



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

“FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y ESTRÉS OXIDATIVO  
EN EL RIÑÓN DE RATAS CON SÍNDROME  
METABÓLICO”

# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)  
P R E S E N T A

**ANGÉLICA RUIZ RAMÍREZ**

DIRECTOR DE TESIS: DR. MOHAMMED EL HAFIDI BENTLACKDER

MÉXICO, D.F.

Enero, 2009



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.

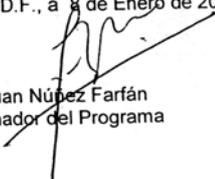
**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 3 de Noviembre de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **ANGÉLICA RUIZ RAMÍREZ** con número de cuenta **98175158** con la tesis titulada **"Función mitocondrial y estrés oxidativo en el riñón de ratas con síndrome metabólico"** realizada bajo la dirección del **DR. MOHAMMED EL HAFIDI BENTLAKDER:**

Presidente: DR. SALVADOR URIBE CARVAJAL  
Vocal: DRA. KARLA GUADALUPE CARVAJAL AGUILERA  
Secretario: DR. MOHAMMED EL HAFIDI BENTLAKDER  
Suplente: DR. MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA  
Suplente: DR. GERARDO GAMBA AYALA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 8 de Enero de 2009.

  
Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM

Al CONACyT por apoyar parcialmente por proyecto CONACyT 67640

Y por proporcionar Beca-Tesis al sustentante

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi comité tutorial integrado por el Dr. Salvador Uribe Carvajal, el Dr. Gerardo Gamba Ayala y el Dr. Mohammed El Hafidi Bentlyakder, gracias por su tiempo, consejos y apoyo.

A la Dra. Karla Guadalupe Carvajal Aguilera y al Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza, gracias por sus observaciones y su valiosa opinión.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

## DEDICATORIAS

A la memoria de mi abuela María, quien fue ejemplo de vida y de quien siempre recibí amor y cuidado.

A Silvia Ramírez, quien ha sido mamá, papá y amiga al mismo tiempo, gracias por el apoyo y cariño incondicional que siempre me has brindado. Todos los logros que he tenido hasta ahora han sido gracias a tú respaldo y este no podría ser la excepción, te quiero mucho mami.

A Luis mi esposo, por tú amor, paciencia y apoyo durante esta aventura. Estos 2 años contigo han sido grandiosos, espero que sigamos juntos siempre. Te amo

A Juan y Ana, mis hermanos a quienes día a día descubro cuanto me quieren. A Erika, mi cuñada, por que eres parte importante en esta familia.

A mi tío Horacio, y mi abuelo Evaristo, gracias por su apoyo y su cariño.

A mis amigos del laboratorio: a Luz, gracias por tú apoyo pero sobre todo por tú amistad sincera, a Oralia y Marilú por su cariño. A Eduardo, gracias por tú amistad y por el apoyo que me has brindado desde que llegue a laboratorio.

A la Dr. Baños, gracias por su apoyo.

A Rodrigo Velázquez Espejel y a Israel Pérez, por mostrarme que la casualidad no existe, gracias por su apoyo.

A Dora Molina, gracias por tú amistad, cariño y animo para seguir con este proyecto.

Al Dr. Mohammed, gracias por la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección y por todas sus enseñanzas.

## ÍNDICE

I.	RESUMEN .....	1
II.	INTRODUCCIÓN.....	5
III.	ANTECEDENTES .....	6
	La cadena respiratoria mitocondrial (CRM).....	6
	Especies reactivas del oxígeno (EROs).....	8
	Contribución de la mitocondria en el desarrollo de patologías.....	12
	Sistemas antioxidantes.....	13
	Las especies reactivas del oxígeno y el síndrome metabólico.....	15
	Efecto de los ácidos grasos no esterificados (AGNEs) sobre el metabolismo mitocondrial.....	16
	Las proteínas desacoplantes.....	18
	El síndrome metabólico.....	20
	El síndrome metabólico y el daño renal crónico.....	21
	Antecedentes experimentales del modelo de síndrome (SM) metabólico en ratas.....	22
IV.	JUSTIFICACIÓN.....	23
V.	HIPÓTESIS.....	24
VI.	OBJETIVOS.....	24
VII.	METODOLOGÍA.....	25
	Inducción del síndrome metabólico.....	25
	Diseño experimental.....	25
	Función renal.....	26
	Determinación de creatinina sérica y urinaria.....	26
	Preparación de mitocondrias.....	27
	Preparación de cortes histológicos: Técnica de tricrómico de Masson-Goldner.....	27
	Determinación de proteínas.....	28
	Potencial transmembranal.....	29
	Análisis de AGNEs por cromatografía de gases (CG).....	30
	Análisis de la UCP-2 por Western Blot.....	31

	Cuantificación de malondialdehído (MDA) por HPLC.....	32
	Cuantificación de la generación de EROs en mitocondrias de riñón....	33
	Determinación de la actividad de catalasa y superóxido dismutasa.....	34
	Cuantificación de ubiquinol y alfa-tocoferol por HPLC.....	35
	Análisis estadístico.....	36
VIII.	RESULTADOS.....	37
	Características generales de los animales.....	37
	Función renal.....	37
	Análisis histológico del riñón.....	38
	Análisis de los AGNEs en el riñón.....	39
	Estrés oxidativo.....	40
	Actividad de superóxido dismutasa.....	41
	Actividad de catalasa.....	42
	La mitocondria como generadora de estrés oxidativo.....	43
	Potencial mitocondrial.....	45
	Efecto del ácido oleico sobre la generación de EROs y el potencial transmembranal.....	46
	Western Blot de la UCP-2 en mitocondrias de riñón.....	48
	Análisis de la CoQ y $\alpha$ -tocoferol.....	50
IX.	DISCUSIÓN.....	52
X.	CONCLUSIONES.....	56
XI.	GLOSARIO.....	57
XII.	REFERENCIAS.....	58

## I. RESUMEN

Existe una asociación entre el síndrome metabólico (SM) y alteraciones en la función renal. La obesidad puede ser un factor importante en esta relación por la alta actividad lipolítica en el tejido adiposo, con liberación de un exceso de ácidos grasos no esterificados (AGNE). El mecanismo por el cual la obesidad afecta la función renal puede ser a través de los AGNE, que están implicados en el desarrollo de estrés oxidativo en el riñón de los animales con SM. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue elucidar el mecanismo por el cual las mitocondrias participan en la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y evaluar la defensa antioxidante y la participación de la expresión de la UCP2 para disminuir las EROs.

En este trabajo el SM se indujo en las ratas Wistar administrándoles sacarosa al 30% en el agua de bebida durante 20 a 24 semanas. Los animales con SM desarrollaron micro albuminuria y su índice de depuración fue menor comparado con los controles. El estudio histológico por microscopía electrónica del glomérulo muestra pérdida de podocitos, fenestración del endotelio y engrosamiento en la membrana basal, características de alteraciones en la función renal.

Los AGNEs y el índice de lipoperoxidación (MDA) se encontraron aumentados en suero y en el homogeneizado de riñones así como en orina de animales con SM.

En las mitocondrias aisladas de riñón de animales con SM, en presencia de piruvato/malato o succinato, se generaron EROs con una velocidad significativamente mayor con respecto a los controles. La incubación de las mitocondrias con ácido oleico (AO) aumentó la generación de EROs en mitocondrias de la misma manera, tanto de animales con SM como de controles.

El aumento en la generación de EROs en las mitocondrias de ratas con SM está asociado con una disminución en la actividad del MnSOD, una enzima clave en la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno. En cuanto a la Cu/ZnSOD se encontró aumentada en la mitocondria así como el homogeneizado de riñón de ratas con SM. El aumento en la actividad de la Cu/ZnSOD presente en el espacio inter membranar de las mitocondrias puede contribuir a un aumento en la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La actividad de catalasa en el homogeneizado de riñón de ratas con SM se encontró disminuida, lo que implica la acumulación de EROs. Además la proteína desacoplante UCP-2 se encontró sobre-expresada, probablemente en

respuesta a estrés oxidativo. Esta proteína es sensible a inhibición por GDP, como su homóloga la UCP-1 en el tejido adiposo café. La adición de 0.5 mM de GDP a las mitocondrias aumentó la velocidad de generación de EROs en ambas mitocondrias.

Los resultados sugieren que la mitocondria participa en el mecanismo por el cual el síndrome metabólico induce alteraciones en la función renal, aumentando la generación de EROs a través de la cadena respiratoria mitocondrial. Mientras que la sobre-expresión de la UCP2 en mitocondrias de riñones es una respuesta al estrés oxidativo, generado por exceso de sustrato oxidativo como los AGNEs

## ABSTRACT

An association exists between the metabolic syndrome (MS) and alterations in the renal function. Obesity can be an important factor in this relationship due to the high lipolytic activity in adipose tissue, which releases an excess of non-esterified fatty acids (NEFA). The mechanism by which obesity affects the renal function can be due to the NEFA, that are implicated in the development of oxidative stress in the kidney of the animals with MS. Therefore, the objective of this study was to elucidate the mechanism by which mitochondria participates in the generation of reactive oxygen species (ROS) and to evaluate the antioxidant defense and the role of the expression of the uncoupler protein UCP2 in diminishing ROS.

In this study the MS was induced in the rats Wistar by 30% sucrose administration in the drinking water during 20 to 24 weeks. The animals with MS developed microalbuminuria and their depuration index was smaller when compared with controls. The histological study by electronic microscopy of the glomerulii shows loss of podocytes, fenestration of the endothelium and thickening of the basal membrane, a characteristic of alteration of renal function.

NEFAs and the lipoperoxidation index (MDA) were increased in serum and in the homogenized kidney as well as in urine of animals with MS.

In the isolated mitochondria from kidney of animals with MS, when oxidizing pyruvate/malate or succinate, the rate of ROS generation was significantly higher with regard to the control. The incubation of mitochondria with oleic acid (OA) increased ROS generation in both mitochondria to the same extent.

The increase in ROS generation in the mitochondria from rats with MS is associated with a decrease in the activity of the MnSOD, a key enzyme in the dismutation of the anion superoxide to dihydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). However, the activity of Cu/ZnSOD was found increased in both homogenized kidney and mitochondria from animals with MS. The increase in the activity of the Cu/ZnSOD in the intermembrane space of mitochondria can contribute to the increased generation rate of  $H_2O_2$ . The activity of catalase in homogenized kidney from rats with SM was diminished, which induces ROS accumulation. Also UCP-2 is over-expressed in response to oxidative stress. This protein is sensitive to inhibition by GDP like its homologous UCP-1, a specific

protein of the brown adipose tissue. The addition of 0.5 mM GDP to the mitochondria increases ROS generation to the same extent in both mitochondria.

The results suggest that mitochondria participates in the mechanism by which metabolic syndrome induces alterations in the enhanced renal function by ROS generation, through the mitochondrial respiratory chain. While the over-expression of UCP2 in kidney mitochondria is a response to the oxidative stress generated by excess of oxidative substrates such as NEFAs.

## II. INTRODUCCION

El síndrome metabólico (SM) caracterizado por obesidad, dislipidemia, hipertensión y resistencia a la insulina, ha generado mucha atención por que está relacionado con el desarrollo de la diabetes tipo 2 y por que incrementa el riesgo de enfermedades cardiovasculares (1). Las conexiones entre el daño renal y el SM son extremadamente complicadas e incluyen riesgos tradicionales como la hipertensión y la obesidad. Recientemente se ha descrito que la hipertensión renal esta asociada con alteraciones en el metabolismo de la glucosa (2) probablemente por su efecto directo sobre la generación de especies reactivas de oxigeno (EROs) (3). Aunque el daño renal en el SM puede ser causado también por altas concentraciones de ácidos grasos no esterificados (AGNE) implicados en el desarrollo de estrés oxidativo en diferentes tejidos (4).

El presente trabajo muestra que en el modelo de SM inducido por consumo de sacarosa, existe un aumento en la generación de especies reactivas del oxígeno (EROs) y modificaciones en las enzimas antioxidantes.

### III. ANTECEDENTES

#### La cadena respiratoria mitocondrial (CRM)

Las mitocondrias son organelos especializados en suministrar la mayor parte de la energía necesaria para las actividades celulares, sintetizando ATP mediante la fosforilación oxidativa (5).

La cadena respiratoria mitocondrial (CRM) es un conjunto de transportadores de electrones que se encuentran localizados en la membrana interna mitocondrial. Durante la fosforilación oxidativa se lleva a cabo la reducción tetravalente del  $O_2$  a  $H_2O$ . Los electrones son donados por  $NADH + H^+$  o  $FADH_2$  a los complejos I y II, respectivamente, y posteriormente pasan a la ubiquinona, también llamada coenzima Q (CoQ), que al aceptar el par de electrones sufre dos semireacciones de reducción a ubisemiquinona y ubiquinol respectivamente, recibiendo un electrón a la vez (6). Estos electrones son posteriormente donados al complejo III, al citocromo *c* y al complejo IV, que finalmente los utiliza para reducir al  $O_2$  hasta agua (7).

La CRM está compuesta por 4 complejos. El quinto complejo es la  $F_1F_0$  ATP sintetasa (8):

- **Complejo I** o Complejo NADH deshidrogenasa: Tiene un peso molecular aproximado de 1000 kDa (9) y está constituido por 16 polipéptidos. Este complejo acepta electrones del NADH y los transfiere a la ubiquinona, mientras transloca cuatro protones hacia el espacio intermembranal generando el gradiente de protones. El NADH es oxidado del lado de la matriz por medio de la NADH deshidrogenasa que tiene flavín mononucleótido (FMN) y por cada FMN posee de 16 a 18 átomos de hierro y 4 átomos de azufre ácido-lábil, organizados en centros de 2-Fe y 4-Fe. El complejo I puede ser inhibido por diferentes compuestos clasificados en tres tipos: Tipo A-antagonistas de quinona (Piericidina), Tipo B-antagonista de semiquinona (rotenona) y Tipo C-antagonista del quinol (mixotiazol) (9, 10).
- **Complejo II** o Complejo succinato deshidrogenasa: Además del complejo I, existen otras 3 vías redox para el transporte de electrones hasta la CoQ y el

complejo III. Estas vías son: el complejo II, el cual transfiere los electrones que provienen del succinato; la flavoproteína transportadora de electrones, la cual suministra electrones procedentes de la  $\beta$ -oxidación; y la  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa, que cataliza la oxidación extramitocondrial del  $\alpha$ -glicerofosfato a fosfato de dihidroxiacetona.

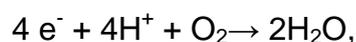
El complejo II está formado por 4 polipéptidos, dos de ellos constituyen la succinato deshidrogenasa cuya subunidad mayor contiene  $\text{FAD}^+$  unido covalentemente y dos centros Fe/S, mientras que la subunidad menor posee un solo centro Fe/S.

El complejo II contiene también *cit b* en la misma proporción que el  $\text{FAD}^+$ ; sin embargo, éste es un citocromo *b* distinto al del complejo III y se encuentra asociado con los polipéptidos menores. El complejo II es transportador de electrones, pero no es un translocador de protones.

- **Complejo III** o Complejo citocromo *bc1*: La ubiquinona es el componente redox más pequeño de la cadena respiratoria. Es un transportador móvil de  $(2\text{H}^+ + 2\text{e}^-)$ , que transfiere electrones desde los complejos I y II hasta el III. La oxidación de la coenzima Q ocurre en una serie de reacciones conocidas como “*el ciclo Q*” que está acoplado a la translocación de protones fuera de la matriz.

El complejo III está compuesto por 8 subunidades, incluyendo 2 moléculas de citocromo *b*, una de citocromo *c* y una única proteína Fe/S muy electropositiva que es llamada “proteína de Rieske”, el complejo III también tiene proteínas intrínsecas que carecen de funciones redox pero que posiblemente estén implicadas en la translocación de protones (11). El complejo III es inhibido por antimicina A.

- **Complejo IV** o Citocromo *c* oxidasa: El complejo III transfiere los electrones al cit *c*, el cual es una proteína extrínseca que se encuentra en la cara externa de la membrana interna mitocondrial. La citocromo-oxidasa es el complejo terminal de la cadena respiratoria que cataliza la reducción del  $\text{O}_2$  hasta  $\text{H}_2\text{O}$ , en una reacción que utiliza 4 electrones.



Por tratarse de un proceso en el que se transfieren 4 e<sup>-</sup>, en el complejo hay 4 grupos redox cada uno con capacidad para 1 e<sup>-</sup>, 2 hemos (*cit a* y *cit b*) y 2 átomos de Cu que pueden ser reducidos de Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>+</sup>. La reacción catalizada por la *cit c* oxidasa es irreversible, contrario a lo que ocurre en el resto de la cadena respiratoria.

- **Complejo V** o ATP sintasa: Su función es convertir la fuerza protón-motriz generada por los complejos I, III y IV en energía química en forma de ATP. Su peso molecular es aproximadamente de 530 kDa. Está conformado por una parte hidrofílica llamado F<sub>1</sub>, el cual posee 3 sitios de unión a nucleótidos, donde se lleva a cabo la síntesis de ATP y una parte que es hidrofóbica, embebida en la membrana, conocida como F<sub>0</sub>, que forma un canal a través del cual retornan a la matriz los protones que fueron translocados por los otros complejos (12, 13).

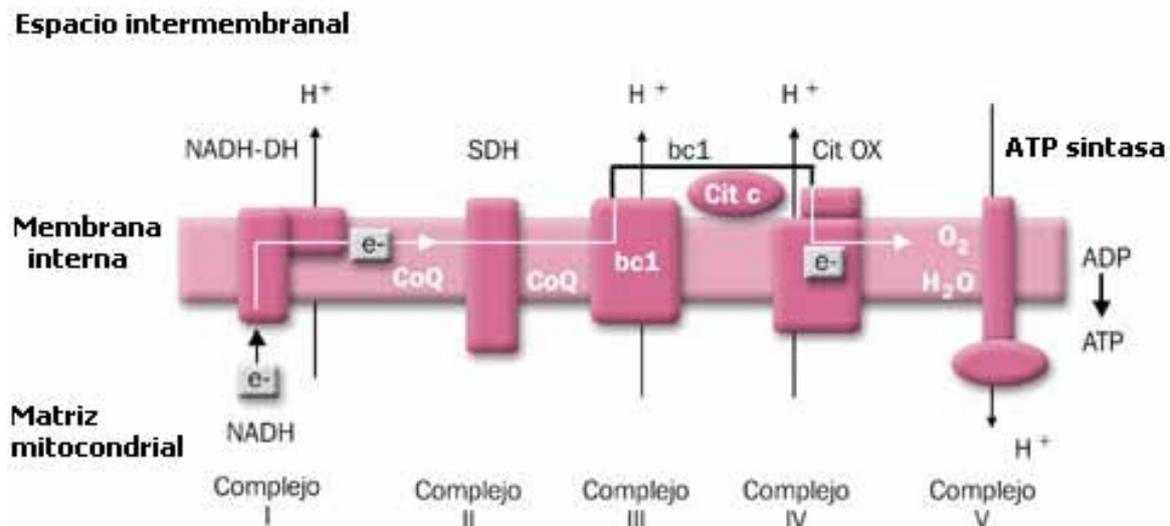


Fig.1 **Cadena respiratoria mitocondrial.** La figura muestra la dirección del flujo de electrones y la translocación de protones, comenzando por el complejo I (NADH deshidrogenasa) hacia el complejo III (complejo bc1) y IV (citocromo oxidasa) hasta la síntesis de ATP por la ATP sintasa a partir de ADP y fosfato.

## Especies Reactivas del Oxígeno (EROs)

El oxígeno es un elemento químico indispensable para los organismos aeróbicos. La aparición de este elemento hace más de 2,600 millones de años en la

atmósfera primitiva fue una ventaja evolutiva para que se desarrollara la vida pluricelular. Al oxidar nutrientes se obtiene mayor cantidad de ATP (14, 15).

El oxígeno es un birradical, es decir que, tiene dos electrones desapareados en su orbital externo, esto hace que el oxígeno sea incapaz de captar dos electrones simultáneamente en una reacción y lo hace uno por uno (reacción univalente). Es por ello que la reducción total del oxígeno se lleva a cabo en 4 etapas, las cuales generan distintas especies reactivas. La reducción del oxígeno por un electrón genera anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) el cual al ser dismutado en una reacción espontánea por la enzima superóxido dismutasa se convierte en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Éste no es formalmente un radical, pero al interactuar con metales de transición como el cobre o el hierro se desencadena la reacción de Fenton que genera el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) el cual es altamente reactivo.

Todos los radicales del oxígeno son peligrosos para la integridad de la célula, ya que generan daño oxidativo en biomoléculas importantes tal como lípidos, ADN y proteínas.

Las especies reactivas del oxígeno (EROs), se forman de manera natural dentro de los sistemas biológicos por distintas vías, de las cuales las más importantes son:

1. NADPH oxidasa. Es una proteína que se encuentra en la membrana plasmática de células polimorfonucleares, macrófagos y células endoteliales. Esta enzima cataliza el estallido respiratorio utilizando el NADPH como donador de electrones hacia el  $O_2$  y generando  $O_2^{\cdot-}$  de manera regulada en respuesta a factores de crecimiento, citocinas y señales de calcio (16, 17).



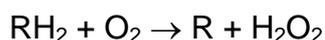
2. Citocromo P450. Esta proteína está asociada a las membranas, plasmática, mitocondrial y del retículo endoplásmico; es responsable del metabolismo oxidativo de los xenobióticos. El P450 se encarga de la oxidación de una extensa gama de sustratos a expensas del  $O_2$  por lo que es dependiente de oxigenasas y forma  $O_2^{\cdot-}$  como subproducto (18).



donde, RH es un sustrato orgánico.

3. Xantina-xantina oxidasa: esta proteína se encuentra distribuida tanto en bacterias como en mamíferos. La xantina oxidasa utiliza  $O_2$  para oxidar xantina e hipoxantina a ácido úrico, que es el producto final del catabolismo purínico en humanos. En esta reacción se genera  $O_2^{\cdot-}$  (19).

4. Peroxisomas: En estos organelos se lleva a cabo el metabolismo peroxisomal de los ácidos grasos, donde se forma  $H_2O_2$  como subproducto, aunque existe la presencia de catalasa para contrarrestar el efecto deletéreo del peróxido de hidrógeno, se ha reportado que en condiciones patológicas, los peroxisomas pueden ser una fuente importante en la generación de EROs (20).



donde, RH es un sustrato orgánico.

5. Formación de  $O_2^{\cdot-}$  por vías no enzimáticas: Esto ocurre cuando un electrón es transferido al oxígeno por coenzimas reducidas, grupos prostéticos como las flavinas o centros hierro- azufre y por xenobióticos previamente reducidos (18).

6. La mitocondria. La mitocondria es la mayor fuente de especies reactivas de oxígeno dentro de la célula. La generación de EROs es inevitable durante el metabolismo oxidativo, función principal de este organelo para la formación de ATP, lo que se traduce en suministro de energía para funciones vitales de la célula; sin embargo, cuando se pierde el balance entre los niveles de antioxidantes y de EROs se produce estrés oxidativo, el cual está asociado a diferentes patologías tales como la diabetes tipo II, la obesidad, las enfermedades neurodegenerativas y las cardiovasculares (18, 21).

Durante la fosforilación oxidativa, la primera especie reactiva que se forma es el  $O_2^{\cdot-}$ , el cual se convierte en  $H_2O_2$  por dismutación espontánea o por la acción de la superóxido dismutasa (22). Se ha identificado el complejo I como formador de anión superóxido en la matriz mitocondrial y el complejo III en la interfase del ciclo Q, el cual genera el  $O_2^{\cdot-}$  en el espacio intermembranal con mayor intensidad que el del lado de la matriz. En este último complejo también se forma el radical

ubisemiquinona en el espacio intermembranal, el cual es altamente reactivo (23). Un factor importante en la regulación de la generación de EROs es el estado redox de la cadena respiratoria, el cual es dependiente del potencial transmembranal. Por lo tanto los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial al funcionar como bombas de  $H^+$ , generan estrés oxidativo de manera diferente y con distinta intensidad (24).

a) **Complejo I:** Está constituido por subunidades hidrofóbicas llamadas N1-N6 y ND4L (centros Fe-S) y FMN. Utilizando diferentes inhibidores (rotenona) de este complejo se ha sugerido que un centro fierro-azufre específicamente N2 puede ser el sitio de fuga del electrón hacia el  $O_2$ , y formar  $O_2^{\cdot-}$ , sólo del lado de la matriz mitocondrial (25, 26).

Existe evidencia de que las EROs aumentan cuando existen defectos estructurales del complejo I, que probablemente juegan un rol en la generación de estrés oxidativo. La producción de  $O_2^{\cdot-}$  por el complejo I aumenta durante el transporte de electrones en reversa (en presencia de succinato), mientras que el transporte de electrones directo es mucho más bajo. (24, 27).

b) **Complejo III:** Tiene 2 componentes formadores de  $O_2^{\cdot-}$ , el centro  $Q_o$  orientado hacia el espacio intermembranal y el centro  $Q_i$  orientado hacia la matriz mitocondrial, así pues la generación se da en ambos lados de la mitocondria. La inhibición del centro  $Q_i$  con antimicina A, aumenta la generación de  $O_2^{\cdot-}$  por el centro  $Q_o$  así mismo la inhibición del centro  $Q_o$  con estigmatelina disminuye la generación de EROs casi de la misma manera que cuando es bloqueado el centro  $Q_i$  (28). En mitocondrias de corazón la inhibición del complejo III con antimicina A aumentan la generación de  $H_2O_2$ , lo que sugiere que las EROs formadas por el centro  $Q_o$  no son afectados por las defensas antioxidantes de la matriz mitocondrial, así mismo la inhibición del centro  $Q_o$  con estigmatelina (29).

c) **Ciclo Q:** Durante el transporte de electrones la CoQ es reducida y esto lleva a la formación del radical ubisemiquinona ( $UQ^{\cdot-}$ ), la cual reacciona rápidamente con el  $O_2$  y así formar  $O_2^{\cdot-}$  (24). A su vez, la ubisemiquinona puede sufrir auto-reducción de forma no enzimática y generar  $H_2O_2$  (30, 31).

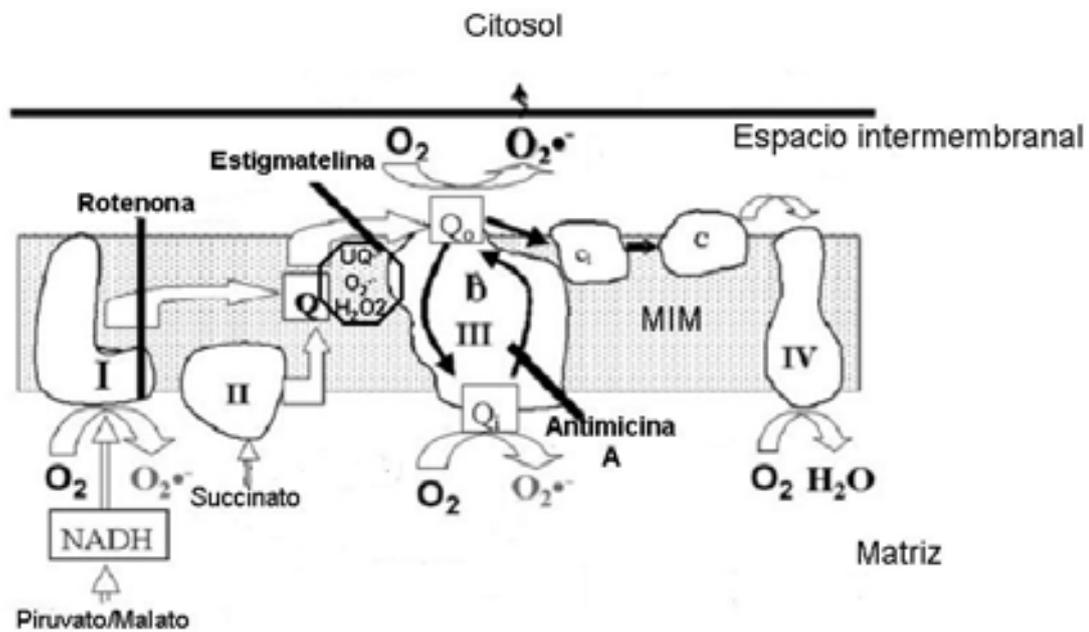


Fig 2. Formación de EROs por la CRM. El esquema muestra que el complejo I, el ciclo Q y el complejo III son formadores de EROs. Esto se corroboró al inhibir específicamente los complejos I y III. (rotenona: Complejo I, estigmatelina: complejo III).

## Contribución de la mitocondria en el desarrollo de patologías

La mitocondria proporciona la energía necesaria para que se lleven a cabo la mayoría de los procesos celulares para la supervivencia celular, así pues también tiene una participación importante en la apoptosis (5).

Es por ello que las alteraciones en el metabolismo oxidativo de la mitocondria pueden llevar a muerte celular y al desarrollo de distintas enfermedades.

Una gran cantidad de enfermedades están relacionadas con la mitocondria, que van desde las cardiovasculares hasta las neuronales y pasando por aquellas en donde están implicados genes que se codifican en su genoma.

La generación de estrés oxidativo por la mitocondria está relacionado con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer que está caracterizado por una acumulación del péptido  $\beta$ -amiloide constituyente principal de la placa senil en el cerebro y en donde se ha observado un incremento en la oxidación de proteínas y DNA, lipoperoxidación y disminución en ácidos grasos poliinsaturados; así como aumento en la generación de 4-hidroxinonenal; el Parkinson, se caracteriza por la pérdida de neuronas en el área media del cerebro llamada sustancia negra, en

donde existe una disminución de glutatión en pacientes con esta enfermedad; la enfermedad de Huntington es una patología hereditaria que se caracteriza por el desgaste de células nerviosas del cerebro y en donde se observan fallas a nivel de cadena respiratoria mitocondrial; la enfermedad de Wilson está caracterizada por defectos en el metabolismo del cobre y que pueden provocar enfermedad hepática; la enfermedad de Friedrich causa daño progresivo del sistema nervioso y esta dada por defectos en el metabolismo del hierro y la esclerosis amiotrófica lateral, causa perdida de neuronas motoras y se observan defectos en la Cu/ZnSOD y disfunción mitocondrial (20, 32).

La generación y acumulación de EROs por la mitocondria son procesos propuestos como una de las causas del proceso de envejecimiento y enfermedades que se relacionan con la edad (33), con enfermedades cardiovasculares como la diabetes tipo II y la obesidad (34-36).

## **Sistemas Antioxidantes**

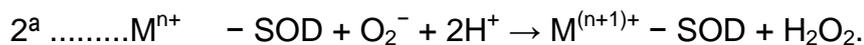
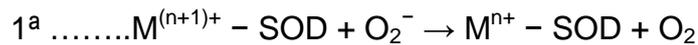
Los sistemas biológicos han adquirido maneras de contrarrestar el daño que puede causar el estrés oxidativo, a los cuales se les ha nombrado defensas antioxidantes, estos incluyen (18): (a) proteínas que catalíticamente remueven los radicales libres tal como la superóxido dismutasa, la catalasa y la peroxidasa; (b) proteínas que minimizan la capacidad de los agentes pro-oxidantes, por la presencia de hierro, cobre, manganeso, zinc y grupos hemos como las transferrinas; (c) proteínas que protegen el DNA como las proteínas de “heat shock” y (d) moléculas de bajo peso molecular que son atrapadoras de especies reactivas tanto del oxígeno como del nitrógeno, ejemplos de ellas son el alfa-tocoferol, glutatión, CoQ reducida y carotenos (5).

La acción de las enzimas antioxidantes depende del tipo de especie reactiva que se esté formando. Estas enzimas tienen diferentes isoformas que se encuentran expresadas en distintos lugares de la célula (37):

- a) Superóxido Dismutasa, es una metaloenzima que cataliza la dismutación del  $O_2^{\cdot-}$  a  $O_2$  y  $H_2O_2$  y que puede tener en su sitio activo metales como el Fe, Cu, Zn, Mn.

La Cu/ZnSOD se encuentra sólo en eucariontes, situada en citoplasma, lisosomas, núcleo y en el espacio intermembranal de la mitocondria. La MnSOD se encuentra presente en bacterias, plantas y animales, en estos últimos se localiza únicamente en la matriz mitocondrial. También existe una FeSOD en bacterias, algas y en cloroplastos de plantas superiores.

La reacción que cataliza la SOD se puede resumir en dos semirreacciones:

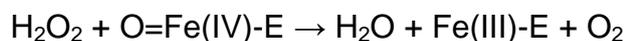
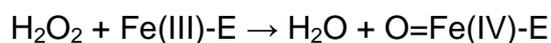


donde, M = Cu (n=1) ; Mn (n=2) ; Fe (n=2) ; Zn (n=2).

La actividad de las diferentes SOD en tejidos humanos difiere, así pues se ha reportado que tanto la Cu/ZnSOD como la MnSOD tienen actividad en el hígado, riñón, tiroides, mucosa gástrica, páncreas, pulmón y aorta torácica.

b) Catalasa, cataliza la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en O<sub>2</sub> y 2H<sub>2</sub>O y se encuentra localizada en los peroxisomas, organelos donde se lleva a cabo la β- oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga, proceso en el que intervienen enzimas generadoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tales como la flavoproteínas deshidrogenasas, las cuales reaccionan con O<sub>2</sub> y generan el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. También existe catalasa, aunque en poca proporción, en retículo endoplasmático, cloroplastos y mitocondrias.

La reacción química que cataliza la catalasa se realiza en 2 pasos:



donde, Fe-E representa el núcleo de hierro del grupo hemo unido a la enzima que actúan como cofactores.

La actividad de catalasa en el humano se encuentra restringida al hígado, en eritrocitos, riñón, corazón, nodo linfático, pulmón, músculo esquelético, cerebro, tejido adiposo y páncreas.

- c) Glutatión peroxidasa (GPX), degrada el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La GPX reduce el  $\text{H}_2\text{O}_2$  hasta  $\text{H}_2\text{O}$  utilizando el glutatión reducido (GSH) como donador de electrones y forma glutatión oxidado (GSSG) el cual es regenerado por la glutatión reductasa (GR) utilizando NADPH como donador de electrones (31) (Fig 3). La GPX se encuentra presente en animales, plantas y en muchas bacterias aeróbicas.

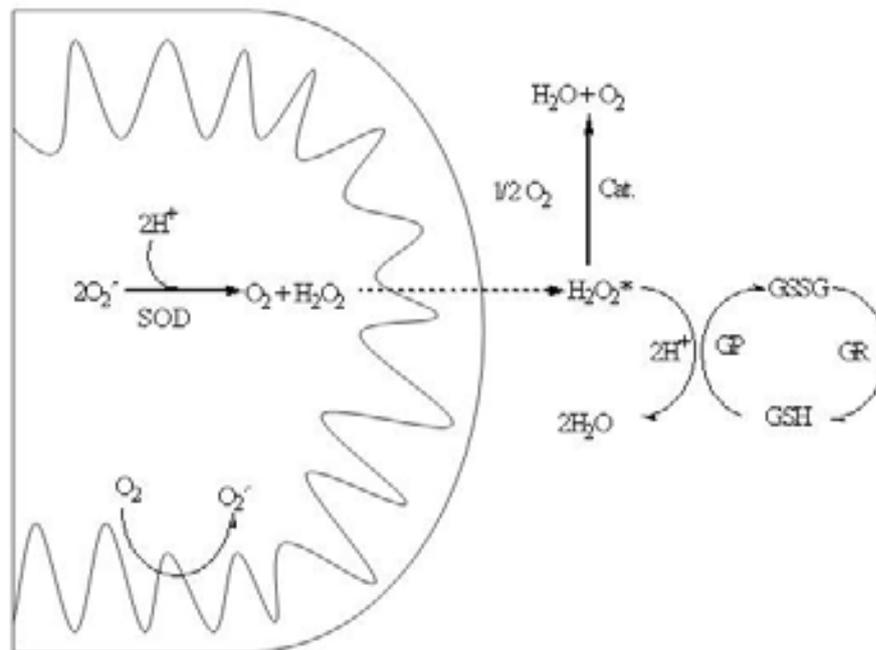


Fig 3. **Glutatión peroxidasa.** El esquema muestra la reacción antioxidante de la glutatión peroxidasa (GPX) en presencia de sustrato, el glutatión reducido (GSH). También se muestra la acción de la MnSOD y de la catalasa.

La glutatión peroxidasa tiene actividad en el humano en eritrocitos, hígado, corazón, lente ocular, cerebro, músculo esquelético, pulmón, páncreas y tejido adiposo.

### Las especies reactivas del oxígeno y el síndrome metabólico

La obesidad puede definirse como un desequilibrio entre el aporte y el gasto energético que es producido por alteraciones genéticas, bioquímicas, dietéticas y conductuales, lo cual provoca una acumulación de grasa (38).

La obesidad es el factor principal para el desarrollo de síndrome metabólico, ya que el incremento del estrés oxidativo en la grasa acumulada es un mecanismo importante del síndrome metabólico asociado con la obesidad (39, 40). Existen

diferentes hipótesis de que la obesidad puede estar causando estrés oxidativo, una de ellas es por la acumulación de triacilgliceroles en el citosol de tejidos no grasos, los cuales pueden estar aumentando la producción de  $O_2^-$  (41). En macrófagos expuestos a una alta concentración de triacilgliceroles se observó un aumento en la generación de EROs específicamente de  $O_2^-$  por la cadena respiratoria mitocondrial y se determinó que esto era vía el complejo I al inhibir con rotenona (42). Otra hipótesis es la presencia del aumento de citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL 1) e interleucina-6 (IL-6), como respuesta del estado de inflamación crónica que existe en la obesidad (43).

### **Efecto de los ácidos grasos no esterificados sobre el metabolismo mitocondrial**

La mayoría de los ácidos grasos se encuentran unidos a proteínas o están asociados con las membranas celulares en su conformación de fosfolípidos, sin embargo existe una proporción de ácidos grasos libres o ácidos grasos no esterificados (AGNEs) que se pueden acumular bajo ciertas circunstancias, como el consumo excesivo de etanol, estrés por frío y patologías como la obesidad y la diabetes tipo II (44).

Los ácidos grasos desacoplan la cadena respiratoria mitocondrial, causando pérdida en el potencial transmembranal y un aumento del estado 4 de la respiración (45).

Los ácidos grasos tienen 2 maneras de internalizarse en las mitocondrias, la primera es específica y están involucradas una serie de proteínas como la carnitina palmitoiltransferasa I y II (CPTI y II) (Fig 3), localizadas en la membrana mitocondrial externa y la translocasa de ácidos grasos, localizada en membrana interna mitocondrial. La segunda manera descrita es el transporte pasivo, el llamado “*flip-flop*”, el cual consiste en que los ácidos grasos en su forma protonada (RCOOH) atraviesan la membrana interna mitocondrial, efectuando un efecto de desacoplamiento de la cadena respiratoria mitocondrial por el acarreo inespecífico de  $H^+$  hacia la matriz. Esto se ha demostrado por experimentos en donde se mide el cambio de pH en respuesta al movimiento de los AGNEs a través de bicapas fosfolípicas libres de proteínas (46).

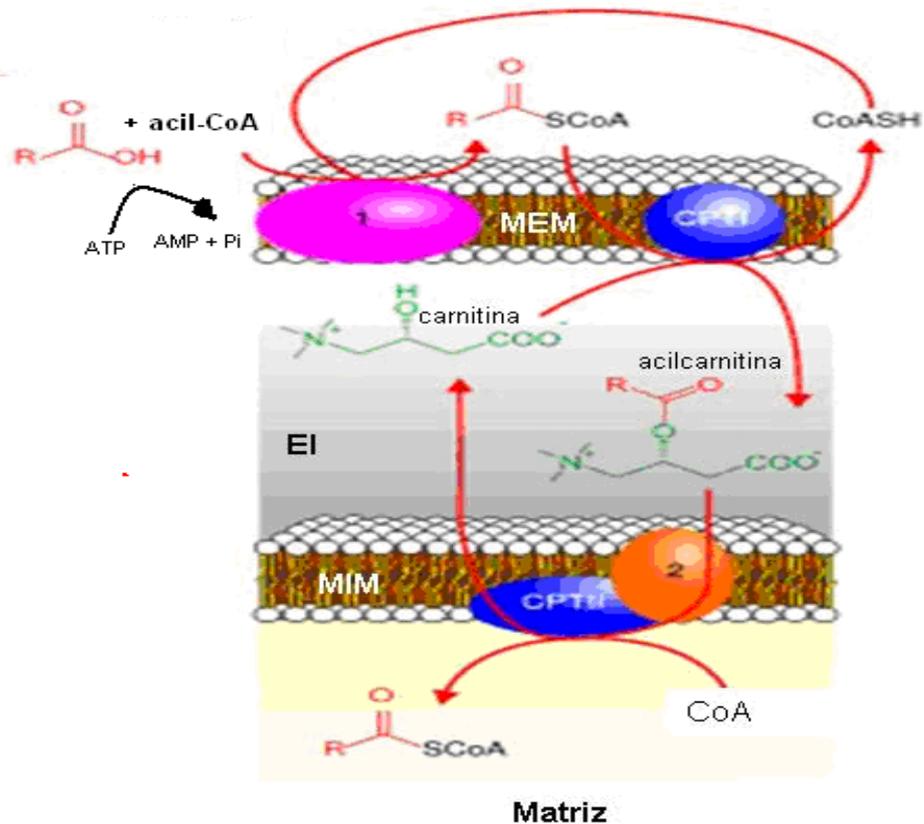


Fig 4. **Transporte activo de los ácidos grasos hacia el interior de la mitocondria.** El primer paso es la activación del ácido graso en la membrana externa mitocondrial (MEM). El ácido graso se une a la CoA, reacción que cataliza la acil-CoA sintetasa (1) y que es dependiente de ATP. Así pues la CPTI transfiere la CoA de la molécula de acil-CoA y la une a la carnitina situada en el espacio intermembranal (EI) originando acilcarnitina, así la translocasa de ácidos grasos (2) situada en membrana interna (MIM) transfiere la acilcarnitina a la matriz mitocondrial y la CPTII une una molécula de CoA al ácido graso, regenerando una molécula de acil-CoA.

También se ha reportado que los AGNEs interaccionan con la translocasa de adenin nucleótidos (TAN) y los acarreadores de aspartato/glutamato, dicarboxilato y las proteínas desacoplantes (UCPs); estos acarreadores pueden lograr transportar ácidos grasos no sólo por pertenecer a la misma familia de transportadores, sino porque todos ellos tienen la habilidad de transportar  $\text{Cl}^-$ , piruvato y otros mono-aniones (47).

Los ácidos grasos representan una de las principales fuentes de energía del organismo; así pues se pueden encontrar formando parte de los triacilgliceroles, en complejos de lipoproteínas o como ácidos grasos libres en el plasma circulante (40).

Los ácidos grasos también interactúan con las membranas mitocondriales e interfieren con su metabolismo de distintas formas:

- **Como protonóforos.** Los AGNEs tienen la habilidad de actuar como protonóforos dependiendo del largo de su cadena de carbonos y del grado de insaturación, por ejemplo en mitocondrias aisladas de cerebro, el ácido araquidónico actúa a una concentración de 20-40  $\mu\text{M}$ . Este efecto se observa cuando los AGNEs se encuentran sólo en su forma protonada. A este efecto se le denomina “desacoplamiento” (48, 49).

- **Como generadores de EROs.** Los AGNEs pueden inducir aumento en la generación de especies reactivas de distintas formas; una de ellas es por inhibición de la reducción del glutatión reducido de su forma oxidada, esto impide que haya remoción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dependiente de este sistema (42, 50), otra forma es la interacción entre los ácidos grasos con los complejos respiratorios lo que puede generar inactivación de la cadena respiratoria (44). Se ha observado que altas concentraciones de ácidos grasos, hacen que la ATP sintasa sea insensible a oligomicina, lo que sugiere la disociación del complejo  $\text{F}_1\text{F}_0$  (50).

Así mismo, en mitocondrias de corazón se ha observado que hay un aumento en las concentraciones de ácido araquidónico que causa inhibición del estado 3 y desacoplamiento, el cual se atribuye a la interacción del ácido graso con los complejos I y III, los cuales están asociados con la producción de EROs cuando oxidan piruvato/malato o succinato (48).

### **Las Proteínas Desacoplantes**

La membrana interna mitocondrial es permeable a metabolitos pequeños; sin embargo está controlada y es selectiva para mantener el gradiente electroquímico creado por la cadena respiratoria. La membrana interna puede transportar sustratos como ADP, ATP, fosfato, oxoglutarato y malato a través de transportadores específicos (51).

La respiración mitocondrial está acoplada a la síntesis de ATP; sin embargo, este acoplamiento se puede perder por la presencia y funcionamiento de proteínas desacoplantes (UCPs), las cuales están localizadas en la membrana interna mitocondrial y están implicadas en diferentes procesos fisiológicos y patológicos (52). Estas proteínas se han encontrado en mamíferos, plantas, protozoarios y

levaduras. La familia de UCPs está conformada por 6 integrantes; UCP1, la cual se expresa exclusivamente en tejido adiposo café característico de animales que hibernan (53); la UCP2, distribuido en distintos órganos incluyendo hígado, bazo, páncreas, pulmón, macrófagos y riñón (54); la UCP3 se expresa exclusivamente en el músculo esquelético (55, 56); la UCP4 y la BMCP1 (brain mitochondrial carrier protein-1) se encuentran expresadas predominantemente en sistema nervioso central (57) y por último la KMCP1 (kidney mitochondrial carrier protein-2) es representativa de riñón y su expresión se restringe a la corteza renal; específicamente a los túbulos distales y proximales; se ha descrito que esta proteína se sobre-expresa después de un daño en el riñón y que está asociada a la capacidad de este órgano de regenerarse después de algún daño (58). Así pues, existe la hipótesis de que las UCPs regulan la fuga de protones por un mecanismo de transporte de protones como se muestra en la figura 4 (59).

La expresión de las UCPs está regulada por eventos transcripcionales (60). En mitocondrias de hepatocitos de ratas y ratones se ha observado que el receptor- alfa activado de proliferadores de peroxisomas (PPAR-  $\alpha$ ) aumentan los niveles de RNA mensajero de la UCP2 (61).

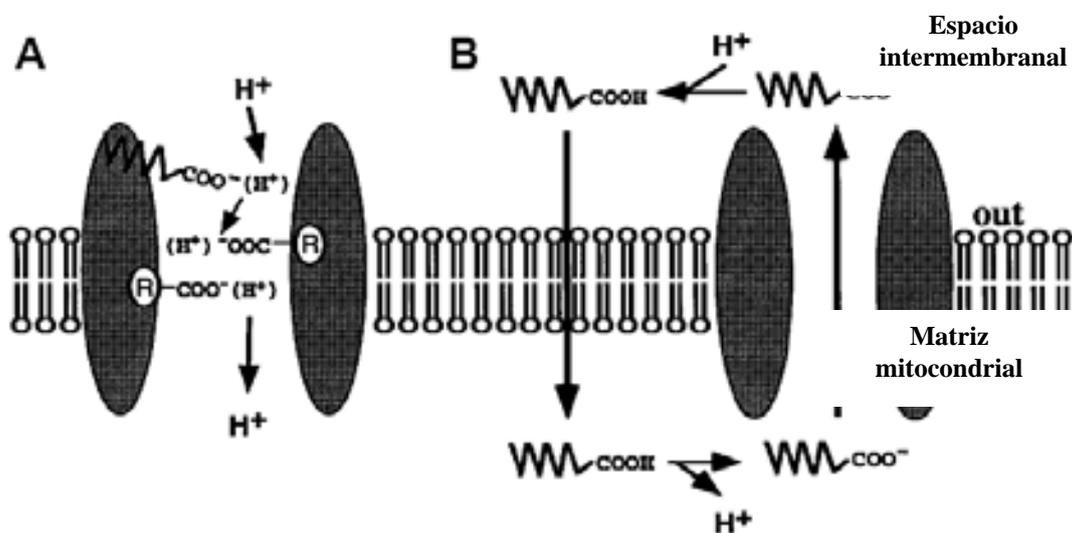


Fig 5. **Mecanismo propuesto para el transporte de  $\text{H}^+$  activado por ácidos grasos por medio de UCPs.** (A) Transporte de ácidos grasos en su forma protonada, hacia la matriz mitocondrial desacoplando así el transporte de protones y disminuyendo la síntesis de ATP vía UCPs. (B) Movimiento cíclico de los ácidos grasos como protonóforos. Los ácidos grasos en su forma aniónica son transportados hacia el espacio intermembranal, mientras que su forma protonada puede entrar a la matriz por efecto de "Flip-Flop".

## El síndrome metabólico

El Síndrome Metabólico (SM) está caracterizado por un conjunto de patologías tales como la resistencia a la insulina, obesidad, hipertensión y dislipidemia, las cuales son factores de riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo II (62, 63). En 1923 Kylin fue el primero que observó y describió al Síndrome Metabólico, como la presencia de hipertensión, hipertrigliceridemia y gota (64). En 1947 Vague, puso atención en la acumulación de la grasa (tipo androide) que está directamente relacionada con las anormalidades metabólicas de la diabetes tipo II (65). Reaven en 1988 describió al síndrome "X" como la presencia de resistencia a la insulina, hiperglicemia, hipertensión, disminución de HDL y aumento de los triacilgliceroles. Así pues, el Síndrome Metabólico ha tenido diferentes nombres a través del tiempo, "Síndrome X", "El Síndrome de la Resistencia a la Insulina" y el "Cuarteto de la muerte (66).

Sin embargo, lo más difícil y controversial ha sido definirlo para ser diagnosticado correctamente.

La Organización Mundial de la Salud (WHO por sus siglas en inglés) y el Programa Nacional de Educación sobre Colesterol y el Panel III de Tratamiento del Adulto (NCEP III por sus siglas en inglés) formularon diferentes definiciones. Eckel propone que la definición de la WHO es mejor empleada como una herramienta de investigación, mientras que la definición de NCEP III es más utilizada para el diagnóstico clínico de la enfermedad (66).

**Tabla I. Identificación Clínica del Síndrome Metabólico NCEP III**  
**Factores de riesgo**

---

Obesidad abdominal (circunferencia de la cintura)

- *Hombres*.....> 102 cm (> 40 in)
- *Mujeres*.....> 88 cm (> 35 in)

Triglicéridos.....≥ 150 mg/dL

Colesterol HDL

- *Hombres*.....< 40 mg/dL
- *Mujeres*.....< 50 mg/dL

Presión sanguínea.....≥ 130 / ≥ 85 mmHg

Glucosa.....≥ 110 mg/dL

El Síndrome Metabólico parece tener 3 puntos cruciales en su patogénesis (67):

1. Obesidad y alteración en el tejido adiposo: Factor principal para desarrollar síndrome metabólico, también contribuye a desarrollar hipertensión, altos niveles de colesterol y triacilglicerolos en la sangre y bajas concentraciones de HDL que están asociadas a enfermedades cardiovasculares.
2. Resistencia a la Insulina: Relacionada con la disfunción en los adipocitos.
3. Factores Independientes como moléculas involucradas con la respuesta inmunológica, vascular y hepática.

### **El síndrome metabólico y el daño renal crónico**

Cuando los riñones dejan de funcionar de manera correcta se dice que hay daño o falla renal. La microalbuminuria, definida como la presencia de bajos niveles de albúmina en la orina (30-299 mg/24 h), es el primer signo de daño renal, aunque también se considera como marcador generalizado de disfunción vascular (68).

En los últimos años se ha observado que los pacientes que presentan síndrome metabólico tienen complicaciones renales, tales como, microalbuminuria y daño renal crónico (69). La asociación que existe entre estas dos grandes condiciones patológicas aún sigue sin resolverse, sin embargo, se ha mencionado que la obesidad puede estar jugando un papel importante entre ellas, ya que la enfermedad crónica renal está acompañada por anormalidades en el metabolismo de los lípidos (70).

Las dislipidemias son importantes en el desarrollo de daño renal, sobre todo los niveles altos de triacilglicerolos en suero, estas observaciones se han hecho en pacientes con proteinuria. Se cree que los lípidos circulantes son atrapados por la matriz extracelular en donde se oxidan y aumentan la formación EROs, principalmente de anión superóxido y de peróxido de hidrógeno, lo cual va a tener efectos sobre la función del endotelio (69). Así mismo, se ha reportado que el aumento en los niveles de leptina en plasma que se presentan en la obesidad puede predisponer al desarrollo de glomeruloesclerosis (1), la cual está caracterizada por

tejido cicatrizado que interrumpe el proceso de filtración de los riñones y por lo tanto permite el paso de proteínas de la sangre a la orina.

En general, la obesidad puede causar alteración en la hemodinámica renal, reabsorción de sodio, hiperlipidemia, acumulación de matriz extracelular y glomeruloesclerosis (70).

El SM está asociado frecuentemente a la diabetes tipo II y a la enfermedad crónica que está caracterizada por un aumento en los niveles de glucosa en la sangre (hiperglucemia) como resultado de bajas concentraciones de insulina, lo cual se traduce en alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas (71).

Las altas concentraciones de glucosa que se presentan en la diabetes tipo II causan daño en células  $\beta$  pancreáticas y en células mesangiales (72, 73) lo que se traduce en defectos en el funcionamiento correcto tanto del páncreas como del riñón. Una de las características del daño renal es la albuminuria que es frecuente también en la diabetes tipo II (74).

### **Antecedentes experimentales del modelo de síndrome metabólico en ratas**

En nuestro laboratorio, el cual es parte del departamento de bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" se ha desarrollado un modelo de síndrome metabólico en ratas Wistar machos, el cual es una variante del desarrollado anteriormente por Reaven (75). Este modelo se caracteriza por ser dependiente de dietas hipercalóricas es decir, dietas altas en sacarosa o fructosa por un determinado periodo de tiempo, así los animales desarrollan hipertensión, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina. Esto refleja el cuadro clínico que se observa en los humanos con síndrome metabólico.

Este cuadro clínico fue inducido por el consumo de sacarosa (azúcar refinada comercial) al 30% en el agua de beber durante 24 semanas. El modelo se encuentra bien establecido y los resultados obtenidos acerca de éste son:

1. El consumo de azúcar refinada comercial en el agua de bebida produce hipertrigliceridemia, e hipertensión en ratas Wistar comparables a las encontradas cuando se administran los carbohidratos en el alimento sólido (75-77).

2. La rata con síndrome metabólico desarrolla hipertrigliceridemia (78, 79).
3. Se han encontrado niveles altos de AGNE en el suero de los animales con síndrome metabólico (79).
4. Se ha encontrado que en suero y mitocondrias hay un aumento de malondialdehído (MDA), indicador de estrés oxidativo (80).

#### **IV. JUSTIFICACIÓN**

Se sabe que el SM es un factor de riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo II y enfermedad crónica del riñón, es por ello que se considera un problema de salud pública mundial.

Está bien establecido que las enfermedades crónicas presentes en el SM están relacionadas con un aumento en la generación de estrés oxidativo (81). Sin embargo, las conexiones entre el daño renal y el SM son extremadamente complicadas, recientemente se ha descrito que la hipertensión renal está asociada con alteraciones en el metabolismo de la glucosa (72). En el modelo de rata con SM se han observado alteraciones fisiológicas tales como, hipertensión, hipertrigliceridemia, resistencia a la insulina, obesidad y aumento en las EROs en hígado y es por ello que este modelo es una buena herramienta para determinar si el alto consumo de carbohidratos puede alterar el funcionamiento renal a través del aumento de las EROs generadas por la mitocondria, en presencia de diferentes concentraciones de AGNEs que reflejen mayor actividad de la lipólisis en el modelo.

## **V. HIPÓTESIS**

Las alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos no esterificados asociados al SM producen un aumento en la generación de estrés oxidativo en la mitocondria de riñón.

## **VI. OBJETIVOS**

### **General:**

- Elucidar el mecanismo por el cual se generan EROs de manera exacerbada en las mitocondrias de animales con síndrome metabólico y evaluar el papel de la expresión de la UCP2 para disminuir las EROs.

### **Particulares:**

- Determinar el efecto de los AGNEs sobre el potencial transmembranal en mitocondrias de riñón de animales con SM.
- Evaluar el papel de la UCP2 sobre el potencial transmembranal de mitocondrias de riñón con SM.
- Cuantificar la generación de EROs durante el metabolismo mitocondrial en los animales con SM.
- Evaluar la actividad de algunas enzimas antioxidantes en homogeneizado y mitocondrias de riñón de animales con SM.

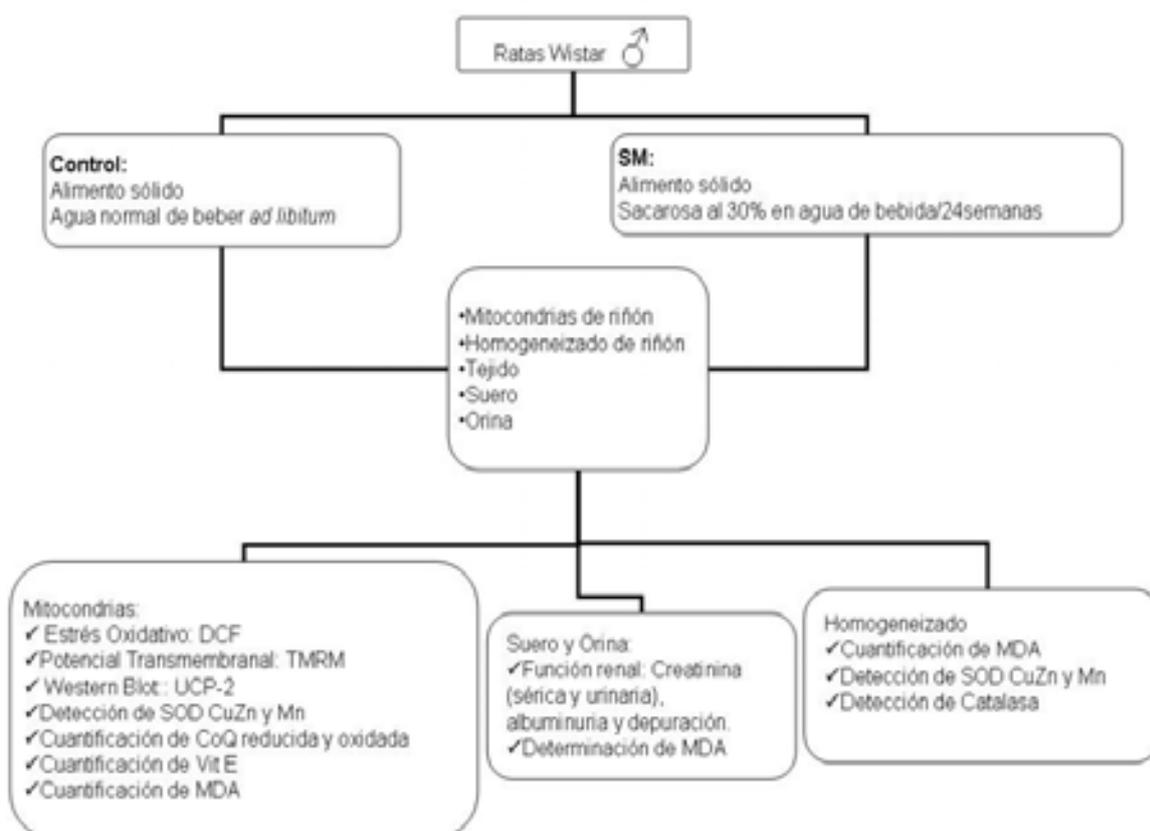
## VII. METODOLOGÍA

### Inducción del síndrome metabólico

Se utilizaron ratas Wistar macho recién destetadas que fueron divididas en dos grupos al azar. El grupo control tuvo acceso libre al alimento sólido comercial (Lab Diet, fórmula 5001) y agua de beber *ad libitum*.

El síndrome metabólico se indujo en el segundo grupo dándole una solución de sacarosa al 30% como agua de bebida y el mismo alimento que los animales controles. El tratamiento duró 24 semanas. Una vez finalizado el tratamiento los animales se pusieron en ayuno durante una noche para recolectar una muestra de orina y sangre para la determinación de la función renal y posteriormente ser decapitadas y realizar los experimentos.

### Diseño experimental



## **Función Renal**

En la semana 23 de tratamiento, los animales se colocaron en cajas metabólicas (NALGENE) durante 5 días para su aclimatación con acceso libre al alimento y al agua. Después de este tiempo se dejaron en ayuno durante 12 h para hacer la recolección de una muestra de orina y sangre para la determinación de creatinina urinaria y sérica, así mismo se registró la cantidad de agua que consumieron los animales para la obtención del índice de depuración, el cual se determinó por la siguiente formula:

$$C: UV/P,$$

donde, **C**= creatinina, **U**= concentración de creatinina urinaria, **V**= velocidad de la excreción de orina en ml/min y **P**= concentración de creatinina sérica.

### **Determinación de creatinina sérica y urinaria.**

Antes de medir la creatinina en suero sanguíneo, se desproteinizaron las muestras: A 300  $\mu$ l de suero se le adicionaron 2.1 ml de agua destilada, 300  $\mu$ l de  $H_2SO_4$  0.33N y 300  $\mu$ l de  $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$  al 5%. Esta mezcla se agitó con vortex 3 veces cada 10 minutos y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante en donde se midió la creatinina.

Para la determinación de creatinina en suero, se preparó una mezcla pícrica que contenía ácido pícrico 40 mM y NaOH al 10% (5/1, v/v).

Se utilizaron 500  $\mu$ l del sobrenadante del suero desproteinizado y se adicionaron 1.5 ml de agua destilada y 1 ml de la mezcla pícrica. Se dejó incubar durante 10 minutos y el registró de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro a 540 nm. Paralelamente se realizó una curva de calibración con creatinina (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) (Sigma) a diferentes concentraciones (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40  $\mu$ g).

Para la determinación de creatinina en orina se utilizaron 10  $\mu$ l de orina y se adicionaron 2 ml de agua destilada y 990  $\mu$ l de la mezcla pícrica, se dejaron incubar

10 minutos y se registró la absorbencia en un espectrofotómetro a 540 nm. La curva de calibración de creatinina ( $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) fue de 0, 10, 20 y 40  $\mu\text{g}$ .

### **Preparación de mitocondrias**

Una vez concluido el tratamiento de 24 semanas, las ratas se pusieron en ayuno la noche previa a sacrificarlas. Los animales fueron pesados y decapitados para extraer sangre, se recuperaron los riñones para homogenizarlos y obtener mitocondrias aisladas.

La obtención de mitocondrias se realizó por centrifugación diferencial extrayendo los riñones y colocándolos en una solución de aislamiento que contenía, sacarosa 250 mM, Tris-base 10 mM, EGTA 1mM a pH 7.4 a 4°C. Los órganos fueron triturados finamente y se colocaron en un homogenizador tipo Potter con aproximadamente 30 ml de solución de aislamiento. El homogeneizado se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C para sedimentar el tejido conjuntivo y restos celulares. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos y se obtuvo la fracción mitocondrial. El pellet se resuspendió y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. La fracción obtenida se resuspendió en 1 ml de solución de aislamiento.

### **Preparación de cortes histológicos: Técnica de Tricrómico de Masson-Goldner**

Una fracción del riñón se embebió en parafina para realizar los cortes a 5  $\mu\text{m}$  y realizar la tinción con el siguiente procedimiento (82).

Los cortes se desparafinaron y se hidrataron con soluciones graduales de etanol hasta llegar al 100% de agua. Posteriormente se colocaron en solución de Bouin (25 ml de solución saturada de ácido picrico, 25 ml de formol al 40% y 5 ml de ácido acético) durante 1 hora a 56°C. Se dejaron enfriar y se lavaron con agua corriente hasta eliminar el color amarillo. Una vez lavadas las muestras se colocaron en hematoxilina de Weigert durante 5 minutos. Se lavó con agua corriente durante 10 minutos y después con agua destilada. Posteriormente se agregó colorante Escarlata de Biebrich-Fuccina ácida (90 ml de Escarlata de Biebrich al 1%, 10 ml de

Fuccina ácida al 1% y 1 ml de ácido acético glacial) durante 10 minutos, se enjuagaron con agua destilada y se colocaron en solución de ácidos (ácido fosfotungstico al 2.5% y ácido fosfomolibdico al 2.5%). Después de colocaron en Azul de anilina (azul de anilina al 2.5% y ácido acético glacial al 2%), se lavó con agua destilada y se colocó ácido acético al 1% durante 1 minuto para finalmente deshidratar y montar las muestras.

### **Determinación de proteínas**

Las proteínas se cuantificaron con el método de Lowry modificado (83).

Se prepararon tres soluciones: Sol. A ( $\text{NaOH}_3$  al 1%), Sol. B (tartrato de sodio y potasio al 1%) y Sol. C ( $\text{CuSO}_4$  al 0.5%).

Las mitocondrias aisladas de riñón se diluyeron 1:100 en solución fisiológica ( $\text{NaCl}$  al 0.9%) y se determinó la proteína con 100  $\mu\text{l}$  de esta solución por duplicado. Paralelamente se preparó una curva de calibración con albúmina de suero bovino (ASB) a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de la siguiente manera: se colocaron 0, 10, 20 y 40  $\mu\text{l}$  de la solución de ASB en tubos de ensayo y se llevaron a 100  $\mu\text{l}$  de solución salina y se adicionó 1 ml de la mezcla hecha con las soluciones A (10 ml), B (100  $\mu\text{l}$ ) y C (100  $\mu\text{l}$ ). Después de 10 minutos de incubación se adicionan 100 ml de Folin 1N (Sigma) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. El registro de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro a 750 nm. La curva de calibración que corresponde a la absorbancia en función de las concentraciones utilizadas de ASB es lineal y obedece a la ley de Beer Lambert, lo que permite determinar la concentración de proteína presente en las muestras mitocondriales.

### **Potencial transmembranal en la mitocondria**

La tetrametilrodamina metil-éster (TMRM) pertenece a un grupo de cationes lipofílicos tales como la rodamina 123, la tetrametilrodamina etil éster (TMRE), la safranina, y el tetrafenilfosfonium (TPP), los cuales son compuestos que se acumulan en la matriz mitocondrial (84).}

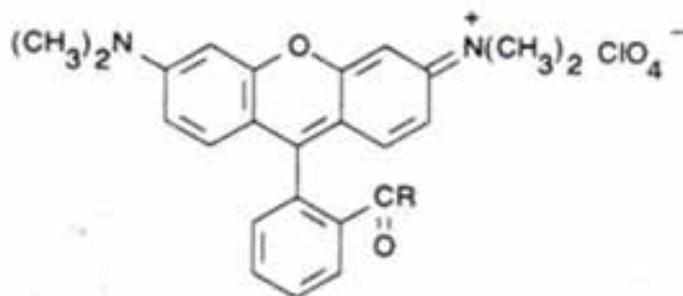


Fig 6. Estructura química de la tetrametilrodamina metil-ester (TMRM).

Cuando se activa la cadena respiratoria mitocondrial se forma un gradiente de protones y el lado interno de la matriz mitocondrial es el que queda con una carga negativa, debido a la translocación de los  $H^+$  a través de los complejos I III y IV hacia el espacio intermembranal. Esta diferencia de carga hace que la TMRM se desplace del espacio intermembranal hacia el lado interno de la membrana interna mitocondrial, lo que se traduce en un “quenching” o apagamiento de la fluorescencia. El cambio de la fluorescencia se detectó en un espectrofluorómetro marca Perkin-Elmer, modelo LS-50-B con un software FL WinLab, con agitación magnética y baño de agua a 30 °C. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 550 y 590 nm respectivamente; las ranuras para el paso de luz (slit) fueron de 6 nm tanto en la emisión como en la excitación.

En una celda de cuarzo conteniendo 1.95 ml de una solución que contenía: KCl 130 mM, HEPES 25 mM, EGTA 0.1 mM,  $KH_2PO_4$  10 mM a pH 7.4 se adicionaron 0.5 mg de proteína mitocondrial y 2  $\mu$ l de TMRM (2  $\mu$ M). Se comenzó la lectura de la fluorescencia y se obtuvo la línea basal en aproximadamente 2 minutos, posteriormente se adicionó piruvato/malato 10 mM como sustrato del complejo I o succinato 10 mM como sustrato del complejo II de la cadena respiratoria generando así un potencial transmembranal y finalmente para abatir este potencial se adicionaron 2  $\mu$ M de CCCP o ácido oleico a diferentes concentraciones.

Para poder medir la actividad de la UCP2 por este método se adicionaron 500  $\mu$ M de GDP como inhibidor de la proteína.

## **Análisis de los AGNEs por cromatografía de gases (CG)**

La determinación y la concentración de los AGNEs se realizó según el método de Folch (85) con una mezcla de cloroformo-metanol (2/1 v/v) que contenía 0.002% de BHT como antioxidante (Butil-hidroxitolueno, SIGMA) y se llevó a cabo en tres etapas:

1.- Extracción: Se utilizó 1 mg de proteína mitocondrial a la cual se le adicionaron 20  $\mu$ l de ácido margárico (C:17) como estándar interno (1  $\mu$ g/ $\mu$ l), 1 ml de metanol y se agitó con vortex durante 30 segundos; se agregaron 2 ml de cloroformo y se agitó con vortex durante 30 segundos. Posteriormente se agregó 1 ml de solución salina al 0.9% y se agitó con vortex 30 segundos, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos y se recuperó la fase de cloroformo (fase orgánica). Se adicionaron 200  $\mu$ l de metanol para clarificar la muestra y sulfato de sodio para eliminar los residuos de agua; se filtró sobre algodón y se evaporó con gas nitrógeno de alta pureza. Todos los pasos excepto la evaporación se realizaron en hielo.

2.- Derivatización: Al residuo lipídico se le agregaron 1 ml de metanol, 100  $\mu$ l de 2,4-dimetoxipropano (Sigma) y 10  $\mu$ l de ácido sulfúrico (Sigma) se agitó con vortex durante 30 segundos; la reacción se realizó a temperatura ambiente durante 15 minutos . Se agregó 1 ml de solución salina al 5%, 2 ml de hexano, se agitó con vortex durante 30 segundos y se centrifugaron las muestras a 3000 rpm durante 2 minutos. Se recuperó la fase orgánica (hexano) y se repitió la extracción 2 veces. Finalmente se evaporó el hexano con gas nitrógeno a temperatura ambiente.

3.- Cromatografía de gas: El residuo lipídico fue disuelto en 100  $\mu$ l de hexano se agitó con vortex y se analizó una fracción de esta solución por el cromatógrafo de gases (86). El cromatógrafo utilizado fue un GC-2010 marca Shimadzu 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 y se utilizó gas helio como acarreador de la muestra a una presión de 2 Kg/cm<sup>2</sup>. La detección se realizó por medio de la flama de H<sub>2</sub>. Los picos de cada ácido graso fueron cuantificados gracias

a la comparación de su tiempo de retención. La cuantificación se realizó gracias a la presencia de un estándar interno, que en este caso fue el ácido margárico.

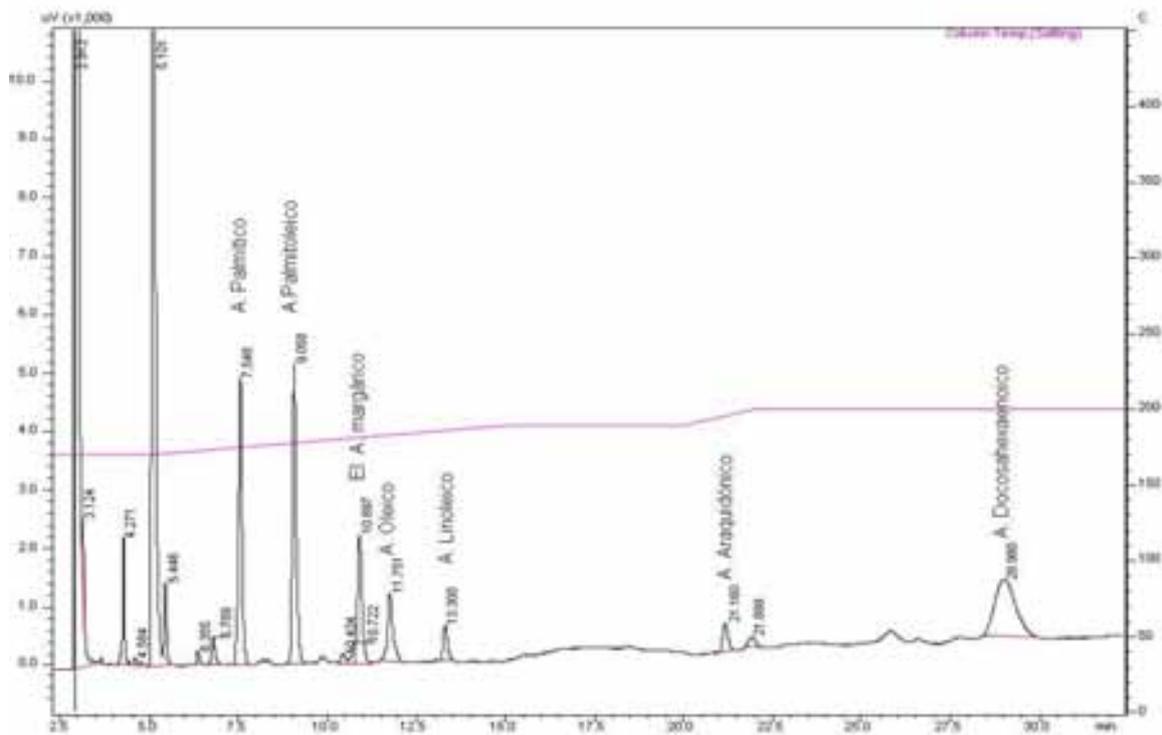


Fig 7. **Cromatograma.** La figura muestra diferentes picos que corresponden a los siete ácidos grasos detectados en una muestra control. (EI= estándar interno)

### **Análisis de la UCP-2 por Western Blot**

Una vez que se obtuvieron las mitocondria se les adicionó una mezcla de antiproteasas (5µg/ ml de PMSF, 5µg/ml de leupeptina, 2 µg/ml de pepstatina y 1µg/ml de aprotonina A) para descartar la degradación de proteína. Posteriormente 60 µg de proteína fueron depositados en geles SDS-PAGE al 12% y se realizó la electroforesis a 120 V durante 3 horas en un buffer de Tris-Glicina-SDS a pH 8.3 a 4°C.

Después de la corrida, el gel se transfirió a una membrana de PVDF (Millipore) durante 60 minutos a 350 mA utilizando un buffer de Tris-Glicina y Metanol al 10% sin ajustar el pH a 4°C. Posteriormente la membrana se incubó durante toda la noche a 4°C con solución bloqueadora que contenía TBS-Tween (Tris-HCl 10 mM, NaCl 10 mM, Tween 0.1%) y leche descremada al 5%. Al término del bloqueo se

eliminó el exceso de leche con TBS-Tween y se incubó con el anticuerpo primario anti UCP-2 de cabra (Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:400 en solución de TBS y leche descremada al 3%, la membrana se incubó durante 4 horas a 4°C, posteriormente la membrana se lavó 3 veces con TBS-Tween y se incubó con el anticuerpo secundario IgG anti-cabra de conejo conjugado con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1:5000 en solución de TBS y leche descremada al 3% durante 2 horas a temperatura ambiente. Concluido el tiempo de incubación, la membrana se lavó 5 veces con TBS-Tween y se cubrió durante 3 minutos con una mezcla del reactivo para revelar por quimioluminiscencia (Chemiluminescent HRP Substrate Immobilon TM Western, Millipore), se eliminó el exceso de los reactivos y se expuso a una placa de autorradiografía (Biomax MR Film, Kodak) durante 5 minutos.

Posteriormente la membrana fue incubada con anti TAN (translocador de adenin nucleótidos) de cabra (Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:3000 y posteriormente con el anticuerpo secundario IgG anti-cabra de conejo conjugado con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1:5000, como control de carga para determinar que las muestras fueron cargadas con la misma cantidad de proteína.

El análisis de imágenes se realizó por densitometría utilizando el programa de computo ImageJ, desarrollado por la National Institutes of Health.

### **Cuantificación de malondialdehído (MDA) por HPLC**

El índice de lipoperoxidación se midió por el método convencional de TBARS. Para 2 mg de proteína mitocondrial o 100 µl de orina; se adicionaron 50 µl de metanol con BHT al 4% más 1 ml de buffer de fosfatos (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 150 mM) a pH 7.4, se mezclaron con vortex durante 30 segundos y se incubaron en baño maría a 37°C durante 30 minutos. Finalizada la incubación, se adicionó 1 ml de ácido acético al 20% a pH 2.5, 1.5 ml de ácido tiobarbitúrico al 0.8%, el cual se preparó al momento. La formación de TBARS se realizó incubando las muestras en baño maría a 100°C durante 1 hora.

Para detener la reacción, los tubos se colocaron en hielo y se adicionó 1 ml de KCL al 5% y 5 ml de n-butanol (SIGMA) y se agitó con vortex durante 30 segundos.

Las muestras se centrifugaron a 2000 rpm a temperatura ambiente durante 2 minutos y se recuperó la fase orgánica

Las muestras se filtraron a través de una membrana de poro 45  $\mu\text{m}$  y se depositaron 50  $\mu\text{l}$  en el inyector del HPLC. La  $\lambda$  de excitación y emisión se calibraron a 532 y 553 respectivamente (87, 88). Se utilizó una columna Resolve<sup>TM</sup> C18 90 Å 5  $\mu\text{m}$  de 3.9 x 150 mm (Waters).

La cuantificación se realizó con una curva de calibración utilizando tetraetoxipropano como estándar, el cual se convirtió en un MDA cuando se trató del mismo modo que las muestras.

### Cuantificación de la generación de EROs en mitocondrias de riñón

Durante la oxidación de sustratos como el succinato o el piruvato/malato por la cadena respiratoria mitocondrial (CRM), se genera  $\text{O}_2^-$ , el cual es rápidamente dismutado por la MnSOD que lo convierte en  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el cual difunde libremente hacia fuera de la matriz mitocondrial. La detección del  $\text{H}_2\text{O}_2$  se realizó por medio de la oxidación del 2, 7-dihidroclorofluoresceína en presencia de peroxidasa (89).

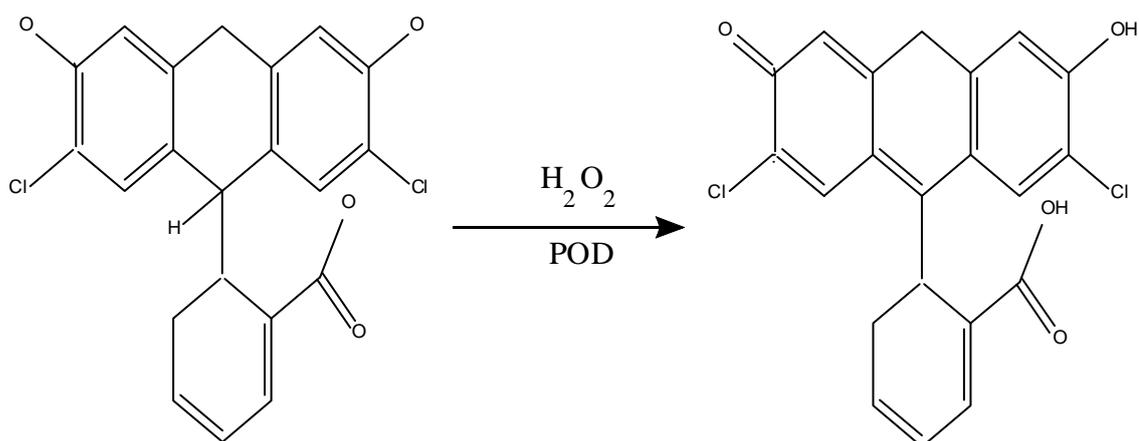


Fig 8. **Detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por fluorescencia.** El esquema muestra la manera que el DCF hidrolizado utiliza la peroxidasa para detectar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, En el momento que interacciona con el cambia su carga y emite fluorescencia. (POD=peroxidasa)

El equipo que se utilizó fue un espectrofluorómetro Perkin-Elmer modelo LS-50-B con un software FL WinLab, agitación magnética y baño de agua a 30 °C y las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 475 y 525 respectivamente; las ranuras para el paso de luz se seleccionaron de 8 nm tanto en la excitación como en la emisión.

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,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM y  $\text{MgCl}_2$  3mM a pH 7.4, se adicionaron 5  $\mu\text{l}$  de albúmina de suero bovino (ASB), 0.5 mg de proteína mitocondrial, DCF-hidrolizado 100 nM y 100 ng de peroxidasa (POD). Se inició la medida de la fluorescencia y se obtuvo la línea basal después de 2 minutos, posteriormente se adicionó succinato 10 mM para inducir el estado 4 de la respiración, después de 3 minutos se adicionó ADP 250 nM para determinar la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el estado 3.

### **Determinación de la actividad de catalasa y superóxido dismutasa**

Las muestras de mitocondrias y de homogeneizado de riñón se analizaron por electroforesis en un gel nativo PAGE (sin SDS) al 8%, en un buffer de tris-glicina a pH 8.3 durante 4 horas a 120 V.

Para la determinación de la catalasa, el gel se lavó 3 veces durante 5 minutos con agua destilada, posteriormente se incubó con una solución de agua oxigenada (20 mM). Después se incubó con una mezcla de revelado que contenía 1% de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  y 1% de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , durante 10 minutos en la oscuridad. Finalmente se detuvo la reacción con agua destilada. El gel se tiñó de azul excepto las bandas que corresponden a la actividad de la catalasa.

Se utilizó catalasa comercial (SIGMA) a una concentración de 100 ng como estándar.

Para la determinación de la SOD, después de la electroforesis, el gel se incubó con una solución que contenía NBT 2.45 mM (azul de tetrazolio) (SIGMA) durante 20 minutos, pasado este tiempo se incubó con una solución que contenía EDTA 28 mM, riovflavina 0.028 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  36 mM a pH 7.6 durante 5 minutos. Finalmente se expuso a la luz blanca durante 5 minutos. Se detuvo la reacción con agua destilada.

El gel se tiñó color morado excepto las bandas correspondientes a la actividad de la superóxido dismutasa.

Se utilizó CuZnSOD de bovino a una concentración de 100 ng como estándar.

El análisis de imágenes se realizó por densitometría utilizando el programa de computo ImageJ, desarrollado por la National Institutes of Health. Los resultados están expresados en porcentaje de los pixeles.

### **Cuantificación de ubiquinol y alfa-tocoferol por HPLC.**

La determinación de la CoQ y la vitamina E, se realizó en 2 partes:

1. Extracción: En un tubo de vidrio se colocaron 5 mg de proteína mitocondrial y se adicionaron 4 ml de metanol que contenía 0.002% de BHT para evitar la oxidación de la muestra y se agitó con vortex durante 1 minuto; posteriormente se adicionaron 3 ml de éter de petróleo (-20°C) (Baker) y se agitó con vortex durante 1 minuto, posteriormente se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos. La fase orgánica (éter de petróleo) se transfirió a otro tubo de vidrio y se repitió la extracción 2 veces más.

Finalizada la extracción, a los extractos se les adicionaron 2 ml de metanol al 95% y se agitó en vortex suavemente durante 30 segundos. El éter de petróleo se evaporó con gas nitrógeno de alta pureza.

2. Cromatografía. El extracto se disolvió en 200 µl de metanol-etanol (1:1) y se filtró a través de una membrana con poro de 0.45 µm. Se introdujeron 50 µl de la muestra filtrada en el inyector del HPLC (90).

El detector electroquímico se programó a +550 mV para la detección de la coenzima Q en su estado reducido y simultáneamente el alfa-tocoferol. La velocidad del flujo fue de 1ml/min de la fase móvil (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, ácido octanosulfónico 0.05 mM a pH 3). Se utilizó una columna Nova-Pak® C<sub>18</sub> de 3.9 x 150 mm (Waters).

Los estándares utilizados fueron CoQ oxidada (1.1 µmol), CoQ reducida (110 nmol) y alfa-tocoferol (10 µmol). La reducción de la CoQ se realizó adicionando 9.57 mg de ditionita disuelta en agua por 110 nmol de CoQ, se incubó durante 30 minutos

con agitación suave en la oscuridad y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante.

### **Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron aplicando la prueba de "t" de Student para grupos no apareados, para ello se utilizó el programa estadístico Sigma Plot 9.0. Los resultados numéricos están representados como la Media  $\pm$  Desviación Estándar. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p < 0.05$ .

## VIII. RESULTADOS

### Características generales de los animales

Finalizado el tratamiento de 24 semanas con sacarosa al 30%, los animales con SM, tuvieron un peso corporal significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) con respecto a los controles lo cual está asociado con el aumento en la grasa retroperitoneal, la cual fue significativamente mayor en la rata con SM (Tabla II).

El consumo de sacarosa indujo un incremento en los niveles de triglicéridos e insulina ( $p < 0.05$ ), mientras que los niveles de glucosa se mantuvieron constantes.

Con estos datos podemos corroborar que las ratas cumplen con al menos 4 características que definen el SM.

**Tabla II. Características generales de los animales**

	Control	SM	P
Peso corporal (g)	440 ± 29	526 ± 57	< 0.05
Grasa retroperitoneal (g)	2.87 ± 0.8	15.3 ± 5.2	< 0.05
Triacilgliceroles (mM)	0.50 ± 0.10	1.22 ± 0.32	< 0.05
Glucosa (mM)	6.22 ± 0.12	5.63 ± 0.52	NS
Insulina (pM) <sup>α</sup>	106.8 ± 17.4	285.2 ± 53.5	< 0.05

Los valores representan la media ± la DE (n=4 animales diferentes) (<sup>α</sup>n=6 animales diferentes)

### Función renal

El daño renal se evaluó en vivo por la determinación de proteinuria y el índice de depuración de creatinina.

Las ratas con SM aumentaron significativamente ( $p < 0.05$ ) sus niveles de creatinina sérica con respecto a los animales controles, mientras que el índice de depuración es significativamente inferior en los animales con SM con respecto los controles, lo que clínicamente indica daño renal. Esto se corroboró midiendo la excreción de proteína total en donde se observó que los animales con SM tuvieron

una excreción significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) de proteína total con respecto a los controles (Tabla III).

**Tabla III. Función renal de los animales**

	Control	SM	P
Proteinuria (mg/24hr)	10.65 ± 5.66	18.545 ± 4.18	< 0.05
Creatinina urinaria (µg/ml)	17.24 ± 8.67	7.076 ± 4.41	< 0.05
Creatinina sérica (µg/mL)	0.0530 ± 0.007	0.4654 ± 0.24	< 0.05
Depuración (mL/min)	2.275 ± 1.72	0.327 ± 0.40	< 0.05

Los valores fueron expresados como la media ± la DE (n= 5 animales diferentes)

### Análisis histológico del riñón

Para corroborar los datos anteriores, se realizaron cortes histológicos y se sometieron a la tinción de Masson-Goldner (Tricrómico de Goldner), la cual se basa en el uso de distintos colorantes. Los resultados muestran que los animales con SM, tuvieron cambios estructurales a nivel de glomérulo como engrosamiento de la membrana basal, acumulación de matriz extracelular, pérdida de podocitos, siendo todas estas estructuras que juegan un rol importante para que se lleve a cabo filtración de proteínas a nivel de la cámara de Bowman.

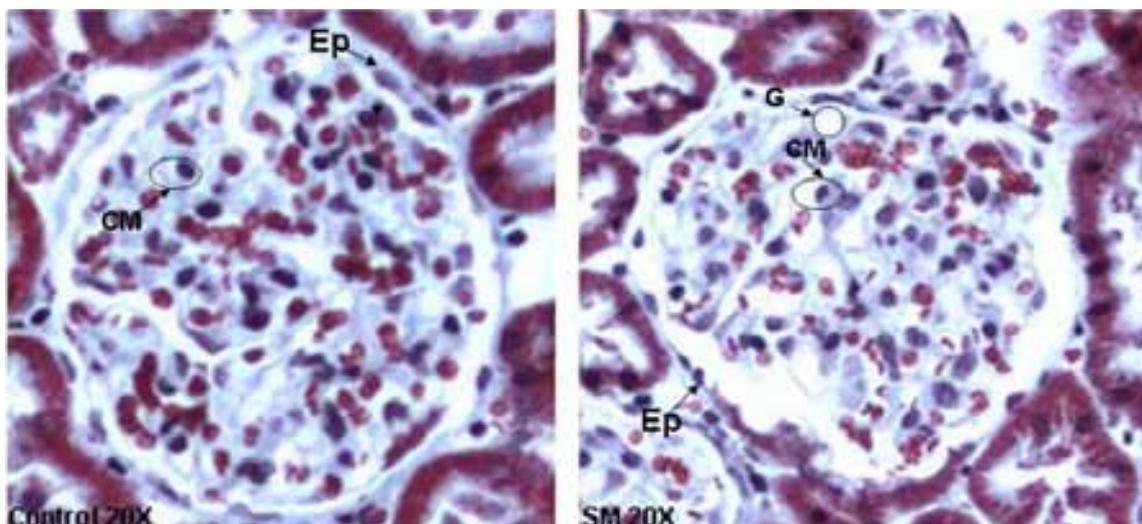


Fig. 9 **Tinción de Masson-Goldner** El glomérulo control muestra integridad estructural, el epitelio (Ep) se mantiene íntegro y las células mesangiales (CM) no se encuentran aglomeradas. El glomérulo con SM, muestra pérdida del epitelio y fusión de las células mesangiales, así como la presencia de vesículas de grasa.

También se observó que los glomérulos de las ratas con SM, perdieron la fenestración del endotelio y el lumen de los capilares estaba reducido en estos animales en comparación con los controles.

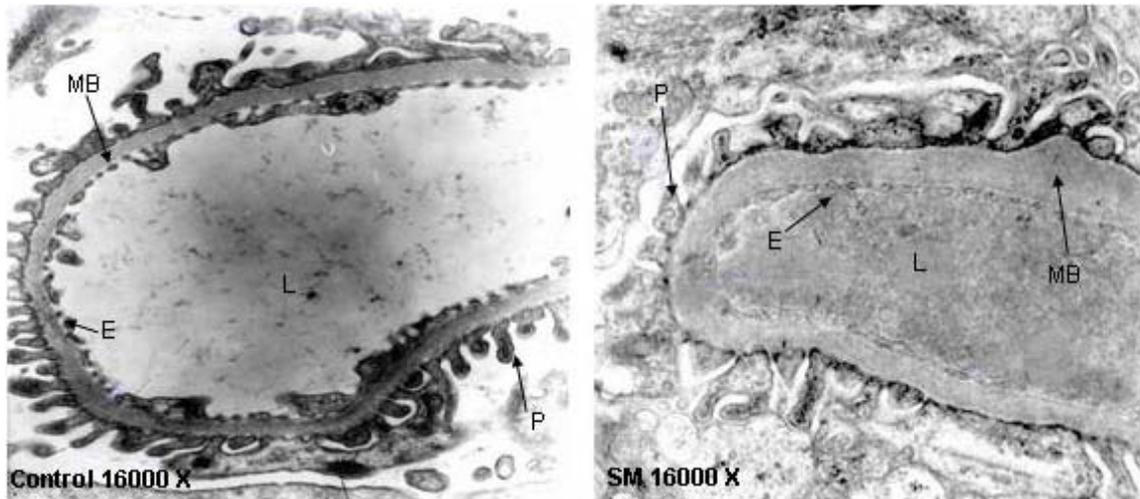


Fig. 10 **Microscopía electrónica de transmisión.** Las fotografías muestran que los glomérulos de animales controles (1) tienen una morfología normal, el endotelio (E), células podocíticas definidas y la membrana basal (MB) delgada, mientras que el glomérulo de animales con SM (2) hay pérdida de los podocitos, engrosamiento de la membrana basal y el endotelio se encuentra fusionado.

### **Análisis de los AGNEs en el riñón**

La composición de AGNEs en el homogeneizado y mitocondrias de riñones controles y con SM se determinaron por cromatografía de gases. Se identificaron siete ácidos grasos (Tabla IV) de los cuales se obtuvo un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en el ácido palmítico, palmitoleico y oleico, en el homogeneizado de riñón de animales con SM respecto a los controles, mientras que las concentraciones del ácido linoleico disminuyeron significativamente ( $p < 0.05$ ) en animales con SM y el ácido esteárico, araquidónico y docosahexanoico se mantuvieron similares en ambos grupos. La concentración total de AGNEs se ve significativamente incrementada en riñón de animales con SM en comparación con el control.

En mitocondrias no hubo diferencias significativas en ninguno de los siete AGNEs analizados.

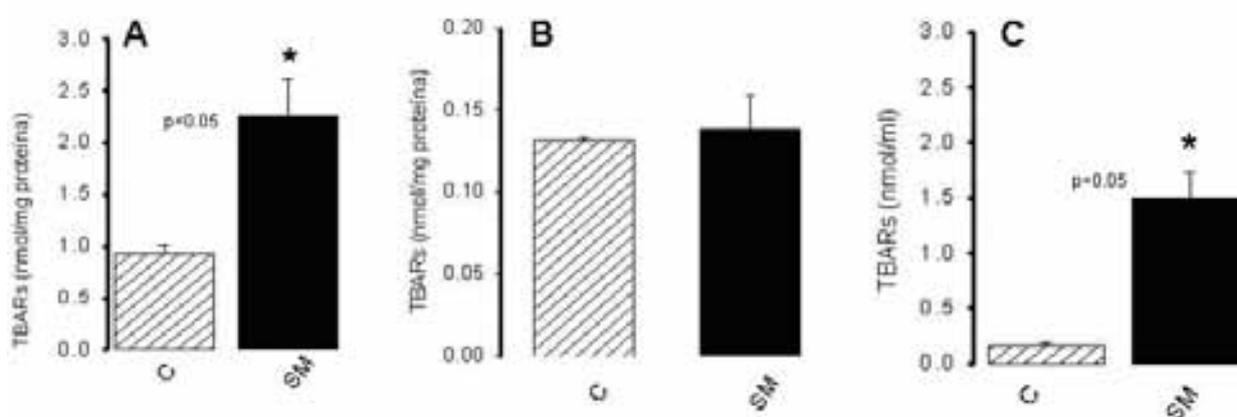
**Tabla IV. Ácidos grasos no esterificados en mitocondrias y en homogeneizado de riñón.**

AGNE	Mitocondria		Homogeneizado	
	Control	SM	Control	SM
Palmítico (C16:0)	23.46 ± 1.95	26.56 ± 3.91	28.86 ± 2.97	42.04 ± 6.76*
Palmitoleico (C16:1)	0.23 ± 0.23	0.27 ± 0.17	4.51 ± 4.34	11.83 ± 1.91*
Estearico (C18:0)	19.85 ± 1.2	20.3 ± 3.30	19.33 ± 3.25	21.29 ± 3.9
Oleico (C18:1)	3.88 ± 0.6	4.7 ± 1.93	28.71 ± 3.9	41.17 ± 10.87*
Linoleico (C18:2)	7.43 ± 1.3	6.16 ± 1.56	27.32 ± 3.27	18.21 ± 5.16*
Araquidónico (C20:4)	9.44 ± 1.66	9.78 ± 2.52	23.59 ± 5.07	28.51 ± 3.30
Docosahexaenoico	0.78 ± 0.39	0.88 ± 0.39	0.95 ± 0.40	1.58 ± 1.35
Cantidad total	66.9 ± 5.0	70.32 ± 9.36	133.99 ± 17.89	164.01 ± 28.28*

Los valores se reportan en nmol/mg de proteína tanto en mitocondrias como en homogeneizado. Los valores se expresan como la media ± la DE (n= 5 animales diferentes) (p<0.05)

### Estrés Oxidativo

El síndrome metabólico inducido por el alto consumo de sacarosa produjo un aumento significativo (p<0.05) en los niveles de MDA en el homogeneizado de riñón y en la orina (Fig. 11A, 11C), lo que indica un estrés oxidativo en los animales con síndrome metabólico. Por otro lado en las mitocondrias de riñón no se encontró diferencia significativa en los niveles de MDA (Fig 11B).



**Fig 11. Niveles de MDA en el homogeneizado de riñón (A), en mitocondrias de riñón (B) y en orina de animales con SM en comparación de los controles. Los valores representan el promedio ± DE de 6 experimentos.**

## Actividad de superóxido dismutasa

Se sabe que una de las razones más importantes para que exista estrés oxidativo en los sistemas biológicos es que las defensas antioxidantes se encuentren abatidas y que de esta manera no puedan ser contrarrestadas las EROs generadas durante el SM.

Es por ello que lo siguiente fue medir las actividades de enzimas antioxidantes como la catalasa y la Cu/ZnSOD y MnSOD en mitocondrias y en el homogeneizado de riñón.

La determinación de las actividades de las enzimas catalasa y SOD por la tinción de geles nativos permite evaluar la actividad de las enzimas sin interferencias de otras sustancias (Fig 12). Los geles nativos permiten la separación de dos isoformas de la enzima, la Cu/ZnSOD y la MnSOD.

Los resultados muestran que la actividad de la MnSOD en las mitocondrias control no difiere de las actividades de las mitocondrias de riñón con SM. En cuanto a la actividad de la Cu/ZnSOD estuvo muy incrementada en las mitocondrias de riñón con SM en comparación con la de los riñones control.

En el homogeneizado de riñón las diferencias en las actividades de la Cu/ZnSOD no muestran diferencias entre ambos grupos (Fig. 13).

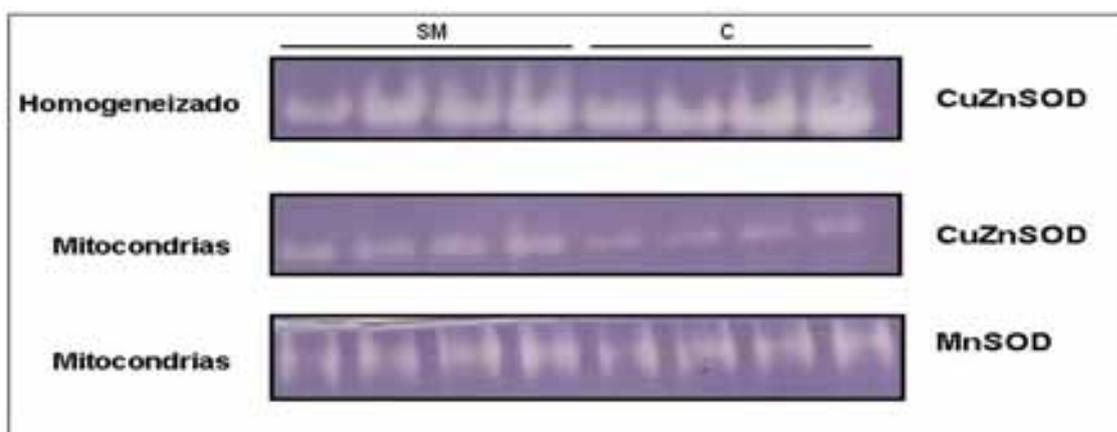


Fig 12. **CuZn y MnSOD**. Los geles muestran la expresión de la CuZnSOD y MnSOD en homogeneizado y mitocondrias de animales control y con SM.

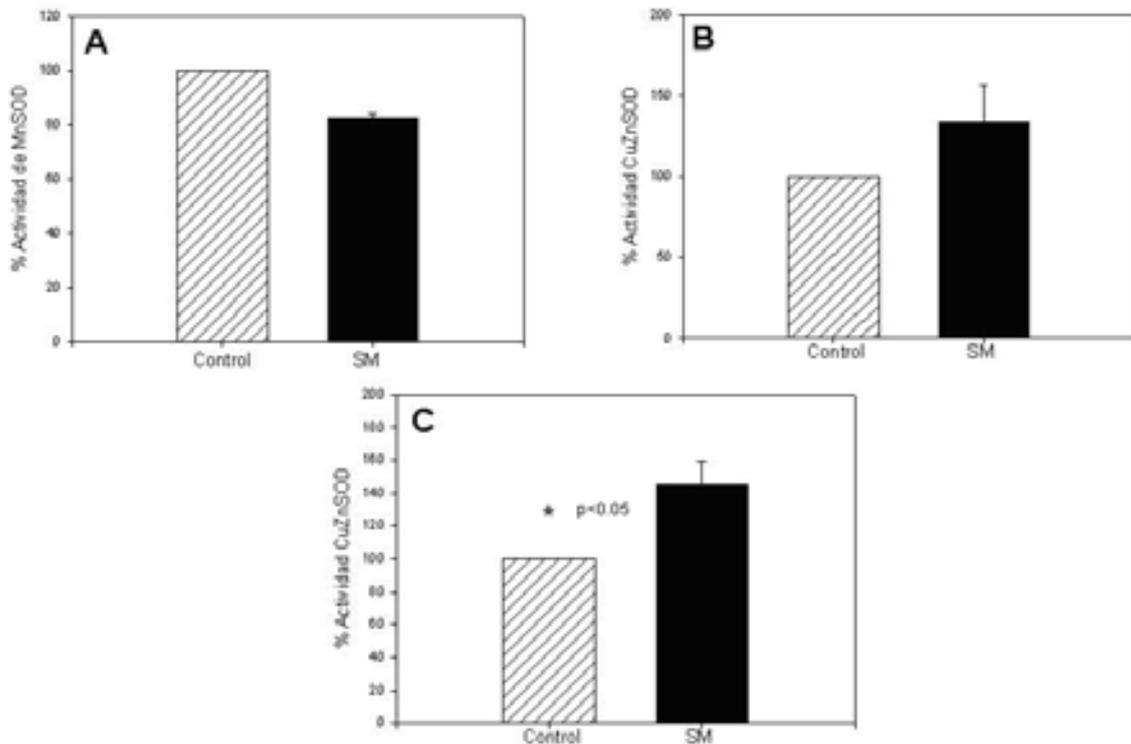


Fig 13. **Actividad de las enzimas antioxidantes** (dado en porcentaje de pixeles). (A) MnSOD mitocondrial, (B) Cu/ZnSOD en homogeneizado y (C) Cu/ZnSOD mitocondrial.

### Actividad de catalasa

Cuando se midió la actividad de la catalasa por tinción de geles nativos (Fig 14), se observó que existe una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en el homogeneizado de riñones de animales con SM (Fig. 15) con respecto a los controles, esto sin duda puede ser motivo para que exista un aumento en las especies reactivas del oxígeno, sobre todo del  $H_2O_2$  que es el sustrato de esta proteína.

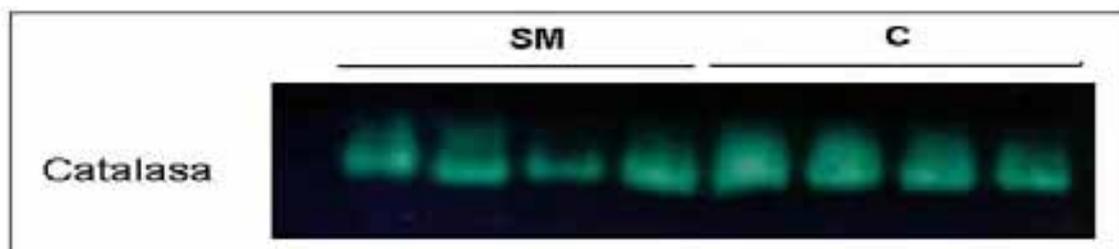


Fig 14. **Gel de Catalasa.** El gel muestra la disminución que existe en la actividad de catalasa en el homogeneizado de riñón de animales con SM.

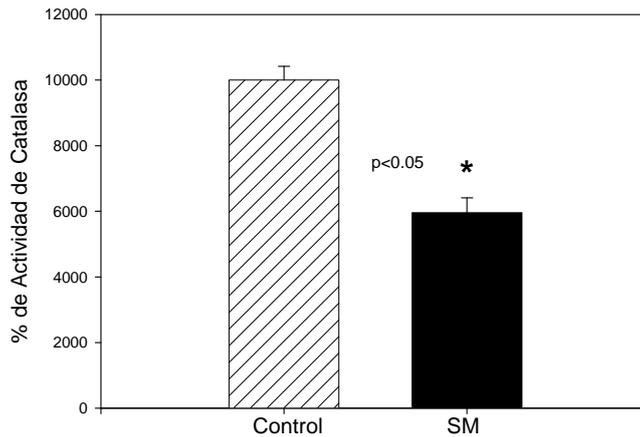


Fig 15. **Actividad de catalasa.** Las barras muestran que la actividad de la catalasa en el homogeneizado de riñones con SM es significativamente menor en comparación con los controles.

### La mitocondria como generadora de estrés oxidativo

La determinación de EROs generados por la mitocondria se realizó mediante la detección de la fluorescencia del DCF-hidrolizado que es sensible a la oxidación. En la figura 16 se observa un trazo representativo de la velocidad de generación de  $H_2O_2$  en presencia de succinato como sustrato oxidativo del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial.

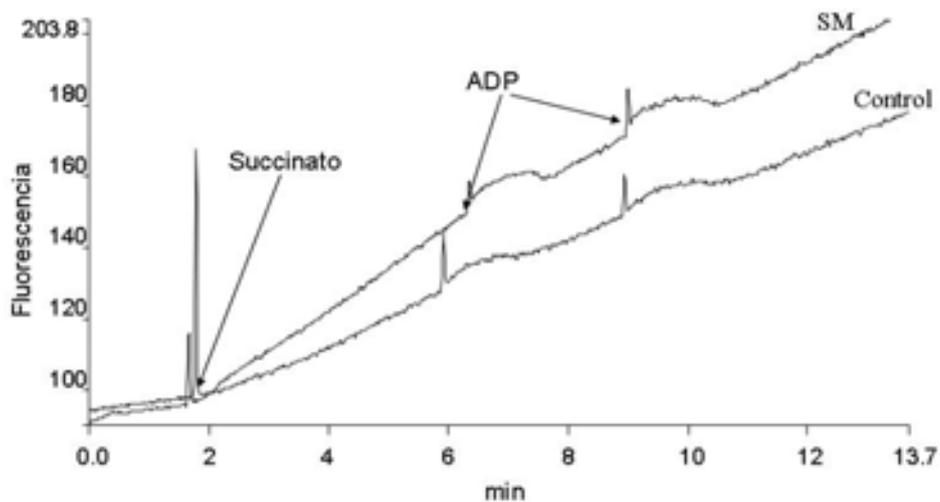


Fig 16. **Cambio de la fluorescencia del DCF en función del tiempo.** La oxidación del DCF refleja la generación de  $H_2O_2$  por las mitocondrias aisladas de riñón oxidando succinato (10 mM).

### Liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por las mitocondrias de riñón

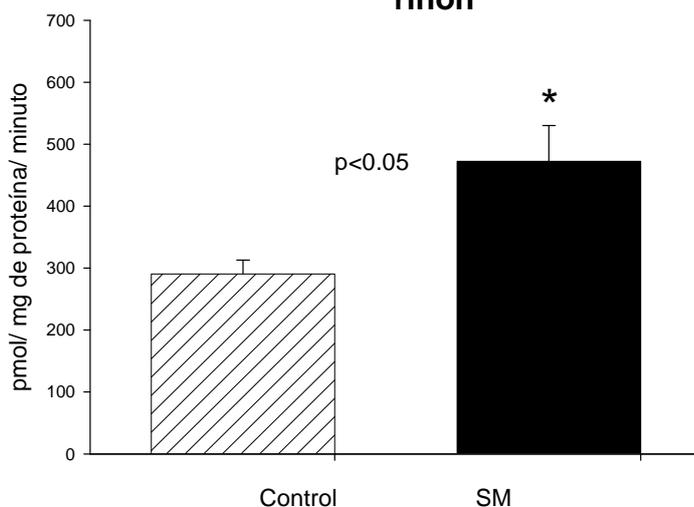


Fig 17 **Velocidad de generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**. La gráfica muestra que hay un aumento significativo en la velocidad de producción de EROs en el estado 4 (oxidando succinato 10 mM) de la respiración por las mitocondrias de riñón de animales con SM. (n=6 experimentos)

La figura 17 resume los resultados obtenidos en cuanto a la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por las mitocondrias de riñón de ambos grupos.

Las mitocondrias de riñón de animales con SM generaron EROs con una velocidad mayor oxidando succinato (10 mM) comparadas con las mitocondrias del riñón control. En presencia de rotenona (4 μM) como inhibidor del complejo I de la CRM, la velocidad de generación de EROs oxidando succinato fueron inhibidos por ambas mitocondrias. (Fig 18)

### Liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por las mitocondrias de riñón: Efecto de la Rotenona

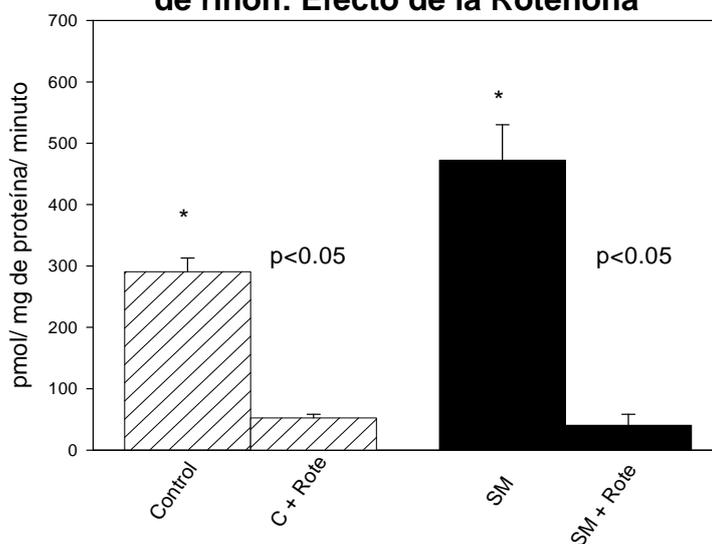


Fig 18. **Disminución en la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, oxidando succinato en presencia de rotenona inhibidor del complejo I de la CRM.**

## Potencial mitocondrial

El potencial mitocondrial esta directamente relacionado con la formación de EROs.

La determinación del potencial transmembranal se realizó por medio de la detección de los cambios en la fluorescencia emitida por la TMRM.

En la figura 19 se muestra un esquema representativo de la generación del potencial transmembranal en presencia de succinato 10 mM (transporte de electrones en reversa) o en presencia de piruvato/ malato 10 mM (transporte de electrones directo). Al adicionar las mitocondrias al minuto 2, se observó una disminución en la fluorescencia que corresponde al “quenching” de la TMRM, que es proporcional a la salida de  $H^+$  de la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal. En el minuto 5 la adición de CCCP (un protonóforo que produce el regreso del  $H^+$  desde el espacio intermembranal hacia la matriz mitocondrial) indujo un aumento en la fluorescencia proporcional al colapso del potencial.

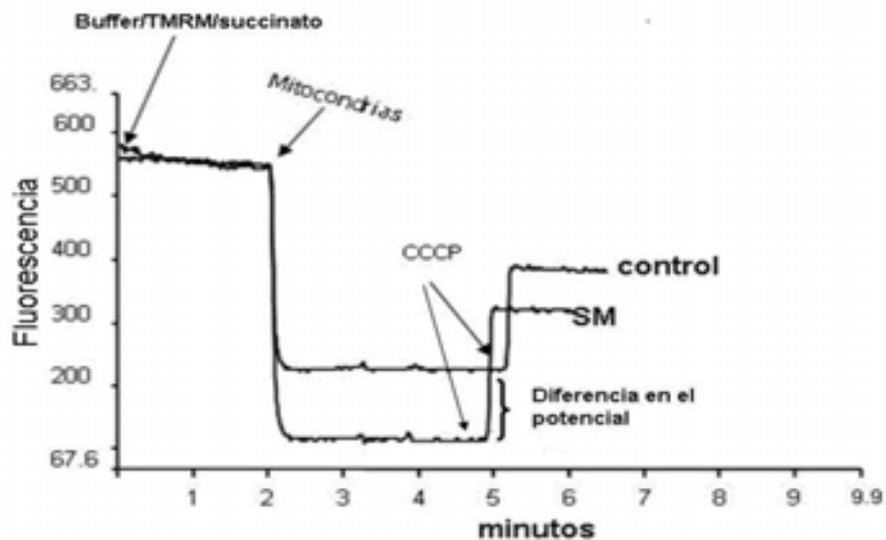


Fig.19. **Potencial transmembranal.** Trazo representativo de la determinación del potencial transmembranal en mitocondrias aisladas.

Las mitocondrias aisladas de riñón con SM oxidando succinato (10 mM) o piruvato/malto tuvieron una disminución de la fluorescencia en presencia de CCCP con respecto a los controles.

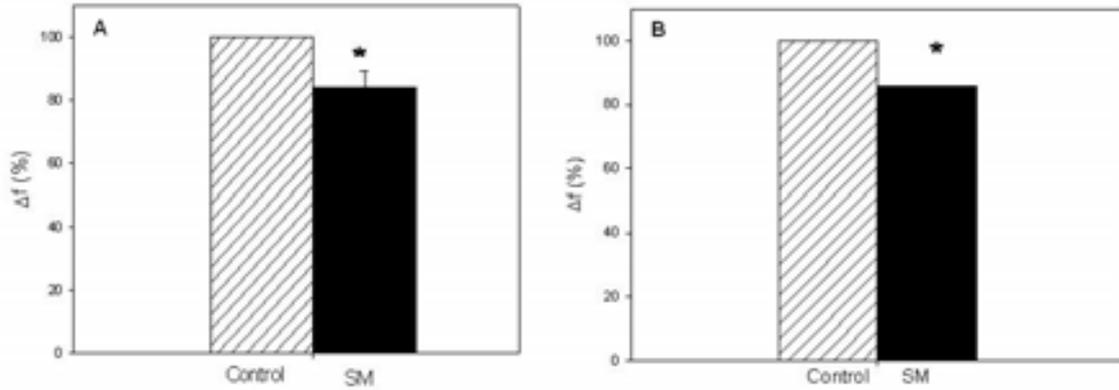


Fig 20. Los histogramas muestran el porcentaje del  $\Delta f$  que generaron las mitocondrias control y SM (A) en presencia de succinato (10 mM) y (B) de piruvato/malato (10 mM). La  $\Delta f$  corresponde a la diferencia entre la fluorescencia después de adicionar CCCP y la fluorescencia antes la adición de CCCP (\*  $p < 0.05$ ).

Así pues en la figura 20 se observa que la  $\Delta f$  es significativamente menor en las mitocondrias con SM con respecto a los controles, después de adicionar CCCP.

### Efecto del ácido oleico sobre la generación de EROs y el potencial transmembranal

Se ha reportado que los AGNEs pueden interaccionar con complejos de la cadena respiratoria mitocondrial o con acarreadores como el TAN. Al interaccionar con complejos respiratorios pueden estar generando estrés oxidativo.

La adición de ácido oleico como ácido graso no esterificado (15  $\mu\text{M}$ ) aumentó de manera significativa la velocidad de generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en mitocondrias de riñones controles y con SM de la misma manera (Fig 21). El ácido oleico se encontró aumentado de manera significativa en los animales con SM.

También se sabe que los ácidos grasos son desacoplantes naturales de la CRM y que lo pueden hacer interaccionando directamente con la membrana o con el TAN.

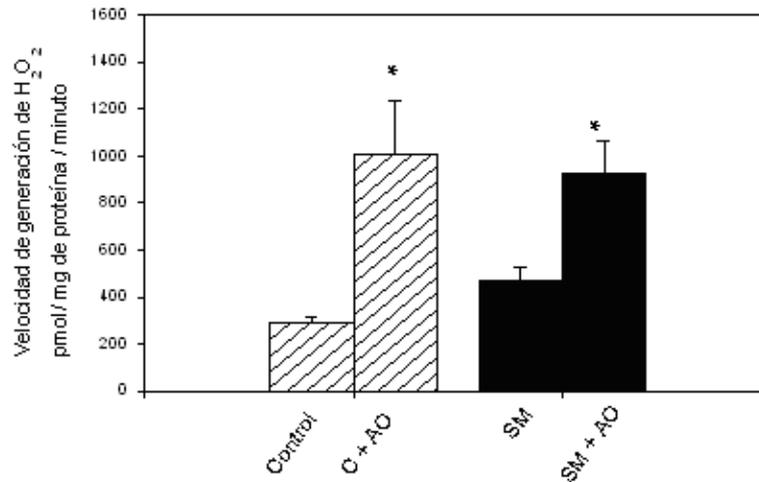


Fig 21. Efecto del ácido oleico sobre el potencial transmembranal. La generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solo aumento de manera significativa en las mitocondrias controles. (\*p<0.05)

La figura 22 muestra que la adición de diferentes concentraciones de ácido oleico reduce la  $\Delta f$  dosis respuesta en las mitocondrias de animales con SM y control, siendo más sensibles los controles al efecto del AGNE.

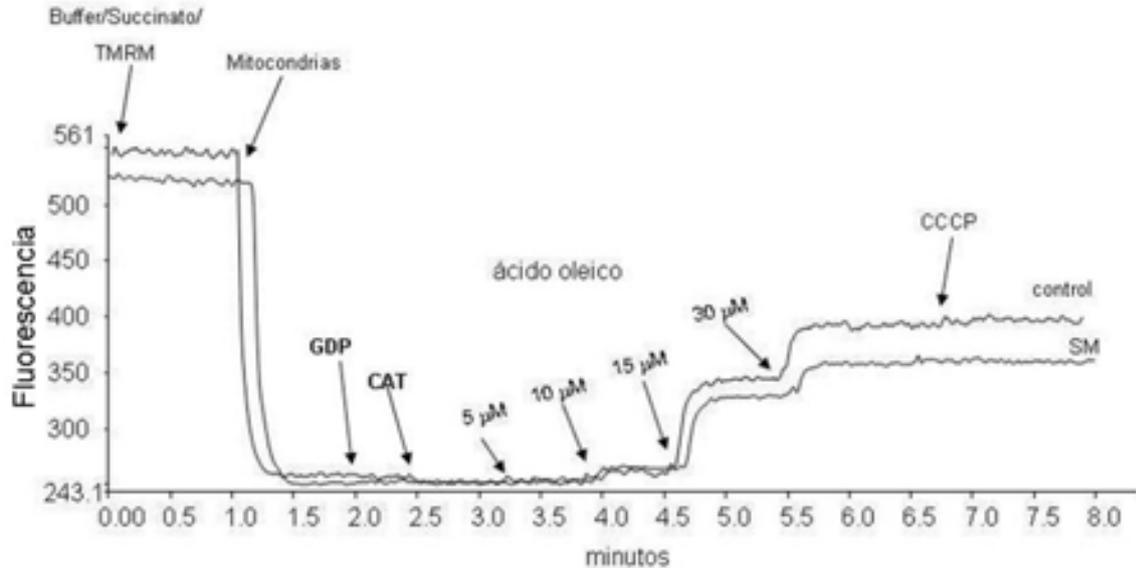


Fig 22. Efecto del GDP, CAT (carboxilatractilósido), y ácido oleico (5, 10, 15 y 30  $\mu$ M) sobre el potencial transmembranal en presencia de succinato.

La adición de 1  $\mu$ M de carboxilatractilósido (CAT) como inhibidor del TAN, nos permitió visualizar que este acarreador tiene una participación importante en la

translocación de ácidos grasos, ya que cuando se adicionó a las mitocondrias en presencia de ácido oleico, el desacoplamiento disminuyó (Fig 22).

### Western Blot de la UCP 2 en mitocondrias de riñón

Se ha descrito que la UCP2 está distribuida en muchos órganos incluyendo el riñón, también se sabe que se expresa en distintas patologías (51, 91). La hipótesis de su función es inducir una fuga de  $H^+$  desacoplando el consumo de  $O_2$  de la síntesis de ATP, disminuyendo así las EROs. En el tejido adiposo café la UCP1 es responsable del desacoplamiento de la CRM, y convertir el gradiente electroquímico en calor.

Utilizando el anticuerpo contra la UCP2, el análisis por Western Blot muestra un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en la expresión de la proteína en animales con SM con respecto a los controles, utilizando en TAN como control de carga (Fig 23).

Cabe mencionar que la expresión del TAN no varió en ninguno de los grupos.

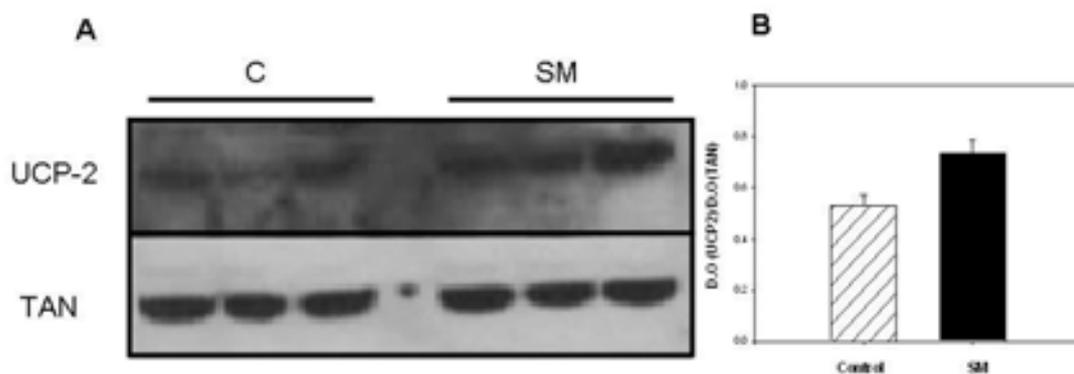


Fig 23. **Expresión de la UCP-2 en mitocondrias de riñón control y con SM.** (A) El gel muestra la UCP2 con un peso molecular aproximadamente de 32 kDa se muestra el gel y al TAN con como control de carga. (B) Los histogramas muestran el aumento significativo en las mitocondrias de riñón con SM en comparación con los controles.

Para establecer la participación de la UCP2 en las mitocondrias de riñón con SM, se determinó el efecto de esta proteína sobre la disminución del metabolismo mitocondrial y sobre la generación de especies reactivas. Esto se determinó usando el GDP (500  $\mu M$ ) como inhibidor de la proteína.

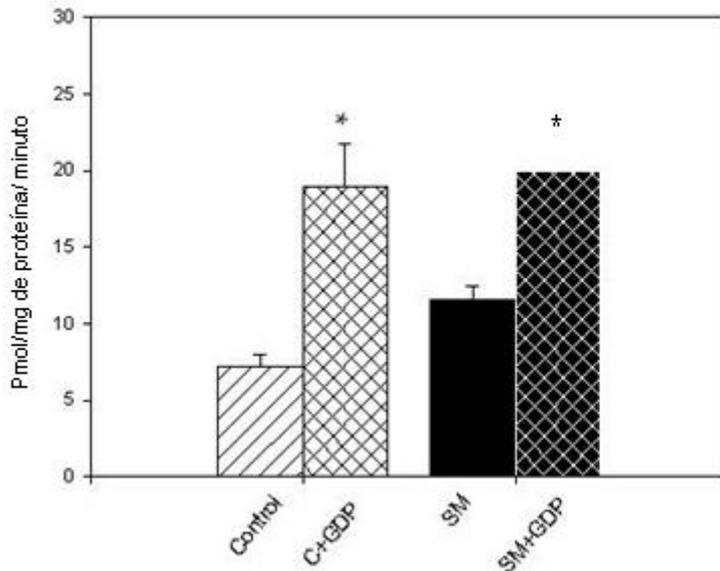


Fig 24. La gráfica muestra que cuando la proteína UCP-2 es inhibida por el GDP (0.50 mM), aumenta la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Así pues se observó que la adición de GDP (500 μM) a las mitocondrias de riñón control y con SM causó un aumento significativo en la velocidad de generación de EROs, aunque no hubo diferencias entre ambos grupos (Fig 24).

Mientras que, cuando analizamos el efecto del GDP sobre el potencial transmembranal, encontramos que en presencia del inhibidor el potencial aumenta de manera muy discreta, lo que confirma la presencia de la UCP-2 (Fig 25).

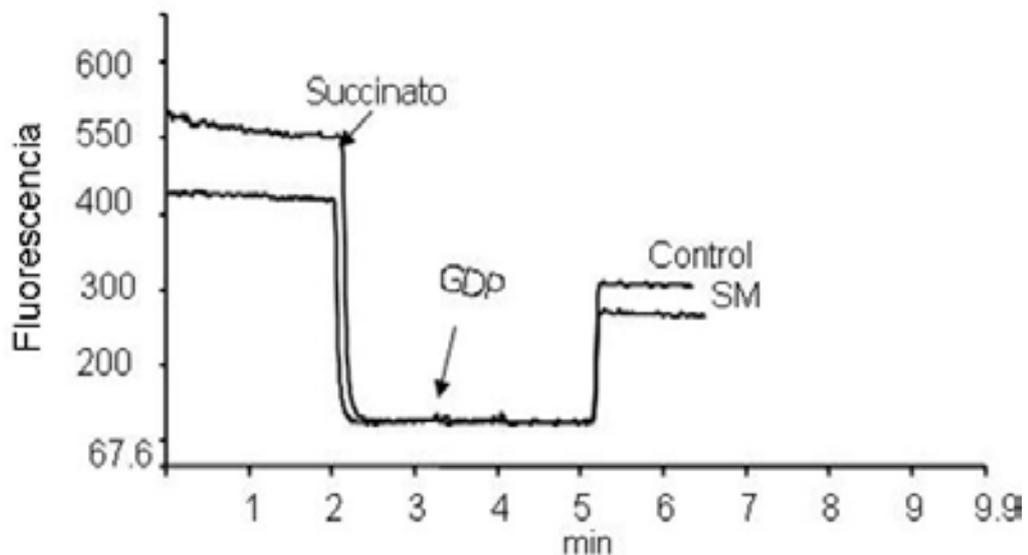


Fig 25. La figura muestra un aumento en el potencial transmembranal tras la adición de 50 mM de GDP como inhibidor de la UCP-2, en presencia de succinato.

## Análisis de CoQ y $\alpha$ -tocoferol

Como se mencionó anteriormente, un estado de estrés oxidativo se debe a la disminución de las enzimas antioxidantes o de moléculas que actúan no enzimáticamente como tal. Es por ello que se analizaron los niveles de CoQ<sub>9</sub> y CoQ<sub>10</sub> en su forma oxidada y reducida por HPLC.

La figura 28A muestra que existe una disminución en la concentración de CoQ<sub>9</sub> reducida en las mitocondrias de riñón de animales con SM en comparación a los controles. Mientras que la CoQ<sub>10</sub> no muestra cambios en ambos grupos.

El análisis de la forma oxidada de la CoQ, también se realizó, ya que es ésta la que funciona como cofactor de las UCPs (92).

Los resultados muestran que tanto la CoQ<sub>9</sub> como la CoQ<sub>10</sub> en su forma oxidada no presentan cambios en ninguno de los dos grupos (Fig 28B).

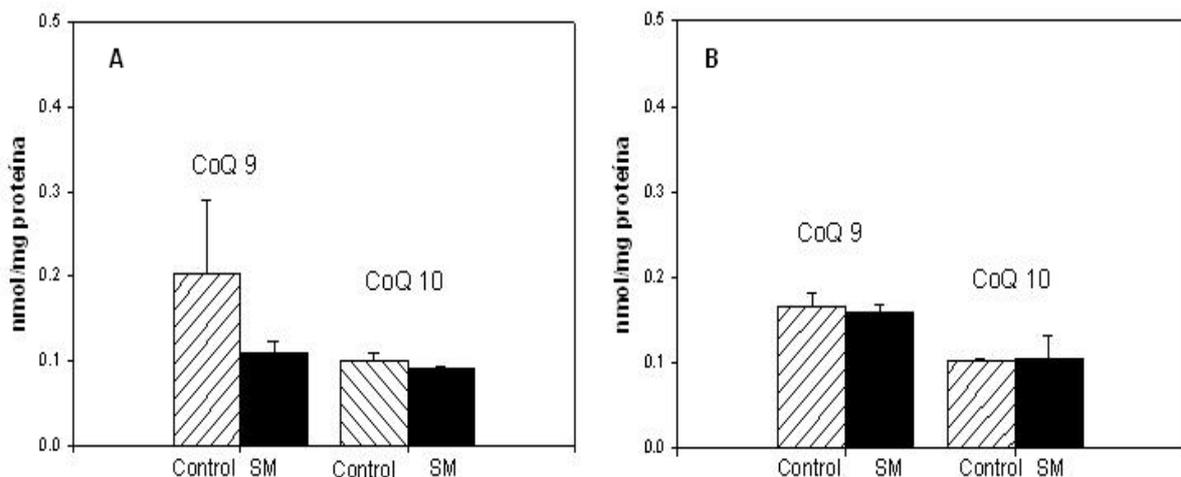


Fig 26. **Concentraciones de CoQ<sub>9</sub> y CoQ<sub>10</sub> en mitocondrias de riñón.** Se muestran las formas (A) reducidas y (B) oxidadas de las coenzimas.

En cuanto a los niveles de  $\alpha$ -tocoferol detectados mediante HPLC, no se observaron diferencias entre las mitocondrias de riñón de animales control y SM (Fig 28).

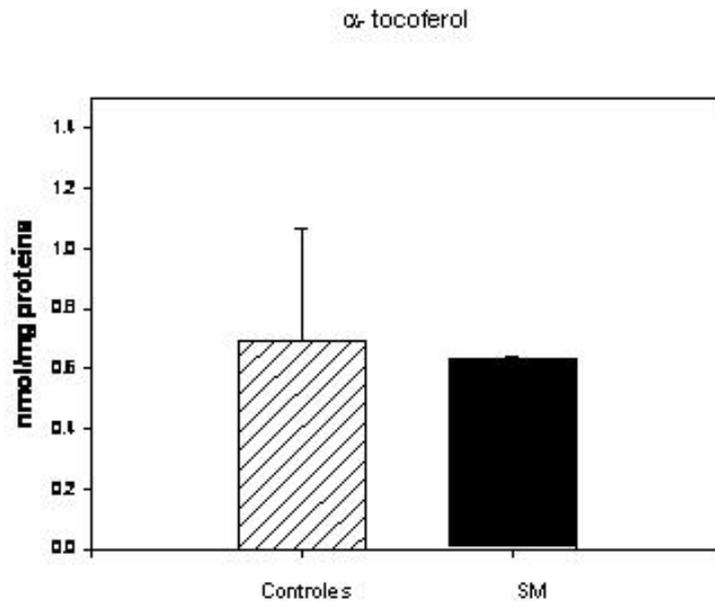


Fig 29. Concentraciones de alfa-tocoferol en mitocondrias de riñón.

## IX. DISCUSIÓN

Las dietas hipercalóricas están asociadas con el desarrollo de diversas patologías como la obesidad, la hipertensión, la hipertrigliceridemia, la diabetes tipo II y enfermedades cardiovasculares (cardiopatía coronaria, enfermedades cerebrovasculares, cardiopatía reumática y embolias pulmonares) tanto en humanos como en modelos experimentales (2).

El alto consumo de sacarosa en el modelo de SM produjo un incremento en el peso corporal y en la grasa retroperitoneal y triglicéridos circulantes, lo cual indicó que existen alteraciones en el metabolismo de los lípidos, tanto en su oxidación como en su biosíntesis (93).

En la obesidad asociada con resistencia a la insulina (RI) se observa un aumento en la actividad lipolítica en el tejido adiposo (93), ya que la actividad de la lipasa hormono-sensible (LHS) presente en el tejido adiposo es regulada por fosforilación (activa) y desfosforilación (inactiva). La insulina promueve la desfosforilación de la proteína y entonces cuando hay resistencia a la insulina, la LHS es fosforilada permaneciendo activa e induciendo un incremento en la lipólisis que se refleja en un aumento en los AGNEs circulantes (94). La RI también afecta el mecanismo por el cual hay entrada de glucosa y esterificación de los AGNE (posprandio) en el adipocito, así, los AGNEs circulantes pueden depositarse en cualquier órgano blanco incluyendo el riñón (95).

La obesidad juega un rol importante en la asociación que existe entre el daño renal y el SM, sin que exista de por medio diabetes tipo II (96, 97).

En este trabajo se encontró que el alto consumo de sacarosa induce daño renal. Los animales con síndrome metabólico desarrollaron proteinuria y su índice de depuración de creatinina fue menor comparado con el de los controles, además los cortes histológicos muestran cambios morfológicos en el glomérulo y estructuras como los podocitos, la membrana basal y el endotelio se encuentran alterados. Estas alteraciones están probablemente asociadas con la disminución en el índice de depuración en los animales con SM.

El mecanismo bioquímico por el cual la dieta alta en carbohidratos genera cambios en la fisiología y estructura renal en este modelo no está del todo establecido, sin embargo se sabe que la obesidad central presente en el SM,

provoca un proceso inflamatorio y el aumento en la secreción de citocinas (72) y que la acumulación de AGNEs está relacionada con la generación de microalbuminuria, estrés oxidativo y daño a nivel glomerular (98, 99).

El análisis de la composición de AGNEs en el homogenizado de riñón muestra un aumento significativo de los AGNEs totales en el homogenizado y en particular el ácido palmítico que es el primer producto de la síntesis de novo de los ácidos grasos, el ácido palmitoleico, producto de la desaturación del palmítico por la  $\Delta 9$  desaturasa (99) y el ácido oleico el cual es un ácido graso monoinsaturado. La acumulación de AGNEs en el riñón de los animales con síndrome metabólico puede ser asociada con la generación de estrés oxidativo, un factor importante en la alteración de la función renal que se observa en este modelo de SM (Tabla IV) (70).

El incremento de la concentración de TBARS (índice de lipoperoxidación) en la orina como en el homogenizado de riñón de animales con SM refleja un aumento en el estrés oxidativo en estos animales, que puede ser debido en un aumento en la generación de moléculas pro-oxidantes y una disminución en las defensas antioxidantes. La mitocondria es una fuente de generación de especies reactivas de oxígeno que representan el 1 al 2% del oxígeno que se consume a nivel de la cadena respiratoria mitocondrial para la síntesis de ATP (22). En condiciones patológicas como el síndrome metabólico, esta proporción puede aumentar por la pérdida del equilibrio entre la generación de pro-oxidantes y antioxidantes. Además, se ha observado que en presencia de AGNEs como el ácido palmítico o el araquidónico, las mitocondrias de corazón o del cerebro producen las EROs con una velocidad mayor que en ausencia de AGNEs (100), esto indica que los ácidos grasos tanto de cadenas saturadas e insaturadas interaccionan con la cadena respiratoria para aumentar la velocidad de generación de EROs.

En mitocondrias aisladas de riñón de animales con SM la velocidad de generación de EROs en presencia de succinato como sustrato oxidativo del complejo II (estado 4) es mayor con respecto a la de los animales controles; esta diferencia se mantiene en presencia de piruvato/malato como sustrato oxidativo del complejo I, aunque en menor proporción. Este resultado concuerda con lo reportado por otros autores ya que se ha propuesto que el aumento en la generación de EROs en presencia de succinato es dependiente del potencial transmembrana, del estado redox y de los flavin mononucleótidos (9, 25, 101). La adición de rotenona (un inhibidor del complejo I) al medio de incubación disminuyó significativamente la

velocidad de generación de EROs en las mitocondrias de SM de igual manera que las de los animales controles. Este resultado sugiere que el complejo I contribuye de una manera muy importante en la generación de EROs en las mitocondrias de riñón como se ha reportado previamente (9, 30). El mecanismo por el cual las mitocondrias de animales con SM generan EROs con mayor velocidad en presencia de succinato o piruvato/malato puede atribuirse a diferentes factores tales como: alteraciones en la actividad de la cadena respiratoria mitocondria (CRM), la cual se ha investigado ampliamente su participación en distintas patologías (33, 102), alteraciones en la actividad de las enzimas superoxido dismutasa de Mn o de Cu/Zn y de las moléculas antioxidantes como las CoQ, vitamina E (vitE), glutatión o el aumento en la concentración de los AGNEs.

En este trabajo se analizó el efecto del ácido oleico (AO) como AGNEs que se encuentra en concentraciones altas en el homogenizado de riñón y que puede contribuir a aumentar la generación de EROs en las mitocondrias. La adición del AO aumenta la velocidad de generación de EROs en los dos tipos de mitocondrias aisladas de los dos grupos de animales.

La CRM produce  $O_2^{\cdot-}$  vía el complejo I hacia el espacio intermembranal y el complejo III hacia el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial (24, 104, 105); este  $O_2^{\cdot-}$  es rápidamente dismutado por la superoxido dismutasa a  $H_2O_2$ , especie reactiva más estable y liposoluble, así puede ser detectado por oxidación del DCF en presencia de peroxidasa.

El mecanismo por el cual la generación de  $H_2O_2$  está aumentada puede ser el resultado de un aumento en la actividad de la Cu/ZnSOD localizada en el espacio intermembranal (106, 107). El análisis por gel nativo de esta enzima muestra un aumento significativo en la actividad de la Cu/ZnSOD en mitocondrias de animales con SM. El aumento en la actividad de esta enzima puede resultar en la formación incrementada de  $H_2O_2$  y su liberación hacia el citosol donde puede acumularse por la disminución en la actividad de catalasa que se encontró en el homogenizado de riñón de los animales con SM.

El  $H_2O_2$  puede reaccionar con metales de transición según la reacción de Fenton, la cual genera OH $\cdot$  que produce altos niveles de malondialdehído como producto final de la lipoperoxidación, esto explicaría el aumento en la concentración del MDA en el homogeneizado de riñón.

Sin embargo, en mitocondrias aisladas de riñón no se encontraron diferencias en la concentración de TBARS entre control y SM. Esto sugiere que la lipoperoxidación en membrana mitocondrial fue limitada probablemente debido a la expresión de la UCP2. Se ha reportado que la sobre-expresión de la UCP2 en cardiomiocitos disminuye el daño celular por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (108). Así mismo, en el modelo de ratón knockout de la UCP2 hay una sobre-producción de EROs (52).

El análisis por gel PAGE-SDS de la UCP2 muestra una sobre-expresión de la proteína en mitocondrias de riñón con SM. Para explorar el mecanismo por el cual la sobre-expresión de la UCP2 participa en la disminución de las EROs la mitocondria fue incubada con GDP, inhibidor de la UCP1 homóloga de la UCP2. El índice de generación de EROs oxidando succinato en presencia de GDP se incrementó en mitocondrias control y con SM (91). Este resultado sugiere que el incremento en la expresión de la UCP2 en el riñón de animales con SM es una respuesta contra la generación de EROs *in vivo*.

La sobre-expresión de la UCP2 puede ser la causante de la disminución del potencial transmembranal en mitocondrias de riñón de animales con SM, medido por la fluorescencia de la TMRM en presencia de succinato. Cuando el desacoplamiento fue activado por AO como AGNEs no se observó el restablecimiento del potencial en presencia de GDP.

La inhibición de la UCP3 de músculo esquelético depende del estado redox de la coenzima Q (UQ) (109). Se ha observado que la inhibición por GTP, un análogo del GDP no fue capaz de inhibir el desacoplamiento del potencial inducido por AGNEs como activadores de la UCP3 del músculo esquelético bajo condiciones del estado 3, es decir cuando la reducción de CoQ es alta.

La ausencia de inhibición de la UCP2 por GDP mediado por AO puede deberse a que no hay cambio en las concentraciones de CoQ oxidada y reducida en ambos grupos (Fig. 26).

## X. CONCLUSIONES

1. El SM inducido por el alto consumo de sacarosa está asociado con la acumulación de AGNEs en el riñón.
2. La sobre-expresión de la UCP2 en mitocondrias es una respuesta al estrés oxidativo; esta protección puede ser apreciada, ya que no hubo cambios en las concentraciones de MDA en mitocondrias aisladas como índice de lipoperoxidación y por el aumento en el índice de estrés oxidativo por la adición de GDP como inhibidor de la UCP2. Sin embargo, la adición de AO exacerbó la generación de EROs por la mitocondria e indujo la pérdida en la sensibilidad por GDP.
3. En mitocondrias aisladas de riñón de animales con SM, el incremento en la generación de  $H_2O_2$ , puede ser debido también al incremento en la actividad de la Cu/ZnSOD en el espacio intermembranal y a la disminución de la catalasa en el homogeneizado de riñón. Estos factores pueden ocasionar que el  $H_2O_2$  no solo se acumule fuera de la mitocondria sino que reaccione formando otros radicales y dañe de esta manera otras membranas por lipoperoxidación, lo cual se refleja en los altos índices de MDA en el homogeneizado de riñón de animales con SM.

## XI. GLOSARIO

<b>ADN:</b> Ácido desoxirribonucleico	<b>HDL:</b> Lipoproteínas de alta densidad
<b>ADP:</b> Adenosín difosfato	<b>HPLC:</b> Cromatografía líquida de alta eficacia
<b>AG:</b> Ácido graso	<b>LHS:</b> Lipasa hormono-sensible
<b>AGNE:</b> Ácido graso no esterificado	<b>MDA:</b> Malondialdehído
<b>AO:</b> Ácido oleico	<b>NAD<sup>+</sup>:</b> Nicotin-amin-adenin dinucleótido
<b>ASB:</b> Albúmina de suero bovino	<b>NADH:</b> Nicotin-amin-adenin dinucleótido reducido
<b>ATB:</b> Ácido tiobarbitúrico	<b>NADPH:</b> Fosfato de nicotin-amin-adenin dinucleótido reducido
<b>ATP:</b> Adenosín trifosfato	<b>NCEP:</b> Programa Nacional de Educación sobre Colesterol y el Panel III de Tratamiento del Adulto
<b>BHT:</b> Hidroxitolueno butilado	<b>OMS:</b> Organización mundial de la salud
<b>CAT:</b> Catalasa	<b>Pi:</b> Pirofosfato
<b>CCCP:</b> Carbonil cianuro clorofenil hidrazona	<b>POD:</b> Peroxidasa
<b>cit:</b> Citocromo	<b>PVDF:</b> Fluoruro de polivinil
<b>CoQ:</b> Coenzima Q	<b>PPAR:</b> Receptor activado por proliferadores peroxisamales
<b>CPT:</b> Carnitina palmitoiltransferasa	<b>RI:</b> Resistencia a la Insulina
<b>CRM:</b> Cadena respiratoria mitocondrial	<b>SDS:</b> Dodecil sulfato de sodio
<b>DA-DCF:</b> 2, 7- Diacetato de diclofluoresceína	<b>SM:</b> Síndrome metabólico
<b>DAG:</b> Diacilglicerol	<b>SOD:</b> Superóxido dismutasa
<b>DCF:</b> Diclofluoresceína	<b>TAN:</b> Translocador de adenin nucleótidos
<b>EDTA:</b> Ácido etilendiamintetraacético	<b>TBH:</b> Ter- butyl hidroxiperóxido
<b>ERO:</b> Especies reactivas del oxígeno	<b>TG:</b> Triglicérido
<b>FAD:</b> Flavín adenin dinucleótido	<b>UCP:</b> Proteína desacoplante
<b>FADH:</b> Flavín adenin dinucleótido reducido	<b>UQ:</b> Ubiquinona (forma oxidada)
<b>FMN:</b> Flavín mononucleótido	<b>UQH<sub>2</sub>:</b> Ubiquinol (forma reducida)
<b>GDP:</b> Guanosin difosfato	<b>UQ<sup>•</sup>:</b> Radical ubisemiquinona
<b>GR:</b> Glutación reductasa	
<b>GSH:</b> Glutación reducido	
<b>GSSG:</b> Glutación oxidado	
<b>GPX:</b> Glutación peroxidasa	

## XII. REFERENCIAS

1. Locatelli F, Pozzoni P and Del Vecchio L. Renal manifestations in the metabolic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2006; 17: 581-585.
2. Segura J, Campo C, Roldán C, et al. Hypertensive renal damage in metabolic syndrome is associated with glucose metabolism disturbances. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2004; S1: S37- S42.
3. Massen JA, Janssen GM and Hart CM. Molecular mechanisms of mitochondrial diabetes (MIDD). *Annals of internal medicine*. 2005; 37: 213-221.
4. Ingushi T, Li P, Umeda F et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent Activation of NADPH oxidase in cultured vascular cell. *Diabetes*. 2000; 49: 1939-1945.
5. Fariss MW, Chan CB, Patel M, et al. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Molecular Interventions* 2005; 5: 94-108.
6. Cape JL, Bowman MK and Kramer DM. A semiquinone intermediate generated at the Qo site of the cytochrome *bc1* complex: importance for the Q-cycle and superoxide production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007; 104: 7887-7892.
7. Martínez-Abundis E, Sánchez-Rodríguez M and El Hafidi-Bentlakder M. Participación de la mitocondria en el desarrollo de estrés oxidativo en la obesidad. *Bioquímica*. 2005; 30: 82-89.
8. Nicholls DG. Bioenergética: Introducción a la teoría quimiosmótica. Editorial Reverté S.A. Barcelona, 1987. Pp. 71-135

9. Lenaz G, Fato R and Genova ML. Mitochondrial complex I: Structural and functional aspects. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006; 1757: 1406-1420.
10. Okun JG, Lümme P and Brandt U. Three classes of inhibitors share a common binding domain in mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase). *The journal of biological chemistry*. 1999; 274: 2625-2630.
11. Forquer I, Covian R, Bowman MK, et al. Similar transition states mediate the Q-cycle and superoxide production by the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex. *Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281: 38459-38465.
12. Weber J. ATP synthase: subunit-subunit interactions in the stator stalk. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006; 1757: 1162-1170.
13. Noji H and Yoshida M. The rotatory machine in the cell, ATP synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276: 1605-1668.
14. Madigan MT, Martinko JM and Parker J. *Biología de los Microorganismos*. Editorial Prentice Hall Iberia. Madrid 1999. Pp 1064.
15. Dismukes GS, Klimov VV and Baranov SV. The origin of atmospheric oxygen on Earth: the innovation of oxygenic photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98: 2170-2175.
16. Lambert DJ. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Immunology*. 2004; 4: 181-189.
17. Murdoch CE, Grive DJ, Cave AC, et al. NADPH oxidase and heart failure. *Current Opinion in Pharmacology*. 2006; 6: 148-153.
18. Halliwell B and Gutteridge. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford 1999. Pp 105-245

19. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*. 1997; 82: 291-295.
20. Valko M, Leinfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007; 39:44-84.
21. Baños G, El Hafidi M and Franco M. Oxidative stress and cardiovascular physiology. *Current topics in pharmacology*. 2005; 5: 1-6
22. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*. 2003; 552: 335-344.
23. Brookes PS. Mitochondrial H<sup>+</sup> Leak and ROS Generation: An odd couple *Free Radical Biology & Medicine* 2005; 38: 12-23.
24. Adam-Vizi V and Chinopoulos Ch. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. 2006; 27: 639-645.
25. Genova ML, Ventura B, Giuliano G, et al. The site of production of superoxide radical in mitochondrial complex I is not a bound ubiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Letters*. 2001; 55: 364-368.
26. Grivennikova VG and Vinogradov AD. Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006; 1757: 553-561.
27. Lambert AJ and Brand MD. Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADPH: ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *The Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279: 39414-39420.
28. Boveris A, Cardenas E and Stoppani AOM. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *The biochemical journal*. 1976; 156: 435-444.

29. Chen Q, Vazquez EJ and Moghaddas S. Production of reactive species by mitochondrial: Central role of complex III. *The journal biological chemistry*. 2003; 278: 36027-36031.
30. St-Pierre J, Buckinham JA, Roebuck S, et al. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277: 4478-4480.
31. Watanabe N, Dickson DA, Liu RM, et al. Quinones and glutathione metabolism. *Methods in enzymology*. 2004; 378: 319-340.
32. Lima-Hermes M. Oxidative stress and medical sciences. Wiley-Liss 2004. Pp. 383
33. Duchen MR. Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes*. 2004; 53: 5096-5102.
34. Dobrian AD, Davies MJ, Schriver SD, et al. Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension. *Hypertension*. 2001; 37: 554-560.
35. Higdon J and Frei B. Obesity and oxidative stress. A direct link to CVD?. *Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2003; 23: 365-367.
36. Sorg O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?. *Comptes Rendus Biologies*. 2004; 327: 649-662.
37. Mate's JM, Pérez-Gómez C and Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*. 1999; 32: 595-603.
38. Hernández- Jiménez S. Fisiopatología de la obesidad. *Gaceta Médica México* 2004; 140: S27-S32.

39. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*. 2004; 114:1752-1761.
40. Godínez SA, Marmolejo GE, Márquez E, et al. La grasa visceral y su participación en la obesidad. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 2002; 10: 121-127.
41. Bakker SJ, IJzerman RG, Teerlink T, et al. 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
42. Aronis A, Madar Z and Tirosh O. Mechanism underlying oxidative stress-mediated lipotoxicity: Exposure of J774.2 macrophages to triacylglycerols facilitate mitochondrial reactive oxygen species production and cellular necrosis. *Free Radical Biology & Medicine*. 2005; 38: 1221-1230.
43. Fenster CP, Weinsier RL, Darley-Usmar, et al. Obesity, aerobic exercise, and vascular disease: the role of oxidant stress. *Obesity Research* 2002; 10: 964-968.
44. Wojtczac L and Shönfeld P. Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1993; 1183: 41-57.
45. Di Paola M and Lorusso M. Interaction of Free fatty acids with mitochondria: coupling, uncoupling and permeability transition. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; 1757: 1330-1337
46. Civelek VN, Hamilton JA, Tornheim K, et al. Intracellular pH in adipocytes: effects of free fatty acid diffusion across the plasma membrane lipolytic agonist, and insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996; 93:10139-10144.

47. Skulachev VP. Anion carriers in fatty acid- mediated physiological uncoupling. *Journal of Bioenergetics and Membranes*. 1999; 31: 431-445.
48. Dedukhova VI, Mokhova EN, Skulachev VP, et al. Uncoupling effect of fatty acids on heart muscle mitochondrial and submitochondrial particles. *FEBS*. 1991; 295: 51-54.
49. Skulachev VP. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS*.1991; 294:158-162.
50. Schönfeld P and Wojtczak L. Fatty acids as modulator of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radical & Medicine*.2008; 45: 231-241.
51. Rousser S, Alves-Guerra MC, Mozo J, et al. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes*. 2004; 53:S130-S135.
52. Sluse FE, Weislawa J, Navet R et al. Mitochondrial UCPs: new insights into regulation and impact. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006; 1757:480-485.
53. Nicholl DG. Mitochondrial uncoupling proteins. *Biochemical Society Transactions*. 2001; 29: 751-755.
54. Pecqueur C, Alves-Guerra MC, Gelly Ch, et al. Uncoupling Protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276: 8705-8712.
55. Boss O, Hagen T, Lowell BB. Uncoupling proteins 2 and 3 potential regulators of mitochondrial energy metabolism. *Diabetes* 2000; 49:143-156.
56. Jabůrek M, Varecha M, Gimeno RE, et al. Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling protein 2 and 3. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999; 274: 26003-26007.

57. Nübel T, Ricquier D. Respiration Under control of uncoupling proteins: Clinical perspective. *Hormone Research*. 2006; 65: 300-310
58. Haguenaer A, Raimbault S, Masscheleyn S, et al. A New Renal Mitochondrial Carrier, KMCP1, Is Up-regulated during tubular cell regeneration and induction of antioxidant enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280: 22036-22043.
59. Boss O, Hagen T, and Lowell BB. Uncoupling proteins 2 and 3 potential regulators of mitochondrial energy metabolism. *Diabetes* 2000; 49:143-156.
60. Pequer C, Alvez-Guerra MC, Guelly C, et al. Uncoupling protein 2 *in vivo* distribution, induction upon oxidative stress evidence for translational regulation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276: 8705-8712.
61. Nakatani T, Kasaoca N, Takahashi M, et al. Mechanism for peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  activator induced up-regulation of UCP2 mRNA in rodent hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277: 9562-9569.
62. Gogia Atul and Agarwal PK. Metabolic syndrome. *Indian Journal of Medical Sciences*. 2006; 60: 72-81.
63. Stern MP, Hunt KJ, Williams K, et al. Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease?. *Diabetes Care*. 2004; 27: 2676-2681.
64. Kylin E. Studien .Hypertonie-hyperglykaemie-hyperurikamiesyndrome. *Zentralblatt fur innere Medizin*. 1923; 44: 105-127.
65. Vague J. Le differenciation sexuelle, facteur determinant des formes de l'obesite. *La Presse médicale*. 1947; 30: 339-340.

66. Eckel RH, Grundy SM and Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005; 365 : 1415-1428.
67. Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, et al. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. *Circulation* 2004; 109: 433- 438.
68. Karalliedde J and Viberti G. Microalbuminuria and cardiovascular risk. *American Journal of Health Promotion*. 2004; 17: 986-993.
69. Peralta CA, Kurella M, Lo JC et al. The metabolic syndrome and chronic kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2006; 15: 361-365.
70. Trevisan R, Dodesini AR and Lepore G. Lipids and renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2006; 17:S145-S147.
71. Wahba IM and Mark RH. Obesity and obesity- initiated metabolic: mechanistic links to chronic kidney disease. *Clinical Journal of American Society of Nephrology*. 2002; 2: 550-562.
72. Rahier J, Guiot Y, Goebbels RM, et al. Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism* 2008; 10: 32-42.
73. Nahman NS, Leonhart KL, Cosio FG, et al. Effects of high glucose on cellular proliferation and fibronectin production by cultured human mesangial cells. *Kidney International*.1992; 4: 396-402.
74. Cederholm J, Eliasson B, Nilsson PM, et al. Microalbuminuria and risk factors in type 1 and type 2 diabetic patients. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2005; 67: 258-266.
75. Reaven G, Ho H. Sugar induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *The American Journal of Hypertension*. 1992; 4: 610-614.

76. Martínez Abundis E. liberación de radicales libres en un modelo de rata hipertrigliceridémica e hipertensa: efecto del género. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza, UNAM. 2004
77. Pérez I, El Hafidi M, Sánchez C, et al. Effect of sugar-induced hypertension in rats on the pattern of serum araquidonic, dihomo- $\gamma$ -linoleic and linoleic acids. *Medical Science Research*. 1999; 27: 847-849.
78. El Hafidi M, Valdez R and Baños G. Possible relation between altered fatty acid composition of serum, platelets, and aorta and hypertension induced by sugar feeding in rats. *Clinical and experimental hypertension* 2000; 22: 99-108.
79. Carvajal K, El Hafidi M and Baños G. Myocardial damage due to ischemia and reperfusion in hypertriglyceridemic and hypertensive rats: participation of free radicals and calcium overload. *Journal of hypertension*. 1999; 17: 1607-1616
80. El Hafidi M, Valdez R and Baños G. Possible relationship between fatty acid composition of serum platelets and aorta, and hypertension induced by sugar feeding in rats. *Clinical and experimental hypertension*. 2000; 22: 99-108.
81. Martínez Abundis Eduardo. Estrés oxidativo en el hígado de rata con síndrome metabólico: Participación de la mitocondria. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. 2006.
82. Luna G. Manual of histology staining methods of the armed forces of pathology. 1960 New York. McGraw Hill.
83. Lowry H, Rosebrough NJ, Farr A, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 1951; 193: 265-275.
84. Russel CS and Lee WG. Measures of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophysical Journal*. 1999; 76: 469-477.

85. Folch J, Lees M and Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 1957; 193: 265-275.
86. Christie WW. The preparation of derivatives of fatty acids and lipids in gas chromatographic. *The oil press*. 1989: 64-84.
87. Londero D and Greco PL. Automated high-performance liquid chromatographic separation with spectrofluorometric detection of a malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in plasma. *Journal of Chromatographic*. 1996; 729: 207-210.
88. Suttner J, Čermák J and Dyr JE. Solid –Phase extraction in malondialdehyde analysis. *Analytical Biochemistry*. 1997; 249:20-23.
89. Possel H, Noack H and Augustin W. 2,7-Dihydrodichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation. *FEBS Letters*. 1997; 416: 175-178.
90. Tanf HD, Miles YM and DeGrauw A. HPLC analysis of reduced on oxidized coenzyme Q10 in human plasma. *Clinical of Chemistry*. 2002; 47: 256-265.
91. Fislser AS and Warden C. Uncoupling proteins, dietary fat and the metabolic syndrome. *Nutrition & Metabolism*. 2006; 3: 1-7.
92. Echtay K, Winkler E and Klingenberg M. Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function. *Letters to Nature*. 2000; 408: 609-613.
93. Awad AB and Chattopadhyay JP. Effect of dietary saturated fatty acids on hormone-sensitive lipolysis in rats adipocytes. *The Journal of Nutrition*. 1986; 116: 1088-1094.
94. Egan JJ, Greenberg A, Chang MK, et al. Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: Translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid

- storage droplet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992; 89: 8537-8541.
95. González A, Lavalle F and Tíos JJ. Síndrome metabólico y enfermedad cardiovascular. Libro 2. Editorial Intersistemas S.A de C.V. 2006 México.
  96. García de Vinuesa S, Goicoechea M, Kanter J, et al. Insulin resistance, inflammatory biomarkers, and adipokines in patients with chronic kidney disease: effects of angiotensin II blockade. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006; 17: S206-S212.
  97. Sonnenberg GE, Glenn RK and Kissebah AH. A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome. *Obesity Research*. 2004; 12: 180-186.
  98. Chen J, Munter P, Hamm LL, et al. The metabolic syndrome and chronic kidney disease in US adults. *Annals of internal medicine* 140: 167–174, 2004
  99. El Hafidi M, Cuéllas A, Ramírez J, et al. Effect of sucrose addition to drinking water that induces hypertension in the rats on liver microsomal  $\Delta 9$  and  $\Delta 5$  desaturase activities. *The Journal of nutritional biochemistry* 2001; 12:396-403.
  100. Shönfeld P and Reiser G. Rotenone-like action of the branched-chain phytanic acid induces oxidative stress in mitochondria. *The Journal of Biological and Chemistry*. 2006; 281: 7136-7142.
  101. Vinogradov AD, Grivennikova VG. Generation of superoxide-radical by the NADH: Ubiquinone oxidoreductase of heart mitochondria. *Biochemistry*. 2005; 70: 150-159.
  102. Imarisio S, Carmichel J, Korolchuk V, et al. Huntington's disease: from pathology and genetic to potential therapies. *The Biochemical Journal*. 2008; 412: 191-209.

103. Sastre J, Pallardó FV and Viña J. Mitochondrial oxidative stress a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life*. 2000; 49: 427-435.
104. Batandier C, Guigas B, Demaille, et al. The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin. *The Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2006; 38: 33-42.
105. Esterházy D, King MS, Yakovlev G, et al. Production of reactive oxygen species by complex I (NADH: Ubiquinone Oxidoreductase) from *Escherichia coli* and comparison to the enzyme from mitochondria. *Biochemistry*. 2008; 47: 3964-3971.
106. Goldsteins G, Keksa-Golsteine V, Ahtoniemi T, et al. Deleterious role of superoxide dismutase in the mitochondrial intermembranal space. *The Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283: 8446:8452.
107. Li Q, Sato EF, Kira Y, et al. A possible cooperation of SOD1 and cytochrome c in mitochondria-dependent apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine*. 2006; 40: 173-181.
108. Teshima Y, Akao M, Jones S, et al. Uncoupling proteína-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circulation Research*. 2003; 93: 192-200.
109. Jarmuszkiewicz W, Navet R, Alberici LC, et al. Redox state of endogenous coenzyme Q modulates the inhibition of linoleic acid-induced uncoupling by guanosine triphosphate in isolated skeletal muscle mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2004; 36: 493-502.