



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN *EX VIVO* DE ÁCIDO PALMÍTICO SOBRE LA
EXPRESIÓN DE MITOFUSINAS HEPÁTICAS**

***TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO
PRESENTA***

RICARDO ZAMORA OROZCO

TUTOR

Dr. Edgar R. Mendieta Condado

OCTUBRE 2015

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México



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.

Agradecimientos

A la M. en C. Lourdes Sánchez Sevilla, del Instituto de Fisiología Celular UNAM, por el apoyo técnico en la elaboración de la parte experimental de este trabajo.

A la M. en C. Carmen Mondragón Huerta de la Carrera de Médico-Cirujano de la FES Iztacala, por su apoyo técnico en la elaboración de los cortes histológicos de este trabajo.

Al Dr. Rafael Villalobos Molina y a la Dra. Itzell Gallardo por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

A los Doctores Rafael Villalobos Molina, Rolando Hernández Muñoz, Ana V. Vega Salcedo y Ricardo Mejía Zepeda, por sus comentarios a este trabajo.

Al Dr. Edgar R. Mendieta Condado por su apoyo en la realización de este trabajo.

Índice

Portada.....	1
Introducción.....	4
Hipótesis.....	18
Objetivo General	18
Objetivos específicos	18
Metodología.....	19
Resultados	22
Discusión.....	32
Conclusión.....	38
Perspectivas.....	38
Bibliografía	39

Introducción

El sistema digestivo está encargado de transformar los elementos de la dieta en combustible utilizable por el cuerpo, descomponiendo las moléculas grandes que conforman los alimentos habituales de los organismos, de tal forma que puedan ser absorbidos y utilizadas por ellos (Kardong, 2007).

El hígado tiene un papel central en la transformación, distribución y secreción de varias sustancias relacionadas con el procesamiento de nutrientes. Proporciona a los órganos y tejidos una variedad de moléculas para la nutrición a través del sistema circulatorio. La centralidad del hígado se pone de manifiesto incluso al denominar a los demás órganos “extrahepáticos” o “periféricos” (Kmieć, 2001).

El hígado de un humano adulto pesa entre 1400 y 1600 gramos, lo que representa el 2.5% del peso corporal, este órgano tiene la particularidad de recibir el flujo sanguíneo de dos aportes diferentes, siendo el principal la vena porta hepática que se estima aporta entre el 60% y 70% del flujo sanguíneo, mientras que la arteria hepática aporta entre 30% y 40%. En ratas se estima que el flujo sanguíneo portal es de 90%, mientras que el arterial es 10% (Mitchel *et al.* 2004; Ferrigno *et al.* 2002)

Los componentes celulares del hígado son heterogéneos, primordialmente encontramos hepatocitos que conforman cerca del 75% de la masa hepática total y se calcula realizan más de 5000 reacciones químicas diferentes; éstos transforman los nutrientes de la dieta en los combustibles y precursores necesarios para cada tejido. Los hepatocitos son de gran importancia en la administración de los nutrientes a nivel sistémico, como lo ejemplifica el caso de la glucosa sanguínea (molécula usada como fuente primaria de energía por las células) proveniente de la digestión, que se absorbe por los hepatocitos y se almacena como glucógeno. Este mecanismo es fundamental para mantener la homeostasis pues protege al resto del cuerpo de los niveles altos y bajos de glucosa en la sangre. Por otra parte, los ácidos grasos también son absorbidos por

los hepatocitos y metabolizados para producir energía en forma de ATP. Los hepatocitos también producen moléculas como colesterol, fosfolípidos, lipoproteínas y bilis entre muchas otras moléculas de importancia crucial para el funcionamiento del cuerpo.

También encontramos otros tipos celulares como las células estelares; células de Kupffer; linfocitos granulados, también llamados “Natural Killer” cuya función es defender contra infecciones virales y células tumorales metastásicas. Las células ovals que pueden diferenciarse en hepatocitos o en células del ducto biliar en caso de daño crónico masivo y, finalmente, las células endoteliales y las células del ducto biliar (Mendieta, 2010; Nelson *et al.* 2008).

Los tres principales tipos de moléculas que funcionan como macronutrientes, carbohidratos, proteínas y lípidos, experimentan hidrólisis enzimática hasta convertirse en sus constituyentes más sencillos. Esta descomposición y degradación química de los alimentos es necesaria, puesto que las células epiteliales digestivas sólo absorben moléculas relativamente pequeñas (Nelson *et al.* 2008).

Posterior a la absorción, los nutrientes son llevados por el torrente sanguíneo al hígado (con excepción de los triacilgliceroles que van al tejido adiposo a través del sistema linfático). La vena porta es una ruta directa de los órganos digestivos al hígado, siendo este el primer órgano en acceder a los nutrientes. Además de recibir la sangre del intestino grueso y del intestino delgado, el hígado también recibe la sangre proveniente del bazo y del páncreas.

La importancia que reviste el hígado a nivel sistémico ha llevado al desarrollo de sistemas de reparación inmediatos, pese a ello existen muchos factores que inducen daño hepático, entre ellos se puede mencionar la pérdida de células causadas por virus, enfermedades autoinmunes, toxinas, ingesta de alcohol, el uso de fármacos como antiinflamatorios, anticonvulsivos, quimioterapia, así como resecciones de hígado en pacientes con tumores primarios o metastásicos (Michalopoulos, 2007).

El hígado es una glándula central en el metabolismo intermediario debido a que procesa y administra prácticamente todos los nutrientes, y tiene la capacidad, única en su tipo, de regenerar hasta el 70% de su masa. Sin embargo, la capacidad regenerativa presenta límites y es insuficiente en enfermedades crónicas como en la hepatitis viral o en casos de ingesta de alcohol a largo plazo. También lo es en cuadros clínicos causantes de cirrosis hepática, caracterizada por el reemplazo del epitelio funcional por tejido conectivo no funcional, lo cual causa insuficiencia hepática (Böhm *et al.* 2010).

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés) está asociada con obesidad y presenta gran prevalencia a nivel mundial. Su importancia sanitaria deriva de que un porcentaje de los pacientes con NAFLD progresan a esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés), síndrome asociado con esteatosis hepática y elevación de ácidos grasos libres, cuyo mecanismo no ha sido posible dilucidar. Sin embargo se ha reportado que los ácidos grasos libres causan esteatosis y mejoran la expresión de dos efectores apoptóticos: factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y Fas, de esta forma la lipotoxicidad se ha relacionado con inducción de apoptosis y desarrollo de NASH (Malhi *et al.* 2006).

Mitocondrias

Las mitocondrias ocupan una porción sustancial del volumen citoplasmático de las células eucariontes y son los organelos generadores de energía química en forma de moléculas de ATP. Se caracterizan por estar rodeadas por dos membranas y poseer su propio material genético. La membrana interna mitocondrial forma plegamientos, denominados crestas, que se proyectan dentro de la matriz incrementando el área de la membrana interna mitocondrial. Característica distintiva de las mitocondrias es que están bajo un control genético dual, tanto del DNA nuclear como del DNA mitocondrial (O'Connor *et al.* 2010).

Las dos membranas mitocondriales están altamente especializadas y desempeñan funciones distintas; ambas forman dos compartimientos diferentes: la matriz mitocondrial y el espacio intermembranal, cada uno con diferentes clases de proteínas, algunas codificadas en el núcleo y otras codificadas en las mitocondrias. En la membrana interna se encuentran proteínas involucradas con el transporte de electrones y la síntesis de ATP. Esta membrana rodea la matriz mitocondrial, donde se encuentran las enzimas que metabolizan el piruvato y los ácidos grasos para producir acetil-CoA, que será oxidado a través del ciclo del ácido cítrico (Alberts *et al.* 2008).

Ácidos grasos

Los ácidos grasos desempeñan papeles cruciales en el metabolismo, son componentes esenciales de todas las membranas y son reguladores genéticos. Además, los lípidos de la dieta proporcionan ácidos grasos poliinsaturados que son los precursores de moléculas señalizadoras como los eicosanoides. Como parte de lípidos complejos, los ácidos grasos funcionan como aislantes térmicos y eléctricos que igualmente protegen mecánicamente. (Tabla 2) (Rustan *et al.* 2005).

Funciones de los ácidos grasos
Fuente de energía (37 kJ g ⁻¹)
Forma transportable de energía, lípidos en la sangre (triacilgliceroles en las lipoproteínas)
Almacenamiento de energía (en tejido adiposo y músculo esquelético)
Componente de las membranas celulares (fosfolípidos)
Señalización (eicosanoides, regulación de genes -transcripción-)

Tabla 1. Funciones de los ácidos grasos. Tomado de Rustan *et al.* 2005.

Los ácidos grasos encontrados en el organismo proceden de diferentes fuentes: 1) son ingeridos a través de la dieta, 2) proceden de la lipólisis del tejido adiposo, o 3) son sintetizados *de novo* a través de la lipogénesis (Rustan *et al.* 2005).

Los lípidos de la dieta se encuentran como triacilgliceroles que son transformados en micelas microscópicas por efecto de las sales biliares (moléculas anfipáticas que funcionan como detergentes biológicos) para ser absorbidos, de esta forma se convierten las grasas de la dieta en micelas mixtas de sales biliares y triacilgliceroles. Las lipasas convierten los tricilglicéridos que componen las micelas de triacilgliceroles a monoglicéridos y diglicéridos, ácidos grasos libres y glicerol, que difunden dentro de las células epiteliales, en donde son reconvertidas en triacilgliceroles y almacenadas con colesterol de la dieta y proteínas específicas formando agregados lipoproteínicos, llamados quilomicrones (Nelson *et al.* 2008).

En mamíferos, el exceso de ácidos grasos es almacenado en el tejido adiposo blanco, que funciona como suministro de lípidos para los tejidos periféricos. La lipólisis es el proceso a través del cual los triacilgliceroles almacenados son liberados por lipasas, formando ácidos grasos libres y glicerol, que pasan a la sangre donde se unen a la albúmina y son transportados a músculo esquelético, corazón, corteza renal, entre otros tejidos. En los tejidos, los ácidos grasos son disociados de la albúmina y captados por los transportadores de la membrana plasmática al interior de las células para servir como combustible (Nelson *et al.* 2008; Rustan *et al.* 2005).

La lipogénesis *de novo* convierte el exceso de carbohidratos en ácidos grasos a través del acetyl-CoA y eventualmente en triacilgliceroles. Este proceso es activado en primer lugar por la insulina secretada por el páncreas después de una comida rica en carbohidratos (Rustan *et al.* 2005).

Características de ácidos grasos

Los ácidos grasos tienen dos regiones químicamente diferentes, una cadena hidrocarbonada hidrofóbica con poca reactividad química, y un grupo carboxilo (-COOH), que en solución se ioniza rápidamente, es altamente hidrofílico y muy reactivo. La mayoría de los ácidos grasos de una célula están unidos de forma covalente a otras moléculas por medio de su grupo carboxilo (Alberts *et al.* 2008).

Cada grupo en los extremos del ácido graso recibe diferentes nombres, por un lado el grupo metilo (al final de la molécula) se denomina como omega (ω), mientras en el otro extremo (el inicio de la molécula) el grupo carboxilo es denominado carbono alfa (α) y el carbono siguiente es conocido como carbono beta (β). Los ácidos grasos se clasifican en dos grupos dependiendo de la presencia de dobles enlaces en la cadena de carbono, de esta manera se tienen ácidos graso saturados e insaturados. Los ácidos grasos saturados tienen sus cadenas de carbono llenas (saturadas) de hidrógeno, se caracterizan por ser lineales, por tener un alto punto de fusión, tener consistencia cerosa a temperatura ambiente y por tener rotación libre entre los enlaces C-C. Este hecho les confiere gran flexibilidad y una gran capacidad de empaquetamiento, estableciendo interacciones de van der Waals entre átomos a lo largo de la propia cadena y con cadenas adyacentes. Entre los más comunes se encuentran los que contienen entre 12-24 átomos de carbono (Nelson *et al.* 2008; Rustan *et al.* 2005).

Los ácidos grasos insaturados, tienen dobles enlaces en sus cadenas de carbono. Son llamados monoinsaturados si tienen solamente una insaturación (doble enlace), mientras que los poliinsaturados tienen dos o más dobles enlaces. Los monoenoos más comunes tienen entre 16 y 22 átomos de carbono, y un doble enlace *cis*, lo que significa que los átomos de hidrógeno en cada lado del doble enlace están orientados en la misma dirección, en oposición a los dobles enlaces *trans*, en donde los átomos de hidrógeno adyacentes se encuentran en lados diferentes. La presencia de dobles enlaces restringe la movilidad entre los enlaces

C-C, determina su forma de empaquetamiento y su punto de fusión a temperatura ambiente, siendo éste considerablemente más bajo, por lo que los ácidos grasos insaturados se presentan como aceites a temperatura ambiente (Nelson *et al.* 2008; Rustan *et al.* 2005).

El ácido graso saturado más común en los animales, plantas y microorganismos es el ácido palmítico (16:0), en humanos es el ácido graso más elevado en pacientes con NASH y también es el más utilizado en estudios de lipotoxicidad *in vitro*. El ácido esteárico (18:0) es el principal ácido graso en animales y en algunos hongos y el menor componente en la mayoría de las plantas. El ácido mirístico (14:0) está ampliamente difundido, ocasionalmente como componente principal. Los ácidos grasos de cadena pequeña se encuentran principalmente en la leche y en los triacilgliceroles de coco (Rustan *et al.* 2005).

Se ha establecido que la absorción de ácidos grasos por el parénquima y su translocación a través de la membrana celular, ocurre por difusión simple (transporte pasivo) con una velocidad de absorción determinada por la velocidad de suministro de los ácidos grasos (flujo sanguíneo multiplicado por la concentración extracelular) y la velocidad del metabolismo intracelular de los ácidos grasos. Sin embargo, desde un punto de vista fisiológico es preferible la regulación de la entrada de ácidos grasos con la finalidad de establecer una sincronización de la ingesta y las necesidades metabólicas y, de esta manera, evitar efectos dañinos por el exceso y acumulación de ácidos grasos (Glatz *et al.* 2010).

En términos fisiológicos, el control en la ingesta de los ácidos grasos podría tener como objetivos: 1) asegurar la ingesta cuando la concentración extracelular es baja; 2) limitar la ingesta cuando la concentración es alta; 3) seleccionar ácidos grasos específicos; 4) permitir ajustes en el suministro de ácidos grasos a nivel de tejidos locales para satisfacer fluctuaciones de las demandas metabólicas (Glatz *et al.* 2010).

La β -oxidación es la principal forma de oxidación de los ácidos grasos para generar energía, en especial cuando la disponibilidad de glucosa es baja durante periodos de inanición. Este fenómeno se lleva a cabo tanto en mitocondrias como en lisosomas; sin embargo, mientras que las mitocondrias son capaces de catalizar los ácidos grasos cortos ($<C_8$), medios (C_8-C_{12}) y largos ($C_{14}-C_{20}$), los peroxisomas preferentemente catalizan los ácidos grasos de cadenas largas (Long Chain Fatty Acids, LCFAs) y de cadenas muy largas (Very Long Chain Fatty Acids, VLCFAs) (Reddy *et al.* 2001; Hashimoto *et al.* 1999; Nelson *et al.* 2008).

Se estima que en personas adultas, los ácidos grasos y los cuerpos cetónicos, derivados del metabolismo de los ácidos grasos, proporcionan aproximadamente el 80% de las calorías requeridas después de 24 h de inanición. Debido a que el ayuno conduce a una dramática depleción de los carbohidratos como fuente de energía, se requiere de una eficiente oxidación de los ácidos grasos como forma de regulación del metabolismo energético (Reddy *et al.* 2001).

Dinámica mitocondrial

La variabilidad morfológica de las mitocondrias se conoce desde las primeras descripciones realizadas en músculo por Von Kölliker en 1857, a quien se le atribuye la designación del nombre de sarcosomas. Estos organelos se identificaron como compartimentos granulares citoplasmáticos con membranas propias. Posterior a la descripción inicial, fueron finalmente designadas por Benda en 1898 como mitocondrias, derivado de las palabras Griegas *mitos* (que significa hilo) y *chondron* (grano) (Liesa *et al.* 2009). No fue sino a partir de 1930 que éste término se convirtió en el más utilizado.

A principios del siglo XX los avances en microscopía y el desarrollo de cultivos celulares permitieron las primeras observaciones confiables de los cambios en la forma y la dinámica que presentaban las mitocondrias; no obstante, estas

observaciones iniciales fueron eclipsadas por el descubrimiento, en la década de 1940-1950, de grandes avances en el campo de la bioquímica mitocondrial, demostrándose la β -oxidación, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa (Liesa *et al.* 2009).

En las fotografías clásicas tomadas con microscopio electrónico que aún se encuentran en muchos libros de texto, se puede ver a las mitocondrias como organelos solitarios en forma granular, imagen que se popularizó y se encuentra en el imaginario científico referido a dichos organelos: sin embargo, la razón principal es debido a que estas imágenes fueron en su mayoría tomadas transversalmente (Westermann, 2002). Aunque generalmente es aceptado que las mitocondrias juegan un papel central en la apoptosis, en la respuesta celular al estrés, en el envejecimiento y en enfermedades hereditarias, es relativamente reciente el punto de vista de que la regulación de la morfología mitocondrial juega un papel central en la función celular (Shaw *et al.* 2002). Por esta razón constituye un tema interesante de investigación: los mecanismos por los que las mitocondrias cambian de forma y cómo estos cambios interfieren en las respuestas fisiológicas.

Las mitocondrias son organelos dinámicos que pueden cambiar en número y forma dentro de una célula en diferentes etapas de su desarrollo. Como ejemplos se pueden mencionar los cambios observados durante la embriogénesis, el ciclo celular o bajo distintas condiciones de estrés, como es el caso de la formación de un fenotipo de pro-fusión observado en condiciones que incluyen la inhibición de la transcripción/traducción, radiación UV o privación de suero y aminoácidos (Galloway *et al.* 2012). Estos organelos frecuentemente se fisianan y fusionan, formando redes tubulares en constante cambio, en donde la regulación de la dinámica mitocondrial es de crucial importancia para el funcionamiento de la célula (Karbowski *et al.* 2003).

El mantenimiento de la morfología mitocondrial está dado por un balance entre los eventos de fusión y fisión, relacionados de forma importante con los procesos de regulación de energía, complementación genética del ADN mitocondrial y distribución de componentes mitocondriales especiales como la cardiolipina; al

mismo tiempo, los procesos de fisión facilitan el transporte de mitocondrias a las células hijas durante la mitosis y la meiosis (Hales, 2010). Por otro lado, los desequilibrios en estos procesos pueden estar implicados en el desarrollo de obesidad y en la resistencia a la insulina (Lionetti *et al.* 2014).

La disfunción mitocondrial es característica en la resistencia a la insulina y en la enfermedad de hígado graso no alcohólico. En condiciones que involucran resistencia a la insulina, ha sido reportado un deterioro en la oxidación lipídica; mientras que en la enfermedad de hígado graso no alcohólico, un flujo de lípidos elevado estimula la oxidación de las grasas, incrementando la producción de radicales libres de oxígeno. El daño a la cadena de transporte de electrones puede estar relacionado con una alteración ultra-estructural, como ha sido encontrado en individuos con esteatohepatitis no alcohólica (Lionetti *et al.* 2014).

En células de mamífero estos organelos pueden formar redes interconectadas que hacen más eficiente la oxidación de los sustratos, mientras que en la levadura *S. cerevisiae*, se encontró que el número de ramificaciones de las mitocondrias depende de las condiciones de crecimiento y se incrementa cerca de cuatro veces cuando la levadura crece en una fuente de carbono no fermentable (Karbowski *et al.* 2003).

Por otro lado, un decremento en la conectividad y la formación de mitocondrias redondas y pequeñas ocurre bajo condiciones en las que se compromete la función mitocondrial. Bajo diferentes condiciones de crecimiento, la fisión y la fusión pueden cambiar, elevando o disminuyendo el número de mitocondrias (Karbowski *et al.* 2003; Hales *et al.* 2012).

Los eventos de fusión y fisión no son procesos que se limiten a las mitocondrias, ya que están bien documentados en la endocitosis y en la formación de vesículas en los diferentes compartimientos de las células eucariontes (Hinshaw, 2000). Estos procesos son altamente regulados dentro de las células, puesto que no encontramos fusiones y fisiones membranales realizadas descontroladamente de uno a otro compartimento. Por lo que respecta a las moléculas encargadas de la

fusión y fisión mitocondrial, se han encontrado varias proteínas encargadas de regular la morfología de estos organelos. Los eventos de fusión son coordinados por Mfn1 y Mfn2 (Mitofusinas 1 y 2) y por la proteína OPA1 (Autosomal Dominant Optic Atrophy-1), estas proteínas están asociadas con la membrana mitocondrial externa y la membrana mitocondrial interna, respectivamente. Por otro lado, los eventos de fisión son regulados por una proteína GTPasa de la familia de las Dineínas llamada Dnm1 en levaduras y Drp1 (Dynamin-related protein 1) en mamíferos. Otra proteína de la membrana mitocondrial externa que desempeña una función esencial en completar la fisión mitocondrial es llamada Fis1 (Fission 1 protein) (Lionetti *et al.* 2014; Karbowski *et al.* 2003; Westermann, 2002; Zorzano *et al.* 2004; Liesa *et al.* 2009; Chan *et al.* 2006).

Se ha demostrado que la morfología mitocondrial es de crucial importancia en el funcionamiento celular adecuado, por ejemplo, en la esteatohepatitis no alcohólica, las mitocondrias muestran lesiones morfológicas y disminución de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria (Lionetti *et al.* 2014). Por otro lado, se conoce que alteraciones en proteínas que participan en la dinámica mitocondrial están ligadas a patologías humanas, especialmente la disrupción de la maquinaria de la fusión conduce a enfermedades neurodegenerativas, clásicas. Tal es el caso de una mutación en el gen Mfn2, que causa una enfermedad neurodegenerativa denominada enfermedad Charcot-Marie-Tooth tipo 2A; otra mutación en el mismo gen produce la atrofia óptica de Kjer (Autosomal Dominant Optic Atrophy) (Baloh *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2011).

Observaciones recientes indican que el metabolismo mitocondrial se puede regular a través de la manipulación de proteínas relacionadas con la dinámica mitocondrial de fusión y fisión, particularmente la Mfn2. Alteraciones en la actividad de Mfn2, modifican la respiración celular, la oxidación de sustratos y la fosforilación oxidativa (Jesen *et al.* 2011; Shaw *et al.* 2002).

En el marco de las enfermedades hepáticas, como es el caso de NAFLD, no se han encontrado factores involucrados en el desarrollo progresivo que puedan derivar en NASH, fibrosis, cirrosis, o carcinoma hepatocelular; sin embargo, hay

evidencias recientes que sugieren la partición de mitocondrias disfuncionales durante los diferentes pasos que llevan de la obesidad al desarrollo de NASH (Zhang *et al.* 2011).

Con la finalidad de evaluar los cambios en la morfología y en la dinámica mitocondrial, se realizó un estudio basado en el desarrollo de un modelo de esteatosis hepática en ratas: se administraron dos dietas altas en grasas, una basada en manteca de cerdo y la otra en aceite de pescado. Los resultados mostraron que la dieta con manteca de cerdo provocó la acumulación hepática de lípidos y la resistencia a la insulina asociada a la disfunción mitocondrial, al estrés oxidativo y a una morfología mitocondrial fisionada; por otro lado la dieta alta en aceite de pescado presentó efecto anti esteatótico, asociado con incremento de la fusión mitocondrial. Se concluyó que diferentes dietas altas en grasa tienen diferentes efectos en la función y en la dinámica mitocondrial (Lionetti *et al.* 2014).

Por otro lado, Zhang *et al.* (2011) establecieron un modelo *in vitro* de esteatosis hepática a partir del cultivo de células HepG2 incubadas con una mezcla de ácido palmítico y ácido oleico, observando que durante el establecimiento de la esteatosis el mRNA (ARN mensajero) de Mfn2 disminuyó significativamente, los niveles de ATP bajaron y la red mitocondrial se mostró fragmentada en pequeñas esferas, al mismo tiempo que se incrementaron los Radicales Libres de Oxígeno (ROS). También evaluaron el efecto de ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (ácido eicosapentanoico y ácido docosahexanoico) en las células esteatóticas, mostrando que el mRNA de Mfn2 fue significativamente mayor comparado con los controles, asociado con un incremento en la producción de ATP y una disminución en la producción de ROS, al igual que incremento en la longitud de los tubos mitocondriales (Zhang *et al.* 2011).

Pese al conocimiento actual, el proceso completo de la fusión y la fisión mitocondrial no ha sido definido a fondo, debido, probablemente, a que los genes que ejecutan y modulan esta actividad permanecen sin ser determinados. La mayor parte de estos estudios se han hecho principalmente en levaduras y en cultivos celulares de mamíferos. Por tanto, los patrones, la relevancia fisiológica y

su función en procesos como la lipotoxicidad o su participación en el desencadenamiento de condiciones patológicas en humanos o en tejidos o en hígados de roedores son entendidos precariamente o desconocidos.

Modelo de aislamiento y perfusión de hígado de rata (IPRL)

Hace más de cien años Claude Bernard reportó, por primera vez, el uso del modelo de aislamiento y perfusión de hígado de rata (IPRL, por sus siglas en inglés). Desde entonces, es utilizado como herramienta para explorar la fisiología del hígado; de hecho, su utilidad es vigente a pesar de la disponibilidad de nuevas técnicas para evaluar la función hepática (Gores *et al.* 1986).

El IPRL está ampliamente difundido en diferentes áreas de la ciencia: farmacología, toxicología, fisiología y patofisiología. Algunas áreas de uso común son la evaluación del daño por isquemia-reperfusión, el metabolismo de los compuestos perfusados, metabolismo de amonio y aminoácidos, la función endotelial, el consumo de oxígeno, la síntesis de proteínas, etc. (Bessems *et al.* 2006).

Bessems *et al.* (2006) realizaron una revisión centrada en las aplicaciones del modelo en hígados de rata, argumentando preferencias de tamaño del animal, adquisición y mantenimiento baratos (Bessems *et al.* 2006). No obstante, el IPRL se ha practicado en hígados de diferentes especies de animales tales como monos, hamsters, cobayos, gatos, conejos, perros, borregos, becerros y cerdos (Gores *et al.* 1986).

Esta técnica es considerada como un modelo *ex vivo* diferente de estudios en hígado *in vivo* e *in vitro*. Frente a modelos *in vitro* (hepatocitos aislados, cortes de hígado) tiene como ventajas la preservación de la arquitectura hepática y la polaridad, conservación de las relaciones naturales célula-célula, mantenimiento de la integridad vascular y evaluación del flujo biliar. En contraste con modelos *in*

vivo, el IPRL evita la influencia de factores extra hepáticos tales como los constituyentes de la sangre y las sustancias neuro-hormonales, permitiendo un control preciso de las condiciones experimentales; además permite la fácil exposición del hígado a diferentes sustancias, así como una evaluación en tiempo real del daño (Gores *et al.* 1986; Ferrigno *et al.* 2013).

En nuestros experimentos, los animales fueron ayunados por 12 horas con la intención de inducir rutas metabólicas alternas que aseguran la captación del ácido palmítico. Está bien documentado que cuando el ayuno es prolongado los procesos metabólicos cambian, tanto cuantitativa como cualitativamente, y los sustratos energéticos consumidos son modificados. En condición de ayuno la oxidación de la glucosa, los ácidos grasos no esterificados y cuerpos cetónicos, es globalmente disminuida. De esta manera, después de la depleción inicial del glucógeno hepático y muscular y la reducción del catabolismo de las proteínas, la glucosa plasmática se mantiene por la gluconeogénesis, proceso que depende principalmente del catabolismo del músculo y tejido adiposo. Subsecuente a este proceso, se reducen y se prioriza la lipólisis, la gluconeogénesis y la cetogénesis (Albero *et al.* 2004). La importancia del ayuno radica en “programar” una ruta metabólica que priorice la asimilación de los ácidos grasos por parte del hígado, facilitando la captación del ácido palmítico utilizado como tratamiento en la perfusión.

Hipótesis

Las proteínas implicadas en la dinámica mitocondrial (Mfn1, Mfn2, Opa1 y Fis1) modifican su expresión en respuesta a altas concentraciones de ácido palmítico. Así, la lipotoxicidad modificará los procesos de fisión/fusión mitocondrial, que pueden disminuir la expresión de las proteínas relacionadas con la fusión (Mfn1, Mfn2 y Opa1) y aumentar la expresión de la proteína (Fis1) implicada en la fisión.

Objetivo General

Determinar el efecto del ácido palmítico administrado *ex vivo* sobre la expresión de proteínas Mfn1, Mfn2, Opa1 y Fis1, implicadas en la dinámica mitocondrial.

Objetivos específicos

- Estandarizar el modelo de aislamiento y perfusión de hígado de rata.
- Analizar la expresión de las proteínas hepáticas Mfn1 y Mfn2, Opa1 y Fis1 con diferentes concentraciones de ácido palmítico.
- Analizar los cambios en la permeabilidad mitocondrial por la liberación de transaminasas TGO y TGP en el perfusado.

Metodología

Animales

Se utilizaron 9 ratas macho Wistar con un peso entre 250-290g. Las ratas se dividieron en tres grupos (3 ratas cada grupo). Posterior al ayuno de 12 horas se realizó la intervención quirúrgica.

Grupos Experimentales

Los grupos experimentales fueron divididos como sigue: grupo control vehículo (CGV), donde el hígado fue perfundido con una mezcla de los solventes, albúmina y amortiguador Ringer-Krebs (pH 7.4) sin ácido palmítico; grupo con 15 mg de ácido palmítico (GAPA15) y grupo con 50 mg de ácido palmítico (GAPA50).

Preparación del ácido palmítico

El ácido palmítico se solubilizó con 1 ml. de dimetil sulfóxido (DMSO) y 1 ml. de butanol, posteriormente se agregaron 3 ml. de agua y se agitó por 1 min. Después de solubilizar se agregaron 10 ml de albúmina sérica de bovino y 35 ml de una mezcla de amortiguador Krebs-Ringer (pH 7.4).

Perfusión de hígado

Las ratas se anestesiaron con una dosis i.p. de pentobarbital sódico (dosis de 25 mg/kg), para realizar laparotomía y canulación por la vena porta hepática con un catéter 18GA, procediendo al corte de la vena cava superior para drenar el sistema vascular. El hígado se aisló y se lavó por 20 minutos con amortiguador salino de bicarbonato Krebs-Ringer con 5 mmol de glucosa, la solución se oxigenó con una mezcla de carbógeno (O₂ 95%, CO₂ 5%) y se calentó a 37°C; finalmente, el hígado se disectó y se montó en el sistema de perfusión. Los hígados de los grupos experimentales fueron perfundidos con diferentes cantidades de ácido palmítico durante 90 minutos, manteniendo un flujo constante de 1.5 ml/min/g de hígado, a 37°C y un pH de 7.4.

Transaminasas (TGO y TGP)

Durante el experimento se tomó cada 10 minutos una muestra del perfusado para analizar la liberación de enzimas transaminasas TGO y TGP, por el método de Bishop *et al.* 1985.

Western Blot

Al término de la perfusión, el hígado se fraccionó sub-celularmente por centrifugación diferencial para recuperar la fracción mitocondrial. Las proteínas mitocondriales fueron solubilizadas en frío con una mezcla de Nonidet 40 al 0.1% lauril maltósido al 0.5%. en amortiguador de HEPES pH= 7.0. Se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford modificado y se analizó la

expresión de las proteínas Mfn1, Mfn2, Opa1 y Fis1 por el método de Western Blot, como a continuación se describe.

Se cargaron 25µg de proteína mitocondrial por carril, que fueron separadas por electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) en un gel al 10% de acrilamida, utilizando una curva de voltaje creciente (60-110 V); al término, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore, Amersham) usando amperaje constante de 250mA, por 2 h. a 4°C, después se bloquearon los sitios inespecíficos con amortiguador de caseína 1%-gelatina 0.3% en PBS-Tween 20 al 0.3% por 2 h. a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios utilizados fueron, Mfn1, Mfn2, Opa1, Fis1 (Santa Cruz Biotechnology, CA). Finalmente, las proteínas fueron detectadas con un sustrato quimioluminiscente (Millipore, Amersham). El análisis densitométrico se realizó con el fotodocumentador Gel Doc EZ y el software Image Lab 5.1 (Bio-Rad, CA).

Análisis histológico

Los hígados se fijaron con p-formaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos (fosfato mono-básico de potasio 80mM, fosfato dibásico de potasio 20mM, pH 7.2). Posteriormente el tejido se deshidrató con tren secuencial de etanol, se incluyó en parafina, se realizaron cortes de 10µm y tiñeron con hematoxilina y eosina (HE). La observación se realizó con microscopio óptico.

Resultados

Histología

Con la finalidad de determinar si el ácido palmítico administrado en la perfusión fue captado por los hepatocitos, se realizó histología y tinción con H&E. El GAPA50 mostró el puntilleo característico de esteatosis hepática, mientras que el GCV a pesar de tener la morfología característica de un órgano perfundido, no muestra el puntilleo característico de esteatosis.

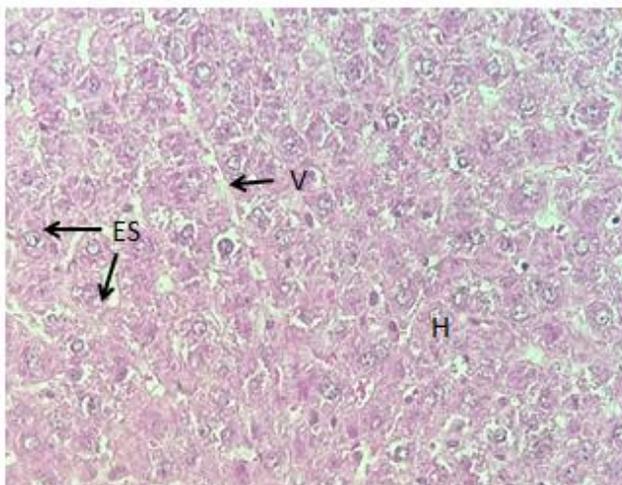


Imagen 1. Microfotografía histológica con microscopio óptico, tinción H&E, Grupo GCV. La anatomía de los hepatocitos no presenta alteraciones, son fácilmente observables los espacios sinusoidales un poco más amplios característicos de un hígado perfundido; también se pueden observar algunas vascularizaciones libres de eritrocitos igualmente características de un órgano perfundido; el citoplasma no presenta ningún tipo de acumulación. H: Hepatocito; V: Vascularización; ES: Espacio Sinusoidal. Magnificación 40X.

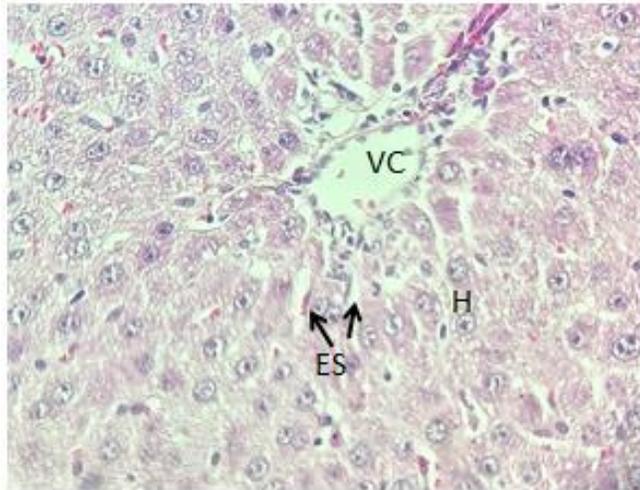
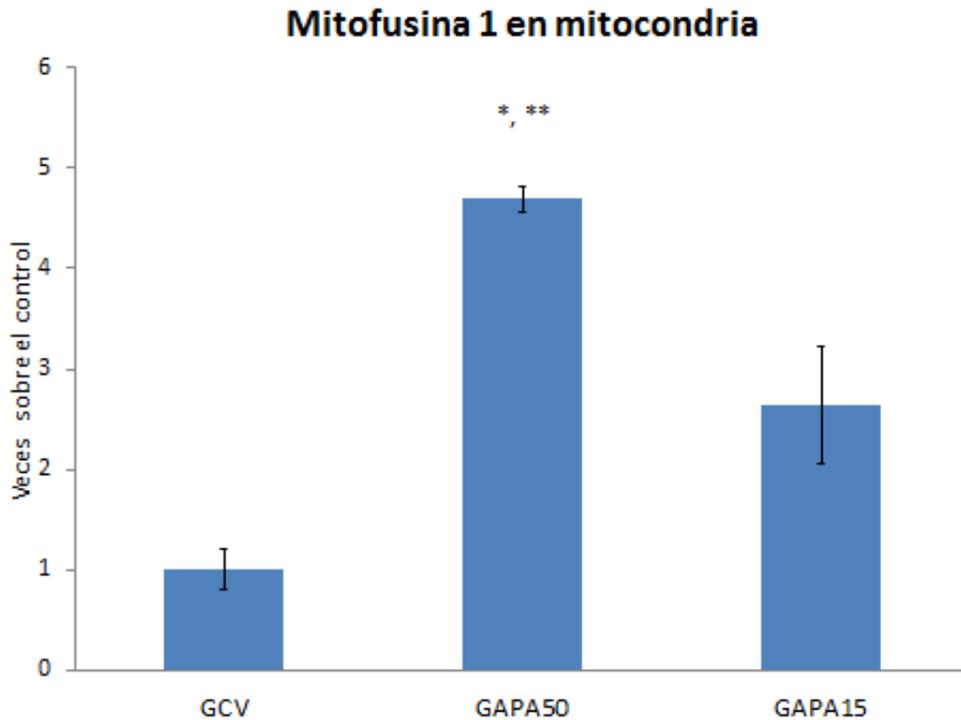


Imagen 2. Microfotografía histológica con microscopio óptico, tinción H&E, Grupo GAPA50. La anatomía de los hepatocitos presenta alteraciones citoplasmáticas; se observa un puntillito blanquecino en el citoplasma que sugiere el ingreso del ácido palmítico dentro de las células. Se observan los espacios sinusoidales un poco más amplios característicos de un hígado perfundido; se observa la vena central libre de eritrocitos, característico de un órgano perfundido. H: Hepatocito; CV: Vena Central; ES: Espacio Sinusoidal. Magnificación 40X.

Western Blot

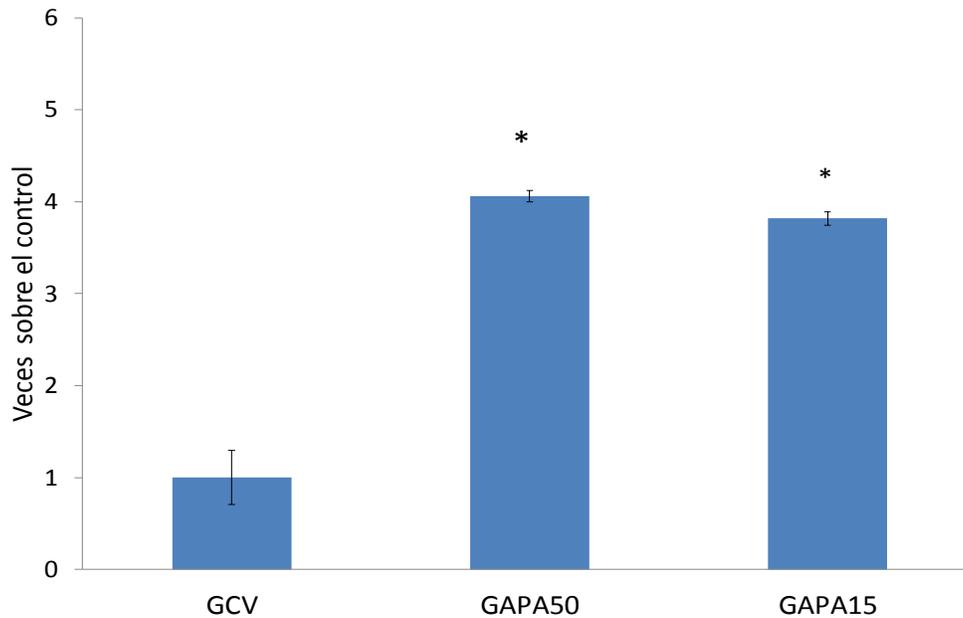
El tratamiento con 50 mg de ácido palmítico (GAPA50) incrementó de forma significativa la expresión de la proteína Mfn1 en mitocondria con respecto al grupo control (GCV), elevándose más de tres veces. GAPA50 también presentó diferencias significativas en la expresión de Mfn1 en el grupo tratado con la dosis de 15 mg de ácido palmítico (GAPA15). La elevación de la expresión de Mfn1 mitocondrial en el grupo GAPA15 se elevó sobre el control, sin encontrar diferencias significativas. Todo lo anterior ocurrió después de perfundir los hígados por 90 minutos con los tratamientos (Gráfica 1).



Gráfica 1. Análisis densitométrico de Mitofusina 1 mitocondrial. Se observa el efecto del ácido palmítico sobre la expresión de la Mfn1 en fracción mitocondrial hepática de animales ayunados. La gráfica corresponden al promedio del análisis densitométrico \pm error estándar. Los valores del control para la Mfn1 son 8866 (UDO/mm²). * $p < .05$ respecto a GCV. ** $p < .05$ respecto a GAPA15.

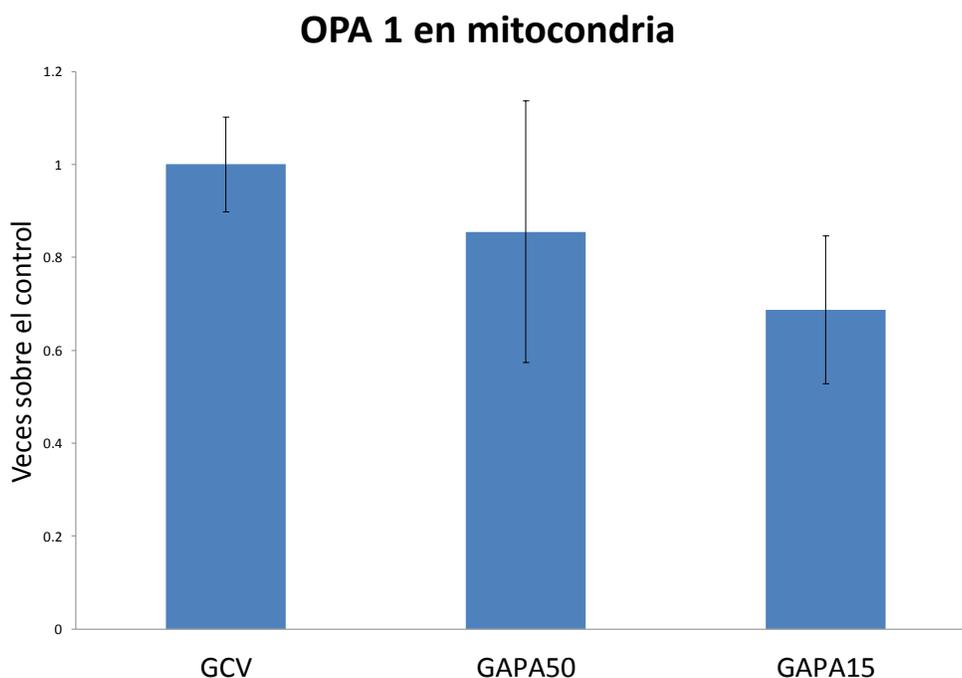
La expresión de Mfn2 en los grupos con tratamiento de ácido palmítico (GAPA50 y GAPA15) presentó valores que se elevaron por lo menos 3 veces sobre el control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa con respecto al control. Los grupos tratados con ácido palmítico (GAPA50 y GAPA15) presentaron una expresión similar de Mfn2. A pesar de que la expresión fue ligeramente mayor en el GAPA50 con respecto al GAPA15, no existieron diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos (Gráfica 2).

Mitofusina 2 en mitocondria



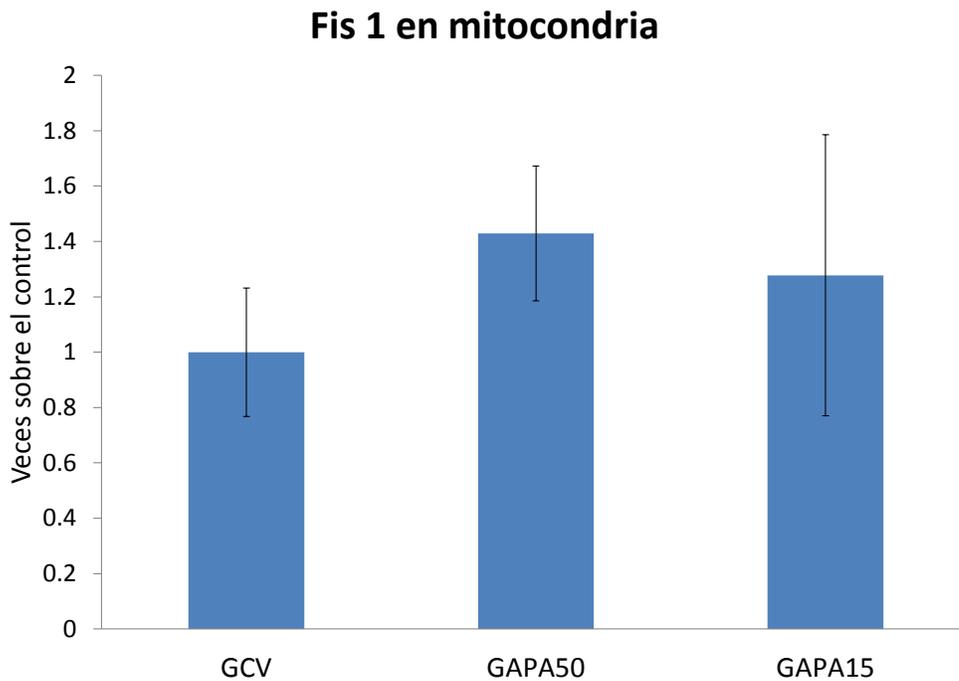
Gráfica 2. Análisis densitométrico de Mitofusina 2 mitocondrial. Se observa el efecto del ácido palmítico sobre la expresión de la Mfn1 en fracción mitocondrial hepática de animales ayunados. La gráfica corresponden al promedio del análisis densitométrico \pm error estándar. Los valores del control para la Mfn2 son 11153 (UDO/mm²). * $p < .05$ respecto a GCV.

La expresión de la proteína OPA1 mitocondrial fue mayor en el grupo control (GCV), decreciendo ligeramente en el grupo GAPA50 y disminuyendo aún más en el grupo GAPA15; las diferencias entre los tres grupos no son estadísticamente significativas. Es posible observar que los tratamientos con ácido palmítico no interfieren con el aumento o disminución significativa de la expresión de esta proteína durante los 90 min de la perfusión (Gráfica 3).



Gráfica 3. Análisis densitométrico de Opa1 mitocondrial. Se observa el efecto del ácido palmítico sobre la expresión de la OPA1 en fracción mitocondrial hepática de animales ayunados. La gráfica corresponden al promedio del análisis densitométrico \pm error estándar. Los valores del control para la Opa1 son 41456 (UDO/mm²).

Los valores más altos en la expresión de la proteína Fis1 se presentaron en el grupo con tratamiento de ácido palmítico GAPA50, mientras que en el grupo GAPA15 estuvieron ligeramente por debajo. El incremento de ambos grupos con tratamiento de ácido palmítico no fue más de 0.5 veces sobre el control, por lo que los valores de expresión de Fis1 mitocondrial no se modificaron en ninguno de los grupos experimentales, como puede verse en la gráfica 4.



Gráfica 4. Análisis densitométrico de Fis1 mitocondrial. Se observa el efecto del ácido palmítico sobre la expresión de la Fis1 en fracción mitocondrial hepática de los animales ayunados. La gráfica corresponden al promedio del análisis densitométrico \pm error estándar. Los valores del control para Fis1 son 17035 (UDO/mm²).

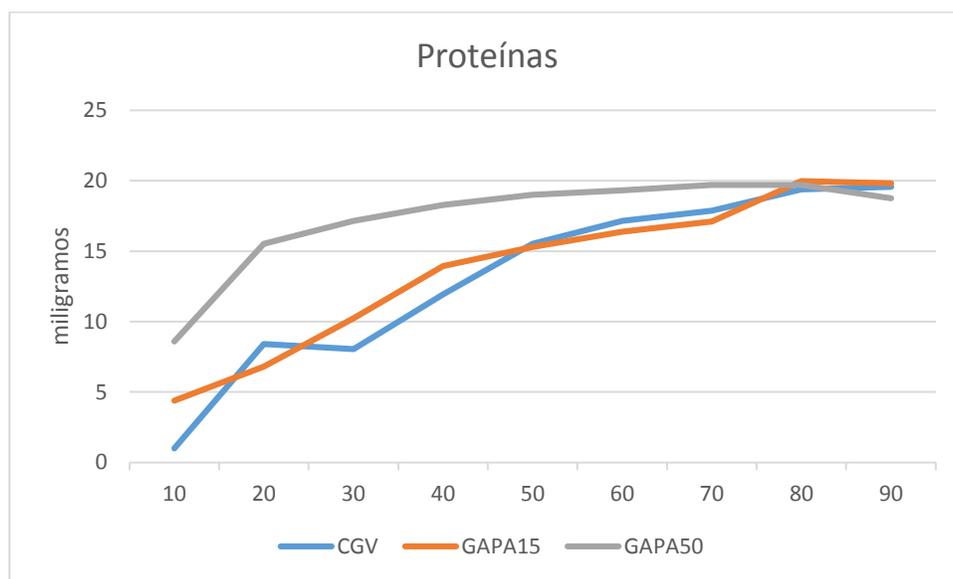
Transaminasas

Proteínas

La cuantificación de proteínas en el perfusado se realizó con la finalidad de conocer la cantidad de proteína liberada por los hepatocitos durante la perfusión y ajustar los datos con la liberación de las transaminasas.

La cantidad de proteína del grupo GAPA50 liberada en el perfusado fue más alta que en los grupos GAPA15 y GCV, a lo largo de 70 min del experimento, elevándose 5 veces sobre el control. Los grupos GAPA15 y GCV presentan

incremento similar en la liberación de proteína a lo largo de todo el experimento, exceptuando el punto inicial, donde el GCV inicia con una liberación de proteína menor que GAPA15. A partir de los 80 min los tres grupos casi igualan la liberación de proteína al perfusado (Gráfica 5).



Gráfica 5. Cuantificación de proteína liberada por el hígado al perfusado (miligramos). La cuantificación se realizó con una muestra del perfusado obtenido cada 10 minutos durante los 90 minutos del experimento. Se muestran los tres grupos experimentales.

TGP

TGP está presente en el citoplasma de los hepatocitos y en muy bajas concentraciones en otros órganos, su presencia en la sangre se relaciona específicamente con daño hepático debido a la ubicación específica de la enzima.

En el GCV se presentó el nivel más bajo de liberación de TGP en los primeros 10 minutos del experimento, pero la liberación aumentó progresivamente hasta alcanzar un valor de 4.5 U/dl en el minuto 90. El grupo con mayor cantidad administrada de ácido palmítico, GAPA50, liberó visiblemente más TGP al perfusado durante 80 minutos y cayó abruptamente en la última medición. El grupo GAPA15 presentó oscilaciones que no muestran un patrón constante en la liberación de TGP, ya que inicialmente la liberación de esta transaminasa fue alta

y mayor que en los otros dos grupos experimentales, por encima de 5 U/dl y disminuyó en el minuto 30, en donde se estabilizó y se elevó tan solo media unidad por arriba de los valores del GCV; sin embargo, al minuto 70, se observó una caída abrupta hasta 2 U/dl, menor al CGV y al GAPA50.

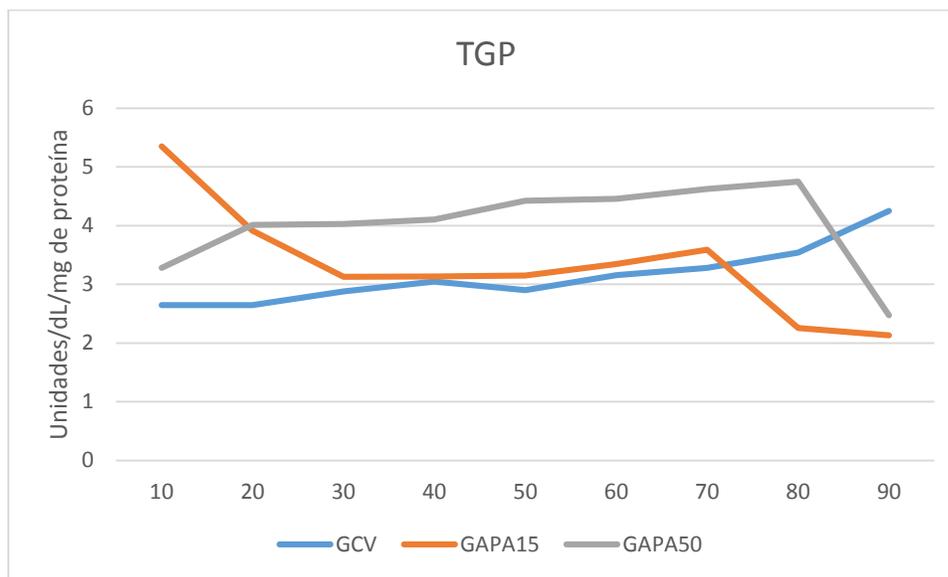


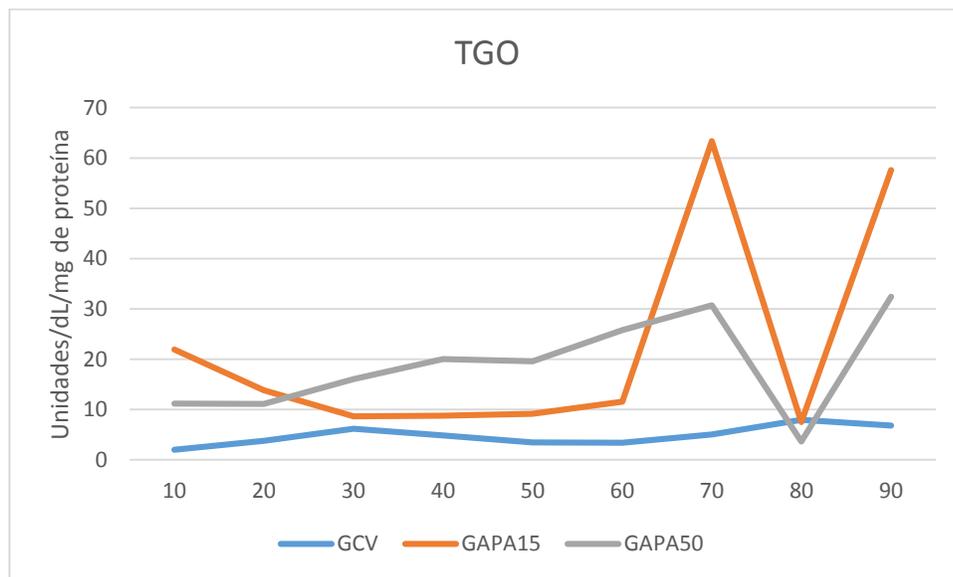
Figura 7. Liberación de Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP) por grupo experimental. Se muestran los valores de liberación de la enzima cuantificados a intervalos de 10 minutos a lo largo de los 90 minutos del experimento.

TGO

TGO se encuentra en el citoplasma y en mitocondrias de diferentes tejidos incluyendo hígado, corazón, músculo esquelético, riñones, cerebro, páncreas, pulmones, células blancas y rojas. Debido a su amplia distribución en los órganos, su liberación en plasma no se considera específica de daño hepático; sin embargo, su utilidad resulta de gran importancia predictiva en clínica cuando se obtiene el cociente resultante de TGO/TGP.

Con respecto a TGP, los niveles de TGO son mayores, lo que indica más liberación de esta enzima por el hígado en perfusión. TGO se considera como no específica de daño hepático; sin embargo, dado que nuestro modelo es el hígado aislado, no cabe duda que la liberación de esta enzima la realiza el hígado. El

grupo GCV tuvo un patrón de liberación basal durante los 90 minutos del experimento sin elevación ni decremento bruscos, e inició con liberación en los primeros 10 minutos de 1 U/dl y terminó con liberación cercana a las 6 U/dl. El GAPA50 inició con una liberación de 10 U/dl que se incrementó a lo largo del experimento, hasta el minuto 70 donde alcanzó 30 U/dl; en ese punto, el patrón de incremento que tenía TGO descendió bruscamente y comenzó a oscilar. El Grupo GAPA15, no mostró un patrón definido de liberación de TGO, ya que inició con 21 U/dl en los primeros 10 minutos de perfusión (10 y 20 veces mayor que en los grupos GAPA50 y GCV, respectivamente); a los 30 minutos, la TGO disminuyó su liberación mínimamente por encima del control, se estabilizó durante los siguientes 30 minutos y hasta el minuto 60 comenzó a oscilar. Pese a este patrón, la liberación de TGO durante todo el experimento fue mayor que el control.

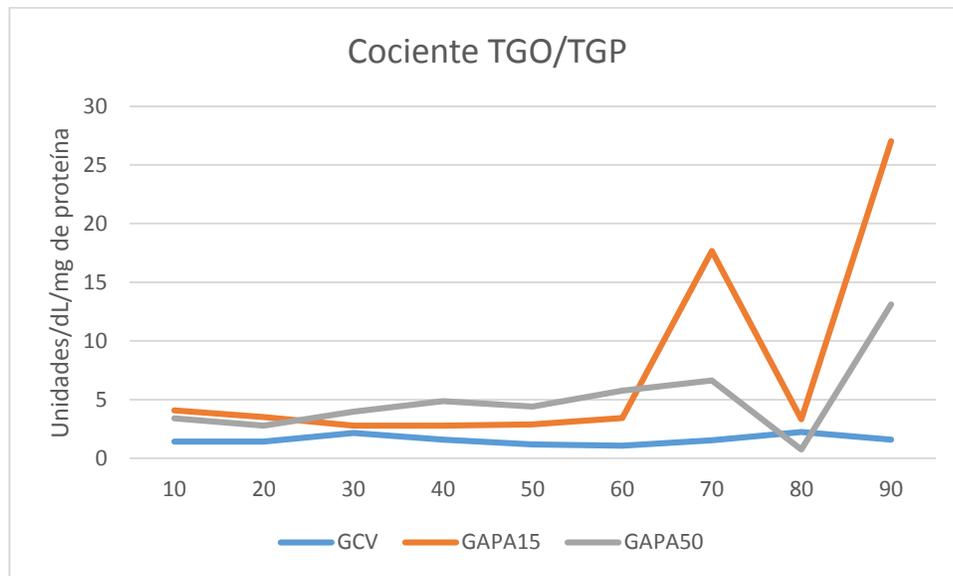


Gráfica 6. Liberación de enzima Transaminasa Glutámico Oxalacética (TGO) por grupo de estudio. Se muestran los valores de liberación de la enzima cuantificados a intervalos de 10 minutos, a lo largo de los 90 minutos del experimento. La liberación de TGO mantiene una tendencia basal a lo largo de los 90 minutos en el grupo GCV, contrastando con los grupos experimentales. El grupo GAPA50 se eleva constantemente hasta los 70 min donde comienza a oscilar.

Cociente TGO/TGP

El cociente TGO/TGP es útil en clínica para orientar sobre algunas patologías, por ejemplo $TGO/TGP \leq 1$ indica muy probablemente hepatitis vírica, mientras que $TGO/TGP > 4$ sugiere fallo hepático agudo (Álvarez-Martínez *et al.* 2005).

En la gráfica del cociente de transaminasas (Gráfica 8), el grupo control se mantuvo ligeramente por encima de los valores reportados como indicadores de daño hepático (Álvarez-Martínez *et al.* 2005) a lo largo de los 90 minutos de perfusión; esto quiere decir, por encima de 1.2 y 2.6, valores clínicos correlacionados con cuadros de hepatitis viral que no sobreviven. Reportes clínicos de los niveles de transaminasas indican que un valor del cociente mayor a 4 sugiere daño hepático agudo (García *et al.* 2010); nosotros observamos que el grupo experimental GAPA15 varía ligeramente alrededor de 4, aunque presentó oscilaciones abruptas a partir de los 70 minutos. Por su parte el grupo GAPA50 inicia con valores menores a 4 pero se eleva hasta más de 6 en el minuto 60, en donde, al igual que el grupo GAPA15 presenta oscilaciones; sin embargo, fue clara la tendencia hacia los 70 minutos de un incremento en la liberación de enzimas, que fue más agudo en el grupo GAPA50.



Gráfica 8. Cociente TGO/TGP por grupo experimental. Se muestra los cocientes obtenidos por la división entre los valores de TGO y TGP por cada 10 minutos a lo largo de los 90 minutos del experimento. Típicamente estos valores son un indicativo clínico de daño hepático según valores estandarizados.

Discusión

Este proyecto exhibe el impacto que tiene una sobrecarga de grasa administrada directamente al hígado en condiciones *ex vivo*, con la finalidad de mostrar el comportamiento de las mitocondrias a través de la expresión de las proteínas involucradas en la dinámica mitocondrial de fusión y fisión. Mediante los trabajos histológicos, se demuestra que el ácido palmítico es captado por los hepatocitos, lo que resulta en una acumulación de gotas de grasa en los hígados perfundidos con ácido palmítico, esto se ha observado en otros modelos de estudio de consumo de grasa *in vivo* o de cultivo celular *in vitro* (Lionetti *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2011). La acumulación de grasa es característica del cuadro clínico de la enfermedad de hígado graso no-alcohólico (NAFLD) y se presenta en individuos que no consumen cantidades significativas de alcohol y que no tienen enfermedades virales, congénitas o autoinmunes del hígado, igualmente estudios

indican que NAFLD está fuertemente asociada con síndrome metabólico, especialmente con obesidad (Nassir *et al.* 2014).

De la misma forma, los grupos a los cuales se les administró el ácido palmítico tuvieron mayor liberación de transaminasas, resultados que concuerdan con los datos clínicos pues las transaminasas son liberadas a la sangre en grandes cantidades cuando hay daño a la membrana del hepatocito, aumentando su permeabilidad (García *et al.* 2010). Se ha demostrado que cuadros de esteatosis hepática elevan la concentración de las transaminasas en sangre, lo que concuerda con la entrada de grasa que se observó en los mismos grupos experimentales en los cortes histológicos (Álvarez-Martínez *et al.* 2005), también se ha demostrado que los ácidos grasos son altamente tóxicos (Malhi *et al.* 2006), razón por la cual es comprensible que los hígados perfundidos con ácido palmítico generen una mayor concentración de transaminasa en el perfusado. Por otro lado, investigaciones afirman que los cambios en la liberación de las transaminasas están relacionados con la presión hemodinámica ejercida por la perfusión, lo que indica que no necesariamente su liberación es indicativa de daño al tejido hepático (Díaz-Juárez *et al.* 2011). Por nuestra parte, la velocidad de perfusión que utilizamos en los experimentos se encuentra en el rango de flujo normal hepático más ampliamente utilizada en la bibliografía, la cual está ajustada al nivel fisiológico (Bessems *et al.* 2013; Ferrigno *et al.* 2014).

Por otro lado, derivado de los experimentos con Western Blot, se observó expresión diferencial de las proteínas implicadas en la dinámica mitocondrial. En los grupos a los que se les administró ácido palmítico (GAPA50 y GAPA15), la expresión de las proteínas de la fusión mitocondrial (Mfn1 y Mfn2) se incrementó, con excepción de Opa1 que no tuvo diferencias significativas con el control; mientras que en la proteína de fisión Fis 1, tampoco tuvo diferencias significativas. Los resultados obtenidos de los grupos administrados con ácido palmítico sugieren, en conjunto, un cambio en la morfología mitocondrial hacia el estado de pro-fusión, relacionado con formación del retículo mitocondrial. Debe tomarse en cuenta que los cambios en la función mitocondrial están asociados con cambios

en la morfología mitocondrial, en respuesta a la demanda energética o cambios ambientales (Galloway *et al.* 2013), por lo que es necesario analizar la función mitocondrial para conocer si la expresión de las proteínas de fusión se relacionan con una función mitocondrial eficiente.

La observación más importante de nuestro trabajo fue que las concentraciones administradas de ácido palmítico aumentan significativamente la expresión de Mfn1 y Mfn2, así como la liberación de transaminasas en 90 minutos de perfusión, constituyendo la primera evidencia de que un ácido graso puede modificar la expresión de las proteínas implicadas en la formación de redes mitocondriales en el hígado en perfusión en cuestión de minutos. Por otro lado, el resultado obtenido no concuerda con los antecedentes reportados en investigaciones anteriores en donde se analiza la dinámica mitocondrial. Estudios con modelos de dieta alta en grasas *in vivo* (Lionetti *et al.* 2014) y estudios *in vitro* de sobrecarga de ácidos grasos (Zhang *et al.* 2011) muestran que los tratamientos altos en grasa disminuyen la expresión de las proteínas de la fusión (Mfn 1 y 2) e incrementan la expresión de las proteínas de fisión (Fis 1 y Drp 1). Estos resultados demuestran que cuando la expresión de la Mfn2 es significativamente inhibida, la red mitocondrial se fragmenta en pequeños óvalos o esferas, disminuyendo la tasa de oxidación de sustratos y la síntesis de ATP; estas alteraciones estructurales en la organización mitocondrial, son consideradas actualmente como un factor relacionado con el desarrollo de síndrome metabólico y obesidad (Chen *et al.* 2005; Lionetti *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2011).

Este estudio tiene como limitante que los resultados obtenidos *ex vivo* no pueden ser comparados con los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro*, pero de ahí la novedad de realizar el estudio de la dinámica mitocondrial utilizando el modelo de aislamiento y perfusión de hígado de rata.

Existen reportes que dan evidencia de que un funcionamiento defectuoso de Mfn2 puede contribuir al daño en la función mitocondrial (Chen *et al.* 2005; Bach *et al.* 2003); además, como se ha mencionado arriba, una disminución de la expresión de Mfn2 está ligada a experimentos con dietas altas en grasas y a experimentos *in*

vitro con sobrecarga de ácidos grasos. Por otro lado, otros reportes muestran que una sobreexpresión de Mfn2 se presenta en condiciones de buen funcionamiento mitocondrial y una eficiente tasa de oxidación de ácidos grasos (Chen *et al.* 2005; Jesen *et al.* 2011; Shaw *et al.* 2002). Basados en nuestras observaciones, proponemos que la exposición al ácido palmítico, en el hígado en perfusión, incrementa significativamente la expresión de Mfn1 y Mfn2 como consecuencia de una respuesta homeostática a la oxidación de la grasa administrada durante 90 minutos de perfusión. Aquí, el ayuno indujo en estos animales la ruta metabólica de oxidación de ácidos grasos que promovió que la grasa administrada *ex vivo* sea oxidada de manera más eficaz en los primeros minutos de su exposición al hígado, antes de causar daño hepático y disminuir la expresión de Mfn1 y Mfn2, como ocurre en otros modelos experimentales de duración prolongada. En apoyo a esta hipótesis realizamos experimentos similares en los que no se ayunó a las ratas y en donde la expresión de la Mfn1 es significativamente inferior al control (datos no mostrados), por lo que proponemos que el ayuno es condición imprescindible en los primeros momentos de la exposición a la grasa para que los mecanismos homeostáticos, relacionados con la expresión de las Mfn1 y Mfn2, promuevan una mayor fusión mitocondrial y una mejor oxidación de sustratos.

No es sorprendente que el hígado cuente con mecanismos homeostáticos que permitan responder inmediatamente a los cambios ambientales; prueba de ello es la capacidad que tiene el hígado de metabolizar sustancias tóxicas que entran al organismo después de la ingesta de alimento, constituyéndose como una de las primeras barreras en contra de sustancias peligrosas.

Esta adaptación funcional en las mitocondrias podría proteger contra los daños iniciales producidos por el ácido palmítico, en los primeros momentos de la perfusión, funcionando como un mecanismo de oxidación de grasa que evita la acumulación en los primeros minutos de la exposición al hígado en perfusión. Esto requeriría una adaptación morfológica de las mitocondrias y una mayor expresión de mitofusinas para formar retículos capaces de oxidar de forma más eficiente las grasas, y de esta manera podría explicarse la elevación de las mitofusinas en 90

minutos de perfusión en este modelo *ex vivo*, a diferencia de los modelos *in vivo* e *in vitro* que son modelos que requieren más tiempo de experimentación.

La mayoría de los modelos de investigación en animales se realizan una vez que la enfermedad está totalmente establecida, con lo cual se describen las alteraciones asociadas con la enfermedad en dicha etapa. Sin embargo, también es relevante estudiar la respuesta inicial y los cambios fisiológicos que pueden ocurrir en las primeras etapas del desarrollo de una enfermedad.

Poussin *et al.* (2011) realizaron un estudio comparativo con ratones A/J y C57B1/6G los cuales son resistentes y sensibles al desarrollo de esteatosis y obesidad, respectivamente. Este grupo de investigación administró una dieta alta en grasas y analizó en diferentes tiempos el desarrollo de patologías asociadas a su consumo. Sus resultados muestran que los ratones A/J presentan sobre regulación transitoria y coordinada de 13 genes relacionados con la fosforilación oxidativa, fenómeno que no se presentaba en los ratones C57B1/6J. Análisis bioquímicos confirmaron que en los ratones A/J alimentados con la dieta alta en grasas se incrementó la respiración mitocondrial, mostrando igualmente que esta no estaba acoplada a la producción de ATP. En contraste, en los hígados de los ratones C57B1/6J no hubo cambios en la velocidad de la respiración ni desacoplamiento, lo que probablemente es crucial para el desarrollo de esteatosis. Colectivamente, sus resultados sugieren que la resistencia que presentan los ratones A/J al desarrollo de esteatosis está asociada con una respuesta adaptativa, que se manifiesta como una adaptación transitoria de la fosforilación oxidativa, lo que demuestra la flexibilidad en la expresión de los genes relacionados con la fosforilación en respuesta de un incremento agudo del consumo de energía. Este aumento en la fosforilación oxidativa proporciona un medio para aumentar el gasto de energía e incrementa la disipación a través del desacoplamiento mitocondrial. Esta respuesta puede proteger contra los efectos deletéreos iniciales de la ingesta de dietas altas en grasas a través del incremento en la disipación de energía y la disminución de la producción de ROS. Esto es

parte de una respuesta protectora global de los hígados de los ratones A/J a la dieta alta en grasas (Poussin *et al.* 2011).

En otra investigación, Hall *et al.* (2010) demostraron las adaptaciones que presentan los ratones A/J y C57B1/6J a una dieta alta en grasas, identificando un incremento rápido y coordinado en la expresión de 10 genes peroxisomales, una elongasa microsomal (Elovl5) y dos desaturasas microsomales (Fads 1 y Fads 2), lo que está asociado con incremento en la β -oxidación. Como consecuencia, en los hígados de los ratones A/J hay una rápida adaptación de muchas rutas metabólicas a la ingesta de dieta alta en grasas: incremento en la β -oxidación peroxisomal, incremento en la fosforilación oxidativa y desacoplamiento mitocondrial, lo cual de forma global muestra la resistencia a la esteatosis inducida por dieta alta en grasa en hígado de ratones A/J. Esto indica una posible protección contra el desarrollo de obesidad por medio de una rápida adaptación de múltiples rutas metabólicas que protegen al hígado contra una sobre carga tóxica de lípidos (Hall *et al.* 2010).

Estos estudios sugieren la habilidad que tienen las células para adaptarse rápidamente a los cambios en la disponibilidad de nutrientes, poniendo de manifiesto que es un aspecto importante en la respuesta protectora al estrés metabólico. La flexibilidad metabólica (Poussin *et al.* 2011) es la capacidad de los órganos para adaptar rápidamente sus rutas metabólicas y prevenir la generación de metabolitos dañinos que, a través del tiempo, pueden acumularse provocando condiciones patológicas y es un aspecto importante para comprender el desarrollo a largo plazo de enfermedades metabólicas, ya que pueden estar asociadas con la falta de adaptación a un cambio crónico en la disponibilidad nutrientes.

Sugerimos que los resultados de nuestra investigación apuntan a una adaptación fisiológica de las mitocondrias hacia la morfología de pro-fusión que se da en los primeros momentos de la administración aguda de ácido palmítico. Sin embargo, muchas preguntas derivan de esta investigación que están encaminadas a complementar y a avanzar en la hipótesis postulada.

Conclusión

El modelo de aislamiento y perfusión de hígado de rata (IPRL) es una herramienta que ha sido utilizada para explorar la fisiología del hígado. En esta investigación utilizamos el IPRL como modelo experimental, con la finalidad de conocer el patrón de las proteínas implicadas en la dinámica mitocondrial al administrar ácido palmítico por 90 minutos. Los resultados obtenidos demuestran que se genera un cuadro de esteatosis en los hepatocitos, la liberación selectiva de las transaminasas y, lo más importante, que el ácido palmítico aumenta significativamente la expresión de Mfn1 y Mfn2, constituyendo la primera evidencia de que un ácido graso puede modificar la expresión de las proteínas implicadas en la fusión mitocondrial en 90 minutos de perfusión. Esto sugiere que el ácido palmítico en el hígado en perfusión incrementa las proteínas implicadas en la fusión mitocondrial, como consecuencia de una respuesta homeostática a la oxidación de la grasa, en donde el ayuno previo programa rutas metabólicas que promueven que la grasa administrada *ex vivo* sea oxidada de manera más eficaz en los primeros minutos de su exposición al hígado.

Perspectivas

Este estudio tiene más preguntas formuladas que respuestas contestadas. Es una nueva aproximación al estudio de la dinámica mitocondrial que debe ser analizado desde varias perspectivas. Una de las más importantes es conocer si la administración de ácidos grasos insaturados tiene un efecto contrario sobre la expresión de las proteínas implicadas en la fusión y fisión mitocondrial, como se ha demostrado en modelos *in vitro*.

Bibliografía

Albero, R., Sanz, A., Playán, J. 2004. Metabolismo en el ayuno. *Endocrinología y nutrición*. 51(4):139-148.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2008. *Molecular Biology of the Cell*. New York, Garland Science, Taylor & Francis Group.

Álvarez-Martínez, H., Pérez-Campos, E. 2005. El paciente con hipertransaminasemia. *Revista de la Facultad de Medicina, UNAM*, 48(002): 58-65.

Bach, D., et al. 2003. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *The Journal of Biological Chemistry*. 278: 17190-17197.

Baloh, H. R, Schmidt, E.R., Pestronk, A., Milibrandt, J. 2007. Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from Mitofusin 2 mutations. *The Journal of Neuroscience*. 27(2):422-430.

Bessems, M., Hart, N.A., Tolba, R., Doorschodt, B.M., Leuvenink, H.G., Ploeg, R.J., Minor, T., Van Gulik, T.M. 2006. The isolated perfused rat liver: standardization of a time-honoured model. *Laboratory Animals*. 40(3): 236-46.

Bishop M., Duben-von Laufen J., Fody E. 1985. *Clinical chemistry: principles, procedures, correlations*. Philadelphia: J.B Lippincott Co.

Böhm, F., Kölher, U.A., Speicher, T., Werner, S. 2010. Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines. *EMBO Molecular Medicine*. 2(8): 294-305.

Chen, H., Chomyn, A., Chan, D.C., 2005. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *The Journal of Biological Chemistry*. 280:26185-26192.

Díaz-Juárez, J., Hernández-Muños, R. 2011. The role of Calcium and Nitric Oxide During liver enzyme release Induced by increased physical forces as evidence in partial hepatectomized Rats. *Liver Transplantation* 17: 334-343.

Ferrigno, A., Richelmi, P., Vairetti, M. 2012. Troubleshooting and improving the mouse and rat isolated perfused liver preparation. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 67:107–114.

Galloway, C.A., Lee, H., Yoon, Y. 2012. Mitochondrial morphology-emerging role in bioenergetics. *Free Radical Biology and Medicine*. 53: 2218-2228.

Galloway, C.A., Yoon, Y. 2013. Mitochondrial morphology in metabolic disease. *Antioxidants & Redox Signaling*. 19(4): 415-430.

García, M.M., Zurita, M.A. 2010. Transaminasas: valoración y significación clínica. *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología. Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHNPAPE. ERGON*. 267-275.

Glatz, C.F., Luiken, P.F.J.J., Bonen, A. 2010. Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiological Review*, 90(1):367-417.

Gores, J.G., Kost, J.L., LaRusso, F.N., 1986. The Isolated Perfused Rat Liver: Conceptual and Practical Considerations. *Hepatology*. 6: 511-517.

Hales, K. G. 2010. Mitochondrial fusion and division. *Nature Education* 3(9):12.

Hall, D., Poussin, C., Valagapudi, V.R. 2010. Peroxisomal and microsomal lipid pathways associated with resistance to hepatic steatosis and reduced proinflammatory state. *The Journal of Biological Chemistry*. 285: 31011-31023.

Hashimoto, T., Fujita, T., Usuda, N., Cook, W., Chao, Q., Peters, M.J., González, J.F., Yeldandi, V.A., Sambasiva, M., Reddy, K.J. 1999. Peroxisomal and mitochondrial fatty acid β -oxidation in mice nullizygous for both peroxisome proliferator-activated receptor α and peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(27): 19228-19236.

Hinshaw, J. E. 2000. Dynamin and its role in membrane fission. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 16: 483-519.

Jensen, R.E., Hobbs, A. E., Cervený, K.L., Sesaki, H. 2000. Yeast mitochondrial dynamics: fusion, division, segregation, and shape. *Microscopy Research and Technique*. 51(6): 573-583.

Karbowski, M., Youle, R.J. 2003. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 10: 870-880.

Kardong, V. K. 2007. *Vertebrados: anatomía comparada, función y evolución*. McGraw-Hill interamericana, pp. 782.

Kmieć Z. 2001. Cooperation of liver cells in health and disease. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*. 161: 151.

Liesa, M., Palacín, M., Zorzano, A. 2009. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiological Review*. 89(3): 799-845.

- Lionetti, L., Mollica, P.M., Donizzetti, I., Gifuni, G. Sica, R., Pignalosa, A., Cavaliere, G. Gaita, M. De Filippo, C., Zorzano, A. 2014. High-Lard and High-Fish-Oil diet differ in their effects on function and dynamic behaviour of rat hepatic mitochondria. PLoS ONE. 9(3): e 92753. Doi:10.1371/journal.pone.0092753.
- Malhi, H., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Gores, G.J. 2006. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. The Journal of Biological Chemistry, Vol 281, No. 17, pp. 12093-12101.
- Mendieta, C.E. 2010. Efecto de la adenosina sobre la progresión del ciclo celular durante la regeneración hepática inducida por hepatectomía parcial. Tesis de doctorado. México, UNAM-Facultad de Ciencias, 67.
- Michalopoulos, G.K. 2007. Liver regeneration. Journal of Cellular Physiology, Vol 213 (7): 286-300.
- Mitchell, R.N., Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Aster, J.C. 2004. Compendio de Robbins y Cotran: patología estructural y funcional. Madrid. 770.
- Nassir, F., Ibdha, A.J. 2014. Role of mitochondria in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. International Journal of Molecular Science. 15: 8713-8742.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. 2008. Lehninger. Principles of biochemistry. New York, Freeman and Company, 1100.
- O'Connor, C.M., Adams, J.U. 2010 Essentials of Cell Biology. Cambridge, MA: NPG Education.
- Poussin, C., Ibberson, M., Hall, D., Ding, J., Jamie, S., Abel, D.A., Thorens, B. 2011. Oxidative phosphorylation flexibility in the liver of mice resistant to high-fat diet induced hepatic steatosis. Diabetes. 60: 2216-2224.
- Reddy, K.J., Hashimoto, T. 2001. Peroxisomal β -oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor α : an adaptative metabolic system. Annual Review of Nutrition. 21:193–230.
- Rustan, C.A. Drevon, A.C. 2005 Fatty acids: structure and properties. Encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net
- Shaw, M.J., Nunnari, J. 2002. Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. Trends en Cell Biology. 12(4):178-184.
- Westermann, B. 2002. Merging mitochondria matters. Cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion. EMBO Reports. 3(6):525-531.

Zhang, Y., Jiang, L., Hu, W., Zheng, Q., Xiang, W. 2011. Mitochondrial dysfunction during *in vitro* hepatocyte steatosis is reversed by omega-3 fatty acid-induced up-regulation of mitofusin 2. *Metabolism Clinical and Experimental*. 60:767-775.

Zorzano, A., Bach, D., Pich, S., Palacín, M. 2004. Papel de nuevas proteínas mitocondriales en el balance energético. *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra*. 48(2): 30-35.