

## INFLUENCIA DE LA LIPOPEROXIDACIÓN DE LAS MEMBRANAS MITOCONDRIALES SOBRE LA SENSIBILIDAD DEL COMPLEJO III AL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO.

Cortés Rojo, C., Estrada Villagómez, M.M., Calderón Cortés, E., Manzo Avalos, S., Saavedra Molina, A.

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio B-3, Ciudad Universitaria. Francisco J. Mújica s/n. C.P. 58030. Morelia, Mich. Tel. (443) 3-26-57-88 ext. 117. Fax (443) 3-26-57-90. [post93@jupiter.umich.mx](mailto:post93@jupiter.umich.mx)

**RESUMEN.** El complejo III (ubiquinol-citocromo *c* oxidorreductasa) es uno de los principales sitios de formación de ERO. En este complejo, las reacciones redox que sufren los sustratos de la enzima están acopladas al bombeo de protones a través de un mecanismo conocido como el ciclo Q. Una de las reacciones cruciales del ciclo Q es la oxidación bifurcada del ubiquinol a ubiquinona por la proteína de Rieske (ISP) y el citocromo *b*. La producción de ERO puede estimularse en presencia de ciertos inhibidores del complejo que provocan la acumulación del radical ubisemiquinona (QH<sup>•</sup>) debido a la aparición de reacciones colaterales al ciclo Q (p. ej., la generación de radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) debido a la oxidación del radical QH<sup>•</sup> por el O<sub>2</sub> [1]). Bajo condiciones normales, la aparición de este tipo de reacciones es minimizada por el movimiento rotacional de la ISP entre el citocromo *b* y el citocromo *c*<sub>1</sub> al contribuir a la rápida oxidación del radical QH<sup>•</sup> [1]. Algunas interacciones específicas entre fosfolípidos de la membrana interna de la mitocondria (MIM) y la ISP son esenciales para la catálisis y la conformación de la ISP [2]. Por lo tanto, el daño a los lípidos de la MIM por el ataque de las ERO podría comprometer el movimiento de la ISP y aumentar la tasa de generación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> a través de la estimulación de las reacciones colaterales al ciclo Q, así como afectar la actividad catalítica del complejo III. Para comprobar esta hipótesis, se utilizaron como modelo de estudio mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae* debido a que esta levadura posee la peculiaridad de contener únicamente ácidos grasos resistentes a la peroxidación [4] y a que el grado de insaturación de los lípidos membranales de la levadura puede manipularse a través de la adición de ácidos grasos poliinsaturados al medio de cultivo. Lo anterior permite modular la susceptibilidad de los lípidos de membrana al daño por ERO y estudiar la sensibilidad del complejo III al estrés oxidativo y su tasa de formación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en función de la susceptibilidad de la membrana a la peroxidación. Los resultados obtenidos muestran que la lipoperoxidación aumenta la sensibilidad del complejo III al estrés oxidativo y contribuye a un aumento en la formación de ERO mediante el escape de los electrones en el sitio Q<sub>o</sub>.

**RESULTADOS.** Para aumentar el grado de insaturación de las membranas mitocondriales de la levadura, se agregó el ácido graso triinsaturado ácido linolénico (C18:3) al medio de cultivo, y se analizó la composición de los ácidos grasos de la mitocondria por cromatografía de gases, encontrándose que el C18:3 fue incorporado hasta en un 79% (dato no mostrado). El enriquecimiento con C18:3 aumentó la susceptibilidad de las membranas mitocondriales a la

lipoperoxidación inducida por  $\text{Fe}^{2+}$  (un generador de radical hidroxilo [3]), mientras que las mitocondrias sin C18:3 son totalmente resistentes a todas las concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  probadas (Fig. 1).

El aumento en la susceptibilidad a la lipoperoxidación incrementó la sensibilidad del complejo III al estrés oxidativo ya que el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  inhibió totalmente su actividad únicamente en mitocondrias con C18:3 (Fig. 2). Esta sensibilización fue atribuida a un aumento en los niveles de lipoperoxidación debido a que el tratamiento previo con BHT (un agente antilipoperoxidante) protege hasta en un 70% la actividad en presencia de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  (dato no mostrado). Para comprobar si el daño exacerbado en el complejo III atribuido a la lipoperoxidación puede incrementar la generación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , se evaluó el efecto de la superóxido dismutasa (MnSOD) sobre la velocidad de reducción de citocromo *c*. Esto es un indicador de la generación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  debido a que la SOD inhibe la reducción de citocromo *c* que es debida a su reacción con  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . En la figura 3 se observa que en mitocondrias sin C18:3 expuestas a 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ , la reducción de citocromo *c* es insensible a la SOD, mientras que en mitocondrias con C18:3 este parámetro disminuye de manera importante. Lo anterior indica que se produce  $\text{O}_2^{\cdot-}$  únicamente en mitocondrias que son sensibles a la lipoperoxidación y sugiere que el daño a los lípidos estimula una reacción colateral al ciclo Q que es responsable de la producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Para comprobar lo anterior, se comparó el efecto de la antimicina (inhibidor del sitio quinol reductasa que estimula la producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) en mitocondrias con y sin C18:3 tratadas con 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ . En la figura 4 se observa que en mitocondrias con C18:3 se induce una resistencia a este inhibidor ya que la reducción del citocromo *c* se inhibe en solo 42%, mientras que en mitocondrias sin C18.3 la antimicina inhibe esta actividad hasta un 93.6%. Por último, se midió el efecto de la estigmatelina, (inhibidor del sitio quinol oxidasa el cual se une a la ISP e inhibe totalmente su actividad y la formación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), y se comprobó que este compuesto inhibe casi en su totalidad la reducción de citocromo *c* resistente a antimicina. En conjunto, estos datos indican que el daño a los lípidos de la MIM no inhibe la oxidación del quinol por parte de la ISP (reflejado por la inhibición de la reducción de citocromo *c* con estigmatelina); sin embargo, dicho daño podría limitar la rotación de esta subunidad para reducir al citocromo  $c_1$  (reflejado como una disminución en la actividad del complejo). Por lo tanto, la oxidación del quinol por parte de la ISP provocaría la acumulación del radical  $\text{QH}^{\cdot}$ , el cual sería oxidado por el oxígeno para formar  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y este a su vez podría reducir de una manera no catalítica al citocromo *c* (reflejado por la reducción de citocromo *c* sensible a SOD).

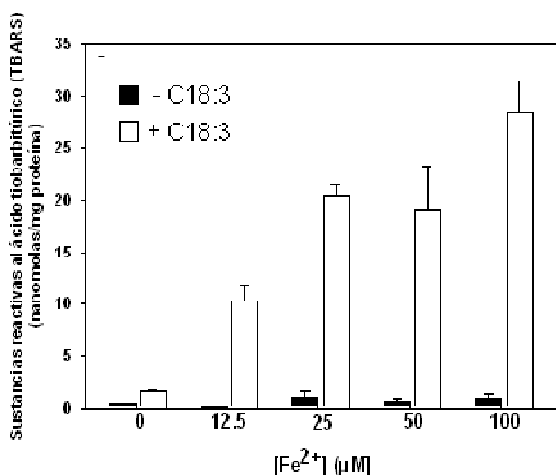
**CONCLUSION.** El aumento en el grado de insaturación de los lípidos de las membranas mitocondriales aumenta su susceptibilidad hacia el estrés oxidativo, lo que afecta la actividad del complejo III e incrementa la producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  debido a una reacción colateral al ciclo Q a nivel del sitio quinol oxidasa.

**AGRADECIMIENTOS.** Se agradece el apoyo económico parcial de los donativos de CONACYT-Fondos Mixtos Estado de Michoacán (64277), COECYT 2008, CIC-UMSNH (2.126).

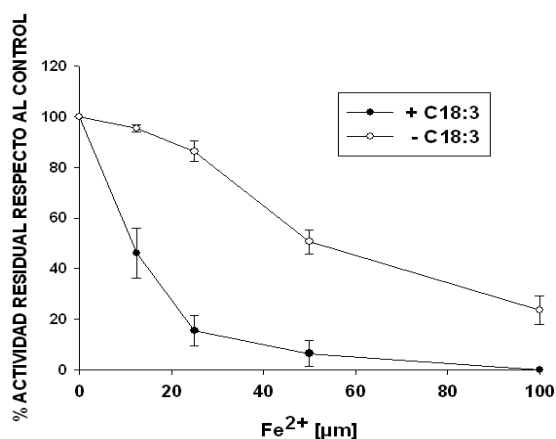
## REFERENCIAS

1. - Muller, F. et al. (2002). *Biochemistry* **41**, 7866-7874.
2. - Lange, C. et al. (2001). *EMBO J.* **20**: 6591-6600.
3. - North JA, et al. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**: 5743-2746.
4. - Avery, S.V. et al. (1996). *App. Environ. Microbiol.* **62**: 3960-3966.

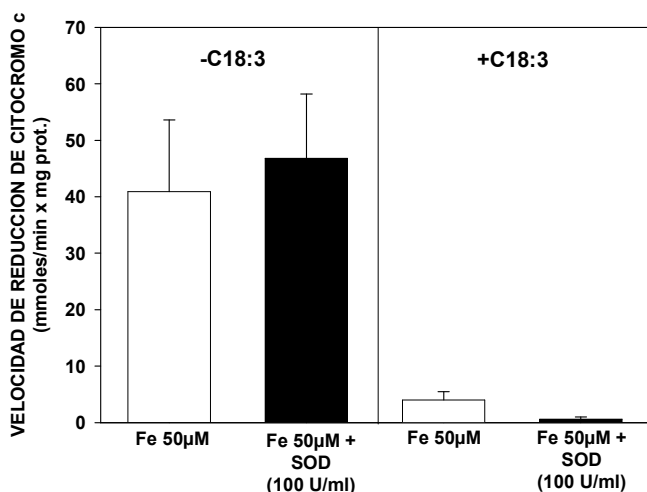
## FIGURAS



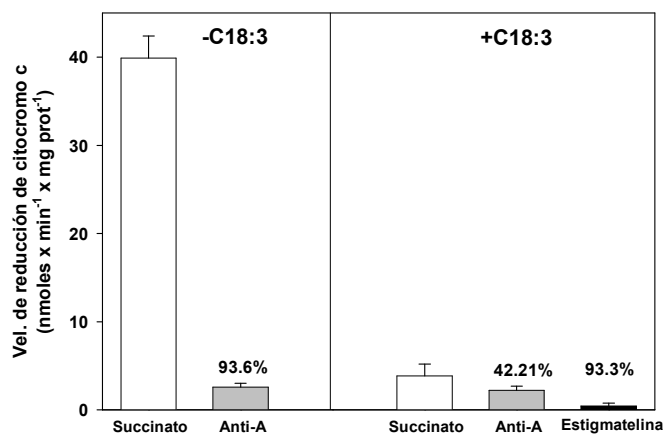
**Figura 1.** Influencia de la incorporación de C18:3 sobre los niveles de lipoperoxidación mitocondrial.



**Figura 2.** Influencia de la incorporación de C18:3 sobre el efecto del estrés oxidativo inducido por Fe<sup>2+</sup> en la actividad del complejo III.



**Figura 3.** Efecto de la MnSOD sobre la velocidad de reducción de citocromo c de mitocondrias expuestas a 50 µM de Fe<sup>2+</sup>



**Figura 4.** Efecto de la antimicina y la estigmatelina sobre la velocidad de reducción de citocromo c de mitocondrias expuestas a 50 µM de Fe<sup>2+</sup>.