



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS ω -3
SOBRE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL
INDUCIDA POR EL ÁCIDO
3-NITROPROPIÓNICO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:
JAZMÍN GARCIA MORALES**



MÉXICO, DF

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: DR. JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE**

VOCAL: **Profesor: GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS**

SECRETARIO: **Profesor: DRA. MARISOL OROZCO IBARRA**

1er. SUPLENTE: **Profesor: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRÍ**

2° SUPLENTE: **Profesor: DRA LAURA CARMONA SALAZAR**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE NEUROBIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DEL INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA “MANUEL VELASCO SUÁREZ”.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Marisol Orozco Ibarra

SUSTENTANTE:

Jazmín García Morales

ÍNDICE

Abreviaturas	6
Resumen	7
1. ANTECEDENTES	9
1.1 Mitocondria.....	9
1.1.1. Anatomía de la mitocondria.....	10
1.1.2. Función de la mitocondria.....	10
1.1.3. Cadena transportadora de electrones (CTE)	14
1.1.4. Disfunción mitocondrial.....	16
1.1.5. Mitocondria y neurodegeneración.....	17
1.2. Acido 3-nitropropiónico (3-NP)	17
1.2.1. Generalidades.....	18
1.2.2. Efecto neurotóxico del 3-NP.....	20
1.2.3. Participación de la mitocondria en el efecto del 3-NP.....	21
1.3. Ácidos grasos ω -3.....	22
1.3.1. Nomenclatura y clasificación de los ácidos grasos.....	24
1.3.2. Fuentes y biosíntesis de ácidos grasos.....	27
1.3.3. AHB como fuente de ácidos grasos ω -3.....	27
1.3.4. Absorción y metabolismo de ácidos grasos.....	28
1.3.5. Ácidos grasos ω -3 en desarrollo, función y delive del SNC.....	31
1.3.6. Participación de los AGPI ω -3 en disfunción mitocondrial.....	34
2. JUSTIFICACIÓN	35
3. HIPÓTESIS	35
4. OBJETIVOS	36
5. MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1. Reactivos y equipo	36
5.2. Animales.....	36
5.3. Estrategia experimental.....	36
5.4. Determinación de conducta exploratoria.....	38
5.5. Aislamiento de fracción mitocondrial.....	39
5.6. Determinación de proteínas.....	39
5.7. Potencial transmembranal.....	40
5.8. Consumo de oxígeno.....	40
5.9. Actividad del complejo I.....	41
5.10. Actividad de complejo II.....	42
5.11. Actividad de complejo III.....	43
5.12. Actividad de complejo IV.. ..	43
5.13. Capacidad de síntesis de ATP (complejo V.....	43
5.14. Análisis estadístico.....	43
	45
6. RESULTADOS	46
7. DISCUSIÓN	55
8. CONCLUSIONES	58
9. PERSPECTIVAS	58
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

Abreviaturas:

AA	Ácido araquidónico
ADNmit	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ADP	Adenosin difosfato
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
AHB	Aceite de hígado de bacalao
ASB	Albumina sérica bovina
ATP	Adenosin trifosfato
CTE	Cadena transportadora de electrones
DB	Decilbuquinona
DCPIP	2,6-Diclorofenol indofenol
DHA	Ácido docosahexaenoico
EGTA	Acido Bis (2-aminoetil) etilenglicol N,N,N',N'Tetraacético.
EH	Enfermedad de Huntington
EI	Espacio intermembranal
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FADH ₂	Flavín adenín dinucleótido reducido
FCCP	Carbonilcincanuro-p-trifluorometoxi-hidrazona
FMN	Mononucleótido de flavina
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
HEPES	4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanol sulfónico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
<i>i.p</i>	Intraperitoneal
ICR	Índice de control respiratorio
Mn-SOD	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
MMI	Membrana mitocondrial interna
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADP ⁺	Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NO·	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
O ₂ ^{·-}	Anión superóxido
·OH	Radical hidroxilo
ONOO ⁻	Anión peroxinitrito
QH ₂	Ubiquinol
SS	Solución salina
SNC	Sistema nervioso central
SDH	Succinato deshidrogenasa
UAF	Unidades arbitrarias de fluorescencia
Δψ	Potencial transmembranal

Resumen

INTRODUCCIÓN: Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo de padecimientos con diferentes manifestaciones clínicas, que presentan muerte selectiva de uno o más grupos neuronales y aunque no se conoce el mecanismo exacto que desencadena dicha muerte neuronal, un gran número de investigaciones apuntan hacia la mitocondria como un elemento clave. De hecho, algunos modelos de enfermedades neurodegenerativas se generan al dañar a la mitocondria, tal es el caso del ácido 3-nitropropiónico (3-NP), una toxina producida por algunos hongos y plantas, que debido a su similitud estructural con el succinato, inhibe irreversiblemente a la enzima succinato deshidrogenasa, con lo cual se desencadena una serie de eventos moleculares que dependiendo de las dosis y tiempo de administración del 3-NP pueden llevar a la muerte selectiva de las neuronas medianas espinosas de estriado y generar características de la enfermedad de Huntington (EH). Debido a todo esto, se ha postulado a la protección mitocondrial como un blanco contra las enfermedades neurodegenerativas.

Recientemente se ha encontrado evidencia de que los ácidos grasos ω -3 juegan un papel importante en el mantenimiento de la integridad y función mitocondrial principalmente en hígado y corazón; además que se ha mostrado que la presencia de estos ácidos grasos mejora capacidades cognitivas, de aprendizaje y memoria. Algunos estudios muestran que la administración de ácidos grasos ω -3 disminuye las deficiencias de movimiento que se presentan en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas y que la administración de ácidos grasos ω -3 puede inducir la expresión de genes relacionados con el metabolismo oxidativo y la biogénesis mitocondrial, sin embargo pocos estudios han evaluado el efecto de los ácidos grasos ω -3 en modelos de neurotoxicidad y solo muy recientemente se ha comenzado el estudio de la mitocondria en dicho efecto.

OBJETIVO: Evaluar el efecto de la administración de aceite de hígado de bacalao (AHB), una fuente rica en ácidos grasos ω -3, sobre la disfunción mitocondrial generada por el 3-NP.

DISEÑO EXPERIMENTAL: Primeramente, se evaluó el efecto del 3-NP sobre la función mitocondrial, para esto se administró 3-NP a ratas Wistar de 250 g en 3 diferentes dosis: 5, 10 y 15 mg/kg/24 h durante tres días; al cuarto día se evaluó la actividad exploratoria de los animales, se obtuvo la fracción mitocondrial de estriado y se determinó la función mitocondrial por medio del estudio del consumo de oxígeno, el potencial transmembranal, la capacidad de síntesis de ATP y la actividad de los complejos I-IV de la cadena transportadora de electrones (CTE).

Posteriormente, se evaluó el efecto del AHB sobre la disfunción mitocondrial generada por el 3-NP, para lo cual se formaron tres grupos experimentales: a) *Control*, b) *3-NP* 15 mg/kg/24h por tres días y c) *AHB* 0.5 ml/kg/24 h por 15 días + 3-NP; al término del tratamiento se evaluó la actividad exploratoria de los animales, así como la función mitocondrial en estriado.

RESULTADOS: La administración sistémica de 3-NP causó una disminución en la actividad exploratoria de las ratas a la dosis más alta utilizada (15 mg/kg). En lo que respecta a los efectos de esta toxina en la mitocondria, la actividad de los complejos II y III de la CTE, así como la capacidad de síntesis de ATP (complejo V) se inhibieron cerca de un 50% independientemente de la dosis utilizada, a diferencia del consumo de oxígeno, que disminuyó de forma dosis-dependiente. Por otro lado, el 3-NP no afectó el potencial transmembranal ni la actividad de los complejos mitocondriales I y IV.

Con base en estos resultados, se eligió la dosis de 15 mg/kg para evaluar el efecto del AHB, la administración de este aceite previno la disminución de la actividad exploratoria por el 3-NP; a pesar de esto, el AHB no tuvo efectos sobre la inhibición del complejo II y tampoco restauró ICR, sin embargo no solo restauró la actividad del complejo III, si no que presentó una sobreactivación del 40%, de igual forma el complejo IV, a pesar de que no se afectó por el 3-NP, la administración de AHB generó un aumento del 100% en su actividad.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS: El AHB previene la disminución de la conducta exploratoria que se presenta tras la administración de 3-NP; En cuanto a su función en la mitocondria, el AHB no actúa directamente sobre la actividad del complejo II, pero si tiene la capacidad de aumentar la actividad de los complejos III y IV en presencia de un daño generado a la mitocondria. Se propone profundizar el estudio del mecanismo por el que se presenta la sobreactivación de estos complejos.

1. ANTECEDENTES

1.1 Mitocondria

La mitocondria (del griego: *mitos*, filamento + *chondros*, gránulo) es el lugar donde se lleva a cabo el metabolismo oxidativo en eucariontes. A menudo es llamada “planta de energía de la célula” ya que contiene las enzimas del ciclo del ácido cítrico, enzimas que catalizan la oxidación de ácidos grasos, enzimas y proteínas redox involucradas en el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa (Voet, 2006). En los organismos aerobios más del 90% de ATP que se necesita para mantener las funciones biológicas proviene de las mitocondrias.

1.1.1 Anatomía mitocondrial

Las mitocondrias varían en forma y tamaño, en función de su origen y estado metabólico, pero por lo general son de forma oval, típicamente de unos 2 μm de longitud y 0.5 μm de diámetro, aproximadamente del tamaño de una bacteria (Berg et al; 2009). Una célula eucarionte contiene de 200 a 2000 mitocondrias, dependiendo del tipo celular, el mayor número de mitocondrias se encuentra en células metabólicamente más activas tales como el músculo esquelético y cardíaco, el hígado y el cerebro (Pieczenik y Neustadt; 2007).

Estos orgánulos se encuentran presentes en todas las células humanas (excepto en los eritrocitos maduros); y varían en cuanto a forma y número dependiendo del tipo celular (Metzler, 2003).

La mitocondria está formada por dos bicapas lipídicas, una interna y otra externa, cada una de 5-7 nm de grosor, la membrana externa es altamente permeable a sustancias de 10 KDa o menos, debido a la presencia de poros de aproximadamente 2 nm de diámetro, a diferencia de la membrana interna, la cual es impermeable a muchas sustancias, solo moléculas neutras de <150 Da pueden atravesarla, pero el ingreso de todas las demás sustancias incluidos los iones pequeños como H^+ , K^+ , Na^+ , y Cl^- está altamente regulado (Metzler; 2003). Después de que la mitocondria fue vista en células vivas, se hizo inmediatamente evidente que las mitocondrias están lejos de ser estáticas, (Youle y Blik; 2012) estos orgánulos se encuentran formando una compleja red dentro de la célula (Dupuis; 2013) la cual está continuamente regulada, por el balance entre los eventos de fusión y fisión.

1.1.2 Función de la mitocondria

Las mitocondrias son las principales generadoras de adenosin trifosfato (ATP) ya que producen más del 90% de éste a través de la fosforilación oxidativa (FO) (Kidd, 2005), además están implicadas en otras vías metabólicas, incluida la síntesis de ácidos grasos, gluconeogenesis, esteroidogenesis, síntesis de hemo y ciclo de la urea. Por otra parte, la mitocondria junto con el retículo endoplásmico, controlan la homeostasis del calcio y la apoptosis (Scorrano L, 2013).

La producción de energía dentro de la mitocondria es el resultado de dos procesos metabólicos coordinados: el ciclo de Krebs y la CTE. El ciclo de Krebs produce algo de ATP mediante la degradación de carbohidratos y ácidos grasos, sin embargo su principal trabajo es producir las coenzimas nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) y flavín adenín dinucleótido reducido (FADH₂) para que éstas entren en la CTE (Pieczenik y Neustadt; 2007).

La vía general para la producción de energía dentro de la mitocondria es la siguiente: el catabolismo de la glucosa en el citosol produce dos moléculas de piruvato, que pasan a través de la doble membrana de la mitocondria donde se encuentra el complejo de la piruvato deshidrogenasa, enzima que en alta demanda de energía transforma las dos moléculas de piruvato en dos moléculas de acetil coenzima A, éstas entran al ciclo de Krebs y producen 3 moléculas de NADH y 2 moléculas de FADH₂, en total 6 NADH y 4 FADH₂ por molécula de piruvato. Posteriormente, el NADH y el FADH₂ donan sus electrones a los complejos I y II, respectivamente, de la CTE. La ubiquinona transporta estos electrones al complejo III, de donde el citocromo c los transfiere al complejo IV. El flujo de los electrones a través de los complejos genera un gradiente electroquímico, el cual tiene como resultado final la reducción del O₂ a H₂O por el complejo IV; a la par ocurre un flujo de protones que son bombeados por los complejos I, III y IV a través de la membrana mitocondrial interna (MMI) hacia el espacio intermembranal (EI), para establecer una fuerza protón motriz, la cual es usada por la ATP sintasa para fosforilar adenosin difosfato (ADP) y formar ATP.

1.1.3 Cadena transportadora de electrones (CTE)

La CTE está embebida en la bicapa lipídica de la MMI y está compuesta por cinco complejos enzimáticos multiméricos (I-V) y dos transportadores móviles de electrones que actúan secuencialmente (Eckert; 2013), la mayoría son proteínas integrales de membrana con grupos prostéticos capaces de aceptar o donar uno o dos electrones (Fig 1.1.2).

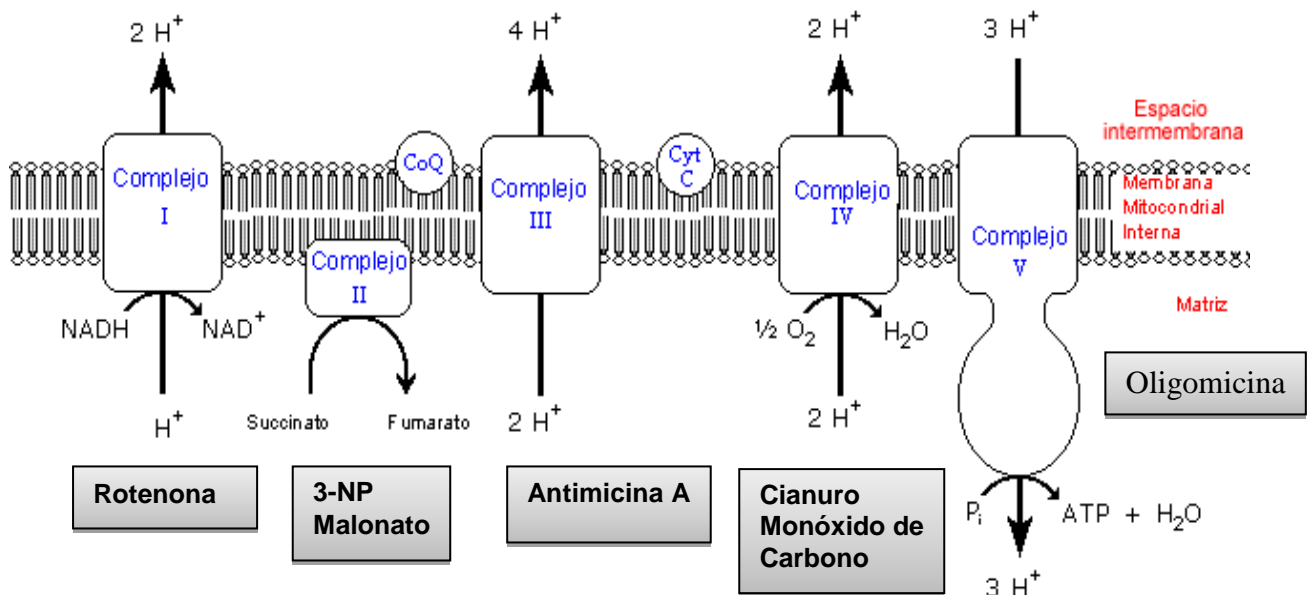
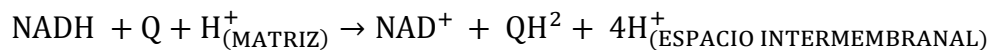


Figura 1.1.2. Cadena transportadora de electrones. En los recuadros grises se indican los principales inhibidores de cada complejo.

Complejo I o NADH: Ubiquinona Oxidorreductasa. Es una enzima formada por 42 cadenas polipeptídicas diferentes, este es el mayor complejo de la CTE, incluye un mononucleotido de flavina (FMN) y al menos 6 centros hierro-azufre. Este complejo tiene forma de L con uno de los brazos dentro de la membrana interna y el otro extendido en la matriz mitocondrial (Leninger; 2008).

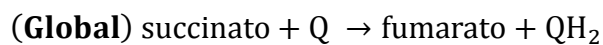
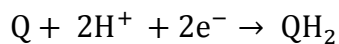
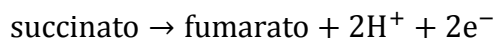
Los electrones fluyen en el complejo I desde el NADH a través de FMN y una serie de complejos hierro-azufre (Fe-S) hasta la ubiquinona (Q), la cual se reduce a ubiquinol (QH₂).



El flujo electrónico produce un bombeo de cuatro protones desde la matriz al espacio intermembranal.

El ubiquinol (QH₂; forma totalmente reducida de la quinona) difunde libremente a través de la membrana y actúa transfiriendo los electrones desde el complejo I al complejo III. Los barbitúricos y otros compuestos como la rotenona inhiben el transporte de electrones en este complejo, al bloquear la transferencia desde Fe-S hasta la Q (Krishnamoorthy Y Hinkle; 1988).

Complejo II. Succinato deshidrogenasa. Esta enzima cataliza la oxidación de succinato a fumarato. El complejo está formado por cuatro subunidades, una de ellas de masa molecular de 70 KDa que contiene flavín adenín dinucleótido (FAD) unido covalentemente a un residuo de histidina, otra subunidad de 30 KDa que contiene tres centros Fe-S y dos proteínas hidrofóbicas pequeñas (Devlin; 2004). Durante la oxidación de succinato a fumarato se transfieren primeramente dos electrones y dos protones al FAD, el FADH₂ formado transfiere los electrones a la ubiquinona vía los centros Fe-S del complejo II en las dos reacciones siguientes:

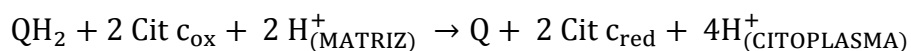


El complejo II no bombea protones al espacio intermembranal por lo cual solo alimenta de e⁻ a la CTE, consecuentemente se forma menos ATP a partir de la oxidación de FADH₂ que a partir de NADH.

Complejo III o Ubiquinona: citocromo c oxidorreductasa. El complejo III, también llamado citocromo bc es un complejo dimérico con una masa molecular de 25 KDa para cada monómero, tiene una forma de pera con un dominio que sobresale hacia la matriz mitocondrial y otro pequeño dominio que sale hacia el espacio intermembranal. Cada monómero consta de 11 subunidades, de las cuales tres tienen grupos prostéticos que actúan como centros redox, estos son el citocromo b y el citocromo c₁, cada uno de los cuales contiene un grupo hemo y una proteína ferrosulfurada de Rieske (Devlin; 2004).

Este complejo cataliza la transferencia de electrones desde el QH₂ al citocromo c oxidado con el transporte vectorial de protones de la matriz al espacio intermembranal.

El flujo de un par de electrones a través de este complejo produce el transporte neto efectivo de 2H⁺ al lado citoplasmático, el paso de e⁻ y protones a través del complejo III se puede describir como la ecuación neta para la reacción redox del ciclo Q:



El ciclo Q adecua el intercambio de e⁻ entre la Q (acarreadora de 2e⁻) y los citocromos b₅₆₂, b₅₆₆, c₁ y c (acarreadores de e⁻) y explica la estequiometría mediada de 4H⁺ bombeados por par de electrones que pasan a través del complejo II al citocromo c.

La antimicina A es un antibiótico que se une al citocromo b del complejo III, con lo cual bloquea la continuidad del transporte de electrones (Ramachandran y Gottlieb; 1961).

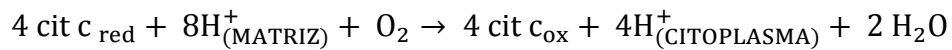
Citocromo C. A través del complejo III se transfieren electrones al citocromo c, una pequeña proteína globular hidrofílica con una masa molecular de 13 KDa, contiene un grupo hemo plano situado en el centro de la proteína rodeado por residuos hidrofóbicos. Al igual que la ubiquinona, funciona como un transportador móvil en la CTE. Esta proteína está unida débilmente a la superficie exterior de la membrana interna mediante fuerzas electrostáticas donde se une al citocromo c_1 del complejo III y acepta electrones, el citocromo c reducido se desplaza a continuación a lo largo de la superficie de la membrana en donde interacciona con la subunidad 2 de la citocromo c oxidasa y cede sus electrones al sitio Cu_A .

Además de su importante participación en la CTE, el citocromo c es uno de los activadores más potentes de la apoptosis ya que al ser liberado de la mitocondria llega al citoplasma donde activa toda una cascada de enzimas proteolíticas llamadas caspasas, las cuales tienen como fin la muerte programada de la célula (Berg et al; 2009). Por lo cual el citocromo c es ampliamente utilizado como un marcador de apoptosis.

Complejo IV o citocromo oxidasa El complejo IV cataliza la transferencia de electrones desde el citocromo c al oxígeno molecular reduciéndolo a H_2O , en un mecanismo acoplado a el bombeo de cuatro protones al espacio intermembranal (Nelson y Cox; 2008). Este complejo enzimático de 20 KDa que contiene trece subunidades, tres de las cuales están codificadas por el propio genoma mitocondrial (Berg et al; 2009). Las tres subunidades mayores del complejo IV son esenciales para que la enzima sea funcional, estas son codificadas por ADN mitocondrial (ADNmit) y son homologas a las tres únicas subunidades de la citocromo oxidasa bacteriana, el resto de las subunidades del complejo IV de los mamíferos están codificados por el DNA nuclear y funcionan como subunidades reguladoras o en el ensamblaje de la enzima. El complejo posee dos grupos hemo, un citocromo a y otro a_3 , así como dos centros de cobre (uno denominado Cu_A y el otro Cu_B).

Los electrones transportados por el citocromo c reducido desde el complejo III se transfieren al complejo IV, el citocromo c se une al centro de cobre Cu_A y le transfiere un electrón, el cual pasa al hemo y de allí se conduce al centro binuclear (que está formado por Cu_B y el hemo a_3), el cual es el centro activo para la reducción de oxígeno. En conjunto se requieren cuatro electrones para reducir el oxígeno molecular, con la recepción de cuatro protones desde la matriz que originan con ello dos moléculas de agua. Al mismo tiempo se transportan cuatro protones, desde el lado de la matriz hasta el espacio intermembranal.

La citocromo c oxidasa trasfiere de forma neta cuatro electrones de cuatro moléculas de citocromo c a una molécula de oxígeno, que se reduce a dos moléculas de agua, con lo cual se requiere cuatro protones, al mismo tiempo que cuatro protones son bombeados desde la matriz hasta el espacio intermembranal. La reacción global que se cataliza en este complejo es:



Diferentes moléculas como el cianuro, la azida y el monóxido de carbono compiten con la unión de O_2 al centro binuclear del complejo IV, por lo cual estos compuestos inhiben el complejo y por ende bloquean la CTE (Müller-Sterl; 2008).

ATP sintasa o F1F0-ATPasa La ATP sintasa o complejo V, es un gran complejo enzimático que se encuentra embebido en la membrana mitocondrial interna, cataliza la formación de ATP a partir de ADP y P_i , y consta de dos componentes (o factores) distintos: F_1 una proteína periférica de membrana, y F_0 , una proteína integral (Nelson y Cox; 2008).

La transferencia de electrones a través de la CTE provoca el bombeo de protones desde la matriz hacia el espacio intermembranal. El gradiente de pH y el potencial de membrana constituyen una fuerza protón-motriz que es utilizada para dirigir la síntesis de ATP.

La ATP sintasa tiene un mecanismo con un acoplamiento reversible. Puede utilizar tanto el flujo de protones a favor de un gradiente electroquímico para generar ATP (su papel normal en las mitocondrias y en la membrana plasmática de bacterias aerobias), como emplear la energía de hidrólisis del ATP para bombear los protones a través de la membrana como bomba de H^+ . El hecho de que la ATP sintasa genere o consuma ATP depende de la variación neta de energía libre de los procesos acoplados a al bombeo de H^+ a través de la membrana.

1.1.4 Disfunción mitocondrial

La disfunción mitocondrial se puede definir como la incapacidad de las mitocondrias para producir ATP apropiadamente en respuesta a las demandas de energía. Sin embargo, la mitocondria lleva a cabo múltiples funciones más, entre las que se puede mencionar: degradación de ácidos grasos, producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y regulación de calcio intracelular.

Además, este organelo está involucrado en varias vías metabólicas de anabolismo y catabolismo de metabolitos, así como en la regulación de algunas formas de apoptosis.

Por lo tanto, la disfunción mitocondrial se puede definir como la anomalía en cualquiera de estos procesos (Brand y Nicholls; 2011).

Uno de los agentes causantes de la disfunción mitocondrial son las ERO, las cuales se producen principalmente en la mitocondria durante el proceso de fosforilación oxidativa (Pieczenik y Neustadt; 2007), y a pesar de que son indispensables para una señalización celular adecuada (Kang y Pervaiz; 2012), su presencia dentro de las células está altamente regulada, ya que su generación excesiva daña a elementos celulares particularmente vulnerables como son los lípidos, las proteínas, las enzimas de la fosforilación oxidativa y el ADNmit. También se ha atribuido a la desregulación metabólica como una causa de disfunción mitocondrial, ya que algunas vitaminas, minerales y otros metabolitos son cofactores necesarios para la función de enzimas mitocondriales (Ames; 2004), por lo cual una dieta deficiente en micronutrientes puede causar disfunción mitocondrial. Asimismo, se ha descrito que algunas sustancias pueden ejercer efectos dañinos a la mitocondria, como es el caso de metales tóxicos y contaminantes ambientales.

Debido al importante papel que ejerce la mitocondria en la célula; la disfunción mitocondrial, tiene un papel clave en una gran variedad de patologías. La primera enfermedad mitocondrial fue descrita en 1962, cuando una mujer de 35 años de edad presentó miopatía, sudoración excesiva, intolerancia al calor, polidipsia, poliuria y una tasa de metabolismo basal de 180%, esta paciente sufría de un desacoplamiento en la fosforilación oxidativa, lo cual le ocasionaba la generación de calor sin la producción de ATP (Luft et al; 1962). Desde este primer caso documentado, la disfunción mitocondrial ha sido implicada en casi todas las condiciones patológicas y toxicológicas (Aw y Jones; 1989).

En la actualidad hay más de 200 enfermedades que son atribuidas al establecimiento de mutaciones del ADNmt como la principal causa de la enfermedad, entre estas se incluye la neuropatía óptica hereditaria de Leber, MELAS (encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios parecidos a un accidente cerebrovascular), MERRF (síndrome de epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgadas), entre otras; estas patologías están inequívocamente causadas por la disfunción mitocondrial, sin embargo también hay muchas enfermedades muy comunes para las cuales existe una fuerte evidencia correlativa, que sugiere que la disfunción mitocondrial es al menos parcialmente causal de estos padecimientos (Meyer et al; 2013).

1.1.5. Mitocondria y neurodegeneración

Debido a que el cerebro humano usa más oxígeno y produce más energía por unidad de masa que cualquier otro órgano, su metabolismo tiene una alta actividad en la fosforilación oxidativa y por ende una alta producción de ERO, además el cerebro tiene un alto contenido en hierro, el cual que puede catalizar procesos de oxidación. Aunado a esto, el cerebro no cuenta con menor contenido de enzimas antioxidantes que el resto de los tejidos; todos estos factores hacen que este órgano sea excepcionalmente vulnerable al daño oxidativo (Kidd; 2005).

En general, todas las mitocondrias pueden ser susceptibles a ser dañadas, sin embargo los tejidos que tienen una alta demanda energética son más vulnerables. Considerando la intensa demanda de energía y la limitada regeneración de las neuronas, el mal funcionamiento de las mitocondrias puede tener efectos devastadores en la supervivencia neuronal (Jorhi y Beal; 2012).

Es en este punto es donde cobra importancia el papel de la mitocondria en las enfermedades neurodegenerativas, ya que a pesar de las diferentes manifestaciones clínicas, en estos padecimientos la muerte neuronal que se genera comparte eventos bioquímicos y moleculares que están estrechamente relacionados con la función mitocondrial, como son la producción de radicales libres, las mutaciones o defectos en el ADNmt, la desregulación del calcio (Du y Yan; 2010) y la sobreestimulación del receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) y la excitotoxicidad neuronal (Lee et al; 2009).

De hecho, el papel de la mitocondria en la degeneración neuronal se ha hecho evidente con la administración de algunas toxinas, como es el caso de la rotenona y el 3-NP, que al inhibir el complejo I o II de la CTE, respectivamente, pueden reproducir las características de la enfermedad la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Huntington.

1.2. ACIDO 3-NITROPROPIÓNICO

1.2.1. Generalidades

El ácido 3-nitropropionico (3-NP) es una toxina natural, producida por más de 30 especies de hongos y plantas (Francis et al; 2013). Algunos hongos del género *Astragalus*, *Arthrinium* y plantas del género *Indigofera endecapylla* contienen esta toxina. En las

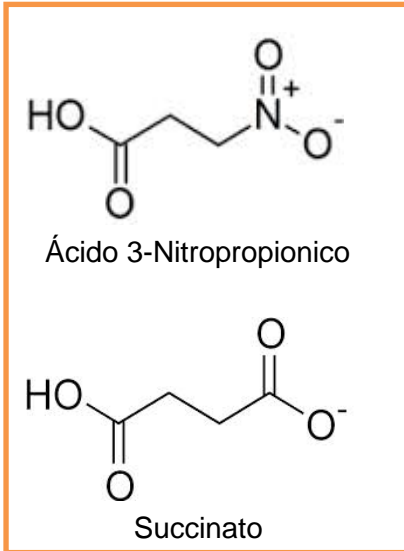


Figura 1.2.1. Acido 3-Nitropropionico (3-NP) y succinato.

plantas dicha toxina proporciona un medio de defensa contra los herbívoros y en el caso de algunas leguminosas, participa en la fijación del nitrógeno.

El 3-NP es un inhibidor suicida de la enzima succinato deshidrogenasa, ya que debido a su similitud estructural con el succinato (Fig 1.2.1), se une irreversiblemente a la enzima e inhibe la oxidación de succinato a fumarato.

Casos de intoxicación con 3-NP han sido ampliamente documentados tanto en seres humanos como en ganado doméstico.

El efecto del 3-NP en humanos fue descrito por primera vez en regiones del norte de china debido a la ingestión de caña de azúcar contaminada con 3-NP (Moldy; 1995).

De 1972 a 1989 se registraron al menos 884 casos de intoxicación por la caña de azúcar de los cuales el 10% fueron fatales. Los niños son más susceptibles a esta toxina presentando diversas distonías, sin embargo éstas también pueden ocurrir entre jóvenes y ancianos (Francis et al; 2013).

La neurotoxicidad del 3-NP se ha establecido de manera concluyente en modelos animales, principalmente por el impacto del envenenamiento en la industria agrícola en las partes occidentales de los Estados Unidos y Canadá, y en regiones del norte de México. Los signos clínicos de intoxicación con 3-NP en el ganado vacuno son la mala coordinación de las extremidades, la formación de espuma de la boca y la nariz y dificultad respiratoria. El agente causante de la mayoría de los casos de envenenamiento es el arbusto de *Astragalus* sp, el cual crece en los pastos después de periodos prolongados de sequía o exceso de pastoreo (Francis et al; 2013). Durante estos periodos, los efectos de la intoxicación 3-NP pueden ser graves. Por ejemplo, un brote en Nuevo México dio lugar a la mortalidad de entre un 3 y un 20% del ganado vacuno y ovino intoxicado.

La toxicidad inducida por el 3-NP causa degeneración selectiva de las neuronas medianas espinosas gabaérgicas en el estriado (Guyot et al; 1997), semejando los procesos observados en la EH, por lo cual que el 3-NP se ha utilizado ampliamente para generar un modelo de dicha enfermedad ya que puede reproducir, dependiendo de la dosis y el tiempo de administración, disfunciones motoras, de aprendizaje y lesiones estriatales que imitan a las alteraciones histológicas y neuroquímicas de la EH (Túnez y Santamaría; 2009).

La respuesta al 3-NP difiere de acuerdo a la especie y cepa utilizada como modelo; el modelo más común es el de roedores, donde la rata es más sensible que el ratón; y entre las especies de ratas, la cepa Fisher es la más vulnerable, sin embargo esta no es usada para generar el modelo ya que es muy difícil controlar el daño causado por esta toxina. La rata de la cepa Lewis responde de manera más estable y reproduce alteraciones conductuales, mientras que la ratas Wistar y Sprague-Dawley, a pesar de su menor sensibilidad al 3-NP, desarrollan lesiones y alteraciones conductuales de gran valor para estudiar los efectos causados por el 3-NP (Túnez et al; 2010).

Hay una gran variedad de estudios que han reportado el uso del 3-NP en un amplio rango de dosis y tiempos, debido a que este modelo puede reproducir tanto las alteraciones hipercinéticas como las hipocinéticas de la EH, en función del tiempo y la dosis administrada, permitiendo así evaluar las fases iniciales (o principios) y tardías de la enfermedad. Por ejemplo, para ratas Wistar el rango va desde 10-20 mg/kg/día de 1 a 4 días en tratamientos agudos; mientras que en tratamientos crónicos los tiempos varían de 7 días hasta cuatro semanas, con dosis desde 10 hasta 60 mg/kg/día (Túnez; 2010).

1.2.2. Efecto neurotóxico del 3-NP

La neurotoxicidad del 3-NP es inicialmente producida por la inhibición de la enzima succinato deshidrogenasa, lo cual desencadena diferentes eventos celulares (Villarán et al; 2008) como la disminución en la producción de ATP, aumento de la formación de radicales libres, cambios en la concentración de Ca^{2+} , la inducción de proteínas apoptóticas, daño al DNA mitocondrial y un aumento en los niveles de dopamina, todos estos eventos llevan a la muerte neuronal, principalmente de las neuronas espinosas medianas en estriado; se han reportado muchos de los efectos que ejerce esta toxina, algunos de los cuales se muestran en la tabla 1.1.2

Tabla 1.2.2. Algunos de los principales efectos del 3-NP.

Efectos del 3-NP	Modelo	Dosis	Referencias
Inhibe irreversiblemente la SDH	Mitocondrias aisladas de hígado de rata	3-NP 2 mM	Altson et al, 1977
Induce muerte celular necrótica y apoptótica	Cultivos primarios de neuronas de hipocampo	5 mM	Nars P et al; 2003.
Genera muerte neuronal mediante: Activación de calpaínas Induce la presencia de citocromo c y Smac/Diablo	Cultivos primarios de neuronas estriatales y corticales	100 mM	Galas et al; 2004.
Eleva los niveles de dopamina. Inhibe la recaptura de glutamato y producción de ERO.	Cerebros de ratas Wistar	Perfusión de 3-NP 5 mM por 1 h.	Villarán et al; 2008.
Estimulación de NOS Producción de NO[•] que reacciona con O₂^{•-} produciendo ONOO⁻, y OH[•].	Rebanadas estriatales de cerebro de ratas Wistar	Preincubación de 3-NP 100 μM, por 3 h.	Napolitano M, 2008.
Disminución de los niveles de ATP	Cultivo de neuronas corticales de rata	1 mM – 10 mM (1, 3 y 6 h de exposición)	Liot et al; 2009
Aumento citosólico de Ca₂⁺ y la consiguiente exitotoxicidad glutamatérgica.	Mitocondrias estriatales aisladas de rata Sprague-Dawley	20 mg/kg/día 1-5 días	Nasr et al; 2009.

El 3-NP ejerce un amplio espectro de efectos tóxicos en el cerebro (Ryu et al; 2003), a pesar de que la mayoría de los estudios sobre la citotoxicidad inducida por el 3-NP se han centrado en la muerte neuronal, también hay evidencia que muestra que otras células del cerebro son afectadas por el tratamiento con esta toxina. Así, un estudio de difusión por resonancia magnética en ratas administradas con 3-NP reveló una disminución en el número de astrocitos (Nishino et al; 1997) y un aumento en sus niveles citosólicos de Ca²⁺, también se reportó un daño axonal y pérdida de oligodendrocitos en ratas

administradas con diferentes dosis de 3-NP (10-30 mg/Kg), dicho daño fue dependiente de la concentración utilizada de la toxina (McCracken et al., 2001).

Ryu y colaboradores mostraron que la microglía tiene una participación en la neurotoxicidad del 3-NP, ya que al administrar 3-NP tanto in vivo como en cultivos celulares, la microglía se activó e invadió las regiones dañadas del cuerpo estriado, aumentando la producción de ERO.

A pesar de la cantidad de estudios realizados, hasta el momento no se conocen los mecanismos subyacentes de la degeneración preferente del cuerpo estriado en el modelo de 3-NP, así como en la EH, pero se ha sugerido que el daño mitocondrial podría desempeñar un papel importante.

1.2.3. Participación de la mitocondria en el efecto del 3-NP

Una hipótesis generalmente admitida para explicar la degeneración inducida por 3-NP, es el agotamiento de los niveles de ATP producidos por un déficit en el metabolismo de la energía, lo cual puede conducir a la despolarización de la membrana y producir excitotoxicidad a través del aumento de la sensibilidad de los receptores NMDA y un consiguiente aumento citosólico de Ca^{2+} (Villarán et al; 2008). Por otro lado, la alteración del metabolismo energético debido a la inhibición de la succinato deshidrogenasa puede producir estrés oxidativo, el cual tiene un papel crítico en la muerte neuronal.

En lo que se refiere al daño oxidativo, se sabe que la alteración del metabolismo por 3-NP induce el estrés oxidativo y nitrosativo debido a la excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) y / o el agotamiento de los sistemas antioxidantes (Túnez; 2010). También se ha demostrado que el 3-NP altera la homeostasis de los iones Ca^{2+} , lo cual conduce a la activación de la sintasa de óxido nítrico a través de Ca^{2+} /calmodulina, y la posterior producción de NO.

Diversos estudios también sugieren que la excitotoxicidad juega un papel importante en la degeneración estriatal inducida por 3-NP, ya que las terminales dopaminérgicas del cuerpo estriado liberan su neurotransmisor con mayor facilidad que las neuronas de otras regiones cerebrales, lo cual hace del cuerpo estriado una estructura más vulnerable (Villarán et al; 2008).

A pesar de que el 3-NP inhibe la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa de todos los tejidos, como se mencionó anteriormente, el estriado es particularmente vulnerable a esta toxina, por lo cual el 3-NP constituye una herramienta útil para el estudio de los mecanismos involucrados en la EH y para el análisis de nuevas estrategias terapéuticas.

1.3. ÁCIDOS GRASOS ω -3

Tradicionalmente, se ha pensado que los nutrientes obtenidos de la dieta solo protegen al organismo del desarrollo de los síndromes característicos de las deficiencias nutricionales. Sin embargo, algunos nutrientes presentan una función dual: cuando se consumen a través de la dieta en dosis bajas, son esenciales para mantener el metabolismo normal o el crecimiento, pero cuando se administran en dosis altas o en forma pura también pueden ejercer efectos farmacológicos (Wurtman, 2011). Una gran ventaja para este tipo de nutrientes, entre los que se puede destacar ácidos grasos esenciales, vitaminas, minerales y antioxidantes (Bourre, 2006), es que la barrera hematoencefálica es naturalmente permeable a ellos. Esto ha llevado a plantear que la nutrición puede tener consecuencias no solo para la función normal del tejido nervioso, sino también para minimizar algunas de las consecuencias del envejecimiento, las enfermedades neurodegenerativas y otros trastornos neurológicos (Morley, 2010).

Suplementos dietéticos de aceite de pescado han ido ganando popularidad en los últimos años debido a diversos beneficios de salud proporcionados por los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) (Sullivan et al., 2011). Entre los AGPI se encuentran los ácidos grasos ω -3, los cuales juegan un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de diferentes órganos, y se ha atribuido que tienen una importante participación en la prevención de diferentes patologías, como las cardiovasculares, trastornos psiquiátricos, neurológicos, dermatológicos e inmunológicos (Mazza et al; 2007). Por lo cual, en los siguientes apartados se describe cómo es que estos ácidos grasos se nombran y clasifican, las principales fuentes alimenticias de las que se pueden obtener, su importancia en el desarrollo y mantenimiento de las funciones celulares; así como también algunos de los padecimientos asociados a su deficiencia y el efecto que se ha presentado tras su administración.

1.3.1 Nomenclatura y clasificación de los ácidos grasos

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos con grupos laterales hidrocarbonados de cadena larga, estos pocas veces se encuentran libres en la naturaleza, más bien aparecen en forma esterificada como constituyentes tanto de los triglicéridos como de los lípidos complejos y pueden esterificar también al colesterol. Son compuestos muy insolubles en agua y ricos en energía metabólica (Mataix; 2004). Los ácidos grasos de interés biológico son ácidos carboxílicos de número par de átomos de carbono (principalmente entre 4 y 26).

En las plantas y en los animales superiores los ácidos grasos predominantes son los de 16 y 18 carbonos como el ácido palmítico, oleico, linoleico y esteárico. De acuerdo con la longitud de su cadena los ácidos grasos se pueden clasificar en:

- Ácidos grasos de cadena corta (4-6 carbonos)
- Ácidos grasos de cadena media (8-12 carbonos)
- Ácidos grasos de cadena larga (14-18 carbonos)
- Ácidos grasos de cadena muy larga (20 o más carbonos)

Los ácidos grasos también se clasifican en función de su cadena carbonada en: ácidos grasos saturados, monoinsaturados (con un doble enlace) y poliinsaturados (con dos o más dobles enlaces) (Fig.1.3.1). Sus dobles enlaces suelen tener configuración “cis” y encontrarse conjugados dentro de la cadena, es decir estar separados por un grupo metileno. Aunque no son mayoritarios, también hay ácidos grasos con dobles enlaces en posición trans (los cuales proceden de modo natural de la grasa de la leche y de la carne de rumiantes, así como también por transformación química a través de procesos tecnológicos).

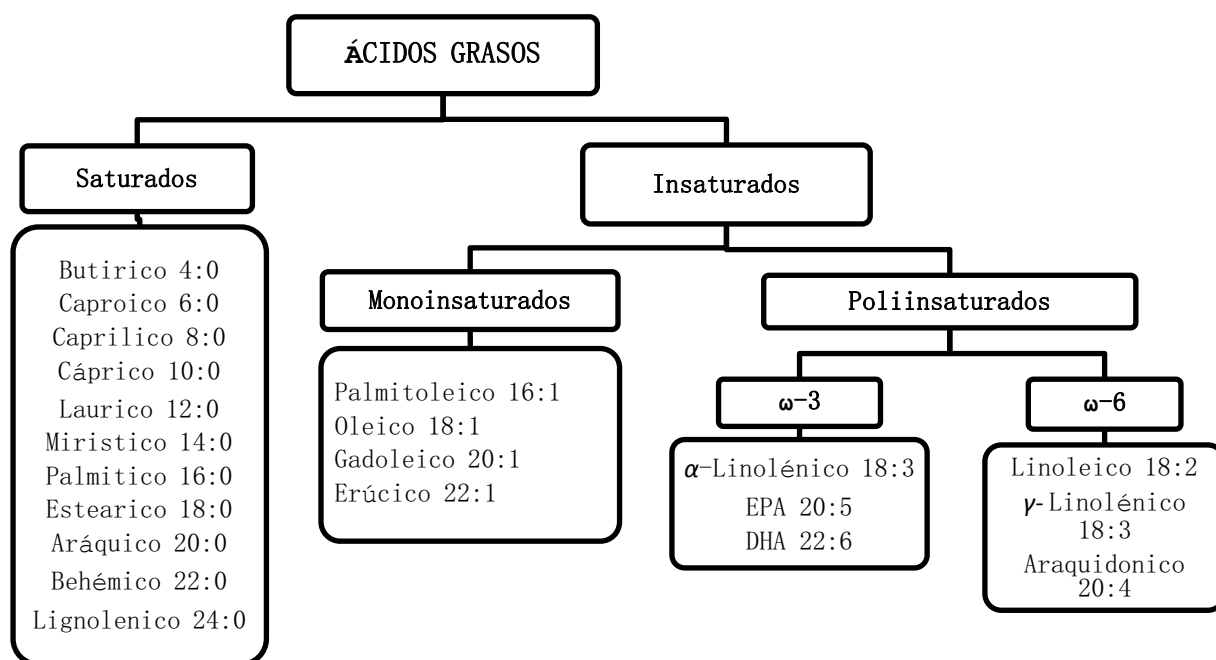


Figura 1.3.1.1. Clasificación de los ácidos grasos de acuerdo con las insaturaciones que presentan.

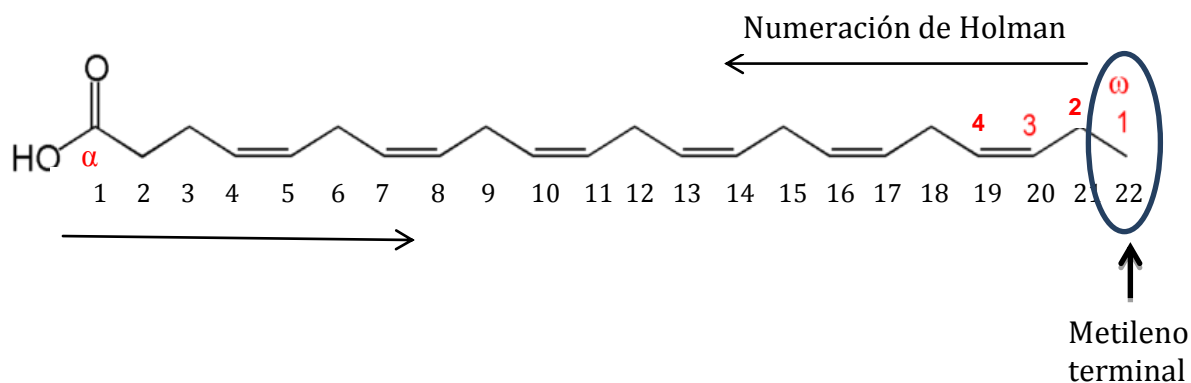
En cuanto a su nomenclatura, los ácidos grasos naturales más frecuentes suelen tener un nombre común tal como se muestra en la Fig.1.3.1, además del nombre sistemático (Mataix; 2004) establecido por la IUPAC.

Así por ejemplo el ácido graso saturado de 16 átomos de carbono cuyo nombre sistemático es hexadecaenoico, se suele conocer como ácido palmítico, o abreviadamente, 16:0 (lo que indica que son 16 átomos carbono y ningún doble enlace).

En la nomenclatura sistemática los ácidos grasos se enumeran considerando al carbono que posee la función ácida o carboxílica como carbono 1, y así sucesivamente enumera los carbonos hasta alcanzar el metilo terminal, la ubicación de los dobles enlaces se identifica con el símbolo Δ .

Si bien esta notación es útil para la identificación química de los ácidos grasos, no lo es para el análisis de sus efectos biológicos y nutricionales, por lo cual es más común utilizar la nomenclatura introducida por Holman, en la cual los ácidos grasos se numeran empezando por su extremo metilo terminal, es decir, al revés de la notación de la IUPAC, el metileno terminal se denomina carbono ω .

Los ácidos grasos pueden ser ω -3, ω -6 u ω -9 de acuerdo con la ubicación de la primera doble ligadura a partir del metileno terminal (Coronado-Herrera et al; 2006). Si la doble ligadura se encuentra entre los carbonos 3 y 4 (contados a partir del metileno terminal) se denominan ω -3 (Figura 1.3.1.2), entre estos se encuentra el ácido linolénico ($18:3\Delta^{9,12,15}$) presente en algunos vegetales terrestres y sus derivados: el DHA (ácido docosahexaenoico; $22:6\Delta^{3,6,9,12,15,18}$) y el EPA (ácido eicosapentaenoico; $22:5\Delta^{3,6,9,12,15,18}$), que pueden ser obtenidos principalmente a partir de algas y peces de aguas frías.



- Nombre común: Ácido cervónico
- Nomenclatura IUPAC: Ácido docosahexaenoico (DHA); $22:6\Delta^{3,6,9,12,15,18}$
- Nomenclatura de Holman: 22:6, ω -3 (El primer doble enlace se encuentra en el tercer carbono a partir del metileno terminal).

Figura 1.3.1.2. Diversas nomenclaturas de los ácidos grasos. (Ejemplo el DHA).

Del mismo modo, si el primer doble enlace se encuentra entre los carbonos 6 y 7 el ácido graso se identifica como perteneciente a la familia de los ω -6, de los cuales el ácido

linoleico (18:2 $\Delta^{9, 12}$) es particularmente abundante en vegetales terrestres. Mientras que si el doble enlace esta entre los carbonos 9 y 10, se identifica como perteneciente a la familia ω -9, el ácido oleico (18:1 Δ^9) es el más abundante en la naturaleza, tanto en animales como en vegetales.

1.3.2. Fuentes y biosíntesis de los ácidos grasos ω -3

Considerados en su conjunto, los ácidos grasos saturados abundan en los animales terrestres, especialmente los mamíferos, así como en dos aceites de procedencia vegetal, el de coco y el de palma.

Por otra parte, entre los ácidos grasos monoinsaturados, se encuentra principalmente en el ácido oleico el cual caracteriza de modo especial el aceite de oliva y en menor proporción el de colza. De los ácidos grasos poliinsaturados, el más abundante es el ácido linoleico, ω -6 que se encuentra presente en todos los aceites de semillas como: girasol, maíz, cártamo, germen de trigo, pepita de uva y cacahuete (Mataix et al; 2004). Mientras que en los ácidos grasos de la serie ω -3, el α -linolénico se encuentra en cantidades pequeñas, aunque suficientes desde el punto de vista de los requerimientos nutricionales, en los aceites de colza y soja, también se encuentra en aceites de semillas como la chía y lino, y en las hojas verdes de plantas y algas (Bazan, 2011). Los otros ácidos grasos de la serie que son importantes desde el punto de vista nutricional, son el EPA y el DHA, estos se encuentran principalmente en peces de aguas frías y sus aceites (salmón, trucha, bacalao, etc.). En estos animales acuáticos la necesidad de la biosíntesis de ácidos grasos ω -3 es un imperativo biológico para que la grasa del animal marino no se solidifique a la temperatura del medio acuático en el que vive (Mataix et al; 2004).

La razón bioquímica por la cual no todos los ácidos grasos se encuentran en todos los organismos radica en la presencia de los sistemas enzimáticos necesarios su biosíntesis; En general, tanto las plantas como los animales pueden sintetizar ácidos grasos a partir de la condensación de dos unidades de carbono mediante una serie de cuatro reacciones enzimáticas opuestas a la β -oxidación, donde el producto final del proceso es el ácido palmítico (16:0). Éste es inmediatamente esterificado por la coenzima A para formar palmitoil-CoA, que es transportado al retículo endoplásmico donde se forman ácidos grasos de cadena más larga a través de reacciones de elongación catalizadas por enzimas, las cuales añaden de modo secuencial fragmentos de dos carbonos al extremo carboxilo; en los sistemas del retículo endoplásmico también se introducen dobles enlaces a los acil-CoA de cadena larga.

De esta forma, el ácido esteárico (18:0) por acción de una delta 9 desaturasa se transforma en ácido oleico (18:1, ω -9), dicha reacción ocurre tanto en animales como en vegetales. Sin embargo para la generación de una insaturación posterior en este ácido se produce una divergencia metabólica: las células vegetales introducen los dos nuevos dobles enlaces desde el centro de la molécula hacia el extremo no carboxílico, mientras que las células animales lo hacen hacia el extremo carboxílico (Fig 1.3.2). Este hecho, hace que únicamente los vegetales formen los ácidos grasos linoleico y α -linolénico y a partir de estos, tanto en las células animales como vegetales se forman las familias ω -3 y ω -6.

Para los seres humanos tanto el ácido linoleico como el α -linolénico son ácidos grasos esenciales, ya que al carecer del sistema enzimático necesario para producirlos deben ser obtenidos de la dieta, a diferencia del EPA y el DHA los cuales además de ser obtenidos de la dieta pueden ser sintetizados a partir de su precursor el ácido α -linolénico mediante procesos enzimáticos de elongación y desaturación. Dicha biosíntesis se lleva a cabo en una primera etapa en los microsomas del retículo endoplásmico liso y después en los peroxisomas (Bazan et al; 2011) este proceso ocurre en su mayoría en las células del hígado, aunque también se ha reportado una baja biosíntesis en células endoteliales del cerebro y en astrocitos (Igarashi et al; 2007).

Anteriormente se pensaba que la ingesta de ácido α -linolénico era suficiente para suplir las necesidades de ácidos grasos ω -3, sin embargo este concepto ha sido ampliamente cuestionado debido a que la capacidad del α -linolénico de convertirse en EPA y DHA es muy limitada (Schuchardt y Hahn; 2013), alrededor de un 4% para los hombres y 9% para las mujeres (Gerster; 1998). Por lo cual se ha propuesto como indispensable la ingesta de ácidos grasos ω -3: EPA y DHA.

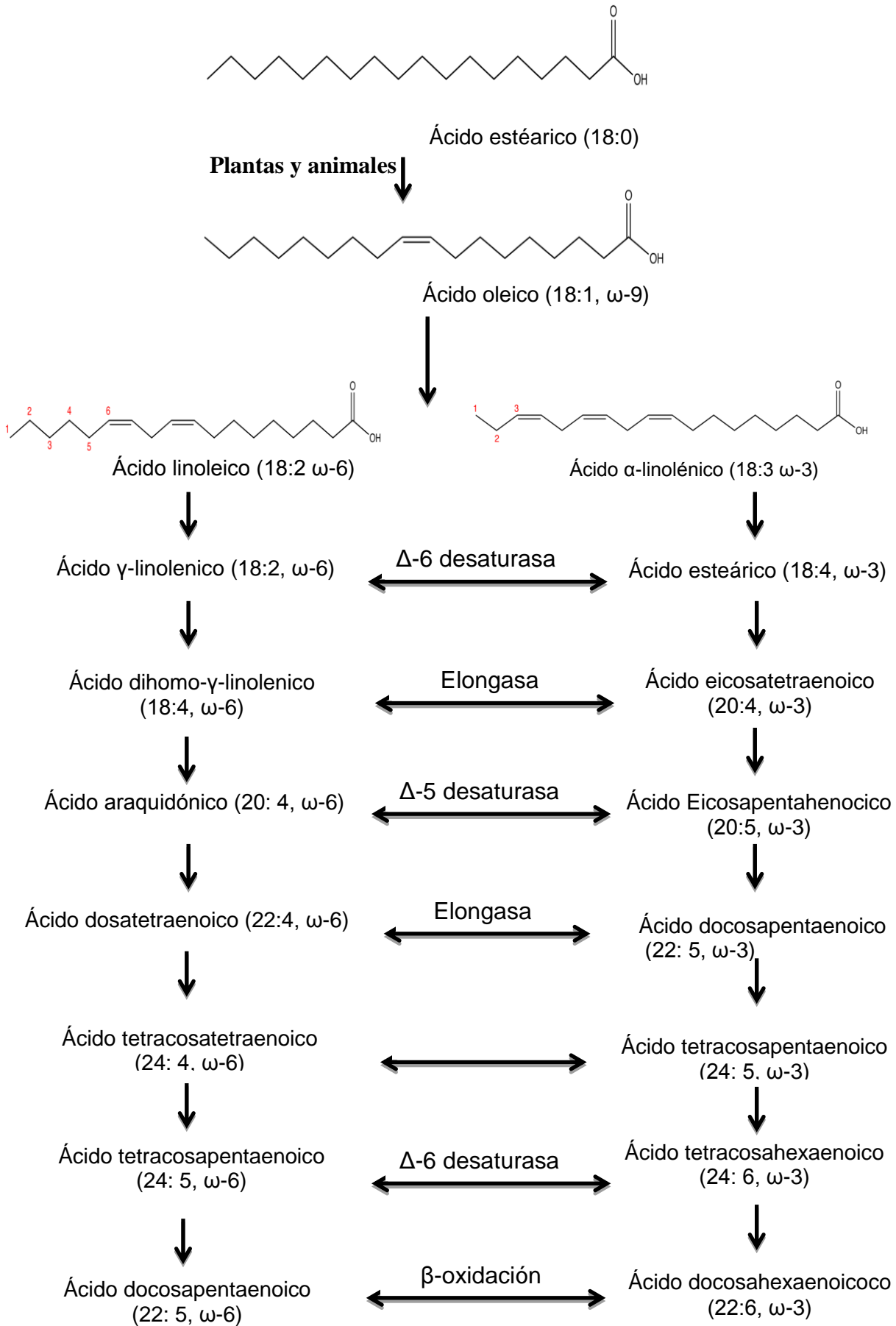


Figura 1.3.2. Síntesis de ácidos grasos ω-3 y ω-6.

1.3.3 Aceite de hígado de bacalao como fuente de ácidos grasos ω -3

El aceite de hígado de bacalao (AHB) ha sido ampliamente usado como un suplemento alimenticio, debido a que contiene importantes proporciones de ácidos grasos ω -3, principalmente DHA y EPA, y significantes cantidades de vitaminas A y D., Este aceite es recomendado para tratar y proteger a niños de raquitismo, su ingesta ha sido asociada con efectos benéficos en corazón, huesos, cerebro, piel, cabello y uñas, así como también es recomendado en enfermedades cardiovasculares, desórdenes autoinmunes, enfermedades mentales y entre otros (Guillén; 2008).

Este aceite es extraído de hígados frescos de la especie de bacalao *Gardus morrhua* Linné y otras especies de la familia Gadiadae mediante calentamiento con vapor a baja presión, el contenido de ácidos grasos ω -3 depende de la calidad del proceso de extracción utilizado, así como de su subsecuente purificación y condiciones de almacenamiento; su calidad es definida por algunos parámetros como la proporción de ω -3 presentes o de vitaminas A y D.

La seguridad de consumo de este aceite es determinada por la ausencia o bajos niveles de contaminantes como metales pesados (mercurio, cadmio, y plomo) y bifenoles policlorados. Como anteriormente se mencionó los niveles de ácidos grasos ω -3 que contiene el AHB dependen de varios factores, sin embargo usualmente tienen entre un 75 y un 80% de ácidos grasos insaturados, de estos entre el 9 y 11% son DHA, así como entre un 10 y 14% de EPA (Guillén et al; 2008).

1.3.4. Absorción, metabolismo y biodisponibilidad de los ácidos grasos

El aporte de nutrientes en las células diana, no solo depende de la concentración de la respectiva sustancia en los alimentos, sino también de la biodisponibilidad del nutriente, es decir de su capacidad para ser absorbido y transportado a la circulación sistémica y al sitio de la actividad fisiológica (Schuchardt y Hahn; 2013).

En el caso de los ácidos grasos, estos se ingieren en forma de triacilgliceroles, y se incorporan en micelas que se forman con la ayuda de las sales biliares en la luz intestinal. La incorporación de los ácidos grasos a las micelas orienta sus enlaces éster hacia la superficie de la micela, logrando que dichos enlaces sean más susceptibles a la digestión por parte de las lipasas pancreáticas, quienes degradan los triacilgliceroles hasta monoacilglicerol y dos ácidos grasos, éstos se transportan en las micelas hasta el epitelio intestinal, donde se absorben a través de la membrana plasmática (Nelson y Cox; 2008) con la ayuda de una proteína transportadora de ácidos grasos FATP4 (Bazan et al; 2011).

Una vez dentro de los enterocitos, los ácidos grasos (principalmente los AGPI) se unen a proteínas citosólicas acarreadoras de ácidos grasos, las cuales los pueden llevar a las mitocondrias para la beta-oxidación o al retículo endoplásmico donde son reesterificados en forma de triglicéridos y ensamblados en quilomicrones, los quilomicrones son secretados en la linfa, posteriormente la linfa drena en la corriente sanguínea a través del ducto torácico y los quilomicrones circulan e interactúan con la lipoproteína lipasa endotelial que hidroliza los triacilgliceroles a ácidos grasos y glicerol, los ácidos grasos libres se unen a la albumina para ser transportados al hígado o a otros tejidos.

El ácido α -linolenico como se describió anteriormente (Fig 1.3.2), se puede convertir en EPA y DHA en el hígado. El DHA formado se une a la coenzima A y forma DHA-coenzima A, lo cual permite que sea esterificado en la posición sn-2 de los fosfolípidos, principalmente fosfatidilcolina. Posteriormente los fosfolípidos de DHA son empaquetados en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLs) u otras lipoproteínas; de esta forma el DHA derivado de la dieta o de la elongación y desaturación hepática aumenta en la circulación sanguínea y los fosfolípidos llegan a los capilares de la retina y a la unidad neurovascular del cerebro, principalmente, así como a otros tejidos (Bazan et al; 2011).

Diversos estudios han mostrado que los ácidos grasos poliinsaturados entran rápidamente del plasma al cerebro, pero su incorporación en los fosfolípidos de las membranas del cerebro es menor al 0.2% (Rapoport; 2001).

1.3.5. Papel de los ácidos grasos ω -3 en el desarrollo, función y declive del SNC.

Desde el punto de vista nutricional la ingesta de los ácidos grasos ω -3 y ω -6 debe guardar un equilibrio (ω -6/ ω -3 de 2:1, lo que significa ingerir el doble de ω -6 de lo que se ingiere de ω -3), sin embargo, las poblaciones actuales ingieren una mayor cantidad de calorías combinado con un menor gasto energético, más ácidos grasos trans, grasas saturadas y ácidos grasos ω -6, frente a un menor consumo de ácidos grasos ω -3, proteínas, antioxidantes y calcio (Coronado-Herrera; et al 2006). Dichos cambios en la alimentación han incrementado la taza ω -6/ ω -3 a más de 15, es decir, se ingiere 15 veces más ω -6 que ω -3 (Mazza et al; 2007).

Este profundo cambio en la dieta y por ende en la biodisponibilidad de los ácidos grasos ω -3, ha tenido como resultado alteraciones en el sistema cardiovascular, el sistema inmune, el sistema nervioso central (SNC) así como en otros órganos (Bazan et al; 2011).

En lo que respecta al SNC, la importancia de los ácidos grasos ω -3 radica en primera instancia en su abundancia, ya que después del tejido adiposo el cerebro es el órgano con mayor contenido de lípidos, de los cuales el 35% son AGPI (Eckert et al; 2013) y de éstos, el DHA es el más abundante (ya que constituye aproximadamente el 50% de los AGPI) (Bazan et al; 2011).

Debido a la longitud de su cadena y al número de dobles enlaces que contienen, los AGPI son capaces de hacer la bicapa lipídica dinámica y flexible (Mazza et al; 2007). Además los ácidos grasos ω -3 son componentes importantes de los fosfolípidos de membrana neuronal y de la glía; participan en la remodelación y síntesis de la membrana del cerebro, así como en la transducción de señales (Rapoport et al; 2001)

La necesidad de ácidos grasos ω -3 en el cerebro se presenta a lo largo de toda la vida de del ser humano, ya que son necesarios desde la etapa prenatal para el desarrollo normal del SNC (Mazza et al; 2007), y su deficiencia puede afectar el desarrollo y las funciones normales del cerebro, al alterar la composición de las membranas celulares de neuronas, oligodendrocitos y astrocitos, así como la mielina, sinaptosomas y mitocondrias (Eckert; 2013).

La mayor parte de ácido araquidónico (AA) y DHA se incorporan a las estructuras del cerebro durante el tercer trimestre del desarrollo prenatal y el inicio del período post-natal. Por tanto, un suministro adecuado en la dieta de ácidos grasos ω -3 y ω -6 durante este periodo es crucial para la incorporación óptima de DHA y AA en el cerebro. Así, las cantidades limitadas de ácidos grasos ω -3 en las dietas occidentales podrían dar lugar a una relativa falta de DHA durante el desarrollo del cerebro, lo cual representa un gran problema ya que el crecimiento acelerado del cerebro se correlaciona con el contenido de DHA en sus fosfolípidos (Lauritzen et al., 2001). Las estimaciones disponibles sugieren que 70 mg/día de ácidos grasos ω -3 se incorporan en tejidos fetales durante el tercer trimestre de gestación. Particularmente, el DHA es importante en esta etapa, ya que este ácido graso se integra en las células nerviosas durante la sinaptogénesis y participa en la transmisión sináptica colinérgica (Mazza et al; 2007); la deficiencia del DHA es compensada por un incremento de ácidos grasos ω -6, los cuales están involucrados en procesos inflamatorios (Denis et al; 2013).

Así, en varios estudios donde se adicionaron ácidos grasos ω -3 a las fórmulas para lactantes prematuros, éstos presentaron una mejoría en su actividad visual (Heird y Lapillonne; 2005). Aunque están disponibles pocos datos con respecto a la función cognitiva, un estudio llevado a cabo por Fleith y Clandinin (2005) demostró que la alimentación suplementada con ácidos grasos ω -3 mejora la atención visual y el

desarrollo cognitivo de los bebés prematuros en comparación con los que no recibieron ácidos grasos ω -3.

El consumo de ácidos grasos ω -3 se ha asociado con muchos beneficios a la salud (Eckert; 2013). En general en los últimos años, se ha realizado una gran cantidad de estudios clínicos con el fin de conocer si la suplementación con estos ácidos grasos especialmente EPA, puede ser usada como tratamiento de desórdenes psiquiátricos, y de hecho parecen ser eficaces en trastornos como depresión y demencia.

Una serie de reportes epidemiológicos mostraron una relación entre la ingesta de pescado y mariscos y la protección contra el trastorno bipolar (Noaghiul y Hibbeln; 2003) y el desorden afectivo estacional (Cott y Hibbeln; 2001). Otra investigación concerniente a una muestra aleatoria de la población confirma que el consumo frecuente de pescado está relacionado con la reducción de ideas suicidas (Tanskanen et al., 2001).

Aunque todavía hay resultados contradictorios derivados de los estudios sobre la posible utilización de los ácidos grasos ω -3 en el tratamiento de la depresión, el trastorno bipolar y la esquizofrenia; sí se ha mostrado que los ácidos grasos ω -3 pueden ser útiles en el tratamiento de la demencia y son un tratamiento seguro para los trastornos psiquiátricos en el embarazo y en la lactancia (Mazza et al; 2007).

La esperanza de vida ha aumentado enormemente en el siglo pasado, de alrededor de 50 años a más de 80, debido a una mejor atención médica y mejores condiciones de vida. Sin embargo, el aumento de la edad también es el principal factor de riesgo de importantes condiciones que amenazan la vida, como las enfermedades neurodegenerativas y los trastornos cognitivos relacionados con la edad. Ambas aumentan significativamente después de los 60 años de edad en casi todas las poblaciones del mundo (Janssen y Kiliaan; 2014).

El envejecimiento normal es a menudo acompañado por una disminución la función cognitiva, marcado por el descenso de la densidad sináptica y en la supervivencia neuronal, así como una pérdida en el volumen de la materia gris y blanca (Janssen y Kiliaan; 2014). Este daño cerebral relacionado con la edad tiene muchas causas, algunas de las cuales pueden ser influenciados por la dieta. Por tanto, una dieta óptima puede ser una forma práctica de retrasar el inicio de la disminución cognitiva; como anteriormente se ha destacado, las investigaciones nutricionales indican que el contenido de ácidos grasos ω -3 en las dietas occidentales es demasiado bajo para proporcionar al cerebro un suministro óptimo de DHA, aunado a esto, se ha mostrado que las concentraciones de ácidos grasos ω -3 declinan con la edad (Gao et al; 2012); Esta deficiencia de ácidos

grasos ω -3 en el cerebro se ha asociado con deterioro de la memoria, trastornos emocionales y alteración de procesos cerebrales en roedores (Eckert et al; 2013).

Los estudios en humanos sugieren que un consumo adecuado de ácidos grasos ω -3 puede disminuir el deterioro cognitivo relacionado con la edad y también puede proteger contra el riesgo de la demencia senil (Denis et al; 2013).

En lo que respecta a las enfermedades neurodegenerativas, los beneficios de la suplementación con ácidos grasos ω -3 han sido reportados en modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Joseph y Muralidhara; 2013). Varios estudios animales, epidemiológicos y clínicos han mostrado que la alta ingesta de DHA está relacionada con la reducción del riesgo de la enfermedad de Alzheimer (Janssen y Kiliaan; 2014). Por ejemplo, la administración crónica de DHA y EPA en la dieta ha demostrado disminuir el deterioro de la capacidad de aprendizaje y la cognición espacial en un modelo de la enfermedad de Alzheimer en rata (Hashimoto y Hossian; 2011).

A pesar de los numerosos estudios en este ámbito, el impacto benéfico de los ácidos grasos ω -3 en lo que respecta a la función cerebral, solo recientemente se ha vinculado a mecanismos específicos (Denis et al; 2013), los cuales no ha sido del todo aclarados a pesar de que se han propuesto mecanismos de acción tales como efectos anti-apoptóticos, anti-inflamatorios y anti-oxidantes (Joseph y Muralidhara; 2013). Como anteriormente se ha mencionado la disfunción mitocondrial es un evento patológico común en el envejecimiento y en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Huntington, algunas evidencias apuntan hacia este organelo como uno de los blancos de acción de los ácidos grasos ω -3 en estos padecimientos, sin embargo aún falta un largo camino por recorrer para comprender su mecanismo exacto de acción.

1.3.6. Participación de los AGPI ω -3 en disfunción mitocondrial.

Respecto al efecto de los ácidos grasos ω -3 sobre la función mitocondrial, se han realizado estudios en modelos *in vitro* e *in vivo* de daño cardíaco (Khairallah, 2010; O'Shea et al; 2009) o hepático (Song et al; 2008; Zhang et al; 2011). Con estos estudios se ha encontrado evidencia de que el DHA y el EPA podrían jugar un papel importante en el mantenimiento de la integridad y función mitocondrial, ya que el tratamiento de animales con dietas suplementadas con aceite de pescado (ricos en ω -3), incrementa la capacidad de retención de Ca^{2+} y disminuye el hinchamiento mitocondrial, lo que sugiere que retrasa la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (Khairallah, 2010).

Aunque hay estudios que revelan el papel de la suplementación de ácidos grasos omega ω -3 en la expresión de genes relacionados con el metabolismo oxidativo, la biogénesis mitocondrial y la producción de ATP tanto en cerebro como en otros tejidos (Kitajka et al; 2002, Flachs et al; 2005), el papel de estos ácidos grasos en la disfunción mitocondrial del sistema nervioso se ha explorado muy poco, aunque sí hay evidencia de su efecto neuroprotector. Por ejemplo, el DHA redujo la respuesta celular prooxidante inducida por metilmercurio tanto en cultivos de astrocitos como de neuronas (Kaur et al., 2008). Por otro lado, la suplementación de la dieta con un concentrado de aceite de pescado rico en DHA y EPA incrementó los niveles séricos de estos ácidos grasos en un efecto dependiente de la dosis, y redujo la degeneración axonal 30 días después de inducido daño por traumatismo cerebral en ratas (Mills et al., 2011). En el modelo de daño mitocondrial inducido por rotenona se mostró que la administración de aceite de pescado por 30 días disminuye los niveles de malonaldehído, hidroxiperoxido, y proteínas carboniladas (Joseph y Muralidhara; 2012) (los detalles experimentales sobre cada uno de estos estudios se muestran en la tabla 1.3.5).

Los estudios en los que se evalúa el efecto neuroprotector de los ácidos grasos ω -3 en modelos animales de neurotoxicidad, como los mostrados anteriormente son relativamente pocos en comparación a la gran cantidad de estudios epidemiológicos y clínicos en los que se muestra el efecto de los ácidos grasos ω -3, este último tipo de estudios a pesar de su importancia no pueden determinar cuál es el mecanismo exacto de acción de los ácidos ω -3, por lo cual la necesidad de desarrollar estudios en los que se determine cuál es el mecanismo de acción de estos ácidos grasos, con la finalidad de desarrollar blancos terapéuticos más eficaces.

Tabla 1.3.5. Estudios realizados en modelos animales sobre el papel de los ácidos grasos ω -3 en mitocondria y modelos neurotóxicos.

Efecto de ácidos grasos ω-3	Dosis	Modelo	Referencia
Aumento en los niveles de enzimas de la β -oxidación.	Dieta suplementada con 15% de aceite de pescado, durante 15 días.	Mitocondrias de hígado de ratas Sprague-Dawley	Ide et al; 2000.
Modulación de la expresión de genes en el cerebro asociados con el metabolismo energético y la producción de ATP.	Dieta suplementada con 8% de aceite de pescado, desde la concepción hasta la edad adulta de la rata.	RNA obtenido de cerebros de ratas Wistar.	Kitajka et al; 2002.
Estimulación en la expresión de genes que codifican factores de regulación de la biogénesis mitocondrial y el metabolismo oxidativo.	Dieta suplementada con 20% de ácidos grasos (de los cuales el 6% EPA y 51% DHA) durante 4 semanas.	Tejido adiposo blanco de epidídimo y subcutáneo dorso lumbar de ratones C57BL/6J.	Flachs et al; 2005
Reducción del estrés oxidativo y cambios apoptóticos en hipocampo.	Dieta suplementada con 0.4 g/kg/día con Marincap® (18% EPA, 12 % DHA)	Tejido de hipocampo de ratas Sprague-Dawley.	Cosar et al; 2008.
Reducción en la respuesta celular prooxidante inducida por metilmercurio	Células expuestas a 30 y 90 μ M de DHA por 24 horas,	Cultivos de primarios de astrocitos y neuronas de cerebelo.	Kaur et al; 2008
Disminución en las ERO. Recuperación en el potencial de acción y producción de ATP.	Administración oral de 0.5 g/Kg y 1g/Kg de aceite de perilla durante 21 días.	Células disociadas de cerebro obtenidas de conejillos de indias.	Eckert et al; 2010.
Retraso del poro de transición mitocondrial inducido por Ca^{2+}	Dieta suplementada con 2.5% de EPA o EPA durante 8 semanas.	Mitocondrias de corazón de rata Wistar.	Khairallah et al; 2010.
Reducción de la degeneración axonal 30 días después de inducido daño por traumatismo cerebral en ratas	Dieta suplementada con 10 o 40 mg/kg /día de aceite de pescado durante 30 días.	Análisis inmunohistoquímico de cerebro y médula espinal de ratas Sprague-Dawley	Mills et al; 2010.
Aumento de los niveles de glutatión en regiones cerebrales. Disminuye los niveles de malonaldehído, hidroxiperoxido, y proteínas carboniladas generadas por rotenona.	Administración oral de 2ml/kg o 4ml/kg de aceite de pescado durante 30 días. Posterior administración de rotenona por 7 días.	Mitocondrias de corteza, estriado, hipocampo y cerebelo aisladas de ratas Wistar.	Joseph y Muralidhara; 2012
Aumento de la expresión de Bcl-XL en condiciones de estrés genotóxico/oxidativo.	Células expuestas a DHA de 10-5 ⁰ μ M a diferentes tiempos (1-24 h).	Células de hipocampo murino (Cultivo celular HT22).	Cieslik et al; 2013.

2. JUSTIFICACIÓN

Una creciente evidencia sugiere que la disfunción mitocondrial juega un papel importante en el envejecimiento y en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas; el 3-NP es una toxina que al generar disfunción mitocondrial y posterior muerte neuronal, puede reproducir algunas características de la enfermedad de Huntington, por lo cual es ampliamente utilizada como un modelo de la enfermedad; sin embargo sus efectos varían de acuerdo con la dosis y el tiempo de administración y los mecanismos que desencadenan la muerte neuronal tras la administración de esta toxina no se encuentran del todo aclarados, por lo cual evaluar los efectos que ejerce el 3-NP en la función mitocondrial a diferentes dosis permite comprender los mecanismos moleculares que participan en la disfunción de la mitocondria generada por esta toxina, lo cual es de gran importancia ya que puede proporcionar información para encontrar futuros blancos terapéuticos para estos padecimientos.

Por otra parte se han realizado una gran variedad de estudios en modelos *in vitro* e *in vivo* de daño cardíaco y hepático. Con estos estudios se ha encontrado evidencia de que los ácidos grasos podrían jugar un papel importante en el mantenimiento de la integridad y función mitocondrial, y aunque hay evidencia del efecto neuroprotector de algunos ácidos grasos, no se ha explorado el papel de los ácidos grasos ω -3 en la disfunción mitocondrial del sistema nervioso, es por lo cual en este trabajo se determinará el efecto de que tienen los ácidos grasos ω -3, en la disfunción mitocondrial inducida por el 3-NP.

3. HIPÓTESIS

El consumo de ácidos grasos ω -3 se ha asociado con un mejor funcionamiento cerebral, también se ha demostrado que ejercen efectos protectores en la mitocondrias de corazón e hígado, por lo que se espera que la administración *in vivo* de AHB (fuente rica de ácidos grasos ω -3) prevenga la disfunción mitocondrial inducida por la administración de 3-NP.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el efecto de la administración de AHB sobre la disfunción mitocondrial generada por la inhibición de la enzima succinato deshidrogenasa mediante la administración de 3-NP en ratas Wistar.

Objetivos particulares

- En ratas tratadas con dosis crecientes de 3-NP, determinar alteraciones en la actividad exploratoria y parámetros de función mitocondrial: consumo de oxígeno, potencial transmembranal, y actividad de los complejos I a V de la CTE.
- Evaluar el efecto del AHB sobre las alteraciones inducidas por 3-NP en actividad exploratoria y los parámetros de función mitocondrial: consumo de oxígeno, potencial transmembranal y actividad de los complejos I a V de la CTE.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos y equipo

El 3-NP, el AHB, el citocromo c, la antimicina A, la NADP⁺, la hexocinasa, la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH), el carbonilcincanuro-p-trifluorometoxi-hidrazona (FCCP), la safranina O y la rotenona se adquirieron de Sigma Aldrich C. (St Louis, MO, EEUU). El tween 20 y el manitol se adquirieron en Golden Bell reactivos (DF; México). La albúmina sérica bovina (BSA) se adquirió de Armesco (Cochran, Ohio USA). La decilubiquinona se adquirió en Enzo (Farmingdale NY, USA). El KCN se adquirió en Mallinckrodt (D.F; México). Todos los demás reactivos fueron grado analítico y están disponibles comercialmente.

5.2 Animales

Se utilizaron ratas macho cepa Wistar de 250 g de peso, proporcionadas por el bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, “Manuel Velasco Suárez”. Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico durante todo el tratamiento, con ciclos artificiales de luz/oscuridad de 12 h (7:00- 19:00) con una dieta estándar (Tekland Global rodent diet; Harland Laboratories Inc; Maddison, WI, EEUU) y agua corriente *ad libitum*. Todos los procedimientos que se llevaron a cabo en las ratas, se apegaron a la norma oficial mexicana NOM 062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”. La manipulación de los animales se realizó siempre procurando minimizar su sufrimiento.

5.3 Estrategia experimental

Este proyecto se dividió en dos etapas, la primera fue determinar el efecto de dosis crecientes de 3-NP sobre la actividad exploratoria de las ratas y parámetros de función mitocondria en estriado, la segunda etapa tuvo la finalidad de evaluar el efecto de la administración previa de AHB sobre la disfunción mitocondrial producida por la toxina 3-NP.

A. Efecto de dosis crecientes de 3-NP

Se evaluó la actividad exploratoria de las ratas tratadas con 3 diferentes dosis de 3-NP: 5, 10 y 15 mg/Kg/24 h por 3 días, administrado vía subcutánea.

Posteriormente, se aislaron las mitocondrias de estriado de los animales que recibieron el tratamiento y se determinó el índice de control respiratorio (ICR), el potencial

transmembranal, la actividad de los complejos I, II, III, IV y la capacidad de síntesis de ATP (complejo V), como se muestra en la Figura 5.3.1.

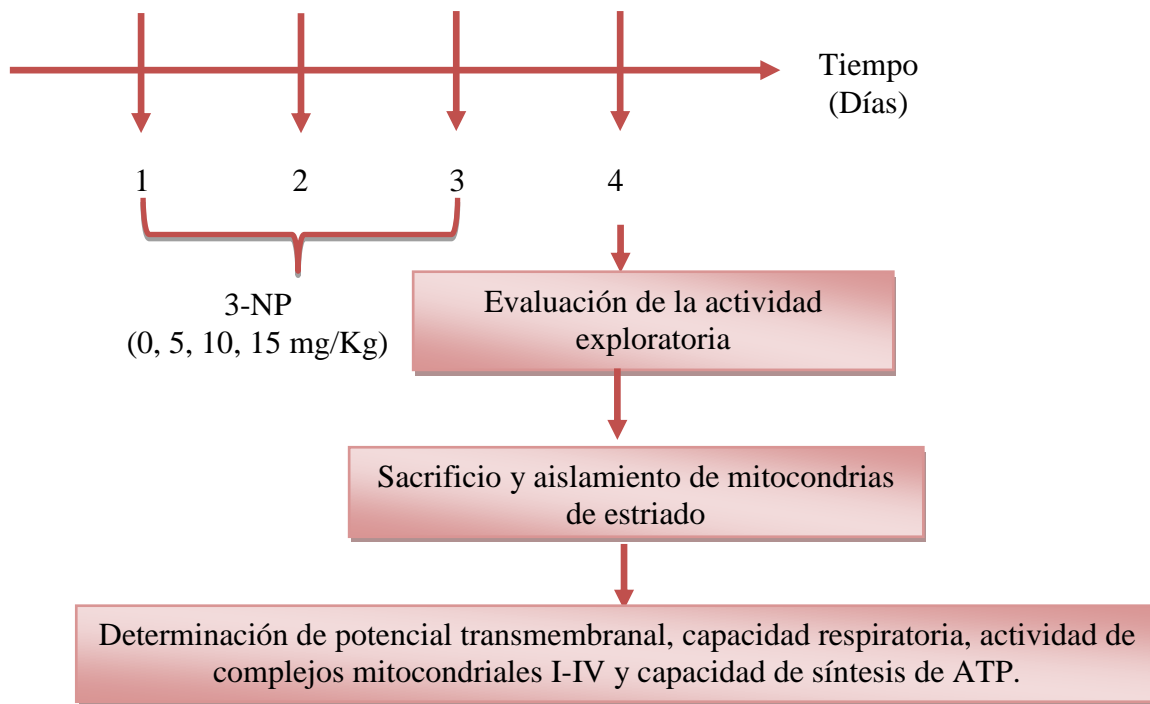


Figura. 5.3.1. Esquema de administración de las diferentes dosis de 3-NP.

B. Efecto de AHB

Se trabajó con los siguientes grupos experimentales:

- 1) *Grupo control*: solución salina vía oral por 15 días + vehículo del 3-NP por 3 días vía subcutánea.
- 2) *Grupo 3-NP*: solución salina vía oral por 15 días + 3-NP 15 mg/Kg/24 h por 3 días, vía subcutánea.
- 3) *Grupo AHB + 3-NP*: AHB 0.5 mg/Kg/24 h por 15 días, vía oral + 3-NP por 3 días vía subcutánea.

Una vez finalizado el tratamiento, se evaluó la actividad exploratoria de los animales tratados, para después aislar mitocondrias de estriado, evaluar el ICR, el potencial transmembranal, la actividad de los complejos I, II, III Y IV y la capacidad de síntesis de ATP, como se muestra en la Figura 5.3.2

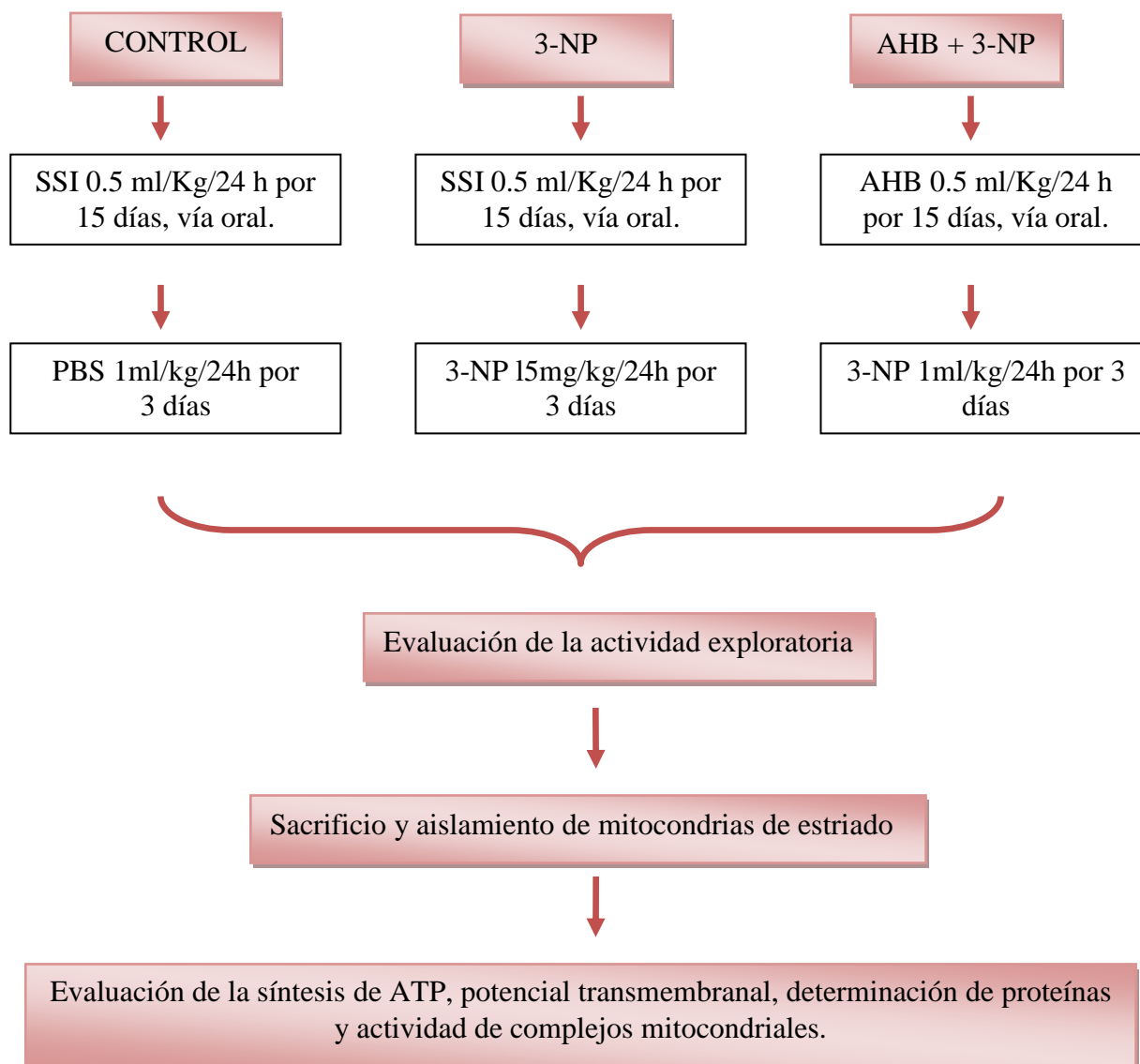


Figura. 5.3.2. Esquema de administración de AHB y 3-NP.

5.4 Evaluación de actividad exploratoria

La determinación de la actividad exploratoria en las ratas se llevó a cabo utilizando un cilindro de acrílico (20 cm de diámetro y 30 cm de alto), de acuerdo con el método previamente descrito por Gharbawie et al (2004). Esta prueba se realizó en un cuarto oscuro, utilizando luz roja ya que la longitud de onda de la luz roja no es percibida por los animales. Cada animal se colocó individualmente dentro del cilindro durante 5 minutos, y se contó el número de veces que el animal colocó las extremidades delanteras en la pared del cilindro, como lo muestra la Figura 5.4.1. El resultado se expresó como el número de levantamientos/ 5 minutos.



Fig 5.4.1. Prueba de actividad exploratoria.

5.5 Aislamiento de fracción mitocondrial

Las mitocondrias se aislaron por el método reportado por Chinopoulos et al. (2011) con algunas modificaciones. Una vez terminado el tratamiento con 3-NP se obtuvo el cerebro y se disectó el estriado, el cual se homogenizó en un amortiguador de aislamiento (MSEGTA) con la siguiente composición: manitol 225 mM, sacarosa 75 mM, EGTA 1 mM y HEPES 10 mM a pH 7.2. (El tejido y todos los amortiguadores utilizados se mantuvieron siempre en hielo). Este homogenado se centrifugó a 500 x g por 5 minutos para eliminar tejido y células completas. Después, el sobrenadante se recentrifugó a 14,000 x g por 10 minutos y el botón resultante se resuspendió en amortiguador de aislamiento adicionado con digitonina al 10% para ser sometido a un paso más de centrifugación a 14,000 x g por 10 minutos. La fracción mitocondrial se purificó utilizando un gradiente de Percoll, para lo cual el pellet obtenido en el paso anterior se resuspendió en 0.2 ml de Percoll 12% y se colocó cuidadosamente sobre 1 ml de Percoll 24% y se centrifugó a 18,000 x g por 15 minutos. Posteriormente, se retiró 0.9 ml de amortiguador y se adicionó 1.2 ml de MSEGTA, para volver a centrifugar a 18,000 x g por 5 min. Como último paso, se sustituyó 1.5 ml del amortiguador con MSEGTA limpio para centrifugar a 14,000 x g por 15 minutos. Finalmente, el botón se resuspendió en 100 μ L de amortiguador de aislamiento sin EGTA para alcanzar una concentración de proteína de 4-8 mg/ml.

5.6 Determinación de proteína

La concentración de proteína se determinó utilizando el método reportado por Lowry (1951). Este método se basa en la reducción del reactivo Folin por la oxidación de aminoácidos aromáticos presentes en las proteínas, en una reacción catalizada por cobre. El ensayo se llevó a cabo utilizando una dilución de 1:100 de la fracción mitocondrial, los valores de absorbancia obtenidos se extrapolaron en una curva estándar de ASB, tanto la curva como las muestras se midieron a 660 nm, y el resultado se expresó en mg proteína /ml.

5.7 Potencial transmembranal ($\Delta\psi$)

El potencial de membrana mitocondrial se evaluó como se describió por Cano-Ramirez et al. (2012). Esta determinación se basa en el monitoreo de los cambios de fluorescencia de la safranina O (un compuesto catiónico liposoluble) que se registran al disipar el gradiente de protones en la mitocondria, estos cambios de fluorescencia se midieron a $\lambda=495$ y $\lambda=586$ nm de excitación y emisión, respectivamente

La determinación se llevó a cabo en un medio que contenía safranina O a una concentración de 20 μM , con la posterior adición de 25 μg de proteína mitocondrial, y glutamato/malato 0.25 M o succinato 140 μM como sustratos para alimentar la CTE a través del complejo I o II, respectivamente. El potencial se disipó al adicionar FCCP 200 μM y se calculó la diferencia de la fluorescencia medida entre la adición de los sustratos y la del FCCP, los valores se reportaron como unidades de fluorescencia/mg de proteína ($\Delta\text{UF}/\text{mg prot}$).

5.8 Respiración mitocondrial (consumo de oxígeno)

La respiración mitocondrial se determinó mediante un ensayo previamente descrito (Cano-Ramírez et al; 2012) usando un electrodo tipo Clark, el ensayo se llevó a cabo en un medio de respiración compuesto por sacarosa 70 mM, Manitol 220 mM, KH_2PO_4 10 mM, MgCl_2 5 mM, EGTA 1 mM, BSA 0.2% y HEPES 25 mM a $\text{pH}=7.3$. Como se muestra en la figura 5.8 se adicionó de 40-80 μg de proteína mitocondrial a este medio, posteriormente se adicionó una mezcla de glutamato/malato (3 mM cada uno) o succinato (10 mM) con rotenona (5 mM) con lo cual se inició el consumo de oxígeno en estado estacionario (respiración en estado 2); la respiración en estado fosforilante (estado 3) se inició agregando ADP a una concentración final de 100 μM . Una vez consumido el ADP (estado 4), se adicionó oligomicina (estado desacoplado, U).

El ICR se calculó dividiendo las tasas del consumo de oxígeno en el estado 3 sobre el estado 4, esta estimación proporciona el acoplamiento de la síntesis de ATP al flujo de electrones. Un $\text{ICR}=1$ ocurre en mitocondrias no acopladas, mientras que un $\text{ICR}>3$ se detecta en mitocondrias acopladas.

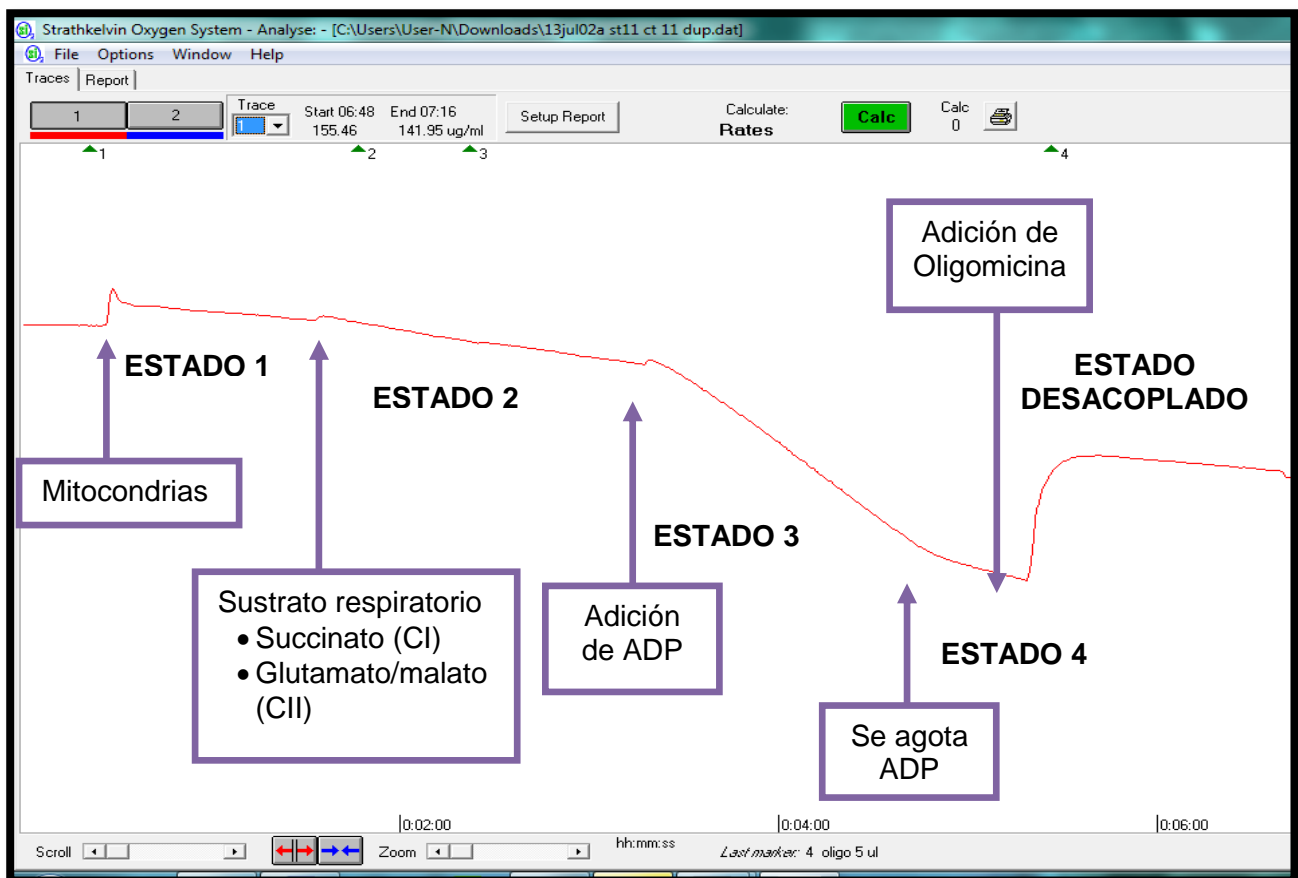


Figura.5.8 Trazo de oximetría usando una muestra de fracción mitocondrial extraída de estriado de una rata control. El sustrato respiratorio puede ser succinato para alimentar la CTE por complejo II o bien, una mezcla de glutamato y malato para alimentar la CTE por complejo I, en este caso se utilizó glutamato/malato.

5.9 Complejo I

La actividad del complejo I se determinó por el método descrito por Long et al. (2009), que se basa en la reducción del 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP), un aceptor artificial de electrones. El DCPIP se reduce, pasando de azul a incoloro, cuando recibe dos electrones provenientes de la oxidación de la delcilubiquinona a ubiquinol por el complejo I, que transfiere a su vez los electrones a partir del NADH provisto en la reacción (Fig.5.10). Para inhibir la actividad de los III y IV se utilizó antimicina y KCN, respectivamente. El ensayo se llevó a cabo utilizando una mezcla de reacción que contenía: albúmina sérica bovina 3 mg/ml, NADH 60 μ M, KCN 2 mM, antimicina A 2 μ M, y decilubiquinona 60 μ M en amortiguador de fosfato de potasio 10 mM, pH 7.4. La reacción inició al adicionar una muestra de fracción mitocondrial (\sim 20 μ g de proteína). La reducción de DCPIP se monitoreó a 600 nm por 3 minutos. En una reacción paralela, se determinó la actividad insensible a rotenona al adicionar rotenona 4 μ M a la mezcla de reacción. La actividad se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar del DCPIP ($19.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

5.10 Complejo II

La actividad del complejo II se determinó mediante un ensayo espectrofotométrico reportado por Kirby et al (2007), que al igual que la actividad del complejo I, se basa en la reducción del DCPIP. El DCPIP se reduce, pasando de azul a incoloro, cuando recibe dos electrones provenientes de la oxidación de la decilubiquina a ubiquinol, dicha reducción se lleva a cabo debido a que el complejo II transfiere electrones desde el succinato hasta la decilubiquinona (Fig.5.10), mientras se mantiene inhibido el complejo I mediante la adición de rotenona a la reacción. Se incubaron 20 μg de proteína de la fracción mitocondrial a 37°C en una mezcla de reacción con la siguiente composición: succinato 20 mM, antimicina A 2 μM , rotenona 5 μM , KCN 2 mM y DCPIP 50 μM ; la reacción inició con la adición de decilubiquinona 50 μM . La reducción de DCPIP se monitoreó a 600 nm por 5 minutos. Los cálculos para la actividad se realizaron usando el coeficiente de extinción molar del DCPIP ($19.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

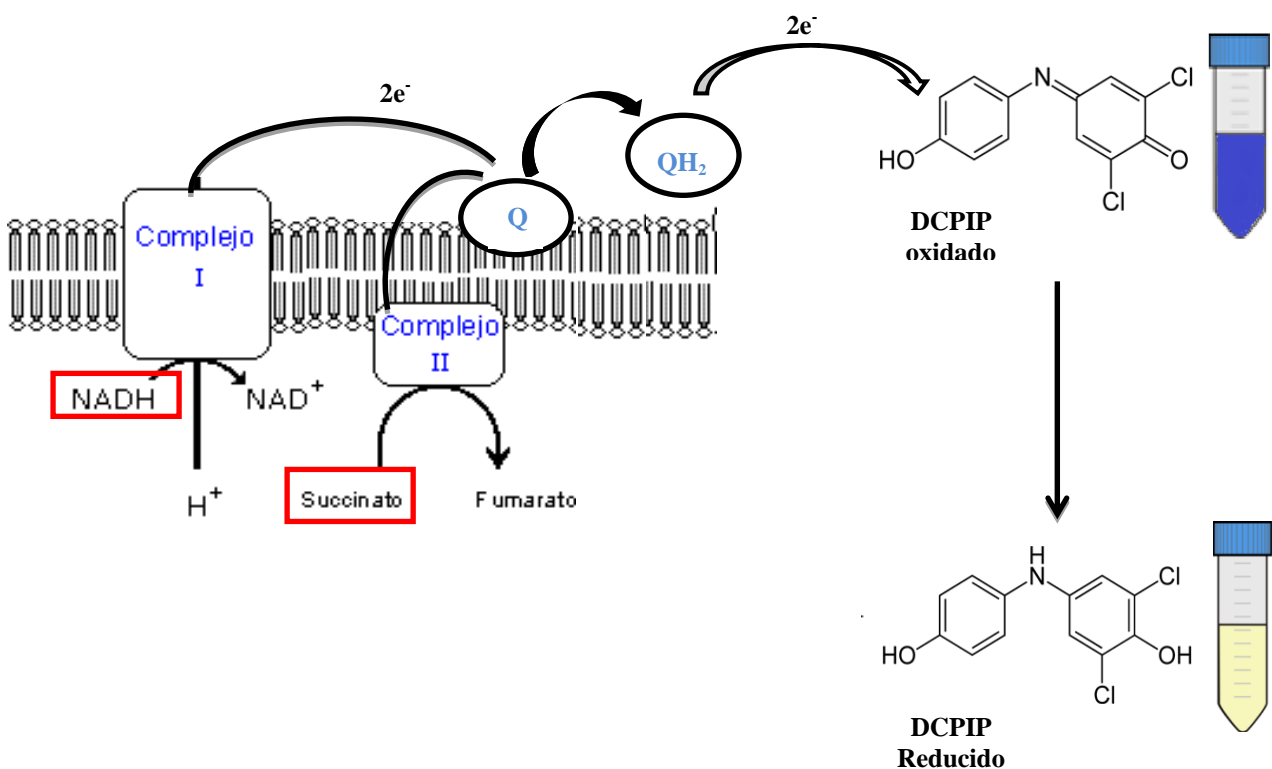


Figura 5.10. Método para determinar la actividad de los complejos I y II de la CTE. La reducción de la Ubiquinona (Q) a ubiquinol (QH₂) puede ser debida a los electrones donados por el complejo I si el sustrato utilizado es NADH, o debido al complejo II si se utiliza succinato como sustrato. El ubiquinol formado es posteriormente es reoxidado por el DCPIP presente en el medio de reacción.

5.11 Complejo III

La actividad del complejo III se determinó como fue descrito por Spinazzi et al. (2012). Esta técnica se basa en la reducción de citocromo c por el complejo III, la reacción se monitoreó a 550 nm, (ya que a esta longitud de onda solo el citocromo c reducido puede ser detectado mientras que el oxidado no) por lo cual se observa un aumento en la absorbancia a medida que se reduce el citocromo c.

Se incubó la fracción mitocondrial a 37°C en una solución de citocromo c oxidado 75 µM, KCN 500 µM, EDTA 100 µM, tween 20 0.025% y amortiguador de fosfatos 25 mM pH 7.5; la reacción se inició al agregar decilubiquinol 100 µM. Para el cálculo de la actividad, se utilizó el coeficiente de extinción molar del citocromo c ($18.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La especificidad de la reacción se estimó restando la actividad detectada en presencia de antimicina A.

5.12 Complejo IV

Este ensayo se realizó como se describió por Spinazzi et al. (2012), registrando la oxidación del citocromo c reducido mediante la disminución de la absorbancia a 550 nm. La determinación se realizó incubando la fracción mitocondrial a 37°C en una solución de citocromo c reducido 60 µM. Para el cálculo de la actividad, se utilizó el coeficiente de extinción molar del citocromo c ($18.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). La especificidad de la reacción se estimó restando la actividad detectada en presencia de KCN.

5.13 Capacidad de síntesis de ATP

La capacidad de síntesis de ATP se midió indirectamente mediante un ensayo enzimático previamente descrito (Cano-Ramírez et al; 2012) que se basa en la detección del incremento en la producción de NADPH a partir de NADP^+ . Esta reacción inicia cuando se alimenta la CTE, ya sea por complejo I o II, mediante glutamato/malato o succinato, respectivamente; en una mitocondria funcional la CTE genera un gradiente de protones en el espacio intermembranal que permite la síntesis de ATP por la ATP sintasa. El ATP formado es utilizado por la enzima hexocinasa para transformar la glucosa a glucosa 6-fosfato, esta última es transformada en 6-fosfogluco lactona, por la enzima G6PDH, la cual reduce a la par la coenzima NADP^+ a NADPH (Figura 5.9).

Para llevar a cabo este ensayo, la fracción mitocondrial se adicionó a una mezcla de reacción que contenía: hexocinasa 4.5 U/ml, G6PDH 2 U/µL, glucosa 22 mM, NADP^+ 1.5 mM y glutamato/malato (7 mM cada uno) o bien, succinato 15 mM.

La producción de NADPH se registró a partir de la adición de ADP 100 μM . Todas las determinaciones se hicieron por duplicado. El cambio en la absorbancia debido a la reducción del NADP^+ se midió a 340 nm. El cálculo de la actividad se realizó usando el coeficiente de extinción molar del NADPH ($6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Los resultados se expresaron como nmol/min/mg de proteína.

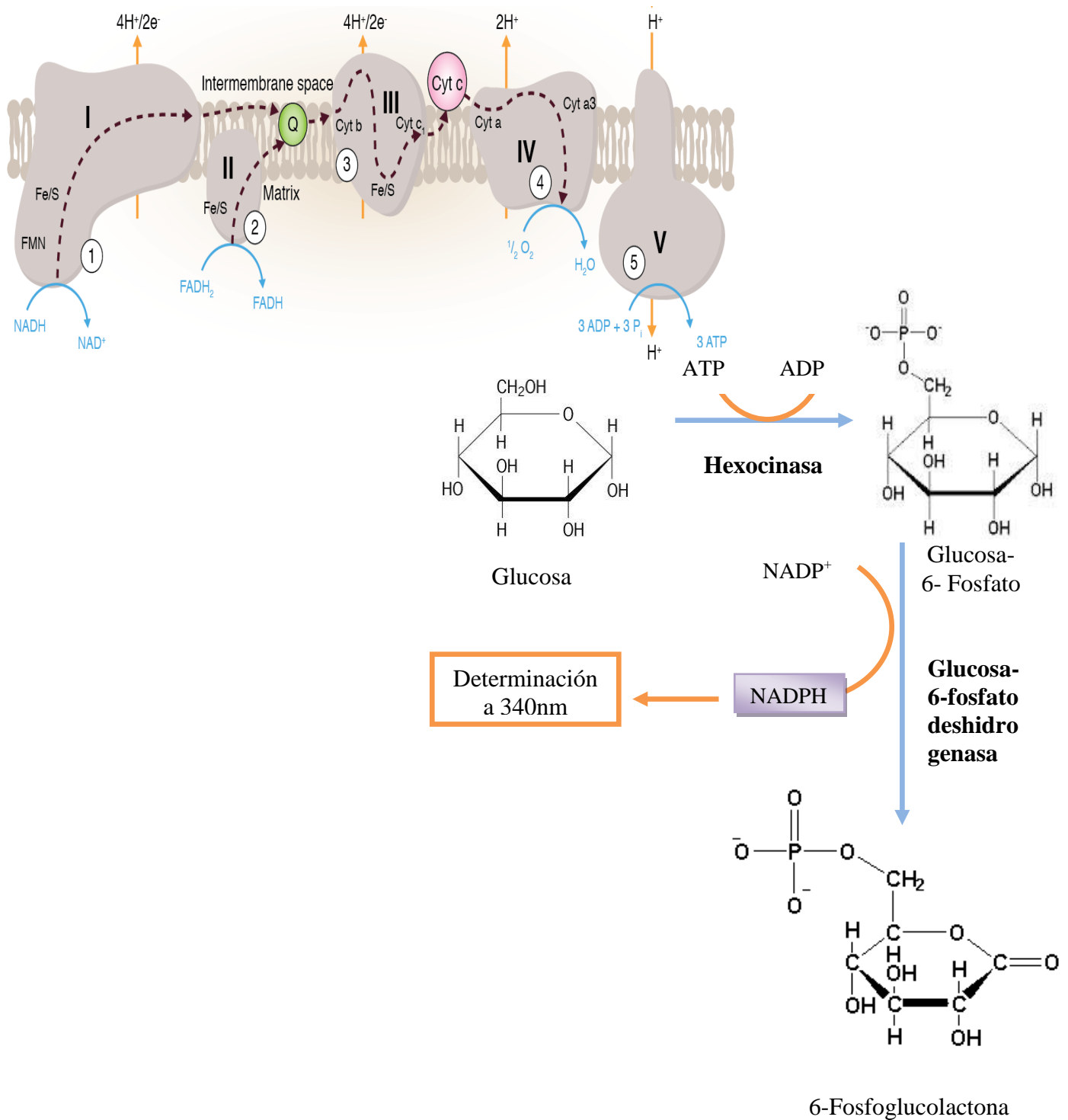


Figura 5.9 Sistema utilizado para detectar la producción de ATP.

5.14 Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando el software Prism 6 (GraphPad, San Diego), mediante una prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples: Dunnet cuando se analizó el efecto de las dosis crecientes de 3-NP, y Bonferroni para el resto de los experimentos. Los valores se expresaron como el promedio \pm error estándar de la media (EEM), $p < 0.05$ se consideró significativa.

6. RESULTADOS

A. Efecto de 3-NP a dosis crecientes

Actividad exploratoria

La administración de 3-NP afectó la conducta de exploración de los animales en forma dependiente de la dosis recibida, como se observa en la Fig. 6.1, donde a una mayor dosis se registró un menor número de levantamientos. Se encontró una diferencia significativa a 15 mg/kg, donde se presentaron en promedio sólo 6 levantamientos en promedio, mientras para los animales del grupo control fue de alrededor de 22 levantamientos.

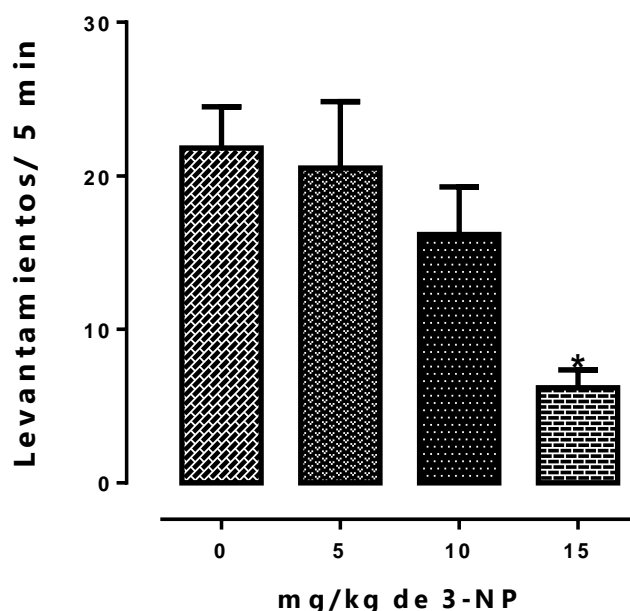


Figura 6.1 Actividad motora de ratas Wistar tratadas con 3-NP. La determinación se llevó a cabo 24 h después de la última administración de 3-NP. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba Dunnett. * $p < 0.05$, $n = 5-7$.

Determinación del consumo de oxígeno o capacidad respiratoria

Se calculó el índice de control respiratorio mediante los datos obtenidos del consumo de oxígeno en el estado 3 y en el estado 4, como se describió en la sección de materiales y métodos, se utilizó succinato como sustrato y se encontró que el ICR disminuyó en forma dependiente de la dosis de 3-NP empleada, llegando a 2.3 para 5 mg/kg, 1.5 para 10 mg/kg y 1.2 para 15 mg/kg, contra un ICR de 3.5 para las mitocondrias control.

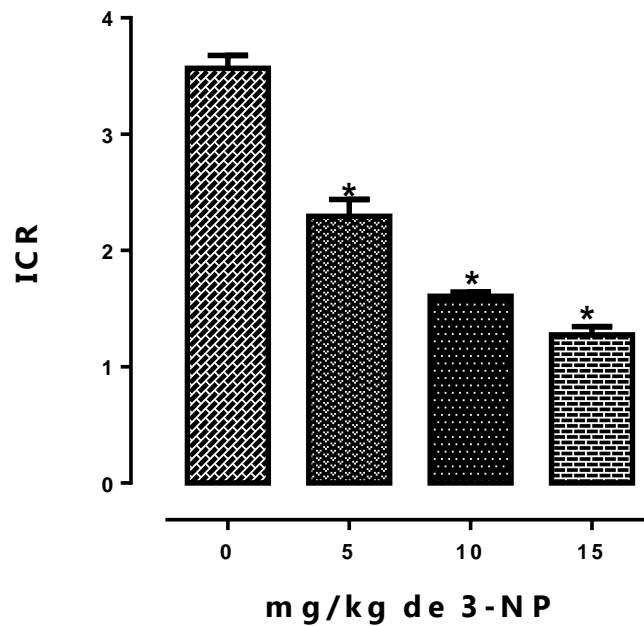


Figura 6.2 Índice de control respiratorio de mitocondrias de estriado de rata. La determinación se llevó a cabo durante las primeras 4 horas después del aislamiento de la fracción mitocondrial. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba Dunnett. * $p < 0.05$, $n = 6-7$. Solo se tomaron en cuenta los valores de cada experimento cuando el ICR del control fue mayor a 3.

Potencial transmembranal

El tratamiento de las ratas con 3-NP no alteró significativamente el potencial transmembranal de la mitocondria cuando se utilizó succinato como sustrato, como se muestra en la Fig. 6.3.

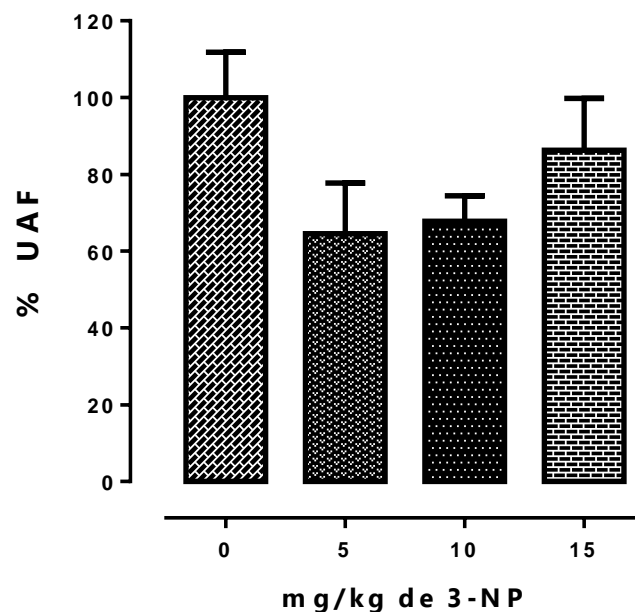


Figura 6.3 Potencial transmembranal de mitocondrias de estriado de rata tratadas con 3-NP. La determinación se llevó durante las primeras 4 horas después del aislamiento. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba Dunnett. * $p < 0.05$, $n = 6-7$.

Actividad de complejos mitocondriales

Como se esperaba, el tratamiento con 3-NP inhibió la actividad del complejo II de la CTE, pero no se observó una relación dosis-dependiente (Fig. 6.4.b), ya que en las tres dosis usadas se encontró aproximadamente un 50% de inhibición. El mismo efecto se observó en la actividad del complejo III (Fig. 6.4.c), ya que se encontró una disminución cercana al 50% a las tres dosis. Sin embargo, el tratamiento con 3-NP no afectó significativamente la actividad de los complejos I y IV (Fig.6.4.a y 6.4.b).

Actividad de complejo V (Capacidad de síntesis de ATP)

Como se puede observar en la Fig. 6.5, la capacidad de síntesis de ATP, utilizando succinato como sustrato, se inhibió de forma independiente de la dosis de 3-NP utilizado, cerca de un 50%.

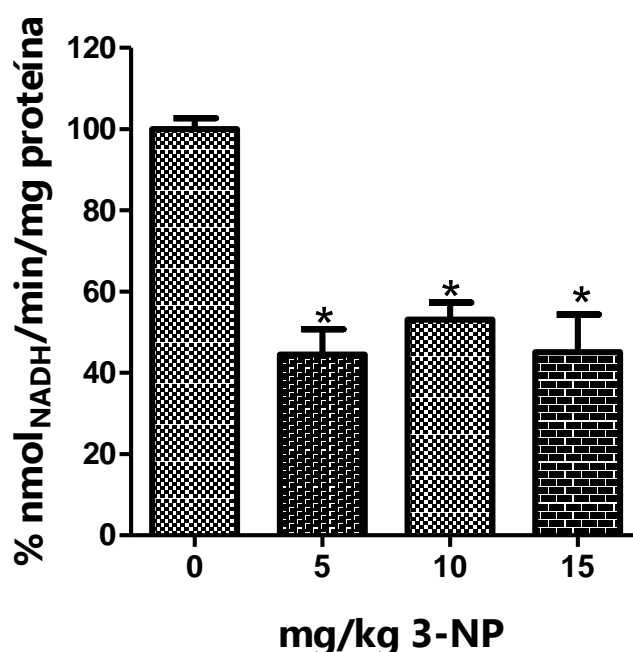
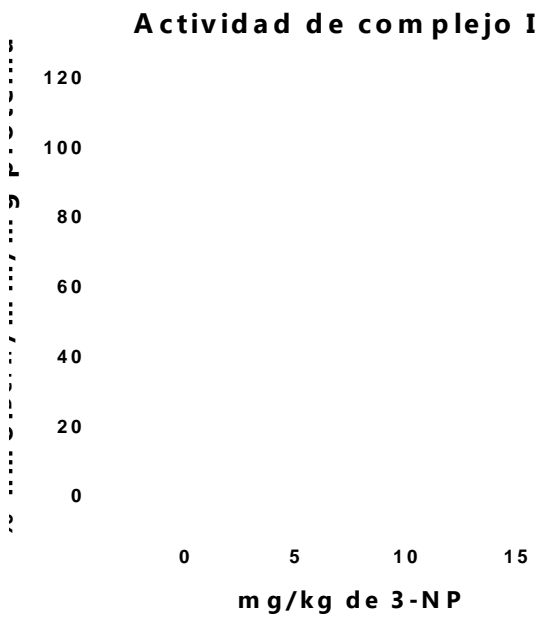


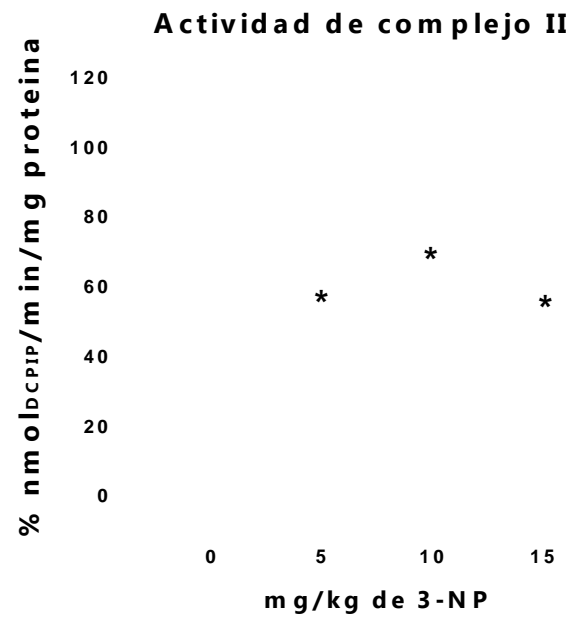
Figura 6.5 Capacidad de síntesis de ATP de mitocondrias de estriado de rata Wistar. La determinación se llevó a cabo durante las primeras 4 horas después del aislamiento. * $p < 0.05$, $n = 5-6$. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba Dunnett.

Una vez determinado el efecto del 3-NP sobre la función mitocondrial, se estudió el efecto de AHB utilizando 15 mg/kg de 3-NP, por ser la dosis en la que se encontró la alteración funcional en los animales y todos los parámetros medidos muestran una diferencia significativa.

a)



b)



c)

d)

Figura 6.4. Actividad de complejos I, II, III y IV de mitocondrias de estriado de ratas tratadas con 3-NP. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba Dunnett. * $p < 0.05$, $n = 6-12$.

B. Efecto de AHB al ser administrado previamente a 3-NP

La administración de AHB previno la disminución de la conducta exploratoria que se presentó por la administración de 15 mg/kg de 3-NP, como se observa en la Fig 6.6.

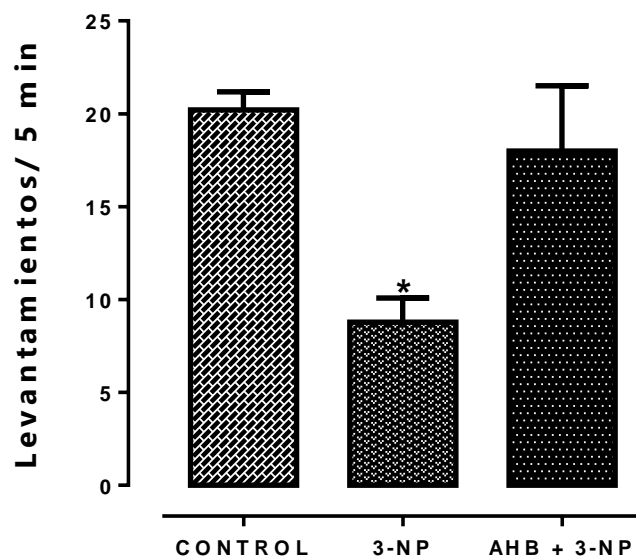


Figura 6.6 Actividad exploratoria de ratas Wistar de los grupos experimentales. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba Bonferroni * $p < 0.05$, $n = 8-10$.

Determinación de consumo de oxígeno o capacidad respiratoria

Al evaluar el ICR utilizando succinato como sustrato, la velocidad de consumo de oxígeno disminuyó tanto en las mitocondrias de las ratas administradas con 3-NP, así como las que se administraron con AHB y 3-NP, es decir, la administración de AHB no previno la disminución el consumo de oxígeno que se presenta por el 3-NP, como se muestra en la Fig. 6.7 (paneles 1A, 1B y 1C).

Dado que el sustrato que se usó para medir el ICR fue succinato, y éste alimenta el complejo II, que se encuentra inhibido, también se determinó el ICR usando como sustrato una mezcla de glu/malato, que alimenta el complejo I. encontramos que la velocidad de consumo de oxígeno no disminuyó en ninguno de los tres grupos experimentales y los valores de ICR no presentaron diferencias significativas (Fig. 6.7 D-F y Fig. 6.8).

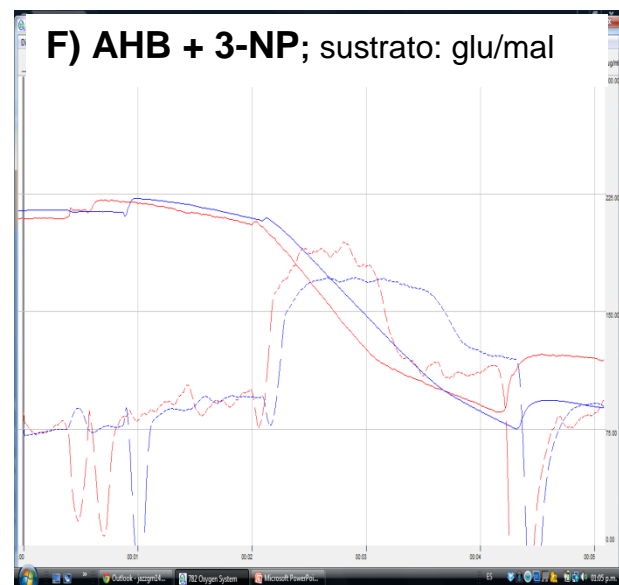
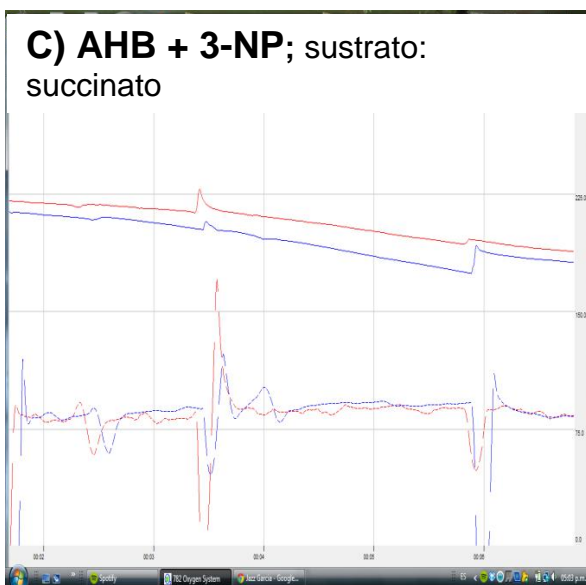
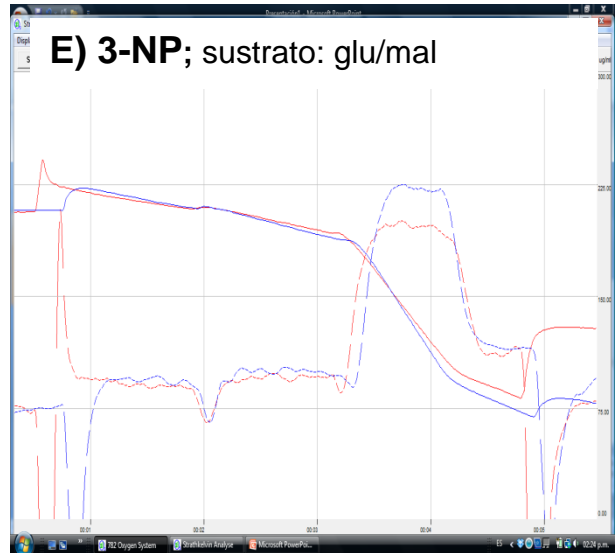
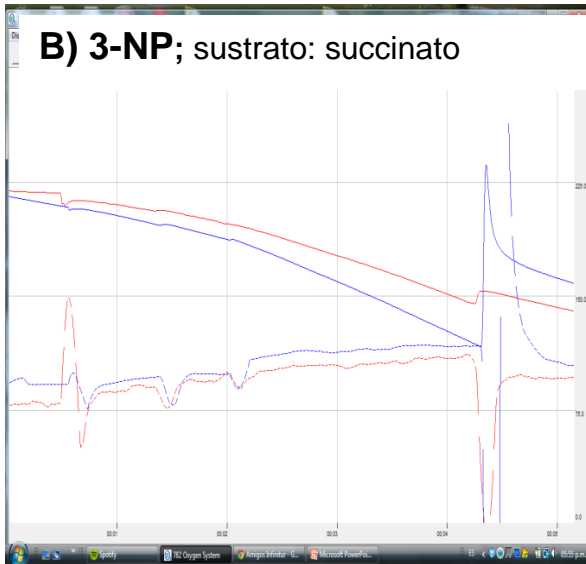
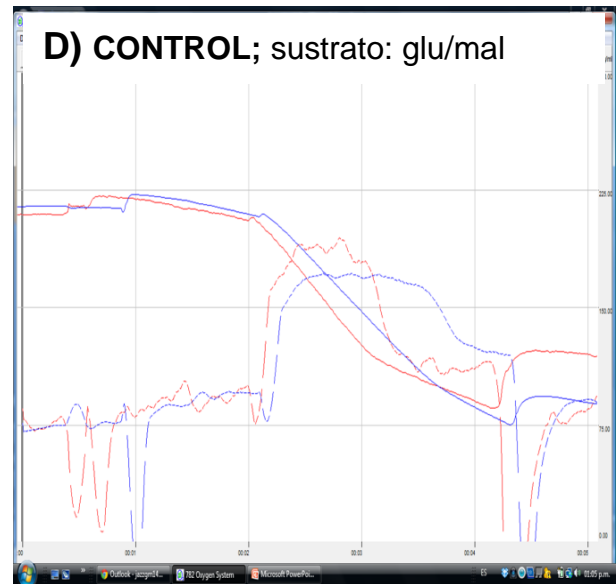
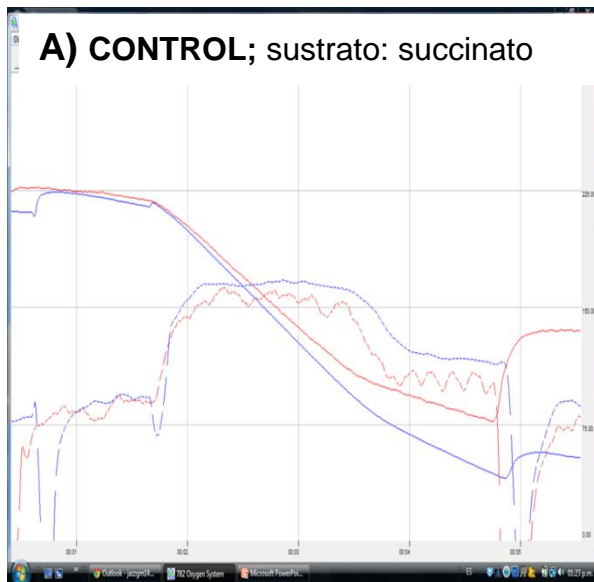


Figura 6.7 Trazos de oximetría de mitocondrias aisladas de estriado, utilizando succinato (A-C) y glutamato/malato (D-F). **A y D:** Control, **B y E:** 3-NP y **C y F:** AHB + 3-NP.

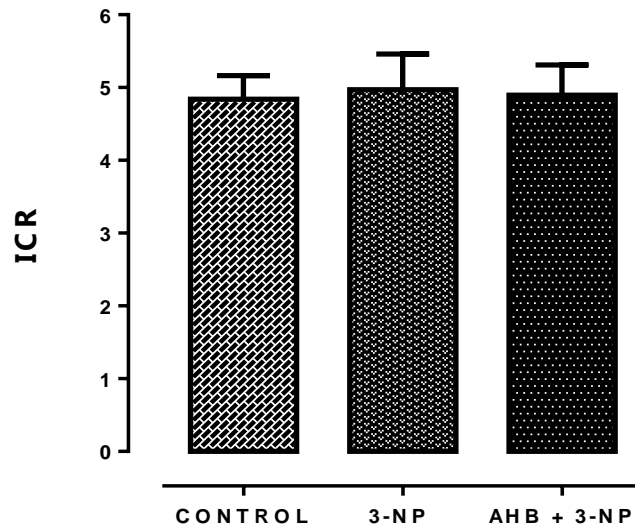


Figura 6.8 Índice de control respiratorio (ICR) de mitocondrias de estriado de rata. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba Bonferroni $*p < 0.05$, $n = 6-8$. La determinación se llevó durante las primeras 4 horas después del aislamiento. Solo se tomaron en cuenta los valores de cada experimento cuando el ICR del control fue mayor a 3.

Potencial transmembranal

La administración sistémica de 3-NP, así como la administración previa de AHB no afectó el potencial transmembranal de las mitocondrias de estriado al alimentar la CTE por complejo I ni por complejo II, como se muestra en la Fig. 6.9.

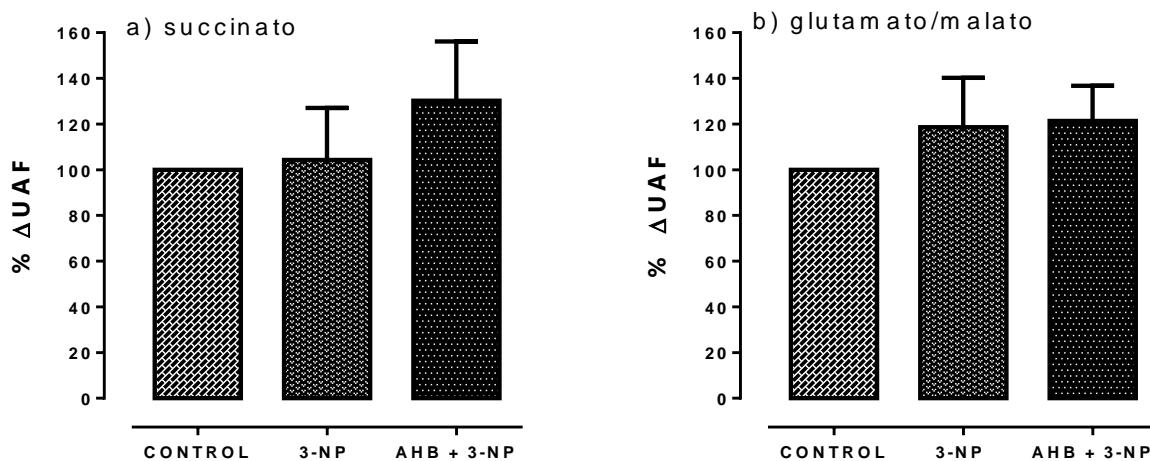


Figura 6.9 Potencial transmembranal de mitocondrias de estriado de rata. La determinación se llevó durante las primeras 4 horas después del aislamiento. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba Bonferroni $*p < 0.05$, $n = 6-8$.

Actividad de complejos de la cadena transportadora de electrones (I-IV)

La administración previa de AHB no previno la disminución la actividad del complejo II (Fig. 6.10 b), ya que las mitocondrias del grupo AHB +3-NP presentaron una disminución del 47% en la actividad de la enzima, valores que son estadísticamente iguales a los del grupo de 3-NP, el cual presentó una disminución del 54% en su actividad. Esto demuestra que el AHB no actúa directamente sobre la inhibición de la succinato deshidrogenasa.

Por otro lado la actividad del complejo III se vio disminuida en un 43.3% tras la administración de 3-NP, como ya se había mostrado anteriormente (Fig. 6.4 c), sin embargo el AHB no solo previno la disminución en la actividad, si no que causó una sobreactivación del complejo en un 100% de actividad para el control a un 139% para el tratado con AHB. De manera similar, el complejo IV presentó un aumento de su actividad a un 203.9% al ser administrado con AHB, como se muestra en la Fig. 6.11, panel d.

Mientras que la actividad del complejo I no se vio afectada por el 3-NP ni por el AHB como se muestra en la Fig. 6.11a.

Capacidad de síntesis de ATP

La actividad del complejo V se vio disminuida tras la administración de 3-NP, cuando la determinación se llevó a cabo en presencia de succinato como sustrato, sin embargo, la capacidad de síntesis de ATP no se afectó al utilizar glutamato/malato como sustrato.

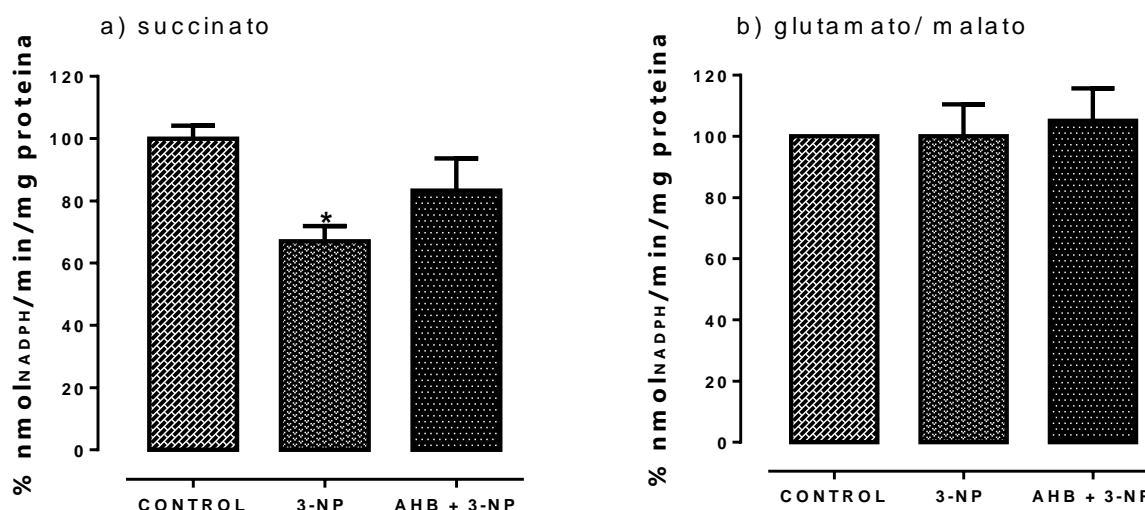


Figura 6.10. Capacidad de síntesis de ATP de mitocondrias de estriado de rata. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba Bonferroni * $p < 0.05$, $n = 6-8$.

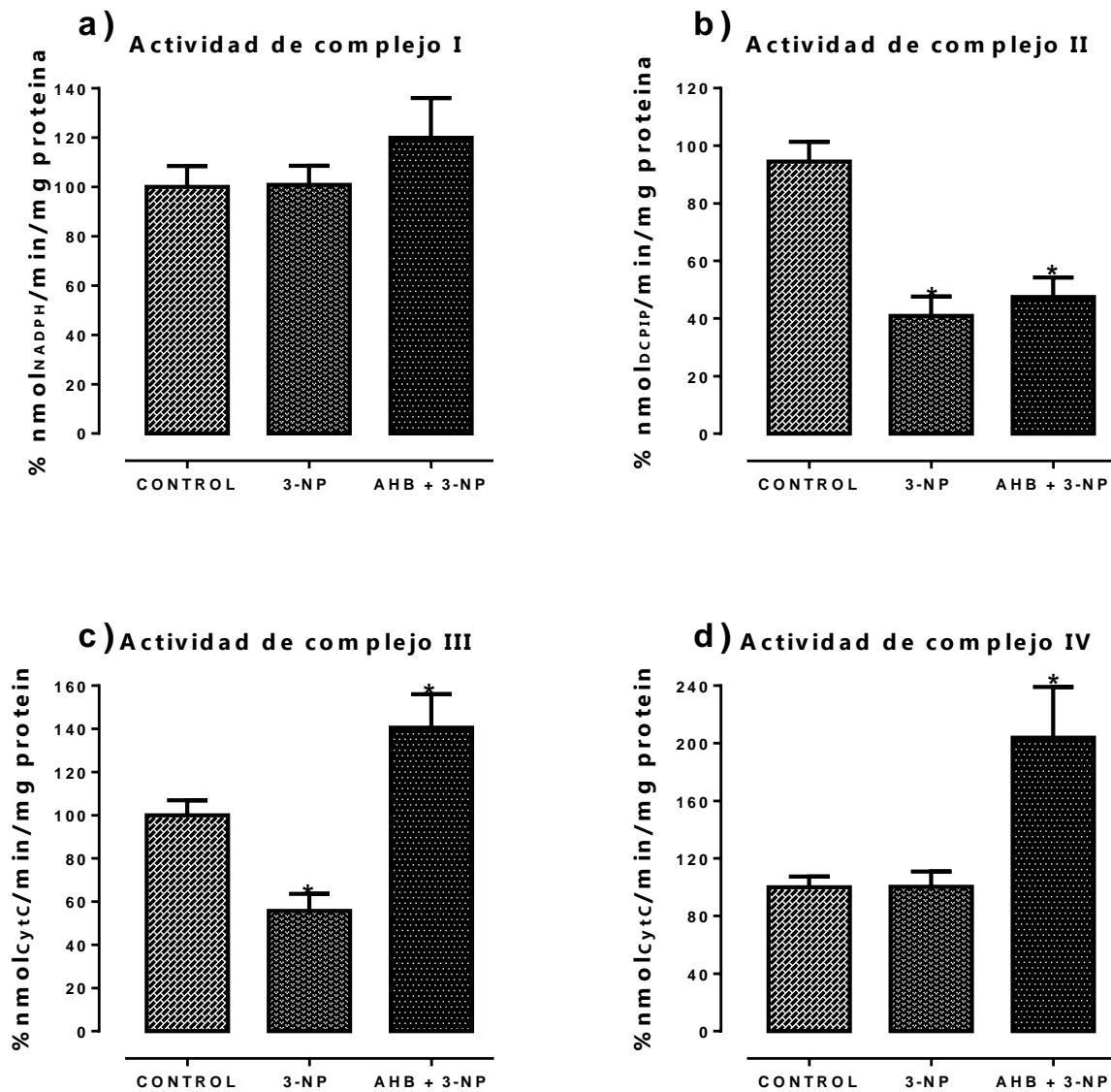


Figura 6.10 Actividad de complejos de mitocondrias de estriado de ratas. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba Bonferroni * $p < 0.05$, $n = 6-8$.

7. DISCUSIÓN

El 3-NP es una toxina que se une irreversiblemente a la enzima succinato deshidrogenasa inhibiendo su actividad. A pesar de que el 3-NP se une al complejo II de todas las células, e inhibe de la misma forma en todos los tejidos y regiones cerebrales, el estriado es la región cerebral que se ve mayormente afectada (Brouillet et al; 1998, Mirandola et al; 2009). En el presente trabajo se alcanzó una inhibición del 50% de la actividad, independientemente de la dosis de 3-NP utilizada.

Un daño en estriado se refleja en alteraciones del movimiento; se ha reportado que el 3-NP puede producir tanto hipercinesia como hipocinesia de acuerdo con la dosis y el tiempo de administración de la toxina (Túnez; 2010). En este trabajo se determinó la actividad motora en las ratas mediante la prueba de la actividad exploratoria en cilindro, y a pesar de que la prueba de conducta utilizada no había sido reportada para el 3-NP, si se ha utilizado para otros modelos de enfermedades neurodegenerativas en que se presentan trastornos del movimiento, como el modelo de Parkinson inducido por rotenona (Cannon et al; 2009). En acuerdo con la literatura, en este trabajo se encontró un efecto hipocinético en las ratas tratadas con 3-NP, que fue significativo a la dosis de 15 mg/kg, el cual se logró prevenir por la administración de AHB; el efecto preventivo de los ácidos grasos ω -3 también se ha reportado en otros modelos de la EH, por ejemplo en ratones transgénicos R 6/1 que expresan huntingtina mutada; la suplementación por 12 semanas con 254 mg de lípidos (24% ácido linoleico, 8% γ -linolenico, 3% de EPA, 2% DHA y 5% de ácido α -lipoico) previno las deficiencias motoras que se presentaron en los animales (Clifford et al; 2002). En otro modelo murino de la EH en el que se utilizaron ratones YAC128, la administración de etil-EPA (1% en la dieta por 5 meses) mejoró la disfunción motora que se presentó en estos animales (Van Raamsdonk et a; 2005). En lo que respecta a sus efectos en humanos, un estudio clínico con pacientes de EH a quienes se les administró EPA reportó una mejoría de la actividad motora en comparación con pacientes a quienes se les administró placebo (Puri et al; 2005). Sin embargo, aún no se ha determinado mediante qué mecanismos los ácidos grasos confieren esta protección.

En el presente trabajo, la función mitocondrial del estriado se afectó al administrar el 3-NP, lo cual se hizo evidente al registrar una inhibición cercana a un 50% de los complejos II y III de la CTE, una disminución significativa en el ICR y en la capacidad de síntesis de ATP al utilizar succinato como sustrato para alimentar la CTE.

A pesar que la mitocondria perdió la capacidad de sintetizar ATP al alimentar la CTE por complejo II (ya que éste está inhibido por el 3-NP), no la perdió al alimentarla por complejo I, aunque el complejo III se encontró inhibido, por lo cual sería interesante determinar el porqué de este efecto.

Se ha reportado una disminución en la cantidad de ATP posterior al tratamiento con 3-NP, tanto en mitocondrias aisladas de rata (Sing et al; 2010) como en cultivos celulares (Liot et al; 2009); de hecho, esta deficiencia de ATP es considerada como uno de los principales factores relacionados con la muerte neuronal (Tunéz et al; 2010). Por lo tanto, una de las perspectivas de este trabajo es determinar el contenido de ATP en estriado con el fin de confirmar si se encuentra disminuido, como se reporta en la literatura, ya que si la mitocondria no pierde la capacidad de síntesis de ATP en presencia de un sustrato para complejo I, ¿cómo es que el contenido de ATP se encuentra disminuido?. Una posible explicación a este hecho es que la succinato deshidrogenasa forma parte del ciclo de Krebs y al ser inhibida también se inhibe el ciclo, lo cual ya ha sido reportado por Henry y colaboradores (2002), con la inhibición del ciclo de Krebs disminuye el contenido de NADH (sustrato para complejo I). Por lo cual en condiciones fisiológicas la mitocondria no contaría con el sustrato para complejo I y por lo tanto a pesar de que el complejo no se encuentre inhibido no puede producir ATP. Los ácidos grasos ω -3 lograron restaurar la capacidad de síntesis de ATP al utilizar succinato como sustrato, por lo cual sería interesante estudiar los mecanismos por medio de los cuales se presenta este efecto.

Por otro lado el potencial transmembranal no presentó cambios a ninguna de las dosis de 3-NP utilizadas, a pesar de la inhibición de los complejos II y III de la CTE. Esta ausencia de cambio en el potencial por la administración de 3-NP también se reportó en una línea proveniente de ratones silvestres, al tratarlos con 3-NP no se afectó el potencial transmembranal, sin embargo, la línea proveniente de ratón transgénico que sobreexpresa huntingtina mutada presentó una disminución significativa en el potencial como resultado del tratamiento con 3-NP (Mao et al; 2006). Otro trabajo realizado por Mirándola y colaboradores (2009) mostró resultados similares en los que mitocondrias aisladas de cerebro expuestas a 1.2 mM de 3-NP no presentaron pérdida de potencial, sino hasta que se adicionó calcio al medio de reacción

Con estos estudios se puede plantear que para que se presente una pérdida del potencial transmembranal debe haber factores como huntingtina mutada o aumento en los niveles de calcio, ya que el potencial de membrana se encuentra altamente regulado a través del control respiratorio; es decir, cuando la síntesis de ATP disminuye, aumenta la fuerza protón motriz debido a que los protones ya no son utilizados por la ATP sintasa y se

acumulan en el espacio intermembranal, la acumulación de estos protones inhibe los complejos que bombean protones (complejo I, III y IV) y por lo tanto se inhibe la respiración mitocondrial (Sanderson et al; 2013). Lo cual puede ser una posible explicación de porqué en este trabajo el potencial no se encuentra disminuido, mientras que el consumo de oxígeno si se encuentra disminuido a pesar de que la actividad del complejo IV no se afecte tras la administración de 3-NP.

En lo que respecta a los efectos de los ácidos grasos ω -3 en la mitocondria, la administración de AHB no ejerce un efecto directo sobre la inhibición del complejo II, tampoco presentó efectos sobre el ICR, al alimentar la CTE por complejo I o complejo II, ni sobre el potencial; sin embargo la evaluación de la actividad los complejos mitocondriales permitió determinar que la forma en que mitocondria respondió en presencia de los ácidos grasos ω -3 al daño ocasionado por 3-NP, es la sobreactivación de los complejos III y IV. En lo que respecta al complejo III no se han reportado efectos similares, por lo cual, es de gran importancia continuar con el estudio de los efectos que ejercen los ácidos grasos ω -3 sobre su actividad.

Diversos autores han reportado que el complejo IV puede ser afectado por la administración de 3-NP, aunque en menor medida que el complejo II; sin embargo con el esquema de administración utilizado en este trabajo la actividad del complejo no se vio afectada, pero tras la administración de AHB y el posterior daño con 3-NP el complejo IV presentó un aumento del 103.9% en su actividad, un estudio reciente realizado por Salama y colaboradores (2013) mostró que la administración de aceite de AHB restaura la actividad del complejo IV de mitocondrias de hígado después de la reducción del 38% de su actividad por la administración de nitrito de sodio (Salama et al 2013); también se ha reportado que otros compuestos tienen la capacidad de mejorar la actividad del complejo IV, por ejemplo al ser inhibido por la administración durante 4 días con 25 mg/kg de 3-NP su actividad disminuyó en un 21.3%, mientras que la administración de licopeno la restauró en un 14.7% (Sandhir et al; 2010). Se ha propuesto que la baja actividad de la citocromo oxidasa está relacionada con la formación de ERO y la apoptosis (Yu et al; 2002), ya que tanto el AHB como el licopeno restauran la actividad de la mitocondria a través de su efecto antioxidante, por lo cual, como parte complementaria de este trabajo se determinará la producción de ERO.

Sin embargo también se ha reportado el efecto de los ácidos grasos ω -3 sobre la función mitocondrial en ausencia de daño, Kitajka y colaboradores (2002) analizaron el efecto de la administración de ácidos grasos ω -3 en la expresión de diversos genes, este estudio reveló que la administración de aceite de pescado durante toda la vida de las ratas causa

la sobreexpresión de 55 genes diferentes, mientras que otros 47 genes fueron suprimidos, entre estos genes sobreexpresados se encontraron subunidades del complejo IV y otros genes relacionados con el metabolismo oxidativo y la biogénesis mitocondrial.

En forma paralela a este trabajo de tesis, también se está evaluando el efecto que tiene la administración de los ácidos grasos ω -3 en ausencia de daño en mitocondrias aisladas de diferentes tejidos cerebrales, con el propósito de determinar si este efecto de sobreactivación que se está presentando en los complejos III y IV se debe únicamente a los ácidos grasos ω -3, o si se requiere que exista un daño en la mitocondria para que se presente dicha sobreactivación.

8. CONCLUSIONES

- El aceite de hígado de bacalao previene la disminución en la conducta exploratoria ocasionada por la administración de 3-NP.
- Los ácidos grasos ω -3 no actúan directamente sobre la inhibición del complejo II. Sin embargo un posible mecanismo de acción de los ácidos grasos ω -3 es la sobreactivación de los complejos III y IV de la cadena transportadora de electrones.

9. PERSPECTIVAS

- Evaluar la expresión génica de los complejos III y IV CTE tras la administración de AHB y 3-NP.
- Determinar la producción de ERO en mitocondrias de rata administradas con AHB y 3-NP.
- Estudiar por separado el efecto del 3-NP y el AHB en mitocondrias de diferentes grupos celulares (neuronas y astrocitos) presentes en estriado.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alston TA, Mela L, Bright HJ. 3-nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1977**; 74: 3767-71.
- Ames BN. Supplements and tuning up metabolism. *J Nutr.* **2004**; 134(11): 3164S-3168S.
- Aw TY y Jones DP. Nutrient supply and mitochondrial function. *Annu Rev Nutr.* **1989**; 9:229-51.
- Bazan NG, Molina MF, Gordon WC. Docosahexaenoic acid signalolipidomics in nutrition: significance in aging, neuroinflammation, macular degeneration, Alzheimer's, and other neurodegenerative diseases. *Annu Rev Nutr.* **2011**; 31:321-51.
- Berg J, Stryer L, Tymoczko J. *Biochemistry*. Editorial Reverté. 6 edición. **2009**; 1029 páginas.
- Bourre JM. Effects of nutrients (in food) on the structure and function of the nervous system: update on dietary requirements for brain. Part 2: Macronutrients. *J Nutr Health Aging.* **2006**; 10:386-99.
- Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.* **2011**; 435: 297–312.
- Brouillet E, Guyot MC, Mittoux V, Altairac S, Condé F, S Palfi, Hantraye. Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase by 3-nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in rat. *J Neurochem.* **1998**; 70 (2):794-805.
- Cano-Ramírez D, Torres-Vargas CE, Guerrero-Castillo S, Uribe-Carvajal S, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverri J, Orozco-Ibarra M. Effect of glycolysis inhibition on mitochondrial function in rat brain. *J Biochem Mol Toxicol.* **2012**; 26(5):206-11.
- Chinopoulos C, Zhang SF, Thomas B, Ten V, Starkov AA. Isolation and functional assessment of mitochondria from small amounts of mouse brain tissue. *Methods Mol Biol.* **2011**; 10793:311-24.
- Clifford JJ, Drago J, Natoli AL. Essential fatty acids given from conception prevent topographies of motor deficit in a transgenic model of Huntington's disease, *Neuroscience.* **2002**; 109: 81–88.
- Coronado-Herrera M, Vega y León S, Gutiérrez-Tolentino R, García-Fernandez B y Díaz Gonzales G. Los ácidos grasos omega-3 y omega-6: Nutrición, bioquímica y salud. **2006**; REB 25(3):72-79.

- Cosar M, Songur A, Sahin O, Uz E, Yilmaz R, Yagmurca M, Ozen OA. The neuroprotective effect of fish n-3 fatty acids in the hippocampus of diabetic rats. *Nutr Neurosci*. **2008**; 11(4):161-6.
- Cott J, Hibbeln JR. Lack of seasonal mood change in Icelanders. *Am J Psychiatry*. **2001**; 158:328.
- Denis I, Potierb B, Vancassela S, Heberdena C, Lavialle M. Omega-3 fatty acids and brain resistance to ageing and stress: Body of evidence and possible mechanisms *Ageing Research Reviews*. **2013**; 12: 579– 594.
- Du H, Yan SS. Mitochondrial medicine for neurodegenerative diseases. *Int J Biochem Cell Biol*. **2010**; 42:560–72.
- Dupuis L. Mitochondrial quality control in neurodegenerative diseases. *Biochimie*. 2013 [Epub ahead of print].
- Eckert GP, Lipka U, Muller WE. Omega-3 fatty acids in neurodegenerative diseases: focus on mitochondria. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. **2013**; 88(1):105-14.
- Eckert GP, Franke C, Nöldner M, Rau O, Wurglics M, Schubert-Zsilavec M, Müller WE. Plant derived omega-3-fatty acids protect mitochondrial function in the brain. *Pharmacol Res*. **2010**; 61(3):234-41.
- Flachs P, Horakova O, Brauner P, Rossmeisl M, Pecina P, Franssen-van Hal N, Ruzickova J, Sponarova J, Drahotka Z, Vlcek C, Keijer J, Houstek J, Kopecky J. Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. *Diabetologia*. **2005**; 48(11):2365-75.
- Fleith M, Clandinin MT. Dietary PUFA for preterm and term infants: review of clinical studies. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2005**; 45(3):205–29.
- Francis K, Smitherman C, Nishino SF, España JC , Gadda T. The biochemistry of the metabolic poison propionate 3-Nitronate and its conjugate acid, 3-Nitropropionate. *IUBMB Life*. **2013**, 65(9):759-68.
- Galas MC, Bizat N, Cuvelier L, Bantubungi K, Brouillet E, Schiffmann, Blum D. Death of cortical and striatal neurons induced by mitochondrial defect involves differential molecular mechanisms. *Neurobiol Dis*. **2004**, 15: 152-9.
- Gao F, Taha AY, Ma K, Chang L, Kiesewetter D, Rapoport SI. Aging decreases rate of docosahexaenoic acid synthesis-secretion from circulating unesterified α -linolenic acid by rat liver. *Age (Dordr)*. **2013**; 35(3):597-608.
- Gerster H. Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3)?. *Int J Vitam Nutr Res*. **1998**; 68(3):159–73.

- Gharbawie OA, Wishaw PA, Wishaw IQ The topography of three-dimensional exploration: a new quantification of vertical and horizontal exploration, postural support, and exploratory bouts in the cylinder test. *Behav Brain Res.* **2004**; 151(1-2):125-35.
- Guillén DM, Carton I, Goicoechea E, Uriarte PS. Characterization of cod liver oil by spectroscopic techniques. New approaches for the determination of compositional parameters, acyl groups, and cholesterol from ¹H nuclear magnetic resonance and fourier transform infrared spectral data. *J Agric Food Chem.* **2008**; 56(19):9072-9.
- Guyot MC, Hantraye P, Dolan R, Palfi S, Maziere M, Brouillet E. Quantifiable bradykinesia, gait abnormalities and Huntington's disease-like striatal lesions in rats chronically treated with 3-nitropropionic acid. *Neuroscience.* **1997**; 79: 45-56.
- Hashimoto M, Hossain S. Neuroprotective and ameliorative actions of polyunsaturated fatty acids against neuronal diseases: beneficial effect of docosahexaenoic acid on cognitive decline in Alzheimer's disease. *J Pharmacol Sci.* **2011**; 116(2):150-62.
- Heird WC, Lapillonne A. The role of essential fatty acids in development. *Annu Rev Nutr* **2005**; 25:549–71.
- Henry PG1, Lebon V, Vaufrey F, Brouillet E, Hantraye P, Bloch G. Decreased TCA cycle rate in the rat brain after acute 3-NP treatment measured by in vivo 1H-[13C] NMR spectroscopy. *J Neurochem.* **2002**; 82(4):857-66.
- Ide T¹, Kobayashi H, Ashakumary L, Rouyer IA, Takahashi Y, Aoyama T, Hashimoto T, Mizugaki M. Comparative effects of perilla and fish oils on the activity and gene expression of fatty acid oxidation enzymes in rat liver. *Biochim Biophys Acta.* **2000**; 1485(1): 23-35.
- Igarashi M, Ma K, Chang L, Bell JM, Rapoport SI. Dietary n-3 PUFA deprivation for 15 weeks upregulates elongase and desaturase expression in rat liver but not brain, *J. Lipid Res.* **2007**; 48: 2463–2470.
- Janssen CI, Kiliaan AJ. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: The influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration. *Progress in Lipid Research.* **2014**; 531–17.
- Johri A, Beal F. Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Diseases. *J Pharmacol Exp Ther.* **2012**; 342(3): 619–630.
- Joseph MD, Muralidhara M. Fish oil prophylaxis attenuates rotenone-induced oxidative impairments and mitochondrial dysfunctions in rat brain. *Food and Chemical Toxicology* **2012**; 50:1529–1537.
- Kang J, Pervaiz S. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochem Res Int.* **2012**; Article ID 896751, 14 pages.

- Kaur P, Hegglund I, Aschner M, Syversen T. Docosahexaenoic acid may act as a neuroprotector for methylmercury- induced neurotoxicity in primary neural cell cultures. *Neurotoxicology*. **2008**; 29(6):978-87.
- Khairallah RJ, O'Shea KM, Brown BH, Khanna N, Des Rosiers C, Stanley WC. Treatment with docosahexaenoic acid, but not eicosapentaenoic acid, delays Ca²⁺ induced mitochondria permeability transition in normal and hypertrophied myocardium. *J Pharmacol Exp Ther*. **2010**; 335(1):155-62.
- Kidd MD. Neurodegeneration from mitochondrial insufficiency: nutrients, stem cells, growth factors, and prospects for brain rebuilding using integrative management. *Alternative Medicine Review*. **2005**; 10(4): 268-293.
- Kirby DM, Thorburn DR, Turnbull DM, Taylor RW. Biochemical assays of respiratory chain complex activity. *Methods Cell Biol*. **2007**; 80:93-119.
- Kitajka K, Puskás LG, Zvara A, Hackler L Jr, Barceló-Coblijn G, Yeo YK, Farkas T. The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fattyacids. *Proc Natl Acad* **2002**; 99(5):2619-24.
- Krishnamoorthy T, Hinkle PC. Estudies on the electron transfer pathway, topography of iron-sulfur centers, and site of coupling in nadh-qlee oxidoreductase. *J Biol Chem*. **1988**, 263 (33):17566-75.
- Lauritzen L, Hansen HS, Jørgensen MH, Michaelsen KF. The essentiality of long chain omega-3 fatty acids in relation to the development and function of the brain. *Prog Lipid Res* **2001**; 40:1–94.
- Lee J, Boo JH, Ry H. The failure of mitochondria leads to neurodegeneration: do mitochondria need a jump start? *Adv Drug Deliv Rev*. **2009**; 61(14): 1316–1323.
- Liot T, Bossy B, Lubitz S, Kushnareva Y, Sejbuk N, Bossy-Wetzel E. Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial, fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. *Cell Death and Differentiation*. **2009**. 16: 899-909.
- Long J, Ma J, Luo C, Mo X, Sun L, Zang W, Liu J. Comparison of two methods for assaying complex I activity in mitochondria isolated from rat liver, brain and heart. *Life Sci*. **2009**; 85(7-8):276-80.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. **1951**; 193(1):265-75.
- Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius B. A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a

correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J Clin Invest.* **1962**; 41:1776-1804.

- Mao Z, Choo YS, Lesort M. Cystamine and cysteamine prevent 3-NP-induced mitochondrial depolarization of Huntington's disease knock-in striatal cells. *European Journal of Neuroscience.* **2006**; 23: 1701–1710.
- Mataix VJ. Libro blanco de los Omega-3: los ácidos grasos poliinsaturados Omega-3 y monoinsaturados tipo oleico y su papel en la salud. Editorial Panamericana. **2004**; 162 pp.
- Mazza M, Pomponi M, L Janiri, Bria P, S Mazza. Omega-3 fatty acids and antioxidants in neurological and psychiatric diseases: An overview. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.* **2007**; 31: 12–26.
- McCracken E, Dewar D, Hunter AJ. White matter damage following systemic injection of the mitochondrial inhibitor 3-nitropropionic acid in rat. *Brain Res.* **2001**; 892, 329–335.
- Metzler D. Biochemistry. The chemical reactions of living cells. Editorial academic press. 2^{da} edición. **2003**; Massachusetts. USA. 1977 pages.
- Meyer JN, Leung MC, Rooney JP, Sandoel A, Hengartner MO, Kisby GE, Bess AS. Mitochondria as a target of environmental toxicants. *Toxicol Sci.* **2013**; 134(1):1-17.
- Mills JD, Bailes JE, Sedney CL, Hutchins H, Sears B. ω -3 fatty acid supplementation and reduction of traumatic axonal injury in a rodent head injury model. *J Neurosurg.* **2011**; 114:77-84.
- Moldy ML. Sugarcane poisoning-a case report with a brief review. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **1995**, 33: 363–367.
- Morley JE. Nutrition and the Brain. *Clin Geriatr Med.* **2010**; 26:89–98.
- Müller-Sterl W. Bioquímica. Fundamentos para medicina y ciencias de la vida. Editorial Reverté. 1^{ra} edición. **2008**.
- Napolitano M, Zei D, Centonze D, Palermo R, Benerdi G, Vacca A, Calabresi P, Gulino A. NF-KB/NOS cross-talk induced by mitochondrial complex II inhibition: implications for Huntington's disease. *Neurosci Lett.* **2008**; 343: 241-6.
- Nasr P, Carbery T, Geddes JW. N-methyl-D-aspartate receptor antagonists have variable affect in 3-nitropropionic acid toxicity. *Neurochem Res.* **2009**; 34: 490-8.
- Nasr P, Gursahani HI, Pang Z, Bondada V, Lee J, Hadley RW, Geddes JW. Influence of cytosolic and mitochondrial Ca^{2+} , ATP, mitochondrial membrane potential, and calpain activity on the mechanism of neuron death induced by 3-nitropropionic acid. *Neurochem Int.* **2003**, 43: 89-99.
- Nelson D y Cox M. Lehninger: Principles of Biochemistry. 4ta Edición. 2007; 1296 pp.

- Nishino H, Kumazaki M, Fukuda A, Fujimoto I, Shimano Y, Hida H, Sakurai T, Deshpande SB, Shimizu H, Morikawa S, Inubushi T. Acute 3-nitropropionic acid intoxication induces striatal astrocytic cell death and dysfunction of the blood-brain barrier: involvement of dopamine toxicity. *Neurosci. Res.* **1997**; 27, 343–355.
- Noaghiul S, Hibbeln JR. Cross-national comparisons of seafood consumption and rates of bipolar disorders. *Am J Psychiatry* **2003**; 160:2222–7.
- O'Shea KM , Jairallah RJ , Sparagna GC , Xu W , Hecker PA , Robillard-Frayne I , Des Rosiers C , Kristian T , Murphy RC , Fiskum T , Stanley WC . Dietary omega-3 fatty acids alter cardiac mitochondrial phospholipid composition and delay Ca²⁺-induced permeability transition *J Cardiol Mol Cell.* **2009**;47 (6) :819-27
- Pieczenik R, Neustadt J. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Experimental and molecular pathology.* **2007**; 83: 84–92.
- Puri BK, Leavitt BR, Hayden MR, Ross CA, Rosenblatt A, Greenamyre JT, Hersch S, Vaddadi KS, Sword A, Horrobin DF, Manku M, Murck H. *Neurology.* Ethyl-EPA in Huntington disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **2005**; 65(2):286-92.
- Ramachandran S, Gottlieb D. Mode of action of antibiotics. II. Specificity of action of antimycin A and ascocin. *Biochim Biophys Acta.* **1961**; 53:396-402.
- Rapoport SI, Chang MCJ, Spector AA. Delivery and turnover of plasma-derived essential PUFAs in mammalian brain. *J Lipid Res* **2001**; 42:678–85.
- Rapoport SI. In vivo fatty acid incorporation into brain phospholipids in relation to plasma availability, signal, transduction and membrane remodeling. *J Mol Neurosci* **2001**; 16:243–62.
- Rigon P, Achaval M, Iagher F, de David C, Marroni N, Ferraz AC. Evaluation of chronic omega-3 fatty acids supplementation on behavioral and neurochemical alterations in 6-hydroxydopamine-lesion model of Parkinson's disease. *Neurosci. Res.* **2010**; 66, 256–264.
- Ryu JK, Nagai A, Kim J, Lee MC, McLarnon JG, Kim SU. Microglial activation and cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid in vitro and in vivo studies. *Neurol Dis.* **2003**, 12: 121-32.
- Salama MF¹, Abbas A, Darweish MM, El-Hawwary AA, Al-Gayyar MM. Hepatoprotective effects of cod liver oil against sodium nitrite toxicity in rats. *Pharm Biol.* 2013; 51(11):1435-43.
- Sanderson TH¹, Reynolds CA, Kumar R, Przyklenk K, Hüttemann M. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial

- membranepotential in reactive oxygen species generation. *Mol Neurobiol.* **2013**; 47(1):9-23.
- Schuchardt JP, Hahn A. Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* **2013**; 89(1):1-8.
 - Scorrano L. Keeping mitochondria in shape: a matter of life and death. *Eur J Clin Invest.* **2013**; 43(8):886-93.
 - Singh S, Misiak M, Beyer C, Arnold S. Brain region specificity of 3-nitropropionic acid-induced vulnerability of neurons involves cytochrome c oxidase. *Neurochem Int.* **2010**; 57(3):297-305.
 - Song BJ, Moon KH, Olsson NU, Salem N Jr. Prevention of alcoholic fatty liver and mitochondrial dysfunction in the rat by long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Hepatol.* **2008**; 49(2):262-73.
 - Spinazzi M1, Casarin A, Pertegato V, Salviati L, Angelini C. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat Protoc.* **2012**; 7(6):1235-46.
 - Sullivan JC, Budge SM, St-Onge M. Modeling the primary oxidation in commercial fish oil preparations. *Lipids.* **2011**; 46: 87–93.
 - Tanskanen A, Hibbeln JR, Hintikka J, Haatainen K, Honkalampi K, Viinamäki H. Fish consumption, depression, and suicidality in a general population. *Arch Gen Psychiatry.* **2001**; 58(5):512-3.
 - Túnez I, Santamaría A. Modelo de enfermedad de Huntington inducido con ácido 3-nitropropiónico. *Rev Neurol.* **2009**; 48 (8): 430-434.
 - Túnez I, Tasset I, Pérez-De La Cruz V, Santamaría A. 3-nitropropionic acid as a tool to study the mechanism involved in huntington's disease: past, present and future. *Molecules.* **2010**; 15: 878-916.
 - Van Raamsdonk JM, J Pearson, Rogers DA, Lu T, Barakauskas VE, Barr AM, Honer WG, Hayden MR, Leavitt BR . Ethyl-EPA treatment improves motor dysfunction, but not neurodegeneration in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Exp Neurol.* **2005**; 196(2):266-72.
 - Villarán RF, Tomás-Camardiel M, De Pablos RM, Santiago M, Herrera AJ, Navarro A, Machado A, Cano J. Endogenous dopamine enhances the neurotoxicity of 3-nitropropionic acid in the striatum through the increase of mitochondrial respiratory inhibition and free radicals production. *Neurotoxicology.* **2008**; 29: 244-58.
 - Voet D, Voeth JG, Pratt CW. *Fundamentos de bioquímica.* 2da edición. Editorial Médica Panamericana. **2006**; 1176 pp.

- Wurtman RJ. Non-nutritional uses of nutrients. *European Journal of Pharmacology*. **2011**; 668 (2011) S10–S15.
- Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion and stress. *Science*. **2012**; 337(6098):1062-5.
- You KR1, Wen J, Lee ST, Kim DG. Cytochrome c oxidase subunit III: a molecular marker for N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced oxidative stress in hepatoma cells. *J Biol Chem*. **2002**; 277(6):3870-7.
- Zhang Y, Jiang L, Hu W, Zheng Q, Xiang W. Mitochondrial dysfunction during in vitro hepatocyte steatosis is reversed by omega-3 fatty acid-induced up-regulation of mitofusin 2. *Metabolism*. **2011**; 60(6):767-75.