



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

**PARTICIPACIÓN DE LAS FOSFOLÍPIDO
HIDROPERÓXIDO GLUTATIÓN PEROXIDASAS (PHGP_x)
EN LA PRESERVACIÓN DE LA FUNCIÓN
MITOCONDRIAL EN EL ENVEJECIMIENTO DE
*Saccharomyces cerevisiae***

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

I.B. MELINA CANIZAL GARCÍA

ASESOR: D.C. ALFREDO SAAVEDRA MOLINA

MORELIA, MICHOACÁN, DICIEMBRE DE 2015.

ÍNDICE

No.	Título	Pág.
	RESUMEN	
I	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Envejecimiento	1
1.2.	Teoría de envejecimiento por radicales libres	1
1.3.	El envejecimiento y el grado de insaturación de los ácidos grasos que componen las membranas	3
1.4.	La mitocondria	5
1.5.	Cadena de transporte de electrones (CTE)	7
1.6.	Especies reactivas de oxígeno (ERO) y estrés oxidativo	9
1.7.	La peroxidación de lípidos en el proceso de envejecimiento	14
1.8.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio	17
1.9.	Fosfolípido Hidroperóxido Glutación Peroxidasas	20
II	JUSTIFICACIÓN	24
III	HIPÓTESIS	25
IV	OBJETIVOS	25
4.1	Objetivo General	25
4.2.	Objetivos específicos	25
V	MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1.	Reactivos	26
5.2.	Material biológico	26
5.3.	Determinación de la mutación de los genes Gpxs en <i>S. cerevisiae</i>	26
5.4.	Cinéticas de crecimiento	28
5.5.	Cultivo de células de <i>S. cerevisiae</i> e inducción del envejecimiento	28
5.6.	Manipulación del contenido de ácidos grasos de la levadura	29

No.	Título	Pág.
5.7.	Evaluación del envejecimiento: Determinación de la viabilidad celular por conteo en placa	29
5.8.	Preparación de células para las determinaciones de velocidad de consumo de oxígeno y ensayos de potencial de membrana	30
5.9.	Determinación de la respiración mitocondrial <i>in situ</i>	30
5.10.	Determinación del potencial de membrana mitocondrial <i>in situ</i>	30
5.11.	Análisis de especies reactivas de oxígeno (ERO) por citometría de flujo	31
5.11.1.	Preparación de levaduras para citometría de flujo	31
5.11.2.	Estandarización y condiciones de corrida del equipo (BD AccuriTM C6)	32
5.11.3.	Cuantificación de la producción de ERO por citometría de flujo	34
5.12.	Análisis estadístico	34
VI	RESULTADOS	35
6.1.	Determinación de la mutación de los genes GPXs en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
6.2.	Cinéticas de crecimiento	37
6.3.	Efecto del ácido linolénico (C18:3) en la viabilidad de células envejecidas en las mutantes PHGGPx de <i>S. cerevisiae</i>	37
6.4.	Efecto de la mutación de los genes PHGPx en el potencial de membrana mitocondrial de células envejecidas	39
6.5.	Efecto de las mutaciones en los genes PHGPx sobre la respiración de células envejecidas	41
6.6.	Niveles de ERO en mutantes envejecidas en los genes PHGPx	45
VII	DISCUSIÓN	57
VIII	CONCLUSIÓN	62
IX	BIBLIOGRAFÍA	63

Resumen

La tasa de envejecimiento de varias especies ha sido inversamente correlacionada con el grado de insaturación de los ácidos grasos que componen las membranas biológicas. De manera similar, recientemente se ha observado que la incorporación de ácidos grasos poliinsaturados (AGP) en las membranas de levaduras envejecidas conduce a una pérdida acelerada de la viabilidad, disfunción mitocondrial, aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno e incremento a la sensibilidad a la peroxidación de lípidos. Se observó una disminución en la susceptibilidad a la peroxidación de lípidos con el progreso del envejecimiento, lo que sugiere la activación de sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos como una respuesta adaptativa a este proceso. A este respecto, tres fosfolípidos hidropéroxidos glutatión peroxidasas (PHGPx) han sido identificadas en *Saccharomyces cerevisiae*. Estas enzimas tienen una participación en la protección de fosfolípidos de membrana contra el estrés oxidativo al catalizar la reducción de hidropéroxidos de ácidos grasos y fosfolípidos que son producidos en las membranas peroxidadas. De estas tres isoformas, la Gpx2p se localiza en la mitocondria, mientras que las otras dos están presentes en el citosol. Así, el objetivo de este estudio fue demostrar que las PHGPx son importantes para la supervivencia de las levaduras envejecidas en presencia de AGP, debido a que pueden contribuir a una mejor preservación de la función mitocondrial, entre otros efectos. La cepa BY4741 de *S. cerevisiae* y sus respectivas mutantes *gpx1Δ*, *gpx2Δ* y *gpx3Δ* fueron envejecidas 30 días cultivándose en fase estacionaria en ausencia y presencia de ácido linolénico. La viabilidad celular, el potencial de membrana *in situ* y la respiración mitocondrial *in situ* se midieron a los 0 días (fase exponencial), 15 y 30 días (fase estacionaria). Los resultados muestran que la viabilidad se afectó a las 15 días en las mutantes *gpx1Δ* y *gpx2Δ*, disminuyendo su viabilidad 53% y 63%, respectivamente, cuando se crecieron en presencia de ácido linolénico. Por otro lado en ausencia de ácido linolénico se observó una disminución de 29% en la viabilidad de la mutante

gpx2Δ, mientras que en *gpx1Δ* y *gpx3Δ* no se afectó su viabilidad a los 15 días. De manera paralela, se comparó con una pérdida de función mitocondrial como la respiración y el potencial de membrana. Por lo tanto, nuestros resultados apoyan la hipótesis que el mantenimiento de las funciones mitocondriales e integridad de la membrana por Gpx2p, es esencial para la supervivencia de las levaduras durante el envejecimiento.

Palabras clave: PHGPx, envejecimiento, potencial de membrana, respiración mitocondrial.

Abstract

The rate of aging of several species has been inversely correlated with the degree of unsaturation of fatty acids that comprise biological membranes. Similarly, recently it has been observed that the incorporation of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in the membranes of aging yeast leads to a rapid loss of viability, mitochondrial dysfunction, increased generation of reactive oxygen species and increased sensitivity to lipid peroxidation. A decrease was observed in the susceptibility to lipid peroxidation with the progress of aging, suggesting activation of enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems as an adaptive response to this process. In this regard, phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase three (PHGPx) have been identified in *Saccharomyces cerevisiae*. These enzymes have a stake in membrane phospholipids protection against oxidative stress to catalyze the reduction of fatty acid hydroperoxides and phospholipids that are produced in peroxidized membranes. Of these three isoforms, Gpx2p is located in the mitochondria, while the other two are present in the cytosol. Thus the aim of this study was to demonstrate that PHGPx are important for the survival of yeasts in the presence of aged PUFA because they can contribute to better preservation of mitochondrial function, among other effects. The *S. cerevisiae* strain BY4741 and their respective mutant's *gpx1Δ*, *gpx2Δ* and *gpx3Δ* were aged 30 days cultivated in stationary phase in the absence and presence of linolenic acid. Cell viability, membrane potential and mitochondrial respiration *in situ* were measured at 0 days (exponential phase), 15 and 30 days (stationary phase). The results show that viability was affected at 15 days and the *gpx1Δ* *gpx2Δ* mutants, reducing its feasibility 53% and 63%, respectively, when grown in presence of linolenic acid. Furthermore, in linolenic acid absence, decrease of 29% in the viability of mutant *gpx2Δ*, while in *gpx1Δ* and *gpx3Δ* their viability after 15 days was affected. In parallel, mitochondrial function such as respiration and membrane potential were affected. Therefore, our results support the hypothesis that the maintenance of mitochondrial functions and membrane integrity by Gpx2p is essential for the survival of yeasts during aging.

Keywords: PHGPx, aging, membrane potential, mitochondrial respiration.

I- Introducción

1.1. Envejecimiento

El envejecimiento, es un fenómeno biológico multifactorial que consiste en una degradación progresiva de los sistemas biológicos de reparación y de respuesta al estrés, como consecuencia de daños producidos de forma aleatoria y acumulativa a lo largo del tiempo (Hayflick, 2007; Guarente *et al.*, 2008), causando una menor fertilidad, mayor vulnerabilidad y susceptibilidad a un gran número de enfermedades de diversa naturaleza, tales como procesos degenerativos de carácter nervioso o muscular, alteraciones del sistema inmune o tumores derivados de la desregulación de la proliferación celular y mayor mortalidad (Kirkwood, 2005). El proceso de envejecimiento tiene cuatro características: es progresivo, endógeno, irreversible y perjudicial para el individuo (Strehler, 1962). El carácter progresivo del envejecimiento sugiere que las causas están presentes durante todo el período de vida de un organismo, tanto en edades jóvenes como tardías. El carácter endógeno sugiere que factores exógenos no son causas del proceso de envejecimiento intrínseco, aunque pueden interactuar con causas endógenas, o bien aumentar o disminuir sus efectos (Hulbert *et al.*, 2007).

1.2. Teoría de envejecimiento por radicales libres

Se ha sugerido, un papel de las ERO como mensajeros intracelulares, otorgándoles una importancia activa en el metabolismo celular más allá de la acción deletérea derivada del ataque a biomoléculas (Bartosz, 2009). La proliferación celular y la progresión en el ciclo celular estarían moduladas por las concentraciones de ERO. Valores demasiado altos de estas moléculas provocarían la detención del ciclo celular e incluso la muerte de la célula (Boonstra y Post, 2004). La actividad de algunas ERO como oxidantes débiles en condiciones fisiológicas, podría modular el estado redox de la célula y controlar así los mencionados procesos, sin que se produzcan interacciones dañinas irreparables.

En 1956, Denham Harman propuso esta teoría. Postula que el envejecimiento y las enfermedades degenerativas asociadas, se atribuyen básicamente a los ataques secundarios nocivos de los radicales libres sobre los componentes celulares y en los tejidos conectivos. Los radicales libres surgen en gran medida a través de las reacciones que implican oxígeno molecular, catalizadas en la célula por las enzimas oxidativas y en los tejidos conectivos por trazas de metales tales como hierro, cobalto y manganeso. La incapacidad de los mecanismos antioxidantes celulares para contrarrestar este daño supone la pérdida progresiva de funcionalidad (Harman, 1956).

La producción endógena de especies reactivas de oxígeno (ERO) tiene lugar, principalmente, en la membrana interna mitocondrial, durante el proceso de la fosforilación oxidativa para producir moléculas de adenosín trifosfato (ATP). Los complejos enzimáticos la NADH:ubiquinona oxidorreductasa (complejo I) y el ubiquinol:citocromo c oxidorreductasa (complejo III), pertenecientes a la cadena de transporte de electrones (CTE), son las principales fuentes de ERO, generando anión superóxido (O_2^-) en una proporción del 1-2% del total de moléculas transportadas en la CTE. Los peroxisomas son otra fuente de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y otros muchos procesos metabólicos producen de forma colateral especies reactivas, sean o no radicales libres (Chance y Williams, 1956; Halliwell, 1999).

El desequilibrio entre producción y eliminación de ERO da como resultado un estado de estrés oxidativo. La peroxidación lipídica, especialmente importante en el caso de los ácidos grasos poliinsaturados, es una consecuencia de dicho estrés oxidativo. Algunos aminoácidos como la cisteína y la tirosina son también blanco de las ERO en las proteínas. Algunas de estas reacciones generan nuevos compuestos, como el 4-hidroxinonanal producido en la peroxidación lipídica, que pueden extender el daño mediante reacciones en cadena (Halliwell, 1999).

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

En estrecha relación con la teoría de los radicales libres, existe un segundo parámetro relacionado con el estrés oxidativo que también se correlaciona con la longevidad máxima, y es el grado de insaturación de los ácidos grasos presentes en las membranas mitocondriales, que podría ser un factor que determina la longevidad, ya que las membranas con una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados son más susceptibles al daño oxidativo y a la formación de especies reactivas de oxígeno, afectando en consecuencia al envejecimiento y la longevidad (Pamplona *et al.*, 2002; Barja, 2005; Aguilar-Toral *et al.*, 2014). Las biomoléculas más susceptibles al daño por ERO son los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), concretamente en aquellos átomos de carbono situados entre dos dobles enlaces, debido a la presencia de electrones muy inestables junto a sus dobles enlaces. En consecuencia la sensibilidad a la peroxidación lipídica aumenta exponencialmente conforme sube el número de dobles enlaces por molécula (Hulbert *et al.*, 2007).

Algunos estudios comparativos han mostrado interesantes correlaciones entre la longevidad máxima (L_{max}) de los organismos y las características de sus lípidos de membrana, se ha observado que los únicos dos parámetros que correlacionan de manera significativa con la longevidad máxima son la producción de ERO (inversamente) y el grado de saturación de los lípidos de membrana (en relación directa) (Figura 1) (Pamplona *et al.*, 1999). Así, en una comparación entre ocho especies de mamíferos, el índice de dobles enlaces (IDE), número total de dobles enlaces: la sumatoria del porcentaje de ácidos grasos insaturados por el número de dobles enlaces de cada ácido graso insaturados, es mayor en los animales con una menor longevidad máxima. Cuando se comparan distintas clases de vertebrados, aves y mamíferos del mismo tamaño corporal, las aves muestra una mayor longevidad y un menor IDE (Pamplona *et al.*, 1996). La correlación inversa entre IDE y L_{max} , según fueron probando diversos estudios, es válida en los fosfolípidos mitocondriales y totales de corazón e hígado

(Pamplona *et al.*, 1996; Pamplona *et al.*, 1998).

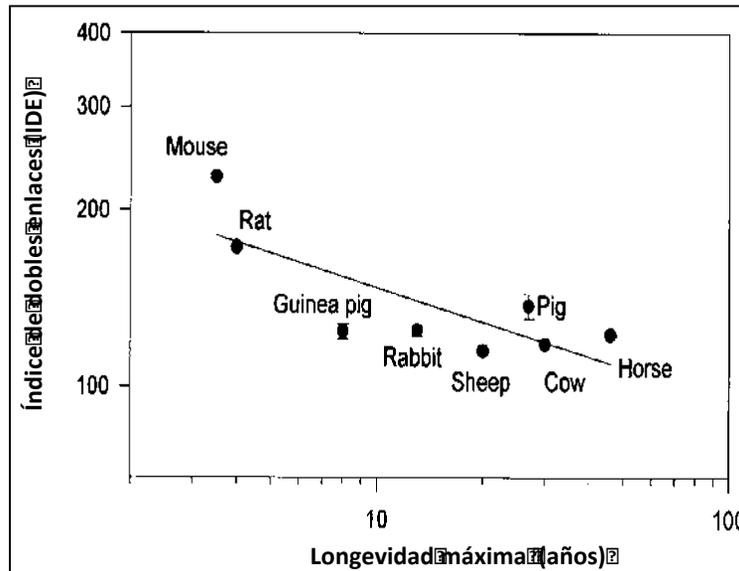


Figura 1. Relación entre el índice de dobles enlaces de ácidos grasos (IDE) y su longevidad máxima en los fosfolípidos del corazón de ocho especies de mamíferos. Tomado de Pamplona *et al.*, 1999.

Diseños experimentales con intervenciones dietéticas, incluyendo como componente lipídico mayoritario ácidos grasos poliinsaturados o ácidos grasos saturados (SFA), consiguieron demostrar que una disminución del IDE inducida por la manipulación de la dieta provocaba, a su vez, un descenso de la peroxidación lipídica y del nivel de grupos carbonilo en proteínas, entre otros indicadores de daño oxidativo (Herrero *et al.*, 2001).

Adicionalmente a la teoría de los cambios del IDE, algunos autores han sugerido que existe un patrón de expresión de enzimas desaturasas (introducen dobles enlaces en los acil-CoA de cadena larga) propio de cada especie, así como una regulación estrecha del ciclo de desacilación/reacilación, como mecanismos de homeostasis en lo que se refiere al grado de saturación de los lípidos de membrana (Pamplona *et al.*, 2000).

1.4. La mitocondria

Las mitocondrias son organelos esenciales semiautónomos de células eucariotas. Llevan a cabo una variedad de procesos metabólicos incluyendo reacciones del ciclo de los ácidos tricarbónicos, ensamble de los grupos hierro/azufre y la biosíntesis de muchos metabolitos celulares (Scheffler, 2000). Su más prominente función es suplementar energía a la célula generada por la fosforilación oxidativa (Saraste, 1999).

La cantidad de mitocondrias, el tamaño y su forma en las células eucarióticas varía enormemente, de acuerdo con su origen, función y estado metabólico, por ejemplo los hepatocitos o células héticas tienen el mayor número de mitocondrias (Whittaker y Mdanks, 1982; Voet y Voet, 2006). La forma de las mitocondrias varía de esférica a cilíndrica; las cilíndricas tienen de 2µm o más de diámetro y hasta 10 µm de longitud, mientras que las esféricas miden de 0.5 a 5 µm (Whittaker y Mdanks, 1982), pero la forma no es constante, se modifica continuamente en la célula (Nicholls, 1987) ya que son orgánulos muy dinámicos, pueden fusionarse para formar redes mitocondriales interconectadas o fragmentarse generando mitocondrias separadas. Se cree que estos procesos son un sistema de control de acuerdo con las necesidades metabólicas de la célula.

La mitocondria es inusual, ya que contiene dos membranas que separan cuatro compartimentos distintos, la membrana externa, espacio intermembrana, membrana interna y la matriz. La membrana interna está altamente plegada en forma de crestas, que alojan los complejos de la CTE y la F₁F₀-ATP sintasa que controlan los tipos básicos del metabolismo celular (McBride *et al.*, 2006).

Las membranas mitocondriales externa e interna difieren en su estructura, la superficie interna de la membrana interior se halla recubierta de partículas esféricas, espaciadas regularmente (diámetro 8.0 a 9.0 nm) y conectadas a la membrana por un estrecho vástago. Estas estructuras, semejantes a pomos, que al principio fueron llamadas partículas elementales, pero que ahora son conocidas como esferas de la membrana interna, no se hallan presentes en la superficie

exterior de la membrana interna ni en cualquiera de las dos superficies de la membrana externa. La membrana interna es prácticamente impermeable a sustancias polares e iónicas. El agua, el CO₂ y el O₂ son de las pocas moléculas que pueden atravesar libremente la membrana mitocondrial interna. La mayoría de las moléculas que atraviesan la membrana mitocondrial interna lo hacen únicamente por la mediación de proteínas transportadoras específicas. Esto permite el establecimiento del potencial transmembranal y evita pérdidas en el mismo debidas a la tendencia termodinámica de los iones a igualar las cargas eléctricas y su concentración en ambos lados de la membrana (Stryer, 2012).

La membrana interna contiene los citocromos *b*, *c*, *c*₁, *a* y *a*₃, la porción F₁ de la ATPasa, asociada con el mecanismo de la fosforilación oxidativa, así como ciertas deshidrogenasas. La membrana externa no contiene ninguno de estos componentes, pero posee enzimas características ausentes en la membrana interna, siendo las más características la mono amino-oxidasa, que es una flavoproteína que cataliza la oxidación de diversas monoaminas, tales como la adrenalina (Stryer, 2012). Es permeable a pequeñas moléculas e iones. La permeabilidad de esta membrana se atribuye a la presencia de una proteína transmembrana llamada porina la cual forma canales o poros. La función de esta proteína es formar un canal acuoso para el movimiento de metabolitos de naturaleza aniónica de hasta 10 kDa hacia adentro y afuera de la mitocondria. (Stryer, 2012)

La matriz contiene una amplia variedad de enzimas solubles, incluyendo las que son necesarias para la oxidación del piruvato y los ácidos grasos y para el ciclo de Krebs, parte de la cual se halla organizada en un retículo ligado, según parece, a la superficie interna de la membrana interna. La matriz experimenta enormes cambios de volumen y de organización durante los cambios de la actividad respiratoria. Contiene también ADN y ribosomas; estos últimos están a menudo localizados cerca de la porción de la membrana interna (Stryer, 2012).

1.5. Cadena de transporte de electrones (CTE)

La respiración celular está compuesta de una serie de reacciones mediante las cuales la célula degrada moléculas orgánicas y produce energía, con la participación del O₂ como aceptor final de los electrones provenientes de las oxidaciones de los nutrientes y la consecuente generación de ATP a partir de ADP y fosfato (Pi) (Der-Giezen, 2011).

Los electrones se transfieren a través de una serie de transportadores que constituyen la CTE, por medio de reacciones oxidación reducción del FADH₂ o NADH, antes de reducir el O₂ a H₂O (Nicholls, 1987; Voet y Voet, 2006). A medida que los electrones son transportados a lo largo de la cadena, se liberan protones hacia el espacio inter-membranal, posteriormente estos protones son utilizados en la generación del ATP (Tortora *et al.*, 2007).

La CTE es una parte fundamental de la fosforilación oxidativa y consiste en cuatro complejos proteicos independientes, de los cuales tres funcionan como bombas redox de electrones, acoplado el transporte de electrones a la translocación vectorial de protones que corresponden a los complejos I, III y IV, funcionan en paralelo si se consideran respecto al circuito de protones, mientras que respecto a la corriente eléctrica funcionan en serie, ya que cada complejo es independiente dentro de la membrana mitocondrial interna. La CTE también está constituida por dos moléculas móviles transportadoras de electrones. El primero es la coenzima Q (Q), conocido también como ubiquinona. La coenzima Q es un derivado de la quinona con una larga cola consistente en unidades isoprenoides de cinco carbonos que le brindan su carácter hidrofóbico, lo cual le permite difundir con gran rapidez en el interior de la membrana interna mitocondrial. El número de unidades de isopreno en la cola depende de la especie. En mamíferos, la forma más común contiene 10 unidades de isopreno (coenzima Q₁₀). Las quinonas existen en tres estados de oxidación. En el estado totalmente oxidado (Q), la coenzima Q presenta dos grupos ceto (Figura 2). La adición de un protón y un electrón origina la forma semiquinona (QH[•]). La forma semiquinona puede perder un protón para dar lugar al radical aniónico de la semiquinona (Q^{•-}). La adición de

un segundo protón y electrón da lugar al ubiquinol (QH₂), esta es la forma totalmente reducida de la coenzima Q, que retiene sus protones con más intensidad (Figura 2). Por lo tanto, en las quinonas, las reacciones de transferencia de electrones están acopladas a la unión y liberación de protones, una propiedad clave a la hora de transportar protones a través de la membrana. Debido a que la ubiquinona es soluble en la membrana, se cree que en la membrana interna mitocondrial existe una reserva de Q y QH₂, llamada reserva Q. En contraste con Q, el segundo transportador electrónico especial es una proteína. El citocromo c es una proteína pequeña y soluble que oxida al Q: citocromo c oxidorreductasa (complejo III) y transfiere los electrones reduciendo al citocromo c oxidasa (complejo IV), el componente final de la cadena que cataliza la reducción del O₂. (Roskoski, 2003; Cano-Estrada, 2011; Stryer, 2012).

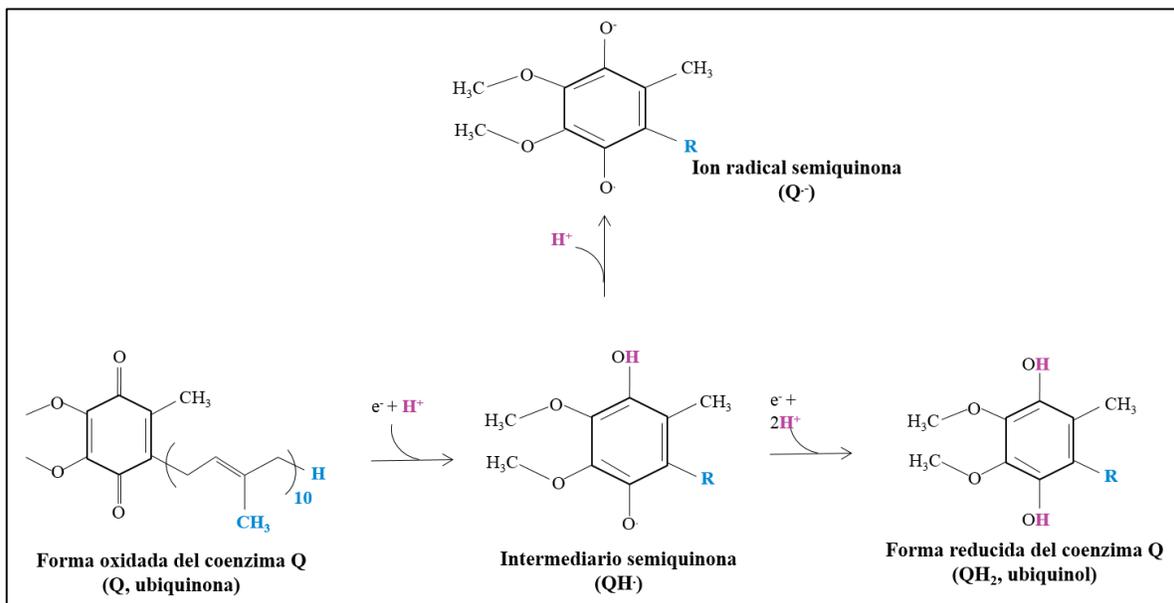


Figura 2. Estados de oxidación de las quinonas. La reducción de la ubiquinona (Q) a ubiquinol (QH₂) se realiza a través de un intermediario semiquinona (QH[•]). Tomado de Stryer, 2012.

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

complejos I, II y III) y los grupos hemo (en los complejos II, III y IV) (Roskoski, 2003).

Cada complejo acepta o dona electrones a la coenzima Q y el citocromo c. Cada acarreador de la CTE puede recibir electrones de un donador y subsecuentemente pueden donarlos al siguiente acarreador de la cadena, finalmente se combinan con el aceptor final de electrones, el oxígeno molecular, que al reducirse forma agua (Der-Giezen, 2011; Hulbert *et al*, 2007). Con la excepción de la coenzima Q, todos los miembros de esta cadena son proteínas (Der-Giezen, 2011).

1.6. Especies reactivas de oxígeno (ERO) y estrés oxidativo

El término "radicales libres" se utiliza para denotar cualquier átomo o molécula con uno o más electrones desapareados en su capa externa (Finaud, 2006). Su vida es muy corta porque va desde nanosegundos a milisegundos. Los radicales libres pueden mediar el daño celular mediante la extracción de electrones de una molécula estable en un intento de aparear sus propios electrones, dejando así la molécula original en un estado inestable (Halliwell, 2007). En biología, el término tiende a la asignación de connotaciones negativas, ya que los radicales libres se asocian con alta reactividad indiscriminada que puede conducir al daño molecular. La teoría de los radicales libres del envejecimiento se basa en esta premisa (Finaud *et al.*, 2006). Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son moléculas pequeñas, generalmente de corta duración y altamente reactivas, formadas por la reducción incompleta de un electrón de oxígeno. Se producen en niveles bajos durante las condiciones fisiológicas normales y son eliminados por los sistemas antioxidantes endógenos.

El oxígeno molecular (dioxígeno) tiene una configuración electrónica única y es un radical. La adición de un electrón a dioxígeno forma el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) considerado como la especie "primaria" de las ERO. Puede interactuar con otras moléculas para generar ERO "secundarias", que son más agresivos, ya sea directamente o predominantemente a través de procesos

catalizados por enzimas como un subproducto de la respiración en las mitocondrias o se sintetizan enzimáticamente por la NADPH oxidasa (NOX) y las oxidasas duales (DUOX) (Suh *et al.*, 1999; Edens *et al.*, 2001). Las ERO incluyen radicales libres, tales como el superóxido, el radical hidroxilo; peróxidos, tales como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Varias vías de formación de ERO se resumen en la figura 3. Las concentraciones en "estado estable" son determinadas por el equilibrio entre sus tasas de producción y sus tasas de eliminación por varios antioxidantes. (1) El radical O₂⁻ es formado por el proceso de reducción de oxígeno molecular mediado por las NADPH oxidasas y la xantina oxidasa; (2) el radical O₂⁻ es dismutado por la superóxido dismutasa (SOD) a H₂O₂; (3) el H₂O₂ se elimina de manera más eficiente por la enzima glutatión peroxidasa (GPx), que requiere el glutatión reducido (GSH) como el donador de electrones; (4) el glutatión oxidado (GSSG) se reduce de nuevo a GSH por la enzima glutatión reductasa (GR), que utiliza NADPH como donante de electrones; (5) algunos metales de transición (por ejemplo, el Fe²⁺) hace que el peróxido de hidrógeno se convierta a radical hidroxilo (reacción de Fenton); (6) el radical O₂⁻ puede reaccionar con el óxido nítrico (NO) para producir peroxinitrito (ONOO⁻) (Filaire y Toumi, 2012).

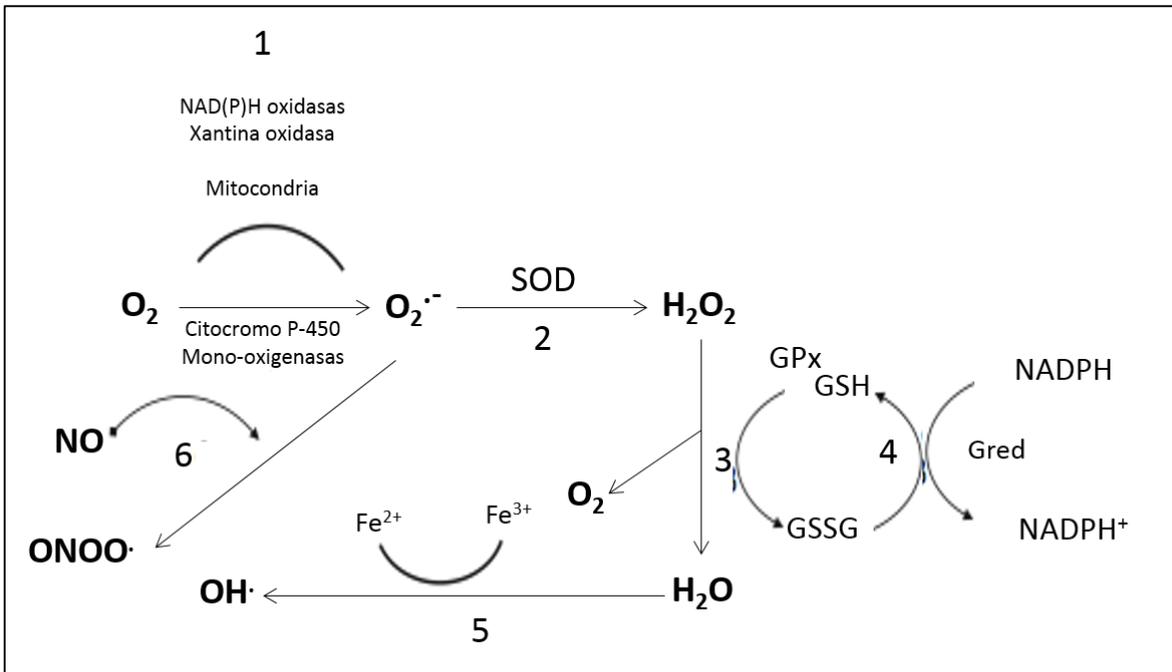


Figura 3. Vías de formación de ERO. Tomada de Filaire y Toumi, 2012.

La CTE mitocondrial es una de las fuentes importantes de ERO en eucariontes durante el metabolismo. De acuerdo con algunos estudios *in vitro*, el complejo III de la CTE es responsable de más del 80% de las ERO producidas en la levadura (Richter, 1988).

Los complejos I y III de la CTE son los sitios principales de producción de ERO (Turrens y Boveris, 1980; Sugioka *et al.*, 1988; Cortés-Rojo, 2006). La inhibición del complejo I por rotenona bloquea el sitio de unión del ubiquinol, el aceptor de electrones del complejo I (Okun *et al.*, 1999), esto aumenta la reducción del sitio NADH deshidrogenasa del complejo lo que provoca aumento en la fuga de electrones y en consecuencia incrementa la generación de ERO (Turrens y Boveris, 1980). La fuga de electrones en el sitio de NADH deshidrogenasa en el complejo I se encuentra en el lado de la matriz de la membrana mitocondrial interna (Grigorieff, 1999). Por lo tanto, en las mitocondrias, la producción de ERO por el complejo I es probable que sea dirigido a la matriz y desintoxicado por los sistemas de defensa antioxidantes (Figura 4) (Chen *et al.*,

2003). Complejo III es un sitio clave para la generación de ERO. El complejo III tiene dos centros que puede producir ERO: el centro Q_o , orientado hacia el espacio intermembranal y el centro Q_i , orientado hacia la matriz mitocondrial. El $O_2^{\cdot-}$ producido en el centro Q_o se libera en el espacio intermembranal (St-Pierre *et al.*, 2002; Gille y Nohl, 2001; Han *et al.*, 2003), mientras el $O_2^{\cdot-}$ generado en el centro Q_i se libera hacia la matriz (Figura 4). La Antimicina A inhibe el complejo III en el centro de Q_i y aumenta la generación de $O_2^{\cdot-}$ del centro Q_o (Demin *et al.*, 1998a; Demin *et al.*, 1998b). La estigmatelina y el mixotiazol bloquean el transporte de electrones en el complejo III en el centro Q_o (Trumpower, 1990) que conduce a una disminución de la producción de ERO inducida por antimicina A. En mitocondrias aisladas, el complejo II puede generar $O_2^{\cdot-}$ o H_2O_2 a velocidades elevadas cuando se evita la reoxidación de la Q a través de los complejos I y complejo III y cuando la concentración de succinato es baja (Quinlan *et al.*, 2012).

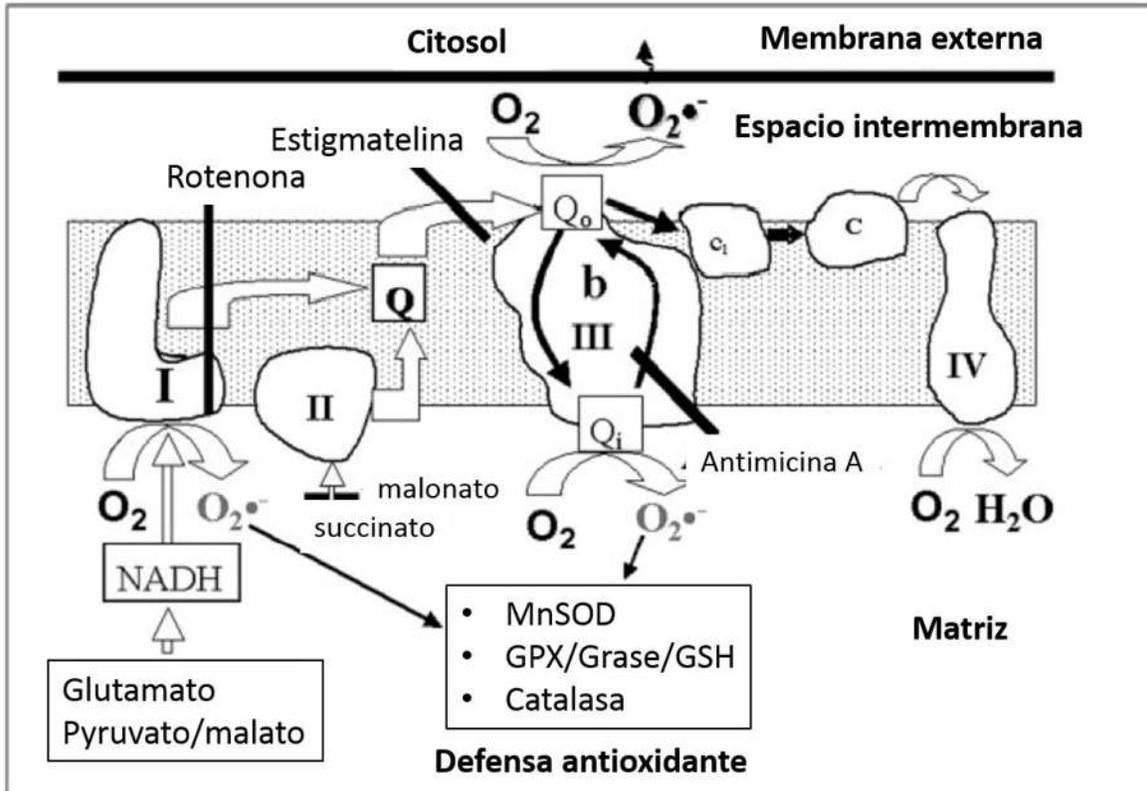


Figura 4. Representación de la CTE que muestra los sitios de producción de ERO. El complejo I (sitio NADH deshidrogenasa) y el sitio Q_i del complejo III liberan ERO hacia la matriz a las defensas antioxidantes. Se muestran las defensas antioxidantes de la matriz, la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD), el glutatión (GSH), la glutatión peroxidasa (GPX) y la glutatión reductasa (GRase). En contraste, el sitio Q_o del complejo III libera ERO hacia el espacio intermembranal. Tomada de Chen *et al.*, 2003.

Las mitocondrias se han considerado tradicionalmente como la principal fuente de ERO intracelulares, pero otros sistemas enzimáticos, como las NADPH oxidasas (NOX), el citocromo P-450, la ciclooxigenasa, la aldehído oxidasa, la dihidroorotato deshidrogenasa, la triptófano dioxigenasa, la óxido nítrico sintasa y la xantina oxidasa, también contribuyen a la producción de ERO (Finaud *et al.*, 2006).

Si la concentración de ERO sobrepasa la capacidad celular para eliminarlas, se produce un estado de estrés oxidativo. La acumulación de ERO dentro de las mitocondrias afecta la funcionalidad de este orgánulo debido a

mutaciones del ADN mitocondrial , a un aumento en la peroxidación de lípidos y a la apertura de canales de la membrana mitocondrial, incluyendo el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP) y el canal de aniones de membrana interna (Lemasters *et al.*, 1998).

Para contender con el estrés oxidativo y proteger los componentes celulares al mantener un adecuado ambiente redox dada la inherente exposición a las ERO, los organismos constantemente detectan y se adaptan a cualquier perturbación mediante distintos sistemas de defensa antioxidantes conformados por sistemas enzimáticos y no enzimáticos (Folch-Mallol *et al.*, 2004).

1.7. La peroxidación de lípidos en el proceso de envejecimiento

La peroxidación de lípidos puede ser descrita generalmente como un proceso en el cual las ERO atacan lípidos que contienen más de un doble enlace carbono-carbono(s), que implican la abstracción de hidrógeno de un carbono, con la inserción de oxígeno resultante en los radicales peroxilo e hidroperóxidos de lípidos. (Rice-Evans y Burdon, 1993). Los hidroperóxidos lipídicos son una de las ERO más tóxicas, ya que su descomposición resulta en varios productos secundarios reactivos, tales como radicales libres, el 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) o el malondialdehído (MDA). Los lípidos de membrana son particularmente susceptibles a la peroxidación. Las membranas forman la base de muchos orgánulos celulares como la mitocondria, el retículo endoplásmico, los lisosomas, los peroxisomas. Por lo anterior, el daño causado por peroxidación de lípidos es altamente perjudicial para el funcionamiento de la célula y su supervivencia (Raha y Robinson, 2000).

La presencia de ácido grasos poliinsaturados (AGPI) en los fosfolípidos de las membranas biológicas es la base de su fluidez. La peroxidación de lípidos disminuye la fluidez de la membrana, altera sus propiedades y disminuye la resistencia eléctrica. El proceso general de la peroxidación lipídica consta de tres pasos: iniciación, propagación y terminación (Kanner *et al.*, 1987; Girotti, 1998; Yin *et al.*, 2011).

En la etapa de iniciación de la peroxidación lipídica (Figura 5), las ERO abstraen un átomo de hidrogeno del grupo metileno de un lípido insaturado (LH), lo que genera un radical lipídico (L^{\cdot}) que se estabiliza por reordenamiento molecular para producir un dieno conjugado (Figura 5, (1)).

En la fase de propagación, los radicales L^{\cdot} reaccionan rápidamente con el oxígeno para formar un radical peróxido lípido (LOO^{\cdot}), (2) que abstrae un hidrógeno de otra molécula de lípido para generar un nuevo radical L^{\cdot} , que continúa la reacción en cadena, e hidroperóxido de lípidos (LOOH) (3). Estos radicales pueden extraer átomos de hidrógeno de otras moléculas de lípidos (LH) para convertirse en LOOH. Cuando L es formado a partir del segundo LH, la peroxidación lipídica e propaga. El LOOH puede ser degradado por la reacción de Fenton en presencia de Fe^{2+} a otro radical LOO^{\cdot} . El LOO^{\cdot} es inestable y se descompone para formar diversos MDA y 4-HNE. En la reacción de terminación, los antioxidantes como la vitamina E donan un átomo de hidrógeno a LOO^{\cdot} formando una radical que reacciona con otro LOO^{\cdot} formando productos no radicales (4) (Figura 5). (Yin *et al.*, 2011; Ayala *et al.*, 2014).

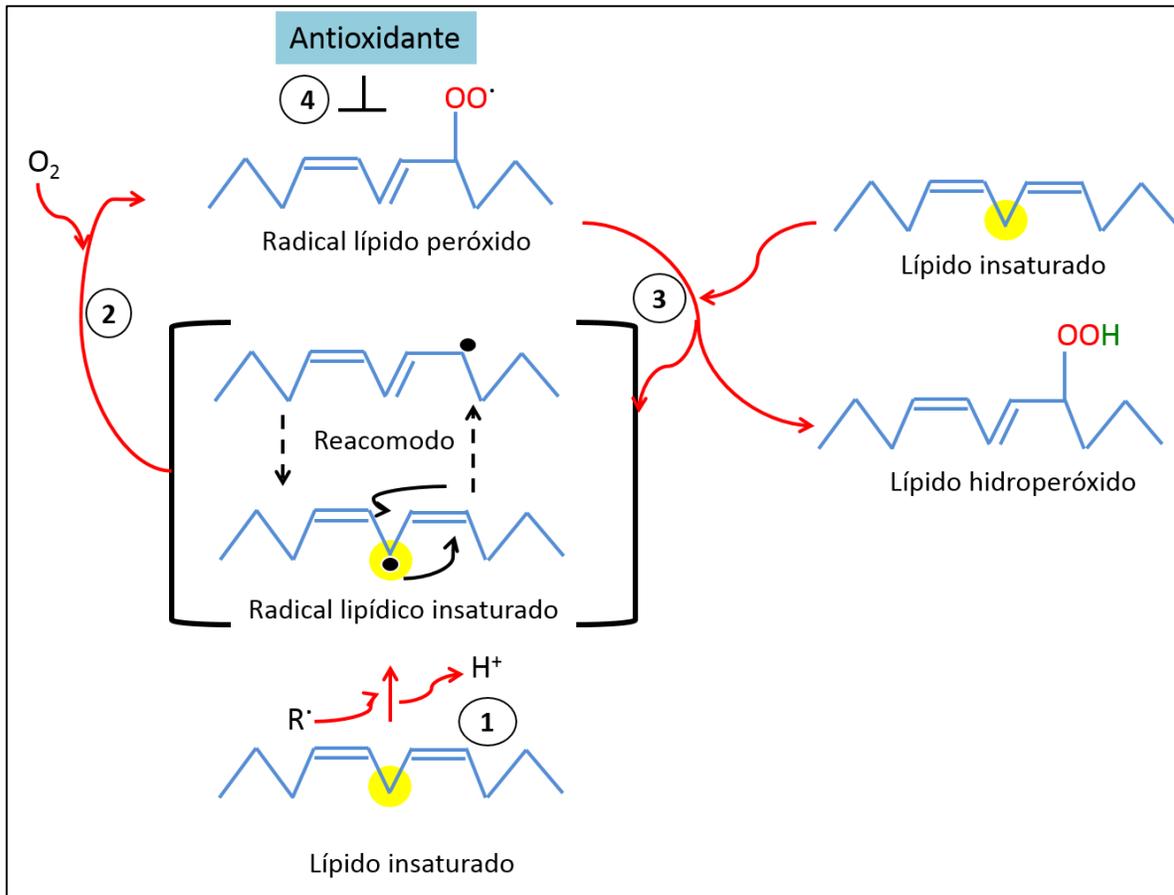


Figura 5. Proceso de peroxidación lipídica. En la iniciación, los prooxidantes abstraen el hidrógeno alílico formando un radical lípido; el radical de carbono tiende a ser estabilizado por un reordenamiento molecular para formar un dieno conjugado (paso 1). En la fase de propagación, el radical lípido reacciona rápidamente con el oxígeno para formar un radical lípido peróxido (paso 2) que abstrae un hidrógeno de otra molécula lipídica generando un nuevo radical lípido e hidroperóxidos de lípidos (paso 3). En la reacción de terminación, los antioxidantes donan un átomo de hidrógeno a las especies de radicales lípido peróxidos resultando en la formación de productos no radicales (paso 4). Tomado de Ayala *et al.*, 2014

La composición de los ácidos grasos de las membranas celulares juega un papel muy importante en la peroxidación lipídica y puede intervenir en la determinación de la longevidad máxima. Así, un menor grado de insaturación de los ácidos grasos en las membranas, particularmente en la membrana mitocondrial interna, podría ser ventajoso y resultar en una disminución en su sensibilidad a la peroxidación lipídica (Cortés-Rojo, 2009a).

Diversas investigaciones han identificado a la peroxidación de lípidos como uno de los principales factores de daño de la CTE por ERO. El incremento en la formación mitocondrial de ERO puede resultar de los efectos de las ERO sobre los ácidos grasos de membrana a través de alteraciones en la CTE (Cortés-Rojo, 2009b).

El grado de insaturación de los ácidos grasos hace variar la susceptibilidad de la membrana a la peroxidación de un modo directamente proporcional al número de dobles enlaces presentes en las grupos ácido de los fosfolípidos (Hulbert, 2010). En relación con lo anterior, se ha observado que el aumento en el grado de insaturación de las membranas mitocondriales de la levadura incrementa la susceptibilidad de la CTE a la inhibición por ERO, lo cual a su vez tiene un efecto negativo en la célula ya que esto ha sido asociado con una mayor pérdida de viabilidad de la levadura en presencia de AGPI (Cortés Rojo *et al.*, 2009a, 2009b).

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

1.8. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio

Se ha probado la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como un modelo valioso para la comprensión de los procesos celulares básicos en humanos por primera vez en 1959, era difícil aceptar que un organismo unicelular tan simple podría proporcionar información sobre el envejecimiento humano, que es uno de los fenómenos biológicos más complejos. Si bien es cierto que el envejecimiento es multifactorial, hay una creciente conciencia de que todos los eucariontes poseen vías de longevidad sorprendentemente conservadas que rigen el ritmo de

envejecimiento (Bitterman *et al.*, 2003).

Las razones para el uso de la levadura como un modelo del envejecimiento, es su facilidad de manipulación genética, que su genoma ha sido secuenciado y su tiempo corto de generación. Pero estas razones pueden no ser suficientes. La razón es que el envejecimiento es diferente de otros procesos biológicos básicos, ya que es probable que no sea adaptativo (es decir, no otorga beneficios a la especie) (Kirkwood y Holliday, 1979). Una segunda razón para esperar algo de conservación entre el envejecimiento de levaduras y humanos, es que tienen la misma biología fundamental.

Muchos investigadores han propuesto que el envejecimiento en células humanas en división puede ser fundamentalmente diferente al envejecimiento de células que permanecen en un estado post-mitótico. Del mismo modo, para *S. cerevisiae* se hace una distinción entre el envejecimiento de las células mitóticas y las que están en fase estacionaria. Los primeros estudios de envejecimiento de levadura se publicaron hace más de 50 años, en el que se mostró que las células de levadura tienen una capacidad replicativa finita (Mortimer, 1959).

El tiempo de vida replicativa de la levadura se define como el número de divisiones que una célula de levadura lleva a cabo antes de morir (Figura 6) (Kaeberlein *et al.*, 2007). Una característica atractiva de *S. cerevisiae*, a diferencia de muchos otros eucariotas simples, es que la célula progenitoras se distingue fácilmente de sus descendientes porque la división celular es asimétrica: una célula "hija" recién formado es casi siempre menor que la célula "madre" que dio origen a la misma. Las células madre de la levadura se dividen unas 20 veces antes de morir, y como se describe a continuación, se someten a cambios característicos estructurales y metabólicas a medida que envejecen (Bitterman *et al.*, 2003).

Un segundo modelo de envejecimiento ha sido más recientemente desarrollado en la levadura, "tiempo de vida cronológico", también denominado como "supervivencia post-diauxica," es la longitud de tiempo que una población de

células de levadura permanece viable en un estado que no se dividen después de la privación de nutrientes (Figura 6) (Longo *and* Fabrizio, 2002; Kaeberlein *et al.*, 2007). Las células de levadura cultivadas en un medio rico en nutrientes se multiplican hasta que todos los nutrientes se agotan. En este punto, las células dejan de dividirse y entran en un estado post-diauxico, estado hipo-metabólico conocido como fase estacionaria, donde pueden permanecer viables por semanas. En medio sintético, las células agotan el medio y cesan de dividirse, sin embargo, mantienen relativamente alto su metabolismo (Longo y Fabrizio, 2002). Asimismo, su cultivo por periodos prolongados se ha considerado un modelo del proceso de envejecimiento de tejidos post-mitóticos de mamíferos (MacLean *et al.*, 2001).

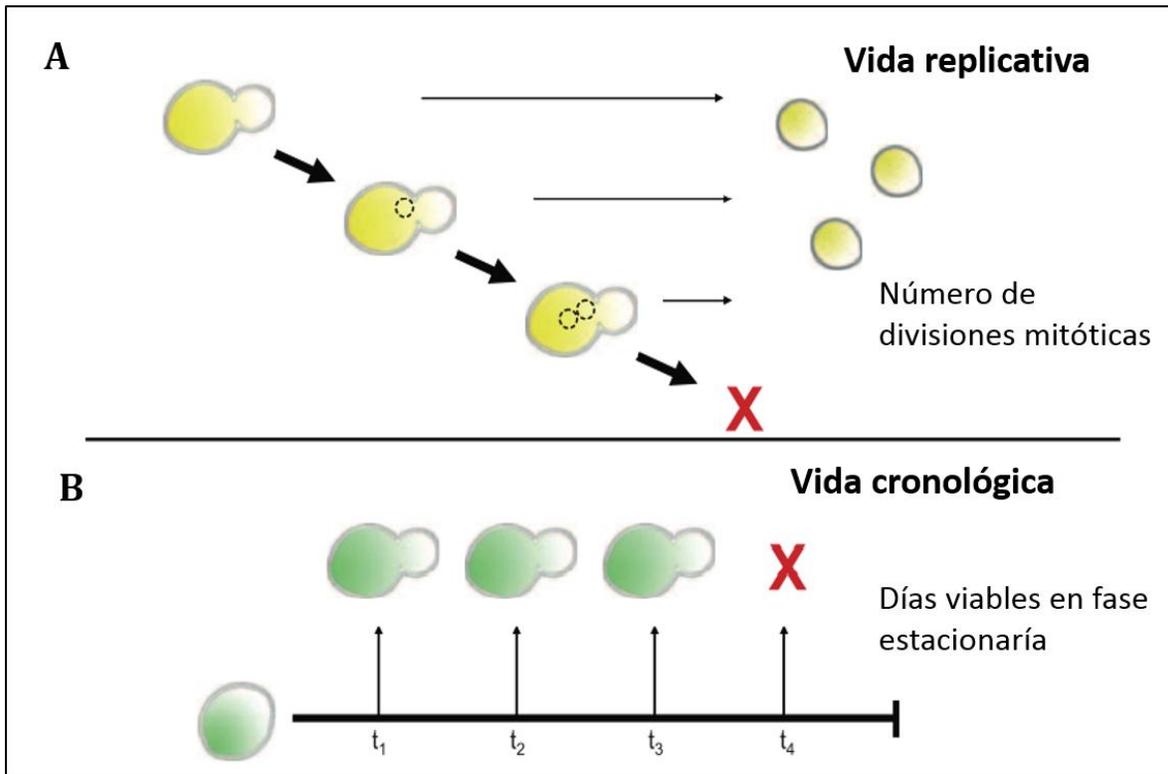


Figura 6. Esquema de envejecimiento cronológico y replicativo de *S. cerevisiae*. (A) La vida replicativa en la levadura se mide por el número de divisiones mitóticas que pueden surgir a partir de una sola célula madre. La viabilidad replicativa se calcula como la media del número de hijas producidas a partir de madres de un fondo cepa particular antes de la senescencia. (B) La vida cronológica se mide por la longitud del tiempo en que las células en un cultivo estacionario puede permanecer viable. La viabilidad es calculada por la fracción de cultivos capaz de volver a entrar en el ciclo celular después de un extendido estado quiescente. Tomado de Kaeberlein *et al.*, 2007.

1.9. Fosfolípido Hidroperóxido Glutati6n Peroxidasa

En los organismos aerobios, las ERO se forman constantemente por la reducci6n incompleta del ox6geno molecular y son degradadas por el mecanismo de las defensas antioxidantes. Las ERO son altamente t6xicas para la c6lula, causando severos da1os a las biomol6culas: Prote6nas, ADN y l6pidos. Cuando los l6pidos de membrana son expuestos a las ERO, se someten a la peroxidaci6n, que genera fosfol6pidos oxidados. La descomposici6n de los l6pidos hidroper6xidos resulta en la formaci6n de electr6filos reactivos, incluyendo 4-hidroxi-2-nonenal, que covalentemente modifica ADN y prote6nas. Por lo tanto, es importante la eliminaci6n de l6pidos hidroper6xidos para la protecci6n de macromol6culas del da1o oxidativo. Los sistemas de defensa enzim6ticos contra el da1o causado por las ERO, son el ciclo redox del glutati6n, el ciclo de tiorredoxina y catalasa. El glutati6n peroxidasa (GPx) cataliza la reducci6n de H₂O₂ o hidroper6xidos org6nicos a H₂O y correspondientes alcoholes, respectivamente, usando glutati6n como reductor. La mayor6a de los eucariotas expresan la familia de prote6nas GPx, incluyendo ocho GPxs en humanos (GPx1-GPx8), ocho en rat6n (GPx1-GPx8), una en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (PHGPx) y tres en la levadura *S. cerevisiae* (Gpx1p-Gpx3p) (Imai y Nakagawa, 2003; Toppo *et al.*, 2008).

La familia de glutati6n peroxidosas abarca tres GPX tetram6ricas y la PHGPx monom6rica. Aunque la similitud entre la secuencia completa de las enzimas tetram6ricas y PHGPx es menor del 30%, existe una similitud pronunciada en los grupos involucrados en la triada catal6tica (glutamina, selenociste6na y tript6fano) esta ha sido definida por datos estructurales y cin6ticos (Urisini *et al.*, 1997). Las GPX y la PHGPx contienen un sitio activo con selenociste6na que participa en la reducci6n en dos electrones de los per6xidos a alcoholes. Hay muchas diferencias entre PHGPx y GPxs. La mayor diferencia es estructural, las PHGPx es un mon6mero de 20-22 kDa, mientras las otras GPxs son tetr6meros de 85 kDa. Adem6s de ser el 6nico GPx que utiliza fosfol6pidos hidroper6xidos como sustratos, PHGPx puede reaccionar con H₂O₂ y un amplio

rango de lípidos hidroperóxidos, incluyendo a los derivados del colesterol y ésteres de colesterol. PHGPx puede también reducir hidroperóxidos de timina. La distribución subcelular, y la secuencia de aminoácidos (sólo, 30% de similitud) (Brigelius-Flohe *et al.*, 1994). También exhiben notables diferencias en la reactividad a peróxidos. La PHGPx se ha identificado en varios tejidos de mamíferos, donde pueden estar solubles y unidas a la membrana (Roveri *et al.*, 1994).

Hay dos formas de PHGPx: una forma mitocondrial (L-PHGPx; 23 kDa), y una forma no mitocondrial (S-PHGPx; 20 kDa). La L-PHGPx, que contiene una secuencia líder de 27 aminoácidos que se requiere para el transporte a la mitocondria (Pushpa-Rekha *et al.*, 1995; Arai *et al.*, 1999), se encuentra en el espacio intermembranal de la mitocondria. Las actividades más altas se han observado en los sitios en contacto de membranas externa e interna de la mitocondria (Godeas *et al.*, 1994). La S-PHGPx está presente en el citosol, donde se asocia con la membrana plasmática, nuclear y de otros orgánulos (Ursini *et al.*, 1985). La forma L de la PHGPx es más eficaz que la forma S en la prevención de la muerte celular causada por ERO (Imai *et al.*, 1996; Nomura *et al.*, 1999). Por ello se considera como una enzima clave en la defensa contra el daño oxidativo de las biomembranas.

S. cerevisiae tiene tres homólogos de la glutatión peroxidasa: GPX1, GPX2, y GPX3 (Inoue *et al.*, 1999). Dos homólogos estructurales de GPxs de mamíferos, Gpx2 y GPX3 de *S. cerevisiae*, se han encontrado que son atípicas 2-Cys peroxirredoxinas (Delaunay *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2005). La identidad entre GPx de mamíferos y GPx homólogas de levadura es de aproximadamente 36%. Por otro lado, la identidad entre los homólogos de la levadura es mayor en comparación con GPx de mamíferos, y los valores son 53% entre Gpx1p y Gpx2p, 58% entre Gpx1p y Gpx3p, y 74% entre Gpx2p y Gpx3p (Inoue *et al.*, 1999). El peso molecular de una subunidad de GPXS de mamíferos es de aproximadamente 22 kDa, y las enzimas consisten en un homotetrámero. Los pesos moleculares de Gpx1p, Gpx2p, y Gpx3p en *S. cerevisiae* son 19,483.68,

18,405.25 y 18,640.61 kDa, respectivamente, que son más pequeñas que las de las enzimas de mamíferos. Los niveles de expresión basal del gen GPX3 es alta en comparación con los de otros dos genes GPXs, y su expresión no es inducida por ningún estrés ambiental. Mientras que los niveles de expresión del gen GPX1 aumentan en las condiciones de privación de glucosa y los de GPX2 por estrés oxidativo (Inoue *et al.*, 1999).

La GPX3 es una fosfolípido peroxidasa dependiente de glutatión (PHGPx) que específicamente destoxifica los fosfolípido peróxidos (Avery y Avery, 2001). Otra función propuesta para Gpx3 es que participa en la vía de respuesta al estrés oxidante y se une al factor de transcripción Yap1p (Delaunay *et al.*, 2002). Tras la acumulación de H₂O₂, el residuo Gpx3-Cys36 se oxida a un ácido sulfénico (Cys-SOH) y luego se forma un enlace disulfuro con YAP1-Cys598. Este enlace disulfuro se resuelve en un enlace disulfuro intra molecular YAP1 Cys310-Cys598, dejando un Gpx3-Cys36 reducido listo para el siguiente ciclo de detección de señal. Cuando disminuye el estrés oxidativo, la tiorredoxina Trx2 puede desactivar esta vía de transducción de señal mediante la reducción tanto de Gpx3 y Yap1. En experimentos *in vivo*, se ha demostrado que es más probable que Gpx3 sea un sensor oxidativo y transductor de señal, más que un eliminador de hidroperóxidos (Delaunay *et al.*, 2002).

La expresión de GPX1 se induce cuando células que están en crecimiento logarítmico en medio con 2% de glucosa se transfieren a medio deficiente en glucosa. Los niveles de Gpx1 son altos durante el cambio diáuxico (37-49 h), y se mantiene constante en el cambio post-diáuxico (61-73 h) (Ohdate *et al.*, 2010). Gpx1 está presente en el citoplasma, peroxisomas y mitocondrias de células cultivadas en medio con ácido oleico. Gpx1 se encuentra en la matriz peroxisomal y restaura la formación de peroxisomas. GPX1 funciona como enzima antioxidante en los peroxisomas, en el sistema tiorredoxina y el sistema de glutatión (Ohdate y Inoue, 2012).

De los genes GPX, la expresión de GPX2 es inducida específicamente por

el estrés oxidativo a través de los factores de transcripción Yap1p y Skn7p (Inoue *et al.*, 1999; Tsuzi *et al.*, 2004).

Entre las GPXs de mamíferos, sólo PHGPx/GPx4 (fosfolípido hidroperóxido GPx) es capaz de reducir glicerofosfato hidroperóxidos y Gpx2 en *S. cerevisiae* es el ortólogo de PHGPx / GPx4 (Tanaka *et al.*, 2005). En la reacción peroxidasa que lleva a cabo Gpx2, el grupo sulfhidrilo del sitio activo Cys se oxida inicialmente a ácido sulfónico. Gpx2 tiene cuatro residuos de Cys. El peso molecular de Gpx2 es de 18,406 Da. Gpx2 se encuentra en la mitocondria y el citoplasma en células de levadura. En la mitocondria, Gpx2 existe ya sea en la membrana externa orientada hacia el citoplasma, en la superficie de la membrana interna orientada hacia el espacio intermembranal y en la matriz mitocondrial. Gpx2 no es una proteína integral de membrana, sino que se encuentra asociada con la membrana externa a través de una interacción iónica por lo cual Gpx2 es una proteína periférica de membrana (Ukai *et al.*, 2011).

II. JUSTIFICACIÓN

Considerando que en trabajos previos, la incorporación de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas mitocondriales de *S. cerevisiae*, disminuye la supervivencia de las levaduras, debido a un incremento masivo en la sensibilidad a la peroxidación de lípidos causando un exacerbado daño en la función de la cadena de transporte de electrones y un elevado incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno mitocondriales durante estados tempranos del envejecimiento. Mientras que la pérdida de ácidos grasos poliinsaturados, puede ser el resultado de un incremento en la peroxidación de estos ácidos grasos, que probablemente ocurra entre la fase logarítmica y durante los primeros días de la fase estacionaria, ya que después de que ocurre la fase temprana de la peroxidación de lípidos, es posible la activación de algún mecanismo de respuesta adaptativa en la levadura que detenga la pérdida de ácidos grasos poliinsaturados y disminuya la propagación del daño de las membranas. Por lo cual es necesario estudiar si después de la peroxidación de lípidos realmente se activa un mecanismo de respuesta antioxidante, es altamente probable que sean las enzimas fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasas que puedan contrarrestar o disminuir los daños de las membranas.

III. HIPÓTESIS

Las fosfolípido hidroperóxido glutati3n peroxidasas (PHGPx) preservan la funci3n mitocondrial de c3lulas envejecidas de *Saccharomyces cerevisiae*.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar la funci3n de las Fosfolípido Hidroperóxido Glutati3n Peroxidasa (PHGPx) en la preservaci3n de la funci3n mitocondrial en c3lulas envejecidas de *S. cerevisiae*.

4.2. Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto del ácido linolénico en la viabilidad de c3lulas envejecidas en las mutantes PHGPx.
2. Evaluar la influencia de las PHGPx en la p3rdida de la funci3n mitocondrial inducida por ácido linolénico en c3lulas envejecidas.
3. Estudiar el papel de las PHGPx en la formaci3n de ERO en c3lulas envejecidas de la levadura.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos

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

5.2. Material biológico

En este trabajo se utilizaron las siguientes cepas: Como cepa control o nativa la BY4741 (*Mat a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0*) de *Saccharomyces cerevisiae*; y las mutantes *gpx1Δ* (*Mat a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YKL026c::kanMX4*), *gpx2Δ* (*Mat a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YBR244w::kanMX4*) y *gpx3Δ* (*Mat a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YIR037w::kanMX4*) de *S. cerevisiae*, estas se caracterizan por la por la interrupción de los genes Gpx1, Gpx2 y Gpx3 con un cassette de resistencia a kanamicina. Las cepas fueron adquiridas de Euroscarf (Frankfurt, Alemania).

5.3. Determinación de la mutación de los genes Gpxs en *S. cerevisiae*

Para verificar la mutación de los genes Gpxs, alícuotas de 20-50 μ L de una suspensión de cada cepa almacenada a -80 °C, se inocularon en 1 ml de medio YPD (Extracto de levadura 1%, Peptona 2% y Dextrosa 2%) con agitación a 30 °C durante 12 h. Posteriormente de cada cultivo se tomaron 500 μ l y se plaquearon en cajas Petri con agar YPD, se incubaron durante 24 h a 30 °C. Las colonias aisladas se plaquearon en medio agar YPD con geneticina (150 μ g/ml) y se incubaron durante 24 h a 30 °C. Posteriormente, se crecieron las levaduras en 3 ml de medio YPD 2% toda la noche, se cosecharon las células en tubos eppendorff de 1.5 ml centrifugando a 13000 rpm durante 1 minuto y se decantó el sobrenadante. Después, se adicionaron 0.3 g de perlas de vidrio estériles, 200 μ L de solución de lisis celular (Tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-Cl 10

mM pH 8.0 y Na₂EDTA 1 mM), 200 µL de una mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) preparado en fresco, los tubos se agitaron durante 5 min en un agitador Vortex. Se añadió 200 µL de buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM) y se centrifugó a 17949 g durante 5 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorff nuevo, se le añadió 1 ml de etanol 100% mezclando por inversión y después se centrifugó a 17949 g durante 10 min. Se decantó el sobrenadante y se re suspendió en 400 µL de buffer TE, se añadió 3 µL de ARNasa y se incubó durante 20 min a 37 °C. Se agregó 10 µL de acetato de amonio 4 M y 1 ml de etanol 100% a -20 °C durante 20 min y se procedió a centrifugar a 17949 g durante 10 min. Se decantó el sobrenadante y los precipitados de ácidos nucleicos se secaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en 50 µL de buffer TE. El ADN obtenido en cada precipitado se mantuvo en refrigeración a -20 °C hasta su uso. Para verificar las mutaciones de cada gen, se diseñaron los siguientes oligonucleótidos: *GPX1F*, 5-CCGCTCGAGA- TGCAAGAATTTTATTC-3' y *GPX1R*, 5-CGCGGATCCTTAAATCTGTTCTTCTGG-3'; *GPX2F*, 5-CCGCTCGAGATGACCACATCTTTT-3 y *GPX2R* 5-CGCGGATCCC-ATTTACTTAACAGG-3'; *GPX3F*, 5-CCGCTCGAGATGTCAGAATTCTAT-3' y *GPX3R* 5-CGCGGATCCCTATTCCACCTCTTTC-3'.

Posteriormente se hizo una reacción de amplificación de ADN (PCR) con los oligonucleótidos de anclaje: En un tubo Eppendorf de 200 µL, se adicionaron 45 µL de Platinum® PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen), 1 µL de los oligos (*GPX1F*, *GPX2F* y *GPX3F*), 1 µL de los oligos (*GPX1R*, *GPX2R* y *GPX3R*), 1 µL de ADN y 2 µL de agua destilada estéril, para tener un volumen total de 50 µL. Los tubos se colocaron en el termociclador MultiGene OptiMax® Thermalcycle bajo las siguientes condiciones. Un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 2 min seguido por 35 ciclos, cada ciclo consistió de un paso de desnaturalización a 94°C por 30 seg, un paso de alineamiento a 60 °C para *GPX1*; 54 °C para *GPX2* y 56 °C para *GPX3* por 30 seg. Y un paso de extensión a 68°C por 1 min, con una extensión final a 72 °C por 10 min. Después de la amplificación, los productos fueron almacenados a 4 °C hasta su uso. Para verificar la presencia o ausencia de productos de PCR, se hicieron electroforesis en geles de agarosa (1%) para ADN,

la agarosa se disolvió en amortiguador TAE (Tris-Acetato 0.04 M y EDTA 0.001 pH 8). Los geles se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal Mini-Sub® Cell GT BIO-RAD®, sumergidos en amortiguador TAE. Las muestras se mezclaron con azul de bromofenol en solución de glicerol al 30%, colocándose posteriormente en los pozos del gel. Y el corrimiento electroforético se hizo con un voltaje de 120 a 130 voltios de 20 a 30 min. Luego, el gel fue teñido con bromuro de etidio al 0.01% durante 30 min, las bandas de ADN se observaron en un transiluminador de luz UV (Molecular Imager® Gel Doc TM XR+ system, BIO-RAD)

5.4. Cinéticas de crecimiento

Las curvas de crecimiento se realizaron en medio líquido YPD. Se inocularon matraces de 250 ml con 50 ml de medio, con un precultivo de 3 ml crecido 12 h, tomando el volumen adecuado para partir de una densidad óptica (D.O.) a 600 nm =0.1, medida en un espectrofotómetro UV/vis Perkin-Elmer Lambda 18, incubados en agitación a 180 rpm y 30 °C; tomando muestras de 1 ml cada 2 h partiendo de las 0 h, donde se graficó la D.O. a 600 nm vs. tiempo.

5.5. Cultivo de células de *S. cerevisiae* e inducción del envejecimiento

A partir de las cepas almacenadas en cajas Petri con medio YPD y agar 2% y en refrigeración, se tomó una asada de la cepa BY4741 y las mutantes *Gpx1Δ*, *Gpx2Δ*, *Gpx3Δ* y se inocularon en cultivos primarios (precultivo) de YPD líquido, estos se incubaron a temperatura ambiente a 180 rpm durante 12 h. Posteriormente de cada precultivo se tomó una alícuota para inocular en medios YPD líquidos con una densidad óptica D.O. de 0.03 a 600 nm medida en un espectrofotómetro UV/vis Perkin-Elmer Lambda 18 usando como blanco agua desionizada. Las células se mantuvieron en el medio de cultivo hasta por 30 días para inducir envejecimiento.

5.6. Manipulación del contenido de ácidos grasos de la levadura

El contenido de ácidos grasos de las membranas de las cepas de *S. cerevisiae* fue determinado mediante el método modificado de Cortés-Rojo *et al.*, (2009). A cada medio de cultivo antes de la inoculación de las cepas, se les añadió ácido α -linolénico 1 mM (ácido *cis,cis,cis*-9,12,15-octadecatrienoico, α -C18:3(Δ 9,12,15); pureza $\geq 99\%$, adquirido de Sigma Chemical), disuelto en 5% del detergente Igepal CA-630 (Sigma Chemical)

5.7. Evaluación del envejecimiento cronológico: Determinación de la viabilidad celular por conteo en placa

La viabilidad de las células de las cepas BY4741, *gpx1* Δ , *gpx2* Δ , *gpx3* Δ de *S. cerevisiae* se determinó mediante el conteo de colonias crecidas en placas de YPD sólido a una dilución 1×10^{-3} células por mL. Primero, se realizó una dilución con 1900 μ L de agua y 100 μ L de medio de cultivo inoculado, se cargó una alícuota de la dilución en la cámara de Neubauer y se contó el número total de levaduras en cinco cuadrículas de la cámara. Posteriormente, se calculó la cantidad de medio inoculado que se colocaría en cada dilución con la razón:

$$\text{Número de células}/\mu\text{L de medio} = (\text{promedio del número de células contadas}) (25 \text{ campos de la cámara}) / (\text{factor de dilución}) / (\text{volumen de la cámara})$$

Las diluciones se realizaron a partir de un volumen del cultivo equivalente a 1×10^8 células por mL. La cantidad de medio estéril a agregar a cada dilución se calculó restando el volumen del medio inoculado para completar 1000 μ L. Posteriormente, se realizaron las diluciones seriadas desde 1×10^{-1} hasta 1×10^{-3} células por mL. Después la dilución 1×10^{-3} células por mL, se sembró en medio sólido YPD y se incubaron durante 3 días a 30°C. Todo este proceso se realizó en condiciones estériles.

5.8. Preparación de células para las determinaciones de velocidad de consumo de oxígeno y ensayos de potencial de membrana

Las células procedentes de los cultivos envejecidos se lavaron tres veces con agua estéril y luego se centrifugaron a 1960 g por 5 min a 25°C con agua desionizada y se suspendieron en una proporción de 1:1 de peso: volumen. Las células se utilizaron inmediatamente para la determinación de la peroxidación lipídica y los ensayos de potencial de membrana (Aguilar-Toral *et al.*, 2014).

5.9. Determinación de la respiración mitocondrial *in situ*

La respiración mitocondrial *in situ* fue analizada polarográficamente con un electrodo tipo Clark conectado a un monitor de oxígeno YSI5300 y a un ordenador para la adquisición de datos. En la cámara del polarógrafo se añadieron 125 mg de células (peso húmedo) y 2.5 ml de buffer MES-TEA (ácido morfoetanol sulfónico 10 mM, pH 6.0 con trietanolamina) las células se mantuvieron con agitación constante. La medición del consumo de oxígeno se inició en el estado 4 mediante la adición de 10 mM de glucosa. Una vez que se observó una velocidad de consumo de oxígeno estable, la respiración en estado desacoplado (estado U) se estimuló con la adición del desacoplante carbonilcianuro-*p*-triclorofenilhidrazona (CCCP) al 15 mM.

5.10. Determinación del potencial de membrana mitocondrial *in situ*

Este parámetro se ensayó usando la metodología modificada de Peña *et al.* (2010), 25 mg de células (peso húmedo) se colocaron en una celda de cuarzo que contenía medio MES-TEA, glucosa 20 mM, 15 μ M BaCl₂ y 1 μ M del colorante DiSC₃(3) en un volumen final de 2 ml. Los trazos de potencial de membrana se iniciaron mediante el monitoreo de la fluorescencia basal durante 180 s. A continuación, se añadió 15 mM CCCP y los cambios en la señal de fluorescencia se monitorearon durante 90 s. Después, se añadió KCl 25 mM y la fluorescencia

se monitoreó durante 60 s adicionales. Los cambios en la fluorescencia del DiSC₃(3) ($\lambda_{ex} = 555$ nm; $\lambda_{em} = 572$ nm) se evaluaron en un espectrofluorómetro Shimadzu RF5000U con agitación constante.

5.11. Análisis de ERO por citometría de flujo

5.11.1. Preparación de levaduras para citometría de flujo

De cada cultivo se transfirieron 1.5 mL a tubos Eppendorff, los tubos se centrifugaron a 2150 g durante 2 min. El sobrenadante se decantó y el paquete celular se re suspendió en 1 ml de buffer PBS (NaCl 0.8%, KCl 0.02%, Na₂HPO₄ 0.148%, KH₂PO₄ 0.024%; pH 7.4). Nuevamente los tubos se centrifugaron a 2150 g por 2 min, el sobrenadante se decantó y el paquete celular se re suspendió en 1 ml de PBS 1X. Posteriormente de cada suspensión celular se hicieron diluciones como se muestra en la tabla 1, estas diluciones consistieron básicamente en añadir a tubos eppendor 900 μ L de PBS, 100 μ L de cada cultivo respectivamente y 4 μ L del fluorocromo H₂DCFDA (2',7'diacetato de diclorodihidrofluoresceína 2.5 mg/ml) en la oscuridad, se agitó en el vortex. Se incubaron por 30 min a 30 °C. Se utilizaron estas muestras para los análisis de citometría de flujo, aproximadamente 1-10⁶ células/ml, en diluciones 1:10.

De cada cultivo se transfirieron 1.5 mL de cada cultivo en tubos Eppendorff y se centrifugaron a 2150 g durante 2 min. El sobrenadante se decantó y el precipitado se resuspendió en 1 ml de agua desionizada estéril, nuevamente los tubos se centrifugaron a 2150 g por 2 min, el sobrenadante se decantó y el precipitado se resuspendió en 1 ml de agua desionizada estéril. A partir de cada suspensión celular se hicieron diluciones (Tabla 1) básicamente estas consistieron, en añadir 900 μ L de agua desionizada estéril, 100 μ L de cada cultivo respectivamente y 50 nM del fluorocromo Rh 123 en la oscuridad, los tubos se agitaron en el vortex, luego se incubaron por 30 min a 30 °C. Estas muestras se utilizaron para los análisis de citometría de flujo, aproximadamente 1X10⁶ células/ml, en diluciones 1:10.

Tabla 1. Preparación de muestras para análisis de ERO con H₂DCFDA y Rh 123

Tubo (Control) 1	Tubo (Glucosa) 2*	Tubo (Glucosa + AA) 3*	Tubo (Glicerol) 4*	Tubo (Glicerol + AA) 5*	Tubo 6* (sin tratamiento)
100 µl Cultivos**	100 µl Cultivos**	100 µl Cultivos**	100 µl Cultivos**	100 µl Cultivos**	100 µl Cultivos**
900 µl PBS	900 µl PBS	900 µl PBS	900 µl PBS	900 µl PBS	900 µl PBS
	4 µl H ₂ DCFDA (2.5 mg/ml) ó Rh 123 50 nM	4 µl H ₂ DCFDA (2.5 mg/ml) ó Rh 123 50 nM	4 µl H ₂ DCFDA (2.5 mg/ml) ó Rh 123 50 nM	4 µl H ₂ DCFDA (2.5 mg/ml) ó Rh 123 50 nM	4 µl H ₂ DCFDA (2.5 mg/ml) ó Rh 123 50 nM
Se agitó en vortex e incubó durante 30 min a 30 °C					
	20 mM Glucosa	20 mM Glucosa 1µg de antimicina A	20 mM Glicerol	20 mM Glicerol 1µg de antimicina A	
Se agitó en vortex, se incubó durante 1 h y se tomaron las muestras					
Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

*Se protegieron los tubos eppendorf de la luz para evitar la oxidación del H₂DCFDA y Rh 123.

**Se trabajó con las células obtenidas de la preparación para citometría de flujo.

5.11.2. Estandarización y condiciones de corrida del equipo (BD Accuri™ C6)

Antes de iniciar con la lectura de las muestras fue necesario determinar las condiciones de muestreo para el equipo, utilizando el programa CFlow Sampler. Dentro de los parámetros que se ingresaron para la lectura de las muestras son los siguientes:

Tipo de plato: placa de 96 pocillos con fondo plano

Nombre del plato: Generación de ERO (Fecha)
Condiciones de muestreo (No. Eventos o volumen): 20,000 eventos
Forma de muestreo (tiempo o volumen): 100 μ l
Velocidad (lenta, media, rápida): media
Tamaño de la muestra (μ m): medio

En primer lugar se hizo una prueba para determinar la región de interés a analizar, de acuerdo a las muestras estudiadas (en este caso levaduras) en base a su tamaño (FSC-A) y complejidad (SSC-A) dado por la dispersión de la luz de cada partícula (célula). Esto con la finalidad de seleccionar la región que contenga el tamaño promedio para las levaduras, que sean viables, descartando otro tipo de partículas contaminantes y restos celulares que interfieran con la lectura (Fig. 7A).

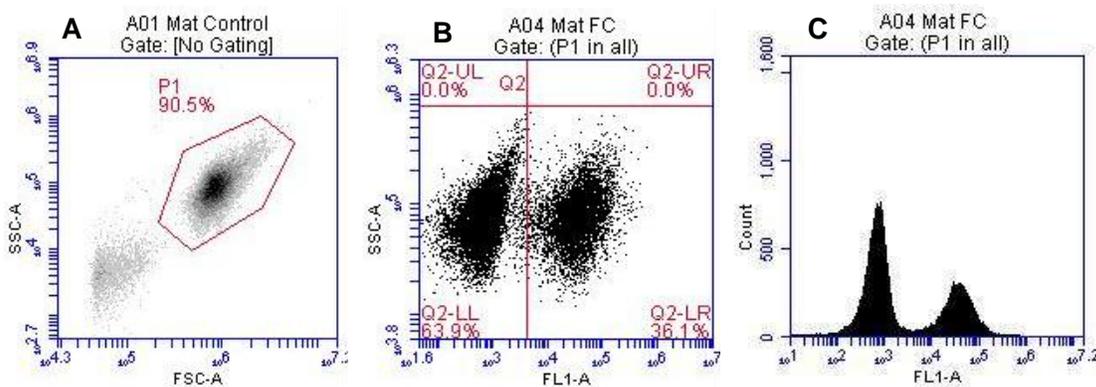


Figura 7. Análisis por citometría de flujo. A. Gráfico representativo de la región P1, que delimita las características de la muestra analizada (levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*) de acuerdo a su tamaño (FSC- A) y complejidad (SSC-A) (orgánulos celulares). B. Gráfico de la población celular con mayor generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) dado por el incremento en la fluorescencia (FL1-A) de acuerdo a la complejidad de las células (SSC-A), de la región P1. C. Cantidad de ERO generada con base en el incremento en la intensidad de fluorescencia (FL1-A) dado por el número de células (Count), de la región P1. Se grafica en escala logarítmica.

Una vez seleccionada la región de interés (P1) ésta se utilizó como estándar para todos los experimentos, utilizando un número de muestra de 20,000 eventos (células).

5.11.3. Cuantificación de la producción de ERO por citometría de flujo

Las muestras anteriores se analizaron en un citómetro de flujo BD Accuri™ C6, utilizando el programa CFlow Sampler. El sistema está equipado con un láser azul y un láser rojo, dos detectores de dispersión de luz, y cuatro detectores de fluorescencia con filtros ópticos optimizado para la detección de fluorocromos, que son utilizados como indicadores, pues son permeables a la membrana y sufren la escisión de los grupos acetato por esterasas intracelulares, haciendo que sean mucho mejor retenidos por las células. Debido a que estos compuestos son susceptibles a la foto-oxidación, se deben utilizar en condiciones de poca luz. Estos fluorocromos presentan una longitud de excitación y una longitud de emisión de: 492-495/517-527 en nm, $\lambda_{Ex}=491$ nm y $\lambda_{Em}=518$ para H2DCFDA; $\lambda_{Ex}=555$ nm y $\lambda_{Em}=585$ nm para Rodamina 123 (Molecular Probes, 2006) (Fig. 7). Cada muestra se colocó en el pocillo correspondiente en una placa de 96 pozos, evitando lo más posible la luz directa sobre la muestras. Se colocó la placa sobre la charola de muestras del equipo. Posteriormente se procedió a leer las muestras.

5.12. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de al menos tres experimentos independientes. Los niveles de significancia estadística de las diferencias entre las medias aritméticas ($p \leq 0.001$ y $p \leq 0.01$) se determinaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, aplicando el test de comparaciones múltiples de Tukey para buscar diferencias entre los grupos, se empleó el programa GraphPad Prism5.

VI. RESULTADOS

6.1. Determinación de la mutación de los genes GPXs en *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas mutantes en GPXs adquiridas en la colección de cepas de *S. cerevisiae* Euroscarf, tienen la interrupción del marco de lectura abierto de los genes GPX1 (YKL026c), GPX2 (YBR244w) y GPX3 (YIR037w) con *kanMX4*, un gen de resistencia a kanamicina que media la resistencia al antibiótico genético G418.

Con el objetivo de verificar la mutación de los genes GPXs en *S. cerevisiae*, las cepas mutantes y su cepa parental BY4741 fueron crecidas en medio YPD líquido con genético G418. En la figura 8, panel A, se observa el crecimiento de las mutantes *gpx1Δ*, *gpx2Δ* y *gpx3Δ*, mientras que la cepa BY4741 no creció en el medio con genético G418. Estos resultados indican de manera indirecta la interrupción de los genes GPXs en *S. cerevisiae*. Para verificar la interrupción de estos genes en el genoma de cada cepa, los marcos de lectura o región codificante de cada gen se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la figura 8 el panel B se observa la amplificación del gen GPX1 en el carril 2 de la cepa silvestre BY4741 con un tamaño aproximado de 523 pb, mientras que en el carril 3 no se observó un producto de amplificación del gen GPX1 en la cepa *gpx1Δ*. Para verificar si la ausencia de amplificación del gen GPX1 no fue debida a la degradación del ADN al momento de aislarlo, se amplificó el gen GPX2, observándose una banda de aproximadamente 486 pb en el carril 4. Esto sugiere que la ausencia de amplificación de GPX1 no fue debida a que el ADN se encontraba degradado.

En el panel C de la figura 8 se observa la amplificación del gen GPX2 de la cepa BY4741 con un tamaño aproximado de 486 pb en el carril 2. En el carril 3 se observa el producto de la amplificación del gen GPX2 en la cepa *gpx2Δ*, en el cual no hay producto de PCR. De igual modo que se procedió para el gen GPX1, para

descartar el efecto de la degradación del ADN se utilizó, el ADN de la mutante *gpx2Δ* para amplificar el gen GPX3, en la figura 8, panel C, se observa en el carril 4 una banda de aproximadamente 511 pb. En el panel D, se observa la amplificación del gen GPX3 de la cepa BY4741 de un tamaño aproximado de 511 pb en el carril 2, en el carril 3 no se observa producto de PCR del gen GPX3 en la mutante *gpx3Δ*. Para descartar daño en el DNA de la mutante *gpx3Δ* se amplificó el gen GPX1, cuyo producto se observa en el carril 4 una banda de aproximadamente 523 pb.

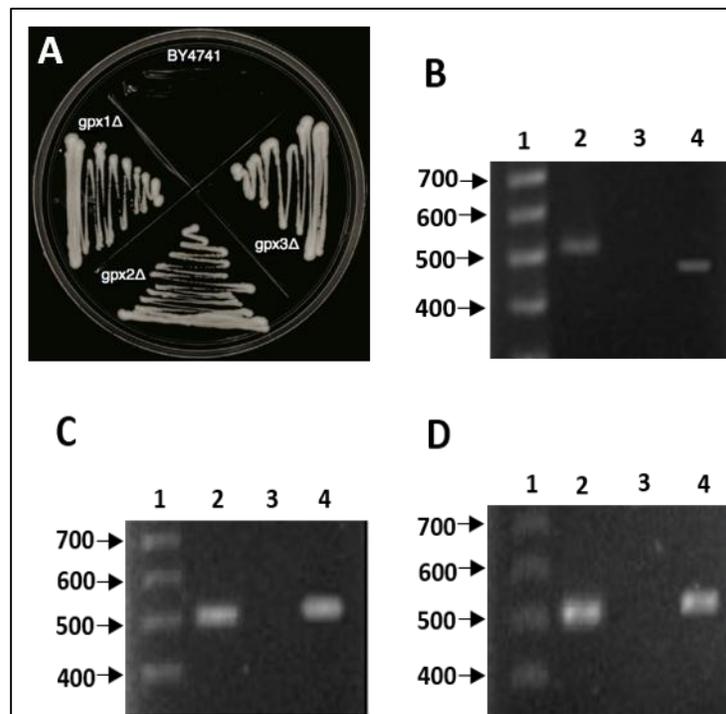


Figura 8. Determinación de la mutación de los genes GPXs en *Saccharomyces cerevisiae*. Crecimiento en medio YPD 2% con 150 μg/ml de genenticina G418 (A). Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: producto de PCR GPX1 en BY4741; carril 3: producto de PCR GPX1 en *gpx1Δ*; carril 4: producto de PCR GPX2 en *gpx1Δ* (B). Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: producto de PCR GPX2 en BY4741; carril 3: producto de PCR GPX2 en *gpx2Δ*; carril 4: producto de PCR GPX3 en *gpx2Δ* (C). Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: producto de PCR GPX3 en BY4741; carril 3: producto de PCR GPX3 en *gpx3Δ*; carril 4: producto de PCR GPX1 en *gpx3Δ* (D). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes (n=3)

6.2. Cinéticas de crecimiento

Para determinar si existían diferencias en el crecimiento debido a la ausencia de los genes que codifican para los tres tipos de enzimas Gpxp, se realizaron cinéticas de crecimiento en medio enriquecido (YPD) con todas las cepas de *S. cerevisiae*: la cepa silvestre BY4741 y las mutantes *gpx1* Δ , *gpx2* Δ y *gpx3* Δ . No se observaron diferencias significativas entre las distintas cepas respecto a su crecimiento (Tabla 2). Estos resultados indican que las mutaciones en los genes GPX1, GPX2 y GPX3 no influyen en el crecimiento de *S. cerevisiae* en un medio rico en fase exponencial.

Tabla 2. Efecto de la ausencia de los genes GPXs en parámetros de crecimiento cinético. Velocidad de crecimiento específico (μ), tiempo de duplicación (*td*).

Células	μ (min ⁻¹)	<i>td</i> (min)
BY4741	0.002701 \pm 0.000218	128.28 ^{ns}
<i>gpx1</i> Δ	0.002502 \pm 0.000187	138.54 ^{ns}
<i>gpx2</i> Δ	0.002514 \pm 0.000130	137.88 ^{ns}
<i>gpx3</i> Δ	0.002565 \pm 0.000155	135.06 ^{ns}

Los resultados representan la media \pm e.e de 3 experimentos independientes. P<0.001; ns=no significante.

6.3. Efecto del ácido linolénico (C18:3) en la viabilidad de células envejecidas en las mutantes PHGPXs de *S. cerevisiae*

Con el objetivo de conocer el efecto de la incorporación del C18:3 sobre el envejecimiento de las cepas mutantes *gpx1* Δ , *gpx2* Δ y *gpx3* Δ , se evaluó la viabilidad celular a diferentes tiempos de la fase estacionaria, a través del conteo de colonias crecidas en placas de YPD a una dilución 1X10⁻³ células por mL.

En el panel A de la figura 9, se observa la viabilidad de las células de los días 0, 15 y 30 en ausencia de C18:3, el día 0 corresponde al momento en que los

cultivos llegaron al inicio de la fase estacionaria y los días 15 y 30 fueron contados a partir del día 0. En las células mutantes *gpx2Δ* sin C18:3 (-C18:3), se observa una disminución del 29% de la viabilidad a los 15 días de envejecimiento, mientras que no hay diferencias en la viabilidad de las mutantes *gpx1Δ* y *gpx3Δ* con respecto a la cepa BY4741. A los 30 días de envejecimiento, en la mutante *gpx1Δ* se observa una disminución de la viabilidad del 40%, en *gpx2Δ* 43% y en la mutante *gpx3Δ* 6% sin significancia estadística en esta última.

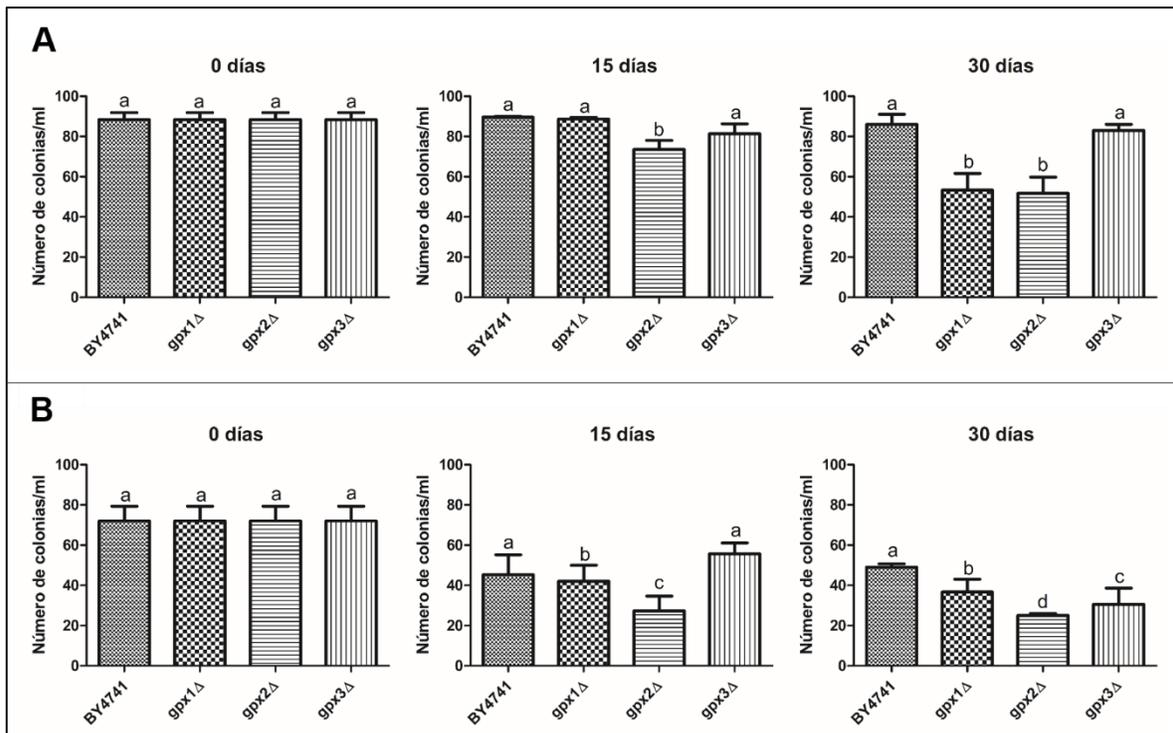


Figura 9. Efecto del ácido linolénico sobre la viabilidad de las mutantes PHGPx: sin C18:3 (panel A) y con C18:3 (panel B) a los 0,15 y 30 días de envejecimiento. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de $n \geq 3$ $P < 0.001$.

Por otro lado, se observa una notoria disminución en la viabilidad de todas las células cultivadas con C18:3 (Figura 9, panel B), ya que la viabilidad de las mutantes *gpx1Δ* y *gpx2Δ* disminuyó un 53% y de 63% respectivamente y un comportamiento similar se observó al día 30. La cepa BY4741 presentó una disminución de su viabilidad del 32% tanto a los 15 días como a los 30 días. La

mutante *gpx1Δ* presentó una disminución en la viabilidad de 50% respecto a la cepa parental a los 15 días, sin cambios a los 30 días. Por otra parte, la viabilidad en *gpx2Δ* disminuyó un 66% respecto a BY4741 a los 15 días y 76% a los 30 días. Y la viabilidad de *gpx3Δ* disminuyó un 44% respecto a BY4741 a los 15 días de envejecimiento y un 70% a los 30 días.

Estos resultados indican que la presencia de ácidos grasos poliinsaturados aumenta la pérdida de viabilidad de células envejecidas y este efecto se exacerbó en la mutante *gpx2Δ*, mientras que en ausencia de ácidos grasos poliinsaturados, también se observó que la mutante *gpx2Δ* muestra una mayor pérdida de viabilidad por lo cual esta enzima podría tener alguna función protectora independiente de la presencia de ácidos grasos poliinsaturados.

6.4. Efecto de la mutación de los genes PHGPx en el potencial de membrana mitocondrial de células envejecidas

Con el objetivo de estudiar los efectos dañinos del aumento de la presencia de ácidos grasos poliinsaturados en la función mitocondrial de células envejecidas y el posible papel de las Gpxp sobre el mantenimiento en el potencial de membrana, se evaluaron los cambios de la fluorescencia de la cianina DiSC₃(3) en respuesta al desacoplante CCCP a una concentración que disipa selectivamente el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{mit}$) de suspensiones celulares, este procedimiento es una medida *in situ* dicho parámetro. Además, los cambios de la fluorescencia de la cianina en respuesta a KCl permiten estimar el potencial de membrana plasmático ($\Delta\Psi_{cit}$) (Peña *et al.*, 2010).

En la figura 10 se muestran trazos representativos del $\Delta\Psi_{mit}$ y $\Delta\Psi_{cit}$ en levaduras -C18:3 y +C18:3 de los días 0, 15 y 30 de envejecimiento, en el día 0 en células -C18:3 se observa que la adición de CCCP produce un incremento de la fluorescencia de la cianina, lo cual es indicativo de que esas células presentaban $\Delta\Psi_{mit}$. Asimismo, la caída de la fluorescencia de la cianina posterior a la adición de KCl indica la presencia del $\Delta\Psi_{cit}$. Respecto a las mutantes en GPX, presentan trazos de $\Delta\Psi_{mit}$ y $\Delta\Psi_{cit}$ similares a la cepa silvestre BY4741

(línea negra) a los 0 y 15 días en ausencia de C18:3. A los 30 días, se observa una ligera disminución del $\Delta\Psi_{mit}$ en las tres mutantes, mientras que en el $\Delta\Psi_{cit}$ se aprecia una disminución más acentuada en las tres mutantes. Por otro lado las células +C18:3 tienen a los 0 días un menor $\Delta\Psi_{mit}$ que las células -C18:3. Al tiempo 0, la disminución más acentuada en el $\Delta\Psi_{mit}$ se observó en la mutante *gpx3Δ*. A los 15 días de envejecimiento en presencia de C18:3, se observó que las cepas mutantes no tienen $\Delta\Psi_{mit}$, mientras que preservan su $\Delta\Psi_{cit}$ predominantemente en la cepa silvestre y *gpx1Δ*. A los 30 días de envejecimiento con C18:3, se observó una recuperación del $\Delta\Psi_{mit}$ y $\Delta\Psi_{cit}$ en la cepa silvestre. En cambio, en las mutantes *gpx1Δ* y *gpx3Δ*, se observa una ligera recuperación del $\Delta\Psi_{mit}$, mientras que el $\Delta\Psi_{cit}$ en la mutante *gpx3Δ* se recupera más que en las células *gpx1Δ*. De manera notable, se observó que mutante *gpx2Δ* carece de $\Delta\Psi_{mit}$ y $\Delta\Psi_{cit}$.

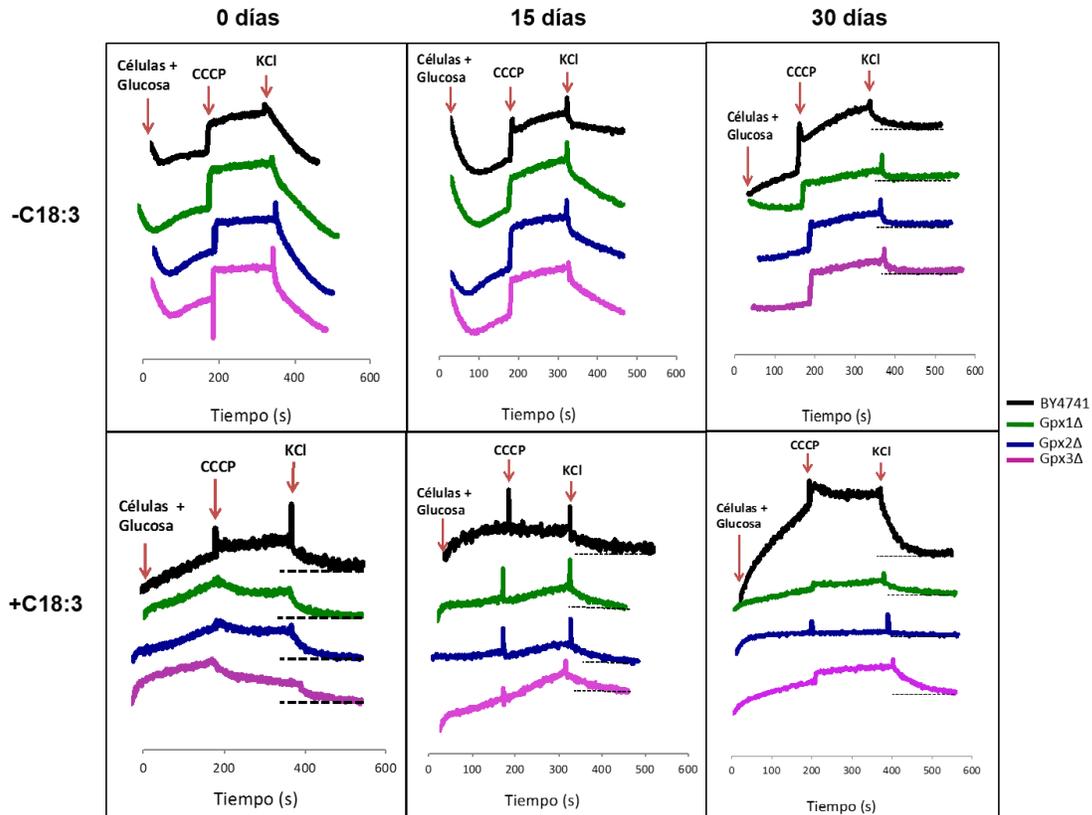


Figura 10. Potencial de membrana mitocondrial de levaduras crecidas en medio YPD durante 0, 15 y 30 días de envejecimiento. Los trazos del potencial son representativos de $n \geq 3$.

6.5 Efecto de las mutaciones en los genes PHGPx sobre la respiración de células envejecidas.

La respiración mitocondrial está controlada por el transporte de electrones y el bombeo de H^+ en la CTE. Por lo tanto, con el objetivo de analizar si la pérdida de la viabilidad de mutantes envejecidas en los genes GPX está relacionada con una disminución de la funcionalidad de la CTE, se decidió determinar el consumo de oxígeno en células crecidas en presencia y en ausencia de C18:3.

En la figura 11 se muestra la respiración basal en presencia de glucosa como sustrato (estado 4) que se presentó tanto en células $-C18:3$ (panel A) como en las $+C18:3$ (panel B). En el estado 4 (panel A), se observó que la respiración de células $-C18:3$ disminuyó a los 15 días en las cuatro cepas hasta 2 nat O/min

en las mutantes *gpx2Δ* y 5 nat O/min en BY4741, *gpx1Δ* y *gpx3Δ*. A los 30 días de envejecimiento, el consumo de O₂ fue similar al observado a los 15 días, excepto que el consumo aumentó en la cepa *gpx3Δ* siendo similar a la cepa parental BY4741. En condiciones +C18:3 (panel B), se observó una disminución a un cuarto del consumo de O₂ en el día 0 en comparación con el mismo día en las células -C18:3 (panel A). A los 15 días de envejecimiento, y comparar con el consumo de oxígeno en las células BY4741, se observó una disminución del 96% en el consumo de O₂ de la cepa *gpx2Δ*, mientras que en las otras dos mutantes, hubo una tendencia a que disminuyera este parámetro. A los 30 días de envejecimiento, el consumo de O₂ fue similar que a los 15 días de envejecimiento.

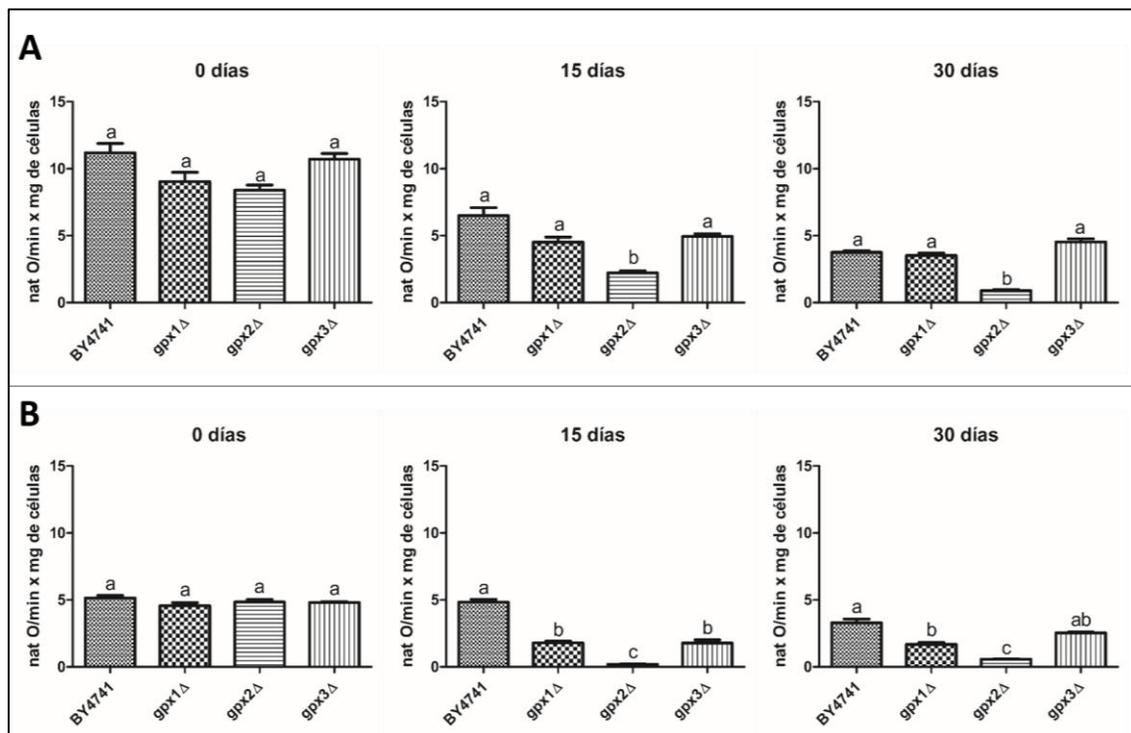


Figura 11. Efecto de las mutación de los genes de PHGPx en la respiración mitocondrial *in situ* en células envejecidas inducidas por C18:3 de *S. cerevisiae*. Respiración basal en presencia de glucosa como sustrato (estado 4) en células -C18:3 (panel A), células +C18:3 (panel B). A los 0,15 y 30 días de envejecimiento. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de $n \geq 3$ $P < 0.001$.

En la figura 12 se muestra la velocidad máxima de respiración inducida por el compuesto desacoplante de la fosforilación oxidativa CCCP (estado U) en células -C18:3 (panel A) así como en las +C18:3 (panel B). En el estado U -C18:3 (panel A) se observó una disminución en el consumo de O₂ a los 15 días de envejecimiento en las cuatro cepas, disminuyendo hasta 2 nat O/min en las mutantes *gpx2Δ*, 5 nat O/min en *gpx1Δ* y *gpx3Δ* y 7 nat O/min en BY4741. A los 30 días de envejecimiento, el consumo de O₂ fue similar al observado a los 15 días. En condiciones +C18:3 (panel B), se observó una disminución del 50% del consumo de O₂ en el día 0 en comparación con el mismo día en las células -C18:3 (panel A). A los 15 días de envejecimiento, respecto a la cepa parental BY4741, se observó una disminución del 96%, 67% y 67% en el consumo de O₂ de la cepa *gpx2Δ*, *gpx3Δ* y *gpx1Δ* respectivamente. A los 30 días de envejecimiento, el consumo de O₂ disminuyó en la cepa BY4741, mientras que en *gpx3Δ* y *gpx1Δ* fueron similares a BY4741, por otro lado, en la mutante *gpx2Δ*, el consumo de O₂ fue similar que a los 15 días en comparación con la misma cepa.

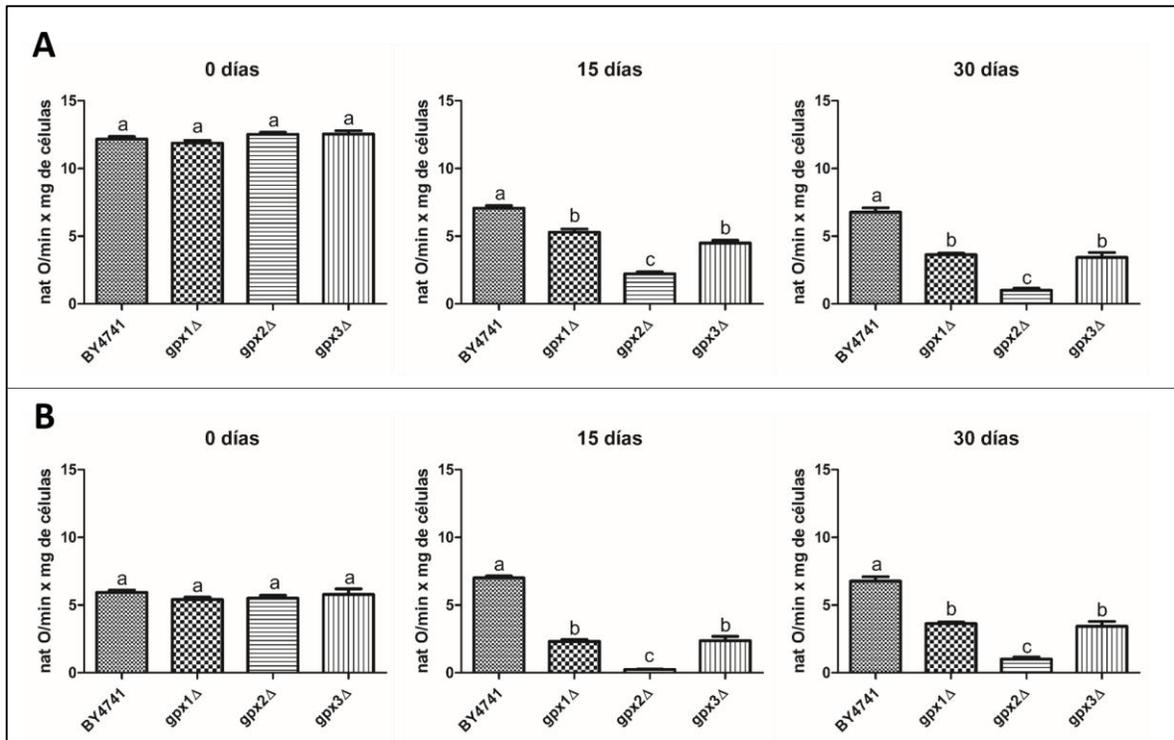


Figura 12. Efecto de las mutación de los genes de PHGPx en la respiración mitocondrial *in situ* en células envejecidas inducidas por C18:3 de *S. cerevisiae*. Velocidad máxima de respiración inducida por el desacoplante de la fosforilación oxidativa CCCP (estado U) en condiciones sin C18:3 (panel A) y con C18:3 (panel B). A los 0,15 y 30 días de envejecimiento. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de $n \geq 3$ $P < 0.001$.

6.6. Niveles de ERO en mutantes envejecidas en los genes PHGPx

La producción de ERO en células intactas se determinó mediante su reacción con los compuestos fluorescentes H₂DCFDA y Rh123 en presencia de dos diferentes sustratos.

En la figura 13 se muestran los niveles de ERO medidas como fluorescencia a los 0 días de envejecimiento en células –C18:3 con H₂DCFDA (panel A), y con Rh 123 (panel B). La cuantificación de ERO al emplear Rh 123 sobre estima los niveles de ERO, en el panel A se observa que los niveles de ERO aumentaron en la cepa BY4741 con sustrato glicerol y Antimicina A para estimular la generación de ERO en la mitocondria. No hubo diferencia significativa entre las cepas BY4741, *gpx1*Δ, *gpx2*Δ, mientras que en la cepa *gpx3*Δ disminuyen los niveles de ERO. En cambio con Rh123 (panel B) se observa un incremento en los niveles de ERO en presencia de glicerol, glicerol y Antimicina A, sin que haya diferencias significativas entre las mutantes, mientras que en la cepa silvestre aumentan los niveles de ERO.

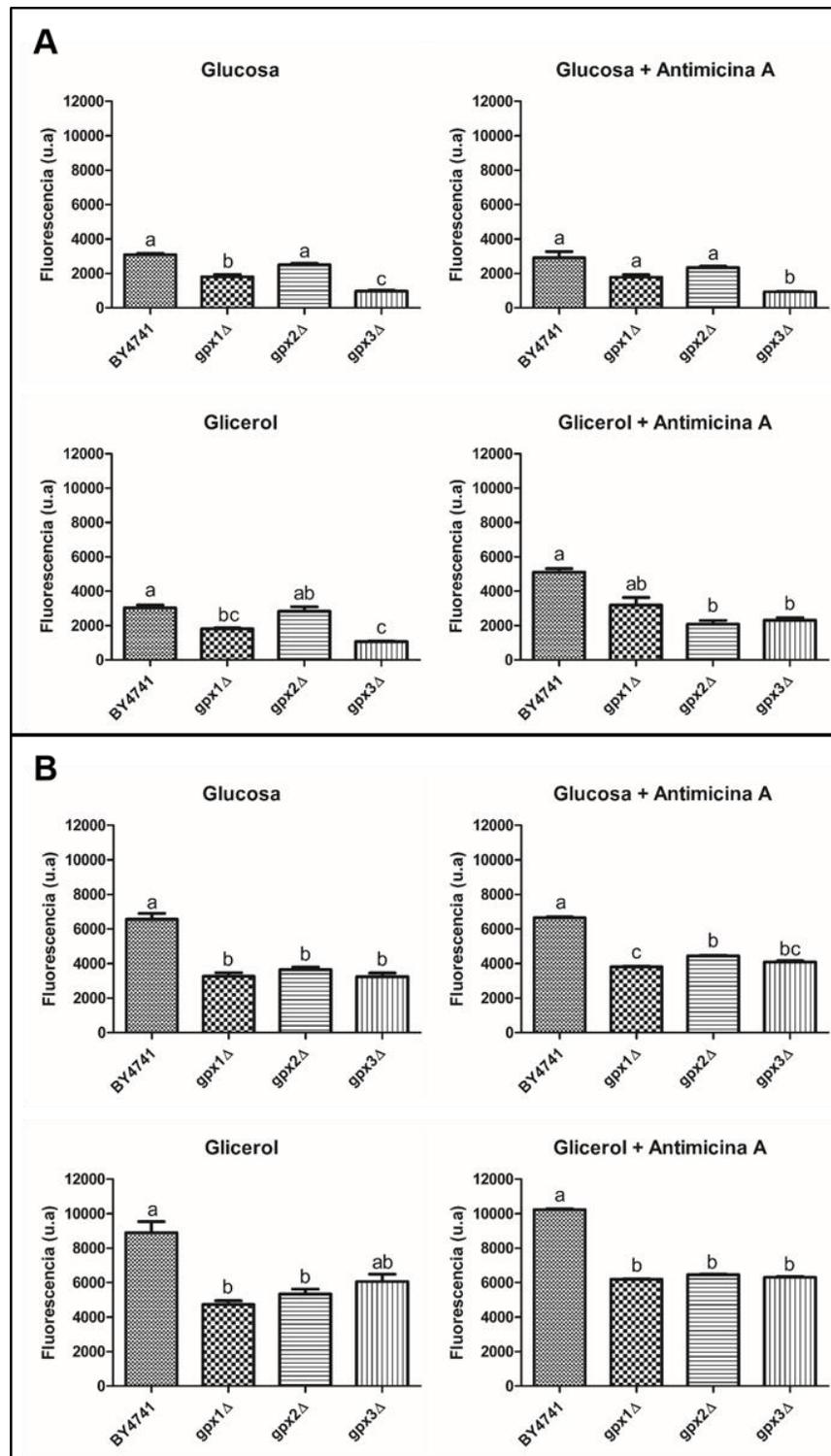


Figura 13. Participación de las PHGPx en la formación de ERO en el envejecimiento en *S. cerevisiae*. La producción de ERO se estimó en células intactas –C18:3 a los 0 días de envejecimiento (fase post-diáuxica) mediante la evaluación de los cambios en la fluorescencia de H₂DCFDA (A) y Rh 123 (B). Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de $n \geq 3$ $P < 0.001$.

En la figura 14 se muestra los niveles de ERO a los 0 días en células +C18:3 con H₂DCFDA (panel A) y Rh123 (panel B), se observó que los niveles de ERO aumentaron diez veces en las células +C18:3 en comparación con las células -C18:3 (Fig. 13). En el panel A se observa que los niveles de ERO son similares entre las cepas BY4741, *gpx1Δ* y *gpx3Δ*, mientras que en la cepa *gpx2Δ* hay una ligera tendencia en la disminución de los niveles de ERO utilizando glucosa y glicerol como sustratos. En el panel B se observa una ligera tendencia al aumento en los niveles de ERO con el glicerol, glicerol y Antimicina A en la cepa *gpx3Δ* no habiendo diferencias significativas con las cepas BY4741, *gpx1Δ* y *gpx2Δ*.

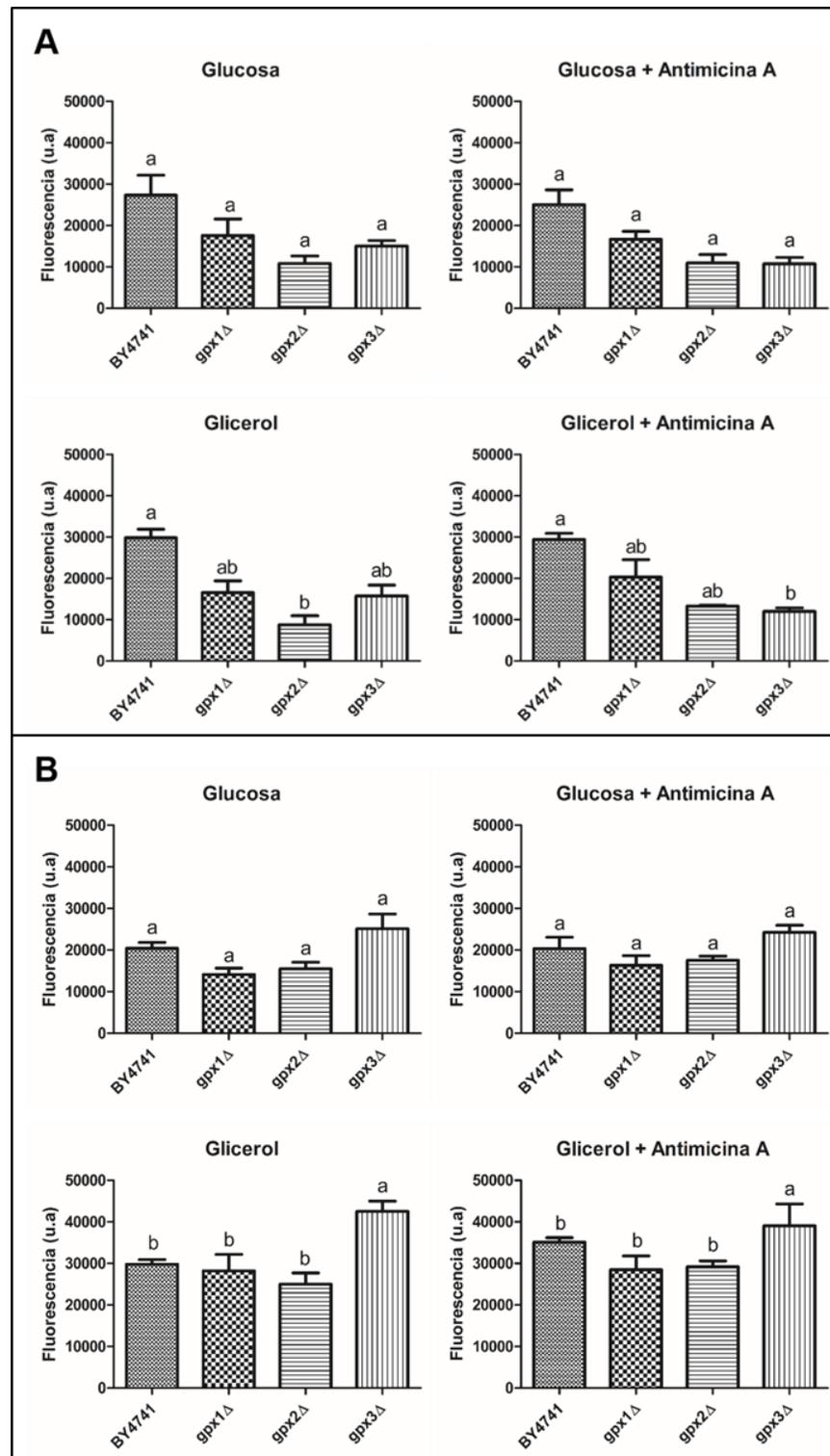


Figura 14. Participación de las PHGPx en la formación de ERO en el envejecimiento en *S. cerevisiae*. La producción de ERO se estimó en células intactas +C18:3 a los 0 días de envejecimiento (fase post-diáuxica) mediante la evaluación de los cambios en la fluorescencia de H₂DCFDA (A) y Rh 123 (B). Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de n≥3 P<0.001.

En la figura 15 se muestra los niveles de ERO a los 15 días de envejecimiento en células –C18:3 H₂DCFDA (panel A), y con Rh 123 (panel B). En el panel A se observa un incremento en los niveles de ERO en la cepa BY4741 con sustrato glicerol y Antimicina A, mientras que en las cepas *gpx1Δ*, *gpx2Δ* y *gpx3Δ* disminuyen los niveles de ERO, no habiendo diferencia significativa. En el panel B se observó un incremento del doble en los niveles de ERO en la cepa BY4741 utilizando glicerol y antimicina A, mientras que se observa una ligera tendencia que indica el incremento en los niveles de ERO en presencia de glicerol y Antimicina A en las cepas *gpx1Δ*, *gpx2Δ* y *gpx3Δ* siendo menor que la cepa BY4741.

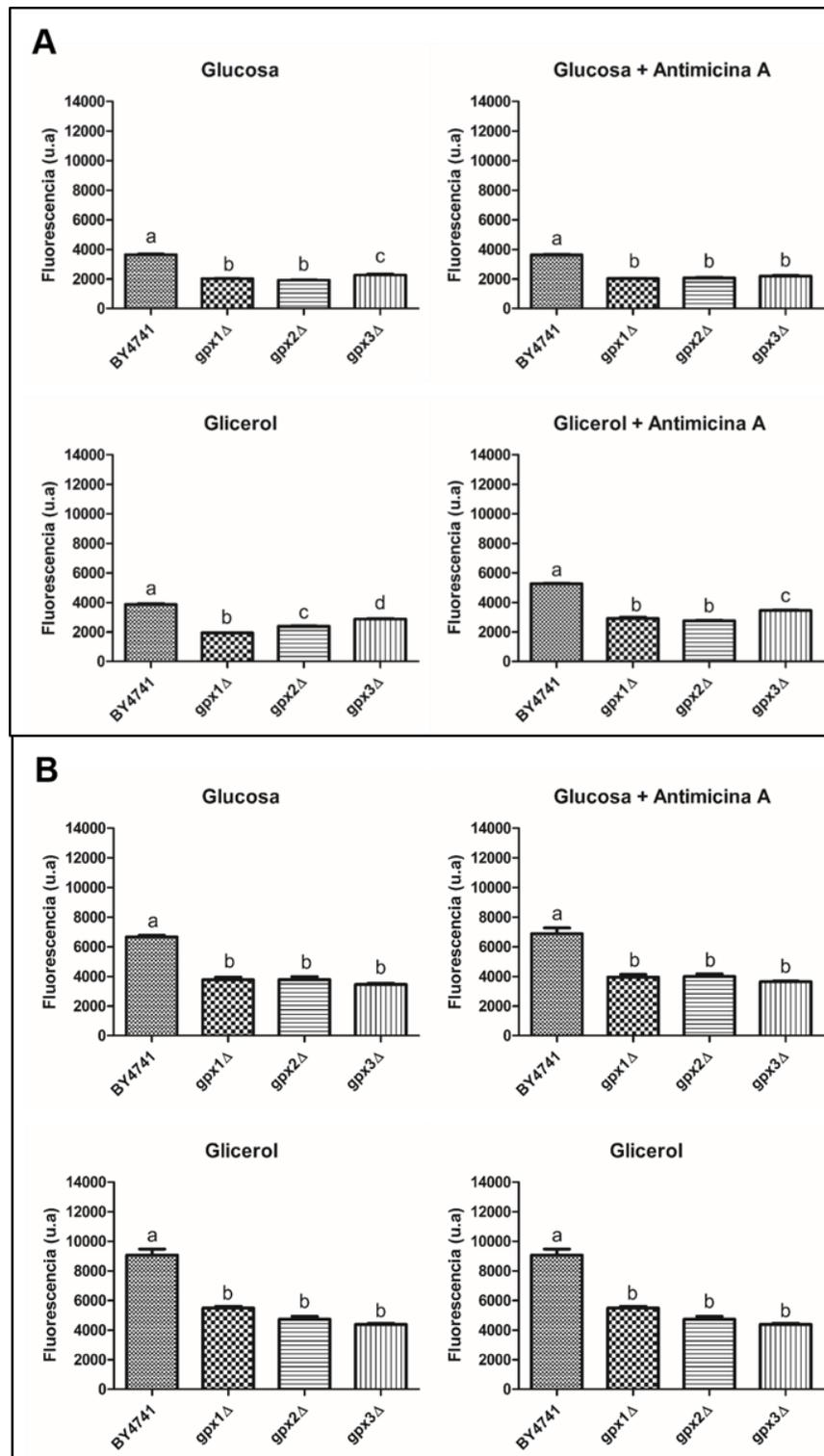


Figura 15. Participación de las PHGPx en la formación de ERO en el envejecimiento en *S. cerevisiae*. La producción de ERO se estimó en células intactas –C18:3 a los 15 días de envejecimiento mediante la evaluación de los cambios en la fluorescencia de H₂DCFDA (A) y Rh 123 (B). Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de n \geq 3 P<0.001

En la figura 16 se muestra los niveles de ERO a los 15 días de envejecimiento en células +C18:3 con H₂DCFDA (panel A) y Rh123 (panel B) aumentaron en comparación con las células -C18:3 (Fig. 15). En el panel A se observa que los niveles de ERO aumentaron en la cepa BY4741, mientras que en las cepas *gpx1Δ*, *gpx2Δ* y *gpx3Δ* disminuyen los niveles de ERO, por otro lado se observa que no hubo estimulación en la generación de ERO con Antimicina A en las mutantes, en cambio en la cepa parental se observa una ligera tendencia al aumento de las ERO con el estímulo de la Antimicina A. En el panel B se observa que la generación de ERO aumento el doble en comparación con H₂DCFDA (panel A), los niveles de ERO aumentaron en la cepa BY4741 con glicerol, glicerol y antimicina, mientras que en las cepas *gpx1Δ*, *gpx2Δ* y *gpx3Δ* se observó una disminución de los niveles de ERO siendo más marcada la disminución en la cepa *gpx2Δ*.

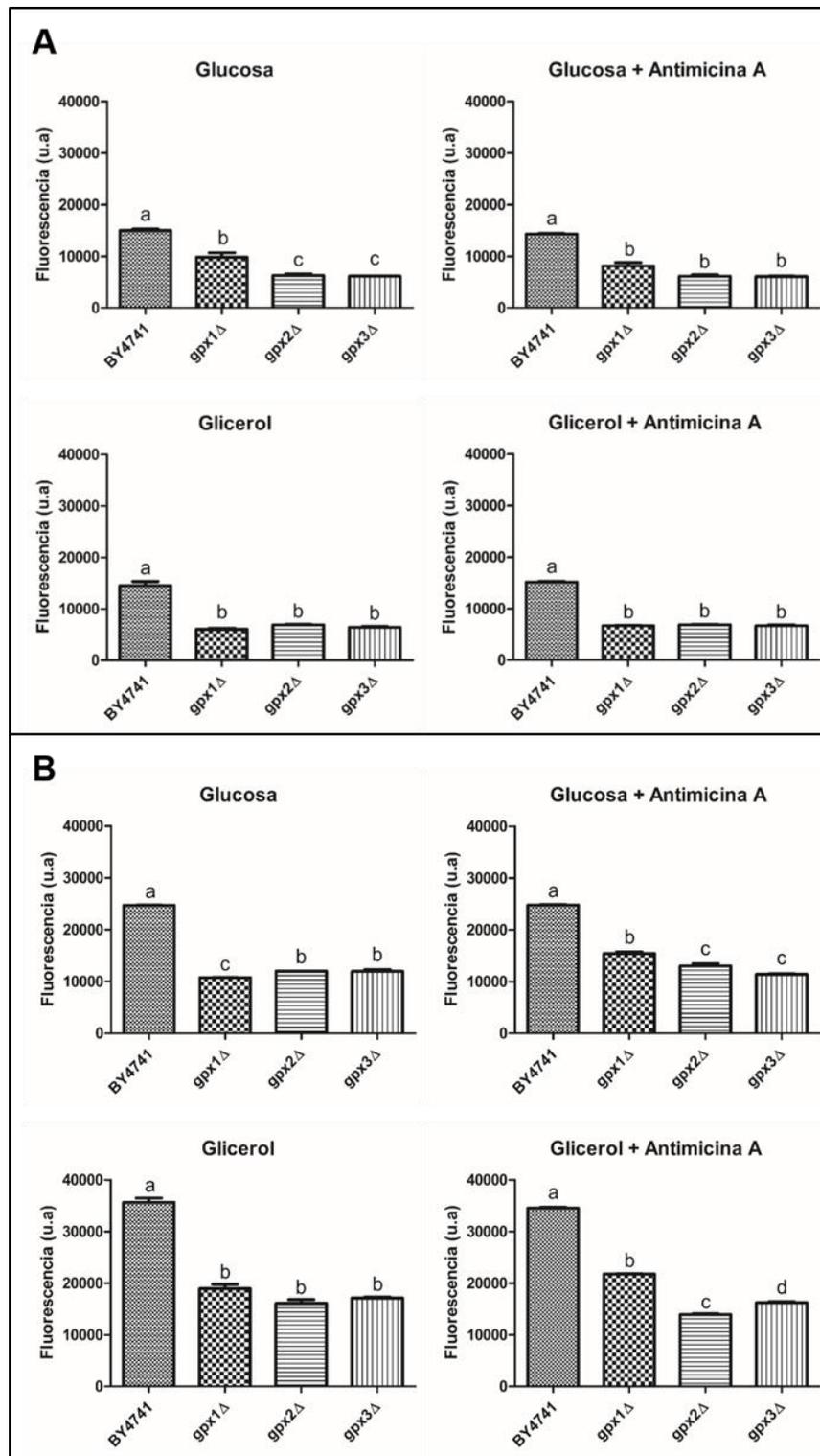


Figura 16. Participación de las PHGPx en la formación de ERO en el envejecimiento en *S. cerevisiae*. La producción de ERO se estimó en células intactas +C18:3 a los 15 días de envejecimiento mediante la evaluación de los cambios en la fluorescencia de H₂DCFDA (A) y Rh 123 (B). Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de $n \geq 3$ $P < 0.001$.

En la figura 17 se muestran los niveles de ERO a los 30 días de envejecimiento en células –C18:3 con H₂DCFDA (panel A) y Rh123 (panel B). En el panel A se observa que los niveles de ERO incrementaron en la cepa BY4741, mientras que no se observa una estimulación en la generación de ERO con la Antimicina A, por otro lado no se observan diferencias entre las cepas *gpx1Δ*, *gpx2Δ* y *gpx3Δ*, ni estimulación en la generación de ERO con la Antimicina A. En el panel B se observa incremento en los niveles de ERO en la cepa BY4741 con glicerol, glicerol y Antimicina A, mientras que en las cepas *gpx1Δ*, *gpx2Δ* y *gpx3Δ* disminuyeron los niveles de ERO no habiendo diferencias significativas entre ellas, al igual no respondieron ante el estímulo con la Antimicina A para la generación de ERO mitocondriales.

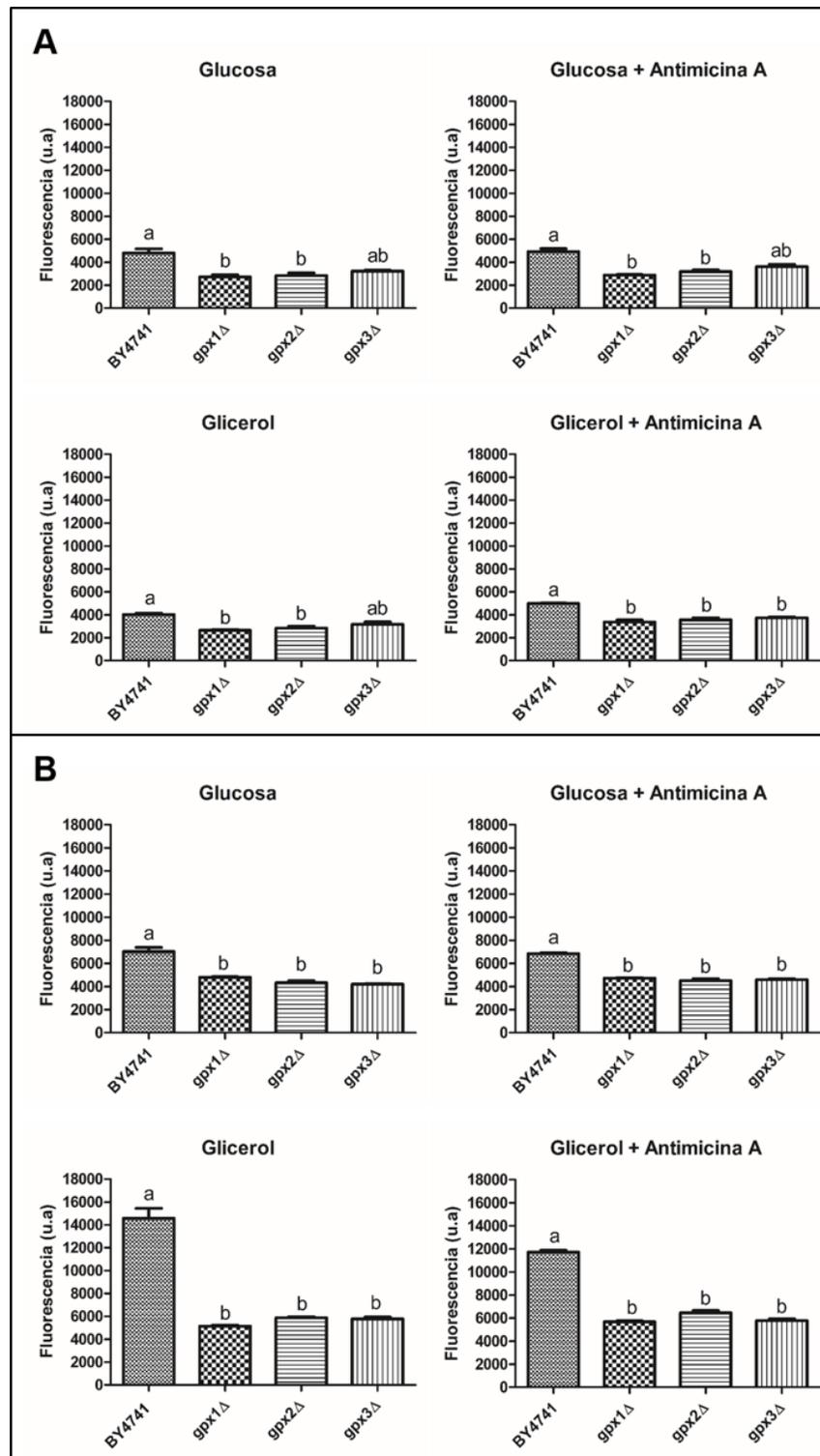


Figura 17. Participación de las PHGPx en la formación de ERO en el envejecimiento en *S. cerevisiae*. La producción de ERO se estimó en células intactas –C18:3 a los 30 días de envejecimiento mediante la evaluación de los cambios en la fluorescencia de H₂DCFDA (A) y Rh 123 (B). Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de n≥3 P<0.001 con respecto a su control.

En la figura 18 se muestran los niveles de ERO a los 30 días de envejecimiento en células +C18:3 con H₂DCFDA (panel A) y Rh123 (panel B). En el panel A se observa incremento en los niveles de ERO en la cepa BY4741, mientras que en las cepas *gpx1Δ*, *gpx2Δ* y *gpx3Δ* se observa una disminución de ERO no habiendo diferencias entre ellas, aunque no se observa el estímulo en la generación de ERO mitocondriales con la Antimicina A en las cepas mutantes como en la cepa parental BY4741. En el panel B se observa incremento en los niveles de ERO en la cepa BY4741 mientras que en las cepas *gpx1Δ*, *gpx2Δ* y *gpx3Δ* se observa una disminución de ERO no habiendo diferencias entre ellas, aunque no se observa el estímulo en la generación de ERO mitocondriales con la Antimicina A en las cepas mutantes como en la cepa parental BY4741.

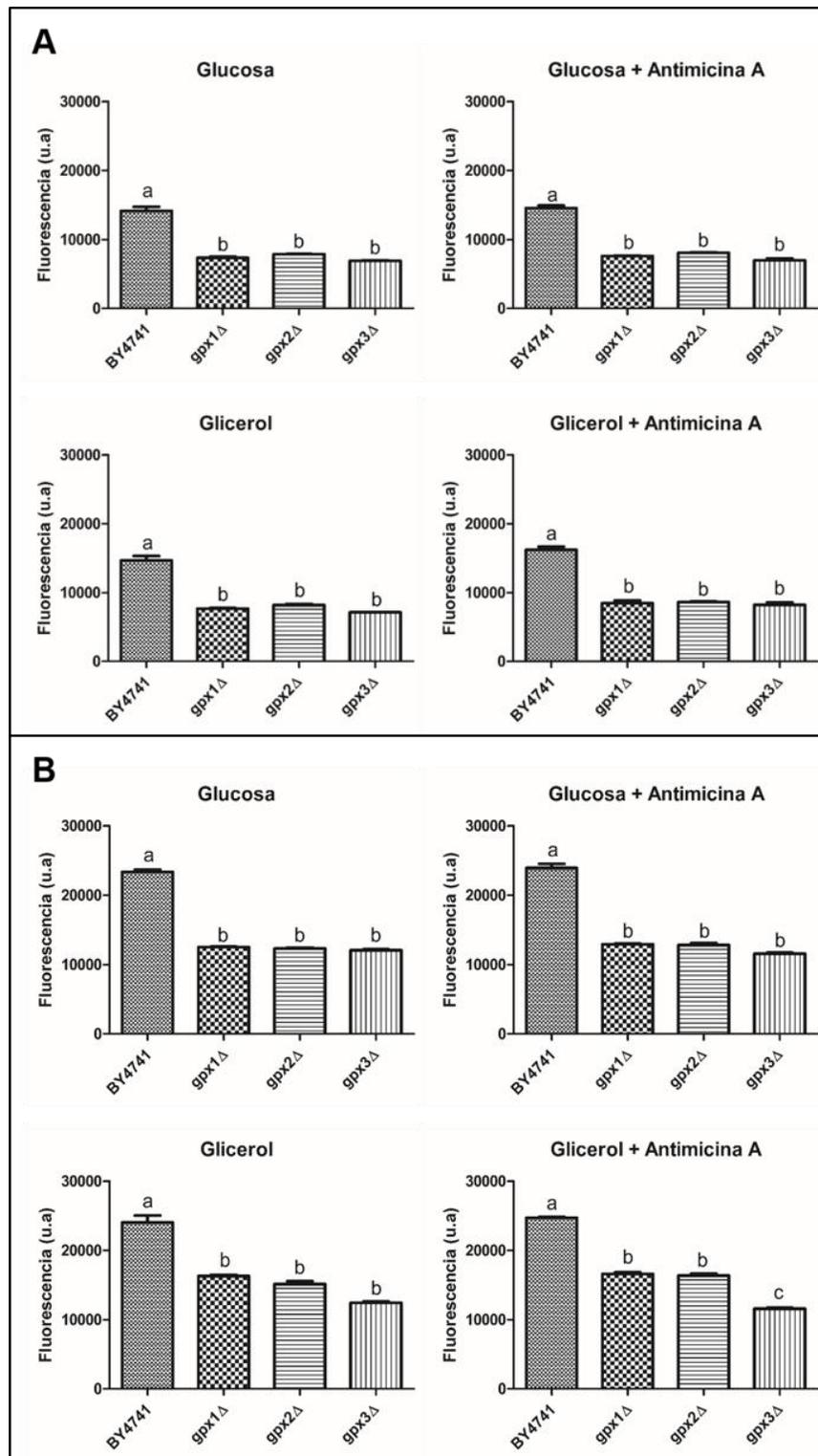


Figura 18. Participación de las PHGPx en la formación de ERO en el envejecimiento en *S. cerevisiae*. La producción de ERO se estimó en células intactas +C18:3 a los 30 días de envejecimiento mediante la evaluación de los cambios en la fluorescencia de H₂DCFDA (A) y Rh 123 (B). Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de $n \geq 3$ $P < 0.001$ con respecto a su control.

VII. DISCUSIÓN

El aumento de las ERO es debido a la susceptibilidad de la peroxidación de los lípidos de la membrana, inducidas por daño oxidativo que provoca una disfunción de la CTE y disminución en la longevidad (Aguilar-Toral *et al.*, 2014). En el presente trabajo, se estudió si las PHGPx podrían tener una función en la protección de la respiración mitocondrial en células de levadura envejecidas, en particular la isoforma Gpx2. Gpx2 es una de las tres fosfolípido hidroperóxido glutatiól peroxidasa (Gpx1, Gpx2 y Gpx3) en *Saccharomyces cerevisiae* y es ortóloga de la PHGPx/Gpx4 en mamíferos (Tanaka *et al.*, 2005). Gpx2 se encuentra en la mitocondria tanto en la membrana externa orientada hacia el citoplasma; en la superficie de la membrana interna orientada hacia el espacio intermembranal y en la matriz mitocondrial (Ukai *et al.*, 2011). Lo cual refleja la importancia de esta enzima en el mantenimiento del estado redox de los diferentes compartimientos mitocondriales. Cabe resaltar que Gpx2 es una proteína periférica de membrana que se encuentra asociada a ésta a través de interacciones iónicas (Ukai *et al.*, 2011).

Como experimento control para observar si la ausencia de los genes GPXs tiene un efecto en el crecimiento, las levaduras se crecieron hasta fase estacionaria, donde se observó que durante la fase logarítmica, la mutación en cualquiera de los genes GPXs no tuvo un efecto negativo sobre la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación (Tabla 2). Esto sugiere que probablemente los genes GPXs se inducen durante la fase estacionaria de la levadura. En concordancia con lo anterior, se observó que efectivamente cuando las células se dejaron envejecer en condiciones con y sin C18:3, la viabilidad disminuyó principalmente en las células *gpx2Δ* a los 15 días de envejecimiento en condiciones ya sea con C18:3 (Figura 9, panel B) o en ausencia de este ácido graso (Figura 9, panel A). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la participación de Gpx1 y Gpx2 es en la preservación de la viabilidad de la levadura en presencia de C18:3 a los 15 días de envejecimiento. Mientras que la Gpx2

puede tener alguna función protectora independiente del efecto perjudicial de los ácidos grasos, lo cual sugiere que Gpx2 tiene una función adicional como antioxidante, esta posible función contrasta con la interrupción del gen GPX2 no afectó el crecimiento en presencia o en ausencia de C18:3 (Avery y Avery, 2001). Sin embargo, es posible proponer que las discrepancias entre el presente trabajo y el anteriormente citado radican en que en el primero, las células se encontraban en fase estacionaria donde el metabolismo respiratorio se vuelve indispensable debido al agotamiento de la glucosa en el medio y a la acumulación de productos no fermentables tales como el etanol o el glicerol, para cuyo metabolismo la función mitocondrial es vital para la supervivencia de la levadura. En cambio, en el trabajo de Avery y Avery, las células fueron crecidas en glucosa como fuente de carbono hasta fase exponencial media o tardía, donde predomina el metabolismo fermentativo y la respiración mitocondrial no es esencial para la supervivencia. Debido a esto, es posible proponer que Gpx2 es necesaria para la preservación de la viabilidad de la levadura cuando la respiración mitocondrial es máxima para permitir el recambio de ATP y la reoxidación del NAD^+ procedente del catabolismo, posiblemente por disminuir la formación de las ERO producidas durante la respiración. La disminución de la viabilidad podría estar relacionada con la pérdida de la función mitocondrial. La respiración en el estado 4 y U así como el potencial de membrana disminuyeron de manera más acentuada en la cepa *gpx2Δ* a los 15 días de envejecimiento (Figura 11). En ausencia de C18:3 se observó una mayor funcionalidad de la CTE, lo cual fue corroborado por la disipación del potencial de membrana inducido por el desacoplante CCCP (Figura 10). En contraste, en presencia de C18:3, la respiración de las células disminuyó tanto en el estado 4 (Figura 11), como en el estado U (Figura 12), en especial, en la cepa *gpx2Δ* a los 15 días de envejecimiento, de manera paralela a una disminución del potencial de membrana mitocondrial (Figura 10). Estos resultados pueden ser explicados de dos maneras: en primer lugar, podrían indicar que la disminución del potencial de membrana mitocondrial es debida a una disminución de la capacidad de la CTE para translocar H^+ a través de la membrana interna al afectarse la actividad de los complejos respiratorios, como lo refleja la disminución de la respiración; la otra

explicación podría ser que la disipación del potencial de membrana es causado por el daño en las membranas mitocondriales debido a la presencia del C18:3 y a su peroxidación por las ERO, lo cual daría lugar al reingreso de los H⁺ del espacio intermembranal a la matriz. Lo anterior puede significar que Gpx2 tiene una función protectora del funcionamiento de la CTE a los 15 días de envejecimiento al prevenir la pérdida de la actividad de la CTE debido al estrés producido por los productos de degradación de los ácidos grasos poliinsaturados debido al incremento en la generación de ERO. A este respecto, en otro estudio previo, se observó que la adición de C18:3 incrementó varias veces la producción de ERO de células envejecidas durante 28 días e inhibió casi por completo la respiración mitocondrial. Sin embargo, de manera inesperada, se observó que las células se volvieron resistentes a la peroxidación de lípidos aun cuando las mitocondrias contenían en sus membranas una proporción importante de C18:3 (Aguilar-Toral *et al.*, 2014). Por lo tanto, Gpx2 podría ser una proteína crucial para la preservación de la composición y función de las membranas mitocondriales en etapas tardías del envejecimiento, lo cual se ve reflejado en la mayor sensibilidad al C18:3 observada en la cepa *gpx2Δ* respecto a su cepa parental tanto en términos de sobrevivencia; preservación de la función mitocondrial y la producción de ERO.

No obstante, la viabilidad en ausencia del C18:3 de las cepas *gpx1Δ* y *gpx2Δ* disminuyó de manera acentuada a los 30 días (Figura 9) respecto a la viabilidad de la cepa parental, mientras que la respiración mitocondrial se inhibió en mayor grado en las cepas *gpx2Δ* y *gpx3Δ* a la misma edad del cultivo (Figura 11). Debido a que *S. cerevisiae* carece de las desaturasas y elongasas necesarias para la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados (Martin *et al.* 1999), no contiene este tipo de ácidos grasos de forma nativa y por lo cual esos datos sugieren que las proteínas Gpx cumplen otra función adicional a las de ser fosfolípido hidroperóxido glutatió peroxidasas como ha sido propuesto por Avery y Avery (2001). En este sentido, se ha propuesto que Gpx3 participa en la señalización mediada por el factor de transcripción de respuesta a estrés oxidativo Yap1p para la inducción de la transcripción de genes involucrados en la defensa antioxidante

(Delaunay *et al.*, 2002). Por lo tanto, es de suponerse que los efectos de la mutación de GPX3 se manifiestan en fases muy avanzadas del envejecimiento de los cultivos cuando las defensas antioxidantes basales (es decir, aquellas que se expresan constitutivamente) son sobrepasadas por la acumulación de daño oxidativo. En el mismo tenor, de manera inesperada, la mutación de GPX2 dio como resultado una menor velocidad de respiración (Figura 11) y una menor viabilidad en las células envejecidas en ausencia de C18:3 a los 15 y 30 días (Figura 9). Esto, por lo tanto, podría implicar que GPX2 podría tener una función de peroxidasa con otros tipos de peróxidos diferentes a los fosfolípidos de hidroperóxidos. En relación a lo anterior, se ha propuesto que en la proteína homóloga de Gpx2 en mamíferos, la Gpx4 puede reducir a otros sustratos diferentes a los hidroperóxidos de lípidos tales como el H₂O₂ (Ran *et al.* 2004). Por lo tanto, es probable que Gpx2 pueda ser un sistema protector del daño inducido por el H₂O₂ una vez que otras enzimas que remueven las ERO tales como la catalasa o el sistema de tiorredoxina pierdan su capacidad antioxidante o que Gpx2 tenga una Km más alta por el H₂O₂ y que participen en la destoxicación de este peróxido una vez superada una concentración cercana a su Km. Esta idea tiene sentido también si se toma en cuenta que es poco probable que un gen se haya mantenido en la levadura durante la evolución tomando en cuenta que su sustrato fisiológico en mamíferos, los fosfolípidos peroxidados, no se encuentran en este microorganismo.

Las células envejecidas con C18:3 produjeron niveles más altos de ERO que las células mantenidas en ausencia de este ácido graso (Figura 13). Las ERO aumentaron utilizando sustratos no fermentables, por lo cual, esto indica que las mismas fueron generadas en la mitocondria. Mientras tanto, las ERO detectadas en presencia de un sustrato fermentable, además de poder ser de origen mitocondrial, también pueden provenir de otras fuentes citosólicas tales como las NADPH oxidasas (Rinnerthaler *et al.*, 2012) o los peroxisomas (Ohdate *and* Inoue, 2012). Es de destacar que en la cepa *gpx3Δ* aumentaron las ERO a los 0 días, en la fase post-diáuxica donde el metabolismo es alto (Figura 13). Estudios de esperanza de vida con metabolismo alto han sido cruciales en establecer un

enlace entre resistencia al estrés oxidativo y la longevidad (Fabrizio *et al.*, 2001). Gpx3 es una proteína que tiene una función de detectar y transferir la señal oxidativa al factor de transcripción Yap1 para la expresión de sistemas antioxidantes (Delaunay *et al.*, 2002). En función de esto, la observación en el presente estudio de los niveles aumentados de ERO en esta mutante se puede interpretar como que la señal oxidativa no se detectó y se transfirió a Yap1p, por lo cual no se produjo una respuesta antioxidante mediada por este factor transcripcional (Figura 13). Estos resultados confirman que la Gpx3 participa en una respuesta antioxidante a concentraciones fisiológicas de ERO, mientras que Gpx2 y Gpx1 protegen contra el daño a concentraciones supra fisiológicas de ERO.

A los 15 días de envejecimiento las ERO disminuyeron en todas las mutantes, tanto con sustratos fermentables y no fermentables (Figura 15). Esto podría ser causado por la disfunción mitocondrial observada a los 15 días de envejecimiento, principalmente en la cepa *gpx2Δ*, donde el daño causado por las ERO en los complejos de la CTE se podría ver reflejado como una disminución de la capacidad de las mitocondrias para oxidar sustratos respiratorios, lo cual es un requisito para la formación de especies parcialmente reducidas que son responsables de la formación de ERO tales como el radical semiquinona o el superóxido. En contraste, en la cepa parental BY4741 los niveles de ERO permanecieron constantes, lo cual sugiere que las PHGPx reducen; neutralizan y reparan los lípidos oxidados de las membranas, con estas funciones se preserva la función mitocondrial en el envejecimiento y permite la oxidación de los sustratos y, a su vez, la formación especies parcialmente reducidas. A los 30 días las ERO no aumentaron en las cepas *gpx1Δ*, *gpx2Δ* y *gpx3* pero sí lo hicieron en la cepa nativa BY4741 (Figura 17). Esto podría ser causado debido a que en las mutantes *gpxΔ* el ciclo celular podría entrar en estado quiescente G₀. Ya que las ERO producidas son neutralizadas por las glutatión peroxidasas y PHGPx durante la fase G₁/S del ciclo celular (Rhee, 2006), por ello, al estar ausentes las PHGPx, las ERO no son neutralizadas y el ciclo celular se detendría. Aunque en la fase G₀ existe poca cantidad de ERO formadas y son neutralizadas por las glutatión

peróxidasas y PHGPx (Rhee, 2006). En conjunto los resultados muestran que las PHGPx participan en la preservación de la función mitocondrial durante el envejecimiento en *Saccharomyces cerevisiae*, en particular, Gpx2.

VIII. CONCLUSIÓN

Los productos de los genes GPX preservan de manera diferencial la función mitocondrial y la viabilidad celular durante el envejecimiento en *Saccharomyces cerevisiae*, inclusive en ausencia de un ácido graso poliinsaturado.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar-Toral R., Fernández-Quintero M., Ortiz-Ávila O., Hernández De La Paz L. Calderón-Cortés E., Rodríguez-Orozco A.R., Saavedra-Molina A., Calderón-Torres M., Cortés-Rojo C. 2014. Characterization of the effects of a polyunsaturated fatty acid (PUFA) on mitochondrial bioenergetics of chronologically aged yeast. *J Bioenerg Biomembr.* 46:205-220

Arai M., Imai H., Koumura T., Yoshida M., Emoto K., Umeda M., Chiba N., Nakagawa Y. 1999. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a major role in preventing oxidative injury to cells. *J Biol Chem.* 274:4924-4933

Avery A.M., Avery S.V. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *J Biol Chem.* 276:33730-33735

Ayala A., Muñoz M.F., Argüelles S. 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *J OMCL.* 2014: 1-5

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

Bartosz, G. 2009. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol.* 8:1303-1315

Bitterman K. J., Medvedik O., Sinclair D. A.. 2003. Longevity regulation in *Saccharomyces Cerevisiae*: linking metabolism, genome stability, and heterochromatin. *Microbiol Mol Biol.* 67: 376-399

Boonstra J., Post J.A. 2004. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene.* 337:1-13

Brigelius-Flohe R., Aumann K-D., Blocker H., Gross G., Kiess M., Kloppel K-D., Maiorino M., Roveri A., Schuckelt R., Ursini F., Wingender E., Flohe L. 1994. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence. *J Biol Chem.* 269: 7342-7348

Camougrand N., Caubet R., Guerin M. 1983. Evidence for an alternative and non-phosphorylating pathway for NADH reoxidation in a yeast resistant to glucose repression. *J Biochem* 145:367-371

Cano-Estrada A., González- Halphen D. 2011. F₁F₀ –ATP Sintasa y sus diferencias estructurales. *REB 30* 3: 98-108

PARTICIPACIÓN DE LAS FOSFOLÍPIDO HIDROPERÓXIDO GLUTATIÓN PEROXIDASAS (PHGPx) EN LA PRESERVACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN EL ENVEJECIMIENTO DE *Saccharomyces cerevisiae*.

Chance B., G.R. Williams. 1956. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem.* 17:65-134

Chen Q., Vazquez E.J., Moghaddas S., Hoppel C.L. And Lesnefsky E.J. 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem.* 278: 36027-36031

Chomyn A., Cleeter M.W.J., Ragan C.I., Riley M., Doolittle R.F., Attardi G.1986. URF6, Last unidentified reading frame of human mtDNA, codes for an NADH dehydrogenase subunit. *Science* 234:614-618

Cortés Rojo C., Clemente Guerrero M., Calderón Cortés E., Manzo Ávalos S., Uribe S., Saavedra Molina A. 2006. La cadena del transporte de electrones de *Saccharomyces cerevisiae* es inhibida por H₂O₂ sin la participación de la oxidación de lípidos. *Ciencia Nicolaita.* 45:55-70

Cortés-Rojo C. 2009a Influencia de la peroxidación lipídica sobre la susceptibilidad de la cadena de transporte de electrones al daño por el estrés oxidativo: estudios en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Doctorado. Universidad Michoacana De San Nicolás De Hidalgo. Instituto De Investigaciones Químico Biológicas. Pp. 3-18

Cortés-Rojo C., Calderón-Cortés E., Clemente-Guerrero M., Estrada-Villagómez M., Manzo-Avalos S., Mejía-Zepeda R., Boldogh I., Saavedra-Molina A. 2009b. Elucidation of the effects of lipoperoxidation on the mitochondrial electron transport chain using yeast mitochondria with manipulated fatty acid content. *J Bioenerg Biomembr.* 1:15- 28

Der-Giezen M. 2011. Mitochondria and the rise of eukaryotes. *Bioscience.* 61:594-601

De Santis A., Melandri B.A. 1984. The oxidation of external NADH by an intermembrane electron transfer in mitochondria from the ubiquinone-deficient mutant E3-24 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys.*232: 354-365

Delaunay A., Pflieger D., Barrault M.B., Vinh J., Toledano M.B. 2002. A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox- transducer in gene activation. *Cell* 111: 471-481

Demin O.V., Kholodenko B.N., Skulachev V. P. 1998a. A model of O₂-generation in the complex III of the electron transport chain. *Mol Cell Biochem.* 184:21-33

Demin O.V., Westerhoff H.V., Kholodenko, B.N. 1998. Mathematical modelling of superoxide generation with the Bc1 complex of mitochondria. *Biochemistry* 63:634-649

PARTICIPACIÓN DE LAS FOSFOLÍPIDO HIDROPERÓXIDO GLUTATIÓN PEROXIDASAS (PHGPx) EN LA PRESERVACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN EL ENVEJECIMIENTO DE *Saccharomyces cerevisiae*.

Edens W.A., Sharling L., Cheng G., Shapira R., Kinkade J.M., Lee T., Edens H.A., Tang X., Sullards C., Flaherty D.B., Benian G.M., Lambeth J.D. 2001. Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by duox, a multidomain oxidase/oxidoreductase with homology to the phagocyte oxidase subunit Gp91phox. *J Cell Biol.* 154:879-891

Fabrizio P., Pozza F., Pletcher S.D., Gendron C.M., Longo V.D. 2001. Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science* 292:288-290

Filaire E., Toumi H. 2012. Reactive oxygen species and exercise on bone metabolism: friend or enemy?. *Science* 79: 341-346

Finaud J., Lac G., Filaire E. 2006. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med* 36:327-58

Folch-Mallol J. L., Garay-Arroyo A., Lledías F., Covarrubias-Robles A. 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev Latinoam Microbiol.* 46:24-46

Gille L., and Nohl H. 2001. The ubiquinol/Bc1 redox couple regulates mitochondrial oxygen radical formation. *Arch Biochem Biophys.* 388:34-38

Girotti W. 1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res.* 39:1529-1542

Godeas C., Sandri G., Panfili E. 1994. Distribution of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) in rat testis mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1191:147-150

Grandier-Vazeille X., Bathany K., Chaignepain S., Camougrand N., Manon S., Schmitter JM. 2001. Yeast mitochondrial dehydrogenases are associated in a supramolecular complex. *Biochemistry* 40:9758-9769

Grigorieff N., 1999. Structure of the respiratory NADH: ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *Curr Opin Struct. Biol.* 9: 476-483

Guarente L.P., Partridge L., Wallace D.C. 2008. Molecular biology of aging. *CSH Monographs.* 51:1-38

Halliwell B., Gutteridge J. 2007 Free radicals in biology and medicine. Oxford, UK: Oxford Univ. Press.

Halliwell B. 1999. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res.* 4:261-272

PARTICIPACIÓN DE LAS FOSFOLÍPIDO HIDROPERÓXIDO GLUTATIÓN PEROXIDASAS (PHGPx) EN LA PRESERVACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN EL ENVEJECIMIENTO DE *Saccharomyces cerevisiae*.

Han D., Antunes F., Canali R., Rettori D., Cadenas E. 2003. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem.* 278:5557-5563

Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry *J Gerontol* 3: 298-300

Hayflick L. 2007. Biological aging is no longer an unsolved problem. *Ann N Y Acad Sci.* 1100:1-13

Herrero A., Portero-Otín M., Bellmunt M.J., Pamplona R., Barja G. 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.* 122:427-443

Hulbert A.J., Pamplona R., Buffenstein R., Buttemer W. A. 2007. Life And Death: Metabolic Rate, Membrane Composition And Life Span Of Animals. *Physiol Rev.* 87: 1175–1213

Imai H., Nakagawa Y. 2003. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPc, gp4) in mammalian cells. *Free Radical Biol Med.* 34:145–169

Imai H., Sumi D., Sakamoto H., Hanamoto A., Arai M., Chiba N., Nakagawa Y. 1996. Overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppressed cell death due to oxidative damage in rat basophile leukemia Cells (RBL-2H3). *Biochem Biophys Res Commun.* 222:432-438

Inoue Y., Matsuda T., Sugiyama K., Izawa S., Kimura A. 1999. Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 274: 27002-27009

Iwata S., Lee J.W., Okada K., Lee J.K., Iwata M., Rasmussen B., Link T.A., Ramaswamy S., Jap B.K. 1998. Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc₁ complex. *Science.* 281:64-71

Kaeberlein M., Burtner C.R., Kennedy B.K. 2007. Recent developments in yeast aging. *Plos Genet.* 3:0655-0660

Kanner J., German J.B., Kinsella J.E. 1987. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Critic Rev Food Science Nutrition.* 25:317-364

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

PARTICIPACIÓN DE LAS FOSFOLÍPIDO HIDROPERÓXIDO GLUTATIÓN PEROXIDASAS (PHGPx) EN LA PRESERVACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN EL ENVEJECIMIENTO DE *Saccharomyces cerevisiae*.

Kirkwood T.B., Holliday R.. 1979. The evolution of ageing and longevity. *Proc R Soc London B Ser.* 205:531–546

Kirkwood T.B. 2005. Understanding the old science of aging. *Cell.* 4: 437-447

Lemasters J.J., Nieminen A.L., Qian T., Trost L.C., Elmore S.P., Nishimura Y., Crowe R.A., Cascioc W.E., Bradham C.A., Brenner D.A., Herman B. 1998. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta.* 1366:177-196

Longo V.D., Fabrizio P. 2002. Regulation of longevity and stress resistance: a molecular strategy conserved from yeast to humans? *Cell Mol Life Sci.* 59:903-908

MacLean M., Harris N., Piper P. W. 2001. Chronological lifespan of stationary phase yeast cells; a model for investigating the factors that might influence the ageing of post-mitotic tissues in higher organisms. *Yeast.* 18: 499-509

Marres C.A., De Vries S., Grivell L.A. 1991. Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenone-insensitive internal NADH: ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 195:857-862

Mcbride H.M., Neuspiel M., Wasiak S. 2006. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Current Biol* 16:551-560

Molecular Probes. 2006. Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Reagents. Invitrogen.

Montgomery M.K., Hulbert A.J., Buttemer W.A. 2011. The long life of birds: the rat- pigeon comparison revisited. *Plos ONE* 6: 1-13

Mortimer R.K., Andjohnston J.R. 1959. Life span of individual yeast cells. *Nature* 183: 1751–1752

Nicholls D.G. 1987. Bioenergética: introducción a la teoría quimiosmótica. Editorial Reverté. 105-138

Nomura K., Imai H., Koumura T., Arai M., Nakagawa, Y. 1999. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. *J Biol Chem.* 274:29294-29302

Ohdate T., Inoue Y. 2012. Involvement of glutathione peroxidase 1 in growth and peroxisome formation in *Saccharomyces cerevisiae* in oleic acid medium. *Biochim Biophys Acta.* 1821:1295-305

PARTICIPACIÓN DE LAS FOSFOLÍPIDO HIDROPERÓXIDO GLUTATIÓN PEROXIDASAS (PHGPx) EN LA PRESERVACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN EL ENVEJECIMIENTO DE *Saccharomyces cerevisiae*.

Ohdate T., Kita K., Inoue Y. 2010. Kinetics and redox regulation of Gpx1, an atypical 2-Cys peroxiredoxin, in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 10:787-790

Okun J.G., Lummen P., Brandt U. 1999. Three classes of inhibitors share a common binding domain in mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) *J Biol Chem* 274:2625-2630

Pamplona R., Portero-Otín J.R., Requena S.R., Thorpe A., Herrero., G. Barja. 1999. 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.* 106:283-296

Pamplona R., Barja G., Portero-Otin M. 2002. Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous-longevity adaptation?. *Ann N Y Acad Sci.* 959:475-490

Pamplona R., Portero-Otín M., Ruiz C., Gredilla R., Herrero A., Barja G. 2000. Double Bond Content Of Phospholipids And Lipid Peroxidation Negatively Correlate With Maximum Longevity In The Heart Of Mammals. *Mech Ageing Dev.* 112:169-183

Pamplona R., Portero-Otín M., Riba D., Ruiz C., Prat J., Bellmunt M.J., Barja G. 1998. Mitochondrial membrane peroxidizability index is inversely related to maximum life span in mammals. *J Lipid Res.* 39: 1989-1994

Pamplona R., Prat J., Cadenas S., Rojas C., Pérez-Campo R., López Torres M., Barja G. 1996. Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from long-lived species: the pigeon and human case. *Mech Ageing Dev.* 86:53-66

Peña A., Sánchez N.S., Calahorra M. 2010. Estimation of the electric plasma membrane potential difference in yeast with fluorescent dyes: comparative study of methods. *J Bioenerg Biomem.* 42: 419-432

Pushpa-Rekha T.R., Burdsall A.L., Oleksa L.M., Chisolm G.M., Driscoll, D.M. 1995. Rat phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. cDNA cloning and identification of multiple transcription and translation start sites. *J Biol Chem.* 270: 26993-26999

Quinlan C.L., Orr A.L., Perevoshchikova I.V., Treberg J.R., Ackrell B.A., Brand M.D. 2012. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J Biol Chem.* 287:27255-27264

PARTICIPACIÓN DE LAS FOSFOLÍPIDO HIDROPERÓXIDO GLUTATIÓN PEROXIDASAS (PHGPx) EN LA PRESERVACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN EL ENVEJECIMIENTO DE *Saccharomyces cerevisiae*.

Raha S., Robinson B.H. 2000. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci.* 25:502-508

Ran Q., Liang H., Gu M., Qi W., Walter C.A., Roberts L.J., Herman B., Richardson A., Van Remmen H. 2004 Transgenic mice overexpressing glutathione peroxidase 4 are protected against oxidative stress-induced apoptosis. *J Biol Chem.*279:55137-55146

Rhee SG. 2006. Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science.* 312: 1882-1883.

Rice-Evans C., Burdon R. 1993. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res* 32:71-110

Richter C. 1988. Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging? *FEBS Lett.* 241:1-5

Rinnerthaler M., Büttner S., Laun P., Heeren G., Felder T. K., Klinger H., Weinberger M., Stolze K., Grousl T., Hasek J., Benada O., Frydlova I., Klocker A., Simon-Nobbe B., Jansko B., Breitenbach-Koller H., Eisenberg T., Gourlay C. W., Madeo F., Burhans W. C., Breitenbach M. 2012. Yno1p/Aim14p, a NADPHoxidase ortholog, controls extramitochondrial reactive oxygen species generation, apoptosis, and actin cable formation in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109: 8658-8663

Roskoski R. 2003. Bioquímica. Mc Graw Hill Interamericana. Pp 76-77, 127-135

Roveri A., Maiorino M., Nisii C., Ursini F. 1994. Purification and characterization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from rat testis mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1208:211-221

Saraste, M. 1999. Oxidative phosphorylation at the *Fin De Sie`Cle*. *Science* 283:1488-1493

Scheffler I.E. 2000. A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* 1:3-31

Seo B.B., Kitajima-Ihara T., Chan EK., Scheffler I.E., Matsuno-Yagi A., Yagi T. 1998. Molecular remedy of complex I defects: rotenone-insensitive internal NADH-quinone oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria restores the NADH oxidase activity of complex I-deficient mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9167-9171

St-Pierre J., Buckingham J.A., Roebuck S.J., Brand M.D. 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem.* 277:44784-44790

Strehler B.L. 1962. Time, cells and aging. *Academic Press, New York.*

Stryer L., Berg J.M., Tymoczko J.L. 2012. Bioquímica con aplicaciones clínicas. Editorial Reverté. Séptima Edición. Pp 525-543.

Sugioka K., Nakano M., Totsune-Nakano H., Minakami H., Tero-Kubota S., Ikegami Y. 1988. Properties of a coenzyme, pyrroloquinoline quinone: generation of an active oxygen species during a reduction-oxidation cycle in the presence of NAD(P)H and O₂. *Biochim Biophys Acta* 936:377-385

Suh Y.A. Arnold R.S., Lassegue B., Shi J., Xu X., Sorescu D., Chung A.B., Griending K.K., Lambeth D.J. 1999. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*. 401:79-82

Sun Y., Kaksonen M., Madden D.T., Schekman R., Drubin D.G. 2005. Interaction of Sla2p ANTH domain with PtdIns(4,5)P₂ is important for actin-dependent endocytic internalization. *Mol Biol Cell* 16:717-730

Tanaka T., Izawa S., Inoue Y. 2005. GPX2, encoding a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homologue, codes for an atypical 2-Cys peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280: 42078-42087

Toppo S., Vanin S., Bosello V., Tosatto S.C.E. 2008. Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily. *Antiox redox signal*. 10:1501-1510

Tortora V., Quijano C., Freeman B., Radi R., Castro L. 2007. Mitochondrial aconitase reaction with nitric oxide, S-nitrosoglutathione, and peroxynitrite: mechanisms and relative contributions to aconitase inactivation. *Free Radic Biol Med*. 42:1075-1088

Trumpower B.L. 1990. The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome *Bc₁* complex. *J Biol Chem*. 265:11409-11412

Tsuzi D., Maeta K., Takatsume Y., Izawa S., Inoue Y. 2004. Regulation Of The Yeast Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase GPX2 By Oxidative Stress Is Mediated By Yap1 And Skn7. *FEBS Lett*. 565:148-154

Turrens J.F., Boveris, A. 1980. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J*. 191:421-427

Ukai Y., Kishimoto T., Ohdate T., Izawa S., Inoue Y. 2011. Glutathione peroxidase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is distributed in mitochondria and involved in sporulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 411:580-585

PARTICIPACIÓN DE LAS FOSFOLÍPIDO HIDROPERÓXIDO GLUTATIÓN PEROXIDASAS (PHGPx) EN LA PRESERVACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN EL ENVEJECIMIENTO DE *Saccharomyces cerevisiae*.

Ursini F., Maiorino M., Gregolin C. 1985. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta*. 839:62-70

Ursini F., Maiorino M., Roveri A. 1997. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx): more than an antioxidant enzyme?. *Biom Environ Sci*. 10: 327-332

Voet D., Voet J. 2006. Bioquímica. Tercera Edición. Editorial Panamericana. 829- 877

Whittaker P. A., Manks S. 1982. Mitocondria: estructura, función y formación. *Editorial Continental*. 137-163

Yin H., Xu L., Porter N.A. 2011. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev*. 111:5944-5972

Zhang L.P., Maiorino M., Roveri A., Ursini F. 1989. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: specific activity in tissues of rats of different age and comparison with other glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta*. 1006:140-143