

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”



**PAPEL DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA 2 (GPX2) EN LA
PRODUCCIÓN MITOCONDRIAL DE ESPECIES REACTIVAS DEL
OXÍGENO EN EL CITOCROMO *b* DE CÉLULAS DE *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE* EN RESTRICCIÓN CALÓRICA**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

L.N Ana Victoria Hurtado Villagómez

Director:

D.C Christian Cortés Rojo

Morelia, Mich. Junio 2021

ÍNDICE

Resumen.....	6
Abstract.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 El envejecimiento.....	8
1.2 Restricción calórica.....	9
1.3 Especies reactivas de oxígeno (ERO).....	9
1.4 Cadena de transporte de electrones (CTE).....	11
1.5 El complejo III de la CTE.....	12
1.6 Citocromo <i>b</i>	14
1.7 Glutación peroxidasa 2 (<i>Gpx2</i>).....	14
2. JUSTIFICACION.....	15
3. HIPOTESIS.....	16
4. OBJETIVOS.....	16
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	16
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
5.1 Condiciones de cultivo.....	16
5.2 Determinación de la longevidad celular.....	17
5.3 Aislamiento de mitocondrias.....	17
5.4 Medición de la actividad del complejo III.....	17
5.5 Determinación de la reducción del citocromo <i>b</i>	18
5.6 Determinación de los niveles de ERO.....	18
5.7 Análisis estadístico.....	18
6. RESULTADOS.....	19
6.1 Efectos de la restricción calórica en la longevidad cronológica de la levadura.....	19
6.2 Efecto de la restricción calórica y el envejecimiento en la actividad del complejo III.....	20
6.3 Efectos de la restricción calórica sobre la reducción de los citocromos del complejo III.....	22
6.4 Efectos de la restricción calórica sobre la producción de ERO.....	27
7. DISCUSIÓN.....	29
8. CONCLUSIÓN.....	32
9. REFERENCIAS.....	33

DEDICATORIA

A mis padres quienes me han motivado a seguir adelante pese a las dificultades, gracias por su amor y apoyo incondicional.

A mi amado hijo Matías por ser fuente de inspiración y alegría.

A mis hermanos Jaime y Adrián por ser un gran ejemplo y por su apoyo incondicional.

No existe el fracaso, salvo cuando dejamos de esforzarnos.

(jean- Paul Marat)

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor **D.C Christian Cortés Rojo** por su gran disposición, motivación y apoyo.

A mi comité tutorial **D.C. Bertha Fenton Navarro, D.C. Daniel Godínez Hernández, D.C. Marcia Gauthereau Torres, D.C. Rocío del Carmen Montoya Perez.**

A **M.C Eridani Olmos** por su colaboración, paciencia y apoyo en el Laboratorio.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por la beca otrogada.

Resumen. La producción mitocondrial de especies reactivas del oxígeno (ERO) incrementa con el envejecimiento y esto ha sido asociado con una disminución en la longevidad. La restricción calórica (RC) es la única manipulación no genética que extiende la longevidad en una amplia variedad de organismos, incluyendo a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Un mecanismo por el cual la RC podría aumentar la longevidad es mediante la disminución de la producción de ERO al incrementar el flujo de electrones en la subunidad citocromo *b* del complejo III, uno de los principales sitios de producción de ERO en la mitocondria. La glutatión peroxidasa 2 (*Gpx2*) es una enzima contrarresta la producción mitocondrial de ERO, por lo que los efectos benéficos de la RC podrían estar mediados por esta enzima. El objetivo de este trabajo fue determinar si *Gpx2* media el incremento de la longevidad de la levadura por la RC al preservar el flujo de electrones en el citocromo *b* del complejo III. Se indujo la RC en la cepa nativa (WT) BY4741 de *S. cerevisiae* y su mutante en el gen *Gpx2Δ* mediante el cultivo en medio con 0.05% de glucosa, y sin RC con 2% de glucosa hasta por 37 días para inducir el envejecimiento de los cultivos. Se observó que la RC aumentó la longevidad de la cepa WT, al detectarse una mayor viabilidad celular con RC que con 2% de glucosa, lo cual no se observó en la mutante *Gpx2Δ*. La actividad máxima del complejo III se observó a los 17 días de envejecimiento en las células WT con RC, la cual fue disminuyendo gradualmente hasta los 37 días de cultivo. En todos los casos, la actividad fue menor en las células sin RC, siendo casi nula a los 37 días. La actividad del complejo III fue residual en la mutante *Gpx2Δ* en comparación con la WT, independientemente de la RC. En concordancia con lo anterior, se observó una mejor reducción del citocromo *b* en mitocondrias de células WT con RC a partir de los 17 días hasta el día 37, mientras que en las mitocondrias de la mutante *Gpx2Δ*, solo se observó una mayor reducción del citocromo en el día 17 con RC, mientras que en el resto de los días estudiados, la reducción de los citocromos fue despreciable. Respecto a los niveles de ERO, se observó un incremento de un orden de magnitud a los 17 días en la cepa WT, el cual fue ligeramente mayor sin RC. En contraste, la producción de ERO fue mucho mayor en la mutante *Gpx2Δ* independientemente de la restricción calórica, mientras que fue casi nula a los 37

días. Se concluyó que el incremento de la longevidad por RC se ve afectado por la ausencia de *Gpx2*, lo cual podría estar asociado con la disfunción del complejo III, la casi nula reducción del citocromo *b* y la formación excesiva de ERO provocadas por la ausencia de *Gpx2*.

Palabras clave: envejecimiento, restricción calórica, glutatión peroxidasa 2, mitocondria, ERO.

Abstract. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) increases with aging and this has been associated to decreased longevity. Calorie restriction (CR) is the only non - genetic manipulation that extends longevity in a wide variety of organisms, including the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. A mechanism by which CR may augment longevity is by decreasing ROS production due to increased electron flow in the cytochrome *b* subunit of the complex III, one of the main sites of ROS production in mitochondria. Glutathione peroxidase 2 (*Gpx2*) counteracts ROS mitochondrial ROS production, thus, the possibility exists that the beneficial effects of CR may be mediated by this enzyme. The goal of this work was to determine whether *Gpx2* mediates longevity extension by CR by decreasing ROS production via the improvement of electron flow in the cytochrome *b* of the complex III. CR was induced in the wild - type BY4741 strain of *S. cerevisiae* and its *Gpx2Δ* mutant by the culture in a medium with 0.05% glucose, while standard medium with 2% glucose was used in non – restricted cultures, which were maintained up to 37 days to induce aging. CR increased yeast longevity in the WT strain, as higher cell viability was observed with 0.05% glucose than with 2%, which was not observed in the *Gpx2Δ* mutant. Maximal complex III activity was observed on the 17th day of aging in WT cells with CR, which was diminishing gradually up to 37 days of culture. In all the days studied, complex III activity was lower in the cells without CR, being negligible on the 37th day. Complex III activity was residual in the *Gpx2Δ* mutant in comparison with the WT cells, independently of CR. Accordingly, it was observed a better cytochrome *b* reduction in mitochondria from WT cells with CR since the 17th day up to the 37th day, while in mitochondria from the *Gpx2Δ* mutant it was observed a higher cytochrome *b* reduction only on the 17th day with CR, while in the other days

cytochrome *b* reduction was negligible. Regarding ROS levels, it was observed an increase in ROS production of one order of magnitude on the 17th day in the WT cells, which was slightly lower with CR. In contrast, ROS production was much higher in the *Gpx2Δ* mutant, independently of CR, while it was almost undetectable on the 37th day. It was concluded that increased longevity by CR was impaired by the *Gpx2* deletion, which was associated to complex III dysfunction, the lack of cytochrome *b* reduction, and the excessive ROS production caused by *Gpx2* deletion.

Keywords: aging, calorie restriction, glutathione peroxidase 2, mitochondria, ROS

INTRODUCCIÓN

1.1. El envejecimiento.

Gran parte del éxito reciente de la investigación sobre el envejecimiento ha sido posible gracias a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, uno de los modelos eucariontes de estudio más simple. En este microorganismo se han identificado genes homólogos en mamíferos que modulan el envejecimiento, por lo que continuará sirviendo como un organismo modelo líder para estudiar vías relevantes para el envejecimiento y la enfermedad humana [Srivastava., 2017]. El envejecimiento es un proceso donde ocurre aumento del estrés oxidativo mitocondrial, lo cual causa daño en células, tejidos y disfunción de órganos [Skulachev et al., 2005]. Esto ha sido asociado a un incremento en el riesgo de padecer enfermedades crónico-degenerativas características del envejecimiento tales como la diabetes, la hipertensión, el cáncer, entre otras [Srivastava., 2017].

Para la gran mayoría de los estudios de envejecimiento en levaduras, el medio de elección es el crecimiento en medio rico YPD (extracto de levadura - peptona - dextrosa [YPD]). en presencia de glucosa al 2%. La reducción en la concentración de glucosa, una condición que se usa para modelar la restricción calórica en eucariontes multicelulares, provoca la extensión de la longevidad también en *S. cerevisiae*, aunque este puede variar en más del 30% en algunos fondos genéticos de la levadura a ningún efecto en otros fondos [Kaeberlein et al., 2007]. Las variaciones genéticas que explican estas diferencias han permanecido en gran parte inexploradas, pero es probable que

proporcionen información importante sobre los mecanismos del envejecimiento en la levadura.

1.2 Restricción calórica.

Se sabe que la restricción calórica dietética, una reducción en la disponibilidad de nutrientes sin inducir desnutrición, extiende el tiempo de vida en una amplia gama de organismos que va desde la levadura hasta los primates [Skulachev et al., 2005]. Se ha dedicado un gran esfuerzo a comprender las vías que median los beneficios de la restricción calórica, ya que intervenciones dirigidas a estas vías podrían ser efectivas en humanos contra las enfermedades asociadas al envejecimiento. En la levadura, la restricción calórica y sus efectos se producen al reducir la concentración de glucosa de 2% a 0.5% - 0.05% [Ruetenik et al., 2015].

S. cerevisiae es un organismo aerobio facultativo que genera la mayor parte de su energía en presencia de glucosa abundante a través de la fermentación con un metabolismo respiratorio limitado. En *S. cerevisiae*, limitar la disponibilidad de glucosa mejora el metabolismo respiratorio en la fase estacionaria temprana, pero se sabe poco sobre las respuestas durante el envejecimiento cronológico, que se define como la pérdida de viabilidad celular conforme transcurre la fase estacionaria [Kaeberlein et al., 2007].

1.3 Especies reactivas de oxígeno (ERO)

En el proceso de fermentación y respiración, una molécula debe aceptar electrones para que los carbohidratos y las grasas sean oxidados. El oxígeno es una molécula ideal en este sentido porque, en principio, se reduce hasta producir agua un residuo inocuo. Esto hace al oxígeno esencial, pero durante su reducción parcial se producen especies reactivas de oxígeno (ERO). Cuando el oxígeno molecular acepta un electrón, el producto generado es un radical libre con carga negativa, el anión superóxido, mientras que cuando acepta un segundo electrón y protones se puede producir otra especie reactiva, el peróxido de hidrogeno. Para que un átomo o molécula sea estable debe tener todos sus electrones apareados. Los átomos y moléculas que poseen electrones desapareados son llamados radicales libres y son muy inestables y

altamente reactivos. Pueden participar en una gran variedad de reacciones químicas y bioquímicas, al reaccionar con muchas de las moléculas que componen las células y oxidarlas [Aruoma et al., 2006].

Existe un gran número de fuentes exógenas de ERO, pero en torno al 5% del oxígeno utilizado en las reacciones de la respiración celular da lugar de manera fisiológica a la producción de ERO. Hay más especies reactivas de oxígeno aparte de las ya mencionadas, como pueden ser radical el hidróxilo ($\text{OH}\cdot$), el cual es extremadamente reactivo.

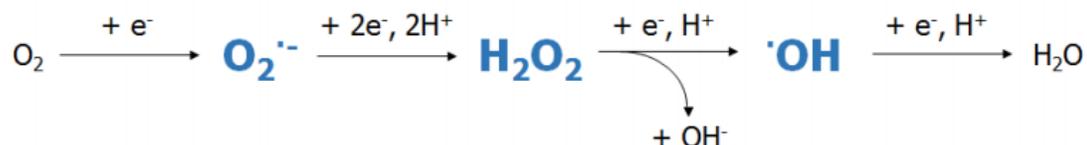


Figura 1. Captación de electrones y protones en el proceso de generación de ERO. La generación de ERO a partir de oxígeno se produce gracias a la captación sucesiva de electrones y protones.

La cadena de transporte de electrones (CTE) mitocondrial lleva a cabo la fase final del catabolismo al oxidar el NADH y el FADH_2 utilizando como aceptor final de electrones al oxígeno. Durante este proceso, se generan ERO debido a la reducción no catalítica del O_2 en los sitios redox de los complejos de la CTE. Se sabe que la producción de ERO a bajos niveles tiene un papel fisiológico en una amplia variedad de procesos que abarcan la diferenciación celular, la autofagia, la inmunidad, entre otros [Sena et al., 2012]. Dicha producción está finamente regulada por sistemas antioxidantes que actúan diferencialmente en función de los niveles de ERO [Winterbourn et al., 2008]. Este proceso, denominado hormesis, consiste en que bajo niveles de ERO activan transcripcionalmente a varios sistemas antioxidantes, lo cual resulta en un aumento posterior en la resistencia al estrés oxidativo; existe evidencia de que la restricción calórica ejerce sus beneficios a través de la hormesis [Cavezzi et al., 2020]. Por el contrario, las ERO pueden provocar daño oxidativo cuando la capacidad

protectora de los sistemas antioxidantes es superada por la tasa de producción de ERO, a lo cual se le denomina estrés oxidativo. Las ERO provocan daño a nivel molecular, atacando a los ácidos grasos poliinsaturados, proteínas y al ácido desoxirribonucleico (ADN). Esto pueden derivar en condiciones patológicas de etiología muy variada, desde enfermedades crónicas – degenerativas, enfermedades infecciosas o errores innatos del metabolismo, entre otras [Cortés – Rojo et al., 2011].

1.4 Cadena de transporte de electrones (CTE)

La fosforilación oxidativa es el proceso a través del cual las células liberan la energía almacenada en carbohidratos, grasas y proteínas para producir trifosfato de adenosina (ATP), la principal fuente de energía para las reacciones intracelulares. El proceso tiene lugar dentro de las mitocondrias e implica reacciones de oxidación – reducción y la generación de un gradiente electroquímico por la cadena de transporte de electrones. La cadena de transporte de electrones (cadena respiratoria mitocondrial) está incrustada en la membrana mitocondrial interna y consta de cuatro complejos multiproteicos (complejos I-IV), que transfieren electrones del dinucleótido reducido de nicotinamida adenina (NADH) y del dinucleótido de flavina adenina reducido (FADH_2) al oxígeno, generando agua (H_2O). La energía producida por las reacciones redox que ocurren en estos complejos se utiliza para translocar protones (H^+), desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal, generando un gradiente electroquímico a través de la membrana interna mitocondrial, cuya energía es utilizada por la F_1F_0 ATP – sintasa para la síntesis de ATP (Figura 2). Los electrones son transportados desde los complejos I y II al complejo III por la ubiquinona, y entre los complejos III y IV por el citocromo c [Acín-Pérez, et al., 2008].

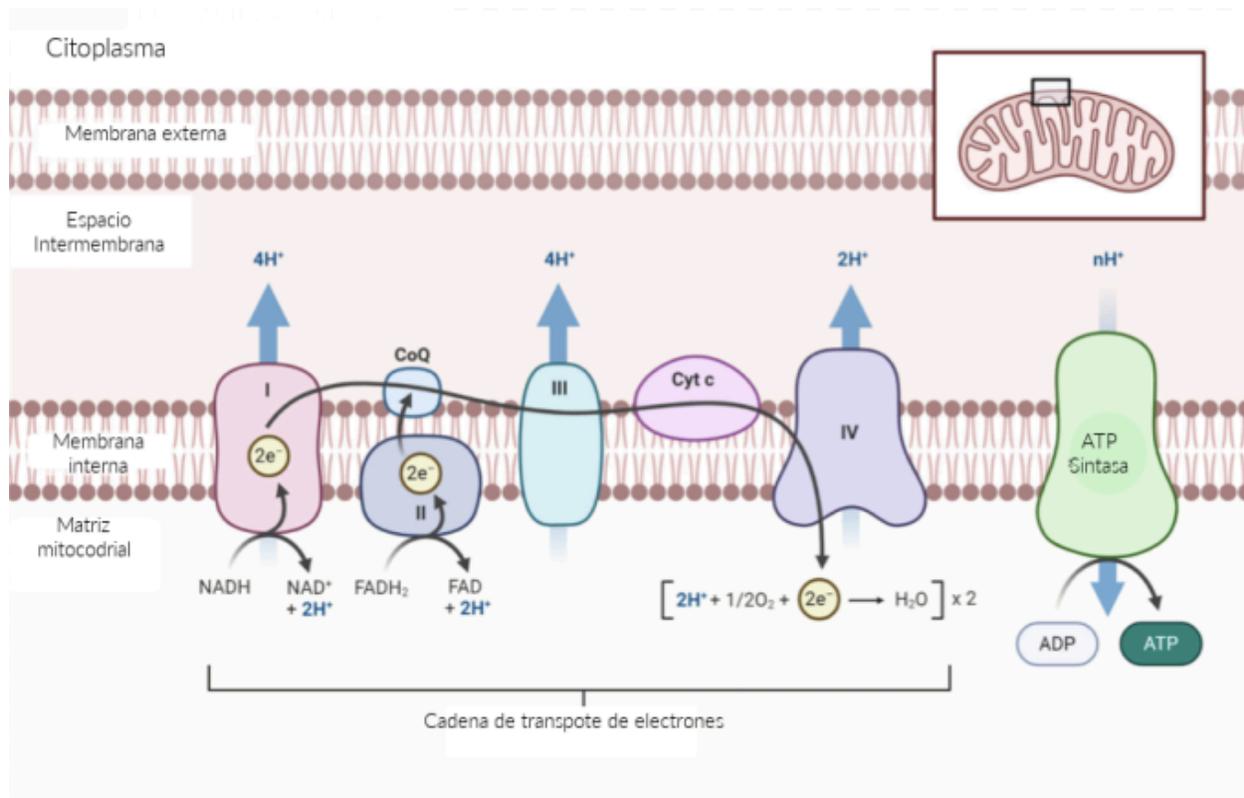


Figura 2. La cadena de transporte de electrones (CTE). Tomado y modificado de <https://microbenotes.com/electron-transport-chain/>

1.5 El complejo III de la CTE.

El complejo III está formado por 11 subunidades proteicas e interviene varias moléculas de ubiquinol, dos de citocromo *b*, un núcleo Fe-S y una de citocromo *c*₁ y presenta una estructura dimérica. Es el responsable de la oxidación de ubiquinol en ubiquinona a través de un intermediario ubisemiquinona, lo cual ocurre El mecanismo mediante el cual el complejo III acopla la oxidación del ubiquinol con la reducción del citocromo *c* se denomina ciclo Q (Figura 3). El ciclo Q comienza con la oxidación bifurcada del ubiquinol por la proteína Fe-S en el sitio quinol oxidasa (Q_o), conformado por dominios del citocromo *b* y la proteína Fe-S orientados hacia el espacio intermembranal. El centro Fe-S transfiere un electrón al citocromo *c*₁, el cual, a su vez, lo transfiere al citocromo *c*. El electrón restante es transferido al citocromo *b*, el cual reduce una molécula de ubiquinona a ubisemiquinona en el sitio quinol reductasa (Q_i), constituido por dominios del citocromo *b* orientados hacia la matriz. En otra vuelta del ciclo Q, se oxida otra molécula de ubiquinol en el sitio Q_o,

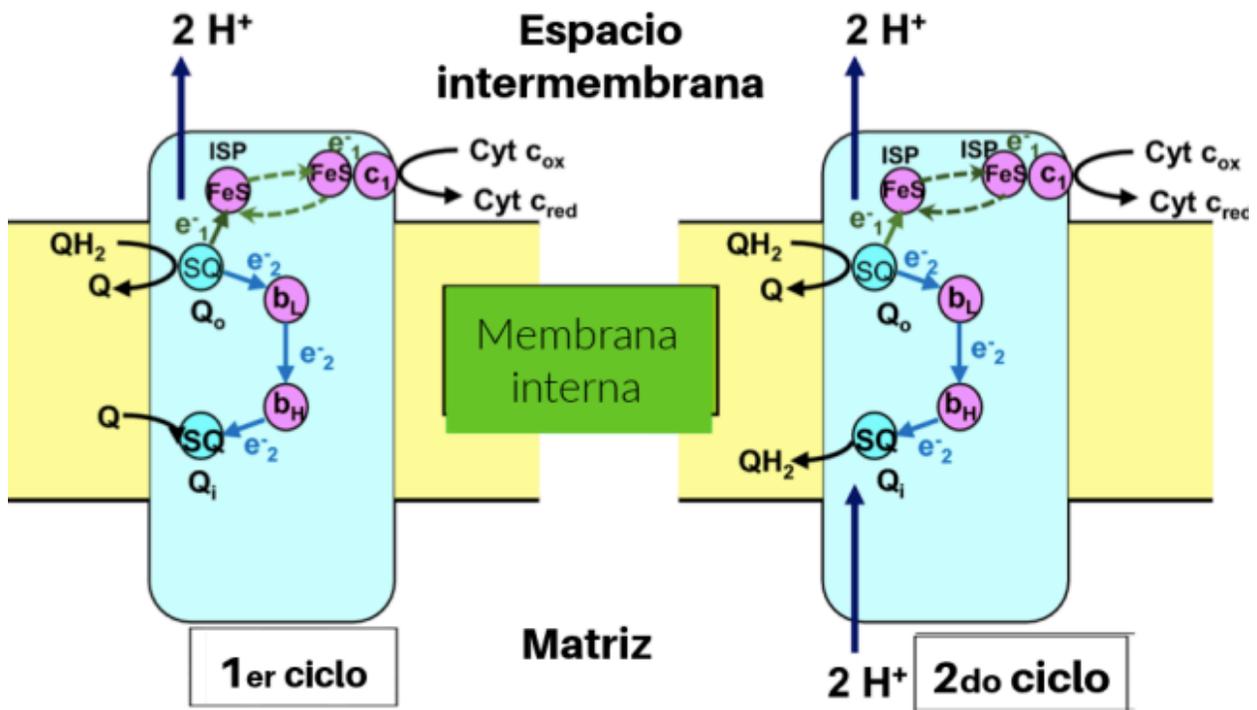


Figura 3. El ciclo Q. Tomado de Mazat et al., 2020.

se reduce otro citocromo *c*, y la ubisemiquinona en el sitio Q_i se reduce a ubiquinol. En este proceso se toman 2 protones de la matriz mitocondrial y se ceden 4 al espacio intermembranal [Mazat et al., 2020].

La producción de radical O_2^- en el complejo III ocurre cuando la transferencia de electrones en el sitio Q_i se bloquea por inhibidores tales como la antimicina A o por alteraciones en la membrana interna o en la estructura del citocromo *b*, lo cual ocasiona la fuga de electrones en el sitio Q_o y su reacción con moléculas de ubiquinona para formar de manera no catalítica radical ubisemiquinona. Esta a su vez, reacciona con el oxígeno para formar radical O_2^- [Cortés – Rojo et al., 2009].

1.6 Citocromo *b*

La secuencia de aminoácidos del citocromo *b* está codificada en el ADN mitocondrial. Se han descrito diversas mutaciones puntuales para esta proteína, desde levadura a eucariotas superiores, con consecuencias que van desde la resistencia a los medicamentos hasta la enfermedad [Hill et al., 2003]. El citocromo *b* contiene dos hemo tipo *b*: un hemo *b_L* de bajo potencial redox, ubicado cerca del lado del espacio intermembranal y un hemo *b_H* de alto potencial en el lado opuesto de la membrana [Crofts., 2004].

1.7 Glutación peroxidasa 2 (*Gpx2*)

Las glutación peroxidasas (*Gpx*) son enzimas dependientes de selenio (Se) que participan en la eliminación de las ERO, catalizando la reducción de peróxidos orgánicos e inorgánicos utilizando como agente reductor al glutación reducido (GSH). En el caso de los peróxidos orgánicos, las *Gpx* los convierte en sus respectivos alcoholes. La *Gpx* fueron descritas primero en el eritrocito bovino, y más tarde fue reportada en otros tejidos como el pulmón e hígado de rata, e inclusive en músculo, piel y hepatopáncreas de los peces, por lo que parece ser una familia de enzimas presentes de manera universal [Brigelius-Flohé, et al., 2013].

En *S. cerevisiae* se han descrito 3 isoformas de *Gpx* con actividad de fosfolípido hidroperóxido glutación peroxidasa, las cuales pueden potencialmente reducir los hidroperóxidos de fosfolípidos de membrana [Avery & Avery 2001]. De ellas, *Gpx2* es una enzima que se une mediante interacciones débiles a la membrana interna mitocondrial del lado de la matriz [Ukai et al., 2011]. A diferencia de otras *Gpx*, el donador fisiológico de electrones no es el GSH sino la tiorredoxina [Tanaka et al., 2005]. Se ha encontrado que la mutación en *Gpx2* no confiere hipersensibilidad a peróxidos orgánicos e inorgánicos, por lo que su papel antioxidante fue puesto en duda [Inoue et al., 1999]. Sin embargo, un estudio reciente demostró que *Gpx2* disminuye la producción excesiva de ERO al proteger el funcionamiento de los complejos respiratorios de la CTE en células envejecidas de *S. cerevisiae*, lo cual fue independiente de la protección contra la peroxidación de lípidos, a diferencia de *Gpx4* en mamíferos, la cual es un homólogo de *Gpx4* de levaduras que contraresta la

peroxidación de fosfolípidos de membrana interna mitocondrial [Canizal – García et al., 2021].

2. JUSTIFICACION

La restricción calórica es la única intervención no genética que aumenta la longevidad en una amplia variedad de organismos que abarca desde levaduras, nematodos, roedores y primates. Más allá de su efecto en la longevidad, la restricción calórica puede tener efectos positivos en la salud tales como un menor riesgo cardiovascular, aumento en la sensibilidad a la insulina y niveles disminuidos de inflamación. Sin embargo, la implementación de esta intervención en humanos ha sido poco viable, sobretodo en individuos con sobrepeso, debido a la dificultad de cumplir a largo plazo con una disminución de un 20 – 40% en la ingesta calórica [Anton et al., 2013]. Por lo tanto, un área de oportunidad es la búsqueda de blancos celulares cuya intervención pueda mimetizar los efectos de la restricción calórica. No obstante que existen mecanismos adicionales que controlan la longevidad de los organismos, el aumento notable de la longevidad obtenido en roedores con moléculas antioxidantes dirigidas hacia la mitocondria, es una evidencia del papel preponderante de la mitocondria en este fenómeno [Skulachev et al., 2008]. Por otro lado, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido ampliamente validada como un modelo de estudio de la restricción calórica y de los mecanismos que controlan la longevidad [Barro et al., 2010], además de ser un modelo de manejo relativamente sencillo en el laboratorio. Esto justifica el estudio en la levadura de procesos mitocondriales que podrían extender la longevidad a través de la restricción calórica y que podrían ser potencialmente manipulables

En virtud de lo anterior y del papel protector que tiene *Gpx2* contra la producción excesiva de ERO en células envejecidas de la levadura, mediante la preservación del funcionamiento de los complejos de la CTE [Canizal – García et al., 2021], en este proyecto se pretende establecer si *Gpx2* media los efectos de la restricción calórica al disminuir la producción de ERO mediante el aumento en el flujo de electrones en el citocromo *b* del complejo III.

3. HIPOTESIS

La restricción calórica disminuye la producción mitocondrial de ERO en células envejecidas de la levadura al aumentar el flujo de electrones en el citocromo *b* del complejo III de una manera dependiente de *Gpx2*.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si la restricción calórica disminuye la producción mitocondrial de ERO en células envejecidas de la levadura, al aumentar el flujo de electrones en el citocromo *b* del complejo III y su dependencia de *Gpx2*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la influencia de *Gpx2* en los efectos de la restricción calórica sobre la longevidad de la levadura.
2. Determinar si la restricción calórica aumenta los niveles de reducción del *citocromo b* y disminuye la producción de ERO en el complejo III de células envejecidas.
3. Determinar la participación de *Gpx2* en los efectos de la restricción calórica sobre la longevidad, la reducción del citocromo *b* y la producción de ERO en mitocondrias de células envejecidas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa haploide de *S. cerevisiae* BY4741 (*MATa*; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*; *WT*) y su mutante por sustitución con un casete de resistencia a kanamicina *Gpx2Δ* (*MATa*; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*; *YBR244W::KanMX4*; *Gpx2Δ*), las cuales se adquirieron de EUROSCARF (Frankfurt, Alemania). El medio de cultivo utilizado para los procedimientos experimentales fue YPD líquido (1.0 % extracto de levadura, 2.0% peptona de caseína) con 2.0% de glucosa en los medios sin RC y 0.05% para inducir RC [Tello – Padilla et al., 2018]. A los medios inoculados con la

cepa mutante se les añadió el antibiótico G-418 (Merck, USA) para seleccionar a las células con la mutación. El envejecimiento de la levadura se indujo mediante su cultivo durante 2, 17, 27 y 37 días después del inicio de la fase estacionaria, en agitación orbital constante de 200 rpm a 30°C. Los cultivos se ajustaron a una densidad óptica inicial de 0.03 a partir de un pre-cultivo de 24 h en YPD 2%.

5.2 Determinación de la longevidad celular.

La longevidad de la levadura se define como la capacidad que tiene un cultivo en fase estacionaria de mantenerse viable con el transcurso del tiempo [MacLean., 2001]. Por lo tanto, la longevidad se evaluó de 2, 17, 27 y 37 días después de iniciada la fase estacionaria mediante el método de dilución seriada en placa [Canizal – García et al., 2021].

5.3 Aislamiento de mitocondrias.

Se aislaron mitocondrias de cultivos mantenidos en envejecimiento durante 2, 17, 27, y 37 días. Las células se lavaron dos veces con agua desionizada. La pared celular se rompió con perlas de vidrio y se agitó en un vórtex 10 veces durante un minuto en hielo, dejando un min de descanso entra cada agitación. Después, las células se sonicaron a 50 Hz con medio de ruptura, 10 veces durante 1 min en hielo dejando 1 min de descanso entra cada ciclo de sonicación. Posteriormente, la suspensión obtenida se centrifugó a 3000 rpm a 4 °C por 10 min, se recuperó el sobrenadante, el cual se centrifugó a 12000 rpm por 20 min a 4 °C. El precipitado se colectó y se guardó a -80 °C hasta que se realizaron los experimentos.

5.4 Medición de la actividad del complejo III.

La actividad del complejo III se evaluó en 0.1 mg/mL de mitocondrias aisladas resuspendidas en buffer 50mM de KH_2PO_4 (pH 7.6). La actividad del complejo se determinó mediante la evaluación espectrofotométrica de la reducción del citocromo c oxidado a 550 nm, utilizando succinato como sustrato e inhibiendo el flujo de electrones en el complejo IV con cianuro de potasio para evitar la reoxidación del citocromo c. La actividad se calculó con la pendiente de los trazos utilizando el coeficiente de extinción molar de $21 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ del citocromo c [Cortés- Rojo et al., 2009].

5.5 Determinación de la reducción del citocromo *b*.

El flujo de electrones hacia el citocromo *b* se analizó determinando su reducción a 562nm mediante espectros diferenciales oxidado menos reducido con un espectrofotómetro de doble monocromador y doble haz Shimadzu UV2550. 1 mg/mL de mitocondrias se resuspendieron en buffer 50mM de KH_2PO_4 (pH 7.6) en dos cubetas de 1mL. A la cubeta de referencia se le añadió como agente reductor ditionita de sodio. Los espectros se determinaron entre 500 y 620 nm. La cubeta de referencia solo se le añadió solución buffer y mitocondrias. La reducción del citocromo *b* se determinó mediante la intensidad del pico de absorción a 562nm, mientras que la reducción de los citocromos *c+c₁* se determinó mediante la intensidad del pico de absorción a 550 nm [Cortés- Rojo et al., 2009].

5.6 Determinación de los niveles de ERO.

Esta determinación se realizó evaluando la oxidación de la sonda fluorescente 2'7' – diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína (DCDHF-DA) por las ERO. En la celda se añadió 1 mg/mL de suspensión de mitocondrias aisladas y 5 μl de DCDHF- DA (500mM) para obtener un volumen final de 2mL con buffer 50 mM KH_2PO_4 (pH 7.6). La lectura de la fluorescencia se realizó a un $\lambda_{\text{excitación}}$ de 485 nm y una $\lambda_{\text{emisión}}$ de 520 nm en un espectrofluorómetro Shimadzu RF5000U. Después de un minuto se añadió una concentración de 10 mM de succinato y se midió el incremento de fluorescencia durante 10 min adicionales. La producción de ERO se calculó restando la fluorescencia al momento de la adición del succinato menos la fluorescencia después de 10 min de adición del succinato. Los resultados fueron expresados como el cambio en unidades arbitrarias de fluorescencia por minuto por mg de proteína.

5.7 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm el error de estándar de experimentos independientes, cuyo número se indica en el pie de cada figura. La significancia estadística de las diferencias entre las medias fue evaluada mediante la prueba t de Student, a una $P \leq 0.05$, con el programa Sigma – Plot v. 11.0.

6. RESULTADOS

6.1 Efectos de la restricción calórica en la longevidad cronológica de la levadura.

Se observó que las células BY4741 en restricción calórica mantienen una viabilidad más alta hasta los 27 días de cultivo que las células sin restricción calórica con 2% de glucosa (Fig. 4); sin embargo, esta diferencia desaparece a los 37 días de envejecimiento, donde la viabilidad disminuye de manera drástica en ambas condiciones. De manera importante, el efecto positivo de la restricción calórica se vio disminuido en la mutante *Gpx2* Δ desde el día 17 de cultivo, lo que sugiere que los efectos de la restricción calórica sobre la longevidad de la levadura son dependientes de *Gpx2*.

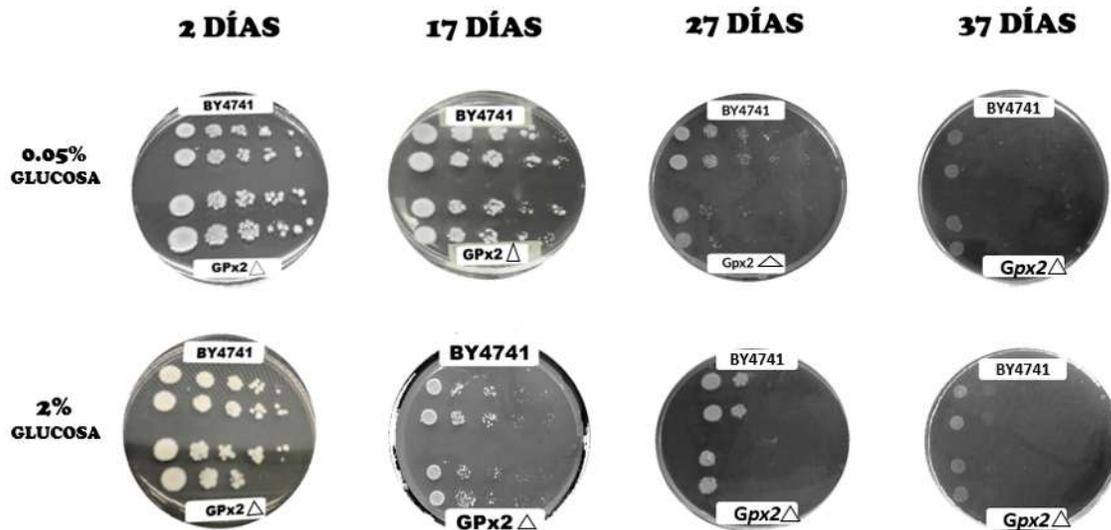


Figura 4. Efectos de la restricción calórica sobre la viabilidad de la levadura. La viabilidad de *S. cerevisiae* BY4741 y su mutante *Gpx2* Δ fue evaluada por dilución en placa, con RC (0.05% de glucosa) y sin RC (2% de glucosa) a partir de cultivos envejecidos en fase estacionaria en los días indicados en la figura. Se muestra un resultado representativo de n=3.

6.2 Efecto de la restricción calórica y el envejecimiento en la actividad del complejo III.

Los efectos de la restricción calórica y el envejecimiento en la actividad del complejo III fueron evaluados en mitocondrias aisladas de células envejecidas en la fase estacionaria durante 2, 17, 27 y 37 (Figura 5). La RC aumentó la actividad del complejo III en mitocondrias de células BY4741 de una manera significativa a partir del día 17 (Fig. 5A), siendo la actividad 60% y 50% mayor con RC que sin RC a los 27 y 37 días, respectivamente. Se observó un nivel de actividad intermedio a los 2 días, lo cual posiblemente se deba a que las levaduras entraron en ese momento a la fase estacionaria, por lo que puede haber represión catabólica remanente de los genes mitocondriales. La actividad del complejo III de mitocondrias de la mutante *Gpx2Δ* (Fig. 5B) fue una fracción de la actividad observada en las mitocondrias de las células BY4741, independientemente de la presencia de la RC. Solo se observó un aumento de la actividad con RC a los 17 días; sin embargo, esta actividad fue cuatro veces menor que en las mitocondrias de las células BY4741 del mismo día. En el día 37, la actividad del complejo III fue mínima en mitocondrias de las células BY4741, no obstante se sigue observando un efecto positivo de la restricción calórica. En contraste, la actividad de la mutante *Gpx2Δ* fue prácticamente nula con o sin RC. Estos resultados indican que la RC incrementa la actividad el complejo III y que este efecto es dependiente de la presencia de *Gpx2*.

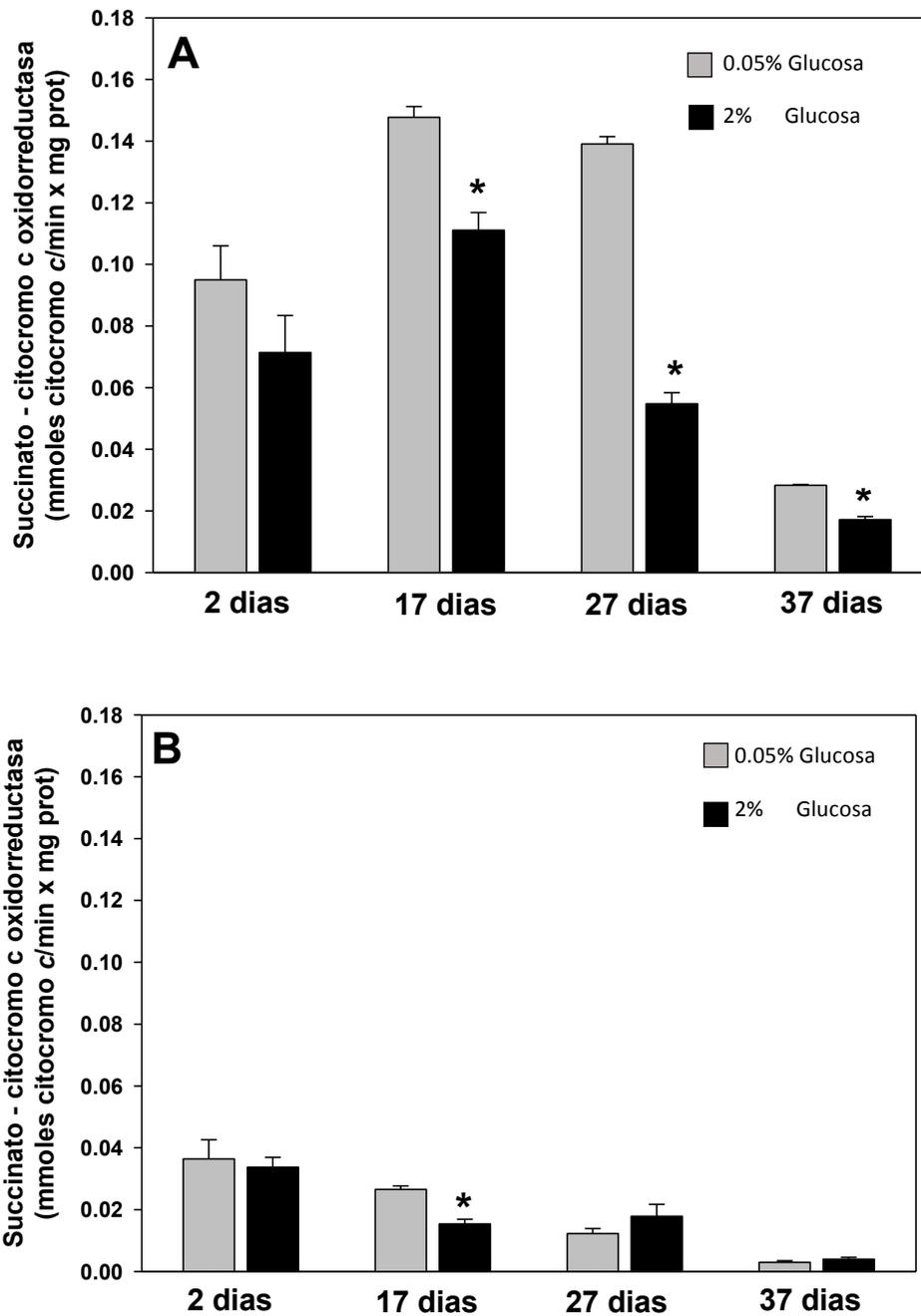


Figura 5. Efecto de la restricción calórica y el envejecimiento en la actividad del complejo III. Panel A: actividad del complejo III de mitocondrias de células BY4741; panel B; actividad del complejo III de mitocondrias de células mutantes en *Gpx2Δ*. Los resultados fueron expresados como la media \pm el error estándar de $n=3$. La significancia estadística de las diferencias entre las medias ($P<0.05$) se determinaron mediante la prueba t de Student con el programa estadístico Sigma Plot versión 11.

6.3 Efectos de la restricción calórica sobre la reducción de los citocromos del complejo III

Se evaluaron los espectros oxidado menos reducido de citocromos de mitocondrias de células BY4741 (línea azul) y de células mutantes en *Gpx2Δ* (línea roja) a los 2, 17, 27 y 37 días de envejecimiento (Figs. 6, 7, 8 y 9, respectivamente), con RC (paneles A) o sin RC (paneles B). A los 2 días de envejecimiento (Fig. 6), no se detectó para ningún caso la señal de los citocromos, lo cual concuerda con la idea de que existe represión catabólica de genes mitocondriales y con la actividad mínima del complejo III a los dos días (Fig. 5). Por el contrario, a los 17 días (Fig. 7) se observó un pico entre 550 y 562 nm que indica la reducción de los citocromos $c+c_1$ y b en células con RC (Fig. 7A), siendo esta señal menor en las mitocondrias de células mutantes *Gpx2Δ* que en las BY4741. Algo similar se observó en las mitocondrias de células sin RC (Fig. 7B), donde se ve de manera más clara un pico a 562 nm, lo que sugiere una mayor reducción del citocromo b que de los citocromos $c+c_1$. Asimismo, la intensidad del pico fue mayor en la cepa BY4741 que en la mutante *Gpx2Δ*, lo que indica un menor flujo de electrones en el citocromo b por la mutación en *Gpx2Δ*.

El efecto de la RC y de la mutación en *Gpx2* fue aún más claro al día 27 (Fig 8). En mitocondrias de células BY4741 con RC (Fig 8A) se observa un pico a 562 nm el cual no fue observado en la mutante *Gpx2Δ*. En contraste, no se observaron señales claras en células sin RC ya sea de mitocondrias de células BY4741 o *Gpx2Δ*. Esto indica que la restricción calórica preserva de mejor manera a los 27 días el flujo de electrones en el citocromo b y que este efecto es dependiente de la presencia de *Gpx2*. Finalmente, a los 37 días, no se observaron señales de citocromos bajo ninguna condición (Figs. 9A y B), lo cual concuerda con la actividad mínima de complejo III observada tanto en la cepa BY4741 y la *Gpx2Δ* a los 37 días (Fig 5).

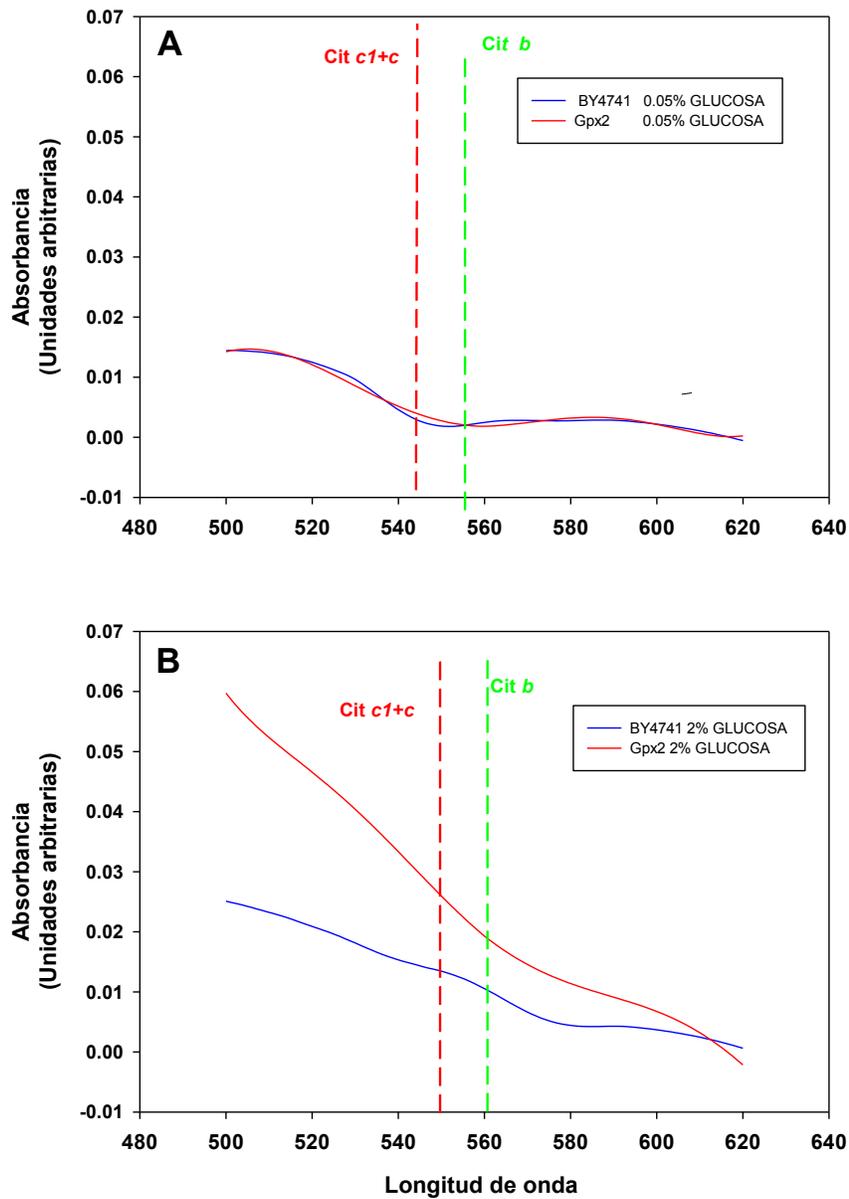


Figura 6. Efecto de la restricción calórica sobre la reducción de citocromos a los 2 días de envejecimiento. Panel A: espectro de mitocondrias de células con RC; panel B: espectro de mitocondrias de células sin RC. Línea azul: espectro de mitocondrias de células BY4741; línea roja; espectro de mitocondrias de células de la mutante *Gpx2Δ*. Las líneas punteadas roja y verde se usan para resaltar las longitudes de onda a 550 y 562 nm donde absorben los citocromos $c+c_1$ y b , respectivamente. Los resultados son representativos de $n=3$.

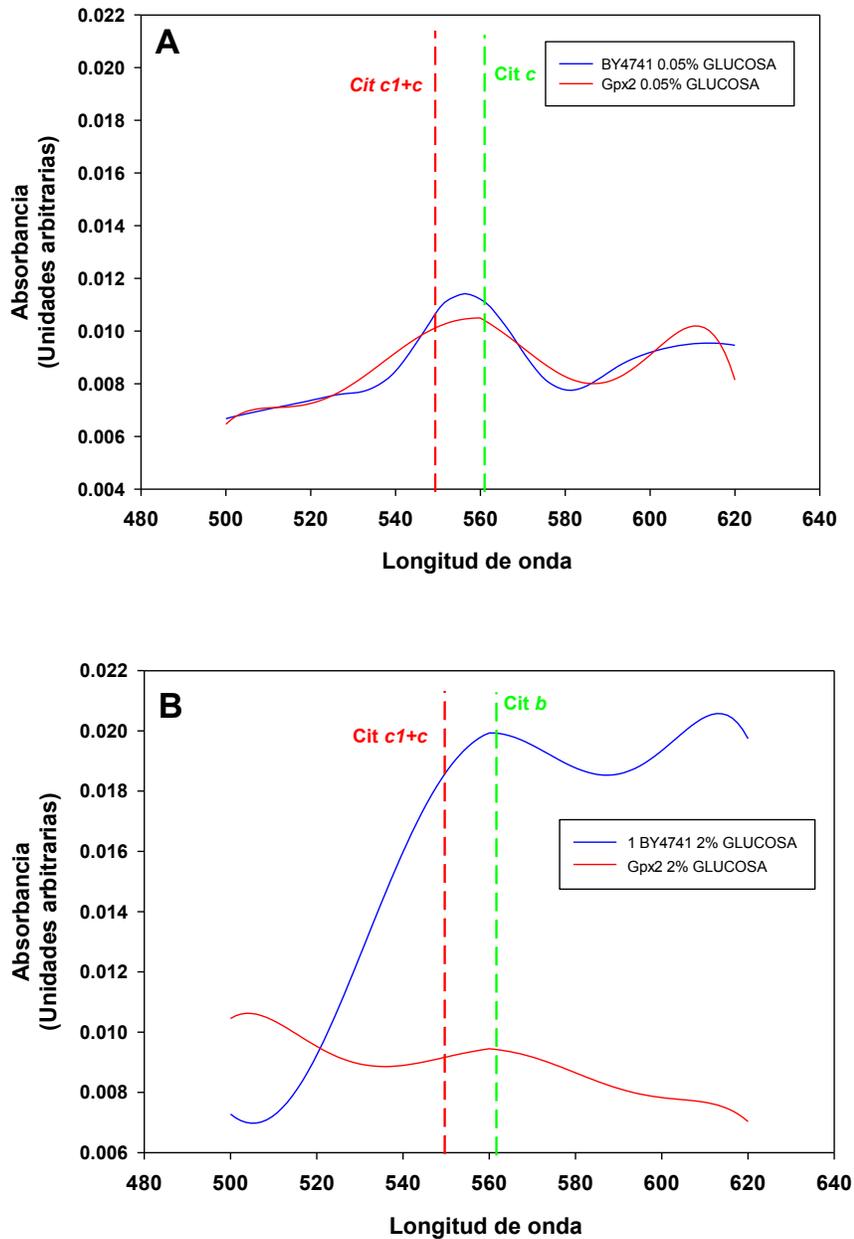


Figura 7. Efecto de la restricción calórica sobre la reducción de citocromos a los 17 días de envejecimiento. Panel A: espectro de mitocondrias de células con RC; panel B: espectro de mitocondrias de células sin RC. Línea azul: espectro de mitocondrias de células BY4741; línea roja; espectro de mitocondrias de células de la mutante *Gpx2Δ*. Las líneas punteadas roja y verde se usan para resaltar las longitudes de onda a 550 y 562 nm donde absorben los citocromos $c+c_1$ y b , respectivamente. Los resultados son representativos de $n=3$.

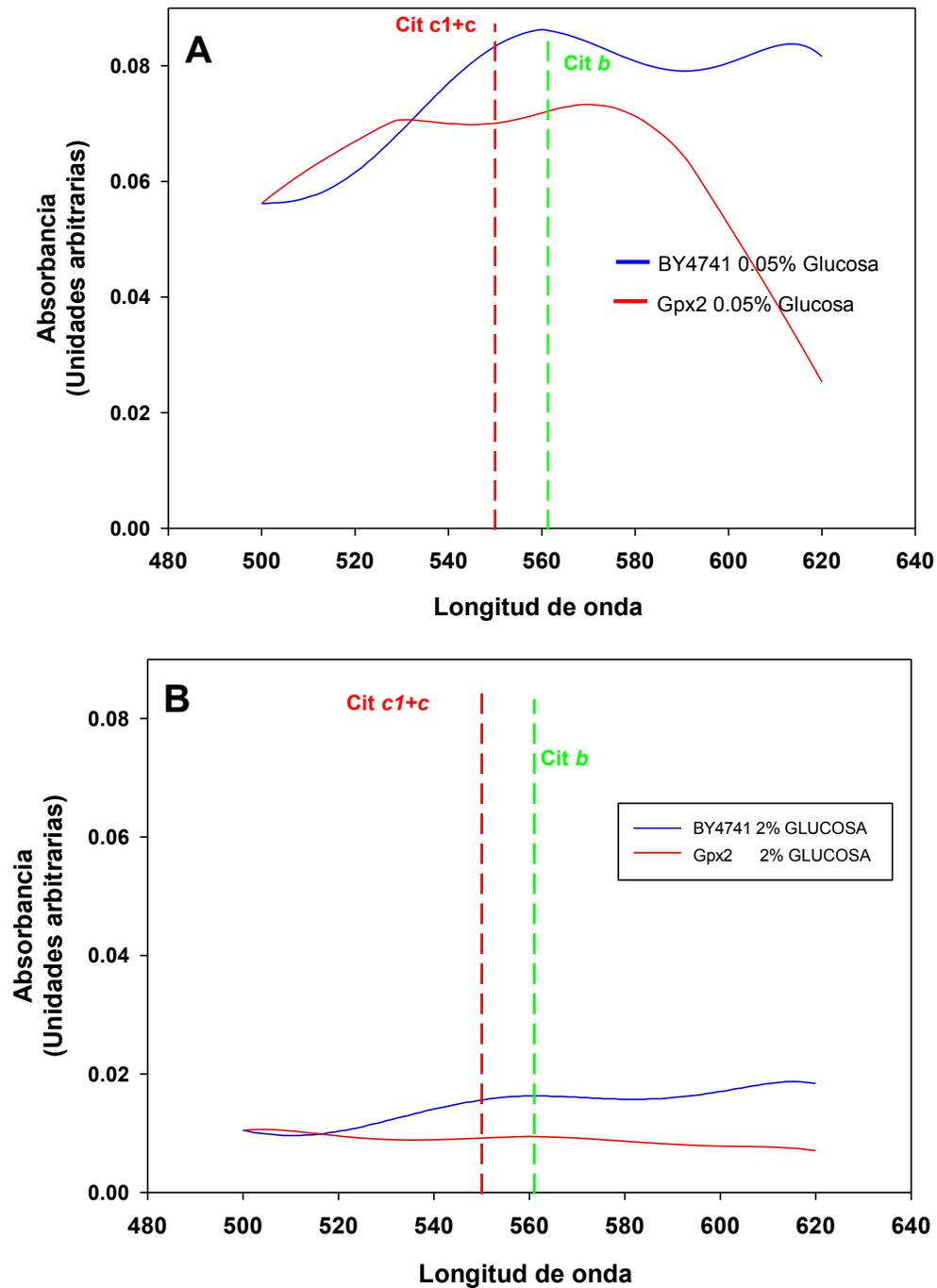


Figura 8. Efecto de la restricción calórica sobre la reducción de citocromos a los 27 días de envejecimiento. Panel A: espectro de mitocondrias de células con RC; panel B: espectro de mitocondrias de células sin RC. Línea azul: espectro de mitocondrias de células BY4741; línea roja; espectro de mitocondrias de células de la mutante *Gpx2Δ*. Las líneas punteadas roja y verde se usan para resaltar las longitudes de onda a 550 y 562 nm donde absorben los citocromos $c+c_1$ y b , respectivamente. Los resultados son representativos de $n=3$.

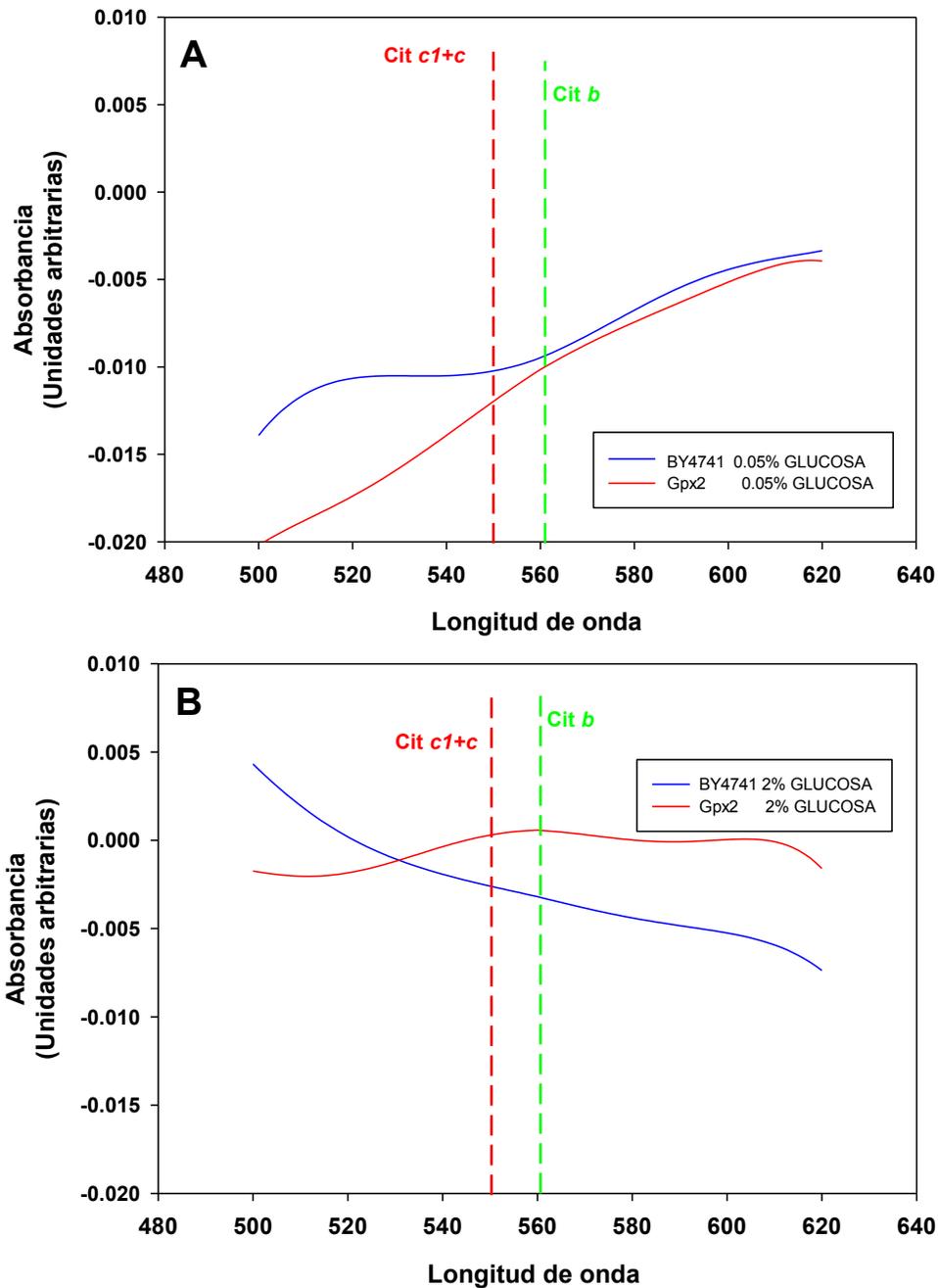


Figura 9. Efecto de la restricción calórica sobre la reducción de citocromos a los 37 días de envejecimiento. Panel A: espectro de mitocondrias de células con RC; panel B: espectro de mitocondrias de células sin RC. Línea azul: espectro de mitocondrias de células BY4741; línea roja; espectro de mitocondrias de células de la mutante *Gpx2Δ*. Las líneas punteadas roja y verde se usan para resaltar las longitudes de onda a 550 y 562 nm donde absorben los citocromos $c+c_1$ y *b*, respectivamente. Los resultados son representativos de $n=3$.

6.4 Efectos de la restricción calórica sobre la producción de ERO

La producción de ERO (Figura 9) se evaluó en mitocondrias de células envejecidas durante 2, 17, 27 y 37 con RC (barras grises) y sin RC (barras negras). en las mitocondrias de las células con 0.05% de glucosa y en el grupo control con 2% de glucosa. La producción de ERO fue en general más baja en todo el tiempo de envejecimiento en las células BY4741 (panel A) que en la mutante *Gpx2Δ* (panel B). De manera inesperada, la producción de ERO fue menor en las mitocondrias de células BY4741 sin RC que con RC (Fig. 9A) a los 2 y 17 días, mientras que no hubo diferencias en los días restantes de envejecimiento. Por el contrario, la RC disminuyó la producción de ERO en mitocondrias de las células *Gpx2Δ* a los 2 días (Fig. 9B), mientras que a los 17 y 27 días, no hubo diferencias respecto al tratamiento con RC. A los 37 días, la producción de ERO fue prácticamente indetectable a los 37 días tanto en las mitocondrias de células BY4741 como de *Gpx2Δ*, independientemente de la presencia de RC.

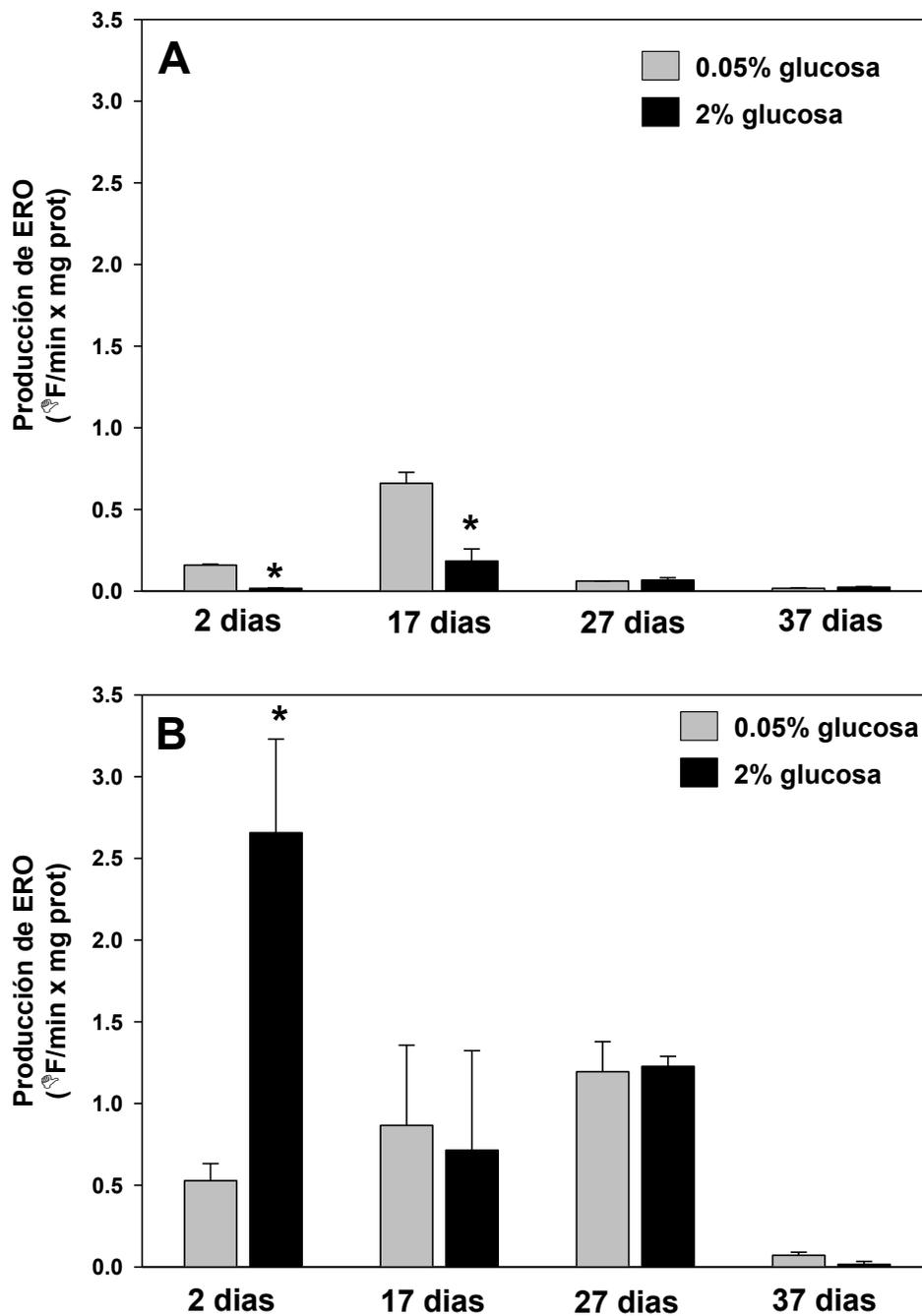


Figura 10. Efectos de la restricción calórica sobre la producción de ERO en mitocondrias de células BY4741 (Panel A) y *Gpx2Δ* (panel B). Las células fueron envejecidas con RC (barras grises) y sin RC (barras negras). Los resultados fueron expresados como la media \pm el error estándar de $n=3$. La significancia estadística de las diferencias entre las medias ($P<0.05$) se determinaron mediante la prueba t de Student con el programa estadístico Sigma Plot versión 11.

7. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo muestran que la RC incrementa la longevidad de la levadura tal como ha sido ampliamente demostrado por otros grupos de investigación [Lin et al., 2004]. Esto fue dependiente de la presencia de *Gpx2* (Fig. 4). Esto corrobora el importante papel que tiene la mitocondria en el incremento de la longevidad, al ser *Gpx2* una enzima localizada en este orgánulo [Ukai et al., 2011]. Este es el primer reporte acerca de la participación directa de esta enzima en el mecanismo de extensión de la longevidad por restricción calórica en la levadura. Esto ha sido un tema controversial ya que se ha observado la sobreexpresión de esta enzima por RC en un estudio [Wang et al., 2015], mientras que otro reportó una disminución de su expresión por la RC [Sharma et al., 2011]. En relación con esto último, en dicho estudio se midieron los niveles de mRNA de *Gpx2* en células crecidas en fase logarítmica media, pero no en la fase estacionaria que es donde se considera el inicio del envejecimiento cronológico de la levadura. Lo anterior, y el hecho de que en nuestro grupo de trabajo ha descrito recientemente que *Gpx2* es un sistema antioxidante tardío en la levadura que protege contra el estrés oxidativo mitocondrial en etapas avanzadas de la fase estacionaria [Canizal-García et al., 2021], pueden explicar dicha controversia. Además, debe mencionarse que en este estudio se utilizó una mutante por substitución del gen *Gpx2* con un gen de resistencia a kanamicina, por lo que esto garantiza una nula expresión de *Gpx2* y, por lo tanto, confirma la participación de *Gpx2* en la extensión de la longevidad por RC.

Por un largo tiempo, *Gpx2* en levadura ha sido descrito como un homólogo de *Gpx4* de mamíferos, una enzima mitocondrial que repara los hidroperóxidos de cardiolipina en la membrana interna mitocondrial, por lo que se encarga de la preservación de la integridad de este fosfolípido que es fundamental para el funcionamiento de toda la CTE [Panov et al., 2020]. En virtud de la ausencia de ácidos grasos poliinsaturados en *S. cerevisiae* y por lo tanto, de la insensibilidad de sus fosfolípidos a la peroxidación [Cortés-Rojo et al., 2009], así como por algunas características cinéticas que hacen poco probable que *Gpx2* de levadura tenga el mismo papel que *Gpx4* de mamíferos [Canizal-García et al., 2021], es poco probable

que el papel que tiene *Gpx2* en la extensión de la longevidad de la levadura esté relacionado con la protección de la cardiolipina de la membrana interna mitocondrial. Por lo tanto, es importante la identificación de una proteína de mamíferos que sea homóloga a *Gpx2* de levadura para estudiar si esa hipotética proteína puede tener un papel en los efectos benéficos de la restricción calórica en organismos superiores, para ser así un probable blanco que sea manipulable por medios nutricionales o farmacológicos para mimetizar los efectos de RC.

La disminución de la actividad del complejo III en células BY4741 concuerda con reportes acerca de la disminución de la actividad de este complejo en mitocondrias de mamíferos [Lesnefsky et al., 2001]. Sin embargo, no existen reportes previos acerca de un efecto específico de la RC sobre la actividad del complejo III. Sin embargo, se ha reportado que la RC incrementa la biogénesis mitocondrial, dando lugar a un mayor número de mitocondrias en la célula con una mayor eficiencia bioenergética [López-Lluch et al., 2006]. Por lo tanto, esto podría explicar tanto el aumento en la actividad del complejo III de células BY4741 con RC (Fig. 5A), así como la mayor intensidad en la reducción de citocromos (Figs. 7A y 8A).

Se ha propuesto que la restricción calórica actúa aumentando la biogénesis mitocondrial y la expresión de enzimas antioxidantes aumentando la producción de ERO a niveles que permiten la activación de la transcripción de genes sin causar daño oxidativo en moléculas, proceso al cual se le conoce como hormesis [Masoro, 2007]. *Gpx2* es un gen en *Saccharomyces cerevisiae* cuya transcripción aumenta en respuesta al incremento en los niveles de ERO, vía la activación de los factores transcripcionales Yap1p y Skn7p [Lee et al., 1999]. Por lo tanto, los radicales libres producidos por la RC podrían estar aumentando la transcripción de *Gpx2* vía la activación de los factores transcripcionales Yap1p y Skn7p, previniendo la disminución de la actividad del complejo III por el daño oxidativo, junto con un probable aumento de la biogénesis mitocondrial como se discutió anteriormente. La falta de estimulación de la actividad del complejo III por la RC en la mutante *Gpx2* (Fig. 5B), podría estar relacionada con la ausencia de este gen pese a la activación de los factores Yap1p y Skn7p, provocando, por lo tanto, un mayor daño en los complejos respiratorios y una

menor actividad tal como se observó en la Fig 5B. Esto concuerda con la disminución drástica de la actividad de los complejos de la CTE observada previamente en una mutante en *Gpx2* de *S. cerevisiae* envejecida mediante el cultivo prolongado en fase estacionaria [Canizal – Garcia et al., 2021].

La idea de que la restricción calórica incrementa los niveles de enzimas antioxidantes, incluyendo *Gpx2*, al inducir un aumento en la formación de ERO y la activación de respuestas transcripcionales que incrementan los sistemas antioxidantes, concuerda con el inesperado incremento de la formación de ERO en las mitocondrias de las células BY4741 en RC a los 2 y 17 días de envejecimiento (Fig. 10A). Este incremento podría ser parte del mecanismo hormético que favorece la expresión de *Gpx2* y que disminuye los niveles en general de ERO en la mitocondria. Esta hipótesis está apoyada por los niveles más altos de ERO observados en las mitocondrias de la mutante *Gpx2Δ* (Fig. 10B) en comparación con los niveles en BY4741 (Fig. 10A). En resumen, la ausencia de *Gpx2* causó una mayor producción de ERO en las mitocondrias de la mutante en *Gpx2Δ*, la cual no pudo ser contrarrestada por la RC debido a que dicho gen no pudo ser activado por los factores transcripcionales Yap1p y Skn7p, pese a existir un mayor nivel de ERO.

En los espectros de citocromos a los dos días (Fig. 6) se observó la ausencia de cualquier señal, lo cual pudo haber sido debido a que esas células recién salieron de la fase logarítmica y, por lo tanto, genes mitocondriales como el del citocromo *b* pudieron haber sufrido represión por glucosa [Ulery et al., 1994]. Por el contrario, señales más claras de reducción del citocromo *b* se observaron a los 17 y 27 días de envejecimiento con RC (Figs. 7A y 8A). Esto concuerda con la hipótesis inicial de que la RC podría mejorar el flujo de electrones en el complejo III a nivel del citocromo *b*. La disminución en la transferencia de electrones en el citocromo *b* es una de las causas más importantes de formación de ERO en este complejo, ya que el bloqueo de la transferencia de electrones entre el hemo *b* de bajo potencial redox y la ubiquinona causa la acumulación de electrones en el sitio Q_o del complejo III, lo que estimula reacciones colaterales al ciclo Q como la reducción monovalente del oxígeno por uno de esos electrones para formar radical superóxido, o la reducción de una molécula de

ubiquinona para formar un intermediario ubisemiquinona inestable fuera del sitio Q_i , la cual puede reducir también monovalentemente al oxígeno [Muller et al., 2002]. La mayor reducción del citocromo b en las mitocondrias de las células BY4741 con RC es indicativa de un mejor flujo de electrones a nivel de esta subunidad, y por lo tanto, menor probabilidad de reacciones colaterales al ciclo Q que incrementan la formación de ERO. Por el contrario, el menor flujo de electrones en el citocromo b como en las mitocondrias de las células *Gpx2Δ* podría ser responsable también del incremento de ERO, ya que los electrones provenientes de la oxidación del ubiquinol en el sitio Q_o podrían acumularse en dicho sitio por una menor transferencia al citocromo b , favoreciendo reacciones colaterales al ciclo Q. La idea de que la mejor transferencia de electrones a nivel del citocromo b por la restricción calórica promueve una menor formación de ERO e incrementa la longevidad, concuerda con estudios comparativos donde se ha observado que mutaciones que favorecen el transporte de electrones en el citocromo b que pueden disminuir la formación de ERO, podrían estar asociadas con una mayor longevidad de ciertas especies de aves [Rottenberg., 2007].

8. CONCLUSIÓN

En *S. cerevisiae*, la restricción calórica incrementa la longevidad en asociación con un aumento en la actividad del complejo III y una menor producción de ERO, debido a un mejor flujo de electrones en citocromo b , lo cual es dependiente de *Gpx2*.

9. REFERENCIAS

Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A., & Enriquez, J. A. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Molecular cell*, 32(4), 529–539.

Aguilar-Toral, R., Fernández-Quintero, M., Ortiz-Avila, O., de la Paz, L. H., 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. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 46(3), 205–220.

Anton, S., & Leeuwenburgh, C. (2013). Fasting or caloric restriction for healthy aging. *Experimental gerontology*, 48(10), 1003–1005.

Aruoma, O. I., Grootveld, M., & Bahorun, T. (2006). Free radicals in biology and medicine: from inflammation to biotechnology. *BioFactors (Oxford, England)*, 27(1-4), 1–3.

Avery, A. M., & Avery, S. V. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *The Journal of biological chemistry*, 276(36), 33730–33735.

Brigelius-Flohé, R., & Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica et biophysica acta*, 1830(5), 3289–3303.

Canizal-García, M., Olmos-Orizaba, B. E., Moreno-Jiménez, M., Calderón-Cortés, E., Saavedra-Molina, A., & Cortés-Rojo, C. (2021). Glutathione peroxidase 2 (Gpx2) preserves mitochondrial function and decreases ROS levels in chronologically aged yeast. *Free radical research*, 1–11. Advance online publication.

Cavezzi, A., Ambrosini, L., Colucci, R., Ionna, G. D., & Urso, S. U. (2020). Aging in the Perspective of Integrative Medicine, Psychoneuroendocrineimmunology and Hormesis. *Current aging science*, 13(2), 82–91.

Cortés-Rojo, C., Calderón-Cortés, E., Clemente-Guerrero, M., Estrada-Villagómez, M., Manzo-Avalos, S., Mejía-Zepeda, R., Boldogh, I., & Saavedra-Molina, A. (2009). Elucidation of the effects of lipoperoxidation on the mitochondrial electron transport chain using yeast mitochondria with manipulated fatty acid content. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 41(1), 15–28.

Cortés-Rojo, C., & Rodríguez-Orozco, A. R. (2011). Importance of oxidative damage on the electron transport chain for the rational use of mitochondria-targeted antioxidants. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(7), 625–632.

Crofts A. R. (2004). The cytochrome *bc1* complex: function in the context of structure. *Annual review of physiology*, 66, 689–733.

Hill, P., Kessl, J., Fisher, N., Meshnick, S., Trumpower, B. L., & Meunier, B. (2003). Recapitulation in *Saccharomyces cerevisiae* of cytochrome *b* mutations conferring resistance to atovaquone in *Pneumocystis jiroveci*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(9), 2725–2731. 47 (9): 2725-31.

Inoue, Y., Matsuda, T., Sugiyama, K., Izawa, S., & Kimura, A. (1999). Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 274(38), 27002–27009.

Kaeberlein, M., Burtner, C. R., & Kennedy, B. K. (2007). Recent developments in yeast aging. *PLoS genetics*, 3(5), e84.

Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J., & Toledano, M. B. (1999). Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *The Journal of biological chemistry*, 274(23), 16040–16046.

Lesnefsky, E. J., Gudz, T. I., Moghaddas, S., Migita, C. T., Ikeda-Saito, M., Turkaly, P. J., & Hoppel, C. L. (2001). Aging decreases electron transport complex III activity in heart interfibrillar mitochondria by alteration of the cytochrome c binding site. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 33(1), 37–47.

Lin, S. J., Ford, E., Haigis, M., Liszt, G., & Guarente, L. (2004). Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes & development*, 18(1), 12–16.

López-Lluch G, Hunt N, Jones B, Zhu M, Jamieson H, Hilmer S, Cascajo MV, Allard J, Ingram DK, Navas P, de Cabo R. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 7;103(6):1768-73.

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 postmitotic tissues in higher organisms. *Yeast (Chichester, England)*, 18(6), 499–509. <https://doi.org/10.1002/yea.701>;18:499

Masoro E. J. (2007). The role of hormesis in life extension by dietary restriction. *Interdisciplinary topics in gerontology*, 35, 1–17.

Mazat, J. P., Devin, A., & Ransac, S. (2020). Modelling mitochondrial ROS production by the respiratory chain. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 77(3), 455–465.

Muller, F., Crofts, A. R., & Kramer, D. M. (2002). Multiple Q-cycle bypass reactions at the Qo site of the cytochrome bc1 complex. *Biochemistry*, 41(25), 7866–7874.

Panov, A. V., & Dikalov, S. I. (2020). Cardiolipin, Perhydroxyl Radicals, and Lipid Peroxidation in Mitochondrial Dysfunctions and Aging. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, 1323028.

Rottenberg H. Exceptional longevity in songbirds is associated with high rates of evolution of cytochrome b, suggesting selection for reduced generation of free radicals. *J Exp Biol*. 2007 Jun;210(Pt 12):2170-80.

Ruetenik, A., & Barrientos, A. (2015). Dietary restriction, mitochondrial function and aging: from yeast to humans. *Biochimica et biophysica acta*, 1847(11), 1434–1447.

Sena, L. A., & Chandel, N. S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular cell*, 48(2), 158–167.

Sharma, P. K., Agrawal, V., & Roy, N. (2011). Mitochondria-mediated hormetic response in life span extension of calorie-restricted *Saccharomyces cerevisiae*. *Age* (Dordrecht, Netherlands), 33(2), 143–154.

Skulachev, V. P., & Longo, V. D. (2005). Aging as a mitochondria-mediated atavistic program: can aging be switched off?. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1057, 145–164.

Skulachev, V. P., Anisimov, V. N., Antonenko, Y. N., Bakeeva, L. E., Chernyak, B. V., Elichev, V. P., Filenko, O. F., Kalinina, N. I., Kapelko, V. I., Kolosova, N. G., Kopnin, B. P., Korshunova, G. A., Lichinitser, M. R., Obukhova, L. A., Pasyukova, E. G., Pisarenko, O. I., Roginsky, V. A., Ruuge, E. K., Senin, I. I., Severina, I. I., ... Zorov, D. B. (2009). An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach. *Biochimica et biophysica acta*, 1787(5), 437–461.

Srivastava S. (2017). The Mitochondrial Basis of Aging and Age-Related Disorders. *Genes*, 8(12), 398.

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*. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(51), 42078–42087.

Tello-Padilla, M. F., Perez-Gonzalez, A. Y., Canizal-García, M., González-Hernández, J. C., Cortes-Rojó, C., Olivares-Marin, I. K., & Madrigal-Perez, L. A. (2018). Glutathione levels influence chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* in a glucose-dependent manner. *Yeast* (Chichester, England), 35(5), 387–396.

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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411(3), 580–585.

Ulery, T. L., Jang, S. H., & Jaehning, J. A. (1994). Glucose repression of yeast mitochondrial transcription: kinetics of derepression and role of nuclear genes. *Molecular and cellular biology*, 14(2), 1160–1170.

Wang, D., Wu, M., Li, S., Gao, Q., & Zeng, Q. (2015). Artemisinin mimics calorie restriction to extend yeast lifespan via a dual-phase mode: a conclusion drawn from global transcriptome profiling. *Science China. Life sciences*, 58(5), 451–465.

Winterbourn, C. C., & Hampton, M. B. (2008). Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free radical biology & medicine*, 45(5), 549–561.