya una abundante disponibilidad de glucosa en el medio (Luttik *et al.* 1998). En adición, el NADH se produce en el citosol durante la síntesis de algunos aminoácidos (De Vries y Grivell 1988). La adaptación de la levadura a una alta producción de NADH se atribuye a las NADH deshidrogenasas externas, ya que estas enzimas juegan un papel fundamental en el mantenimiento del balance redox citosólico al constituir el

principal sistema de reoxidación del exceso de NADH producido en el citosol (Overkamp *et al* 2000).

La presencia de dos NADH deshidrogenasas externas podría parecer redundante; sin embargo, su duplicidad le confieren al metabolismo mitocondrial de la levadura una gran plasticidad ya que el papel de estas enzimas puede cambiar de acuerdo a las diferentes condiciones bajo las cuales este organismo puede crecer (Bunoust *et al.* 2004, Melo *et al.* 2004).



Esquema 2. Representación de la CTE de *S. cerevisiae*; ex, NADH deshidrogenasas externas; in, NADH deshidrogenasa interna; UBQ, poza de ubiquinol:ubiquinona; c, citocromo c. Nótese la ausencia del complejo I. Las flechas indican la dirección del flujo de electrones. Tomado y modificado de Joseph-Horne *et al.* 2001

Otra enzima que no se encuentra en las CTE típicas es la oxidasa alterna (AOX). Esta enzima cataliza la oxidación del ubiquinol y la reducción del O₂ a H₂O. Una función fisiológica propuesta para esta enzima es la disminución en la formación de ERO durante la inhibición de los complejos III y IV. Bajo esta condición, la ubisemiquinona se acumula en los sitios de unión a quinonas de los complejos I y III y se produce un aumento en la formación de ERO (Muller *et al.* 2002). La presencia de la AOX previene este efecto al tomar el papel del complejo III en la oxidación del ubiquinol y del complejo IV en la reducción del oxígeno. Esto puede tener relevancia fisiológica en hongos patógenos de plantas para evitar la respuesta de defensa basada en la producción de NO. Sin embargo, en el caso de *S. cerevisiae*, esta enzima no se encuentra presente ya que la presencia simultánea de las NDE y la AOX daría lugar a una respiración totalmente desacoplada en la cual la producción de ATP sería nula debido a

que no existiría bombeo de protones. De hecho, no se conoce ningún hongo en el cual el complejo I este ausente y la AOX presente (Joseph-Horne *et al.* 2001).

Por lo tanto, las características de la mitocondria de la levadura representan una ventaja para el estudio de la producción de ERO a nivel del complejo III, ya que la ausencia del complejo I permite asumir que la totalidad de las ERO producidas en la mitocondria provienen del complejo III, mientras que la ausencia de AOX constituye una variable menos que controlar durante la detección de las ERO.

1.3 El estrés oxidativo en la mitocondria y el papel del complejo III en la producción de especies reactivas del oxígeno.

Uno de los problemas del transporte de electrones en la CTE es que su eficacia no es del 100% debido a que algunos electrones pueden escapar de los sitios catalíticos de la CTE y reducir parcialmente al O₂ dando lugar a la formación de especies reactivas del oxígeno (ERO) tales como el radical superóxido (O₂^{•-}) o el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Turrens 2003). Diversas condiciones, entre las que destacan: ciertos inhibidores de la CTE (p. ej., la antimicina A), algunos estados patológicos (p. ej., la isquemia-reperusión [Paradies *et al.* 2004]) o una disminución en la capacidad antioxidante de la mitocondria, aumentan la generación de ERO, provocando estrés oxidativo que puede afectar el correcto funcionamiento de la CTE y como consecuencia, condicionar la generación de energía necesaria para la supervivencia de la célula. El estudio de los mecanismos por los que el estrés oxidativo causa disfunción mitocondrial se ha convertido en un importante tema de estudio, debido a que participa en una amplia variedad de desórdenes, como el daño hepático por el virus de la hepatitis B (Lee *et al.* 2004), el daño por isquemia-reperusión (Lucas y Szweda 1998), el cáncer (Guo y Lemire 2003), la diabetes (Green *et al.* 2004) o enfermedades degenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica (Sen *et al.* 2006).

Uno de los principales sitios de generación de ERO es el complejo III, también conocido como complejo ubiquinona:citocromo *c* oxidorreductasa o complejo de citocromos *bc*₁. El complejo III transfiere los electrones de la ubiquinona reducida (ubiquinol, QH₂) hacia el citocromo *c* y transloca cuatro protones hacia el lado electropositivo de la membrana (espacio intermembranal) por par de electrones transferidos a dos moléculas de citocromo *c* (Trumpower 1990). El ciclo Q es el mecanismo por el cual complejo III transfiere electrones

desde el QH₂ hacia el citocromo *c* y acopla este proceso a la translocación de protones. Durante el ciclo Q (Esquema 2), el QH₂ es oxidado en el sitio quinol oxidasa (Q_O) mediante una reacción que de manera divergente, transfiere los dos electrones del QH₂, uno de ellos hacia el grupo Fe-S de la subunidad de Rieske (ISP) y el otro al hemo *b_L* de la subunidad citocromo *b* (reacciones 1a y 1b). El electrón de la ISP es transferido al citocromo *c* a través de la subunidad citocromo *c*₁ mediante la rotación del dominio extrínseco de la ISP hacia las inmediaciones del citocromo *c*₁ (reacción 2). Al mismo tiempo, dos protones son liberados del sitio Q_O hacia el espacio intermembranal. El electrón del hemo *b_L* es transferido al hemo *b_H* (reacción 3) y este último reduce parcialmente una molécula de ubiquinona (Q) a radical ubisemiquinona (QH[•]) en el sitio quinol reductasa (Q_i) (reacción 4). En un segundo ciclo de reacciones, otra molécula de QH₂ es oxidada en el sitio Q_O, se reduce otra molécula de citocromo *c*, se liberan otros dos protones al espacio intermembranal y se reduce la QH[•] del sitio Q_i para formar una molécula de QH₂ (reacción 5), concomitante con el consumo de dos protones en el sitio Q_i (Hunte *et al.* 2003).

La interrupción en la transferencia de electrones entre los componentes redox del complejo III puede llevar a la aparición de reacciones colaterales a las que ocurren durante el ciclo Q, que son responsables por la formación de ERO. Por ejemplo, el tratamiento con el inhibidor antimicina A bloquea la reoxidación del citocromo *b_H* en el sitio Q_i, causando que los electrones se acumulen en los hemos del citocromo *b* y que ocurra una transferencia reversa de los electrones hacia la ubiquinona en el sitio Q_O (reacción 6, línea punteada) para producir radical QH[•], el cual puede reducir al oxígeno a radical superóxido (O₂^{•-}, reacción 7) (Muller *et al.* 2002). La formación de O₂^{•-} en presencia de antimicina puede inhibirse en presencia del inhibidor estigmatelina, el cual evita la oxidación del QH₂ en el sitio Q_O.

niveles de lipoperoxidación. Asimismo, en mitocondrias aisladas de corazón de rata y bovino sujetas a un ciclo de isquemia-reperfusión, se observó que la producción de H_2O_2 aumentó en presencia de succinato como sustrato respiratorio, causando la pérdida del fosfolípido cardiolipina debido a un aumento en los niveles de lipoperoxidación, lo cual se asoció con una disminución en la velocidad de respiración en estado 3 atribuida a una inhibición parcial en las actividades de los complejos I y III (Petrosillo *et al.* 2003, Paradies *et al.* 2004).

Dichos estudios ponen de relieve el papel de la destrucción de la Q y de la cardiolipina como la principal causa de disfunción de la CTE. Sin embargo, poco se ha explorado acerca del efecto de la lipoperoxidación sobre los componentes redox de los complejos de la CTE (p. ej., los citocromos). Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo en partículas submitocondriales de corazón de bovino, se observó que el contenido de citocromo *c* y la reducción del citocromo *b* por sustratos respiratorios disminuyen bajo condiciones lipoperoxidantes inducidas con ascorbato y ADP/Fe^{3+} (Forsmark-Andree *et al.* 1997). Sin embargo, a partir de estos resultados parece difícil establecer una correlación directa entre las anomalías en la reducción y el contenido de citocromos y la lipoperoxidación, puesto que el efecto directo de las ERO sobre los citocromos no fue descartado de manera apropiada (p. ej., no se usaron inhibidores de la lipoperoxidación).

El efecto de la lipoperoxidación sobre la transferencia de electrones en los citocromos es una importante cuestión a elucidar debido a que, durante la catálisis del complejo III, los citocromos participan en la transferencia de electrones en los sitios de generación de ERO (Hunte *et al.* 2003). Además, existe un vínculo entre la transferencia de electrones en los citocromos y la integridad de los lípidos de la membrana interna mitocondrial, ya que se han establecido interacciones específicas entre los fosfolípidos y subunidades del complejo III que son esenciales para su correcta conformación y actividad catalítica. Por ejemplo, se ha descrito una interacción específica entre fosfatidilinositol y una región flexible de la ISP, que permite el movimiento rotacional del dominio cabeza de esta subunidad entre las proximidades del hemo b_L del citocromo *b* y el citocromo c_1 (Lange *et al.* 2001). Se ha sugerido que este movimiento rotacional es parte del mecanismo que permite la oxidación concertada del ubiquinol por parte de la ISP y el citocromo b_L que impide la formación del radical QH^\bullet en el sitio Q_O (Zhu *et al.* 2007). Asimismo, la deslipidación del complejo III altera la unión de la antimicina A en un modo reversible al adicionar cardiolipina, lo que refleja que el citocromo

b requiere este fosfolípido para una estabilización adecuada de su estructura (Tsai *et al.* 1986). La relación de la lipoperoxidación con la alteración de los centros redox del complejo III fue puesta de manifiesto en mitocondrias de hígado de rata, donde se encontró que el complejo III es la enzima de la CTE más susceptible al ataque por radicales libres, producidos por el sistema ascorbato/Fe, sin observarse alteraciones estructurales en las subunidades del complejo. Así, se sugirió que la sensibilidad podría explicarse por daño específico de los centros redox del complejo, debido a alteraciones en las interacciones fosfolípidos-proteínas (Reinheckel *et al.* 1995).

1.5 La mitocondria como una fuente rica en inductores de la lipoperoxidación. La mitocondria es una fuente rica en especies químicas que pueden estimular la lipoperoxidación al generar el radical hidroxilo (OH^\bullet), el cual puede iniciar y propagar dicho proceso (North *et al.* 1992). Esas especies químicas son el Fe y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El Fe es un metal de transición que puede catalizar la formación de radical OH^\bullet en presencia de H_2O_2 mediante la reacción de Fenton (Reacción 1) (Winterbourn 1995):



Asimismo, el Fe en estado reducido (Fe^{2+}), puede dar lugar a la formación de un agente oxidante fuerte con características de radical OH^\bullet (North *et al.* 1992). La mitocondria es una fuente importante de Fe debido a que: (1) en este orgánulo se lleva a cabo casi la totalidad de la síntesis de los centros Fe-S y la incorporación de Fe en la protoporfirina IX, el cual es el paso final para la síntesis de grupos hemo (Kwok y Kosman 2005) y (2) la CTE es rica en centros Fe-S y grupos hemo, debido a la capacidad del Fe para cambiar su estado de oxidación y transferir electrones (González-Halphen y Vázquez-Acevedo 2002).

La CTE de la mitocondria es considerada como una de las fuentes más importantes de producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en los organismos aerobios (Halliwell y Gutteridge 1999). A su vez, el radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ producido en la mitocondria es rápidamente convertido a H_2O_2 por la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) (Liu *et al.* 2002), lo que convierte a la mitocondria en uno de los sitios más importantes de generación de H_2O_2 en la célula. No obstante que entre las ERO el H_2O_2 es un oxidante débil y una especie generalmente poco reactiva (Halliwell y

Gutteridge 1999), su reacción con Fe en estado libre produce especies más oxidantes que pueden estimular la lipoperoxidación, tales como el radical OH^\bullet (Winterbourn 1995). Asimismo, el H_2O_2 puede favorecer la formación de OH^\bullet y la lipoperoxidación al aumentar la disponibilidad del Fe en estado libre por degradación de los grupos hemo y los centros Fe-S de algunas proteínas (Jang e Imlay 2007; Halliwell y Gutteridge 1999), lo que ocasiona la liberación del Fe contenido en estos grupos prostéticos.

En síntesis, la abundancia de Fe en la mitocondria y su importante capacidad para generar H_2O_2 son factores que podrían conjugarse para afectar el funcionamiento de la CTE mediante la generación de radical OH^\bullet , producto de la interacción entre estas dos especies químicas y la consecuente estimulación de la lipoperoxidación.

1.6 La importancia del grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas mitocondriales y su susceptibilidad a la lipoperoxidación. Algunos estudios han mostrado que el grado de insaturación de las membranas mitocondriales y su susceptibilidad a la lipoperoxidación podrían jugar un papel clave en procesos importantes tales como el envejecimiento o el desarrollo de algunos tipos de cáncer (Herrero *et al.* 2001, Ng *et al.* 2005). Lo anterior ha sido relacionado con la formación mitocondrial de ERO y el daño inducido por las mismas sobre los componentes de la CTE. Sin embargo, no se ha estudiado a fondo el mecanismo mediante el cual la lipoperoxidación y el daño a la CTE provocan un aumento en la formación de ERO.

En el caso del envejecimiento, se ha encontrado que las especies animales con mayores longevidades tienen un contenido de ácidos grasos con un nivel de insaturación menor que el de las especies menos longevas. Asimismo, la generación mitocondrial de ERO es menor en especies con mayor longevidad. Por lo tanto, se ha propuesto que un menor grado de insaturación lipídica podría disminuir la susceptibilidad a la lipoperoxidación y contribuiría a preservar la funcionalidad mitocondrial (Pamplona *et al.* 1998, 2000). Además, se ha sugerido que la mayor resistencia a la lipoperoxidación y la tasa reducida de producción de ERO podrían estar mecanísticamente interconectadas. Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo en mitocondrias de corazón de ratas a las cuales se les manipuló el grado de insaturación de sus membranas mediante la administración en la dieta de ácidos grasos altamente insaturados (p. ej. ácido docosahexanoico, C22:6), se encontró que el aumento en el grado de insaturación

incrementó los niveles de lipoperoxidación y esto fue asociado con un aumento en la producción de ERO en el complejo III en presencia de antimicina A. Sin embargo, dicha relación fue solo asociativa y no se investigó el mecanismo mediante el cual los niveles mayores de lipoperoxidación dieron lugar a un incremento en la formación de ERO (Herrero *et al.* 2001). En adición, en este trabajo no se descartó la posibilidad de que otros cambios inducidos por el tratamiento dietético, diferentes de su impacto sobre la composición lipídica, pudieran ser también responsables de las variaciones observadas en el daño oxidativo a los lípidos y la tasa de generación de ERO.

En otro estudio, se demostró que la presencia de ácidos grasos altamente insaturados aumenta durante el envejecimiento de ciertos órganos (p. ej., los testículos), lo cual trae como consecuencia un aumento en la susceptibilidad a la lipoperoxidación y en la formación de ERO y una disminución en la actividad de la CTE. Sin embargo, en dicho trabajo no se encontró una relación directa entre los niveles de lipoperoxidación y la sensibilidad de los complejos de la CTE a dicho proceso, lo cual fue atribuido a la alta actividad de ciertos sistemas antioxidantes encargados de remover los productos de la lipoperoxidación en mitocondrias de testículo (Vázquez-Memije *et al.* 2008).

Asimismo, se ha demostrado que la incorporación de C22:6 aumenta los niveles de lipoperoxidación y la producción de ERO en una línea inmortalizada de colonocitos de rata sujetos a un tratamiento con butirato. Sin embargo, en este caso solo se investigó la relación entre la producción de ERO y la inducción de la apoptosis y no se exploró el mecanismo mediante el cual el butirato y la incorporación de C22:6 aumentaron la tasa de generación de ERO en la mitocondria (Ng *et al.* 2005).

Una posible alternativa para manipular el contenido de ácidos grasos de las membranas mitocondriales es la adición directa de ácidos grasos con diferentes grados de insaturación a mitocondrias aisladas. Sin embargo esta estrategia plantea algunos problemas si se pretende estudiar el efecto de la lipoperoxidación sobre la sensibilidad de la CTE al estrés oxidativo y su relación con la producción de ERO. Por ejemplo, en algunos casos, la adición directa de ácidos grasos a mitocondrias aisladas inhibe *per se* la actividad de la CTE y provoca un aumento en la producción de ERO (Cocco *et al.* 1999, Bondy y Marwah 1995) mientras que en otros casos, los ácidos grasos promueven el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa dando lugar a una disminución en la formación de ERO (Korshunov *et al.* 1998).

Por lo tanto, para estudiar la relación entre la lipoperoxidación, la inhibición de la CTE y la formación de ERO es deseable contar con un modelo en el cual la composición de ácidos grasos pueda ser manipulada *in vivo* para evitar los problemas derivados de la adición directa de los ácidos grasos a la mitocondria y la posible influencia de factores dietéticos que puedan influir en la producción de ERO y el funcionamiento de la CTE. Además, puede ser conveniente contar con un modelo en el cual la lipoperoxidación pueda ser anulada totalmente para discriminar los efectos de la lipoperoxidación sobre la funcionalidad de la CTE de aquellos producidos directamente por la interacción entre las ERO y los componentes de la ETC. A este respecto, las mitocondrias provenientes de modelos de mamíferos son poco convenientes ya que sus membranas por lo general están constitutivamente formadas por ácidos grasos susceptibles a la lipoperoxidación (Faulks *et al.* 2006).

1.7 La mitocondria de la levadura *S. cerevisiae* como un modelo ideal para evaluar los efectos de la lipoperoxidación en la CTE. La levadura *S. cerevisiae* es un microorganismo unicelular eucarionte que posee casi todas las estructuras subcelulares, incluyendo las mitocondrias, observadas en los organismos eucariontes más complejos. Los estudios con la mitocondria de la levadura han sido clave para entender las funciones mitocondriales en organismos superiores, ya que la función mitocondrial y su composición proteica se encuentra conservada (Prokisch *et al.* 2006; Boldogh y Pon 2007). *S. cerevisiae* es un microorganismo aerobio facultativo que puede crecer bajo condiciones anaerobias con una fuente de carbono fermentable. Esta característica es una importante ventaja con respecto a otros modelos biológicos pues permite crecer células de levadura, aún con mutaciones en el ADN mitocondrial, que causen deficiencias respiratorias debido al daño a una o algunas funciones específicas (Contamine y Picard 2000). De este modo, se puede determinar si la mitocondria se encuentra involucrada en algún fenómeno en particular (p. ej., la muerte celular, la síntesis de algún metabolito, etc.)

Una de las peculiaridades de las células de *S. cerevisiae* es su composición membranal de ácidos grasos, donde 70-80% son ácidos grasos monoinsaturados: ácido palmitoleico (C16:1) y ácido oleico (C18:1), y el resto son ácidos grasos saturados: ácido palmítico (C16:0) y ácido esteárico (C18:0) (Bossie y Martin 1989). Una composición similar se observa en la mitocondria cuando la levadura crece en una fuente de carbono no fermentable (Tuller *et al.*

1999). Los ácidos grasos monoinsaturados de la levadura son sintetizados a partir de sus precursores acil-CoA por la desaturasa del retículo endoplásmico Ole1p, la cual introduce un doble enlace entre los carbonos 9 y 10 de la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos saturados (Bossie y Martin 1989). Además, *S. cerevisiae* puede importar del medio de cultivo una amplia variedad de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, lo cual produce cambios radicales en la composición de los grupos acilo de los lípidos de membrana al disminuir o inhibir la desaturasa Ole1p y el remplazo de las especies monoinsaturadas nativas con los ácidos grasos suplementados en el medio de cultivo (Martin *et al.* 2007).

Como en el caso de *S. cerevisiae*, tanto la rata como el ser humano contienen una $\Delta 9$ desaturasa (denominada SCD en estas especies) que utiliza como sustratos preferentemente a los ácidos grasos saturados ácido palmítico (C16:0) y ácido esteárico (C18:0) para formar los correspondientes ácidos grasos monoinsaturados ácido palmitoleico (C16:1) y ácido oleico (C18:1), los cuales son los principales ácidos grasos monoinsaturados de los fosfolípidos de membrana. De manera similar a lo que sucede en *S. cerevisiae*, la expresión de SDC puede ser reprimida a través del suministro en la dieta de ácidos grasos poliinsaturados (C18:3n-3, C18:3n-6, C20:4n-6, C20:5n-3, C22:6n-3). Dichas especies inhiben la transcripción del gen que codifica para SDC a través de factores de transcripción que se unen a elementos de respuesta a ácidos grasos. Asimismo, los ácidos grasos poliinsaturados disminuyen los niveles de la desaturasa a través de la desestabilización de los ARNm de SDC (Tambi, 1999). Por lo anterior, la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados puede alterar la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de las membranas mitocondriales de mamíferos. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en la levadura, la composición de ácidos grasos de los mamíferos muestra cierto grado de resistencia a las alteraciones dietarias. Por ejemplo, si se suministra una dieta libre de ácidos grasos poliinsaturados, los mamíferos sintetizan un ácido graso poliinsaturado inusual (C20:3n-9) (Hulbert *et al.* 2007). Por lo tanto, para el objetivo principal de este trabajo (la elucidación de los efectos de la lipoperoxidación sobre la cadena de transporte de electrones), esto representa un problema en los modelos de mamíferos ya que hace difícil la manipulación de la composición de ácidos grasos a un nivel en el cual predominen únicamente ácidos grasos resistentes a la lipoperoxidación (saturados y monoinsaturados). A este respecto, resulta más ventajoso el uso de *S. cerevisiae* como modelo de estudio ya que este microorganismo regula la fluidez de su membrana a través de la

variación en la proporción de C18:1 y C16:1/C18:0 y C16:0 y no es capaz de sintetizar ácidos grasos poliinsaturados.

Una característica de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados es su resistencia a la peroxidación (Holman 1954). En contraste, la susceptibilidad de los ácidos grasos poliinsaturados a la peroxidación aumenta de manera exponencial al incrementarse el número de dobles enlaces (Pamplona *et al.* 2000). Lo anterior implica que las mitocondrias de la levadura nativa son más resistentes y que su susceptibilidad a la lipoperoxidación puede aumentar al manipularse la composición de los ácidos grasos membranales. Por lo tanto, la mitocondria de la levadura constituye un modelo ideal para discernir los efectos de la lipoperoxidación sobre el funcionamiento de la CTE de aquellos efectos causados por las ERO y que no son mediados por la lipoperoxidación.

1.8 La levadura *S. cerevisiae* como modelo ideal para el estudio de la generación mitocondrial de ERO. No obstante que las cadenas de transporte de electrones han sido reconocidas como la fuente principal *in vivo* de ERO en la vasta mayoría de las células aerobias (Halliwell y Gutteridge 1999), existen otras fuentes importantes las cuales incluso, bajo ciertas condiciones, pueden sobrepasar la capacidad de producción de ERO de la mitocondria.

La principal fuente no mitocondrial de generación de ERO son las NAD(P)H oxidasas (Nox). Estas enzimas catalizan la reducción monovalente del O_2 a $O_2^{\cdot-}$ usando NADPH como donador de electrones. Las Nox están comprendidas dentro de una familia de proteínas que agrupa a 7 miembros en vertebrados (Griendling 2006). Estas proteínas se expresan en virtualmente cada tejido de mamíferos y median una multitud de funciones biológicas tales como la defensa del hospedero, la inflamación, el desarrollo celular, la señalización celular, la expresión de genes, por solo mencionar algunos ejemplos (Bedard y Krauze 2007). A diferencia de otras proteínas que producen ERO como subproductos, la función enzimática de las Nox consiste específicamente en la producción de ERO, por lo que su actividad debe ser finamente regulada (Lambeth *et al.* 2007). De lo contrario, la sobreproducción de ERO por las Nox ocurre en una amplia variedad de condiciones patológicas que incluyen padecimientos crónicos como la hipertensión, la aterosclerosis, la diabetes o enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o el mal de Parkinson (Lambeth 2007).

En *S. cerevisiae* no se ha reportado la presencia de miembros de la familia Nox y solo se ha descrito la presencia de una ferrireductasa (Fre1p) que guarda cierta homología con las Nox humanas. Esta proteína contiene un segmento de 402 aminoácidos en su extremo C-terminal que presenta un 18% de identidad y un 62% de similaridad con la subunidad gp91^{phox} de la Nox de células fagocíticas humanas. La función de Fre1p es la reducción del Fe³⁺ a Fe²⁺ para facilitar su transporte a través de la membrana plasmática (Dancis *et al.* 1992, Roman *et al.* 1993). Sin embargo, se ha demostrado que Fre1p no es capaz de producir radical O₂^{•-} (Shatwell *et al.* 1996).

Otra enzima involucrada en la formación de radical O₂^{•-} es la xantina oxidasa. Esta proteína produce O₂^{•-} bajo condiciones *in vitro*. Sin embargo, esta enzima funciona *in vivo* como una xantina deshidrogenasa, catalizando la transferencia de electrones desde sus sustratos al NADH. La xantina deshidrogenasa se convierte en una xantina oxidasa durante su purificación por el ataque de enzimas proteolíticas o por la oxidación de grupos –SH. Por lo tanto, el metabolismo de la xantina por esta enzima normalmente no genera ERO (Halliwell y Gutteridge 1999). Se han reportado secuencias de aminoácidos con posible función de xantina deshidrogenasa en los hongos *Neurospora crassa* (XP_956459.2) y *Aspergillus niger* (XP_001401908.1). En *S. cerevisiae* no se han descrito secuencias de aminoácidos o marcos de lectura abiertos que codifiquen para esta proteína.

Las enzimas citocromo P450 (CytP450) son oxidases terminales de membrana presentes en la mayoría de los organismos vivos incluyendo a la levadura (Sutter y Loper 1989). Estas enzimas se encargan de la activación o la inactivación metabólica de la mayor parte de los xenobióticos y pueden en ciertas ocasiones producir como subproducto al radical O₂^{•-} (Madger 2006). En mamíferos, las CytP450 catalizan la formación de ERO utilizando como sustrato ácido araquidónico (Terashvili *et al.* 2006). Por lo tanto, es posible que la generación de ERO por esta vía sea marginal en la levadura dado que este microorganismo no contiene dicho ácido graso (Martin *et al.* 2007).

Otras fuentes importantes de ERO en células de mamíferos son la ciclooxigenasa (Madger 2006) y bajo ciertas condiciones (p. ej., en ausencia del cofactor tetrahydrobiopterina), las diferentes isoformas de la óxido nítrico sintasa (NOS) (Andrew 1999). Estas dos enzimas no están codificadas en el genoma de la levadura (Brenner 2004, Castello *et al.* 2006) y por tanto, no constituyen una fuente de ERO en este microorganismo.

Con base a todo lo anterior, se puede considerar a *S. cerevisiae* como un modelo ideal para el estudio de la generación de ERO en la mitocondria, dado que los principales sistemas no mitocondriales de generación de ERO se encuentran ausentes (Nox, NOS, ciclooxigenasas) o su contribución a este proceso puede considerarse marginal (Cyt P450, xantina oxidasa). Por lo tanto, la contribución principal a la formación de ERO en la levadura está dada por el complejo III de la CTE.

1.9 El papel de la lipoperoxidación en la sensibilidad de la CTE al estrés oxidativo y la producción de ERO. Con base en los antecedentes, la hipótesis de trabajo es que la lipoperoxidación incrementa la sensibilidad de la CTE a los efectos perjudiciales del estrés oxidativo y la producción de ERO por alterar las interacciones fosfolípidos-proteínas esenciales para el funcionamiento de los complejos respiratorios. En lo particular, la lipoperoxidación podría aumentar la sensibilidad al estrés oxidativo en aquellos complejos donde hay requerimiento de lípidos para su adecuado funcionamiento (Chicco y Sparagna 2007). En el complejo III, la lipoperoxidación podría alterar la transferencia bifurcada de electrones en el sitio Q_0 hacia los citocromos *b* y c_1 al afectar las interacciones con los fosfolípidos que permiten el movimiento rotacional de la ISP. Además, la lipoperoxidación afectaría la capacidad del citocromo *b* para aceptar uno de los electrones provenientes de la oxidación del QH_2 ya que esta subunidad requiere lípidos para mantener una estructura y función adecuadas (Tsai *et al.* 1986), y podría ser una de las subunidades catalíticas del complejo más susceptible al daño lipoperoxidativo por su naturaleza hidrofóbica (Trumpower 1990a). Por lo tanto, el resultado acumulativo de estos efectos sería la disminución en la transferencia de electrones producto de la oxidación del QH_2 hacia los citocromos, dando lugar a la acumulación del radical QH^\bullet y a una reacción colateral al ciclo Q que favorecería la formación anómala de radical $O_2^{\bullet-}$ debido a la reducción del oxígeno por el radical QH^\bullet .

Por otra parte, la probabilidad de que las interacciones fosfolípidos-proteínas sean afectadas por el estrés oxidativo sería menor en ausencia de lipoperoxidación y por lo tanto, bajo esta condición, se esperaría que ciertos aminoácidos en las proteínas de los complejos sean el principal blanco del estrés oxidativo. Uno de los aminoácidos más susceptibles al ataque por ERO es la cisteína (Davies *et al.* 1987). Puesto que se ha demostrado en los complejos de la CTE la existencia de grupos $-SH$ de la cisteína que responden al estrés

oxidativo (Lin *et al.* 2002) y que regulan su actividad catalítica, (Lê-Quôc *et al.* 1981, Hurd *et al.* 2008), la oxidación de dichos grupos podría constituir el principal mecanismo de inhibición de la CTE en ausencia de lipoperoxidación. En estas condiciones, la inhibición de la CTE podría ser revertida mediante el uso de agentes reductores de grupos –SH. En consecuencia, es posible predecir que bajo condiciones lipoperoxidantes, la sensibilidad de la CTE al estrés oxidativo será mayor por acumulación provocada por el daño en los fosfolípidos de membrana esenciales para la actividad de la CTE, así como por la oxidación de los –SH que pueden regular esa actividad. Visto desde otra perspectiva, la resistencia intrínseca de la mitocondria de levadura a la lipoperoxidación aumentaría la resistencia de la CTE a los efectos dañinos del estrés oxidativo y disminuiría la formación de ERO en los sitios redox del complejo III.

En adición, es factible proponer que la liberación del Fe de los centros redox de la CTE se favorecería durante la lipoperoxidación ya que este proceso podría dañarlos. El aumento en la disponibilidad de Fe en estado libre estimularía la formación de radical OH[•]. Lo anterior y la hipotética formación de ERO en los centros redox del complejo III, formarían un círculo vicioso de daño oxidativo-producción de ERO que culminaría con el colapso bioenergético de la célula, el cual se vería reflejado como una disminución en la viabilidad que sería de mayor magnitud bajo condiciones lipoperoxidantes.

2.- HIPOTESIS

La lipoperoxidación aumenta la sensibilidad de la CTE hacia los efectos dañinos del estrés oxidativo y la producción de ERO mediante la inducción de reacciones colaterales al ciclo Q y la liberación de Fe.

3.- OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Demostrar que la lipoperoxidación aumenta la susceptibilidad de la CTE de *S. cerevisiae* al daño por el estrés oxidativo y la producción de ERO.

3.2 Objetivos específicos

- Aumentar la sensibilidad de *S. cerevisiae* a la lipoperoxidación al modificar su contenido de ácidos grasos de membrana.
- Determinar si la modificación del contenido de ácidos grasos de membrana aumenta la sensibilidad de la CTE y de la viabilidad celular hacia los efectos del estrés oxidativo.
- Establecer el papel de la lipoperoxidación en la inhibición de la CTE por el estrés oxidativo.
- Conocer si la oxidación de grupos –SH está involucrada en la inhibición de la actividad enzimática de los complejos de la CTE por el estrés oxidativo.
- Determinar si la lipoperoxidación aumenta la formación de ERO en el complejo III por reacciones colaterales al ciclo Q.
- Establecer si la lipoperoxidación altera la concentración y/o la reducción de los citocromos.
- Determinar si la lipoperoxidación favorece un aumento en la disponibilidad de Fe en estado libre en la mitocondria.

4.- RESULTADOS

Capítulo 1

Información Tecnológica
Vol. 20(2), 71-81 (2009)
doi:10.1612/inf.tecnol.40438.08

Influencia de la Peroxidación de Lípidos sobre el Daño Oxidativo Mitocondrial y la Integridad de *Saccharomyces cerevisiae*

Christian Cortés-Rojo, Mirella Estrada-Villagómez, Salvador Manzo-Ávalos y Alfredo Saavedra-Molina

Univ. Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Edificio B-3, Ciudad Universitaria, 58030 Morelia, Michoacán-México (e-mail: saavedra@umich.mx)

*autor a quien debe ser dirigida la correspondencia

Resumen

Se ha estudiado la influencia de la peroxidación de lípidos sobre el daño oxidativo mitocondrial y la integridad de *Saccharomyces cerevisiae*. Para esto, se aumentó el grado de insaturación de las membranas celulares de *S. cerevisiae* con ácido α -linolénico (C18:3). Se obtuvieron esferoplastos para poder estudiar la función mitocondrial *in situ*. Se encontró que la peroxidación de lípidos, estimulada por la adición de Fe^{2+} , incrementó únicamente en esferoplastos con C18:3, mientras que la función mitocondrial, medida como el consumo de oxígeno sensible a cianuro y la integridad celular, determinada por la exclusión del colorante azul de tripano, se ven afectadas de manera significativa sólo en esferoplastos con C18:3. Estos resultados muestran que la peroxidación de lípidos sensibiliza la integridad celular y la función mitocondrial hacia los daños por el estrés oxidativo.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, estrés oxidativo, ácido linolénico, peroxidación lipídica

Influence of Lipoperoxidation over Mitochondrial Oxidative Damage and Integrity of *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

The influence of lipoperoxidation over mitochondrial oxidative damage and integrity of *Saccharomyces cerevisiae* has been studied. For this, the unsaturation degree of cell membranes from *Saccharomyces cerevisiae* was increased by adding α -linolenic acid (C18:3). Spheroplasts were obtained to evaluate *in situ* the mitochondrial function. Lipid peroxidation levels, stimulated by the treatment with Fe^{2+} , increased only in spheroplasts with C18:3, while mitochondrial function, measured as cyanide-sensitive oxygen consumption, and cell integrity, determined by trypan blue exclusion, were affected significantly only in spheroplasts with C18:3. These results show that lipid peroxidation sensitizes cell integrity and mitochondrial function towards damaging effects of oxidative stress.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, oxidative stress, linolenic acid, lipid peroxidation

INTRODUCCIÓN

La cadena de transporte de electrones (CTE) de la mitocondria es el principal sitio de generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) en las células aerobias eucariontes (Beckman y Ames, 1998). 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).

Durante el estrés oxidativo, uno de los principales blancos de daño oxidativo por ERO son las colas hidrofóbicas insaturadas que componen a los lípidos de las membranas mitocondriales. 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 rata sujeto a un proceso de isquemia-reperusión, 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.

La susceptibilidad de las membranas biológicas a la peroxidación depende fuertemente del grado de insaturación de los lípidos que las constituyen, siendo mayor su susceptibilidad conforme aumenta el número de dobles enlaces (Pamplona et al., 2000). De acuerdo a lo anterior, la vulnerabilidad de la CTE a la inhibición por el ataque de ERO podría ser atenuada al disminuir el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas lipídicas. Asimismo, 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.

El objetivo de este trabajo fue comprobar esta hipótesis para lo cual se utilizaron células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio debido a que 1) la función de la CTE puede ser estudiada *in situ* mediante la formación de esferoplastos (células sin pared celular), 2) el grado de insaturación de sus membranas puede ser fácilmente manipulado a través de la adición de ácidos grasos insaturados libres al medio de cultivo y 3) que la composición nativa de los ácidos grasos de membrana de la levadura consiste principalmente de los ácidos grasos saturados ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0) y los ácidos grasos monoinsaturados ácido palmitoleico (C16:1) y ácido oleico (C18:1) (Bossie y Martin, 1989), los cuales son resistentes a la peroxidación (Holman, 1954) y permite estudiar los efectos del estrés oxidativo que son independientes de este proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

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

Aislamiento de esferoplastos

Los esferoplastos se aislaron de acuerdo con el método reportado por Guérin et al. (1979), a partir de la cepa industrial Yeast Foam de la levadura *S. cerevisiae*. Las células fueron crecidas en medio YLac (ácido láctico 2%, extracto de levadura 1%, KH₂PO₄ 1%, NaOH 0.5%, (NH₄)₂SO₄ 0.12%, pH

5.0) durante 24 hrs. a 30°C y 150 rpm. A las 24 hrs se re-sembró en medio YLac fresco a una densidad óptica (DO) de 0.03 a 600 nm y las células fueron cosechadas en fase de crecimiento exponencial tardía (DO = 3.5-4.0). Las levaduras se lavaron 3 veces por centrifugación con agua destilada a 2744 g, se resuspendieron en medio SH (Tris 0.1 M, β -mercaptoetanol 0.5 M, pH 9.3 con NaOH) y se dejaron incubar a 32°C durante 15 minutos. Posteriormente, las células fueron lavadas 2 veces por centrifugación a 2744 g con medio de lavado (KCl 0.5M, tris 10 mM, pH 7 con HCl). Para la obtención de los esferoplastos, las células se resuspendieron en medio de digestión (sorbitol 1.35 M, EGTA 1 mM, fosfato disódico 30 mM, fosfato monosódico 30 mM, ácido cítrico 10 mM, pH 5.8) y se agregó la enzima zymoliasa 20T a razón de 10 mg por cada gramo de peso seco. La formación de esferoplastos se evaluó midiendo la disminución de la DO a 600 nm. La incubación con la zymoliasa se detuvo en el momento en que la DO de una dilución de las células con agua 1:100 fue igual a la DO de una dilución 1:1000 determinada al inicio de la incubación. Por último, los esferoplastos fueron lavados 3 veces con buffer de lavado de protoplastos (sorbitol 0.75 M, manitol 0.4 M, Tris-maléico 10 mM, albúmina sérica de bovino 0.2%, pH 6.8) a 686 g por 5 minutos y resuspendidos en el mismo medio. La concentración de proteína fue determinada por el método de Biuret modificado (Gornall et al., 1949) utilizando como estándar albúmina bovina sérica.

Manipulación del contenido de ácidos grasos de la levadura

La composición de ácidos grasos de *S. cerevisiae* se manipuló con el método modificado de Bossie y Martin (1989), mediante la adición de 1 mM de ácido α -linolénico (ácido *cis,cis,cis*-9,12,15-octadecatrienoico, α -C18:3^{9,12,15}, pureza $\geq 99\%$, adquirido de Sigma Chemical) disuelto en IGEPAL CA-630 a un cultivo de *S. cerevisiae* en medio YLac (DO=0.03 a 600 nm), el cual se incubó como se describió anteriormente.

Extracción y análisis de lípidos

Los lípidos fueron extraídos por el método reportado por Bligh y Dyer (1959). Las células fueron resuspendidas en agua destilada (1 ml) y se adicionó 3.75 ml de una mezcla cloroformo:metanol 1:2 (v/v). Esta mezcla fue homogenizada vigorosamente con un vástago de teflon. Después, se agregó 1.25 ml de cloroformo y 1.25 ml de agua y se agitó vigorosamente después de cada adición. Por último, se centrifugó durante 5 min. a 2744 g y la fase orgánica se extrajo con una pipeta Pasteur. Para el análisis de los ácidos grasos, los respectivos metil-ésteres se prepararon por el método descrito por Morrison y Smith (1964). Brevemente, los lípidos fueron combinados con trifluoruro de boro (BF_3) al 14% en metanol durante 30 min. a 92° C en baño de agua. A continuación, la muestra se enfrió a temperatura ambiente y los metil ésteres se extrajeron por agitación vigorosa con dos volúmenes de n-hexano. Después de la adición de un volumen de agua, se formó un sistema de dos fases que se centrifugó y se colectó la fase orgánica. Se evaporó el n-hexano bajo una corriente de nitrógeno y los ácidos grasos transesterificados se resuspendieron en n-hexano para su posterior análisis. Los metil ésteres se analizaron en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 500 controlado por computadora, equipado con un inyector capilar "split/splitless" y detector de ionización de llama. La separación se realizó en una columna capilar Omegawax (0.25 mm de diámetro interno) de 30 metros de longitud. Se utilizó nitrógeno de alta pureza como gas de acarreo. Se determinaron los tiempos de retención de cada uno de los estándares de metil-ésteres de ácidos grasos y se hicieron curvas de calibración para cada uno de ellos. La composición de ácidos grasos y su concentración se determinaron por comparación de los tiempos de retención y por análisis de las áreas bajo los picos, respectivamente.

Inducción de estrés oxidativo

Se establecieron condiciones de estrés oxidativo incubando los esferoplastos a razón de 0.3 mg/ml de proteína en medio de incubación de fosfatos (Na_2HPO_4 0.5 M, MgSO_4 2 mM, KH_2PO_4 10 mM, EGTA 0.5 mM, a pH 6.8) con concentraciones de 50, y 100 μM de FeSO_4 durante 30 minutos a una temperatura de 4°C. El hierro en estado reducido (Fe^{2+}), adicionado en células intactas suspendidas en solución amortiguadora de fosfatos, puede estimular la formación de radical hidroxilo, el cual es capaz de iniciar el proceso de peroxidación de lípidos, así como propagar dicho proceso mediante la

reacción del Fe^{2+} con los lipoperóxidos generados por la auto-oxidación de los radicales lipídicos para generar radicales alcoxilo (North et al., 1992).

Medición del consumo de oxígeno

Al término de la inducción del estrés oxidativo, los esferoplastos (3 ml) fueron transferidos a una cámara de vidrio sellada y la velocidad de consumo de oxígeno (respiración) de los esferoplastos fue determinada a temperatura ambiente con un electrodo tipo Clark acoplado a un monitor biológico de oxígeno YSI 5300 y a un graficador. La respiración basal (estado 4) fue inducida mediante la adición de 5 μ l de etanol como sustrato respiratorio. La adición de un agente protonóforo abate el potencial de membrana generado a través de la membrana interna de la mitocondria debido al bombeo de protones hacia el espacio intermembranal por los complejos de la CTE (Nicholls y Ferguson, 2002). Esto causa que la actividad de la cadena respiratoria se estimule al máximo para restablecer el potencial transmembranal; a esta condición se le denomina estado desacoplado (estado D) y permite estudiar la actividad máxima de la CTE. Para tal efecto, se agregó 5 μ M del desacoplante carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP). La respiración fue inhibida en su totalidad por la adición de 500 μ M de KCN, indicando que la medición de dicho parámetro refleja exclusivamente la actividad de la CTE y descarta la medición artificial del consumo de oxígeno producto de la actividad redox del ion Fe^{2+} y sus derivados.

Medición de los niveles de peroxidación lipídica

Los niveles de peroxidación lipídica fueron determinados mediante una modificación del método del ácido tiobarbitúrico (TBA) reportada por Buege y Aust (1978). Al término de la inducción del estrés oxidativo, se agregó a cada muestra 2 ml de una solución ácida compuesta por ácido tricloroacético 15%, TBA 0.375% y HCl 0.25 N. Posteriormente, las muestras se calentaron en un baño de agua hirviendo y a los 15 minutos, fueron enfriadas en hielo y centrifugadas a 2744 g durante 5 minutos. Por último, se extrajo el sobrenadante y se leyó su absorbancia a 532 nm en un espectrofotómetro UV/vis Perkin-Elmer Lambda 18. Los resultados fueron expresados como nanomoles de sustancias reactivas al TBA (TBARS) producidas por mg. de proteína y fueron calculados en base al coeficiente de extinción molar (ϵ) de malondialdehído de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Determinación de la viabilidad celular

La viabilidad de los esferoplastos fue determinada evaluando la incorporación del colorante azul de tripano al interior de las células. El azul de tripano es un colorante cargado negativamente, por lo cual, es excluido de las células cuya membrana plasmática se encuentra íntegra, mientras que las células con la membrana plasmática dañada se tñen de azul (Freshney, 1987). Los esferoplastos fueron tratados como se indica en inducción del estrés oxidativo, excepto que las incubaciones con los oxidantes se hicieron hasta por 7 horas. Después de cada incubación se tomó una alícuota de 25 μ l y se colocó en un portaobjetos adicionando 25 μ l del colorante azul de tripano; la suspensión se observó al microscopio con objetivo seco fuerte y se contaron los esferoplastos viables y no viables por campo hasta 100 esferoplastos.

Procesamiento estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de al menos 5 experimentos. Los niveles de significancia ($p < 0.01$ y $p < 0.05$) se determinaron mediante la prueba t de Student con el programa de computadora Sigma Plot Versión 9 (SPSS Inc).

RESULTADOS

Efecto de la adición de ácido linolénico sobre el perfil de ácidos grasos

Con el objetivo de aumentar la susceptibilidad de *S. cerevisiae* hacia la peroxidación lipídica, las células fueron crecidas en presencia del ácido graso triinsaturado ácido α -linolénico (C18:3) para estimular su incorporación en los lípidos de membrana y aumentar el grado de insaturación de la

misma. Como se muestra en la figura 1A, la composición nativa de ácidos grasos de *S. cerevisiae* consiste principalmente de los ácidos grasos monoinsaturados ácido oleico (C18:1, 40.9%) y ácido palmitoleico (C16:1, 23.5%) y en menor proporción de los ácidos grasos saturados ácido palmítico (C16:0, 21.7%) y ácido oleico (C18:1, 13.9%). Cuando las células fueron crecidas en presencia de C18:3 (Fig 1B), este ácido graso se convirtió en el principal constituyente (92.9%), mientras que la concentración de ácidos grasos saturados C16:0 y C18:0 disminuyó a 2.9% y 2.2%, respectivamente. En el caso de los ácidos grasos monoinsaturados, solo se detectaron cantidades marginales (0.72% y 1.15% de C16:1 y C18:1, respectivamente).

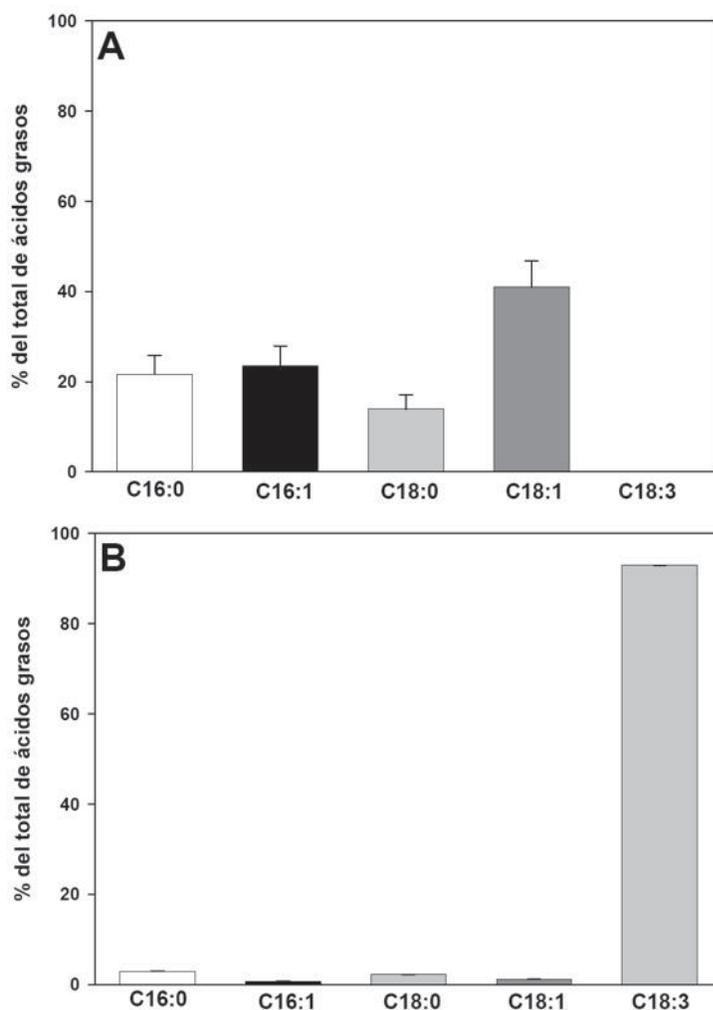


Fig. 1: Composición porcentual de ácidos grasos de la levadura crecida en ausencia (panel A) y en presencia (panel B) de 1 mM de C18:3. Los valores se expresan como el promedio \pm el error estándar de los porcentajes de cada ácido graso.

Influencia de la composición de ácidos grasos sobre los efectos del estrés oxidativo por Fe²⁺ en los niveles de peroxidación lipídica

Con el propósito de investigar si la incorporación de ácido linolénico sensibiliza a los lípidos de membrana de la levadura hacia los efectos dañinos del estrés oxidativo, se midieron los niveles de peroxidación lipídica en esferoplastos con y sin C18:3. En esferoplastos sin C18:3 (Fig. 2, barras

blancas), los niveles de peroxidación se mantuvieron constantes a las dos concentraciones de Fe^{2+} utilizadas (50 y 100 μM). En contraste, los niveles de peroxidación de los esferoplastos con C18:3 (Fig. 2, barras negras) aumentaron un 51% y 353% con 50 y 100 μM de Fe^{2+} (** $p < 0.01$), respectivamente. Estos resultados indican que el aumento en los niveles de insaturación de los ácidos grasos membranales sensibiliza a la célula hacia los efectos dañinos del estrés oxidativo.

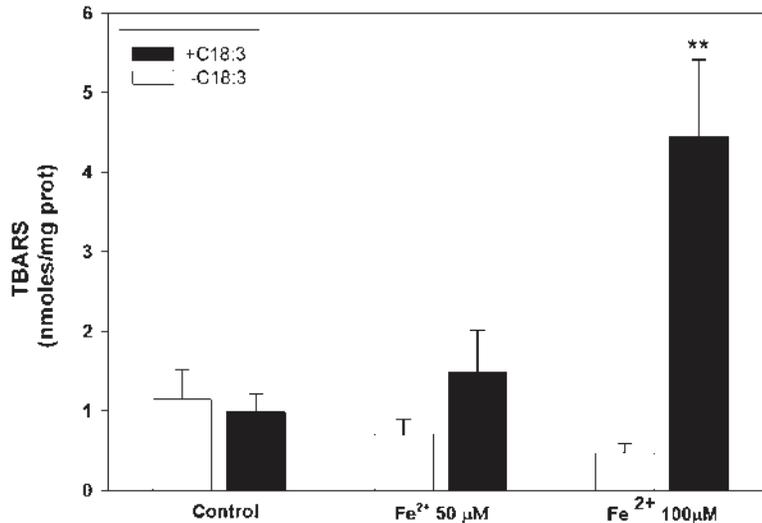


Fig. 2: Efecto del Fe^{2+} sobre la peroxidación lipídica en esferoplastos con (barras negras) y sin (barras blancas) C18:3. Los resultados se expresan como el promedio \pm el error estándar de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) ($p < 0.01$).

Influencia de la composición de ácidos grasos sobre la sensibilidad de la función mitocondrial in situ al estrés oxidativo por ion Fe^{2+}

Con la finalidad de determinar si el aumento de la susceptibilidad a la peroxidación lipídica de la célula puede sensibilizar al mismo tiempo la funcionalidad de la CTE al estrés oxidativo, se evaluó *in situ* la función mitocondrial de esferoplastos de levadura midiendo el consumo de oxígeno sensible a cianuro. En esferoplastos sin C18:3 (Fig. 3, barras blancas), la respiración se encontró prácticamente inalterada tanto en estado 4 como en estado D bajo cualquier concentración de Fe^{2+} utilizada con excepción de la respiración en estado D a 100 μM de Fe^{2+} , donde se observó una inhibición no significativa de alrededor del 22%. En contraste, la misma concentración de Fe^{2+} causó en esferoplastos con C18:3 (Fig. 3, barras negras) una inhibición significativa ($p < 0.01$) de de aproximadamente 53% en la respiración en estado D. Asimismo, se observaron efectos menos pronunciados en esferoplastos con C18:3 en el estado D a 50 μM de Fe^{2+} y en estado 4 a 100 μM de Fe^{2+} (20% y 26%, respectivamente). Es de resaltar que en el estado 4 no se observó un aumento en el consumo de oxígeno tanto en esferoplastos con y sin C18:3, indicando que no se presentó un desacoplamiento aparente de la CTE debido a un aumento en la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial. En conjunto, los resultados anteriores muestran que el aumento en la susceptibilidad a la peroxidación lipídica debido a un aumento en los niveles de insaturación de los ácidos grasos de membrana convierten a la CTE de la mitocondria en un blanco importante del estrés oxidativo.

Influencia de la composición de ácidos grasos sobre los efectos del ion Fe^{2+} en la viabilidad celular

Para conocer el efecto del estrés oxidativo sobre la integridad celular de la levadura y su relación con la susceptibilidad a la peroxidación lipídica, se midió la viabilidad celular a través de la incorporación del colorante azul de tripano al interior de la célula. En la figura 4 se observa que la viabilidad de los

esferoplastos sin C18:3 tratados en presencia de 100 μM de Fe^{2+} (Fig. 4, círculos blancos) disminuye en menos de 12% a través de todo el tiempo de incubación (7 hrs.) En contraste, la viabilidad de los esferoplastos con C18:3 tratados con la misma concentración de Fe^{2+} (Fig. 4, círculos negros) disminuyó de manera más acentuada, obteniéndose una inhibición mayor al 12% a las 3 horas de incubación y un valor máximo de inhibición del 33% a las 7 horas de incubación. Un comportamiento muy parecido al anterior se observó en esferoplastos sin C18:3 tratados con una concentración de Fe^{2+} 10 veces más alta (1 mM) (Fig. 4, cuadros blancos). A esta concentración, la pérdida de la viabilidad fue notablemente más rápida en los esferoplastos con C18:3 (Fig. 4, cuadros negros), apreciándose una pérdida total de la misma a las 7 hrs. de incubación. Por lo tanto, los resultados anteriores indican que una menor susceptibilidad a la peroxidación de lípidos debido a un menor grado de insaturación de los mismos, protege a la célula de los efectos dañinos del estrés oxidativo inducido por Fe^{2+} .

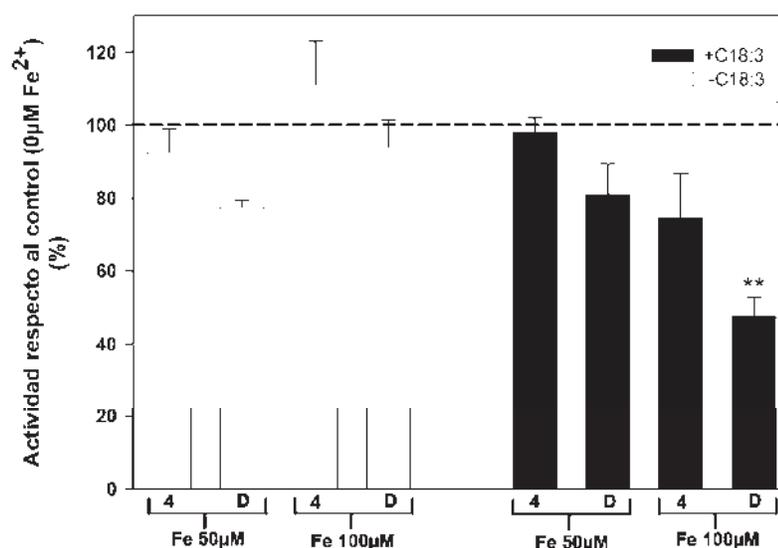


Fig. 3: Efecto del Fe^{2+} sobre la respiración de esferoplastos con (barras negras) y sin (barras blancas) C18:3. La respiración en estado 4 (4) y en estado desacoplado (D) se estimuló como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como el promedio \pm el error estándar del porcentaje de la velocidad de respiración respecto al control (0 μM de Fe^{2+}) ($p < 0.01$).

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo muestran que la resistencia a la peroxidación de lípidos, evidenciada por la nula estimulación de este parámetro incluso a 100 μM de Fe^{2+} , está relacionada con una resistencia substancial de la CTE y la integridad celular hacia el daño por el estrés oxidativo. Esta resistencia disminuyó cuando las células fueron enriquecidas con C18:3.

El aumento en el grado de insaturación de los lípidos de membrana en solo 2 insaturaciones obtenido mediante la adición de C18:3, provocó diferencias dramáticas en las respuestas de los diferentes parámetros medidos ante el estrés oxidativo. Los niveles de peroxidación de lípidos obtenidos en este trabajo están en concordancia con los obtenidos en el trabajo pionero de Holman (1954) con ácidos grasos purificados, en el que se muestra que los ácidos grasos saturados y monoinsaturados de 16 y de 18 carbonos son resistentes a la peroxidación, mientras que el aumento en el grado de insaturación a partir de dos dobles enlaces incrementa la sensibilidad de los ácidos grasos hacia este proceso de una manera directamente proporcional al número de dobles enlaces

presente. El enriquecimiento con C18:3 disminuyó de manera dramática los porcentajes de C16:1 y C18:1 de un 23.5% y 40.9% a solo 0.72 y 1.15%, respectivamente. Lo anterior puede ser el reflejo de la represión que los ácidos grasos insaturados ejercen sobre la transcripción del gen *OLE1* que codifica para la desaturasa $\Delta 9$ que forma el doble enlace entre los carbonos 9 y 10 del C16:0 y el C18:0; como consecuencia, la levadura reemplaza las especies monoinsaturadas nativas por los ácidos grasos adicionados al medio de cultivo (Martin et al., 2007).

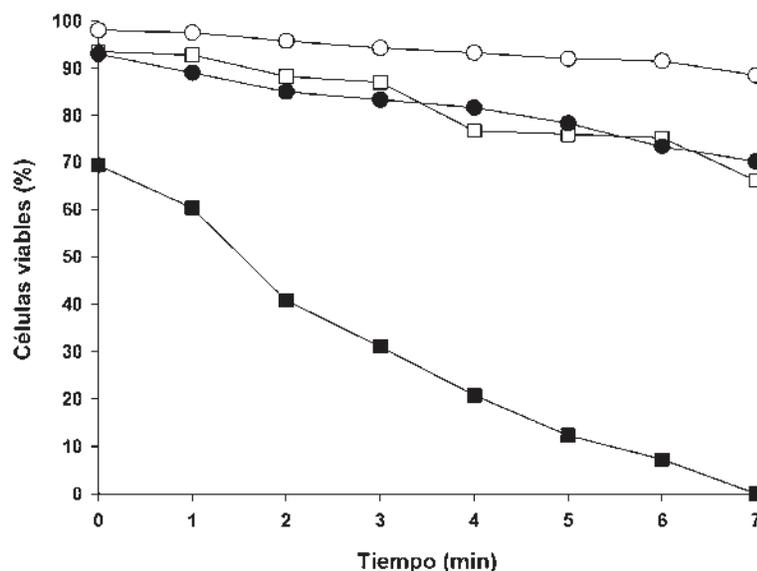


Fig. 4: Efecto del Fe^{2+} sobre la viabilidad de esferoplastos de *S. cerevisiae*. Sin (símbolos blancos) y con (símbolos negros) C18:3, tratados con 100 μM (círculos) y 1000 μM (cuadros) de Fe^{2+} . Los resultados se expresan como el porcentaje de células que excluyeron el colorante azul de tripano.

Se pudo observar una buena concordancia entre los resultados de peroxidación de lípidos y la inhibición de la CTE obtenidos en esferoplastos con C18:3 a 100 μM de Fe^{2+} , ya que es a esta concentración donde se observaron de manera significativa los cambios más notables en dichos parámetros. Bajo esta condición, es posible proponer dos mecanismos o la combinación de ambos que podrían explicar la inhibición en el funcionamiento de la CTE: el primero consiste en que a esta concentración de Fe^{2+} , el daño inducido en la membrana plasmática por la peroxidación permita el paso libre del Fe^{2+} hacia el citosol, lo cual es apoyado por el incremento en la pérdida de viabilidad en esferoplastos con C18:3. En consecuencia, las membranas mitocondriales estarían expuestas directamente a los efectos peroxidativos de este catión afectando a los componentes de la CTE. Esta situación sería favorecida debido al hecho de que la mitocondria de la levadura transporta de manera preferencial el Fe en estado reducido proveniente del espacio intermembranal (Kwok y Kosman, 2005). Asimismo, una sobrecarga citosólica de Fe y su acumulación en la mitocondria han sido reportados en células de murino (Shvartsman et al., 2007). El otro posible escenario es que a esta concentración de Fe^{2+} , la acumulación de MDA (4.5 nanomoles/mg prot), uno de los productos finales de la peroxidación de lípidos, sea capaz de reaccionar con los complejos proteicos de la CTE inhibiendo su actividad. El MDA puede modificar de manera covalente grupos -SH expuestos de cisteínas de los complejos de la CTE de eucariontes superiores, lo cual inhibe de manera negativa el transporte de electrones a través de la CTE (Lashin et al., 2006). Asimismo, en mitocondrias de levadura se ha encontrado que el estrés oxidativo puede regular la actividad de la CTE a nivel de los complejos II y III mediante la oxidación reversible de -SH (Cortés-Rojo et al., 2007). Por lo tanto, estos dos complejos podrían constituir el blanco de inhibición por los sub-productos de la peroxidación de lípidos.

Independientemente del mecanismo de inhibición de la CTE, resulta evidente que el aumento en la sensibilidad a la peroxidación convierte a la mitocondria en uno de los principales blancos del estrés oxidativo y que la composición nativa de los ácidos grasos membranales le confiere por sí misma una resistencia notable a la célula a los efectos dañinos del estrés oxidativo. En relación a lo anterior, existe evidencia creciente de que el grado de insaturación y la susceptibilidad a la peroxidación de los lípidos mitocondriales es uno de los principales determinantes del tiempo de vida de eucariontes superiores en diversas especies (Pamplona et al., 2000). En el caso de la levadura, se ha encontrado que la incorporación de ácidos grasos insaturados en sus membranas celulares mediante la expresión heteróloga de desaturasas provenientes de girasol (Rodríguez-Vargas et al., 2007), aumenta la resistencia de las células al estrés salino y por congelamiento. No obstante la ventaja que supone lo anterior (la conservación de las células por un tiempo prolongado para aplicaciones industriales), los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la levadura con un nivel mayor de insaturación podría ser menos eficiente en algún proceso industrial donde puede presentarse la sobreproducción de ERO, tal como la producción de etanol, en donde, al menos en eucariontes superiores, se ha demostrado que el metabolismo de este alcohol puede aumentar la formación de ERO en la mitocondria mediante diferentes mecanismos (Phillips y Jenkinson, 2001; Hoek et al., 2002).

CONCLUSIONES

Se encontró que la sensibilidad de esferoplastos de *S. cerevisiae* hacia la peroxidación de lípidos inducida por Fe^{2+} es prácticamente nula, mientras que el funcionamiento de la CTE de la mitocondria y la integridad de la célula no muestran tampoco alteraciones importantes a 50 y 100 μM de Fe^{2+} . La adición de 1 mM de C18:3 provocó cambios dramáticos en la composición de ácidos grasos membranales al presentarse un enriquecimiento hasta del 90% en este ácido graso y una disminución drástica en los ácidos grasos saturados y monoinsaturados nativos de la levadura. Estos cambios sensibilizaron a las células hacia los efectos del estrés oxidativo generado por el tratamiento con 100 μM de Fe^{2+} ya que los niveles de peroxidación de lípidos aumentaron en 353%; la respiración en estado D y la viabilidad celular disminuyeron en alrededor de un 50% y 33%, respectivamente, mientras que 1 mM indujo una pérdida total de viabilidad a las 7 hrs. En conjunto, estos resultados muestran que la peroxidación de lípidos convierte a la mitocondria en un blanco importante del estrés oxidativo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo de los donativos: Fondos Mixtos-Gob. del Estado de Michoacán (64277, 64308), COECYT, CIC-UMSNH (2.16). CCR es becario CONACYT.

REFERENCIAS

- Beckman, K.B. y B.N. Ames; The free radical theory of aging matures, *Physiol. Rev.* 78(2), 547-581(1998).
- Bligh, E.G., y W.J. Dyer; A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37(8), 911-917 (1959).
- Bossie, M.A. y C.E. Martin; Nutritional regulation of yeast Δ -9 fatty acid desaturase activity, *J. Bact.* 171(12), 6409-6413 (1989).
- Buege, J.A. y S.D. Aust; Microsomal lipid peroxidation, *Methods Enzymol.*: 52, 302-310 (1978).
- Cardoso, S.M., C. Pereira, y C.R. Oliveira; Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*: 26(1-2), 3-13 (1999).
- Cortés-Rojo, C. y otros seis autores; Electron transport chain of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria is inhibited by H_2O_2 at succinate-cytochrome c oxidoreductase level without lipid peroxidation involvement. *Free Radic. Res.*: 41(9), 1212-1223 (2007).

Forsmark-Andréé, P., C.P. Lee, G. Dallner y L. Ernster; Lipid peroxidation and changes in the ubiquinone content and the respiratory chain enzymes of submitochondrial particles. *Free Radic. Biol. Med.*: 22(3), 391-400 (1997).

Freshney, R.; *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, p.117, Alan R. Liss, Inc., New York (1987).

Gornall, A.G., C.J. Bardawill y M.M. David; Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177(2), 751-766 (1949).

Guérin, B., P. Labbe y M. Somlo; Preparation of yeast mitochondria (*Saccharomyces cerevisiae*) with good P/O and respiratory control ratios. *Methods Enzymol.*: 55, 149-159 (1979).

Halliwell, B., J.M. Gutteridge y C.E. Cross; Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J. Lab. Clin. Med.*: 119(6), 598-620 (1992).

Hoek, J.B., A. Cahill y J.G. Pastorino; Alcohol and mitochondria: A dysfunctional relationship. *Gastroenterology*: 122(7), 2049-2063 (2002).

Holman, R.T.; Autooxidation of fats and related substances. En: Holman, R.T., Lundberg, W.O., Malkin, T. (Eds). *Progress in the chemistry of fats and other lipids*, vol 2. Academic Press, New York, pp. 51-98 (1954).

Kwok, E. y D. Kosman, Iron in yeast: mechanisms involved in homeostasis. En *Topics in Current Genetics, Molecular Biology of Metal Homeostasis: From Microbes to Man*. Tamas, M.J., and Marinaio, E. (eds). Berlin: Springer-Verlag, pp. 59-99 (2005).

Lashin, O.M., P.A. Szweda, L.I. Szweda y A.M. Romani; Decreased complex II respiration and HNE-modified SDH subunit in diabetic heart. *Free Radic. Biol. Med.*: 40(5), 886-96 (2006).

Martin, C.E., C. Oh y Y. Jiang; Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast. *Biochim. Biophys. Acta*: 1771(3), 271-285 (2007).

Morrison, W.R. y L.M. Smith; Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res*: 5(10), 600-608 (1964).

Nicholls, D.G. y S.J. Ferguson; *Bioenergetics 3*. London, UK Academic Press. 5, 89-156 (2002).

North, J.A., A.A. Spector y G.R. Buettner; Detection of lipids radicals by electron paramagnetic resonance spin trapping using intact cells enriched with polyunsaturated fatty acid. *J. Biol. Chem.*: 267(9), 5743-5746 (1992).

Pamplona, R. y otros seis autores; Low fatty acid unsaturation: a mechanism for lowered lipoperoxidative modification of tissue proteins in mammalian species with long life spans. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*: 55(6), 286-291 (2000).

Paradies, G., G. Petrosillo, M. Pistolese y F.M. Ruggiero; Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene*: 286(1), 135-141 (2002).

Petrosillo, G., F.M. Ruggiero, N. Di Venosa y G. Paradies; 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 (2003).

Phillips, B.J. y P. Jenkinson; Is ethanol genotoxic? A review of the published data. *Mutagenesis*: 16(2), 91-101 (2001).

Rodríguez-Vargas, S. y otros cuatro autores; Fluidization of membrane lipids enhances the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to freezing and salt stress. *Appl. Environ. Microbiol*: 73(1), 110-116 (2007).

Shvartsman, M., R. Kikkeri, A. Shanzer y Z.I. Cabantchik; Non-transferrin-bound iron reaches mitochondria by a chelator-inaccessible mechanism: biological and clinical implications. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*: 293(4), C1383-C1394 (2007).

Capítulo 2

J Bioenerg Biomembr (2009) 41:15–28
DOI 10.1007/s10863-009-9200-3

Elucidation of the effects of lipoperoxidation on the mitochondrial electron transport chain using yeast mitochondria with manipulated fatty acid content

Christian Cortés-Rojo · Elizabeth Calderón-Cortés ·
Mónica Clemente-Guerrero ·
Mirella Estrada-Villagómez · Salvador Manzo-Avalos ·
Ricardo Mejía-Zepeda · Istvan Boldogh ·
Alfredo Saavedra-Molina

Received: 31 December 2008 / Accepted: 26 January 2009 / Published online: 18 February 2009
© Springer Science + Business Media, LLC 2009

Abstract Lipoperoxidative damage to the respiratory chain proteins may account for disruption in mitochondrial electron transport chain (ETC) function and could lead to an augment in the production of reactive oxygen species (ROS). To test this hypothesis, we investigated the effects of lipoperoxidation on ETC function and cytochromes spectra of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. We compared the effects of Fe²⁺ treatment on mitochondria isolated from yeast with native (lipoperoxidation-resistant) and modified (lipoperoxidation-sensitive) fatty acid composition. Augmented sensitivity to oxidative stress was observed in the complex III-complex IV segment of the ETC. Lipoperoxidation did not alter the cytochromes content. Under lipoperoxidative conditions, cytochrome *c* reduction by succinate was almost totally eliminated by superoxide dismutase and stigmatellin. Our results suggest that lipoperoxidation impairs electron transfer mainly at

cytochrome *b* in complex III, which leads to increased resistance to antimycin A and ROS generation due to an electron leak at the level of the Q_o site of complex III.

Keywords Lipoperoxidation · Cytochromes · Yeast mitochondria · Iron · Electron transport chain

Introduction

The study of mechanisms underlying oxidative stress-related mitochondrial dysfunction has become a relevant research field due to participation of mitochondrial oxidative stress in the development of a wide variety of disorders such as liver damage by hepatitis B virus (Lee et al. 2004), heart ischemia-reperfusion (Lucas and Szveda 1998), aging (Wei et al. 1998, 2001) cancer (Lemire et al. 2003), diabetes (Green et al. 2004), and neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis (Tanusree et al. 2007). The mitochondrial electron transport chain (ETC) is the primary source of reactive oxygen species (ROS) in the cell. Generally, ROS are short-lived species that react readily with molecules surrounding its generation site. Among cellular biomolecules, polyunsaturated fatty acids display the highest propensity to ROS attack (Pamplona et al. 1998), making unsaturated fatty acids from mitochondrial membranes the main target of ROS during mitochondrial oxidative stress.

Lipoperoxides inactivate enzymes bound to biological membranes and decrease membrane fluidity (Rice-Evans 1994). Consequently, ETC function becomes impaired during oxidative stress and several reports have recognized lip-

C. Cortés-Rojo · E. Calderón-Cortés · M. Clemente-Guerrero ·
M. Estrada-Villagómez · S. Manzo-Avalos ·
A. Saavedra-Molina (✉)
Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas,
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo,
Edificio B-3, C.U.,
Morelia, Mich 58030, México
e-mail: saavedra@umich.mx

R. Mejía-Zepeda
Unidad de Biomedicina,
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. D.F.,
Mexico, Mexico

I. Boldogh
School of Medicine University of Texas
Medical Branch at Galveston,
Galveston, TX, USA

operoxidation as the major cause of mitochondrial dysfunction (Petrosillo et al. 2003; Paradies et al. 1999, 2002, 2004; Cardoso et al. 1999; Forsmark-Andréé et al. 1997). In these studies, cardiolipin and quinone loss have been identified as the fundamental cause of ETC dysfunction. However, the damaging effects of lipoperoxidation in other redox components of the ETC (i.e. cytochromes) have not been further explored. In one of these studies (Forsmark-Andréé et al. 1997), it was observed that the content of cytochrome *c* and the reduction of cytochrome *b* by respiratory substrates decrease by the treatment with ascorbate and ADP/Fe³⁺. Nevertheless, from these results it seems difficult to establish a direct correlation between anomalies in cytochromes reduction and lipoperoxidation because of the direct effect of ROS on cytochromes was not properly discarded.

Impairment of cytochromes by lipoperoxidation is an important issue to address because in the ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase complex (complex III), cytochromes participate in electron transfer at quinone redox sites, which produce ROS from mitochondria. According to the Q-cycle (Hunte et al. 2003), during bifurcated quinol oxidation at the quinol oxidase (Q_O) site, one electron is transferred to the cytochrome *b* subunit and another electron is transferred to cytochrome *c*₁ via the Rieske iron-sulfur protein (ISP) rotation between the Q_O site and the cytochrome *c*₁ vicinity. Inhibition of electron transfer during complex III turnover by treatment with inhibitors of quinone redox sites induces the apparition of reactions that bypass the Q-cycle which are responsible for ROS production (Muller et al. 2003). For example, treatment of complex III with antimycin A blocks reoxidation of cytochrome *b* at the Q_i site, leading to electrons accumulation in *b* hemes and reverse transfer of electrons to quinone at the Q_O site to produce semiquinone, which can reduce oxygen to superoxide (Muller et al. 2002).

There are functional, specific binding of phospholipid molecules with protein moieties of complex III. For example, a molecule of phosphatidylinositol was found to be bound to a position near the flexible linker region of ISP in the yeast complex III. This interaction was proposed to facilitate the rotation of the ISP catalytic, head domain (Lange et al. 2001). As well, delipidation of complex III impairs antimycin A binding in a reversible way through cardiolipin addition, reflecting a requirement of cytochrome *b* for lipids to achieve an adequate stabilization of its structure (Tsai and Palmer 1986). Taking into account these facts, it is feasible to expect that an augment on lipoperoxidation sensitivity could impair electron transfer at the cytochromes level, which may lead to an increased susceptibility of ETC to inhibition by oxidative stress and the apparition of Q-cycle bypass reactions responsible for undesirable ROS production. To test this hypothesis, mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

represent an ideal research model because yeast membranes are resistant to lipoperoxidation (which allow an investigation of the effects of ROS on the ETC that are independent of lipoperoxidation) (Cortés-Rojo et al. 2007) and the sensitivity of yeast to this process can be increased by manipulation of the membranes fatty acid content.

In the present work, we studied the effects of Fe²⁺ on levels of lipoperoxidation, ETC function and cytochromes status in yeast mitochondria with native (lipoperoxidation-resistant) and modified (lipoperoxidation-sensitive) fatty acid composition. Lipoperoxidation increased the sensitivity of ETC to inhibition by oxidative stress except at the level of complex II. Furthermore, lipoperoxidation induced a resistance to the inhibitory effects of antimycin A on cytochrome *c* reduction, which was associated with an increment in superoxide (O₂⁻) formation and a defect in cytochrome *b* reduction that was prevented by an anti-lipoperoxidative agent.

Materials and methods

Materials

α-Linolenic acid (cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrienoic acid, purity ≥99%), Igepal CA-630, succinic acid, 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP), potassium cyanide, cytochrome *c*, antimycin A, were obtained from Sigma Chemical. Co. (St. Louis, MO, USA). Stigmatellin and dithionite were obtained from Fluka Chemie GmbH, (Buchs, Switzerland). Zymolyase 20T was obtained from ICN Biomedicals, Inc. (Aurora, OH USA). All other reagents were of the highest purity commercially available.

Cell growth and mitochondria isolation

For mitochondria isolation, an industrial wild type diploid strain of *Saccharomyces cerevisiae*, Yeast Foam was used (Kind gift from Professor Michel Rigoulet, IBGC, U of Bordeaux-2, France). Growth medium (YLac: 0.12% (NH₄)₂SO₄, 0.1% KH₂PO₄, 1% yeast extract, 2% DL-lactate, pH 5.0 with NaOH) was inoculated to an optical density of 0.03 by using cells from 24-h starter cultures grown in YLac. Cells were grown aerobically at 28°C with orbital shaking at 180 RPM and harvested in mid-exponential growth phase (OD₅₅₀=3.5–4.0). For yeast fatty acid content manipulation, 1 mM of linolenic acid (C18:3) solubilised with 5% (v/v) Igepal CA-630 was added to growth medium immediately previous to inoculation. Mitochondria were isolated from spheroplasts as described previously (Guérin et al. 1979; Avéret et al. 1998) except that zymoliase 20T was used instead of cytohelicase. Mitochondrial protein concentration was measured by the Biuret assay.

Lipid extraction and fatty acid analysis

Lipids were extracted from mitochondrial homogenates by the method of Bligh and Dyer (1959). For fatty acid analysis, methyl esters were generated by the BF₃-methanol assay of Morrison and Smith (1964). After extraction with *n*-hexane, samples of methyl esters were separated by gas chromatography (Perkin Elmer Clarus 500) on a 30 m × 0.25 mm Omegawax capillary column using high-purity N₂ as carrier gas. Fatty acids were identified and quantified by comparison of their retention time with those of authentic standards.

Induction of oxidative stress

Oxidative stress was established by incubating mitochondria (at proper concentrations for each determination as indicated below) at 4°C during 30 min in 50 mM KH₂PO₄ buffer (pH 7.6 with NaOH) with Fe²⁺ at the concentrations indicated in the legend to each figure. It has been showed that Fe²⁺ can initiate the lipoperoxidative process in phosphate buffer through the generation of a strong oxidant that has hydroxyl radical (OH[•]) characteristics (North et al. 1992). Iron was added from a stock solution of 12.5 mM FeSO₄·7H₂O which was acidified with four drops of concentrated H₂SO₄ to maintain iron in the Fe²⁺ form. For experiments of protection with an antilipoperoxidative agent, mitochondria were incubated with 5 μM butylated hydroxytoluene (BHT) during 15 min previous to treatment with Fe²⁺. Controls were treated in the same way except by iron addition.

Lipid peroxidation measurements

Changes in lipid peroxide levels were determined with the thiobarbituric acid (TBA) assay (Buege and Aust 1978). Mitochondria were treated as indicated above and mixed with 2 ml of an acid mixture containing 0.25 N HCl, 15% w/v trichloroacetic acid and 0.375% w/v thiobarbituric acid. The mixtures were boiled for 15 min, cooled on ice and centrifuged at 1,000 g for 5 min. The absorbance of the supernatant was measured at 535 nm (Perkin Elmer Lambda 18 UV/vis spectrophotometer) against a blank containing all the reagents minus mitochondrial protein. The results were calculated using the molar extinction coefficient for malondialdehyde and expressed in terms of nanomoles of TBA reactive species (TBARS) per milligram of protein.

Succinate-DCIP oxidoreductase activity

This enzymatic activity was measured at room temperature following the succinate-stimulated secondary reduction of

DCIP (Uribe et al. 1985). For optimal determination of ETC reactions, mitochondria were permeabilized by mild detergent treatment with Triton X-100 (Hallberg et al. 1993) and treated with Fe²⁺ and BHT as indicated above. The reaction mixture contained 50 mM KH₂PO₄ phosphate buffer (pH 7.6), 0.3 mg/ml permeabilized mitochondria, 80 μM DCIP, 1 mg antimycin A and 0.75 mM KCN in a final 1 ml volume. 0.2 mM EDTA was also added to eliminate unspecific reduction of DCIP by Fe²⁺. After incubating for 5 min with inhibitors and EDTA, the reaction was initiated with 10 mM sodium succinate (pH 7.6). Absorbance changes were recorded in a Perkin Elmer Lambda 18 UV/vis spectrophotometer at 600 nm. The rate of DCIP reduction was calculated from the slope of the absorbance plot using the molar extinction coefficient of 21 mM⁻¹ cm⁻¹ for DCIP. The activity was calculated by subtracting the background rate reduction of DCIP in the absence of succinate to the reduction rate of DCIP stimulated with succinate.

Succinate cytochrome *c* oxidoreductase activity

The antimycin A-sensitive succinate-mediated reduction of cytochrome *c* was followed by measuring at room temperature the reduction of cytochrome *c* in permeabilized mitochondria treated with Fe²⁺ and BHT as describe above. The reaction mixture contained 50 mM KH₂PO₄ (pH 7.6), 0.1 mg/ml permeabilized mitochondria, 1.5 mg cytochrome *c*, and 0.75 mM KCN in a final 1 ml volume. After incubating for 5 min with inhibitors, the reaction was initiated by adding 10 mM sodium succinate (pH 7.6). The reaction was stopped by the addition of 1 μg antimycin A. Alternatively, where indicated, reaction was stopped by 2 μg stigmatellin. Absorbance changes were recorded in a Perkin Elmer Lambda 18 UV/vis spectrophotometer at 550 nm. The rate of cytochrome *c* reduction was calculated from the slopes of the absorbance plots using a molar extinction coefficient of 19.1 mM⁻¹ cm⁻¹ for cytochrome *c*. The antimycin A-sensitive reduction of cytochrome *c* was calculated by subtracting the activity in the presence of antimycin A plus succinate to the activity stimulated only with succinate.

Cytochrome *c* oxidase activity

This activity was evaluated by measuring the cyanide-sensitive oxidation of reduced cytochrome *c* in permeabilized mitochondria treated with Fe²⁺ and BHT as described above. The reaction mixture contained 50 mM KH₂PO₄ (pH 7.6), 0.1 mg/ml permeabilized mitochondria and 1 μg antimycin A in a final 1 ml volume. After incubating for 5 min with antimycin A, the reaction was initiated by adding 250 mg dithionite-reduced cytochrome *c*. The reaction was stopped by the addition of 0.75 mM KCN.

Absorbance changes were recorded in a Perkin Elmer Lambda 18 UV/vis spectrophotometer at 550 nm. The rate of cytochrome *c* reduction was calculated from the slopes of the absorbance plots using a molar extinction coefficient of $19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for cytochrome *c*. The cyanide-sensitive reduction of cytochrome *c* was calculated by subtracting the activity in the presence of cyanide plus cytochrome *c* to the activity stimulated only with cytochrome *c*.

Assessment of superoxide production

$\text{O}_2^{\cdot -}$ production was estimated by evaluating the superoxide dismutase (SOD)-sensitive succinate-stimulated reduction of cytochrome *c* (Boveris and Cadenas 1975; Muller et al. 2002; Cape et al. 2005). The determinations were carried out under the same conditions used for succinate cytochrome *c* oxidoreductase activity except that 100 U/ml MnSOD, which is resistant to KCN (Muller et al. 2002), was added 5 min. before activity assays. Under our experimental conditions, 100 U/ml MnSOD inhibit the antimycin A-resistant reduction of cytochrome *c* (attributable to $\text{O}_2^{\cdot -}$ formation at the Q_O site of complex III) at levels comparable with the inhibition of cytochrome *c* reduction achieved with stigmatellin. Results were depicted as the rate of remaining cytochrome *c* reduction stimulated by succinate after MnSOD treatment.

Cytochromes spectra

Cytochromes spectra were obtained by measuring at room temperature the reduced minus oxidized spectra with a SLM Aminco DW2000 spectrophotometer fitted in the split mode. Mitochondria (1.5 mg/ml) were treated with Fe^{2+} (and BHT where indicated) as described above and placed in reference and sample cuvettes for recording of the baseline. 10 min before scanning of reduced spectra, ETC inhibitors (0.75 mM KCN and, where indicated, 1 μg antimycin A) and 10 mM succinate were added to sample cuvette. Spectra were scanned between 500 and 580 nm. For measurement of cytochromes concentration, the content of the reference cuvette was reduced by adding a few grains of solid sodium dithionite. Cytochromes contents were calculated using the following wavelengths and molar extinction coefficients: cytochrome *c*+*c*₁, $\Delta A=552 \text{ nm}$ minus 540 nm and $\epsilon=19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; cytochrome *b*, $\Delta A=562 \text{ nm}$ minus 575 nm and $\epsilon=20 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Results

Analysis of mitochondrial fatty acid composition

To know mitochondrial fatty acid composition of the Yeast Foam strain of *S. cerevisiae* and verify the incorporation of

C18:3 into mitochondria, the composition and amount of fatty acid of isolated mitochondria was analyzed by gas chromatography. The percentage fatty acid composition is presented in Fig. 1. In mitochondria isolated from cells grown in the absence of C18:3 (–C18:3, panel a), the percentage composition consist mainly of the monounsaturated fatty acids palmitoleic acid (C16:1, 50.7%) and oleic acid (C18:1, 41.9%). Much lower amounts of the saturated fatty acids palmitic acid (C16:0, 4.6%) and stearic acid (C18:0 2.7%) were detected. When cells were grown in the presence of 10 mM C18:3 (+C18:3, panel b), the mitochondrial fraction becomes highly enriched in this fatty acid (79.2%). In comparison with –C18:3 mitochondria, the amount of saturated fatty acids in +C18:3 mitochondria increased to 9.3% and 7% for C16:0 and C18:0, respectively. In contrast, the quantity of monounsaturated fatty acids decreased to 2.1% and 2.4% for C16:0 and C18:0, respectively.

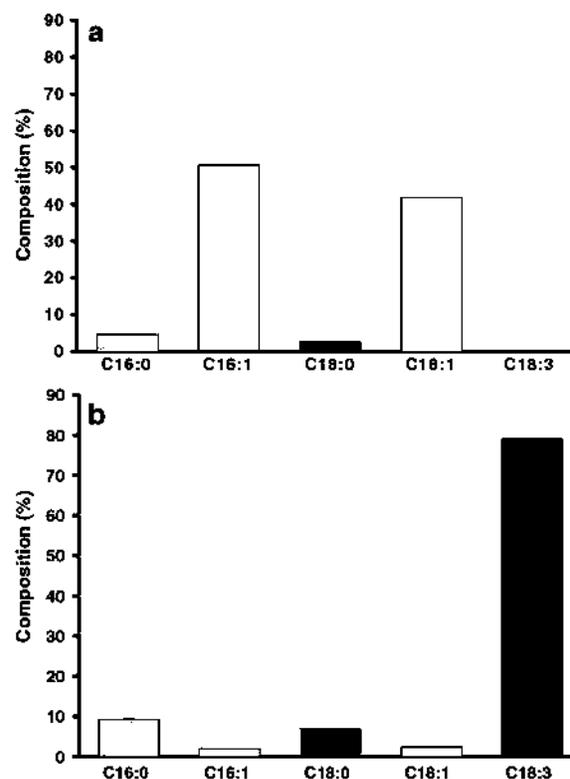


Fig. 1 Effect of C18:3 supplementation on fatty acid profile of yeast mitochondria. Mitochondria were isolated from cells grown in the absence of C18:3 (a) or supplemented with 10 mM C18:3 (b) and lipids were extracted and analyzed from mitochondrial homogenates as described in “Materials and methods”. Data are presented as the mean \pm SE of four determinations

Effect of C18:3 incorporation on mitochondrial sensitivity to lipoperoxidation

Mitochondria were challenged during 30 min with increasing amounts of Fe^{2+} to establish oxidative stress conditions and test whether enrichment with C18:3 can augment the sensitivity of mitochondria towards lipoperoxidation. A null effect on lipoperoxidation levels was observed in -C18:3 mitochondria even at the higher concentration of Fe^{2+} (Fig. 2a). The same treatment stimulated a notable rise in lipoperoxidation levels of +C18:3 mitochondria with all Fe^{2+} concentrations tested. These results indicate that incorporation of C18:3 sensitized mitochondria to the deleterious effects of oxidative stress. To further support this results and discard the possibility that the latter result could be the product of an unspecific reaction of thiobarbituric acid, +C18:3 mitochondria were pre-incubated with 5 μ M of the anti-lipoperoxidative agent BHT during 15 min before Fe^{2+} treatment. Phenolic compounds like BHT inhibit lipoperoxidation by trapping intermediate peroxy radicals that promote the propagative phase of this process (Porter 1986). Figure 3 shows that BHT fully inhibits the increment in lipoperoxidation obtained with 50 μ M Fe^{2+} and does not exert any effect on the basal levels of this parameter.

Influence of C18:3 incorporation on ETC sensitivity to Fe^{2+}

The sensitivities of ETC partial reactions to Fe^{2+} in -C18:3 and +C18:3 mitochondria were compared to investigate whether incorporation of C18:3 into mitochondria and the

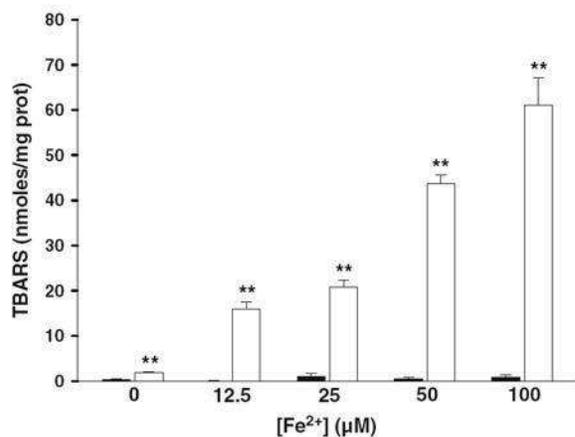


Fig. 2 Effect of Fe^{2+} on lipoperoxidation levels in -C18:3 (black bars) and +C18:3 (white bars) mitochondria. Mitochondria were challenged at 4°C during 30 min. with indicated concentrations of Fe^{2+} . Measurements were made as described in “Materials and methods”. Data are presented as mean \pm S.E. of at least three independent experiments. Significantly different when compared to -C18:3 mitochondria at the same Fe^{2+} concentration (** P <0.01, Student’s test)

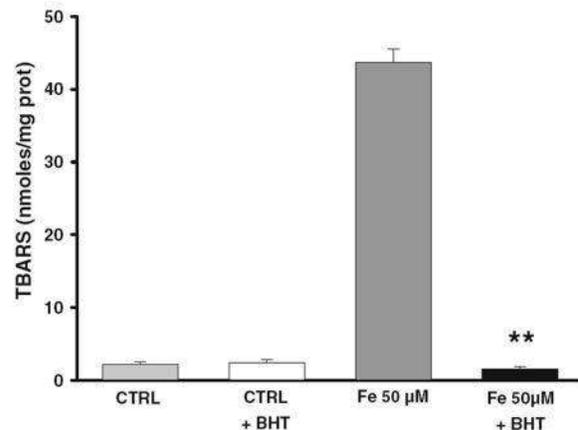


Fig. 3 Protective effect of BHT against lipoperoxidative damage induced in +C18:3 mitochondria by 50 μ M Fe^{2+} . To test protective effect of BHT, +C18:3 mitochondria were pre-incubated with 5 μ M BHT 15 min. prior to treatment with Fe^{2+} , which was carried out as described in Fig. 2. Controls were treated in the same way except by Fe^{2+} or BHT addition. Data are presented as mean \pm S.E. of at least three independent experiments. Significantly different when compared to Fe^{2+} 50 μ M (** P <0.01, Student’s test)

consequent augment in lipoperoxidation may enhance susceptibility of ETC function to oxidative stress. Mitochondria were treated during 30 min with Fe^{2+} and ETC activities were measured spectrophotometrically with appropriate substrates and inhibitors for each complex. Figure 4a shows a concentration-dependent progressive inhibition on succinate-DCIP oxidoreductase (complex II) activity. However no significant differences in sensitivity to Fe^{2+} were observed between -C18:3 and +C18:3 mitochondria, suggesting that lipoperoxidation may not participate in the mechanism of complex II inhibition.

Deeper differences in sensitivity to Fe^{2+} were observed when antimycin A-sensitive succinate-cytochrome *c* oxidoreductase activity (representative of the complex III activity using succinate and endogenous ubiquinone-6 as electron donor [Matsuno-Yagi and Hatefi 1996]), was assayed (Fig. 4b). In -C18:3 mitochondria, this activity was inhibited about 24% with low (12.5 μ M) and intermediate (25 μ M) concentrations of Fe^{2+} . At high (50–100 μ M) concentrations, a remaining activity of 43% and 26%, respectively, was observed. Significant differences in sensitivity with respect -C18:3 mitochondria were observed in +C18:3 mitochondria at concentrations above 12.5 μ M Fe^{2+} . Activity was inhibited by 67% and 92% with 25 μ M and 50 μ M Fe^{2+} , respectively, while 100 μ M Fe^{2+} almost fully inhibited this activity.

Cytochrome *c* oxidase (complex IV) activity (Fig. 4c) also becomes more sensitive to Fe^{2+} inhibition in +C18:3 mitochondria, although in a lower proportion than that observed in complex III activity, At high (50–100 μ M) Fe^{2+}

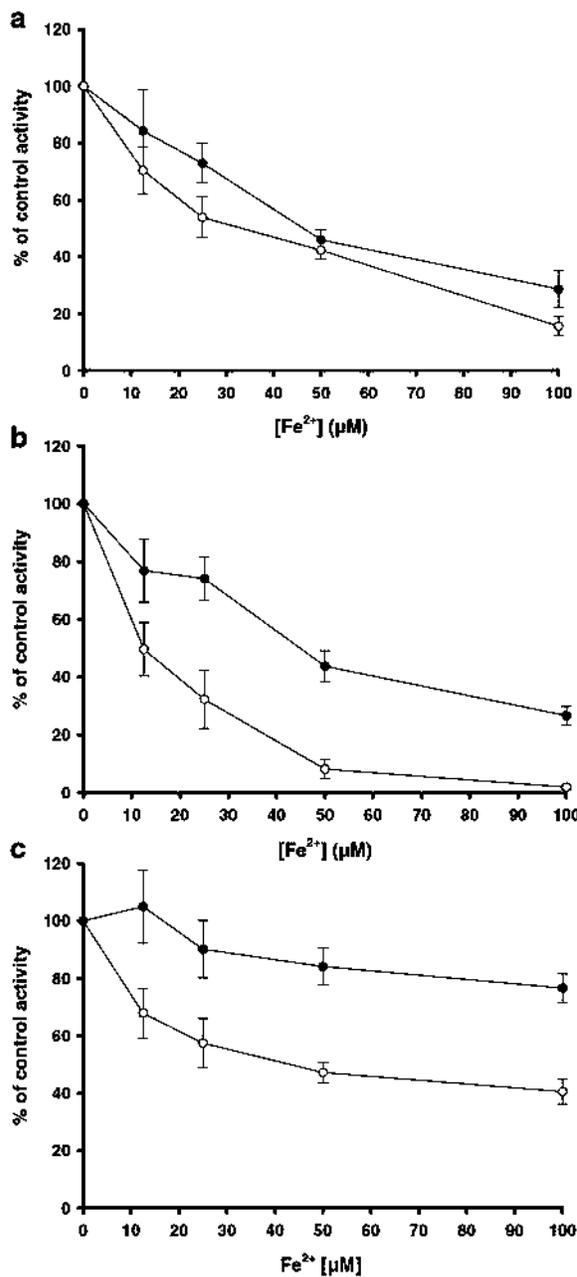


Fig. 4 Effect of Fe^{2+} on partial reactions of ETC in $-C18:3$ (black circles) and $+C18:3$ (white circles) mitochondria. Mitochondria were challenged at 4°C during 30 min. with the indicated concentrations of Fe^{2+} . Succinate-DCIP oxidoreductase (a), antimycin A-sensitive succinate-cytochrome *c* oxidoreductase (b) or KCN-sensitive cytochrome *c* oxidase activities were measured as described in “Materials and methods”. Data are expressed as the percentage of the remaining activities with respect to control activities ($0 \mu\text{M Fe}^{2+}$). The values of control activities (100%) were: 72.62 ± 6.7 and 51.01 ± 9.01 $\mu\text{moles DCIP}/\text{min} \times \text{mg protein}$ for succinate-DCIP oxidoreductase activities in $-C18:3$ and $+C18:3$ mitochondria, respectively; 192.63 ± 28.14 and 56.7 ± 3.22 $\mu\text{moles cytochrome } c / \text{min} \times \text{mg protein}$ for antimycin A-sensitive succinate-cytochrome *c* oxidoreductase activities in $-C18:3$ and $+C18:3$ mitochondria, respectively; 162.81 ± 11.16 and 160.01 ± 26.7 $\mu\text{moles cytochrome } c / \text{min} \times \text{mg protein}$ for KCN-sensitive cytochrome *c* oxidase activities in $-C18:3$ and $+C18:3$ mitochondria, respectively. Data are presented as mean \pm S.E. of at least four independent experiments

Protective effect of BHT on ETC inhibition by Fe^{2+}

The protective effect of $5 \mu\text{M}$ BHT on the inhibition of ETC activities by $50 \mu\text{M Fe}^{2+}$ was assayed to further assess the participation of lipoperoxidation in the augmented sensitivity to Fe^{2+} observed in $+C18:3$ mitochondria. As observed in Fig. 5a, BHT did not exert a protective effect from the inhibition achieved in complex II with $50 \mu\text{M Fe}^{2+}$ neither in $-C18:3$ nor $+C18:3$ mitochondria, which confirm that complex II activity is not affected by lipoperoxidation. On the other hand, a recovery of up to 68% in the complex III activity was observed with BHT exclusively in $+C18:3$ mitochondria (Fig. 5b) indicating an important participation of lipoperoxidation in the inactivation of this complex. As expected, BHT had no effect on the inhibition observed in $-C18:3$ mitochondria.

Considering the higher resistance of complex IV to inhibitory effects of Fe^{2+} , we decided to test protective effects of BHT in the presence of $100 \mu\text{M Fe}^{2+}$ for a better discernment of the results. BHT fully protected complex IV activity exclusively in $+C18:3$ (Fig. 5c), confirming the notion that the increase in susceptibility to oxidative stress in this complex can be attributed to lipoperoxidation. A similar result was observed in the presence of $50 \mu\text{M Fe}^{2+}$ (data not shown). Taken together, these results confirm that an augment on the sensitivity of complex III–IV segment of ETC towards oxidative damage is attributable to lipoperoxidation.

concentrations, oxidase activity was repressed in $+C18:3$ mitochondria by 53% and 60%, respectively, and 16% and 24% in $-C18:3$ mitochondria. It must be pointed out that overall resistance of cytochrome *c* oxidase to Fe^{2+} in $-C18:3$ mitochondria were higher in this complex than that observed for the other ETC complexes. Taken together, these results suggest that lipoperoxidation is involved in the augmented sensitivity of the complex III–IV segment of the ETC to oxidative stress.

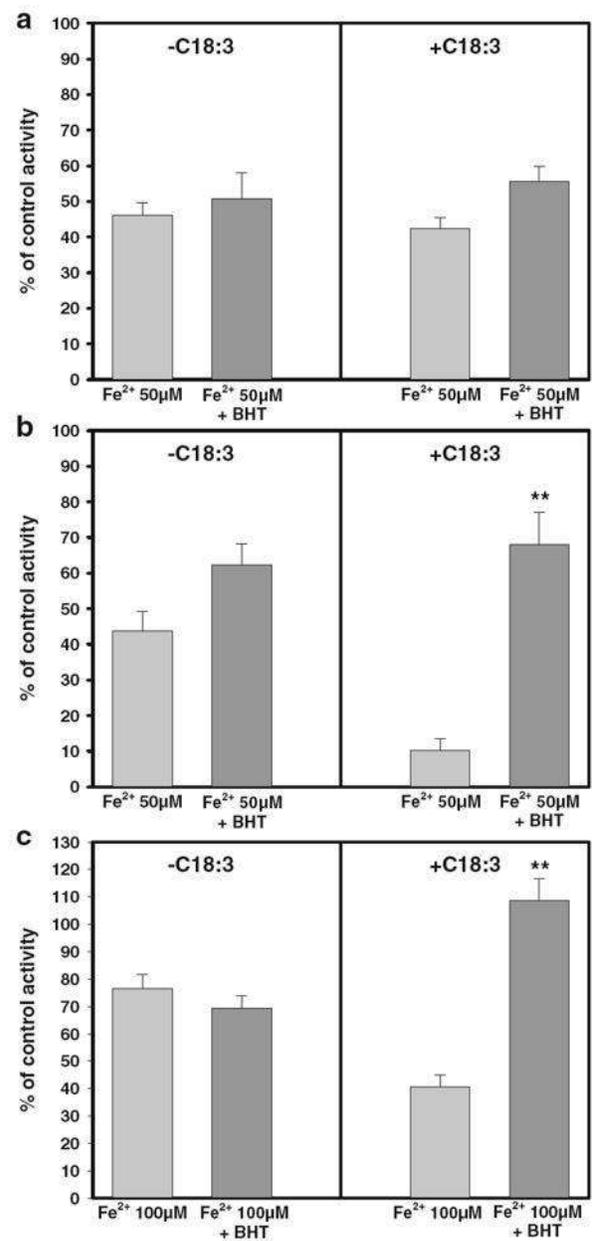
Influence of C18:3 incorporation and oxidative stress over the effects of complex III inhibitors and SOD on cytochrome *c* reduction

The effects of complex III inhibitors and MnSOD on cytochrome *c* reductions were evaluated as an approach to assess $\text{O}_2^{\cdot -}$ formation, identify its site of generation and investigate whether lipoperoxidative damage may enhance ROS production. Figure 6a illustrates the effect of complex

III inhibitors on the traces of cytochrome *c* reduction by control mitochondria. Succinate addition stimulates a rapid reduction of cytochrome *c*. Antimycin A partially inhibits this reduction (97.6% in -C18:3 mitochondria and 94.5% in +C18:3 mitochondria) and is fully abolished by stigmatellin. Antimycin A-resistant cytochrome *c* reduction at complex III has been closely associated with $O_2^{\cdot-}$ production (Chance et al. 1979). Moreover, stigmatellin inhibit $O_2^{\cdot-}$ production by binding in the ubiquinol oxidation pocket at Q_O site (Muller et al. 2003; Kessl et al. 2003). Considering these facts, we assumed that the effects observed in Fig. 6a reflect $O_2^{\cdot-}$ generation at the Q_O site of complex III. Therefore, the effect of complex III inhibitors on cytochrome *c* reduction was analyzed in mitochondria treated with Fe^{2+} (50 μ M). In -C18:3 mitochondria, the rate of cytochrome *c* reduction was inhibited with antimycin A by 93.5% (Fig. 6b), which was comparable with that observed in control treatment. Although the rate of cytochrome *c* reduction by succinate was lower in +C18:3 mitochondria, an increased resistance to antimycin A was detected in this case, since this inhibitor decreased the reduction rate by just 42.1% (Fig. 6b). Furthermore, stigmatellin abolished cytochrome *c* reduction in +C18:3 mitochondria (Fig. 6c). The loss of sensitivity to antimycin A observed in Fe^{2+} -treated +C18:3 mitochondria was recovered by 82.8% through pre-treatment with BHT (Fig. 6d)

Fig. 5 Protective effect of BHT against the inhibition induced in ETC partial reactions by Fe^{2+} . To test the protective effect of BHT, -C18:3 or +C18:3 mitochondria were pre-incubated with 5 μ M BHT 15 min. prior to the treatment with the indicated concentrations of Fe^{2+} , which was carried out as described in Fig. 2. Succinate-DCIP oxidoreductase (a), antimycin A-sensitive succinate-cytochrome *c* oxidoreductase (b) or KCN-sensitive cytochrome *c* oxidase (c) activities were measured as described in "Materials and methods". Data are expressed as the percentage of the remaining activities with respect to control activities (0 μ M Fe^{2+} in the absence of BHT or 0 μ M Fe^{2+} plus 5 μ M BHT when this agent was tested). The control values for succinate-DCIP oxidoreductase activities were: 72.62 \pm 6.7 and 76.73 \pm 2.23 mmoles DCIP/min \times mg protein in -C18:3 mitochondria in the absence and the presence of BHT, respectively; 51.01 \pm 9.01 and 49.14 \pm 0.28 mmoles DCIP/min \times mg protein in +C18:3 mitochondria in the absence and the presence of BHT, respectively. The control values for antimycin A-sensitive succinate-cytochrome *c* oxidoreductase activities were: 192.63 \pm 28.14 and 230.98 \pm 46.76 mmoles cytochrome *c* /min \times mg protein in -C18:3 mitochondria in the absence and the presence of BHT, respectively; 56.7 \pm 3.22 and 56.78 \pm 6.74 mmoles cytochrome *c* /min \times mg protein in +C18:3 mitochondria in the absence and the presence of BHT, respectively. The control values for KCN-sensitive cytochrome *c* oxidase activities were: 162.81 \pm 11.16 and 145.56 \pm 38.82 mmoles cytochrome *c* /min \times mg protein in -C18:3 mitochondria in the absence and the presence of BHT, respectively; 160.01 \pm 26.7 and 157.59 \pm 5.93 mmoles cytochrome *c* /min \times mg protein in +C18:3 mitochondria in the absence and the presence of BHT, respectively. Data are presented as mean \pm S.E. of at least four independent experiments. Significantly different when compared to +C18:3 mitochondria with Fe^{2+} 50 μ M (b) or +C18:3 mitochondria with Fe^{2+} 100 μ M (c) (** P <0.01, Student's test)

Increased resistance to antimycin A induced by Fe^{2+} in +C18:3 mitochondria and the full inhibition of cytochrome *c* reduction by stigmatellin may implicate that under these conditions, a large proportion of the residual reduction of cytochrome *c* can be attributable to $O_2^{\cdot-}$ generation at Q_O site. To test this hypothesis, the effect of 100 U/ml MnSOD on cytochrome *c* reduction stimulated by succinate and in the absence of inhibitors was analyzed. Table 1 shows that this activity was unaffected by MnSOD in -C18:3 mitochondria. In contrast, MnSOD inhibited cytochrome *c*



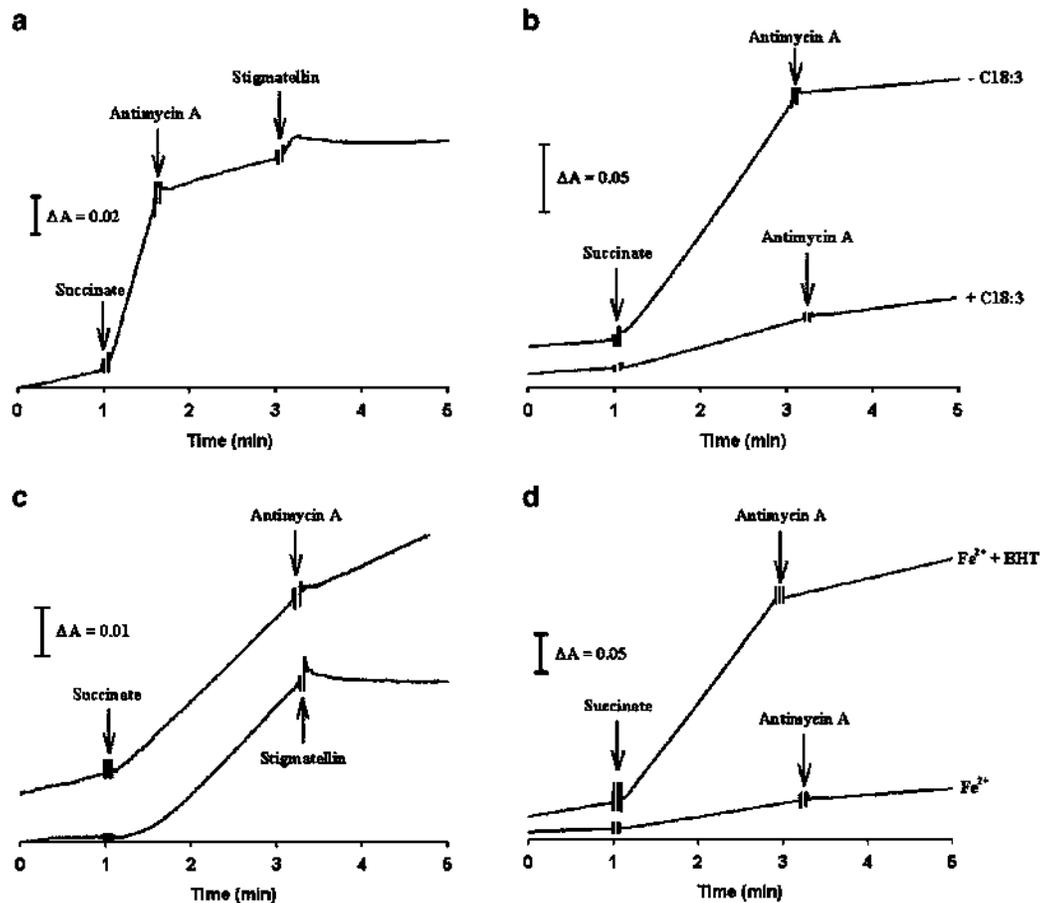


Fig. 6 Time traces of cytochrome *c* reduction by succinate. Cytochrome *c* reduction was evaluated as described in “Materials and methods” for succinate cytochrome *c* oxidoreductase activity measurements. Complex III inhibitors were added at the times indicated by arrows. Where indicated, mitochondria were incubated with Fe^{2+} or BHT plus Fe^{2+} prior to determinations as described in Fig. 3. **a** Effect of consecutive addition of antimycin A and

stigmatellin on cytochrome *c* reduction in control mitochondria. **b** Effect of antimycin A on cytochrome *c* reduction in -C18:3 and +C18:3 mitochondria treated with Fe^{2+} 50 μM . **c** Effect of antimycin A or stigmatellin on cytochrome *c* reduction in +C18:3 mitochondria treated with Fe^{2+} 50 μM . **d** Effect of antimycin A on cytochrome *c* reduction in +C18:3 mitochondria treated with Fe^{2+} 50 μM or BHT plus Fe^{2+} 50 μM . Data are from a representative experiment

reduction by 95% in +C18:3 mitochondria. Together, these results indicate that lipoperoxidative damage in complex III increases its susceptibility to oxidative stress and stimulates $\text{O}_2^{\cdot -}$ generation at the Q_O site.

Influence of C18:3 incorporation and oxidative stress on cytochromes spectra

Table 1 Effect of MnSOD on the rate of cytochrome *c* reduction stimulated by succinate in mitochondria exposed to Fe^{2+} 50 μM

Treatments	-C18:3	+C18:3
Fe^{2+} 50 μM	50.8±10.2	4.0±1.4
Fe^{2+} 50 μM +MnSOD (100 U/ml)	57.7±4.1	0.2±0.06*

Rates are expressed in nmoles of reduced cytochrome *c*/min/mg protein. Data are presented as the mean ± SE of at least 3 independent experiments. Significantly different when compared to +C18:3 mitochondria treated with Fe^{2+} 50 μM (* P <0.05, Student’s test).

The effect of Fe^{2+} on absorption spectra of cytochromes was evaluated to reveal if the increased sensitivity of ETC to oxidative stress observed in +C18:3 mitochondria is related with impaired cytochrome(s) function and/or altered cytochrome(s) content. Figure 7 depicts the total amount of cytochromes reduced in the presence of dithionite. The amount of cytochrome *b* and *c*+*c*₁ per milligram of protein was higher in -C18:3 (Fig. 7a) than in +C18:3 (Fig. 7b). Although their lower cytochromes content, no appreciable effect was exerted by Fe^{2+} on +C18:3 mitochondria. Conversely, the treatment with Fe^{2+} 50 μM decreased the content of cytochromes *c*+*c*₁ in -C18:3 mitochondria. As expected, pre-treatment with BHT did not protect from cytochromes loss.

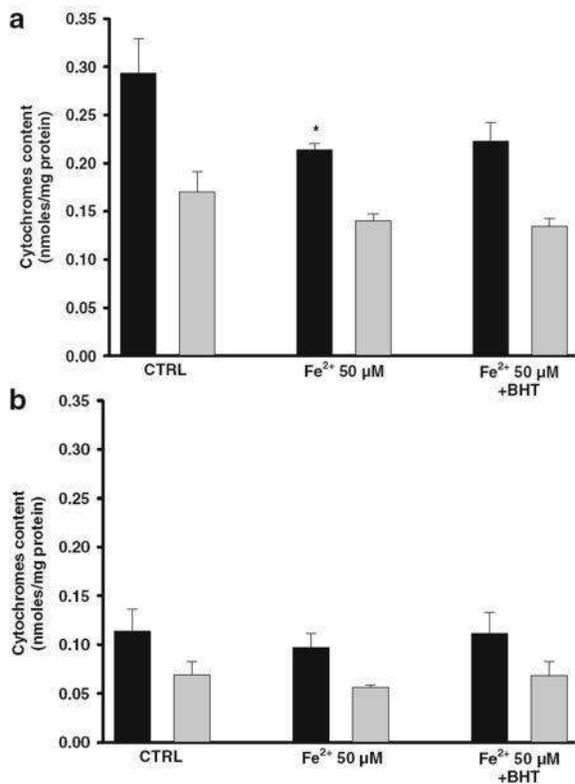


Fig. 7 Effect of Fe²⁺ on cytochromes content of -C18:3 (a) and +C18:3 (b) mitochondria using dithionite as electron donor. Mitochondria were incubated with 50 μM Fe²⁺ or BHT plus 50 μM Fe²⁺ prior to determinations as described in Fig. 3. Cytochromes spectra were recorded as described in “Materials and methods”. Cytochromes content was calculated from wavelengths and molar extinction coefficients described in “Materials and methods”. *Black bars*: cytochromes c+c₁. *Gray bars*: cytochrome b. Data are presented as mean ± S.E. of at least three independent experiments. Significantly different when compared to control (*P<0.05, Student’s test)

Figures 8a and b show cytochromes spectra of both -C18:3 and +C18:3 control mitochondria (solid line) using succinate as electron donor instead dithionite. The characteristic absorption peak of cytochromes c+c₁ can be observed at 550 nm and the shoulder corresponding to cytochrome b appears at 562 nm. Absorption peak of cytochromes c+c₁ and shoulder corresponding to cytochrome b were also observed when -C18:3 mitochondria were treated with 50 μM Fe²⁺ (Fig. 8c). However, in +C18:3 mitochondria, Fe²⁺ treatment caused the total disappearance of the shoulder corresponding to cytochrome b (Fig. 8d), suggesting an impairment on the reduction of this cytochrome. To further investigate this result, the effect of antimycin A in cytochrome b reduction was tested. Antimycin A blocks cytochrome b re-oxidation at Q₁ site which is reflected as an augment in the intensity of cytochrome b absorption in both -C18:3 and +C18:3

control mitochondria (Fig. 8a and b, dotted line). When oxidative stress was induced by Fe²⁺, the effect of antimycin A was also observed in -C18:3 mitochondria (Fig. 8c, dotted line), while in +C18:3 mitochondria, antimycin A induced just a very weak increment in absorption in the range of wavelengths between approx. 560 to 565 nm (Fig. 8d, dotted line). The impairment in cytochrome b reduction by succinate observed in +C18:3 mitochondria was not attributed to cytochromes loss as the cytochrome b shoulder was observed in Fe²⁺-treated +C18:3 mitochondria in the presence of dithionite (Fig. 8f) and cytochrome b content in +C18:3 mitochondria was not altered by Fe²⁺ treatment (Fig. 7b). To test whether the failure in cytochrome b reduction by succinate can be attributed to lipoperoxidative damage, the effect of BHT was tested on cytochromes spectra of Fe²⁺-treated +C18:3 mitochondria using succinate as electron donor. Figure 8e shows that the shoulder corresponding to cytochrome b is present when lipoperoxidation was prevented with BHT (solid line). Moreover, antimycin A produced an increment in cytochrome b absorption (dotted line), indicating that sensitivity to this inhibitor was recovered. Taken together, these results indicate lipoperoxidation does not affect the cytochromes content but impairs electron transfer at the level of cytochrome b, while under non-lipoperoxidative conditions, oxidative stress affects mainly the content of cytochromes c+c₁.

Discussion

The present study shows that an increase in mitochondrial sensitivity to lipoperoxidation brings important changes in the response of ETC to oxidative stress. This was related with incorporation into mitochondria of a fatty acid with a higher number of double bounds than that observed in the native fatty acids from yeast membranes. As demonstrated by this and other reports (Watson et al. 1975; Tuller et al. 1999; Priault et al. 2002), the fatty acid composition of *S. cerevisiae* mitochondria consist of saturated and monounsaturated fatty acids, the latter being the main membrane components when yeast grows in a non fermentable carbon source. In yeast, monounsaturated fatty acids are formed from saturated fatty acyl CoA precursors by the Ole1p Δ9-fatty acid desaturase (Martin et al. 2007). When supplemented in growth medium, unsaturated fatty acids are imported into the cell and subsequently activated to the corresponding CoA thioesters (Johnson et al. 1994). The latter strongly repress desaturase activity of Ole1p due to the decrease of *OLE1* mRNA levels (Bossie and Martin 1989). Thus, the final result of fatty acid supplementation is the induction of radical changes in the acyl composition of membranes lipids by replacement of the native monounsaturated fatty acids with the supplemented fatty acids (Martin et al.

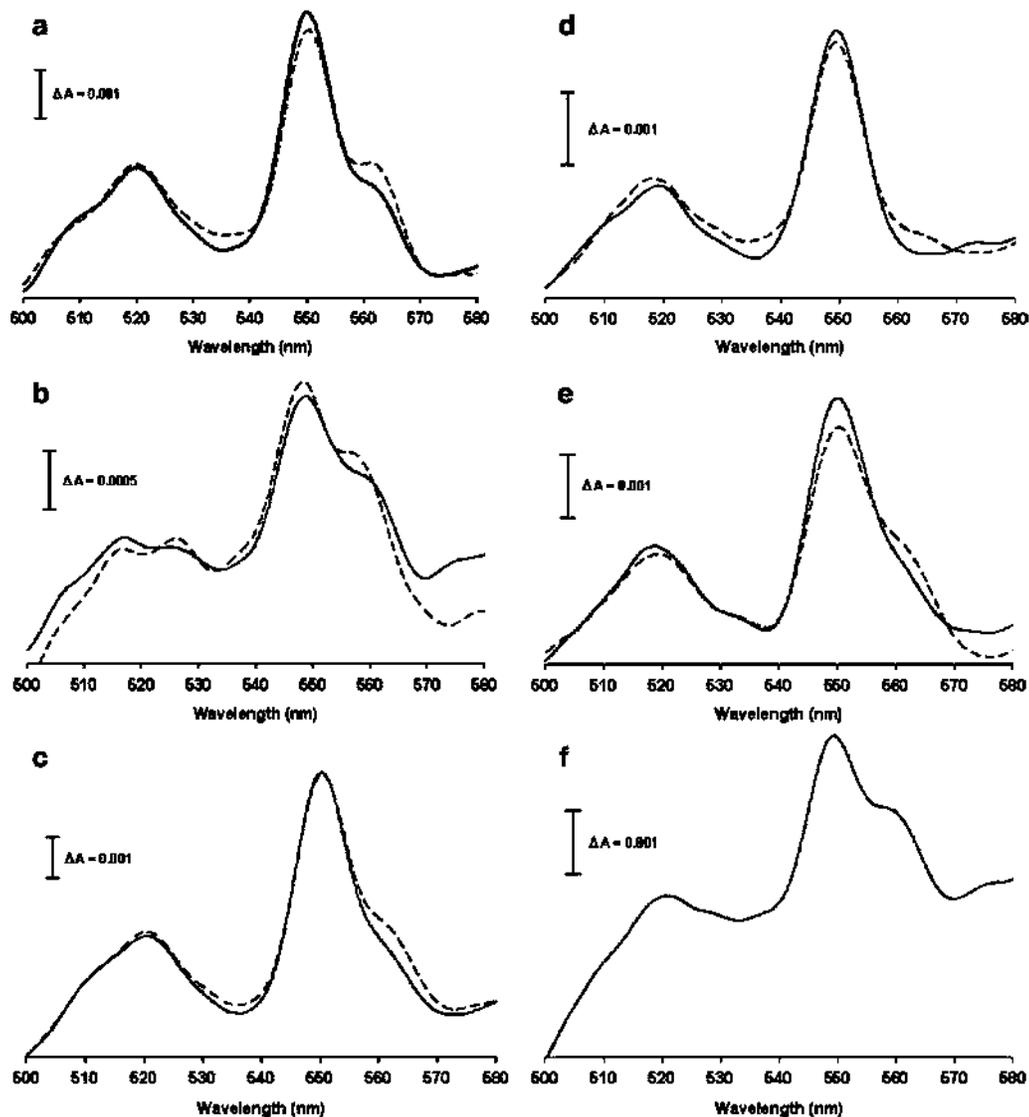


Fig. 8 Effect of Fe^{2+} on difference absorption spectra of cytochromes from -C18:3 and +C18:3 mitochondria. Mitochondria were incubated with $50 \mu\text{M}$ Fe^{2+} or BHT plus $50 \mu\text{M}$ Fe^{2+} prior to determinations as described in Fig. 3. Cytochromes spectra were recorded as described in “Materials and methods” using succinate as electron donor except by (f), where dithionite was used instead succinate. Solid lines: spectra in the absence of complex III inhibitors. Dotted lines: spectra in the presence

of antimycin A. a Spectra of -C18:3 control mitochondria. b Spectra of +C18:3 control mitochondria. c Spectra of -C18:3 mitochondria treated with $50 \mu\text{M}$ Fe^{2+} . d Spectra of +C18:3 mitochondria treated with $50 \mu\text{M}$ Fe^{2+} . e Spectra of +C18:3 mitochondria treated with BHT plus $50 \mu\text{M}$ Fe^{2+} . f Spectra of +C18:3 mitochondria treated with $50 \mu\text{M}$ Fe^{2+} using dithionite as electron donor. Data are from a representative experiment

2007). Our results show that mitochondria were successfully enriched with C18:3 through addition of this fatty acid to the culture medium. Also, C18:3 supplementation produced a drastic diminution in the amount of monounsaturated fatty acids (Fig. 1), which may be interpreted as the result of the repression exerted by C18:3 on Ole1p desaturase activity.

Lipoperoxidation is initiated by the abstraction of an H atom from a methylene group of a polyunsaturated fatty

acid to produce a carbon-centered radical (North et al. 1992). This radical tends to be stabilized by a molecular rearrangement to give a stabilized conjugated dienyl radical that undergo rapid autoxidation. Methylene-interrupted diene fatty acids (i.e. C18:3) undergo autoxidation readily at room temperature via the stabilized dienyl radicals, while monounsaturated fatty acids only undergo autoxidation at elevated temperatures due to the impossibility to form a

stabilized radical (Porter 1986). These data explain the insensitivity to peroxidation observed in saturated and monounsaturated fatty acids (Holman 1954) and are in concordance with the null sensitivity to lipoperoxidation observed in $-C18:3$ mitochondria, whose membranes are constituted of that type of fatty acids. Incorporation of $C18:3$ increased the sensitivity of mitochondria to lipoperoxidation, which is explained in view that sensitivity of fatty acids to peroxidation depends on the number of double bonds contained in its hydrophobic tail; the higher number of double bonds the higher susceptibility to peroxidation.

No differences in the sensitivity of complex II to Fe^{2+} were observed between $-C18:3$ and $+C18:3$ mitochondria. As well, inhibition of complex II activity was not prevented by BHT, suggesting that the contribution of lipoperoxidation is not determining the mechanism of inhibition of this complex. In concordance with this suggestion, in a study carried out in rat synaptosomes, it was observed that the inhibition in complex II activity with ascorbate/iron was not prevented by pre-incubation with the lipophilic antioxidant vitamin E (Cardoso et al. 1999). A wide array of mitochondrial proteins depends on the phospholipid cardiolipin for its adequate functioning; however, there are no reports describing a cardiolipin requirement for adequate function of complex II (For a review see Chicco and Sparagna 2007). From this perspective, it can be suggested that peroxidation of cardiolipin and other phospholipids may not have a harmful effect on complex II function. Hence, other targets would be proposed to explain complex II inactivation by oxidative stress. One of these candidates could be oxidation of thiol groups that are essential for complex II activity (Lê-Quôc et al. 1981). In agreement with this idea, in a study carried out in rat synaptosomes, the inhibition of the complex II activity with ascorbate/iron was prevented by treatment with reduced glutathione (Cardoso et al. 1999), while in yeast mitochondria, the thiol reductant β -mercaptoethanol reversed the inhibition in complex II activity induced by H_2O_2 (Cortés-Rojo et al. 2007). Other possible candidates are the three iron-sulfur clusters that direct electron flow in complex II (Cheng et al. 2006), given that these kind of prosthetic groups can be damaged through overproduction of ROS caused by iron overload (Rustin et al. 1999).

Augmented susceptibility to oxidative stress was observed in complex III and complex IV activities from $+C18:3$ mitochondria. This effect was attributed to lipoperoxidative damage since BHT protected to a different degree the enzymatic activities of these complexes. In this regard, BHT fully protected complex IV activity in $+C18:3$ and no protection was observed in $-C18:3$ mitochondria, which discard the possibility of artifactual protection by BHT. There are reports pointing to cardiolipin as an

essential phospholipid for complex IV functioning (Fry and Green 1980; Robinson 1993). As well, it has been demonstrated that peroxidative damage to membrane lipids affects complex IV activity in a reversible way through cardiolipin restitution (Paradies et al. 2000). From these data, it can be inferred that complex IV inactivation can be attributed totally to lipoperoxidation.

Complex III activity from $+C18:3$ mitochondria was the most sensitive segment of ETC to the damaging effects of oxidative stress since a concentration of $100 \mu M Fe^{2+}$ almost fully abolished this activity. Likewise, in a study carried out in rat liver mitochondria, it was observed that complex III behaved as the most sensitive enzyme against the attack of free radicals generated by the iron/ascorbate system (Trümper et al. 1988). In a subsequent study (Reinheckel et al. 1995), it was observed that high susceptibility of the complex III activity in comparison to the other complexes was not attributable to structural alterations in complex subunits given that changes in electrophoretic mobilities or specific losses of protein subunits were not found. Hence, it was suggested that the loss of activity has to be explained by specific impairment of the redox-active centers in the respiratory chain proteins, most likely by changes in phospholipid-protein interactions. In this work, we searched for alterations in cytochromes status caused by Fe^{2+} in an attempt to elucidate how a higher susceptibility to lipoperoxidation sensitizes complex III activity against the damaging effects of oxidative stress. First, it was found that basal complex III activity was lower in $+C18:3$ mitochondria than in $-C18:3$ mitochondria. This may be attributed to an inferior capability of $+C18:3$ mitochondria for electron transport due to a lower concentration of cytochromes *c+c1* and *b*. We do not have experimental evidence to explain the diminished cytochromes content when cells are supplemented with $C18:3$. In this regard, it can be speculated that lower content of cytochromes may be related with repression of desaturase activity by supplemented fatty acids. Removal of electrons and protons during fatty acid desaturation is a process energetically demanding (Fox et al. 2004) and requires oxygen (Martin et al. 2007). Therefore, energy expenditure and oxygen demand could considerably decrease when unsaturation is repressed by supplementation with $C18:3$ and the cell could respond to this change by diminishing energy production and oxygen consumption through down-regulation in cytochromes synthesis at a threshold level that allow aerobic growth in a non-fermentable carbon source. In any case, a lower amount of cytochromes was not related with a higher inhibition of complex III activity in $+C18:3$ mitochondria as the content of cytochromes was not altered by Fe^{2+} treatment. Indeed, a decrease in cytochromes *c+c1* was observed only in $-C18:3$ mitochondria. Studies carried out in liposomes containing lipids with a variable unsaturation degree have demonstrated

that the presence of unsaturated fatty acids protects structure and function of cytochrome *c* from oxidative damage caused by exposure to oxygen singlet (Rodrigues et al. 2007) or *t*-butylhydroperoxide (Nantes et al. 2000). In a similar way, it is reasonable to assume that tri-unsaturated lipids from +C18:3 mitochondria react preferentially with ROS produced by Fe^{2+} exposure, which may help to preserve structural characteristics responsible for light absorption of cytochromes. Conversely, it is possible that in -C18:3 mitochondria, cytochromes $c+c_1$ becomes the main target of the ROS generated by Fe^{2+} given the low unsaturation of fatty acids from -C18:3 mitochondria and its null susceptibility to lipoperoxidation. As expected, BHT did not protect from inhibition complex III activity and cytochromes loss in -C18:3 mitochondria. This suggests that under non-lipoperoxidative conditions, the damage in cytochromes $c+c_1$ is the main factor that limits electron transfer at complex III.

Although the cytochromes content was not affected by oxidative stress in +C18:3 mitochondria, a failure in cytochrome *b* reduction by succinate was observed. During the Q-cycle, reduction of cytochrome *b* is achieved by bifurcated sequential oxidation of quinol at the Q_O site of complex III. The first electron from quinol is transferred to the ISP, leaving a reactive radical semiquinone. The semiquinone then transfers an electron to hemes *b* contained in the cytochrome *b* subunit (Muller et al. 2003). Alternatively, a concerted mechanism for quinol oxidation has been proposed (Zhu et al. 2007). On the other hand, delipidation of complex III impairs antimycin A binding in a reversible way by cardiolipin restitution. Taking into account these data and the lipophilic nature of cytochrome *b*, it seems plausible to hypothesize that, without altering heme *b* concentration, lipoperoxidation may alter the cytochrome *b* conformation or redox potential of *b* hemes to an unfavourable value in such a way that electron transfer to hemes becomes impaired. As well, this argument is supported by the lack of antimycin A effects observed in the cytochromes spectra and the augmented resistance to this inhibitor observed in cytochrome *c* reduction. The role of lipoperoxidation in these effects is confirmed because when +C18:3 mitochondria were pre-incubated with BHT, Fe^{2+} treatment did not impair the cytochrome *b* reduction by succinate and the effects of antimycin A were recovered in both the cytochromes spectra and in cytochrome *c* reduction. Furthermore, disappearance of the cytochrome *b* shoulder and increased resistance to antimycin A were not observed in -C18:3 mitochondria.

Although cytochrome *b* reduction was impaired by lipoperoxidation, our results suggest that quinol binding and oxidation by the ISP protein at the Q_O site was not totally affected by lipoperoxidation since residual cytochrome *c* reduction was abolished by stigmatellin, a

competitive inhibitor of quinol oxidation (Kessl et al. 2003). Also, contrary to the quinone destroyed by lipoperoxidation reported in another study (Forsmark-Andréé et al. 1997), residual cytochrome *c* reduction by succinate implicate that a fraction of endogenous ubiquinone was still available for electron transfer from complex II to complex III. Otherwise, cytochrome *c* reduction would be completely inhibited.

Specific interactions between membrane phospholipids and domains of ISP have been proposed to facilitate the rotation of the ISP catalytic, head domain (Lange et al. 2001). These interactions could be altered in +C18:3 mitochondria when lipoperoxidation was stimulated by Fe^{2+} treatment. In addition, it has been proposed that disruption in the electron transfer between *b* hemes impair the movement of the head domain of reduced ISP (Yang et al. 2008). Thus, these two factors may conjugate to impair ISP movement in +C18:3 mitochondria. As stated above, the stigmatellin-sensitive cytochrome *c* reduction suggest that quinol oxidation by ISP is still operative in +C18:3 mitochondria subjected to oxidative stress. Thus, quinol oxidation and the presumed impairment in ISP movement caused by lipoperoxidation could lead to increased $\text{O}_2^{\cdot-}$ production and non-catalytic reduction of cytochrome *c*. Disruption in cytochrome *b* reduction in mutants lacking *b* hemes leads to increased $\text{O}_2^{\cdot-}$ formation because the second electron from quinol is retained either in b_L heme or semiquinone and reacts with oxygen to produce $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Shang 2008). Similarly, the disruption in cytochrome *b* reduction observed in +C18:3 mitochondria may contribute to an electron leak at the Q_O site and $\text{O}_2^{\cdot-}$ production. In accordance with this argument, residual cytochrome *c* reduction was almost fully inhibited by MnSOD (or stigmatellin) only in +C18:3 mitochondria, indicating that under lipoperoxidative conditions, a large part of the cytochrome *c* reduction proceeds through $\text{O}_2^{\cdot-}$ generation at Q_O site.

Taken together with the data observed by others and the results obtained in this study, we suggest a mechanism by which lipoperoxidation could lead to decreased complex III activity and augmented $\text{O}_2^{\cdot-}$ production. Lipoperoxidation affects cytochrome *b* conformation, which would be reflected as a disruption in the reduction of *b* hemes and an increased resistance to antimycin A. At the same time, lipoperoxidation and/or the defect in electron transfer at cytochrome *b* may impair ISP movement between heme b_L and cytochrome c_1 , which would lead to a decrease in catalytic cytochrome *c* reduction. Damage in ISP movement would not impair quinol oxidation (as reflected by inhibition of cytochrome *c* reduction by stigmatellin). The failure in electron transfer to cytochrome *b* and the impaired ISP movement would lead to the leak of electrons arising from quinol oxidation by ISP. These electrons may react with oxygen to produce $\text{O}_2^{\cdot-}$, which in turn could

reduce cytochrome *c* in a non-catalytic way (as reflected by inhibition of cytochrome *c* reduction MnSOD).

The total concentration of Fe^{2+} in yeast mitochondria has been estimated to be in the range between approximately 500–800 μM and it has been suspected that about 20% is in a free chelatable form (Hudder et al. 2007). The higher concentration of Fe^{2+} used in this study (100 μM) is out of the range of the free iron concentration mentioned above. Considering that even this concentration was not able to fully inhibit any of the activities measured in $-\text{C18:3}$ mitochondria, this indicates that yeast mitochondria are highly resistant to the damaging effects of oxidative stress, as was suggested in another report (Machida et al. 1998). A great part of this resistance must be attributed to the low unsaturation degree of yeast membranes. Lipid unsaturation of mitochondrial membranes and resistance to lipoperoxidation has generated a great interest in the scientific community that studies ageing mechanisms in superior organisms (For a review see Hulbert 2005). Peroxidizability index of mitochondrial membranes has been strongly correlated with the life span of superior organisms: the higher life span, the lower sensitivity of mitochondrial membranes to lipoperoxidation (Pamplona et al. 1998). The higher susceptibility to lipoperoxidation observed in organisms with shorter life spans would lead to an accelerated decay in mitochondrial function (maybe involving some aspects of mitochondrial dysfunction described in the present investigation), compromising the adequate function of the cell and predisposing it to early ageing. Taking into account the results obtained in the present study and the fact that yeast has been used as a model in ageing research (Breitenbach et al. 2003), we consider that yeast with manipulated fatty acid content may be useful to understand the underlying molecular mechanisms that connect mitochondrial lipoperoxidation with ageing.

Acknowledgements This work was supported by CIC-UMSNH (2.16 to S.M.A and A.S.M.), COECYT 2008 (to S.M.A and A.S.M.), Fondos Mixtos CONACYT-Estado de Michoacán (to S.M.A and A.S.M.), NIAID (AI062885 to I.B), NIH/NIA (AG 021830 to I.B) and NIEHS Center Grant, EOS 006677. The authors appreciated the technical assistance from Dr. Emma Bertha Gutiérrez-Cirlos, UBIMED Iztacala, UNAM.

References

- Avéret N, Fitton V, Banoust O, Rigoulet M, Guérin B (1998) *Mol Cell Biochem* 184:67–79
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) *Can J Biochem Physiol* 37:911–917
- Bossie MA, Martin CE (1989) *J Bact* 171:6409–6413
- Boveris A, Cadenas E (1975) *FEBS Lett* 54:311–314
- Breitenbach M, Madeo F, Laun P, Heeren G, Jarolim S, Fröhlich K-U, Wissing S, Pichova A (2003) Yeast as a model for ageing and apoptosis research. Topics in current genetics. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, pp 61–97
- Buege JA, Aust D (1978) *Methods Enzymol* 52:302–310
- Cardoso SM, Pereira C, Oliveira CR (1999) *Free Radic Biol Med* 26:3–13
- Chance B, Sies H, Boveris A (1979) *Physiol Rev* 59:527–605
- Cheng VWT, Zhao EMZ, Rothery RA, Weiner JH (2006) *J Biol Chem* 281:27662–27668
- Chicco AJ, Sparagna GC (2007) *Am J Physiol Cell Physiol* 292:33–44
- Cortés-Rojo C, Calderón-Cortés E, Clemente-Guerrero M, Manzo-Avalos S, Uribe S, Boldogh I, Saavedra-Molina A (2007) *Free Radic Res* 41:1212–1223
- Forsmark-André P, Lee CP, Dallner G, Ernster L (1997) *Free Radic Biol Med* 22:391–400
- Fry M, Green DE (1980) *Biochem Biophys Res Commun* 93:1238–1246
- Green K, Brand MD, Murphy MP (2004) *Diabetes* 53:110–118
- Guérin B, Labbe P, Somlo M (1979) *Methods Enzymol* 55:149–159
- Hallberg EM, Shu Y, Hallberg RL (1993) *Mol Cell Biol* 13:3050–3057
- Holman RT (1954) *Autooxidation of fats and related substances*. Academic, New York, pp 51–98
- Hudder BN, Morales JG, Stubna A, Münck E, Hendrich MP, Lindahl PA (2007) *J Biol Inorg Chem* 12:1029–1053
- Hulbert AJ (2005) *J Theor Biol* 234:277–288
- Hunte C, Palsdottir H, Trumpower BL (2003) *FEBS Lett* 545:39–46
- Johnson DR, Knoll LJ, Levin DE, Gordon JI (1994) *J Cell Biol* 127:751–762
- Lange C, Nett JH, Trumpower BL, Hunte C (2001) *EMBO J* 20:6591–6600
- Lee YI, Hwang JM, Im JH, Lee YI, Kim DG, Yu DY, Moon HB, Park SK (2004) *J Biol Chem* 279:15460–15471
- Lê-Quôc K, Lê-Quôc D, Gaudemer Y (1981) *Biochemistry* 20:1705–1710
- Lucas DT, Szweda LI (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95:510–514
- Machida K, Tanaka T, Fujita K-I, Taniguchi M (1998) *J Bact* 180:4460–4465
- Martin CE, Oh C-S, Jiang Y (2007) *Biochim Biophys Acta* 1771:271–285
- Matsuno-Yagi A, Hatefi Y (1996) *J Biol Chem* 271:6164–6171
- Morrison WR, Smith LM (1964) *J Lipid Res* 5:600–608
- Muller FL, Crofts AR, Kramer DM (2002) *Biochemistry* 41:7866–7874
- Muller FL, Roberts AG, Bowman MK, Kramer DM (2003) *Biochemistry* 42:6493–6499
- Nantes IL, Faljoni-Alario A, Nascimento OR, Bandy B, Gatti R, Bechara EJM (2000) *Free Radic Biol Med* 28:786–796
- North JA, Spector AA, Buettner GR (1992) *J Biol Chem* 267:5743–5746
- Pamplona R, Portero-Otin M, Riba D, Ruiz C, Prat J, Bellmunt JP, Barja G (1998) *J Lipid Res* 39:1989–1994
- Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Di Venosa N, Serena D, Ruggiero FM (1999) *Free Radic Biol Med* 27:42–50
- Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Ruggiero FM (2000) *FEBS Lett* 466:323–326
- Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Ruggiero FM (2002) *Gene* 286:135–141
- Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Di Venosa N, Federico A, Ruggiero FM (2004) *Circ Res* 94:53–59
- Petrosillo G, Ruggiero FM, Di Venosa N, Paradies G (2003) *FASEB J* 17:714–716
- Porter NA (1986) *Acc Chem Res* 19:262–268
- Priault M, Bessoule J-J, Grelaud-Coq A, Camougrand N, Manon S (2002) *Eur J Biochem* 269:5440–5450
- Rice-Evans CA (1994) *Free radical damage and its control*. Elsevier Science, Amsterdam, pp 131–153
- Robinson NC (1993) *J Bioenerg Biomembr* 25:153–163
- Rodrigues T, de Franca LP, Kawai C, de Faria PA, Mugnol KCU, Braga FM, Tersariol ILS, Smaili SS, Nantes IL (2007) *J Biol Chem* 282:25577–25587

- Rustin P, von Kleist-Retzow JC, Chantrel-Groussard K, Sidi D, Munnich A, Röhrig A (1999) *Lancet* 354:477–479
- Trümper L, Hoffmann B, Wiswedel I, Augustin W (1988) *Biochim Biophys Acta* 47:933–939
- Tsai A, Palmer G (1986) *Biochim Biophys Acta* 852:100–105
- Tuller G, Nemeč T, Hrašnik C, Daum G (1999) *Yeast* 15:1555–1564
- Uribe S, Ramírez J, Peña A (1985) *J Bact* 161:1195–1200
- Watson K, Bertoli E, Griffiths DE (1975) *Biochem J* 146:401–407
- Wei Y-H, Lu CY, Lee H-C, Pang C-Y, Ma Y-S (1998) *Ann New York Acad Sci* 854:155–170
- Wei Y-H, Lu CY, Wei CY, Lee H-C (2001) *Chin J Physiol* 44:1–11
- Yang S, Ma H-W, Yu L, Yu CA (2008) *J Biol Chem* 283:28767–28776
- Zhu J, Egawa T, Yeh S-R, Yu L, Yu CA (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104:4864–4869

Capítulo 3

Free Radical Research
2007, 1: 12, iFirst article

informa
healthcare

Electron transport chain of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria is inhibited by H₂O₂ at succinate-cytochrome c oxidoreductase level without lipid peroxidation involvement

CHRISTIAN CORTÉS-ROJO¹, ELIZABETH CALDERÓN-CORTÉS¹,
MÓNICA CLEMENTE-GUERRERO¹, SALVADOR MANZO-ÁVALOS¹,
SALVADOR URIBE², ISTVAN BOLDOGH³, & ALFREDO SAAVEDRA-MOLINA¹

¹Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich. México, ²Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México, and ³University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, USA

Accepted by Dr J. Kuller

(Received 13 April 2007; in revised form 13 August 2007)

Abstract

The deleterious effects of H₂O₂ on the electron transport chain of yeast mitochondria and on mitochondrial lipid peroxidation were evaluated. Exposure to H₂O₂ resulted in inhibition of the oxygen consumption in the uncoupled and phosphorylating states to 69% and 65%, respectively. The effect of H₂O₂ on the respiratory rate was associated with an inhibition of succinate-ubiquinone and succinate-DCIP oxidoreductase activities. Inhibitory effect of H₂O₂ on respiratory complexes was almost completely recovered by β -mercaptoethanol treatment. H₂O₂ treatment resulted in full resistance to Q₀ site inhibitor myxothiazol and thus it is suggested that the quinol oxidase site (Q₀) of complex III is the target for H₂O₂. H₂O₂ did not modify basal levels of lipid peroxidation in yeast mitochondria. However, H₂O₂ addition to rat brain and liver mitochondria induced an increase in lipid peroxidation. These results are discussed in terms of the known physiological differences between mammalian and yeast mitochondria.

Keywords: Yeast, mitochondria, oxygen consumption, respiratory chain, H₂O₂, peroxidation

Introduction

In cells, the mitochondrial electron transport chain (ETC) is one of the most important sources of reactive oxygen species (ROS) [1]. ROS generation in ETC may be promoted *in vivo* through addition of certain inhibitors of respiratory complexes, whereas some pathological situations, such as cardiomyopathy [2,3], hyperglycaemia [4], calcium overload [5] or genetic defects in proteins that constitute respiratory complexes [6] may increase the *in vivo* rate of mitochondrial ROS production. Because ROS are short-lived species and react readily with molecules

surrounding their generation site, it should be expected that lipids and proteins from mitochondrial membranes are their main target when mitochondrial ROS generation is augmented. Hence, the study of oxidative stress effects on ETC components has become important, because mitochondrial oxidative stress-related dysfunction could be implicated in a wide range of disorders, including liver damage by hepatitis B [7], heart ischemia-reperfusion [8] and ageing [9,10].

A number of studies have focused on lipid peroxidation as the main factor of ETC inhibition

Correspondence: Alfredo Saavedra-Molina, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B-3, C.U., 58030, Morelia, Mich. México. Tel: 52-443-326-5790, Ext. 117. Fax: 52-443-326-5788. E-mail: saavedra@zcu.usmich.mx

ISSN 1071-5762 print/ISSN 1029-2370 online © 2007 Informa UK Ltd
DOI: 10.1080/10715760701635082

2 C. Cortés-Rojo et al.

by ROS. Exposure of bovine heart submitochondrial particles to ascorbate plus ADP/Fe²⁺ diminished the ubiquinone content and succinate dehydrogenase and cytochrome *c* oxidase activities. These effects were paralleled by an increase in lipid peroxidation [11]. In rat synaptosomes, the activities of complexes II, III and V were partially inhibited by ascorbate-iron treatment. In this system, lipophilic antioxidants protected the activity of complex III, so it was suggested that lipid peroxidation was involved in inhibition. However, protein oxidation could also be involved in the effects on these complexes [12]. In mitochondria isolated from rat hearts subjected to an ischemia-reperfusion cycle, the rate of H₂O₂ production increased when using succinate as respiratory substrate, leading to lipid peroxidation-associated cardiolipin loss and diminution in state 3 respiration rate. This last effect was attributed to a partial inhibition in activities of complexes I and III [13,14].

Despite the above described, some authors have reported that ETC may be oxidatively damaged by mechanisms which do not necessarily involve peroxidative damage to lipids. Giulivi et al. [15] reported the preferential attack of oxygen singlet to proteic components of ETC over the attack to lipidic components of mitochondrial membranes. In beef heart submitochondrial particles exposed to increasing doses of hydroxyl radical (OH[•]) [16], lipophilic antioxidants that inhibit lipid peroxidation did not prevent the oxidative inactivation of NADH and succinate dehydrogenases. Similarly, the incubation of rat brain mitochondria with FeSO₄/ascorbate mixtures (an OH[•] generating system) augmented lipid peroxidation levels and inhibit ETC function. However, the lipid peroxidation inhibitor, butylated hydroxytoluene, did not avoid inhibition in ETC function but did prevent the increase in lipid peroxides and the OH[•]-stimulated carbonylation of proteins [17]. Therefore, these reports suggest that lipid peroxidation-independent oxidative damage might be of critical importance in the mechanism of ETC inactivation.

Even when a more extensive characterization about the effects of OH[•] and superoxide radicals has been done, less attention has been put in the effects of H₂O₂ on ETC functionality. This aspect could be potentially important since H₂O₂ has been considered the most important ROS at cellular level [18], mitochondria are the principal source of H₂O₂ [18] and ETC components of mitochondria are enriched in cytochromes and Fe-S centres, which are important targets of oxidative attack by this ROS [19,20].

A large body of experimental evidence has demonstrated a direct correlation between susceptibility to peroxidation of membrane lipids and its degree of unsaturation [21-24]. In fact, this correlation has

also been shown at mitochondrial level. In rat mitochondria the three main membrane phospholipids (cardiolipin, phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine) are composed of the highly unsaturated docosahexaenoic acid (22:6) and arachidonic acid (20:4) and they are significantly more sensitive to lipid peroxidation, whereas, in membranes from pigeon mitochondria, which are more resistant to lipid peroxidation than rat mitochondria, these highly unsaturated fatty acids are substituted by linoleic acid (18:2) [23,24].

Saccharomyces cerevisiae mitochondria present some important differences in comparison to rat mitochondria, including (a) the lack of a rotenone-sensible complex I [25,26] and (b) when grown using lactate as a carbon source, the membrane fatty acid composition of mitochondria consists mainly of C16:1 and C18:1 fatty acids [27]. The last feature of yeast mitochondria probably results in higher resistance to oxidative stress. Hence, the way in which ROS inhibit yeast ETC could be different from their action on rat mitochondria, because yeast mitochondria might be less sensitive to lipid peroxidation due to their lipid composition. For the same reason, yeast mitochondria may be a more suitable system than lipophilic antioxidants to discriminate the direct effects of ROS on components of ETC from those attributable to lipid peroxidation.

The toxicity of H₂O₂ on yeast mitochondria was studied. It was found that yeast mitochondria are highly resistant to ROS and, in addition, the mechanism of damage seems to be circumscribed to thiol groups of proteins since thiol reductant β-mercaptoethanol was able to revert the damaging effect of H₂O₂ on dehydrogenase activities of ETC, phospholipids in the membrane were not damaged, cytochrome content was not altered and hydroxyl radical scavenger mannitol or iron quelant EDTA were not able to prevent the inhibitory effect exerted by H₂O₂ on ETC reactions. It was observed that the Q₀ site in complex-III was the most affected function on the ETC.

Materials and methods

Materials

Zymolyase 20T was obtained from ICN Biomedicals, Inc. (Aurora, OH). H₂O₂ (38% v/v), succinic acid, β-mercaptoethanol, 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP), potassium cyanide, tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD), cytochrome *c*, flavone, antimycin A and myxothiazol were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Stigmatellin was obtained from Fluka Chemie GmbH (Buchs, Switzerland). All other reagents were of the highest purity commercially available.

Biologicals

An industrial wild type diploid strain of *Saccharomyces cerevisiae*, Yeast Foam was used (kind gift from Professor Michel Rigoulet, IBGC, U. of Bordeaux-2, France). Three-month old, male Wistar rats from our local colony were used for isolation of liver and brain mitochondria.

Isolation of yeast mitochondria

Cells of Yeast Foam were grown aerobically at 28°C in a medium containing 0.12% (NH₄)₂SO₄, 0.1% KH₂PO₄, 1% yeast extract, 2% D,L-lactate (pH 5.0 with NaOH) and harvested in mid-exponential growth phase (OD₅₅₀ = 3.5–4.0). Mitochondria were isolated from spheroplasts as described previously [28,29], except that zymolase was used instead of cytohelicase.

Isolation of rat brain mitochondria

Rat brain mitochondria were isolated by differential centrifugation in a Percoll gradient as described [30,31], with some modifications. Briefly, rats were decapitated and the brain was extracted and placed in cold medium containing 210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 1 mM EGTA, 0.5% bovine serum albumin and 10 mM MOPS (pH 7.4). The brain was homogenized manually in a glass homogenizer and centrifuged at 400 g; the supernatant was centrifuged at 9 000 g. Centrifugations were carried out for 10 min at 4°C. The pellet was resuspended in 15% Percoll and placed in a discontinuous Percoll (23% and 40%) gradient. The gradient was centrifuged at 30 700 g, during 6 min, band 3 was extracted, diluted 1:4, centrifuged and washed at 16 700 g in the isolation medium supplemented with 0.5% bovine serum albumin for 10 min. The last centrifugation was done at 6900 g for 10 min.

Isolation of rat liver mitochondria

Rat liver mitochondria were prepared from the same rats used for brain mitochondria isolation. Once the liver was extracted, it was cut into small pieces and homogenized. The homogenate was subjected to differential centrifugation as described previously [32]. In all cases, mitochondrial protein concentration was assayed by Biuret assay [33].

Treatments with H₂O₂

Treatments were performed before each assay at 4°C and mitochondrial protein at a concentration of 0.3 mg/ml. Mitochondria were suspended in 50 mM KH₂PO₄ buffer (pH 7.6 with NaOH), except for oxygen consumption measurements, where mitochondrial protein (0.3 mg/ml) was suspended in a medium with 0.6 M sucrose, 2 mM EGTA, 4 mM

KH₂PO₄, 10 mM Tris-maleate, pH 6.8. This was done because incubation of mitochondria in isotonic KH₂PO₄ buffer inhibited oxygen consumption in intact mitochondria due to swelling. H₂O₂ was added at the beginning of incubations at the concentrations indicated in the legend to each figure. For experiments of protection with EDTA or mannitol, mitochondria were incubated with 50 μM EDTA or 10 mM mannitol during 15 min previous to treatment with H₂O₂. For experiments to determinate reversion of the H₂O₂ effects by β-mercaptoethanol, mitochondria were incubated during 30 min with β-mercaptoethanol after treatments with H₂O₂. To avoid interferences due to cytochromes release in cytochrome spectra experiments and unspecific reduction of DCIP by β-mercaptoethanol during measurements of succinate-DCIP oxidoreductase activity, H₂O₂ was removed to carry out both determinations at the end of the treatment by centrifugating mitochondrial solution at 8700 g during 15 min and mitochondrial pellet were re-suspended in 50 mM KH₂PO₄ buffer (pH 7.6 with NaOH) at adequate concentration and volume for each determination. Controls were treated in the same way except for H₂O₂ addition.

Oxygen consumption

The rate of cyanide-sensitive oxygen consumption in resting state (state 4), phosphorylating state (state 3) and uncoupled state (state U) was monitored at room temperature using an YSI 5300 biological oxygen monitor (Yellow Springs Instrument, Yellow Springs, OH), equipped with a Clark-type electrode. Pre-treated mitochondria (0.3 mg/ml) were placed in a glass chamber with constant stirring, containing 3.0 ml of a medium with 0.6 M sucrose, 2 mM EGTA, 4 mM KH₂PO₄, 10 mM Tris-maleate, pH 6.8. Respiration in states 3 and U was initiated with 300 μM ADP and 2 μM FCCP, respectively.

Succinate dehydrogenase activity

This enzymatic activity was measured at room temperature in permeabilized mitochondria, following the TTFAs sensitive secondary reduction of DCIP [34]. Mitochondria were permeabilized with Triton X-100 as reported by Hallberg et al. [35] and treated with H₂O₂ as indicated above. H₂O₂ was removed at the end of the treatment to eliminate unspecific reduction of DCIP by β-mercaptoethanol by centrifuging mitochondrial solution at 8700 g during 15 min and mitochondrial pellet was resuspended at a concentration of 0.3 mg in a final 1 ml volume of reaction mixture contained 50 mM KH₂PO₄ phosphate buffer (pH 7.6), 10 mM sodium succinate (pH 7.6), 50 μM flavone, 1 μg antimycin A and 1 mM KCN. After incubating for 3 min with inhibitors, the reaction was initiated with 80 μM DCIP. Reaction

4 C. Cortés-Rojo et al.

was stopped by the addition of 1 mM TTFA. Absorbance changes were recorded in a SLM Aminco DW 2000 spectrophotometer, in the dual wavelength mode at 600–590 nm. The activity was calculated from the slope of the absorbance plot using the molar extinction coefficient of $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for DCIP. The TTFA-sensitive activity was calculated by subtracting the activity in the presence of TTFA plus succinate to the activity stimulated only with succinate.

Succinate cytochrome c oxidoreductase activity

The antimycin A sensitive succinate-mediated reduction of cytochrome *c* was followed by measuring the reduction of cytochrome *c* in permeabilized mitochondria by mild detergent treatment [35]. The reaction mixture contained 50 mM KH_2PO_4 (pH 7.6), 1.5 mg cytochrome *c*, 50 μM flavone and 1 mM KCN in a final 1 ml volume. Pre-treated mitochondrial protein (0.1 mg) was added and, after 3 min, the reaction was initiated by adding 10 mM sodium succinate (pH 7.6). The reaction was stopped by the addition of 1 μg antimycin A. Absorbance changes at 550–540 nm were recorded as described above. The rate of cytochrome *c* reduction was calculated from the slopes of the absorbance plots using a molar extinction coefficient of $19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for cytochrome *c*. The antimycin-sensitive reduction of cytochrome *c* was calculated by subtracting the activity in the presence of antimycin plus succinate to the activity stimulated only with succinate.

Cytochrome oxidase activity

This activity was evaluated by measuring the cyanide-sensitive oxygen consumption at room temperature using an YSI 5300 biological oxygen monitor, equipped with a Clark-type electrode. The reaction mixture contained 50 mM KH_2PO_4 buffer (pH 7.6), 1 μg antimycin A, 50 μM TMPD and 0.9 mg detergent-solubilized mitochondrial protein in a final concentration of 0.3 mg/ml. The assay was started by the addition of 5 mM sodium ascorbate or 0.6 mg oxidized cytochrome *c* (pH 7.6) and stopped by the addition of 100 μM KCN.

Cytochrome spectra

Cytochrome spectra were obtained by measuring at room temperature the reduced minus oxidized spectra with a SLM Aminco DW 2000 spectrophotometer fitted in the split mode. To eliminate the possibility of cytochromes released by H_2O_2 treatment interfering with the results, pre-treated mitochondrial samples (2 mg) were centrifuged at 8700 *g* during 15 min and re-suspended in a medium with 0.6 M sucrose, 10 mM Tris maleate (pH 6.8), 4 mM KH_2PO_4 ,

2 mM EGTA and 1 mM KCN. bc_1 complex inhibitors were added 5 min before spectra recording. Reference and sample cuvettes were treated in the same way and the baseline was recorded. Then a small amount of KFeCN was added to the reference cuvette while 10 mM succinate or, when indicated, a small quantity of sodium dithionite, was added to the sample cuvette. These cuvettes were used to record the differential spectra. Spectra were scanned between 500–580 nm. Cytochrome contents were calculated using the following wavelengths and molar extinction coefficients: cytochrome $c+c_1$, $\Delta A = 552 \text{ nm} - 540 \text{ nm}$ and $\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; cytochrome *b*, $\Delta A = 562 - 575 \text{ nm}$ and $\epsilon = 20 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [11].

Lipid peroxidation measurements

The extent of lipid peroxidation was determined with the thiobarbituric acid (TBA) assay [36]. Mitochondria were treated with H_2O_2 as indicated above and later combined with 2 ml of an acid mixture containing 0.25 N HCl, 15% w/v trichloroacetic acid and 0.375% w/v thiobarbituric acid. This combination was heated for 15 min in a boiling water bath, cooled on ice and centrifuged at 1 000 *g* for 5 min. The absorbance of the supernatant was measured at 535 nm against a blank containing all the reagents minus mitochondrial protein. A Perkin Elmer Lambda 18 UV/vis spectrometer was used. The results were calculated using the molar extinction coefficient for malondialdehyde and expressed in terms of nanomoles of TBA reactants (TBARS) per milligram of protein.

Results

Isolated yeast mitochondria were incubated for 30 min in the presence of increasing concentrations of H_2O_2 and the effects on the rate of oxygen consumption were tested. Measurements were conducted in both the resting state (state 4) and the phosphorylating state (state 3). In state 4 (Figure 1A) the addition of increasing concentrations of H_2O_2 resulted in a progressive inhibition of respiration, reaching a significant decrease in 51% and 60%, with 0.5 mM and 1.0 mM, respectively. A more pronounced effect was mediated by H_2O_2 in state 3 (Figure 1B), resulting in a decrease in respiration from the lowest concentration tested (0.125 mM). Wide variations in the concentration of H_2O_2 (0.25–1.0 mM) exhibited a stronger inhibitory effect (60–75%) (Figure 1B).

Addition of the protonophore FCCP to mitochondria dissipated membrane potential; thus, respiratory chain activity is stimulated (state U respiration) to compensate membrane potential dissipation. In this way, it is possible to study the maximal activity of respiratory chain. On this basis, respiration in the

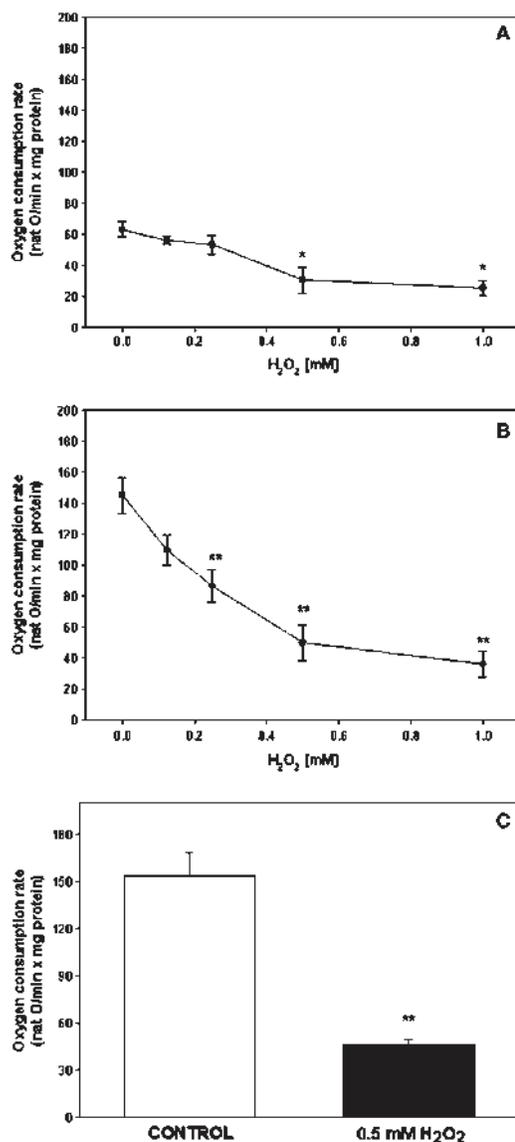


Figure 1. Effect of H₂O₂ on the rate of O₂ uptake in state 4 (A), state 3 (B) or uncoupled state (C). Mitochondria were incubated during 30 min at 4°C in respiration medium (0.6 M sucrose, 2 mM EGTA, 4 mM KH₂PO₄, 10 mM Tris-maleate), with indicated amounts of H₂O₂. After pre-incubation, oxygen uptake was measured as described in Materials and methods. Data are presented as mean ± SE of >3 independent experiments. Significantly different when compared to control (0 mM H₂O₂) (**p* < 0.05, ***p* < 0.01).

presence of FCCP was measured to discard that impairment on ATP synthesis was responsible for the inhibition observed in state 3 respiration. In Figure 1C it can be observed that 0.5 mM H₂O₂ inhibited respiration to a similar degree than observed in state 3 at the same concentration of H₂O₂ (65% and 69% in

state 3 and state U, respectively). This result and the partial inhibitory effect on respiration even to the highest concentration of H₂O₂ suggest that damage was exerted at the level of at least one of the respiratory complexes. As well, impairment in ATP synthesis probably is not participating in the observed effects.

Control experiments were carried out to eliminate the possibility that oxygen produced by spontaneous decomposition of H₂O₂ may produce an artificial inhibition on respiration. As Figure 2A shows, oxygen consumption was not detected when this parameter was evaluated in respiratory medium plus 1.0 mM H₂O₂ for 30 min at 4°C. Also, oxygen consumption was not detected in mitochondria treated in the same way and inhibited with 0.1 mM KCN (Figure 2B). Together, these results validate the inhibition on respiration induced by H₂O₂.

Even at the highest concentrations (1.0 mM), H₂O₂ addition resulted in only a partial inhibition, suggesting that electron flow through ETC was compromised at some point. To locate the site of inhibition, the activities of some partial reactions occurring during electron transport in ETC were measured. Succinate-DCIP oxidoreductase activity (complex II) was diminished by 23% and 30% with low (0.125 mM) and intermediate (0.250 mM) concentrations of H₂O₂ (Figure 3A), respectively. Higher quantities of H₂O₂ (0.5–1.0 mM) did not produce an expected inhibitory effect, reaching just 40–45%. A higher sensitivity to H₂O₂ challenge was detected in succinate-cytochrome *c* oxidoreductase activity

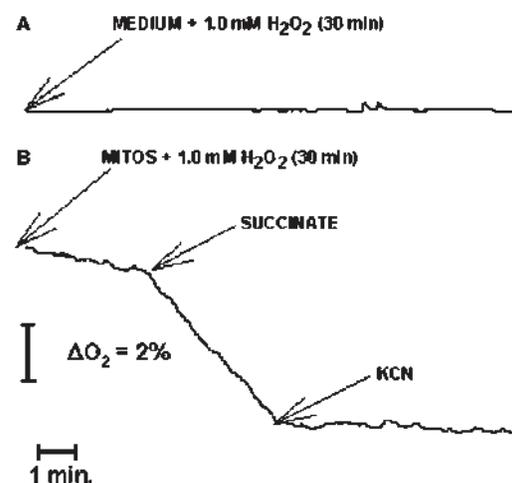


Figure 2. Influence of H₂O₂ decomposition on oxygen consumption determinations. Respiration medium (A) or respiration medium plus 0.9 mg mitochondria (B) were incubated during 30 min at 4°C with 1.0 mM H₂O₂. Then, oxygen production was evaluated with a Clark-type oxygen electrode as described in Materials and methods. (A). Experiment was repeated at least three times. Data are from a representative experiment.

6 C. Cortés-Rojo et al.

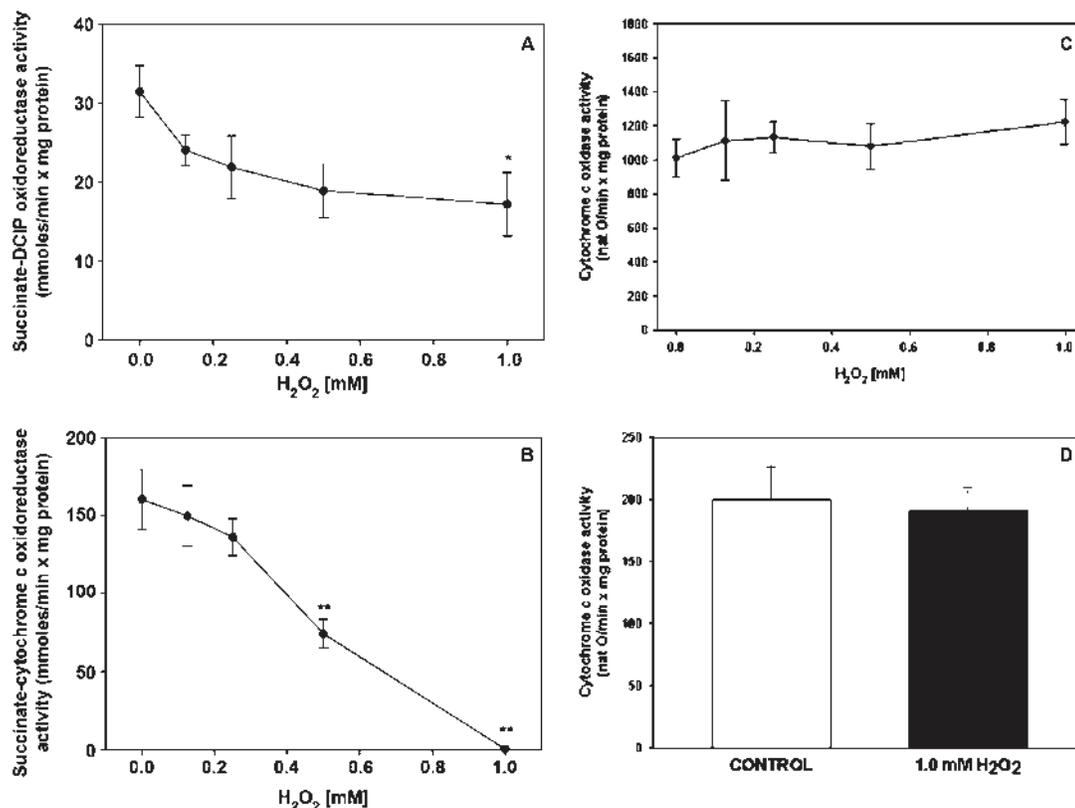


Figure 3. Effect of H_2O_2 on partial reactions of ETC. Triton-solubilized mitochondria were incubated during 30 min at $4^\circ C$ in 50 mM KH_2PO_4 buffer with indicated concentrations of H_2O_2 under conditions described in Materials and methods. Succinate-DCIP oxidoreductase (A), succinate-cytochrome *c* oxidoreductase (B), cytochrome oxidase (C) or cytochrome *c* oxidase (D) activities were measured as described in Materials and methods. Results are expressed as the mean \pm SE of >3 independent experiments. Significantly different when compared to control (0 mM H_2O_2) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

(complex II–III segment). In this case, a more clear correlation between concentration of H_2O_2 and activity was found; half of the activity was lost when mitochondria was incubated with 0.5 mM, while 1.0 mM H_2O_2 fully inhibited this activity (Figure 3B).

In contrast, cytochrome oxidase activity (complex IV) was completely insensitive to all concentrations of H_2O_2 tested (0.125–1.0 mM), whatever TMPD (Figure 3C) or cytochrome *c* (Figure 3D) were used as electron donor. It must be pointed out that both TMPD and cytochrome *c* bind to cytochrome *c* oxidase in distinct sites [37]. Taken together, these results indicate that inhibition of the ETC occurs mainly at the level of the succinate-cytochrome *c* oxidase segment of ETC (i.e. bc_1 complex).

The role of sulphhydryl oxidation in the deleterious effects exerted by H_2O_2 on ETC was investigated. After incubation with H_2O_2 , mitochondria were treated for 30 min with increasing concentrations of β -mercaptoethanol. Afterwards, remnant of β -mercaptoethanol and H_2O_2 were washed twice with fresh

medium to avoid the reduction of electron acceptors by β -mercaptoethanol. Also, this ensures that the effect exerted by β -mercaptoethanol can be attributed to thiol reduction and not to the H_2O_2 removal from the medium. Both succinate-DCIP oxidoreductase activity (Figure 4A) and succinate-cytochrome *c* oxidoreductase (Figure 4B) were nearly restored (89% and 95%, respectively) when concentration of β -mercaptoethanol was twice the concentration of H_2O_2 used (1.0 mM for succinate-DCIP oxidoreductase and 0.5 mM for succinate-cytochrome *c* oxidoreductase). It must be pointed out that treatment of control samples with maximal concentrations used of β -mercaptoethanol (2.0 mM for succinate-DCIP oxidoreductase activity and 1.0 mM for succinate-cytochrome *c* oxidoreductase) did not have an appreciable effect on control values of enzymatic activities (inset, Figure 4A and B). These results suggest that oxidation of thiol groups on proteins from respiratory complexes could be involved in the inhibitory effect of H_2O_2 .

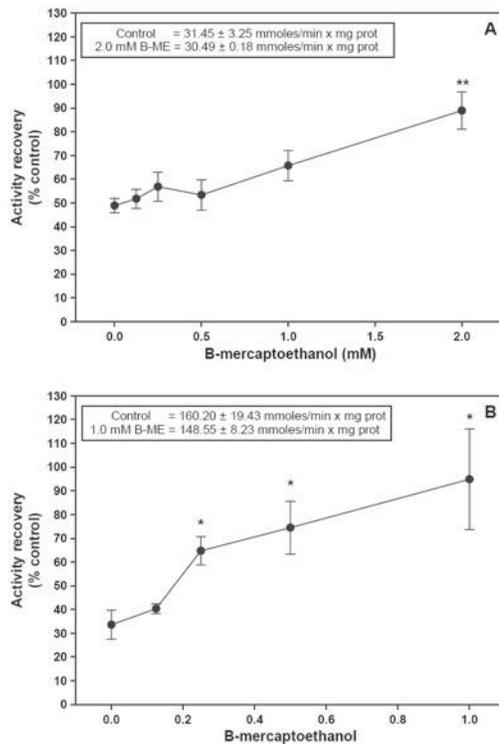


Figure 4. Effect of β -mercaptoethanol on the impairment induced by H_2O_2 on partial reactions of ETC. Mitochondria were incubated after H_2O_2 treatment with indicated concentrations of β -mercaptoethanol during 30 min at 4°C on 50 mM KH_2PO_4 buffer. Later, H_2O_2 and β -mercaptoethanol were removed twice by centrifugation and mitochondrial pellet re-suspended on fresh 50 mM KH_2PO_4 buffer. Concentrations of H_2O_2 used were: 1.0 mM H_2O_2 for succinate-DCIP oxidoreductase activity (A) and 0.5 mM H_2O_2 for succinate-cytochrome *c* oxidoreductase activity (B). Activities were measured as described in Materials and methods. Values from mitochondria incubated with 2.0 mM β -mercaptoethanol (inset, panel A) or 1.0 mM β -mercaptoethanol (inset, panel B) without H_2O_2 addition were taken as 100%. Results are expressed as the mean \pm SE of >3 independent experiments. Significantly different when compared to control (0 mM H_2O_2) (* p < 0.05, ** p < 0.01).

H_2O_2 can also mediate oxidative damage through iron release by degrading haem proteins and iron-sulphur clusters. Released iron reacts with H_2O_2 to produce the highly reactive hydroxyl radical (OH^\bullet), which in turn oxidizes lipids and proteins [19,38,39]. To further investigate about the nature of the damage induced by H_2O_2 on ETC, the protective effect of the iron chelator EDTA and the OH^\bullet scavenger mannitol was tested. The pre-incubation during 15 min with either 10 mM mannitol or 50 μ M EDTA previous to treatment with H_2O_2 did not protect both succinate-DCIP oxidoreductase activity (Figure 5A) and succinate-cytochrome *c* oxidoreductase (Figure 5B) from the inhibitory effect of H_2O_2 . Even an augment

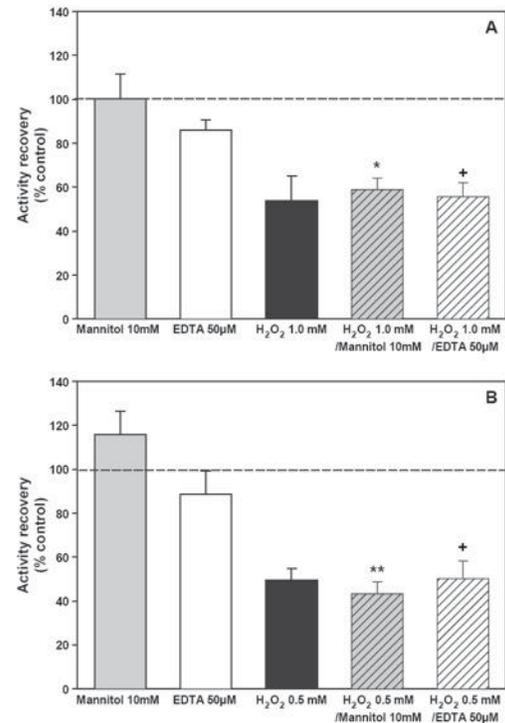


Figure 5. Effect of mannitol and EDTA on the impairment induced by H_2O_2 on partial reactions of ETC. Triton-solubilized mitochondria were incubated during 15 min on 50 mM KH_2PO_4 buffer at 4°C with 10 mM mannitol or 50 μ M EDTA previous to treatment during 30 min with 1.0 mM H_2O_2 for succinate-DCIP oxidoreductase activity (A) and 0.5 mM H_2O_2 for succinate-cytochrome *c* oxidoreductase activity (B). Activities were measured as described in Materials and methods. Values from incubated controls (mitochondria incubated during 45 min without EDTA, mannitol or H_2O_2 addition, data not shown) were taken as 100% (dotted line). Results are expressed as the mean \pm SE of >3 independent experiments. Significantly different when compared to 10 mM mannitol (* p < 0.05, ** p < 0.01) and 50 μ M EDTA (* p < 0.05).

of 10-fold in the concentration of mannitol (100 mM) did not exert protective effects (data not shown), while an augment of 2-fold (100 μ M) in EDTA concentration inhibit *per se* control activities (data not shown). Thus, this result supports the suggestion that thiol oxidation is the main factor responsible for ETC inhibition and discards the participation of OH^\bullet radical in the effects observed.

Next, to locate a putative site in the bc_1 complex where H_2O_2 exerted its effects, difference absorption spectra of cytochromes were recorded. Experiments were conducted in the presence of different quinone redox sites inhibitors of bc_1 complex. The amount of reducible cytochromes *c* (550 nm peak) using dithionite was similar in controls (6.8×10^{-4} mM) (Figure 6, solid line) and in mitochondria subjected to oxidative stress (7.0×10^{-4} mM) (Figure 6, dotted

8 C. Cortés-Rojo et al.

line). In addition, the content of cytochrome *b* (562 nm peak) was 3.1×10^{-4} mM in the control and 3.4×10^{-4} mM in treated mitochondria. These results suggest that the oxidative stress induced by H_2O_2 exposure did not cause the release of cytochromes from the bc_1 complex.

Antimycin A is a bc_1 complex inhibitor that prevents re-oxidation of cytochromes *b* at Q_1 site, which is reflected as a decrease from 2:1 (Figure 7A, continuous lines) to $\sim 1.5:1$ (Figure 7A, dotted lines) in the absorbance ratio of the reduced cytochromes *c* vs *b*. This was observed both in control mitochondria and in H_2O_2 -treated mitochondria in the presence of succinate as electron donor. Thus, H_2O_2 did not change the effect of antimycin A on bc_1 complex.

Myxothiazol is a bc_1 complex inhibitor that prevents ubiquinol oxidation at the proximal position of Q_O site. The effect of myxothiazol is reflected as a decrease from 2:1 to $\sim 0.8:1$ in the absorbance ratio of reduced cytochromes *c* vs *b* (Figure 7B, continuous line). In contrast to antimycin A, H_2O_2 modified the effects of myxothiazol, inducing a full resistance to inhibition and allowing observing a ratio of 2:1 of reduced cytochromes *c* to reduced cytochromes *b* (Figure 7B, dotted line).

In order to further explore the effect of H_2O_2 on the Q_O site of cytochrome bc_1 , another Q_O site inhibitor was tested. Stigmatellin is an inhibitor that completely abolishes electron transfer at the distal niche of Q_O site. This effect can be observed in difference absorption spectra as the disappearance of the absorption peak of cytochromes *c* at 550 nm

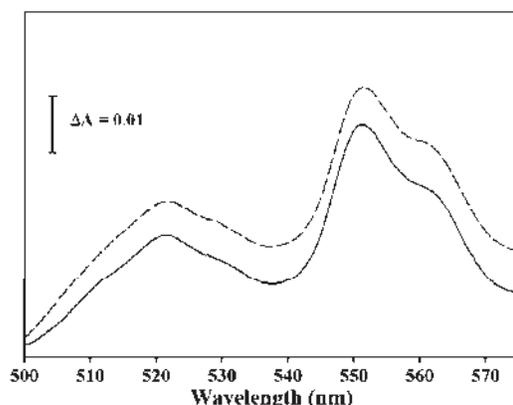


Figure 6. Effect of H_2O_2 on cytochromes levels of yeast mitochondria using dithionite as electron donor. Mitochondria were pre-incubated during 30 min on 50 mM KH_2PO_4 buffer at 4°C in the absence (solid line) or the presence of 0.5 mM H_2O_2 (dotted line). Later, H_2O_2 was removed twice by centrifugation and mitochondrial pellet re-suspended on fresh 50 mM KH_2PO_4 buffer. A small amount of dithionite was used as electron donor. Spectra recording was performed as described in Materials and methods. Experiments were repeated at least three times. Data are from a representative experiment.

(Figure 7C, continuous line). In contrast to myxothiazol, H_2O_2 did not modify the effect of stigmatellin (Figure 7C, dotted line). Taken together, these results suggest that oxidative stress induced by H_2O_2 exposure alters selectively the proximal niche of Q_O site at complex bc_1 . The effect on the Q_O site probably is the mechanism underlying the observed decrease in the rate of electron transfer at the level of the succinate cytochrome *c* oxidoreductase region of ETC.

In mammalian mitochondria subjected to oxidative stress, lipid peroxidation has been reported as the main factor affecting ETC function [11–14]. We evaluated lipid peroxidation to explore whether it could be involved in the harmful effects of H_2O_2 on yeast ETC. Lipid peroxidation in yeast mitochondria did not rise by treatment with H_2O_2 (Figure 8) but, instead, diminished TBARS formation in 0.27 nmoles (0.74 vs 0.47 nmoles TBARS/mg of protein in control vs treated mitochondria, respectively). To verify whether H_2O_2 was an appropriate inducer of mitochondrial lipid peroxidation, mitochondria from rat liver and brain were challenged with H_2O_2 in the same manner as yeast mitochondria. First, it was observed that basal levels of lipid peroxidation were higher in rat mitochondria than yeast mitochondria. Second, H_2O_2 stimulated TBARS level increased $\sim 72\%$ in liver mitochondria (1.26 vs 2.17 nmoles TBARS/mg of protein in control vs treated mitochondria, respectively) and 61% in brain mitochondria (2.26 vs 3.64 nmoles TBARS/mg of protein in control vs treated mitochondria, respectively). These results suggest that H_2O_2 is able to induce lipid peroxidation in isolated mitochondria and that such a process may not be involved in the deleterious effects of H_2O_2 on yeast mitochondrial ETC.

Discussion

The results obtained in this study describe the effects of oxidative stress generated by H_2O_2 on yeast ETC functionality. H_2O_2 has been considered the most important ROS at cellular level [18], whereas mitochondria are the major site of H_2O_2 generation due to the presence of Mn and CuZn-SOD isoforms [18], which convert superoxide to H_2O_2 byproduct of respiration. In addition, activation of NADPH oxidases on immune cells (e.g. macrophages) increase cellular levels of H_2O_2 [40], supporting the rationale of using this oxidant as an oxidative stress inducer.

H_2O_2 decreases oxygen consumption rate in all the respiratory states (Figure 1), even in the lowest concentration used (0.125 μM). This result can be interpreted as a consequence of selective damage on some segment of ETC, as was evidenced by the full lost in activity of succinate cytochrome *c* reductase

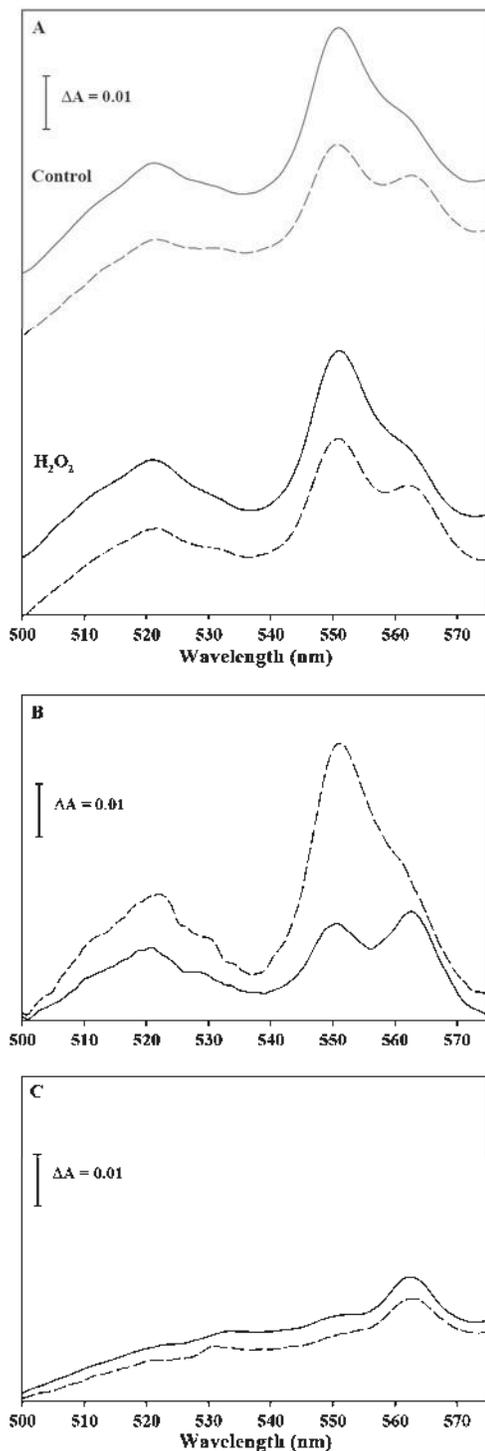


Figure 7

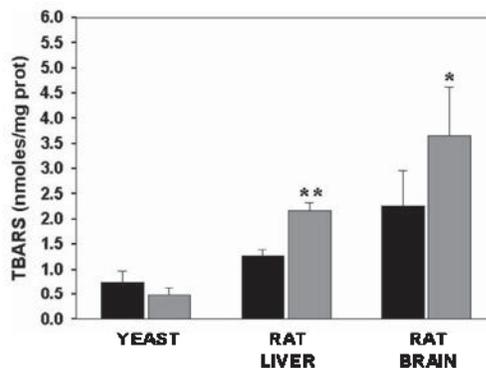


Figure 8. Effect of H₂O₂ on lipid peroxidation levels in yeast and rat mitochondria. Mitochondria were pre-incubated during 30 min on 50 mM KH₂PO₄ buffer at 4°C in the absence (black bars) or the presence (grey bars) of 0.5 mM H₂O₂. Measurements were made as described in Materials and methods. Data are presented as mean ± SE of three independent experiments. Significantly different when compared to yeast mitochondria treated with H₂O₂ (**p* < 0.05, ***p* < 0.01).

(Figure 2B). In agreement with this idea, it has been demonstrated that, due to their susceptibility of certain proteins of yeast, mitochondria undergo oxidative modifications by H₂O₂ exposure [41]. These modifications include methionine residues oxidation, irreversible -SH groups oxidation, carbonylation, protein cross-linking, etc. [42]. The inhibition observed in complex II-complex III segment could be due to one of those modifications: the recovery of the activity obtained with β-mercaptoethanol (Figure 4) and the null protective effect of mannitol and EDTA on enzymatic activities suggests that oxidation of -SH groups are the main event responsible for the inhibition. In addition, given the hydrophilic nature of β-mercaptoethanol, it is likely that the damage to succinate cytochrome *c* reductase was exerted in a hydrophilic region.

The resistance towards quinone redox sites inhibitors of bc₁ complex in native [43] and mutant organisms [44,45] has been used to identify these

Figure 7. Effect of H₂O₂ on difference absorption spectra of cytochromes from yeast mitochondria in the presence of bc₁ complex inhibitors. Mitochondria were pre-incubated during 30 min on 50 mM KH₂PO₄ buffer at 4°C in the absence or the presence of 0.5 mM H₂O₂. Later, H₂O₂ was removed twice by centrifugation and mitochondrial pellet re-suspended on fresh 50 mM KH₂PO₄ buffer. Inhibitors were added 5 min before spectra recording and 10 mM succinate was used as electron donor. Spectra were performed as described in Materials and methods. (A) Spectra in absence (solid line) or the presence (dotted lines) of antimycin A, (B) spectra in the presence of myxothiazol in control (solid line) and treated (dotted line) mitochondria, (C) spectra in the presence of stigmatellin in control (solid line) and treated (dotted line) mitochondria. Experiments were repeated at least three times. Data are from a representative experiment.

sites, as well as to establish structure activity relationships. A similar approach was used to identify which redox site in bc_1 complex underwent alterations during oxidative stress. Stigmatellin is a Q_O site competitive inhibitor that fully avoids ubiquinol oxidation at the distal position [46]. H_2O_2 did not modify the effects of this inhibitor (Figure 7C), suggesting that stigmatellin binding occurred. However, the myxothiazol-resistant cytochrome c reduction, observed in the difference spectra (Figure 7B), reflected some kind of alteration caused by H_2O_2 on the proximal niche of Q_O site. The resistance towards myxothiazol could be explained by either (a) the myxothiazol binding site was modified and thus, inhibitor binding was not possible or (b) an increase in superoxide formation was promoted, leading to the non-catalytic reduction of cytochrome c . Muller et al. [46] demonstrated that interaction of myxothiazol with the proximal niche of Q_O site allows for partial ubiquinol oxidation, but prevents the transfer of a second electron from ubisemiquinone, allowing for its accumulation and the reduction of cytochrome c through superoxide formation. Likewise, it is possible that H_2O_2 modified the environment in the proximal niche, allowing ubisemiquinone escape and non-catalytic cytochrome c reduction. Therefore, Q-cycle would suffer a diminution in its efficiency, limiting partially electron flow towards cytochrome c oxidase in the succinate cytochrome c oxidoreductase segment of the respiratory chain, as reflected by the partial decline observed in respiratory rate even at the highest concentration of H_2O_2 used.

The idea of a direct interaction between H_2O_2 and proteins of the bc_1 complex is supported by the null effects obtained with H_2O_2 on yeast mitochondria lipid peroxidation (Figure 8). In bovine heart submitochondrial particles [11], rat synaptosomes [12] and rat heart mitochondria [13,14], mitochondrial lipid peroxidation has been identified as a key factor in ETC inhibition. In our hands, mitochondrial yeast lipid peroxidation did not increase due to oxidative stress while the same treatment promoted lipid peroxidation in rat liver and brain mitochondria. It is important to emphasize that conditions used in this work to induce oxidative stress were different from those used in the above reports. Even though H_2O_2 does not induce lipid peroxidation by itself, peroxides can induce this process through iron release by degrading hem proteins (e.g. cytochromes c and b) [19]. Iron reacts with H_2O_2 through Fenton's chemistry to produce the highly reactive hydroxyl radical (OH^*) [38]. The latter can initiate lipid peroxidation readily through hydrogen abstraction from double bonds of phospholipids unsaturated hydrophobic chains [39]. Consequently, it is possible that H_2O_2 could have promoted lipid peroxidation by this mechanism in rat mitochondria but not in yeast mitochondria.

In agreement with this argument, different absorption spectra revealed that treatment with H_2O_2 did not diminish the content of either cytochromes c or b , since its reduction in the presence of dithionite was similar to control experiment results (Figure 6), which means that iron was not released, at least from proteins containing this sort of cytochromes (e.g. bc_1 complex). Otherwise, cytochrome reduction would not have been possible.

The unsaturation degree of fatty acids from mitochondrial membranes has been positively correlated with their vulnerability to peroxidation [24]. Fatty acid content from membranes of yeast mitochondria grown on lactate consists mainly of the monounsaturated fatty acids, palmitoleic (C16:1) and oleic (C18:1) acids [27], whereas rat mitochondria membranes contain the highly unsaturated fatty acids, docosahexaenoic acid (22:6) and arachidonic acid (20:4) [23,24]. Thus, the lower double bond content in lipids from yeast mitochondria could increase their resistance against lipid peroxidation, which would explain, in part, the differences observed in this parameter between yeast and rat mitochondria.

A contributor to the resistance of yeast mitochondria against oxidative stress could be the Hsp60 molecular chaperone. Cabisco et al. [20] demonstrated that Hsp60 protects proteins containing Fe/S clusters from damage by H_2O_2 , avoiding in this manner the release of iron from these proteins and allowing greater cell viability than that observed in cells with low Hsp60 levels.

In summary, the results show a high resistance of yeast mitochondria against oxidative stress, as was suggested first by Machida et al. [47]. The study of complex bc_1 inhibition by oxidative stress in terms of the Q cycle dysfunction must also be considered and not only in function of lipid peroxidation and ubiquinone and cardiolipin loss as discussed above, the first could lead to a greater production of ROS. On the other hand, it would be interesting to evaluate whether the differences observed in lipid peroxidation propensity between mammalian and yeast mitochondria are involved in the dissimilarities observed in some important physiological processes where lipid peroxidation has been implicated (e.g. programmed cell death).

Acknowledgements

The authors appreciate the technical assistance of Norma Sánchez-Suárez (IFC-UNAM). This study was supported partially by grants from CONACYT (AS-M: 43705, 64277; SM-A: 64308) and CIC-UMSNH (2.16) and by the P01 AG 021830 (IB) from the NIH/NIA and P01 AI062885-01 (IB) from the NIAID.

References

- [1] Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Phys Rev* 1998;78:547-581.
- [2] Luo X, Pitkänen S, Kassovska-Bratinova S, Robinson BH, Lehotay DC. Excessive formation of hydroxyl radicals and aldehydic lipid peroxidation products in cultured skin fibroblasts from patients with complex I deficiency. *J Clin Invest* 1997;99:2877-2882.
- [3] Pitkänen S, Robinson BH. Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. *J Clin Invest* 1996;98:345-351.
- [4] Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi SI, Matsumura T, Kaneda Y, Yorck MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes H-P, Giardino J, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000;404:787-790.
- [5] Starkov AA, Chinopoulos C, Fiskum G. Mitochondrial calcium and oxidative stress as mediators of ischemic brain injury. *Cell Calcium* 2004;36:257-264.
- [6] Guo J, Lemire BD. The ubiquinone-binding site of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate-ubiquinone oxidoreductase is a source of superoxide. *J Biol Chem* 2003;278:47629-47635.
- [7] Lee YI, Hwang JM, Im JH, Lee YI, Kim NS, Kim DG, Yu DY, Moon HB, Park SK. Human hepatitis B virus-X protein alters mitochondrial function and physiology in human liver cells. *J Biol Chem* 2004;279:15460-15471.
- [8] Paradies G, Petrosillo G, Pistolesi M, Di Venosa N, Federici A, Ruggiero FM. Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin. *Circ Res* 2004;94:53-59.
- [9] Wei Y-H, Lu CY, Lee H-C, Pang C-Y, Ma Y-S. Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. *Ann NY Acad Sci* 1998;854:155-170.
- [10] Wei Y-H, Lu CY, Wei CY, Ma YS, Lee H-C. Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *Chin J Physiol* 2001;44:1-11.
- [11] Forsmark-Andréu P, Lee CP, Dallner G, Ernster L. Lipid peroxidation and changes in the ubiquinone content and the respiratory chain enzymes of submitochondrial particles. *Free Radic Biol Med* 1997;22:391-400.
- [12] Cardoso SM, Pereira C, Oliveira CR. Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1999;26:5-13.
- [13] Petrosillo G, Ruggiero FM, Di Venosa N, Paradies G. Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin. *FASEB J* 2003;17:714-716.
- [14] Paradies G, Petrosillo G, Pistolesi M, Ruggiero FM. Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene* 2002;286:135-141.
- [15] Giulivi C, Sarcansky M, Rosentfeld B, Boveris A. The photodynamic effect of rose bengal on proteins of the mitochondrial inner membrane. *Photochem. Photobiol* 1990;52:745-751.
- [16] Zhang Y, Marcillat O, Giulivi C, Ernster L, Davies KJA. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J Biol Chem* 2002;275:16330-16336.
- [17] Sen T, Sen N, Tripathi G, Chatterjee U, Chakrabarti S. Lipid peroxidation associated cardiolipin loss and membrane depolarization in rat brain mitochondria. *Neurochem Int* 2006;49:20-27.
- [18] O'Brien KM, Dirmeyer R, Engle M, Poyton RO. Mitochondrial protein oxidation in yeast mutants lacking manganese- (MnSOD) or copper- and zinc-containing Superoxide Dismutase (CuZnSOD): evidence that MnSOD and CuZnSOD have both unique and overlapping functions in protecting mitochondrial proteins from oxidative damage. *J Biol Chem* 2004;279:51817-51827.
- [19] Paller MS, Jacob HS. Cytochrome P-450 mediates tissue-damaging OH[•] formation during reoxygenation of the kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7002-7006.
- [20] Cabisco E, Belli G, Tamarit J, Echave P, Herrero B, Ros J. Mitochondrial Hsp60, resistance to oxidative stress, and the labile iron pool are closely connected in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2002;277:44531-44538.
- [21] Pamplona R, Portero-Otin M, Ruiz C, Gredilla R, Herrero A, Barja G. Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mech Ageing Dev* 2000;112:169-183.
- [22] Pamplona R, Portero-Otin M, Riba D, Requena JR, Thorpe SR, Lopez-Torres M, Barja G. 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* 2000;55:286-291.
- [23] Herrero A, Portero-Otin M, Bellmunt MJ, Pamplona R, Barja G. Effect of the degree of fatty acid unsaturation of rat heart mitochondria on their rates of H₂O₂ production and lipid and protein oxidative damage. *Exp Gerontol* 2004;39:725-733.
- [24] Pamplona R, Portero-Otin M, Requena JR, Thorpe SR, Herrero A, Barja G. A low degree of fatty acid unsaturation leads to lower lipid peroxidation and lipoxidation-derived protein modification in heart mitochondria of the longevous pigeon than in the short-lived rat. *Mech Ageing Dev* 1999;106:283-296.
- [25] Lutik MAH, Overkamp KM, Kötter P, de Vries S, van Dijken JP, Pronk JT. The *Saccharomyces cerevisiae* *NDE1* and *NDE2* genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *J Biol Chem* 1998;273:24529-24534.
- [26] de Vries S, Grivell JA. Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH:Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 1988;176:377-384.
- [27] Tuller G, Nemeo T, Hrasnik C, Daum G. Lipid composition of subcellular membranes of an FY 1679-derived haploid yeast wild-type strain grown on different carbon sources. *Yeast* 1999;15:1555-1564.
- [28] Avérier N, Fitton V, Bunoust O, Rigoulet M, Guérin B. Yeast mitochondrial metabolism: from *in vitro* to *in situ* quantitative study. *Mol Cell Biochem* 1998;184:67-79.
- [29] Guérin B, Labbe P, Somlo M. Preparation of yeast mitochondria (*Saccharomyces cerevisiae*) with good P/O and respiratory control ratios. *Methods Enzymol* 1979;55:149-159.
- [30] Sims NR. Rapid isolation of metabolically active mitochondria from rat brain and subregions using Percoll density gradient centrifugation. *J Neurochem* 1990;55:698-707.
- [31] Thakar JH, Hassan MN. Effects of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP), cyperquat (MPP+) and paraquat on isolated mitochondria from rat striatum cortex and liver. *Life Sci* 1988;43:143-149.
- [32] González-Hernández JC, Aguilera-Aguirre I, Pérez-Vázquez V, Ramírez J, Clemente-Guerrero M, Cortés-Rojó C, Saavedra-Molina A. Effect of D-amino acids on some mitochondrial functions in rat liver. *Amino Acids* 2003;24:163-169.
- [33] Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 1949;177:751-765.

12 C. Cortés-Rojo et al.

- [34] Uribe S, Ramírez J, Peña A. Effects of β -pinene on yeast membrane functions. *J Bact* 1985;161:1195-1200.
- [35] Hallberg EM, Shu Y, Hallberg RL. Loss of mitochondrial Hsp60 function: non equivalent effect on matrix-targeted and intermembrane targeted proteins. *Mol Cell Biol* 1993;13:3050-3057.
- [36] Roege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978;52:302-310.
- [37] Yoshida T, Fee JA. Studies on cytochrome c oxidase activity of the cytochrome *c1aa3* complex from *Thermus thermophilus*. *J Biol Chem* 1984;259:1031-1036.
- [38] Halliwell B, Gutteridge JMC. The chemistry of free radicals and related reactive species. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, editors. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press; 1999. p 36-104.
- [39] Barber DJW, Thomas JK. Reactions of radicals with lecithin bilayers. *Radiat Res* 1978;74:51-65.
- [40] Nathan C, Nogueira N, Juangbhanich C, Ellis J, Cohn Z. Activation of macrophages *in vivo* and *in vitro*. Correlation between hydrogen peroxide release and killing of *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med* 1979;149:1056-1068.
- [41] Costa VMV, Amorim MA, Quimranilha A, Moradas-Ferreira P. Hydrogen peroxide-induced carbonylation of key metabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the oxidative stress response regulators Yap1 and Skn7. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1507-1515.
- [42] Berlett BS, Stadman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997;272:20313-20316.
- [43] Esposito ME, Ghelli A, Butler G, Roberti M, Mustich A, Cantatore P. The cytochrome b of the sea urchin *Paracentrotus lividus* is naturally resistant to myxothiazol and mucidin. *FEBS Lett* 1990;263:245-247.
- [44] Thierbach G, Michaelis G. Mitochondrial and nuclear myxothiazol resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 1982;186:501-506.
- [45] Kessel JJ, Lange BB, Merbitz-Zahradnik T, Zwicker K, Hill P, Meunier B, Palsdottir H, Hunte C, Meshnick S, Trumppower BL. Molecular basis for atovaquone binding to the cytochrome bc1 complex. *J Biol Chem* 2003;278:31312-31318.
- [46] Muller F, Crofts AR, Kramer DM. Multiple Q-cycle bypass reactions at the Qo site of the cytochrome bc1 complex. *Biochemistry* 2002;41:7866-7874.
- [47] Machida K, Tanaka T, Fujita K-I, Taniguchi M. Farnesol-induced generation of reactive oxygen species via indirect inhibition of the mitochondrial electron transport chain in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bact* 1998;180:4460-4465.

4.1 RESULTADOS ADICIONALES

4.1.1. Efecto del H₂O₂ en los niveles de lipoperoxidación en mitocondrias con C18:3. Se midieron los niveles de lipoperoxidación en mitocondrias con ácido linolénico (+C18:3) tratadas con H₂O₂ con el objetivo de conocer si la insensibilidad a la lipoperoxidación con este oxidante observada anteriormente (Fig. 8, Capítulo 3), es debida al tipo de ácidos grasos que componen las membranas mitocondriales (Fig. 1, Capítulo 2). En la figura 1A se observaron aumentos significativos en los niveles de lipoperoxidación a 0.5 y 1 mM de H₂O₂, aunque este efecto fue de menor magnitud respecto a lo observado con Fe²⁺ (Fig. 1, Capítulo 2). Para descartar que el aumento observado en los niveles de lipoperoxidación fuera debido a una reacción inespecífica del TBA, las mitocondrias se incubaron durante 15 min. con 5 μM del agente antioxidante hidrox-tolueno butilado (BHT) previo a la incubación con 1.0 mM de H₂O₂. En la figura 1B se aprecia que el BHT protegió de los efectos del H₂O₂ y no alteró significativamente los niveles basales de este parámetro. Estos resultados indican que la insensibilidad a la lipoperoxidación observada en mitocondrias sin C18:3 (-C18:3) es debida a la composición nativa de ácidos grasos de la levadura y que el H₂O₂ puede estimular de manera moderada dicho proceso posiblemente mediante su interacción con un metal de transición para formar un oxidante mas fuerte.

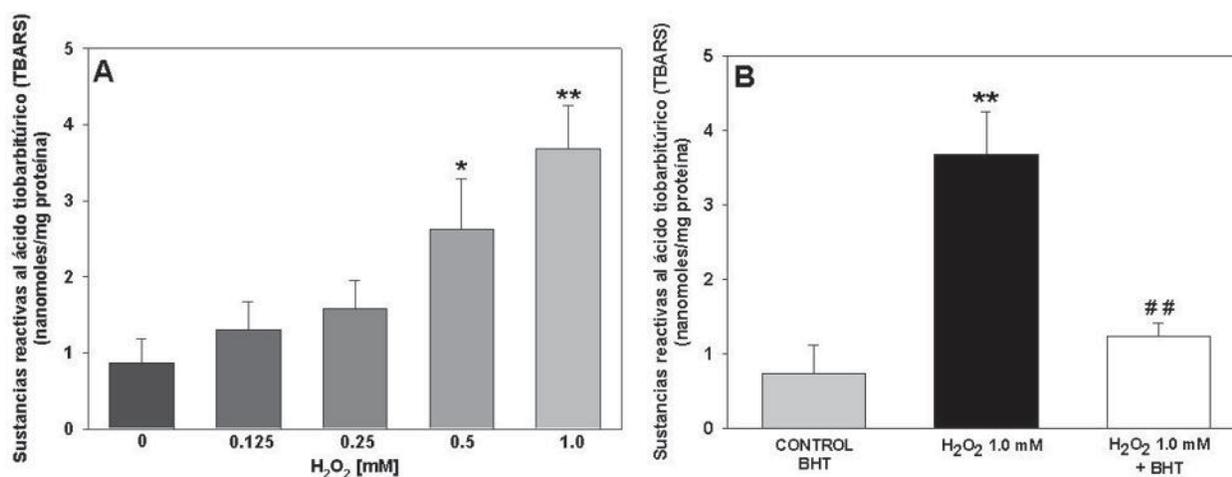


Figura 1. Efecto del H₂O₂ sobre los niveles de lipoperoxidación en mitocondrias +C18:3.

Panel A: las mitocondrias fueron incubadas durante 30 min. a 4°C con concentraciones crecientes de H₂O₂ previo a las determinaciones de lipoperoxidación. Panel B: Las mitocondrias fueron incubadas durante 15 min. con 5 μM de BHT previo a la incubación con H₂O₂. Los resultados fueron expresados como el promedio ± el error de estándar de n = 4-5. Panel A: *P<0.05 y **P<0.01 con respecto a 0 μM de H₂O₂. Panel B: **P<0.01 con respecto a control BHT y ##P<0.01 con respecto a H₂O₂ 1.0 mM+BHT.

4.1.2. Influencia de la incorporación del C18:3 sobre el efecto del H₂O₂ en la actividad de los complejos de la CTE.

Se evaluó el efecto del H₂O₂ sobre algunas reacciones parciales de la CTE de mitocondrias con +C18:3 y se compararon estos resultados con los obtenidos en mitocondrias -C18:3 (Fig. 3, Capítulo 3) para comprobar si la incorporación de +C18:3 a las membranas mitocondriales puede alterar la sensibilidad de los complejos de la CTE a los efectos del estrés oxidativo inducido por H₂O₂. En primer término, se evaluó en mitocondrias +C18:3 la actividad del complejo II medida como la actividad de la succinato:2,6-dicloro-fenil-indofenol oxidorreductasa (Materiales y métodos, Capítulo 3). En la figura 2A se observa una inhibición gradual en esta actividad dependiente de la concentración del oxidante, la cual fue independiente de la composición membranal de ácidos grasos, lo que sugiere que la lipoperoxidación no está involucrada en el mecanismo de inactivación de este complejo.

En contraste, en la figura 2B se muestra que la sensibilidad del complejo III, medida como la actividad succinato-citocromo *c* oxidorreductasa sensible a antimicina A (Materiales y métodos, Capítulo 3), es mayor en mitocondrias con C18:3 a concentraciones de 0.125 mM y 0.25 mM de H₂O₂, en tanto que a partir de 0.5 mM, la sensibilidad es la misma en ambos tipos de mitocondrias. Estos resultados sugieren que a las concentraciones más bajas de H₂O₂ utilizadas, la lipoperoxidación u otro factor asociado a este proceso (p. ej. el daño en los grupos prostéticos del complejo III), aumenta la sensibilidad de este complejo y que a concentraciones mayores, el factor determinante en la inhibición de esta actividad es la oxidación reversible de grupos -SH (Fig. 4B, Capítulo 3). En la figura 2C se observa que la actividad del complejo IV, medida como la actividad citocromo *c* oxidasa sensible a cianuro (Materiales y métodos, Capítulo 3), fue completamente resistente a la inhibición por H₂O₂ independientemente de la composición de ácidos grasos de la mitocondria.

En conjunto, los resultados anteriores sugieren que la incorporación de C18:3 a las membranas mitocondriales aumenta la sensibilidad de la CTE al estrés oxidativo por H₂O₂ a nivel del complejo III, lo cual podría estar asociado a un aumento moderado en los niveles de lipoperoxidación.

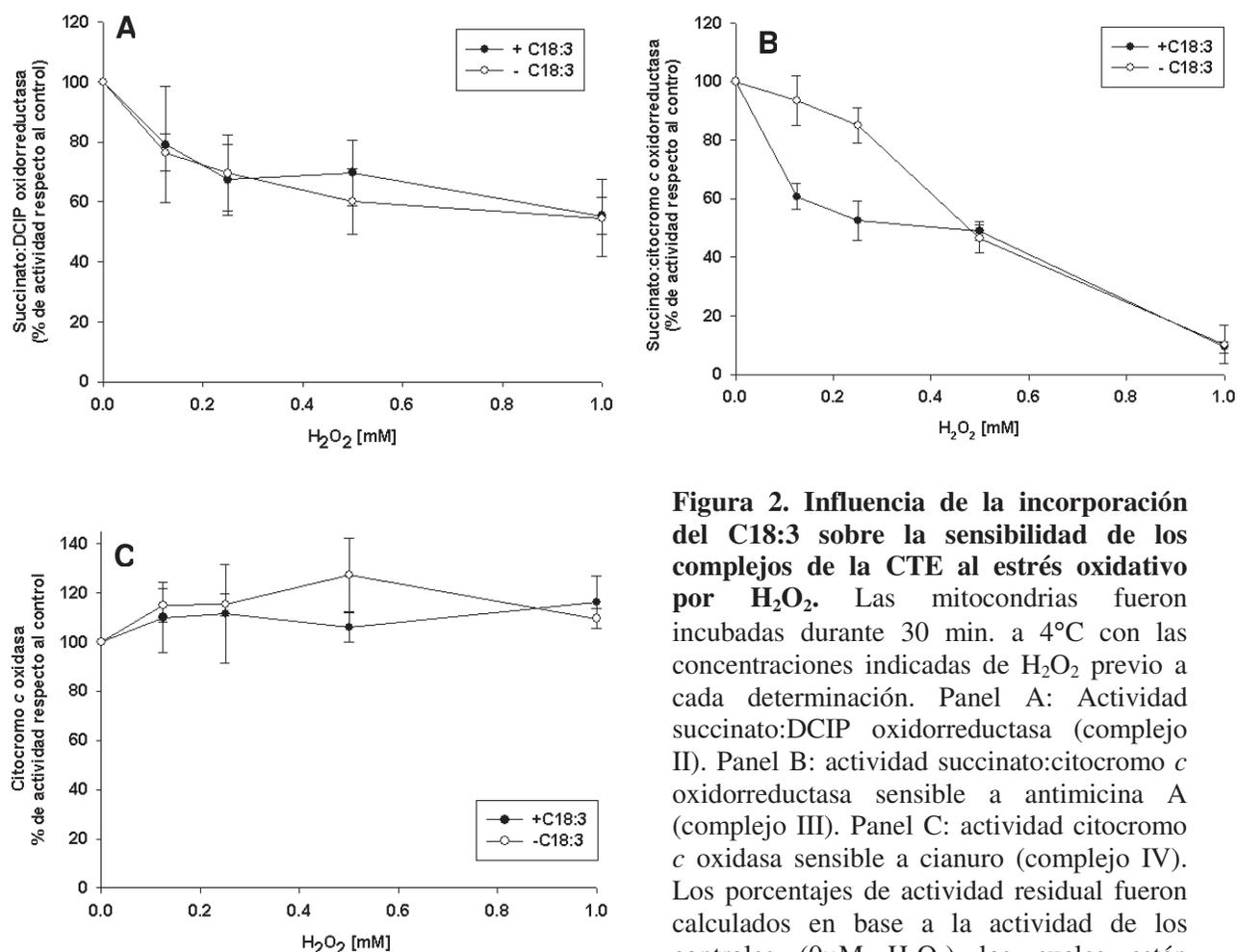


Figura 2. Influencia de la incorporación del C18:3 sobre la sensibilidad de los complejos de la CTE al estrés oxidativo por H₂O₂. Las mitocondrias fueron incubadas durante 30 min. a 4°C con las concentraciones indicadas de H₂O₂ previo a cada determinación. Panel A: Actividad succinato:DCIP oxidorreductasa (complejo II). Panel B: actividad succinato:citocromo *c* oxidorreductasa sensible a antimicina A (complejo III). Panel C: actividad citocromo *c* oxidasa sensible a cianuro (complejo IV). Los porcentajes de actividad residual fueron calculados en base a la actividad de los controles (0μM H₂O₂) los cuales están reportados en el pie de la Fig. 4 del Capítulo 2. Los resultados fueron expresados como el promedio ± el error de estándar de n > 4.

4.1.3. Efecto protector de agentes antioxidantes sobre la inhibición de la CTE por H₂O₂ y Fe²⁺.

Con el objetivo de dilucidar el papel de la lipoperoxidación y la oxidación de grupos –SH en la inhibición de los complejos de la CTE y ampliar la información obtenida en los capítulos 2 y 3, se evaluó el efecto protector del agente antilipoperoxidante BHT y del reductor de grupos –SH β-mercaptoetanol (BME) de la inhibición ejercida por el Fe²⁺ y el H₂O₂ en la actividad de los complejos II y III de la CTE. En adición, para tener un indicio acerca del efecto del estrés oxidativo sobre las proteínas de la CTE, se probó el efecto protector del manitol debido a su capacidad de proteger proteínas del daño oxidativo ejercido por radicales libres (Shen *et al.* 2007).

En la figura 3A se muestra el efecto protector de los antioxidantes sobre la inhibición de la actividad del complejo II por 1.0 mM de H₂O₂ en mitocondrias +C18:3, observándose que bajo esta condición, solamente el BME (2.0 mM) tuvo un efecto protector de hasta un 84%, lo que sugiere que la oxidación de grupos –SH es el principal factor que inhibe la actividad de este complejo y que la lipoperoxidación no participa en dicho efecto. Respecto a la inhibición ejercida por 50 µM de Fe²⁺, en la figura 3B se observa que solo el manitol (1.0 mM) protegió de manera parcial la actividad del complejo en mitocondrias –C18:3, mientras que ni el BHT (5 µM) (ver también la Fig. 5A del Capítulo 2) ni el BME ejercen un efecto protector, lo que corrobora la nula participación de la lipoperoxidación en la inhibición de este complejo y sugiere que el Fe podría dañar otro tipo de residuos de aminoácidos diferentes a la cisteína tales como el triptófano, la histidina o la tirosina, los cuales son los residuos de aminoácidos más sensibles al ataque por OH[•]. Asimismo, estos resultados concuerdan con la observación de que la lipoperoxidación no aumenta la sensibilidad de este complejo al estrés oxidativo (Fig. 4A, Capítulo 2 y Fig. 2A de este capítulo).

En la figura 4A se muestra el efecto de los antioxidantes en la inhibición ejercida por 0.5 mM de H₂O₂ en la actividad del complejo III. En este caso, se observó que únicamente el tratamiento con 1.0 mM de BME revirtió de manera muy discreta la inhibición de este complejo. Este resultado contrasta con la reversión de hasta un 90% obtenida en mitocondrias –C18:3 tratadas bajo las mismas condiciones (Fig. 4B, Capítulo 3), lo que sugiere que en mitocondrias +C18:3, el H₂O₂ inhibe la actividad de este complejo mediante un mecanismo adicional a la oxidación reversible de los grupos –SH. En el caso de la inhibición del complejo III por 50 µM de Fe²⁺, la actividad fue protegida en más de un 80% por el pretratamiento con manitol en mitocondrias –C18:3 (Fig. 4B), mientras que en mitocondrias +C18:3, únicamente el BHT mostró un efecto protector (Fig. 5B, Capítulo 2). Estos resultados sugieren que, cuando los lípidos no son peroxidados, el daño a los componentes proteicos del complejo por las ERO producidas por el Fe²⁺ es el principal factor que inhibe su actividad, mientras que en mitocondrias +C18:3, la lipoperoxidación es el principal factor que afecta dicha actividad. En adición, este último resultado concuerda con la idea de que la lipoperoxidación aumenta la sensibilidad del complejo III al estrés oxidativo (Fig. 4B, Capítulo 2 y Fig. 2B de este capítulo).

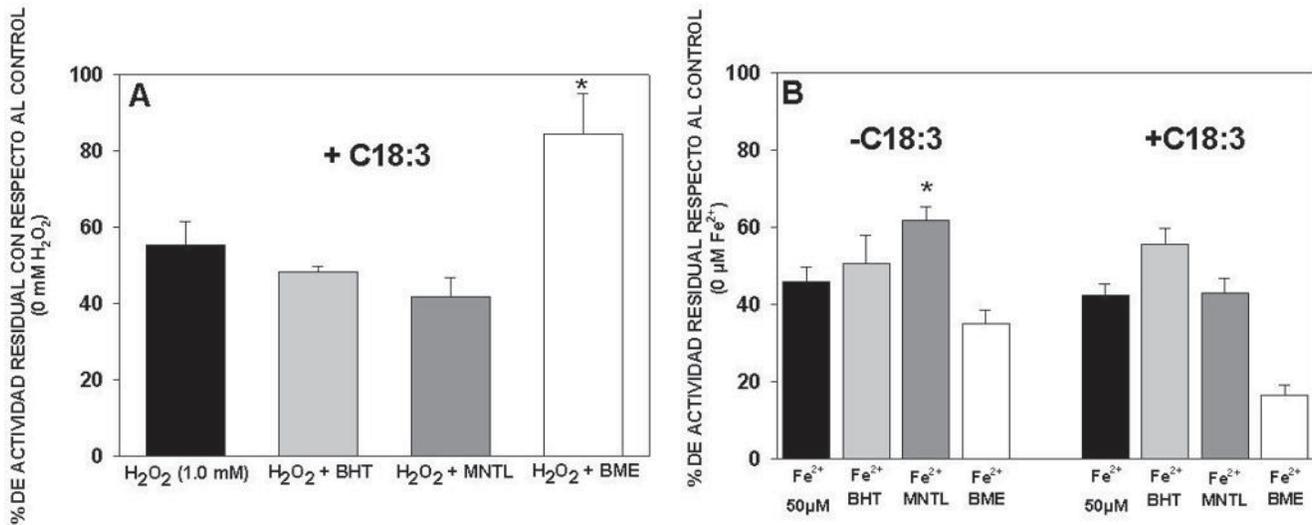


Figura 3. Efecto protector de algunos antioxidantes en la inhibición del complejo II. Las mitocondrias fueron preincubadas durante 15 min. a 4°C con los antioxidantes durante 15 min. previo al tratamiento durante 30 min. con 1.0 mM de H₂O₂ (*panel A*) o 50 μM de Fe²⁺ (*panel B*), excepto por el BME el cual fue agregado después de los oxidantes durante 15 min. para observar el efecto en la oxidación reversible de los grupos –SH. Los resultados fueron expresados como el promedio ± el error de estándar de n > 4. Panel A: *P<0.05 con respecto a 1.0 mM de H₂O₂. Panel B: *P<0.05 con respecto a 50 μM de Fe²⁺.

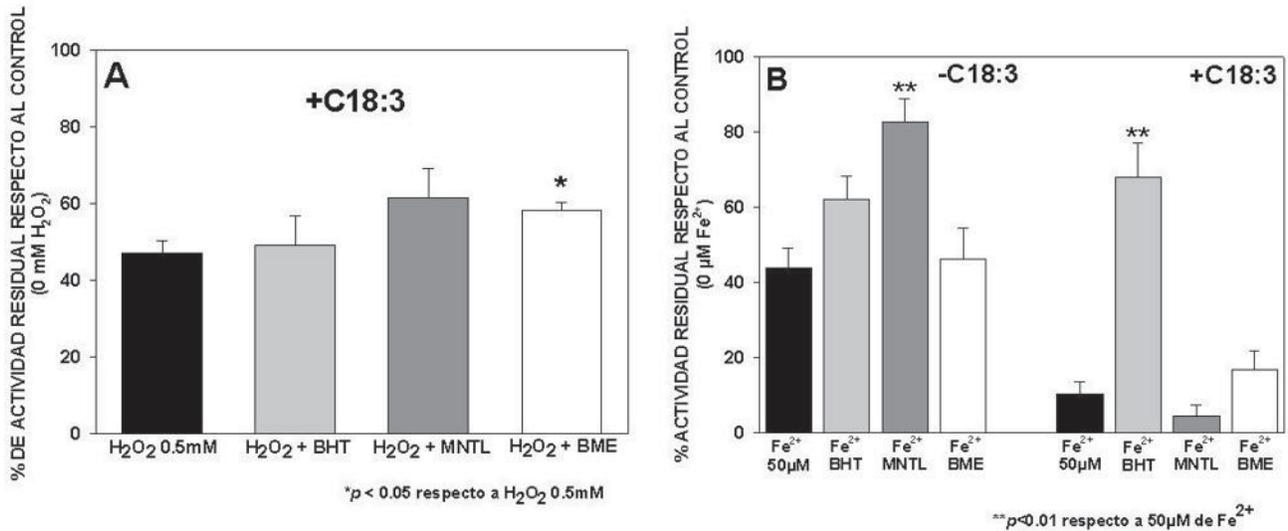


Figura 4. Efecto protector de algunos antioxidantes en la inhibición del complejo III. Las mitocondrias fueron preincubadas durante 15 min. a 4°C con los antioxidantes durante 15 min. previo al tratamiento durante 30 min con 0.5 mM de H₂O₂ (*panel A*) o 50 μM de Fe²⁺ (*panel B*), excepto por el BME el cual fue agregado después de los oxidantes durante 15 min. para observar el efecto en la oxidación reversible de los grupos –SH. Los resultados fueron expresados como el promedio ± el error de estándar de n > 4. Panel A: *P<0.05 con respecto a 0.5 mM de H₂O₂. Panel B: **P<0.01 con respecto a 50 μM de Fe²⁺.

4.1.4. Influencia de la incorporación de C18:3 sobre la producción de $O_2^{\bullet-}$ bajo condiciones de estrés oxidativo por H_2O_2 .

Se determinó el efecto de la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) sobre la reducción de citocromo *c* estimulada por succinato y sensible a estigmatelina como una manera de evaluar la formación de $O_2^{\bullet-}$ por el complejo III (Materiales y Métodos, Capítulo 2), debido a que el radical $O_2^{\bullet-}$ reduce al citocromo *c* oxidado y esta reacción puede ser inhibida por SOD (Boveris y Cadenas, 1975, Muller *et al.* 2002). En la figura 5 se muestra que 100 U/ml de MnSOD no afectaron la velocidad de reducción de citocromo *c* de mitocondrias – C18:3 tratadas con una concentración 1.0 mM de H_2O_2 , mientras que en mitocondrias +C18:3, la MnSOD inhibió este parámetro en un 81%. Estos datos indican que el daño oxidativo en el complejo III de mitocondrias +C18:3 induce un aumento en la formación de $O_2^{\bullet-}$, el cual podría estar relacionado con el aumento en los niveles de lipoperoxidación observado en la Fig. 1 de este capítulo.

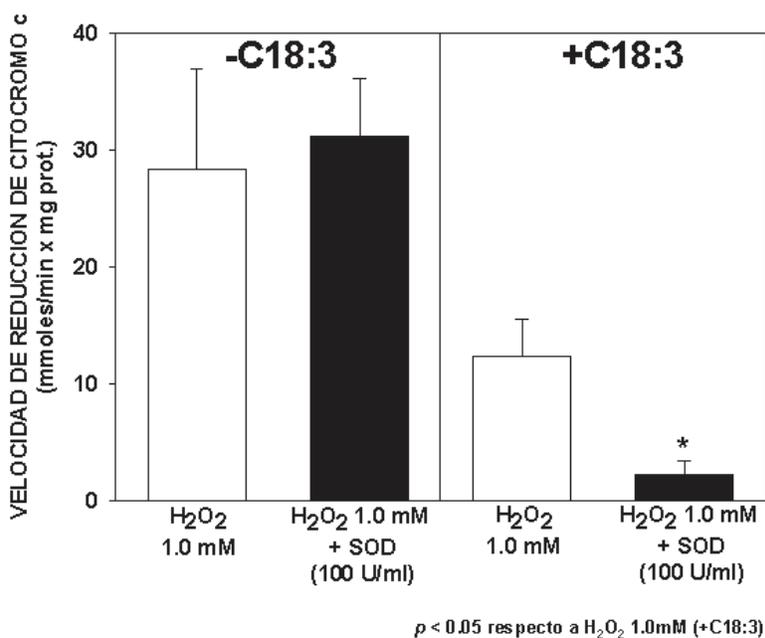


Figura 5. Efecto de la MnSOD sobre la velocidad de reducción de citocromo *c* estimulada por succinato en mitocondrias expuestas al H_2O_2 . Las mitocondrias fueron preincubadas durante 30 min. a 4°C con 1.0 mM de H_2O_2 . Posteriormente, las mitocondrias fueron incubadas durante 5 min. con 100 U/ml de MnSOD y la velocidad de reducción de citocromo *c* se determinó bajo las mismas condiciones utilizadas para la medición de la actividad succinato:citocromo *c* oxidorreductasa descritas en la sección de “Materiales y Métodos” del Capítulo 2. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm el error de estándar de $n > 3$.

4.1.5. Efecto del H₂O₂ y la lipoperoxidación sobre la disponibilidad mitocondrial de Fe en estado libre.

Se estimó la disponibilidad de Fe en estado libre de la mitocondria con el propósito de determinar si la lipoperoxidación observada en mitocondrias +C18:3 en presencia de 1.0 mM de H₂O₂ puede favorecer la liberación del Fe de las pozas mitocondriales mediada por dicho oxidante, La estimación del Fe libre mitocondrial se realizó mediante la prueba fluorescente aceto-metil-éster de calceína (calceína-AM), la cual puede permear las membranas mitocondriales y una vez dentro de la mitocondria, es hidrolizada a calceína libre. La calceína libre se une a los iones Fe²⁺ y Fe³⁺ con constantes de estabilidad de 10¹⁴ y 10²⁴ M⁻¹, respectivamente, resultando en el apagamiento de su fluorescencia (Breuer *et al.* 1995). El Fe unido a calceína puede ser detectado mediante la recuperación de su fluorescencia por el tratamiento con un quelante de Fe que provoque la disociación del complejo Fe-calceína.

En la figura 6 se muestran ejemplos representativos de los trazos de fluorescencia en mitocondrias -C18:3 (Panel A) y mitocondrias +C18:3 (Panel B) tratadas con H₂O₂ a razón de 1.0 mM H₂O₂ por cada 0.1 mg. proteína y cargadas previamente con 2 µM de calceína-AM. En mitocondrias -C18:3 se puede apreciar que la adición de 1 mM de EDTA indujo un aumento discreto en la fluorescencia basal (mitos) y que la adición posterior de otra cantidad similar del quelante no causó ningún efecto. En contraste, en mitocondrias +C18:3 se observa que la adición de EDTA produjo un aumento importante en la fluorescencia y la pendiente del trazo y una adición posterior causó solo un aumento moderado en la pendiente del trazo. Los efectos observados en el panel B pueden interpretarse como un comportamiento bifásico en la disociación del complejo Fe-calceína, donde el aumento instantáneo en la fluorescencia puede atribuirse a una fase rápida de disociación del complejo y el cambio posterior de pendiente como una fase lenta de dicha disociación.

En la figura 7 se muestra el promedio de los efectos producidos por el EDTA en la fluorescencia de la calceína bajo todas las condiciones experimentales utilizadas. En el panel A se puede observar que en mitocondrias -C18:3 ninguno de los tratamientos utilizados alteró en forma significativa los niveles de la fluorescencia basal, mientras que en mitocondrias +C18:3 tratadas con H₂O₂ la fluorescencia incrementó de manera importante; este efecto fue inhibido por el tratamiento con catalasa y BHT previo a la incubación con H₂O₂. En conjunto,

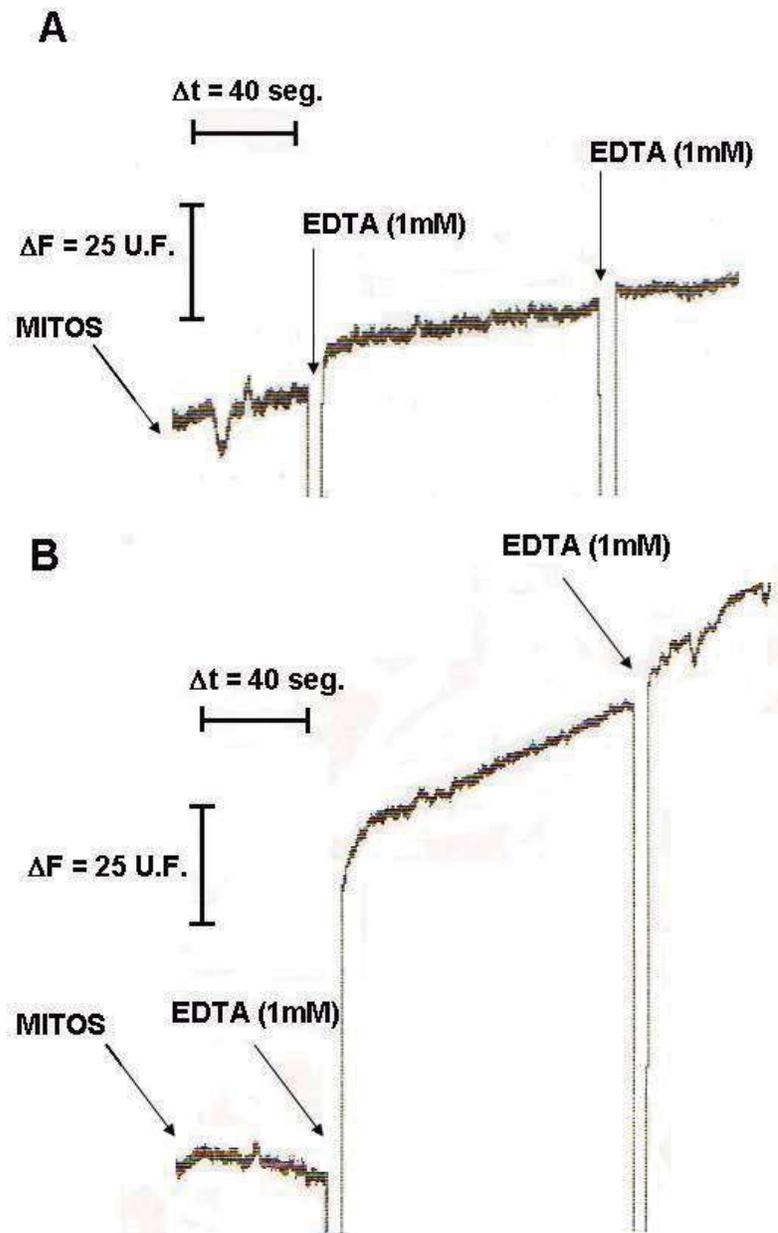


Figura 6. Efecto del EDTA en la fluorescencia de la calceína en mitocondrias tratadas con H_2O_2 . Las mitocondrias fueron incubadas durante 30 min. a $4^\circ C$ con 1.0 mM H_2O_2 /0.1 mg. proteína. Posteriormente, las mitocondrias fueron cargadas con $2 \mu M$ de calceína-AM. Previo al cargado con la prueba fluorescente, las mitocondrias fueron tratadas con 100 U/ml de catalasa para remover el H_2O_2 remanente en el medio y evitar la oxidación de la calceína. Los cambios en la fluorescencia fueron registrados en un espectrofluorómetro Shimadzu RF 5000U utilizando λ de excitación y de emisión de 494 nm y 517 nm, respectivamente. Panel A: mitocondrias -C18:3. Panel B: mitocondrias +C18:3. Los trazos son representativos de $n=3$.

estos datos sugieren que el estrés oxidativo inducido por el H_2O_2 produjo un aumento en los niveles de Fe libre mediante un proceso que es dependiente de la lipoperoxidación.

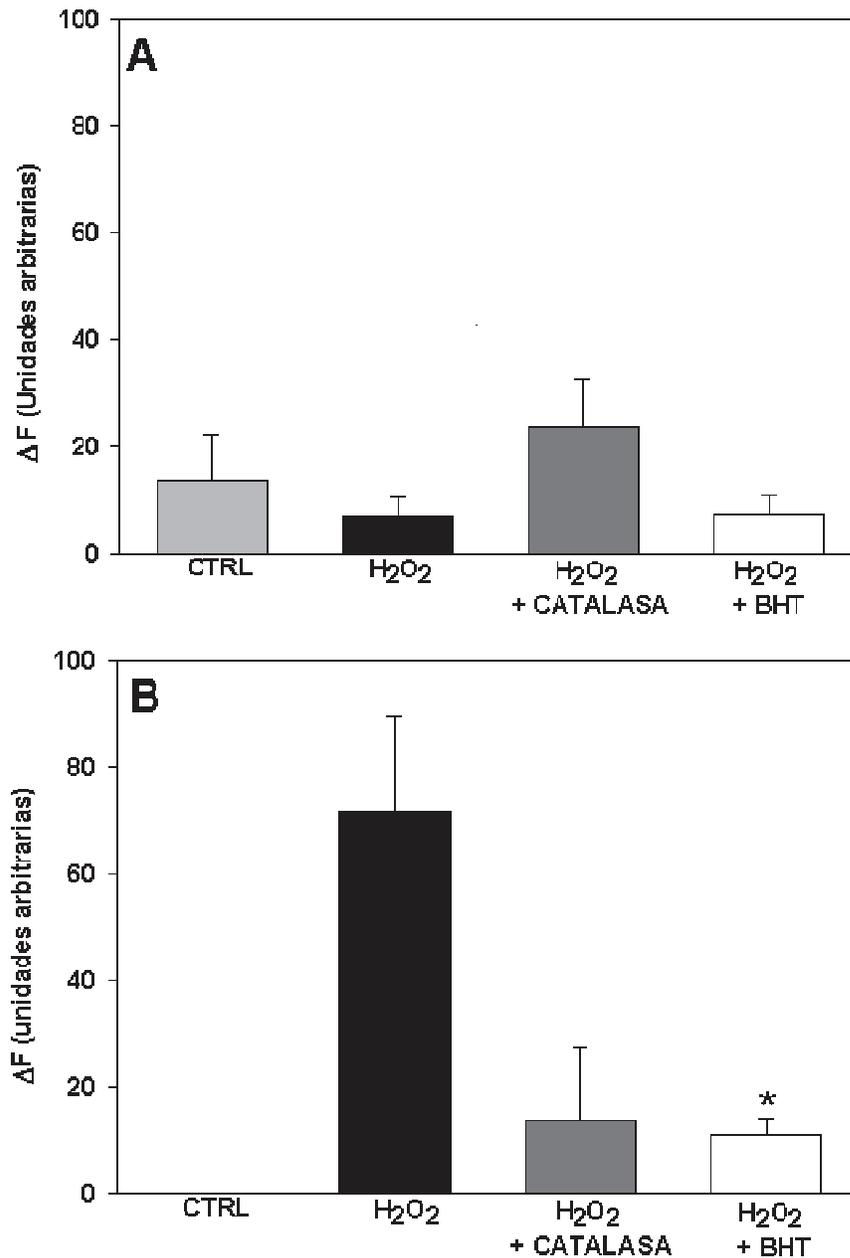


Figura 7. Influencia de la lipoperoxidación sobre la liberación de Fe en estado libre mediada por H_2O_2 .

Las mitocondrias fueron tratadas con H_2O_2 y cargadas con calceína-AM bajo las condiciones indicadas en la Fig. 5, excepto que, donde se indica, se hizo una incubación con 100 U/ml de catalasa o 5 μ M de BHT previo al tratamiento con H_2O_2 . Los cambios en la fluorescencia fueron registrados como se indica en la Fig. 5. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm el error de estándar de $n=3$. * $P<0.05$ con respecto a H_2O_2 (C18:3). Panel A: mitocondrias - C18:3. Panel B: mitocondrias +C18:3.

5.- DISCUSION

El estudio del impacto de la lipoperoxidación en los sistemas biológicos ha adquirido una alta relevancia ya que este proceso puede jugar un papel crucial iniciando y/o mediando algunos aspectos del proceso de envejecimiento y del desarrollo de una variedad de estados patológicos (Praticò 2002, Marnett 1999, Romero *et al.* 1998). Esto es debido a que los lípidos son uno de los principales componentes de los organismos vivientes y probablemente el principal blanco del ataque por radicales libres.

La mitocondria es una estructura particularmente rica en lípidos debido a su peculiar arreglo de doble membrana. En particular, la membrana interna es una estructura altamente compleja ya que se ha probado que las crestas de las mismas son en realidad cisternas con un diámetro aprox. de 30-40 nm con forma tubular o aplanada, las cuales están conectadas entre si y a la superficie periférica de la membrana interna mitocondrial mediante estructuras tubulares de aprox. 28 nm de diámetro, siendo la superficie de la membrana interna y las crestas una superficie continua. Además, existen sitios de contacto entre las membrana mitocondriales interna y externa a lo largo de la periferia de la mitocondria (Manella 1994; Frey y Manella 2000). De lo anterior, se puede inferir que las membranas ocupan una gran parte del volumen interno de la mitocondria. En la membrana interna se encuentra embebida la CTE, la cual ha sido considerada como uno de los principales sitios de generación de ERO de la célula (Chance *et al.* 1979; Beckman y Ames 1998), y por otro lado, la CTE es una fuente rica en metales de transición tales como el Fe o el Cu (González-Halphen y Vázquez-Acevedo 2002) los cuales en estado libre pueden estimular la formación de ERO. Por lo tanto, la conjugación de todos los factores mencionados con anterioridad hace de la membrana interna uno de los blancos celulares más importantes del estrés oxidativo.

En concordancia con lo anterior, algunos estudios han identificado a la peroxidación de los lípidos de membrana mitocondrial como el principal factor que determina el daño a la CTE. En específico, se ha identificado a la pérdida de ubiquinona y a la peroxidación de la cardiolipina como los principales eventos que afectan el transporte de electrones a través de la cadena (Forsmark-André *et al.* 1997; Petrosillo *et al.* 2003; Paradies *et al.* 2004). Sin embargo, el daño oxidativo a la membrana interna podría no limitarse únicamente a los efectos mencionados con anterioridad, ya que dicho daño podría también comprometer la funcionalidad de las proteínas embebidas en la membrana debido a que la estructura y función

de algunas proteínas parece depender de interacciones específicas entre ciertos dominios de las mismas y algunas moléculas de fosfolípidos (Shimomura 1984; Tsai y Palmer 1986; Lange *et al.* 2001) y por lo tanto, esto podría traducirse en el daño en la estructura y/o función de los centros redox de los complejos de la CTE (Reinheckel *et al.* 1995). Por otra parte, la sensibilidad de los lípidos a la peroxidación aumenta en una relación directamente proporcional al número de dobles enlaces en sus cadenas de ácidos grasos. Por lo tanto, es posible plantear que una menor susceptibilidad de las membranas mitocondriales a la lipoperoxidación, debido a una disminución en el grado de insaturación de los lípidos, podría disminuir la sensibilidad de la CTE a los efectos nocivos del estrés oxidativo al atenuar el daño sobre las interacciones de los fosfolípidos-proteínas mencionadas con anterioridad.

Con base en los argumentos anteriores, en el presente trabajo se decidió estudiar el efecto del estrés oxidativo inducido por dos de los agentes inductores del estrés oxidativo más importantes presentes en la mitocondria (H_2O_2 y Fe), sobre la funcionalidad de la CTE de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La elección de este microorganismo como modelo de estudio fue hecha por su peculiar composición de ácidos grasos de membrana, la cual la hace resistente a la lipoperoxidación y a que la misma puede ser manipulada fácilmente en condiciones de laboratorio. La resistencia de la levadura a la lipoperoxidación permite investigar si una menor susceptibilidad a este proceso puede disminuir la sensibilidad de la CTE al estrés oxidativo y brinda la posibilidad de discernir los efectos del estrés oxidativo sobre la CTE en los que la lipoperoxidación está involucrada de aquellos que se producen debido a la interacción entre las ERO y los componentes de la cadena de naturaleza no lipídica. La caracterización de tales efectos es relevante debido a la importancia de la CTE en la generación de la energía para realización del trabajo químico y mecánico de la célula y la participación de la disfunción mitocondrial relacionada con el estrés oxidativo en una amplia variedad de estados patológicos (Lucas y Szveda 1998; Guo y Lemire 2003; Green *et al.* 2004; Lee *et al.*, 2004; Sen *et al.* 2006). Asimismo, el uso de la levadura para investigar la producción de ERO de la mitocondria resulta ventajoso respecto a los modelos de mamíferos ya que este microorganismo carece de las principales enzimas involucradas en la formación de ERO tales como las NOX (Shatwell *et al.* 1996), la xantina oxidasa, la ciclooxigenasa (Brenner 2004) o las NOS (Castello *et al.* 2006). Por lo tanto, se puede considerar al complejo III como la principal fuente de ERO en la levadura.

En primer término, se manipuló el contenido de ácidos grasos de la levadura con el objetivo de aumentar la susceptibilidad de las membranas a la lipoperoxidación, lo cual se realizó a través de la adición del ácido graso triinsaturado ácido linolénico (C18:3) al medio de crecimiento. El ácido linolénico (C18:3) es un ácido graso esencial que no es sintetizado por los mamíferos ni por la levadura. Su incorporación en mamíferos se lleva a cabo principalmente a través de la ingesta de alimentos y aceites de origen vegetal (Brouwer *et al.* 2004). Este ácido graso es el precursor de los ácidos grasos de cadena más larga de la serie ω -3 tales como el ácido eicosapentanoico (C20:5n-3), el ácido docosahexanoico (C22:6n-3), o el ácido docosapentanoico (C22:5n-3), los cuales se sintetizan a partir del C18:3 mediante su elongación y desaturación por Δ 5 y Δ 6 desaturasas (Cho *et al.* 1999a, Cho *et al.* 1999b). Por lo tanto, la composición de ácidos grasos es mucho más heterogénea en mitocondrias y en células de mamíferos que en mitocondrias de levadura. Por ejemplo, en mitocondrias de músculo esquelético de ratón, la composición de los grupos acilo de los fosfolípidos de membranas consta de ácidos grasos de 14 hasta 22 átomos de carbono y con cero hasta seis insaturaciones (Faulks *et al.* 2006). Con respecto al C18:3, este ácido graso se encuentra presente en un bajo porcentaje tanto en mitocondrias de músculo esquelético de ratón (0.3%) (Faulks *et al.* 2006) como en el hígado de seis especies diferentes de mamíferos (0.1 - 2.6%) (Pamplona *et al.* 2000); este pequeño porcentaje es el reflejo tanto de su esencialidad como de su utilización en la síntesis de ácidos grasos de cadena mas larga. En contraste, ni este ácido graso ni sus productos de elongación y desaturación se encuentran presentes en las mitocondrias y las células de *S. cerevisiae*.

La adición de C18:3 produjo cambios dramáticos en la composición de ácidos grasos de la levadura, ya que el C18:3 (el cual no se detectó en esferoplastos ni mitocondrias nativos), se convirtió en el ácido graso mayoritario tanto en esferoplastos (Fig. 1B, Capítulo 1), como en la fracción mitocondrial (Fig. 1B, Capítulo 2). En contraste, los ácidos grasos monoinsaturados C16:1 y C18:1 se convirtieron en los constituyentes minoritarios en esferoplastos y mitocondrias enriquecidas con C18:3, mientras que en condiciones nativas, dichos ácidos grasos fueron el principal componente en ambos modelos analizados (Fig. 1A, Capítulos 1 y 2). En *S. cerevisiae*, los ácidos grasos monoinsaturados C16:1 y C18:1 son formados a partir de sus respectivos precursores saturados C16:0 y C18:0 por la desaturasa Ole1p (Bossie y Martin 1989). El importe desde el medio de cultivo de ácidos grasos

poliinsaturados de cadena larga (p. ej., el C18:3), reprime a nivel transcripcional y de estabilidad del ARNm la actividad de la desaturasa Ole1p y provoca el remplazo de las especies monoinsaturadas nativas con los ácidos grasos suplementados en el medio de cultivo (Martin *et al.* 2007). Por lo tanto, la disminución drástica en el porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados y el enriquecimiento con C18:3 puede interpretarse como el resultado en la represión de la actividad de Ole1p. Además, este resultado confirma la incorporación del C18:3 a las membranas de la levadura bajo las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo.

El enriquecimiento con C18:3 elevó de manera importante la sensibilidad de los esferoplastos y las mitocondrias a la lipoperoxidación inducida por Fe^{2+} , mientras que en ausencia de C18:3, la sensibilidad a la lipoperoxidación fue nula, incluso a la concentración más elevada de Fe^{2+} (Fig. 2, Capítulos 1 y 2), La resistencia a la lipoperoxidación está dada por la presencia exclusiva en las membranas de la levadura de ácidos grasos saturados y monoinsaturados (Panel A, Fig. 2 Capítulos 1 y 2), cuya característica es su resistencia a la lipoperoxidación (Holman 1954). El proceso de lipoperoxidación inicia por la extracción de un átomo de H de un carbono metilénico ($-CH_2-$), dando lugar a la formación de un radical lipídico en un carbono ($-CH^{\bullet}$ -), el cual tiende a ser estabilizado mediante un arreglo intramolecular para formar un radical dienilo conjugado ($-CH_2-CH^{\bullet}-CH=CH-CH=CH$) que sufre una rápida autooxidación por el O_2 del ambiente y que produce especies que pueden propagar la lipoperoxidación (Baynes 2006). Los ácidos grasos que contienen más de un doble enlace separado por un grupo metileno ($-CH=CH-CH_2-CH=CH-$, p.ej. el C18:3), se autooxidan rápidamente a temperatura ambiente a través de la formación de radicales dienilo conjugados, debido a que estos últimos son estabilizados por resonancia, mientras que los ácidos grasos monoinsaturados sufren autooxidación únicamente a temperaturas elevadas debido a la imposibilidad de formar radicales dienilo conjugados (Porter 1986). Lo anterior explica la resistencia de este tipo de ácido graso a la lipoperoxidación y por lo tanto, la resistencia a la lipoperoxidación observada en la levadura y el aumento en la sensibilidad a este proceso ocasionado por la incorporación de C18:3.

El tratamiento con H_2O_2 elevó también los niveles de lipoperoxidación en mitocondrias +C18:3 (Fig. 1A, Capítulo 4). Sin embargo, los niveles de lipoperoxidación fueron bajos si se los compara con lo obtenido en presencia de Fe^{2+} (Fig. 2, Capítulo 3). Esto puede ser explicado

en función de que el H_2O_2 no es un agente lipoperoxidante *per se*, sino que su efecto depende de la disponibilidad de Fe o Cu libre para la producción de una especie más oxidante (p. ej. radical OH^\bullet) que pueda iniciar el proceso lipoperoxidativo. Bajo las condiciones experimentales usadas, se comprobó que el H_2O_2 aumentó la disponibilidad de Fe libre en mitocondrias +C18:3 (Fig. 7, Capítulo 4), por lo que se puede asumir que la lipoperoxidación observada con H_2O_2 procedió a través de la interacción entre esta ERO y el Fe liberado de las pozas mitocondriales. Sin embargo, es probable que la concentración de Fe liberado por el H_2O_2 sea menor a la usada en los experimentos con Fe^{2+} . En relación con lo anterior, se ha descrito que bajo condiciones oxidantes inducidas con H_2O_2 , la proteína Hsp60 de mitocondrias de la levadura se asocia con proteínas mitocondriales que contienen centros Fe-S para evitar la liberación del Fe e impedir un daño oxidativo mayor (Cabisco *et al.* 2002). Lo anterior, por lo tanto, podría disminuir la disponibilidad de Fe libre en la mitocondria y contribuiría con los niveles menores de lipoperoxidación observados con H_2O_2 .

En relación a las concentraciones de Fe utilizadas en el presente trabajo y las concentraciones mitocondriales de Fe en mamíferos, se han encontrado concentraciones de Fe libre de alrededor de 1.5 μM en fibroblastos y linfoblastos de pacientes con ataxia de Friedreich (enfermedad caracterizada por la baja expresión de la proteína frataxina, la cual está involucrada en la homeostasis mitocondrial de hierro) (Sturm, 2005). Sin embargo, la concentración de Fe libre puede variar en los diferentes tejidos y depender de la especie en estudio e incluso puede ser mayor bajo condiciones normales. Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo en mitocondrias de hígado de rata, se encontró que la concentración de hierro libre es de 16 μM (Rauen, 2007). Por lo tanto, se puede inferir que la concentración de hierro libre alcanzada en los experimentos de esta tesis podría no estar tan alejada de las concentraciones mencionadas anteriormente si se toma en cuenta que una parte del hierro total que se adicionó (la cual se encuentra en el rango μM) se puede acomplejar con distintas moléculas de bajo peso molecular presentes en la mitocondria (p. ej, los nucleótidos de adenina) y que además una parte del hierro adicionado puede ser secuestrado por las proteínas involucradas tanto en su almacenamiento (p. ej, la frataxina de levadura) como en la síntesis de los centros Fe-S y los grupos hemo.

Por otro lado, la incorporación del C18:3 aumentó la sensibilidad de la CTE al estrés oxidativo en esferoplastos tratados con Fe^{2+} (Fig. 3, Capítulo 1) y un efecto similar ha sido

encontrado en esferoplastos +C18:3 tratados con H₂O₂ (Corona 2007). En el caso del tratamiento con Fe²⁺, dicho efecto fue el resultado de un aumento en la sensibilidad de los complejos III y IV al estrés oxidativo (Fig 4, paneles b y c. Capítulo 2 y Tablas II y III), el cual fue atribuido a una elevación en los niveles de lipoperoxidación, ya que el agente antilipoperoxidante BHT fue el único antioxidante capaz de proteger las actividades de dichos complejos de los efectos del Fe²⁺ (Fig. 5, paneles b y c. Capítulo 2 y Tablas II y III). Este resultado concuerda con el requerimiento del fosfolípido cardiolipina para el adecuado funcionamiento de estos complejos (Chicco y Sparagna 2007). En contraste, la inhibición en la actividad del complejo II fue de la misma magnitud tanto en mitocondrias –C18:3 y mitocondrias +C18:3 (Fig. 4a, Capítulo 2 y Tabla I). Este resultado y el efecto protector nulo del BHT (Fig. 5a, Capítulo 2 y Tabla I) indican que la lipoperoxidación no participa en el mecanismo de inhibición de este complejo. En concordancia con estos hallazgos, se ha reportado que la inhibición del complejo II bajo condiciones lipoperoxidantes no puede ser prevenida por antioxidantes de naturaleza lipofílica tales como la vitamina E o la idebenona (Cardoso *et al.* 1999). En adición, no existen evidencias hasta el momento acerca de un requerimiento de fosfolípidos por parte del complejo II para su funcionamiento (Chicco y Sparagna 2007).

Por otro lado, se puede proponer que las ERO producidas por el tratamiento con Fe²⁺ atacan residuos de aminoácidos importantes para la actividad de los complejos II y III ya que el tratamiento con manitol protegió parcialmente la actividad de dichos complejos en mitocondrias –C18:3 (Figs. 3B y 4B, Capítulo 4 y Tablas I y II). Bajo estas condiciones, el BME no fue capaz de revertir la inhibición en la actividad de dichos complejos (Figs. 3B y 4B, Capítulo 4 y Tablas I y II). Esto puede indicar que la oxidación de otro(s) aminoácido(s) diferente(s) a la cisteína e involucrado(s) en la actividad catalítica de estos complejos fue responsable de su inhibición. Otra posibilidad es que el estrés oxidativo inducido por Fe²⁺ provoque la oxidación irreversible de los grupos –SH que participan en la actividad catalítica de estos complejos (Lê-Quôc *et al.* 1981, Fig. 4, Capítulo 3 y Tablas I y II). Lo anterior puede suceder en condiciones fuertemente oxidantes a través de la oxidación consecutiva del –SH de la cisteína (R-SH) hasta el correspondiente ácido sulfínico (R-SOOH), el cual no puede ser convertido nuevamente a la forma reducida aún a concentraciones altas de agentes reductores de grupos –SH (Brocklehurst *et al.* 1987). En adición, se ha sugerido que la oxidación de

grupos –SH está involucrada en la inhibición de los complejos II y III por el estrés oxidativo, ya que la incubación con glutatión reducido puede prevenir dicho efecto (Cardoso *et al.* 1999). En vista de estos razonamientos, es factible proponer que el aumento en la sensibilidad del complejo III observada en mitocondrias +C18:3 en presencia de Fe²⁺ fue debido a la acumulación de los efectos inhibitorios tanto de la lipoperoxidación como de la oxidación de residuos de aminoácidos necesarios para su actividad y esto concuerda con el efecto protector parcial observado en presencia de BHT (Fig. 5B, Capítulo 2 y Tabla II). Este argumento podría ser comprobado en un subsecuente estudio mediante la combinación de agentes antioxidantes que contengan propiedades protectoras en blancos diferentes (p. ej. el uso simultáneo de manitol y BHT) o la incubación con BME previa al tratamiento con Fe²⁺. Otro posible factor que podría participar en el aumento de la sensibilidad del complejo III al H₂O₂, es la pérdida de Fe de los centros redox del complejo, la cual se manifestaría como un aumento en la disponibilidad de Fe en forma libre (Figs. 6 y 7, Capítulo 4).

Tabla I

Efecto de algunos antioxidantes sobre la inhibición de la actividad del complejo II inducida por Fe²⁺ o H₂O₂

Tratamientos	-C18:3	+C18.3
Fe ²⁺ 50 µM	46.0 ± 3.62	42.3 ± 3.1
Fe ²⁺ 50 µM + BHT	50.7 ± 7.2	55.7 ± 4.0
Fe ²⁺ 50 µM + MNTL	61.8 ± 3.6*	43.1 ± 3.8
Fe ²⁺ 50 µM + BME	34.9 ± 3.6	16.4 ± 2.7
H ₂ O ₂ 1.0 mM	54.6 ± 12.8	55.4 ± 6.3
H ₂ O ₂ 1.0 mM + BME	89.1 ± 2.4**	84.6 ± 10.4**
H ₂ O ₂ 1.0 mM + EDTA	55.6 ± 6.43	ND
H ₂ O ₂ 1.0 mM + MNTL	58.7 ± 5.2	41.8 ± 4.9
H ₂ O ₂ 1.0 mM + BHT	ND	48.3 ± 1.6

Los valores corresponden al porcentaje de actividad residual respecto al control y están expresados como el promedio ± el error estándar de al menos 3 repeticiones. *P<0.05 respecto a Fe²⁺ 50 µM. **P<0.01 respecto a H₂O₂ 1.0 mM ND: actividad no determinada. BHT: hidroxitolueno butilado. MNTL: manitol. BME: β-mercaptoetanol.

Tabla II

Efecto de algunos antioxidantes sobre la inhibición de la actividad del complejo III inducida por Fe²⁺ o H₂O₂

Tratamientos	-C18:3	+C18.3
Fe ²⁺ 50 μM	43.8 ± 5.4	10.3 ± 3.3
Fe ²⁺ 50 μM + BHT	62.2 ± 6.0	67.9 ± 9.1**
Fe ²⁺ 50 μM + MNTL	82.6 ± 6.3**	4.6 ± 2.9
Fe ²⁺ 50 μM + BME	46.4 ± 7.9	16.7 ± 5.0
H ₂ O ₂ 0.5 mM	46.4 ± 4.7	48.9 ± 3.2
H ₂ O ₂ 0.5 mM + BME	95.7 ± 3.3 ⁺⁺	58.2 ± 2.2*
H ₂ O ₂ 0.5 mM + EDTA	50.2 ± 8.1	ND
H ₂ O ₂ 0.5 mM + MNTL	43.3 ± 5.4	61.5 ± 7.8
H ₂ O ₂ 0.5 mM + BHT	ND	49.3 ± 7.5

Los valores corresponden al porcentaje de actividad residual respecto al control y están expresados como el promedio ± el error estándar de al menos 3 repeticiones. **P*<0.05 respecto a H₂O₂ 0.5 mM. ⁺⁺*P*<0.01 respecto a H₂O₂ 0.5 mM ^{**}*P*<0.01 respecto a Fe²⁺ 50μM. ND: actividad no determinada. BHT: hidroxitolueno butilado. MNTL: manitol. BME: β-mercaptoetanol.

Tabla III

Efecto de algunos antioxidantes sobre la inhibición de la actividad del complejo IV inducida por Fe²⁺ o H₂O₂

Tratamientos	-C18:3	+C18.3
Fe ²⁺ 100 μM	76.6 ± 5	40.5 ± 4.3
Fe ²⁺ 100 μM + BHT	69.5 ± 4.4	108.5 ± 8.3**
H ₂ O ₂ 1.0 mM	109.5 ± 4.1	116.3 ± 10.7

Los valores corresponden al porcentaje de actividad residual respecto al control y están expresados como el promedio ± el error estándar de al menos 3 repeticiones. ^{**}*P*<0.01 respecto a Fe²⁺ 100 μM a H₂O₂ 1.0 mM. BHT: hidroxitolueno butilado. MNTL: manitol. BME: β-mercaptoetanol.

Los altos niveles de lipoperoxidación logrados con Fe no alteraron la concentración de citocromos (Fig. 7, Capítulo 2), lo que significa que el Fe contenido en los grupos hemo no fue liberado por este proceso. Sin embargo, otra posibilidad es que el Fe libre provenga del centro Fe-S de la ISP, ya que se ha demostrado en otras proteínas una alta susceptibilidad de estos centros al ataque por H₂O₂ (Tretter y Adam-Vizi 2000; Lee 1999).

En el caso de los efectos producidos por el H₂O₂ en la CTE, se encontró que la sensibilidad a este oxidante aumentó en mitocondrias +C18:3 únicamente en el complejo III a las concentraciones más bajas de H₂O₂ utilizadas, lo cual se debe a que concentraciones más altas de este oxidante inhiben casi totalmente esta actividad también en mitocondrias -C18:3 (Fig. 2, Capítulo 4 y Tabla II). Respecto a lo anterior, se encontró que la protección obtenida mediante el tratamiento con BME fue sensiblemente menor en mitocondrias +C18:3 (Fig. 4A, Capítulo 4 y Tabla II) que la observada en mitocondrias -C18:3 (Fig. 4B, Capítulo 3 y Tabla II), lo que sugiere que en ausencia de lipoperoxidación, la inhibición de este complejo con H₂O₂ procede a través de la oxidación de grupos -SH necesarios para su actividad, en tanto que bajo condiciones de lipoperoxidación moderada observadas con H₂O₂, la inhibición de este complejo procede a través de un mecanismo adicional a la oxidación de grupos -SH y que podría estar relacionado con la alteración de alguno de los grupos prostéticos inducida por la lipoperoxidación. Asimismo, es factible proponer que dicha alteración podría haberse llevado a cabo a nivel del centro Fe-S de la ISP o de los hemos de los citocromos que constituyen al complejo de un modo tal que propiciaría la liberación del Fe de estos grupos prostéticos y que correspondería con los niveles mayores de Fe libre observados en mitocondrias +C18:3 (Figs. 6 y 7, Capítulo 4). Consecuentemente, el Fe liberado sería responsable de la estimulación de la lipoperoxidación observada en la Fig. 1 del Capítulo 4, creando un círculo vicioso de lipoperoxidación-daño oxidativo a los complejos respiratorios-liberación de Fe-estimulación de la lipoperoxidación.

Respecto a la inhibición del complejo II por H₂O₂, se observó que la sensibilidad a este oxidante fue la misma tanto en mitocondrias -C18:3 como en mitocondrias +C18:3 (Fig. 2A, Capítulo 4 y Tabla I), lo que apoya la conclusión mencionada con anterioridad acerca de la nula participación de la lipoperoxidación en la inhibición de este complejo. En el caso del efecto protector por los diferentes antioxidantes probados, se encontró que el BME revierte la inhibición en la actividad de este complejo a un nivel similar en mitocondrias -C18:3 y en

mitocondrias +C18:3 (Fig. 4A, Capítulo 3; Fig. 3A, Capítulo 4 y Tabla I)), mientras que los demás antioxidantes no presentaron efecto alguno (Fig. 5A, Capítulo 3, Fig. 3A, Capítulo 4 y Tabla I). Estos resultados sugieren que la inhibición de este complejo por H₂O₂ procede a través de la oxidación reversible de los grupos –SH que han sido descritos como necesarios para su actividad catalítica (Lê-Quôc *et al* 1981), mediante un proceso que es independiente de la lipoperoxidación.

A diferencia de lo observado en los complejos II y III, el complejo IV fue totalmente insensible a los efectos del H₂O₂ independientemente de la composición mitocondrial de ácidos grasos (Tabla III). Una posible explicación para este fenómeno puede radicar en el hecho de que este complejo puede actuar en presencia de H₂O₂ como una peroxidasa usando citocromo *c* reducido como donador de electrones (Vygodina *et al.* 1998). Durante el ciclo catalítico del complejo, el dióxigeno unido al Fe³⁺ del hemo *a*₃ (Fe³⁺-O-O⁻) sufre una doble protonación, formándose un peróxido (Fe³⁺-HO-OH) el cual es inestable y sufre inmediatamente un rompimiento heterolítico dando lugar a la liberación de agua. El H₂O₂ puede unirse directamente al hemo *a*₃, formar el complejo Fe³⁺-HO-OH y sufrir un rompimiento heterolítico similar al del peróxido intermediario formado durante el ciclo catalítico en condiciones normales (Vygodina y Konstantinov 2007). Por lo tanto, es posible que el H₂O₂ en este complejo funcione más como un sustrato de la enzima que como un agente que oxide y dañe su estructura. A este respecto, se ha comprobado la existencia de grupos –SH libres en el complejo IV de mamíferos (Lin *et al.* 2003); sin embargo, en función de los resultados obtenidos es posible que estos sulfhidrilos no sean esenciales para su actividad o que el hemo *a*₃ tenga una mayor afinidad por el H₂O₂ que dichos grupos -SH.

El complejo IV requiere del fosfolípido cardiolipina para su actividad catalítica (Chicco y Sparagna 2007), lo cual puede explicar la inhibición en la actividad de este complejo sensible a BHT observada en mitocondrias +C18:3 tratadas con Fe²⁺ (Figs. 4C y 5C, Capítulo 2 y Tabla III). No obstante que la lipoperoxidación fue inducida también por H₂O₂ en mitocondrias +C18:3, es posible que los bajos niveles de este parámetro observados bajo estas condiciones (Fig. 1 Capítulo 4) no sean suficientes para afectar la actividad de este complejo.

Por otra parte, el tratamiento con Fe²⁺ indujo en mitocondrias +C18:3 una resistencia al efecto inhibitorio de la antimicina A sobre la reducción del citocromo *c*, producto de la actividad del complejo III (Fig. 6b, Capítulo 2). Esta resistencia puede ser atribuida al daño

lipoperoxidativo sobre el complejo ya que fue prevenida por el tratamiento con BHT (Fig. 6d, Capítulo 2) y no fue observada en mitocondrias -C18:3 (Fig. 6b, Capítulo 2). La reducción de citocromo *c* resistente a antimicina A puede interpretarse como una reacción colateral al ciclo Q que aumentó la formación de radical $O_2^{\bullet-}$, puesto que este radical libre es capaz de reducir de manera no catalítica al citocromo *c* (Boveris y Cadenas 1975; Muller *et al.* 2002). La reducción del citocromo *c* fue casi totalmente eliminada a través de la remoción del $O_2^{\bullet-}$ por la MnSOD únicamente en mitocondrias +C18:3 (Tabla 1, Capítulo 2), lo que confirma que el daño lipoperoxidativo inducido por Fe^{2+} incrementó la formación de $O_2^{\bullet-}$. Un efecto similar fue encontrado en las mitocondrias +C18:3 expuestas al H_2O_2 (Fig. 5, Capítulo 4). El radical $O_2^{\bullet-}$ puede producirse en el sitio Q_0 del complejo III a través de la reacción del radical QH^{\bullet} con el O_2 . Dicha reacción puede ser impedida mediante la inhibición de la oxidación del QH_2 por el inhibidor del sitio Q_0 estigmatelina, el cual bloquea de manera competitiva el sitio de unión donde el QH_2 es parcialmente oxidado y desprotonado (Muller *et al.* 2003), La estigmatelina inhibió totalmente la reducción del citocromo *c* (Fig. 6c, Capítulo 2), confirmando que la misma fue debida a la producción de $O_2^{\bullet-}$ en el sitio Q_0 del complejo III.

La producción de $O_2^{\bullet-}$ fue atribuida a un defecto en la reducción del citocromo *b* provocado por la lipoperoxidación, ya que el pico de absorción de este citocromo (562 nm), usando succinato como donador de electrones, no se observó en el espectro de absorción de mitocondrias +C18:3 tratadas con Fe^{2+} (línea continua, Fig. 8d, Capítulo 2), en tanto que dicho pico si apareció tanto en el espectro de mitocondrias -C18:3 (línea continua, Fig. 8c, Capítulo 2) como en el de mitocondrias +C18:3 tratadas previamente con BHT (línea continua, Fig. 8e, Capítulo 2). Asimismo, la adición de antimicina A (la cual inhibe la reoxidación del citocromo *b* en el sitio Q_i) (línea punteada, Fig. 8d, Capítulo 2), no tuvo el mismo efecto que el observado en mitocondrias -C18:3 (un aumento en la intensidad del pico a ~562 nm, línea punteada, Fig. 8c, Capítulo 2) o en mitocondrias +C18:3 en presencia de BHT y Fe^{2+} (línea punteada, Fig. 8e, Capítulo 2), lo que confirma que el citocromo *b* no fue reducido y concuerda con la resistencia a la antimicina A observada en los trazos de reducción de citocromo *c* (Fig. 6b, Capítulo 2). El defecto en la reducción del citocromo *b* no fue debido a la destrucción de los grupos hemo de esta subunidad, dado que la concentración de citocromo *b* usando ditionita como donador de electrones (la ditionita reduce directamente a los citocromos independientemente de la actividad de la CTE) fue similar a la observada en el

control (Fig. 7b, Capítulo 2). Por lo tanto, la inhibición de la reducción del citocromo *b* podría ser debida a una alteración en su conformación inducida por la lipoperoxidación, dado el requerimiento de esta subunidad por los lípidos para mantener una estructura y función adecuadas (Tsai *et al.* 1986). Otra explicación alternativa es que la lipoperoxidación alteró el potencial redox de los hemos *b* a un valor desfavorable que impediría su reducción. En cualquier caso, el defecto en la reducción del citocromo *b* estimularía una reacción colateral al ciclo Q atribuible a la acumulación de radical QH^{\bullet} en el sitio Q_0 debido a la imposibilidad de los hemos *b* de aceptar el segundo electrón de la oxidación bifurcada del QH_2 . El radical QH^{\bullet} reduciría al oxígeno a radical O_2^{\bullet} y este a su vez, reduciría al citocromo *c* de una manera insensible a antimicina A.

La lipoperoxidación podría afectar también la reducción catalítica del citocromo *c* a través del citocromo c_1 debido a que el movimiento rotacional de la ISP hacia el citocromo c_1 depende de la interacción de la ISP con la cardiolipina de la membrana interna mitocondrial. El defecto en la reducción del citocromo *b* podría también contribuir a la alteración en el movimiento rotacional de la ISP, puesto que se ha propuesto que la disrupción en la transferencia de electrones entre los hemos *b* podría afectar dicho movimiento (Yang *et al.* 2008).

En cuanto al efecto del estrés oxidativo inducido por el Fe^{+2} sobre los citocromos de mitocondrias -C18:3, no se encontró alteración alguna en la reducción de los mismos estimulada por succinato (línea continua, Fig. 8c, Capítulo 2), mientras que tampoco se observaron alteraciones en el efecto de la antimicina A sobre la reducción del citocromo *b* (línea punteada, Fig. 8c, Capítulo 2). Sin embargo, se encontró una disminución en la concentración total de citocromos $c+c_1$ (Fig. 7a, Capítulo 2). Por lo tanto, este efecto podría participar en la disminución observada en la actividad del complejo III en mitocondrias -C18:3 (Fig. 4b, Capítulo 2) limitando el flujo de electrones a través del complejo. Dado que la inhibición de dicha actividad fue prevenida por el tratamiento con manitol (Fig. 4B, Capítulo 4), es factible proponer que las ERO podrían haber afectado a alguno de los aminoácidos que participan en la catálisis de este complejo o en la unión del grupo hemo del citocromo *c* o c_1 . El hecho de que la concentración de los citocromos $c+c_1$ haya sido alterada en mitocondrias -C18:3 pero no en mitocondrias +C18:3, puede estar relacionado con el efecto protector que tienen los ácidos grasos poliinsaturados sobre el daño inducido en la estructura y función del

citocromo *c* por diferentes agentes oxidantes (Nantes *et al.* 2000; Rodrigues *et al.* 2007). Es posible que los citocromos se conviertan en uno de los principales blancos del estrés oxidativo en mitocondrias +C18:3 en vista de la resistencia de los ácidos grasos de esta clase de mitocondrias al daño oxidativo.

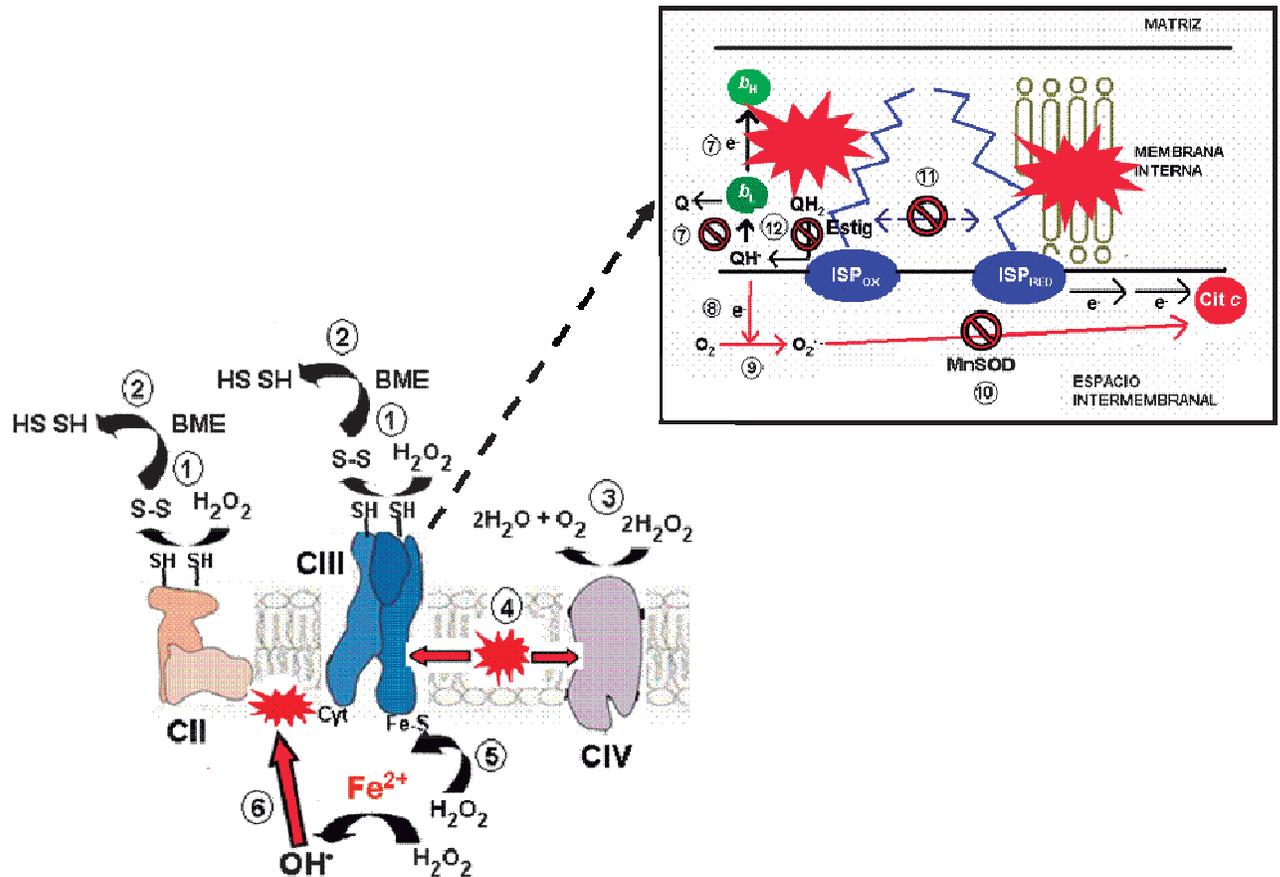
Generalmente, la generación de ERO en las mitocondrias es vista como un proceso deletéreo para la célula (Ide *et al.* 1999; Cadenas y Davies, 2000). Sin embargo, al H₂O₂ se le ha atribuido un papel en la señalización celular como segundo mensajero debido a que posee una mayor selectividad en su acción que otras ERO (p. ej. el radical OH[•]), a su alta capacidad de difundir a sitios lejanos de su lugar de generación y a que es una molécula enzimáticamente metabolizable (Forman *et al.* 2004). En el caso particular de *S. cerevisiae*, la transcripción de diferentes genes involucrados en la respuesta a condiciones de estrés oxidativo, puede ser regulada por concentraciones sub-letales de H₂O₂ y de radical O₂^{•-} a través de su interacción con el factor de transcripción Yap1p (Coleman *et al.* 1999). Entre los genes cuya expresión se regula por Yap1p, se encuentra *GLR1*, el cual codifica para una glutatión reductasa involucrada en el mantenimiento de un valor alto de la proporción GSH/GSSG (Grant *et al.* 1996). A su vez, el glutatión está involucrado en la destoxificación enzimática de los productos tóxicos de la lipoperoxidación (Tan *et al.* 1984). Por lo tanto, es posible proponer que la producción de ERO detectada en mitocondrias +C18:3 podría ser parte de una vía de señalización en respuesta al daño lipoperoxidativo en la mitocondria. Dicha vía podría activar mecanismos que eliminen los productos tóxicos de la lipoperoxidación y que disminuyan la concentración de ERO a un nivel que no sea letal para la célula. En relación a lo anterior, se encontró un aumento en la sensibilidad de la viabilidad celular al estrés oxidativo en esferoplastos +C18:3 tratados con 100 μM Fe²⁺ (Fig. 4, Capítulo 1), observándose una pérdida parcial de la viabilidad en un 30%, lo cual sugiere que la lipoperoxidación sensibiliza a la célula en general a los efectos dañinos del estrés oxidativo pero permite cierto nivel de viabilidad. En contraste, en otro trabajo en el que se utilizaron esferoplastos con la función mitocondrial eliminada mediante el uso de bromuro de etidio, se encontró que la viabilidad celular disminuyó hasta en un 90% exclusivamente en esferoplastos +C18:3 tratados con la concentración de Fe²⁺ antes mencionada (Estrada 2007). Por lo tanto, esto indica que la mitocondria es necesaria para mantener un cierto grado de viabilidad aún cuando bajo en estas

condiciones, la mitocondria produce ERO (Tabla 1, Capítulo 2), las cuales podrían activar una respuesta de defensa mediante el mecanismo señalado anteriormente.

En el caso de la inhibición reversible de la CTE por la oxidación de grupos –SH en presencia de H₂O₂, es posible plantear que dichos grupos podrían funcionar como un sensor redox que modularía la actividad de la CTE en función del estado redox de la mitocondria, limitando el flujo de electrones hacia la CTE y por lo tanto, la producción de ERO en la misma, lo cual concordaría con la nula producción de O₂^{•-} observada en mitocondrias –C18:3 (Fig. 5, Capítulo 4).

En el esquema 3 se propone un modelo que explica el papel de la lipoperoxidación sobre el daño a la CTE tomando en cuenta la mayor parte de los resultados encontrados en el presente trabajo. En condiciones de nula lipoperoxidación, los complejos de II (CII) y III (CIII) de la CTE serían inhibidos por el H₂O₂ y posiblemente, por las ERO producidas por el Fe²⁺, mediante la oxidación de grupos –SH reactivos que son necesarios para la actividad de estos complejos (1) lo cual sería revertido mediante la adición de un reductor de agentes –SH como el BME (2), mientras que en el caso del Fe²⁺, el daño sobre estos grupos podría ser prevenido por el manitol. En el caso del complejo IV (CIV), el H₂O₂ no ejercería ningún efecto sobre su actividad y funcionaría más como un sustrato debido a su actividad peroxidasa (3). La lipoperoxidación (explosión de color rojo en la membrana) aumentaría la sensibilidad de la CTE al estrés oxidativo a nivel de los complejos III y IV debido al requerimiento de lípidos en estos complejos para su actividad (4). La lipoperoxidación estimularía la liberación de Fe de los grupos prostéticos del complejo III posiblemente a nivel del centro Fe-S de la ISP (5). El Fe estimularía la producción de radical OH[•] mediante su interacción con el H₂O₂ (6), lo que favorecería la lipoperoxidación en presencia de este oxidante. En el caso del complejo III (recuadro), la lipoperoxidación afectaría la estructura de la subunidad citocromo *b* debido a su naturaleza hidrofóbica, de un modo tal que impediría la transferencia de electrones hacia los hemos *b_L* y *b_H* (7). Por lo tanto, el radical QH[•] producto de la oxidación del QH₂ por la ISP se acumularía en el sitio Q_O propiciando la aparición de una reacción colateral al ciclo Q en la que la QH[•] reaccionaría con el O₂ (flecha roja) para formar radical O₂^{•-} (8 y 9). Por lo tanto, bajo estas condiciones, la reducción del citocromo *c* procedería principalmente a través de su reacción con el radical O₂^{•-} de una manera sensible a MnSOD (10), mientras que la reducción catalítica del citocromo *c* a través del ciclo Q estaría limitada debido a que la lipoperoxidación

impediría el movimiento rotacional de la ISP entre el citocromo *b* y el citocromo *c*₁ al afectar las interacciones fosfolípido-proteína necesarias para dicho movimiento (11). Asimismo, la producción de radical $O_2^{\bullet-}$ y la reducción no catalítica del citocromo *c* sería eliminada al inhibir la oxidación parcial del QH_2 a radical QH^{\bullet} por el inhibidor del sitio Q_O estigmatelina (12).



Esquema 3. Modelo propuesto para explicar el mecanismo mediante el cual la lipoperoxidación aumenta la sensibilidad de la CTE al estrés oxidativo y favorece la formación de radical $O_2^{\bullet -}$ mediante el daño lipoperoxidativo en el complejo III. Revisar el texto para explicación.

6.- PERSPECTIVAS

- Determinar si el defecto observado en la reducción del citocromo *b* por la lipoperoxidación es debido a una alteración en el potencial redox de los hemos *b* o a una alteración estructural de esta subunidad.
- Determinar el efecto de la lipoperoxidación sobre otros parámetros del funcionamiento mitocondrial tales como el establecimiento del $\Delta\Psi$ o la síntesis de ATP.
- Determinar si las ERO generados por el complejo III sirven como una señal para inducir una respuesta al estrés oxidativo mediante la activación de la transcripción de genes involucrados en los mecanismos antioxidantes de la célula (p. ej. el sistema de glutatión peroxidasa) mediada por factores de transcripción que son activados por ERO (p. ej. Yap1p), o establecer si dichas ERO sirven para activar la muerte programada de la célula.
- Determinar el origen (centros Fe-S de los complejo II y III o de la aconitasa, grupos hemo de los citocromos) del Fe libre detectado bajo condiciones lipoperoxidantes en presencia de H₂O₂.
- Conocer si el estrés oxidativo generado por la exposición a diversos agentes (p. ej. farnesol, ácido acético) que estimulan la producción de ERO en la mitocondria de levadura, puede tener un efecto similar al observado cuando el estrés oxidativo es generado de manera exógena (este trabajo).

7.- BIBLIOGRAFIA

Ames, G. F.-L. 1988. **Structure and mechanism of bacterial periplasmic transport systems.** J. Bioenerg. Biomembr. 20: 1-18.

Andrew, P.J. y B. Mayer. 1999. **Enzymatic function of nitric oxide synthases.** Cardiovasc. Res. 43: 521-531,

Baynes, J.W. 2006. **Oxígeno y vida.** En: Baynes, J.W. y M.H. Dominiczak. (Eds). **Bioquímica médica.** 2ª Ed. Elsevier Mosby. Madrid. pp. 505-532.

Beckman, K.B. y B.N. Ames. 1998. **The free radical theory of aging matures.** Phys. Rev. 78: 547-581.

Bedard, K. y K-H. Krause. 2007. **The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology.** Physiol. Rev. 87: 245-313.

Boldogh, I. R. y L.A. Pon. 2007. **Purification and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** Methods in Cell Biology 80:45-64.

Bondy, S.C. y S. Marwah. 1995. **Stimulation of synaptosomal free radical production by fatty acids: relation to esterification and to degree of unsaturation.** FEBS Lett. 375: 53-55.

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

Boveris, A. y B. Chance. 1973. **The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen.** Biochem. J. 134: 707-716.

Boveris, A. y E. Cadenas. 1975. **Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration.** FEBS Lett. 54: 311-314.

Brenner, C. 2004. **Chemical genomics in yeast.** Genome Biology 5: 240-243.

Breuer, W., S. Epsztejn, P. Millgram y Z.I. Cabantchik. 1995. **Transport of iron and other transition metals into cell as revealed by a fluorescent probe.** Am. J. Physiol. 268: C1354-C1361.

Brocklehurst, K., F. Willenbrock y E. Salih. 1987. **Cysteine proteinases.** En: Neuberger, A. y K. (Eds.). **Hydrolytic Enzymes.** Elsevier. Amsterdam. pp. 39-158.

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

Bunoust, O., A. Devin, N. Avéret, N. Camougrand y M. Rigoulet. 2005. **Competition of electrons to enter the respiratory chain: a new regulatory mechanism of oxidative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.** J. Biol. Chem. 280: 3407–3413.

Cabiscol, E., G. Bellí, J. Tamarit, P. Echave, E. Herrero y J. Ros. 2002. **Mitochondrial Hsp60. Resistance to oxidative stress, and the labile iron pool are closely connected in *Saccharomyces cerevisiae*.** J. Biol. Chem. 277 (46): 44531-44538.

Cadenas, E. K. J. A. Davies. 2000. **Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging.** Free Rad. Biol. Med. 29: 222–230.

Cande, W. Z. y S. M. Wolniak. 1978. **Chromosome movement in lysed mitotic cells is inhibited by vanadate.** J. Cell Biol. 79 (2): 573-580.

Cardoso, S.M., C. Pereira y C.R. Oliveira. 1999. **Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress.** Free Rad. Biol. Med. 26 (1): 3-13.

Castello, P.R., P.S. David, T. McClure, Z. Crook y R.O. Poyton. 2006. **Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: Implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes.** Cell metabolism 3: 277–287.

Chance, B., H. Sies y A. Boveris. 1979. **Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.** Physiol. Rev. 59: 527-605.

Chicco, A.J. y G.C. Sparagna. 2007. **Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease.** Am. J. Physiol. Cell Physiol. 292 (1): C33– C44.

Chivasa, S., B. K. Ndimba, W. J. Simon, K. Lindsey y A. R. Slabas. 2005. **Extracellular ATP functions as an endogenous external metabolite regulating plant cell viability.** The plant cell 17, 3019–3034.

Cho, H.P., M. Nakamura, S.D. Clarke. 1999a. **Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human delta-5 desaturase.** J. Biol. Chem. 274(52): 37335-37339.

Cho, H.P., M.T. Nakamura, S.D. Clarke. 1999b. **Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian delta-6 desaturase.** J. Biol. Chem. 274(1): 471-477.

Christen, R., J.L. Gatti, y R. Billard. 1987. **Trout sperm motility. The transient movement of trout sperm is related to changes in the concentration of ATP following the activation of the flagellar movement.** Eur. J. Biochem. 166 (3): 667-671.

Cocco, T., M. Di Paola, S. Papa y M. Lorusso. 1999. **Arachidonic acid interaction with the mitochondrial electron transport chain promotes reactive oxygen species generation.** Free Radic. Biol. Med. 27: 51-59.

Coleman, S.T., E.A. Epping, S.M. Steggerda y W. S. Moye-Rowley. 1999. **Yap1p activates aene transcription in an oxidant-specific fashion.** Mol. Cel. Biol. 19 (12): 8302-8313.

Contamine, V. y M. Picard. 2000. **Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64, 281-315.

Corona Gómez, R. 2007. **Relación entre la liberación de Fe y la lipoperoxidación en el daño mitocondrial *in situ* inducido por H₂O₂.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 68 pp.

Dancis, A., D.G. Roman, G.J. Anderson, A.G. Hinnebusch y R.D. Klausner. 1992. **Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89: 3869-3873.

Davies, K.J., M.E. Delsignore y S.W. Lin. 1987. **Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids.** J. Biol. Chem. 262 (20): 9902-9907.

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

De Vries, S. y L.A. Grivell. 1988. **Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH:Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*.** Eur. J. Biochem. 176: 377-384.

Estrada-Villagómez, M.M. 2007. **Influencia de la composición lipídica membranal de *S. cerevisiae* sobre los efectos del ión Fe²⁺ en la función mitocondrial.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 59 pp.

Faulks, S.C., N. Turner, P. L. Else y A. J. Hulbert. 2006. **Calorie restriction in mice: effects on body composition, daily activity, metabolic rate, mitochondrial reactive oxygen species production, and membrane fatty acid composition.** J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. 61(8): 781-794.

Forman, H.J. J.M. Fukuto y M. Torres. 2004. **Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers.** Am. J. Physiol. Cell Physiol. 287: C246-C256.

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.

Frey, T.G. y C.A. Manella. 2000. **The internal structure of mitochondria.** Trends Biochem. Sci. 25: 319-324.

Gombert, A.K., M. Moreira dos Santos, B. Christensen y J. Nielsen. 2001. **Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression.** J. Bact. 183: 1441–1451.

González-Halphen, D y Vázquez-Acevedo, M. 2002. **La cadena respiratoria mitocondrial: un enfoque estructural.** En: Vázquez Memije, M.E. y M.M. Tuena de Gómez-Pouyou. (Eds). **Mitocondria, una mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos.** Editorial Prado. México. pp. 65-88.

Gordon, J.L. 1986. **Extracellular ATP: effects, sources and fate.** Biochem. J. 233: 209-319.

Grant, C. M., L. P. Collinson, J.-H. Roe e I. W. Dawes. 1996. **Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation.** Mol. Microbiol. 21: 171-179.

Green, C., M.D. Brand y M.P. Murphy. 2004. **Prevention of mitochondrial damage as a therapeutic strategy in diabetes.** Diabetes 53: 110–118.

Griendling, K.K. 2006. **NADPH oxidases: new regulators of old functions.** Antioxid. Redox Signal. 8: 1443–1445,

Guo, J. y B.D. Lemire. (2003). **The ubiquinone-binding site of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate-ubiquinone oxidoreductase is a source of superoxide.** J. Biol. Chem, 278 (48): 47629-47635.

Halliwell, B. y J.M.C. Gutteridge. 1999. **Free radicals in biology and medicine**. 3a. Ed. Oxford University Press. England. 936 pp.

Herrero, A., M. Portero-Otín, M.J. Bellmunt, R. Pamplona y G. Barja. 2001. **Effect of the degree of fatty acid unsaturation of rat heart mitochondria on their rates of H₂O₂ production and lipid and protein oxidative damage**. Mech. Ageing Dev. 122 (4): 427-443

Holman, R.T. 1954. **Autooxidation of fats and related substances**. En: Holman, R.T., W.O. Lundberg, y T. Malkin. (Eds). **Progress in the chemistry of fats and other lipids**. Academic Press. New York. Vol. 2. pp. 51-98.

Hulbert, A. J., R. Pamplona, R. Buffenstein y W. A. Buttemer. 2007. **Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals**. Physiol. Rev. 87: 1175–1213.

Hunte, C., H. Palsdottir y B.L. Trumpower. 2003. **Protonmotive pathways and mechanism in the cytochrome *bc*₁ complex**. FEBS Lett. 545: 39-46.

Hurd, T.R., R. Requejo, A. Filipovska, S. Brown, T.A. Prime, A.J. Robinson, I.M. Fearnley y M.P. Murphy. 2008. **Complex I within oxidatively stressed bovine heart mitochondria is glutathionylated on Cys-531 and Cys-704 of the 75-kDa subunit: potential role of Cys residues in decreasing oxidative damage**. J. Biol. Chem. 283 (36): 24801-24815.

Ide, T., H. Tsutsui, S. Kinugawa, H. Utsumi, D. Kang, N. Hattori, K. Uchida, K. Arimura, K. Egashira y A. Takeshita. 1999. **Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium**. Circ. Res. 85: 357-363.

Jang, S. y J. A. Imlay. 2007. **Micromolar intracellular hydrogen peroxide disrupts metabolism by damaging iron-sulfur proteins**. J. Biol. Chem. 282 (2): 929-937.

Joseph-Horne, T., D.W. Hollomon y P.M. Wood. 2001. **Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components**. Biochim. Biophys. Acta 1504: 179-195.

Korshunov, S.S., O.V. Korkina, E.K. Ruuge, V.P. Skulachev y A.A. Starkov. 1998. **Fatty acids as natural uncouplers preventing generation of O₂^{•-} and H₂O₂ by mitochondria in the resting state**. FEBS Lett. 435: 215-218.

Kwok, E. y D. Kosman. 2006. **Iron in yeast: Mechanisms involved in homeostasis**. En: Tamàs, M.J. y E. Martinoia (Eds.). **Molecular biology of metal homeostasis and detoxification. From microbes to man**. Springer. Berlin. pp. 59–100.

Lambeth, J.D. 2007. **Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy.** Free Rad. Biol. Med. 43: 332–347.

Lambeth, J.D., T. Kawahara y B. Diebold. 2007. **Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression.** Free Radic. Biol. Med. 43: 319-331.

Lange, C., J.H. Nett, B.L. Trumpower y C. Hunte. 2001. **Specific roles of protein-phospholipid interactions in the yeast cytochrome *bc*₁ complex structure.** EMBO J. 20: 6591-6600.

Lee, K. 1999. **Benzene-induced uncoupling of naphthalene dioxygenase activity and enzyme inactivation by production of hydrogen peroxide.** J. Bact. 181 (9): 2719-2725.

Lee, Y.I., J.M. Hwang, J.H. Im, Y.I. Lee, D.G. Kim, D.Y. Yu, H.B. Moon y S.K. Park. 2004. **Human hepatitis B virus-X proteins alter mitochondrial function and physiology in human liver cells.** J. Biol. Chem. 279: 15460-15471.

Lê-Quôc, K., D. Lê-Quôc y Y. Gaudemer. 1981. **Evidence for the existence of two classes of sulfhydryl groups essential for membrane-bound succinate dehydrogenase activity.** Biochemistry 20 (7): 1705-1710.

Lin, T.K., G. Hughes, A. Muratovska, F.H. Blaikie, P.S. Brookes, V. Darley-Usmar, R.A.J. Smith, y M.P. Murphy. 2002. **Specific modification of mitochondrial protein thiols in response to oxidative stress: a proteomics approach.** J. Biol. Chem. 277 (19): 17048-17056.

Lucas, D.T. y L.I. Szweda. 1998. **Cardiac reperfusion injury, aging, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 510-514.

Luttik, M.A.H., K.M. Overkamp, P. Kötter, S. de Vries, J.P. van Dijken y J.T. Pronk. 1998. **The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH.** J. Biol. Chem. 273: 24529–24534.

Magder, S. 2006. **Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life?** Critical Care 10: 208-217.

Mannella, C.A. 1994. **The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope.** Microsc. Res. Tech. 27: 278-283.

- Marnett, L.J. 1999. **Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde.** IARC Sci. Publ. 150: 17-27.
- Martin, C.E., C. Oh, y Y. Jiang. 2007. **Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast.** Biochim. Biophys. Acta 1771 (3): 271-285.
- Matsuno-Yagi, A. y T. Yagi. 2001. **Complex I—An L-Shaped black box.** J. Bioenerg. Biomembr. 33: 155-157.
- Melo, A.M.P., T.M. Bandejas y M. Teixeira. 2004. **New insights into type II NAD(P)H:quinone oxidoreductases.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68: 603–616.
- Muller, F., A.R. Crofts y D.M. Kramer. 2002. **Múltiple Q-cycle bypass reactions at the Q_o site of the cytochrome *bc*₁ complex.** Biochemistry 41: 7866-7874.
- Muller, F.L., A.G. Roberts, M.K. Bowman y D.M. Kramer. 2003. **Architecture of the Q_o site of the cytochrome *bc*₁ complex probed by superoxide production.** Biochemistry 42: 6493-6499.
- Nantes, I.L., A. Faljoni-Alario, O.R. Nascimento, B. Bandy y E.J.H. Bechara. 2000. **Modifications in heme iron of free and vesicle bound cytochrome *c* by *tert*-butyl hydroperoxide: a magnetic circular dichroism and electron paramagnetic resonance investigation.** Free Radic. Biol. Med. 28: 786–796.
- Ng Y, R. Barhoumi, R.B Tjalkens, Y.Y. Fan, S. Kolar, N. Wang, J.R. Lupton y R.S. Chapkin. 2005. **The role of docosaheptaenoic acid in mediating mitochondrial membrane lipid oxidation and apoptosis in colonocytes.** Carcinogenesis 26(11): 1914-1921.
- Nicholls, D.G. y S.J. Ferguson. 2002. **Bioenergetics.** 3a. Ed. Academic Press. London, UK. 297 pp.
- North, J.A., A.A. Spector y G.R. Buettner. 1992. **Detection of lipid radicals by electron paramagnetic resonance spin trapping using intact cells enriched with polyunsaturated fatty acid.** J. Biol. Chem. 267 (9): 5743–5746
- Overkamp, K.M., B.M. Bakker, P. Kötter, A. van Tuijl, S. de Vries, J.P. van Dijken y J.T. Pronk. **In Vivo analysis of the mechanisms for oxidation of cytosolic NADH by *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria.** J. Bact. 182: 2823–2830.
- Pamplona, R. M. Portero-Otín, D. Riba, C. Ruiz, J. Prat, J.P. Bellmunt y G. Barja. 1998. **Mitochondrial membrane peroxidizability index is inversely related to maximum life span in mammals.** J. Lipid Res. 39 (10): 1989–1994.

Pamplona, R. M., Portero-Otín, D. Riba, J.R. Requena, S.R. Thorpe, M. López-Torres y G. Barja. 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): B286-B291.

Paradies, G, G. Petrosillo, M. Pistolese, N. Di Venosa, A. Federico y F.M. Ruggiero. 2004. **Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin.** Circ. Res. 94: 53-59.

Paravicini, T.M. y R.M. Touyz. 2008. **NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension.** Diabetes care 31: S170-S180.

Peña D. A., A.A. Begovich, A.G. Puyou y R.T. Ibarguengoitia. 1979. **Bioquímica.** 1a. ed. Editorial Limusa. México. 398 pp.

Petrosillo, G., F.M. Ruggiero, N. Di Venosa 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, 714-716.

Porter, N.A. 1986. **Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids.** Acc. Chem. Res. 19: 262-268

Praticò, D. 2002. **Lipid Peroxidation and the Aging Process.** Sci. Aging Knowl. Environ. 2002 (50): re5.

Prokisch, H., Andreoli, C., Ahting, U., Heiss, K., Ruepp, A., Scharfe, C., and Meitinger, T. 2006. **MitoP2: The mitochondrial proteome database—now including mouse data.** Nucleic Acids Res. 34, D705-D711.

Rauen U., A. Springer, D. Weisheit, F. Petrat, H.G. Korth, H. de Groot y R. Sustmann. 2007. **Assessment of chelatable mitochondrial iron by using mitochondrion-selective fluorescent iron indicators with different iron-binding affinities.** Chembiochem. 8(3): 341-352.

Regnier, M., D. M. Lee, y E. Homsher. 1998. **ATP analogs and muscle contraction: mechanics and kinetics of nucleoside triphosphate binding and hydrolysis.** Biophys. J. 74: 3044-3058.

Reinheckel, T., I. Wiswedel, H. Noack y W. Augustin. 1995. **Electrophoretic evidence for the impairment of complexes of the respiratory chain during iron/ascorbate**

induced peroxidation in isolated rat liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 1239 (1): 45-50.

Rice-Evans, C.A. y Burdon, R.H. 1994. **Free radical damage and its control.** 1a. ed. Elsevier Science B.V. Amsterdam. 392 pp.

Rodrigues, T., L.P. de Franca, C. Kawai, P.A. de Faria, K.C.U. Mugnol, F.M. Braga, I.L.S. Tersariol, S.S. Smaili e I.L. Nantes. 2007. **Protective role of mitochondrial unsaturated lipids on the preservation of the apoptotic ability of cytochrome *c* exposed to singlet oxygen.** J. Biol. Chem. 282: 25577–25587.

Roman, D.G., A. Dancis, G.J. Anderson y R.D. Klausner, 1993. **The fission yeast ferric reductase gene *frp1+* is required for ferric iron uptake and encodes a protein that is homologous to the gp^{91-phox} subunit of the human NADPH phagocyte oxidoreductase.** Mol. Cell. Biol. 13: 4342–4350.

Romero, F.J., F. Bosch-Morell, M. J. Romero, E. J. Jareño, B. Romero, N. Marín y J. Romá. 2005. **Lipid Peroxidation Products and Antioxidants in Human Disease.** Environ. Health Perspect. 106 (Suppl. 5): 1229-1234.

Rötig, A. y A. Munnich 2003. **Genetic features of mitochondrial respiratory chain disorders.** J. Am. Soc. Nephrol. 14: 2995–3007.

Saraste, M. 1999. **Oxidative phosphorylation at the *fin de siècle*.** Science 283: 1488-1493.

Sen, T., N. Sen, S. Jana, F. H. Khan, U. Chatterjee y S. Chakrabarti. 2007. **Depolarization and cardiolipin depletion in aged rat brain mitochondria: Relationship with oxidative stress and electron transport chain activity.** Neurochem. Int. 50 (5): 719-725.

Shatwell, K.P., A. Dancis, A.R. Crossi, R.D. Klausner y A.W. Segal. 1996. **The FRE1 ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae* is a cytochrome *b* similar to that of NADPH oxidase.** J. Biol. Chem. 271: 14240–14244,

Shen, B., R. G. Jensen y H. J. Bohnert. 1997. **Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals.** Plant Physiol. 115: 527-532.

Shimomura, Y., M. Nishikimi y T. Ozawa. 1984. **Isolation and reconstitution of the iron-sulfur protein in ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase complex.** Phospholipids

are essential for the integration of the iron-sulfur protein in the complex. *J. Biol. Chem.* 259 (22): 14059-14063.

Sturm, B., U. Bistrich, M. Schranzhofer, J. P. Sarsero, U. Rauen, B. Scheiber-Mojdehkar, H. de Groot, P. Ioannou, y F. Petrat. 2007. **Friedreich's ataxia, no changes in mitochondrial labile iron in human lymphoblasts and fibroblasts: A decrease in antioxidative capacity?** *J. Biol. Chem.* 280(8): 6701 - 6708.

Sutter T.R. y J.C. Loper. 1989. **Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for NADPH-cytochrome P450 reductase causes increased sensitivity to ketoconazole.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160(3): 1257-1266.

Tambi, J.M. 1999. **Regulation of stearyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol.** *J. Lipid Res.* 40, 1549-1558.

Tan, K.H., D. J. Meyer, J. Belin, y B. Ketterer. 1984. **Inhibition of microsomal lipid peroxidation by glutathione and glutathione transferases B and AA. Role of endogenous phospholipase A2.** *Biochem. J.* 220(1): 243–252.

Terashvili, M., P.F. Pratt, D. Gebremedhin, J. Narayanan y D.R. Harder. 2006. **Reactive oxygen species cerebral autoregulation in health and disease.** *Pediatr. Clin. North Am.* 53(5): 1029-1038.

Tretter, L. y V. Adam-Vizi. 2000. **Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: a key role of α -ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress.** *J. Neurosci.* 20: 8972–8979.

Trumpower, B.L. 1990(a). **Cytochrome *bc*₁ complexes of microorganisms.** *Microbiol. Rev.* 54: 101-129.

Trumpower, B.L. 1990. **The protonmotive Q cycle.** *J. Biol. Chem.* 265 (20): 11409-11412.

Tsai, A. y G. Palmer. 1986. **The role of phospholipids in the binding of antimycin to yeast complex III.** *Biochim. Biophys. Acta* 852: 100–105.

Tuller, G., T. Nemeč, C. Hrastnik, y G. Daum. 1999. **Lipid composition of subcellular membranes of an FY1679-derived haploid yeast wild-type strain grown on different carbon sources.** *Yeast* 15: 1555-1564.

Turrens, J.F. 2003. **Mitochondrial formation of reactive oxygen species.** *J. Physiol.* 552: 335–344

Vázquez-Memije, M.E., R. Capin, A. Tolosa y M. El-Hafidi. 2008. **Analysis of age-associated changes in mitochondrial free radical generation by rat testis.** Mol. Cell Biochem. 307: 23-30.

Vygodina, T. V y A.A. Konstantinov. 2007. **Peroxidase activity of mitochondrial cytochrome c oxidase.** Biochemistry (Moscow) 72: 1056-1064.

Vygodina, T. V., C. Pecoraro, D. Mitchell, R. Gennis y A.A. Konstantinov. 1998. **Mechanism of inhibition of electron transfer by amino acid replacement K362M in a proton channel of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome c oxidase.** Biochemistry 37: 3053-3061.

Winterbourn, C.C. 1995. **Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction.** Toxicol. Lett. 82-83: 969-974.

Yabusaki, Y., H. Murakami y H. Ohkawa. 1988. **Primary structure of *Saccharomyces cerevisiae* NADPH-cytochrome P450 reductase deduced from nucleotide sequence of its cloned gene.** J. Biochem. 103: 1004-1010

Yang, S., H-W. Ma, L. Yu y C.A. Yu. 2008. **On the mechanism of quinol oxidation at the Q_p site in the cytochrome bc₁ complex: studied using mutants lacking cytochrome b_L or b_H.** J. Biol. Chem. 283: 28767–28776.

Yuanbin, L., G. Fiskum y D. Schubert. 2002. **Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain.** J. Neurochem. 80: 780-787.

Zhu, J., T. Egawa, S-R. Yeh, L. Yu y C-A. Yu. 2007. **Simultaneous reduction of iron–sulfur protein and cytochrome b_L during ubiquinol oxidation in cytochrome bc₁ complex.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104: 4864-4869.