



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTRÉS OXIDATIVO EN EL HÍGADO DE RATA CON
SÍNDROME METABÓLICO: PARTICIPACIÓN DE LA
MITOCONDRIA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A:

QFB EDUARDO MARTÍNEZ ABUNDIS

DIRECTOR DE TESIS: DR. MOHAMMED EL HAFIDI BENTLAKDER

MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Indice

1. Resumen.	1
2. Introducción	5
Las especies reactivas de oxígeno y el estrés oxidativo.	5
Generación de especies reactivas de oxígeno por la mitocondria	6
Cadena respiratoria mitocondrial	7
Sistemas antioxidantes mitocondriales	10
La vitamina E	13
Métodos de evaluación de estrés oxidativo	14
Papel de la mitocondria en el desarrollo de enfermedad	15
Estrés oxidativo en obesidad	16
Esteatosis hepática	17
Efecto de los ácidos grasos no esterificados sobre el metabolismo mitocondrial	21
Las proteínas desacoplantes	23
Antecedentes experimentales de las ratas con síndrome metabólico	25
3. Hipótesis	27
4. Objetivos	27
5. Metodología	28
Determinación de triglicéridos e insulina	29
Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata	29
Determinación de proteínas	30
Controles respiratorios	31
Liberación de H ₂ O ₂ a partir de mitocondrias de hígado	33
Potencial membranal mitocondrial	35
Determinación de ubiquinol 9, α -tocoferol y glutatión en mitocondrias	36

Determinación de ácidos grasos no esterificados	39
Cuantificación de malondialdehído	40
Determinación de la actividad de superóxido dismutasa mitocondrial	41
Determinación de la actividad de catalasa	42
Determinación de la actividad de glutatión peroxidasa	42
Análisis de UCP-2 por Western Blot	43
Diseño estadístico	44
6. Resultados	45
Características generales	45
Estrés oxidativo	47
Implicación de la cadena respiratoria mitocondrial en el estrés oxidativo	48
Efecto del ácido oleico sobre el potencial mitocondrial y generación de H ₂ O ₂	53
Análisis de UCP-2 en hígado	57
Efecto del suplemento de vitamina E sobre el estrés oxidativo	59
7. Discusión	63
El síndrome metabólico	63
Esteatosis hepática en las ratas con síndrome metabólico	64
Participación de la mitocondria en el desarrollo de estrés oxidativo en las ratas con síndrome metabólico	65
El ciclo Q	66
Potencial membranal	68
Efecto de los ácidos grasos sobre la generación mitocondrial de H ₂ O ₂	69
Actividad antioxidante mitocondrial	70
Suplemento alimenticio de vitamina E	72
8. Conclusiones	73
9. Bibliografía	74

Símbolos y abreviaturas

ACC Carboxilasa de acetyl CoA.	GPx Glutathión peroxidasa.
ACL Liasa de ATP citrato.	GR Glutathión reductasa.
ADN Acido Desoxirribonucleico.	GSH Glutathión reducido.
ADP Adenosín difosfato.	GSSG Glutathión oxidado.
AG ácidos grasos.	HPLC Cromatografía líquida de alta resolución.
AGNE Acidos grasos libres.	LDL Lipoproteínas de baja densidad.
ApoB Apolipoproteína B.	LHS Lipasa hormonosensible.
ASB Albúmina sérica bovina.	MDA Malondialdehido.
ATB Acido tiobarbitúrico.	MAD ⁺ Nicotin-amin-adenín dinucleótido.
ATP Adenosín trifosfato.	NADH Nicotin-amin-adenín dinucleótido reducido.
BHT Hidroxitolueno butilado.	NADPH Fosfato de nicotin-amin-adenín dinucleótido reducido.
Cat Catalasa.	Pi Pirofosfato.
CCCP Carbonil cianuro clorofenilhidrazona. cit citocromo.	PK-H Proteína cinasa de hígado.
CPT-1 Carnitina palmitoil transferasa.	POD Peroxidasa.
CR Control respiratorio.	PVDF Fluoruro de polivinil.
CRM Cadena respiratoria mitocondrial.	Rh 123 Rodamina 123.
DETAPAC Acido dietiltetraaminopentaacético.	RSM Ratas con síndrome metabólico.
DiA-DCF 2, 7-Diacetato de diclorofluoresceína.	SCD Desaturasa de esterol-CoA.
DCF Diclorofluoresceína	SDS Dodecil sulfato de sodio.
EDTA Acido etilendiamintetraacético	SODm Superóxido Dismutasa mitocondrial.
EGTA Acido etilenglicoltetraacético.	TAC Tejido adiposo café.
EO Estrés oxidativo.	TAN Translocador de adenín nucleótidos.
ERO Especies reactivas de oxígeno.	TBH Tert-butyl hidroperóxido.
FAD Flavín adenín dinucleótido.	TEP Tetraetoxipropano.
FADH Flavín adenín dinucleótido reducido.	UCP Proteína desacoplante.
FAS Sintasa de ácido graso.	UQ Ubiquinona (estado oxidado).
FMN Flavín mononucleótido.	UQH ₂ Ubiquinol (estado reducido).
FNT- α Factor necrótico tumoral alfa.	UV Ultravioleta.
GDP Guanosín difosfato.	VLDL Lipoproteínas de muy baja densidad.

1. Resumen

La obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y hepáticas, que se asocian con niveles elevados de marcadores de daño oxidativo, debido posiblemente a alteraciones en el metabolismo mitocondrial.

Durante la fosforilación oxidativa, el 4 % del oxígeno consumido se convierte fisiológicamente a especies reactivas de oxígeno (ERO); sin embargo, bajo ciertas condiciones patológicas donde se pierde el balance entre pro-oxidantes y antioxidantes, esta producción se incrementa y provoca daño a biomoléculas tales como ADN, lípidos y proteínas.

El objetivo de este trabajo fue el investigar la posible participación de la mitocondria en el desarrollo de estrés oxidativo en el hígado de rata, un modelo experimental de síndrome metabólico (hipertensión, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, obesidad central) inducido por el consumo crónico de solución de sacarosa al 30%.

Resultados. El hígado de las ratas con síndrome metabólico (RSM) contiene niveles elevados de grasa en general y de ácidos grasos no esterificados (AGNE). Además se encontró un aumento en el contenido de malondialdehído (MDA), un índice de lipoperoxidación, en los sueros y mitocondrias de hígado de estos animales. La lipoperoxidación resulta de la reacción entre los ácidos grasos poliinsaturados y las ERO. Las mitocondrias aisladas de hígado de las RSM mostraron una mayor velocidad de liberación de ERO que los controles, ambos oxidando succinato como sustrato.

Diversas alteraciones encontradas en estos animales, tales como los niveles altos de AGNE, la disminución del α - tocoferol, el incremento de la CoQ₉ y la sobre-expresión de la UCP-2 pueden contribuir al desarrollo del estrés oxidativo en las RSM.

El ácido oleico disminuye el potencial de membrana, pero además induce un incremento de la liberación de H₂O₂. Este efecto ocurre debido a la interacción del ácido oleico con el translocador de adenín nucleótidos (TAN). Al suministrar un suplemento de vitamina E en la dieta de las RSM, disminuyó el MDA en plasma, aunque no así la liberación mitocondrial de H₂O₂. Para protegerse del estrés oxidativo, las RSM incrementan los niveles del antioxidante CoQ₉ y la expresión de UCP-2 en mitocondrias, lo cual se ha descrito previamente como una defensa contra el estrés oxidativo.

Conclusiones. Las RSM presentan esteatosis hepática. La cadena respiratoria mitocondrial contribuye al desarrollo de estrés oxidativo determinado en el hígado de estos animales debido, posiblemente, a los AGNE que inducen una mayor liberación de H₂O₂. Este efecto ocurre debido a interacciones con el TAN.

Abstract

Obesity is a risk factor for cardiovascular and hepatic development diseases, which are associate with high levels of oxidative stress markers, due at possible mitochondrial metabolism injury.

During the oxidative phosphorylation 4 % of oxygen is convert to reactive oxygen species (ROS), however, under phatologycal conditions on the pro-oxydant and antioxydant equilibrium broke, this production incresses. Thus injury is induced at biomolecules such DNA, lipids and proteins.

The goal was research the participation about the mitochondria on oxidative stress in rat's liver with metabolic syndrome (hypertension, hypertriglyceridemic, hyperinsulinemic and central obesity) induced by chronic intake of 30 % sucrose solution.

Metabolic syndrome rats (MSR) liver has high levels of fat and non-esterified fat acids (NEFA). Moreover we found incressed the malondialdehydo (MDA) in animal's mitochondria and homogenate, a index of lipoperoxydation. The lipoperoxydation is due at reaction between poliunsaturated fat acids and ROS. The mitochondria from liver showed a high speed of ROS syntheses that controls, both whit succinato as substrate.

Many injuries found on this animals, such high levels of NEFA, lowered of α -tochopherol, increment of CoQ₉ and the overexpresion of uncopling protein 2 (UCP-2) can contribute with develop of oxidative stress on the rats.

The oleic acid lowered the membrane potential, furthermore induced an increasing in H_2O_2 released. This effect occurs due to interactions of oleic acid with Adenine Nucleotide Translocator (ANT).

Supplementation of α -tocopherol on rat's food, decreased the MDA in plasma but not the release of mitochondrial H_2O_2 .

As a protection against oxidative stress, MSR increased CoQ9 and the expression of UCP-2 in mitochondria, described previously as antioxidant defense.

The MSR has hepatic steatosis. The mitochondrial respiratory chain contributes to the development of oxidative stress in the liver of these animals due to the influence of NEFA, that induce high H_2O_2 release. This is because of the interaction with ANT.

2. Introducción

Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo

El oxígeno (O_2) es considerado como un birradical por tener dos electrones desapareados en su último orbital. Esta característica le impide participar en reacciones que implican recibir dos electrones al mismo tiempo, por lo cual su reducción se lleva a cabo en cuatro reacciones consecutivas, lo que da lugar a la formación de intermediarios altamente reactivos como radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^{\bullet}) que son conocidos como especies reactivas de oxígeno (ERO) ¹.

La aerobiosis significó una gran ventaja evolutiva para los organismos eucariotes debido a que los combustibles que aportan energía son oxidados en la mitocondria utilizando al oxígeno molecular como último aceptor de electrones, con lo cual se obtiene la mayor cantidad de ATP que la célula necesita; sin embargo, el oxígeno también puede resultar tóxico debido a sus propiedades oxidantes y a los productos intermedios de su metabolismo (ERO) ya que son oxidantes poderosos que participan en el daño a biomoléculas (lípidos, proteínas, ADN). Este tipo de daño se conoce como estrés oxidativo (EO) ².

Dentro del metabolismo celular existen numerosos sitios de generación de especies oxidantes *in vivo*, de entre estos, cuatro son los más importantes:

1- Metabolismo peroxisomal de ácidos grasos, donde se forma H_2O_2 como subproducto y a pesar de que los peroxisomas contienen alta actividad de catalasa, pueden provocar estrés oxidativo bajo ciertas condiciones patológicas.

2- Reacciones microsomales de citocromo P-450 que cataliza el metabolismo de compuestos xenobioticos por óxido-reducciones, formándose $O_2^{\bullet-}$ como subproducto, lo cual puede provocar EO, aunque no está bien definido bajo qué condiciones se desarrolla.

3- Las células fagocíticas que atacan a los patógenos invasivos con una mezcla de ERO y otros oxidantes (formados por la NADPH oxidasa en los fagosomas), este mecanismo conocido como estallido respiratorio es una importante respuesta del sistema inmunológico, sin embargo puede dañar tejidos aledaños produciendo inflamación.

4- La cadena respiratoria mitocondrial (CRM), cuya participación en el desarrollo de daño oxidativo es objeto de muchas investigaciones ³. Se considera que la mitocondria es el sitio dentro de la célula donde se genera la mayor cantidad de ERO que desencadenan EO ⁴, provocando alteraciones en el metabolismo mitocondrial y con ello enfermedades metabólicas.

Generación de especies reactivas de oxígeno por la mitocondria

El funcionamiento de la CRM no es perfecto y se puede llevar a cabo la reducción univalente del O_2 dando como resultado la formación de $O_2^{\bullet-}$ durante la síntesis de ATP. Se ha identificado a la interfase entre el ciclo Q y el complejo III como un sitio de formación de $O_2^{\bullet-}$ ⁵ y más recientemente también el complejo I se ha señalado como formador de este radical al ceder electrones directamente al O_2 (Fig. 1) ⁶⁻⁸. Del oxígeno total consumido por la mitocondria, del 2 al 4% es convertido a $O_2^{\bullet-}$ de manera normal, aunque este porcentaje varía significativamente en situaciones patológicas, por lo que la mitocondria cuenta con un importante sistema de defensas antioxidantes.

Cadena respiratoria mitocondrial

La cadena respiratoria de la mitocondria es un conjunto de más de veinte transportadores distintos de electrones asociados a un número indeterminado de péptidos estructurales, todos los cuales se localizan en la membrana interna mitocondrial. La cadena respiratoria funciona como una bomba de protones controlada por procesos de oxidación-reducción, pero las bases estructurales que fundamentan esta función aún no se conocen del todo.

La cadena respiratoria transfiere electrones desde el par NAD^+/NADH o FAD/FADH , hasta el par $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ y en su mayor parte las reacciones son reversibles⁹.

La mayor parte de los electrones que se transfieren a la cadena respiratoria provienen de un grupo de enzimas que cataliza la deshidrogenación de sustratos cuyo potencial estándar se encuentra próximo a 0 mV. Estas enzimas son: succinato deshidrogenasa, α -glicerofosfato deshidrogenasa y la flavoproteína transportadora de electrones (que transfiere electrones de la β -oxidación de los ácidos grasos, en forma de FADH_2 a la CRM) y catalizan la entrada directa de los electrones a la cadena respiratoria sin la mediación del par NAD^+/NADH . Esta transferencia requiere que las enzimas se encuentren en contacto directo con la cadena respiratoria, deben estar ligadas a las membranas.

El transporte de electrones en la CRM se realiza a través de 4 complejos:

Complejo I (NADH-UQ óxido-reductasa). El complejo I cataliza la transferencia de dos electrones desde el NADH hasta la UQ_{10} , translocando simultáneamente protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal. El complejo I tiene un peso molecular de alrededor de 850 000, siendo probablemente el mayor complejo proteico en la membrana interna mitocondrial. Está constituido al menos por 16

polipéptidos, donde la mayor parte de los cuales no juega un papel redox de modo directo. El NADH se oxida en el lado interno de la membrana por medio de la NADH-deshidrogenasa que tiene FMN como grupo prostético. Además de FMN, el complejo I posee de 16 a 28 átomos de hierro y 4 átomos de azufre ácido-lábil por cada FMN, organizados en centros de 2-Fe y 4-Fe. Hay entre 4 y 7 centros Fe/S por mol de complejo I.

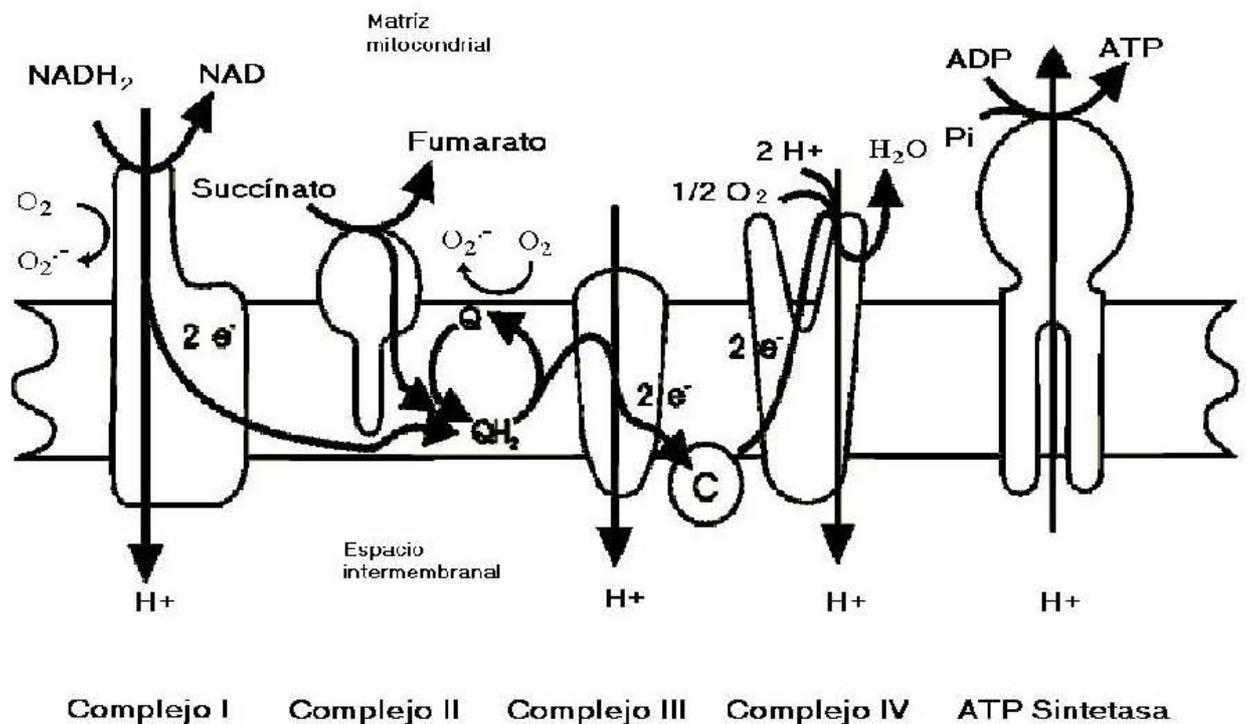


Fig. 1 Cadena respiratoria mitocondrial. El esquema muestra el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial de mamíferos, la translocación de protones por los complejos I (NADH deshidrogenasa), III (complejo bc1) y IV (citocromo oxidasa) y la síntesis de ATP por la ATP-sintetasa a partir de ADP y fosfato, además de los sitios que se han identificado como formadores de radical superóxido: el complejo I y la interface entre el ciclo Q y el complejo III.

Complejo II. (succinato deshidrogenasa). Además del complejo I, hay otras tres vías redox para conducir electrones hasta la UQ y el complejo III. Estas vías son: el complejo II, que transfiere los electrones que proceden del succinato; la flavoproteína transportadora de electrones, que suministra electrones procedentes de la β -oxidación de los ácidos grasos y la α -glicerolfosfato deshidrogenasa, que cataliza la oxidación extramitocondrial del α -glicerolfosfato que se reduce a fosfato de dihidroxiacetona.

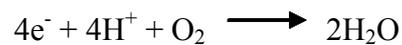
El complejo II está formado por cuatro polipéptidos. Los dos mayores constituyen la succinato deshidrogenasa cuya subunidad mayor contiene FAD unido covalentemente y dos centros Fe/S. El complejo II contiene cit b en la misma proporción que FAD, pero es un cit b distinto al del complejo III y está asociado con los polipéptidos menores.

Ubiquinona y complejo III (complejo-bc1 o ubiquinona: citocromo c oxidorreductasa). La ubiquinona es el componente redox más pequeño de la cadena respiratoria. El papel más sencillo que se le ha atribuido es el de un transportador móvil de $2H^+ + 2e^-$ que transfiere electrones desde los complejos I y II hasta el III.

El complejo III posee 8 subunidades, incluyendo 2 moléculas de cit b y una de cit c1, además de una única proteína Fe/S muy electropositiva (proteína de Rieske), que posee un centro 2Fe/S. El complejo contiene también un cierto número de proteínas intrínsecas que carecen de función redox pero que posiblemente estén implicadas en la translocación de protones.

Citocromo c y complejo IV (citocromo c oxidasa; ferrocitocromo- O_2 oxidorreductasa). El complejo III transfiere los electrones al citocromo c. El citocromo c no se aísla como si fuera un componente del complejo, aunque puede unirse de modo estequiométrico a la cit c oxidasa. El citocromo c es una proteína extrínseca que se encuentra en el lado externo de la membrana interna mitocondrial. La citocromo-

oxidasa es el complejo terminal de la cadena respiratoria que cataliza la reducción del O₂ hasta H₂O, en una reacción que pone en juego 4 electrones.



El donador natural de los electrones es el cit c. Por tratarse de un proceso en el que se transfieren 4 e⁻, en el complejo hay cuatro grupos redox, cada uno con capacidad para un electrón: dos hemos (cit a y cit a₃) y dos átomos de cobre que pueden ser reducidos de Cu (II) a Cu (I). A diferencia de lo que ocurre con el resto de la cadena respiratoria, la reacción de la citocromo c oxidasa es irreversible.

Complejo V (ATP-sintasa). Es una proteína de ~530 kDa, cuya función es convertir la fuerza protón-motriz generada por los complejos I, III y IV en energía química en forma de ATP. Está conformado por dos sectores: Uno hidrofílico conocido como F₁, el cual posee tres sitios para unión de nucleótidos, donde se lleva a cabo la síntesis de ATP y un sector hidrofóbico embebido en la membrana conocido como F₀, que forma un canal a través del cual retornan a la matriz los protones translocados por los otros complejos ¹⁰.

Sistemas antioxidantes mitocondriales

Las células cuentan con una batería de defensas antioxidantes, cuya función es impedir la formación de ERO o neutralizarlas una vez que se han formado. Una parte importante de estas defensas se concentra en la mitocondria y se clasifican en cinco niveles:

Sistema enzimático. Primero, se cuenta con un sistema enzimático capaz de efectuar la reducción tetravalente consecutiva del oxígeno, sin liberar los intermediarios tales como O₂^{•-} y H₂O₂. Aunque no es en sí una enzima antioxidante, esto lo logra con

gran eficiencia el sistema citocromo oxidasa, (el complejo IV de la CRM) responsable de la reducción de más del 90% del oxígeno en la célula ¹¹.

En el segundo nivel tenemos la presencia de una enzima especializada, la superóxido dismutasa mitocondrial (SODm), que es miembro de una familia de metaloenzimas las cuales catalizan la dismutación del radical anión superóxido para formar oxígeno y peróxido de hidrógeno ¹². En las células de los organismos eucariotes existen tres tipos de SOD, además de la mitocondrial que contiene manganeso (Mn^{2+}) en su sitio activo existe una citoplasmática con un átomo de Cu^{2+} y uno de Zn^{2+} en su sitio activo (Cu,Zn-SOD) y la tercera es una SOD extracelular.

Un tercer nivel de defensa está constituido por un grupo de enzimas especializadas, tales como la catalasa que cataliza la conversión de H_2O_2 a H_2O y cuya actividad se ha descrito en la mitocondria ¹³ además del citosol; o las peroxidasas, que por diversos donadores de electrones reducen el H_2O_2 . En los mamíferos se ha descrito una enzima importante, la glutatión peroxidasa (GPx) que además del citosol, también se encuentra en la mitocondria y cataliza la reducción de H_2O_2 a H_2O utilizando glutatión reducido (GSH) como donador de electrones (Fig. 2). Acoplada a esta reacción, la glutatión reductasa (GR) reduce el glutatión oxidado (GSSG) utilizando NADPH, e impidiendo así que se agoten las reservas de GSH.

Sistema no enzimático. En el cuarto nivel, las ERO pueden ser neutralizadas por compuestos con propiedades antioxidantes conocidos como atrapadores de radicales libres⁴. Estos pueden ser hidrofóbicos, como las quinonas, carotenos y el α -tocoferol o vitamina E, el cual es considerado un excelente antioxidante ¹⁴⁻¹⁷, o hidrofílicos como el ácido ascórbico y el GSH que participa en la reacción descrita arriba, entre otros. En muchos estudios se ha demostrado que el nivel de antioxidantes es de vital importancia

para prevenir, revertir, o al menos reducir los daños causados por el desarrollo de estrés oxidativo¹⁸⁻²¹.

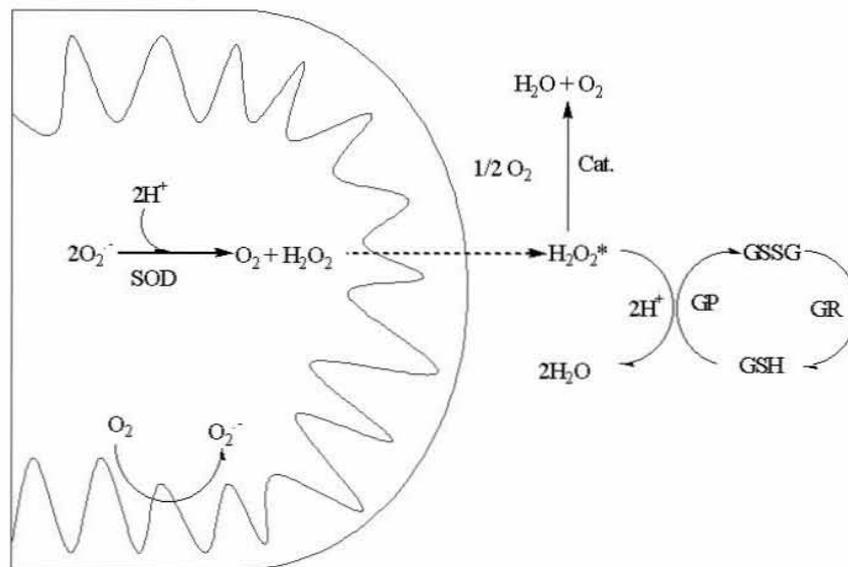


Figura 2. Defensas antioxidantes. Reacción antioxidante de glutatión peroxidasa (GPx) a expensas del glutatión reducido (GSH). La GPx reduce el H_2O_2 hasta H_2O utilizando GSH como donador de electrones y formando glutatión oxidado (GSSG). Finalmente la glutatión reductasa (GR) regenera el GSH utilizando NADPH como donador de electrones. Se muestra también la actividad antioxidante de la SODm y Catalasa (Cat).

Sistema de reparación. Una vez producido el daño molecular, el quinto nivel de defensa lo constituye la reparación. La mayor parte de las moléculas del organismo sufren un recambio constante, por lo cual son periódicamente reemplazadas. En el caso del material genético, los radicales de oxígeno son capaces de producir rupturas en la cadena del ADN y aún de inducir mutagénesis²², por lo que existen mecanismos

enzimáticos de reparación que permiten mantener intacta la información genética ²³, aunque en la mitocondria estos mecanismos de protección y reparación de material genético son menos eficientes que en el núcleo, por lo cual el ADN mitocondrial es particularmente susceptible al daño por ERO ^{3,24}.

La vitamina E

La vitamina E o α tocoferol es un micronutriente esencial ya que su aportación es dietética. Debido a esto, las deficiencias en esta vitamina se pueden dar como consecuencia de un estado de desnutrición. El hecho de que la vitamina E tenga actividad antioxidante hace resaltar la importancia de mantenerla en los niveles adecuados para la salud. Este antioxidante, debido a su hidrofobicidad se encuentra en medios lipídicos, sobre todo en las membranas celulares y en LDL, que son los sitios donde lleva a cabo su actividad antioxidante protegiendo de la peroxidación lipídica al impedir la propagación del efecto oxidante de las ERO ²⁵.

Se ha demostrado que la vitamina E tiene efectos benéficos en la prevención de enfermedades cardiovasculares, evitando la oxidación de LDL, aunque su uso en suplementos alimenticios para prevenir este tipo de enfermedades arroja resultados discrepantes, ya que mientras algunos autores reportan resultados benéficos, para otros su aplicación no muestra beneficio alguno ^{4,14}.

Métodos de evaluación de estrés oxidativo

Una vez que se conoció la importancia de las ERO en diversos cuadros patológicos, se han hecho muchos intentos para cuantificar su producción a partir de diferentes fuentes, tanto químicas como biológicas y de forma directa (se mide la ERO)

o indirecta (donde se miden productos de oxidación) y utilizando diferentes técnicas tales como citometría de flujo, espectrofluorescencia, microscopia confocal, etc.

Métodos indirectos. Los hidroperóxidos lipídicos, productos primarios de la lipoperoxidación se analizan por HPLC utilizando métodos de detección basados sobre óxido-reducción, quimioluminiscencia o detección por UV a 234 nm para dienos conjugados ^{26, 27}. Una de las más populares es la determinación de los aldehidos alquílicos tales como 4-hidroxinonal (4HNE) y el malondialdehido (MDA), productos de degradación de los hidroperóxidos lipídicos.

Métodos directos. Dentro de las técnicas directas, son muy utilizados los marcadores fluorescentes y quimioluminiscentes. Se trata de reactivos que cambian sus propiedades fluorescentes o que emiten luz al oxidarse. De éstos, algunos son altamente específicos para reaccionar con el radical superóxido como el caso de dihidroetidió ²⁸, ²⁹ y otros como el 2,7-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DiA-DCF) que reacciona con diferentes especies tales como el radical hidroxilo, el anión superóxido y el H₂O₂. Es un compuesto lipofílico por lo que puede pasar libremente a través de membranas biológicas ³⁰ y por medio de esterasas no específicas se hidroliza y se vuelve más susceptible a la oxidación.

Si se utiliza el DCF como donador de electrones en el sistema peróxido de hidrógeno-peroxidasa, la fluorescencia emitida será proporcional a la cantidad de peróxido en el medio, lo cual suele ser utilizado como mecanismo de detección de ERO (Fig. 3), además, una ventaja adicional de su uso es poder hacer determinaciones intracelulares.

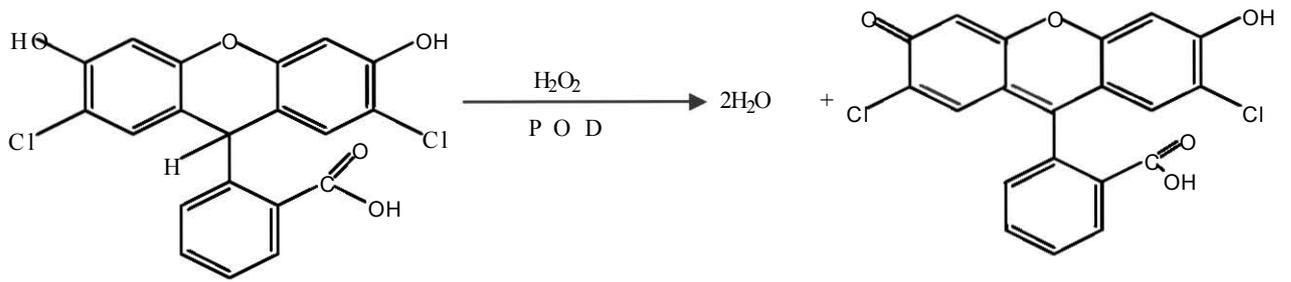


Figura 3.-Detección de H₂O₂ por fluorescencia. El esquema muestra la estructura del DCF y la reacción de oxidación que sufre por intermedio de la peroxidasa (POD). El DCF cede los electrones para la reducción del H₂O₂ a H₂O y se oxida emitiendo fluorescencia a 475 nm.

Papel de la mitocondria en el desarrollo de enfermedad

La mitocondria es esencial para mantener la entropía necesaria para sustentar la vida. Es la mitocondria quien provee la energía necesaria para casi todos los procesos celulares que finalmente permiten llevar a cabo funciones tales como contracción muscular, mantenimiento de los gradientes iónicos, para poder llevar a cabo acumulación y secreción de hormonas y neurotransmisores, además de que participa de manera importante en la muerte celular programada (apoptosis) ³¹. Por estas razones resulta evidente que alteraciones en la función mitocondrial puedan provocar enfermedades, induciendo desde trastornos en su propio metabolismo hasta la muerte celular.

Los procesos de enfermedad en los cuales la disfunción mitocondrial se ha identificado y tiene un papel importante, generan una lista que crece rápidamente ³². El daño mitocondrial en células β-pancreáticas causa diabetes al alterar la liberación de insulina inducida por glucosa ³. Las mitocondrias sufren daño durante la isquemia y aún

más durante la reperfusión de un tejido ^{8, 34}. Además, la disfunción mitocondrial se ha implicado en la mayor parte de las enfermedades neurodegenerativas –Parkinson, Alzheimer, entre otras- ¹³. También la acumulación de defectos mitocondriales se señala como un mecanismo de envejecimiento y enfermedades relacionadas con la edad ³⁵.

Entre estas alteraciones fisio-patológicas, la obesidad está caracterizada por alteraciones en el metabolismo de lípidos que se reflejan en altas concentraciones de triglicéridos, AGNE, y algunas citocinas tales como el factor de necrosis tumoral α (FNT- α) que pueden inhibir la CRM ³⁶ y favorecer la generación de ERO y el desarrollo de EO.

Estrés oxidativo en la obesidad

Datos del estudio Framingham describen que alrededor de 78% de los casos de hipertensión en hombres y 65% de los casos en mujeres están asociados con la obesidad ³⁷. La naturaleza de esta asociación no está del todo establecida. Sin embargo existen evidencias de un mayor estrés oxidativo relacionado con la obesidad ^{38, 39} y con mayor generación de especies reactivas de oxígeno tal como el $O_2^{\cdot-}$ que reacciona con óxido nítrico (un vasodilatador liberado por el endotelio vascular) impidiendo su efecto y produciendo peroxinitrito, que es un potente oxidante, con lo que se favorece la hipertensión y el daño oxidativo ⁴⁰.

Se ha sugerido que la obesidad desencadena estrés oxidativo debido a dos mecanismos diferentes. El tejido adiposo que se encuentra en exceso es una fuente de citocinas inflamatorias como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) y FNT- α (³⁷). Estas citocinas son un potente estímulo para la producción de ERO por los macrófagos

y monocitos, además el FNT- α inhibe la actividad de la CRM, incrementando la interacción de los electrones con O_2 para generar $O_2^{\bullet-}$ ⁴¹. El otro mecanismo involucra un efecto de los triglicéridos elevados sobre el funcionamiento de la CRM; específicamente se ha propuesto que los triglicéridos elevados inhiben al translocador de adenín nucleótidos e inducen la generación de $O_2^{\bullet-}$ ⁴².

La obesidad también es un factor de riesgo para desarrollar aterosclerosis. Por una parte se atribuye este efecto a la dislipidemia producida por la resistencia a la insulina que acompaña a la obesidad ^{43, 44}, aunque también se sabe de la importante participación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) levemente oxidadas que son retenidas en la intima de las arterias, contribuyendo en muchas de las etapas posteriores del desarrollo de la placa aterosclerótica, tales como migración de monocitos y formación de células espumosas ⁴⁵.

Esteatosis hepática

La obesidad no sólo induce daño cardiovascular; el hígado graso o esteatosis hepática es una complicación común que vuelve a este órgano particularmente susceptible a necrosis por daños que suelen ser bien tolerados por un hígado normal tales como isquemia-reperfusión y exposición a endotoxinas ⁴⁶, además de que un hígado graso puede evolucionar hasta esteatohepatitis y cirrosis.

El hígado graso se desarrolla debido a una acumulación de triglicéridos y ácidos grasos libres en los hepatocitos; puede ser causado por diversas drogas, factores nutricionales y defectos genéticos del metabolismo; sin embargo, el desorden más común con que se asocia es resistencia a la insulina ⁴⁷, por lo que se ha propuesto que

sea considerado como uno de los componentes del síndrome metabólico. El hígado graso es una complicación frecuente en la obesidad y suele considerarse una enfermedad exclusiva de adultos. Sin embargo, debido a la prevalencia de obesidad en todos los segmentos de la población, ahora se extiende hasta la población infantil. El hígado graso es una de las principales causas de funcionamiento hepático anormal.

La explicación convencional para la acumulación hepática de triglicéridos es que la obesidad y la resistencia a la insulina resultan en un incremento de la liberación de AGNE por el tejido adiposo. Una mayor actividad de lipasa hormono-sensible (LHS) contribuye a elevar los AGNE plasmáticos, con lo cual se elevan también los AGNE hepáticos ⁴⁶.

Una función metabólica central del hígado es mantener los niveles plasmáticos de glucosa relativos al estado nutricional. En el caso de exceso de energía, la glucosa es convertida a ácidos grasos vía la conversión de glucosa a piruvato, que entra al ciclo de Krebs en la mitocondria (Fig. 3). El citrato formado en el ciclo de Krebs es expulsado al citosol, donde es convertido a acetil-CoA por la Liasa ATP Citrato (ACL). La carboxilasa acetil CoA 1 (ACC1) convierte después la acetil CoA a malonil CoA, que es utilizada por la sintasa de ácidos Grasos (FAS) para formar ácido palmítico (C16:0). El ácido palmítico es posteriormente desaturado por la $\Delta 9$ -desaturasa a ácido palmitoleico el cual puede ser aumentado en la cadena hidrocarbonada (elongado) por la acil elongasa de ácidos grasos de cadena larga y formar ácido esteárico (C18:0) que a su vez también puede ser desaturado para formar ácido oleico (C18:1). En humanos y ratones con hígado graso, el ácido oleico está aumentado, lo que sugiere que la velocidad de síntesis de ácidos grasos (AG) está también incrementada ⁴⁷.

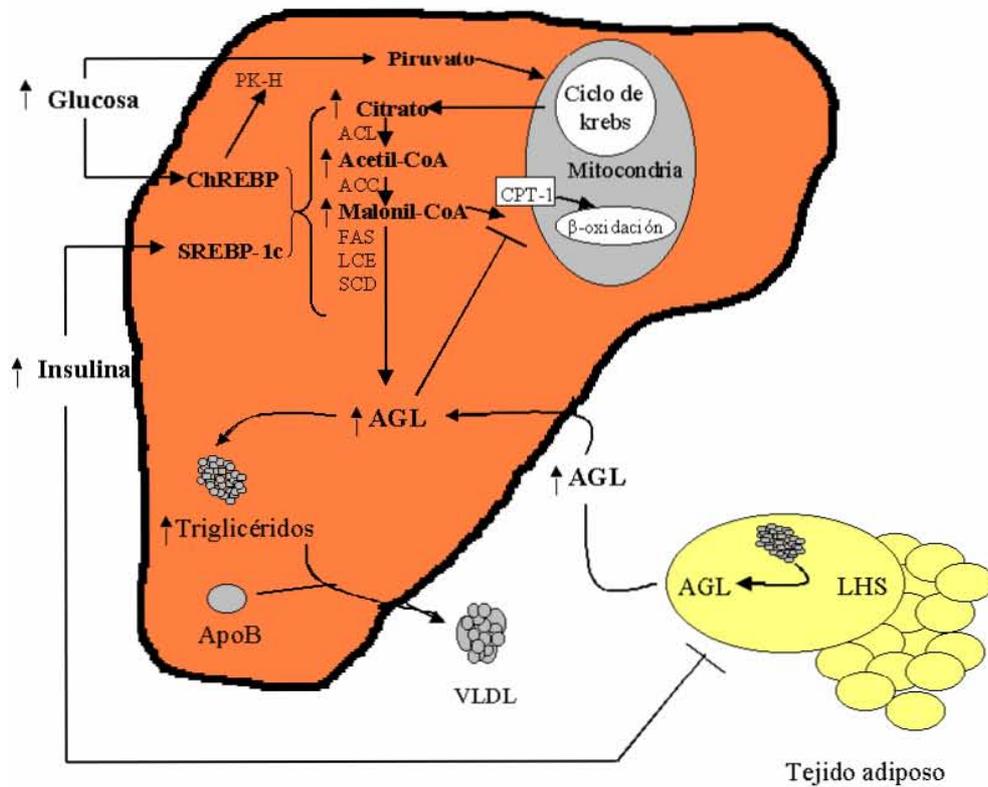


Figura 4. Mecanismo para el desarrollo de hígado graso por obesidad. La descripción completa de la figura se encuentra en el texto. AGL: ácidos grasos libres; LHS: lipasa hormono-sensible; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad; ApoB: apolipoproteína B; CPT-1: carnitina palmitoil transferasa 1, PK-H: proteína cinasa de hígado; ACL: Liasa ATP Citrato; ACC: carboxilasa de Acetil CoA; FAS: Sintasa de Ácido Graso; LCE: acil elongasa de ácidos de cadena larga; SCD: desaturasa de estearoil-CoA; (Modificado de Jeffrey, et al. 2004).

La síntesis de AG en el hígado es regulada por insulina y glucosa. La capacidad de la insulina para activar la lipogénesis se media transcripcionalmente por el factor de transcripción llamado “proteína que se une a elementos en respuesta a eteroles” (SREBP-1c, sterols regulatory elements-binding protein). SREBP-1c es una de las tres isoformas de SREBP. En el núcleo activa transcripcionalmente a todos los genes requeridos para la lipogénesis ⁴⁸, y su sobre-expresión en ratones transgénicos induce hígado graso debido al incremento de la lipogénesis.

SREBP-1c también activa ACC2, una isoforma de ACC que produce malonil-CoA en la membrana mitocondrial. El incremento en malonil-CoA resulta en una disminución de la oxidación de ácidos grasos debido a la inhibición de carnitina palmitoil transferasa-1 (CPT-1) cuya función es internalizar los ácidos grasos a la mitocondria.

La estimulación de la lipogénesis por glucosa es transcripcionalmente mediada por un segundo factor transcripcional conocido como la “proteína que se une a elementos en respuesta a carbohidratos” (ChREBP, carbohydrates regulatory elements binding protein) por sus siglas en inglés. La glucosa activa al ChREBP regulando su internalización al núcleo y activando su unión al ADN. El estímulo de glucosa sobre ChREBP promueve la expresión de la piruvato cinasa de hígado (PK-H) que es una enzima clave en la regulación de la glucólisis. La PK-H cataliza la conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato, que entra al ciclo de Krebs para generar citrato, la principal fuente de acetil-CoA usada para síntesis de ácidos grasos. Existe evidencia de que ChREBP puede estimular independientemente la transcripción de todos los genes lipogénicos. Además, la activación de PK-H estimula tanto glucólisis como lipogénesis, facilitando de esta manera la conversión de glucosa a ácidos grasos bajo condiciones de exceso de energía.

En resumen, la lipogénesis incrementada puede causar dos alteraciones metabólicas que llevan al incremento del contenido de triglicéridos hepáticos: directamente aumentando la síntesis de triglicéridos e indirectamente incrementando la producción de malonil-CoA, que inhibe la CPT-1 y la entrada de AG en la mitocondria, reduciendo así la β -oxidación e incrementando la acumulación de AGNE y triglicéridos.

En ratas obesas se ha observado que el hígado desarrolla mecanismos para protegerse contra la acumulación de triglicéridos y AGNE, que están probablemente

implicados en el desarrollo de estrés oxidativo, sobreexpresando una proteína desacoplante que normalmente no es constitutiva en hepatocitos (UCP-2).

Efecto de los AGNE sobre el metabolismo mitocondrial

Aunque la mayor parte de los ácidos grasos se encuentra unida a proteínas, existe una pequeña proporción que está libre en la célula. Estos ácidos grasos libres o AGNE pueden interaccionar con la mitocondria alterando el potencial de membrana y con ello la fosforilación oxidativa. En la mitocondria existe un sistema de transporte especializado para AGNE a través de proteínas de membrana, tanto en membrana interna como en externa, que incluye modificaciones por enzimas específicas (Sintetasa de acil-CoA, Transferasa de carnitina acil I, Translocasa de acil-carnitina y Transferasa de carnitina acil II), para llevar estos AGNE hasta la matriz mitocondrial donde son utilizados en la β -oxidación ⁴⁹. Sin embargo, se ha descrito que pueden atravesar la membrana por medio de un transporte pasivo conocido como *flip-flop* (Fig. 4) que implica la difusión de los ácidos grasos protonados a través de la membrana (efecto desacoplante que ocurre por el acarreo inespecífico de protones del espacio intermembranal a la matriz mitocondrial) ⁵⁰, con lo cual se acumulan de manera inespecífica en la matriz mitocondrial, aunque también se ha propuesto que interaccionan con el translocador de adenín nucleótidos (TAN) ⁵¹ así como con el de aspartato/glutamato ⁵². Este tipo de efectos es de gran relevancia en el caso de la obesidad central, donde se incrementan los AGNE de manera importante, siendo el hígado uno de los órganos más afectados y en donde se han encontrado alteraciones en el funcionamiento mitocondrial ²³.

El efecto que tienen los AGNE sobre el metabolismo mitocondrial también se ha descrito en tejidos sometidos a isquemia. Se ha propuesto que los AGNE se acumulan en el miocardio y cerebro isquémicos⁵³. Se encontró un incremento en la concentración de ácido araquidónico en mitocondrias de cerebro de rata donde se acelera el estado 4 de la respiración y se inhibe marcadamente el estado 3⁵³. Además se ha encontrado que el ácido araquidónico y otros AGNE, en concentraciones micromolares, inhiben la actividad de los complejos I, I+III y III, y promueven la formación de ERO en mitocondrias aisladas de corazón de bovino⁵⁴.

En otro estudio realizado en células β -pancreáticas se evaluó el efecto del ácido oleico sobre diversas funciones celulares y se encontró que como desacoplante incrementa el estado 4 de la respiración mitocondrial, disminuye el ATP celular y finalmente altera la secreción de insulina inducida por glucosa⁵⁵; pero los efectos son más evidentes cuando son incubadas por períodos largos de tiempo con el ácido oleico (72 h). También se encontró que la generación de H₂O₂ por mitocondrias aisladas de estas células aumenta con la incubación previa con el ácido graso⁵⁵.

Las proteínas desacoplantes

Aunque desde 1978 ya se conocía la existencia de una proteína de la membrana interna mitocondrial en tejido adiposo café (TAC) responsable de la expedición de calor en animales hibernantes, por lo que fue conocida como termogenina⁵⁶, hasta el día de hoy continúa el debate sobre el mecanismo por el cual se lleva a cabo este efecto.

Las proteínas desacoplantes tienen aproximadamente 300 aminoácidos en tres repeticiones de 100 y un peso molecular de aproximadamente 32 KDa. Poseen una secuencia que se utiliza para identificar a potenciales transportadores mitocondriales ⁵⁷. En su estructura se pueden identificar seis posibles hélices transmembranales ⁵⁸, y se han descrito varias de estas moléculas; pero hasta el momento tres son las más estudiadas en mitocondrias de mamíferos: UCP-1, UCP-2 y UCP-3.

El descubrimiento de esta familia de proteínas mitocondriales ha dirigido la atención de muchos grupos de investigación hacia este organelo. La UCP-1 fue la primera en descubrirse en TAC, donde se sabe que participa en el control de termogénesis adaptativa y control del peso corporal en animales hibernantes, tales como roedores ⁵⁹.

La UCP-3, que se encuentra exclusivamente en músculo esquelético humano y músculo esquelético y TAC de roedores, parece tener también un efecto en la expedición de calor en los primeros, pero protege a la mitocondria de lipotoxicidad asociada con el aumento en la concentración de AGNE en la matriz, ya que los acarrea hacia el espacio intermembranal (Fig. 4) ⁶⁰. Recientemente se demostró que la sobreexpresión de UCP-3 en miotúbulos L6 esta asociada con un incremento en la internalización de glucosa a través de un aumento en el reclutamiento del transportador de glucosa GLUT-4 a la superficie celular⁶¹. También en una comparación hecha entre sujetos con diabetes tipo 2 y sujetos sanos, se demostró que los diabéticos tienen sólo 50% de UCP-3 en músculo esquelético ⁶².

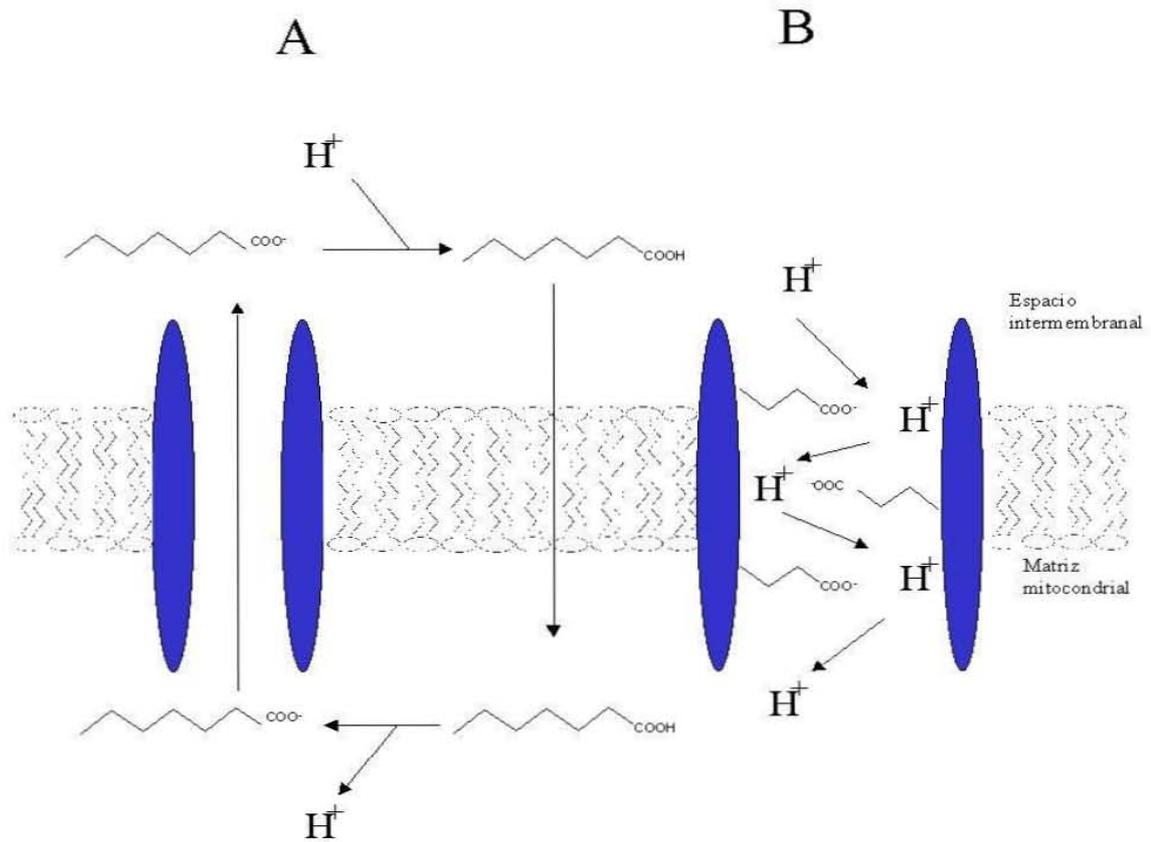


Figura. 5. Dos mecanismos propuestos para las interacciones de la UCP con los AGNE. A) El mecanismo conocido como *flip-flop*, en el cual el ácido graso es protonado del lado del espacio intermembranal, por lo cual es capaz de cruzar la membrana interna. Una vez en la matriz mitocondrial, se libera el protón y es expulsado por la UCP. B). Los ácidos grasos se ligan a la UCP y las cabezas polares funcionan como puentes para acarrear el protón del espacio intermembranal a la matriz mitocondrial (Modificado de Schrauwen y Hesselink, 2002).

La función de la UCP-2, que se encuentra distribuida en diversos tejidos, es la más controvertida; pero se sobreexpresa en situaciones en que el estrés oxidativo aumenta, como cuando disminuye la disponibilidad de ADP o se incrementa la concentración intracelular de AGNE. En experimentos realizados con mitocondrias de tejidos que expresan UCP-2 (TAC, tejido adiposo blanco, hígado, timo y bazo), la incubación de las mitocondrias de hígado con GDP (un inhibidor de UCP-1 y

probablemente también de UCP-2) incrementa el potencial de membrana y la generación de ERO ⁶³.

En células beta aisladas del páncreas, los AGNE inducen mayor generación de ERO que se asocia con alteraciones en la secreción de insulina ⁵⁹, lo que puede explicar el mecanismo por el cual la obesidad induce diabetes. Una posible función de la UCP-2 expresada en estas células es la de disminuir el potencial de membrana y con ello también la generación de ERO, como se demostró en otro trabajo, donde en mitocondrias de hígado graso se expresa esta proteína, sin ser constitutiva, como mecanismo de defensa contra la lipotoxicidad ³⁶ al movilizar fuera de la matriz mitocondrial los AGNE que resultan perjudiciales para la función de este organelo (Fig. 5) ⁵⁹.

Antecedentes experimentales de las ratas con síndrome metabólico

Existe un grupo de trastornos metabólicos identificados como factores de riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares; estos son hipertrigliceridemia, hipertensión arterial, hipercolesterolemia, hiperglicemia y obesidad central ^{64, 65}. Cuando un sujeto presenta tres o más de estos trastornos, se dice que padece síndrome metabólico. A su vez, el síndrome metabólico es considerado como un indicador de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares tales como aterosclerosis e infarto al miocardio ⁶⁶⁻⁶⁸.

Por otra parte, se sabe que además de los factores genéticos, los factores ambientales tales como el sedentarismo, la dieta no balanceada (pobre en proteínas y vitaminas y rica en carbohidratos y/o grasa saturada) son esenciales para desarrollar

síndrome metabólico ⁶⁹, sobre todo el cambio a una dieta alta en carbohidratos tales como fructosa y sacarosa ⁷⁰.

En este laboratorio se ha desarrollado un modelo de rata con síndrome metabólico, una variante del modelo descrito por Reaven ⁷¹ en el cual las dietas con concentraciones altas de sacarosa o fructosa inducen hipertensión, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina. Este cuadro patológico es frecuentemente observado en la clínica. Estas anormalidades metabólicas y funcionales fueron inducidas en ratas Wistar por el consumo de sacarosa (azúcar refinada comercial) al 30 % en el agua de beber, durante un período de 20-24 semanas. Se ha realizado la caracterización parcial de este modelo y los siguientes son algunos de los hallazgos:

1.- La adición de azúcar refinada comercial al agua de bebida de las ratas Wistar produce hipertrigliceridemia e hipertensión comparables a las encontradas por otros autores que administraron los carbohidratos en el alimento sólido ⁷¹.

2.- En las RSM se observó un importante incremento en la acumulación de grasa intraabdominal.

3.- La RSM presenta hiperinsulinemia ⁷².

4.- En el suero e hígado de las RSM se han detectado niveles elevados de AGNE, en particular ácido palmítico, palmitoleico y oleico ⁷³.

5.- En el suero y mitocondrias de hígado de estas ratas se encontró niveles elevados de MDA ⁷⁴.

6.- En un trabajo previo ⁷⁵ se reportó que la vitamina E disminuye de manera significativa en las mitocondrias de las RSM y que las mitocondrias puede contribuir al estrés oxidativo que se observa en las RSM.

3. Hipótesis

El estrés oxidativo desarrollado en el hígado de las RSM puede ser debido a alteraciones en el metabolismo mitocondrial, que propician un incremento en la formación de ERO; esto puede ser inducido por los AGNE que se encuentran aumentados y/o por la disminución en las defensas antioxidantes mitocondriales.

4. Objetivos

General:

- Analizar los factores que pueden influir en el desarrollo del estrés oxidativo encontrado en el hígado de las RSM.

Particulares:

- Determinar la generación de ERO por mitocondrias de hígado de RSM durante la respiración en estados 3 y 4.
- Analizar la influencia del potencial de membrana mitocondrial sobre la generación de ERO.
- Determinar el efecto de los AGNE sobre el acoplamiento y la generación de ERO por la CRM de hígado de las RSM.
- Evaluar la actividad de enzimas antioxidantes tales como SODm, catalasa y GPx.

- Analizar el efecto de un suplemento dietético de vitamina E sobre la generación mitocondrial de ERO y el EO en general.
- Analizar la expresión de UCP-2 en hígado y su posible implicación en la generación de ERO.

5. Metodología

Se utilizaron ratas Wistar macho recién destetadas que fueron separadas en dos grupos al azar. Los animales del grupo control tuvieron acceso libre al alimento comercial (Lab Diet, fórmula 5001) y agua de beber *ad libitum*.

El síndrome metabólico se induce en los animales (grupo de RSM) tratándolos con una solución de sacarosa al 30% en sustitución del agua de beber y el mismo alimento comercial *ad libitum*.

Después de 20 semanas del tratamiento, las ratas de cada grupo se pusieron en ayuno durante la noche. A la mañana siguiente fueron decapitadas para realizar los protocolos experimentales.

Tratamiento con vitamina E. Después de 20 semanas de tratamiento de los animales con sacarosa, recibieron alimento suplementado con vitamina E (180 U/Kg vs 44 U/Kg del alimento comercial) durante 3 semanas, después de lo cual se pusieron en ayuno una noche y a la mañana siguiente fueron decapitadas para realizar los protocolos experimentales.

Determinación de triglicéridos e insulina

Los triglicéridos fueron determinados por técnica enzimática en un autoanalizador Abbott UP Serie II (Irving, Texas, Estados Unidos), de acuerdo con el método descrito por Nägele⁷⁶ y la insulina se determinó utilizando el método de radioinmuno-análisis con un kit comercial Coat-a-Count (Diagnostic Products, L.A. California, Estados Unidos). Ambas determinaciones se realizaron en el departamento de Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata

Reactivos: Albúmina sérica bovina (ASB) libre de ácidos grasos (Sigma), sacarosa grado reactivo (Invitrogen), tris-HCl (Sigma), EGTA (Sigma).

Método: Una vez concluido el tratamiento y después de una noche de ayuno, las ratas fueron pesadas y posteriormente decapitadas; se disectó y se pesó la grasa retroperitoneal, se recolectó sangre para separar el suero y se homogeneizó el hígado para aislamiento de mitocondrias.

La preparación de las mitocondrias se realizó por centrifugación diferencial de la siguiente manera ⁴⁰: el hígado se extrajo rápidamente y se depositó en una solución que contenía: sacarosa 250 mM, Tris-Cl 10 mM, EGTA 1 mM, (pH=7.4), se homogeneizó en ~50 ml de la solución de aislamiento utilizando un homogeneizador tipo Potter. El homogeneizado se centrifugó a 750 x g durante 10 minutos para sedimentar el tejido conjuntivo, el núcleo y los restos celulares. El sobrenadante se centrifugó a 12 000 x g durante 10 minutos a 4°C para sedimentar las mitocondrias. Después de descartar el sobrenadante, las mitocondrias fueron resuspendidas en 20 ml de la misma solución de aislamiento con adición de 0.1% de ASB donde fueron incubadas durante 20 minutos, posteriormente se centrifugaron a 12 000 x g durante 10 minutos y finalmente resuspendidas en 1 ml de solución de aislamiento sin albúmina. Todo el proceso de aislamiento de las mitocondrias se realizó a 4°C.

Determinación de proteínas

Las proteínas se cuantificaron según el método de Lowry modificado ⁷⁷.

Reactivos: solución A (NaOH 0.1 N en NaHCO₃ al 1%), solución B (tartrato de sodio y potasio al 1%), solución C (CuSO₄ al 0.5%), ASB, Folin 1 N (Sigma).

Método: Las mitocondrias aisladas se diluyeron 1:100 en una solución salina (NaCl al 0.9%). La determinación de proteínas se realizó en 100 µl de esta solución.

Por otra parte, se preparó una curva de calibración utilizando ASB como estándar, de la siguiente manera: se colocaron 0, 20, 40 y 60 µl de una solución de ASB (1mg/ml) en tubos de ensayo, se llevaron a 100 µl con solución salina y se adicionó 1 ml de la mezcla de soluciones (10 ml de solución A por 50 µl de B y 50 µl de C). Después de 10 minutos de incubación, se adicionó a cada tubo 50 µl de solución Folin 1 N y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en la obscuridad.

La lectura de absorbencia se realizó en un espectrofotómetro a 750 nm. La curva de calibración que corresponde a la absorbencia en función de las concentraciones utilizadas de albúmina es lineal y obedece a la ley de Beer Lambert, lo que permite determinar la concentración de proteína presente en las muestras de mitocondrias.

Controles respiratorios

La reducción del oxígeno que genera agua como producto final (consumo de oxígeno) y la síntesis de ATP por la ATP-sintasa son dos mecanismos que ocurren simultáneamente (acoplados) en mitocondrias en buenas condiciones funcionales.

Cuando no existe este acoplamiento y se produce el consumo de oxígeno sin síntesis de ATP, se denomina respiración desacoplada ⁹.

En mitocondrias aisladas se pueden medir estos tipos de respiración y conocer algunas variables que brindan información sobre la viabilidad de la preparación en cuestión.

El control respiratorio (CR) es una variable que permite comprobar la integridad de una preparación de mitocondrias. Se define como el valor que se obtiene al dividir la velocidad de respiración que se observa cuando hay máxima síntesis de ATP (es decir, en presencia de ADP y sustrato: estado 3) entre la velocidad cuando no hay síntesis de ATP (estado 4), por lo tanto:

$$\text{CR} = \text{Respiración estado 3} / \text{Respiración estado 4}$$

Desde los años 50, el electrodo de oxígeno (tipo Clark) ha demostrado ser una herramienta extraordinariamente versátil para la investigación de la función mitocondrial. El electrodo de oxígeno sólo determina directamente la velocidad de una reacción sencilla como es la transferencia de electrones al oxígeno y es la herramienta con la cual se realizan los controles respiratorios.

Reactivos: KCl (Merck), HEPES (Research Organics), EGTA, MgCl₂, KH₂PO₄, ADP (Sigma), y succinato de sodio (Sigma).

Equipo: Se utilizó una cámara de vidrio de 1.5 ml equipada con un electrodo detector de oxígeno tipo Clark, donde se lleva a cabo la reacción; la cámara cuenta con agitación magnética. El consumo de oxígeno se detectó con un monitor de oxígeno biológico YSI Modelo 5300 (oxímetro) al cual estaba conectado el electrodo. El registro se obtuvo en un graficador Kipp & Zonen.

Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente en la cámara de reacción con agitación magnética ⁴⁰. En 1.5 ml de solución que contenía: KCl 130 mM, HEPES

25 mM (Research Organics), EGTA 0.1 mM, MgCl₂ 3 mM, KH₂PO₄ 10 mM, (pH=7.4) se determinó la velocidad del consumo de oxígeno por la mitocondria al oxidar succinato de sodio (10 mM) en ausencia (estado 4) y en presencia de ADP (estado 3).

Se tomó registro durante dos minutos para estabilizar la línea basal, se adicionó 1 mg de proteína mitocondrial y se registró durante dos minutos más para establecer el estado 4 de la respiración. Se adicionaron 5 µl de ADP (250 nmol) para registrar el estado 3 de la respiración (Fig. 6).

El control respiratorio se obtuvo dividiendo la velocidad a la que se consume el oxígeno en presencia de ADP (estado 3) entre la velocidad a la que se consume cuando se ha agotado el mismo (estado 4).

Nota: Durante estos experimentos las muestras y reactivos se conservaron en hielo.

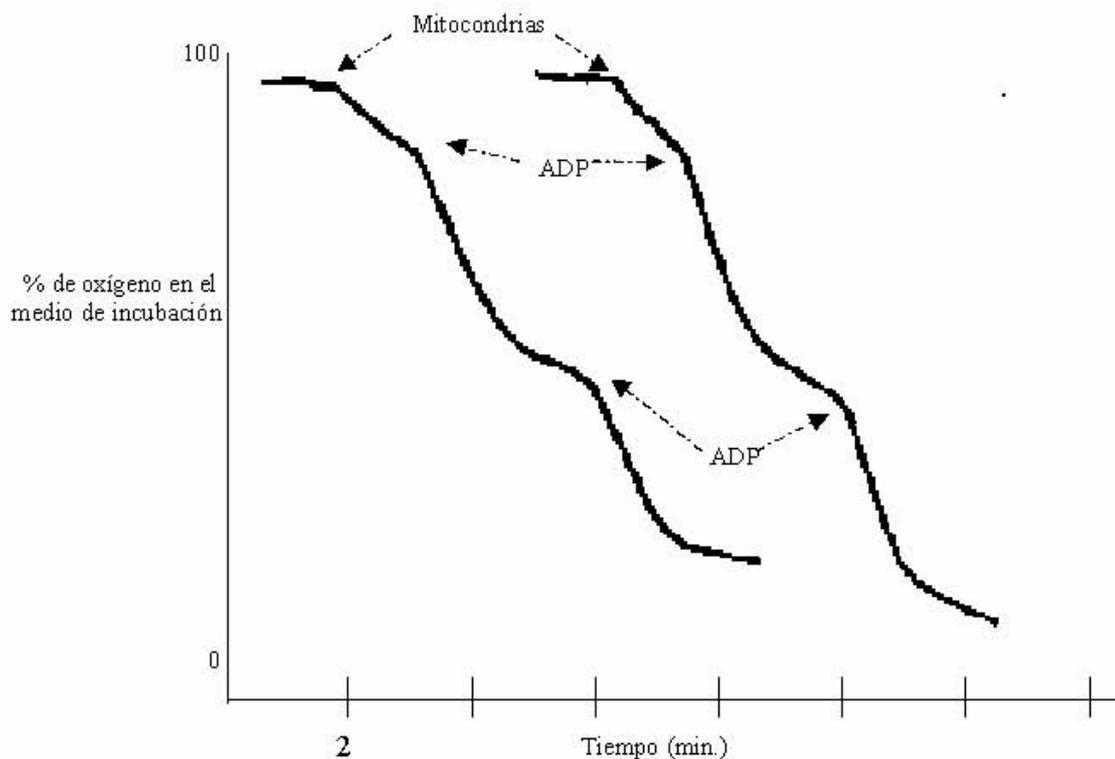


Figura 6. Controles respiratorios. Se muestran ejemplos de los trazos obtenidos como controles respiratorios de las mitocondrias aisladas de hígado de rata. En este caso, los trazos son de mitocondrias de RSM (izquierda) y control (derecha). Se indican los puntos donde se llevan a cabo las adiciones, tanto de mitocondrias como de ADP, tal como se indica en el texto. Se utilizó succinato 10 mM como sustrato.

Liberación de peróxido de hidrógeno a partir de mitocondrias de hígado

Durante la oxidación de succinato por la CRM se forma radical superóxido, que inmediatamente se convierte en H_2O_2 por dismutación y éste difunde libremente fuera de la mitocondria donde es reducido por la peroxidasa que puede utilizar DCF como donador de electrones.

Reactivos: succinato de sodio 1 M pH 7.4, ASB 0.1 mg/ μ L, DCF (Sigma) 100 μ M, CCCP (Sigma) 1 mM, POD (Sigma) 1 mg/ml, A.A. (Sigma) 1 mM, KCl, HEPES, EGTA, $MgCl_2$, KH_2PO_4 , KOH.

Equipo: Se utilizó un espectrofluorómetro Perkin-Elmer Modelo LS-50-B con un software FL WinLab, agitación magnética y un baño de agua. Todos los experimentos se realizaron a 30 °C y a longitudes de onda de excitación y emisión de 475 y 525 nm, respectivamente; las ranuras para el paso de luz se seleccionaron de 8 nm⁵⁴.

En una celda de cuarzo se adicionó 1.95 ml de una solución que contenía: KCl 130 mM, HEPES 25 mM, EGTA 0.1 mM, MgCl₂ 3 mM, KH₂PO₄ 10 mM (pH 7.4 ajustado con KOH), se adicionaron 5 µl de ASB, 0.5 mg de proteína mitocondrial, 100 nM de DCF y 2 µl de POD. Se inició la medida de fluorescencia para obtener una línea basal, después de dos minutos se adicionaron 10 mM de succinato para inducir el estado 4 de la respiración, una vez transcurridos tres minutos se adicionaron 250 nmol de ADP para determinar la formación de H₂O₂ en el estado 3.

Para conocer la cantidad de H₂O₂ liberada por las mitocondrias se realizó una curva de calibración utilizando H₂O₂ de concentración conocida como estándar.

Los reactivos y mitocondrias se mantuvieron en hielo durante el experimento.

Potencial membranar mitocondrial

La rodamina 123 (Rh 123) es un catión lipofílico. Al activarse la CRM se forma un gradiente de protones, siendo el lado que da hacia la matriz mitocondrial donde

existe una menor concentración debido a que son translocados por los complejos I, III y IV hacia el espacio intermembranal. Esta diferencia de cargas induce la migración de la Rh 123 hacia la matriz mitocondrial, con lo cual desaparece su fluorescencia detectada a 527 nm^{78,79}.

Reactivos: succinato de sodio 1 M pH 7.4, Rh 123 (Sigma) 5 μ M, CCCP 1 mM, KCl, HEPES, EGTA, MgCl₂, KH₂PO₄, KOH, GDP (Sigma) 40 mM.

Equipo: Se utilizó un espectrofluorómetro Perkin-Elmer Modelo LS-50-B equipado con un software FL WinLab, agitación magnética y un baño de agua. Los experimentos se realizaron a 25°C y a 503 y 527 nm longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente; las ranuras para el paso de luz se seleccionaron de 6 nm tanto de excitación como de emisión.

En una celda de cuarzo para 3 ml, con agitación magnética, se adicionaron 1.95 ml de solución que contenía: KCl 130 mM, HEPES 25 mM, EGTA 0.1 mM, MgCl₂ 3 mM, KH₂PO₄ 10 mM, (pH 7.4 ajustado con KOH), 1 mg de proteína mitocondrial y 2 μ l de Rh 123 (5 μ M). Se inició la medida de fluorescencia para obtener una línea basal durante 2 minutos, posteriormente se adicionaron 10 mM de succinato para inducir la formación de potencial membranal. 2 μ l de CCCP se utilizaron para abatir el potencial.

Determinación de ubiquinol 9, α -tocoferol y glutatión en mitocondrias de hígado

Reactivos: Gas nitrógeno de alta pureza (Infra), metanol (Baker), etanol (Baker), ácido acético (Baker), acetato de sodio (Sigma), BHT 0.002% en etanol, éter de petróleo (Baker), GSH, (Sigma), ácido metanosulfónico (Sigma), ácido octanosulfónico (Sigma),

ácido dietiltetraaminopentaacético (DETAPAC), ácido fosfórico (Baker), fosfato de sodio monobásico.

Equipo: Ultracentrífuga Sorvall RC2-B a temperatura de 4°C, HPLC conectado a un guardacolumna, a una columna Nova Pack C18 de 3.9 x 150 mm (Waters) y posteriormente a un detector electroquímico digital amperométrico (ANTEC) equipado con electrodo de carbono y un electrodo de hidrógeno como referencia. Todo el sistema bajo control con el software Millennium 32 (versión 3.2).

Extracción de ubiquinol y α -tocoferol⁸⁰⁻⁸². En un tubo de vidrio con tapón de rosca que contenía 5 mg de proteína mitocondrial, se agregaron 5 μ l de BHT para prevenir la oxidación de la muestra, posteriormente se adicionaron rápidamente 4 ml de metanol helado (-20°C) y se agitó en Vortex durante 1 minuto. Esta mezcla se extrajo con 3 ml de éter de petróleo frío (en hielo), agitando en Vortex durante 1 minuto, se centrifugó a 750 x g durante 5 minutos y se trasvasó la fase superior (éter de petróleo) a otro tubo de vidrio con tapón de rosca. Esta extracción se repitió y se reunieron las dos fases etéreas.

Una vez mezclados los extractos, fueron tratados con 2 ml de metanol al 95%, agitando suavemente durante 30 segundos y separando nuevamente las dos fases. El éter se evaporó a sequedad con gas nitrógeno. El residuo lipídico se redisolvió en 1 ml de metanol-etanol (1:1) y se filtró a través de una membrana con tamaño de poro de 0.45 μ m.

Cromatografía. 50 μ l de la muestra filtrada se introdujeron en el inyector del HPLC. Previamente se programó el detector electroquímico a +550 mV para determinar quinol (forma reducida de la coenzima) y α -tocoferol simultáneamente, en el modo DC con una velocidad de flujo de 1 ml/min de la fase móvil (metanol-etanol 1:1 con acetato de sodio 50 mM y ácido acético 250 mM) (Fig. 7-A).

Extracción de glutatión⁸³. En un tubo Eppendorf de 1.5 ml se adicionó 1 mg de proteína mitocondrial, se agregaron 500 µl de solución de extracción que contenía ácido metanosulfónico 200 mM y DETAPAC 5 mM. Esta mezcla fué agitada en Vortex durante 1 minuto y se centrifugó a 16 000 x g durante 30 minutos a 4 °C.

Cromatografía. Quinientos µl del sobrenadante fueron diluidos 1:1 con la fase móvil (NaH₂PO₄ 50 mM, ácido octanosulfónico 0.05 mM, pH=3 ajustado con ácido fosfórico). El extracto se filtró a través de una membrana con poro de 45 µm y se depositaron 50 µl en el inyector del HPLC utilizando el detector electroquímico que se programó a un potencial de +700 mV, con un flujo de 1 ml/min de la fase móvil. La columna utilizada fue Nova-Pak C18 3.9 X 150 mm (Waters) que se mantuvo a 30 °C. Por medio de una curva de calibración del GSH estándar, se determinó la concentración de GSH en las mitocondrias (Fig. 7-B).

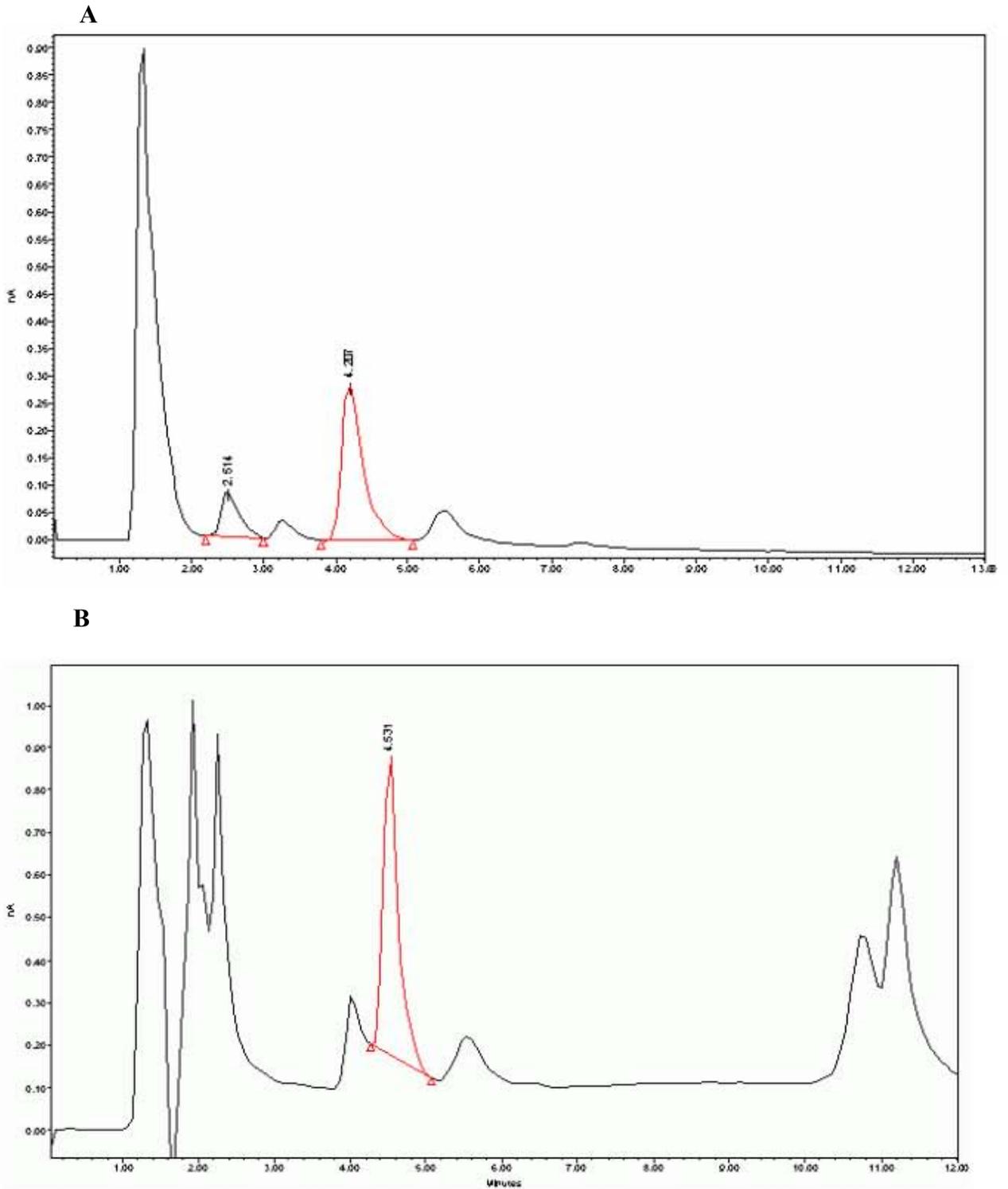


Figura 7. Análisis de antioxidantes por HPLC. Se determinaron los antioxidantes lipofílicos vitamina E y CoQ₉ reducida, además del GSH. (A) Cromatograma obtenido del extracto de mitocondrias. Se pueden apreciar los picos que corresponden a: 2.5 y 4.2 min para vitamina E y CoQ₉ reducida, respectivamente. (B) Extracto ácido de mitocondrias de hígado donde se muestra el pico que corresponde al GSH con un tiempo de retención de 4.5 min.

Determinación de ácidos grasos no esterificados

Reactivos: Gas helio (Praxair), gas nitrógeno (Infra), etanol, metanol, cloroformo (Baker), hexano (Baker), NaCl al 0.9 %, ácido heptadecanoico (Sigma), sulfato de sodio anhidro, ácido sulfúrico, 2,2-dimetoxipropano (Sigma).

Extracción: Cinco mg de proteína mitocondrial se extrajeron siguiendo el método de Folch, con una mezcla de cloroformo-metanol (2/1 v/v) y 0.002 % de BHT. Se utilizaron 10 μ l de ácido heptadecanoico en etanol como estándar interno (1 mg/ml). La fase de cloroformo se trató con sulfato de sodio anhidro para eliminar los residuos de agua, se filtró sobre algodón y se evaporó con corriente de nitrógeno.

Derivatización: El residuo lipídico fue resuspendido en 1 ml de metanol, se adicionó 100 μ l de 2,4-dimetoxipropano y 10 μ l de ácido sulfúrico concentrado, se mezcló en Vortex y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se extrajo dos veces con 2 ml de hexano que fue evaporado a sequedad con corriente de gas nitrógeno³⁸.

Cromatografía: El residuo fue redissuelto en 100 μ l de hexano, diluido 1:3 y de la dilución se depositaron 2 μ l en el inyector del cromatógrafo de gases⁸⁵. El cromatógrafo utilizado fue CARLO ERBA, con una columna SP2330 30 m x 0.25 mm DI (Supelco). La temperatura del inyector y la columna se fijaron a 250 °C y 195 °C, respectivamente, se usó helio como gas acarreador a una presión de 2 Kg/cm².

Cuantificación de malondialdehido

Reactivos: metanol, n-butanol, hidroxitolueno butilado (BHT o 2,6-di-ter-butil-p-cresol, (Sigma), fosfato monobásico de potasio, ácido tiobarbitúrico (ATB, Sigma), ácido acético glacial, cloruro de potasio, 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP o bis-malonaldehido, Sigma).

Cincuenta μl de suero se colocaron en un tubo con tapón de rosca (con capacidad para 10 ml), mantenido en hielo ⁸⁵. Se adicionaron 50 μl de BHT al 4 % en metanol y 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos (fosfato monobásico de potasio 0.15 M, pH 7.4). Esta mezcla se agitó en Vortex durante 5 segundos y se mantuvo en un baño de agua a 37 °C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 1.5 ml de ATB al 0.8 % ,1 ml de ácido acético al 20 % (pH 3.5) y se incubó en un baño de agua a ebullición (90 °C) durante una hora.

Después de una hora de reacción, la mezcla se enfrió en hielo, se le adicionó 1 ml de KCl al 2% y 5 ml de n-butanol. Se centrifugó durante 4 minutos a 750 x g, se recuperó la fase de n-butanol y se determinó la absorbencia en espectrofotómetro a 532 nm. La concentración de MDA se calculó a partir de una curva de calibración, utilizando TEP como estándar.

Determinación de la actividad de superóxido dismutasa mitocondrial.

Se midió la capacidad que tiene la superóxido dismutasa mitocondrial (SODm) para evitar la oxidación de citocromo *c* por el anión superóxido, el cual es generado por el sistema xantina-xantina oxidasa.

Reactivos: Fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de sodio, tetraacetato de etilendiamina (EDTA), xantina (Sigma), hidróxido de sodio, citocromo *c* (Sigma), xantina oxidasa (Sigma), superóxido dismutasa (Sigma).

Metodología ³⁶: Un mg de proteína mitocondrial se suspendió en 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$) pH 7.8, que contenía 0.1 mM de EDTA. Esta solución fue sonicada durante 5 ciclos de 60 segundos para romper las mitocondrias (La suspensión pierde la turbidez cuando las mitocondrias se rompen).

Cincuenta μl de la mezcla sonicada se adicionaron a 2.9 ml de la solución amortiguadora de fosfatos que contenía xantina 0.5 μmol , NaOH 0.1 mM y citocromo *c* 2 μmol . La reacción se inició al adicionar 50 μl de una solución de xantina oxidasa (0.2 U/ml) en EDTA 0.1 mM. Se midió la inhibición de la oxidación de citocromo *c* a 550 nm durante 3 minutos a 37 °C. La actividad específica se calculó construyendo una curva de calibración con SOD de actividad conocida.

Determinación de la actividad de catalasa

En este experimento se midió directamente la desaparición del H_2O_2 que es degradado por la catalasa a O_2 y H_2O .

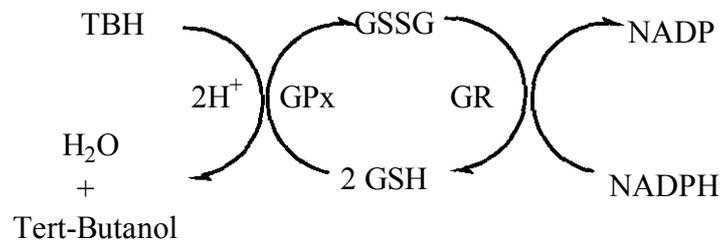
Reactivos: NaH_2PO_4 , Tween 20 (Sigma), etanol, H_2O_2 grado reactivo (Sigma), catalasa (Sigma).

Metodología ³⁶: El hígado fue homogeneizado en 10-20 volúmenes de solución amortiguadora [NaH_2PO_4 (pH 7.4) con 0.1 % de Tween 20 y 0.1 % de etanol] en un homogeneizador tipo Potter mantenido en hielo. El homogeneizado fue centrifugado a

2500 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se diluyó 1:10 con la solución amortiguadora sin Tween 20 ni etanol. En una celda de cuarzo (para 1 ml) que contenía 995 µl de la solución amortiguadora y 10 mM de H₂O₂ se adicionaron 5 µl del sobrenadante diluido y se monitoreó la desaparición del peróxido a 240 nm durante 5 minutos a 37 °C. La actividad se calculó aplicando la ley de Beer Lambert, utilizando el coeficiente de extinción del H₂O₂ a esta longitud de onda ($\xi = 43.6 \text{ M}^{-1}$).

Determinación de la actividad de glutatión peroxidasa

La determinación de actividad de glutatión peroxidasa (GPx) se llevó a cabo midiendo la desaparición de NADPH como una reacción acoplada a la reducción de TBH utilizando GSH como donador de electrones de acuerdo con el siguiente esquema:



Reactivos: Tris-HCl (Research Organics), EDTA, GSH, NADPH (Sigma), glutatión reductasa (GR, Sigma), tert-butilhidroperóxido (TBH, Sigma).

Metodología ³⁶: En una celda de cuarzo (capacidad 1 ml) que contenía 990 µL de una solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM (pH 7.6) adicionada con 5 mM de EDTA, 1 mM de GSH, 0.22 mM de NADPH y 0.4 U de GR, se agregaron 250 µg de proteína mitocondrial. La reacción se inició con la adición de TBH a una concentración final de 0.22 mM. El consumo de NADPH fue medido a 340 nm y 37 °C durante 5

minutos. Para el cálculo de la actividad la equivalencia fue: 1 nmol de NADPH consumido/min/ml = 1 mU/ml de actividad de GPX ($\xi_{\text{NADPH}} = 6.22 \text{ mM}^{-1}$).

Análisis de UCP-2 por Western Blot

Las muestras de mitocondrias se corrieron en geles desnaturalizantes de acrilamida-bis acrilamida al 10 % a 120 V durante 2 horas en amortiguador Tris-glicina-SDS.

Después de la corrida, el gel se transfirió a una membrana de PVDF (Millipore) durante 1 hora a 100 mA, utilizando un amortiguador de CAPS (ácido ciclohexilamino propanosulfónico)-metanol a 4 °C.

Al terminar la transferencia se separó la membrana, se incubó en TPBS (NaCl 136 mM, KCl 2.68 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1.76 mM, 0.1 % de Tween 20) con 2.5 % de BSA durante 1 hora a temperatura ambiente, se enjuagó tres veces con TPBS y posteriormente se incubó con el anticuerpo primario (anti UCP-2 de cabra) diluido 1:3000 en TPBS + 1 % de leche descremada, durante toda la noche a 4°C. La membrana se enjuagó 2 veces con TPBS, se incubó durante 4 horas a 4°C con anticuerpo secundario (IgG anticabra de conejo, conjugado con peroxidasa) diluido 1:5000 en TPBS. Se lavó una vez con TPBS y dos veces con PBS (TPBS sin Tween) durante 5 minutos.

Una vez lavada la membrana, se cubrió durante 1 minuto con la mezcla de reactivos para revelar por quimioluminiscencia (Western Blotting Luminol Reagent de Santa Cruz Biotechnology). Se eliminó el exceso de reactivos y se reveló utilizando placas de autoradiografía (Kodak Biomax Light Film) ⁸⁶.

Diseño estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados aplicando la prueba “t” de Student para grupos no apareados. Se utilizó el programa Sigma Plot 7.0 para el análisis estadístico. Los resultados numéricos representan la Media \pm Desviación Estándar. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

6. Resultados

Características generales de los animales

Al final del tratamiento (20 semanas) las RSM tuvieron un peso corporal ligeramente superior al de las ratas controles. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (Tabla I). La grasa retroperitoneal fue mucho más abundante en las RSM en comparación con los animales controles, lo cual refleja la obesidad central. El consumo de sacarosa indujo un aumento significativo en los triglicéridos y la insulina circulantes ($p < 0.005$). Como se publicó con anterioridad, estas ratas son además hipertriglicéridémicas e hiperinsulinémicas, con lo cual se cumplen al menos tres de las condiciones necesarias para definir el síndrome metabólico.

Tabla I. Características generales de la RSM.

CARACTERISTICAS GENERALES			
	Control	RSM	p
Peso corporal (g)	440 ± 25	526 ± 49	< 0.05
Grasa retroperitoneal (g)	2.87 ± 0.8	15.3 ± 5.2	< 0.005
Triglicéridos (mM)	0.506 ± 0.104	1.220 ± 0.320	< 0.005
Insulina (pM)	106.8 ± 17.4	285.2 ± 53.5	< 0.0005
MDA en suero (nM)	12.4 ± 2.2	23.0 ± 1.2	< 0.0005
MDA en homogeneizado de hígado (μmol/mg)	3.78 ± 0.50	7.05 ± 1.30	< 0.005

Los valores representan la media ± DS; n = 5.

Posteriormente analizamos el contenido de ácidos grasos libres (AGNE) tanto en las mitocondrias aisladas de hígado como en homogeneizados.

De los seis ácidos grasos determinados (Tabla II), el palmítico, palmitoleico y oleico se encuentran incrementados, aunque este último no alcanza significancia estadística. En lo que respecta a los ácidos araquidónico, linoleico y esteárico, se encuentran disminuidos en las RSM. Como se esperaba, la cantidad total de AGNE tiende a ser mayor en las RSM tanto en mitocondrias como en homogeneizados.

Tabla II. Ácidos grasos libres en mitocondrias y homogeneizados de hígado.

Ácido graso	Mitocondrias		Homogeneizados	
	Control	RSM	Control	RSM
Palmítico	1.50 ± 0.025	2.13 ± 0.15 *	1.44 ± 0.17	1.94 ± 0.14 *
Palmitoleico	N.D.	0.51 ± 0.04 *	0.12 ± 0.12	0.43 ± 0.07 *
Esteárico	1.32 ± 0.06	1.01 ± 0.10 *	0.83 ± 0.07	0.56 ± 0.02 *
Oleico	1.13 ± 0.03	1.32 ± 0.16	0.98 ± 0.60	1.54 ± 0.04
Linoleico	1.10 ± 0.05	0.63 ± 0.09 *	0.66 ± 0.31	0.45 ± 0.06
Araquidónico	0.71 ± 0.06	0.42 ± 0.04 *	0.34 ± 0.05	0.20 ± 0.02*
Total	5.77 ± 0.14	6.02 ± 0.3	4.37 ± 1.06	5.12 ± 0.16

Los valores se reportan en nmol/mg de proteína tanto para mitocondrias como para homogeneizados. ND = no detectable. * p < 0.01 vs Control, n = 5.

Para comprobar que existía acumulación de grasa en el hígado, se realizaron tinciones de cortes del órgano con el colorante rojo oleoso, el cual es utilizado para evidenciar la grasa presente en el tejido. Esto nos permitió detectar, cualitativamente, una acumulación de grasa en el hígado de las RSM, que se puede apreciar al microscopio como puntos de color marrón y no se encuentran en las muestras de animales control (Fig. 8).

A

B

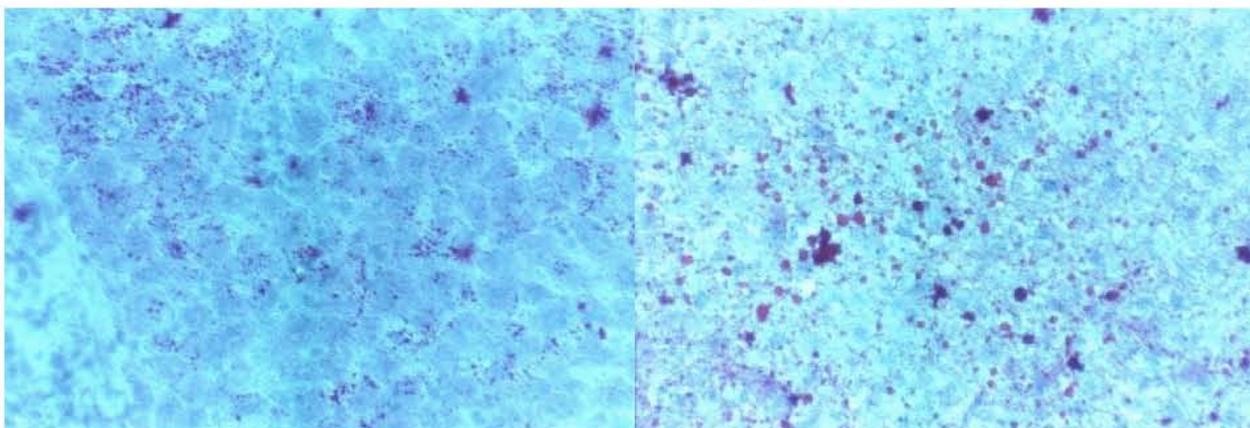


Figura 8. Tinciones con rojo oleoso de cortes de hígado en fresco. Las fotografías corresponden a Control (A) y RSM (B). El colorante es retenido por la grasa que se puede observar como puntos rojo-naranja en la preparación. Estos puntos son más abundantes y grandes en la preparación correspondiente a la RSM. Las fotografías fueron tomadas con un aumento 25X. Cortes y tinciones realizados en el departamento de Patología del INCICH.

Estrés oxidativo

El consumo de sacarosa indujo un aumento significativo en la concentración del MDA tanto en mitocondrias como en homogeneizado de hígado (Tabla I). Los valores elevados de este metabolito indican que la oxidación de lípidos fue mayor, por lo que los animales estuvieron sujetos a estrés oxidativo.

Una de las condiciones para que se desarrolle estrés oxidativo, además de un incremento en la generación de oxidantes, es que disminuyan las defensas antioxidantes, por lo cual se determinó la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa en homogeneizado, GPx y SOD en mitocondrias, además de los antioxidantes no enzimáticos vitamina E (α -tocoferol), CoQ₉ reducida y glutatión reducido, todos ellos en mitocondrias de hígado (Tabla III). De estas variables, solamente la CoQ₉ se encontró incrementada de manera significativa; aunque los valores de vitamina E tendieron a disminuir en la RSM, pero no

alcanzaron diferencia significativa debido a la dispersión de los valores. Las actividades enzimáticas de catalasa, GPx y SOD no presentaron diferencia significativa en comparación con los controles.

Tabla III. Defensas antioxidantes.

ANTIOXIDANTES			
	Control	RSM	p
Catalasa	477 ± 22	453 ± 7	NS
GPx	69 ± 7	57 ± 8	NS
SODm	28 ± 5	22 ± 2	NS
Vitamina E	0.237 ± 0.114	0.175 ± 0.082	NS
Co Q₉ reducida	5.9 ± 2.3	10.7 ± 2.0	< 0.05
GSH	2.3 ± 0.18	2.0 ± 0.3	NS

Las actividades enzimáticas se indican en nmol/min/mg proteína mitocondrial, excepto catalasa que se determinó en homogeneizado de hígado, mientras que los antioxidantes en nmol/mg proteína mitocondrial. NS = no significativo, GPx = glutatión peroxidasa mitocondrial, SODm = superóxido dismutasa mitocondrial, GSH = glutatión reducido. Los valores representan la media ± DS; n = 5 para antioxidantes y n = 6 para actividades enzimáticas.

Implicación de la cadena respiratoria mitocondrial en el estrés oxidativo

Control respiratorio y consumo de oxígeno. Se ha reconocido que la mitocondria es la principal fuente fisiológica de ERO y que esta generación proviene de la CRM.

Se midió el consumo de oxígeno en las mitocondrias frescas usando polarografía, como se describió en la sección “Metodología”. De los trazos obtenidos se calculó control respiratorio (CR), consumo de oxígeno en estado 4 (sin síntesis de ATP), consumo de oxígeno en estado 3 (acoplado a la síntesis de ATP) y el índice ADP/O (Tabla IV). Los resultados muestran que las mitocondrias aisladas de los dos tipos de hígados (de RSM y

ratas control) se comportaban de manera semejante. La única diferencia encontrada radicó en que las mitocondrias de RSM tenían un estado 4 menor, lo cual fue estadísticamente significativo. Esta diferencia en el valor de consumo de oxígeno en estado 4 resultó en un CR mayor, aunque no alcanzó significancia estadística.

Tabla IV. Variables respiratorias en mitocondrias de hígado.

VARIABLES RESPIRATORIAS			
	Control	RSM	p
CR	6.8 ± 1.5	7.6 ± 0.5	NS
Edo. 4 (natO ₂ /min/mg prot.)	11.7 ± 1.3	6.9 ± 0.5	< 0.001
Edo. 3 (natO ₂ /min/mg prot.)	67.6 ± 7.2	60.9 ± 5.1	NS
ADP/O	2.3 ± 0.2	2.4 ± 0.2	NS

NS = no significativo. El control respiratorio (CR) y el cociente ADP/O carecen de unidades. Los valores representan la media ± DS; n = 5.

Generación de H₂O₂. La Figura 9 muestra el aumento de fluorescencia en función del tiempo; que refleja la oxidación del DCF en presencia de H₂O₂ liberado por las mitocondrias durante la oxidación del succinato en el estado 3 y 4. Se observa que se liberó H₂O₂ a una velocidad mayor cuando no había síntesis de ATP (estado 4), mientras que al adicionar ADP al medio (estado 3) la velocidad de liberación disminuyó de manera considerable. Por otra parte, las mitocondrias de hígado de RSM liberaron el H₂O₂ a una mayor velocidad que en el caso de los controles. En la figura 10 se muestra el resumen de estos resultados.

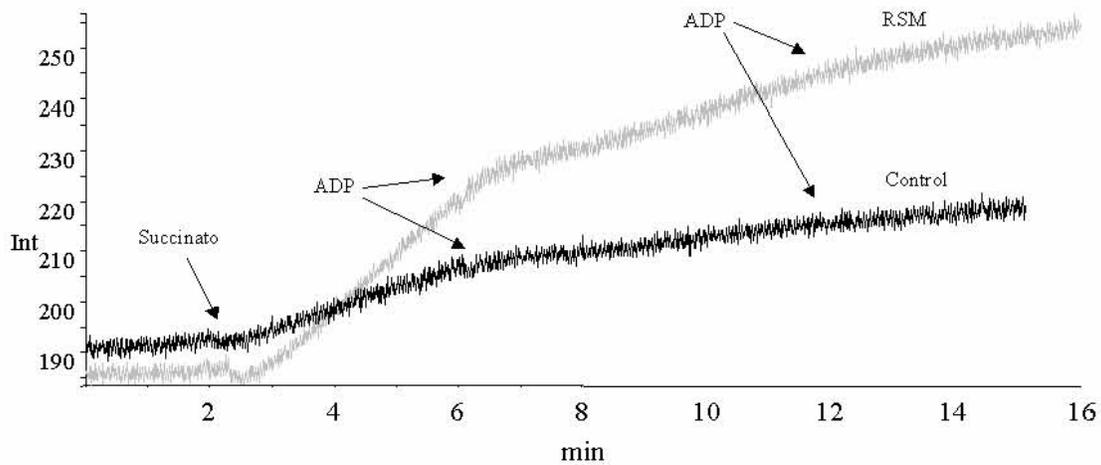


Figura 9. Determinación de H_2O_2 por espectrofluorimetría. En estos experimentos se siguió la fluorescencia del DCF a 475 nm de excitación y 525 nm emisión. Las flechas indican los puntos donde se hicieron las adiciones del sustrato (succinato 10 mM) y ADP (250 nmol) para inducir la síntesis de ATP. Los experimentos se realizaron en un medio KHE, pH = 7.4 adicionado de Pi y $MgCl_2$, como se describió anteriormente.

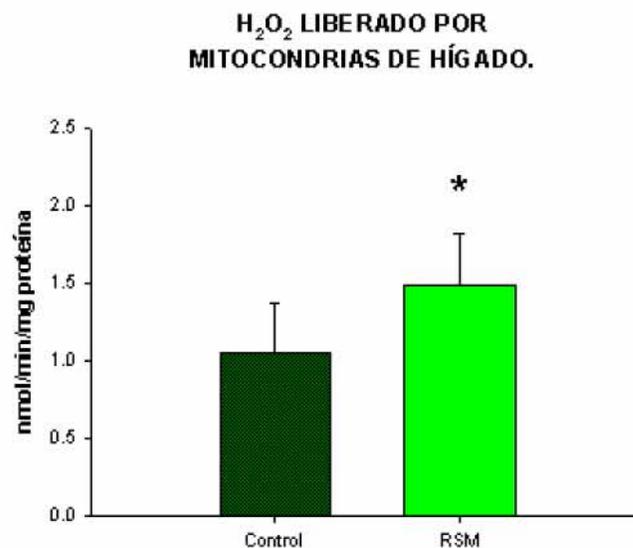


Figura 10. Velocidad de liberación de H_2O_2 en el estado 4 de la respiración mitocondrial. La velocidad se calculó construyendo una curva tipo utilizando H_2O_2 de concentración conocida como estándar. * $p < 0.05$. Las barras representan la media \pm DS; $n = 6$.

Potencial de la membrana mitocondrial. Se ha descrito que una mayor generación de H_2O_2 por las mitocondrias puede ser debida a un incremento del potencial membranal, lo cual provoca que los componentes de la CRM permanecen reducidos por más tiempo y es más probable que cedan los electrones directamente al O_2 para formar $\text{O}_2^{\bullet-}$.

El potencial membranal mitocondrial se determinó midiendo la fluorescencia de Rh 123. La Figura 11 muestra ejemplos de los trazos obtenidos al medir esta variable. Al adicionar succinato se forma el potencial, el cual es proporcional a la caída de la curva de fluorescencia (medida en unidades arbitrarias de fluorescencia o UAF). Con la adición de ADP se da inicio a la síntesis de ATP y con ello el retorno de protones hacia la matriz mitocondrial a través de la ATP-sintasa, lo cual implica una disminución en el potencial, que se mantiene mientras es consumido el ADP. Conforme se agota el ADP, el potencial regresa a su máximo, como lo muestran los ejemplos.

Finalmente, la adición del desacoplante CCCP colapsa el potencial formado y la fluorescencia retorna a niveles basales.

Para transformar los valores de los potenciales obtenidos en UAF a mV, se utilizó metodología ya descrita aplicando la ecuación de Nernst^{87, 79}, utilizando las concentraciones de Rh 123 dentro y fuera de la mitocondria en diferentes condiciones ya sea al formarse el potencial con succinato, totalmente desacopladas con CCCP o sólo parcialmente desacopladas con ácido oleico. Al graficar los valores del potencial obtenidos de esta manera, encontramos que el potencial fue ligeramente menor para las mitocondrias de RSM, pero con diferencia estadísticamente significativa (Fig. 12).

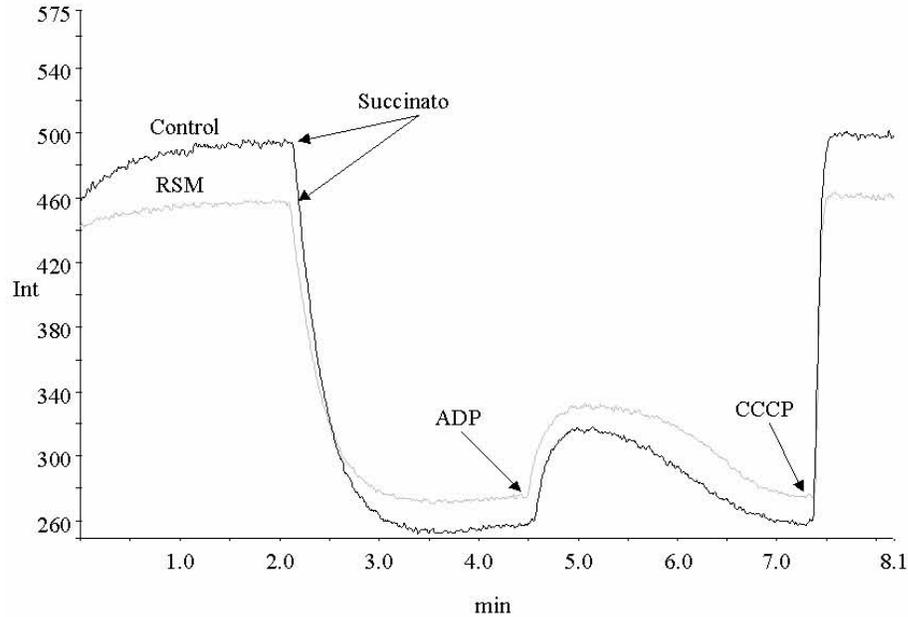


Figura 11. Trazos obtenidos al determinar el potencial membranar mitocondrial por fluorescencia. Utilizando el fluoróforo Rodamina 123, al adicionar succinato 10 mM se forma el potencial, lo cual se refleja en la caída de la curva de fluorescencia. Posteriormente ésta disminuye al adicionar ADP, por el retorno de protones a la matriz mitocondrial a través de la ATP-sintasa durante la síntesis de ATP. Finalmente se adicionó el desacoplante CCCP, con lo cual se abate el potencial y la fluorescencia retorna a su nivel basal.

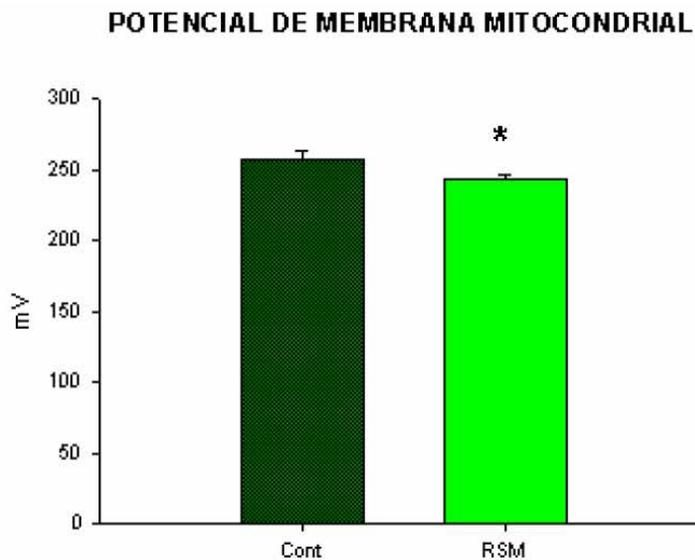


Figura 12. Se graficaron los potenciales obtenidos de mitocondrias de hígado de RSM y ratas control. Hay diferencia entre ambos grupos, siendo menores los potenciales de mitocondrias de RSM. Los resultados se expresan en mV calculados a partir de las UAF aplicando la ecuación de Nernst. * $p < 0.05$. Las barras representan la media \pm DS; $n = 6$.

Efecto del ácido oleico sobre el potencial mitocondrial y generación de H₂O₂

Previamente se encontró que la RSM tiene elevados los AGNE, además de que existen estudios que indican que éstos tienen efectos deletéreos sobre la función mitocondrial: algunos de ellos son capaces de inducir la generación de ERO y colapsar el potencial membranaral mitocondrial. Utilizamos el ácido oleico, que se encontró elevado en este modelo, para determinar su efecto sobre las mitocondrias de hígado de estas ratas. Encontramos que el ácido oleico, a una concentración de 85 μ M, incrementó de manera importante la velocidad de generación de H₂O₂ en los dos tipos de mitocondrias (Fig. 13), pero su efecto fue más significativo sobre las mitocondrias de RSM (Fig. 14).

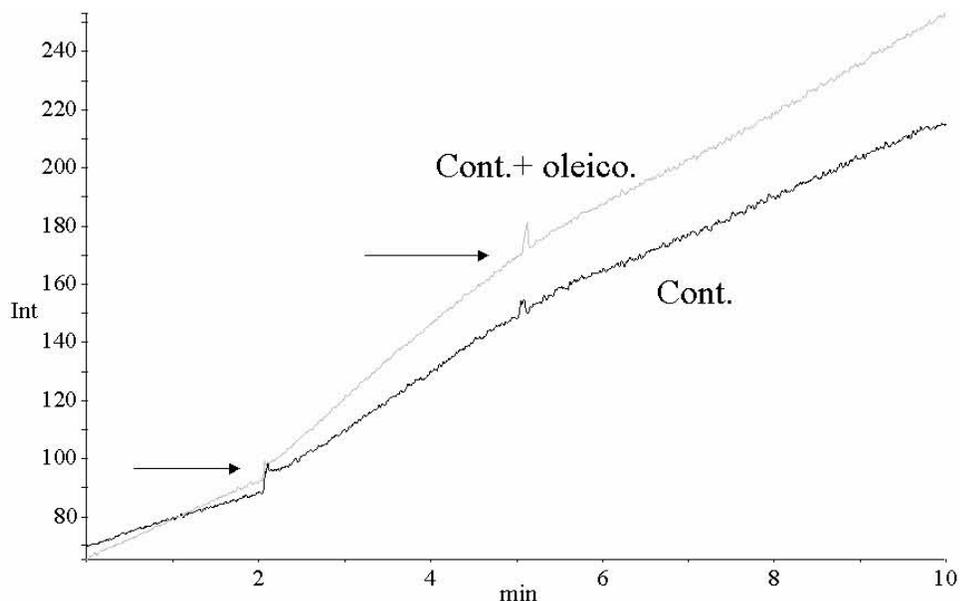


Figura 13. Efecto del ácido oleico sobre la liberación de H₂O₂. Se determinó la velocidad de liberación de H₂O₂ en presencia de 85 μ M de ácido oleico. El experimento es semejante a los que aparecen en la Figura 11, por lo cual las flechas indican las adiciones de succinato a los dos minutos y ADP a los cinco minutos. Se muestra la comparación entre control y control en presencia del ácido oleico. El ácido oleico indujo un incremento en la velocidad de liberación de H₂O₂ en los dos tipos de mitocondrias, lo cual se refleja en el incremento de las pendientes tanto en estado 4, como en estado 3.

Cuando las mitocondrias de hígado del grupo control se exponen al ácido oleico, se incrementa la velocidad de liberación de H_2O_2 de manera apenas significativa, en cambio las mitocondrias de RSM sufren un incremento de más de 50 % (Fig. 14).

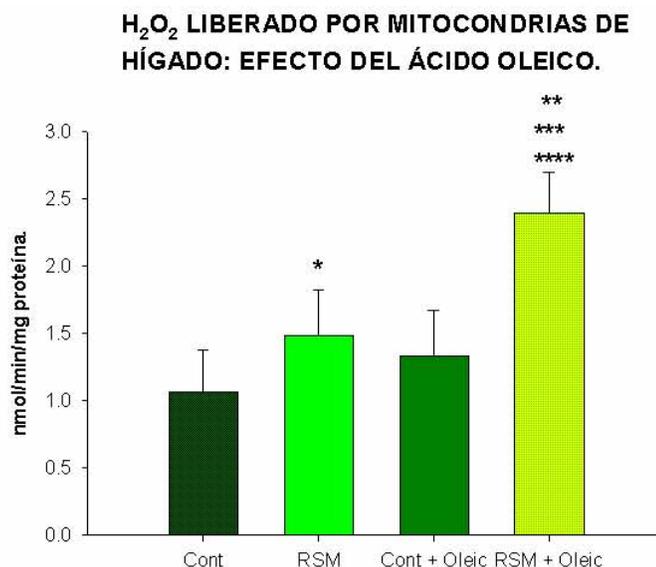


Figura 14. El gráfico muestra la comparación hecha entre las velocidades de liberación de H_2O_2 por mitocondrias de hígado durante el estado 4 de la respiración. Podemos observar que aunque el ácido oleico incrementó esta velocidad en los dos grupos, fue más importante el incremento en el grupo de RSM. *, ** $p < 0.05$ vs Cont, *** $p < 0.0005$ vs RSM, **** $p < 0.005$ vs Cont + Oleico. Las barras representan la media \pm DS; $n = 6$.

Posteriormente se determinó el efecto de este ácido graso sobre el potencial membranar mitocondrial. El potencial fue abatido de manera parcial con concentraciones cercanas a $35 \mu M$, hasta que se colapsa totalmente con $85 \mu M$ (Fig. 15). No se encontró diferencia en el efecto que tiene el ácido oleico sobre el potencial de controles y RSM, lo cual se muestra en la Figura 16.

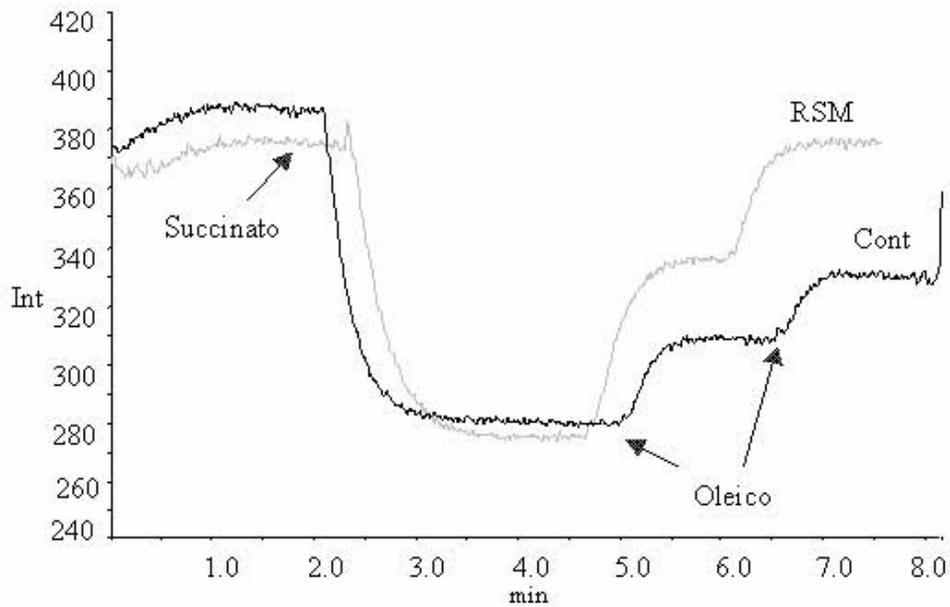


Figura 15. Efecto del ácido oleico sobre el potencial mitocondrial. Los potenciales se determinaron de la manera descrita en la sección de Metodología, utilizando succinato 10 mM como sustrato. Al adicionar ácido oleico observamos que el potencial se abate de manera gradual, dependiendo de la concentración del ácido graso. A la concentración de 85 μM , el ácido oleico abate totalmente el potencial.

Se ha descrito que los AGNE pueden interactuar con algunos de los complejos de la CRM o con el TAN. Con el fin de investigar si el efecto de los AGNE se debe a su interacción con alguna de estas proteínas de la membrana interna mitocondrial, se realizaron experimentos utilizando diferentes inhibidores específicos: rotenona para el complejo I, TTFA para el complejo II, antimicina A para el complejo III y carboxiatractilósido (CAT) para inhibir el TAN.

Los resultados más relevantes de estos experimentos mostraron que el ácido oleico abatió el potencial membranal y que al inhibir el TAN el efecto desacoplante del ácido oleico disminuyó (Fig. 16-A). En lo que respecta a la generación de H_2O_2 , la inhibición del

complejo I con rotenona no indujo diferencia alguna en los dos grupos; sin embargo, el efecto del ácido oleico disminuyó al inhibir el TAN con CAT (Fig. 16-B).

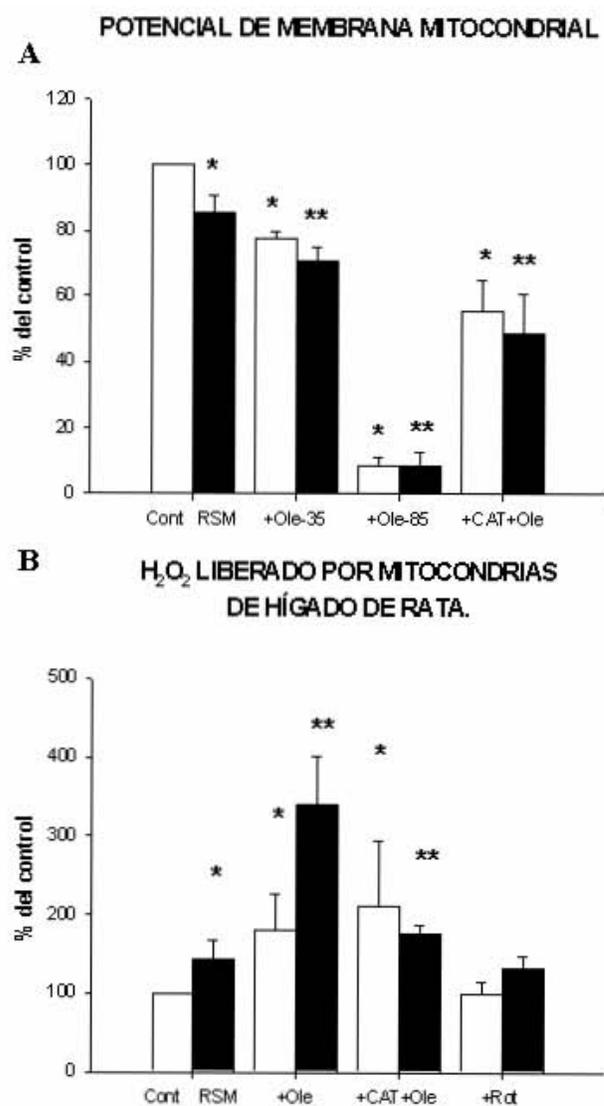


Figura 16. Efecto de diferentes inhibidores sobre el potencial y generación de H₂O₂. La figura muestra el efecto de la inhibición del complejo I con rotenona y del TAN con CAT en la formación del potencial mitocondrial y la liberación de H₂O₂. La inhibición del complejo I provoca un aumento del potencial de manera importante, tanto en controles como en RSM; también encontramos que a mayor concentración de ácido oleico, es menor el potencial formado (35 y 85 μ M) y por otra parte, la inhibición del TAN provoca que disminuya el efecto del ácido oleico sobre el potencial (A). La inhibición del complejo I no afectó la velocidad de liberación de H₂O₂; sin embargo, la inhibición del TAN provocó que disminuyera de manera importante el efecto del ácido oleico (85 μ M) sobre la liberación de H₂O₂ en las RSM (B). * $p < 0.05$ vs Cont, ** $p < 0.05$ vs RSM. Los valores representan la media \pm DS; n = 6.

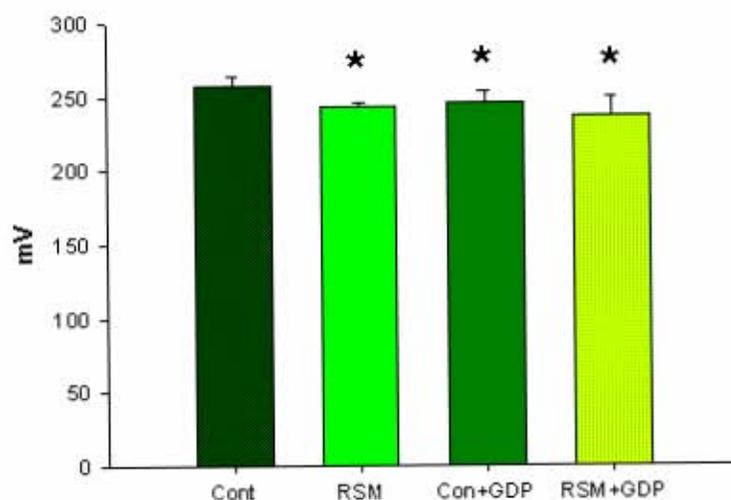
Análisis de UCP-2 en hígado

Se ha descrito que los hepatocitos grasos expresan una proteína desacoplante que no está presente de manera constitutiva, con la finalidad de movilizar los AGNE acumulados en la matriz mitocondrial y disminuir la generación de ERO al reducir el potencial de membrana mitocondrial, por lo que analizamos la expresión de UCP-2 en las mitocondrias de hígado, la cual se activa por los AGNE a bajas concentraciones y se inhibe por GDP.

Inicialmente se midió el potencial mitocondrial en presencia de GDP 40 mM para tratar de evidenciar la presencia de la proteína funcional. Los resultados muestran que el potencial disminuyó en el grupo control por efecto del inhibidor, mientras que el grupo de RSM permanece sin cambios (Fig. 19) mientras que la generación de H₂O₂ también se incrementó en el grupo control (Fig. 19) sin mostrar efecto en el grupo RSM.

Para determinar si la proteína estaba presente en las mitocondrias de hígado, utilizamos Western Blot para evidenciarla estructuralmente. Los resultados nos muestran que en las RSM existe una mayor expresión de esta proteína que los animales controles. La Figura 17 muestra el resultado de un Western Blot, donde se aprecia que las bandas correspondientes a las muestras de RSM son más intensas que los controles (A) también se observa el resultado del análisis densitométrico (B) donde la media de RSM es mayor que los controles, aunque no alcanza significancia estadística y un gel teñido con Coumassie como control de la carga de proteína (C).

POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL: EFECTO DEL GDP



H₂O₂ liberado por mitocondrias: Efecto del GDP

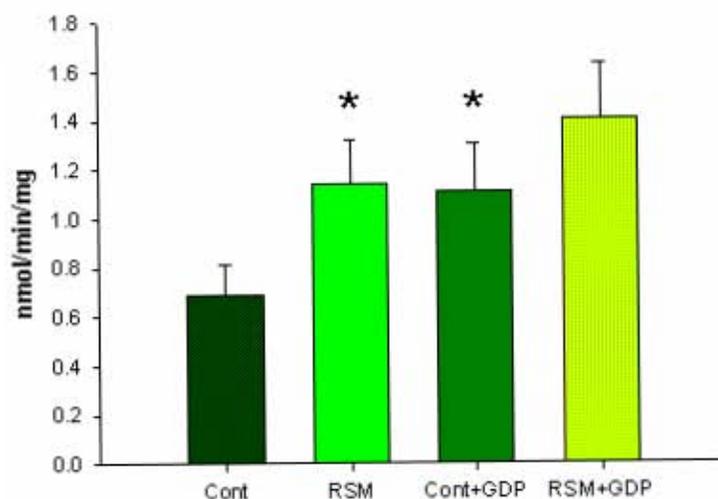


Figura 17. Efecto de GDP sobre el potencial de membrana mitocondrial y la generación de H₂O₂. Se utilizó GDP 40 mM, con lo cual se encontró que tanto el potencial control como en RSM disminuyeron en comparación con el control sin GDP, mientras que la generación de H₂O₂ aumentó sólo en el grupo control, permaneciendo sin cambio en el grupo RSM. * p < 0.5 vs Control, ** p < 0.5 vs Cont + GDP, n = 5.

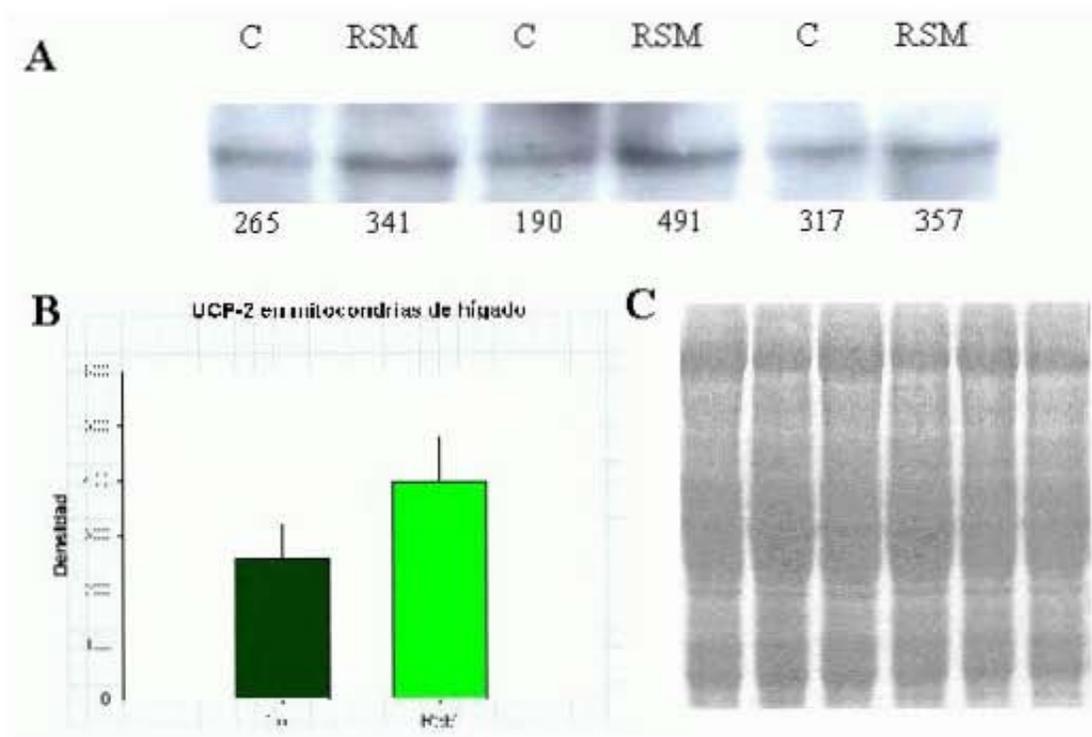


Figura 18. Expresión de UCP-2 en hígado. Se realizó el Western-Blot utilizando un anticuerpo policlonal contra la UCP-2, como se describió anteriormente. Las bandas que se muestran corresponden al peso molecular de la proteína (~34 kD). Las intensidades de las bandas en las muestras de controles son menores que las correspondientes a RSM (A), los números representan las intensidades determinadas para cada banda. En “B” se muestra el gráfico de barras para las intensidades: aunque los valores medios son diferentes, no son estadísticamente significativos (n=3). Se depositó la misma cantidad de proteína mitocondrial en los gels desnaturizantes, como se aprecia en un gel teñido por Coomassie (C).

Efecto del suplemento de vitamina E sobre el estrés oxidativo

Se mencionó anteriormente que las RSM tienen niveles menores de vitamina E en suero y mitocondrias de hígado, por lo que se les suministró un suplemento de este antioxidante (200 U/Kg de alimento vs 44 U/Kg que contiene el alimento comercial) durante tres semanas para investigar cuánto puede influir la disminución en los niveles de

antioxidantes sobre el estrés oxidativo desarrollado, después de lo cual se midieron algunas de las variables que se refieren al EO.

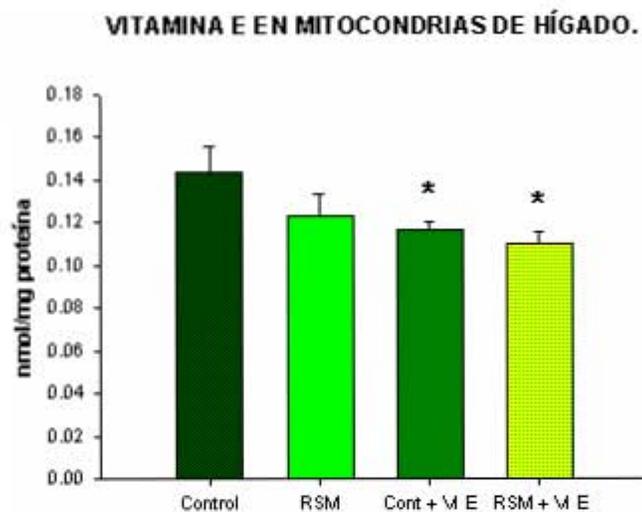


Figura 19. Concentración de vitamina E en mitocondrias de hígado. La figura muestra las concentraciones de vitamina que se encontraron en los grupos de ratas que recibieron el suplemento del mismo antioxidante. Las determinaciones se hicieron por HPLC, como se describe en la sección de Metodología. Los valores representan la media \pm DS. * $p < 0.05$ vs control; $n = 6$.

Encontramos que la vitamina E no se acumuló en el tejido, por el contrario, disminuyó en las mitocondrias de los animales que recibieron el suplemento, tanto en los controles como en las RSM (Fig. 17); a pesar de lo cual el MDA determinado en suero disminuyó de manera importante en los animales que recibieron el suplemento, tanto controles como RSM (Fig. 18-A). Sin embargo, no ocurrió lo mismo con la generación mitocondrial de H_2O_2 , que no mostró cambio alguno en respuesta al suplemento del antioxidante (Fig. 18-B).

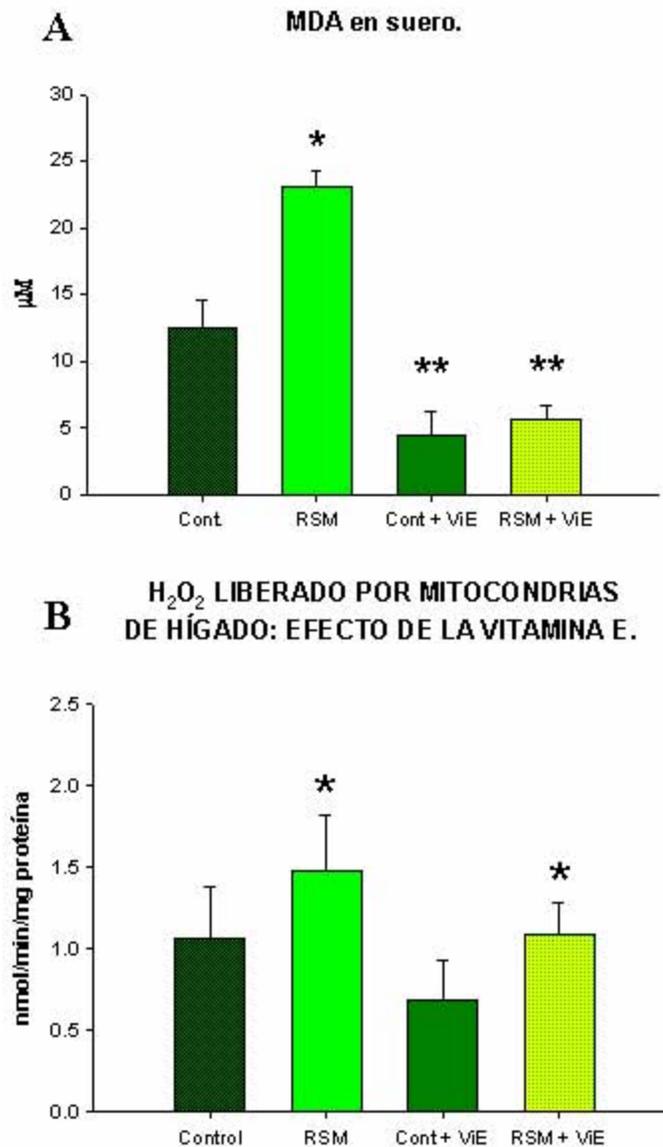


Figura 20. MDA en los sueros y H₂O₂ liberado por las mitocondrias de hígado. Se midieron estas variables en muestras de las ratas que recibieron el suplemento dietético de vitamina E. El MDA disminuyó de manera notable tanto en los controles como en la RSM después de tres semanas de consumo del antioxidante (A), mientras que el H₂O₂ liberado no mostró cambio alguno en el grupo control pero disminuyó de manera significativa en el grupo de RSM (B). Los valores representan la media \pm DS.* $p < 0.005$ vs Control, ** $p < 0.005$ vs RSM en A y * $p < 0.05$ vs Cont en B; $n = 6$.

Por otra parte, se determinó la actividad de las enzimas antioxidantes y encontramos que las RSM que recibieron el suplemento alimenticio presentaron una disminución en las

actividades de las tres enzimas con respecto al grupo control que no recibió el suplemento (Tabla V), además de otras diferencias tales como la disminución de la actividad de GPx en comparación con el grupo control que recibió vitamina E y una disminución en la actividad de SOD comparada con la de RSM sin vitamina E.

Tabla V. Actividad de enzimas antioxidantes.

	Control	RSM	Cont. + Vit E	RSM + Vit E
Catalasa	477.6 ± 22.7	453.0 ± 7.6	439.7 ± 47.8	395.0 ± 50.5 *
GPx	68.7 ± 6.6	56.9 ± 8.0	57.4 ± 21.2	36.8 ± 3.0 *, **
SODm	27.8 ± 5.6	21.9 ± 2.4	24.6 ± 3.8	18.5 ± 0.8 *, ***

Las actividades enzimáticas de GPx y SOD se determinaron en mitocondrias y la actividad de catalasa en citosol. Se indican en U/mg proteína. Los valores representan la media ± DS.* p < 0.05 vs Control, ** p < 0.05 vs Cont. + Vit E, *** p < 0.01 vs RSM; n = 6.

7. Discusión

El síndrome metabólico

El consumo de una dieta alta en carbohidratos y/o grasas induce acumulación de la grasa predominantemente en la cavidad intra-abdominal que se asocia frecuentemente con alteraciones en el metabolismo de los lípidos y de la glucosa, con la hiperinsulinemia y con hipertensión ⁸⁸⁻⁹⁰, como se ha encontrado en nuestro modelo de síndrome metabólico.

El mecanismo por el cual se incrementa la masa del tejido adiposo está bien descrito en la literatura ⁹¹. El tejido adiposo obtiene la mayor parte de sus ácidos grasos a partir de su liberación del hígado o de los provenientes de la dieta. Los ácidos grasos son activados mediante la formación del correspondiente acil-CoA y a continuación son esterificados con el glicerol-3-fosfato a triacilglicerol para ser almacenados ⁹². El glicerol-3-fosfato se genera a partir de la reducción de la dihidroxiacetona la cual aumenta durante la glucólisis.

Los adipocitos tienen un sistema de lipólisis y uno de lipogénesis que están continuamente activos. Estas dos reacciones son diferentes y utilizan diferentes reactivos y sustratos. Sin embargo, el tejido adiposo no es únicamente un depósito pasivo de la grasa. De hecho, después del hígado, el tejido adiposo es el más importante en el mantenimiento de la homeostasis metabólica. Muchos de los factores nutritivos, metabólicos y hormonales que regulan el metabolismo del tejido adiposo actúan ya sea sobre el proceso de la lipólisis o de la lipogénesis. En los procesos de la lipólisis, la lipasa hormono-sensible (LHS) es la enzima limitante en la liberación de los ácidos grasos a partir del tejido adiposo. Esta enzima es susceptible a la fosforilación y a la desfosforilación en respuesta a los niveles del

AMPc controlado hormonalmente⁹³. La fosforilación activa la LHS estimulando la lipólisis en el tejido adiposo, elevando la concentración de los ácidos grasos no esterificados (AGNE) circulantes y finalmente activando la ruta de la β -oxidación en otros tejidos u órganos, tales como el hígado y el músculo esquelético⁹⁴. En el caso de una dieta rica en carbohidratos, los niveles altos de la insulina secretada en respuesta a concentraciones elevadas de glucosa en la sangre disminuyen los niveles de AMPc. Esta situación conduce a la desfosforilación de la lipasa hormono-sensible y por tanto a su inactivación, inhibiendo la liberación de los ácidos grasos para la oxidación. En el caso de resistencia a la insulina, la LHS es insensible a la inhibición por la insulina y por consecuencia se observa un aumento en la concentración de los AGNE circulantes.

En las RSM; aunado con la acumulación de grasa intraabdominal, hay un aumento en la concentración de los AGNE y de los triglicéridos circulantes, tanto en el hígado como en las mitocondrias. Un aumento en el flujo de los AGNE del tejido adiposo a los tejidos no adiposos puede participar en la amplificación de las anomalías metabólicas que son características del síndrome de resistencia a la insulina y la diabetes tipo II⁹⁵. Los mecanismos bioquímicos precisos por medio de los cuales los AGNE y los triglicéridos del citosol ejercen sus efectos no están completamente claros.

Esteatosis hepática en las RSM

En trabajos anteriores se han investigado los trastornos cardiovasculares que presentan las RSM^{74, 75}, pero el efecto que puede tener la obesidad sobre la función del hígado no se ha explorado.

Uno de los principales trastornos que asocian a la obesidad con la esteatosis hepática es la resistencia a la insulina ⁴⁸. Las RSM tienen niveles elevados de insulina de manera importante, lo cual puede ser reflejo de la resistencia (Tabla II), por otra parte, detectamos niveles elevados de algunos AGNE tales como el ácido palmítico que es el primer producto de la síntesis de novo de ácidos grasos en el hígado. El ácido palmitoleico, producto de la desaturación del palmítico por la $\Delta 9$ desaturasa ⁹⁶ también se encuentra incrementado, al igual que el siguiente producto de la lipogénesis, el ácido esteárico. Estos resultados nos indican que la lipogénesis está incrementada en el hígado y puede ser causante de la esteatosis detectada en este órgano.

El análisis histoquímico de los cortes de hígado por tinciones con rojo oleoso muestra una importante acumulación de grasa (Fig. 10), lo cual puede deberse al efecto de la hiperinsulinemia, que incrementa la lipogénesis y la acumulación de grasa en el órgano, como se explicó arriba (Fig. 4).

Participación de la mitocondria en el desarrollo de estrés oxidativo en las RSM

La función mitocondrial se evaluó por el consumo de oxígeno, usando succinato como sustrato oxidativo y por el control respiratorio y el ADP/O. Básicamente no existen diferencias en estas variables (Tabla V), probablemente debido a que la preparación de las mismas, por centrifugación diferencial, implica una selección de las mitocondrias que se encuentran íntegras, mientras que las más dañadas no soportan el proceso de preparación y son descartadas, además de que al lavar las mitocondrias con albúmina al 0.1 % se eliminan

los ácidos grasos que tienen acumulados, lo cual puede estar alterando el funcionamiento de las mitocondrias *in vivo*.

Independientemente de las variables respiratorias, las mitocondrias de hígado de RSM liberaron H_2O_2 a mayor velocidad que los controles. Durante el funcionamiento de la CRM se lleva a cabo la reducción univalente del O_2 dando como resultado la formación de $O_2^{\cdot-}$. Se ha identificado a la interfase entre el ciclo Q y el complejo III como un sitio de formación de $O_2^{\cdot-}$ ⁶ y también el complejo I al ceder electrones directamente al O_2 ^{7,8}. Del oxígeno total consumido por la mitocondria, del 2 al 4% es convertido normalmente a $O_2^{\cdot-}$. En las mitocondrias de RSM este porcentaje parece aumentar significativamente. Esta variación puede atribuirse a diferentes factores tales como: la cantidad de CoQ_9 que se encuentra incrementada, al potencial membranar que influye sobre la cantidad del superóxido formado por los complejos respiratorios, por el exceso de los AGNE que desacoplan la mitocondria o por cambios en las defensas antioxidantes mitocondriales.

El ciclo Q

Las CoQ son transportadores móviles de electrones a través de la CRM, toman los electrones de los complejos I y II y los ceden al complejo III (Fig. 1). Las ratas tienen en su mayoría CoQ_9 , la cual encontramos incrementada de manera significativa en las RSM (Tabla IV) y podría influir en que se liberen más ERO a partir de las mitocondrias ⁹⁷ a pesar de que se sabe que tiene una acción antioxidante ⁹⁸.

Esta coenzima puede ser reducida por los complejos I y II al aceptar dos electrones. Posteriormente los cede al complejo III por un mecanismo conocido como ciclo Q en el cual

cede uno de los electrones a la proteína de Rieske, quedando en la forma de radical semiquinona (Fig. 22). Esta especie es la que tiene la capacidad de reducir parcialmente al oxígeno molecular para formar superóxido. Normalmente el segundo electrón es cedido a uno de los citocromo b del complejo III y la CoQ queda totalmente oxidada y lista para iniciar un nuevo ciclo, pero si existe más CoQ, como ocurre en este caso, puede encontrarse una mayor cantidad como semiquinona y ceder el electrón libre al oxígeno con lo que se induce la formación de ERO ⁹⁹.

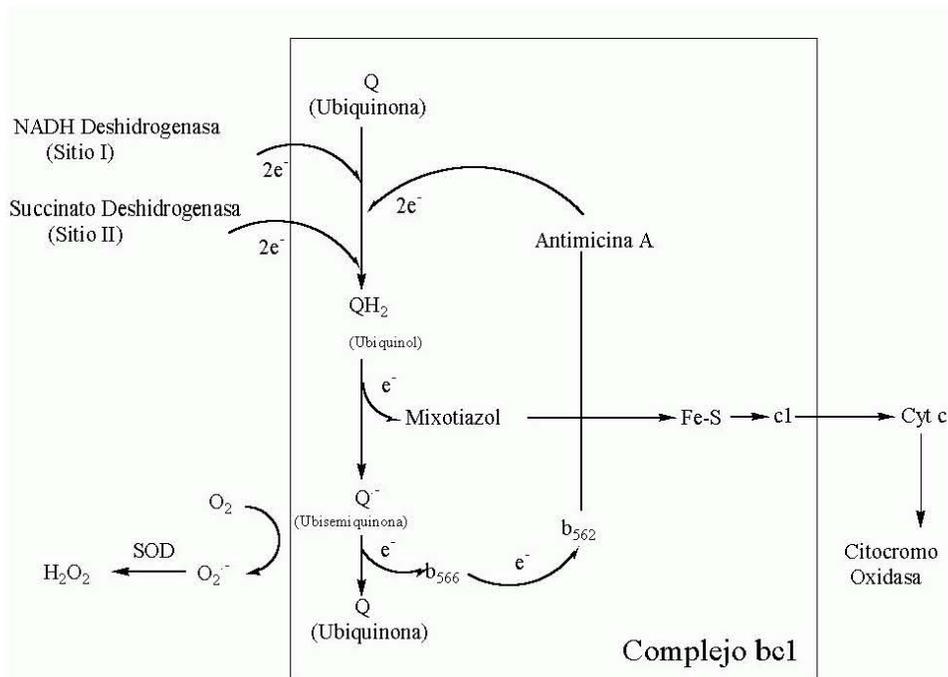


Figura. 22. Ciclo Q. El esquema muestra el mecanismo a través del cual la CoQ puede participar en la formación de ERO cuando se encuentra como radical ubisemiquinona y cede un electrón directamente al O_2 . Se indican los sitios de inhibición de dos inhibidores clásicos: antimicina y mixotiazol. (Modificado de Duranteau J. J Biol Chem, 1998).

Potencial membranaral

Durante el estado 4, la liberación de H_2O_2 a mayor velocidad está asociada con un mayor potencial mitocondrial, por lo que resultó desconcertante que los potenciales de las mitocondrias de RSM fueran menores que los controles (Fig. 14).

Una de las posibles causas de que el potencial sea menor es la expresión de la UCP-2. Los resultados de nuestros experimentos para tratar de evidenciar funcionalmente la presencia de esta proteína (inhibiéndola) no proporcionaron información clara. Por otra parte, se ha reportado que la UCP-2, a diferencia de la UCP-1, es insensible a la inhibición por GDP^{100, 101}, lo cual explicaría que no responda a este nucleótido de la manera esperada.

Para evidenciar la presencia de la UCP-2 estructuralmente, utilizamos un ensayo de Western Blot en muestras de hígado de las ratas y encontramos una señal positiva que corresponde a su peso molecular. Esta señal es mayor en la RSM que en controles, lo cual indica que se está sobreexpresando como respuesta al exceso de grasa (ya que los AGNE inducen la expresión de esta proteína) y al estrés oxidativo, como se ha reportado anteriormente^{56, 64}. No obstante, estos resultados deben ser corroborados, ya que las células no parenquimales expresan UCP-2 de forma constitutiva y en este trabajo no se hizo una discriminación entre estas células y los hepatocitos, por lo que podríamos estar describiendo una sobreexpresión de la proteína en las células no parenquimales y no en los hepatocitos. Esta observación se refuerza por la aparición de la banda en las muestras de animales control (Fig. 21).

Efecto de los ácidos grasos sobre la generación mitocondrial de H₂O₂

En el homogeneizado de hígado de las RSM, los niveles de AGNE tales como ácido palmítico, palmitoleico, esteárico y oleico se encuentran incrementados. Se sabe que este tipo de AGNE desacopla la fosforilación oxidativa e induce una sobreproducción de H₂O₂⁵⁴, por lo que medimos esta variable en presencia de ácido oleico.

Las mitocondrias liberan H₂O₂ a mayor velocidad en presencia del ácido oleico (85 μM), tanto en mitocondrias control como en mitocondrias de RSM, aunque el efecto es más notable en estas últimas (Fig. 16). El ácido oleico también abate el potencial mitocondrial, a concentraciones menores que la que induce mayor liberación de H₂O₂ (Fig. 17 y 18-A). Esta diferencia se explica por la presencia de ASB en el medio de reacción para la determinación de H₂O₂, a diferencia de la determinación del potencial, la cual acompleja al ácido graso y disminuye la concentración disponible que interactuaría con las mitocondrias.

Participación del TAN en el efecto del ácido oleico sobre la mitocondria. Está descrito que los AGNE producen su efecto desacoplante por el transporte inespecífico de protones del espacio intermembranal hacia la matriz a través de la membrana interna, después de lo cual retornan por intermedio de proteínas acarreadoras, tales como el TAN. Los experimentos realizados en presencia de carboxiatractilósido (CAT), que es un inhibidor del TAN, para conocer si puede participar en el EO de las RSM muestran que el efecto del ácido oleico, tanto sobre el potencial como en la liberación de H₂O₂, disminuyó de manera significativa (Fig. 18). Como se mencionó arriba, los AGNE pueden utilizar al TAN para retornar al espacio intermembranal y acarrear otro protón a través de la membrana interna. Al inhibir esta proteína, se evitaría el reciclaje de los AGNE para

efectuar un nuevo ciclo de acarreo de protones y se quedarían en el interior de la matriz mitocondrial (Fig. 22). Este efecto es parcial, pero ilustra muy bien la participación del acarreador y deja abierta la posibilidad de la participación de otros componentes tales como la UCP-2 y el intercambiador aspartato/glutamato ¹⁰².

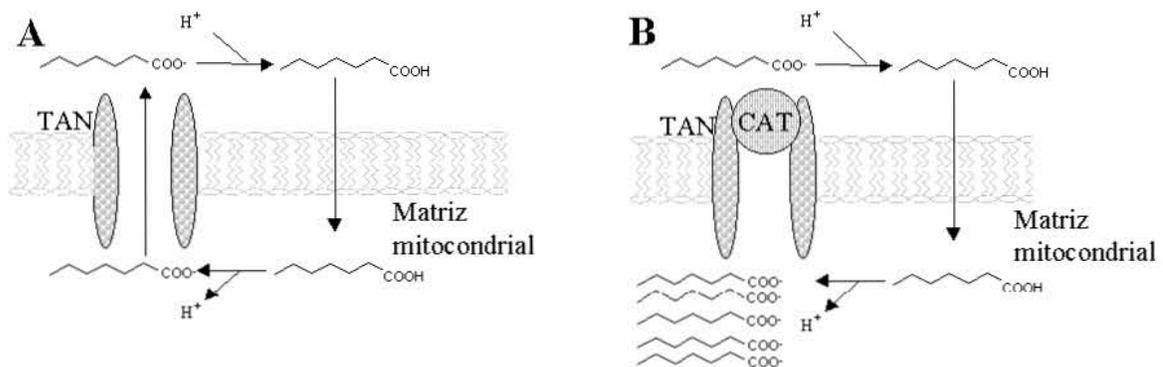


Figura 21. Efecto del carboxiatractilósido sobre el TAN. En el recuadro A se muestra el mecanismo propuesto para el acarreo de protones por los AGNE a través de la membrana interna mitocondrial y la forma en que retornan al espacio intermembranal a través del TAN para continuar así su efecto desacoplante. Al inhibir el TAN con CAT (B), se evita el retorno de los AGNE al espacio intermembranal y se pueden acumular en la matriz, reduciendo su efecto de acarreadores de protones, aunque en la membrana existen otros transportadores como el intercambiador de aspartato/glutamato y las UCP que pueden realizar la misma función.

Actividad antioxidante mitocondrial

Enzimas antioxidantes. Además de una función mitocondrial anómala, existen otras alteraciones que pueden inducir estrés oxidativo, tales como una actividad de enzimas antioxidantes modificada o la disminución de los antioxidantes no enzimáticos. Para analizar estas posibilidades medimos actividades de las enzimas antioxidantes GPx, SODm y catalasa. Los resultados demuestran que no son modificaciones en la actividad de las

enzimas antioxidantes lo que propició el EO de las RSM, ya que se detectó la misma actividad que en animales control (Tabla IV) ^{103, 104}. Estos resultados difieren de los encontrados con anterioridad en el hígado graso de ratones genéticamente obesos ³⁷, donde se observaron cambios en la actividad de estas mismas enzimas.

Antioxidantes no enzimáticos. En un estudio previo ⁷⁶ detectamos bajos niveles de vitamina E, lo cual se repitió en este trabajo (Tabla IV), aunque la diferencia no resultó significativa debido a una desviación muy grande. La vitamina E es un antioxidante muy importante, ya que se encuentra embebido en las membranas y las protege de lipoperoxidación, por lo que puede ser determinante en el EO. El MDA que encontramos aumentado en las RSM, es un producto de la lipoperoxidación en membranas, por lo tanto, con una menor cantidad de vitamina E las membranas son más susceptibles al daño oxidativo y se podría desarrollar EO aún cuando no esté incrementada la producción de ERO.

Extrañamente, el glutatión, que es uno de los sistemas antioxidantes más importantes para la célula ¹⁰⁵, no mostró diferencia entre los dos grupos. Probablemente existe, pero no lo detectamos debido a que con nuestra técnica sólo se identifica el glutatión reducido y no el glutatión oxidado.

Suplemento alimenticio de vitamina E

Para tratar de compensar la disminución en la vitamina E que desarrollan las RSM, se les administró un suplemento de esta vitamina en el alimento por un período de tres semanas. Como respuesta al tratamiento, disminuyó el MDA (Fig. 20-A) al igual que las actividades de las enzimas antioxidantes (Tabla V), lo cual refleja el efecto protector de la vitamina E que induce incluso que disminuyan otras defensas como las enzimáticas. Sin embargo, no disminuyó la velocidad de generación de H_2O_2 por las mitocondrias (Fig. 20-B), lo que se correlaciona con el hecho de que tampoco se incrementó la cantidad de vitamina E en las mitocondrias (Fig. 19). Estos resultados nos sugieren que a pesar de que la compensación de la vitamina E en las RSM puede detener el daño oxidativo, no se corrigió el efecto que tiene el síndrome metabólico sobre el metabolismo mitocondrial; aunque en otros estudios en los cuales se dieron dosis mayores del antioxidante por períodos de hasta 15 semanas, se observó una disminución de la generación mitocondrial de H_2O_2 ⁴.

Nuestros resultados sugieren que las RSM desarrollan hígado graso como consecuencia del incremento en la lipogénesis. El hígado graso presenta EO debido a una mayor generación de ERO por la CRM, lo cual puede ser inducido por el incremento en los AGNE y sus efectos deletéreos sobre el metabolismo mitocondrial, aunque también en parte puede deberse a una deficiencia de vitamina E y al incremento en la CoQ_9 .

En general, no se encontraron cambios espectaculares, aunque sí significativos con respecto al estrés oxidativo en hígado de RSM, sin embargo, hay que considerar que estas ratas se encuentran en un proceso crónico degenerativo que se intensifica con la edad y los animales que utilizamos aún son jóvenes (menos de 7 meses de edad con 6 de tratamiento). Ya se han comenzado a explorar los efectos del envejecimiento en períodos mayores de

tiempo y se ha observado que los efectos se acentúan con la edad y la duración del tratamiento¹⁰⁴.

8. Conclusiones

- La dieta alta en sacarosa induce esteatosis hepática en la RSM.
- Las mitocondrias de hígado de RSM liberan H_2O_2 a una mayor velocidad que las de ratas control.
- El estrés oxidativo en hígado de la RSM es debido a una deficiencia en vitamina E, además del metabolismo anómalo de las mitocondrias, inducido por la acumulación de grasa en el órgano.
- Las mitocondrias de hígado de RSM son más susceptibles a los efectos del ácido oleico sobre la velocidad de liberación de H_2O_2 debido, probablemente, a la exposición crónica.
- El TAN juega un papel importante en los efectos del ácido oleico sobre la velocidad de liberación de H_2O_2 y la formación del potencial mitocondrial.
- Existe una respuesta contra el estrés oxidativo que se refleja en el incremento de CoQ₉ y la sobreexpresión de UCP-2 en el hígado, pero no en la actividad de las enzimas antioxidantes.
- El suplemento alimenticio de vitamina E reduce el daño oxidativo, pero no disminuye la velocidad de liberación de H_2O_2 por las mitocondrias.

9. Bibliografía

1. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003; 552: 335-344.
2. Knight JA. Free radicals, antioxidants, aging & disease. Washington: AACCC Press; 1999. p 21-43.
3. Beckman K, Ames B. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*. 1998; 78: 547-581.
4. Chow CK, Ibrahim W, Wei Z, Chan AC. Vitamin E regulates mitochondrial hydrogen peroxide generation. *Free Radic Biol Med*. 1999; 27: 580-587.
5. Staniek K, Nohl H. Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species?. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1460: 268-275.
6. St-Pierre J, Buckingham J, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem*. 2002; 277: 44784-44790.
7. Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J*. 2002; 368: 545-553.
8. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Usumi H, Kang D, Hattori N, Uchida K. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res*. 1999; 85: 357-363.
9. Nicholls DG. Bioenergética: Introducción a la teoría quimiosmótica. Editorial Reverté S.A. Barcelona, 1987. Pp. 71-135.

10. Noji H, Yoshida M. The rotatory machine in the cell, ATP synthase. *J Biol Chem.* 2001; 276: 1665-1668.
11. Davidson J, Schiestl R. Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 2001; 21: 8483-8489.
12. Piña-Garza E, Huberman A, Chávez R, Lascurain R, Zenteno E, Piña E, Frenk S. Radicales libres. Beneficios y problemas. *Gac Méd Mex.* 1996; 132: 183-203.
13. Beal MF. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol* 2005; 58: 495-505
14. Burczynski J, Southard S, Haynes JR, Longhust PA, Colby HD. Changes in mitochondrial and microsomal lipid peroxidation and fatty acid profiles in adrenal glands, testes and livers from α -tocopherol-deficient rats. *Free Radic Biol Med.* 2001; 30: 1029-1035.
15. Boveris A, Cadenas E, Stoppani A. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 1976; 156: 435-444.
16. Hsiao G, Teng CM, Sheu JR, Cheng YW, Lam KK, Lee YM, Wu TS, Yen MH. Cinnamophilin as a novel antiperoxidative cytoprotectant and free radical scavenger. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1525: 77-88.
17. Motchnik PA, Frei B, Ames BN. Measurement of antioxidants in human blood plasma. *Methods Enzymol.* 1994; 234: 269-279.
18. Nicoletti UG, Marino UM, Cuppari C, Licciardello D, Patti D, Purello VS, Stella AM. Effect of antioxidant diets on mitochondrial gene expression in rat brain during aging. *Neurochem Res.* 2005; 30: 737-752.

19. Houston MC. Nutraceuticals, vitamins, antioxidants and minerals in the prevention and treatment of hypertension. *Prog Cardiovasc Dis.* 2005; 47: 396-449.
20. Jaxa-Chamiec T, Bednarz B, Drozdowska D, Gessek J, Gniot J, Janik K, Kawka-Urbaneck T, et al. Antioxidant effects of combined vitamins C and E in acute myocardial infarction. The randomized, double-blind, placebo-controlled, Multicenter pilot Myocardial Infarction and VITamins (MIVIT) trial. *Kardiol Pol.* 2005; 62: 344-350.
21. Kris-Etherton PM, Lichtenstein AH, Howard BV, Steinberg D, Witztum JL. Antioxidant vitamin supplements and cardiovascular disease. *Circulation.* 2004; 110: 637-641.
22. Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, Utsumi H, Hamasaki N, Takeshita A. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res.* 2001; 88: 529-535.
23. Bohr VA. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32: 804-812.
24. Young I, Woodside J. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.* 2001; 54: 176-186.
25. Morante M. Estudio del estrés oxidativo hepático en un modelo *in vivo* de deficiencia de vitamina E. Papel de NF- κ B en la regulación de los genes de la γ -glutamilcisteína sintetasa y genes implicados en el control del ciclo celular. Tesis doctoral. Universidad de Valencia. Valencia, España. 2004.
26. Lapenna D, Ciofani G, Pierdomenico SD, Giamberardino MA, Cuccurullo F. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31: 331-335.

27. Carbonneau MA, Peuchant E, Sess D, Cannioni P, Clerc M. Free and bound malondialdehyde measured as tiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma. *Clin Chem.* 1991; 37: 1423-1429.
28. Budd S, Castilho R, Nicholls D. Mitochondrial membrane potential and hydroethidine-monitored superoxide generation in cultured cerebellar granule cells. *FEBS Letters.* 1997; 415: 21-24.
29. Rembish J, Trush A. Further evidence that lucigenin-derived chemiluminescence monitors mitochondrial superoxide generation in rat alveolar macrophages. *Free Radic Biol Med.* 1994; 17: 117-126.
30. Hampel S, Buettner G, Wessels O, Flaherty. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-Dichlorodihydro fluorescein diacetate, 5 (and 6)-Carboxy-2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27: 146-159.
31. Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondria as regulator of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1366: 151-165.
32. Sánchez-Rodríguez MA, Mendoza-Núñez VM. Envejecimiento, enfermedades crónicas y antioxidantes. México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2003. p 32-51.
33. Carlsson C, Hakan Borg LA, Welsh N. Sodium palmitate induces partial mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species in rat pancreatic islets in vivo. *Endocrinology.* 1999; 140: 3422-3428.
34. Marín-García J, Goldenthal MJ. La mitocondria y el corazón. *Rev Esp Cardiol.* 2002; 55: 1293-1310.
35. Duchon MR. Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes.* 2004; 53: S96-

S102.

36. Yang S, Zhu H, Li Y, Lin H, Gabrielson K, Trush M A, Diehl AM. Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress. *Arch Biochem Biophys*. 2000; 378: 259-268.
37. Higdon J, Frei B. Obesity and oxidative stress. A direct link to CVD?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 365-367.
38. Dobrian A, Davies M, Schriver S, Lauterio T J, Prewitt R L. Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension. *Hypertension*. 2001; 37: 554-560.
39. Keaney J, Larson M, Vasani R, Wilson P W, Lipinska I, Corey D, Massaro JM, Sutherland P, Vita JA, Benjamin EJ. Obesity and systemic oxidative stress. Clinical correlates of oxidative stress in the Framingham study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 434-439.
40. McBride A G, Borutaité V, Brown G C. Superoxide dismutase and hydrogen peroxide cause rapid nitric oxide breakdown, peroxynitrite production and subsequent cell death. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1454: 275-288.
41. Fenster C, Weinsier R, Darley-Usmar V, Patel RP. Obesity, aerobic exercise and vascular disease: the role of oxidant stress. *Obes Res*. 2002; 10: 964-968.
42. Bakker SJ, IJzerman RG, Teerlink T, Westerhoff HV, Gans RO, Heine RJ. Cytosolic triglycerides and oxidative stress in central obesity: the missing link between excessive atherosclerosis, endothelial dysfunction, and beta-cell failure? *Atherosclerosis*. 2000; 148:17-21.
43. Perticone F, Ceravolo R, Candigliota M, Ventura G, Iacopino S, Sinopoli F, Mattioli PL. Obesity and body fat distribution induce endothelial dysfunction by oxidative stress.

- Diabetes. 2001; 50: 159-165.
44. Morrow J. Is oxidant stress a connection between obesity and atherosclerosis?.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003; 23: 368-370.
45. Libby P, Ridker P, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. Circulation. 2002; 105: 1135-1143.
46. Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis V.
Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.
2002; 282: G193-G199.
47. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. J
Clin Invest. 2004; 114: 147-152.
48. Naagai Y, Nishio Y, Nakamura T, Maegawa H, Kikkawa R, Kashiwagi A. Amelioration
of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPAR α . Am J
Physiol Endocrinol Metab. 2002; 282: E1180-E1190.
49. F erez S, Lupi H. El comportamiento del miocardio en la isquemia y la reperfusión.
Madrid: Elsevier; 2004. p. 118-123.
50. Cocco T, Di Paola M, Minuto M, Carlino V, Papa S, Lorusso M. Steady-state proton
translocation in bovine heart mitochondria bc1 complex reconstituted into liposomes. J
Bioenerg Biomembr. 1997; 29: 81-87.
51. Andreyev A, Bondareva TO, Dedukhova VI, Mokhova EN, Skulachev VP, Tsofina LM.
The ATP/ADP-antiporter is involved in the uncoupling effect of fatty acids on
mitochondria. Eur J Biochem. 1989; 182: 585-592.
52. Samartsev V, Smirnov A, Zeldi I P, Markova O V, Mokhova E N, Skulachev V P.
Involvement of aspartate/glutamate antiporter in fatty acid-induced uncoupling of liver
mitochondria. Biochim Biophys Acta. 1997; 1319: 251-257.

53. Hillered L, Chan PH. Role of arachidonic acid and other free fatty acids in mitochondrial dysfunction in brain ischemia. *J Neurosci Res.* 1988; 20: 451-456.
54. Cocco T, Di Paola M, Papa S, Lorusso M. Arachidonic acid interaction with the mitochondrial electron transport chain promotes reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27: 51-59.
55. Koshkin V, Wang X, Scherer PE, Chan CB, Wheeler MB. Mitochondrial functional state in clonal pancreatic B-cells exposed to free fatty acids. *J Biol Chem.* 2003; 278:19709-19715.
56. Nicholls DG, Bernson US, Heaton GM. The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation. *Experientia Suppl.* 1978; 32: 89-93.
57. Boss O, Hagen T, Lowell BB. Uncoupling proteins 2 and 3 potential regulators of mitochondrial energy metabolism. *Diabetes.* 2000; 49: 143-156.
58. Boss O, Muzzin P, Giacobino JP. The uncoupling proteins, a review. *Eur J Endocrinol.* 1998; 139: 1-9.
59. Schrauwen P, Hesselink M. UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism. *J Exp Biol.* 2002; 205: 2275-2285.
60. Schrauwen P, Saris W, Hesselink MK. An alternative function for human uncoupling protein 3: protection of mitochondria against accumulation of nonesterified fatty acids inside the mitochondrial matrix. *FASEB J.* 2001; 15: 2497-2502.
61. Huppertz C, Fischer B, Kim YB, Kotani K, Vidal-Puig A, Sliker LJ. Uncoupling protein 3 stimulates glucose uptake in muscle cells through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2001; 276: 12520-12529.

62. Schrauwen P, Saris W, Hesselink MK. An alternative function for human uncoupling protein 3: protection of mitochondria against accumulation of nonesterified fatty acids inside the mitochondrial matrix. *FASEB J.* 2001; 15: 2497-2502.
63. Negree-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, Cazenave R, Troly M, Salvayre R, Penicaud L, Casteilla L. A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J.* 1997; 11: 809-815.
64. Sonnenberg GE, Krakower GR, Kissebah AH. A novel pathway to the manifestation of metabolic syndrome. *Obes Res.* 2004; 12: 180-186.
65. Reaven GM. The metabolic syndrome: requiescat in pace. *Clin Chem.* 2005; 51: 931-938.
66. Bloomgarden ZT. Dyslipidemia and the metabolic syndrome. *Diabetes Care.* 2004; 27: 3009-3016.
67. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet.* 2005; 365: 1415-1428.
68. Meigs JB. Metabolic syndrome. In search of a clinical role. *Diabetes Care.* 2004; 27: 2761-2763.
69. McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity and programming. *Physiol Rev.* 2005; 85: 571-633.
70. Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance and metabolic dyslipidemia. *Nutrition & Metabolism.* 2005; 2: 5.
71. Reaven G, Ho H. Sugar induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *Am J Hypertens.* 1991; 4: 610-614.
72. El Hafidi M, Baños G. In vivo plasma lipid oxidation in sugar-induced rat

- hypertriglyceridemia and hypertension. *Hypertension*. 1997; 30: 624-628.
73. Carvajal K, El Hafidi M, Baños G. Myocardial damage due to ischemia and reperfusion in hypertriglyceridemic and hypertensive rats: participation of free radicals and calcium overload. *J Hypertens*. 1999; 17: 1607-1616.
74. El Hafidi M, Valdez R, Baños G. Possible relationship between altered fatty acid composition of serum, platelets and aorta, and hypertension induced by sugar feeding in rats. *Clin Exp Hypertens*. 2000; 22: 99-108.
75. Martínez Abundis Eduardo. Liberación de radicales libres en un modelo de rata hipertriglicéridémica e hipertensa: efecto del género. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza, UNAM. 2004.
76. Nägele U, Hägele EO, Sauer G, Wiedemann E, Lehmann P, Wahleld AW, Gruber W. Reagent for the enzymatic determination of serum total triglycerides with improved lipolytic efficiency. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1984; 22: 165-174.
77. Lowry H, Rosebrough NJ, Farr A, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-275.
78. Scaduto RC, Grotyohann LW. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J*. 1999; 76: 469-477.
79. Baracca A, Sgarbi G, Solaini G, Lenaz G. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. *Biochem Biophys Acta*. 2003; 1606: 137-146.
80. Achim L, Sanjiv A, Rajindar S. Mitochondrial ubiquinone homologues, superoxide radical generation and longevity in different mammalian species. *J Biol Chem*. 1997; 272: 19199-19204.

81. Tang HP, Miles VM, DeGrauw A. HPLC analysis of reduced and oxidized coenzyme Q10 in human plasma. *Clin Chem.* 2002; 47: 256-265.
82. Junqueira V, Carrasquedo F, Azzalis L. Content of liver and brain ubiquinol-9 and ubiquinol-10 after chronic ethanol intake in rats subjected to two levels of dietary tochopherol. *Free Radic Res.* 2000; 33: 313-319.
83. Lakritz J, Plopper CG, Buckpitt AR. Validated high-performance liquid chromatography-electrochemical method for determination of glutathione and glutathione disulfide in small tissue samples. *Anal Chem.* 1997; 247: 63-68.
84. Christie WW. The preparation of derivatives of fatty acids en: Christie WW. *Gas chromatography and lipids.* The oily press. Scotland. 1989; 64-84.
85. Gutteridge JM. The use of standards for malondialdehyde. *Anal Biochem.* 1975; 69: 518-526.
86. Huppertz C, Fischer BM, Kim Y, Kotani K, Vidal-Puig A, Sliker LJ, Sloop KW, Lowell BB, Kahn BB. Uncoupling protein 3 (UCP3) stimulates glucose uptake in muscle cell through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2001; 276: 12520-12529.
87. Emaus RK, Grunwald R, Lemasters JJ. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochim Biophys Acta.* 1986; 850: 436-448.
88. Kanai H, Tokunaga K, Fujioka S, Yamashita S, Kameda-Takemura KK, Matsuzawa Y. Decrease in intra-abdominal fat may reduce blood pressure in obese hypertensive women. *Hypertension.* 1996; 27: 125-129.
89. Després JP. Obesity and lipid metabolism: Relevance of body fat distribution. *Curr*

- Opinion Lipidol. 1991; 2: 5-15.
90. Björntorp P. Abdominal obesity and the development of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev.* 1988; 4:615-622.
91. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature.* 2000; 404:635-643.
92. Foufelle F, Girard J, Ferre J. Regulation of lipogenic enzyme expression by glucose in liver and adipocyte tissue: A review of the potential cellular and molecular mechanism. *Adv Enzyme Reg.* 1996; 36: 199-226.
93. Salvin BG, Ong JM, Kern PA. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. *J Lipid Res.* 1994; 35: 1535-1541.
94. Frayn KN, Coppack SW, Fielding BA, Humphery SM. Coordinated regulation of hormone-sensitive lipase and lipoprotein lipase in human adipose tissue in vivo: Implications for the control of fat storage and fat mobilization. *Adv Enzyme Regul.* 1995; 35: 163-178.
95. Daly ME, Vale C, Walker M, Alberti KG, Mathers JC. Dietary carbohydrates and insulin sensitivity: a review of the evidence and clinical implications. *Amer J Clin Nutr* 1997; 66: 1072-1085.
96. El Hafidi M, Cuéllar A, Ramírez J, Baños G. Effect of sucrose addition to drinking water, that induces hypertension in the rats, on liver microsomal Delta9 and Delta5-desaturase activities. *J Nutr Biochem.* 2001; 12: 396-403.
97. Echtay KS, Brand MD. Coenzyme Q induces GDP-sensitive proton conductance in kidney mitochondria. *Biochem Soc Trans.* 2001; 29: 763-768.
98. Genova ML, Merlo M, Biondi A, Bernacchia A, Falasca A, Bovina C, Formiggini G, Parenti G, Lenaz G. Mitochondrial production of oxygen radical species and the role of

- coenzyme Q as an antioxidant. *Exp Biol Med.* 2003; 228: 506-513.
99. Duranteau J, Chandel NS, Kulisz A, Shao Z, Schumackers. Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 1998; 273: 11619-11624.
100. Fink BD, Yoong-Sun H, Mathahs MM, Scholz T, Dillon JS, Sivitz WI. UCP-2 dependent proton leak in isolated mammalian mitochondria. *J Biol Chem.* 2002; 277: 3918-3925.
101. Stuart JA, Harper JA, Brindle KM, Jekabsons MB, Brand MD. Physiological levels of mammalian uncoupling protein 2 do not uncouple yeast mitochondria. *J Biol Chem.* 2001; 276: 18633-18639.
102. Mokhova EN, Khailova LS. Involvement of mitochondrial inner membrane anion carriers in the uncoupling effect of fatty acids. *Biochemistry (Moscow).* 2005; 70: 159-163.
103. Baños G, Medina-Campos O, Maldonado P, Zamora J, Pérez I, Pavón N, Pedraza-Chaverrí. Antioxidant enzymes in hypertensive and hypertriglyceridemic rats: effect of gender. *Clin Exp Hypertens.* 2005; 1: 45-57.
104. Baños G, Medina-Campos O, Maldonado P, Zamora J, Pérez I, Pavón N, Pedraza-Chaverrí. Activities of antioxidant enzymes in two stages of pathology development in sucrose-fed rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2005; 83: 278-286.
105. Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol.* 1999; 27: 922-935.