



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y APOPTOSIS EN
HÍGADO GRASO DE UN MODELO DE SÍNDROME
METABÓLICO: PAPEL DE LA CARDIOLIPINA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MIGUEL ANGEL BARRIOS MAYA

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. MOHAMMED EL HAFIDI BENTLAKDER
FACULTAD DE MEDICINA**

COMITÉ TUTOR:

**DR. SALVADOR URIBE CARVAJAL
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR
DR. MARCO ANTONIO JUAREZ OROPEZA
FACULTAD DE MEDICINA**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 26 DE ENERO, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y APOPTOSIS EN
HÍGADO GRASO DE UN MODELO DE SÍNDROME
METABÓLICO: PAPEL DE LA CARDIOLIPINA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MIGUEL ANGEL BARRIOS MAYA

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. MOHAMMED EL HAFIDI BENTLAKDER
FACULTAD DE MEDICINA**

COMITÉ TUTOR:

**DR. SALVADOR URIBE CARVAJAL
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR
DR. MARCO ANTONIO JUAREZ OROPEZA
FACULTAD DE MEDICINA**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 26 DE ENERO, 2024

Lic. Diana González Nieto

Directora de Certificación y Control Documental
Dirección General de Administración Escolar, UNAM

Presente.

Nos permitimos informar que con base al Artículo 31 del RGEP el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS** en su reunión 537 del 2 de agosto del 2023, designó el siguiente jurado para examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** de **MIGUEL ANGEL BARRIOS MAYA** con número de cuenta **304043808** con la tesis titulada "**Función mitocondrial y apoptosis en hígado graso de un modelo de síndrome metabólico: papel de la cardioplipina.**", dirigida por el Dr. Mohammed El Hafidi Bentlakder.

Presidente: Dra. Rosa Estela Navarro González.
Secretario: Dr. Mohammed El Hafidi Bentlakder.
Vocal: Dra. Karla Guadalupe Carvajal Aguilera.
Vocal: Dra. María Soledad Funes Arguello.
Vocal: Dra. Yazmin Macotela Guzmán.

Asimismo, informo a los honorables miembros del jurado que, de acuerdo con los lineamientos generales para el funcionamiento del posgrado, tendrán un máximo de 30 días hábiles, contados a partir del momento en que reciban el manuscrito de la tesis para revisar y emitir por escrito su voto probatorio fundamentado.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e
"Por mi raza hablará el espíritu"
Ciudad Universitaria, Cd. de Mx., a 4 de agosto del 2023.
Representante de la Dirección de Facultad Medicina



Dr. Abraham Landa Piedra
Profesor Titular C de T. C.
Representante del Programa Posgrado en Ciencias Biomédicas
Sede Facultad de Medicina

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por proporcionar la BECA-TESIS al sustentante con número de becario 583627.

A mi comité tutorial integrado por el Dr. Salvador Uribe Carvajal, el Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza y el Dr. Mohammed El Hafidi Bendlakder, muchas gracias por sus consejos, tiempo y apoyo durante el doctorado.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

A los honorables miembros del jurado de examen, integrado por la Dra. Rosa Estela Navarro González, la Dra. Yazmín Macotela Guzmán, la Dra. María Soledad Funes Arguello, la Dra. Karla Guadalupe Carvajal Aguilera y el Dr. Mohammed El Hafidi Bentlyakder, a quienes les agradezco su disposición, sugerencias y observaciones que contribuyeron enormemente al enriquecimiento de mi trabajo.

Al Dr. Héctor Quezada Pablo y a la M. en C. Ana Laura Guzmán Ortiz del Laboratorio de Investigación en Inmunología y Proteómica del Hospital Infantil de México Federico Gómez por su apoyo y dirección en el uso del cromatógrafo de masas.

Al Dr. Vicente Castrejón Téllez y al Dr. Francisco Correa Segura por sus consejos y apoyo.

Al mi tutor, el Dr. Mohammed El Hafidi Bentlyakder a quien agradezco infinitamente por su apoyo, consejos, tiempo, paciencia, pero sobre todo por compartirme sus conocimientos y por la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biomedicina Cardiovascular del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez

DEDICATORIAS

A mi madre, Mayita, quiero agradecerte por estar a mi lado incondicionalmente cuidándome, apoyándome y guiándome siempre siendo un excelente ejemplo a seguir. La conclusión de este trabajo es posible gracias a todo tu esfuerzo, dedicación y sobre todo por siempre creer en mí, no hay palabras para agradecerte por todo lo que me has dado, este logro también es tuyo te amo.

A mis hermanos mayores, muchas gracias por siempre apoyarme, guiarme en las buenas y en las malas, pero sobre todo por su apoyo y cariño incondicional a lo largo de mi vida.

A la Dra. Angélica Ruiz Ramírez quien fungió como otra tutora enseñándome las técnicas de laboratorio, guiándome en todo momento y a quien agradezco infinitamente por todo el apoyo y conocimientos que me brindó a lo largo de mi posgrado, pero sobre todo por brindarme su amistad y hacerme sentir parte de la familia.

A la Dra. Ocarol López Acosta con quien compartí mi estancia como estudiantes de posgrado, muchas gracias por todo tu apoyo y amistad jefaza.

A la familia que uno escoge, mis amigos, quienes me han acompañado en las buenas y en las malas a lo largo de mi vida: Ricardo Bustos, Adriana Hernández, Ivonne Castañeda, Isabel Barragan, Iván Sánchez, Alfredo Zepeda, Fabián Segura, Ángel Martínez, Moisés García, Juan Torres, Rubi Massé, Judith Bolio, Eduardo Reynoso, Arlett García, Francisco Gutiérrez y a todos los demás.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	4
ABSTRACT.	6
INTRODUCCIÓN.....	8
Definiciones del síndrome metabólico.....	8
La obesidad una de las características del SM.....	10
El HGNA una enfermedad metabólica.	11
El SM y su asociación con el HGNA.	13
RI y su asociación con el HGNA.	14
Alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y lípidos asociados con el HGNA.	15
Metabolismo de los carbohidratos en condiciones hipercalóricas.	16
Metabolismo de los lípidos.	17
Lipogénesis de novo.	18
Síntesis de Triglicéridos.	18
Síntesis de Cardioplipina.	19
Estructura y función de la mitocondria.	21
El complejo I (NADH deshidrogenasa).....	22
El complejo II (succinato deshidrogenasa)	22
La ubiquinona (UQ)	22
El complejo III (citocromo c reductasa o complejo bc1)	23
El cit-c	24
El complejo IV (citocromo c oxidasa)	24
El complejo V (F ₁ F ₀ ATP Sintasa o ATPasa)	24
Principales sitios de generación de ERO en la mitocondria.	25
Estrés oxidante en el HGNA.....	27

Apoptosis	28
Vía intrínseca o vía mitocondrial	28
Vía extrínseca o de receptores	30
JUSTIFICACIÓN	32
HIPÓTESIS	33
OBJETIVOS	33
Objetivo general	33
Objetivos Particulares	33
METODOLOGÍA	34
Desarrollo del modelo experimental	34
Obtención de muestras biológicas	34
Preparación de las mitocondrias	34
Determinación de proteína	35
La grasa intraabdominal	35
Extracción y análisis de ácidos grasos no esterificados	35
Extracción:	35
Derivatización:	36
Cromatografía de gases:	36
Consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas	36
Liberación de cit-c de mitocondrias aisladas de hígado	36
Cuantificación de la generación de H₂O₂ en mitocondrias aisladas	37
Capacidad de retención de calcio mitocondrial	37

Análisis de proteínas por inmunorrélicas tipo <i>Western Blot</i>.	38
Análisis de la CL por espectrometría de masas.	38
Degradación de ADN genómico como marcador de la apoptosis.	39
Análisis estadístico.	40
RESULTADOS	41
Características generales de los animales.	41
Alteraciones de AGNE hepáticos en mitocondrias aisladas de rata con SM.	42
El Pal-CoA afecta el estado III de la respiración mitocondrial.....	43
El SM reduce la liberación de cit-c en mitocondria aislada de hígado de rata.	44
Aumento en la liberación de cit-c en mitocondria aislada en presencia de Pal-CoA.....	45
El Pal-CoA induce un incremento en la generación de H₂O₂ en mitocondria aislada.	47
El Pal-CoA induce la formación del PTPm.....	49
El Pal-CoA disminuye la CRC en mitocondria aislada.....	50
Expresión de proteínas implicadas en la formación del PTPm.	53
La incubación de las mitocondrias en presencia de Pal-CoA y C16:0 disminuye parcialmente el contenido total de CL. ..	54
Los marcadores apoptóticos disminuyen en el hígado de ratas con SM.....	57
Fragmentación del ADN.	57
Análisis de Apaf-1 por inmunorréplica tipo Western Blot.....	58
Análisis de Caspasa 3 activa por inmunorréplica tipo Western Blot.	58
Análisis de P53 por inmunorréplica tipo Western Blot.	58
Análisis de AIF por inmunorréplica tipo Western Blot.	59
Análisis de cit-c por inmunorréplica tipo Western Blot.	59
Actividad de Caspasa 9.	60
DISCUSIÓN.	62
Efecto del C16:0 y Pal-CoA sobre la función mitocondrial.	63

Pal-CoA y la transición de la permeabilidad de la membrana mitocondrial.	64
Pal-CoA y CL.....	66
CL y muerte celular programada (apoptosis).	67
CONCLUSIONES.....	70
PERSPECTIVAS.....	70
REFERENCIAS:	71
ARTÍCULO DE TITULACIÓN.	84

Abreviaturas.

- **AAD:** Asociación Americana de Diabetes
- **ABS:** albúmina de suero bovino
- **ACC:** acetil-CoA carboxilasa
- **Acil-CoA:** acil coenzima A
- **ACLY:** ATP-citrato liasa
- **AGNE:** ácidos grasos no esterificados
- **AGPAT:** acil-CoA:1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa
- **AIF:** factor inductor de la apoptosis
- **ALCAT1:** lisocardiopina aciltransferasa 1
- **ALP:** ácido lisofosfático (ALP)
- **AMPK:** proteína cinasa activada por monofosfato de adenosina
- **ANT:** translocador de nucleótidos de adenina
- **AP:** ácido fosfático (AP)
- **APAF-1:** factor activador de la peptidasa apoptótica 1
- **ASB:** albúmina de suero bovino
- **ATP:** adenosín trifosfato
- **Bcl-2:** proteína reguladora del linfoma de células B-2
- **BHT:** butil-hidroxil-tolueno
- **C14:0₄CL:** tetra-meristoil cardiopina
- **C16:0:** ácido palmítico
- **C16:1:** ácido palmitoleico
- **C17:0:** ácido heptadecanoico
- **C18:1:** ácido oleico
- **C18:2:** ácido linoleico
- **C20:4:** ácido araquidónico
- **CAD:** DNAasa activada por caspasa
- **CARD:** dominio de reclutamiento de caspasas
- **CDP-DAG:** citidina difosfodiácilglicerol
- **ChREBP:** proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos
- **cit-b:** citocromo *b*
- **cit-c:** citocromo *c*
- **cit-c1:** citocromo *c1*
- **CL:** cardiopina
- **CLS:** cardiopina sintasa
- **CoA:** coenzima A
- **CPT1:** carnitina palmitoiltransferasa-1
- **CPT2:** carnitina palmitoiltransferasa-2
- **CR:** control respiratorio
- **CRC:** capacidad de retención de calcio
- **CsA:** ciclosporina A
- **CTE:** cadena de transporte de electrones
- **CypD:** ciclofilina D
- **DAG:** diácilglicerol
- **DD:** dominio de muerte
- **DE:** desviación estándar
- **DGAT:** diácilglicerol aciltransferasa
- **DIABLO:** proteína de unión directa a IAP con bajo pI
- **DISC:** complejo de señalización de muerte
- **EE:** error estándar
- **EHGNA:** enfermedad del hígado graso no alcohólico
- **EHNA:** esteatohepatitis no alcohólica

- **EIM:** espacio intermembranal
- **ERO:** especies reactivas del oxígeno
- **ESI:** ionización por electropulverización
- **FADD:** proteína FAS asociada a un DD
- **FADH₂:** dinucleótido adenina de flavina
- **FAS:** sintasa de ácidos grasos
- **Fe²⁺:** hierro reducido
- **Fe³⁺:** hierro oxidado
- **FID:** Federación Internacional de Diabetes
- **FMN:** mononucleótido de flavina
- **GLUT2:** transportador de glucosa 2
- **GPAT:** sn-1-glicerol-3-fosfato aciltransferasa
- **H₂O₂:** peróxido de hidrógeno
- **HDL:** lipoproteína de alta densidad
- **HGNA:** hígado graso no alcohólico
- **HPLC:** cromatografía líquida de alta resolución
- **HSL:** lipasa sensible a hormona
- **ICAD:** Inhibidor de la Desoxiribonucleasa Activada por Caspasas
- **IGF-1:** factor de crecimiento similar a la insulina 1
- **IMC:** índice de masa corporal
- **INEGI:** Instituto Nacional de Estadística y Geografía
- **IR:** receptor de insulina
- **IRR:** receptor relacionado con el receptor de insulina
- **IRS-1:** sustrato del receptor de insulina
- **JNK:** la cinasa N-terminal c-Jun
- **LCAD:** Acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga
- **LPA:** ácido lisofosfatídico
- **MAPK / ERK 1/2:** cinasas activadas por mitógeno
- **MEM:** membrana externa mitocondrial
- **MIM:** membrana interna mitocondrial
- **MLCL:** monolisocardiopina
- **MLCLAT1:** monolisocardiopina aciltransferasa 1
- **MS:** espectrómetro de masas
- **mTOR:** diana de rapamicina en células de mamífero
- **NaCl:** cloruro de sodio
- **NADH:** nicotinamida adenina dinucleótido
- **NCEP:** ATP III: Programa Nacional de Educación sobre Colesterol en el Panel III para el Tratamiento del Adulto (por sus siglas en inglés)
- **NHANES:** Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición
- **O₂:** oxígeno
- **O₂^{•-}:** superóxido
- **OMS:** organización mundial de la salud
- **Pal-CoA:** palmitoil-CoA
- **PC:** fosfatidilcolina
- **PE:** fosfatidiletanolamina
- **PG:** fosfatidilglicerol
- **PGP:** fosfatidilglicerol fosfato
- **PGS1:** fosfatidilglicerolfosfato sintasa
- **PI:** fosfatidilinositol
- **PI3K/Akt:** cinasa de fosfatidilinositol 3
- **PKC:** proteína cinasa C
- **PLA2:** fosfolipasa A2
- **PPAR-α** receptores activados por proliferadores peroxisomales alfa
- **PS:** fosfatidilserina

- **PTPm**: poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial
- **PVDF**: difluoruro de polivinilideno
- **QH₂**: ubiquinol
- **Qo**: sitio de oxidación de quinol
- **RI**: resistencia a la insulina
- **RIPK1**: proteína del receptor de cinasa que interacciona 1 (mejor conocido como RIP1)
- **SGLT-1**: cotransportador de sodio y glucosa 1
- **SM**: síndrome metabólico
- **Smac**: segundo activador mitocondrial de caspasas
- **SREBP-1C**: proteína de unión al elemento regulador del esterol 1-C
- **Tam41**: CDP-DAG sintasa mitocondrial
- **TAZ**: Tafazina
- **TFA**: ácido trifluoroacético
- **TGs**: triglicéridos
- **TLR**: los receptores tipo Toll
- **TNFR**: receptor del factor de necrosis tumoral
- **TRAIL**: FAS, el receptor del ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral
- **UQ**: ubiquinona
- **UQ⁻**: ubisemiquinona
- **VDAC**: canal aniónico dependientes de voltaje
- **Δψ**: potencial transmembranal

Resumen.

Se denomina síndrome metabólico (SM) al conjunto de alteraciones metabólicas que incluyen a la hipertrigliceridemia, la obesidad central, la resistencia a la insulina (RI), la intolerancia a la glucosa y la hipertensión, que constituyen factores de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. Así mismo, la obesidad y la RI son factores de riesgo para el desarrollo de hígado graso no alcohólico (HGNA). El HGNA se caracteriza por la acumulación ectópica de grasa en su etapa inicial y su progresión está íntimamente relacionada con el estrés oxidante, la inflamación, la disfunción mitocondrial y la muerte celular por apoptosis.

En un modelo de SM basado en ratas Wistar macho recién destetadas a las cuales se les administró una solución de sacarosa al 30% como agua de bebida durante 24 semanas, se observó un aumento en la concentración de ácidos grasos no esterificados (AGNE) en homogenado total y en mitocondrias aisladas de hígado de los animales con SM, principalmente el ácido palmítico (C16:0) que es el principal producto de la lipogénesis *de novo*. Sin embargo, poco se sabe sobre la participación de su producto de activación: el palmitoil-CoA (Pal-CoA) en la disfunción mitocondrial que contribuye a la progresión de HGNA en ratas con SM.

En el presente trabajo se observó que la incubación de mitocondrias aisladas de animales con SM y controles, en presencia de Pal-CoA disminuyó considerablemente el consumo de oxígeno, además exacerbó la generación de H₂O₂ de manera dosis dependiente en ambos grupos experimentales, siendo significativamente mayor en el SM. Así mismo, el Pal-CoA aumentó la liberación de citocromo c (cit-c), y redujo la capacidad de retención de calcio (CRC) contribuyendo a la apertura del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTP_m) en mitocondrias con SM.

En mitocondrias aisladas de animales con SM se observó un aumento en la generación de H₂O₂ lo que podría contribuir a la muerte celular por apoptosis. No obstante, no se encontró evidencia de marcadores apoptóticos (fragmentación del ADN, Apaf-1 y p53), además se observó una disminución en la actividad de caspasa 9 y una reducción en el contenido total de caspasa 3 activa. Estas alteraciones pueden ser debidas a una disminución en la liberación de cit-c en mitocondrias con SM, un proceso clave en la formación del apoptosoma y la activación de la apoptosis.

Los resultados sugieren que existe una resistencia a la apoptosis en el hígado de los animales con SM, a pesar de que etiológicamente la acumulación de AGNE y sus productos de activación como el Pal-CoA, así como el estrés oxidativo lo favorecen.

Para esclarecer el mecanismo por el cual la liberación de cit-c está disminuida en SM, se analizó la composición lipídica de la cardiolipina (CL), lípido exclusivo de la mitocondria que mantiene unido al cit-c con la membrana interna mitocondrial (MIM). Se encontró que en mitocondrias con SM la CL esta enriquecida con C16:0, lo que le confiere una mayor resistencia a la lipoperoxidación, lo anterior se demostró incubando a la mitocondria con dosis altas de Pal-CoA y analizando posteriormente la CL y no se encontró evidencia de lipoperoxidación de la CL.

En conjunto, nuestros datos sugieren que el modelo de SM a nivel hepático se encuentra en la fase inicial de la enfermedad, una esteatosis simple, sin actividad apoptótica evidente. Por otro lado, el Pal-CoA es un actor principal en la progresión de HGNA hacia una enfermedad más grave a través de mecanismos que involucran el aumento en la liberación de cit-c y la inducción del PTPm, procesos clave en el desencadenamiento del proceso apoptótico.

Abstract.

Metabolic syndrome (MS) is a cluster of metabolic alterations consisting of hypertriglyceridemia, central obesity, insulin resistance (IR), impaired glucose tolerance, and hypertension, and is a risk factor for developing type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. Obesity and IR are risk factors for the development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). NAFLD is characterized by ectopic accumulation of fat in its early stage and its progression is closely related to oxidative stress, inflammation, mitochondrial dysfunction, and cell death by apoptosis.

In a model of MS based on newly weaned male Wistar rats given a 30% sucrose solution as drinking water for 24 weeks, an increase in the concentration of non-esterified fatty acids (NEFAs) was observed in total homogenate and in liver mitochondria of animals with MS, mainly palmitic acid (C16:0) which is the main product of *de novo* lipogenesis. However, little is known about the involvement of its activation product: palmitoyl-CoA (Pal-CoA) in mitochondrial dysfunction that contributes to the progression of NAFLD in rats with MS.

In the present work, it was observed that the incubation of isolated mitochondria from MS or control animals, in the presence of Pal-CoA, considerably decreased oxygen consumption, in addition to exacerbating the generation of H₂O₂ in a dose-dependent manner in both experimental groups, being significantly higher in MS. Likewise, Pal-CoA increases the release of cytochrome *c* (cyt-*c*), and reduces the calcium retention capacity (CRC), contributing to the opening of mitochondrial permeability transition pore (mPTP) in mitochondria with MS.

In isolated mitochondria from animals with MS, an increase in the generation of H₂O₂ was observed, which could contribute to cell death by apoptosis. However, no evidence of apoptotic markers (DNA fragmentation, Apaf-1 and p53) was found, and a decrease in caspase 9 activity and a reduction in total active caspase 3 content were observed. These alterations may be due to a decrease in the release of cyt-*c* in mitochondria with MS, a key process in the formation of the apoptosome and the activation of apoptosis.

The results suggest that there is a resistance to the triggering of the apoptotic process in the liver of animals with MS, although etiologically the accumulation of NEFAs and their activation products such as Pal-CoA, as well as oxidative stress favor it.

To elucidate the mechanism by which the release of cyt-c is decreased in MS, the lipid composition of cardiolipin (CL), a lipid exclusive to the mitochondria that keeps cyt-c attached to the mitochondrial inner membrane (MIM), was analyzed. It was found that CL of mitochondria from MS animals is enriched with C16:0, which is resistant to lipoperoxidation, this was demonstrated by incubating the mitochondria with high doses of Pal-CoA and subsequently analyzing the CL and no evidence of lipoperoxidation of the CL was found.

Overall, our data suggest that our MS model have a simple steatosis as the initial phase of the hepatic disease, with no obvious apoptotic activity. On the other hand, Pal-CoA could be a player in the progression of NAFLD to more severe disease through mechanisms involving increased cyt-c release and mPTP induction, key processes in triggering the apoptotic process.

Introducción.

El hígado graso no alcohólico (HGNA) actualmente es la enfermedad hepática crónica más común a nivel mundial, la cual ha ido incrementando su incidencia en la población adulta a lo largo del tiempo, pasando de un estimado de 25.5% en el año 2005 a 37.8% en estudios a partir del año 2016¹, además, se estima que afecta a aproximadamente del 75% al 90% de los pacientes obesos^{2, 3}. El HGNA comprende un amplio espectro clínico que va desde la esteatosis simple, la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), la fibrosis hepática y en algunos casos desemboca en cáncer hepático⁴.

Las alteraciones en el metabolismo lipídico contribuyen en gran medida al desarrollo de enfermedades metabólicas como la obesidad, el síndrome metabólico (SM), la diabetes mellitus tipo 2 y el HGNA. Los pacientes con HGNA tienen 3 veces más probabilidades de mortalidad relacionada con enfermedades hepáticas⁵. Debido a la acumulación de lípidos hepáticos, la lipotoxicidad conduce a la activación del proceso apoptótico promoviendo la inflamación y la fibrosis en la EHNA⁶.

En la literatura se ha reportado tanto en pacientes humanos como en modelos animales, que las dietas ricas en carbohidratos o lípidos contribuyen al desarrollo y progresión del HGNA. Estas dietas, estimulan la lipogénesis *de novo*, donde el producto final es la formación de ácido palmítico (C16:0)^{7, 8, 9}.

El C16:0, es el principal producto de la lipogénesis *de novo* y se ha reportado que promueve la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), lo que promueve la disfunción mitocondrial, disminuyendo el potencial transmembranal ($\Delta\Psi$), la producción de ATP, lo que en conjunto desencadena la apoptosis en el hígado^{6, 10, 11, 12}. Por tal motivo, se consideró estudiar el proceso apoptótico en el hígado de un modelo de SM y la participación del Pal-CoA en el mecanismo de liberación de citocromo *c* (cit-*c*).

Definiciones del síndrome metabólico.

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de alteraciones metabólicas entre las que se encuentran la hipertensión, la obesidad central, la resistencia a la insulina (RI), la intolerancia a la glucosa y la dislipidemia aterogénica, el cual aumenta significativamente el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares, accidente cerebrovascular y esteatosis hepática^{13, 14}.

En el año 1988 el Dr. Gerald Reaven describe por primera vez que existe una relación causal entre un conjunto de patologías y el desarrollo de las enfermedades coronarias. A este conjunto de patologías le llamó “síndrome X”, e identificó que se caracteriza por RI, hiperglucemia, hiperinsulinemia, aumento en la concentración plasmática de triglicéridos (TGs) y la disminución de la concentración de lipoproteína de alta densidad (HDL)¹⁵.

Posteriormente, en 1998 un comité integrado por expertos de la organización mundial de la salud (OMS) y la Asociación Americana de Diabetes (AAD) incluyó a la obesidad en el espectro de enfermedades que componen al síndrome X y lo renombraron a SM, el cual es un factor de riesgo para el desarrollo de diabetes y de enfermedades cardiovasculares¹⁶.

En mayo del 2001 el Programa Nacional de Educación sobre Colesterol en el Panel III para el Tratamiento del Adulto (NCEP: ATP III, por sus siglas en inglés) definió nuevos parámetros clínicos para el diagnóstico del SM donde la RI toma mayor relevancia gracias a que está íntimamente ligada con la obesidad y la diabetes mellitus¹⁷.

Sin embargo, en 2005, la Federación Internacional de Diabetes (FID) publicó sus lineamientos, en donde reconoce que en la práctica clínica es mucho más fácil medir la obesidad abdominal que la RI, por lo cual, en su definición se debe de presentar obesidad central además de dos alteraciones adicionales para diagnosticar SM a los pacientes¹⁸.

La tabla I resume los parámetros de las diferentes organizaciones para el diagnóstico clínico del SM, la cual tiene como características comunes la prevalencia de la RI, la hipertrigliceridemia y la obesidad central, factores que incrementan el riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus.

En el año 2018 Gutiérrez-Solis A.L. y colaboradores, publicaron un meta-análisis (basado en 15 estudios independientes y un total de 34583 pacientes) utilizando datos recabados entre 2004 y 2016, cuyo enfoque principal fue la población adulta residente de las zonas urbanas de México. Reportaron que la prevalencia del SM basada en diferentes criterios ronda entre el 54% (criterio FID) y el 31% (criterio OMS), no obstante, utilizando el modelo de efectos aleatorios de Der Simonian-Laird la prevalencia combinada es del 41%, cabe destacar que el consumo de bebidas azucaradas fue el principal factor de riesgo para el desarrollo de SM en este estudio¹⁹. Así mismo se ha reportado que el SM aumenta en un 70% el riesgo de muerte súbita cardíaca, cuando se conjunta con factores como el hígado graso no alcohólico (HGNA) y la RI²⁰.

Tabla I. Parámetros clínicos para el diagnóstico de SM de acuerdo con diferentes organizaciones

Parámetros	OMS 1998	NCEP: ATP III 2001	FID 2005
Glucosa plasmática en ayunas:	≥ 110 mg/dl	≥110 mg/dl	≥100 mg/dl
2 horas después de la carga de glucosa:	≥ 140 mg/dl		
Niveles bajos de colesterol HDL			
En hombres:	<35 mg/dl)	<40 mg/dl	<40 mg/dl
En mujeres:	<39 mg/dl	<50 mg/dl	<50 mg/dl
Hipertrigliceridemia	150 mg/dl	≥150 mg/dl	≥150 mg/dl
Obesidad central	Relación cintura-cadera	Circunferencia de cintura	Circunferencia de cintura
	> 0.9 Hombres > 0.85 Mujeres	>102 cm Hombres >88 cm Mujeres	≥94 cm Hombres ≥80 cm Mujeres
Índice de masa corporal:	> 30 kg/m ²		> 30 kg/m ²
Presión arterial alta	140/90 mm Hg	≥130/≥85 mm Hg	≥130/≥85 mm Hg

La obesidad una de las características del SM.

La Organización Mundial de la Salud define la obesidad como una acumulación excesiva de grasa y se diagnostica mediante índice de masa corporal (IMC) cuando este es mayor o igual ≥ 30 kg/m². Actualmente la obesidad es considerada una pandemia, la cual está asociada principalmente al cambio en los hábitos alimenticios, dados por la popularización de las comidas y bebidas hipercalóricas e hiperpalatables con alto contenido de carbohidratos y lípidos, actualmente denominadas como productos ultraprocesados²¹, y a los cambios de hábitos tales como el sedentarismo y la falta de actividad física²².

La prevalencia de sobrepeso aumentó del 45.3% al 64% de entre 1980 y 2015 respectivamente, mientras que la prevalencia de la obesidad aumentó de 12.9% al 28.3% en el mismo periodo de tiempo, siendo los Estados Unidos y México los que presentan las mayores tasas de prevalencia²³.

La obesidad, a nivel de tejido adiposo aumenta la síntesis de moléculas pro-inflamatorias tales como IL-6 y TNF- α , mientras que se reducen los niveles de adiponectina, molécula importante por su función antiinflamatoria y por mejorar la sensibilidad a la insulina²⁴. Se sabe que la obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas como la diabetes tipo 2, enfermedad cardiovascular, SM, HGNA y cáncer²⁵.

El HGNA una enfermedad metabólica.

El HGNA actualmente es la enfermedad hepática crónica más común a nivel mundial, se estima que afecta alrededor del 25% al 40% de la población adulta y a aproximadamente del 75% a 90% de los pacientes con obesidad^{1, 2, 26, 27}.

El HGNA es una enfermedad metabólica compleja sobre la cual aún hoy existe controversia en relación con su causa principal, no obstante, se sabe que hay distintos factores clínicos asociados al desarrollo del HGNA tales como la obesidad, la RI, el SM, la diabetes tipo 2, los factores genéticos y ambientales tales como la alimentación o el estilo de vida, que actúan sinérgicamente para el desarrollo y progresión de la enfermedad^{28, 29}.

La enfermedad del HGNA comprende un amplio espectro clínico que va desde la esteatosis simple, la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), la fibrosis hepática y en algunos casos desemboca en cáncer hepático⁴ (figura 1). De acuerdo con la guía práctica de la Asociación Estadounidense para el Estudio de Enfermedades Hepáticas para diagnosticar HGNA debe existir evidencia de esteatosis hepática, ya sea por técnicas de imagenología (ecografía hepática o la resonancia magnética) o por análisis de biomarcadores clínicos atribuidos a causas secundarias al consumo significativo de alcohol (< 20/30 g por día respectivamente, para mujeres y hombres), uso prolongado de medicamentos esteatogénicos (por ejemplo, mipomersen, lomitapide, amiodarona, metotrexato, tamoxifeno, corticosteroides) o trastornos hereditarios monogénicos.

La primera fase del HGNA se denomina esteatosis simple cuyo sello distintivo es la acumulación vesicular citoplasmática de lípidos en al menos el 5% de los hepatocitos, sin evidencia de daño hepatocelular^{30, 31}. Dicha acumulación lipídica es consecuencia de un desbalance entre un mayor consumo de ácidos grasos, aumento de la lipogénesis *de novo* y una menor tasa de oxidación de ácidos

grasos³². En la esteatosis hepática el principal lípido almacenado son los TGs, el paso final en la síntesis de TGs es catalizado por la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT). Se ha reportado que hay dos isoformas DGAT1 y DGAT2, la primera es una enzima constitutiva de retículo endoplásmico, mientras que DGAT2 se localiza en retículo endoplásmico y alrededor de las gotas lipídicas³³. Se ha reportado que en hígado DGAT1 utiliza como sustrato ácidos grasos exógenos para la síntesis de TGs³⁴. Mientras que DGAT2 utiliza principalmente ácidos grasos de la lipogénesis de *novos*³⁵.

El mecanismo por el cual una esteatosis simple aparentemente inerte se convierte en EHNA no está del todo claro, no obstante, se cree que la progresión está directamente relacionada con la lipotoxicidad, el aumento del estrés oxidante y la inflamación. La acumulación prolongada de lípidos desencadena un aumento en la oxidación de los ácidos grasos de manera compensatoria, no obstante, esto puede promover la progresión de la enfermedad al inducir estrés oxidativo, así como comprometer la función mitocondrial, lo que conduce a la activación de caspasas y la consecuente cascada apoptótica, además de promover la respuesta inflamatoria de los hepatocitos (balonización) y posteriormente con el tiempo y la acumulación de daño hepatocelular se establece la segunda fase de la enfermedad, la EHNA que puede presentar o no fibrosis hepática^{6, 32, 36, 37}.

La EHNA puede provocar fibrosis en un rango variable (de F0 a F4), siendo F0: ausencia de fibrosis; F1: fibrosis portal o fibrosis perivenular sin tabiques; F2: fibrosis con pocos tabiques; F3: fase puente de fibrosis entre nódulos portales y finalmente F4: cirrosis. Al respecto, la fibrosis es un proceso de reparación tisular ante el daño hepático, el cual, desencadena la muerte de los hepatocitos. El hígado en respuesta al daño y muerte celular segrega matriz extracelular constituida por colágeno no fibrilar, la cual servirá de soporte para los nuevos hepatocitos y mantener así el tejido hepático funcional, no obstante, si el daño es crónico la producción de matriz extracelular se deposita de manera desorganizada, está formada principalmente por colágeno fibrilar, fibronectina y diversos glucosaminglucanos formando un tejido cicatrizante no funcional.

Por lo tanto, la presencia de fibrosis es el factor más importante para predecir la muerte celular de los hepatocitos, se ha reportado que en etapas avanzadas como F3 y F4 aumenta drásticamente la tasa de mortalidad por enfermedad hepática^{38, 39, 40}. Se estima que aproximadamente el 20% de todos los pacientes con EHNA padecen F3 o F4⁴¹. La etapa final del HGNA es la cirrosis, la cual se caracteriza por necroinflamación y fibrosis lo que conlleva a la pérdida de la arquitectura hepática gracias a la formación de tabiques y nódulos fibrosos, distorsión del parénquima hepático y de la arquitectura vascular. Además, en la cirrosis hay una disminución en la masa hepática funcional, lo que disminuye la función metabólica y sintética del hígado⁴².

En el año 2021 las enfermedades hepáticas fueron la sexta causa de muerte en la población mexicana, la mayor frecuencia de decesos se observó en la población adulta a partir de los 25 años siendo las enfermedades hepáticas responsables de aproximadamente 64.4 % del total de las defunciones, mientras que el 35.6% restante fueron atribuidas al consumo de alcohol ⁴³. México es uno de los países cuya población reúne varios factores de riesgo para esta enfermedad y su prevalencia podría superar el 50%; es por eso que el panorama a mediano plazo es muy pesimista si no se toman acciones inmediatas para contrarrestar lo que ya se considera un problema de salud nacional⁴⁴.

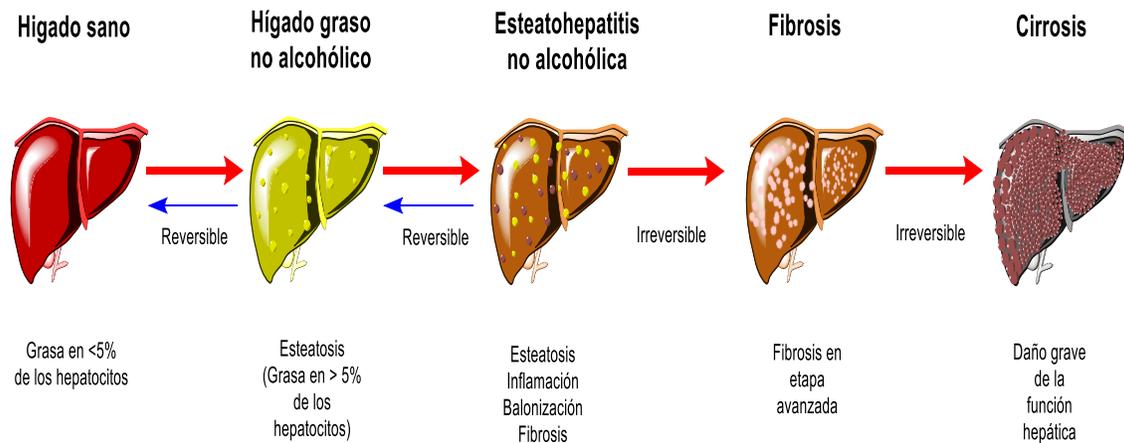


Figura 1. Representación esquemática de la progresión del hígado graso no alcohólico.

El SM y su asociación con el HGNA.

El HGNA históricamente se ha considerado una manifestación hepática del SM⁴⁵. Sin embargo, en las últimas décadas se han realizado diversos estudios que refutan esta idea. Al respecto, Wang y colaboradores reportaron que la presencia de uno de los componentes del SM aumenta 3.6 veces la probabilidad de desarrollar HGNA, mientras que el padecer 2 de los componentes del SM eleva 5 veces la probabilidad de desarrollar HGNA, es importante destacar que se debe tener al menos tres de los factores de riesgo para ser diagnosticado con SM⁴⁶.

En otro estudio de Kanwar y colaboradores en 2016 realizado en adultos que no presentaban diabetes, se encontró que el 70% de los pacientes con EHNA cursaban con 3 o más de los componentes del SM, además, la prevalencia del SM fue del 67% en la cohorte de pacientes con HGNA sin diabetes, rango muy superior al reportado para la población general en E.U.A. del 23% por Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición⁴⁷ (NHANES, por sus siglas en inglés). Así mismo, se ha reportado que

pacientes con HGNA sin SM no presentan mayor riesgo para desarrollar diabetes tipo 2, ni enfermedades cardiovasculares, siendo el HGNA un precedente para el desarrollo del SM⁴⁸.

Por otro lado, de acuerdo con datos de la Academia Mexicana de Cirugía, la prevalencia del HGNA en pacientes mexicanos que tienen SM es de aproximadamente del 80%⁴⁹. También se ha reportado la prevalencia de SM pos-trasplante hepático en 39% de los pacientes, del mismo modo, el 35% de los pacientes desarrollaron SM de nueva aparición pos-trasplante⁵⁰. Diversos estudios longitudinales y meta-análisis han llegado a la conclusión de que HGNA precede al desarrollo de diabetes mellitus y SM⁵¹.

Al respecto, se sabe que los procesos moleculares para el desarrollo de HGNA y el SM están íntimamente relacionados y son bidireccionales⁵², ambas patologías tienen como factores de riesgo comunes a la obesidad y la RI⁵³.

RI y su asociación con el HGNA.

En condiciones fisiológicas, una vez secretada por las células beta del páncreas, la insulina en el torrente sanguíneo llega a sus células blanco en las que interactúa con su receptor, perteneciente a la familia de receptores de tirosina cinasa tales como el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) y el receptor relacionado con el receptor de insulina (IR). Cuando la insulina se une a la cadena α del receptor, esta fosforila a la cadena β promoviendo su actividad de tirosina cinasa.

Posteriormente la cadena β fosforila a la cadena α , provocando un cambio conformacional que aumenta la actividad cinasa del receptor, una vez activado, puede fosforilar a sustratos exógenos como a las proteínas adaptadoras: IRS y Shc las cuales posteriormente desencadenan diferentes cascadas de señalización. La proteína IRS desencadena la vía de la cinasa de fosfatidilinositol 3 (PI3K/Akt), la cual está relacionada con el metabolismo, que incluye, el transporte de la glucosa, la síntesis de glucógeno, la adipogénesis, la síntesis de proteínas y también la sobrevivencia celular. Por otro lado, la proteína Shc se asocia a la vía de señalización de las cinasas activadas por mitógeno (MAPK / ERK 1/2) la cual está relacionada con el crecimiento y la diferenciación celular^{54, 55}.

La RI puede definirse como una alteración en la señalización de la insulina en la cual se requiere de una mayor concentración de insulina para que pueda desempeñar su función normal, su desarrollo se ha vinculado a diferentes proteínas principalmente a la proteína de unión al elemento regulador de esterol 1 (SREBP-1C) el cual es un regulador de las diferentes enzimas responsables de la biosíntesis del colesterol, ácidos grasos no esterificados (AGNE) y TGs^{56, 57}.

La RI, es un factor clave para el desarrollo de HGNA. A nivel de los adipocitos existe un aumento en la lipólisis periférica a consecuencia de mantener activada a la enzima lipasa sensible a hormona (HSL), desencadenando la movilización de AGNE en plasma, los cuales a nivel hepático pueden ser oxidados o esterificados en TGs para su acumulación en gotas lipídicas y así favorecer el desarrollo de esteatosis, fase inicial del HGNA, la cual a través del tiempo tiene el potencial de progresar hacia una EHNA con fibrosis avanzada, particularmente en pacientes que tienen o desarrollan diabetes⁵⁸.

La esteatosis hepática está asociada con la activación de diferentes proteínas, como mTOR, la proteína cinasa C (PKC) y se pueden producir intermediarios en la síntesis de TGs como el diacilglicerol y las ceramidas, las cuales inhiben la señalización de la insulina; particularmente mTOR y PKC pueden fosforilar al sustrato del receptor de insulina (IRS-1), inhibiendo la activación de PI3K/Ak y promoviendo aún más la acumulación de lípidos a manera de una retroalimentación negativa⁵⁹.

Además, se ha reportado que una disminución en la expresión de los receptores activados por proliferadores peroxisomales alfa (PPAR- α) conlleva a una disminución en la oxidación de los ácidos grasos y un incremento en su acumulación, debido a la disminución de carnitina palmitoiltransferasa-1 (CPT1) responsable del transporte de acil-CoA, para su beta oxidación en las mitocondrias⁶⁰.

Alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y lípidos asociados con el HGNA.

El desarrollo de enfermedades metabólicas se ha incrementado en las últimas décadas debido a diversos factores. La carga genética desempeña un papel fundamental para el desarrollo de las enfermedades metabólicas, por ejemplo, se ha descrito que el 49% de los hispanos, el 23% de los caucásicos y el 18% de los afroamericanos presentan un polimorfismo implicado con el desarrollo de esteatosis hepática⁴⁸. Sorprendentemente, la frecuencia más alta reportada se encuentra en la población mexicana con 77% de incidencia, la cual puede actuar sinérgicamente con la actual pandemia de sobrepeso y obesidad condicionando a esta población a tener una mayor probabilidad de desarrollar HGNA⁶¹.

Por otro lado, la falta de actividad física y el sedentarismo^{62, 63}, la popularización de la comida rápida⁶⁴, las dietas occidentales caracterizadas por tener un alto contenido de lípidos, carbohidratos y aditivos industriales (denominados productos ultra procesados) contribuyen al desarrollo de obesidad, SM, HGNA y enfermedades cardíacas⁶⁵. El consumo excesivo de carbohidratos, específicamente de sacarosa o fructuosa se asocia a un incremento en los niveles de TGs, a la RI tanto en humanos como en modelos experimentales^{8, 66, 67, 68}.

Metabolismo de los carbohidratos en condiciones hipercalóricas.

El hígado desempeña un papel fundamental en el metabolismo de la glucosa, ya que es capaz de almacenar y liberar glucosa para mantener la homeostasis glucémica a lo largo del día. Se estima que durante el postprandio el hígado capta aproximadamente el 45% de la glucosa ingerida proveniente de la vena porta⁶⁹, mientras que el resto es distribuida a los diferentes órganos. Para ser utilizada, la glucosa ingresa al hepatocito a través del transportador GLUT2, una vez dentro del hepatocito, la glucosa libre es fosforilada a glucosa 6-fosfato por la enzima glucocinasa. La glucosa 6-fosfato puede seguir diferentes rutas metabólicas, incluida la síntesis de glucógeno, la ruta de la hexosamina o bien continuar la ruta glucolítica o ir hacia la vía de las pentosas⁶⁹.

Cuando la capacidad de almacenar glucosa en forma de glucógeno se ve excedida, se favorecen otras vías como la glucolítica en donde la glucosa 6-fosfato es isomerizada por la enzima glucosa 6-fosfato isomerasa responsable de la formación de fructosa 6-fosfato. Posteriormente, la fructosa 6-fosfato puede ir hacia la ruta de la hexosamina o continuar la ruta glucolítica cuyos productos finales son 2 piruvatos, 2 ATP, 1 NADH por molécula de glucosa. El piruvato a su vez, es descarboxilado por la piruvato deshidrogenasa para la síntesis de acetil-CoA precursor de ácidos grasos de larga cadena como el C16:0 principal producto de la lipogénesis *de novo*^{70, 71}.

Por otro lado, la fructosa en el intestino delgado es transportada del lado apical a través de difusión facilitada vía GLUT5 y basolateralmente por GLUT2^{72, 73}. En los hepatocitos, la fructosa es fosforilada por la hexocinasa para formar fructosa 6-fosfato o bien por la fosfofructocinasa-1 para formar fructosa 1-fosfato. A su vez, la fructosa 1-fosfato es sustrato de la aldolasa la cual genera gliceraldehído (que posteriormente entrará a la glucólisis) y dihidroxiacetona-fosfato que posteriormente se convertirá en glicerol 3-fosfato, el cual servirá como sustrato para la posterior síntesis de TGs⁷⁴ (figura 2).

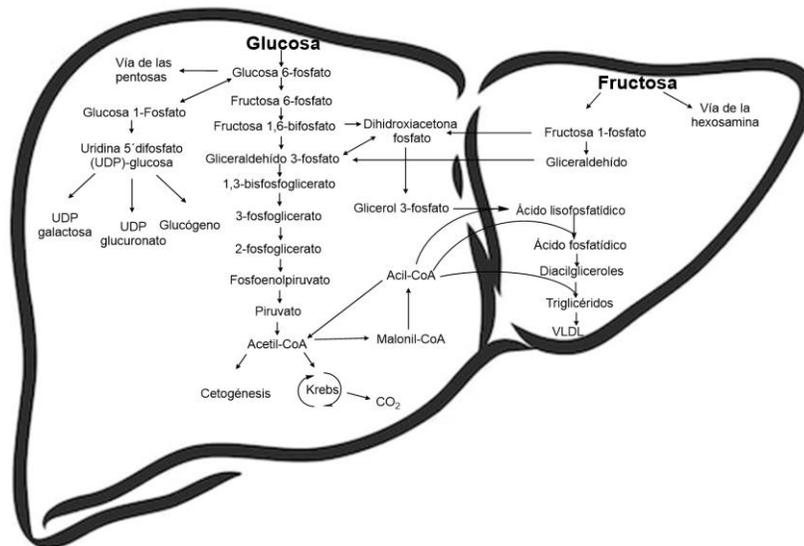


Figura 2. Metabolismo hepático de la glucosa y fructosa. La glucosa se fosforila en glucosa 6-fosfato el cual es sustrato para diferentes vías metabólicas, como la vía de las pentosas, la síntesis de glucógeno, etc. Especialmente se enfatiza en la vía glucolítica que tiene como producto final el piruvato, el cual posteriormente es convertido en acetil-CoA y servirá como sustrato para la cetogénesis, el TCA, o bien, para la lipogénesis *de novo*. El catabolismo de la fructosa produce dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído, los cuales pueden entrar a la vía glucolítica o bien promover la lipogénesis y la subsiguiente síntesis de triglicéridos a partir del acil-coenzima A (CoA). Finalmente, los triglicéridos (TGs) producidos son empaquetados en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) para su almacenamiento en el hígado o su exportación al torrente sanguíneo.

Metabolismo de los lípidos.

El metabolismo de los lípidos está regulado por la acción de diferentes lipasas, enzimas encargadas de hidrolizar los enlaces éster de los TGs, para así liberar a los ácidos grasos y el glicerol para producir monoglicéridos, diacilgliceroles y AGNE.

Los lípidos son la segunda fuente de energía del cuerpo, en condiciones fisiológicas el mayor reservorio de grasa del cuerpo es el tejido adiposo en donde existe un balance entre la acumulación y el catabolismo de lípidos, manteniéndose a concentraciones bajas en un estado de equilibrio. Sin embargo, este equilibrio se puede ver afectado por la falta de actividad física, la ingesta elevada de carbohidratos y de grasa. Por otro lado, en el contexto de los trastornos metabólicos como la obesidad, el exceso energético aumenta la lipogénesis *de novo* y la acumulación de TGs en órganos tales como corazón, riñón, músculo esquelético e hígado^{75, 76}.

Lipogénesis de novo.

La lipogénesis *de novo* es el proceso bioquímico por el cual se sintetizan los ácidos grasos a partir de subunidades de acetil-CoA provenientes de la ingesta excesiva de carbohidratos. El exceso de glucosa, incrementa la producción de citrato en la mitocondria, el cual es transportado al citosol donde la ATP-citrato liasa (ACLY) libera acetil-CoA. Posteriormente, el acetil-CoA resultante se convierte en malonil-CoA mediante la acetil-CoA carboxilasa (ACC), posteriormente la sintasa de ácidos grasos (FAS) utiliza al malonil-CoA para generar una cadena de acilo saturada de dos carbonos, la cual actuará como sustrato para la síntesis de una molécula de C16:0.

Existen dos isoformas de la ACC, ACC1 presente en los tejidos lipogénicos como el tejido adiposo blanco, las glándulas mamarias lactantes y el hígado. La ACC2 es la isoforma predominante en el músculo esquelético y cardíaco. La ACC1 es el paso limitante de la lipogénesis *de novo* a nivel hepático, su regulación ocurre a dos niveles, en primer lugar, se ha reportado que al exponer a los hepatocitos a insulina, la ACC1 sufre una polimerización formando dímeros con mayor actividad catalítica. El segundo nivel de regulación ocurre de manera alostérica. Los activadores alostéricos son el citrato y el glutamato, los cuales promueven la polimerización de ACC1 aumentando su actividad. Por otro lado, los inhibidores alostéricos de ACC1 incluyen al malonil-CoA y los acil-CoA, por ejemplo, la inhibición por altos niveles de C16:0⁷⁷.

Síntesis de Triglicéridos.

La activación de los ácidos grasos en acil-CoA es un paso clave en la bio-síntesis de los triglicéridos. La activación de los AGNE se da en la membrana externa mitocondrial o en el retículo endoplasmático y es catalizada por la enzima acil-CoA sintetasa de cadena larga en la que esterifica una molécula de coenzima A (CoA) a la recién formada cadena de C16:0 para formar una molécula de palmitoil-CoA (Pal-CoA)⁷⁸.

En condiciones de exceso de sustrato los acil-CoA son rápidamente acoplados a la síntesis de TGs, en donde la sn-1-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) utiliza al glicerol-3-fosfato y al acil-CoA como sustrato para la síntesis de ácido lisofosfatídico (ALP). Posteriormente, se da una segunda acilación en la posición sn-2 de ALP por la enzima acil-CoA: 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa (AGPAT) para producir ácido fosfatídico (AP), el cual es un sustrato tanto para la síntesis de TG, de fosfatidilglicerol

(PG), fosfatidilinositol (PI) y cardiolipina. El AP es posteriormente hidrolizado por la fosfatasa de ácido fosfatídico (también llamada lipina) para formar diacilglicerol (DAG), el DAG también puede ser sustrato para la síntesis de diversos lípidos como TGs, fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS). El paso final es la del DAG por la DGAT para producir un TGs⁷⁹.

Se ha reportado que las dietas ricas en carbohidratos estimulan directamente a la proteína SREBP-1C y a la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP) los cuales son reguladores transcripcionales de diferentes enzimas implicadas tanto en el metabolismo glucolítico, como en la lipogénesis *de novo*, lo que contribuye de manera importante para el aumento en la síntesis de TGs y la acumulación ectópica de lípidos en el hígado, induciendo el desarrollo de HGNA, además de contribuir en el desarrollo de parámetros clínicos del SM, tales como la obesidad intra-abdominal, así como el incremento de TGs plasmáticos⁸⁰. Asimismo, la alta concentración de TGs hepáticos es el parámetro más fuertemente asociado con el desarrollo de HGNA⁸¹.

Fisiológicamente, los TGs y los lípidos se almacenan en los hepatocitos en forma de gotas lipídicas. En condiciones patológicas, hay un desequilibrio entre la síntesis y la degradación de las gotas lipídicas, lo que conduce a un depósito masivo de lípidos en los hepatocitos, característica fenotípica principal en la enfermedad del hígado graso⁸². En la literatura se ha propuesto que la rápida esterificación de los AGNE en TGs y su localización dentro de las gotas lipídicas constituye un mecanismo de protección contra la lipotoxicidad ya que su almacenamiento en gotas lipídicas es inicialmente inocua^{83, 84}.

Síntesis de Cardiolipina.

La cardiolipina (CL) es un fosfolípido de carácter aniónico que se encuentra casi exclusivamente en la membrana mitocondrial interna (MIM) en organismos eucariontes, su papel biológico es el de estabilizar la estructura y la función de los componentes individuales de la cadena de transporte de electrones, además, que regula procesos mitocondriales relevantes, como la dinámica de estos organelos, el mantenimiento de la estructura de las crestas, la formación de supercomplejos y también tiene un papel en la vía intrínseca de la apoptosis entre otros⁸⁵.

La CL constituye aproximadamente del 15 al 20% de la MIM, está formada por dos residuos de ácido fosfatídico unidos a través de un esqueleto central de glicerol, debido a su estructura el fosfolípido muestra una forma cónica lo cual ayuda a la formación de las crestas en la MIM (figura 3).

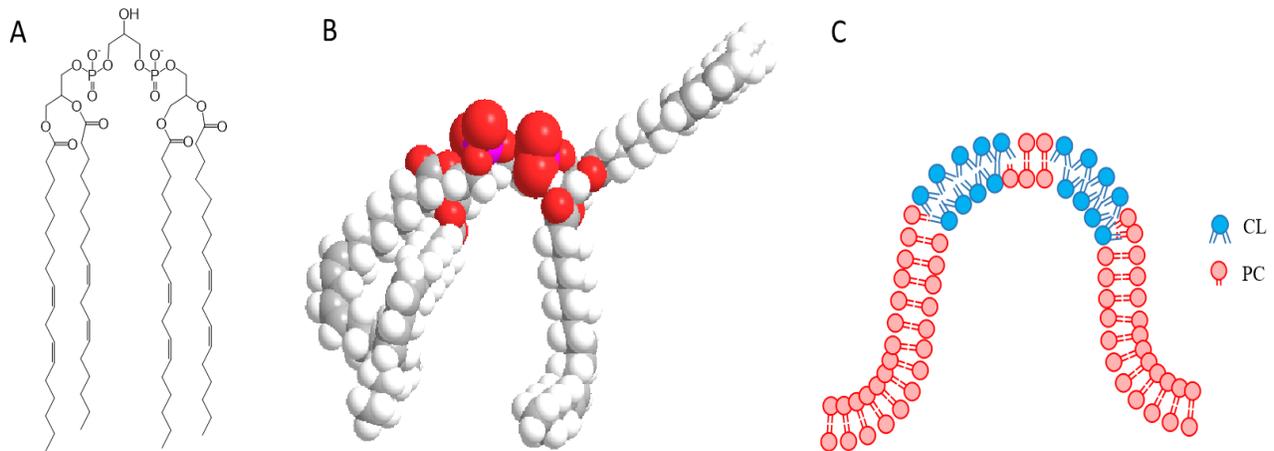


Figura 3. Estructura y forma de la CL. A) Estructura química de la tetra-linoleil-CL, CL formada por cuatro cadenas de ácido linoleico. B) Modelo en tercera dimensión de la tetra-linoleil-CL, en la cual se muestra la cadena de acilo que interacciona con el cit-c C) Representación esquemática de la formación de las crestas mitocondriales, por su forma cónica la CL ejerce presión lateral en la bicapa lipídica induciendo una curvatura negativa, CL corresponde a cardiolipina y PC a fosfatidilcolina.

El retículo endoplásmico es el sitio principal de biosíntesis de CL, en células de mamíferos los sitios de unión entre la mitocondria y el retículo son cruciales para el intercambio de lípidos, la síntesis de *novo* de CL comienza en la MIM con AP proveniente del retículo endoplásmico el cual es convertido a citidina difosfodiácilglicerol (CDP-DAG) por la CDP-DAG sintasa mitocondrial (Tam41). La fosfatidilglicerolfosfato sintasa (PGS1) cataliza el paso siguiente convirtiendo al CDP-DAG a fosfatidilglicerol fosfato (PGP). El fosfatidilglicerol (PG) es formado por la desfosforilación del PGP catalizada por la fosfatasa PTPMT1. Posteriormente la cardiolipina sintasa (CLS) utiliza PG y a una molécula adicional de CDP-DAG para catalizar la síntesis de CL *de novo*⁸⁶.

La recién formada CL es considerada inmadura, por lo que se necesita un proceso de remodelación para formar una CL madura. El proceso de remodelación es iniciado por la fosfolipasa A2 (PLA2), la cual escinde una cadena de acilo de CL generando una monolisocardiolipina (MLCL). Posteriormente una transferasa utiliza un acil-CoA como donante de la cadena de acilo para la acilación de la MLCL y la producción de una CL madura. Este es catalizado por acción de tres enzimas distintas acil-CoA: lisocardiolipina aciltransferasa 1 (ALCAT1), monolisocardiolipina aciltransferasa 1 (MLCLAT1) y tafazina (TAZ)^{87, 88}. Fisiológicamente, la especie de CL madura más abundante es la que contiene principalmente tetra-linoleil-CL [(C18:2)₄CL] compuesta por cuatro cadenas de ácido linoleico insaturado, que representa aproximadamente el 80% de todas las especies de CL tanto en el hígado como en el músculo esquelético y cardíaco⁸⁹.

La formación de las crestas mitocondriales se debe a la capacidad de la CL de no formar bicapas, promoviendo la curvatura negativa de la membrana, lo que induce la formación de la estructura tubular de las crestas proporcionando una gran superficie en la MIM para que se produzcan las reacciones bioquímicas de la fosforilación⁸⁹.

Mediante estudios cristalográficos se ha demostrado la presencia de CL estrechamente unida en las estructuras cristalinas del complejo III, complejo IV y el acarreador de ADP/ATP. Por otro lado, se ha reportado que gracias a la estructura dimérica de la CL promueve el ensamblaje, estabilización y la actividad de los supercomplejos respiratorios. De hecho, en mitocondrias que carecen de CL, se ha reportado la desestabilización de los supercomplejos, de manera similar, al exponer a partículas submitocondriales de corazón de res a la generación de ERO mediada por mitocondrias o por generadores de ERO, se observó la oxidación y disminución de la CL, así como la disminución en la actividad de los complejos I, III y IV⁸⁵.

Estructura y función de la mitocondria.

La mitocondria es la principal fuente de generación de ATP necesario para la homeostasis celular. Estructuralmente, está rodeada por dos membranas: la membrana externa mitocondrial (MEM) y la membrana interna mitocondrial (MIM). La MEM es permeable al paso de iones y moléculas pequeñas a través de canales iónicos y transportadores. Por otro lado, la MI es impermeable al paso de iones y otras moléculas. La MIM se encuentra altamente plegada formando invaginaciones llamadas crestas mitocondriales, en las cuales se encuentran los complejos de la cadena de transporte de electrones (CTE), responsables de la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa⁹⁰.

Durante la fosforilación oxidativa la transferencia de electrones de donadores como la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y al dinucleótido adenina de flavina (FADH₂) procedentes tanto del ciclo de Krebs, como de la β -oxidación generan un gradiente electroquímico de protones por medio del complejo I, III y IV, y este gradiente es utilizado por la F₁F₀ ATP para la síntesis de ATP a partir de ADP y fósforo inorgánico^{91, 92} (figura 4).

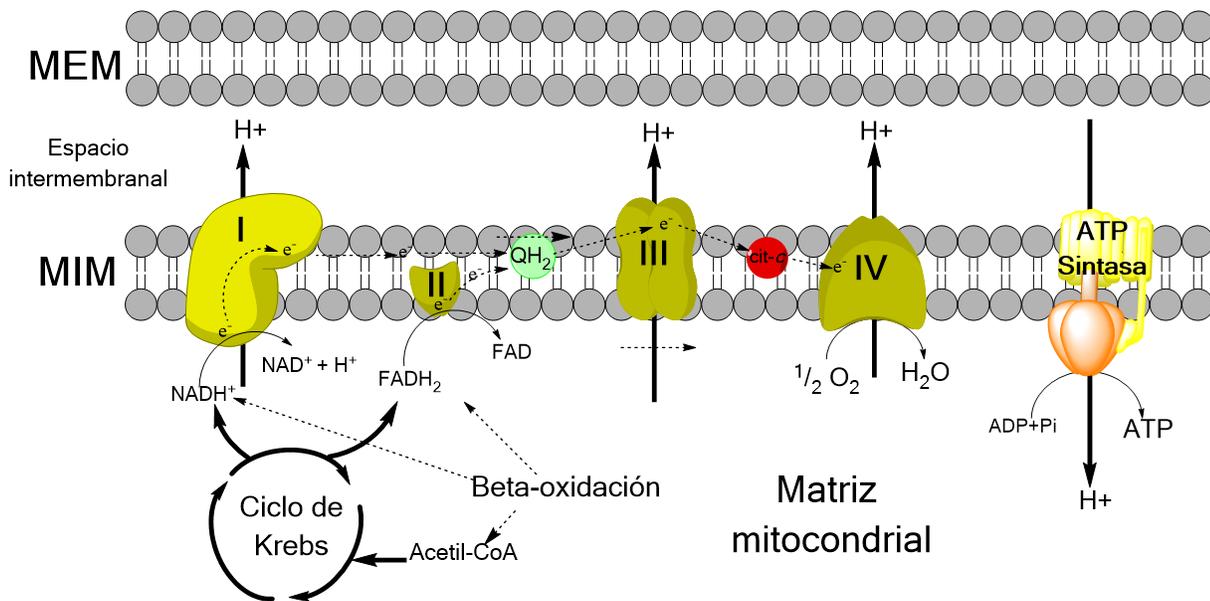


Figura 4. Cadena de transporte de electrones mitocondrial.

En la membrana interna mitocondrial (MIM) ocurre la fosforilación oxidativa cuando los acarreadores de electrones provenientes del ciclo de Krebs o de la beta-oxidación son reducidos en el complejo I (NADH^+) o por el complejo II (FADH_2). El transporte de e^- está acoplado al bombeo de protones (H^+) en los complejos I, III y IV desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal para la creación de un gradiente electroquímico ($\Delta\psi$) que se utiliza para producir ATP a través de ATP sintasa (complejo V).

El complejo I (NADH deshidrogenasa). Es el complejo más grande de la CTE con una masa molecular aproximada de 1 MDa. En mitocondrias de mamíferos consta de 14 subunidades altamente conservadas y 31 accesorias, consta de una arquitectura en forma de “L” con un brazo inmerso en la MIM y un brazo periférico. La función bioenergética principal del complejo I es acoplar la transferencia de electrones del NADH a la ubiquinona con el bombeo de protones al espacio intermembranal, contribuyendo a formar la fuerza protón motriz utilizada para la síntesis de ATP. Experimentalmente su estequiometría es de 4 protones (H^+) / 2 electrones⁹³.

El complejo II (succinato deshidrogenasa). Es el complejo más pequeño de la CTE, consta de cuatro subunidades con una masa molecular total de 140 kDa. El complejo II cataliza la oxidación de succinato a fumarato en el ciclo de Krebs a través de sus grupos Fe-S a la ubiquinona o bien como parte de la CTE transfiere dos electrones desde el FADH proveniente del succinato a la ubiquinona unida la membrana, reduciéndola y formando ubiquinol, esta reacción no está acoplada a la translocación de protones. Posteriormente el ubiquinol transporta los electrones hacia los complejos III y IV⁹⁴.

La ubiquinona (UQ). Es una molécula lipofílica, la cual puede existir en tres estados; completamente oxidado UQ (ubiquinona, UQ), parcialmente reducido (ubisemiquinona, UQ^-) y completamente reducido (ubiquinol, QH_2). Debido a su capacidad redox reversible tiene la función de transportador de electrones en la CTE, específicamente transfiere electrones de los complejos I y II al complejo III⁹⁵.

El complejo III (citocromo c reductasa o complejo bc1). Es un homodímero y cada monómero contiene 11 subunidades con una masa molecular aproximada de 240 kDa. Consta de tres subunidades catalíticas. El citocromo *b* (cit-*b*) contiene dos centros hemo-*b* (un hemo de bajo potencial b_L y un hemo de alto potencial b_H); el citocromo *c1* (cit-*c1*), que contiene un grupo hemo de tipo *c* unido covalentemente; y la proteína de hierro-azufre Rieske con un grupo 2Fe-2S. Su función principal del complejo *bc1* es permitir la transferencia de electrones provenientes de complejo I y II hacia el citocromo *c* (cit-*c*), mientras que acopla a este proceso la translocación de protones mediante un mecanismo conocido como el ciclo Q.

En este ciclo una molécula de QH_2 se une al sitio de oxidación de quinol (Q_o) del cit-*b*, del lado del espacio intermembranal. El QH_2 dona un electrón en el centro de alto potencial formado por la proteína Rieske y cit-*c1*. Esta reacción genera un radical $UQ^{\cdot-}$ con carga negativa, posteriormente dona otro electrón al centro de bajo potencial del cit-*b*, entrando primero por el citocromo b_L y luego rápidamente por el citocromo b_H , este electrón va a la ubiquinona unida al sitio Q_i del lado de la matriz mitocondrial, de tal manera que la $UQ^{\cdot-}$ se reduce a QH_2 nuevamente, para renovación del sitio Q_o . El bombeo de protones se produce por el movimiento del segundo electrón a través de la membrana hacia el cit-*c*, la estequiometría es de 4 protones (H^+) / 2 electrones^{96, 97} (figura 5).

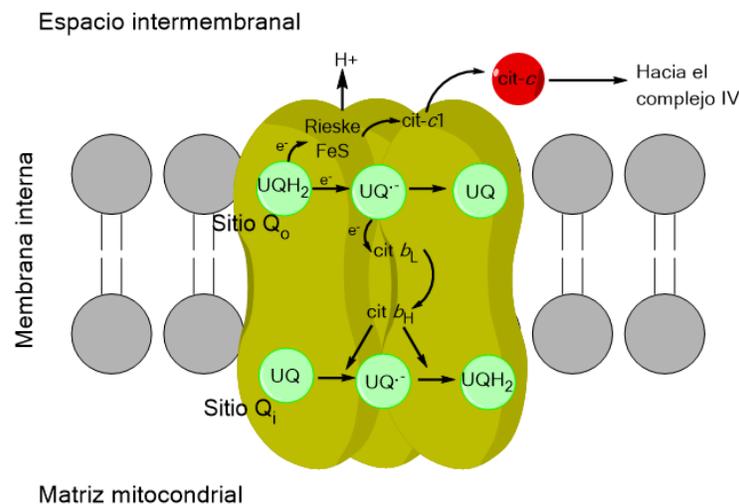


Figura 5. Representación del ciclo Q en el complejo III de la CTE. El ciclo inicia cuando el ubiquinol (UQH_2) se une al sitio Q_o (outside), se transportan dos electrones: el primer electrón es donado a través de los centros redox en la proteína Rieske (FeS) y cit- $c1$ (hemo $c1$), reduciendo finalmente al transportador soluble citocromo c (cit- c). El segundo electrón llega a través de los grupos hemo b_H y b_L en el citocromo b al sitio Q_i reduciendo $\frac{1}{2}$ quinona (UQ). El radical ubisemiquinona ($UQ^{\cdot-}$) es capaz de donar el electrón (e^-) al oxígeno molecular y generar superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en dos sitios diferentes, uno orientado hacia la matriz mitocondrial (Q_o , outside) y otro orientado hacia el espacio intermembranal (Q_i , inside).

El cit-c. Es una proteína que en mamíferos tiene un peso aproximado de 12 kDa (con 104 residuos de aminoácidos), la cual contiene un grupo prostético hemo tipo c unido covalentemente a su cadena de aminoácidos. Su función principal es el de transportar electrones debido a su potencial redox. Cuando el cit-c acepta un electrón del complejo III su grupo hemo de hierro Fe^{3+} se reduce a Fe^{2+} . Posteriormente, el cit-c dona el electrón al complejo IV oxidando nuevamente al grupo hemo del cit-c reestableciendo su carga Fe^{3+} ⁹⁸.

El complejo IV (citocromo c oxidasa). En mamíferos consta de 14 subunidades, es considerada una oxidasa con centro hemo de cobre. Tiene tres unidades catalíticas COXI, COXII y COXIII. Su función principal es la transferencia de electrones del cit-c reducido al oxígeno molecular acoplado a la transferencia de protones.

Los electrones del cit-c provenientes del complejo III se transfieren al hemo Cu_A de la subunidad COX II, posteriormente se transfieren al hemo en la subunidad COX I y finalmente al sitio de unión al oxígeno compuesta por el hemo a_3/Cu_B en la subunidad COX I, lo que permite la transferencia simultánea de cuatro electrones al oxígeno, evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno intermedias (ERO). La subunidad COX III es necesaria para el bombeo de protones y la estabilización de las subunidades COX I y COXII. Es importante destacar que en proporciones altas de ATP/ADP en la matriz mitocondrial, este complejo puede ser inhibido de manera alostérica por su producto final, el ATP. Esto sucede cuando se cambia de una fosforilación oxidativa con altas tasas de síntesis de ATP en situaciones de estrés, asociadas con $\Delta\Psi$ parcialmente elevado y baja eficiencia (estado activo), a bajas tasas de síntesis de ATP en condiciones de relajadas con bajo $\Delta\Psi$ y alta eficiencia (estado relajado). El cambio entre ambos estados se produce de forma inmediata y continua en todas las células eucariotas⁹⁹.

El complejo V (F_1F_0 ATP Sintasa o ATPasa). En mamíferos consta de 17 subunidades diferentes (18 en humanos) con un peso molecular aproximado de 550 kDa (592 kDa en humanos). Su función principal es la síntesis de ATP, se estima que la ATP sintasa genera más del 90% del ATP celular. Está constituida por la sección F_0 unida a la membrana mitocondrial interna y la parte soluble F_1 del lado de la matriz mitocondrial. La ATP sintasa tiene un mecanismo catalítico rotatorio en F_1 el cual gira gracias a la fuerza protón motriz generada por el regreso de los protones hacia la matriz mitocondrial a través de F_0 . Esta energía es utilizada para la fosforilación de ADP para la síntesis de ATP^{100, 101}.

Principales sitios de generación de ERO en la mitocondria.

Las mitocondrias son la fuente principal de formación de ERO, ya que durante la fosforilación oxidativa puede haber una fuga de electrones, los cuales al interactuar con el oxígeno pueden producir superóxido ($O_2^{\bullet-}$) o peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Fisiológicamente, se estima que el 0.1 hasta el 2% de todo el oxígeno molecular consumido en la mitocondria se transforma en ERO, se han reportado que los sitios más importantes para la formación de ERO a nivel mitocondrial son los complejos I y III¹⁰².

El complejo I (NADH deshidrogenasa). El complejo I cataliza la oxidación de NADH en la subunidad que contiene el mononucleótido de flavina (FMN), posteriormente los dos electrones se transfieren a una serie de siete centros de hierro y azufre para reducir Q a QH_2 en el sitio de unión a Q. Se ha propuesto que el complejo I genera $O_2^{\bullet-}$ a nivel de la matriz mitocondrial en dos sitios, en el sitio de unión al FMN (sitio I_F) y el sitio de unión a Q (sitio I_Q). En condiciones normales, la transferencia directa de electrones (oxidando glutamato o piruvato en combinación con malato) los electrones van desde el NADH a Q, no obstante, al bloquear el sitio I_Q con rotenona o piericidina provoca una acumulación de NADH y una reducción del sitio I_F donde los electrones pueden fugarse para reducir al O_2 y generar $O_2^{\bullet-}$. Por otra parte, en ausencia de inhibidores del transporte de electrones, la oxidación de succinato genera $O_2^{\bullet-}$ a tasas muy altas en el sitio I_Q debido la transferencia inversa de electrones desde QH_2 hacia NAD^+ , curiosamente, la rotenona reduce significativamente las ERO producidas a través de la transferencia reversa^{103, 104}.

El complejo II (succinato deshidrogenasa). En la literatura se ha reportado el complejo II es capaz de producir $O_2^{\bullet-}$ en el sitio II_F o sitio de unión a la flavina, teniendo una muy alta capacidad de producción de ERO, superada solo por el complejo III (sitio Q_o) y por el complejo I (sitio I_Q). En mitocondrias aisladas de musculo esquelético se determinó que la capacidad del sitio II_F para producir $O_2^{\bullet-}$ está estrechamente relacionada con la cantidad de flavoproteína reducida, en donde el FAD es un sitio potente de fuga de electrones para generar ERO. En condiciones de exceso de sustrato (ácidos dicarboxílicos, particularmente oxaloacetato, malato y succinato) el sitio II_F está ocupado por lo cual la producción de ERO es prácticamente nula, no obstante, a medida que la concentración de sustrato disminuye, el sitio está cada vez menos ocupado lo que permite el acceso del oxígeno y la producción de ERO se exagera¹⁰⁵. Además, se ha reportado que el sustrato oxidativo puede favorecer la formación de ERO, el metabolismo oxidativo de una molécula de glucosa genera diez electrones NADH y dos $FADH_2$, una proporción de electrones NADH: $FADH_2$ de 5:1, mientras que al oxidar por ejemplo C16:0 la proporción de NADH: $FADH_2$ cambia a 2:1, lo que da como resultado una reducción excesiva de la reserva de Q y un aumento en la generación de $O_2^{\bullet-}$ por transferencia reversa¹⁰⁶.

El complejo III (citocromo c reductasa o complejo bc1). El complejo III es el principal sitio de generación de ERO en la cadena de transporte de electrones, esto se debe a la auto-oxidación de la $UQ^{\cdot-}$ durante el ciclo Q, la $UQ^{\cdot-}$ puede donar directamente su electrón para reducir al O_2 y producir $O_2^{\cdot-}$. El sitio Q_i del complejo III libera el superóxido producido hacia la matriz, mientras que el superóxido generado en el sitio Q_o lo libera al espacio intermembranal. La inhibición del sitio Q_i con antimicina A provoca el estancamiento de electrones en la UQ^{\cdot} en el sitio Q_o , lo que propicia su fuga hacia el oxígeno y la producción de $O_2^{\cdot-}$. Además, la inhibición por antimicina A hace que aumente la relación QH_2/Q , lo que promueve la transferencia reversa en el complejo II. La producción de superóxido del sitio Q_o puede inhibirse con el uso de mixotiazol, estigmatelina u otros inhibidores específicos del sitio Q_o ^{105, 107}. Se ha reportado en corazón isquémico, la lesión por isquemia/reperfusión miocárdica provoca una lesión oxidativa en el complejo I, lo que aumenta la producción de ERO por el complejo III¹⁰⁸.

Por otro lado, estudios recientes indican que la Acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (LCAD) puede ser una fuente importante de H_2O_2 en el hígado. Durante la β -oxidación, la acil-CoA deshidrogenasa cataliza el primer paso de la oxidación de ácidos grasos mitocondriales, LCAD es la encargada de metabolizar los ácidos grasos de cadena larga (de 12 a 22 carbonos) como el C16:0. La participación de LCAD en la formación de H_2O_2 hepática usando Pal-CoA fue confirmada mediante el uso de ratones knockout para LCAD -/- los cuales producen significativamente menos ERO que ratones *wild type*. Por otro lado, se ha descrito que la LCAD está regulada a la baja en varios cánceres humanos, incluyendo el carcinoma hepatocelular. La restauración de la expresión de LCAD en células HepG2 aumenta considerable la generación de H_2O_2 en presencia de Pal-CoA, por lo cual se sugiere que LCAD puede tener un papel importante en la patogenia de las enfermedades hepáticas¹⁰⁹.

Del mismo modo, Kakimoto y colaboradores (2015) observaron que las mitocondrias de animales tratados con una dieta alta en grasas durante una semana, generaban mayor cantidad de H_2O_2 al utilizar Pal-CoA como sustrato oxidante, pero no hubo cambio al utilizar otros sustratos como piruvato o succinato, lo que los llevo a pensar que el aumento en los ERO provenía directamente de la oxidación de ácidos grasos. Por lo cual, investigaron la generación de H_2O_2 por la deshidrogenasa de acil-CoA de cadena muy larga (VLCAD), responsable de la oxidación de ácidos grasos de cadenas de 14 a 24 carbonos. Encontraron que la VLCAD humana recombinante, puede generar H_2O_2 directamente utilizando Pal-CoA como sustrato y que su generación es dosis dependiente, además, atribuyeron una actividad oxidasa parcial a la VLCAD debido a que detectaron la formación de H_2O_2 en ausencia de superóxido dismutasa añadida en sus análisis¹¹⁰.

Estrés oxidante en el HGNA.

El estrés oxidativo, es el resultado del desequilibrio entre la generación de ERO y la defensa antioxidante, lo que a su vez provoca alteraciones en la señalización y regulación redox, así como daño molecular y celular. En años recientes se ha considerado como un componente novedoso del SM, debido a la evidencia experimental que muestra que el estrés oxidativo, junto con las condiciones inflamatorias crónicas, son el núcleo del desarrollo de las enfermedades metabólicas, además, de estar relacionado con el desarrollo de HGNA¹¹¹.

Al respecto, se ha descrito que las ERO en altas concentraciones, pueden desencadenar la progresión de la enfermedad del HGNA. En un estudio pediátrico se reportó que la dieta rica en fructuosa, estimula la activación de la lipogénesis de *novo* y bloquea la oxidación de los ácidos grasos¹¹². Durante el metabolismo de la fructosa por la fructocinasa C aumentan los niveles de ácido úrico, cuyos efectos pro-oxidantes y pro-inflamatorios promueven el proceso lipogénico en el hígado, además favorecen la disfunción mitocondrial, agotando la producción de ATP y suprimiendo la oxidación de los lípidos, lo que aumenta la producción de ERO y la progresión del HGNA¹¹³.

Por otro lado, las dietas altas en grasa que comúnmente contienen alrededor de 45% a 75% de la ingesta total de calorías basada en grasa⁸ desencadenan la disminución en la producción de ATP, el potencial transmembranal ($\Delta\psi$) y en consecuencia, el aumento en la generación de ERO¹¹⁴. Del mismo modo, se ha reportado que la dieta alta en colesterol durante 30 días es capaz de inducir disfunción mitocondrial, a través de un marcado aumento en la generación de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 , favoreciendo el establecimiento del HGNA y su posible progresión a EHNA¹¹⁵.

La sobrecarga de AGNE tanto a nivel citosólico como a nivel mitocondrial, conduce a un aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, promoviendo la disipación del $\Delta\psi$, en consecuencia, disminuye la síntesis de ATP lo que resulta en disfunción mitocondrial y una mayor generación de ERO¹¹⁶. Al respecto, se ha documentado que la dieta occidental promueve la acumulación de lípidos tanto en humanos como en modelos experimentales, aumentando en gran manera su oxidación y por consiguiente la exacerbación en la formación de ERO^{7, 9, 114, 115, 117, 118, 119, 120}.

Las ERO a nivel hepático inducen tanto el inicio como la progresión de la RI. La sobreproducción de ERO está asociada con mayor activación de la proteína cinasa activada por monofosfato de adenosina (AMPK) y de las MAPK, como la cinasa N-terminal c-Jun (JNK). El mecanismo propuesto es que una vez activa la JNK es capaz de fosforilar al receptor IRS-1 en múltiples residuos de serina, lo que promueve su degradación proteosomal y favoreciendo a su vez la RI^{121, 122}.

Además, se han reportado diferentes marcadores de estrés oxidante tanto en pacientes como en modelos experimentales de HGNA, tales como los productos de la peroxidación lipídica (MDA, 4-HNE, hidroperóxidos, 8-isoprostano), productos de oxidación de proteínas (carbonilación de proteínas, nitrotirosina), productos de oxidación de ADN (8-OH-dG) ^{123, 124}. La incubación de células hepáticas con ácidos grasos saturados como el C16:0, induce un aumento en la acumulación de TGs y en la generación de ERO, debido a la disminución del $\Delta\Psi$ y la producción de ATP, lo que promueve la muerte celular por apoptosis y finalmente la progresión de esteatosis simple hacia EHNA¹⁰.

El estrés oxidante juega un papel importante en el establecimiento y la progresión de la fisiopatología del HGNA, la exacerbación en la generación de ERO causada por la peroxidación lipídica puede desencadenar daño en el ADN mitocondrial, oxidación de proteínas, deterioro irreversible de función mitocondrial lo que disminuye la producción de ATP y, eventualmente, desencadena el proceso de muerte celular y la progresión de la enfermedad hacia una EHNA.

Apoptosis.

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso fisiológico necesario para la homeostasis morfogénica durante el desarrollo embrionario, así como para la eliminación de las células senescentes o dañadas. La apoptosis es inducida de forma extrínseca o intrínseca debido a diferentes estímulos, no obstante, ambas vías conllevan a la activación de las caspasas, la condensación de cromatina (picnosis), la ruptura del núcleo celular (cariorraxis) y la formación de pequeñas vesículas aparentemente intactas (cuerpos apoptóticos) que son captadas eficientemente por células vecinas con actividad fagocítica y degradadas dentro de los lisosomas¹²⁵.

Vía intrínseca o vía mitocondrial. Es una forma de muerte celular programada que se activa por perturbaciones del microambiente celular, incluyendo el daño en el ADN, sobrecarga de Ca^{2+} citosólico, radiación, toxinas, o por especies reactivas de oxígeno¹²⁵.

En condiciones fisiológicas cit-c interactúa con la CL formando un complejo (CL—cit-c) a través de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas con la CL. Se ha propuesto que una cadena de acilo de la CL se une a un bolsillo hidrofóbico del cit-c, lo que cambia la conformación del grupo hemo este citocromo, el cual adquiere actividad de peroxidasa en presencia de H_2O_2 cuando la relación umbral del complejo CL—cit-c es de 5:1^{126, 127}. La composición de ácidos grasos de las especies de CL puede influir en la unión y el desdoblamiento del cit-c, y en la subsiguiente actividad del complejo CL—cit-c. El tetra-oleil-CL promueve la actividad peroxidasa del cit-c sólo en presencia de H_2O_2 , mientras que el

tetra-linoleil-CL promueve esta actividad en ausencia de H_2O_2 , probablemente debido a los hidroperóxidos lipídicos (LOOH) preexistentes¹²⁸.

La actividad peroxidasa del cit-c en las primeras etapas de la apoptosis también depende de la naturaleza del reordenamiento estructural cerca del grupo hemo del cit-c. Por ejemplo, los residuos de lisina en el sitio activo que regulan la interacción con la CL y optimizan la actividad peroxidasa del complejo CL—cit-c¹²⁹. Una vez oxidada la CL se disocia de la MIM para posteriormente traslocarse a la MEM, donde participa en la inserción del poro BAX/BAK para la permeabilización de la MEM o como lípido señal para desencadenar la mitofagia, por su parte el cit-c queda de manera soluble en el espacio intermembranal^{127, 130}.

El punto de no retorno en la vía intrínseca es la permeabilización de la MEM, la cual está regulada por la familia de proteínas reguladoras del linfoma de células B-2 (Bcl-2). Cuando la proteína BID sufre una escisión forma a tBID, la cual se trasloca a la MEM e interactúa directamente BAX y BAK induciendo cambios conformacionales y la oligomerización de las proteínas formando un poro en la MEM, posteriormente esto facilita la entrada de H_2O y solutos lo que provoca un hinchamiento osmótico y la posterior liberación de proteínas pro-apoptóticas como son el segundo activador mitocondrial de caspasas (Smac), proteína de unión directa a IAP con bajo pI (DIABLO), factor inductor de apoptosis (AIF) y el cit-c soluble.

Posteriormente, el cit-c soluble puede salir al citoplasma para desempeñar su papel como una proteína pro-apoptótica reclutando a la molécula adaptadora del factor activador de la peptidasa apoptótica 1 (APAF-1), pro-caspasa 9 para formar al complejo llamado apoptosoma, que a su vez, escinde y activa a caspasas ejecutoras (figura 6)^{131, 132}.

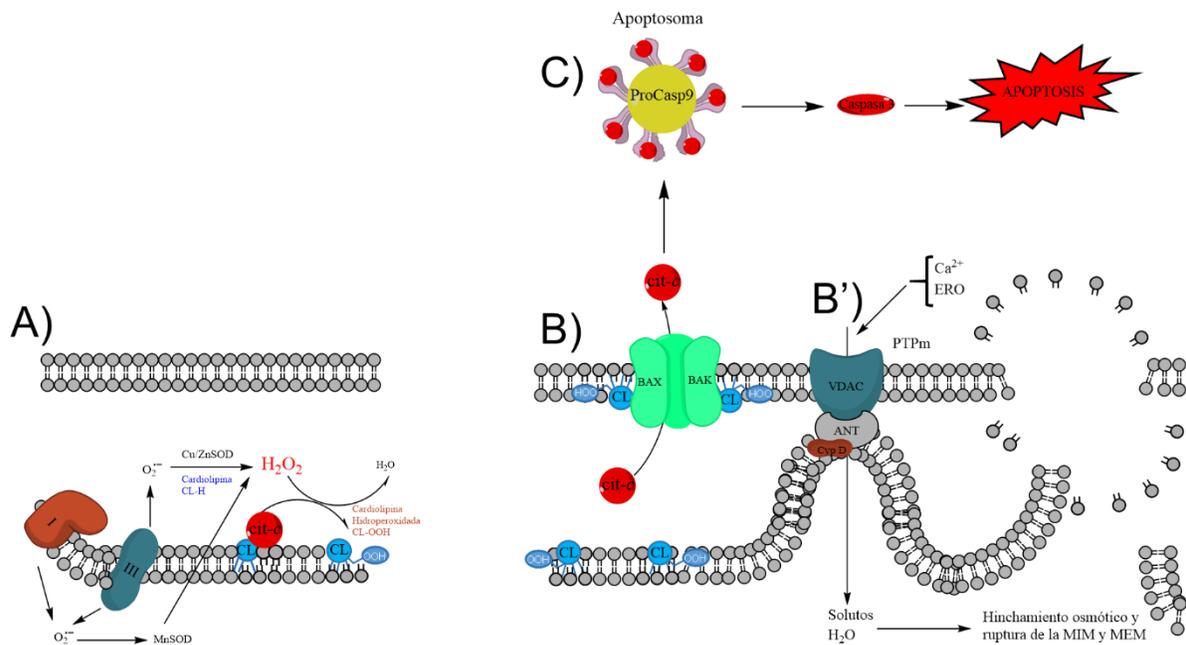


Figura 6. Vía intrínseca de activación de apoptosis. **A)** Mecanismo propuesto de la liberación del cit-c de las mitocondrias en la apoptosis. El cit-c está anclado a la MIM mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbicas con la CL, sin embargo, al aumentar la producción de H₂O₂ debido al estrés oxidante se promueve la actividad peroxidasa del cit-c lo que conlleva la oxidación de la CL. **B)** Permeabilización de la membrana externa. El cit-c se desprende de la MIM manteniéndose soluble en el espacio intermembranal, por su lado, la CL oxidada migra a la membrana externa donde facilita la inserción de las proteínas BAX y BAK, cuya función principal es la formación de poros para la liberación en el citoplasma de proteínas pro-apoptóticas tales como el cit-c, Smac/DIABLO y AIF. **C)** Formación del apoptosoma. Una vez liberado el cit-c se une a APAF-1 y pro-caspasa 9 formando el cual es responsable de la activación de las caspasas efectoras, como caspasa 3 para desencadenar el proceso apoptótico. **B')** La formación del PTPm. Alternativamente se puede promover la formación del PTPm debido a una exacerbación en la producción de ERO o una sobrecarga de Ca²⁺, lo que induce un hinchamiento osmótico y finalmente la ruptura de la membrana externa y liberando el contenido mitocondrial en el citoplasma.

Vía extrínseca o de receptores. Esta vía se regula por señales de estrés extracelulares las cuales se detectan a través de receptores de membrana que amplifican la señal para ejecutar el proceso apoptótico. La vía extrínseca está regulada por los receptores y ligandos de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), FAS, el receptor del ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL), o los receptores tipo Toll (TLR). La unión del ligando a su receptor induce un cambio conformacional que expone a una secuencia conservada de 80 residuos compartidos por todos los receptores llamado “dominio de muerte” (DD).

El DD sirve como un sitio de acoplamiento para otras proteínas pro-apoptóticas como la proteína del receptor de cinasa 1 (RIPK1, mejor conocido como RIP1); la proteína FAS asociada a un DD (FADD) y la procaspasa 8 o 10 formando un complejo de señalización de muerte (DISC). Una vez formado el DISC, activa a las caspasas iniciadoras, las cuales por medio de proteólisis activan a las caspasas efectoras; por ejemplo, la caspasa 3 activa es capaz de viajar al núcleo y activar a la DNAasa activada

por caspasa (CAD) la cual escinde la actina y promueve la fragmentación del ADN, impidiendo la expresión de genes de supervivencia amplificando así la señal apoptótica (figura 7).

Una de las características fenotípicas de la apoptosis es la externalización de la fosfatidilserina, la cual en condiciones fisiológicas está restringida a la cara interna de la membrana plasmática. Posterior al inicio de la apoptosis, las caspasas activan a la escramblasa de fosfolípidos dando como resultado la externalización de la fosfatidilserina, lo que sirve como marcador de la absorción por fagocitos^{133, 134}. En los hepatocitos, la señal de los receptores de muerte no suele ser suficientemente para activar completamente el proceso apoptótico, por lo cual, la escisión de BID por la caspasa 8 es crucial, ya que tBID actúa como un enlace entre la vía extrínseca y la vía intrínseca, donde la permeabilización de la membrana externa mitocondrial desencadena la liberación de factores apoptóticos mitocondriales para activar completamente la maquinaria apoptótica¹³⁵.

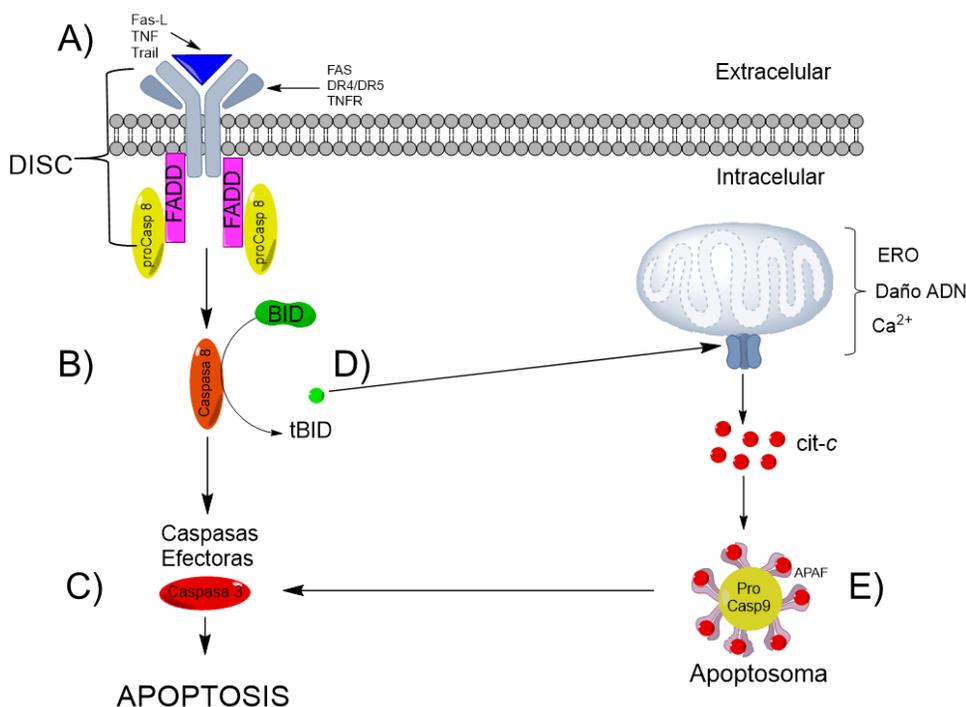


Figura 7. Vía extrínseca de apoptosis. A) Formación del complejo DISC. La unión del ligando (Fas-L, Trail, TNF α) con el receptor de muerte (TNFR, TRAIL, TLR) provoca un cambio conformacional del receptor y posterior unión con las proteínas FADD y pro-caspasa 8 y así formando al complejo DISC. B) Activación de las caspasas. La caspasa 8 es activada dentro del complejo DISC y esta a su vez, activa a las caspasas ejecutoras (caspasa 3 o caspasa 7) para iniciar la apoptosis. C) Activación de la proteína tBID. En hepatocitos la activación de tBID por la caspasa 8 es necesaria para amplificar la señal apoptótica mediante la permeabilización de la MEM. D) Activación de la vía intrínseca. La liberación del cit-c de la mitocondria induce la formación del apoptosoma, que a su vez, activa a las caspasas efectores para activar completamente el proceso apoptótico

Justificación.

La obesidad es un factor de riesgo para la progresión del HGNA a enfermedades hepáticas crónicas como cirrosis, insuficiencia hepática y hepatocarcinoma. En el hígado, los AGNE son altamente lipotóxicos, por lo cual, son rápidamente activados a acil-CoA para ser almacenados posteriormente en forma de TGs en vesículas lipídicas intracelulares como un mecanismo de protección contra la lipotoxicidad. No obstante, en la obesidad, el exceso en la biodisponibilidad sistémica de TGs y de sus precursores debido a un desbalance entre la lipogénesis y la beta-oxidación favorece la lipotoxicidad por un mecanismo que implica la generación de ERO, la disfunción mitocondrial y la muerte celular. En un modelo de SM inducido por alto consumo de sacarosa existe una asociación entre el aumento de la concentración de los AGNE y la generación de ERO en mitocondrias aisladas de hígado. Sin embargo, la liberación del cit-c en mitocondrias aisladas del modelo con SM está disminuida probablemente al enriquecimiento de la CL en C16:0, ácido graso saturado que le confiere mayor resistencia a la lipoperoxidación, mecanismo implicado en la disociación del cit-c de la CL. El cambio en la composición lipídica de la CL puede ser debido una mayor biodisponibilidad de C16:0 y Pal-CoA tanto a nivel citoplásmico como mitocondrial. Por lo tanto, es de gran interés investigar el efecto del Pal-CoA y del C16:0 sobre la función mitocondrial, la generación de ERO y su efecto sobre la liberación de cit-c, así como la composición de la CL en mitocondrias aisladas de hígado de un modelo de SM.

Hipótesis.

En el modelo de síndrome metabólico (SM), la acumulación excesiva de C16:0 y Pal-CoA en mitocondrias de hígado induce cambios en la función mitocondrial y estructurales en la CL lo que afecta el proceso la liberación del cit-c y el proceso apoptótico en el hígado.

Objetivos.

Objetivo general.

- Evaluar el efecto del sustrato de la β -oxidación, el Pal-CoA, tanto en la función mitocondrial como sobre la liberación de cit-c en mitocondrias de hígado de un modelo de SM.

Objetivos Particulares.

Utilizando mitocondrias aisladas de hígado de ratas, se evaluará el efecto de Pal-CoA sobre:

- la función mitocondrial.
- la generación de ERO.
- el proceso de liberación de cit-c y la apoptosis.
- la composición lipídica de la CL

Metodología.

Desarrollo del modelo experimental.

Los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité de Laboratorio y Cuidado Animal del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez y se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices éticas de la institución para la investigación con animales. Se utilizaron ratas machos recién destetados de la cepa Wistar, de 28 días de edad con un peso aproximado de 65 ± 5 g, se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 y se formaron dos grupos al azar, de 6 animales cada uno. El grupo control recibió agua potable, mientras que el otro grupo recibió agua potable que contenía 30% de sacarosa durante 24 semanas con la finalidad de desarrollar los parámetros clínicos del SM¹³⁶. Ambos grupos de animales se alimentaron con una dieta sólida *ad libitum* (fórmula de dieta de laboratorio 5001, Ralston Purina Corp., St Louis, MO). El consumo de alimento ($\text{g día}^{-1} \text{ rata}^{-1}$) y agua ($\text{ml día}^{-1} \text{ rata}^{-1}$) se monitoreó cada 2 días durante la última semana del período experimental. La ingesta calórica individual ($\text{kJ día}^{-1} \text{ rata}^{-1}$) se evaluó a partir de la ingesta de alimentos y sacarosa. Después de 24 semanas de tratamiento, las ratas se mantuvieron en ayunas durante la noche y se sacrificaron al día siguiente.

Obtención de muestras biológicas.

Después de una noche de ayuno, los animales fueron decapitados. La sangre se colectó inmediatamente en un tubo que contenía 10 mM K-EDTA y se centrifugó a $600 \times g$ durante 10 minutos a 4°C . El plasma se complementó con 0.005% de BHT (butil-hidroxil-tolueno) como antioxidante y se almacenó a -70°C hasta que se pudo realizar el análisis de lípidos.

Preparación de las mitocondrias.

Después de sacrificar a los animales, el hígado se extrajo rápidamente y se colocó en una solución A que contiene 250 mM sacarosa, 10 mM Tris-base, 1mM EGTA, pH 7.4 y se mantuvo a 4°C . El hígado se homogenizó en 30 ml de solución A en un homogenizador tipo Potter de vidrio. El homogenizado se centrifugó a $600 \times g$ durante 10 min a 4°C para sedimentar el tejido conjuntivo y los restos celulares insolubles. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a $8000 \times g$ durante 10 min a 4°C para obtener la fracción mitocondrial. El botón resultante se suspendió en una solución B que contiene 250 mM sacarosa, 10 mM Tris-base, pH 7.4, suplementada con albúmina de suero bovino (ASB) al 0.1% y se incubó durante 10 min a 4°C . Después de la incubación, se adicionaron 20 ml de solución B y se centrifugó a $8000 \times g$ durante 10 min a 4°C . La fracción mitocondrial se suspendió en 1 ml de solución B sin ASB y las muestras se mantuvieron a 4°C durante los experimentos⁷.

Determinación de proteína.

La proteína tanto en homogenizado como en mitocondrias, se cuantificó con el método de Lowry modificado¹³⁷. Brevemente, se prepararon tres soluciones: Solución A (NaOH al 1%), Solución B ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$ al 1%) y Solución C ($CuSO_4$ al 0.5%); se hizo una mezcla (Solución D) que por cada mililitro de Solución A contenía 10 μ l de Solución B y 10 μ l de Solución C (v/v). Se realizó una dilución 1:100 del extracto mitocondrial y del homogenizado total en una solución fisiológica de NaCl al 0.9%; de ésta solución se tomaron 100 μ l y se adicionaron 800 μ l de la Solución D por duplicado y se agitaron con vórtex.

Se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron 100 μ l de Folin 1N (SIGMA) y se incubaron las muestras en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Paralelamente se realizó una curva de calibración utilizando albúmina de suero bovino a 0, 10, 20 40 y 60 μ g las cuales fueron tratadas de la misma forma que las muestras. Al terminar la incubación con Folin se registró la absorbancia en un espectrofotómetro a 750 nm. La curva de calibración que corresponde a la absorbancia en función de las concentraciones de ASB es lineal y obedece a la ley de Beer Lambert, lo que permitió determinar la concentración de proteína presente en las muestras de mitocondria y homogenado.

La grasa intraabdominal, en exceso es una característica importante del SM, un marcador de RI y una fuente de AGNE. En este trabajo, el tejido adiposo se diseccionó de la cavidad retroperitoneal, alrededor de ambos riñones y se pesó inmediatamente. La grasa inguinal, duodenal y subcutánea no se incluyeron en este procedimiento.

Extracción y análisis de ácidos grasos no esterificados.

Los AGNE fueron extraídos de la suspensión enriquecida con mitocondrias o de homogeneizado total de hígado de animales controles y con SM. La extracción se realizó según el método de Folch¹³⁸ brevemente:

Extracción: A 10 mg de proteína se adicionaron 10 μ g y 100 μ g de ácido heptadecanoico (C17:0), como estándar interno. El volumen se ajustó a 1 ml con solución salina al 0.9% y se adicionaron 2 ml de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v) que contiene 0.002% de BHT (SIGMA); se agitó con vórtex durante 30 segundos. Las muestras se centrifugaron a 600 x g durante 3 minutos y se recuperó la fase orgánica (cloroformo); este paso de extracción se repitió dos veces. A la fase orgánica, se le adicionaron 200 μ l de metanol para clarificar la muestra y sulfato de sodio anhidro para eliminar los residuos de agua. Las muestras fueron filtradas a través de algodón para eliminar el exceso de sulfato de sodio. Posteriormente se evaporó el metanol y cloroformo con gas nitrógeno de alta pureza. Todos los pasos, excepto la evaporación, se realizaron en hielo.

Derivatización: Posteriormente, al residuo lipídico se le adicionó 1 ml de metanol con 0.002% de BHT, 100 μ l de 2, 4-dimetoxipropano (SIGMA) y 10 μ l de ácido sulfúrico (SIGMA); se agitó con vórtex durante 30 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos, con agitación cada 5 minutos. Para detener la reacción, se colocaron las muestras en hielo y se agregó 1 ml de solución salina al 5%, 2 ml de hexano, se agitó con vórtex durante 30 segundos y las muestras se centrifugaron a 600 x g durante 2 minutos. Se recuperó la fase orgánica y se evaporó el hexano con gas nitrógeno de alta pureza a temperatura ambiente¹³⁹ con modificaciones de nuestro laboratorio¹⁴⁰.

Cromatografía de gases: Los ésteres metílicos de los AGNE se disolvieron en 50 μ l de hexano, se agitaron con vórtex y se analizaron con un cromatógrafo de gases marca Shimadzu modelo GC-8A equipado con un detector de ionización por flama y una columna SP2330 (30 m x 0.25 mm DI, Supelco). La temperatura del inyector y la columna fueron de 250°C y 170°C respectivamente, se utilizó gas helio como acarreador de la muestra a una presión de 2 kg/cm². Los picos de cada ácido graso fueron identificados tomando en cuenta el tiempo de retención para cada uno y fueron cuantificados con un estándar interno calculando el área de éste.

Consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas.

El consumo de oxígeno se midió con un electrodo tipo Clark. Se incubaron 0.5 mg/ml de proteína mitocondrial a 30°C en un medio que contenía 25 mM KCl, 10 mM HEPES (pH 7.4), 10 mM EGTA, 2 mM K₂HPO₄, 5 mM MgCl₂. El consumo de oxígeno se evaluó tanto con el flujo de transporte de electrones directo como el inverso al energizar a las mitocondrias con piruvato/malato (5/3 mM) o succinato (5 mM), respectivamente. Se añadió ADP (250 μ M) para evaluar el estado III (consumo de O₂ acoplada a la síntesis de ATP). El estado IV corresponde a la captación de oxígeno después de agotarse el ADP. También se evaluó el consumo de oxígeno en presencia de succinato con Pal-CoA y C16:0 como sustratos de la β -oxidación, para evaluar su efecto sobre el control respiratorio.

Liberación de cit-c de mitocondrias aisladas de hígado.

Se incubaron 500 μ g de proteína mitocondrial en 500 μ l de una solución que contiene 150 mM sacarosa, 50mM de KCl, 5mM de Tris, 10 μ M de EGTA y 250 μ M de KH₂PO₄ durante 10 min a 30°C en agitación constante en presencia o ausencia de Pal-CoA (5 μ M, 10 μ M y 20 μ M), succinato (5 mM), catalasa, tioridazina y ciclosporina A (CsA) a diferentes concentraciones (ver figuras). Después, de este tiempo, las muestras fueron centrifugadas a 8000 x g durante 10 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se filtró a través de una membrana de PVDF (0.45 μ m) y el contenido de cit-c se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) equipado con un detector UV/Vis. El cit-c fue separado de otras moléculas por medio de una columna de fase reversa Delta Pack C4 de 300 Å con partículas de 5 μ m (3.9 x 150 mm, Waters) utilizando un gradiente de una fase móvil compuesta de solución A

que contiene H₂O y 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) y solución B que contiene acetonitrilo-H₂O (80-20, v/v) y 0.1% TFA durante 20 min. El cit-c se detectó a una longitud de onda de 393 nm. La cuantificación del cit-c se realizó por medio de una curva estándar utilizando cit-c de corazón de bovino como estándar (SIGMA).

Cuantificación de la generación de H₂O₂ en mitocondrias aisladas

Las mitocondrias (0.250 mg/ml) se incubaron en el amortiguador de reacción para liberación de cit-c (150 mM sacarosa, 50mM de KCl, 5mM de Tris, 10 μM de EGTA y 250μM de KH₂PO₄), 10 μM Amplex Red, y 1 U/ml de peroxidasa de rábano para la amplificación de la señal fluorescente por transferencia de electrones de la peroxidasa al Amplex Red durante la reducción de H₂O₂, que se produce por dismutación del anión superóxido⁷. La oxidación de Amplex Red por H₂O₂ (1:1) produce resorufina, la cual es fluorescente y se detecta en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS50B, usando una cubeta de cuarzo con agitación magnética a 30°C. Las mitocondrias se incubaron con Pal-CoA a diferentes concentraciones (2.5 μM, 5 μM, 10 μM y 20 μM) o succinato (10 mM). La oxidación de Amplex Red se midió a 589 nm / 569 nm como longitudes de onda de excitación / emisión, respectivamente. La velocidad de generación de H₂O₂ por las mitocondrias se evaluó por medio de una curva de cantidades conocidas de H₂O₂. Además, se evaluó el efecto antioxidante de la catalasa; el inhibidor de la palmitoil-CoA oxidasa peroxisomal, la tioridazina y la CsA a diferentes concentraciones (ver figuras) sobre la generación de H₂O₂, dicho proceso se examinó utilizando el mismo amortiguador.

Capacidad de retención de calcio mitocondrial.

Las mitocondrias (0.250 mg/ml) se incubaron en el amortiguador para liberación de cit-c (150 mM sacarosa, 50mM de KCl, 5mM de Tris, 10 μM de EGTA y 250μM de KH₂PO₄ pH 7.4), se añadieron 100nM de Calcium Green-5N (Thermo Fisher Scientific) y se incubó durante 1 minuto. Posteriormente se energizó la mitocondria con 5mM de succinato y se añadió repetidamente CaCl₂ (concentración final de 5μM por adición) a intervalos de 1 minuto hasta la inducción de la transición de la permeabilidad. El experimento se realizó en presencia o ausencia de Pal-CoA (2.5 μM, 5 μM y 10 μM), C16:0 2.5 μM y en presencia de 5 μM CsA, ADP 250 μM para inhibir la apertura del PTPm. También se realizaron ensayos con catalasa (100 U / ml) y tioridazina (25 μM) para investigar la implicación de ERO en la apertura del PTPm. La fluorescencia del Calcium Green-5N se midió en un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS50B con longitudes de onda de excitación y emisión fijadas a 506 y 532 nm, utilizando una cubeta de cuarzo agitada magnéticamente a 30 °C. Posteriormente, se agregaron concentraciones saturadas de Ca²⁺ y EGTA al final de cada experimento para obtener la fluorescencia F_{max} y F_{min} respectivamente, para calcular la concentración de Ca²⁺ dentro de las mitocondrias que sirve para calcular la capacidad de retención de calcio de las mitocondrias ($CRC = n * [Ca^{2+}] * mg^{-1}$ de proteína) como describe Amigo, I. y colaboradores (2017), donde n es el número de adiciones de calcio antes de

la inducción de PTPm. La concentración de Ca^{2+} se determinó de acuerdo con la fórmula: $[\text{Ca}^{2+}] = Kd * (F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F)^{141}$, donde F es la pendiente de fluorescencia después de una adición de $5 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} . La constante de disociación (Kd) es una medida de la afinidad de la sonda por el calcio, se utilizó una Kd de $14 \mu\text{M}$ según lo informado por el fabricante.

Análisis de proteínas por inmunorrélicas tipo *Western Blot*.

Se separaron $80 \mu\text{g}$ de proteína mitocondrial usando geles de poliacrilamida-SDS al 8% o 13% (SDS-PAGE) según la masa molecular de la proteína a analizar. La electroforesis se realizó a 120 V durante 3 horas en un amortiguador de corrida que contenía 25 mM Tris, 192 mM glicina y 0.1% SDS, pH 8.3. A continuación, la proteína en los geles, se transfirió en una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Immobilon-P, Millipore) en una solución que contenía 25 mM Tris, 192 mM glicina y 10% de metanol a pH 8.5, durante 60 minutos a 350 mA. Posteriormente, las membranas se bloquearon con leche libre de grasa al 5 % en TBS-Tween (10 mM Tris, 10 mM NaCl y 0.1% de Tween-20) durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalizado este tiempo, las membranas bloqueadas se incubaron durante la noche a 4°C en el mismo amortiguador TBS sin Tween que contiene el anticuerpo primario, VDAC (Santa Cruz Biotechnology CA) en una dilución 1:200; ANT (Santa Cruz Biotechnology CA) y ciclofilina D (Santa Cruz Biotechnology CA) en una dilución 1:500, (Santa Cruz Biotechnology, CA); anti-cyt-c (Santa Cruz Biotechnology CA), anti-Ciclofilina D (Abcam, ab54496-50), anti-ANT (Genetex, GTX42859) y anti-COX IV (Abcam, ab131177) los cuales se utilizaron como control de carga en una dilución 1:1,000 durante toda la noche a 4°C . Las membranas fueron lavadas con TBS-Tween y se incubaron con peroxidasa de rábano picante conjugada con IgG anti-ratón, anti-cabra o anti-conejo, dependiendo del anticuerpo primario usado en una dilución 1: 5,000. Al finalizar este tiempo, las membranas fueron lavadas y se visualizaron las bandas por quimioluminiscencia utilizando un sistema de revelado (Millipore). Las membranas finalmente se expusieron a placas radiográficas Kodak Biomax ML. Finalmente las bandas en las placas radiográficas se analizaron con un foto-documentador GelDoc (UVP, Inc, Upland, CA, E.U.A.) y la cuantificación se hizo con el *software* Image Quant (GE Healthcare).

Análisis de la CL por espectrometría de masas.

Diez miligramos de proteína mitocondrial se trataron con C16:0 $20 \mu\text{M}$ o Pal-CoA durante 10 min. Una vez finalizada la incubación, se extrajeron los lípidos de las mitocondrias utilizando cloroformo-metanol (2: 1, v / v) en presencia de 20 nmol de tetra-meristoil-CL ((C14: 0)₄CL) como estándar interno, según la técnica de extracción de Folch modificado¹³⁸. Los extractos de lípidos totales se secaron bajo una corriente suave con gas nitrógeno de alta pureza y se almacenaron a una temperatura de -20°C hasta su análisis. Los extractos lipídicos se suspendieron en $200 \mu\text{l}$ de hexano-isopropanol (3: 2, v / v) que contenían acetato de amonio 5 mM y se inyectaron mediante infusión directa en un espectrómetro de masas (MS) equipado con ionización por electropulverización (ESI) (Bruker, Billerica, MA, E.U.A.). El

caudal de infusión de la muestra fue de 5 µl / min y la aguja operó a 3 kV en modo negativo. El flujo de gas de secado de nitrógeno se mantuvo a 8 l / min a 200 °C. La fuente de iones y los parámetros de voltaje de iones se optimizaron con respecto a los iones negativos del CL estándar. Los datos de MS se recopilaron en el modo de escaneo completo en el rango de 600 a 2500 m / z (relación masa / carga).

Tabla II. Distribución relativa de las principales especies de CL observadas en mitocondrias aisladas

Contenido de carbón en la CL	Composición de AGNE de la CL	m/z
C68	(C16) ₂ (C18) ₂	1400 – 1404
C70	(C16) ₁ (C18) ₃	1424 – 1428
C72	(C18) ₄	1448 – 1452
C74	(C18) ₃ (C20) ₁	1474 - 1478

Los AGNE correspondientes a C16 podrían ser ácido palmítico o palmitoleico; C18 corresponde a ácido oleico o linoleico, y C20 es consistente con ácido araquidónico.

Degradación de ADN genómico como marcador de la apoptosis.

Se utilizaron 100 mg de hígado de animales controles y con SM y se realizó la extracción del ADN mediante la homogenización de las muestras en amortiguador de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 0.2%) y se incubaron las muestras durante 10-15 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 14000 x g durante 10 minutos a 4°C y se recolectó el sobrenadante en un nuevo tubo al cual se le agregó proteinasa K en una concentración 0.1 mg/ml y se incubó 2 horas a 55°C. Se agregó 1 volumen (aproximadamente 500 µl) de PCI (fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 25: 24: 1) y se mezcló suavemente por inversión durante 2 min. Al terminó se centrifugaron las muestras a 12000 x g durante 10 minutos a 4°C, al terminar la centrifugación se tomó la fase acuática que contiene ADN + ARN y se transfirió a otro tubo. A la solución de ADN acuoso se le agregaron 100 µl de acetato de sodio 3 M (pH 5.2), y se mezcló por vortex y posteriormente se agregaron 700 µl de alcohol isopropílico, finalmente, las muestras se incubaron a una temperatura de -20 °C durante 12 horas.

Las muestras se centrifugaron a 12000 x g durante 10 minutos a 4°C; para descartar el sobrenadante. Al precipitado se le agregó 0.5 a 1 ml de etanol al 70% y posteriormente se centrifugaron las muestras de 5 a 10 minutos a 12000 x g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y los botones se secaron a temperatura ambiente durante 5-10 minutos, los botones resultantes fueron resuspendidos en 50-100 µl de amortiguador TE (100 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA). Finalmente se agregó 1 µl de RNasa A (solución madre de 10 mg/ml) y se incubó la muestra 30-60 min a 37 °C. Posteriormente, el botón se resuspendió en colorante de carga para gel de ADN 6X (Thermo Fisher Scientific, 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.03 % azul de bromofenol, 0.03 % xileno cianol, 60 % glicerol, 60 mM EDTA) antes de analizar las muestras por electroforesis en geles de poliacrilamida al 5%¹⁴² en amortiguador TBE 10X Invitrogen (1M Tris, 0.9 M de ácido bórico, 0.01 M EDTA pH 8.4). Finalmente se incubó en gel con bromuro de etidio 10mg/ml durante 10 minutos y observó el ADN teñido en un transiluminador.

Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SigmaPlot versión 11 (Systat Software Inc, CA, E.U.A.). Todos los valores del presente estudio están expresados como la media ± error estándar (EE). Las diferencias entre los grupos se determinaron mediante ANOVA de una vía para las variables seleccionadas seguidas de la prueba *ad hoc* de Tuckey. El número animales utilizados para cada análisis se indica en las notas al pie de la figura y la tabla. Las diferencias de medias de grupo se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

Resultados.

Características generales de los animales.

Al finalizar las 24 semanas de tratamiento, se realizó una evaluación de parámetros clínicos-metabólicos con la finalidad de confirmar el establecimiento del SM, previo a la obtención de muestras biológicas para las posteriores rondas experimentales. Se observó que los animales con SM presentaron una disminución en la ingesta de alimento sólido ($p < 0.05$) con respecto al grupo de animales control. Sin embargo, no hubo diferencia significativa en la ingesta de agua entre ambos grupos. La ingesta calórica calculada a partir de alimentos y agua fue mayor para ratas con SM con respecto al grupo control ($p < 0.05$).

Por otro lado, la ingesta de sacarosa al 30% en el agua de bebida indujo un aumento en el peso corporal ($P < 0.05$) y en la grasa intra-abdominal ($P < 0.001$). Estas alteraciones se asocian directamente con un aumento de los triglicéridos plasmáticos en animales con SM ($P < 0.001$), sin presentar cambios en la glucosa ni en el colesterol (tabla III). Todos los cambios observados en los animales tratados con sacarosa son marcadores clínicos del SM¹³⁶.

Tabla III. Características generales de los animales

Variables	Control	SM
Peso Corporal (g)	485.5 ± 11.1	559.6 ± 22.4*
Grasa intra-abdominal (g)	4.01 ± 0.4	21.03 ± 2.6**
Glucosa plasmática (mg/dl)	114.76 ± 4.7	101.9 ± 9.2
Triglicéridos plasmáticos (mg/dl)	58.5 ± 4.8	132.6 ± 10.4**
Colesterol (mg/dl)	61.6 ± 4.5	58.2 ± 4.8
Ingesta de alimentos (g / día / rata)	23.6 ± 2.6	14.6 ± 3.7 *
Ingesta de agua (ml / día / rata)	45.6 ± 5.7	43.6 ± 4.8
Aporte energético (kcal / día / rata)	313.4 ± 10.7	375.3 ± 9.5*

Los valores están expresados como la media ± EE (n= 8 animales diferentes). Los valores fueron obtenidos al final de 24 semanas de tratamiento. Diferencia significativa del grupo control vs SM *($P < 0.05$); ** $P < 0.001$

Alteraciones de AGNE hepáticos en mitocondrias aisladas de rata con SM.

Para evidenciar la acumulación de lípidos hepáticos el cual es el sello distintivo del HGNA^{30, 31}, se evaluó la concentración de algunos AGNE, tanto en homogenado total como en mitocondrias aisladas de hígado de rata. La tabla IV muestra un aumento en la concentración del ácido palmítico (C16:0) ($P < 0.05$), del ácido oleico (C18:1) ($P < 0.001$), además de detección de ácido palmitoleico (C16:1) en mitocondrias aisladas de hígado con SM con respecto a los controles. Por el contrario, se encontró una disminución en los niveles de los ácidos grasos poliinsaturados; como el ácido linoleico (C18:2) ($P < 0.05$) y en el ácido araquidónico (C20:4) ($P < 0.001$) en mitocondrias de animales con SM en comparación con los controles.

En homogenado total de hígado se observa un aumento 10 veces mayor en la concentración de C16:1 ($P < 0.05$) y un aumento en la concentración de C18:1 ($P < 0.05$) en SM con respecto a control, no obstante, no se encontró diferencia en las concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados. Con respecto a la cantidad total de AGNE resultante de la suma de todos los ácidos grasos identificados, se observa un aumento de 50% en los AGNE totales en los homogeneizados de hígado de ratas con SM en comparación con los controles ($p < 0.05$). Sin embargo, en la fracción mitocondrial no se observan cambios significativos.

Tabla IV. Composición de AGNE en mitocondrias y homogenado de hígado

Ácido graso	Mitocondrias		Homogenado de hígado	
	Control	SM	Control	SM
Palmítico	9.02 ± 3.68	17.03 ± 5.8*	29.8 ± 15.3	35.8 ± 6.1
Palmitoleico	ND	1.02 ± 0.79**	0.6 ± 0.5	6.3 ± 2.1*
Estearico	17.28 ± 14.17	10.91 ± 2.58	12.2 ± 3.8	13.3 ± 2.4
Oleico	2.21 ± 1.1	5.61 ± 1.52**	11.1 ± 6.5	32.1 ± 8.5*
Linoleico	10.56 ± 8.11	4.81 ± 2.02*	14.3 ± 8.4	17.9 ± 6.4
Araquidónico	14.82 ± 9.73	6.27 ± 1.77**	10.2 ± 5.6	11.9 ± 3.7
Total AGNE	53.92 ± 28.28	45.67 ± 9.53	78.5 ± 11.4	117.5 ± 27.6*

Los valores están expresados como la media ± DE y representan nmol/mg de proteína (n= 6 animales diferentes). Los valores fueron obtenidos al final del período de tratamiento. Diferencia significativa del grupo control vs SM ($P < 0.05$); ** $P < 0.001$. ND: no detectado.

El aumento en la concentración del ácido palmítico, palmitoleico y oleico refleja una alta actividad lipogénica debido al exceso de consumo de sacarosa. Además, el modelo presenta RI¹⁴³ que se asocia con una mayor actividad lipolítica en el tejido adiposo, que se refleja en un aumento de AGNE circulantes en torrente sanguíneo⁷.

El Pal-CoA afecta el estado III de la respiración mitocondrial.

Se ha reportado que el aumento en la concentración de C16:0 a nivel hepático y mitocondrial, puede promover la disfunción mitocondrial^{6, 10, 11, 12}, asimismo, en mitocondria aislada de nuestro modelo de SM se encontró un aumento en la concentración de C16:0, por lo cual se evaluó la función mitocondrial tanto en condiciones basales, como en presencia o ausencia de C16:0 y de su producto de activación, el Pal-CoA.

El consumo de oxígeno en mitocondrias oxidando tanto succinato como glutamato/malato en presencia de ADP (estado III) y después de la depleción de ADP (estado IV) no presentó diferencias significativas entre las mitocondrias SM y control, tampoco se observaron cambios en el control respiratorio (CR), el cual es representado por el cociente del consumo de oxígeno durante el estado III y el estado IV y es un indicador del estado funcional de las mitocondrias aisladas.

Sin embargo, cuando se agregó Pal-CoA a las mitocondrias oxidando succinato, el consumo de oxígeno disminuyó en el estado III ($p < 0.05$), mientras que el estado IV no mostró cambios significativos, lo que resultó en una disminución en el CR ($p < 0.05$). Por otro lado, el C16:0, ácido graso precursor del Pal-CoA no mostro ningún efecto sobre el consumo de oxígeno ni en mitocondrias controles ni en SM (tabla V).

Tabla V. Consumo de Oxígeno

Substratos	Estado III naAtO/min/mg		Estado IV naAtO/min/mg		Control respiratorio	
	C	SM	C	SM	C	SM
G/M	112.4 ± 48.5	120 ± 48.1	23.8 ± 6.7	29.2 ± 3.6	4.9 ± 2	4.1 ± 1.6
Succ	183.8 ± 35	198.9 ± 30.6	43.2 ± 9.8	55.1 ± 15.2	4.6 ± 2.3	4 ± 1.9
Succ + Pal-CoA (10µM)	113.5 ± 30.6*	127.5 ± 36.4**	48.6 ± 16.8	60.5 ± 23.4	2.4 ± 0.6 *	2.2 ± 0.4**
Succ + C16:0 (10µM)	154.6 ± 17.6	168.6 ± 76.8	49.7 ± 16.2	55.1 ± 12.8	3.6 ± 1.8	3 ± 1.2

El consumo de oxígeno por las mitocondrias se expresa como $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína, y fue realizado en presencia de 5 mM de succinato, 5mM de glutamato, 5mM de malato, 5 mM de succinato con 10µM de Palmitoil CoA y 5 mM de succinato con 10µM de C16:0. El control respiratorio (CR) corresponde al cociente del estado III entre el estado IV. * $P < 0.05$ C Succ vs C Succ + Pal-CoA y ** $P < 0.05$ SM Succ vs SM Succ + Pal-CoA. Los valores están expresados como la media ± DE (n= 6 animales diferentes).

El SM reduce la liberación de cit-c en mitocondria aislada de hígado de rata.

La liberación de cit-c desde el espacio intermembranal hacia el citosol es un proceso crucial para desencadenar el proceso apoptótico, por lo tanto, se evaluó la liberación de cit-c en presencia de succinato. La figura 8 muestra que hay una disminución del 40% en la liberación de cit-c en el grupo con SM con respecto al control en condiciones basales ($P < 0.001$). En presencia de succinato, la liberación de cit-c aumenta de manera significativa en ambos grupos experimentales, no obstante, las mitocondrias de animales con SM siguen liberando una menor cantidad de cit-c con respecto al grupo control ($P < 0.001$).

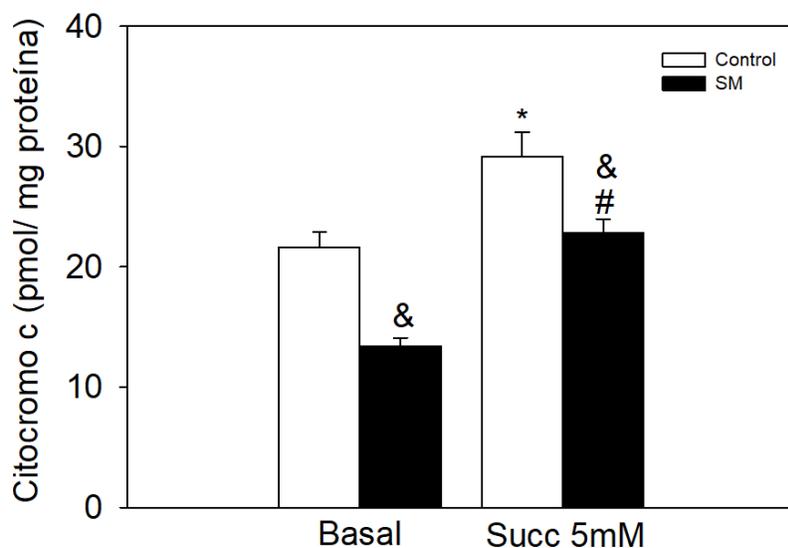


Figura 8. Liberación de cit-c en presencia de 5 mM de succinato como sustrato oxidante. Los valores están expresados como la media \pm EE (n= 6 animales diferentes). & $P < 0.001$ corresponden a control vs SM; * $P < 0.05$ corresponde a C basal vs C + succinato; # $P < 0.001$ corresponde a SM basal vs SM+succinato.

Aumento en la liberación de cit-c en mitocondria aislada en presencia de Pal-CoA.

En la literatura se ha reportado la acumulación de Pal-CoA en enfermedades metabólicas tales como la diabetes y la obesidad ^{144, 145}. En nuestro modelo de SM confirmamos la acumulación mitocondrial de C16:0, precursor del Pal-CoA, por lo cual, se evaluó el efecto de este último sobre el proceso de liberación de cit-c en mitocondrias aisladas de animales controles y con SM.

Se observa que el Pal-CoA induce un aumento en la liberación del cit-c en ambos grupos experimentales de manera dosis dependiente, siendo mayor a concentraciones altas (10 y 20 μM) ($P < 0.05$), sin embargo, la liberación de cit-c permaneció disminuida en mitocondrias con SM en comparación con los controles (figura 9-A). La preincubación de las mitocondrias con CsA, inhibidor de la formación del PTPm en presencia de Pal-CoA suprimió la liberación de cit-c en ambos grupos experimentales independientemente de la concentración utilizada ($P < 0.05$) (figura 9-B).

Se ha descrito que la generación de ERO está involucrada en el proceso de liberación de cit-c, por lo cual, se adicionó catalasa al medio de incubación como enzima antioxidante para eliminar el H_2O_2 generado por Pal-CoA. En la figura 9-C se observa que la catalasa tuvo un efecto parcialmente inhibidor sobre la liberación de cit-c en mitocondrias controles, mientras que en el SM no tuvo efecto.

Debido a que en el proceso de extracción de mitocondrias por centrifugación diferencial puede existir contaminación peroxisomal, lo que puede promover un incremento en la generación de ERO por la actividad de la Pal-CoA oxidasa peroxisomal tal como se ha reportado previamente¹⁴⁶, se realizaron experimentos de liberación de cit-c en presencia de tioridazina como inhibidor de Pal-CoA oxidasa¹⁴⁷. Se utilizó como dosis máxima 25 μM de tioridazina la cual no tiene efecto en la función mitocondrial, ni en el potencial transmembranal¹⁴⁸. La tioridazina inhibió parcialmente la liberación de cit-c de las mitocondrias controles ($P < 0.05$), mientras que las mitocondrias con SM fueron insensibles a tioridazina (figura 9-D).

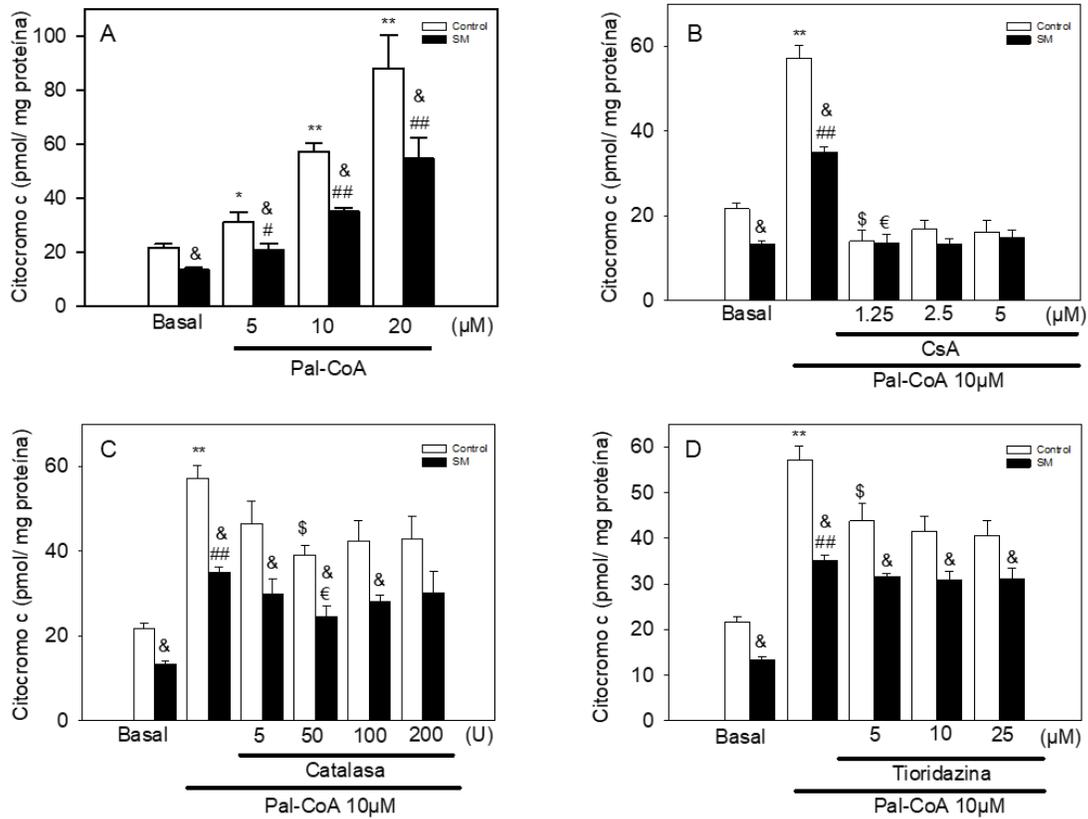


Figura 9. Liberación de cit-c en presencia de Pal-CoA. El Panel A corresponde a diferentes concentraciones de Pal-CoA; El panel B corresponde al efecto de Pal-CoA 10 μM sobre la liberación de cit-c en presencia de diferentes concentraciones de ciclosporina. Los paneles C y D corresponden al efecto de la catalasa y la tioridazina, respectivamente, sobre la liberación de cit-c inducida por Pal-CoA 10 μM. Los valores se expresan como media ± EE (n = 6 a 8 animales diferentes). * P ≤ 0.05 y ** P ≤ 0.001 corresponden a C vs C + Pal-CoA; #P ≤ 0.05 y ## P ≤ 0.001 corresponden a grupos SM vs SM + Pal-CoA; & P ≤ 0,05 corresponde a C frente a SM; \$ P ≤ 0,05 C frente a C + todos los inhibidores usados; € P ≤ 0,05 SM vs SM + todos los inhibidores utilizados.

El Pal-CoA induce un incremento en la generación de H₂O₂ en mitocondria aislada.

Se ha reportado que, en el HGNA, la mitocondria contribuye al daño hepático por un mecanismo que implica el estrés oxidante inducido por el aumento en la concentración de AGNE¹⁴⁹. Por lo cual, se evaluó la generación de H₂O₂ en mitocondrias de ambos grupos experimentales en ausencia y presencia de Pal-CoA. En condiciones basales, es decir, en ausencia de sustrato se observó que la generación de ERO es 29% mayor en SM en comparación con mitocondrias controles (P<0.05).

Por otro lado, en presencia de succinato, se observó un aumento significativo en la generación de H₂O₂ en mitocondrias tanto controles como con SM con respecto a sus condiciones basales (P<0.001), no obstante, el SM generó 25% más H₂O₂ tal como lo había descrito Ruiz Ramírez y colaboradores en 2015¹⁴³. La generación de H₂O₂ inducida por succinato se inhibió en presencia de ADP acoplado el transporte de electrones a la síntesis de ATP en ambos grupos experimentales. En presencia de Pal-CoA la producción de H₂O₂ se exacerbó de manera dosis dependiente en ambos grupos experimentales, siendo significativamente mayor en el grupo SM (figura 10-A).

La figura 10-B muestra que la generación de H₂O₂ fue parcialmente inhibida en presencia de 5μM de CsA. Por otro lado, para evidenciar la generación de H₂O₂ inducida por Pal-CoA, se añadió catalasa y se observó una tendencia a inhibir la generación de H₂O₂ tal como se muestra en la figura 10-C, sin llegar a presentar diferencia entre grupos. Para evitar la participación de la Pal-CoA oxidasa peroxisomal, la cual puede estar presente en pequeñas trazas en nuestra preparación de mitocondrias se utilizó a un inhibidor específico, la tioridazina, la cual inhibió la generación de H₂O₂ inducida por Pal-CoA en mitocondrias de ambos grupos experimentales de manera dosis dependiente (figura 10-D).

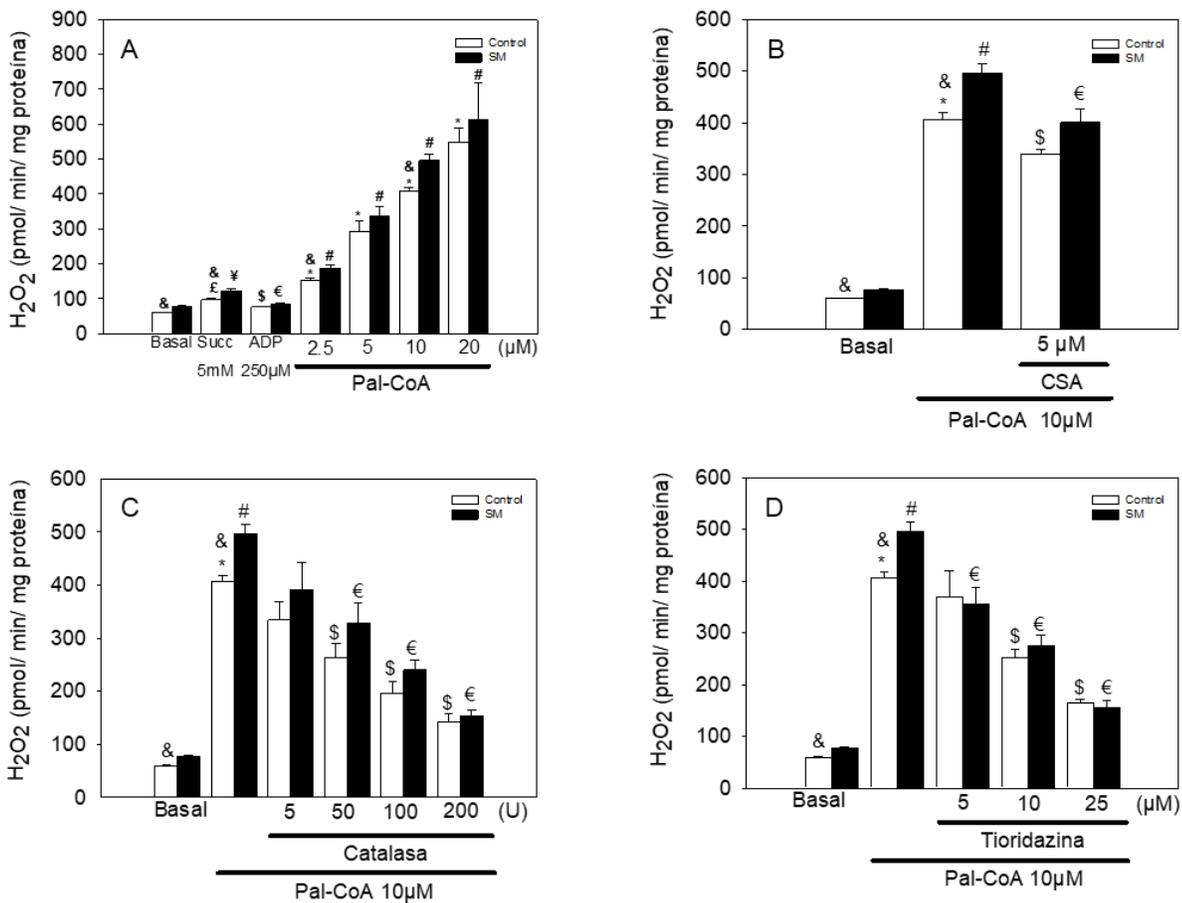


Figura 10. Generación de H₂O₂ en mitocondrias aisladas de hígado. El panel A corresponde al efecto del succinato (5 mM) y a diferentes concentraciones de Pal-CoA (de 2.5 a 20 μM). El panel B corresponde al efecto de Pal-CoA 10 μM en presencia de ciclosporina A 5 μM. El efecto inhibitorio de catalasa y tioridazina sobre la generación de H₂O₂ inducida por Pal-CoA se representa en los paneles C y D, respectivamente. Los valores están expresados como la media ± EE (n= 5 animales diferentes) * P ≤ 0.001 corresponde a C frente a C + Pal-CoA, # P ≤ 0.001 corresponde a SM frente a SM + Pal-CoA; \$ P ≤ 0.05 corresponde a C frente a cada inhibidor utilizado; € P ≤ 0.05 corresponde a SM frente a cada inhibidor utilizado; & P ≤ 0.05 corresponde a C frente a SM; £ P ≤ 0.001 corresponde a C vs C + succinato; ¥ P ≤ 0.001 corresponde a SM vs SM + succinato.

El Pal-CoA induce la formación del PTPm.

La formación del PTPm se da en respuesta a un aumento en el estrés oxidante o por una sobrecarga de calcio, en el cual la membrana mitocondrial interna se vuelve permeable a los solutos de menos de 1500 Da, dando como resultado el colapso del potencial transmembranal mitocondrial, inhibición de la fosforilación oxidativa, la liberación de factores proapoptóticos y finalmente, la muerte celular^{150, 151}. Se ha reportado que las mitocondrias desempeñan un papel en la homeostasis iónica de la célula, particularmente con el Ca^{2+} el cual regula la bioenergética mitocondrial, a bajas concentraciones el Ca^{2+} estimula la oxidación de los ácidos grasos, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa.

Por otro lado, a concentraciones altas el Ca^{2+} provoca un hinchamiento de la mitocondria provocado por un cambio osmótico lo que conduce a la disfunción mitocondrial y la muerte celular. La capacidad de retención de calcio (CRC) refleja la sobrecarga máxima de Ca^{2+} de las mitocondrias que ocurre justo antes de la apertura de PTPm¹⁵². Para evaluar la apertura PTPm se energizó a las mitocondrias con 5 mM de succinato, a continuación se añadió el Calcium Green-5N (Thermo Fisher Scientific) como marcador fluorescente del Ca^{2+} y posteriormente cada minuto se añadió Ca^{2+} (5 μM) a las mitocondrias. La captación de Ca^{2+} se monitoreo midiendo la fluorescencia extra-mitocondrial del Calcium Green-5N hasta que se alcanzó la apertura del PTPm.

En todos los experimentos, tanto los inductores como los inhibidores se añadieron a las mitocondrias antes de las adiciones de Ca^{2+} . En la figura 11, se muestran los trazos típicos de la captación de calcio, en donde se agregó Ca^{2+} a intervalos continuos hasta que se saturó y se indujo la transición de la permeabilidad representado por un aumento súbito en la fluorescencia. Se observó que las mitocondrias de hígado de rata con SM (figura 11-B) requieren una menor cantidad de Ca^{2+} para inducir el PTPm en comparación con las mitocondrias control (figura 11-A). La adición de Pal-CoA a diferentes concentraciones disminuyó el número de adiciones de calcio requeridas para la inducción del PTPm tanto en mitocondrias controles como en mitocondrias SM.

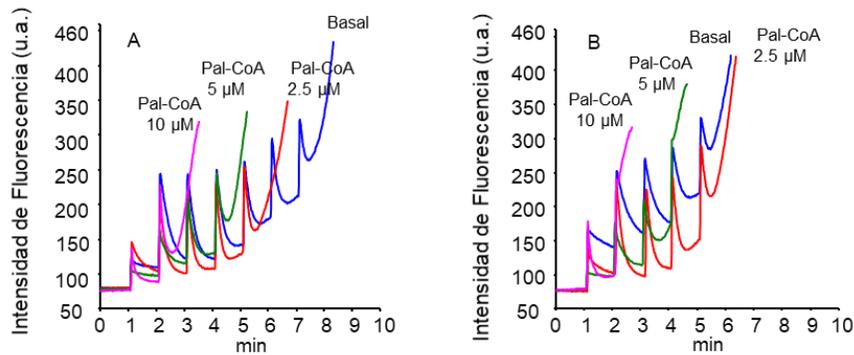


Figura 11. Captación de calcio en mitocondrias de hígado de animales control y SM monitoreados usando Calcium Green-5N. Trazos representativos de mitocondrias de animales C (panel A) y de mitocondrias de animales SM (panel B). Cada pico corresponde a una adición de 5 μM de calcio. Trazos representativos en presencia de Pal-CoA 2.5, 5 y 10 μM .

El Pal-CoA disminuye la CRC en mitocondria aislada.

Para obtener un resultado cuantitativo a partir de los datos cualitativos obtenidos de las curvas de captación de calcio, se calculó la CRC por las mitocondrias aplicando las fórmulas descritas en la sección de metodología. La CRC de las mitocondrias de SM energizadas con succinato es significativamente menor en comparación con los controles ($p < 0.05$) (figura 12-A). La adición del Pal-CoA a 5 y 10 μM disminuye significativamente más la CRC en mitocondrias control y SM sin observar diferencia en la sensibilidad al Pal-CoA entre ambos grupos (figura 12-A).

Al preincubar con CsA, el inhibidor mejor caracterizado de ciclofilina D (CypD), una de las proteínas reguladoras del PTPm, se observó un aumento significativo en la CRC tanto en mitocondrias que se energizaron con succinato como en presencia de Pal-CoA 2,5 μM . Sin embargo, este aumento en la CRC inducida por la CsA fue menor en presencia de 5 y 10 μM de Pal-CoA (figura 12-A).

Se ha descrito que la actividad del translocador de nucleotidos de adenina (ANT) inducida por ADP regula la inducción de PTPm en mitocondrias¹⁵³. La adición de 250 μM de ADP a las mitocondrias energizadas con succinato aumentó el CRC en mitocondrias control, mientras que las mitocondrias SM no mostraron cambios (figura 12-B). En presencia de altas concentraciones de Pal-CoA (5 y 10 μM), las mitocondrias

control y SM perdieron su sensibilidad al ADP lo que colapsó su CRC (figura 12-B). Debido a que las ERO están involucradas en la inducción del PTPm, se adicionaron 100 U de catalasa para inhibir la formación de H₂O₂ inducida por Pal-CoA lo que podría prevenir la formación del PTPm inducido por Pal-CoA.

No obstante, la catalasa no suprimió el PTPm inducido por Pal-CoA, además, la catalasa redujo el CRC en mitocondrias control y SM en presencia de Pal-CoA 2,5 y 5µM (figura 12-C). La generación de ERO inducida por Pal-CoA podría estar mediada por Pal-CoA oxidasa peroxisomal, que podría estar presente en cantidades traza en nuestra preparación de mitocondrias.

Por lo cual, se utilizó tioridazina, un inhibidor de Pal-CoA oxidasa, para investigar la participación de ERO en la inducción del PTPm. La figura 12-D muestra que la tioridazina, así como la catalasa, no afectaron en la disminución del CRC inducida por Pal-CoA a alta concentración.

En cambio, la tioridazina actuó sinérgicamente con Pal-CoA, colapsando significativamente el CRC en ambos tipos de mitocondrias. Al utilizar el precursor del Pal-CoA, es decir, el C16:0 a una concentración de 2,5 µM, la figura 12-E muestra que el C16:0 induce una disminución del CRC en las mitocondrias control a niveles comparables a los de las mitocondrias SM. Ésta disminución es inhibida por CsA, pero no por ADP (figura 12-F). Además, las mitocondrias control son más sensibles a CsA que las mitocondrias SM.

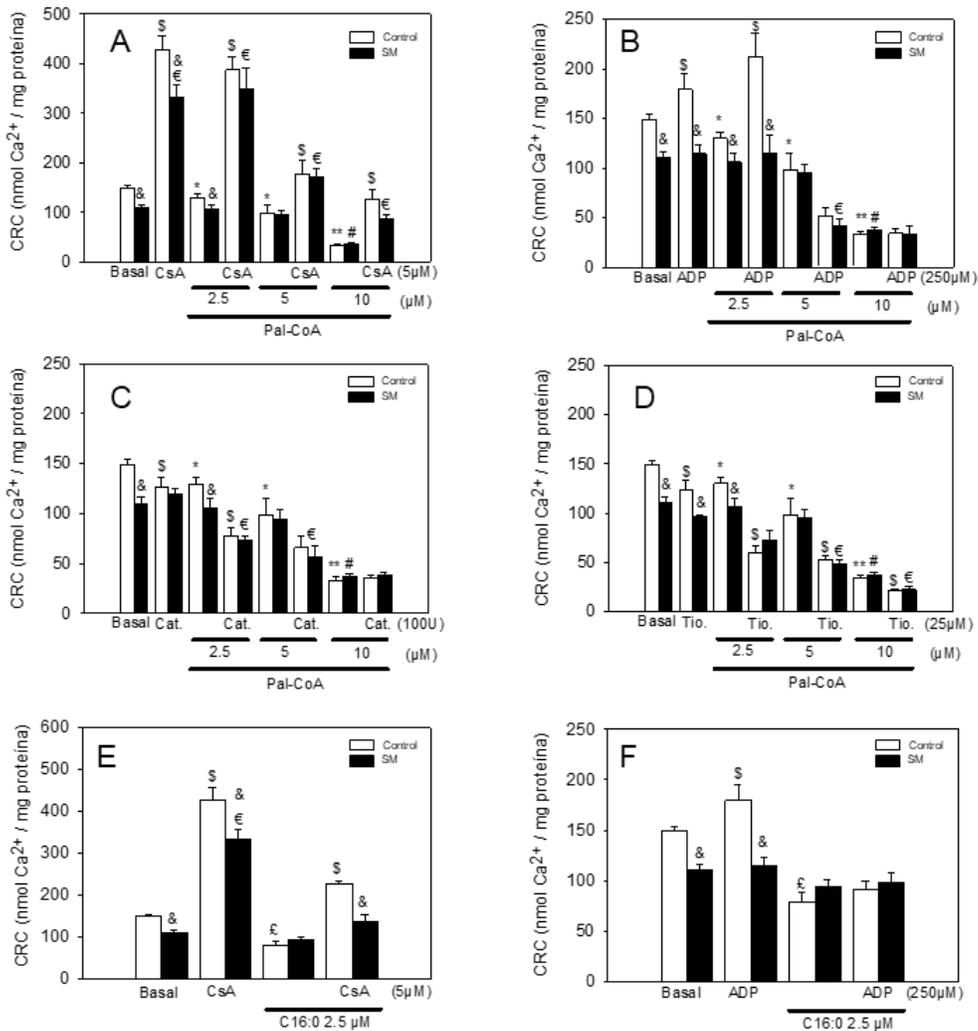


Figura 12. Capacidad de retención de calcio (CRC) inducida por Pal-CoA. El panel A en presencia de CsA; panel B en presencia de ADP; panel C en presencia de catalasa; panel D en presencia de tioridazina. Los paneles E y F corresponden al efecto del ácido palmítico (C16:0) sobre la CRC en presencia de CsA y ADP respectivamente. Los valores se expresan como media \pm EE ($n = 6$ a 8 animales diferentes). * ($P \leq 0.05$) y ** ($P \leq 0.001$) corresponden a C vs C + Pal-CoA; # ($P \leq 0.001$) corresponde a SM frente a SM + Pal-CoA; & ($P \leq 0.05$) corresponde a C vs SM. \$ ($P \leq 0.05$) corresponde a C frente a C + todos los inhibidores usados; € ($P \leq 0.05$) corresponde a SM vs SM + todos los inhibidores utilizados; £ ($P \leq 0.001$) corresponde a C frente a C + C16:0; & ($P \leq 0.05$) corresponde a C vs SM.

Expresión de proteínas implicadas en la formación del PTPm.

Para explicar el posible mecanismo por el cual el Pal-CoA afecta a la liberación de cit-*c* y al CRC, se analizó el contenido total del ANT, CypD y el VDAC, proteínas reguladoras de la apertura del PTPm. Las inmunorrélicas tipo *Western blot* representativas no muestran diferencias significativas en la intensidad de las bandas de las tres proteínas analizadas tanto en mitocondrias control como en SM. Además, se observa en las figuras 13-A, 13-B y 13-C, correspondientes a las proteínas ANT, CypD y VDAC, respectivamente, que no hay diferencia en la densidad óptica de las bandas entre las mitocondrias SM y C.

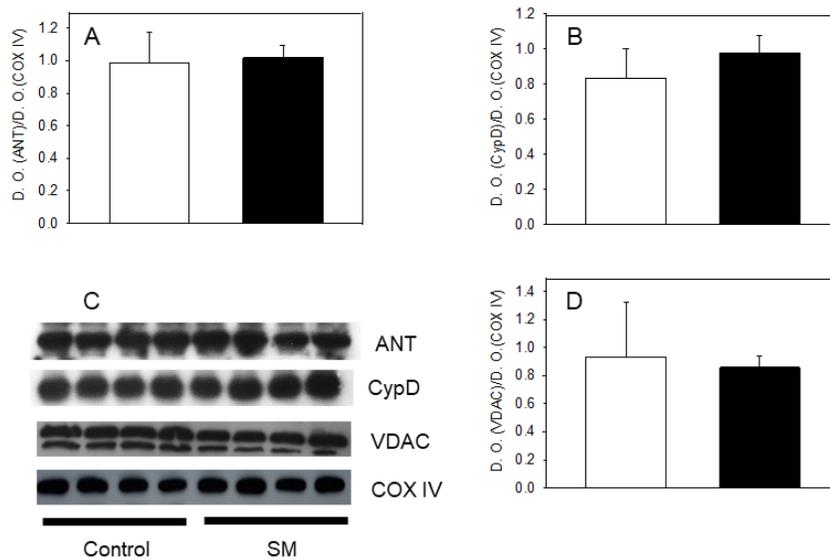


Figura 13. Contenido de proteínas implicadas en la formación del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm). Los paneles A, B y D representan la relación de la densidad óptica (D.O.) de las bandas correspondientes a ANT (A), Ciclofilina D (B) y canal aniónico de voltaje (D) usando como control de carga COX IV, respectivamente. Los valores están expresados como la media \pm EE (n= 6 animales diferentes).

La incubación de las mitocondrias en presencia de Pal-CoA y C16:0 disminuye parcialmente el contenido total de CL.

Hasta el momento hemos confirmado que el Pal-CoA aumenta la liberación del cit-c a través del aumento generación de H₂O₂ y la posible inducción del PTPm, no obstante, se desconoce el efecto que tendría este acil-CoA directamente sobre la CL. Por lo cual, se estudió el efecto del Pal-CoA y su precursor, el C16:0 sobre la composición lipídica de la CL.

Al respecto, se incubaron 10 mg de mitocondrias con 100 μM C16:0 o Pal-CoA durante 15 minutos a 30°C en agitación constante, posteriormente se realizó la extracción de fosfolípidos totales y el botón resultante se analizó mediante espectrometría de masas (MS). El análisis por espectrometría de masas no mostró diferencias significativas en la cantidad total de CL entre control y SM (19.05 ± 5.07 frente a 16.68 ± 2.08 nmol/mg de proteína). La adición tanto de Pal-CoA como de C16:0 en mitocondria aislada redujo de manera discreta la cantidad total de CL sin alcanzar una diferencia estadísticamente significativa con respecto a las condiciones basales (tabla VI).

La proporción de las principales especies moleculares de CL detectadas en mitocondrias control y SM se muestran en la tabla VI. En mitocondrias con SM hay un aumento en el grupo de (C70) CL (P<0.001) que corresponden a una CL enriquecida en C16:0. Sin embargo, el grupo de (C72) CL correspondiente a m/z: 1448.2 a 1450.2 y que corresponden a tetra-linoleil-CL (CL compuesta de 4 cadenas de C18:2), se redujo en mitocondrias con SM (P<0.05) en comparación de mitocondrias control, tal como se reportó previamente¹⁴³. Además, en la tabla VI se observa que el grupo de (C74) CL correspondiente a las especies de CL enriquecidas en ácidos linoleico (C18:2) y araquidónico (C20:0) tuvo una disminución que no alcanza diferencias significativas entre mitocondrias con SM y controles.

En mitocondrias tratadas con C16:0, se observa que el grupo (CL70) CL correspondiente a m/z 1424.2 y 1426.1 está aumentado (P<0.05), mientras que el grupo (CL72) CL se mantiene disminuido (P <0.001) en mitocondrias con SM. En cuanto al tratamiento de las mitocondrias con Pal-CoA, el grupo (CL72) que corresponde a m/z: 1448.2, 1450.2 y 1452.2, no se detecta enriquecimiento de la CL con C18:2, no obstante, disminuye la concentración de CL tanto en mitocondrias controles como con SM sin

alcanzar diferencia significativa. También se observa una disminución en la concentración del grupo (CL72) m/z: 1476.2 que corresponde a la CL enriquecida con ácido araquidónico (P<0.05) en mitocondrias controles. En mitocondrias con SM el tratamiento con Pal-CoA no mostró efecto (tabla VI).

Tabla VI. Especies moleculares de CL en mitocondrias

CL grupo	m/z	Control	SM	Control	SM	Control	SM
		Basal	Basal	C16:0	C16:0	Pal-CoA	Pal-CoA
<i>CL (68)</i>	1400.257	0.84 ± 0.21	0.76 ± 0.11	0.72 ± 0.16	0.67 ± 0.11	0.40 ± 0.11 ×	0.72 ± 0.22 ▣
	1402.149	0.81 ± 0.14	0.73 ± 0.11	0.62 ± 0.07	0.69 ± 0.14	0.66 ± 0.20	0.73 ± 0.24
	1404.156	0.90 ± 0.11	0.70 ± 0.15	0.67 ± 0.07 #	0.89 ± 0.33	0.74 ± 0.26	0.68 ± 0.09
<i>CL (70)</i>	1424.201	0.91 ± 0.14	1.73 ± 0.22 *	0.86 ± 0.10	1.53 ± 0.34°	0.70 ± 0.21	1.67 ± 0.19 ▣▣
	1426.065	0.82 ± 0.08	1.18 ± 0.16 **	0.65 ± 0.08 #	1.07 ± 0.16°	0.58 ± 0.09 ×	1.13 ± 0.16 ▣▣
	1428.263	0.76 ± 0.11	0.83 ± 0.07	0.83 ± 0.16	0.80 ± 0.18	0.61 ± 0.08	0.90 ± 0.30
<i>CL (72)</i>	1448.216	4.47 ± 1.78	2.35 ± 0.23 **	4.47 ± 0.64	2.11 ± 0.27 °°	3.62 ± 1.25	2.20 ± 0.29
	1450.235	3.56 ± 1.18	2.54 ± 0.18**	3.64 ± 0.62	2.34 ± 0.38°	2.86 ± 0.77	2.54 ± 0.32
	1452.233	1.90 ± 0.45	1.80 ± 0.17	1.81 ± 0.19	1.62 ± 0.30	1.42 ± 0.34	1.72 ± 0.19
	1472.261	1.06 ± 0.32	1.08 ± 0.26	0.88 ± 0.16	0.76 ± 0.22	0.91 ± 0.16	0.85 ± 0.12
<i>CL (74)</i>	1474.237	1.13 ± 0.26	1.23 ± 0.21	0.99 ± 0.12	1.11 ± 0.24	0.90 ± 0.16	1.21 ± 0.42
	1476.219	1.06 ± 0.13	0.96 ± 0.15	0.96 ± 0.08	0.92 ± 0.18	0.77 ± 0.16 ×	0.90 ± 0.18
	1478.413	0.84 ± 0.18	0.77 ± 0.06	0.71 ± 0.03	0.71 ± 0.16	0.58 ± 0.13	0.86 ± 0.23 ▣
<i>Total</i>		19.05 ± 5.07	16.68 ± 2.08	17.84 ± 2.47	15.24 ± 3.04	14.75 ± 3.91	16.12 ± 2.95

Los valores están expresados como nmol/mg de proteína y corresponden a la media ± DE (n = 4 animales diferentes). El porcentaje de cada especie se calculó a partir de los conteos de abundancia de cada especie en relación con la abundancia total de todas las especies identificadas. * P<0.001 C basal vs SM basal; ** P<0.05 C basal vs SM basal; ° P<0.05 C C16:0 vs SM C16:0; °°P <0.001 C C16:0 vs SM C16:0; ▣ P<0.05 C Pal-CoA vs SM Pal-CoA; ▣▣ P <0.001 C Pal-CoA vs SM Pal-CoA; # P<0.05 C basal vs C C16:0 y × P<0.05 C basal vs C Pal-CoA.

Por otro lado, en la figura 14 se muestran los espectros de las diferentes especies de CL en el ión [M-H] cargado negativamente en mitocondrias de control y SM en presencia o ausencia de tratamiento con C16:0 y Pal-CoA. En todos los espectros, los iones en m/z: 1401.5, 1425.5, 1450.3 y 1472.4 corresponden a especies CL que contienen (C68) CL, (C70) CL, (C72) CL y (C74) CL, respectivamente.

Sin embargo, no se observan nuevos grupos correspondientes a CL oxidada, m/z: 1482 correspondiente a CL (C74-OOH) y de m/z: 1529 correspondiente a CL (C76-OOH) en mitocondrias control y SM, debido a la generación exacerbada de H₂O₂ inducida por Pal-CoA. Tampoco fueron aparentes los grupos correspondientes a sus derivados hidroxilados (C74-OH) CL en m/z: 1482-16, y (C76-OH) CL en m/z: 1529-16 (16 corresponde a la masa atómica de oxígeno).

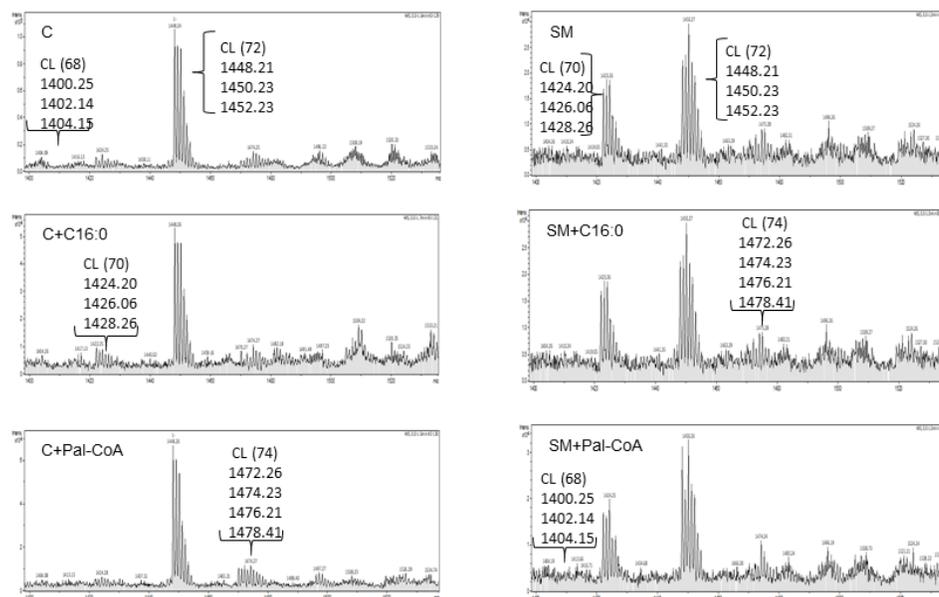


Figura 14. Efecto de Pal-CoA y del C16:0 en espectros de masas de especies de moléculas de cardiolipina (CL) de mitocondrias de control y SM. Se realizó una exploración entre m / z: 1000 a 1500 para identificar las diferentes especies moleculares de CL. En ambos espectros, los grupos de iones en m / z: 1426, 1448 y 1472 coinciden con las especies de CL que contienen, (C70), (C72) y (C74), respectivamente. El grupo (C72) CL (m / z: 1448) corresponde a diferentes especies de CL que contienen cuatro ácidos linoleicos (C18: 2) 4CL. El grupo (C70) CL (m / z: 1425,5) corresponde a (C18: 2) 3 (C16: 0) CL donde el ácido linoleico está sustituido por un ácido palmítico. El grupo 1472 (C74) corresponde a la sustitución de un ácido linoleico por un ácido araquidónico (18: 2) 3 (C20: 4) CL.

Los marcadores apoptóticos disminuyen en el hígado de ratas con SM.

Se ha reportado que la progresión de la enfermedad de HGNA está íntimamente ligada al aumento del estrés oxidante asociado a la lipotoxicidad y la apoptosis^{6, 32, 36, 37}. Para determinar si nuestro modelo de SM se encuentra cursando hacia en una etapa más avanzada del HGNA, se evaluaron diversos marcadores apoptóticos.

Fragmentación del ADN.

La degradación del ADN en fragmentos oligonucleosomales, que se identifican en una escalera cuando el ADN genómico es analizado por electroforesis en gel de poliacrilamida es un marcador de la muerte celular por apoptosis¹⁵⁴. En la figura 15 podemos observar una ausencia total de fragmentos oligonucleosomales de 180 a 200 pares de bases y sus múltiplos en ambos grupos experimentales en comparación con el marcador de peso molecular.

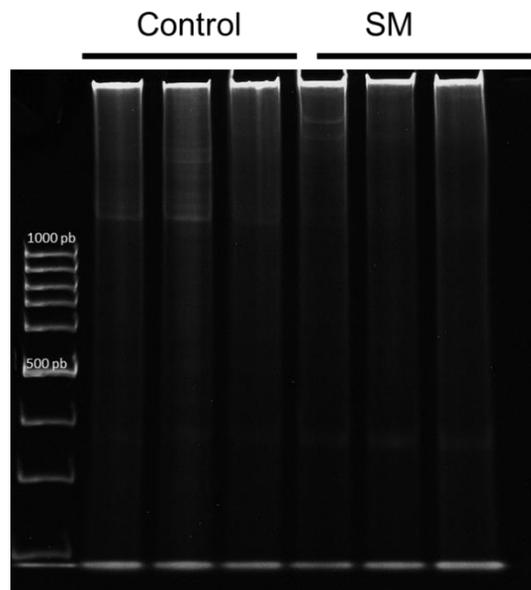


Figura 15. Fragmentación del ADN extraído de hígado de animales controles y con SM, en ambos grupos se observa el ADN integro

Análisis de Apaf-1 por inmunorréplica tipo Western Blot.

El factor Apaf-1 es un regulador clave de la vía intrínseca; que junto con la procaspasa-9 y el cit-c forman el apoptosoma. Cuando Apaf-1 se une al cit-c, efectúa un cambio conformacional que induce su oligomerización, debido a esto su dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) queda expuesto y con este cambio puede reclutar a pro-caspasa 9, la cual se activa dentro del apoptosoma. Una vez formado el apoptosoma este activa sucesivamente a las caspasas efectoras desencadenando la cascada apoptótica. En la figura 16-A se observa que no existen diferencias significativas en el contenido de Apaf-1 entre el homogenado total de hígado control y SM.

Análisis de Caspasa 3 activa por inmunorréplica tipo Western Blot.

La caspasa 3 es una proteasa efectora que al ser liberada de su inhibidor ICAD (Inhibidor de la Desoxiribonucleasa Activada por Caspasas) activa a CAD/DFF40, una DNasa la cual fragmenta el material genético en fragmentos de 50 a 300 kb y posteriormente en pequeños fragmentos de 180 a 200 pb¹³³. Se observó una disminución del 40% en la cantidad de Caspasa 3 activa en el SM en comparación con los controles ($P < 0.05$) (figura 16-B).

Análisis de P53 por inmunorréplica tipo Western Blot.

La proteína p53 es un factor de transcripción implicado en una variedad de procesos celulares importantes, incluida la detención del ciclo celular, la senescencia, la reparación del ADN, la función antioxidante, la regulación metabólica y la apoptosis. Cuando aumentan las señales celulares de estrés tales como el daño del ADN, la hipoxia, el aumento de las ERO, etc. activan a p53 y aumenta rápidamente su concentración intracelular lo que desencadena, por ejemplo, la expresión de genes como BAX para el proceso apoptótico¹⁵⁵. La figura 16-D muestra que no existe diferencia significativa en el contenido total de p53 entre ambos grupos.

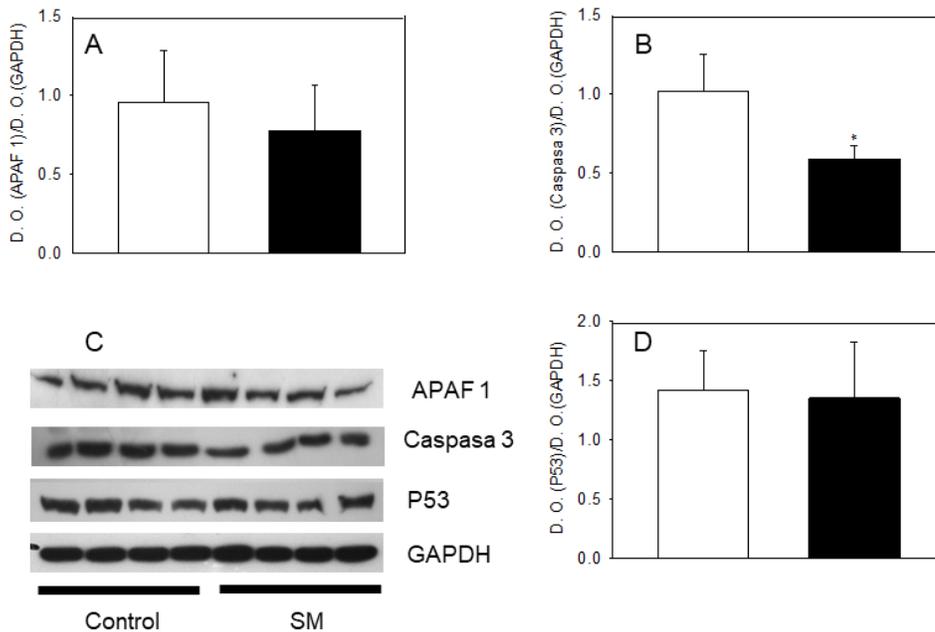


Figura 16. Contenido de proteínas implicadas en el proceso apoptótico en homogenado total de hígado. Los paneles A, B y D representan la relación de la densidad óptica (D.O.) de las bandas correspondientes a APAF 1 (A), Caspasa 3 (B) y P53 (D) usando GAPDH como control de carga, respectivamente. El panel C corresponde a una inmunorréplica tipo Western Blot representativa de 4 animales diferentes. El asterisco muestra diferencia significativa $*P < 0.05$. Los valores están expresados como la media \pm DE (n= 6 animales diferentes).

Análisis de AIF por inmunorréplica tipo Western Blot.

El factor inductor de la apoptosis (AIF) está localizado en el espacio intermembranal de la mitocondria. Su liberación hacia el citosol y su translocación hacia el núcleo da la señal a la célula para condensar sus cromosomas y fragmentarlos previo a la apoptosis. Su análisis por inmunorréplica tipo *Western Blot* muestra un aumento del 30% ($P < 0.05$) en el contenido de esta proteína en mitocondrias de hígado de los animales con SM en comparación con mitocondrias controles (figura 17-A).

Análisis de cit-c por inmunorréplica tipo Western Blot.

El cit-c es una proteína encargada de transportar los electrones entre el complejo III y IV, al ser liberado hacia el citosol, se une a Apaf-1 y pro-caspasa 9 para formar el apoptosoma y desencadenar el proceso apoptótico. En la figura 17-B se observa que no hay diferencia significativa en el contenido total de cit-c entre las mitocondrias de animales control y SM.

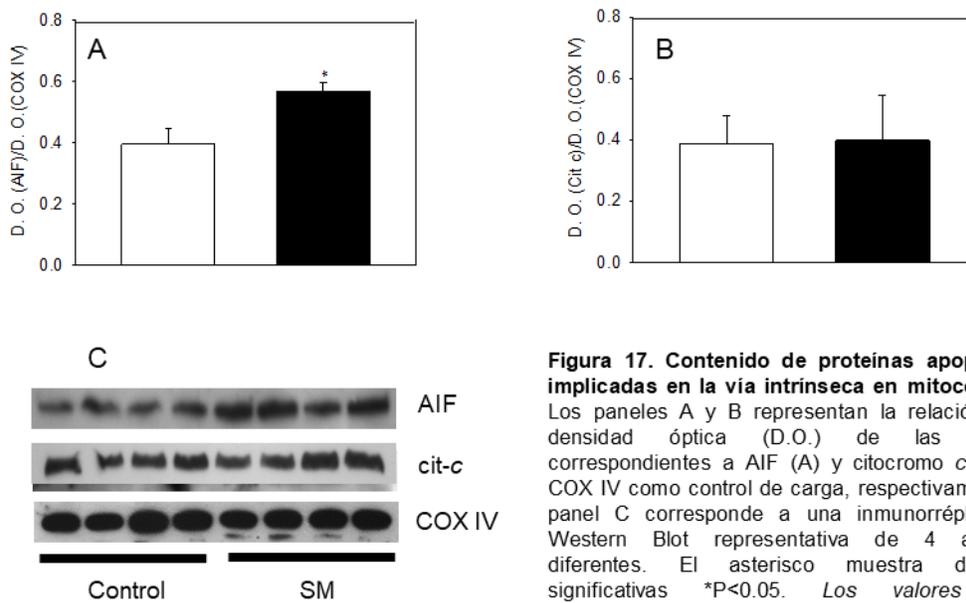


Figura 17. Contenido de proteínas apoptóticas implicadas en la vía intrínseca en mitocondrias. Los paneles A y B representan la relación de la densidad óptica (D.O.) de las bandas correspondientes a AIF (A) y citocromo c usando COX IV como control de carga, respectivamente. El panel C corresponde a una inmunorréplica tipo Western Blot representativa de 4 animales diferentes. El asterisco muestra diferencia significativas * $P < 0.05$. Los valores están expresados como la media \pm DE (n= 6 animales diferentes).

Actividad de Caspasa 9.

La caspasa 9 es una proteasa iniciadora del proceso apoptótico, su activación se da por interacción con el apoptosoma, específicamente con Apaf-1, que promueve la autocatálisis del zimógeno de pro-caspasa 9, dando como resultado una caspasa 9 con actividad catalítica capaz de activar a caspasas efectoras como la caspasa 3 y 7¹⁵⁶. La actividad de caspasa 9 se evaluó por espectrofotometría en el homogenado total de hígado y se observó que su actividad se encuentra disminuida en un 30% ($P < 0.05$) en el hígado de animales con SM con respecto a los controles (figura 18).

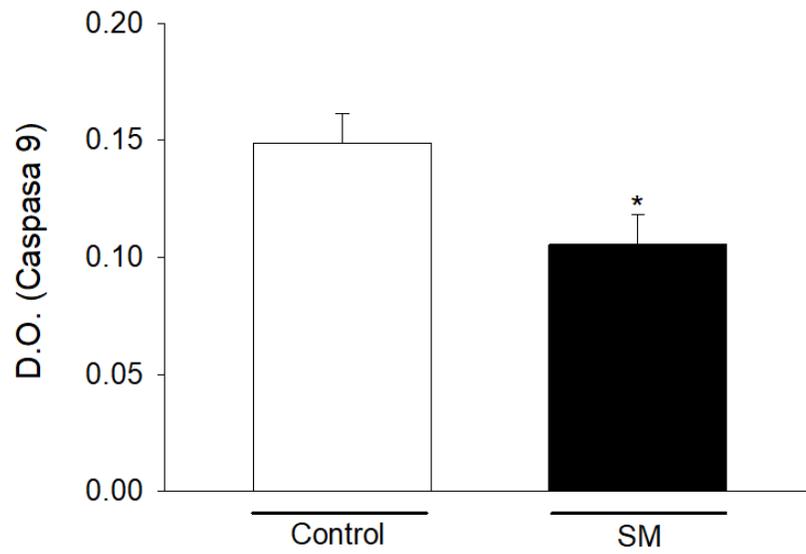


Figura 18. Actividad de Caspasa 9 en homogenado total de hígado. La barra blanca corresponde a control; la barra negra corresponde SM. Los valores están expresados como la media \pm EE (n=6 animales diferentes) *P<0.05.

Discusión.

Nuestro modelo de alteración metabólica y cardiovascular^{136, 157} deriva del modelo de Reaven¹⁵⁸. A diferencia del modelo de Reaven que tuvo una dieta alta en sacarosa (60%) en alimentos sólidos durante 6 a 10 semanas, el modelo desarrollado por nuestro grupo consume una proporción menor de azúcar refinada (30%) en el agua de bebida por un período más largo, de 16 a 24 semanas. Como en otros trabajos previos, este trabajo demostró que el consumo de sacarosa induce hipertensión e hipertrigliceridemia con un alto nivel de AGNE que están asociados a la acumulación de grasa intra-abdominal¹⁴⁰.

El modelo experimental también desarrolla diferentes alteraciones metabólicas similares a las que presentan los pacientes con SM reflejando la realidad que se observa en la población mexicana, la cual ocupa un lugar prominente en el consumo de bebidas gaseosas, las cuales contribuyen con el 70% del total de azúcares agregados en la dieta, y representa el 10% de todas las calorías consumidas¹⁵⁹.

En trabajos previos se describió que el modelo experimental desarrolla RI con altos niveles de marcadores de estrés oxidativo en diferentes órganos y también desarrolla hipertensión con alteraciones en la reactividad vascular debido a un aumento de ERO y a la actividad de la NADPH-oxidasa^{160, 161}.

Por otro lado, se ha encontrado una relación directa entre los AGNE y la acumulación de grasa intra-abdominal como características de la lipotoxicidad¹⁶². Además, la acumulación hepática de triglicéridos y AGNE indica el desarrollo de una esteatosis simple en el hígado de los animales con SM^{81, 163} que es confirmada por el análisis histoquímico del hígado utilizando el rojo oleoso marcador de lípidos en el tejido hepático (datos no publicados).

Efecto del C16:0 y Pal-CoA sobre la función mitocondrial.

El aumento de la concentración del C16:0 en el hígado de ratas con SM es un marcador de alta actividad lipogénica debido a un mayor metabolismo de la glucosa hacia la biosíntesis de ácidos grasos¹⁶⁴. Así mismo, se observó un incremento en C16:1 producto de la desaturación del C16:0, el cual se sintetiza como mecanismo de protección en contra de la lipotoxicidad¹⁶⁵. Sin embargo, el aumento en la concentración del C16:0 tanto en el homogeneizado de hígado como en las mitocondrias de ratas con SM no está asociado con la función de las mitocondrias.

En este estudio, no se encontraron diferencias en el consumo de O₂ ni en el control respiratorio entre las mitocondrias control y con SM oxidando tanto succinato como glutamato/malato. No obstante, al agregar 10 μM de C16:0 o Pal-CoA exógeno actúan de forma diferente sobre el consumo de oxígeno mitocondrial. Por un lado, el Pal-CoA inhibe el consumo de oxígeno en el estado III oxidando succinato y el control respiratorio tanto en las mitocondrias controles como en las de SM¹⁶⁶, probablemente al efecto inhibitor del Pal-CoA sobre el ANT¹⁶⁷, por otro lado, el C16:0 estimula el consumo de oxígeno en el estado IV sólo en las mitocondrias con SM, probablemente debido a su efecto de protonóforo y desacoplante de la fosforilación oxidativa¹⁶⁸.

El Pal-CoA también interfiere en el transporte de electrones disminuyendo el contenido de cit-c de las mitocondrias, interrumpiendo así el flujo de electrones del complejo III al complejo IV e inhibiendo la biosíntesis de ATP, tal y como se ha descrito para las mitocondrias de corazón y de cerebro de rata¹⁶⁹. En este trabajo, encontramos que el Pal-CoA incrementa en mayor medida la liberación de cit-c de las mitocondrias de animales control y SM en comparación con el succinato. Sin embargo, la liberación de cit-c en presencia de succinato o Pal-CoA sigue siendo menor en mitocondrias de hígado de animales con SM con respecto a los controles, a pesar del aumento de la generación de H₂O₂ en las mitocondrias con SM inducido por Pal-CoA o succinato¹⁶⁶.

Las mitocondrias de hígado de ratas con SM generan H₂O₂ a una velocidad mayor que su correspondiente control cuando oxidan succinato o piruvato/malato¹⁴³. Sin embargo, el Pal-CoA aumenta la generación de H₂O₂ mucho más que cuando las mitocondrias son energizadas con succinato, tanto en mitocondrias controles como del modelo de SM¹⁶⁶. La generación exacerbada de H₂O₂ por el Pal-CoA se debe probablemente a la

presencia de trazas de peroxisomas en las preparaciones de mitocondrias que pueden participar en la generación de H_2O_2 durante la beta-oxidación parcial del Pal-CoA por la Pal-CoA oxidasa como se ha descrito en otros trabajos^{146, 170}.

De hecho, la generación de H_2O_2 en mitocondrias por Pal-CoA es sensible a la actividad de la catalasa y a la tioridazina, un inhibidor de la Pal-CoA oxidasa peroxisomal. Estas observaciones sugieren que trazas de peroxisomas presentes en la preparación de las mitocondrias pueden contribuir al aumento en las concentraciones de H_2O_2 liberado por las mitocondrias inducido por Pal-CoA y puede participar en el aumento del cit-c liberado por las mitocondrias. Sin embargo, la liberación de cit-c desde las mitocondrias con SM no se previene con catalasa ni con tioridazina, lo que sugiere que la liberación de cit-c inducida por Pal-CoA no está asociada a la generación de ROS externas desde el peroxisoma¹⁶⁶.

Pal-CoA y la transición de la permeabilidad de la membrana mitocondrial.

La formación del PTPm y la liberación de cit-c del espacio intermembranal de la mitocondria son características importantes que definen el proceso apoptótico. La formación del PTPm da como resultado una apertura que comunica el citoplasma directamente con la matriz mitocondrial, una estructura formada por el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), ubicado en la membrana externa mitocondrial, el ANT en la membrana interna, la ciclofilina D (CypD), sensible a ciclosporina A (CsA) en la matriz mitocondrial, y por la F1Fo ATPasa que puede coincidir con el PTPm¹⁷¹.

El PTPm se induce por un aumento intra-mitocondrial del Ca^{2+} así como las ERO. Las aperturas transitorias del poro liberan el exceso del Ca^{2+} que se acumula en la mitocondria; sin embargo, las aperturas prolongadas pueden inducir hinchamiento osmótico de la mitocondria por una entrada masiva de agua, lo que conlleva a la ruptura de la membrana externa mitocondrial y la muerte celular.

La liberación de cit-c inducida por Pal-CoA es sensible a la CsA, lo que sugiere la participación del mecanismo de la apertura del PTPm¹⁶⁶. Durante mucho tiempo, se ha descrito que los AGNE inducen la apertura del PTPm por su efecto protonóforo y

desacoplante con la disminución de la síntesis de ATP mitocondrial^{146, 170}. Sin embargo, el Pal-CoA no ejerce dicho efecto de desacoplamiento protonóforo en las mitocondrias, pero tiene la característica de funcionar como inhibidor del ANT, un elemento importante del PTPm^{167, 172}.

La baja capacidad de retención de Ca^{2+} (CRC) de las mitocondrias con SM refleja la sensibilidad de éstas a la apertura del PTPm inducida por Ca^{2+} . En presencia de Pal-CoA, el umbral de Ca^{2+} necesario para la inducción del PTPm es menor y se observa un colapso de la CRC de las mitocondrias con ambas concentraciones utilizadas (5 y 10 μM)¹⁶⁶. Estos efectos son prevenidos por CsA y no por ADP, indicando que la inhibición de ANT por Pal-CoA previene el efecto de ADP para restaurar el CRC de las mitocondrias controles y de SM.

La apertura del PTPm inducida por el Pal-CoA en las mitocondrias también puede estar mediada por la generación exacerbada de H_2O_2 inducida por el Pal-CoA. De hecho, se ha observado que las ERO están implicadas en la oxidación de los grupos tioles de las proteínas de membrana, como la cisteína160 (Cys160) del ANT, que está cerca del sitio de unión del nucleótido de adenina y cuya oxidación suprime la capacidad del ADP para inhibir la apertura del PTPm^{173, 174}.

Sin embargo, la apertura del poro en ambas muestras mitocondriales no se ve impedida por la catalasa ni por la tioridazina, que impiden la generación de H_2O_2 estimulada por el Pal-CoA¹⁶⁶. Estas observaciones sugieren que la apertura del poro de la PTPm causada por el Pal-CoA no implica la generación externa de H_2O_2 y que el Pal-CoA puede actuar probablemente inhibiendo la actividad de ANT o por su interacción con la membrana lipídica mitocondrial. De hecho, ANT interactúa con la CypD, una proteína de la matriz mitocondrial que forma parte del PTPm que es sensible al péptido inhibidor CsA al unirse a la CypD¹⁷⁵.

La susceptibilidad de las mitocondrias a la transición de permeabilidad inducida por el Ca^{2+} está asociada con cambios en los niveles de expresión de CypD, del ANT, así como de VDAC que son los principales componentes del PTPm^{176, 177}. Por lo tanto, la falta de diferencia encontrada en la expresión de CypD, ANT o de VDAC sugiere que la diferencia en la susceptibilidad a la apertura del PTPm inducida por Ca^{2+} entre las

mitocondrias control y SM no está relacionada con la expresión de las proteínas reguladoras del poro¹⁶⁶.

Se ha descrito que el Pal-CoA interactúa superficialmente con la membrana al unirse al cit-c¹⁷⁴. Sin embargo, debido a la parte hidrofílica de la CoA, no puede difundirse a través de la membrana interna. Además, por la parte hidrofóbica saturada, puede insertarse en la membrana lipídica induciendo cambios en sus propiedades físicas que influyen en la actividad de los complejos respiratorios¹⁷⁸ y probablemente en la liberación del cit-c. Asimismo, el Pal-CoA al aumentar la liberación de cit-c de las mitocondrias del modelo de SM, puede participar en el progreso de la esteatosis hepática hacia una enfermedad más grave, como la esteatohepatitis, por un mecanismo que implica la liberación de cit-c y la apertura del PTPm.

Pal-CoA y CL.

La disminución de la liberación de cit-c por las mitocondrias del modelo de SM en comparación con las mitocondrias controles, ambas bajo el efecto de Pal-CoA, puede estar relacionada con la composición lipídica de la CL. En presencia de H₂O₂, el cit-c adquiere actividad de peroxidasa, oxidando así la CL y rompiendo las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, y por consecuencia la disociación del cit-c de la membrana lipídica^{179, 180}.

La interacción entre la CL y el cit-c parece depender de la composición de ácidos grasos de la CL, en condiciones fisiológicas está principalmente compuesta por un ácido graso poliinsaturado, el ácido linoleico¹⁸⁰. En este estudio, se analizó por espectrometría de masas la composición lipídica de la CL en mitocondrias de hígado del modelo con SM. Se encontró que en mitocondrias con SM la CL está enriquecida con ácidos grasos saturados como el C16:0 y el C18:1, haciendo a la CL más resistente a la peroxidación lo que se reflejó en una menor liberación del cit-c en las mitocondrias de este grupo, como se ha descrito previamente⁷.

De hecho, los hidroperóxidos de CL o sus correspondientes hidroxilos que son productos de la oxidación de la CL se identificarían en los grupos m/z: 1482, 1466 y 1522 y 1506 correspondientes a (C74-OOH) CL, (C74-OH) CL, (C76-OOH) CL y (C76-OH) CL respectivamente, sin embargo, no fueron detectados claramente en el espectro de masa (figura 14). Estas observaciones sugieren que el enriquecimiento de la CL con C16:0, debido a su alta disponibilidad en el hígado del modelo con SM, la hace más resistente a la oxidación a pesar de la excesiva generación de H₂O₂ inducida por el Pal-CoA. Además, los productos de oxidación de la CL que resultan de la actividad de peroxidasa de cit-c, están implicados en la oligomerización de BAX/BAK para formar un poro en la membrana externa de la mitocondria a través del cual el cit-c se libera de la mitocondria al citosol^{130, 181}.

En resumen, la liberación de cit-c inducido por Pal-CoA tanto en mitocondrias del modelo de SM como en los controles puede atribuirse a la apertura del PTPm debido a la sensibilidad a la CsA en las mitocondrias. Además, los resultados sugieren la interacción directa de Pal-CoA con la membrana mitocondrial y con las proteínas relacionadas con el PTPm. Sin embargo, la disminución de la liberación de cit-c de las mitocondrias con SM, puede atribuirse a cambios en la composición de las especies moleculares de CL. A pesar de la reducción de la liberación de cit-c en las mitocondrias del modelo con SM, el aumento significativo de la liberación de cit-c inducido por el Pal-CoA en ambos tipos de mitocondrias sugiere que el Pal-CoA puede contribuir a la muerte celular por apoptosis por medio de cambios en la función mitocondrial.

CL y muerte celular programada (apoptosis).

Se ha reportado en ratones diabéticos, la oxidación de la CL debido al aumento en la generación de ERO en respuesta a altas concentraciones de glucosa y AGNE especialmente C16:0, lo cual desencadenó el proceso apoptótico en las células β de los islotes pancreáticos de ratón¹⁸². Asimismo, en el miocardio diabético se reportó la pérdida de la especie de CL más abundante, la tetra-linoleil-CL, dicha alteración en el perfil lipídico de la CL ocurrió al quinto día de tratamiento con estreptozotocina, lo cual

contribuye a la disfunción mitocondrial lo que podría explicar la ineficiencia en la utilización de sustratos y la disfunción diastólica manifestada en corazones diabéticos¹⁸³.

En mitocondrias de corazón de rata sometidas a isquemia, se ha reportado, una disminución en el nivel de CL, así como un aumento en la oxidación de la misma. Está oxidación/agotamiento de la concentración de la CL parece ser responsable de la disminución en la actividad del complejo I y complejo III. Además, la oxidación de CL debido a la isquemia puede estar implicada en la liberación de cit-c y la apoptosis en mitocondrias aisladas¹⁸⁴.

Al respecto, en mitocondrias aisladas de corazón de rata se ha demostrado que la adición de CL oxidada exógena sensibiliza a las mitocondrias a la apertura del PTPm inducida por Ca^{2+} . El tratamiento con concentraciones micromolares de CL oxidada dio lugar al hinchamiento de la matriz mitocondrial de manera dosis dependiente, sin embargo, la CsA y el ácido bongkrékico inhibieron estos eventos lo que sugiere la participación del ANT en la inducción de PTPm dependiente de CL oxidada¹⁸⁵.

Por otro lado, se ha reportado en la lesión renal aguda la translocación de la CL de la MIM, al estar expuesta en la MEM la CL se une con LC3 lo cual actúa como señalización para inducir la mitofagia, donde también puede interactuar con Beclin 1, un regulador central en la etapa inicial de la formación del fagóforo, en el contexto de la lesión renal aguda la mitofagia se considera un mecanismo de protección debido a que eliminan las mitocondrias dañadas y disminuyendo tanto la inflamación local como el daño oxidativo¹⁸⁶.

Nuestro trabajo sugiere que el enriquecimiento de la CL en ácidos grasos saturados, específicamente C16:0, lo que reduce su susceptibilidad a la oxidación y, por lo tanto, a la disociación del cit-c de la membrana interna mitocondrial lo que influye sobre el proceso apoptótico en hígado de los animales con SM.

Para que se lleve a cabo la liberación del cit-c debe ocurrir la disociación del complejo que forma con la CL, por un mecanismo que implica la peroxidación de la CL y la formación del poro de oligómeros de BAX y BAK que permita la salida del cit-c al citosol. En el hígado graso del modelo de SM la liberación de cit-c por parte de las mitocondrias está disminuida por el enriquecimiento de la CL en ácidos saturados como el C16:0^{166, 187, 188}, aunque la generación de ERO está aumentada en las mitocondrias de hígado con SM en comparación con las mitocondrias de controles^{143, 189, 190}.

Además, el C16:0 afecta la función mitocondrial tanto en mitocondrias aisladas como en cultivo de células^{191, 192}, y su efecto está asociado a la muerte celular por apoptosis a través de diferentes mecanismos, incluyendo su activación a Pal-CoA¹⁹³.

Por otro lado, la apoptosis en el hígado ha sido descrita como un importante mecanismo implicado en el desarrollo y la progresión de la enfermedad del HGNA. Los pacientes con HGNA y los modelos experimentales de esteatohepatitis presentan un aumento de la muerte celular de los hepatocitos por apoptosis por vía extrínseca (mediada por el receptor de muerte) y por la intrínseca (iniciada por la mitocondria)¹⁹⁴.

Los estudios experimentales sugieren que la apoptosis incontrolada de los hepatocitos induce fibrogénesis y fibrosis hepáticas por medio de la absorción de los cuerpos apoptóticos resultantes por las células de Kupffer favoreciendo a la fibrosis hepática y la inflamación mediante la activación de las células estrelladas y la liberación de citosinas¹⁸⁵. Lo que sugiere que nuestro modelo de SM posee todas las condiciones para desarrollar apoptosis por el alto nivel de C16:0, la generación mitocondrial de ERO, así como la susceptibilidad a la formación de la transición de permeabilidad de la membrana mitocondrial.

No obstante, nuestro estudio demostró que algunos marcadores de la apoptosis se encuentran disminuidos tales como la actividad de la caspasa-9, el contenido de la caspasa-3 activa y la nula activación de la fragmentación del ADN, lo que sugiere que en el hígado de los animales con SM existe una resistencia a la apoptosis. Por otro lado, la acumulación del C16:0 y de su producto de activación el Pal-CoA, por su efecto lipotóxico pueden contribuir a la hepatotoxicidad y a la progresión del HGNA hacia la hepatoesteatosis y la insuficiencia hepática.

Para demostrar la posible progresión de la enfermedad hepática en el modelo de SM es necesario realizar estudios con más tiempo de consumo de sacarosa para determinar los mecanismos involucrados en la progresión y la apoptosis en el hígado de los animales con SM.

Conclusiones.

- El consumo de sacarosa al 30% indujo los parámetros clínicos del SM.
- Existe un aumento en la acumulación de AGNE, especialmente C16:0 en mitocondrias del tejido hepático de ratas con SM.
- El aumento en la biodisponibilidad de AGNE, no está asociado a un aumento en la apoptosis en hígado de animales con SM
- El pal-CoA aumenta la liberación de cit-c, por un mecanismo que implica el aumento de la generación de ERO y la apertura del PTPm.
- En SM la disminución en la liberación de cit-c es atribuida al enriquecimiento en la saturación de la CL.

Perspectivas

- Cuantificar la concentración de los acil-CoA, principalmente Pal-CoA en hígado de animales con SM.
- Generar un modelo *in vitro* o *in vivo* transgénico que sobreexpresa la enzima acil-CoA sintetasa, dando como resultado una mayor formación de Pal-CoA para posteriormente analizar los marcadores apoptóticos y con ello evaluar si participa directamente en la progresión del HGNA.

Referencias:

1. Riazi, K., Azhari, H., Charette, J. H., Underwood, F. E., King, J. A., Afshar, E. E., Swain, M. G., Congly, S. E., Kaplan, G. G., & Shaheen, A. A. (2022). The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: a systematic review and meta-analysis. *The lancet. Gastroenterology & hepatology*, 7(9), 851–861. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(22\)00165-0](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(22)00165-0)
2. Patell, R., Dosi, R., Joshi, H., Sheth, S., Shah, P., & Jasdanwala, S. (2014). Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in Obesity. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 8(1), 62–66. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/6691.3953>
3. Quek, J., Chan, K. E., Wong, Z. Y., Tan, C., Tan, B., Lim, W. H., Tan, D. J. H., Tang, A. S. P., Tay, P., Xiao, J., Yong, J. N., Zeng, R. W., Chew, N. W. S., Nah, B., Kulkarni, A., Siddiqui, M. S., Dan, Y. Y., Wong, V. W., Sanyal, A. J., Noureddin, M., ... Ng, C. H. (2023). Global prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in the overweight and obese population: a systematic review and meta-analysis. *The lancet. Gastroenterology & hepatology*, 8(1), 20–30. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(22\)00317-X](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(22)00317-X)
4. Marchesini, G., Day, C.P., Dufour, J.-F., Canbay, A., Nobili, V., Ratziu, V., Tilg, H., Roden, M., Gastaldelli, A., Yki-Järvinen, H., Schick, F., Vettor, R., Frühbeck, G., Mathus-Vliegen, L. and EASL. (2016) EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*, 64(6), 1388–1402. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.004>
5. Minxuan, X., Sun, Y., Dai, X., Zhan, J., Long, T., Xiong, M., Li, H., Kuang, Q., Tang, T., Qin, Y., Chenxu, G. and Jun, T. (2019). Fisetin attenuates high fat diet-triggered hepatic lipid accumulation: A mechanism involving liver inflammation overload associated TACE/TNF- α pathway. *Journal of Functional Foods*, Volume 53, 2019, Pages 7-21, ISSN 1756-4646, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.12.007>.
6. Hirsova, P., & Gores, G. J. (2015). Death Receptor-Mediated Cell Death and Proinflammatory Signaling in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 1(1), 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2014.11.005>
7. Ruiz-Ramírez, A., Chávez-Salgado, M., Peñeda-Flores, J. A., Zapata, E., Masso, F., & El-Hafidi, M. (2011). High-sucrose diet increases ROS generation, FFA accumulation, UCP2 level, and proton leak in liver mitochondria. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 301(6), E1198–E1207. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00631.2010>
8. Lau, J. K., Zhang, X., & Yu, J. (2017). Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *The Journal of pathology*, 241(1), 36–44. <https://doi.org/10.1002/path.4829>
9. Chen, X., Li, L., Liu, X., Luo, R., Liao, G., Li, L., Liu, J., Cheng, J., Lu, Y., & Chen, Y. (2018). Oleic acid protects saturated fatty acid mediated lipotoxicity in hepatocytes and rat of non-alcoholic steatohepatitis. *Life sciences*, 203, 291–304. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.022>
10. Rafiei, H., Omidian, K., and Bandy, B. (2018). Protection by different classes of dietary polyphenols against palmitic acid-induced steatosis, nitro-oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in HepG2 hepatocytes. *Journal of Functional Foods*, Volume 44, Pages 173-182, ISSN 1756-4646. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.02.033>.
11. Stephenson, K., Kennedy, L., Hargrove, L., Demieville, J., Thomson, J., Alpini, G., & Francis, H. (2018). Updates on Dietary Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Current Studies and Insights. *Gene expression*, 18(1), 5–17. <https://doi.org/10.3727/105221617X15093707969658>
12. Alnahdi, A., John, A., & Raza, H. (2019). Augmentation of Glucotoxicity, Oxidative Stress, Apoptosis and Mitochondrial Dysfunction in HepG2 Cells by Palmitic Acid. *Nutrients*, 11(9), 1979. <https://doi.org/10.3390/nu11091979>
13. Rochlani, Y., Pothineni, N. V., Kovelamudi, S., & Mehta, J. L. (2017). Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Therapeutic advances in cardiovascular disease*, 11(8), 215–225. <https://doi.org/10.1177/1753944717711379>
14. Zafar, U., Khaliq, S., Ahmad, H. U., Manzoor, S., & Lone, K. P. (2018). Metabolic syndrome: an update on diagnostic criteria, pathogenesis, and genetic links. *Hormones (Athens, Greece)*, 17(3), 299–313. <https://doi.org/10.1007/s42000-018-0051-3>

15. Reaven G. M. (1988). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37(12), 1595–1607. <https://doi.org/10.2337/diab.37.12.1595>
16. Alberti, K. G., & Zimmet, P. Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association*, 15(7), 539–553. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9136\(199807\)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S)
17. Lippy R. J. (2003). The National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Journal of managed care pharmacy: JMCP*, 9(1 Suppl), 2–5. <https://doi.org/10.18553/jmcp.2003.9.s1.2>
18. Alberti, K. G., Zimmet, P., & Shaw, J. (2006). Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association*, 23(5), 469–480. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2006.01858.x>
19. Gutiérrez-Solis, A. L., Datta Banik, S., & Méndez-González, R. M. (2018). Prevalence of Metabolic Syndrome in Mexico: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Metabolic syndrome and related disorders*, 16(8), 395–405. <https://doi.org/10.1089/met.2017.0157>
20. Monteiro, C. A., Cannon, G., Levy, R. B., Moubarac, J. C., Louzada, M. L., Rauber, F., Khandpur, N., Cediel, G., Neri, D., Martinez-Steele, E., Baraldi, L. G., & Jaime, P. C. (2019). Ultra-processed foods: what they are and how to identify them. *Public health nutrition*, 22(5), 936–941. <https://doi.org/10.1017/S1368980018003762>
21. Hess, P. L., Al-Khalidi, H. R., Friedman, D. J., Mulder, H., Kucharska-Newton, A., Rosamond, W. R., Lopes, R. D., Gersh, B. J., Mark, D. B., Curtis, L. H., Post, W. S., Prineas, R. J., Sotoodehnia, N., & Al-Khatib, S. M. (2017). The Metabolic Syndrome and Risk of Sudden Cardiac Death: The AthEROclEROis Risk in Communities Study. *Journal of the American Heart Association*, 6(8), e006103. <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.006103>
22. Polyzos, S. A., Kountouras, J., & Mantzoros, C. S. (2019). Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism: clinical and experimental*, 92, 82–97. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.014>
23. Chooi, Y. C., Ding, C., & Magkos, F. (2019). The epidemiology of obesity. *Metabolism: clinical and experimental*, 92, 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.09.005>
24. Ellulu, M. S., Patimah, I., Khaza'ai, H., Rahmat, A., & Abed, Y. (2017). Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Archives of medical science: AMS*, 13(4), 851–863. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.58928>
25. Fruh S. M. (2017). Obesity: Risk factors, complications, and strategies for sustainable long-term weight management. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners*, 29(S1), S3–S14. <https://doi.org/10.1002/2327-6924.12510>
26. Younossi, Z., Tacke, F., Arrese, M., Chander Sharma, B., Mostafa, I., Bugianesi, E., Wai-Sun Wong, V., Yilmaz, Y., George, J., Fan, J., & Vos, M. B. (2019). Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 69(6), 2672–2682. <https://doi.org/10.1002/hep.30251>
27. Cotter, T. G., & Rinella, M. (2020). Nonalcoholic Fatty Liver Disease 2020: The State of the Disease. *Gastroenterology*, 158(7), 1851–1864. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.01.052>
28. Buzzetti, E., Pinzani, M., & Tsochatzis, E. A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism: clinical and experimental*, 65(8), 1038–1048. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.012>
29. Jelenik, T., Kaul, K., Séquaris, G., Flögel, U., Phielix, E., Kotzka, J., Knebel, B., Fahlbusch, P., Hörbelt, T., Lehr, S., Reinbeck, A. L., Müller-Wieland, D., Esposito, I., Shulman, G. I., Szendroedi, J., & Roden, M. (2017). Mechanisms of Insulin Resistance in Primary and Secondary Nonalcoholic Fatty Liver. *Diabetes*, 66(8), 2241–2253. <https://doi.org/10.2337/db16-1147>
30. Stern, C., & Castera, L. (2017). Non-invasive diagnosis of hepatic steatosis. *Hepatology international*, 11(1), 70–78. <https://doi.org/10.1007/s12072-016-9772-z>
31. Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J. E., Charlton, M., Cusi, K., Rinella, M., Harrison, S. A., Brunt, E. M., & Sanyal, A. J. (2018). The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 67(1), 328–357. <https://doi.org/10.1002/hep.29367>

32. Ipsen, D. H., Lykkesfeldt, J., & Tveden-Nyborg, P. (2018). Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 75(18), 3313–3327. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2860-6>
33. Stone, S. J., Levin, M. C., Zhou, P., Han, J., Walther, T. C., & Farese, R. V., Jr (2009). The endoplasmic reticulum enzyme DGAT2 is found in mitochondria-associated membranes and has a mitochondrial targeting signal that promotes its association with mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 284(8), 5352–5361. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805768200>
34. Villanueva, C. J., Monetti, M., Shih, M., Zhou, P., Watkins, S. M., Bhanot, S., & Farese, R. V., Jr (2009). Specific role for acyl CoA: Diacylglycerol acyltransferase 1 (Dgat1) in hepatic steatosis due to exogenous fatty acids. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 50(2), 434–442. <https://doi.org/10.1002/hep.22980>
35. Gluchowski, N. L., Gabriel, K. R., Chitraju, C., Bronson, R. T., Mejhert, N., Boland, S., Wang, K., Lai, Z. W., Farese, R. V., Jr, & Walther, T. C. (2019). Hepatocyte Deletion of Triglyceride-Synthesis Enzyme Acyl CoA: Diacylglycerol Acyltransferase 2 Reduces Steatosis Without Increasing Inflammation or Fibrosis in Mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 70(6), 1972–1985. <https://doi.org/10.1002/hep.30765>
36. Ertunc, M. E., & Hotamisligil, G. S. (2016). Lipid signaling and lipotoxicity in metaflammation: indications for metabolic disease pathogenesis and treatment. *Journal of lipid research*, 57(12), 2099–2114. <https://doi.org/10.1194/jlr.R066514>
37. Papazyan, R., Sun, Z., Kim, Y. H., Titchenell, P. M., Hill, D. A., Lu, W., Damle, M., Wan, M., Zhang, Y., Briggs, E. R., Rabinowitz, J. D., & Lazar, M. A. (2016). Physiological Suppression of Lipotoxic Liver Damage by Complementary Actions of HDAC3 and SCAP/SREBP. *Cell metabolism*, 24(6), 863–874. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.10.012>
38. Stål P. (2015). Liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease - diagnostic challenge with prognostic significance. *World journal of gastroenterology*, 21(39), 11077–11087. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i39.11077>
39. Maurice, J., & Manousou, P. (2018). Non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical medicine (London, England)*, 18(3), 245–250. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.18-3-245>
40. Povsic, M., Wong, O. Y., Perry, R., & Bottomley, J. (2019). A Structured Literature Review of the Epidemiology and Disease Burden of Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH). *Advances in therapy*, 36(7), 1574–1594. <https://doi.org/10.1007/s12325-019-00960-3>
41. Estes, C., Razavi, H., Loomba, R., Younossi, Z., & Sanyal, A. J. (2018). Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 67(1), 123–133. <https://doi.org/10.1002/hep.29466>
42. Smith, A., Baumgartner, K., & Bositis, C. (2019). Cirrhosis: Diagnosis and Management. *American family physician*, 100(12), 759–770.
43. INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (26 de octubre de 2022). Estadísticas de defunciones registradas 2021. Página 13/92 https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2022/EDR/EDR2021_10.pdf
44. Bernal-Reyes, R., Castro-Narro, G., Malé-Velázquez, R., Carmona-Sánchez, R., González-Huezo, M. S., García-Juárez, I., Chávez-Tapia, N., Aguilar-Salinas, C., Aiza-Haddad, I., BallestERO-Amozurrutia, M. A., Bosques-Padilla, F., Castillo-Barradas, M., Chávez-Barrera, J. A., CisnERO-Garza, L., Flores-Calderón, J., García-Compeán, D., Gutiérrez-Grobe, Y., Higuera de la Tijera, M. F., Kershenobich-Stalnikowitz, D., Ladrón de Guevara-Cetina, L., ... Velarde-Ruiz Velasco, J. A. (2019). The Mexican consensus on nonalcoholic fatty liver disease. Consenso mexicano de la enfermedad por hígado graso no alcohólico. *Revista de gastroenterología de Mexico (English)*, 84(1), 69–99. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2018.11.007>
45. Katsiki, N., Perez-Martinez, P., Anagnostis, P., Mikhailidis, D. P., & Karagiannis, A. (2018). Is Nonalcoholic Fatty Liver Disease Indeed the Hepatic Manifestation of Metabolic Syndrome? *Current vascular pharmacology*, 16(3), 219–227. <https://doi.org/10.2174/1570161115666170621075619>
46. Wang, Y., Li, Y. Y., Nie, Y. Q., Zhou, Y. J., Cao, C. Y., & Xu, L. (2013). Association between metabolic syndrome and the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Experimental and therapeutic medicine*, 6(1), 77–84. <https://doi.org/10.3892/etm.2013.1090>

47. Kanwar, P., Nelson, J. E., Yates, K., Kleiner, D. E., Unalp-Arida, A., & Kowdley, K. V. (2016). Association between metabolic syndrome and liver histology among NAFLD patients without diabetes. *BMJ open gastroenterology*, 3(1), e000114. <https://doi.org/10.1136/bmjgast-2016-000114>
48. Käräjämäki, A. J., Bloigu, R., Kauma, H., Kesäniemi, Y. A., Koivurova, O. P., Perkiömäki, J., Huikuri, H., & Ukkola, O. (2017). Non-alcoholic fatty liver disease with and without metabolic syndrome: Different long-term outcomes. *Metabolism: clinical and experimental*, 66, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.06.009>
49. Castro-Martínez, M. G., Banderas-Lares, D. Z., Ramírez-Martínez, J. C., & Escobedo-de la Peña, J. (2012). Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in subjects with metabolic syndrome. *Cirugia y cirujanos*, 80(2), 128–133.
50. Thoenfer, L. B., Rostved, A. A., Pommergaard, H. C., & Rasmussen, A. (2018). Risk factors for metabolic syndrome after liver transplantation: A systematic review and meta-analysis. *Transplantation reviews (Orlando, Fla.)*, 32(1), 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.trre.2017.03.004>
51. Lonardo, A., Ballestri, S., Marchesini, G., Angulo, P., & Loria, P. (2015). Nonalcoholic fatty liver disease: a precursor of the metabolic syndrome. *Digestive and liver disease: official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 47(3), 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2014.09.020>
52. Lonardo, A., Leoni, S., Alswat, K. A., & Fouad, Y. (2020). History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *International journal of molecular sciences*, 21(16), 5888. <https://doi.org/10.3390/ijms21165888>
53. Gastaldelli A. (2017). Insulin resistance and reduced metabolic flexibility: cause or consequence of NAFLD?. *Clinical science (London, England: 1979)*, 131(22), 2701–2704. <https://doi.org/10.1042/CS20170987>
54. Yazıcı, D., & Sezer, H. (2017). Insulin Resistance, Obesity and Lipotoxicity. *Advances in experimental medicine and biology*, 960, 277–304. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_12
55. Marušić, M., Paić, M., Knobloch, M., & Liberati Pršo, A. M. (2021). NAFLD, Insulin Resistance, and Diabetes Mellitus Type 2. *Canadian journal of gastroenterology & hepatology*, 2021, 6613827. <https://doi.org/10.1155/2021/6613827>
56. Moon Y. A. (2017). The SCAP/SREBP Pathway: A Mediator of Hepatic Steatosis. *Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)*, 32(1), 6–10. <https://doi.org/10.3803/EnM.2017.32.1.6>
57. Deng, X., Pan, X., Cheng, C., Liu, B., Zhang, H., Zhang, Y., & Xu, K. (2017). Regulation of SREBP-2 intracellular trafficking improves impaired autophagic flux and alleviates endoplasmic reticulum stress in NAFLD. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids*, 1862(3), 337–350. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.12.007>
58. McPherson, S., Hardy, T., Henderson, E., Burt, A. D., Day, C. P., & Anstee, Q. M. (2015). Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: implications for prognosis and clinical management. *Journal of hepatology*, 62(5), 1148–1155. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.11.034>
59. Yoon M. S. (2017). The Role of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in Insulin Signaling. *Nutrients*, 9(11), 1176. <https://doi.org/10.3390/nu9111176>
60. Lucero, D., Miksztowicz, V., Macri, V., López, G. H., Friedman, S., Berg, G., Zago, V., & Schreier, L. (2015). Overproduction of altered VLDL in an insulin-resistance rat model: Influence of SREBP-1c and PPAR- α . *Clinica e investigacion en arteriosclEROs: publicacion oficial de la Sociedad Espanola de ArteriosclEROs*, 27(4), 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2014.11.002>
61. Martínez, L. A., Larrieta, E., Kershenobich, D., & Torre, A. (2017). The Expression of PNPLA3 Polymorphism could be the Key for Severe Liver Disease in NAFLD in Hispanic Population. *Annals of hepatology*, 16(6), 909–915. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.5282>
62. Carson, V., Hunter, S., Kuzik, N., Gray, C. E., Poitras, V. J., Chaput, J. P., Saunders, T. J., Katzmarzyk, P. T., Okely, A. D., Connor Gorber, S., Kho, M. E., Sampson, M., Lee, H., & Tremblay, M. S. (2016). Systematic review of sedentary behaviour and health indicators in school-aged children and youth: an update. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*, 41(6 Suppl 3), S240–S265. <https://doi.org/10.1139/apnm-2015-0630>

63. Gallardo-Alfaro, L., Bibiloni, M. D. M., Mascaró, C. M., Montemayor, S., Ruiz-Canela, M., Salas-Salvadó, J., Corella, D., Fitó, M., Romaguera, D., Vioque, J., Alonso-Gómez, Á. M., Wärnberg, J., Martínez, J. A., Serra-Majem, L., Estruch, R., Fernández-García, J. C., Lapetra, J., Pintó, X., García Ríos, A., Bueno-Cavanillas, A., ... Tur, J. A. (2020). Leisure-Time Physical Activity, Sedentary Behaviour and Diet Quality are Associated with Metabolic Syndrome Severity: The PREDIMED-Plus Study. *Nutrients*, 12(4), 1013. <https://doi.org/10.3390/nu12041013>
64. Kim, T. H., Choi, D., Kim, J. Y., Lee, J. H., & Koo, S. H. (2017). Fast food diet-induced non-alcoholic fatty liver disease exerts early protective effect against acetaminophen intoxication in mice. *BMC gastroenterology*, 17(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s12876-017-0680-z>
65. Shively, C. A., Appt, S. E., Vitolins, M. Z., Uberseder, B., Michalson, K. T., Silverstein-Metzler, M. G., & Register, T. C. (2019). Mediterranean versus Western Diet Effects on Caloric Intake, Obesity, Metabolism, and Hepatosteatosis in Nonhuman Primates. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 27(5), 777–784. <https://doi.org/10.1002/oby.22436>
66. Higgins, K. A., & Mattes, R. D. (2019). A randomized controlled trial contrasting the effects of 4 low-calorie sweeteners and sucrose on body weight in adults with overweight or obesity. *The American journal of clinical nutrition*, 109(5), 1288–1301. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy381>
67. Chyau, C. C., Wang, H. F., Zhang, W. J., Chen, C. C., Huang, S. H., Chang, C. C., & Peng, R. Y. (2020). Antrodan Alleviates High-Fat and High-Fructose Diet-Induced Fatty Liver Disease in C57BL/6 Mice Model via AMPK/Sirt1/SREBP-1c/PPAR γ Pathway. *International journal of molecular sciences*, 21(1), 360. <https://doi.org/10.3390/ijms21010360>
68. Sun, S., Araki, Y., Hanzawa, F., Umeki, M., Kojima, T., Nishimura, N., Ikeda, S., Mochizuki, S., & Oda, H. (2021). High sucrose diet-induced dysbiosis of gut microbiota promotes fatty liver and hyperlipidemia in rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, 93, 108621. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108621>
69. Herrgårdh, T., Li, H., Nyman, E., & Cedersund, G. (2021). An Updated Organ-Based Multi-Level Model for Glucose Homeostasis: Organ Distributions, Timing, and Impact of Blood Flow. *Frontiers in physiology*, 12, 619254. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.619254>
70. Lee, N. C. W., Carella, M. A., Papa, S., & Bubici, C. (2018). High Expression of Glycolytic Genes in Cirrhosis Correlates With the Risk of Developing Liver Cancer. *Frontiers in cell and developmental biology*, 6, 138. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00138>
71. Feng, J., Li, J., Wu, L., Yu, Q., Ji, J., Wu, J., Dai, W., & Guo, C. (2020). Emerging roles and the regulation of aerobic glycolysis in hepatocellular carcinoma. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 39(1), 126. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01629-4>
72. Lehmann, A., & Hornby, P. J. (2016). Intestinal SGLT1 in metabolic health and disease. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 310(11), G887–G898. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00068.2016>
73. Kiela, P. R., & Ghishan, F. K. (2016). Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, 30(2), 145–159. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2016.02.007>
74. Muriel, P., López-Sánchez, P., & Ramos-Tovar, E. (2021). Fructose and the Liver. *International journal of molecular sciences*, 22(13), 6969. <https://doi.org/10.3390/ijms22136969>
75. Einer, C., Hohenester, S., Wimmer, R., Wottke, L., Artmann, R., Schulz, S., Gosmann, C., Simmons, A., Leitzinger, C., Eberhagen, C., Borchard, S., Schmitt, S., Hauck, S. M., von Toerne, C., Jastroch, M., Walheim, E., Rust, C., Gerbes, A. L., Popper, B., Mayr, D., ... Zischka, H. (2018). Mitochondrial adaptation in steatotic mice. *Mitochondrion*, 40, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.08.015>
76. Kang, H. M., Ahn, S. H., Choi, P., Ko, Y. A., Han, S. H., Chinga, F., Park, A. S., Tao, J., Sharma, K., Pullman, J., Bottinger, E. P., Goldberg, I. J., & Susztak, K. (2015). Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development. *Nature medicine*, 21(1), 37–46. <https://doi.org/10.1038/nm.3762>
77. Sanders, F. W., & Griffin, J. L. (2016). De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 91(2), 452–468. <https://doi.org/10.1111/brv.12178>

78. Grevengoed, T. J., Klett, E. L., & Coleman, R. A. (2014). Acyl-CoA metabolism and partitioning. *Annual review of nutrition*, 34, 1–30. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071813-105541>
79. Alves-Bezerra, M., & Cohen, D. E. (2017). Triglyceride Metabolism in the Liver. *Comprehensive Physiology*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170012>
80. Softic, S., Cohen, D. E., & Kahn, C. R. (2016). Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Digestive diseases and sciences*, 61(5), 1282–1293. <https://doi.org/10.1007/s10620-016-4054-0>
81. Tomizawa, M., Kawanabe, Y., Shinozaki, F., Sato, S., Motoyoshi, Y., Sugiyama, T., Yamamoto, S., & Sueishi, M. (2014). Triglyceride is strongly associated with nonalcoholic fatty liver disease among markers of hyperlipidemia and diabetes. *Biomedical reports*, 2(5), 633–636. <https://doi.org/10.3892/br.2014.309>
82. Li, H., Dun, Y., Zhang, W., You, B., Liu, Y., Fu, S., Qiu, L., Cheng, J., Ripley-Gonzalez, J. W., & Liu, S. (2021). Exercise improves lipid droplet metabolism disorder through activation of AMPK-mediated lipophagy in NAFLD. *Life sciences*, 273, 119314. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119314>
83. Listenberger, L. L., Han, X., Lewis, S. E., Cases, S., Farese, R. V., Jr, Ory, D. S., & Schaffer, J. E. (2003). Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(6), 3077–3082. <https://doi.org/10.1073/pnas.0630588100>
84. Li, N., Sancak, Y., Frasier, J., & Atilla-Gokcumen, G. E. (2018). A Protective Role for Triacylglycerols during Apoptosis. *Biochemistry*, 57(1), 72–80. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00975>
85. Paradies, G., Paradies, V., Ruggiero, F. M., & Petrosillo, G. (2014). Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology*, 20(39), 14205–14218. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i39.14205>
86. Falabella, M., Vernon, H. J., Hanna, M. G., Claypool, S. M., & Pitceathly, R. D. S. (2021). Cardiolipin, Mitochondria, and Neurological Disease. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 32(4), 224–237. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2021.01.006>
87. Tatsuta, T., & Langer, T. (2017). Intramitochondrial phospholipid trafficking. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids*, 1862(1), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.08.006>
88. Dudek J. (2017). Role of Cardiolipin in Mitochondrial Signaling Pathways. *Frontiers in cell and developmental biology*, 5, 90. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00090>
89. Pennington, E. R., Funai, K., Brown, D. A., & Shaikh, S. R. (2019). The role of cardiolipin concentration and acyl chain composition on mitochondrial inner membrane molecular organization and function. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids*, 1864(7), 1039–1052. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.03.012>
90. Protasoni, M., & Zeviani, M. (2021). Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions. *International journal of molecular sciences*, 22(2), 586. <https://doi.org/10.3390/ijms22020586>
91. Vakifahmetoglu-Norberg, H., Ouchida, A. T., and Norberg, E. (2017). The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(3), 426–431. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.088>
92. Spinelli, J. B., & Haigis, M. C. (2018). The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nature cell biology*, 20(7), 745–754. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0124-1>
93. Wirth, C., Brandt, U., Hunte, C., & Zickermann, V. (2016). Structure and function of mitochondrial complex I. *Biochimica et biophysica acta*, 1857(7), 902–914. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.02.013>
94. Fullerton, M., McFarland, R., Taylor, R. W., & Alston, C. L. (2020). The genetic basis of isolated mitochondrial complex II deficiency. *Molecular genetics and metabolism*, 131(1-2), 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2020.09.009>
95. Wang, Y., & Hekimi, S. (2016). Understanding Ubiquinone. *Trends in cell biology*, 26(5), 367–378. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.12.007>

96. Ndi, M., Marin-Buera, L., Salvatori, R., Singh, A. P., & Ott, M. (2018). Biogenesis of the bc1 Complex of the Mitochondrial Respiratory Chain. *Journal of molecular biology*, 430(21), 3892–3905. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.04.036>
97. Fisher, N., Meunier, B., & Biagini, G. A. (2020). The cytochrome bc1 complex as an antipathogenic target. *FEBS letters*, 594(18), 2935–2952. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13868>
98. González-Arzola, K., Velázquez-Cruz, A., Guerra-Castellano, A., Casado-Combreras, M. Á., Pérez-Mejías, G., Díaz-Quintana, A., Díaz-Moreno, I., & De la Rosa, M. Á. (2019). New moonlighting functions of mitochondrial cytochrome c in the cytoplasm and nucleus. *FEBS letters*, 593(22), 3101–3119. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13655>
99. Kadenbach B. (2021). Complex IV - The regulatory center of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Mitochondrion*, 58, 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.10.004>
100. He, J., Ford, H. C., Carroll, J., Douglas, C., Gonzales, E., Ding, S., Fearnley, I. M., & Walker, J. E. (2018). Assembly of the membrane domain of ATP synthase in human mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(12), 2988–2993. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722086115>
101. Neupane, P., Bhujju, S., Thapa, N., & Bhattarai, H. K. (2019). ATP Synthase: Structure, Function and Inhibition. *Biomolecular concepts*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1515/bmc-2019-0001>
102. Speijer, D., Manjeri, G. R., & Szklarczyk, R. (2014). How to deal with oxygen radicals stemming from mitochondrial fatty acid oxidation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369(1646), 20130446. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0446>
103. Scialò, F., Fernández-Ayala, D. J., & Sanz, A. (2017). Role of Mitochondrial Reverse Electron Transport in ROS Signaling: Potential Roles in Health and Disease. *Frontiers in physiology*, 8, 428. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00428>
104. Onukwufor, J. O., Berry, B. J., & Wojtovich, A. P. (2019). Physiologic Implications of Reactive Oxygen Species Production by Mitochondrial Complex I Reverse Electron Transport. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(8), 285. <https://doi.org/10.3390/antiox8080285>
105. Zhao, R. Z., Jiang, S., Zhang, L., & Yu, Z. B. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International journal of molecular medicine*, 44(1), 3–15. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>
106. Guarás, A., Perales-Clemente, E., Calvo, E., Acín-Pérez, R., Loureiro-Lopez, M., Pujol, C., Martínez-Carrascoso, I., Nuñez, E., García-Marqués, F., Rodríguez-Hernández, M. A., Cortés, A., Diaz, F., Pérez-Martos, A., Moraes, C. T., Fernández-Silva, P., Trifunovic, A., Navas, P., Vazquez, J., & Enríquez, J. A. (2016). The CoQH2/CoQ Ratio Serves as a Sensor of Respiratory Chain Efficiency. *Cell reports*, 15(1), 197–209. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.009>
107. Tirichen, H., Yaigoub, H., Xu, W., Wu, C., Li, R., & Li, Y. (2021). Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Their Contribution in Chronic Kidney Disease Progression Through Oxidative Stress. *Frontiers in physiology*, 12, 627837. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.627837>
108. Pei, H., Yang, Y., Zhao, H., Li, X., Yang, D., Li, D., & Yang, Y. (2016). The Role of Mitochondrial Functional Proteins in ROS Production in Ischemic Heart Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 5470457. <https://doi.org/10.1155/2016/5470457>
109. Zhang, Y., Bharathi, S. S., Beck, M. E., & Goetzman, E. S. (2019). The fatty acid oxidation enzyme long-chain acyl-CoA dehydrogenase can be a source of mitochondrial hydrogen peroxide. *Redox biology*, 26, 101253. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101253>
110. Kakimoto, P. A., Tamaki, F. K., Cardoso, A. R., Marana, S. R., & Kowaltowski, A. J. (2015). H2O2 release from the very long chain acyl-CoA dehydrogenase. *Redox biology*, 4, 375–380. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.02.003>
111. Masenga, S. K., Kabwe, L. S., Chakulya, M., & Kirabo, A. (2023). Mechanisms of Oxidative Stress in Metabolic Syndrome. *International journal of molecular sciences*, 24(9), 7898. <https://doi.org/10.3390/ijms24097898>
112. Schwarz, J. M., Noworolski, S. M., Erkin-Cakmak, A., Korn, N. J., Wen, M. J., Tai, V. W., Jones, G. M., Palii, S. P., Velasco-Alin, M., Pan, K., Patterson, B. W., Gugliucci, A., Lustig, R. H., & Mulligan, K. (2017). Effects of Dietary Fructose Restriction on Liver Fat, De Novo Lipogenesis, and Insulin Kinetics in Children With Obesity. *Gastroenterology*, 153(3), 743–752. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.05.043>

113. Jensen, T., Abdelmalek, M. F., Sullivan, S., Nadeau, K. J., Green, M., Roncal, C., Nakagawa, T., Kuwabara, M., Sato, Y., Kang, D. H., Tolani, D. R., Sanchez-Lozada, L. G., Rosen, H. R., Lanasa, M. A., Diehl, A. M., & Johnson, R. J. (2018). Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*, 68(5), 1063–1075. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.01.019>
114. Bellanti, F., Villani, R., Tamborra, R., Blonda, M., Iannelli, G., di Bello, G., Facciorusso, A., Poli, G., Iuliano, L., Avolio, C., Vendemiale, G., & Serviddio, G. (2018). Synergistic interaction of fatty acids and oxysterols impairs mitochondrial function and limits liver adaptation during nafld progression. *Redox biology*, 15, 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.11.016>
115. Domínguez-Pérez, M., Simoni-Nieves, A., Rosales, P., Nuño-Lámbarri, N., Rosas-Lemus, M., Souza, V., Miranda, R. U., Bucio, L., Uribe Carvajal, S., Marquardt, J. U., Seo, D., Gomez-Quiroz, L. E., & Gutiérrez-Ruiz, M. C. (2019). Cholesterol burden in the liver induces mitochondrial dynamic changes and resistance to apoptosis. *Journal of cellular physiology*, 234(5), 7213–7223. <https://doi.org/10.1002/jcp.27474>
116. Masarone, M., Rosato, V., Dallio, M., Gravina, A. G., Aglitti, A., Loguercio, C., Federico, A., & Persico, M. (2018). Role of Oxidative Stress in Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 9547613. <https://doi.org/10.1155/2018/9547613>
117. Park, E. J., Lee, A. Y., Park, S., Kim, J. H., & Cho, M. H. (2014). Multiple pathways are involved in palmitic acid-induced toxicity. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 67, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.01.027>
118. Valdecantos, M. P., Prieto-Hontoria, P. L., Pardo, V., Módol, T., Santamaría, B., Weber, M., Herrero, L., Serra, D., Muntané, J., Cuadrado, A., Moreno-Aliaga, M. J., Alfredo Martínez, J., & Valverde, Á. M. (2015). Essential role of Nrf2 in the protective effect of lipoic acid against lipoapoptosis in hepatocytes. *Free radical biology & medicine*, 84, 263–278. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.019>
119. Koliaki, C., Szendroedi, J., Kaul, K., Jelenik, T., Nowotny, P., Jankowiak, F., Herder, C., Carstensen, M., Krausch, M., Knoefel, W. T., Schlensak, M., & Roden, M. (2015). Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell metabolism*, 21(5), 739–746. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.04.004>
120. Rial, S. A., Ravaut, G., Malaret, T. B., Bergeron, K. F., & Mounier, C. (2018). Hexanoic, Octanoic and Decanoic Acids Promote Basal and Insulin-Induced Phosphorylation of the Akt-mTOR Axis and a Balanced Lipid Metabolism in the HepG2 Hepatoma Cell Line. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(9), 2315. <https://doi.org/10.3390/molecules23092315>
121. Berdichevsky, A., Guarente, L., & Bose, A. (2010). Acute oxidative stress can reverse insulin resistance by inactivation of cytoplasmic JNK. *The Journal of biological chemistry*, 285(28), 21581–21589. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.093633>
122. Han C. Y. (2016). Roles of Reactive Oxygen Species on Insulin Resistance in Adipose Tissue. *Diabetes & metabolism journal*, 40(4), 272–279. <https://doi.org/10.4093/dmj.2016.40.4.272>
123. Song, Q., Guo, R., Wei, W., Lv L., Song, Z., Feng R., Li, S. and Sun, C. (2017). Histidine-alleviated hepatocellular death in response to 4-hydroxynonenal contributes to the protection against high-fat diet-induced liver injury. *Journal of Functional Foods*, Volume 39, Pages 74-83, ISSN 1756-4646. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.056>
124. Ore, A., & Akinloye, O. A. (2019). Oxidative Stress and Antioxidant Biomarkers in Clinical and Experimental Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 55(2), 26. <https://doi.org/10.3390/medicina55020026>
125. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell death and differentiation*, 25(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>

126. Wilkinson, J. A., Silvera, S., & LeBlanc, P. J. (2021). The effect of cardiolipin side chain composition on cytochrome c protein conformation and peroxidase activity. *Physiological reports*, 9(5), e14772. <https://doi.org/10.14814/phy2.14772>
127. Paradies, G., Paradies, V., Ruggiero, F. M., & Petrosillo, G. (2019). Role of Cardiolipin in Mitochondrial Function and Dynamics in Health and Disease: Molecular and Pharmacological Aspects. *Cells*, 8(7), 728. <https://doi.org/10.3390/cells8070728>
128. Renne, M. F., Bao, X., De Smet, C. H., & de Kroon, A. I. (2016). Lipid Acyl Chain Remodeling in Yeast. *Lipid insights*, 8(Suppl 1), 33–40. <https://doi.org/10.4137/LPI.S31780>
129. Tyurina, Y. Y., Lou, W., Qu, F., Tyurin, V. A., Mohammadyani, D., Liu, J., Hüttemann, M., Frasso, M. A., Wipf, P., Bayir, H., Greenberg, M. L., & Kagan, V. E. (2017). Lipidomics Characterization of Biosynthetic and Remodeling Pathways of Cardiolipins in Genetically and Nutritionally Manipulated Yeast Cells. *ACS chemical biology*, 12(1), 265–281. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00995>
130. Kagan, V. E., Chu, C. T., Tyurina, Y. Y., Cheikhi, A., & Bayir, H. (2014). Cardiolipin asymmetry, oxidation and signaling. *Chemistry and physics of lipids*, 179, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.11.010>
131. Raemy, E., & Martinou, J. C. (2014). Involvement of cardiolipin in tBID-induced activation of BAX during apoptosis. *Chemistry and physics of lipids*, 179, 70–74. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.12.002>
132. Bock, F. J., & Tait, S. (2020). Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 21(2), 85–100. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0173-8>
133. Larsen, B. D., & Sørensen, C. S. (2017). The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond. *The FEBS journal*, 284(8), 1160–1170. <https://doi.org/10.1111/febs.13970>
134. Shojaie, L., Iorga, A., & Dara, L. (2020). Cell Death in Liver Diseases: A Review. *International journal of molecular sciences*, 21(24), 9682. <https://doi.org/10.3390/ijms21249682>
135. Eguchi, A., De Mollerat Du Jeu, X., Johnson, C. D., Nektaria, A., & Feldstein, A. E. (2016). Liver Bid suppression for treatment of fibrosis associated with non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of hepatology*, 64(3), 699–707. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.002>
136. El Hafidi, M., & Baños, G. (1997). In vivo plasma lipid oxidation in sugar-induced rat hypertriglyceridemia and hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 30(3 Pt 2), 624–628. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.30.3.624>
137. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), 265–275.
138. Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry*, 226(1), 497–509.
139. Tserng, K. Y., Kliegman, R. M., Miettinen, E. L., & Kalhan, S. C. (1981). A rapid, simple, and sensitive procedure for the determination of free fatty acids in plasma using glass capillary column gas-liquid chromatography. *Journal of lipid research*, 22(5), 852–858.
140. El Hafidi, M., Pérez, I., Zamora, J., Soto, V., Carvajal-Sandoval, G., & Baños, G. (2004). Glycine intake decreases plasma free fatty acids, adipose cell size, and blood pressure in sucrose-fed rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 287(6), R1387–R1393. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00159.2004>
141. Amigo, I., Menezes-Filho, S. L., Luévano-Martínez, L. A., Chausse, B., & Kowaltowski, A. J. (2017). Caloric restriction increases brain mitochondrial calcium retention capacity and protects against excitotoxicity. *Aging cell*, 16(1), 73–81. <https://doi.org/10.1111/acer.12527>
142. Chory, J., & Pollard, J. D., Jr (2001). Separation of small DNA fragments by conventional gel electrophoresis. *Current protocols in molecular biology*, Chapter 2, Unit 2.7. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0207s47>
143. Ruiz-Ramírez, A., Barrios-Maya, M. A., López-Acosta, O., Molina-Ortiz, D., & El-Hafidi, M. (2015). Cytochrome c release from rat liver mitochondria is compromised by increased saturated cardiolipin species induced by sucrose feeding. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 309(9), E777–E786. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00617.2014>
144. Hulver, M. W., Berggren, J. R., Cortright, R. N., Dudek, R. W., Thompson, R. P., Pories, W. J., MacDonald, K. G., Cline, G. W., Shulman, G. I., Dohm, G. L., & Houmard, J. A. (2003). Skeletal

- muscle lipid metabolism with obesity. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 284(4), E741–E747. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00514.2002>
145. Błachnio-Zabielska, A. U., Baranowski, M., Hirnle, T., Zabielski, P., Lewczuk, A., Dmitruk, I., & Górski, J. (2012). Increased bioactive lipids content in human subcutaneous and epicardial fat tissue correlates with insulin resistance. *Lipids*, 47(12), 1131–1141. <https://doi.org/10.1007/s11745-012-3722-x>
 146. Schönfeld, P., Dymkowska, D., & Wojtczak, L. (2009). Acyl-CoA-induced generation of reactive oxygen species in mitochondrial preparations is due to the presence of peroxisomes. *Free radical biology & medicine*, 47(5), 503–509. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.006>
 147. Van den Branden, C., Vamecq, J., Dacremont, G., Premereur, N., & Roels, F. (1987). Short and long term influence of phenothiazines on liver peroxisomal fatty acid oxidation in rodents. *FEBS letters*, 222(1), 21–26. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80184-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80184-9)
 148. Rodrigues, T., Santos, A. C., Pigoso, A. A., Mingatto, F. E., Uyemura, S. A., & Curti, C. (2002). Thioridazine interacts with the membrane of mitochondria acquiring antioxidant activity toward apoptosis--potentially implicated mechanisms. *British journal of pharmacology*, 136(1), 136–142. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704672>
 149. Yang, R. L., Shi, Y. H., Hao, G., Li, W., & Le, G. W. (2008). Increasing Oxidative Stress with Progressive Hyperlipidemia in Human: Relation between Malondialdehyde and Atherogenic Index. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 43(3), 154–158. <https://doi.org/10.3164/jcbn.2008044>
 150. Xu, Z., Zhang, D., He, X., Huang, Y., & Shao, H. (2016). Transport of Calcium Ions into Mitochondria. *Current genomics*, 17(3), 215–219. <https://doi.org/10.2174/1389202917666160202215748>
 151. Hurst, S., Hoek, J., & Sheu, S. S. (2017). Mitochondrial Ca²⁺ and regulation of the permeability transition pore. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 49(1), 27–47. <https://doi.org/10.1007/s10863-016-9672-x>
 152. Jang, S., Chapa-Dubocq, X. R., Fossati, S., & Javadov, S. (2021). Analysis of Mitochondrial Calcium Retention Capacity in Cultured Cells: Permeabilized Cells Versus Isolated Mitochondria. *Frontiers in physiology*, 12, 773839. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.773839>
 153. Kantrow, S. P., Tatro, L. G., & Piantadosi, C. A. (2000). Oxidative stress and adenine nucleotide control of mitochondrial permeability transition. *Free radical biology & medicine*, 28(2), 251–260. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(99\)00238-5](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00238-5)
 154. Barry, M., Heibin, J., Pinkoski, M., & Bleackley, R. C. (2000). Quantitative measurement of apoptosis induced by cytotoxic T lymphocytes. *Methods in enzymology*, 322, 40–46. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)22006-5](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)22006-5)
 155. Yue, X., Zhao, Y., Xu, Y., Zheng, M., Feng, Z., & Hu, W. (2017). Mutant p53 in Cancer: Accumulation, Gain-of-Function, and Therapy. *Journal of molecular biology*, 429(11), 1595–1606. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.03.030>
 156. Hu, Q., Wu, D., Chen, W., Yan, Z., Yan, C., He, T., Liang, Q., & Shi, Y. (2014). Molecular determinants of caspase-9 activation by the Apaf-1 apoptosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(46), 16254–16261. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418000111>
 157. Baños, G., Carvajal, K., Cardoso, G., Zamora, J., & Franco, M. (1997). Vascular reactivity and effect of serum in a rat model of hypertriglyceridemia and hypertension. *American journal of hypertension*, 10(4 Pt 1), 379–388. [https://doi.org/10.1016/s0895-7061\(96\)00400-1](https://doi.org/10.1016/s0895-7061(96)00400-1)
 158. Reaven, G. M., & Ho, H. (1991). Sugar-induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *American journal of hypertension*, 4(7 Pt 1), 610–614. <https://doi.org/10.1093/ajh/4.7.610>
 159. Braverman-Bronstein, A., Camacho-García-Formentí, D., Zepeda-Tello, R., Cudhea, F., Singh, G. M., Mozaffarian, D., & Barrientos-Gutierrez, T. (2020). Mortality attributable to sugar sweetened beverages consumption in Mexico: an update. *International journal of obesity (2005)*, 44(6), 1341–1349. <https://doi.org/10.1038/s41366-019-0506-x>
 160. El-Hafidi, M., Franco, M., Ramírez, A. R., Sosa, J. S., Flores, J. A. P., Acosta, O. L., Salgado, M. C., & Cardoso-Saldaña, G. (2018). Glycine Increases Insulin Sensitivity and Glutathione Biosynthesis and Protects against Oxidative Stress in a Model of Sucrose-Induced Insulin

- Resistance. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 2101562. <https://doi.org/10.1155/2018/2101562>
161. El Hafidi, M., Valdez, R., & Baños, G. (2000). Possible relationship between altered fatty acid composition of serum, platelets, and aorta and hypertension induced by sugar feeding in rats. *Clinical and experimental hypertension (New York, N.Y.: 1993)*, 22(1), 99–108. <https://doi.org/10.1081/CEH-100100065>
 162. Ruiz-Ramírez, A., Ortiz-Balderas, E., Cardozo-Saldaña, G., Diaz-Diaz, E., & El-Hafidi, M. (2014). Glycine restores glutathione and protects against oxidative stress in vascular tissue from sucrose-fed rats. *Clinical science (London, England: 1979)*, 126(1), 19–29. <https://doi.org/10.1042/CS20130164>
 163. Rajendran, S., Kizhakkayil Padikkal, A. K., Mishra, S., & Madhavanpillai, M. (2022). Association of Lipid Accumulation Product and Triglyceride-Glucose Index with Metabolic Syndrome in Young Adults: A Cross-sectional Study. *International journal of endocrinology and metabolism*, 20(2), e115428. <https://doi.org/10.5812/ijem-115428>
 164. Tuvdendorj, D., Zhang, X. J., Chinkes, D. L., Wang, L., Wu, Z., Rodriguez, N. A., Herndon, D. N., & Wolfe, R. R. (2015). Triglycerides produced in the livers of fasting rabbits are predominantly stored as opposed to secreted into the plasma. *Metabolism: clinical and experimental*, 64(5), 580–587. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.01.002>
 165. ALJohani, A. M., Syed, D. N., & Ntambi, J. M. (2017). Insights into Stearoyl-CoA Desaturase-1 Regulation of Systemic Metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 28(12), 831–842. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.10.003>
 166. Barrios-Maya, M. A., Ruiz-Ramírez, A., Quezada, H., Céspedes Acuña, C. L., & El-Hafidi, M. (2021). Palmitoyl-CoA effect on cytochrome c release, a key process of apoptosis, from liver mitochondria of rat with sucrose diet-induced obesity. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 154, 112351. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112351>
 167. Ciapaite, J., Bakker, S. J., Diamant, M., van Eikenhorst, G., Heine, R. J., Westerhoff, H. V., & Krab, K. (2006). Metabolic control of mitochondrial properties by adenine nucleotide translocator determines palmitoyl-CoA effects. Implications for a mechanism linking obesity and type 2 diabetes. *The FEBS journal*, 273(23), 5288–5302. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05523.x>
 168. Schönfeld, P., & Wojtczak, L. (2008). Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free radical biology & medicine*, 45(3), 231–241. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.029>
 169. Kushnareva, Y., Murphy, A. N., & Andreyev, A. (2002). Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *The Biochemical journal*, 368(Pt 2), 545–553. <https://doi.org/10.1042/BJ20021121>
 170. Schönfeld, P., Wieckowski, M. R., Lebieczińska, M., & Wojtczak, L. (2010). Mitochondrial fatty acid oxidation and oxidative stress: lack of reverse electron transfer-associated production of reactive oxygen species. *Biochimica et biophysica acta*, 1797(6-7), 929–938. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.010>
 171. Nesci S. (2020). The mitochondrial permeability transition pore in cell death: A promising drug binding bioarchitecture. *Medicinal research reviews*, 40(2), 811–817. <https://doi.org/10.1002/med.21635>
 172. Miotto, P. M., LeBlanc, P. J., & Holloway, G. P. (2018). High-Fat Diet Causes Mitochondrial Dysfunction as a Result of Impaired ADP Sensitivity. *Diabetes*, 67(11), 2199–2205. <https://doi.org/10.2337/db18-0417>
 173. McStay, G. P., Clarke, S. J., & Halestrap, A. P. (2002). Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *The Biochemical journal*, 367(Pt 2), 541–548. <https://doi.org/10.1042/BJ20011672>
 174. Stewart, J. M., Blakely, J. A., & Johnson, M. D. (2000). The interaction of ferrocyanochrome c with long-chain fatty acids and their CoA and carnitine esters. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 78(6), 675–681.

175. Mishra, J., Davani, A. J., Natarajan, G. K., Kwok, W. M., Stowe, D. F., & Camara, A. K. S. (2019). Cyclosporin A Increases Mitochondrial Buffering of Calcium: An Additional Mechanism in Delaying Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening. *Cells*, 8(9), 1052. <https://doi.org/10.3390/cells8091052>
176. Li, Y., Johnson, N., Capano, M., Edwards, M., & Crompton, M. (2004). Cyclophilin-D promotes the mitochondrial permeability transition but has opposite effects on apoptosis and necrosis. *The Biochemical journal*, 383(Pt 1), 101–109. <https://doi.org/10.1042/BJ20040669>
177. Lee, J., Schriener, S. E., & Wallace, D. C. (2009). Adenine nucleotide translocator 1 deficiency increases resistance of mouse brain and neurons to excitotoxic insults. *Biochimica et biophysica acta*, 1787(5), 364–370. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.01.014>
178. Oberhauser, L., Granziera, S., Colom, A., Goujon, A., Lavallard, V., Matile, S., Roux, A., Brun, T., & Maechler, P. (2020). Palmitate and oleate modify membrane fluidity and kinase activities of INS-1E β -cells alongside altered metabolism-secretion coupling. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1867(2), 118619. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.118619>
179. Mandal, A., Hoop, C. L., DeLucia, M., Kodali, R., Kagan, V. E., Ahn, J., & van der Wel, P. C. (2015). Structural Changes and Proapoptotic Peroxidase Activity of Cardiolipin-Bound Mitochondrial Cytochrome c. *Biophysical journal*, 109(9), 1873–1884. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.09.016>
180. Jiang, J., Huang, Z., Zhao, Q., Feng, W., Belikova, N. A., & Kagan, V. E. (2008). Interplay between bax, reactive oxygen species production, and cardiolipin oxidation during apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 368(1), 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.01.055>
181. Barayeu, U., Lange, M., Méndez, L., Arnhold, J., Shadyro, O. I., Fedorova, M., & Flemmig, J. (2019). Cytochrome c autocatalyzed carbonylation in the presence of hydrogen peroxide and cardiolipins. *The Journal of biological chemistry*, 294(6), 1816–1830. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004110>
182. Zhao, Z., Zhang, X., Zhao, C., Choi, J., Shi, J., Song, K., Turk, J., & Ma, Z. A. (2010). Protection of pancreatic beta-cells by group VIA phospholipase A(2)-mediated repair of mitochondrial membrane peroxidation. *Endocrinology*, 151(7), 3038–3048. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0016>
183. Han, X., Yang, J., Yang, K., Zhao, Z., Abendschein, D. R., & Gross, R. W. (2007). Alterations in myocardial cardiolipin content and composition occur at the very earliest stages of diabetes: a shotgun lipidomics study. *Biochemistry*, 46(21), 6417–6428. <https://doi.org/10.1021/bi7004015>
184. Paradies, G., Paradies, V., Ruggiero, F. M., & Petrosillo, G. (2018). Mitochondrial bioenergetics and cardiolipin alterations in myocardial ischemia-reperfusion injury: implications for pharmacological cardioprotection. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 315(5), H1341–H1352. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00028.2018>
185. Petrosillo, G., Casanova, G., Matera, M., Ruggiero, F. M., & Paradies, G. (2006). Interaction of peroxidized cardiolipin with rat-heart mitochondrial membranes: induction of permeability transition and cytochrome c release. *FEBS letters*, 580(27), 6311–6316. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.036>
186. Su, L., Zhang, J., Gomez, H., Kellum, J. A., & Peng, Z. (2023). Mitochondria ROS and mitophagy in acute kidney injury. *Autophagy*, 19(2), 401–414. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2084862>
187. Farrell, G. C., Haczejni, F., & Chitturi, S. (2018). Pathogenesis of NASH: How Metabolic Complications of Overnutrition Favour Lipotoxicity and Pro-Inflammatory Fatty Liver Disease. *Advances in experimental medicine and biology*, 1061, 19–44. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8684-7_3
188. El Hafidi, M. E., Buelna-Chontal, M., Sánchez-Muñoz, F., & Carbó, R. (2019). Adipogenesis: A Necessary but Harmful Strategy. *International journal of molecular sciences*, 20(15), 3657. <https://doi.org/10.3390/ijms20153657>
189. Kanda, T., Matsuoka, S., Yamazaki, M., Shibata, T., Nirei, K., Takahashi, H., Kaneko, T., Fujisawa, M., Higuchi, T., Nakamura, H., Matsumoto, N., Yamagami, H., Ogawa, M., Imazu, H., Kuroda, K.,

- & Moriyama, M. (2018). Apoptosis and non-alcoholic fatty liver diseases. *World journal of gastroenterology*, 24(25), 2661–2672. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i25.2661>
190. Ruiz-Ramírez, A., Barrios-Maya, M., Quezada-Pablo, H., López-Acosta, O., & El-Hafidi, M. (2020). Kidney dysfunction induced by a sucrose-rich diet in rat involves mitochondria ROS generation, cardiolipin changes, and the decline of autophagy protein markers. *American journal of physiology. Renal physiology*, 318(1), F53–F66. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00208.2019>
191. Penzo, D., Tagliapietra, C., Colonna, R., Petronilli, V., & Bernardi, P. (2002). Effects of fatty acids on mitochondria: implications for cell death. *Biochimica et biophysica acta*, 1555(1-3), 160–165. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(02\)00272-4](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(02)00272-4)
192. Sparagna, G. C., Hickson-Bick, D. L., Buja, L. M., & McMillin, J. B. (2000). A metabolic role for mitochondria in palmitate-induced cardiac myocyte apoptosis. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 279(5), H2124–H2132. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.279.5.H2124>
193. Seeßle, J., Liebisch, G., Schmitz, G., Stremmel, W., & Chamulitrat, W. (2015). Palmitate activation by fatty acid transport protein 4 as a model system for hepatocellular apoptosis and steatosis. *Biochimica et biophysica acta*, 1851(5), 549–565. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2015.01.004>
194. Alkhoury, N., Carter-Kent, C., & Feldstein, A. E. (2011). Apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease: diagnostic and therapeutic implications. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 5(2), 201–212. <https://doi.org/10.1586/egh.11.6>



Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchemtox



Palmitoyl-CoA effect on cytochrome c release, a key process of apoptosis, from liver mitochondria of rat with sucrose diet-induced obesity

Miguel-Angel Barrios-Maya^a, Angélica Ruiz-Ramírez^a, Héctor Quezada^b, Carlos L. Céspedes Acuña^c, Mohammed El-Hafidi^{a,*}

^a Depto de Biomedicina Cardiovascular, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Juan Badiano No 1, Colonia Sección XVI, Tlalpan, CP 14080, C.D. México, Mexico

^b Laboratorio de Inmunología y Proteómica, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Doctor Márquez # 162, Col. Doctores, CP 06720, C.D. México, Mexico

^c Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias, Universidad del BioBio, Chillan, Chile

ARTICLE INFO

Handling Editor: Dr. Jose Luis Domingo

Keywords:
Cardiolipin
Cytochrome c release
Lipotoxicity
Metabolic disease
Mitochondria
Palmitoyl-CoA

ABSTRACT

Cytochrome c (cyt-c) release from the mitochondria to the cytosol is a key process in the initiation of hepatocyte apoptosis involved in the progression of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) to fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Hepatocyte apoptosis may be related to lipotoxicity due to the accumulation of palmitic acid and palmitoyl-CoA (Pal-CoA). Therefore, the aim of this study is to examine whether Pal-CoA induces cyt-c release from liver mitochondria of sucrose-fed rat (SF). Pal-CoA-induced cyt-c release was sensitive to cyclosporine A indicating the involvement of the mitochondrial membrane permeability transition (mMPT). In addition, cyt-c release from SF mitochondria remains significantly lower than C mitochondria despite the increased rate of H₂O₂ generation in SF mitochondria. The decreased cyt-c release from SF may be also related to the increased proportion of the palmitic acid-enriched cardiolipin, due to the high availability of palmitic acid in SF liver. The enrichment of cardiolipin molecular species with palmitic acid makes cardiolipin more resistant to peroxidation, a mechanism involved in the dissociation of cyt-c from mitochondrial inner membrane. These results suggest that Pal-CoA may participate in the progression of NAFLD to more severe disease through mechanisms involving cyt-c release and mMPT, a key process of apoptosis.

1. Introduction

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFL) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH) are associated with obesity, metabolic syndrome, insulin resistance, and dyslipidemia induced by hyperalimentation with high-fat and high-carbohydrate diets. Exposure of the liver to high concentrations of lipids and carbohydrates leads to the development of lipotoxicity and glucotoxicity, respectively, which play an important role in liver cell injury. The mechanisms involved in lipotoxicity and glucotoxicity include oxidative stress and mitochondrial alteration, which appear to play an important role in the progression of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) to fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Geng et al., 2021; Friedman et al., 2018). In addition, mitochondrial dysfunction has been described as playing an important role in the development of hepatocyte apoptosis, a process implicated in the progression of NAFLD to more severe disease (Kanda et al., 2018; Léveillé and Estall, 2019).

In both the intrinsic and extrinsic pathways of hepatic apoptosis, cytochrome c (cyt-c) release from mitochondria to the cytosol is the first step in the apoptosis process within the cell (Lemasters et al., 2009). In fatty liver, cyt-c release from mitochondria can be influenced by the accumulation of free fatty acids (FFA) and their fatty acyl-CoA intermediates, due to the disrupted balance between catabolic and anabolic processes that result in hepatic lipotoxicity (El-Hafidi et al., 2019; Farrell et al., 2018). The Excess FFA in the NAFLD, as oxidative substrates, may exacerbate the generation of reactive oxygen species (ROS) to promote mitochondrial dysfunction (Buzzetti et al., 2016). Palmitic acid, the most common saturated fatty acid in animals and plants, is ingested as part of the diet or can be produced by *de novo* lipid synthesis from excessive carbohydrate consumption. Palmitic acid is well known to affect mitochondrial function, either in isolated mitochondria or in cultured cells (Penzo et al., 2002; Sparagna et al., 2000). In a previous study using a model of obesity and hepatic steatosis induced by a sucrose-rich diet, palmitic acid levels and ROS generation

* Corresponding author.

E-mail address: medelhafidi@yahoo.com (M. El-Hafidi).

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112351>

Received 16 March 2021; Received in revised form 10 June 2021; Accepted 14 June 2021

Available online 24 June 2021

0278-6915/© 2021 Published by Elsevier Ltd.

in succinate- or pyruvate/malate-oxidizing mitochondria were found increased compared to control mitochondria (Ruiz-Ramírez et al., 2015, 2020; Kanda et al., 2018). Moreover, several studies have described the collapsing effect of palmitic acid on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and its inhibitory effect on the activities of respiratory chain complexes increasing ROS generation (Nakamura et al., 2009; Chen et al., 2018, 2020; Alnahdi et al., 2019). Thus, palmitic acid-induced lipotoxicity may be closely related to progressive organelle damage and cell death through a mechanism that involves mitochondrial dysfunction.

Palmitic acid is well known to be associated with cell death by apoptosis through different mechanisms, including its activation to palmitoyl-CoA (Pal-CoA) (Seeble et al., 2015). Pal-CoA is a substrate for peroxisomes and mitochondria, both of which are important intracellular sources of ROS involved in NAFLD (Forrester et al., 2018). In mitochondria the beta-oxidation of Pal-CoA under physiological conditions, generates NAD⁺/NADH and FAD/FADH₂ that transfer electrons to the mitochondrial electron transfer chain to carry out the tetravalent reduction of oxygen by mitochondrial cytochrome oxidase in a process coupled to energy generation and ATP synthesis. However, a small fraction of the total electron transfer is used in the univalent reduction of at least 0.1–2% of the oxygen consumed by mitochondria to generate superoxide anion which is converted to H₂O₂ by superoxide dismutase (Spejler et al., 2014). A few reports have described the inhibitory effect a Pal-CoA, on adenine nucleotide translocase (ANT), reducing mitochondrial sensitivity to ADP to inhibit ROS generation in skeletal muscle mitochondria of experimental animals with high-fat diet (Miotto et al., 2013; Ciapaitė et al., 2006). However, there are no data on whether Pal-CoA induces cyt-c release in mitochondria of a rat model with intra-abdominal fat accumulation and fatty liver induced by a high-sucrose diet. Furthermore, the high availability of palmitic acid in fatty liver is also associated with an increase in palmitic acid-enriched species of mitochondrial cardiolipin molecules, an exclusive phospholipid of mitochondrial inner membrane, suggesting a high incorporation of palmitic acid into cardiolipin during its *de novo* synthesis and making cardiolipin less susceptible to peroxidation (Ruiz-Ramírez et al., 2015, 2020). Indeed, the peroxidation of cardiolipin is a proposed mechanism for the dissociation of cyt-c from the mitochondrial inner membrane, a key process in the initiation of apoptosis (El-Hafidi et al., 2020). Thus, Pal-CoA may play an important role in the progression of liver disease from simple steatosis to more severe hepatic steatohepatitis in the sucrose-fed model, by involving cyt-c release and key apoptosis process. Therefore, the purpose of this study was to examine the effects of Pal-CoA on cyt-c release from liver mitochondria of an obesity model by monitoring mitochondrial membrane permeability transition (mMPT) and ROS generation, which are possible events associated with cyt-c release from mitochondria.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The experiments were conducted in accordance with the Mexican Federal Regulations on Experimentation and Animal Care (NOM-062-ZOO-2001). The protocol was approved by the Animal Care Committee of our National Institute of Cardiology Ignacio Chávez. Male Wistar rats, 28 days old and weighing approximately 65 ± 5 g, were housed on a 12:12 light-dark cycle and randomly separated into two groups of 6–8 animals each: a control group (C) in which the rats received drinking water, and a sucrose-fed group (SF) in which the rats received drinking water containing 30% sucrose for 24 weeks. Both groups of animals were fed a solid diet ad libitum (Lab diet formula 5001, Ralston Purina Corp., St Louis, MO). Food (g day⁻¹ rat⁻¹) and water (ml day⁻¹ rat⁻¹) consumption was monitored every 2 days during the last week of the experimental period. Individual caloric intake (kJ day⁻¹ rat⁻¹) was assessed from food and sucrose intake. After 24 weeks of treatment, rats

were fasted overnight and euthanized the following day.

2.2. Plasma sampling

After fasting overnight, the animals were euthanized and their blood was immediately collected in a tube containing 10 mM K-EDTA and centrifuged at 600×g for 20 min at 4 °C. The resulting plasma was supplemented with 0.005% BHT (butylated hydroxytoluene) as an antioxidant and stored at -70 °C until lipid analysis could be performed. Intra-abdominal fat, an important marker of insulin resistance and a feature of the metabolic syndrome, was dissected from the retroperitoneal cavity and around both kidneys and immediately weighed. Visceral and duodenal fat were not included in this procedure. All procedures were performed in an ice bath.

2.3. Mitochondria preparation

After sacrificing the animals, the liver was rapidly extracted and placed in buffer A containing 250 mM sucrose, 10 mM Tris-base, 1 mM EGTA, pH 7.4 and stored at 4 °C. The liver was homogenized in 30 ml of the buffer A in a Potter-type homogenizer. The homogenate was centrifuged at 600×g for 10 min at 4 °C to remove connective tissue and cellular debris. The supernatant was recovered and centrifuged at 8000×g for 10 min at 4 °C to obtain the mitochondrial fraction. The resulting pellet was suspended in buffer B, containing 250 mM sucrose, 10 mM Tris-base, pH 7.4, supplemented with 0.1% bovine serum albumin (BSA) and incubated for 10 min at 4 °C. After incubation, 20 ml of buffer B was added and the mixture was centrifuged at 8000×g for 10 min at 4 °C. The mitochondrial fraction was suspended in 1 ml of the same buffer B without BSA and the samples were stored at 4 °C for the duration of the experiments. Sample protein content was determined according to the method of Lowry et al. (1951) using BSA for the standard curve.

2.4. Lipid extraction and analysis of FFA composition

FFAs were extracted from 10 mg of mitochondrial protein or whole liver homogenate in the presence of 10 µg and 100 µg of heptadecanoic acid (internal standard), respectively, using chloroform-methanol (2:1 v/v) containing 0.002% BHT, as described by Folch et al. (1957). The resulting lipid residue was dissolved in 1 ml of methanol containing 0.1 ml of 2,2 dimethoxypropane and 0.01 ml of concentrated H₂SO₄ to esterify the FFAs to their corresponding methyl esters at room temperature for 15 min, as described by Tserng et al. (1981) and modified in our laboratory (El Hafidi et al., 2004). These reaction conditions are necessary to avoid esterification of phospholipid fatty acids, cholesterol esters and triglycerides. This method was compared to the method using thin layer chromatography to separate FFA from other lipid components of the total lipid extract and no significant difference was found between the two methods. The method used in this work has the advantage of limiting the exposure time of the lipid extract to auto-oxidation. The concentration and composition of FFA methyl esters were evaluated by gas liquid chromatography (GLC) as previously described (El Hafidi et al., 2004).

2.5. Mitochondria oxygen uptake

Mitochondrial respiratory rates were measured using a Clark-type O₂ electrode and incubating 0.5 mg protein/ml of fresh mitochondria in an air-saturated medium containing: 125 mM KCl, 10 mM HEPES (pH adjusted to 7.4 with KOH), 10 mM EGTA, 2 mM K₂HPO₄, 5 mM MgCl₂. Oxygen uptake was assessed in forward and reverse electron transport fluxes by energizing mitochondria with pyruvate/malate (5/3 mM) or succinate (5 mM), respectively, at 30 °C. ADP (250 µM) was added to evaluate state III. State IV corresponds to oxygen uptake after ADP exhausting. Oxygen uptake was also evaluated in the presence of Pal-

CoA (C16:0-CoA) and palmitic acid.

2.6. Cytochrome c release

Mitochondria (1 mg) were incubated in 1 ml medium containing 150 mM sucrose, 50 mM KCl, 5 mM Tris, 10 μ M EGTA and 1 mM KH_2PO_4 (pH 7.4) for 10 min at 30 °C with continuous stirring. Cyt-c release experiments were performed in the presence of different concentrations of Pal-CoA (2.5, 5, 10 and 20 μ M) and in the presence of cyclosporin A (CsA), an inhibitor of mMPT, and in the presence of thioridazine as an inhibitor of peroxisomal Pal-CoA oxidase. Other experimental conditions are indicated in Figure legends. After 10 min of incubation, the samples were centrifuged for 10 min at 8000 \times g. The supernatant was filtered through a membrane of PVDF (0.45 μ m) and the cytochrome c content was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a 300 Å DeltaPack C4 column with 5 μ m particles (3.9 \times 150 mm, Waters). A gradient of 30% acetonitrile in water with trifluoroacetic acid (0.1% v/v) to 70% acetonitrile in water with trifluoroacetic acid (0.1% v/v) over 15 min with a flow rate of 1 ml/min was used, as described elsewhere (Ruiz-Ramírez et al., 2015). Cyt-c was detected at 393 nm and the concentration was quantitated using a standard curve of cyt-c from bovine heart (Sigma).

2.7. Mitochondria H_2O_2 generation

H_2O_2 generation by mitochondria was assessed by Amplex Red fluorescence measured with a PerkinElmer LS50B spectrofluorometer and using a stirred cuvette maintained at 30 °C. Mitochondria (0.250 mg) were incubated with different concentrations of Pal-CoA (2.5, 5, 10, and 20 μ M) in 2 ml of buffer containing 150 mM sucrose, 50 mM KCl, 5 mM Tris, 3 mM MgCl_2 , 10 μ M EGTA, 1 mM KH_2PO_4 (pH 7.4), 10 μ M Amplex Red, and 1 U/ml horseradish peroxidase. The effect of ADP, CsA, catalase, and thioridazine on H_2O_2 generation from mitochondria was examined using the same buffer. Peroxidase was used to amplify Amplex Red fluorescence during H_2O_2 reduction (Ruiz-Ramírez et al., 2011; Rodrigues and Gomes, 2010). Amplex Red oxidation was monitored at 475 and 525 nm as excitation and emission wavelengths, respectively. The rate of H_2O_2 generation was calibrated by adding known amounts of H_2O_2 to the buffer containing the appropriate dye, horseradish peroxidase and mitochondria.

2.8. Mitochondria membrane permeability transition (mMPT)

Mitochondria (0.250 mg/ml) were incubated in cyt-c release-buffer (150 mM sucrose, 50 mM KCl, 5 mM Tris, and 250 μ M KH_2PO_4 pH 7.4) containing 100 μ M Calcium Green-5N (Thermo Fisher Scientific) for 1 min. Thereafter, mitochondria were energized with 5 mM succinate and CaCl_2 was added repeatedly (with a final concentration of 5 μ M per addition) at 1 min intervals until induction of the permeability transition. This experiment was performed in the presence of Pal-CoA at 2.5, 5 and 10 μ M and in the presence of 5 μ M CsA and 250 μ M ADP to inhibit mMPT. Catalase (100 U/ml) and thioridazine (25 μ M) were also assayed to investigate ROS involvement in mMPT. Calcium Green-5N fluorescence was measured in a PerkinElmer LS50B spectrofluorometer, using a magnetically stirred quartz cuvette at 30 °C. Thereafter, saturated concentrations of Ca^{2+} and EGTA were added at the end of each experiment to obtain the fluorescence F_{max} and F_{min} respectively, to calculate the concentration of Ca^{2+} within mitochondria that serve to calculate the capacity of mitochondria to retain Ca^{2+} ($\text{CRC} = n + [\text{Ca}^{2+}] * \text{mg}^{-1}$ protein) as described by Amigo et al. (2017), where n is the number of times calcium is added before mMPT induction. The concentration of Ca^{2+} was determined according to the formula: $[\text{Ca}^{2+}] = \text{Kd} * (F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F)$ (Amigo et al., 2017), where F is the slope of fluorescence after a successive addition of 5 μ M of Ca^{2+} . The dissociation constant (Kd) is a measure of the affinity of the probe for calcium, a Kd of 14 μ M as reported by the manufacturer was used.

2.9. Western blot of cyt-c and mMPT-related proteins (ANT: adenine nucleotide translocase, cyclophilin-D and VDAC: Voltage-dependent anion channel)

Proteins were separated using 8% or 13% SDS-polyacrylamide gel (SDS-PAGE), depending on their molecular weights, and electro-transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Immobilon-P, Millipore). Cyt-c, ANT, cyclophilin D, and VDAC were measured in mitochondria. After transfer, PVDF membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in TBS-Tween 20 buffer (10 mM Tris-base, 10 mM NaCl, 0.1% Tween-20) for 2 h at room temperature. The blocked membranes were incubated overnight at 4 °C in the same buffer without Tween containing mouse polyclonal antibody against cyt-c (1/1000), ANT (1/500), cyclophilin D (1/500), VDAC (1/200) (Santa Cruz Biotechnology, CA). For control load, goat polyclonal anti COXIV, a cytochrome oxidase subunit (1/1000) (Santa Cruz Biotechnology CA) was used. The PVDF membranes were washed with TBS-Tween buffer and then incubated with horseradish peroxidase conjugated to anti-mouse, anti-goat or anti-rabbit IgG, depending on the primary anti-body used. The bands were visualized using an enhanced chemiluminescence detection reagent (Millipore) and exposed on Kodak Biomax ML scientific image film for 5–10 min. The band densities were analyzed by the photodocumenter GelDoc (UVP, Inc, Upland, CA, USA).

2.10. Cardiolipin analysis

Ten mg mitochondrial protein was treated with 20 μ M palmitic acid or Pal-CoA for 10 min. After the incubation was ended, lipids were extracted from mitochondria using chloroform-methanol (2:1, v/v) in the presence of 20 nmol of tetramethylammonium cardiolipin ((C14:0)₂CL) as internal standard, according to the modified Folch extraction technique (Folch et al., 1957). The total lipid extracts were dried under a gentle stream of nitrogen and they were stored at -20 °C until their analysis. Lipid extracts were suspended in 500 μ l hexane-isopropanol (3:2, v/v) containing 10 mM ammonium acetate and were injected by a direct infusion into a mass spectrometer (MS) equipped with electrospray ionization (ESI) (Bruker, Billerica, MA, U.S.A.). The sample infusion flow rate was 5 μ l/min and the needle operated at 3 kV in negative mode. The nitrogen drying gas flux was maintained at 8 L/min at 200 °C. The ion source and the ion voltage parameters were optimized with respect to the negative ions of the standard CL. The MS data were collected under full scan mode in the range of 600–2500 m/z (mass to charge ratio).

2.11. Statistical analysis

All statistical analyses were performed with Sigma Plot version 11 (Systat Software Inc, CA, U.S.A.). All values are presented as means \pm SD. The differences between groups were determined by one-way ANOVA for selected variables followed by Tukey test. The number of animals used for each analysis is indicated in the Figure and Table footnotes. Group means differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. General characteristics of animals and liver FFA contents

Table 1 shows that the SF animals ingested less solid food than the animals of control group (C). However, there was no difference in water intake between the two groups. Caloric intake calculated from food and sucrose-sweetened drinking water by the SF rats was significantly higher than that of the C group. The sucrose-rich diet promotes significant accumulation of intra-abdominal fat ($p < 0.01$) and a significant increase in body weight ($p < 0.05$). These alterations are associated with a significant increase in plasma triglycerides ($p < 0.01$), whereas glucose

Table 1
General characteristics of animals.

Clinical features	Control	SF
Body weight (g)	485.5 ± 11.06	559.6 ± 22.4*
Intra-abdominal fat (g)	4.01 ± 0.4	21.03 ± 2.6**
Plasma glucose (mg/dl)	114.76 ± 4.7	101.9 ± 9.2
Plasma triglycerides (mg/dl)	58.5 ± 4.8	132.6 ± 10.4**
Cholesterol (mg/dl)	61.6 ± 4.5	58.2 ± 4.8
Food intake (g/day/rat)	23.6 ± 2.6	14.6 ± 3.7 *
Water intake (ml/day/rat)	45.6 ± 5.7	43.6 ± 4.8
Energy intake (Kcal/day/rat)	313.4 ± 10.7	375.3 ± 9.5*

Values are expressed as the mean ± SE (n = 8 different animals). The values were obtained at the end of the treatment period. Significant differences of the control group vs SF * P ≤ 0.05; **P ≤ 0.001.

and cholesterol remain unchanged in both experimental groups.

Table 2 shows a significant increase (p < 0.05) of palmitic, palmitoleic as well as oleic acids, in the mitochondrial fraction of SF rats compared to C rats. Conversely, the levels of polyunsaturated linoleic and arachidonic acids were found to be significantly lower in the mitochondria of SF animals compared to C animals (p < 0.05 and p < 0.001). In whole liver homogenates from SF rats compared to C rats, palmitoleic and oleic acids were significantly higher (p < 0.05) while palmitic acid increased but did not reach statistical significance. On the other hand, the amounts of polyunsaturated linoleic and arachidonic acids in the whole liver homogenates in SF animals do not differ significantly from those in C animals. Regarding the total amount of FFA resulting from the sum of the different fatty acids identified, it appears that the total FFA increases significantly (p < 0.05) in the whole liver homogenates of SF rats. In the mitochondrial fraction, however, the total FFA does not undergo any significant change.

3.2. Mitochondrial oxygen uptake

The rate of oxygen uptake by succinate-oxidizing mitochondria in the presence of ADP (state III) and after ADP depletion (state IV) did not differ significantly between SF and C mitochondria (Table 3), and no change was observed in the respiratory control (RC) that corresponds to the ratio between the rates of oxygen uptake in states III and IV. When Pal-CoA was added to succinate-oxidizing mitochondria, oxygen uptake significantly decreased in state III (p < 0.05) and showed no significant change in state IV, resulting in a significant decrease in RC in both types of mitochondria (p < 0.05). On the other hand, palmitic acid, as a free fatty acid and precursor of Pal-CoA, at the same concentration used for Pal-CoA, showed no effect on oxygen uptake in either control or SF mitochondria.

3.3. Palmitoyl-CoA and cytochrome c release

Fig. 1A shows a significant increase in cyt-c release from SF and C

Table 2
Free fatty acids in mitochondria and whole liver homogenate.

Fatty Acid	Mitochondria		Whole liver homogenate	
	C	SF	C	SF
Palmitic	9.02 ± 3.68	17.03 ± 5.8*	29.8 ± 15.3	35.8 ± 6.1
Palmitoleic	ND	1.02 ± 0.79**	0.6 ± 0.5	6.3 ± 2.1*
Stearic	17.28 ± 14.17	10.91 ± 2.58	12.2 ± 3.8	13.3 ± 2.4
Oleic	2.21 ± 1.1	5.61 ± 1.52**	11.1 ± 6.5	32.1 ± 8.5*
Linoleic	10.56 ± 8.11	4.81 ± 2.02*	14.3 ± 8.4	17.9 ± 6.4
Arachidonic	14.82 ± 9.73	6.27 ± 1.77**	10.2 ± 5.6	11.9 ± 3.7
Total FFA	53.92 ± 28.28	45.67 ± 9.53	78.5 ± 11.4	117.5 ± 27.6*

Values are expressed as the mean ± SE and represent nmol/mg of protein in mitochondria (n = 6 different animals). The values were obtained at the end of the treatment period. * corresponds to the significant differences of C group vs SF * P ≤ 0.05; **P ≤ 0.001. ND corresponds to Not Detected.

Table 3
Effect of Pal-CoA on mitochondria oxygen uptake.

Substrates	State III		State IV		RC	
	C	SF	C	SF	C	SF
G/M	112.4 ± 48.5	120 ± 48.1	23.8 ± 6.7	29.2 ± 3.6	4.9 ± 2	4.1 ± 1.6
Succinate	183.8 ± 35	198.9 ± 30.6	43.2 ± 9.8	55.1 ± 15.2	4.6 ± 2.3	4 ± 1.9
Succ +	113.5 ± 30.6 *	127.5 ± 36.4**	48.6 ± 16.8	60.5 ± 23.4	2.4 ± 0.6 *	2.2 ± 0.4**
CI6:0-CoA	154.6 ± 17.6	168.6 ± 76.8	49.7 ± 16.2	55.1 ± 12.8	3.6 ± 1.8	3 ± 1.2
Succ +	17.6	76.8	16.2	12.8	1.8	
CI6:0						

mitochondria oxidizing succinate compared with its release under baseline conditions (i.e., without succinate and Pal-CoA). Nevertheless, cyt-c release was significantly lower in SF mitochondria than in C mitochondria (12.62 ± 2.3 vs 23.1 ± 4.4 nmol/mg protein). In the presence of Pal-CoA at high concentrations (10 and 20 μM), cyt-c release from both types of mitochondria increased more than in the presence of succinate (Fig. 1A). However, cyt-c release remained lower in SF rats compared with the control. The addition of ADP to mitochondria significantly reduced cyt-c release in C and SF mitochondria during succinate oxidation, and this sensitivity to ADP disappeared when Pal-CoA was added to mitochondria (data not shown). Pre-incubation of mitochondria with cyclosporine A (CsA) suppressed Pal-CoA-induced cyt-c release in C and SF mitochondria (Fig. 1B). Because ROS generation has been described to be involved in cyt-c release from mitochondria, the addition of catalase to the incubation medium to scavenge H₂O₂ generated by Pal-CoA, induced a partial inhibitory effect on cyt-c release in C mitochondria and did not significantly affect cyt-c release from SF mitochondria (Fig. 1C). In the presence of Pal-CoA, ROS generation may be promoted by the activity of peroxisomal Pal-CoA oxidase, which may be present in trace amounts in our mitochondria preparation. Thus thioridazine, as an inhibitor of Pal-CoA oxidase (Van den Branden et al., 1987), partially inhibited cyt-c release from C mitochondria and had no effect on SF mitochondria (Fig. 1D). The difference in cyt-c release between SF and C mitochondria cannot be due to a difference in mitochondrial cyt-c level because Western blot analysis using the anti-cyt-c antibody showed no significant difference between C and SF mitochondria (Fig. 1E).

3.4. Effect of palmitoyl-CoA on mitochondria H₂O₂ generation

Fig. 2A shows that mitochondria from SF rat liver generated H₂O₂ at a higher rate than control mitochondria (121.2 ± 30.5 vs. 97.2 ± 13.7 pmol/min/mg) during succinate oxidation, as previously described (Ruiz-Ramírez et al., 2015). In the presence of ADP, H₂O₂ generation was significantly reduced in SF and C mitochondria (84.3 ± 10.6 vs. 121.2 ± 30.5 in SF and 75.9 ± 7.5 vs. 97.2 ± 13.7 pmol/min/mg in C mitochondria). In addition, ROS generation from SF mitochondria was more sensitive to ADP than that from C mitochondria. In the presence of 5–20 μM of Pal-CoA, H₂O₂ generation was exacerbated in both types of mitochondria (495.9 ± 66.6 vs 121.2 ± 30.5 in SF and 406.2 ± 48.9 vs 97.2 ± 13.7 pmol/min/mg in C mitochondria at 10 μM). Furthermore, H₂O₂ generation remained significantly higher in the mitochondria of SF animals than in C animals at all concentrations of Pal-CoA used. H₂O₂ generation induced by Pal-CoA at several concentrations was insensitive to ADP (data not shown) and to CsA at 5 μM (Fig. 2B), a concentration sufficient to inhibit the effect of Pal-CoA on cyt-c release in C and SF mitochondria. To investigate the involvement of H₂O₂ generated under the effect of Pal-CoA in our mitochondria preparation, catalase was added and was observed to inhibit H₂O₂ generation in a dose-responsive manner, as shown in Fig. 2C. The inhibitory effect of catalase on H₂O₂ generation does not differ between C and SF mitochondria. Fig. 2D shows the effect of thioridazine used to inhibit peroxisomal Pal-CoA oxidase, which may contribute to the increased H₂O₂ generation due

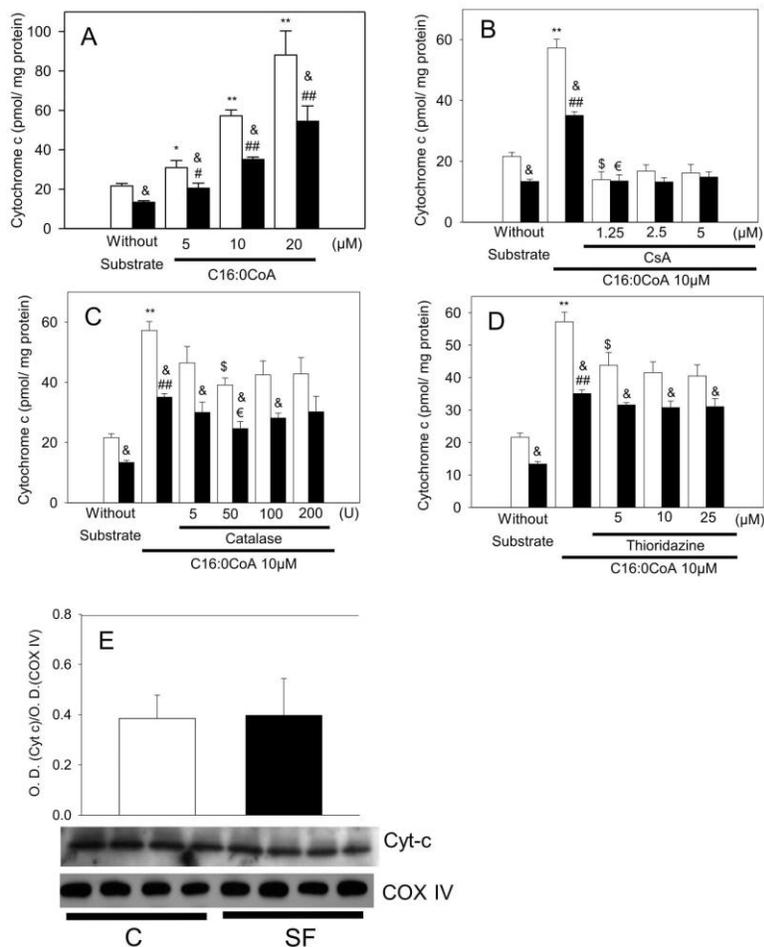


Fig. 1. Cytochrome *c* release in the presence of different concentrations of Pal-CoA (Panel A). Panel B corresponds to the effect of 10 μM Pal-CoA on cyt-*c* release in the presence of different concentrations of cyclosporine. Panels C and D correspond to the effect of catalase and thioridazine respectively, on cyt-*c* release induced by 10 μM Pal-CoA. Panel E corresponds to the Western blot of total mitochondrial cytochrome *c* from liver. The white bars correspond to controls; the black bars correspond to SF mitochondria. The values are expressed as mean ± SE ($n = 6$ to 8 different animals). * $P \leq 0.05$ and ** $P \leq 0.001$ correspond to C vs C + C16:0CoA; # $P \leq 0.05$ and ## $P \leq 0.001$ correspond to SF vs SF + C16:0CoA groups; & $P \leq 0.05$ corresponds to C vs SF; \$ $P \leq 0.05$ C vs C + all inhibitors used; € $P \leq 0.05$ SF vs SF + all inhibitors used.

to peroxisome traces in our mitochondria preparation. As shown in Fig. 2D, thioridazine inhibited Pal-CoA-induced H_2O_2 generation in a dose-responsive manner in both SF and control mitochondria. At all concentrations of pal-CoA used, the sensitivity to the inhibitory effect of thioridazine did not differ between C and SF mitochondria.

3.5. Palmitoyl-CoA and mitochondrial membrane permeability transition (mMPT)

mMPT is an event in which the inner mitochondrial membrane becomes permeable to solutes of less than 1500 Da, resulting in a collapse

of the mitochondrial transmembrane potential, inhibition of oxidative phosphorylation, release of pro-apoptotic factors, and cell death. The increased capacity of mitochondria to retain calcium is well known to delay mMPT and protect against mitochondrial dysfunction. Ca^{2+} (5 μM) was added every minute to mitochondria in the presence of Calcium Green-5N as a fluorescent Ca^{2+} probe. Ca^{2+} uptake was monitored by measuring extra-mitochondrial Calcium Green-5N fluorescence until mMPT pore opening was reached. Each stimulator or inhibitor was added to mitochondria immediately before Ca^{2+} additions were started. Fig. 3A and B shows typical calcium uptake traces in which Ca^{2+} was added at equal intervals until the accumulation capacity was saturated

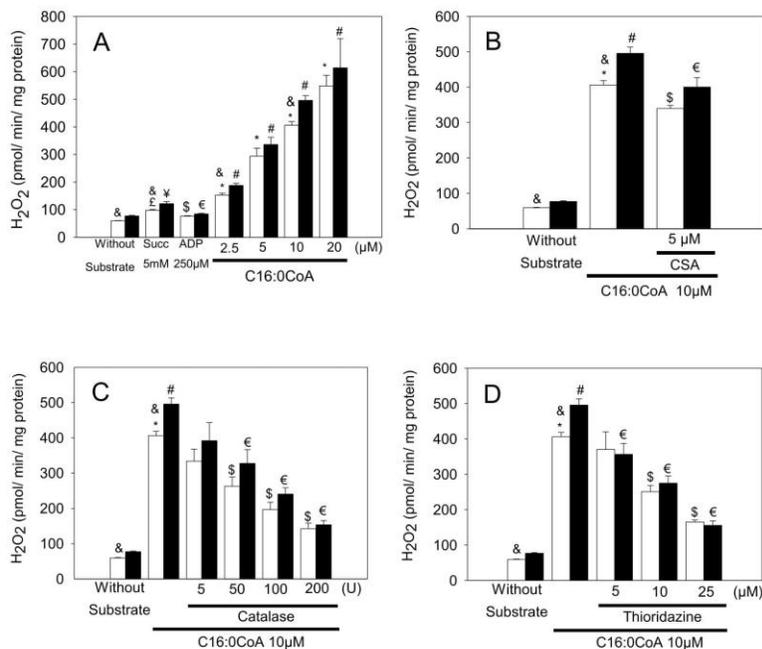


Fig. 2. Generation of H₂O₂ in mitochondria isolated from liver. The white bars correspond to controls; the black bars correspond to SF mitochondria. Panel A corresponds to the effect of succinate (5 mM) and Pal-CoA at different concentrations (from 2.5 to 20 µM). Panel B corresponds to the effect of 10 µM Pal-CoA in the presence of 5 µM cyclosporin A. The inhibitory effect of catalase and thioridazine on Pal-CoA-induced H₂O₂ generation are represented in panels C and D, respectively. *P ≤ 0.001 corresponds to C vs C + C16:0CoA, #P ≤ 0.001 corresponds SF vs SF + C16:0CoA; € P ≤ 0.05 corresponds to C vs each inhibitor used; § P ≤ 0.05 corresponds to SF vs each inhibitor used; & P ≤ 0.05 corresponds to C vs SF; £ P ≤ 0.001 corresponds to C vs C + succinate; ¥ P ≤ 0.001 corresponds to SF vs SF + succinate.

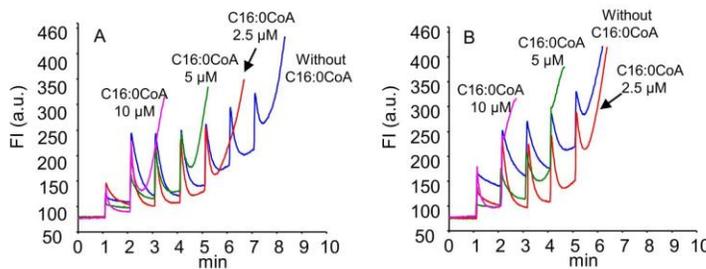


Fig. 3. Calcium uptake in liver mitochondria from C and SF animals monitored using Calcium Green-5N as described in Experimental procedures. Representative traces of mitochondria from C animals (panel A) and of mitochondria from SF animals (panel B). Each peak corresponds to the addition of 5 µM calcium. Representative traces in the presence of 2.5, 5 and 10 µM Pal-CoA.

and no uptake could be observed (resulting in increased levels of measured extra-mitochondrial Ca²⁺). We found that liver mitochondria from SF rats (Fig. 3B) had fewer calcium additions required to reach saturation compared with C mitochondria (Fig. 3A). Interestingly, addition of Pal-CoA at different concentrations decreased the number of calcium additions required in a dose-responsive manner in both C and SF mitochondria. These Ca²⁺ uptake curves of energized mitochondria

allowed us to calculate the Ca²⁺ retention capacity (CRC) of liver mitochondria isolated from SF and C animals to take up and accumulate Ca²⁺ under different experimental conditions; the results are summarized in Fig. 4. We found that the CRC of the SF liver mitochondria in the presence of succinate was significantly reduced compared with C mitochondria (p < 0.05) (Fig. 4A). This capacity was significantly reduced when Pal-CoA was added to mitochondria at 5 and 10 µM in

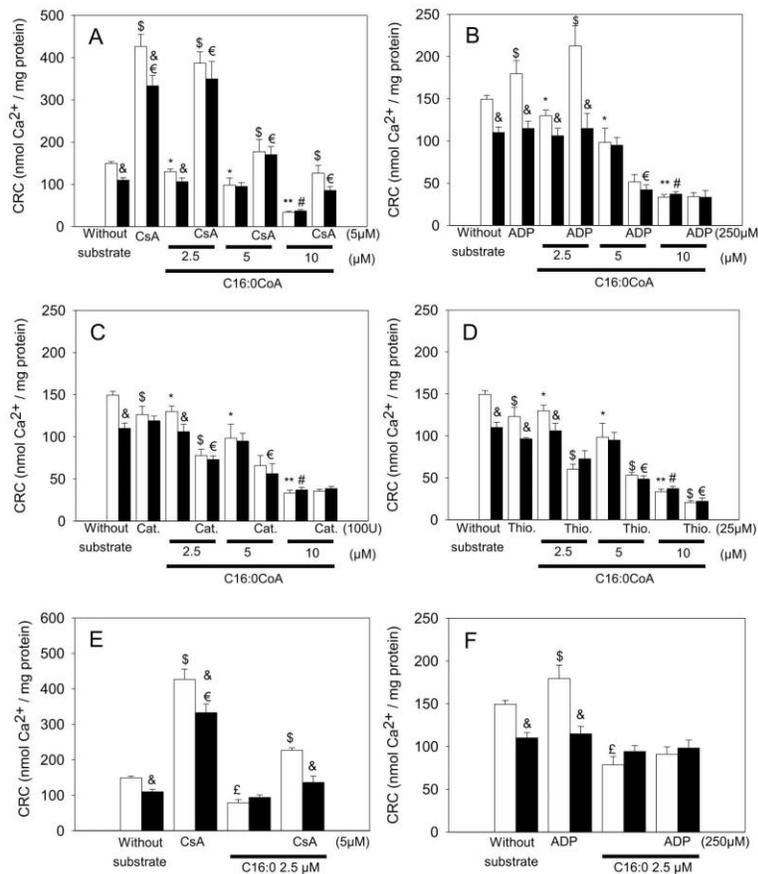


Fig. 4. Calcium retention capacity (CRC) induced by Pal-CoA in the presence and of CsA; (Panel A), in the presence of ADP (Panel B); in the presence of catalase (Panel C) and in the presence of thioridazine (Panel D). Panels E and F correspond to the effect of palmitic acid (C16:0) on CRC in the presence of CsA and ADP respectively. The white bars correspond to controls; the black bars correspond to SF. The values are expressed as mean \pm SE ($n = 6$ to 8 different animals). * ($P \leq 0.05$) and ** ($P \leq 0.001$) correspond to C vs C + C16:0CoA; # ($P \leq 0.001$) corresponds to SF vs SF + C16:0CoA; & ($P \leq 0.05$) corresponds to C vs SF. \$ ($P \leq 0.05$) corresponds to C vs C + all inhibitors used; € ($P \leq 0.05$) corresponds to SF vs SF + all inhibitors used; £ ($P \leq 0.001$) corresponds to C vs C + C16:0; & ($P \leq 0.05$) corresponds to C vs SF.

both C and SF mitochondria and no difference in Pal-CoA sensitivity was observed between C and SF mitochondria (Fig. 4A). Using cyclosporine A (CsA), the best-characterized inhibitor of cyclophilin D (CypD), a member of the mMPPT-regulated proteins, significantly increased CRC when mitochondria were energized with succinate or in the presence of the lowest concentration of Pal-CoA used (2.5 μ M) (Fig. 4A). In addition, the sensitivity of mitochondria CRC to CsA in the presence of Pal-CoA at the lowest concentration used decreased in both C and SF. However, at 10 μ M Pal-CoA, CsA sensitivity of mitochondria CRC was significantly reduced in SF than C mitochondria ($p < 0.05$) (Fig. 4A). ADP-induced adenine nucleotide translocase (ANT) activity has been described to regulate mMPPT induction in mitochondria (Kantrow et al., 2000). Addition of 250 μ M ADP to succinate-oxidizing mitochondria increased CRC in C mitochondria and did not affect it in SF mitochondria (Fig. 4B).

In the presence of high concentrations of Pal-CoA (5 and 10 μ M), both C and SF mitochondria lost their sensitivity to ADP and a collapse of CRC was also observed (Fig. 4B).

Because ROS are involved in mMPPT induction, the addition of catalase to inhibit Pal-CoA-induced H_2O_2 formation may protect mitochondria from Pal-CoA-induced mMPPT. Fig. 4C shows that catalase did not suppress Pal-CoA-induced mMPPT at any concentration used in either control or SF mitochondria (Fig. 4C). In addition, catalase reduced mMPPT in C and SF mitochondria when Pal-CoA was added at 2.5 and 5 μ M to mitochondria. Pal-CoA-induced ROS generation may be mediated by peroxisomal Pal-CoA oxidase, which generates H_2O_2 and may be present in trace amounts in our mitochondria preparation. In this regard, thioridazine, an inhibitor of Pal-CoA oxidase, was used to investigate the involvement of ROS in mMPPT induction. Fig. 4D shows that

thioridazine, as well as catalase, did not affect the decrease in CRC induced by Pal-CoA at high concentration. Instead, thioridazine acted synergistically with Pal-CoA, significantly collapsing CRC in both types of mitochondria.

Regarding the precursor of Pal-CoA, which is palmitic acid at low concentration (2.5 μ M), Fig. 4E shows that it induces a decrease of CRC in SF mitochondria to levels comparable to those of C mitochondria. This decrease is inhibited by CsA and not by ADP (Fig. 4F). In addition, C mitochondria are more sensitive to CsA than SF mitochondria.

3.6. Expression of mMPT-related proteins (ANT, VDAC and cyclophilin-D)

Other possible mechanisms that could be involved in the effect of Pal-CoA on cyt-c release in mitochondria are the expressions of ANT, cyclophilin D (Cyp-D), and the VDAC, members of mMPT-regulated protein pore opening. A representative Western blot shows no difference in the intensity of the bands of the three different proteins analyzed in SF mitochondria compared with C mitochondria. Furthermore, Fig. 5A, B, and 5C, corresponding to ANT, Cyp-D, and VDACs proteins, respectively, show no difference in the optical density of bands between SF and C mitochondria.

3.7. Palmitoyl-CoA and mitochondrial cardiolipin content

Cardiolipin (CL) is a complex phospholipid, specific to mitochondria. It is an anionic phospholipid involved in the anchoring of cyt-c to the inner mitochondrial membrane and is involved in several other functions such as stability and activity of complex II (Pennington et al., 2019). MS analysis showed no significant difference in the total amount of CL between C and SF (19.05 \pm 5.07 vs. 16.68 \pm 2.08 nmol/mg protein). Addition of Pal-CoA to mitochondria reduced the total amount of CL without reaching a statistically significant difference (Table 4). The proportions of the main molecular species of CL detected in C and SF mitochondria are summarized in Table 4. In SF rat mitochondria, there is a general increase in the proportion of (C68)CL to (C70)CL clusters that are enriched in palmitic acid. Nevertheless, the proportion of (C72)CL cluster corresponding to m/z:1448.2 and m/z 1450.5 ions and containing exclusively linoleic acid was decreased in SF mitochondria

Table 4

Effect of Pal-CoA on cardiolipin molecule species composition.

CL cluster	m/z	C	SF	C + Pal-CoA	SF + Pal-CoA
(C68)CL	1400.257	0.84 \pm 0.21	0.76 \pm 0.11	0.40 \pm 0.11 ¥	0.72 \pm 0.22 &
	1402.149	0.81 \pm 0.14	0.73 \pm 0.11	0.66 \pm 0.20	0.73 \pm 0.24
	1404.156	0.90 \pm 0.11	0.70 \pm 0.15	0.74 \pm 0.26	0.68 \pm 0.09
(C70)CL	1424.201	0.91 \pm 0.14	1.73 \pm 0.22*	0.70 \pm 0.21 &	1.67 \pm 0.19
	1426.065	0.82 \pm 0.08	1.18 \pm 0.16**	0.58 \pm 0.09 ¥	1.13 \pm 0.16 &
	1428.263	0.76 \pm 0.11	0.83 \pm 0.07	0.61 \pm 0.08	0.90 \pm 0.30
(C72)CL	1448.216	4.47 \pm 1.78	2.35 \pm 0.23**	3.62 \pm 1.25	2.20 \pm 0.29
	1450.235	3.56 \pm 1.18	2.54 \pm 0.18**	2.86 \pm 0.77	2.54 \pm 0.32
	1452.233	1.90 \pm 0.45	1.80 \pm 0.17	1.42 \pm 0.34	1.72 \pm 0.19
(C74)CL	1472.261	1.06 \pm 0.32	1.08 \pm 0.26	0.91 \pm 0.16	0.85 \pm 0.12
	1474.237	1.13 \pm 0.26	1.23 \pm 0.21	0.90 \pm 0.16	1.21 \pm 0.42
	1476.219	1.06 \pm 0.13	0.96 \pm 0.15	0.77 \pm 0.16 ¥	0.90 \pm 0.18
	1478.413	0.84 \pm 0.18	0.77 \pm 0.06	0.58 \pm 0.13	0.86 \pm 0.23 &
Total CL	19.05 \pm 5.07	16.68 \pm 2.08	14.75 \pm 3.91	16.12 \pm 2.95	

The values are expressed as nmol/mg protein and correspond to the mean \pm SD (n = 4 different animals). The amount of each species was calculated from the count abundance of each species in relation to the count abundance of (C14:0)CL as internal standard. (C68)CL contains two C16 carbon chains and two C18 carbon chains; (C70) CL contains one C16: 0 carbon chain and three C18 carbon chains; (C72)CL contains four C18 carbon chains; (C74)CL contains one C20 carbon chain and three C18 carbon chains. C16 could be palmitic or palmitoleic acid; C18 corresponds to oleic or linoleic acid, and C20 corresponds to arachidonic acid. *P \leq 0.05 C vs SF; **P \leq 0.001 C vs SF; ¥P \leq 0.05 C + C16:0 vs SF + C16:0; \$\$\$P \leq 0.001 C + C16:0 vs SF + C16:0; &P \leq 0.05 C + C16:0CoA vs SF + C16:0CoA and #P \leq 0.05 C vs C + C1:0; ¥ (P \leq 0.05) C + C16:0 vs C.

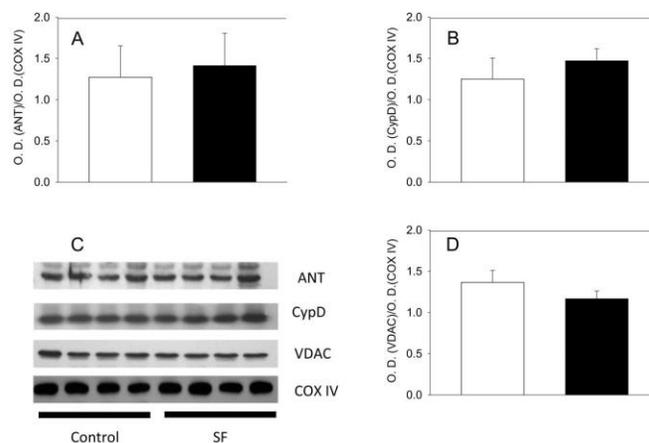


Fig. 5. Western blot against adenine nucleotide translocase (ANT), cyclophilin D (CypD) and voltage depending anion channel (VDAC) using COXIV as loading control. Panels A, B, and C represent the optical density (O.D.) ratio of the bands corresponding to ANT-B (A), CypD (B) and VDAC (C) to the O.D. of the band corresponding to COXIV used as a control load, respectively. Results are shown as mean \pm SD of 6 different mitochondria preparations.

compared to control mitochondria, as described elsewhere (Ruiz-Ramírez et al., 2015).

Table 4 The (C74)CL cluster corresponding to CL species enriched in linoleic (C18:2) and arachidonic (C20:4) acids such as (C18:2)3(C20:4)C appeared to be decreased in SF mitochondria compared to the control but did not reach a significant difference. In regard to the treatment with Pal-CoA, no significant change was observed in all clusters identified in SF and C mitochondria. In the mitochondria of control animals, treatment with Pal-CoA reduced the number of clusters enriched in linoleic at m/z :1448, 1450, and 1452 and arachidonic at m/z :1476. However, these changes did not reach a significant difference (Table 3).

Fig. 6 shows the spectra of the different CL species in negatively charged ion [M-H]⁻ in control and SF mitochondria with and without Pal-CoA treatment. In all spectra, the ions at m/z :1401.5, 1425.5, 1450.3, and 1472.4 correspond to CL species that contain (C68)CL, (C70)CL, (C72)CL, and (C74)CL, respectively. However, no new clusters appeared at m/z : 1482, corresponding to oxygenated (C74-OOH)CL and at m/z : 1529, corresponding to oxygenated (C76-OOH)CL in control and SF mitochondria, due to exacerbated H₂O₂ generation induced by Pal-CoA. Also not apparent were the clusters corresponding to their hydroxylated derivatives (C74-OH)CL at m/z : 1482-16, and (C76-OH)CL at m/z : 1529-16 (16 corresponds to the atomic mass of oxygen).

4. Discussion

Sucrose intake induces hypertriglyceridemia and elevated FFA associated with intra-abdominal fat accumulation, as previously described (El Hafidi et al., 2004). Among the FFA found increased in the liver of SF rats, we observed palmitic acid, a marker of elevated lipogenesis due to increased glucose metabolism to fatty acid biosynthesis (Tuvdendorj et al., 2015). The increased concentration of palmitic acid in the mitochondria of SF rats was not associated with mitochondrial function. In this study, no differences were found in O₂ uptake and respiratory control between C or SF mitochondria oxidizing succinate or glutamate/malate. However, when exogenous palmitic acid and Pal-CoA are added to mitochondria at the same 10 μM concentration, they act differently on mitochondrial oxygen uptake. In contrast to palmitic acid, Pal-CoA inhibits oxygen uptake in state III by oxidizing succinate in C and SF mitochondria, probably due to its inhibitory effect

on adenine nucleotide translocator (ANT) activity (Ciapaite et al., 2006), whereas palmitic acid stimulates oxygen uptake in state IV only in SF mitochondria, probably due to its uncoupling effect. Pal-CoA has also been reported to interfere with electron transport by depleting cytochrome c in mitochondria, thereby interrupting electron flow from complex III to complex IV and inhibiting ATP biosynthesis, as described for rat heart and brain (Schönfeld and Wojtczak, 2008; Kushnareva et al., 2002). In this work, Pal-CoA increases cyt-c release from animal C and SF mitochondria compared to succinate. Nevertheless, cyt-c release in the presence of succinate or Pal-CoA remains lower in SF mitochondria than in control mitochondria, despite the increase in ROS generation in SF mitochondria induced by Pal-CoA or succinate.

In a previous study, we reported that SF rat liver mitochondria generate H₂O₂ at a higher rate than their corresponding control during succinate or pyruvate/malate oxidation (Ruiz-Ramírez et al., 2015). In the present work, Pal-CoA increases ROS generation much more than when mitochondria are energized with succinate, and in both types of mitochondria. The exacerbated ROS generation by Pal-CoA is likely due to the presence of trace amounts of peroxisomes in the mitochondria preparations, which may participate in the Pal-CoA-induced ROS generation, as described elsewhere (Schönfeld et al. 2009, 2010). Indeed, ROS generation in mitochondria by Pal-CoA is sensitive to catalase activity and to thioridazine, an inhibitor of peroxisomal Pal-CoA oxidase. These results suggest that trace amounts of peroxisomes present in the mitochondria preparation may contribute to the high level of mitochondrial H₂O₂ induced by Pal-CoA and may participate in the high level of cyt-c released from mitochondria. However, cyt-c release from SF mitochondria is not prevented by catalase or thioridazine, indicating that Pal-CoA-induced cytochrome c release is not associated with external ROS generation from the peroxisome. Pal-CoA-induced cyt-c release was found to be sensitive to cyclosporine A, suggesting the involvement of the mMPT pore opening mechanism.

For a long time, FFAs have been described as inducing mMPT pore opening through their protonophore-uncoupling effect and decreasing mitochondrial ATP synthesis (Schönfeld et al. 2009, 2010). In contrast, Pal-CoA does not exert such a protonophore-uncoupling effect on mitochondria, but has been reported to inhibit the adenine nucleotide translocator (ANT), an important component of mMPT pore opening (Miotto et al., 2018; Ciapaite et al., 2006). The lower mitochondrial

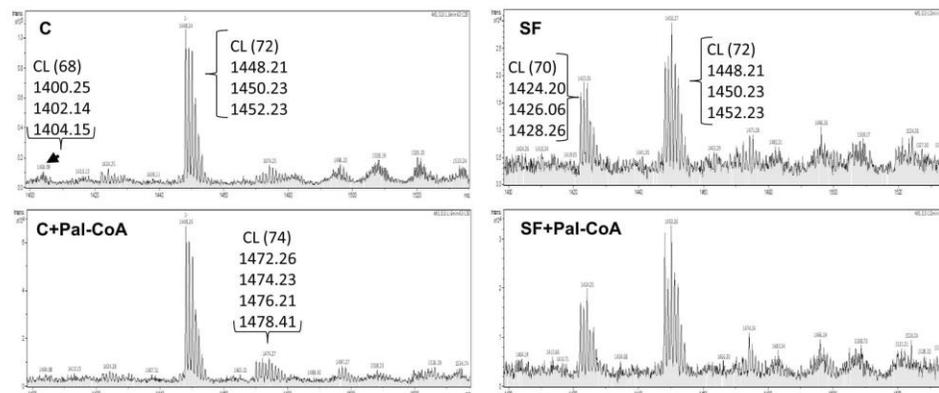


Fig. 6. Effect of Pal-CoA on mass spectra of cardiolipin (CL) molecule species of mitochondria from control (C) and from sucrose-fed (SF) rats. A scan between m/z :1000 to 1500 was performed to identify the different CL molecule species. In both spectra, the clusters of ions at m/z : 1426, 1448, and 1472 match CL species that contain, (C70), (C72) and (C74), respectively. (C70), (C72) and (C74) represent the total number of carbon-related to four fatty acids of CL. The cluster (C72)CL (m/z :1448) corresponds to different CL species containing four linoleic acids (C18:2)4CL. The cluster (C70)CL (m/z :1425.5) corresponds to (C18:2)3(C16:0)CL where linoleic acid is substituted by one palmitic acid. The cluster 1472 corresponds to the replacement of one linoleic acid by arachidonic (18:2)3(C20:4)CL.

calcium retention capacity (CRC) found in SF mitochondria reflects the sensitivity of SF mitochondria to Ca^{2+} -induced mMPT pore opening. In the presence of Pal-CoA, the threshold amount of Ca^{2+} required to induce mMPT pore opening is lower and a collapse of mitochondrial CRC at both concentrations used (5 and 10 μM) is observed. These effects are prevented by CsA and not by ADP, indicating that inhibition of ANT by Pal-CoA may prevent the effect of ADP in restoring CRC of mitochondria from both C and SF. Pal-CoA-induced mMPT pore opening in Ca^{2+} -loaded mitochondria may also be mediated by Pal-CoA-induced exacerbated ROS generation. Indeed, it has been reported that ROS are involved in the oxidation of thiol groups of membrane proteins such as cysteine160 (Cys160), which is close to the adenine nucleotide-binding site of ANT and whose oxidation abolishes the ability of ADP to inhibit mMPT pore opening (McStay et al., 2002; Stewart et al., 2000). However, mMPT pore opening in both mitochondria is not prevented by catalase or thioridazine, which are shown to prevent Pal-CoA-stimulated H_2O_2 generation in both types of mitochondria. These observations suggest that Pal-CoA-induced mMPT pore opening does not involve external ROS generation and that Pal-CoA can probably act by inhibiting ANT activity or through its interaction with the mitochondrial lipid membrane. Indeed, ANT interacts with CypD, a mitochondrial matrix protein that is part of the mMPT pore which is sensitive to the effective peptide inhibitor CsA, by binding to CypD (Mishra et al., 2019). Changes in CypD expression levels in a neuronal cell line (B50) have been reported to correlate with the sensitivity of mitochondria to Ca^{2+} and oxidative stress-induced permeability transition (Li et al., 2004). Similarly, genetic modulation of ANT expression has been shown to alter sensitivity to Ca^{2+} -induced mMPT pore opening in the brain (Lee et al., 2009). Thus, the lack of difference found in the expression of CypD, ANT, and VDAC suggests that the difference in sensitivity to Ca^{2+} -induced mMPT pore opening between C and SF mitochondria is not related to the expression of pore regulatory proteins.

Pal-CoA has been described to interact superficially with the membrane by binding cyt-c (Stewart et al., 2000). However, due to its hydrophilic CoA moiety, it cannot diffuse across the inner membrane. Furthermore, through its saturated hydrophobic moiety, it can be inserted into the lipid membrane, inducing changes in its physical properties that influence the activity of the respiratory complex (Oberhauser et al., 2020) and probably the release of cyt-c. Thus, Pal-CoA, by increasing cyt-c release from SF, may participate in the progression of hepatic steatosis to more severe liver disease, such as steatohepatitis, through a mechanism that involves cyt-c release and mMPT. On the other hand, the decrease in cyt-c release from SF compared with C mitochondria, both under the influence of Pal-CoA, may be related to the lipid composition of the inner membrane such as cardiolipin (CL), an exclusive phospholipid of the mitochondrial membrane that interacts directly with cyt-c. In the presence of H_2O_2 , cyt-c acquires peroxidase activity, oxidizing cardiolipin and breaking the electrostatic and hydrophobic interactions, involved in the dissociation of cyt-c from the lipid membrane (Mandal et al., 2015; Jiang et al., 2008). The interaction between CL and cyt-c seems to depend on the fatty acid composition of CL, which is mainly composed of polyunsaturated linoleic acid under physiological conditions (Ruiz-Ramírez et al., 2015; Jiang et al., 2008). In this study, mass spectrometric analysis of CL suggests that enrichment of CL with palmitic and oleic acids in SF liver mitochondria makes them less susceptible to peroxidation, which may result in a decrease in cyt-c from SF mitochondria, as previously described (Ruiz-Ramírez et al., 2011). Indeed, CL hydroperoxides or their corresponding hydroxides that would be identified at clusters m/z : 1482, 1466 and 1522 and 1506 corresponding to (C74-OOH)CL, (C74-OH)CL (C76-OOH)CL and (C76-OH)CL respectively, are not clearly detected. These observations suggest that the enrichment of cardiolipin with palmitic acid, due to the availability of palmitic acid and its corresponding activated Pal-CoA, makes it more resistant to peroxidation, despite the excessive generation of H_2O_2 induced by Pal-CoA. Furthermore, oxidized CL, products of cyt-c peroxidase activity, are involved in the oligomerization of Bax to

form a pore in the mitochondrial outer membrane through which cyt-c is released from the mitochondrion to the cytosol (Kagan et al., 2014; Barayeu et al., 2019).

In summary, the increased Pal-CoA-induced cyt-c release in SF and C mitochondria can be attributed to the opening of the mMPT pore due to the sensitivity of Ca^{2+} retention capacity and cytochrome c release to CsA in SF mitochondria. Furthermore, the results suggest the direct interaction of Pal-CoA with the mitochondrial membrane and with mMTP-related proteins. However, the decrease in cyt-c release from SF mitochondria can be attributed to changes in the species composition of cardiolipin molecules. Despite the reduction in cyt-c release in SF mitochondria, the significant increase in cyt-c release induced by Pal-CoA in both types of mitochondria suggests that Pal-CoA may contribute to mitochondrial dysfunction that leads to cell death by apoptosis. Finally, our work allows us to propose that Pal-CoA induced by FFA accumulation in the liver due to the high sucrose diet, may contribute to the progression of fatty liver disease to more severe disease through a mechanism that involves cyt-c release and mMPT pore

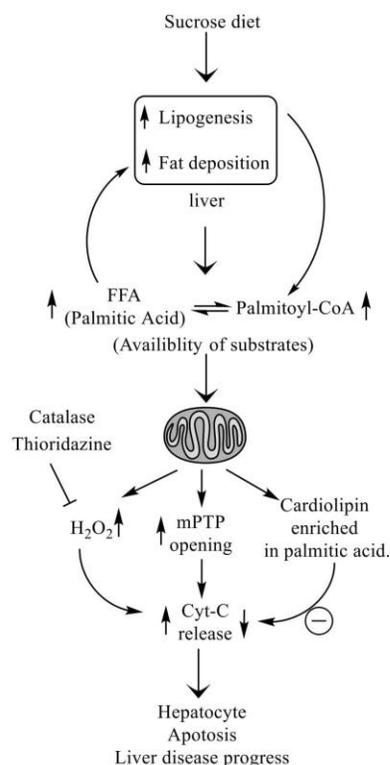


Fig. 7. Proposed mechanism by which Pal-CoA exerts its effect on mitochondria to release cyt-c. Sucrose intake induces FFA biosynthesis. Palmitic acid, as an FFA resulting from *de novo* lipogenesis, is activated to Pal-CoA. The high availability of Pal-CoA induces mMTP and ROS generation, both of which are involved in cyt-c release. However, the incorporation of palmitic acid into cardiolipin makes it resistant to peroxidation, a mechanism involved in the dissociation of cyt-c from the mitochondrial inner membrane that ultimately leads to apoptosis.

opening a keys process of hepatocyte apoptosis as illustrated in Fig. 7.

CRediT authorship contribution statement

Miguel-Angel Barrios-Maya: Visualization, Investigation, and Methodology. Angélica Ruiz-Ramírez: Development or design of methodology, creation of models. Héctor Quezada: Design of methodology. Carlos L. Céspedes Acuña: Writing – review & editing. Mohammed El-Hafidi: Conceptualization, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

The values are expressed as the mean \pm SD (n = 6 different animals). The mitochondria oxygen uptake was expressed as $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of protein, and the experiment was performed in the presence of 5 mM succinate, 5/3 mM glutamate/malate, 10 μM palmitoyl CoA, 10 μM palmitic acid. State III corresponds to the O_2 uptake in the presence of 250 μM ADP and state IV corresponds to the O_2 uptake after exhausting ADP. The respiratory control (RC) corresponds to the ratio of state III to state IV. * $P \leq 0.05$ C + Succ vs C + Succ + C16:0CoA; ** $P \leq 0.05$ SF Succ vs SF + Succ + C16:0CoA; or + C16:0.

Acknowledgments

Miguel-Angel Barrios Maya is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 583627 from CONACYT.

The work was partially supported by Grant 106845 to MEH from CONACYT, Mexico and by the Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chavez.

References

- Alnahdi, A., John, A., Raza, H., 2019. Augmentation of glucotoxicity, oxidative stress, apoptosis and mitochondrial dysfunction in hepG2 cells by palmitic acid. *Nutrients* 11 (9), 1979. <https://doi.org/10.3390/nu11091979>.
- Amigo, I., Menezes-Filho, S.L., Lúevano-Martínez, L.A., Chausse, B., Kowaltowski, A.J., 2017. Caloric restriction increases brain mitochondrial calcium retention capacity and protects against excitotoxicity. *Aging Cell* 16 (1), 73–81. <https://doi.org/10.1111/acel.12527>.
- Barayen, U., Lange, M., Méndez, L., Arnold, J., Shadyro, O.I., Fedorova, M., Flenmig, J., 2019. Cytochrome c autocatalyzed carbonylation in the presence of hydrogen peroxide and cardiolipins. *J. Biol. Chem.* 294 (6), 1816–1830. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004110>.
- Buzzetti, E., Pinzani, M., Tsochatzis, E.A., 2016. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* 65 (8), 1038–1048. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.012>.
- Chen, X., Li, L., Liu, X., Luo, R., Liao, G., Li, L., Liu, J., Cheng, J., Lu, Y., Chen, Y., 2018. Oleic acid protects saturated fatty acid mediated lipotoxicity in hepatocytes and rat of non-alcoholic steatohepatitis. *Life Sci.* 203, 291–304. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.022>.
- Chen, Z., Tian, R., She, Z., Cai, J., Li, H., 2020. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic. Biol. Med.* 152, 116–141. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025>.
- Clapaité, J., Bakker, S.J., Diamant, M., van Eikenhorst, G., Heine, R.J., Westerhoff, H.V., Krab, K., 2006. Metabolic control of mitochondrial properties by adenine nucleotide translocator determines palmitoyl-CoA effects. Implications for a mechanism linking obesity and type 2 diabetes. *FEBS J.* 273 (23), 5288–5302. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05523.x>.
- El Hafidi, M., Buelna-Chontal, M., Sánchez-Muñoz, F., Carbó, R., 2019. Adipogenesis: a necessary but harmful strategy. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (15), 3657. <https://doi.org/10.3390/ijms20153657>.
- El Hafidi, M., Correa, F., Zazueta, C., 2020. Mitochondrial dysfunction in metabolic and cardiovascular diseases associated with cardiolipin remodeling. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1866 (6), 165744. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165744>.
- El Hafidi, M., Pérez, I., Zamora, J., Soto, V., Carvajal-Sandoval, G., Baños, G., 2004. Glycine intake decreases plasma free fatty acids, adipose cell size, and blood pressure in sucrose-fed rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287 (6), R1387–R1393. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00159.2004>.
- Farrell, G.C., Haczezy, F., Chitturi, S., 2018. Pathogenesis of NASH: how metabolic complications of overnutrition favour lipotoxicity and pro-inflammatory fatty liver disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1061, 19–44. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8684-7_3.
- Friedman, S.L., Neuschwander-Tetri, B.A., Rinella, M., Sanyal, A.J., 2018. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat. Med.* 24 (7), 908–922. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0104-9>.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311401>.
- Forrester, S.J., Kikuchi, D.S., Hernandez, M.S., Xu, Q., Griending, K.K., 2018. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signalling. *Circ. Res.* 122 (6), 877–902. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311401>.
- Geng, Y., Faber, K.N., de Meijer, V.E., Blokzijl, H., Moshage, H., 2021. How does hepatic lipid accumulation lead to lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease? *Hepatol. Int.* 15 (1), 21–35. <https://doi.org/10.1007/s12072-020-10121-2>.
- Jiang, J., Huang, Z., Zhao, Q., Feng, W., Belikova, N.A., Kagan, V.E., 2008. Interplay between bax, reactive oxygen species production, and cardiolipin oxidation during apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368 (1), 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.01.055>.
- Kagan, V.E., Chu, C.T., Tyurina, Y.Y., Cheikh, A., Bayir, H., 2014. Cardiolipin asymmetry, oxidation and signaling. *Chem. Phys. Lipids* 179, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.11.010>.
- Kanda, T., Matsuoka, S., Yamazaki, M., Shibata, T., Nirei, K., Takahashi, H., Kaneko, T., Fujisawa, M., Higuchi, T., Nakamura, H., Matsumoto, N., Yamagami, H., Ogawa, M., Inazu, H., Kuroda, K., Moriama, M., 2018. Apoptosis and non-alcoholic fatty liver diseases. *World J. Gastroenterol.* 24 (25), 2661–2672. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i25.2661>.
- Kantrow, S.P., Tatro, L.G., Piantadosi, C.A., 2000. Oxidative stress and adenine nucleotide control of mitochondrial permeability transition. *Free Radic. Biol. Med.* 28 (2), 251–260. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00238-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00238-5).
- Kushnareva, Y., Murrphy, A.N., Andreyev, A., 2002. Complex I mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)+ oxidation reduction state. *Biochem. J.* 368 (Pt 2), 545–553. <https://doi.org/10.1042/BJ20021121>.
- Léveillé, M., Estall, J.L., 2019. Mitochondrial dysfunction in the transition from NASH to HCC. *Metabolites* 9 (10), 233. <https://doi.org/10.3390/metab9100233>.
- Li, Y., Johnson, N., Capano, M., Edwards, M., Crompton, M., 2004. Cyclophilin-D promotes the mitochondrial permeability transition but has opposite effects on apoptosis and necrosis. *Biochem. J.* 383 (Pt 1), 101–109. <https://doi.org/10.1042/BJ20040669>.
- Lee, J., Schriener, S.E., Wallace, D.C., 2009. Adenine nucleotide translocator 1 deficiency increases resistance of mouse brain and neurons to excitotoxic insults. *Biochim. Biophys. Acta* 1787 (5), 364–370. <https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2009.01.014>.
- Lenasters, J.J., Theruvath, T.P., Zhong, Z., Nieminen, A.L., 2009. Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. *Biochim. Biophys. Acta* 1787 (11), 1395–1401. <https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2009.06.009>.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Mandal, A., Hoop, C.L., DeLucia, M., Kodali, R., Kagan, V.E., Ahn, J., van der Wel, P.C., 2015. Structural changes and proapoptotic peroxidase activity of cardiolipin-bound mitochondrial cytochrome c. *Biochem. J.* 473 (9), 1873–1884. <https://doi.org/10.1016/j.bjpp.2015.09.016>.
- McStay, G.P., Clarke, S.J., Hirsteap, A.P., 2002. Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochem. J.* 367 (Pt 2), 541–548. <https://doi.org/10.1042/BJ20011672>.
- Miotto, P.M., LeBlanc, P.J., Holloway, G.P., 2018. High-fat diet causes mitochondrial dysfunction as a result of impaired ADP sensitivity. *Diabetes* 67 (11), 2199–2205. <https://doi.org/10.2337/db18-0417>.
- Mishra, J., Davani, A.J., Natarajan, G.K., Kwok, W.M., Stowe, D.F., Camara, A., 2019. Cyclosporin A increases mitochondrial buffering of calcium: an additional mechanism in delaying mitochondrial permeability transition pore opening. *Cells* 8 (9), 1052. <https://doi.org/10.3390/cells8091052>.
- Nakamura, S., Takamura, T., Matsuzawa Nagata, N., Takayama, H., Misu, H., Noda, H., Nabemoto, S., Kurita, S., Ota, T., Ando, H., Miyamoto, K., Kaneko, S., 2009. Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J. Biol. Chem.* 284 (22), 14809–14818. <https://doi.org/10.1074/jbc.M901488200>.
- Oberhauser, L., Grunziera, S., Colom, A., Goujon, A., Lavallard, V., Matile, S., Roux, A., Brun, T., Maechler, P., 2020. Palmitate and oleate modify membrane fluidity and kinase activities of INS1E β -cells alongside altered metabolism-secretion coupling. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1867 (2), 118619. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.118619>.
- Penzo, D., Tagliapietra, C., Colonna, R., Petronilli, V., Bernardi, P., 2002. Effects of fatty acids on mitochondria: implications for cell death. *Biochim. Biophys. Acta* 1555 (1–3), 160–165. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(02\)00272-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(02)00272-4).
- Pennington, E.R., Fumai, K., Brown, D.A., Shaikh, S.R., 2019. The role of cardiolipin concentration and acyl chain composition on mitochondrial inner membrane molecular organization and function. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1864 (7), 1039–1052. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.03.012>.
- Rodrigues, J.V., Gomes, C.M., 2010. Enhanced superoxide and hydrogen peroxide detection in biological assays. *Free Radic. Biol. Med.* 49 (1), 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.014>.
- Ruiz Ramírez, A., Barrios Maya, M., Quezada Pablo, H., López Acosta, O., El-Hafidi, M., 2020. Kidney dysfunction induced by a sucrose-rich diet in rat involves mitochondria ROS generation, cardiolipin changes, and the decline of autophagy

- protein markers. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 318 (1), F53–F66. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00208.2019>.
- Ruiz Ramírez, A., Barrios Maya, M.A., López Acosta, O., Molina Ortiz, D., El Hafidi, M., 2015. Cytochrome c release from rat liver mitochondria is compromised by increased saturated cardiolipin species induced by sucrose feeding. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 309 (9), E777–E786. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00617.2014>.
- Ruiz-Ramírez, A., Chávez-Salgado, M., Peñeda-Flores, J.A., Zapata, E., Masso, F., El-Hafidi, M., 2011. High sucrose diet increases ROS generation, FFA accumulation, UCP2 level, and proton leak in liver mitochondria. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301 (6), E1198–E1207. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00631.2010>.
- Seedle, J., Liebisch, G., Schmitz, G., Stremmel, W., Channulitrat, W., 2015. Palmitate activation by fatty acid transport protein 4 as a model system for hepatocellular apoptosis and steatosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1851 (5), 549–565. <https://doi.org/10.1016/j.bbblip.2015.01.004>.
- Schönfeld, P., Dymkowska, D., Wojtczak, L., 2009. Acyl-CoA-induced generation of reactive oxygen species in mitochondrial preparations is due to the presence of peroxisomes. *Free Radic. Biol. Med.* 47 (5), 503–509. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.006>.
- Schönfeld, P., Wiczkowski, M.R., Lebidzińska, M., Wojtczak, L., 2010. Mitochondrial fatty acid oxidation and oxidative stress: lack of reverse electron transfer-associated production of reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta* 1797 (6–7), 929–938. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.010>.
- Schönfeld, P., Wojtczak, L., 2008. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 45 (3), 231–241. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.029>.
- Sparagna, G.C., Hickson Bick, D.L., Buja, L.M., McMillin, J.B., 2000. A metabolic role for mitochondria in palmitate-induced cardiac myocyte apoptosis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279 (5), H2124–H2132. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.279.5.H2124>.
- Speijer, D., Manjeri, G.R., Szklarczyk, R., 2014. How to deal with oxygen radicals stemming from mitochondrial fatty acid oxidation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 369 (1646), 20130446. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0446>.
- Stewart, J.M., Blakely, J.A., Johnson, M.D., 2000. The interaction of ferrocytochrome c with long-chain fatty acids and their CoA and carnitine esters. *Biochem. Cell. Biol.* 78 (6), 675–681.
- Tserng, K.Y., Kliegman, R.M., Miettinen, E.L., Kallan, S.C., 1981. A rapid, simple, and sensitive procedure for the determination of free fatty acids in plasma using glass capillary column gas-liquid chromatography. *J. Lipid Res.* 22 (5), 852–858.
- Tuvdendorj, D., Zhang, X.J., Chinkes, D.L., Wang, L., Wu, Z., Rodriguez, N.A., Herndon, D.N., Wolfe, R.R., 2015. Triglycerides produced in the livers of fasting rabbits are predominantly stored as opposed to secreted into the plasma. *Metabolism* 64 (5), 580–587. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.01.002>.
- Van den Branden, C., Vamecq, J., Dacremont, G., Premereur, N., Roels, F., 1987. Short and long term influence of phenothiazines on liver peroxisomal fatty acid oxidation in rodents. *FEBS Lett.* 222 (1), 21–26. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80184-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80184-9).