



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza"

**LIBERACIÓN DE RADICALES LIBRES EN UN MODELO DE
RATA HIPERTRIGLICERIDÉMICA E HIPERTENSA:
EFECTO DEL GÉNERO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

EDUARDO MARTÍNEZ ABUNDIS

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. GUADALUPE DEL CARMEN BAÑOS MARHABER

ASESOR:

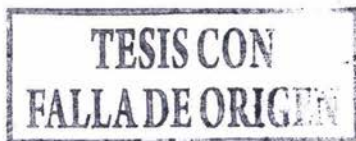
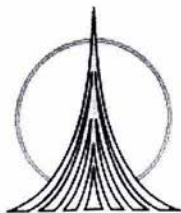
Q. B. P. JOÉL SAUCEDO CONSTANTINO

COASESOR:

DR. MOHAMMED EL HAFIDI BENTLAKDER

Este trabajo fue apoyado por CONACYT
proyecto No. 34467-M.

MÉXICO, D.F. 2004





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.

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

Este trabajo fue apoyado por proyecto de CONACyT No. 34467-M. El sustentante recibió una beca tesis del mismo proyecto.

DEDICATORIAS.

Dedico este trabajo a mis padres Ernesto y Leonor, las dos personas de las que más he recibido sin poder retribuirles algo a cambio alguna vez. A ellos debo todo lo que tengo y lo que soy. Gracias por darme la vida, me encanta como la construyeron.

A mis hermanos Apolinar, Alfredo, Consuelo, Ernesto y Rocío, los mejores amigos que he tenido. Gracias por su apoyo de todos los días.

A Mexti, donde quiera que te encuentres espero que la vida te recompense por todo el amor que me brindaste.

A todos los amigos y maestros que he tenido a lo largo de mi carrera.

AGRADECIMIENTOS.

Mi agradecimiento a la Dra. Guadalupe del C. Baños Marhaber por darme la oportunidad de conocer el maravilloso mundo de la investigación, por su amabilidad y apoyo durante la realización de este trabajo.

Agradezco al Dr. Mohammed El Hafidi Bentlakder todo su apoyo y enseñanzas durante este tiempo. Sin su asesoría este trabajo no habría sido tan satisfactorio. Gracias también por su paciencia.

A las personas que amablemente revisaron este trabajo: Q.B.P. Joel Saucedo Constantino, Dra: Ma. Teresa Corona Ortega y Q.F.I. Leonor Aguilar Santelises.

A todas las personas que laboran en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” por ser tan amables y por el apoyo que recibí para realizar este trabajo.

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.

A.A. Antimicina A.	SOD. Superóxido Dismutasa
ADN. Acido Desoxirribonucleico	UQ . Ubiquinona (estado oxidado)
ADP. Adenosín difosfato	UQH ₂ . Ubiquinol (estado reducido)
ATP. Adenosín trifosfato	UV. Ultravioleta
BSA. Albúmina Sérica Bovina	
Cat. Catalasa	
Cit. Citocromo	
DCF. 2, 7-Diacetato de Dicloroflouresceína	
DETAPAC. Acido Dietiltetraaminopentaacético	
EGTA. Acido Etilenglicoltetraacético	
ERO. Especies Reactivas de Oxígeno	
FAD Flavín Adenín Dinucleótido	
FADH Flavín Adenín Dinucleótido Reducido	
FMN Flavín mononucleotido	
GP. Glutación Peroxidasa	
GR. Glutación Reductasa	
GSH. Se utiliza para representar Glutación Reducido.	
GSSG. Es la forma de representar Glutación Oxidado	
HPLC Cromatografía Líquida de Alta Resolución	
HTG. Hipertrigliceridemia	
KCN. Cianuro de Potasio	
LDL. Lipoproteínas de baja densidad	
NAD ⁺ Nicotinaminadenín Dinucleótido	
NADH. Nicotinaminadenín Dinucleótido Reducido	
NADPH. Fosfato de Nicotinaminadenín Dinucleótido Reducido	
Pi. Pirofosfato	
POD. Peroxidasa	

ÍNDICE.

1. Introducción.	1
2. Fundamentación teórica.	3
2.1. Antecedentes.	3
2.2. Naturaleza de los radicales libres de oxígeno.	6
2.3. Sistemas antioxidantes biológicos.	9
2.4. La cadena respiratoria.	11
2.5. Respiración mitocondrial.	16
2.6. Determinación de especies reactivas de oxígeno.	20
2.7. Antecedentes experimentales de la rata hipertrigliceridémica.	21
3. Planteamiento del problema.	23
4. Objetivos.	24
5. Hipótesis.	24

6. Diseño experimental.	25
7. Materiales y Métodos.	26
7.1. Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata.	26
7.2. Determinación de proteínas.	28
7.3. Controles respiratorios.	30
7.4. Determinación de la formación de peróxido de hidrógeno en las mitocondrias de hígado de rata.	33
7.5. Determinación por HPLC de ubiquinol 9y tocoferol en mitocondrias de hígado de rata.	35
7.6. Determinación por HPLC de glutatión reducido en mitocondrias de hígado de rata.	38
8. Resultados y análisis de resultados.	41
9. Discusión.	51
10. Conclusiones.	55
11. Perspectivas.	56
12. Referencias.	57

1. INTRODUCCIÓN.

Hace aproximadamente 1300 millones de años., se dieron las condiciones para que pudieran desarrollarse los organismos aeróbicos, capaces de utilizar oxígeno para sustraer una mayor cantidad de energía de los nutrimentos, que son oxidados en el ciclo de Krebs, después de ser transformados en acetil-coenzima A. Los electrones y protones, productos de dichas oxidaciones, terminan siendo captados por el oxígeno molecular, que es el último aceptor de la cadena respiratoria mitocondrial. La reducción del oxígeno molecular da lugar a la formación de dos moléculas de agua, totalmente inocuas, mientras que parte de la energía derivada de la oxidación de los nutrimentos es captada en la forma de ATP.

Los procesos metabólicos de la respiración y de la fosforilación oxidativa constituyeron una gran ventaja evolutiva, que facilitó la multiplicación y la diversificación de los eucariotes monocelulares y pluricelulares.

A pesar de que el oxígeno es indispensable para la vida aeróbica, puede ser tóxico y su utilización en los procesos metabólicos sólo es posible si los organismos cuentan con una batería de moléculas que los protejan de los derivados del oxígeno llamados Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), como el radical anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, entre otros.

Cuando se rompe este equilibrio y los sistemas productores de radicales derivados del oxígeno sobrepasan la capacidad neutralizante de los sistemas de defensa, se genera el estrés oxidativo que induce cambios estructurales de los lípidos, de los ácidos nucleicos, de las proteínas y, por consecuencia, de su función. Las defensas contra el estrés oxidativo están constituidas por enzimas como superóxido-dismutasa, catalasa y peroxidasa, además de otras especies como α -tocoferol (vitamina E), ubiquinoles o coenzimas Q y glutatión reducido que neutralizan estas ERO.

Una de las formas conocidas para crear este desequilibrio entre generación de especies oxidantes y capacidad antioxidante es a través de la dieta. Es bien conocido que los individuos con sobrepeso tienen un estrés oxidativo muy marcado debido a una serie de trastornos metabólicos entre los que se encuentra la misma acumulación de grasa intraabdominal y subcutánea, un problema que ha tomado gran importancia a escala mundial en las últimas décadas.

Los radicales de oxígeno son capaces de destruir bacterias, lisar células, iniciar la peroxidación de lípidos de las membranas celulares, inactivar enzimas y atacar los ácidos nucleicos. Pueden ser mediadores importantes del daño producido en tejidos y órganos en situaciones patológicas que involucran la inflamación y la isquemia. Paradójicamente, el retorno del oxígeno durante la reperfusión a un órgano que ha sufrido isquemia (infarto al miocardio, transplantes de órganos, entre otros casos) amplía el daño producido por la falta de oxígeno, debido a la producción masiva de radicales de oxígeno en el tejido dañado.

Algunas pruebas de la toxicidad del oxígeno son las siguientes: El respirar 100% de oxígeno es letal para la rata en menos de 72 horas; los humanos recién nacidos sometidos a oxigenoterapia prolongada sufren lesiones retinianas y pulmonares. Estos datos han llevado a la conclusión de que la toxicidad del oxígeno y de sus derivados desempeña un papel primordial en las lesiones tisulares y celulares producidas en una gran variedad de procesos fisiopatológicos.

A la fecha se han realizado muchos estudios sobre la relación entre daño tisular y obesidad. En algunos casos, como en hipertensión, un tratamiento con especies antioxidantes como la vitamina E revierte o al menos atenúa dichos efectos. Por otra parte, existen evidencias de que este mismo tratamiento puede proteger LDL de daño por oxidación, estas lipoproteínas oxidadas han sido relacionadas con la formación de la placa ateromatosa que acompaña la aterosclerosis. Además se han desarrollado técnicas que permiten cuantificar tanto las especies oxidantes como los componentes celulares a los que han afectado (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos), con lo cual se puede conocer cuanto se ha dañado a la célula, su capacidad para protegerse del daño y hasta los puntos específicos, dentro de la maquinaria celular donde se originan estas ERO.

Gracias a estos conocimientos se sabe que no todo el oxígeno utilizado por la mitocondria es convertido en agua, sino que una pequeña fracción se convierte en radical superóxido, que algunas reacciones enzimáticas que ocurren normalmente en el metabolismo son productoras del mismo radical (como en el caso de hipoxantina-xantina) y que estos y otros sistemas pueden modificarse por una amplia variedad de factores tanto químicos como ambientales.

2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.

2.1. ANTECEDENTES.

Está descrito que la ingesta de una dieta rica en fructosa o sacarosa induce alteraciones en el metabolismo de los lípidos (hipertrigliceridemia) tanto en humanos como en animales de experimentación.

En las últimas décadas se han acumulado evidencias apoyando el concepto de que el proceso de estrés oxidativo generado por radicales libres, que oxidan los lípidos insaturados de la pared vascular, participa en el progreso de las lesiones ateroscleróticas. En varios estudios se ha demostrado la presencia de los productos de la oxidación lipídica tanto en el plasma humano como en las lesiones ateroscleróticas¹⁻³, pero el mecanismo responsable de la iniciación de la oxidación *in vivo* y las especies oxidantes causantes de la misma no se han establecido definitivamente. En modelos *in vitro* se han encontrado varias fuentes de la oxidación de lípidos por medio de reacciones químicas y enzimáticas de generación de radicales libres (entre los cuales están el anión superóxido, el radical hidroxilo, el peroxinitrito y otros compuestos tóxicos)⁴⁻⁸.

La lipoperoxidación induce la formación de varios compuestos como los hidroperóxidos (productos primarios de la lipoperoxidación) y los aldehídos (como el 4-hidroxinonenal y malondialdehído), productos de degradación que pueden modificar irreversiblemente las actividades enzimáticas, los receptores y el sistema de transporte membranar⁹⁻¹¹

La composición de ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos del tejido influye en el grado de la peroxidación lipídica, así como en la formación de los compuestos secundarios mencionados.

Se han encontrado diferencias en la composición lipídica asociadas al género¹². En este laboratorio se ha demostrado que la composición de los ácidos grasos del plasma de la rata hembra es diferente al de la rata macho, la proporción del ácido araquidónico es mucho mayor en la hembra (el ácido araquidónico es muy sensible a la lipoperoxidación dado el número de dobles ligaduras que posee). Cuando se induce el estrés oxidativo por medio de inyección de hierro en el animal entero, el índice de lipoperoxidación es menor en la hembra

que en el macho, eso se debe probablemente al efecto protector de varios antioxidantes en la hembra¹³. En otro trabajo (no publicado), se encontró que en la rata macho, la inducción de estrés oxidativo por hierro puede prevenirse por estradiol exógeno inyectado. Esto puede ser una evidencia del efecto protector del estradiol contra el estrés oxidativo y nos permitirá explicar que la diferencia entre macho y hembra, en la respuesta contra dicho estrés, se debe a los niveles de las hormonas sexuales.

Este mismo efecto se ha identificado en la prevalencia de cuadros cardiovasculares, en donde se ha observado alguna dependencia de edad y sexo. Aunque existen datos controversiales, en términos generales los estrógenos son un factor de protección contra el desarrollo de enfermedades cardiovasculares: la edad promedio en la que se manifiestan síntomas de enfermedad coronaria en la mujer es mayor que la de los hombres¹⁴, mientras que el riesgo de coronariopatías se duplica en mujeres que han sufrido histerectomía y ooforectomía, lo que no ocurre cuando solamente son histerectomizadas y conservan sus ovarios intactos¹⁵. Por otra parte el riesgo de coronariopatías disminuye con la terapia de reemplazo estrogénico en mujeres histerectomizadas o postmenopáusicas^{16,17}.

En estudios epidemiológicos se ha demostrado que el género influye en la sobrevida de pacientes con problemas cardiovasculares. En el caso de insuficiencia cardíaca particularmente, si los individuos presentan disfunción ventricular de etiología no isquémica, la sobrevida es más prolongada en pacientes del sexo femenino, aún en etapas avanzadas de la enfermedad¹⁸. También se ha investigado la prevalencia de arritmias y el riesgo de muerte súbita con relación al sexo de los pacientes. En el estudio de Framingham se demostró que en los hombres, aún sin antecedentes de coronariopatía, el riesgo de desarrollar arritmias ventriculares es el doble que en mujeres y en éstas el riesgo de muerte súbita es sólo de 32% en relación con el de los hombres^{19,20}.

El efecto protector cardiovascular de las hormonas sexuales femeninas se ha conocido por varios años. Parte de esta protección se atribuye a las bien demostradas propiedades antioxidantes de los estrógenos, tanto *in vivo*²¹, como *in vitro*²².

A este respecto, se ha demostrado la participación del estrés oxidativo como un factor determinante en la fisiopatogenia de las enfermedades cardiovasculares, especialmente la aterosclerosis y la hipertensión, así como las dislipidemias frecuentemente asociadas a ellas²³. Los estudios para evaluar el potencial antioxidante de individuos o animales de experimentación son pocos, especialmente en lo que se refiere a estudios comparativos para

establecer diferencias dependientes del género^{24,25}. Tampoco se ha estudiado el efecto de la manipulación hormonal sobre los antioxidantes naturales. Existen estudios poblacionales de larga duración y que abarcan un gran número de individuos, realizados con el fin de establecer un patrón de terapia preventiva o terapéutica basada en la administración de antioxidantes, sin embargo, los factores involucrados son muy complejos y aún no ha podido determinarse un régimen satisfactorio²⁶.

La manipulación experimental de las hormonas sexuales y el estudio de su efecto sobre el metabolismo y perfil de los lípidos, la lipoperoxidación y las fluctuaciones en el potencial antioxidante en diferentes órganos o en el animal entero puede aportar información valiosa para fines de su aplicación clínica y epidemiológica, pues no solamente aportaría conocimientos básicos sino también podría sugerir tratamientos preventivos o terapéuticos.

Varios estudios han demostrado el efecto antioxidante de estrógenos y de catecolestrógenos (productos de hidroxilación de los estrógenos) *in vitro*, en las membranas, cuando la lipoperoxidación es inducida por complejos de metales, por radicales, peróxidos o por radiación ultravioleta. Además de la protección contra la lipoperoxidación, el estradiol protege al ADN del daño por estrés oxidativo²⁷⁻²⁹.

Los estudios para explicar el mecanismo por el cual los estrógenos ejercen sus efectos antioxidantes se han realizado en modelos *in vitro* y sólo se han diseñado pocos estudios *in vivo*. Es muy probable que los mecanismos *in vitro* e *in vivo* sean diferentes, dado por las concentraciones suprafisiológicas que deben manejarse *in vitro* para obtener resultados significativos.

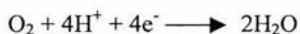
2.2. NATURALEZA DE LOS RADICALES LIBRES DE OXÍGENO.

Los electrones de los átomos y de las moléculas ocupan regiones del espacio denominadas orbitales. Cada orbital sólo puede contener 2 electrones como máximo. Cuando en un orbital externo hay un solo electrón, se dice que este último no está apareado. Se llama radical a cualquier especie atómica o molecular que tenga uno o más electrones no apareados o sea, un número total impar de electrones.

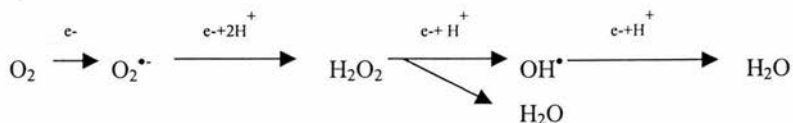
Los radicales son generalmente muy reactivos y buscan con avidez completar su par electrónico. Esto puede lograrse mediante una reacción entre dos radicales, con lo cual ambos dejan de serlo, o bien sustrayendo un electrón de otra molécula, la cual se convierte entonces en un radical. Este último mecanismo puede dar lugar a reacciones en cadena, o sea a la propagación del fenómeno inicial.

El oxígeno molecular (O_2) es fundamentalmente un birradical, ya que tiene dos electrones no apareados en su orbital externo, ambos con el mismo giro (paralelo). Esto impide que capte dos electrones simultáneamente en las reacciones en las cuales interviene, puesto que un donador de un par de electrones cede necesariamente un par antiparalelo. Por esta razón, el oxígeno sólo puede intervenir en reacciones univalentes y aceptar los electrones de uno en uno.

La mayor parte del oxígeno utilizado por el organismo humano es reducido a agua por la acción del complejo citocromo-oxidasa (citocromo $a+a_3$) de la cadena respiratoria mitocondrial^{30,31}, según la siguiente reacción global:



Pero en realidad, y por las razones expuestas anteriormente, esta reducción se lleva a cabo en 4 pasos univalentes:



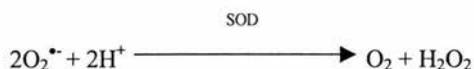
Estos intermediarios quedan unidos al sitio activo de la citocromo-oxidasa y no difunden al resto de la célula.

Cuando la molécula de oxígeno acepta un electrón, se convierte en un radical con carga negativa, el anión superóxido. Este se representa con signo negativo de la carga aniónica y un punto que indica que se trata de un radical $O_2^{\bullet-}$.

El segundo producto de la reacción (H_2O_2), no es realmente un radical, pero su importancia radica en que, por captación de un electrón y de un protón, puede dar lugar a la formación de una molécula de agua y a un radical hidroxilo (OH^{\bullet}), que es una especie sumamente reactiva.

La mayor parte del oxígeno utilizado en la respiración mitocondrial es convertido en agua al final de la cadena respiratoria, pero existe una pequeña fracción (2-5%) que escapa como anión superóxido. Se sabe que algunos constituyentes específicos de dicha cadena son los que forman los radicales libres.

Inmediatamente después de ser liberado el superóxido, es captado por la superóxido-dismutasa (SOD) mitocondrial³² que produce la siguiente reacción con una gran eficiencia:



El peróxido de hidrógeno formado en esta reacción puede difundir libremente hacia el exterior de la mitocondria, no así el superóxido cuya carga le impide cruzar libremente la membrana (Fig. 2.1).

Además de las propiedades tóxicas de las ERO, también se conoce que participan en el correcto funcionamiento celular cuando no se ha desencadenado el estrés oxidativo. Se sabe que actúan como mensajeros (el radical superóxido) en el sistema nervioso, que son utilizados por los macrófagos activados para destruir lo que han fagocitado y que tienen una importante participación en la activación de apoptosis (muerte celular programada)³³.

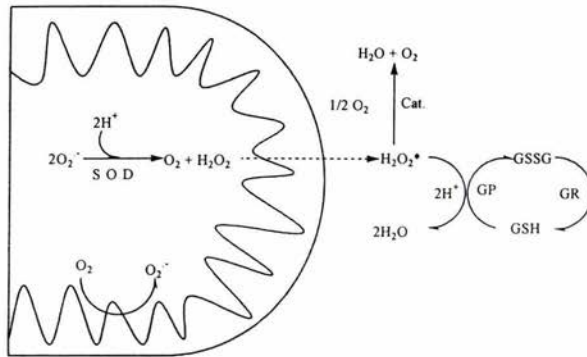


Fig.2.1-El esquema muestra el origen del radical superóxido a partir de la mitocondria, así como el mecanismo normal por el cual es dismutado a peróxido de hidrógeno y después neutralizado por los sistemas antioxidantes citoplásmicos.

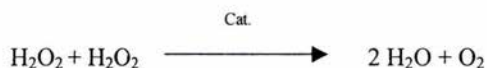
2.3. SISTEMAS ANTIOXIDANTES BIOLÓGICOS.

Una de las exigencias de la aerobiosis es contar con una batería de defensas contra las ERO que tienda a impedir su formación o a neutralizarlas una vez formados. Estas defensas tienen cinco niveles:

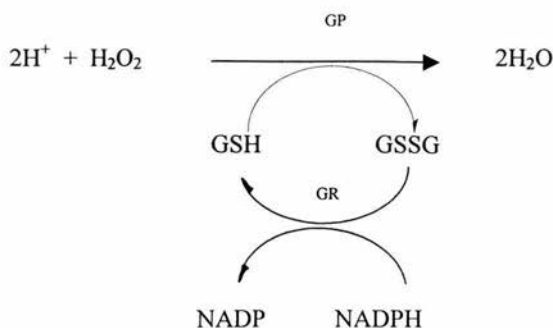
El primer nivel consiste en evitar la reducción univalente del oxígeno, mediante sistemas enzimáticos capaces de efectuar la reducción tetravalente consecutiva, sin liberar los intermediarios. Esto lo logra con gran eficiencia el sistema citocromo-oxidasa, responsable de más del 90% de la reducción del oxígeno en el organismo humano.

El segundo nivel lo constituye la presencia de enzimas especializadas, las superóxido dismutasas, que son metaloenzimas que catalizan la dismutación del radical anión superóxido para dar oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, con una eficiencia tan grande que puede llevarse a cabo a la misma velocidad con que se genera. En las células de los organismos eucariotes existen dos tipos: Una es citoplásmica y contiene un átomo de Cu^{2+} y uno de Zn^{2+} en su sitio activo. El átomo de cobre es reducido a Cu^+ y reoxidado a Cu^{2+} durante el ciclo catalítico. La otra es mitocondrial y contiene manganeso (Mn^{2+}) en su sitio activo.

El tercer nivel de defensa está constituido por un grupo de enzimas especializadas, tales como la catalasa que cataliza la siguiente dismutación:



O las peroxidasas, que catalizan la reducción del H_2O_2 por diversos donadores de electrones. En los mamíferos, la glutatión peroxidasa (GP) (una enzima citoplásmica que contiene Se) es la más importante, ya que cataliza la siguiente reacción:



Por otro lado, la glutatión reductasa (GR) convierte al glutatión oxidado (GSSG) en glutatión reducido (GSH) con intervención de NADPH, impidiendo así que se agoten las reservas de GSH.

En el cuarto nivel, las ERO pueden ser neutralizadas por especies antioxidantes conocidas como atrapadores de radicales libres^{34,35}. Estas pueden ser hidrofóbicas como las quinonas, carotenos y α -tocoferol, que es un excelente antioxidante³⁶⁻³⁹ y que, por su hidrofobicidad, se encuentra en las membranas biológicas donde su protección es particularmente eficaz ó hidrofílicas como glutatión reducido y ácido cítrico, entre otros⁴⁰⁻⁴³. En muchos estudios se ha demostrado que el nivel de antioxidantes es de vital importancia para prevenir o, al menos reducir los daños causados por un estrés oxidativo.

Una vez producido el daño molecular, el quinto nivel de defensa lo constituye la reparación. La mayor parte de las moléculas del organismo sufren un recambio constante, por lo cual son periódicamente reemplazadas. En el caso del material genético, los radicales de oxígeno son capaces de producir rupturas en la cadena del ADN y aun de inducir mutagénesis, como se ha demostrado en algunos experimentos con levaduras³³, pero existen mecanismos enzimáticos de reparación que permiten mantener intacta la información genética.

2.4. LA CADENA RESPIRATORIA.

La cadena respiratoria de la mitocondria es un conjunto de más de veinte distintos transportadores de electrones, asociados a un número indeterminado de péptidos estructurales. Si bien ahora se acepta que la cadena respiratoria funciona como una bomba de protones gobernada por procesos de oxidación-reducción, las bases estructurales que fundamentan esta función aún no se conocen del todo.

La cadena respiratoria transfiere electrones desde el par NAD^+/NADH o FAD/FADH , hasta el par $\text{O}_2/2\text{H}_2\text{O}$. Gran parte de la cadena respiratoria es reversible, y para catalizar tanto la reacción en una dirección como en la opuesta, es necesario que los componentes redox funcionen en unas condiciones en las que tanto las formas oxidadas como las reducidas se encuentren en concentraciones apreciables⁴⁴.

Mientras la mayoría de los electrones son transferidos a la cadena respiratoria de esta forma, existe otro grupo de enzimas que cataliza la deshidrogenación de sustratos cuyo potencial estándar del par sustrato oxidado/sustrato reducido se encuentra próximo a 0 mV. Estas enzimas son succinato deshidrogenasa, α -glicerofosfato deshidrogenasa y la flavoproteína transportadora de electrones (que transfiere electrones de la β -oxidación de los ácidos grasos) y catalizan la entrada directa de los electrones a la cadena respiratoria sin la mediación del par NAD^+/NADH . Esta transferencia requiere que las enzimas se encuentren en contacto directo con la cadena respiratoria, es decir, deben estar ligadas a las membranas.

Los transportadores redox que se encuentran en la cadena respiratoria consisten en flavoproteínas, que contienen FAD o FMN como grupos prostéticos fuertemente ligados y que se reducen por $(2\text{H}^++2\text{e}^-)$; citocromos con porfirinas como grupo prostético, que se reducen por 1e^- ; proteínas ferrosulfuradas (con hierro no hémico) que poseen grupos prostéticos y que se reducen por 1e^- ; ubiquinona, un cofactor liposoluble que se encuentra libre y que es reducido por $(2\text{H}^++2\text{e}^-)$; y finalmente cobre unido a proteínas, que puede ser reducido de Cu^{II} a Cu^{I} .

Los citocromos se clasifican de acuerdo a la estructura de su grupo prostético porfirínico. Las mitocondrias poseen citocromos de los tipos a, b y c.

Las proteínas Fe/S poseen átomos de Fe unidos covalentemente a la apoproteína por medio del azufre de una cisteína, y a otros átomos de Fe por medio de puentes de azufre ácido-lábiles. Los centros Fe/S pueden tener 2 o 4 átomos de Fe aunque cada centro sólo

actúa como transportador de $1e^-$. Las proteínas Fe/S se encuentran ampliamente distribuidas en las cadenas transportadoras de electrones transductoras de energía.

La ubiquinona (coenzima Q, CoQ, UQ o simplemente Q) se encuentra en las mitocondrias de mamífero como UQ₁₀ con una cadena lateral de 10 unidades de isopreno. Esta cadena lateral de 10 unidades de isopreno da a la UQ₁₀ un carácter altamente hidrofóbico. La UQ sufre una reducción ($2H^+ + 2e^-$) para formar UQH₂ (ubiquinol). La función asignada a la UQ es la de transportador redox móvil que conecta los complejos I y II con el III (Fig. 2.2).

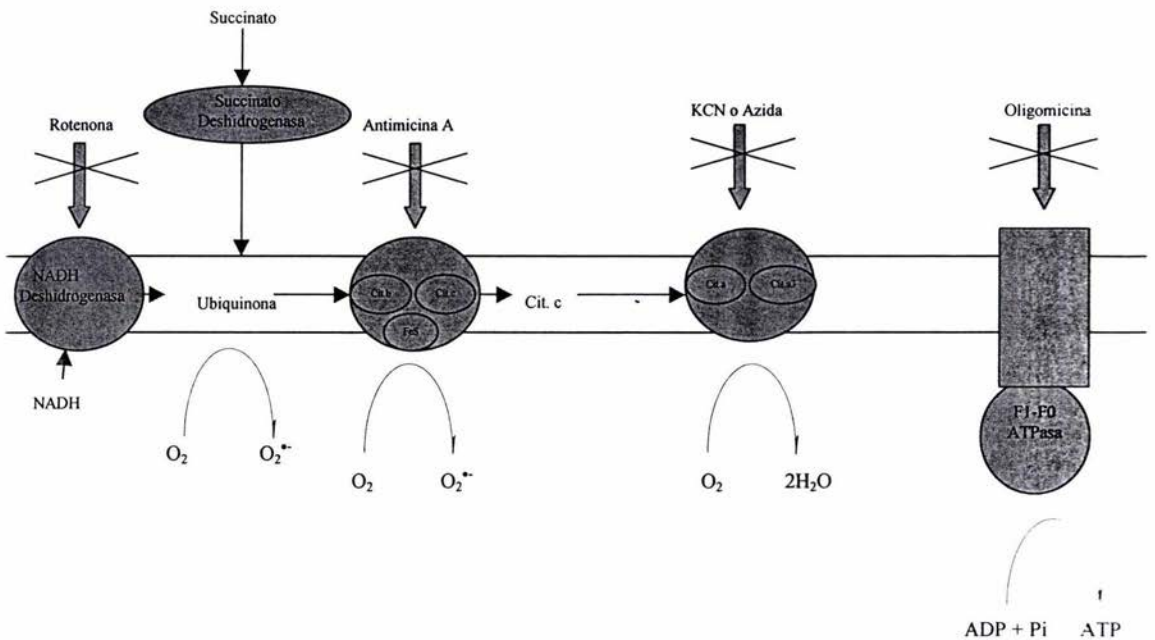


Fig.2.2-Modelo de la cadena respiratoria mitocondrial de mamíferos donde se muestran los diferentes complejos que la integran (NADH deshidrogenasa o complejo I, Succinato deshidrogenasa o complejo II, Complejo bc1 o III, citocromo oxidasa o complejo IV y F1F0 o ATPasa) además de sus inhibidores específicos clásicos; se indica a la ubiquinona y el complejo III como sitios de formación de superóxido, aunque a la fecha se ha demostrado que también el complejo I es formador del mismo radical. La parte inferior de la figura corresponde a la matriz mitocondrial. Tomado de Rembish, S.J., Trush, M.A. (1994). *Free Radical Biology & Medicine*.17:117.

COMPLEJO I (NADH-UQ OXIDOREDUCTASA). El complejo I cataliza la transferencia de 2 electrones desde el NADH hasta la UQ₁₀. El complejo es translocador de protones, lo que se aprecia en mitocondrias intactas o en complejos I reconstituidos con quinona en la forma oxidada como aceptor de electrones. El complejo I tiene un peso molecular de alrededor de 850 000, siendo probablemente el mayor complejo proteico de la membrana interna. Está constituido al menos por 16 polipéptidos, la mayor parte de los cuales no juega un papel redox de modo directo. El NADH es oxidado en el lado interno de la membrana por medio de la NADH-deshidrogenasa que tiene FMN como grupo prostético. Además de FMN, el complejo I posee de 16 a 28 átomos de hierro y 4 átomos de azufre ácido-lábil por cada FMN, organizados en centros de 2-Fe y 4-Fe. Hay entre 4 y 7 centros Fe/S por mol de complejo I. El complejo I es inhibido con rotenona o con piericidina A. El centro de unión de la rotenona no es aún bien conocido, aunque se sabe que en presencia de este inhibidor el FMN y los centros Fe/S se encuentran en forma reducida, por lo que es probable que la inhibición tenga lugar en la etapa final de la transferencia de electrones a la UQ₁₀.

COMPLEJO II. (SUCCINATO DESHIDROGENASA). Además del complejo I, hay otras tres vías redox para conducir electrones hasta la UQ₁₀ y el complejo III. Estas vías son: el complejo II, que transfiere los electrones que proceden del succinato; la flavoproteína transportadora de electrones, que suministra electrones procedentes de la β -oxidación de los ácidos grasos, y la α -glicerolfosfato deshidrogenasa, que cataliza la oxidación extramitocondrial del α -glicerolfosfato que se reduce a fosfato de dihidroxiacetona. Las dos primeras vías se encuentran en la cara de la membrana que da a la matriz y la otra en la cara externa. Las tres son flavoproteínas transportadoras de electrones que proceden de pares de sustrato cuyos potenciales redox estándar están próximos a 0 mV.

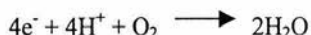
El complejo II está formado por cuatro polipéptidos. Los dos mayores constituyen la succinato deshidrogenasa cuya subunidad mayor contiene FAD unido covalentemente y dos centros Fe/S. El complejo II contiene cit b en la misma proporción que FAD, pero es un citocromo b distinto al del complejo III y está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

UBIQUINONA Y COMPLEJO III (COMPLEJO-bc₁ O UBIQUINONA: CITOCROMO *c* OXIDORREDUCTASA). Aunque la UQ₁₀ es el componente redox más pequeño de la cadena respiratoria, su función es quizá la que ha originado una mayor polémica. El papel más sencillo que se le ha atribuido es el de un transportador móvil de

($2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$) que transfiere electrones desde los complejos I y II hasta el III. Sin embargo, en el llamado “ciclo Q protonmotriz” se propone también para la ubiquinona un papel integral en la transferencia ($\text{H}^+ + \text{e}^-$) dentro del mismo complejo III.

El complejo III posee 8 subunidades, incluyendo 2 moléculas de citocromo b y una de citocromo c1, además de una única proteína Fe/S muy electropositiva (proteína de Rieske), que posee un centro 2Fe/S. El complejo contiene también un cierto número de proteínas intrínsecas que carecen de función redox pero que posiblemente estén implicadas en la traslocación de protones. El complejo III es inhibido por la antimicina A (A.A.) a concentraciones muy bajas, un mol de inhibidor bloquea un mol de complejo.

CITOCROMO c Y COMPLEJO IV (CITOCROMO c OXIDASA; FERROCITOCROMO- O_2 OXIDORREDUCTASA). El complejo III transfiere los electrones al cit c. El citocromo c no se aísla como si fuera un componente del complejo, aunque puede unirse de modo estequiométrico a la citocromo c oxidasa. El citocromo c es una proteína extrínseca que se encuentra en el lado externo de la membrana interna mitocondrial, por lo que se puede solubilizar fácilmente a partir de mitocondrias intactas. La citocromo-oxidasa es el complejo terminal de la cadena respiratoria que cataliza la reducción del O_2 hasta H_2O , en una reacción que pone en juego 4e^- .



El donador natural de los electrones es el cit c. Por tratarse de un proceso en el que se transfieren 4e^- , en el complejo hay cuatro grupos redox, cada uno con capacidad para 1 electrón: 2 hemos (cit a y cit a3) y dos átomos de cobre que pueden ser reducidos de Cu^{2+} a Cu^+ . A diferencia de lo que ocurre con el resto de la cadena respiratoria, la reacción de la citocromo c oxidasa es irreversible. Se han propuesto dos mecanismos de este complejo. Una propuesta dice que el complejo representa el elemento de transferencia de electrones del último bucle redox. Aunque no hay translocación de protones a través de la membrana, el flujo de electrones es suficiente para su acoplamiento a la síntesis de ATP ya que los protones utilizados en la reducción del oxígeno entran a través de la ATP sintetasa. Por el contrario, el modelo de la bomba de protones propone que el flujo de electrones a través del complejo induce un cambio conformacional causante de la translocación de protones a través de la membrana.

Como ya se ha mencionado con anterioridad, la CRM ha sido identificada como uno de los sitios importantes de origen de ERO, particularmente de radical superóxido. Hasta la fecha se ha descrito que tanto el complejo III, el ciclo de oxidoreducción de la coenzima Q y últimamente también el complejo I participan en la producción de este radical (fig.2.2). En el ciclo Q particularmente ha sido bien descrito el mecanismo por el cual se genera esta ERO. Una vez que se encuentra reducida esta coenzima (en forma de ubiquinol), tras recibir los electrones del complejo I o II, los cede al complejo III, pero esta reoxidación se lleva a cabo en dos reacciones parciales (como las mencionadas en la sección 2.2 para el oxígeno) y de esta manera se origina un radical ubisemiquinol que posee un electron desapareado, Este electron puede ser cedido directamente al oxígeno molecular originando con ello un radical superóxido. El tiempo de vida de este ubisemiquinol se puede incrementar al bloquear el flujo de los electrones con sustancias como antimicina A ó mixotiazol, que incrementan el estado reducido de este ciclo Q y así también incrementan la cantidad de superóxido formado.

2.5. RESPIRACION MITOCONDRIAL⁴⁴

Después de la descripción de la relación que existe entre el flujo de electrones a través de la membrana interna mitocondrial, la síntesis de ATP y la reducción del oxígeno molecular hasta agua (fig. 2.3). Ahora debemos retomar estos conceptos para explicar que existen diferentes estados de la respiración en las mitocondrias y que depende de la presencia o ausencia de algunos de los componentes que participan en estas reacciones:

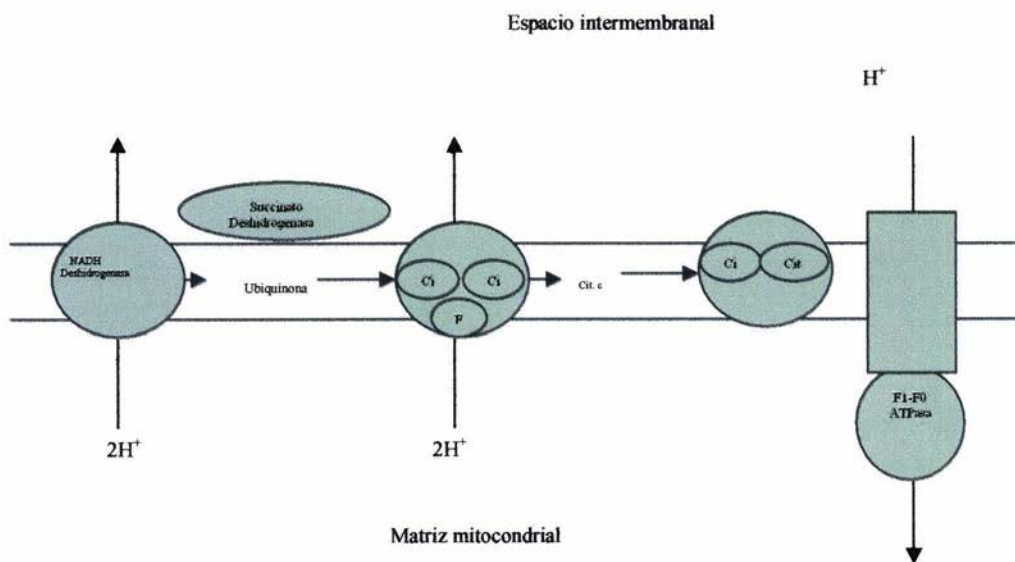


Fig. 2.3. Se muestran los sitios de translocación de protones a lo largo de la cadena respiratoria mitocondrial en la membrana interna, que en conjunto con la figura 2.2 explica el funcionamiento de esta cadena respiratoria.

El funcionamiento de este sistema que es conocido como respiración mitocondrial es muy complejo, pero a grandes rasgos se puede resumir en los siguientes pasos:

- Los electrones ingresan a la cadena respiratoria a través de los complejos I o II hasta donde son acarreados por NADH o succinato, respectivamente.
- El flujo de electrones a través de los complejos de la cadena respiratoria implica también una salida de protones de la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal lo cual es realizado por los complejos I y III, que son conocidos como translocadores de protones.
- El retorno de los protones hacia la matriz mitocondrial ocurre a través de la F1F0 o ATP sintetasa, que aprovecha este flujo para llevar a cabo la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi.

Cuando este mecanismo funciona de manera normal se dice que la respiración es acoplada, eso quiere decir que la reducción del oxígeno ocurre simultáneamente a la síntesis de ATP.

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

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

Tabla 2.1. Estados de la respiración mitocondrial.

		Respiración	
Estado 1	mitocondrias sin sustrato	sin ADP	baja
Estado 2	mitocondrias sin sustrato	+ ADP	baja
Estado 3	mitocondrias + sustrato	+ ADP	alta
Estado 4	mitocondrias + sustrato	ADP agotado	baja
Estado 5	mitocondrias + sustrato	oxígeno agotado	

Los valores típicos de esta relación varían entre 3 y 15 dependiendo de la preparación. A pesar de que es una variable útil empíricamente, es importante hacer constar que es una función híbrida: la velocidad de respiración en el “estado 4” depende de la conductancia

nativa de la membrana (flujo de electrones), mientras que la velocidad en el “estado 3” depende de cuál sea el paso limitante en este estado, es decir, de la permeabilidad al sustrato, la actividad sustrato-deshidrogenasa, la cadena respiratoria, la síntesis de ATP o la translocación de adenín nucleótidos. Por lo tanto, los cocientes de C.R. deben ser interpretados con cuidado.

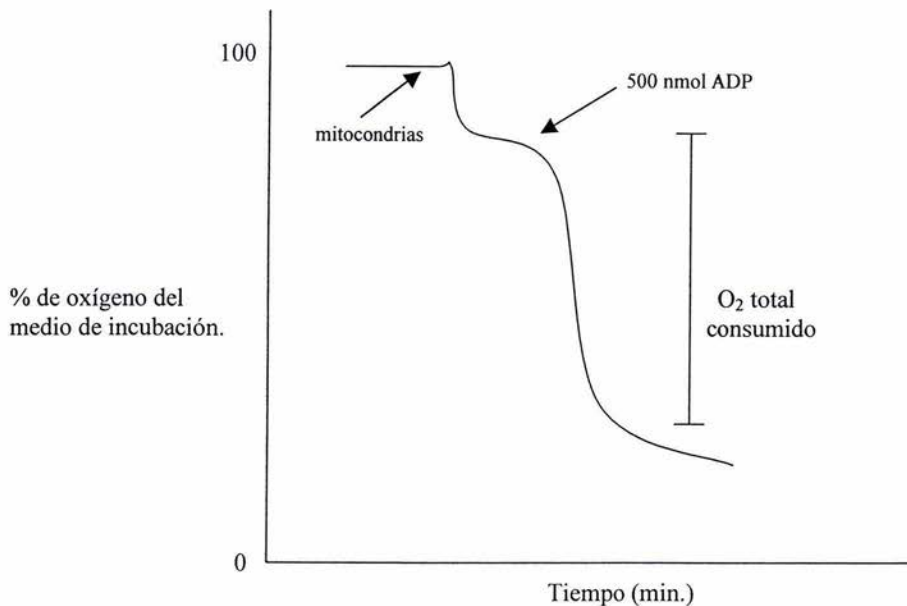


Fig. 2.4. Determinación del control respiratorio con un electrodo de oxígeno. En este experimento las mitocondrias de hígado de rata se incubaron con succinato como sustrato (y rotenona para inhibir cualquier respiración debida al NADH endógeno). Se añade ADP. Cuando se ha fosforilado todo el ADP la respiración retorna al “estado 4”.

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

La adición de las mitocondrias al medio de reacción (Fig. 2.4) ocasiona en principio un gran aumento de la respiración que enseguida disminuye, manteniéndose un cierto consumo

de oxígeno (velocidad en el “estado 4”). Las mitocondrias contienen adenín nucleótidos endógenos en la matriz en cantidad relativamente pequeña (alrededor de 10 nmol/mg proteína), por lo que al adicionar las mitocondrias al medio de incubación este “pool” es rápidamente fosforilado alcanzandose un equilibrio. La respiración que se produce en el “estado 4” se debe a que la membrana no es absolutamente impermeable a los protones, por lo que algunos de éstos pueden reingresar lentamente a través de la membrana sin inducir la síntesis de ATP, o también puede deberse a que las mitocondrias se encuentran dañadas por el proceso de aislamiento.

2.6. DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.

Una vez que se conoció la importancia de las ERO en diversos cuadros patológicos, se han realizado muchos intentos para cuantificar la producción de éstas a partir de diferentes fuentes, tanto químicas como biológicas y de forma tanto directa (se mide la especie formada) como indirecta (donde se miden productos de oxidación) y, usando diferentes técnicas tales como citometría de flujo, espectrofluorescencia, microscopía confocal, etc. Dentro de las técnicas de fluorescencia usadas para este fin, se utilizan compuestos sensibles a la oxidación, que dan una señal al oxidarse. De éstos, algunos son altamente específicos para reaccionar con el radical superóxido como el caso de dihidroetidión^{45,46} y otros como el 2,7-diacetato de diclorofluoresceína o DCF que reacciona más específicamente con el peróxido de hidrógeno. El DCF, es un fluoróforo sensible de ser oxidado por H_2O_2 y como producto de esta oxidación emite fluorescencia, es un compuesto lipofílico (propiedad que le dan los grupos acetato) por lo que puede pasar libremente a través de membranas biológicas⁴⁷.

Si se utiliza el DCF como donador de electrones en el sistema peróxido de hidrógeno-peroxidasa, la fluorescencia emitida será proporcional a la cantidad de peróxido en el medio, lo cual suele ser utilizado como mecanismo de detección de ERO (Fig. 2.5), además una ventaja adicional de su uso es la de poder hacer determinaciones intracelulares utilizando la propiedad antes mencionada de este fluoróforo de pasar libremente a través de membranas biológicas.

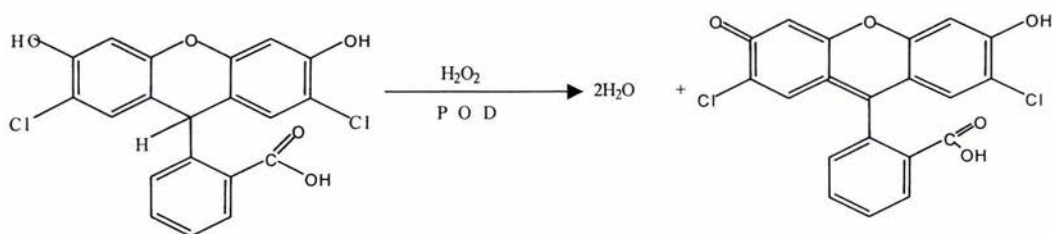


Fig. 2.5-El esquema muestra la estructura del DCF y la reacción de oxidación que sufre por intermedio de peroxidasa (POD). En la figura el fluoróforo se encuentra hidrolizado y en las posiciones donde se muestran dos grupos OH originalmente se encuentran los grupos acetato.

2.7. ANTECEDENTES EXPERIMENTALES DE LA RATA HIPERTRIGLICERIDÉMICA

Puesto que aún no se ha definido con suficiente certeza que la hipertrigliceridemia por sí sola represente un factor de riesgo en la etiopatología de las enfermedades cardiovasculares, hemos enfocado nuestras líneas de investigación al estudio de esta dislipidemia y su relación con la patología cardiovascular.

En este laboratorio se ha desarrollado un modelo de rata hipertensa e hipertrigliceridémica, una variante del modelo descrito por Reaven⁴⁸ en el cual las dietas con concentraciones altas de sacarosa o fructosa inducen hipertensión, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina. Este cuadro patológico es frecuentemente observado en la clínica. En el modelo desarrollado, estas anormalidades metabólicas y funcionales se han inducido en ratas Wistar por la administración de azúcar comercial (sacarosa) al 30 % en el agua de bebida durante un período de 20-24 semanas. Se ha realizado la caracterización de este modelo en parte y los principales hallazgos son los siguientes:

1.- La adición de azúcar refinada comercial al agua de bebida (30%) en ratas Wistar produce hipertrigliceridemia e hipertensión comparables a las encontradas por otros autores que administraron los carbohidratos con el alimento sólido (A estos animales los conocemos como HTG, de hipertrigliceridémica). En nuestro caso únicamente tuvimos que prolongar el tiempo de tratamiento a 20-24 semanas para obtener diferencias significativas con respecto a los controles⁴⁹.

2.- En la rata HTG de uno u otro sexo se observó un importante incremento en la acumulación de grasa intraabdominal, aunque esto no se refleja en el peso corporal total.

3.- Las ratas HTG presentan hiperinsulinemia^{49,50}.

4.- Cambios significativos en el perfil lipídico y peroxidación con diferencias asociadas al género de los animales⁵¹⁻⁵³.

5.- En experimentos de isquemia y reperfusión cardíaca *in vivo* se encontró un efecto protector por algunos compuestos sobre las arritmias post-reperfusión en ratas normales⁵⁴. En las ratas HTG se ensayó uno de estos compuestos, el ketorolac, por sus efectos semejantes a los antagonistas del calcio, así como el atrapador de radicales libres fenil N-t-butilnitrona (PBN). En las ratas HTG hembra se observó que con la administración previa de ketorolac las

arritmias post-reperusión se revertían aunque más lentamente que en las ratas hembra control, en cambio en los machos HTG el compuesto no fue capaz de normalizar los latidos y los animales no se recuperaban. Los resultados sugieren que los estrógenos endógenos ofrecieron protección a las hembras⁵⁵.

6.- En un grupo de ratas macho tratados con ketorolac o PBN también se demostró que la administración de PBN previa a la isquemia y reperusión, prevenía las arritmias letales y disminuía la lipoperoxidación, permitiendo que los animales se recuperaran, esto indica la mayor letalidad de los radicales libres que de la sobrecarga de calcio⁵⁶.

7.- En estudios recientes se investigó el efecto de la castración en ratas HTG de uno u otro sexo sobre las arritmias por reperusión *in vivo*. En las ratas HTG macho castradas y previamente tratadas con ketorolac se encontró protección por el compuesto en aproximadamente 30% de los animales, lo que no se observa en animales HTG intactos, que sufren 100% de mortalidad.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Ya ha sido descrito que en el origen y el progreso de enfermedades crónico-degenerativas como hipertensión y aterosclerosis, el estrés oxidativo juega un papel muy importante. Se han reportado aumentos en niveles de marcadores de estrés oxidativo como malondialdehído, LDL altamente oxidadas, y disminución en los niveles de antioxidantes como carotenos, y glutatión reducido. También se ha demostrado que al suministrar antioxidantes como el mismo α -tocoferol, los cuadros patológicos se revierten o bien se previenen.

La rata HTG presenta un conjunto de alteraciones fisiológicas y metabólicas como hipertensión, hipertrigliceridemia y resistencia a la insulina, acumulación de grasa intraabdominal, e hiperinsulinemia que son inducidas por alto consumo de sacarosa, por lo cual este resulta ser un buen modelo para analizar si la dieta alta en carbohidratos puede alterar el balance entre especies oxidantes-antioxidantes, dando como resultado un estrés oxidativo.

Es importante este análisis debido a que en la actualidad la obesidad se ha convertido en un problema de salud pública a escala mundial, que está asociada con un cambio en los hábitos alimentarios. Las personas obesas en algún momento pueden presentar alteraciones metabólicas como las que se encuentran en el modelo animal (conocido como síndrome X o síndrome metabólico). Este estudio nos puede ayudar a conocer mejor cómo es que una alteración dietética puede influir en la salud induciendo estrés oxidativo.

Además, mucho se ha hablado de la influencia del sexo en una mayor resistencia a cierto tipo de padecimientos, dentro de los cuales se han incluido las enfermedades cardiovasculares y otras que presentan, dentro de sus características, elevados niveles de estrés oxidativo. De esto, poco se ha demostrado con certeza, por lo cual resulta importante saber si el nivel de estrés oxidativo en los animales a estudiar es influenciado por el género.

4. OBJETIVOS:

General:

Determinar si la dieta alta en carbohidratos induce estrés oxidativo y si el sexo del animal influye en el grado de estrés.

Particulares:

- Evaluar la liberación de radicales libres a partir de la cadena respiratoria mitocondrial en la rata HTG y compararlo con controles.
- Cuantificar los niveles de algunos de los antioxidantes más importantes en los animales estudiados.
- Analizar el estado de la respiración mitocondrial de ratas HTG comparado con animales controles.

5. HIPOTESIS:

Sabemos que las ratas HTG presentan un cuadro de alteraciones patológicas debido al alto contenido de sacarosa en su dieta, que estas alteraciones pueden implicar un estrés oxidativo y que las ratas macho han mostrado una mayor susceptibilidad al daño inducido por la dieta, por lo que si analizamos el grado de estrés oxidativo que presentan, encontraremos que es mayor al de animales controles, que la cadena respiratoria mitocondrial participa en el aumento del estrés y que este aumento se ve influenciado por el género del animal.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Se utilizarán ratas Wistar recién destetadas y se dividirán en 4 grupos experimentales. Cada grupo estará compuesto de 10 ratas y el tratamiento para todos los grupos tienen una duración de 20 semanas a partir del día del destete.

El primer grupo consta de 10 machos control que solamente tomará agua y alimento sólido normal para roedores.

El segundo grupo, que también consta de 10 machos ingerirá sacarosa al 30 % en el agua de bebida y alimento sólido normal (machos HTG).

El tercer grupo se compone de 10 hembras y recibirá agua y alimento sólido normal para roedores.

El cuarto grupo, formado por 10 hembras, recibirá agua con sacarosa al 30% y alimento sólido (hembras HTG).

Para poder realizar los experimentos que se describen más adelante, los diferentes grupos de animales serán desfasados cada 2 semanas en el tiempo de inicio del tratamiento.

Al final del tratamiento se mantendrán las ratas en ayuno durante una noche, dos ratas por día y se sacrificarán por la mañana. Las primeras cuatro determinaciones descritas en la metodología (7.1-7.4) se realizan el mismo día y las últimas dos (7.5, 7.6) se llevan a cabo con las muestras que se han guardado congeladas cada día, una vez concluido con los cuatro grupos.

DISEÑO ESTADÍSTICO.

Los resultados obtenidos fueron analizados aplicando la prueba “t” de Student para grupos no apareados, que hace una comparación punto a punto, para determinar si existieron diferencias estadísticamente significativas. Se utilizó el programa Sigma Plot 7.0. Los resultados numéricos representan la media \pm la desviación estandar. La significancia estadística se obtiene cuando $p < 0.05$.

Falta página

N° 26

centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se separó y centrifugado a 10 000 rpm durante 10 minutos.

El precipitado se resuspendió cuidadosamente con un pincel de cerdas finas en la misma solución de aislamiento adicionada con 0.1% de BSA, incubándolo durante 20 minutos en esta solución, posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos y finalmente se resuspendió en 1 mL de solución de aislamiento sin albúmina.

Nota: Todo el proceso es llevado a cabo manteniendo las muestras y reactivos en baño de hielo y la centrifugación se realiza a 4 °C.

7.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.

Método modificado de Lowry (MicroLowry).

MATERIAL Y REACTIVOS:

Solución A (NaOH 0.1 N en NaHCO₃ al 1%)

Solución B (Tartrato de sodio y potasio al 1%)

Solución C (Sulfato cúprico al 0.5%)

Mezcla de soluciones (10 ml de sol. A, 50 µL de sol. B y 50 µL de sol. C)

Gradilla metálica.

Tubos de ensayo.

Micropipetas de 1000, 200 y 50 µL.

Puntas de plástico para las micropipetas.

Probeta de 10 mL.

Matraz Erlenmeyer de 25 mL.

Celda de plástico para espectroscopio UV/Visible.

Piseta con agua destilada.

Espectrofotómetro UV/Visible.

METODOLOGIA⁵⁷.

En un tubo de ensayo con 990 µL de solución salina se adicionaron 10 µL de mitocondrias aisladas, de esta dilución (1:100) se pasaron 100 µL a otro tubo, esto se realizó por duplicado.

Por otra parte, se preparó una curva de calibración utilizando BSA como estándar, se realizó como sigue:

Se colocaron 0, 20, 40 y 60 µL de una solución estándar de BSA (1mg/ml) en tubos de ensayo. Se adicionó 1 mL de la mezcla de reactivos a cada tubo y se deja incubar por 10 minutos, después se adicionó a cada tubo 50 µL de solución comercial Folin 1 N y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Se calibró el espectrofotómetro a cero de absorbencia a 750 nm con la muestra sin BSA como blanco de reactivos. Realizando una regresión lineal, la curva de calibración nos permite conocer la concentración de proteína en las muestras de mitocondrias.

7.3. CONTROLES RESPIRATORIOS.

MATERIAL Y REACTIVOS:

Micropipetas de 1000, 200 y 50 μL

Puntas de plástico para las diferentes micropipetas.

Solución para control respiratorio que contiene:

- KCl	0.932 g/100mL	(125mM)
- Hepes	0.238 g/100mL	(10mM)
- Succinato		(10mM)
- Fosfato inorgánico		(1mM)

Rotenona disuelta en etanol (1mg/mL)

ADP 50 mM

Mitocondrias aisladas el mismo día.

EQUIPO:

El equipo que se utilizó para realizar los controles respiratorios consta de: Una cámara de vidrio de 2 mL en donde se lleva a cabo la reacción, equipada con un electrodo detector de oxígeno; la cámara incluyó un agitador magnético y se colocó sobre una placa para agitación. La señal es detectada por un monitor de oxígeno biológico YSI Modelo 5300 conectado al electrodo. El registro se obtuvo con un graficador Kipp & Zonen.

METODOLOGIA³².

Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente en la cámara de reacción, con agitación suave.

Se adicionaron en la cámara 2 mL de solución para control respiratorio, con la cual el oxímetro se calibró a 100% de concentración de oxígeno y una vez que se estabilizó se inicia el registro.

Se registró unos minutos para tener una línea basal, se adicionó el equivalente de 1 mg de proteína mitocondrial por mL de solución de reacción (la concentración de proteína de las

mitocondrias se determinó por el método de Lowry) se registró dos minutos para establecer el estado 4 de la respiración mitocondrial. Se adicionaron 5 μL de ADP 50 mM para registrar el estado 3 de la respiración hasta que se consumió completamente el ADP; se adicionaron 5 μL más del mismo ADP hasta agotarlo nuevamente (fig.7.1)

Este mismo procedimiento se siguió tanto para mitocondrias de rata control como para las de rata HTG.

El control respiratorio se obtuvo dividiendo la velocidad a la que se consume el oxígeno en presencia de ADP entre la velocidad a la que se consume cuando se ha agotado el mismo (Ver “Respiración Mitocondrial” pg.16)

Nota: Durante estos experimentos las muestras y reactivos se conservan en baño de hielo.

Figura 7.1. CONTROLES RESPIRATORIOS.

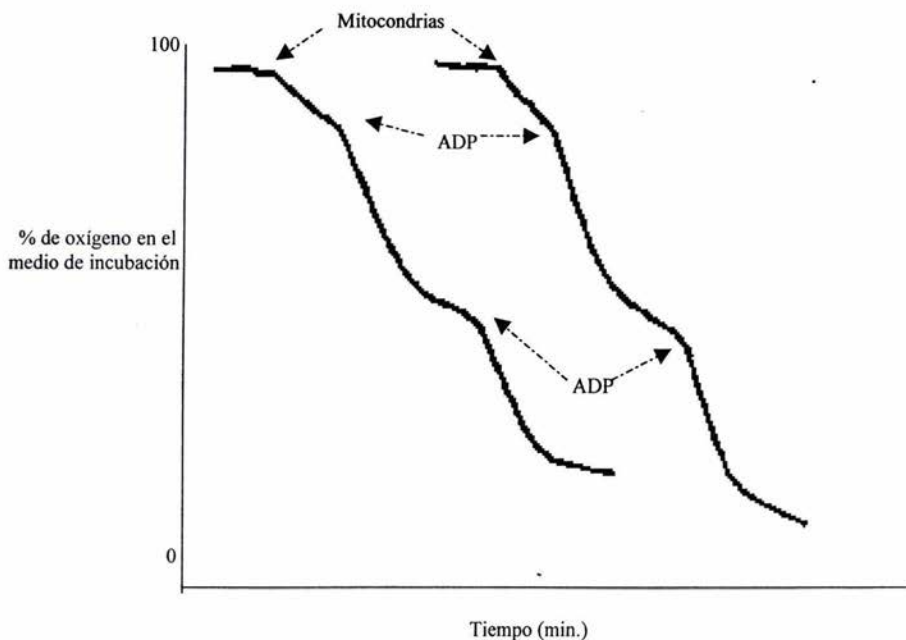


Figura 7.1. Se muestra ejemplos de los trazos obtenidos como controles respiratorios de las mitocondrias aisladas de hígado de rata. En este caso, los trazos son de mitocondrias de rata HTG (izquierda) y control (derecha). Se indican los puntos donde se llevan a cabo las adiciones, tanto de mitocondrias como de ADP, tal como se indica en el texto.

7.4. DETERMINACIÓN DE LA FORMACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN LAS MITOCONDRIAS DE HÍGADO DE RATA.

MATERIAL Y REACTIVOS:

Mitocondrias aisladas en el mismo día.

Celda de cuarzo de 3 mL con barra magnética.

Micropipetas de 1000, 200, 50 y 10 μL

Puntas de plástico para las micropipetas.

Tubos de vidrio de 5 mL.

Baño de hielo.

Piseta con agua destilada.

Piseta con etanol.

Succinato 0.1 M.

BSA 0.1mg/ μL

DCF 100 μM

CCCP 1mM

POD 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

A.A. 1mM

Solución de reacción que contiene por cada 100mL:	Manitol	4.1g	(225mM)
	Sacarosa	2.56g	(75mM)
	DETAPAC	0.039g	(1mM)
	Tris-Cl	0.365g	(30mM)

EQUIPO.

Se utiliza un espectrofluorómetro Perkin-Elmer Modelo LS-50-B equipado con un software FL WinLab, agitación magnética y un baño de agua con temperatura controlada.

METODOLOGÍA⁵⁸.

La temperatura del baño de agua se ajustó a 25°C y el espectrofluorómetro se programó como sigue: el método a utilizar fue Time Drive, con longitudes de onda de excitación y emisión de 475 y 525 nm respectivamente; las ventanas tanto de excitación como emisión se seleccionaron a 6 nm y con una duración del evento de 50 minutos.

En un tubo de vidrio de 5 mL se adicionaron 2 mL de la solución de reacción, 40 µL de BSA, 2 µL de DCF, 2 µL de CCCP y 20 µL de POD, se agitó suavemente y se dejó incubar por 10 minutos protegido de la luz.

La mezcla se transvasó a una celda de cuarzo y se colocó en su posición dentro del espectrofluorómetro. Se adicionaron a la mezcla 2 mg de proteína mitocondrial por cada mL y se inició inmediatamente el registro.

Una vez que se estableció la línea basal de fluorescencia, registrando 2 minutos, se adicionaron 10 µL de succinato. Inmediatamente después se adicionó 10 µL de antimicina A y se registró hasta completar los 50 minutos.

Los registros son cambios en la fluorescencia del DCF, y los cálculos que se pueden obtener del software son valores de las pendientes y los cambios de intensidad de la fluorescencia con respecto al tiempo.

Nota: Los reactivos y las mitocondrias aisladas deben conservarse en baño de hielo todo el tiempo que dura el experimento.

7.5. DETERMINACIÓN POR HPLC DE UBIQUINOL 9 Y α -TOCOFEROL EN MITOCONDRIAS DE HÍGADO DE RATA.

MATERIALES Y REACTIVOS.

Tubos de vidrio con tapón de rosca de 10 mL (2 para cada muestra).

Tubos de ensayo de 10 mL

Gradilla metálica.

Micropipetas para 1000, 200 y 50 μ L.

Puntas de plástico para las micropipetas.

Matraz Erlenmeyer para 25 y 50 mL.

Baño de hielo.

Agitador Vortex.

Pipetas Pasteur con bulbo.

Probeta graduada de 100 mL.

Nitrógeno de alta pureza.

BHT 0.1 mg/mL en etanol

Metanol mantenido a -20 °C.

Eter de petróleo mantenido en hielo.

Metanol-agua 95:5

Metanol-Etanol 1:1.

Fase móvil para la cromatografía que consta de:	Metanol	70 %
	Hexano	28 %
	Propanol	2 %
	Perclorato de Litio	50 mM.

Campana de extracción.

Ultracentrífuga Sorvall RC2-B con temperatura controlada a 4 °C.

Equipo HPLC, conectado a un guardacolumna, a una columna de 25 cm de fase reversa con un tamaño de partícula de 4 μ m y posteriormente a dos sistemas de detección: un detector UV/Visible (Waters 2487 Dual λ Absorbance) y un detector electroquímico (DECADE con una celda de carbono y un electrodo de hidrógeno como referencia). Todo esto es controlado por medio de un software Millennium 32.

METODOLOGIA⁵⁹⁻⁶¹.

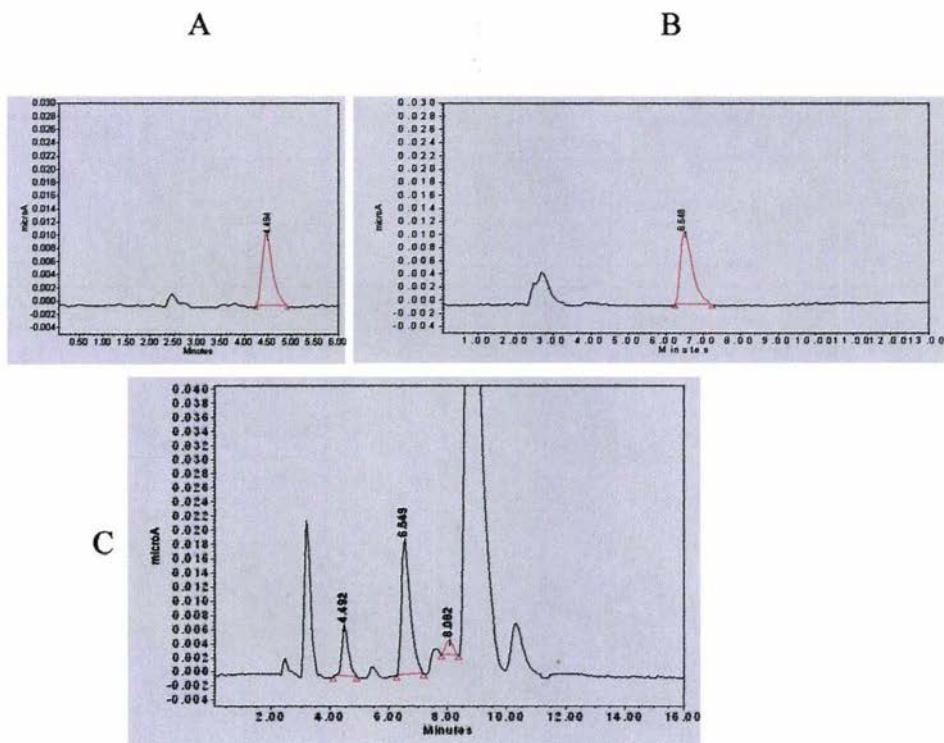
Extracción. En un tubo de vidrio con tapón de rosca se adicionaron 20 mg de proteína mitocondrial, se agregaron 50 μL de BHT (0.1 mg/mL en metanol) para prevenir la autooxidación, posteriormente se adicionaron rápidamente 4 mL de metanol helado ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se agitó en vortex durante 1 minuto.

Esta mezcla se extrajo con 3 mL de éter de petróleo frío (en hielo), agitando en Vortex durante 1 minuto, se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos y se trasasó la fase superior (éter de petróleo) a otro tubo de vidrio con tapón de rosca. Esta operación de extracción se repitió con 2 mL de éter de petróleo frío y se adicionó la fase superior al primer extracto.

Una vez mezclados los extractos, fueron tratados con 2 mL de metanol al 95%, agitando suavemente durante 30 segundos, después de lo cual se evaporó a sequedad con corriente de nitrógeno. El residuo lipídico se redisolvió en 500 μL de metanol-etanol (1:1) y se filtró a través de una membrana (tamaño del poro 0.45 μm).

20 μL de la muestra filtrada Se inyectaron en el HPLC. Previamente se programaron el detector de absorbencia a 270 nm para cuantificar la quinona oxidada y el detector electroquímico a +850mV para determinar quinol (forma reducida de la coenzima) y α -tocoferol simultáneamente, en el modo "pulse" con una velocidad de flujo de 1mL/min de la fase móvil.

Figura 7.2. TRAZOS DE HPLC PARA CoQ₉ Y α -TOCOFEROL.



La figura 7.2. muestra trazos de HPLC obtenidos al determinar antioxidantes lipofílicos. (A) Estándar de vitamina E, (B) estándar de CoQ₉ reducida y (C) trazo obtenido al analizar el extracto de mitocondrias de una de las ratas. Se puede apreciar la correspondencia de los tiempos de retención en los dos antioxidantes determinados: 4.49 min. para vitamina E, 6.54 para CoQ₉ reducida y el pico en 8.08 corresponde a CoQ₁₀ reducida, que no se determinó en este trabajo. Para más detalles revisar sección de Métodos.

7.6. DETERMINACIÓN POR HPLC DE GLUTATION REDUCIDO EN MITOCONDRIAS DE HÍGADO DE RATA.

MATERIAL Y EQUIPO:

Centrífuga para tubos Eppendorf.

HPLC Waters 600 equipado con software Millenium 32.

Detector electroquímico DECADE

Columna Taxsil-2; 0.46 x 15 cm con tamaño de partícula 3µm.

Tubos Eppendorf de 1.5 mL

Tubos de vidrio de 5 mL

Gradilla metálica

Micropipetas de 1000, 200 y 50 µL

Puntas desechables para las pipetas

Mitocondrias de hígado de rata

Glutación reducido (GSH)

Acido metanosulfónico

Acido octanosulfónico

Acido dietiltetraaminopentaacético (DETAPAC)

Acido fosfórico

Fosfato de sodio monobásico

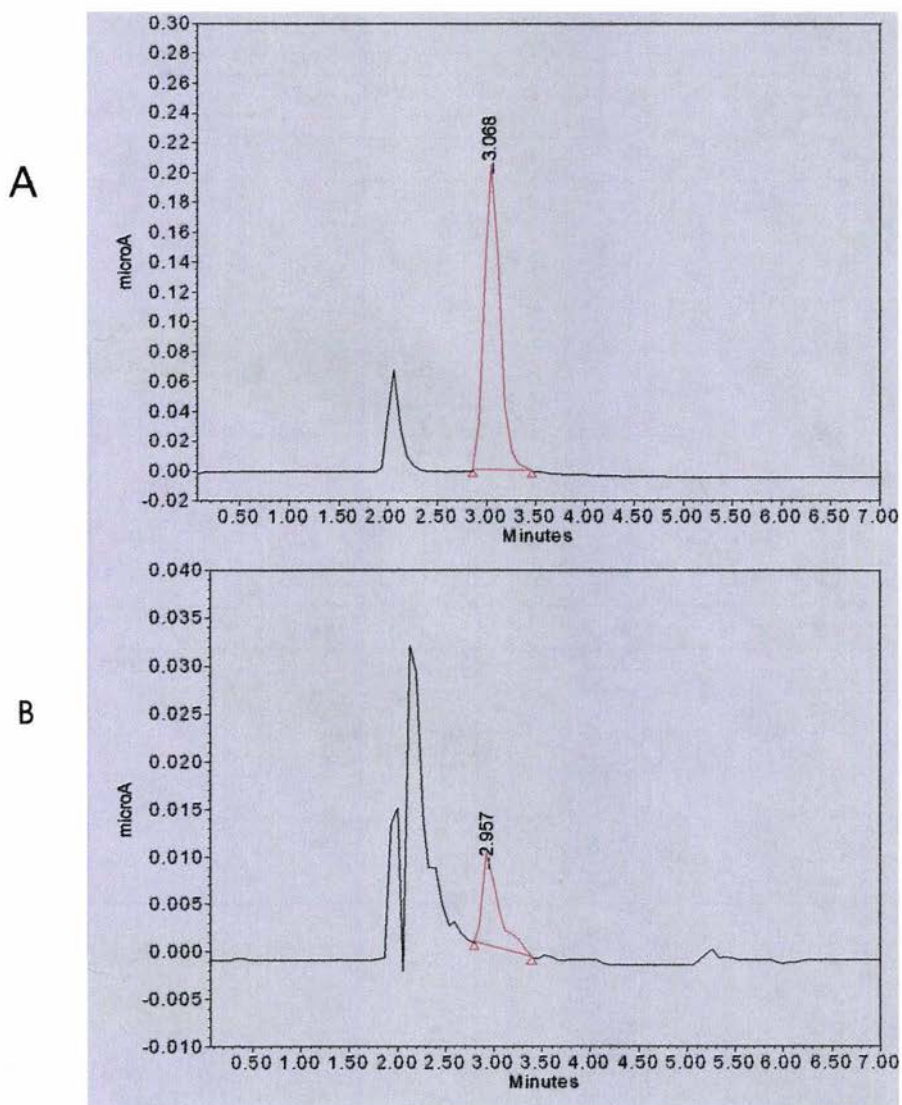
Agua Milli Q

METODOLOGIA⁶¹.

Una parte de la muestra (2-10 mg de proteína) se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se agregaron 500 µl de acido metanosulfónico (200 mM) que contenía 5 mM de DETAPAC. Esta mezcla fué agitada con Vortex durante 1 min. y se centrifugó a 13 000 rpm durante 30 min a 4° C. Una porción del sobrenadante fué diluido 1:1 con la fase móvil (50 mM fosfato de sodio monobásico, 0.05 mM ácido octanosulfónico, pH=3 ajustado con ácido fosfórico), este extracto se filtró a través de una membrana con poro de 45 µm y se inyectó

20 μL en el HPLC conectado al detector electroquímico que se encontraba a un potencial de +850 mV en modo pulse, con un flujo de 1 mL/min de la fase móvil. La curva estandar se construyó usando el GSH en soluciones de concentraciones conocidas (concentración vs área). En esta curva se interpolaron las áreas obtenidas para las muestras problemas.

Figura 7.3. TRAZOS DE HPLC PARA GLUTATION REDUCIDO.



La figura 7.3. muestra los trazos obtenidos al determinar GSH en HPLC. (A) Se corre un estandar de GSH para conocer su tiempo de retención, (B) el trazo obtenido al inyectar el extracto ácido de mitocondrias de hígado de una de las ratas analizadas. Para más detalles revisar sección de Métodos.

8. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.

La Tabla 8.1. muestra información acerca de cómo el consumo de sacarosa afecta de forma más importante a machos que a hembras. El incremento en el peso corporal es más significativo entre machos control y HTG, que entre hembras, que alcanza significancia estadística. También la dieta de sacarosa induce acumulación de grasa intraabdominal, la cual es más notable en machos que en hembras. El efecto de la dieta se aprecia en los resultados de triglicéridos y presión sanguínea, donde tanto machos como hembras se ven afectados por igual, a diferencia de lo que ocurre en con las variables anteriores.

Tabla 8.1. CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS ANIMALES

	MACHOS		HEMBRAS	
	CONTROL	HTG	CONTROL	HTG
PESO CORPORAL	415 ± 48 g	481 ± 57 g ✚	284 ± 35 g	328 ± 22 g ☆
GRASA	4.14 ± 1.8 g	12.7 ± 3.4 g *	1.5 ± 0.5 g	5.1 ± 0.6 g ★
TRIGLICERIDOS (mmol/L)	0.79 ± 0.34	1.73 ± 0.89 *	1.09 ± 0.37	1.56 ± 0.53 **
PRESIÓN SANGUINEA (mm Hg)	113.7 ± 13.6	148.5 ± 10.4 *	115.7 ± 14.4	137.2 ± 13.0 **

Los valores representan la media y su desviación estándar con una n=7 para los cuatro grupos.
 (✚ P < 0.05 macho control vs macho HTG; ☆ P < 0.05 hembra control vs hembra HTG)
 (* P < 0.0001 macho control vs macho HTG; ★ P < 0.0001 hembra control vs hembra HTG)
 (* P < 0.001 Macho control vs macho HTG; ** P < 0.05 Hembra control vs hembra HTG)

Tabla 8.1. El consumo de sacarosa al 30% en el agua de bebida induce un incremento de peso corporal en los animales y una mayor acumulación de grasa intraabdominal, la cual es menos notable en las hembras HTG que en los machos HTG lo que nos indica un menor efecto de la dieta en el caso de las hembras. Se muestra los pesos de las ratas al final del tratamiento, y el peso de la grasa intraabdominal obtenida. Los triglicéridos y presión son tomados de la referencia (12), de éstos las diferencias son significativas entre machos control y HTG y entre hembras control y HTG.

Los resultados de los controles respiratorios realizados a las mitocondrias de hígado de los cuatro grupos de animales (Tabla 8.2) nos indican que no existe efecto del consumo de sacarosa sobre la respiración, además de que el CR también nos sirve para evaluar la calidad del método de aislamiento ya que cuando las mitocondrias resultan muy dañadas, generalmente están desacopladas. Así que el método que se utiliza en el laboratorio nos permite la obtención de mitocondrias en condiciones optimas.

Tabla 8.2. VALORES DE CONTROL RESPIRATORIO

	CON ROTENONA	SIN ROTENONA
MACHO CONTROL	5.00 ± 1.0	5.18 ± 0.8
MACHO HTG	5.14 ± 0.8	5.50 ± 1.3
HEMBRA CONTROL	5.34 ± 0.9	4.84 ± 0.5
HEMBRA HTG	5.30 ± 0.4	5.04 ± 0.6

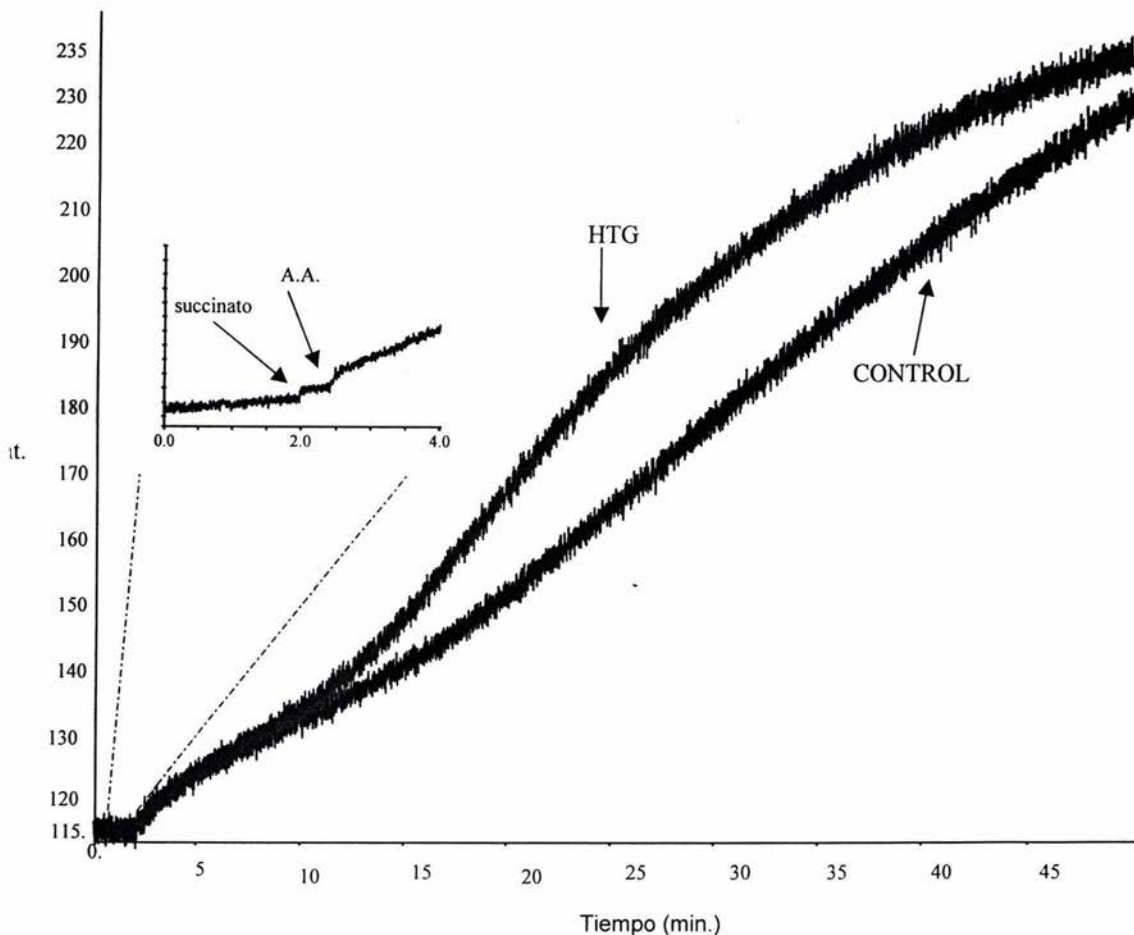
. Las diferencias no son estadísticamente significativas (n=5 para los cuatro grupos)

Tabla 8.2. Se resumen los valores de control respiratorio obtenidos de mitocondrias de hígado para los diferentes grupos estudiados, tanto en presencia de rotenona como sin añadirla. No se encontró diferencias significativas entre los cuatro grupos, lo cual indica que las mitocondrias se encuentran en buenas condiciones. Se realizan los controles en presencia de rotenona, para evitar la participación del complejo I en el consumo de oxígeno. Los controles respiratorios se realizaron utilizando succinato 10 mM como sustrato.

En el caso de la liberación de ERO a partir de la cadena respiratoria mitocondrial, sí se encontraron diferencias con respecto al consumo de sacarosa, ya que tanto la velocidad de liberación como la cantidad de peróxido de hidrógeno liberado son mayores en los grupos de machos que recibieron la sacarosa (Fig.8.2, 8.4 y 8.5). Esta diferencia no es tan notable entre los dos grupos de hembras (Fig. 8.1), lo cual nos indica que el sexo del animal influye en las variables antes mencionadas. Las diferencias más notables se encuentran al comparar el grupo de machos HTG contra hembras HTG, aunque también en el caso de los controles los machos presentan valores más altos. Estas diferencias se pueden apreciar desde el momento de analizar las curvas de liberación al encontrar comportamientos muy diferentes entre machos y

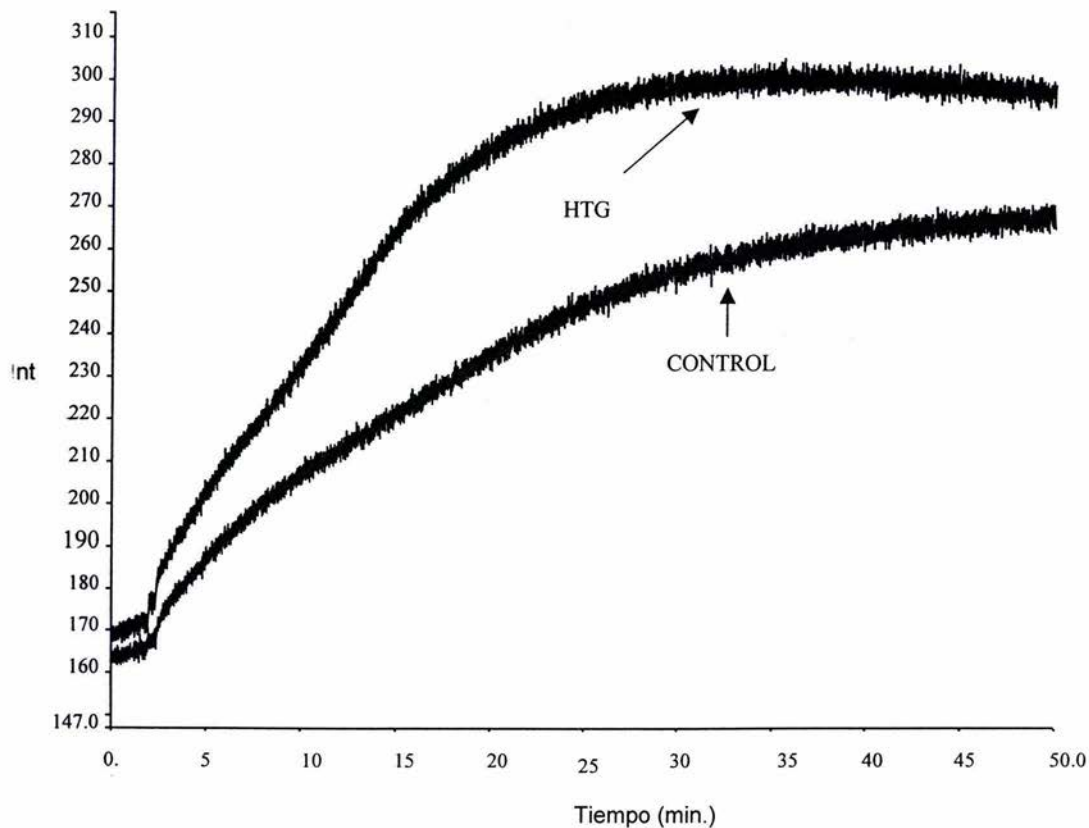
hembras (Fig. 8.3): mientras en los machos la liberación es lineal desde el momento de iniciar la reacción (adición de A.A.), en el caso de las hembras aparece al inicio un tiempo de latencia durante el cual prácticamente no se detecta liberación de peróxido. Sin embargo, después de algunos minutos la velocidad de liberación se incrementa, aunque no iguala la que se alcanza en el caso de los machos. Este comportamiento se conserva tanto en el caso de los animales que recibieron sacarosa, como en los que no la recibieron.

Figura 8.1. GENERACIÓN DE H₂O₂ EN MITOCONDRIAS DE RATAS HEMBRA.



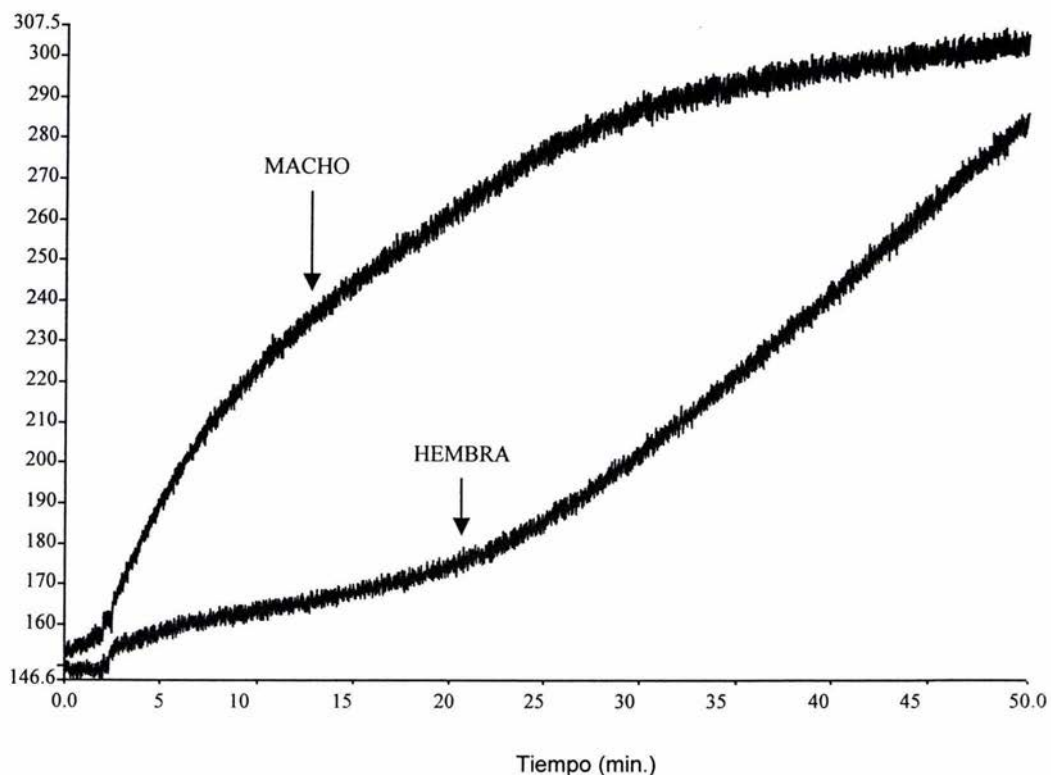
La figura muestra un trazo obtenido por fluorescencia donde se grafica intensidad de fluorescencia vs tiempo. En este caso se realiza la comparación entre liberación de ERO a partir de mitocondrias de una hembra HTG y una hembra control. Se puede apreciar que la diferencia radica en la velocidad de liberación de la ERO (dada por la pendiente) más que en el cambio total de fluorescencia, el cual hacia el final de la curva casi se iguala. En el recuadro se muestra un acercamiento de los primeros minutos para apreciar el efecto de las adiciones descritas en la página correspondiente de la sección de Materiales y métodos.

Figura 8.2. GENERACIÓN DE H₂O₂ EN MITOCONDRIAS DE RATAS MACHO.



La figura muestra trazos obtenidos de los experimentos de fluorescencia (ver Métodos) que indican las diferencias que existen en la velocidad de liberación del peróxido de hidrógeno (dado por la pendiente de las curvas) y la cantidad del mismo (la diferencia total de fluorescencia) en muestras de mitocondrias de hígado obtenidas de ratas macho. Se puede apreciar fácilmente que las mitocondrias de una rata HTG liberan una cantidad mayor y a una mayor velocidad que en el caso del control.

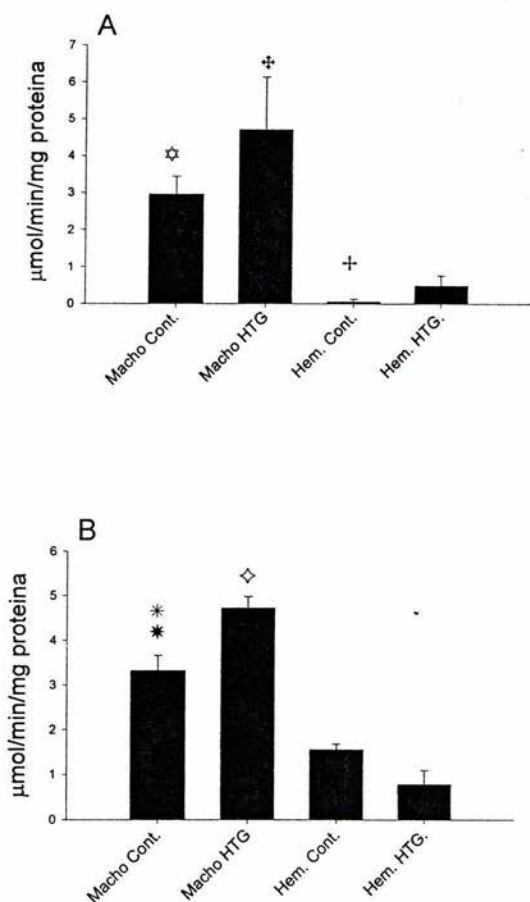
Figura 8.3. LIBERACIÓN DE H₂O₂ EN MITOCONDRIAS DE RATAS HTG.



La figura muestra la comparación entre curvas de fluorescencia obtenidas de mitocondrias de animales macho y hembra HTG. Se puede apreciar las diferencias existentes tanto en la velocidad con la que es liberado el peróxido de hidrógeno (que corresponde a la pendiente de la curva) como en la cantidad del mismo (la máxima fluorescencia alcanzada), sobre todo al inicio del trazo se puede apreciar cómo en el caso de la hembra casi no hay liberación de la ERO. Para más detalles del experimento ver la sección de Materiales y métodos.

Hay que resaltar también las diferencias que aparecen entre los resultados de los experimentos en los que se adicionó rotenona al medio de reacción (Fig. 8.4 y 8.5), donde se puede apreciar que en presencia de rotenona existe menor liberación de especies oxidantes, independientemente de que las mitocondrias sean de machos, hembras, controles o HTG, esto nos indica un aporte por parte del complejo I, que se inhibe al adicionar este reactivo al medio de reacción.

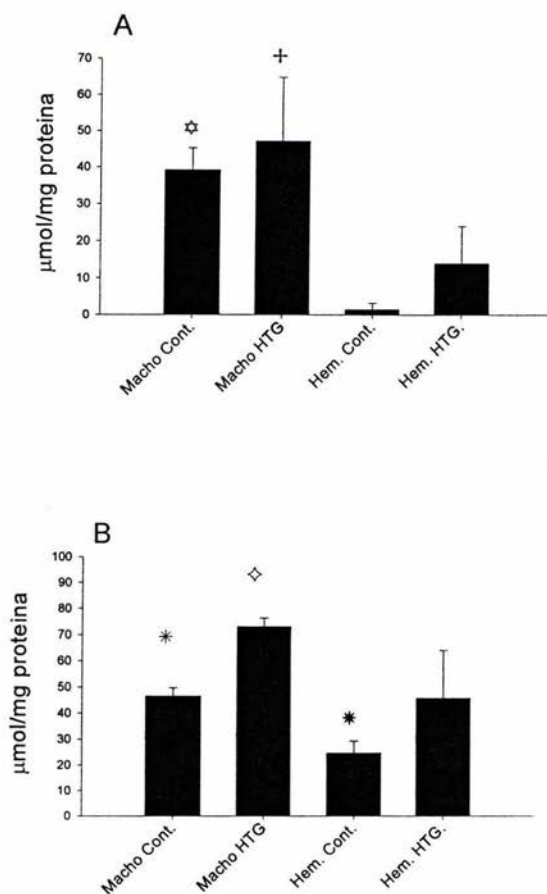
Figura 8.4. VELOCIDAD DE LIBERACIÓN DE H₂O₂



(⊛ P < 0.001 macho control vs hembra control; ⊕ P < 0.05 macho HTG vs hembra HTG; + P < 0.005 hembra control vs hembra HTG, n= 4 en los cuatro grupos); (* P < 0.05 macho control vs macho HTG; * P < 0.0005 macho control vs hembra control; ◇ P < 0.01 macho HTG vs hembra HTG)

Se muestra la velocidad con que se libera el peróxido de hidrógeno en presencia de rotenona (gráfica A). Se aprecia que la velocidad de liberación es mayor en mitocondrias de ratas machos que en el caso de las hembras, aunque también en cuanto a las HTG con respecto a controles sólo entre los grupos de las hembras; cuando el experimento se realiza sin adición de rotenona (gráfica B) las diferencias son importantes entre los cuatro grupos, pero se observa el incremento de la velocidad de liberación a partir de mitocondrias de hembras a diferencia de cuando se adiciona rotenona.

Figura 8.5. CANTIDAD TOTAL DE H₂O₂ LIBERADA.



(☆ P < 0.01 macho control vs hembra control; + P < 0.01 macho HTG vs hembra HTG n=4 para los cuatro grupos); (* P < 0.0001 macho control vs macho HTG; * P < 0.001 macho control vs hembra control; ◇ P < 0.05 macho HTG vs hembra HTG).

La figura nos muestra la cantidad de peróxido de hidrógeno liberada por las mitocondrias de los diferentes grupos en presencia de rotenona (gráfica A), donde se puede apreciar que los machos liberan una cantidad mucho mayor que las hembras tanto HTG como controles; y sin rotenona (gráfica B), en cuyo caso los machos siguen liberando mayores cantidades de la especie oxidante, aunque esta vez la diferencia entre macho control y HTG también es significativa. Cabe añadir que si se compara la gráfica A vs B, se encontrará que en los cuatro casos existe una mayor liberación cuando no se utilizó rotenona (sin inhibición del complejo I).

Con respecto a los niveles de antioxidantes cuantificados en mitocondrias de estos animales (Tabla 8.3), podemos decir que el α -tocoferol se encuentra disminuido en los machos que consumieron sacarosa comparados con los controles, lo cual no ocurre entre los respectivos grupos de hembras, donde la concentración de este antioxidante no presentó diferencia entre los animales controles y HTG. En el caso del GSH, el análisis muestra que prácticamente se encuentra en las mismas concentraciones en los cuatro grupos, sin ser influido por alguna de las variables ya sea género o consumo de sacarosa. En el caso de la CoQ₉ reducida sí aparece diferencia con respecto al género, pero no con una significancia estadística, en cambio al comparar entre grupos del mismo género, no existe tal diferencia, lo que indica que el consumo de sacarosa no afecta la cantidad de la coenzima presente en las mitocondrias, lo mismo que ocurre con el GSH.

Tabla 8.3. ANTIOXIDANTES EN MITOCONDRIAS DE HÍGADO.
(nmol/mg proteína)

	MACHOS		HEMBRAS	
	CONTROL	HTG	CONTROL	HTG
GSH	2.694 ± 0.48	2.318 ± 0.37	2.548 ± 0.78	2.318 ± 0.44
Vitamina E	0.75 ± 0.17	0.32 ± 0.03 ☆★	0.71 ± 0.14	0.64 ± 0.09
CoQ ₉ Reducida	5.08 ± 1.8	5.71 ± 1.0	6.75 ± 2.4	7.42 ± 0.9

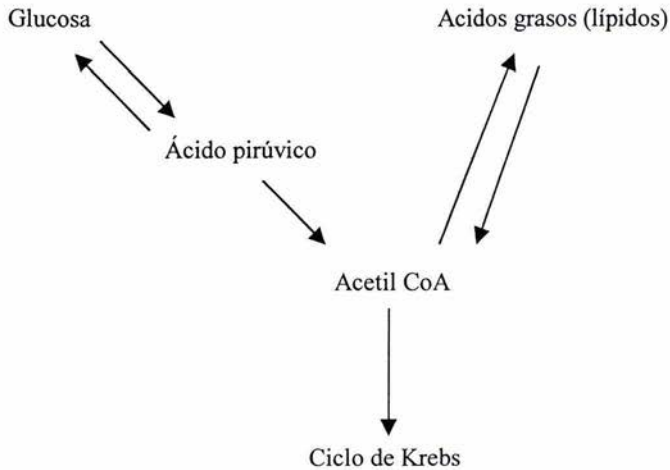
(★ P < 0.001 macho control vs macho HTG; ☆ P < 0.001 macho HTG vs hembra HTG, n=6)

La tabla muestra las concentraciones de antioxidantes presentes en muestras de mitocondrias de ratas. Se encuentran diferencias significativas en el caso de vitamina E. en cuyo caso los machos control y las hembras HTG presentan una mayor concentración que los machos HTG. Estas diferencias no se presentan en el caso del GSH ni CoQ₉ reducida. Las determinaciones se hicieron por medio de HPLC. (para más detalles ver sección de Métodos).

9. DISCUSIÓN.

El efecto del alto consumo de sacarosa sobre la presión arterial es notable tanto en machos como en hembras. Las posibles causas de este efecto han sido estudiadas ya en este laboratorio y se ha encontrado que existe una menor respuesta a vasorelajación inducida por vasodilatadores, lo cual puede indicarnos la presencia de daño endotelial⁴⁹.

El hecho de que los triglicéridos se encuentren elevados en los animales que recibieron sacarosa se puede explicar basándonos en la relación que existe entre la glucólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs). Puesto que la mayor cantidad de energía que requiere la célula para llevar a cabo sus funciones proviene de este último, existe un mecanismo que regula el flujo de carbono desde la glucólisis hasta el ciclo de Krebs cuando se presenta un exceso de carbohidratos. El ácido pirúvico producido en la glucólisis es convertido a acetil coenzima A (acetil CoA) por intermedio de la piruvato deshidrogenasa, y de esta forma se puede exportar a la mitocondria hacia el ciclo de Krebs.



Estos procesos son regulados por las proporciones ATP/ADP, NADH/NAD⁺, acetil CoA/CoA y succinil CoA/CoA. Si las proporciones de estos diferentes pares son altas (10:1, por ejemplo), las células están entonces “cargadas” de compuestos de alta energía.

Una forma en la que estas especies regulan el flujo de carbono antes mencionado es participando en la reacción en cuestión, por ejemplo, en algunas reacciones en el ciclo de

Krebs es indispensable contar con NAD^+ . Si no hay NAD^+ disponible se detiene este ciclo y el flujo de carbono (en forma de Acetil CoA) es desviado a la formación de ácidos grasos⁶⁶². Estos ácidos grasos en exceso son exportados al citosol donde se unen a glicerol para formar triglicéridos, son liberados a la circulación en forma de lipoproteínas y finalmente son acumulados en el tejido adiposo, este efecto lo podemos apreciar en el aumento de grasa intraabdominal de nuestros animales.

La acumulación de grasa intraabdominal en las ratas HTG induce un estrés oxidativo que anteriormente se determinó por la cuantificación de un producto de degradación de ácidos grasos insaturados⁵¹, el malondialdehído (MDA) que es el producto final de una cadena de reacciones que inicia cuando el radical superóxido ataca las insaturaciones presentes en los ácidos grasos, ya sean libres o esterificados. En este trabajo se midió la liberación de ERO a partir de la CRM y se encontró aumentada, lo cual corrobora los resultados obtenidos con el MDA, además de que indican que dentro de las posibles fuentes celulares de radical superóxido (el sistema xantina-xantina oxidasa, NADH oxidasa, etc.), la CRM tiene un papel importante en el incremento del estrés oxidativo. También podemos apreciar basándonos en los resultados, que el complejo I participa en la generación del radical, aunque el mecanismo por el cual se forma aún no está claro.

Una diferencia que debe influir de manera importante en la mayor liberación de ERO a partir de las mitocondrias de ratas HTG es la concentración de α -tocoferol, la cual se ve disminuida. Esta diferencia en la concentración del antioxidante se explica por una disminución en el consumo de alimento sólido que se ha observado en los animales. Este factor es importante pues el α -tocoferol sólo se obtiene de fuentes endógenas y es de vital importancia en la protección de las membranas biológicas debido a su hidrofobicidad³⁶, así es que las mitocondrias que tienen menos antioxidante son más susceptibles al daño por las ERO, generadas como subproducto de la respiración mitocondrial y esto finalmente puede ser un efecto directo de la falta de aporte dietético. Sin embargo, también la sobreproducción de especies oxidantes puede ser la causa de una disminución en antioxidantes debido a que se utilizan más y por lo tanto las reservas se consumen más rápidamente.

La influencia del género sobre la resistencia a daños provocados por estrés oxidativo ya ha sido analizada en diferentes estudios²², pero los mecanismos por los que las hembras parecen ser menos susceptibles, es algo que aún no se ha aclarado. En nuestros resultados se puede apreciar que las hembras acumulan menos grasa intraabdominal, que liberan menos

ERO y que sus reservas de α -tocoferol son mayores comparadas con los machos. Estos comportamientos tan distintos nos llevan a fijar nuestra atención en las diferencias hormonales. En este laboratorio se han hecho experimentos que demuestran que los estrógenos tienen propiedades antioxidantes (no publicado), además de que es bien conocido que las hormonas influyen en una diferente distribución de la grasa en el organismo. El hecho de presentar una menor “suscceptibilidad” a desarrollar obesidad por parte de las hembras, es un mecanismo que las protege contra el estrés oxidativo que conlleva, pero es tan amplia y tan variada la influencia de los estrógenos en el organismo que resulta difícil señalar los mecanismos que sirven a las hembras para protegerse.

Existen en la literatura trabajos relacionados con estrés oxidativo que nos permiten proponer algunos mecanismos que pueden influir en el daño oxidativo encontrado en nuestro modelo animal.

- Es bien conocido que los azúcares circulantes tienden a autooxidarse, dando origen a especies reactivas de oxígeno, con lo cual se explicaría el daño vascular y la hipertensión encontrado en el modelo HTG. Aún cuando estos animales no han sido declarados diabéticos, no se ha analizado si la fructosa circulante se encuentre alta, ya que la fructosa que es ingerida por los animales en la misma proporción que la glucosa, ha sido identificada como un potente agente que disminuye la actividad enzimática⁶³ (probado con enzimas antioxidantes como catalasa y SOD) a través de una glicosilación no enzimática que altera la estructura y finalmente la actividad de dichas enzimas, por lo cual se podría dar que una menor actividad en enzimas antioxidantes genere un desbalance entre las especies antioxidantes y oxidantes que resulta en el estrés oxidativo.
- Otra posible explicación a la mayor liberación de especies oxidantes por parte de ratas HTG es la presencia de las proteínas desacoplantes (UCP), que se ha descrito suelen sobreexpresarse en casos de obesidad. A estas se les adjudica la capacidad de desacoplar la cadena respiratoria mitocondrial favoreciendo una mayor actividad de la misma sin depender de ADP^{64,65}. Se sabe que una de ellas (UCP 1) se expresa exclusivamente en el tejido adiposo café (BAT) y su función es disipar la energía en forma de calor y mantener de esta forma el organismo a una temperatura constante; por medio de este mecanismo se cree que también influye en el control de la obesidad⁶⁶. Aunque estas enzimas han creado controversia, sobre todo la UCP2, que es expresada

en varios tejidos, entre ellos en células hepáticas no parenquimales, células nerviosas y tejido muscular en ratas; esta proteína mantiene el flujo de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial hasta el sitio de la citocromo oxidasa en donde se utiliza el oxígeno como último aceptor de los mismos. De esta manera se evitaría que dichos electrones escaparan, en el ciclo Q o el complejo I o el complejo III, dando lugar a la formación de radicales libres de oxígeno y al subsecuente daño celular. Pero mientras algunos autores consideran que este desacoplamiento daña las células por un déficit de ATP⁶⁷, algunos otros le han adjudicado el papel de regulador de estrés oxidativo⁶⁸. No conocemos el mecanismo a través del cual la alteración metabólica pudiera propiciar que se disminuyera o incrementara la expresión de esta proteína en las ratas HTG, pero es un punto que bien puede ser explorado.

- Además de esto, la formación de mayores cantidades de radicales libres de oxígeno, a partir de la cadena respiratoria mitocondrial provocarían un daño a los componentes de las mitocondria, entre ellos a proteínas y DNA mitocondrial, el cual tiene una menor capacidad de reparación comparado con el DNA nuclear ya que no posee histonas y por encontrarse tan cerca del punto de origen de dichos oxidantes, es más susceptible al daño. Este DNA, aunque pequeño, codifica para algunos componentes de la cadena respiratoria mitocondrial como son varias subunidades del complejo I, de la citocromo oxidasa y de la ATP sintetasa (complejoV). Si este DNA es dañado, seguramente las proteínas para las que codifica sufrirán alteraciones y de ser el caso de las que conformen la cadena respiratoria mitocondrial, se alteraría su funcionamiento favoreciendo la generación de especies oxidantes e incrementando el daño global, aunque en este caso no podemos asegurar que así sea, pues no se midieron actividades individuales de los complejos que componen a esta cadena de transporte de electrones, ni el daño al DNA mitocondrial.

Es cierto que las diferencias referentes al género del animal son muy marcadas en algunos de los resultados mostrados con anterioridad, sin embargo, para poder asegurar que existe una influencia hormonal en el estrés oxidativo observado en los animales de experimentación, es necesario trabajar con la manipulación de las mismas, algo que se encuentra fuera del objetivo de este trabajo, pero es un tema que ya se investiga en nuestro laboratorio.

10. CONCLUSIONES.

- ◆ La ingesta alta en carbohidratos en el agua de bebida induce una mayor acumulación de grasa intraabdominal y disminuye su consumo de alimento sólido en animales de experimentación.
- ◆ El hecho de que exista una mayor acumulación de grasa, conlleva también alteraciones metabólicas tales como hipertrigliceridemia, las cuales se correlacionan con el estrés oxidativo, siendo mayor en los animales que tienen más marcadas estas alteraciones.
- ◆ Este estrés oxidativo se aprecia por una disminución en las concentraciones de antioxidantes como la vitamina E, así como por una mayor liberación de ERO a partir de la cadena respiratoria mitocondrial
- ◆ El género del animal influye en la intensidad de los cambios observados, siendo menos susceptibles las hembras, en las cuales tanto la acumulación de grasa como la liberación de peróxido es menor en comparación con los machos.
- ◆ Se pudo corroborar la participación importante del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (la deshidrogenasa de NADH) en la liberación de ERO.

11. PERSPECTIVAS.

- ◆ Analizar las actividades de cada uno de los complejos que conforman la cadena respiratoria mitocondrial para saber si alguno es particularmente afectado por el alto consumo de sacarosa.
- ◆ Cuantificar la actividad de enzimas antioxidantes tales como SOD, catalasa y peroxidasa para explorar si esta línea de defensa contra el estrés oxidativo es afectada por el tratamiento.
- ◆ Conocer el nivel de ERO generadas utilizando sustratos para el complejo I tales como glutamato y malato, con el fin de valorar el aporte de este complejo en el nivel de estrés oxidativo.
- ◆ Buscar si existe sobreexpresión de las UCP en la rata HTG y analizar el efecto de esta sobreexpresión en la liberación de ERO.
- ◆ Analizar el efecto de los ácidos grasos libres tales como araquidónico, oleico y linoleico sobre la generación de ERO a partir de la cadena respiratoria mitocondrial.

12. REFERENCIAS.

1. Steinberg D., Parthasarathy S., Khoo JL. et al. Beyond cholesterol modification of low density lipoprotein that increases its atherogenicity. *New Engl. J. Med.* 1989 320:915-924.
2. Suarna C., Dean RT., May J. et al. Human atherosclerotic plaque contains both oxidized lipids and relatively large amounts of alpha-tocopherol and ascorbate. *Artheroscler. Thromb. Vasc. Biol* (1998) 150:1616-1624.
3. Polidori MC., Frei B., Cherubini A. et al Increased plasma levels of lipid hydroperoxides in patient with ischemic stroke. *Free Rad. Biol. Med.* (1998) 25:561-567.
4. Smith LL, Review in: *Progress in sterol oxidation:1987-1995, Lipids* 1996,30,453-487.
5. Mohr, D., Stocker R., Radical mediated oxidation of isolated human very low density lipoprotein. *Arterioscler. Throm.* 1994; 14, 1186-1192.
6. Wagner JR, Motchnik PA et al. The oxidation of blood plasma and low density lipoprotein components by chemically generated singlet oxygen. *J Biol. Chem.* 1993; 268, 18502-18506.
7. Pietraforte D, Minetti M., Direct ESR detection of peroxynitrite-induced tyrosine-centred protein radicals in human blood plasma. *Biochem J.* 1997; 325 :675-84,
8. Van der Vliet A, Smith D, O’Niell CA. et al Interactions of peroxynitrite with human plasma and its constituents: oxidative damage and antioxidant depletion. *Biochem J.* 1994; 303,295-301.
9. Sevanian A., Hochstein P., Mechanism and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Ann Rev. Nutr.* 1985; 5:365-390.
10. Sprigler JE, Azbill RD, Mark RJ. et al. 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product rapidly accumulates following traumatic spinal cord injury and inhibits glutamate uptake. *J Neurochem.* 1997; 68:2469-2476,
11. Comporti M., Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab Invest.* 1985; 53: 599-623.
12. El Hafidi M, Baños G. In vivo plasma lipid oxidation in sugar-induced rat hypertriglyceridemia and hypertension. *Hypertension.* 1997;30:624-628.
13. Sugioka K., Shimosegawa Y., Nakano M. Estrogens as a natural antioxidant of membrane phospholipid peroxidation *FEBS Lett.* 1987; 1:87-95.
14. Castelli WP. Cardiovascular disease in women. *Am J Obstet Gynecol.* 1988;6:1553-1560.

15. Colditz GA, Willet WC, Stampfner MJ, et al. Menopause and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med.* 1987; 316:1105-1110.
16. Sullivan JM, van der Zwagg R, Hughes JP, et al. Estrogen replacement and coronary artery disease. *Arch Int Med.* 1990; 150: 2557-2562.
17. Stampfner MJ, Colditz GA, Willet WC et al. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease: ten year follow-up from the Nurses' Health Study. *N Engl J Med.* 1991; 325: 756-762.
18. Adams KF, Sueta CA, Gheorghiade M, et al. Gender differences in survival in advanced heart failure. Insights from the FIRST study. *Circulation* 1999; 14: 1816-1821.
19. Bikkina M, Larson M, Levy D. Prognostic implications of asymptomatic ventricular arrhythmias: The Framingham Heart Study. *Ann Intern Med.* 1992; 117: 990-996.
20. Cupples LA, Gagnon DR, Kannel WB. Long- and short-term risk of sudden coronary death. *Circulation* 1992; 85 (Suppl I): I 11- I18.
21. Lobo RA. Cardiovascular implications of estrogen replacement therapy. *Obstet Gynecol.* 1990; 75 (Suppl 4): 185-255.
22. Lacort M, Leal AM, Liza M, et al. Protective damage in vitro. *Lipids.* 1995; 30 (2): 141-146.
23. Baños G, El Hafidi M, Franco M. Oxidative stress and cardiovascular physiopathology. *Curr Topics Pharmacol.* 2000; 5: 1-17.
24. Palli D, Decarli A, Russo A, et al. Plasma levels of antioxidant vitamins and cholesterol in a large population sample in central-northern Italy. *Eur J Nutr.* 1999; 8: 290-298.
25. Moghadasian MH, Godin DV. Gender-related regional antioxidant profiles in the gastrointestinal tract of the rat. *Mol Cell Biochem.* 1996; 155: 143-149.
26. Hercberg S, Galan P, Preziosi P, et al. The SU.VI.MAX Study: a primary prevention trial using nutritional doses of antioxidant vitamins and minerals in cardiovascular diseases and cancers. *Supplementation on Vitamines et Minéraux Antioxydants.* *Int J Vitam Nutr Res.* 1998; 68 (1): 3.
27. Mooradian A., Antioxidant properties of steroids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1993: 45:509-511.
28. Lacort M., Leal AM., Liza M. et al. Protective effect of estrogens and catecholestrogens against peroxidative membrane damage in vitro. *Lipids.* 1995; 30:141-146.

29. Ayres S., Abplanalp W., Liu J.H., Subbiah MTR. Mechanism involved in the protective effect of estradiol on lipid peroxidation and DNA damage. *Am. J. Physiol.* 1998; 274: E1002-E1008.
30. Katrin Staniek, Hans Nohl. Are a mitochondria a permanent source of reactive oxygen species?. *Bioche et Biophy Acta* . 2000; 1460:268-276.
31. Davidson J, Schiestl R. Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol & Cell Biol.* 2001; 21:8483-8489.
32. McBride A, Borutaite V, Brown G. Superoxide dismutase and hydrogen peroxide cause rapid nitric oxide breakdown, peroxynitrite production and subsequent cell death. *Bioch et Biophy Acta.* 1999; 1454:275-288.
33. Peña-Garza Enrique et al. *Gaceta Médica Mexicana*. Vol. 132, No.2, 183-203.
34. ChengFeng Yang, Han Ming Shen, Choon Nam Ong. Intracellular thiol depletion causes mitochondrial permeability transition in Ebselen-Induced apoptosis. *Archives Bioch. Biophy.* 2000; 380:319-330.
35. Schafer F, Buettner G. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Rad. Biol. Med.* 2001; 30:1191-1212.
36. Ching K. Chow, Wissam Ibrahim, Zhihuawel and Alvin C. Chan. Vitamin E regulates mitochondrial hydrogen peroxide generation. *Free Rad. Biol. Med.* 1999; 27:580-587.
37. George H. Siao, Che, Ming Teng, et al. Cinnamophilin as a novel antiperoxidative cytoprotectant and free radical scavenger. *Bioch. Et Biophy Acta.* 2001; 1525:77-88.
38. Burczynski J, Southard S, et al. Changes in mitochondrial and microsomal lipid peroxidation and fatty acid profiles in adrenal glands, testes and livers from α -tocopherol-deficient rats. *Free Rad. Biol. Med.* 2001; 30:1029-1035.
39. Motchnik P, Frei B, Ames B. Measurement of antioxidants in human blood plasma. *Meth. Enzym.* 1994; 234:269-279.
40. Boveris A, Cardenas E, Stoppani A. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. Journal.* 1976; 156:435-444.
41. Castilho R, Kowaltowski A, Meinicke A, Vercesi A. Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(II), citrate or t-Butyl hydroperoxide in the presence of Ca²⁺: effect of coenzyme Q redox state. *Free Rad. Biol. Med.* 1995; 18:55-59.

42. Kowaltowski A, Castilho R, Vercesi A. Ca²⁺-induced mitochondrial membrane permeabilization: role of coenzyme Q redox state. *Am. J. Phy.* 1995; 269:C141-C147.
43. Schnurr K, Hellwing M, Seidemann B, et al. Oxygenation of biomembranes by mammalian lipoxygenases: the role of ubiquinone. *Free Rad. Biol. Med.* 1996; 20:11-21.
44. Nicholls D. G. *Bioenergética: Introducción a la teoría quimiosmótica*. Editorial Reverté S.A. Barcelona, 1987. Pp. 71-135.
45. Budd S, Castilho R, Nicholls D. Mitochondrial membrane potential and hydroethidine-monitored superoxide generation in cultured cerebellar granule cells. *FEBS Letters.* 1997; 415:21-24.
46. Rembish J, Trush A. Further evidence that lucigenin-derived chemiluminescence monitors mitochondrial superoxide generation in rat alveolar macrophages. *Free Rad. Biol. Med.* 1994; 17:117-126.
47. Hampel S, Buettner G, Wessels O, Flaherty. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-Dichlorodihydro fluorescein diacetate, 5 (and 6)-Carboxy-2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate and dihydrorhodamine 123. *Free Rad. Biol. Med.* 1999; 27:146-159.
48. Reaven G, Ho H. Sugar-induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *Am J Hypertens.* 1991; 4:610-614.
49. Baños G, Carvajal K, Cardoso G et al. Vascular reactivity and effect of serum in a rat model of hypertriglyceridemia and hypertension. *Am J Hypertens.* 1997; 10: 379-388.
50. Nava P, Guarner V, Posadas R, Pérez I, Baños G. Insulin-induced endothelin release and vasoreactivity in hypertriglyceridemic and hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1999; 277: H399-H404.
51. El Hafidi M., Baños G. In vivo plasma lipid oxidation in sugar-induced rat hypertriglyceridemia and hypertension. *Hypertension.* 1997;30:624-628.
52. Pérez I, El Hafidi M, Sánchez C, Baños G. Effect of sugar-induced hypertension in rats on the pattern of serum arachidonic, dihomo-gamma-linoleic and linoleic acids. *Med Sci Res.* 1999; 27: 847-848.
53. El Hafidi M, Valdez R, Baños G. Possible relationship between altered fatty acid composition of serum, platelets and aorta, and hypertension induced by sugar feeding in rats. *Clin Exp Hypertens.* 2000; 22(1): 99-108.

54. Chávez E, Téllez F, Pichardo J, et al. On the protection by the analgesic ketorolac of reperfusion-induced heart damage. *Comp Biochem Physiol.* 1996; 115C: 95-100.
55. Carvajal K. Estudio de la función cardiovascular en un modelo experimental de hipertrigliceridemia e hipertensión en rata. Tesis de Maestría en Biología Experimental. UAM-I, 1997.
56. Carvajal K, El Hafidi M, Baños G. Myocardial damage due to ischemia and reperfusion in hypertriglyceridemic and hypertensive rats: participation of free radicals and calcium overload. *J Hypertens.* 1999; 17: 1607-1616.
57. H Lowry, N J Rosebrough, A Farr, R J Randall. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1951)265-275.
58. Cocco Tiziana, Di Paola Marco, Papa Sergio, Lorusso Michele. Arachidonic acid interaction with the mitochondrial electron transport chain promotes reactive oxygen species generation. *Free Radic. Biol. Med.* (1999) Vol 27:51-59.
59. Lass Achim, Agarwal Sanjiv, Sohals Rajindar. Mitochondrial Ubiquinone Homologues, Superoxide Radical generation and Longevity in Different Mammalian Species. *J Biol. Chem.* (1997); 272:19199-19204.
60. Tang H Peter, Miles V Michael, DeGrauw Antonius. HPLC Analysis of Reduced and Oxidized Coenzyme Q10 in Human Plasma. *Clinical Chem.* (2002); 47:256-265.
61. Junqueira V, Carrasquedo F, Azzalis L. Content of Liver and Brain Ubiquinol-9 and Ubiquinol -10 after Chronic Ethanol Intake in Rats Subjected to Two Levels of Dietary Tocopherol. *Free Rad. Res.* (2000); 33:313-319.
62. St-Pierre, Buckingham J, Roebuck S. Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *J. Biol. Chem.* (2002); 47:44787-44790.
63. Wei Zhao, Devamanoharan P, Varma S. Fructose Induced Deactivation of Antioxidant Enzymes: Preventive Effect of Pyruvate. *Free Rad. Res.* (2000); 33:23-30.
64. Schrauwen P, Hesselink M. UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism. *Exp. Biol. J.* (2002); 205:2275-2285.
65. Boss O, Muzzin P, Giacobino JP. The uncoupling proteins, a review. *European J. Of Endocrinology.* (1998); 139:1-9.

66. Vidal-Puig A, Rosenbaum M, Considine R. Effects of Obesity and Stable Weight Reduction on UCP2 and UCP3 Gene Expression in Humans. *Obes. Res.* (1999); 7:133-140.
67. Yang S, Zhu H, Li H, Gabrielson K. Mitochondrial Adaptations to obesity-Related Oxidant Stress. *Biochem. Biophys. A.* (2000); 378:259-268.
68. Negre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G. A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *The FASEB J.* (1997); 11: 809-815.