



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Efecto de la reducción en catalasa en el
peso corporal y los niveles de glucosa
en sangre de ratones alimentados con
una dieta rica en grasas**

TESIS

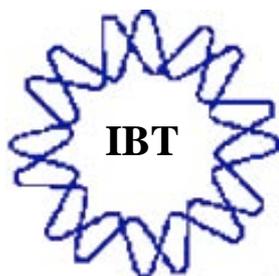
que para obtener el grado académico de

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

José Raúl Pérez Estrada

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles



CUERNAVACA, MOR. 2010



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.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Al Instituto de Biotecnología

A la unidad del Bioterio del Instituto de Biotecnología

A la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología

A la Unidad de Docencia del Instituto de Biotecnología

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

A la dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)

Al proyecto de Investigación SEP-CONACyT 50956-Q

Agradecimientos

Al Dr. Luis Covarrubias por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su paciencia, enseñanzas y proporcionarme siempre su apoyo en el trabajo del laboratorio.

A la Dra. Patricia Joseph y el Dr. Mauricio Díaz, por su disposición para dar comentarios y sugerencias que mejoraron el trabajo.

A los Drs Susana Castro y Christopher Wood por sus comentarios y apoyo.

A Concepción Valencia, por enseñarme varias de las técnicas utilizadas en este trabajo, por su apoyo y su atención.

A todos los Miembros del laboratorio del Dr. Luis Covarrubias, por su apoyo y hacer mi estancia en el laboratorio más placentera.

A los miembros del Laboratorio de Dr. Mauricio Díaz, por enseñarme algunas técnicas utilizaras en este proyecto y por hacer aún más grata mi estancia en su laboratorio.

A mis padres, Silvia y Marcelino. Por estar toda la vida junto a mi, apoyándome y siempre alentándome a cumplir mis metas; por darme la vida y toda mi educación.

A mis hermanos Isabel, Victor y Raquel. Por ser siempre un apoyo en mi vida, por todo su cariño y amor.

A mis amigos de toda la vida: Pedro, Tania, Benly, Huri, Nora, Yan, Marisol, Abraham, Alejandro, Cesar, Josué, Pancho y Lizzet. Por estar siempre junto a mi, por apoyarme y hacer de mi vida una gran aventura.

A mis nuevos amigos de toda la vida: Gaby, Gilda, Ramces, Everardo, Jazmín y Victor. Por su apoyo, amistad, y por hacer de mi estancia en Cuernavaca algo mucho más divertido.

A mis maestros de siempre, a los Drs Irasema Anaya, Lorena Rodríguez y José Luis Muñoz, por ponerme en este camino y confiar en mí.

A todos aquellos que no he mencionado pero que han contribuido a este trabajo, gracias.

Para:

Isabel, Victor y Raquel

ÍNDICE

<u>ABREVIATURAS</u>	<u>7</u>
<u>RESUMEN.....</u>	<u>8</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>9</u>
<u>I INTRODUCCIÓN.....</u>	<u>10</u>
I.1 PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO	10
I.2 SISTEMAS ANTIOXIDANTES	14
I.3 ESTRÉS OXIDATIVO, LA TEORÍA DEL ENVEJECIMIENTO Y ENFERMEDADES CRÓNICO DEGENERATIVAS.	18
I.4 FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	20
<u>II ANTECEDENTES.....</u>	<u>23</u>
II.1 LA CATALASA Y ESTRÉS OXIDATIVO	23
II.2 OBESIDAD Y ESTRÉS OXIDATIVO	25
<u>III HIPÓTESIS.....</u>	<u>28</u>
<u>IV OBJETIVOS</u>	<u>28</u>
<u>V RESULTADOS</u>	<u>29</u>
V.1 CRUZAS Y DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO.....	29
V.2 EFECTO PROOXIDANTE EN RATONES CAS ^{-/-} ALIMENTADOS CON UNA DIETA ALTA EN GRASA	30
V.3 OBESIDAD Y CONSUMO DE ALIMENTO DE LOS RATONES CAS POR EFECTO DE LA DIETA.	36
V.4 ACUMULACIÓN DE GRASA CORPORAL E HISTOLOGÍA DE LOS RATONES CAS ^{-/-} ALIMENTADOS CON UNA DIETA ALTA EN GRASA	47
V.5 EFECTO DE LA DIETA EN LA GLUCEMIA DE LOS RATONES CAS.	52
<u>VI DISCUSIÓN.....</u>	<u>57</u>
<u>VII CONCLUSIONES</u>	<u>68</u>
<u>VIII PERSPECTIVAS.....</u>	<u>69</u>
<u>IX MATERIALES Y MÉTODOS</u>	<u>71</u>
IX.1 OBTENCIÓN DE LOS RATONES MUTANTES DE CATALASA DE LOS DIFERENTES GENOTIPOS	71

IX.2	DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO	71
IX.3	DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO POR DESCOMPOSICIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.....	72
IX.4	DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA DNA POLIMERASA (PCR)	72
IX.5	EXTRACCIÓN DEL DNA GEONÓMICO PARA LA REACCIÓN DE PCR	73
IX.6	REACCIÓN DE PCR.....	74
IX.7	ALIMENTACIÓN DE LOS RATONES CON DIETA ALTA EN GRASA	75
IX.8	PRUEBA DE TOLERANCIA A GLUCOSA	75
IX.9	SACRIFICIO DE LOS RATONES.....	76
IX.10	DETERMINACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO EN LOS TEJIDOS DE RATÓN	76
IX.10.1	HOMOGENIZADO DE TEJIDOS	76
IX.10.2	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE LOWRY.....	76
IX.10.3	DETERMINACIÓN DE DIENOS CONJUGADOS.....	77
IX.10.4	DETERMINACIÓN DE LIPOPEROXIDACIÓN POR EL MÉTODO DE TBARS.....	78
IX.11	INCLUSIÓN EN PARAFINA Y CORTES HITOLÓGICOS	78
IX.12	TINCIÓN DE EOSINA-HEMATOXILINA	79
IX.13	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	80
X	<u>ANEXOS.....</u>	<u>81</u>
X.1	REACTIVOS PARA DETERMINACIÓN DE DIENOS CONJUGADOS	81
X.2	REACTIVOS PARA TBARS.....	81
XI	<u>REFERENCIAS.....</u>	<u>83</u>

Abreviaturas

Akt	Proteína cinasa B
CR	Restricción calórica
DC	Dienos conjugados
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GLUT4	Transportador de glucosa 4
Gpx	Glutación peroxidasa
Grx	Glutarredoxina
GSH	Glutación reducido
GSK3	Glucógeno sintetasa cinasa
GSSH	Glutación oxidado
HFD	Dieta alta en grasa
IL-6	Interlucina 6
IR	Receptor de insulina
IRS	Sustrato del receptor de insulina
NAC	N-acetil cisteína
PAI-1	Pasminogen activator inhbitor-1
PCR	Reacción en cadena de la DNA polimerasa
PDK1	Cinasa dependiente de fosfoinosítidos
PEPCK	Fosfoenol piruvato carboxi cinasa
PI3K	Fosfatidil inositol-3 cinasa
PIP3	Fosfatidil inositol trifosfato
PKB	Proteína cinasa B
PPARs	Activadores de proliferación peroxisomal
PPAR α	Activador de proliferación peroxisomal alfa
PPAR γ	Activador de proliferación peroxisomal gama
PPREs	Elementos de respuesta a activadores de proliferación peroxisomal
Prx	Peroxirredoxina
PTP1B	Fosfatasa de tirosinas B
SOD	Superóxido dismutasa
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TrxR	Teorreductasa
Txr	Teorredoxina
VLCAD	Acetil-CoA deshidrogenasa de ácidos grasos de cadena larga
VLFA	Ácidos grasos de cadena larga

Resumen

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son compuestos reactivos que se producen como subproductos del metabolismo aerobio y por la actividad catalítica de algunas enzimas, como las oxidasas. Sin embargo, cuando hay incremento de ERO por arriba de los basales, debido a una mayor producción o una menor eliminación por parte de los sistemas antioxidantes, se genera lo que se conoce como estrés oxidativo, el cual se puede detectar por el daño que causa en las macromoléculas como lípidos, proteínas y DNA. Se ha propuesto que el estrés oxidativo contribuye al envejecimiento y es un posible agente causante de enfermedades crónico-degenerativas como la enfermedad de Alzheimer y la de Parkinson, y otras como la diabetes tipo II y la obesidad. La catalasa es una enzima antioxidante que se encarga de eliminar las ERO producidas por la β oxidación de ácidos grasos en los peroxisomas. Por lo que consideramos que un aumento en la oxidación de las grasas provocado por la alimentación con una dieta alta en grasas (HDF) sería capaz de generar mayor daño oxidativo en ratones que carecen de la catalasa ($Cas^{-/-}$). Se encontró que la alimentación con HFD no provoca un aumento en el daño oxidativo en lípidos del hígado y cerebro de los ratones $Cas^{-/-}$. Los resultados sugieren que la actividad de la catalasa pudiera estar compensada por otras enzimas antioxidantes o que bajo estas condiciones esta enzima no sea determinante para contender con las ERO generadas en células de los órganos probados. Sin embargo, se encontró que los ratones $Cas^{-/-}$ alimentados con la HFD no desarrollan intolerancia a glucosa e hiperglucemia como sucede normalmente en los ratones silvestres y, además, se observó menor grado de esteatosis hepática en los ratones $Cas^{-/-}$ obesos que en los silvestres. Estos cambios no se asocian a diferencias en el grado de obesidad o consumo de alimento entre los ratones $Cas^{-/-}$ y silvestres, ya que la ganancia de peso corporal y el consumo de HFD es similar en ambos grupos. Los resultados indican que la falta de la catalasa evita la hiperglucemia e intolerancia a glucosa que típicamente se observa en la obesidad, efecto que pudiera ser mediado por un aumento en las ERO producidas en los ratones $Cas^{-/-}$.

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) are reactive compounds produced as intermediates by aerobic metabolism and by enzymes like oxidases. However, when increase ROS production or decrease their degradation by the antioxidants enzymes the oxidative stress is produced. Oxidative stress can be detected by increase in oxidative damage in macromolecules like lipids, proteins and DNA. It has been proposed that oxidative stress is causal of aging and can be contributed to development of chronic degenerative diseases like Alzheimer and Parkinson, and others like type II diabetes and obesity. Catalase is and antioxidant enzyme that removes the ROS that are produced by fatty acids β -oxidation in the peroxisomes. We propose that in knockout mice of catalase (*Cas*^{-/-}) fed with high fat diet (HFD) are increase of fatty acids oxidation and increase of oxidative stress. We found that HFD did not promoted increase in the oxidative damage of lipids from liver and brain. These data suggests that the activity of catalase can be compensatory by others antioxidants enzymes or that in this conditions the catalase is not necessary to removes the ROS produced in this organs. However, we found that in *Cas*^{-/-} mice fed with HFD are not glucose intolerant and hyperglycemic as occurs in wild type mice. Furthermore, we observed less liver esteatosis in obese *Cas*^{-/-} mice in comparison with wild type mice. The changes are not associated with different feeding behavior or body weight gain, because food intake and body weight were similarities in *Cas*^{-/-} and wild type mice. Taken together, these data suggest that the effect protected in mice lacking catalase from HFD induced glucose intolerance and hyperglycemic can be by increase ROS production in *Cas*^{-/-} mice.

I Introducción

La atmosfera de la tierra era anaerobia hasta que evolucionaron microorganismos capaces de llevar a cabo la fotosíntesis, proceso que tuvo como consecuencia la acumulación de oxígeno (O_2) producido por la ruptura del agua (H_2O). El aumento en la concentración de O_2 de la atmosfera permitió que se diera un cambio en la presión de selección sobre la vida, efecto que permitió la evolución de organismos capaces de utilizar a este elemento para oxidar compuestos de alta energía y obtener mayor cantidad de energía. Sin embargo, la utilización de O_2 como sustrato en la producción de energía acarrea ciertos riesgos para las células, ya que durante la transferencia de electrones que tiene lugar para este fin, se forman compuestos parcialmente reducidos del O_2 conocidos como especies reactivas de oxígeno (ERO), estos compuestos resultan tóxicos para las células debido a que su alta reactividad les confiere la capacidad de oxidar, entre otros compuestos, lípidos, proteínas y DNA. Para contender con los efectos tóxicos de los ERO, los organismos han evolucionado sistemas antioxidantes que les permiten metabolizarlos. Sin embargo, cuando existe un desbalance entre la actividad pro-oxidante y antioxidante, es decir, cuando hay sobre-producción de ERO o cuando los sistemas antioxidantes, por alguna razón están atenuados, se produce lo que se conoce como estrés oxidativo, que podría ser responsable, en parte, del desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas en humanos. A pesar de lo anterior, en la actualidad se sabe que las ERO podrían tener funciones importantes como segundos mensajeros en la fisiología de la mayoría de los organismos.

1.1 Producción de especies reactivas de oxígeno

Las ERO son moléculas altamente reactivas derivadas del O_2 ; se producen en todos los organismos aerobios como subproductos del metabolismo y como parte de la actividad catalítica de algunas enzimas.

La reducción parcial del O_2 es lo que produce las ERO, las principales son tres: anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) (Figura 1). El H_2O_2 se descompone fácilmente en presencia de metales de transición, como el hierro, produciendo el más reactivo y

dañino de las ERO, el radical hidroxilo (OH^\bullet). A la reacción que involucra hierro como metal de transición se le conoce como de Fenton (Figura 2). Por su parte el $O_2^{\bullet-}$ puede reducir ciertos quelatos férricos interviniendo en la reacción de formación de OH^\bullet (Figura 2). La reacción condensada entre $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 se conoce como reacción de Haber-Weiss (Figura 3) (Cheeseman and Slater, 1993; Halliwell et al., 1992).

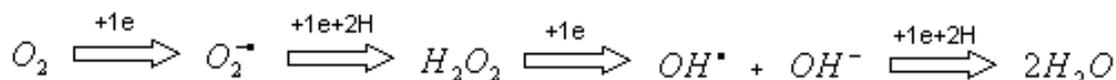


Figura 1 Los cuatro pasos de la reducción del oxígeno molecular a agua con la generación de tres especies reactivas de oxígeno (ERO)



Figura 2 Reacción de Fenton que involucra la presencia de sales ferrosas en la producción del radical hidroxilo.



Figura 3 Reacción de Haber-Weiss catalizada por hierro para la producción del radical hidroxilo.

Debido a que en la mitocondria tienen lugar una gran cantidad de reacciones enzimáticas que involucran la transferencia de electrones, este organelo es la principal fuente de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 en la célula. La producción de $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial ocurre en dos puntos de la cadena de transporte de electrones; en el complejo I (NADH deshidrogenasa) y en el complejo III (ubiquinona-citocromo c oxido-reductasa). Bajo condiciones normales, el complejo III es el principal centro de producción de ERO. Los electrones de las deshidrogenasas de los complejos I y II son transferidos a la coenzima Q, produciéndose la reducción de la coenzima (QH_2) que subsecuentemente sufre dos reducciones consecutivas de un electrón (Figura 4); usando las formas oxidada y reducida de los citocromos b y c, se forma un radical de la coenzima Q ($Q^{\bullet-}$) que es inestable y lleva a la producción de $O_2^{\bullet-}$ por la

transferencia de electrones directamente al O_2 . El $O_2^{\bullet -}$ producido es rápidamente convertido en H_2O_2 por acción de la superóxido dismutasa y posteriormente reducido a agua y oxígeno principalmente por la acción de la glutatión peroxidasa (Halliwell et al., 1992). Se ha estimado que del 0.12-2% del total de oxígeno que consume la mitocondria produce ERO (Hamanaka and Chandel 2009)

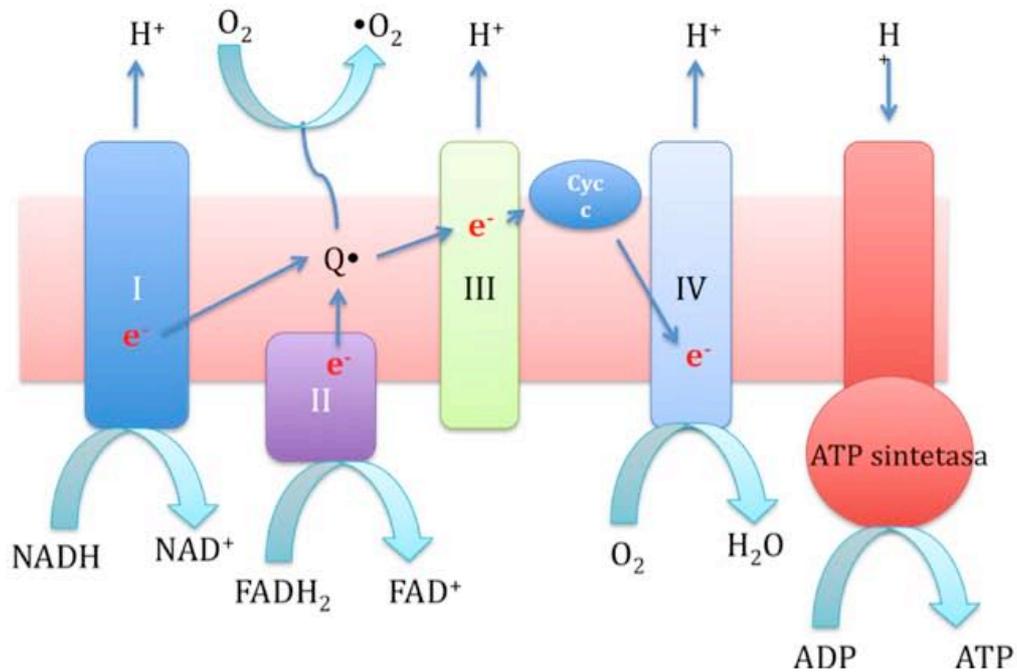


Figura 4 Generación de ROS en la cadena de transporte de electrones en la mitocondria.

A pesar de que se ha identificado a la mitocondria como la principal fuente de ERO, los peroxisomas son organelos en los que también se producen cantidades considerables de ERO. Estos organelos están involucrados en la α -oxidación de ácidos grasos, β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga (VLFA), catabolismo de purinas y síntesis de glicerolípidos y sales biliares (Wanders et al. 2010). Se estima que los peroxisomas utilizan el 20% del O_2 que consume la célula y produce el 35% del H_2O_2 total (Boveris et al., 1972).

Las ERO en los peroxisomas se producen por la actividad de oxidasas, entre las cuales se encuentran acetil-CoA oxidasa, urato oxidasa y xantina oxidasa. Estas enzimas usan oxígeno molecular para la oxidación de sus

sustratos produciendo H_2O_2 el cual se descompone en oxígeno y agua por acción de enzimas antioxidantes presentes en este organelo. De las enzimas antioxidantes que se encuentran en los peroxisomas, la más abundantemente es la catalasa, aunque también se han encontrado glutatión peroxidas, peroxirredoxinas, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa y radical libre ascorbato reductasa (Figura 5) (Bonekamp et al., 2009).

Un grupo de enzimas que producen ERO son la familia de proteínas NOX. Las NOX son un grupo de enzimas NADPH oxidasas que transfieren electrones del NADPH ó, en algunos casos, del NADH, a través de una membrana a un aceptor final que en la mayoría de los casos es el O_2 . Esta actividad produce $O_2^{\cdot -}$. Inicialmente la actividad de las NADPH oxidasas se identificó durante la fagocitosis, debido a que en este proceso los macrófagos y neutrófilos producen grandes cantidades de ERO que se originan por acción de estas enzimas. A la fecha, se han descrito 7 subunidades catalíticas de la familia de NADPH oxidasas en mamíferos, que están codificadas en los genes Nox1-5 y Duox1-2. Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en todos los tejidos, así como dentro de las células, por lo que se ha encontrado que no solo son importantes en la fagocitosis, si no que además participan en una gran variedad de procesos fisiológicos, entre los que se incluyen: actividad antiinflamatoria, regulación de la crecimiento celular y la muerte celular (Bedard and Krause, 2007).

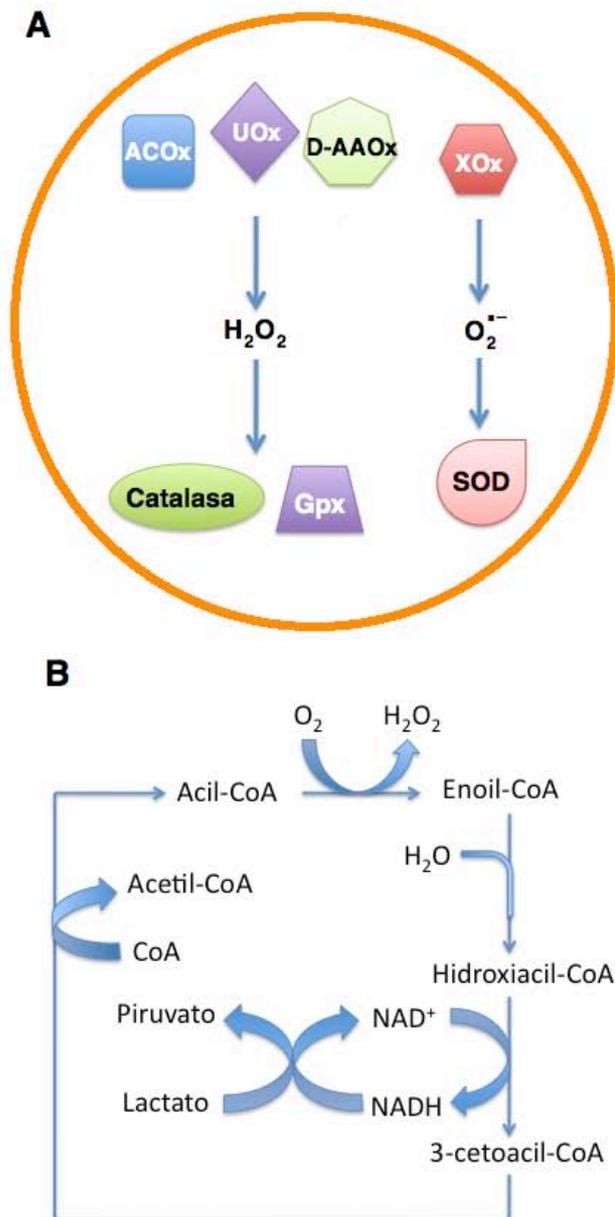


Figura 5 Producción de ERO en los peroxisomas. A, enzimas pro-oxidantes y antioxidantes presentes en los peroxisomas. B, β - oxidación de ácidos grasos de cadena larga en los peroxisomas que produce H_2O_2 directamente a partir de O_2 por la actividad de las acil oxidasas. ACOx, Acetil-CoA oxidasas; UOx, Urato oxidasas; D-AAOx, D-aminácido oxidasas; Xox, xantina oxidasas; Gpx, Glutación peroxidasa; SOD, superóxido bismutasa.

1.2 Sistemas antioxidantes

La utilización de O_2 en la producción de energía provocó que los organismos evolucionaran sistemas antioxidantes que le permitieran metabolizar las ERO generadas. Estos sistemas incluyen enzimas y moléculas antioxidantes. Entre las enzimas que depuran ERO se encuentran las superóxido dismutasas (SOD) que dismutan el $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 ; las glutación peroxidasas (Gpx), las catalasas, la ascorbato peroxidasa y las peroxiredoxinas que convierten el H_2O_2 a agua y O_2 .

En mamíferos se han identificado tres SOD, codificadas en los genes Sod1-3. Las tres isoformas se expresan en la mayoría de los órganos y tejidos, aunque cada una está localizada en compartimentos específicos en la célula. La SOD1 ó CuZn-SOD, que fue la primera enzima antioxidante en ser caracterizada, es un homodímero que contiene cobre y zinc como grupos prostéticos y se encuentra localizada mayoritariamente en el citoplasma. La SOD2 ó Mn-SOD, es un tetrámero que tiene como grupo prostético manganeso y se encuentra exclusivamente en el espacio intermembranal de la mitocondria. La SOD3 ó EC-SOD, es un tetrámero que, al igual que la SOD1, tiene zinc y cobre en su sitio activo. Esta enzima tiene un péptido señal que hace que se encuentre exclusivamente en el espacio extracelular (Maier and Chan, 2002).

Por su parte, las Gpx, son un grupo de selenio-proteínas que están encargadas de reducir los peróxidos generados por ERO utilizando glutatión (GHS) como donador de electrones. En mamíferos, las Gpx mejor caracterizadas son las Gpx1-5. La Gpx1 es la más abundante de todas, se expresa de manera ubicua y se localiza en el citoplasma. La Gpx2 se ha encontrado básicamente expresada en el tracto digestivo, aunque durante el desarrollo su distribución podría ser distinta. La Gpx3 se encuentra en el plasma, por su parte, la Gpx4 es la única que actúa como monómero, se encuentra asociada a proteínas de membrana y es la única que es capaz de reducir los lipoperóxidos que se forman en la membrana celular (Brigelius-Flohe, 1999). La Gpx5 parece ser una enzima que en mamíferos solo se expresa en el epidídimo y su función podría ser la de proteger a los espermatozoides del daño oxidativo (Chabory et al. 2010; Rejraji et al., 2002).

La catalasa consta de cuatro subunidades idénticas, cada una de las cuales contienen un grupo hemo cuya actividad se encarga de descomponer el peroxido de hidrogeno en agua y oxígeno. En el ratón, esta enzima expresa prácticamente en todo el embrión durante las primeras etapas de gestación y conforme avanza en el desarrollo se limita al hígado, pulmón, riñón, sangre, cerebro y músculo esquelético (Hernandez, 2009). En la célula se encuentra localizada principalmente en los peroxisomas y, a

diferencia de otros organismos eucariontes como plantas y hongos, en mamíferos solo hay una catalasa.

Las peroxirredoxinas (Pxr) son enzimas encargadas de metabolizar el H_2O_2 y algunos hidroperóxidos orgánicos. En mamíferos se han identificado las Pxr1-6 (Hofmann et al., 2002). En el caso de las Pxr1-5 utilizan tiorredoxina como donador de electrones y solo la Pxr6 además de la tiorredoxina es capaz de usar glutatión como fuente de electrones (Wood et al., 2003). Las peroxirredoxinas se expresan prácticamente de forma ubicua. En la célula, las Prx1 y 5 se han encontrado en citoplasma, núcleo y peroxisomas. La Prx2 se ha encontrado tanto en el núcleo como en citoplasma, la Prx4 en citoplasma y lisosomas, la Prx3 en mitocondrias y la Prx6 básicamente en citoplasma. Interesantemente la actividad de las peroxirredoxinas se regula por modificaciones pos traduccionales, como es el caso de las Prx1-5 en las que la fosforilación de un residuo de tirosina inhibe su actividad (Kalinina et al., 2008).

El glutatión, tiorredoxinas y glutarredoxinas, son antioxidantes no enzimáticos que tienen un papel esencial en el mantenimiento del estado redox de la célula debido a que son importantes donadores de electrones (Kalinina et al., 2008). El glutatión (GSS) es un tripéptido (γ -glutamil-cistein-glicina) que protege a la célula de las ERO removiéndolas por una vía no enzimática y además mediante la actividad de Gpx. Ambas reacciones producen glutatión oxidado (GSSH) el cual es de nuevo reducido por acción de las glutatión reductasas, utilizando como poder reductor el NADPH que proviene de la vía de las pentosas (Figura 6B) (Rebrin and Sohal, 2008).

Las tiorredoxinas (Trx) y las glutarredoxinas (Grx) son proteínas de bajo peso molecular que tienen un sitio activo tiol/sufidrilo y poseen actividad de oxido-reductasa. Estas proteínas mantienen el estado reducido de la célula mediante la reducción de los grupos tiol de las proteínas. En los mamíferos existen dos Trx: la Trx1, se encuentra en el citosol y la Trx2 se encuentra en mitocondria (Kalinina et al., 2008). Además de estas dos Trx se han identificado la Trx1-like ó $p32^{TrxL}$ y la Trx2-like (Trl) que se encuentra asociada a microtúbulos (Sadek et al., 2003). De las enzimas

encargadas de reducir a las Trx oxidadas, las tiorredoxinas (TrxR), se han identificado tres en mamífero. Por su parte las Grx, al igual que las Trx, están encargadas de mantener el estado reducido de las proteínas y en mamíferos se han identificado Grx1-5 distribuidas en distintos órganos y tejidos (Kalinina et al., 2008).

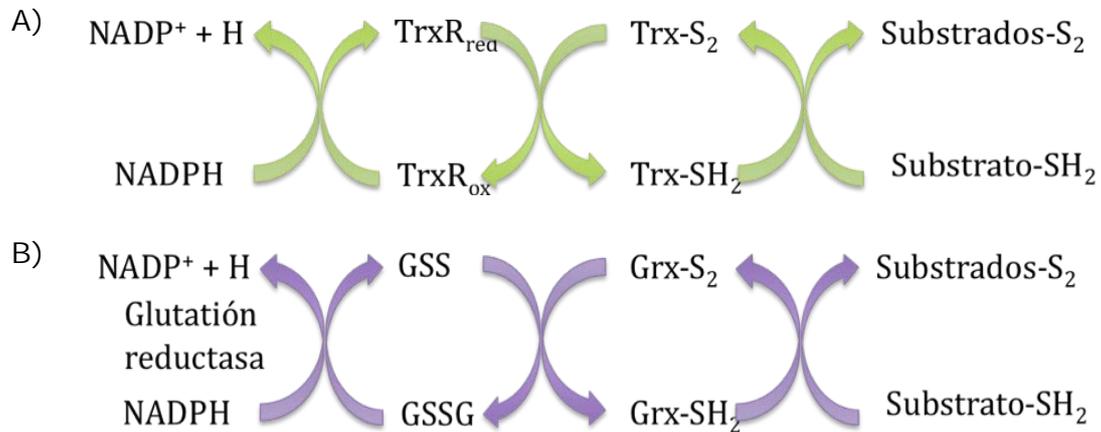


Figura 6 Reacciones antioxidantes. A) Esquema de reacciones catalíticas dependientes de tiorredoxina. B) Esquema de reacciones dependientes de glutarredoxina y glutatión.

Además de los sistemas antioxidantes enzimáticos, los seres vivos, cuentan con antioxidantes no enzimáticos que contribuyen al mantenimiento redox de la célula y, además, son la única defensa contra el radical hidroxilo $\cdot OH$. Estos compuestos son de bajo peso molecular y funcionan como antioxidantes o como "atrapadores" de electrones (Chaudiere and Ferrari-Iliou, 1999). De estos antioxidantes existen una gran variedad en la naturaleza, sin embargo, su capacidad antioxidante depende de las características químicas de cada molécula. Entre los más importantes se encuentra el ácido ascórbico, el ácido úrico, la vitamina E y carotenoides. El ácido ascórbico y úrico, por sus características antioxidantes y al ser moléculas solubles en agua, son capaces de reducir al radical superóxido e hidroxilo así como también algunos peróxidos.

Los carotenoides funcionan como atrapadores de electrones, ya que por la naturaleza química de sus enlaces son capaces de aceptar electrones que mantienen en resonancia evitando que reaccionen con otras moléculas.

Los antioxidantes como es la vitamina E que son liposolubles, tienen un efecto importante en prevenir la oxidación de lípidos de las membranas biológicas impidiendo la formación de lipoperóxidos.

1.3 Estrés oxidativo, la teoría del envejecimiento y enfermedades crónicas degenerativas.

Todos los organismos multicelulares al paso del tiempo sufren cambios cualitativos, envejecen. Estos cambios se asocian con una progresiva degeneración de las funciones biológicas y aumento en la probabilidad de sufrir enfermedades y muerte. El por qué envejecemos, ha sido una pregunta que durante mucho tiempo una gran cantidad de grupos de investigación alrededor del mundo han querido responder.

En este sentido, la identificación de la presencia de radicales libres en la materia biológica (Commoner et al., 1954) sirvió como base para que, en 1956, Denham Harman propusiera la teoría "del envejecimiento por radicales libres", la cual identifica a las ERO como responsables del envejecimiento. Harman describió a las ERO como especies químicas que se producían *in vivo*, como subproductos de la actividad de enzimas que usan O₂ para su actividad catalítica. Las ERO, entonces, por su alta reactividad, serían capaces de dañar macromoléculas (proteínas, lípidos y DNA) y la acumulación de este daño oxidativo sería el responsable del envejecimiento y finalmente de la muerte (Harman, 1956). Aunque inicialmente la idea de producción de oxidantes endógenos era controversial, la identificación de la primera enzima antioxidante, la superóxido dismutasa, dio sustento a la teoría de Harman.

La comparación inter-especies de la relación entre la esperanza de vida y el daño oxidativo, han sido observaciones que sustentan la teoría de Harman. Un ejemplo de es lo observado en moscas en donde se encontró que en cinco especies, a los 15 días de edad, los niveles de proteínas oxidadas (carbonilos) correlacionan negativamente con la esperanza de vida; la especie más longeva (*Drosophila melanogaster*, esperanza de vida: 65.5 días) mostró la tercera parte de niveles de carbonilos que la especie menos longeva (*Phaenecia sericata*, esperanza de vida: 29.5 días) (Sohal et al., 1995). En la comparación de ratones *Mus musculus* con la

especie *Peromyscus leucopus*, se encontró que, el *Mus musculus*, que tiene una esperanza de vida de 3.5 años, presentó un 20% más carbonilos en el corazón y casi un 50% más en cerebro que los ratones *Peromyscus leucopus* a la edad de 3.5 meses. La especie *Peromyscus leucopus* tiene una esperanza de vida de 8 años. Estos datos sugieren que a mayor acumulación de daño oxidativo menor esperanza de vida.

Otro tipo de estudios también han arrojado evidencia que apoyan la teoría de Harman. En *Caenorhabditis elegans*, la mutación de *daf-2*, un miembro de la familia de receptores de insulina, causa longevidad por aumento en la expresión de Mg-SOD (Honda and Honda, 1999). Por otro lado, la suplementación de la dieta de *C. elegans* silvestres con compuestos que mimetizan la actividad de SOD y catalasa promueven longevidad en este organismo (Melov et al., 2000). En otro caso, la falta de *mev-1*, un gene que codifica para una subunidad de la succinato deshidrogenasa citocromo b, provoca envejecimiento prematuro que se asocia al aumento en la producción de ERO (Ishii, 2000). En *Drosophila*, moscas transgénicas con copias extras de los genes de SOD y catalasa también aumentan su longevidad (Orr and Sohal, 1994; Parkes et al., 1998). En el ratón se ha observado que la falta de *p66shc*, una proteína mitocondrial que produce ERO, induce aumento en la esperanza de vida y la resistencia a estrés oxidativo (Migliaccio et al., 1999). En otro estudio, la sobre-expresión de catalasa en la mitocondrias del corazón en el ratón aumenta la esperanza de vida hasta un 20% (Schriner et al., 2005), contrario a esto, un estudio donde se sobre expresan la Mg-SOD, CuZn-SOD, catalasa, y en diferentes combinaciones de estas, no se observa aumento en la esperanza de vida con respecto a los ratones silvestres (Perez et al., 2009).

La restricción calórica (CR), es una condición que promueve longevidad en varios organismos modelo (*Drosophila*, *C. elegans*, levadura, ratón, entre otros). Hay varias teorías de cómo la CR podría promover longevidad, y una de estas es que sea a través una disminución en el estrés oxidativo. Se ha observado que en ratones sometidos a CR disminuyen los niveles de oxidación de lípidos, proteínas y DNA, asociados con la edad, con respecto a los animales alimentados *ad libitum* (Masoro, 2000) a pesar de

este hecho, aún no está claro que es lo que determina que animales sometidos a RC tengan una esperanza de vida mayor.

Además del envejecimiento, se ha propuesto que las ERO contribuyen al desarrollo de enfermedades asociadas a la edad. Algunas de estas enfermedades son el mal de Parkinson, Alzheimer, diabetes tipo II y cáncer. En pacientes con Alzheimer, por ejemplo, se han encontrado bajos niveles de actividad SOD en sangre periférica y en el sistema nervioso central (Ihara et al., 1997). En este padecimiento, también se ha observado la acumulación del péptido β -amiloide en el sistema nervioso central, el cual puede promover inflamación y estrés oxidativo. Esta suma de factores podrían participar en la muerte neuronal y por lo tanto el desarrollo del Alzheimer (Behl, 1997).

1.4 Funciones fisiológicas de las especies reactivas de oxígeno

A pesar de que se han identificado a las ERO como posibles causantes de enfermedades y del envejecimiento, hay evidencias que indican que estas moléculas tienen funciones importantes como defensa contra patógenos y como segundos mensajeros en vías de señalización en prácticamente todos los organismos.

En el ratón, se ha observado que macrófagos y neutrófilos activados producen grandes cantidades de ERO que funcionan como primera línea de defensa en ambientes patógenos (Keisari et al., 1983). Los ERO producidos por los macrófagos y neutrófilos se ha determinado que proviene de las NADPH oxidasas, ya que en ratones que carecen de algún componente de estas enzimas, como es el caso de gp91phox, son susceptibles a infecciones (Dinauer et al., 1997). Recientemente en el pez zebra se encontró que cuando se genera una herida, las células epiteliales crean un gradiente de H_2O_2 mediante la actividad de una oxidasa dual, una enzima que tiene actividad de NADPH oxidasa y superóxido dismutasa, el cual sirve como señal para atraer a los leucocitos para iniciar el proceso de reparación del daño (Niethammer et al., 2009).

En la muerte celular programada también hay evidencia de la función fisiológica de las ERO. Por ejemplo, en células en cultivo los ERO pueden

provocar muerte celular con características fenotípicas a la apoptosis, fenómeno que es posible inhibir con antioxidantes (Hockenbery et al., 1993). Complementario a este hecho, se sabe que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) es capaz de provocar apoptosis cuando se une a su ligando. La unión de TNF α a su ligando induce producción de ERO en la mitocondria (O'Donnell et al., 1995), estas señales podrían ser la responsables de activar la apoptosis, ya que los antioxidantes son capaces de inhibir la muerte inducida por TNF α (Schulze-Osthoff et al., 1992).

En la autofagia que, además de ser la vía catabólica más importante por la cual los organismos eucariontes degradan y reciclan macromoléculas y organelos, puede ser también otro tipo de muerte celular programada con características moleculares y fenotípicas particulares. Se ha encontrado que en condiciones de inanición, hay formación de H₂O₂ el cual activa a Atg4, una molécula importante en la formación de los autofagosomas, mediante la oxidación de una cisteína. La oxidación de Atg4 por ERO puede ser inhibida por acción de los antioxidantes lo que evita la formación de autofagosomas y por lo tanto de la muerte autofágica (Scherz-Shouval et al., 2007).

Las ERO también están involucradas en contribuir a la señalización de algunas hormonas, como es el caso de la señalización por insulina. Se ha observado que pequeñas cantidades de superóxido y H₂O₂ son capaces de aumentar el transporte de glucosa en adipocitos mediado por la insulina (Czech and Fain, 1972; Czech et al., 1974). En adipocitos 3T3-L1, la unión de insulina a su receptor induce la actividad de la NADPH oxidasa para la producción de H₂O₂ a partir del superóxido generado. El H₂O₂ parece tener la función de promover la auto-fosforilación del receptor de insulina (IR) para que a su vez este fosforile al sustrato del receptor de insulina (IRS). La inhibición de las NADPH oxidasas con DPI provoca disminución en los niveles de IRS y Akt fosforilado inducido por insulina. La producción de H₂O₂ por la unión de la insulina a su receptor parece no solo ser importante para la auto-fosforilación del IR, sino que también se ha observado que tiene la función de inactivar a la proteína fosfatasa de tirosinas B (PTP1B) (Figura 7). PTPB1 es una fosfatasa de tirosinas; pertenece a la familia de las

PTPasas. Las PTPasas son proteínas que están involucradas en la regulación de un gran número de vías de señalización. En el caso de la señalización de insulina, se ha identificado a PTP1B como un regulador negativo (Elchebly et al., 1999; Goldstein, 2001). Ratones carentes de PTP1B muestran alta sensibilidad a la insulina (Elchebly et al., 1999; Klamann et al., 2000). Una cisteína en el sitio activo de las PTPasas se oxida por ERO y provoca su inactivación; ésta parece ser la forma más común de regulación de estas enzimas (DeGnora et al., 1998). Debido a que se ha observado que en adipocitos 3T3-L1 el tratamiento con catalasa provoca una disminución en la fosforilación de IRS1 y Akt inducidos por insulina (Mahadev et al., 2001); se sugiere que la formación de H_2O_2 inducido por la insulina podría servir para inhibir la actividad de la PTP1B (Figura 7).

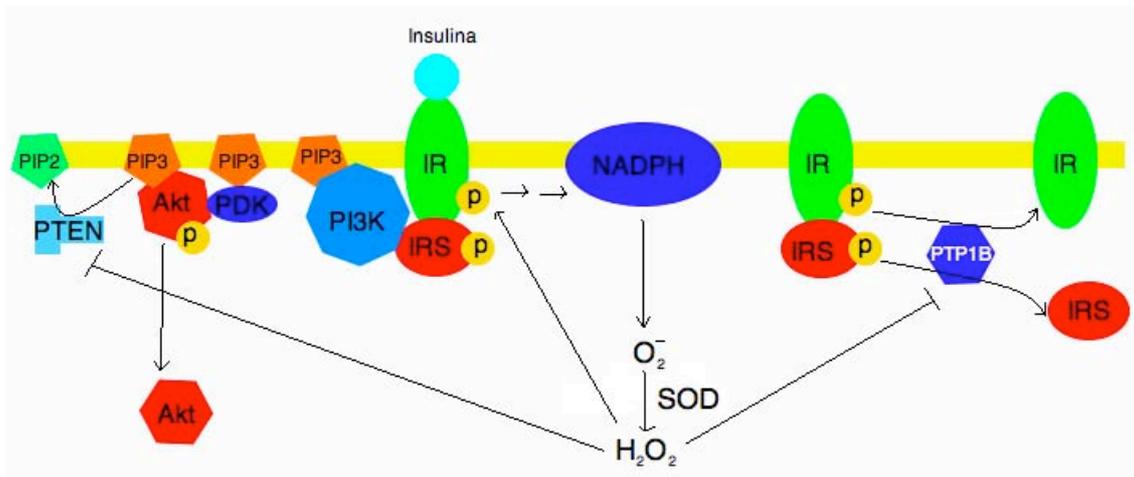


Figura 7 Mecanismo propuesto por el cual el H_2O_2 participa positivamente en la señalización por insulina. La insulina al unirse a su receptor induce la actividad de la NADPH oxidasa para producir H_2O_2 . El H_2O_2 inhibe las PTPasas por oxidación de una cisteína en su sitio activo para que se mantengan activados y fosforilados el IR y el IRS, además del PIP3 de la membrana plasmática.

II Antecedentes

II.1 La Catalasa y estrés oxidativo

La catalasa, como ya se mencionó, es una enzima que se expresa casi de forma ubicua, que en mamíferos se localiza especialmente en peroxisomas y solo existe un gen que codifica para esta enzima. Esta enzima es una de las más eficientes en la naturaleza, tiene una K_m para el H_2O_2 de entre 10-25 mM, por lo que en condiciones fisiológicas es prácticamente insaturable (Deisseroth and Dounce, 1970).

Como también ya se mencionó, en *C. elegans* compuestos que mimetizan la actividad de la catalasa promueven longevidad. En ratones transgénicos, la sobre expresión de la catalasa en la mitocondria de las células en varios órganos, induce extensión de la vida media de los animales hasta de un 20% si se sobre expresa mayoritariamente en las mitocondrias del corazón (Schriner et al., 2005). En otros diseños experimentales, como es el caso en el que se sobre expresa esta enzima en las células β del páncreas, protege a las células del daño oxidativo causado por H_2O_2 y reduce la diabetes causada por la estreptozotocina, una droga que provoca diabetes tipo II por medio de inducir estrés oxidativo y muerte en las células β (Xu et al., 1999).

Sin embargo, a pesar de que en muchos modelos experimentales tanto *in vivo* como *in vitro* se ha observado que la catalasa protege del estrés oxidativo, en realidad poco se sabe acerca de su función fisiológica. En humanos las deficiencias de la catalasa se describieron hace más de 30 años por Takahara (Aebi and Suter, 1971). Se reportó que las personas deficientes en esta enzima pueden padecer infecciones orales y en casos más graves gangrena, supuestamente debido a la acumulación de H_2O_2 producido por las bacterias y las células que fagocitan; el desarrollo de las personas es normal y no se ha observado que presenten enfermedades relacionadas con los peroxisomas (Aebi and Suter, 1971). También se han aislado cepas de ratones acatalacemicos, en los que sus niveles de

expresión de catalasa varían dependiendo del tejido. En estos animales no se ha observado un fenotipo evidente (Ogata, 1991).

Para estudiar el papel de la catalasa en la fisiología del organismo, y debido a que no se contaba con una línea de ratones en la que la mutación de la catalasa fuera nula en todos los órganos y tejidos, en nuestro laboratorio se creó una línea de ratones nulos en catalasa ($Cas^{-/-}$) (Hernandez, 2009). Se encontró que estos animales se desarrollan normalmente y no tienen fenotipo aparente (Hernandez, 2009). Al buscar si estos ratones presentaban mayor daño oxidativo en proteínas y lípidos, midiendo marcadores de lipoperoxidación, dienos conjugados (DC) y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y de carbonilos en proteínas. Se encontró que los niveles de DC, TBARS y carbonilos fueron diferentes dependiendo del tejido y de la edad. En los ratones $Cas^{+/-}$ y $Cas^{-/-}$ de 8 meses de edad se encontraron niveles inferiores de DC comparado con los ratones silvestres en los órganos: hígado, corazón, pulmón y riñón; solo en el cerebro los ratones $Cas^{-/-}$ presentaron niveles mayores de DC que los silvestres. Éstos resultados fueron similares en TBARS y carbonilos, también a los 8 meses de edad. En otras edades, como en las de 6 y 10 meses, no se observaron cambios significativos en el daño oxidativo de los ratones $Cas^{-/-}$ con respecto a los ratones silvestres (Cuevas, 2007).

En curvas de sobrevivencia, se encontró que los ratones $Cas^{-/-}$ macho al parecer tienen una esperanza de vida menor a los silvestres ya que, la mortalidad de estos animales inicia a los 18 meses de edad mientras que en el caso de los ratones silvestres es hasta los 24 meses (Cuevas, 2007).

Una línea de ratones nulos para catalasa ya ha sido reportada por otro grupo de investigación (Ho et al., 2004). En este estudio los autores encontraron que los ratones $Cas^{-/-}$ no son vulnerables al daño oxidativo en los pulmones, tampoco encontraron mayor susceptibilidad al daño oxidativo en la retina de los ojos producido por reacciones fotoquímicas, en comparación a los ratones silvestres. Sin embargo, observaron una disminución en la eficiencia de la respiración de las mitocondrias del cerebro. En base a estos resultados los autores concluyen que la función de

la catalasa como enzima antioxidante depende del tejido y que su actividad puede ser compensada por otros sistemas antioxidantes enzimáticos como las glutatión peroxisomas o peroxiredoxinas (Ho et al., 2004).

11.2 Obesidad y estrés oxidativo

La obesidad es una enfermedad que se define como aumento en la acumulación de grasa corporal y es un problema de salud mundial; en el caso de México el 70% de la población adulta (30 – 60 años) tiene algún problema de sobre peso u obesidad y, a nivel mundial México ocupa el segundo lugar en prevalencia de esta enfermedad. En la actualidad existe una gran cantidad de reportes que sugieren que el estrés oxidativo contribuye al desarrollo de este padecimiento. En humanos se ha encontrado que personas con obesidad tienen bajos niveles de algunos compuestos antioxidantes en el suero como: vitamina C, esteroides de retinol y carotenoides (Ford et al., 2003), disminución de la actividad de superóxido dismutasa, incremento de lípidos peroxidados, proteínas oxidadas en forma de carbonilos y aumento de actividad de la xantina oxidasa (Armutcu et al., 2008; Palmieri et al., 2006).

En modelos de obesidad que consisten en alimentar ratones con una dieta alta en grasa (HFD), se observa que hay aumento de carbonilos en el hígado, antes de que estos animales desarrollen resistencia a insulina (Matsuzawa-Nagata et al., 2008) y aumento en lipoperoxidación en el suero determinado por TBARS (Yamato et al., 2007); sin embargo, en otro estudio con un modelo experimental similar, se observó que en los ratones alimentados con HFD no hubo aumento de TBARS en hígado, grasa epididimal, grasa subcutánea y grasa visceral, aunque sí se observó un incremento en la expresión de NADPH oxidasas en el hígado (Sohet et al., 2009). Estas diferencias podrían deberse a la HFD que se utilizó en cada estudio, ya que en el segundo caso la dieta contenía un alto contenido de vitamina E, lo que podría explicar las diferencias.

En ratones con mutaciones en leptina (*ob/ob*) que desarrollan obesidad y ratones diabéticos *KKAy*, se ha encontrado que tienen disminuidos los niveles de expresión de SOD1, Gpx1 y catalasa en la grasa blanca, lo que correlaciona con una disminución de la actividad en general

de estas tres enzimas antioxidantes. Este hecho provoca un aumento en la lipoperoxidación en la grasa blanca. Sin embargo, cabe mencionar que no hay cambios en los niveles de expresión o de actividad de estas enzimas antioxidantes en músculo e hígado. Además de lo que sucede con las enzimas antioxidantes, se ha encontrado aumento en la expresión de NADPH oxidasas en la grasa blanca, y si a estos ratones se les administra inhibidores de las NADPH oxidasas, desarrollan resistencia a insulina en un grado menor a los que no se les administra el inhibidor (Furukawa et al., 2004).

¿Cómo la obesidad provoca estrés oxidativo?, esta es una pregunta que aún no se ha podido responder, sin embargo, algunos estudios sugieren que la acumulación de grasa en la obesidad podría ser, en parte, la responsable del aumento de estrés oxidativo (Furukawa et al., 2004). Los adipocitos tienen la capacidad de secretar moléculas con actividad biológica que en su conjunto se le conocen como adipocinas. Algunas de las adipocinas son: PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), TNF- α , interleucina 6 (IL-6), leptina y adiponectina. Al respecto, en adipocitos en cultivo se ha observado que el estrés oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno inhibe la expresión de la adiponectina, una hormona que mejora la señalización de insulina, y por otro lado promueve la expresión de PAI-1 y TNF- α (Furukawa et al., 2004), moléculas que se han encontrado pueden provocar estrés oxidativo y resistencia a insulina (Furukawa et al., 2004; Hotamisligil et al., 1993; Hotamisligil and Spiegelman, 1994).

Otra forma de cómo los adipocitos podrían contribuir a generar estrés oxidativo es mediante la disminución de la expresión del activador de proliferación peroxisomal gamma (PPAR γ), que se ha encontrado ocurre en la grasa blanca de ratones ob/ob y en adipocitos 3T3-L1 tratados con TNF α (Furukawa et al., 2004). PPAR γ , es un factor transcripcional que pertenece a la familia de los activadores de proliferación peroxisomal (PPARs). Estos factores de transcripción se han identificado que participan en una gran variedad de procesos, dentro de los que se incluyen: diferenciación celular en el desarrollo, como reguladores del metabolismo energético y en procesos de tumorigénesis. En el caso particular de PPAR γ se ha

encontrado que regula la diferenciación de adipocitos y el mantenimiento de la homeostasis de glucosa (Takano and Komuro, 2009). En cultivos de adipocitos 3T3-L1 se encontró que el PPAR γ regula positivamente la expresión de la catalasa. En ratones que se les administra antagonistas del PPAR γ se observa aumento de expresión de catalasa solo en la grasa blanca. Además, se ha encontrado que en la región enhancer del promotor de la catalasa de el ratón tiene elementos de respuesta a PPARs (PPREs). Con estos hallazgos se determinó que, en el tejido adiposo, PPAR γ podría ser el quién mayoritariamente regule la expresión de catalasa en el ratón (Okuno et al., 2008). En humanos también se encontró que PPAR γ regula la expresión de catalasa en adipocitos, aunque los PPREs son distintos a los de ratón (Okuno et al. 2010). En ratones en los que se administra agonistas del activador de proliferación peroxisomal alfa (PPAR α) se ha observado que expresan abundantemente catalasa en hígado y riñón, lo que sugiere que podría ser éste factor transcripcional el encargado de regular la expresión de la catalasa en estos órganos (Hiuge et al., 2007).

Puesto que los peroxisomas son capaces de llevar a cabo la β oxidación de ácidos grasos de cadena larga, estos organelos podrían jugar un papel importante en la obesidad, ya que en personas con síndrome Zellweger, que se caracteriza por la incapacidad de formar peroxisomas, se ha observado que acumulan una gran cantidad de VLFA, aunque cabe mencionar que estos pacientes no son obesos (Brown et al., 1982)

Debido a que la oxidación de ácidos grasos en los peroxisomas produce H_2O_2 , que es removido principalmente por la catalasa (Bonekamp et al., 2009) y con base a las evidencias anteriores, en este trabajo se buscó probar si en una condición en la que se induzca mayor oxidación de ácidos grasos, como es el caso de la alimentación con una dieta en grasa, es capaz de provocar aumento en el daño oxidativo de ratones que carecen de la catalasa. Como el hígado es el órgano que mayoritariamente se encarga de la oxidación de ácidos grasos y, además, es el órgano en el que se expresa más abundantemente la catalasa, podría ser que en las condiciones de alto consumo de grasa sea este órgano el más afectado.

III Hipótesis

La falta de catalasa provoca un aumento en el daño oxidativo en ratones que se alimentan con una dieta alta en grasa y puede estar acompañado de desordenes metabólicos.

IV Objetivos

Objetivo General

Determinar el efecto causado por una dieta alta en grasa sobre el daño oxidativo en ratones $Cas^{-/-}$.

Objetivos particulares

- Determinar el daño oxidativo en hígado de los ratones $Cas^{+/+}$, $Cas^{+/-}$ y $Cas^{-/-}$ alimentados con dieta control y dieta alta en grasa.
- Determinar alteraciones histológicas en los ratones $Cas^{+/+}$, $Cas^{+/-}$ y $Cas^{-/-}$ alimentados con dieta control y dieta alta en grasa.
- Determinar la tolerancia a glucosa de los ratones $Cas^{+/+}$, $Cas^{+/-}$ y $Cas^{-/-}$ alimentados con dieta control y dieta alta en grasa.

V Resultados

V.1 Cruzas y Determinación del genotipo

Los ratones mutantes de catalasa eran híbridos de dos cepas (129 y C57/BL6), para lograr homogeneidad en los resultados se inició el pase de la mutación hacia el fondo genético C57/BL6. Para esto, ratones $Cas^{-/-}$ híbridos se cruzaron con ratones silvestres C57/BL6. Los ratones nacidos de esta cruce fueron la primera generación, todos $Cas^{+/-}$. Esta primera generación se cruzó con ratones silvestres para dar origen a la segunda, de esta segunda generación solo se seleccionaron los $Cas^{+/-}$ que se cruzaron con ratones silvestres C57/BL6 y así sucesivamente. Se considera que hasta la décima generación los ratones que acarrean la mutación tienen el fondo genético C57/BL6.

El genotipo de los ratones mutantes para la catalasa se determinó mediante dos métodos, el de descomposición de H_2O_2 y por la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR) (Cuevas, 2007). Debido a que la catalasa se expresa abundantemente en la sangre, se puede identificar el genotipo de los ratones $Cas^{+/+}$, $Cas^{+/-}$ y $Cas^{-/-}$ por el nivel de burbujas de O_2 que genera la sangre de estos animales en un tubo con solución de peróxido de hidrógeno. Los ratones $Cas^{+/+}$ generan un mayor volumen de burbujas que los ratones $Cas^{+/-}$, sin embargo, en algunas ocasiones el nivel de burbujas de los $Cas^{+/-}$ puede ser similar el de los silvestres, lo que dificulta identificar el genotipo correcto. Con los ratones $Cas^{-/-}$ no existe este problema, ya que la sangre de estos animales prácticamente no produce burbujas. Por la dificultad para identificar el genotipo correcto en los ratones $Cas^{+/-}$ con el método de descomposición del H_2O_2 (Figura 8) se tomó la decisión de identificar los ratones $Cas^{+/-}$ solo por medio de PCR, técnica que identifica la mutación en el genoma del ratón. Mediante éste método podemos amplificar un fragmento del genoma que para el caso del alelo mutado es de 394 pb y de 254 pb para el alelo no mutado (Figura 9). Éste método identifica de manera muy fina el genotipo de cada ratón (ver métodos).

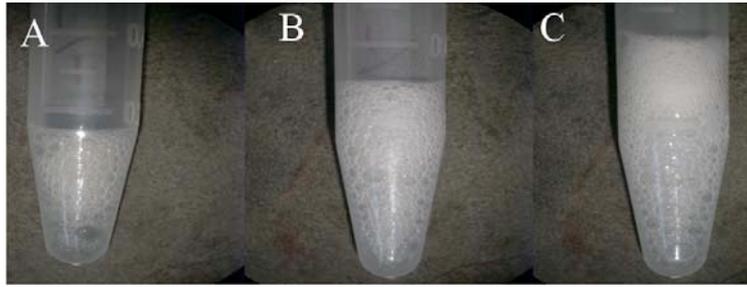


Figura 8 Volumen generado de burbujas por la descomposición del H_2O_2 debido a la sangre de ratones mutantes. A) $Cas^{-/-}$, B) $Cas^{+/-}$, C) $Cas^{+/+}$. Tomado de: (Cuevas, 2007).

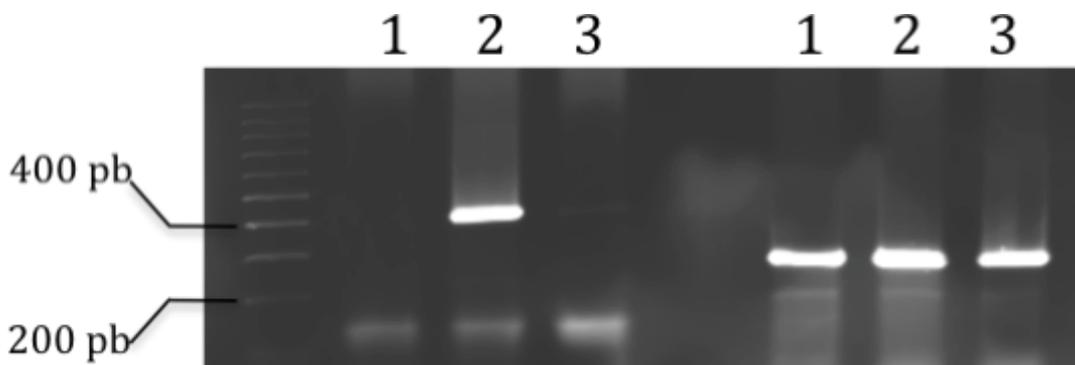


Figura 9 Gel de agarosa al 2% de los productos amplificados por medio de PCR para identificar el alelo mutado en los ratones. Alelo mutado (izquierda) tamaño esperado 394 pb; Alelo silvestre (derecha), tamaño esperado 254 pb. De tres ratones analizados, ratón 1 y 2 corresponden a $Cas^{+/+}$ y el ratón 3 a $Cas^{+/-}$.

V.2 Efecto prooxidante en ratones $Cas^{-/-}$ alimentados con una dieta alta en grasa

Para determinar el posible daño oxidativo producido en los ratones $Cas^{-/-}$ por el alto consumo en grasa, se probaron dos diseños experimentales (Condición A y B; Tabla 1). De la condición A se logró tener dos repeticiones independientes (dos grupos experimentales), aunque, debido a que los resultados no fueron similares, estos se muestran en forma separada. Las posibles causas de estas diferencias se abordarán en la discusión de los resultados.

El daño oxidativo o efecto pro-oxidante, se determinó midiendo la lipoperoxidación de ácidos grasos en el hígado y cerebro, haciendo uso de dos técnicas: DC y TBARS con y sin adición de hierro (Fe^{2+}). Los DC son los

primeros compuestos que se forman cuando un lípido es oxidado por ERO; si el lípido se sigue oxidando forma un lípido peroxidado (aldehídos). Los aldehídos reaccionan con el ácido tiobarbitúrico a pH ácido y forman un compuesto colorido el cual es posible cuantificar y, así, determinar indirectamente la lipoperoxidación. La adición de Fe^{2+} permite oxidar todos los lípidos que ya han iniciado un proceso de oxidación, por lo que los TBARS determinados en esta condición es la máxima oxidación que puede alcanzar la muestra analizada.

Tabla 1 Diseños experimentales de alimentación con la dieta control y alta en grasa para los experimentos de efectos pro-oxidantes

Condición	Edad al inicio de la alimentación	Tiempo de alimentación
A	21 días	6 meses
B	21 días	30 días

Cuando se analizaron los ratones de los tres genotipos del primer grupo de la condición A, no se observaron diferencias en los niveles de DC y TBRAS basal en cerebro independientemente del genotipo y la dieta (Figura 10D y F). A diferencia de lo anterior, en la determinación de TBRAS adicionada con Fe^{2+} se observa que, cuando los ratones son alimentados con la dieta control, los TBARS parecen no cambiar entre los genotipos. Donde se observan diferencias es cuando se alimentan con HFD, ya que en esta condición los $Cas^{+/-}$ presentan menor lipoperoxidación que los silvestres y, aunque hay una tendencia de ser menor en los $Cas^{-/-}$, esta diferencia no es significativa con el silvestre (Figura 10E). En el segundo grupo experimental se observa el mismo patrón en los DC con valores muy similares a los del primer grupo (Figura 11F). En los resultados de TBARS adicionados con Fe^{2+} no se observaron diferencia alguna entre los genotipos y las dietas, y para el caso TBARS basal en los ratones $Cas^{+/+}$ alimentados con la dieta control presentan los niveles más altos de lipoperoxidación (Figura 11D y E). Cabe mencionar que los valores, tanto en los TBARS basal como los adicionados con Fe^{2+} , están muy por debajo de lo que se determinó en el primer grupo experimental.

En el hígado, a diferencia de lo que ocurrió en el cerebro, los resultados fueron similares en ambos grupos analizados. En general hay una tendencia a que los ratones alimentados con HFD presente mayores niveles de DC e, interesantemente, es en los ratones *Cas^{+/-}* alimentados con HFD donde esta diferencia es muy clara, sin embargo, para los *Cas^{-/-}* parece que la dieta no tienen algún efecto en este parámetro ya que, en ambos grupos, los niveles de DC son iguales a los que presentan los ratones silvestres alimentados con la dieta control (Figura 10C y 11C). En la determinación de TBARS basal, se observó que los ratones *Cas^{+/+}* y en los *Cas^{-/-}* la alimentación con HFD induce un aumento en la lipoperoxidación, en el caso de los *Cas^{+/-}* no se ve efecto y los niveles de TBARS en ambas dietas son comparables a los que presentan los *Cas^{+/+}* alimentados con la dieta control (Figura 10A y 11A). Empero, en la determinación de TBARS con Fe^{2+} se observa que la HFD induce mayor lipoperoxidación como se puede apreciar en las figuras 10B y 11B, efecto que se observa en los tres genotipos y solo para el caso de los *Cas^{+/-}* del primer grupo la lipoperoxidación es mayor que en los silvestres (Figura 10B).

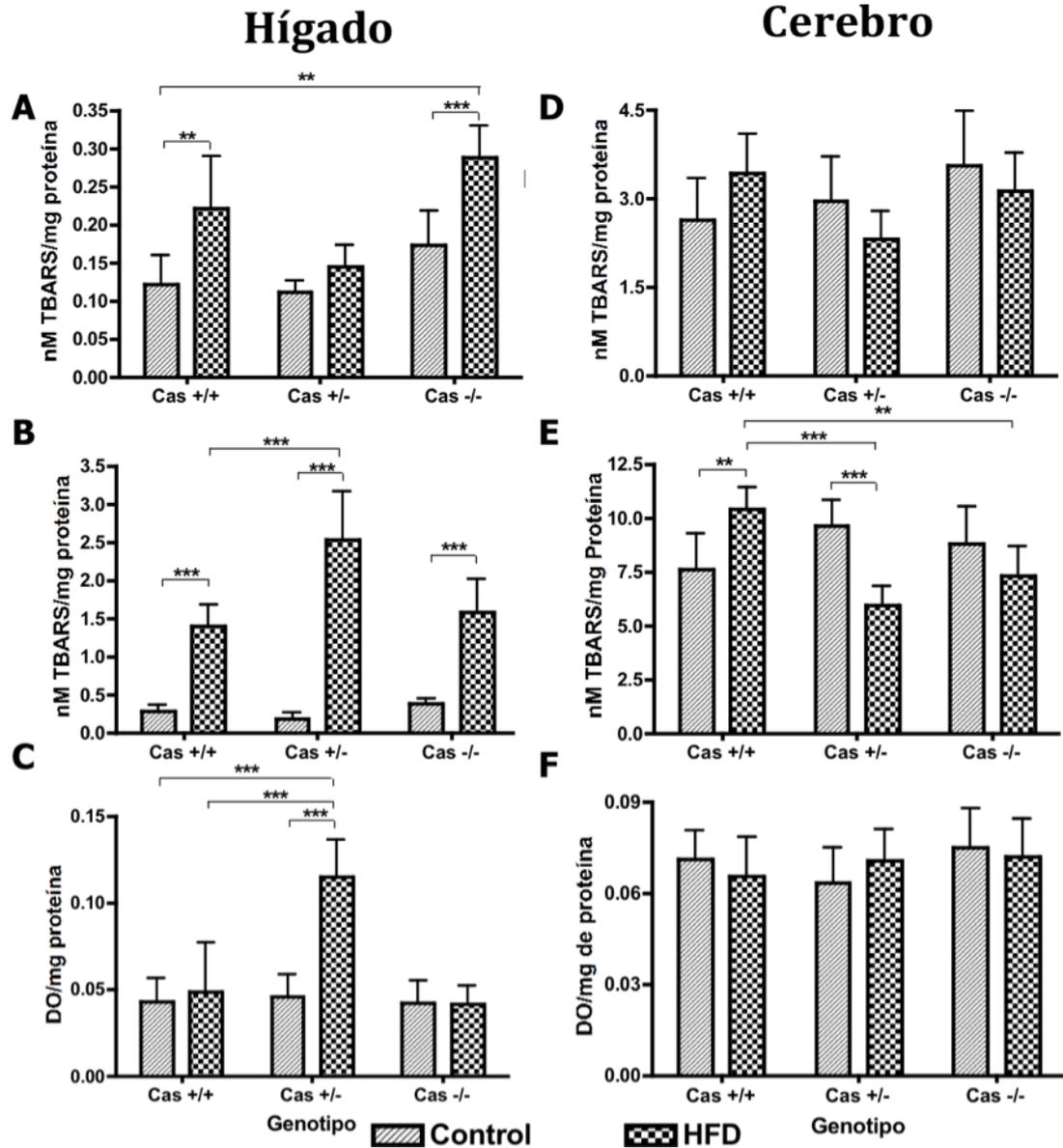


Figura 10 Daño oxidativo en hígado y cerebro en ratones de los tres genotipos alimentados con una dieta control y alta en grasa por 6 meses. A, B y C datos correspondientes al hígado; D, E y F datos correspondientes al cerebro. A y D, lipoperoxidación basal medida por TBARS; B y E, lipoperoxidación medida con TBARS con adición de hierro; C y F, Dienes conjugados. *Datos correspondientes al primer grupo experimental, condición A.* Media±SD; * p<0.05, **p<0.01 y ***p<.001, n = 6.

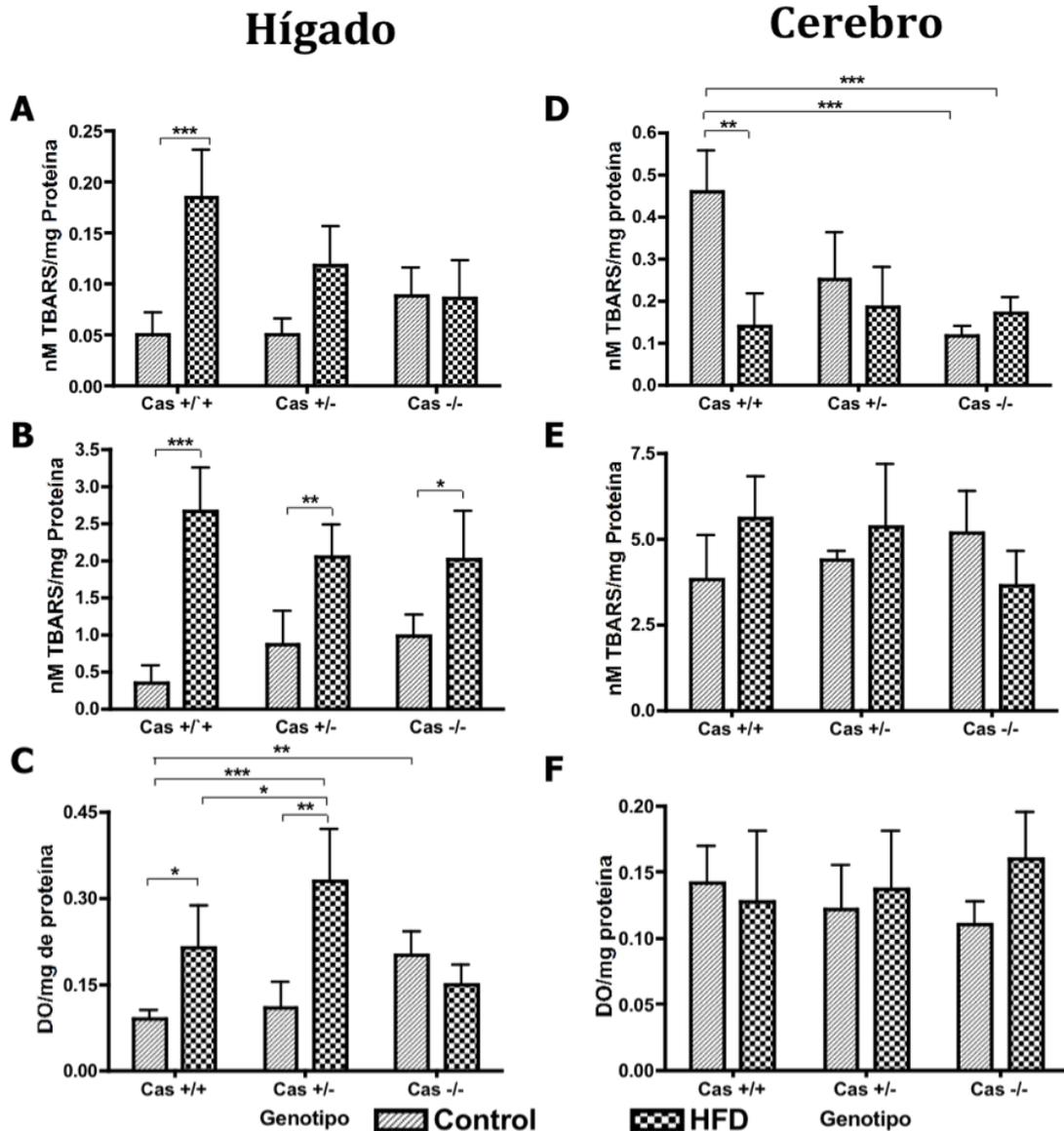


Figura 11 Daño oxidativo en hígado y cerebro en ratones de los tres genotipos alimentados con una dieta control y alta en grasa por 6 meses. A, B y C datos correspondientes al hígado; D, E y F datos correspondientes al cerebro. A y D, lipoperoxidación basal medida por TBARS; B y E, lipoperoxidación medida con TBARS con adición de hierro; C y F, Dienes conjugados. *Datos correspondientes al segundo grupo experimental, condición A.* Media±SD; * p<0.05, **p<0.01 y ***p<.001, n = 6.

En la determinación de DC de cerebro de ratones de la condición B, no se observan diferencias entre genotipos y dietas (Figura 12F). En los niveles de TBARS basal, los ratones $Cas^{+/-}$ y $Cas^{-/-}$ alimentados con la dieta control hay un ligero aumento de la lipoperoxidación con respecto a los $Cas^{+/+}$, este efecto es más claro en los ratones alimentados con HFD, ya que como se observa en la figura 12D, los niveles de TBARS de los ratones silvestres alimentados con HFD son menores que los que presentan los

alimentados con la dieta control (Figura 12D). En la determinación de TBARS con Fe^{2+} , en general no hay diferencias y solo se puede apreciar que los ratones *Cas*^{-/-} alimentados con la dieta control presentan un ligero aumento con respecto a los silvestres (Figura 12E).

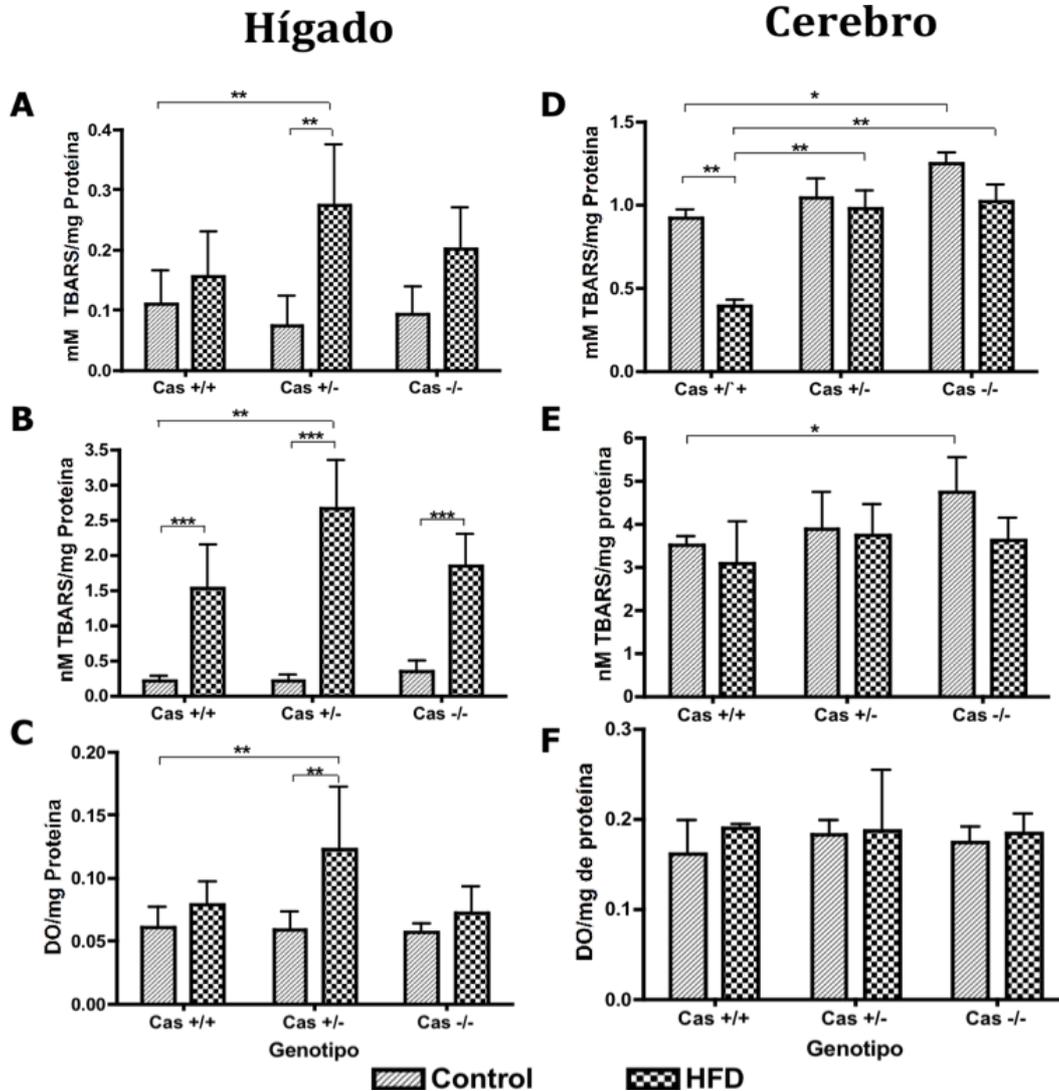


Figura 12 Daño oxidativo en hígado y cerebro en ratones de los tres genotipos alimentados con dieta control y alta en grasa por 30 días. A, B y C datos correspondientes al hígado; D, E y F datos correspondientes al cerebro. A y D, lipoperoxidación basal medida por TBARS; B y E, lipoperoxidación medida con TBARS con adición de hierro; C y F, Dienes conjugados. *Datos correspondientes a la condición B.* Media \pm SD; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$, $n = 6$.

En el hígado de los ratones *Cas*^{+/+} y *Cas*^{-/-} de la condición B, tienen niveles similares de DC en ambas dietas y entre ellos, solo en ratones *Cas*^{+/-} que se alimentaron con HFD presentan niveles de DC mayores a los que se consumen la dieta control y a los silvestres (Figura 12C). En la

determinación de TBARS basal se observa un comportamiento muy similar a lo que sucede con los DC, ya que solo los *Cas^{+/-}* alimentados con HFD son los que presentan los niveles mas altos de TBARS con respecto a los silvestres (Figura 12A). En los TBARS con Fe^{2+} , en la dieta control los niveles son similares entre los genotipos. En los ratones alimentados con HFD se observa un aumento significativo de TBARS con Fe^{2+} con respecto a los alimentados con la dieta control y a pesar de que hay una tendencia de que sea en los *Cas^{+/-}* donde se presenten mayor lipoperoxidación, las diferencias entre genotipos no son significativas (Figura 12B).

V.3 Obesidad y consumo de alimento de los ratones Cas por efecto de la dieta.

Considerando la importancia de la catalasa en la β oxidación de ácidos grasos, el alimentar con HFD de ratones *Cas^{-/-}* podría permitir observar un aumento en el daño oxidativo ó en desordenes metabólicos. En relación al último, la ganancia de peso corporal y el consumo de alimento se vuelven parámetros importantes a medir en este tipo de experimentos.

En esta sección se presentan los resultados de ganancia de peso corporal, consumo de alimento y consumo calórico en relación al peso corporal, de los ratones de los tres genotipos alimentados con una dieta control y HFD. De la condición A se presentan dos grupos experimentales (repeticiones) en forma separada. Debido a que en la condición A se usan ratones de tan solo 21 días de edad, es decir, ratones que no se han desarrollado por completo, se probó un tercer diseño experimental, que es la condición C. En éste diseño se usaron ratones adultos de los tres genotipos, para el caso de los alimentados con la dieta HFD y, en el caso de los alimentados con la dieta control solo se tuvieron los grupos de ratones *Cas^{+/+}* y *Cas^{-/-}* (Tabla 2).

En el primer grupo experimental de la condición A, se observa que los ratones de los tres genotipos alimentados con la misma dieta aumentaron su peso corporal de manera similar, a pesar de que en los *Cas^{+/-}* y *Cas^{-/-}* alimentados con la dieta control parece que la ganancia de peso es mayor que en los silvestres, estas diferencias no son significativas (Figura 13D). Algo que llama la atención de este grupo es la heterogeneidad en el peso

corporal en los ratones $Cas^{+/-}$ y $Cas^{-/-}$ en ambas dietas, la cual se ve reflejada en una desviación estándar mayor (Figura 13D yE).

Tabla 2 Diseños experimentales de alimentación con la dieta control y alta en grasa para los experimentos de obesidad

Condición	Edad al inicio de la alimentación	Tiempo de alimentación
A	21 días	6 meses
B	21 días	30 días
C	3 meses	3 meses

En el segundo grupo experimental, la ganancia de peso corporal de los ratones que se alimentan con HFD es muy rápida y mayor a los que se alimentan con la dieta control. En este grupo no se observa lo que ocurría con los ratones $Cas^{-/-}$ del primer grupo. Tampoco se observa de manera clara que haya gran heterogeneidad en el peso corporal de los ratones mutantes, como si se observó en el primer grupo (Figura 14D y E).

Además del peso corporal, se midió el consumo de alimento de los ratones; los resultados se encuentran representados en la figura 15 para el primer grupo y 16 para el segundo. Es interesante observar que, en gramos de alimento consumido, los ratones silvestres comen prácticamente lo mismo independientemente de la dieta (Figura 15A y 16A), para el caso de los ratones $Cas^{+/-}$ y $Cas^{-/-}$ tienen una tendencia a comer menos alimento alto en grasa comparado con el control, aunque solo en algunos puntos esta diferencia es significativa (Figura 15B y C; 16B y C). En el consumo total de alimento, esto comprende todo el periodo que duró el experimento (Figura 17A y B) en los ratones $Cas^{+/+}$ no hay una diferencia significativa entre el consumo de alimento control y HDF, sin embargo, en los $Cas^{+/-}$ y $Cas^{-/-}$ si hay diferencia significativa, el cual corresponde a un 17% menos alimento alto en grasa con respecto al control.

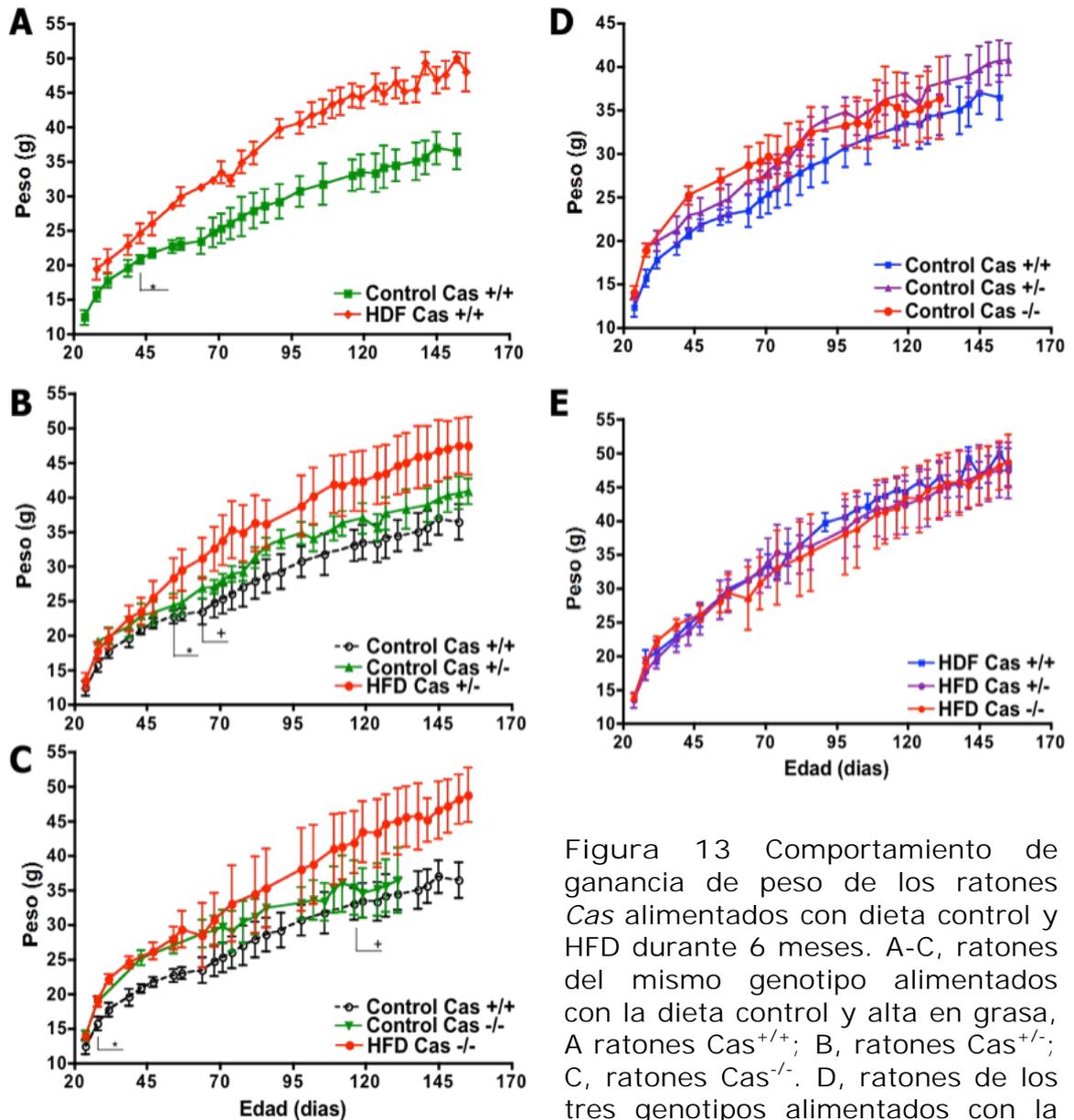


Figura 13 Comportamiento de ganancia de peso de los ratones Cas alimentados con dieta control y HFD durante 6 meses. A-C, ratones del mismo genotipo alimentados con la dieta control y alta en grasa, A ratones $Cas^{+/+}$; B, ratones $Cas^{+/-}$; C, ratones $Cas^{-/-}$. D, ratones de los tres genotipos alimentados con la dieta control; E, ratones de los tres genotipos alimentados con la dieta alta en grasa. Los datos corresponden al primer grupo experimental, condición A. media \pm SD, * $p < 0.05$, diferencia significativa con el control, $Cas^{+/+}$ alimentados con dieta control; + $p < 0.05$, diferencia significativa con los ratones del mismo genotipo alimentados con dieta control. n = 6

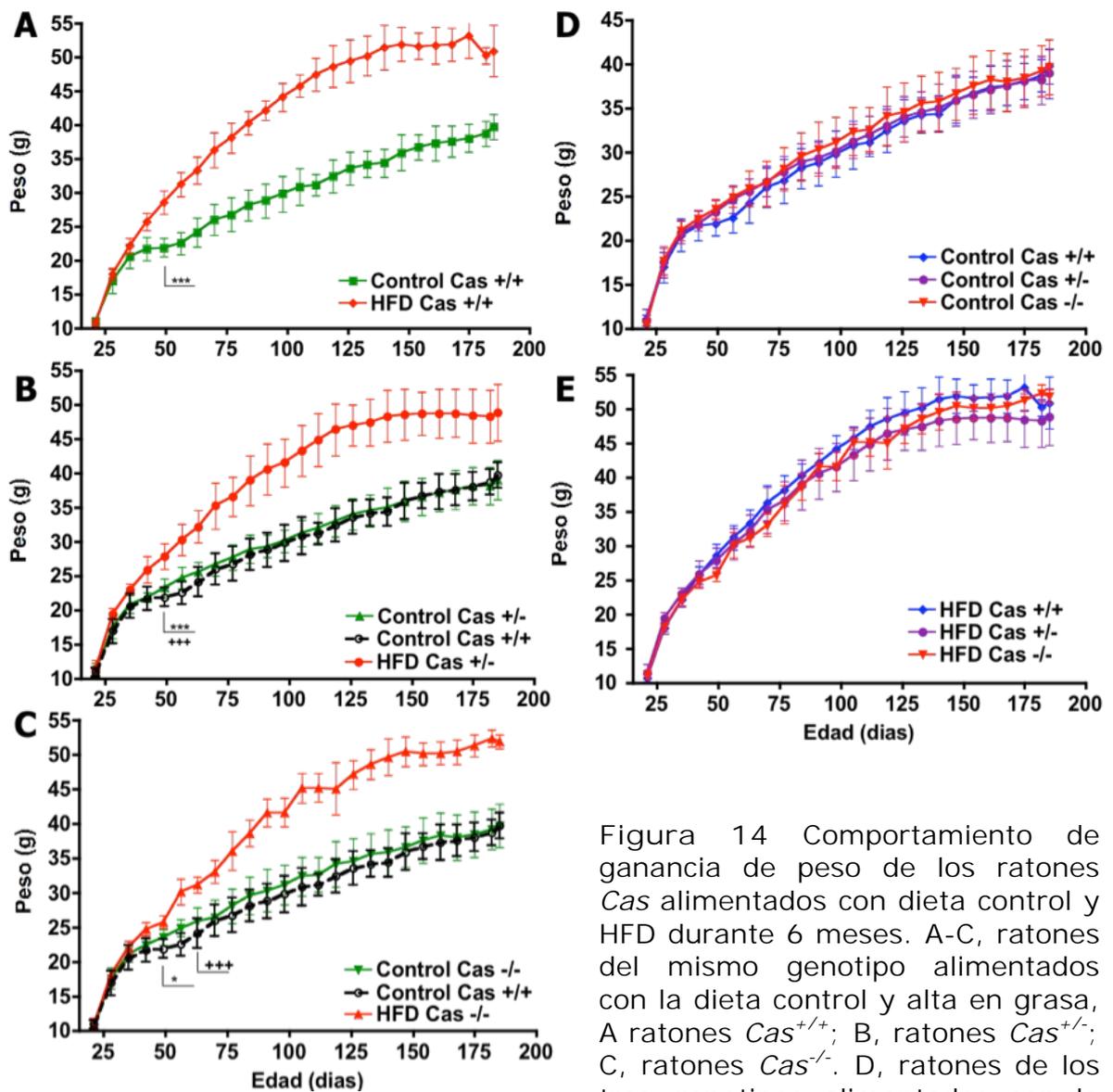


Figura 14 Comportamiento de ganancia de peso de los ratones Cas alimentados con dieta control y HFD durante 6 meses. A-C, ratones del mismo genotipo alimentados con la dieta control y alta en grasa, A ratones $Cas^{+/+}$; B, ratones $Cas^{+/-}$; C, ratones $Cas^{-/-}$. D, ratones de los tres genotipos alimentados con la dieta control; E, ratones de los tres

genotipos alimentados con la dieta alta en grasa. Los datos corresponden al segundo grupo experimental, condición A. media \pm SD, * $p < 0.05$, diferencia significativa con el control, $Cas^{+/+}$ alimentados con dieta control; $^+p < 0.05$, diferencia significativa con los ratones del mismo genotipo alimentados con dieta control. n = 6

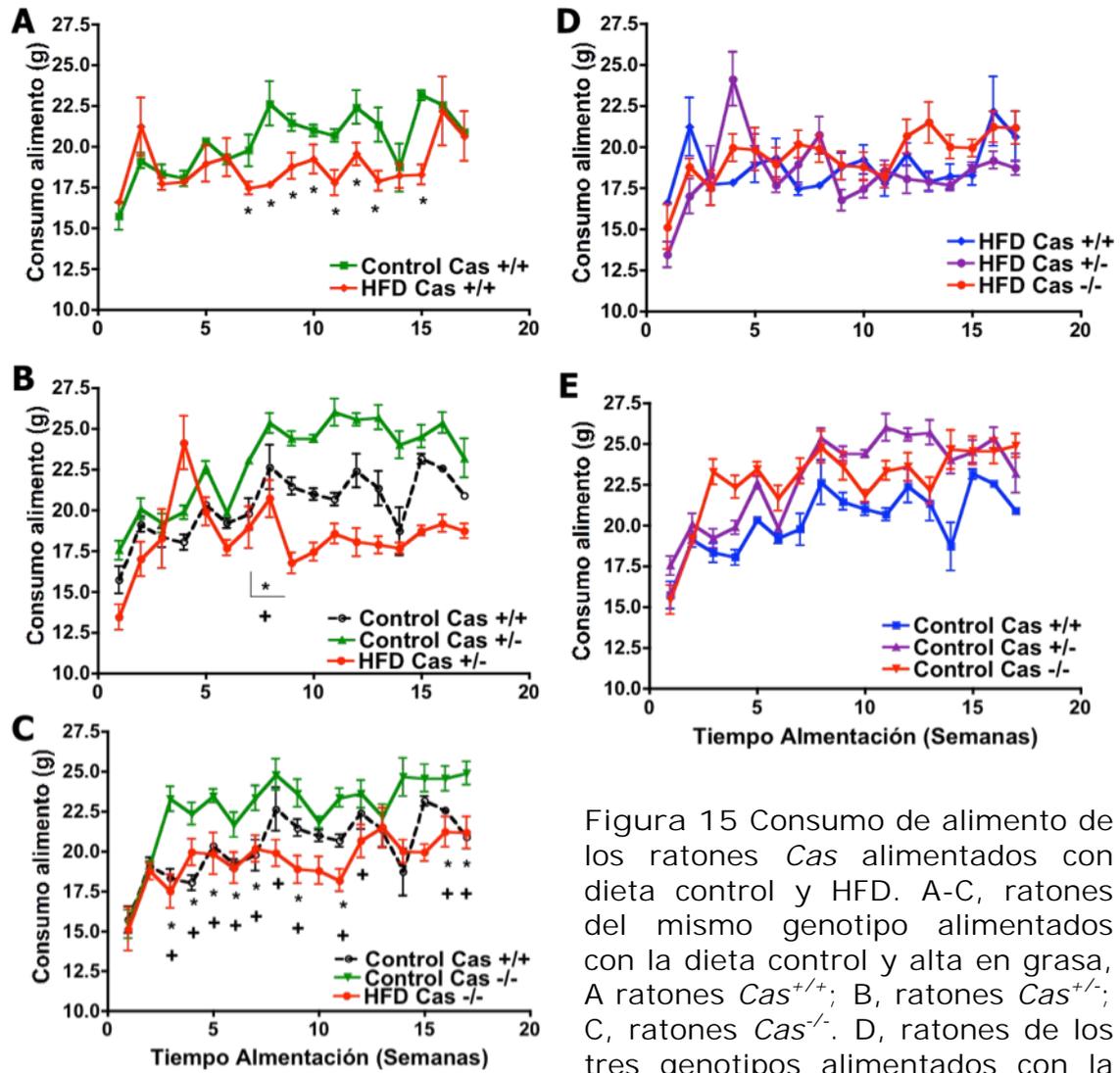


Figura 15 Consumo de alimento de los ratones *Cas* alimentados con dieta control y HFD. A-C, ratones del mismo genotipo alimentados con la dieta control y alta en grasa, A ratones *Cas*^{+/+}; B, ratones *Cas*^{+/-}; C, ratones *Cas*^{-/-}. D, ratones de los tres genotipos alimentados con la dieta control; E, ratones de los tres genotipos alimentados con la dieta alta en grasa. Los datos corresponden al primer grupo experimental, condición A. media±SD, *p<0.05, diferencia significativa con el control, *Cas*^{+/+} alimentado con dieta control; +p<0.05, diferencia significativa con los ratones del mismo genotipo alimentados con dieta control. n = 6

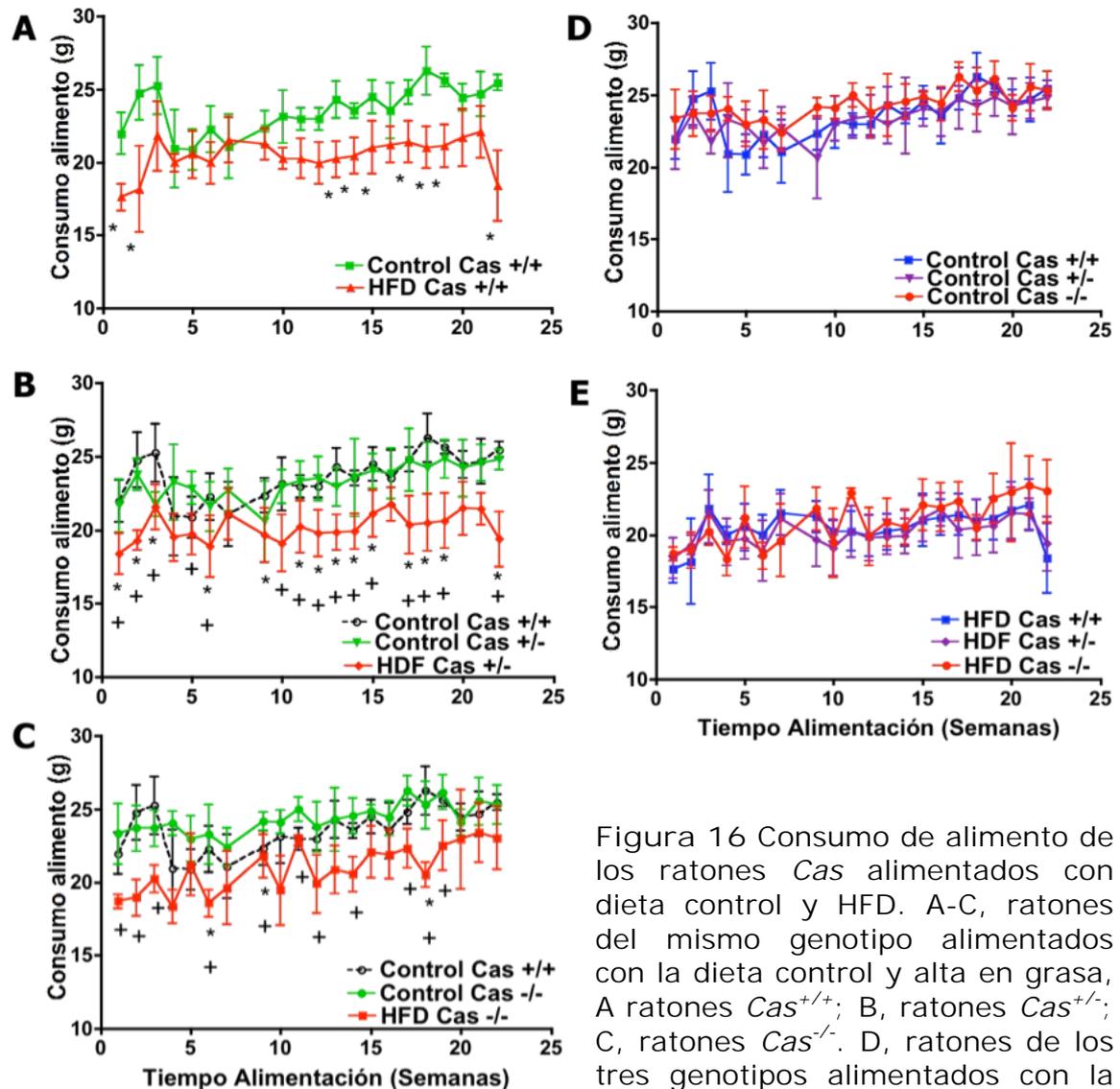


Figura 16 Consumo de alimento de los ratones *Cas* alimentados con dieta control y HFD. A-C, ratones del mismo genotipo alimentados con la dieta control y alta en grasa, A ratones *Cas* $^{+/+}$; B, ratones *Cas* $^{+/-}$; C, ratones *Cas* $^{-/-}$. D, ratones de los tres genotipos alimentados con la dieta control; E, ratones de los tres genotipos alimentados con la dieta alta en grasa. Los datos corresponden al segundo grupo experimental, condición A. media \pm SD, * $p < 0.05$, diferencia significativa con el control, *Cas* $^{+/+}$ alimentado con dieta control; + $p < 0.05$, diferencia significativa con los ratones del mismo genotipo alimentados con dieta control. n = 6

Para tener una medición más clara del consumo de alimento, se construyeron gráficas que involucran en consumo calórico en relación al peso corporal de cada individuo. Entre mayor es el peso corporal mayor debe ser el requerimiento energético, por lo tanto, si hay aumento o disminución en el consumo de alimento debe reflejarse en el valor de este parámetro. Si el valor de este parámetro es alto, quiere decir que los ratones necesitan consumir más calorías con respecto al peso corporal, lo que se traduce en un consumo mayor de alimento; por el contrario, si el

valor es pequeño, el ratón necesita consumir una cantidad de alimento menor para satisfacer su requerimiento calórico.

En las figuras 18 y 19 se muestran los resultados para el primer y segundo grupos experimentales, respectivamente. En el primer grupo, no se observan diferencias en el consumo calórico con respecto al peso corporal de los ratones de los tres genotipos e independiente de la dieta (Figura 18D y E). En ratones del segundo grupo experimental, durante las últimas semanas de alimentación hay diferencias significativas en el consumo calórico de los ratones alimentados con HFD con respecto a los alimentados con la dieta control, por lo que parece que estos animales consumieron menos calorías con respecto a su peso corporal (Figura 19A, B y C). Este efecto se ve en los tres genotipos, pero no hay diferencias entre los ratones de los distintos genotipos alimentados con la misma dieta (Figura 19D y E).

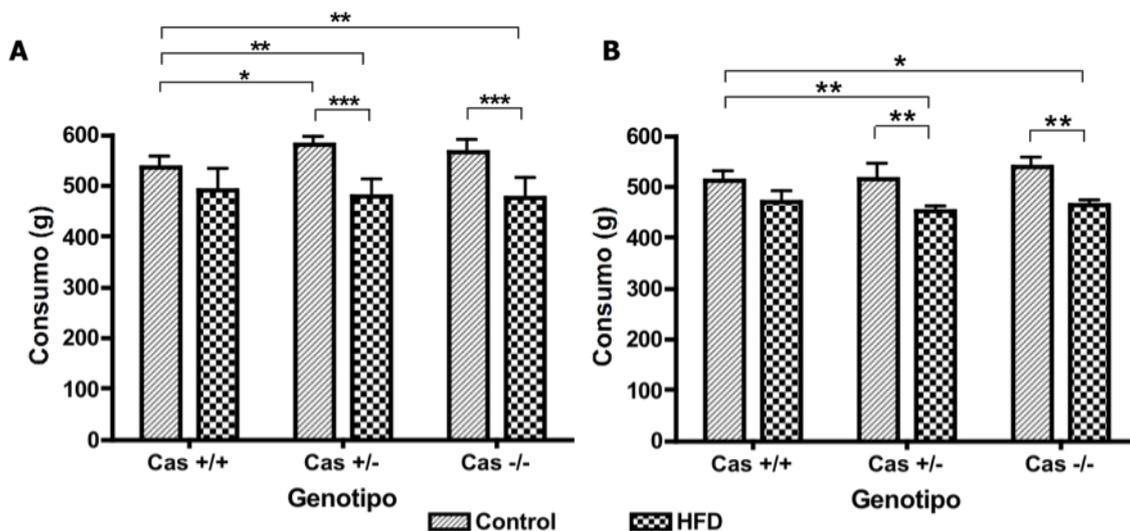


Figura 17 Consumo de alimento durante los 6 meses de alimentación de los ratones de los tres genotipos alimentados con la dieta control y HFD. A, primer grupo experimental; B, segundo grupo experimental. Media±SD; * p<0.05, **p<0.01 y ***p<.001

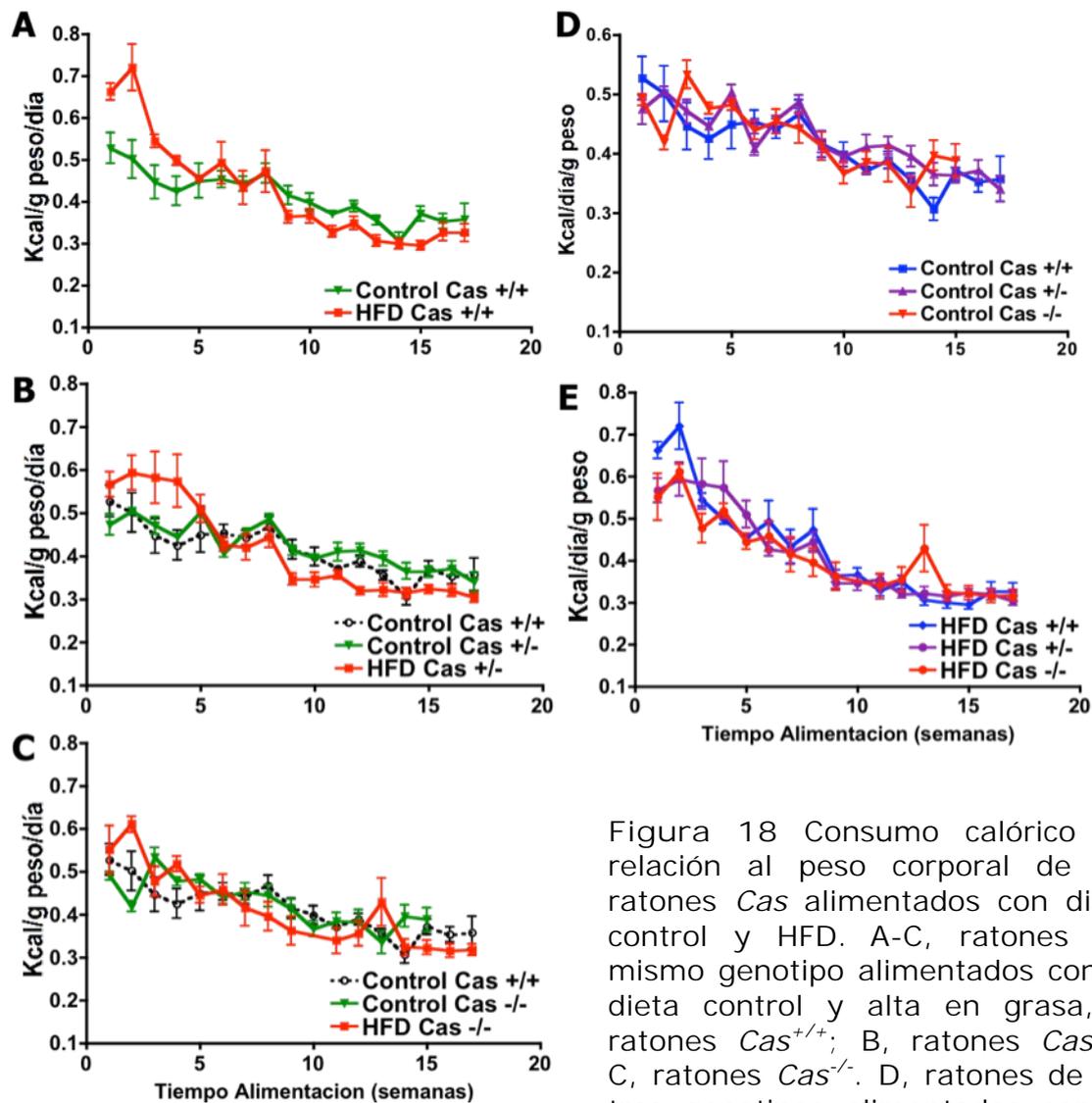


Figura 18 Consumo calórico en relación al peso corporal de los ratones *Cas* alimentados con dieta control y HFD. A-C, ratones del mismo genotipo alimentados con la dieta control y alta en grasa, A ratones *Cas*^{+/+}; B, ratones *Cas*^{+/-}; C, ratones *Cas*^{-/-}. D, ratones de los tres genotipos alimentados con la dieta control; E, ratones de los tres genotipos alimentados con la dieta alta en grasa. Los datos corresponden al primer grupo experimental, condición A. media±SD, *p<0.05, diferencia significativa con el control, *Cas*^{+/+} alimentado con dieta control; +p<0.05, diferencia significativa con los ratones del mismo genotipo alimentados con dieta control. n = 6

En la condición B, se observa que los ratones alimentados con HFD a los pocos días de alimentación su peso corporal es mayor con respecto a los que consumen alimento control, fenómeno que es más rápido en los *Cas*^{+/-} y *Cas*^{-/-} que en los silvestres como se puede observar en la figura 19, donde se muestra que las diferencias de peso corporal entre aquellos ratones que consumen la dieta control respecto a los que consumen la HDF empezó a ser a los 13 días de alimentación para los *Cas*^{+/-} y *Cas*^{-/-} y hasta los 25 días para los silvestres. También en los *Cas*^{+/-} y *Cas*^{-/-} llama la atención la

heterogeneidad del peso corporal entre los individuos en ambas dietas, lo cual se manifiesta como una desviación estándar más grande a diferencia de lo que sucede en los silvestres. Como se puede observar en la figura 20D y E, entre ratones de distinto genotipo alimentados con la misma dieta no hubo diferencias significativas en el peso corporal, a pesar de que durante los primeros 30 días de alimentación parecía que los mutantes alimentados con HFD ganaban más peso corporal que los silvestres al final del experimento el peso fue el mismo entre los genotipos.

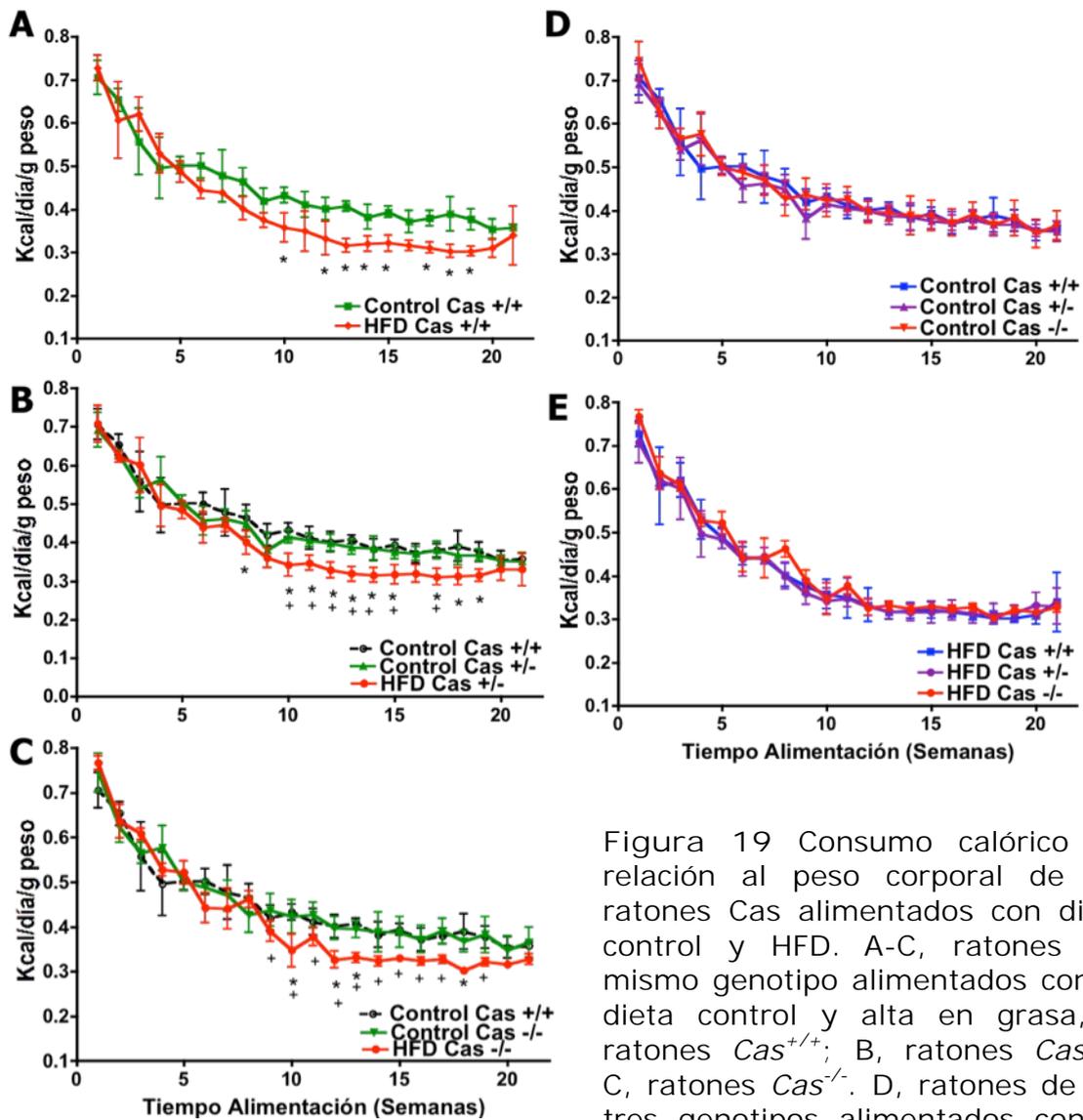


Figura 19 Consumo calórico en relación al peso corporal de los ratones Cas alimentados con dieta control y HFD. A-C, ratones del mismo genotipo alimentados con la dieta control y alta en grasa, A ratones $Cas^{+/+}$; B, ratones $Cas^{+/-}$; C, ratones $Cas^{-/-}$. D, ratones de los tres genotipos alimentados con la

dieta control; E, ratones de los tres genotipos alimentados con la dieta alta en grasa. Los datos corresponden al segundo grupo experimental, condición A. media \pm SD, * $p < 0.05$, diferencia significativa con el control, $Cas^{+/+}$ alimentado con dieta control; + $p < 0.05$, diferencia significativa con los ratones del mismo genotipo alimentados con dieta control. n = 6

En relación al consumo de alimento, en la condición C se observa que los ratones de los tres genotipos alimentados con HFD consumen menos cantidad de alimento que los alimentados con la dieta control (Figura 21), y, en el consumo global, el comportamiento es el mismo (Figura 22). Si se analiza el consumo calórico, este es menor en los ratones alimentados con HFD de los tres genotipos, efecto que fue mucho más claro en los ratones $Cas^{-/-}$ (Figura 23)

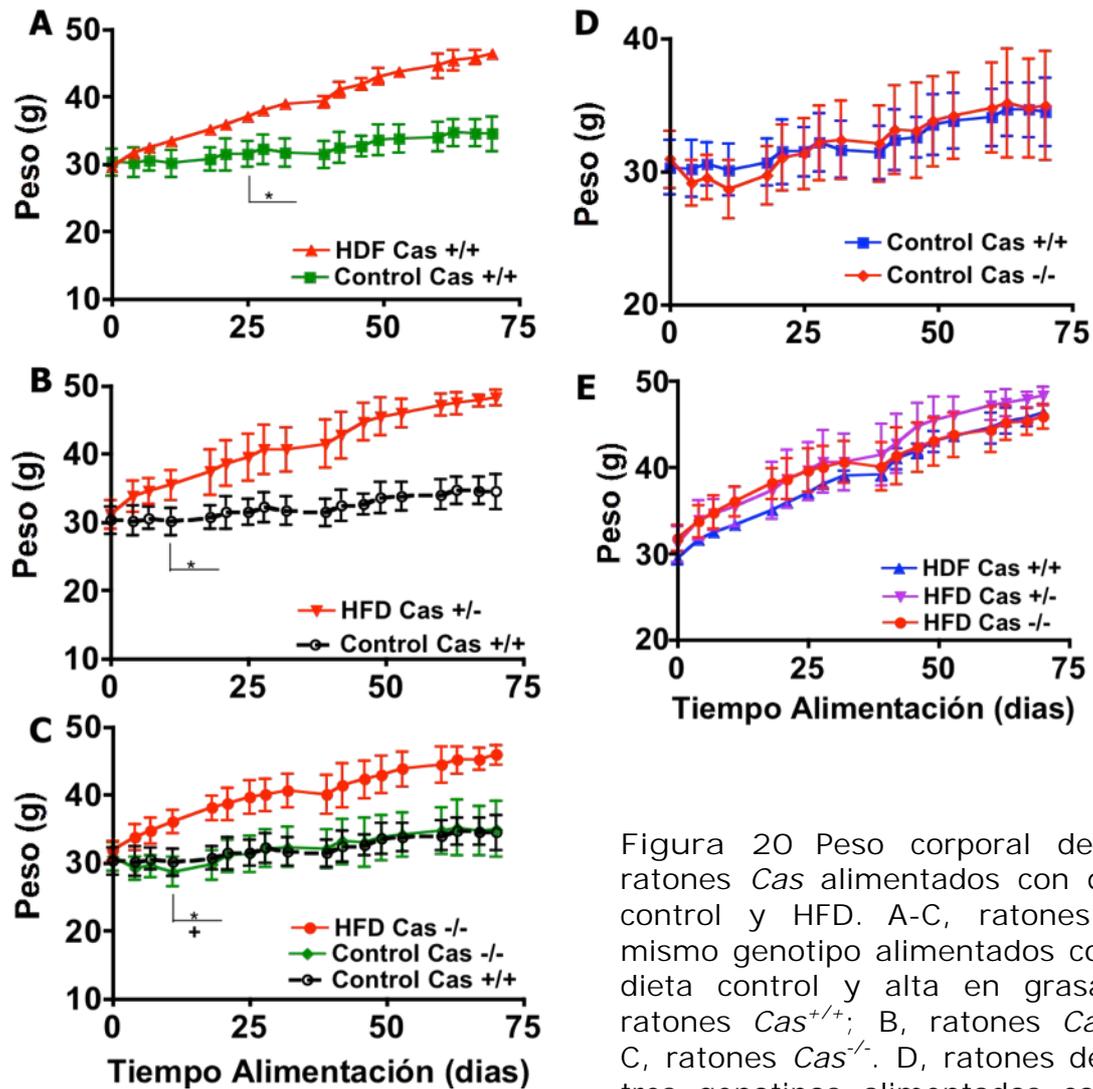


Figura 20 Peso corporal de los ratones Cas alimentados con dieta control y HFD. A-C, ratones del mismo genotipo alimentados con la dieta control y alta en grasa, A ratones $Cas^{+/+}$; B, ratones $Cas^{+/-}$; C, ratones $Cas^{-/-}$. D, ratones de los tres genotipos alimentados con la

dieta control; E, ratones de los tres genotipos alimentados con la dieta alta en grasa. Los datos a ratones de la condición C. media \pm SD, * $p < 0.05$, diferencia significativa con el control, $Cas^{+/+}$ alimentado con dieta control; + $p < 0.05$, diferencia significativa con los ratones del mismo genotipo alimentados con dieta control. n = 6

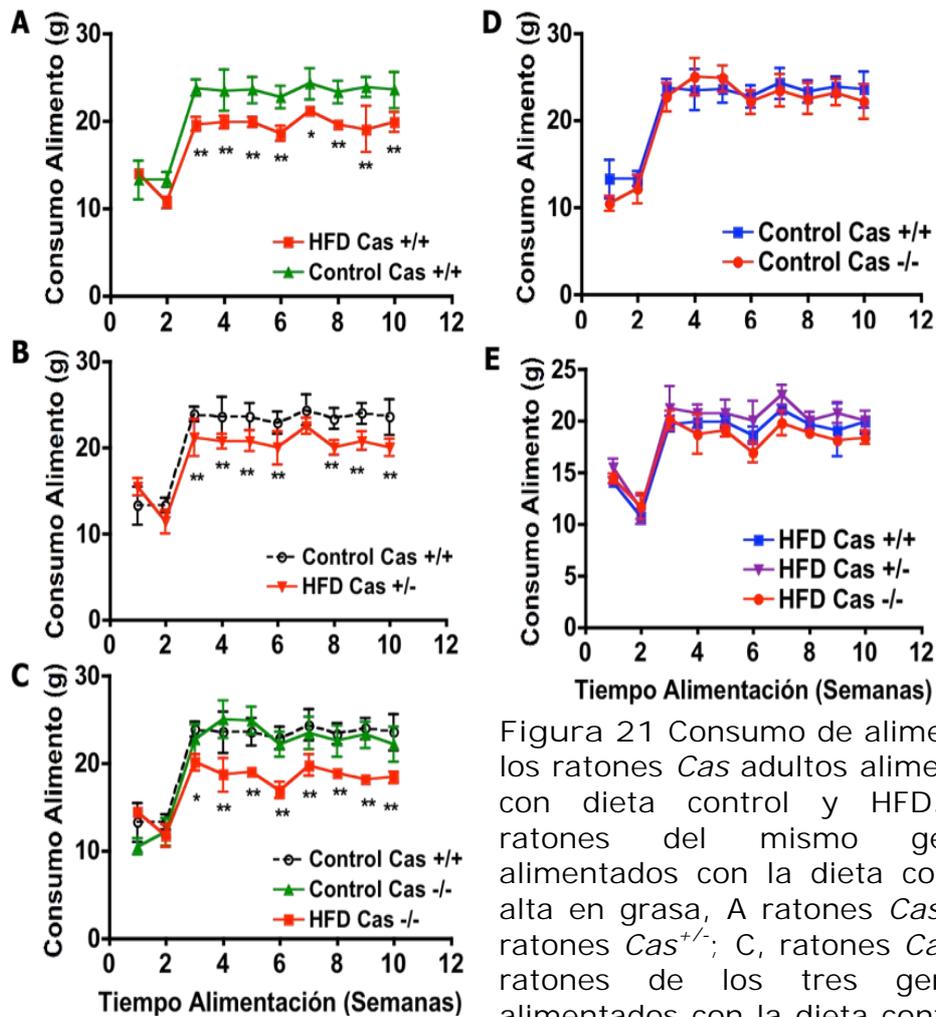


Figura 21 Consumo de alimento de los ratones *Cas* adultos alimentados con dieta control y HFD. A-C, ratones del mismo genotipo alimentados con la dieta control y alta en grasa, A ratones *Cas*^{+/+}; B, ratones *Cas*^{+/-}; C, ratones *Cas*^{-/-}. D, ratones de los tres genotipos alimentados con la dieta control; E,

ratones de los tres genotipos alimentados con la dieta alta en grasa. Los datos ratones de la condición C. media±SD, *p<0.05, diferencia significativa con el control, *Cas*^{+/+} alimentado con dieta control; +p<0.05, diferencia significativa con los ratones del mismo genotipo alimentados con dieta control, n = 6.

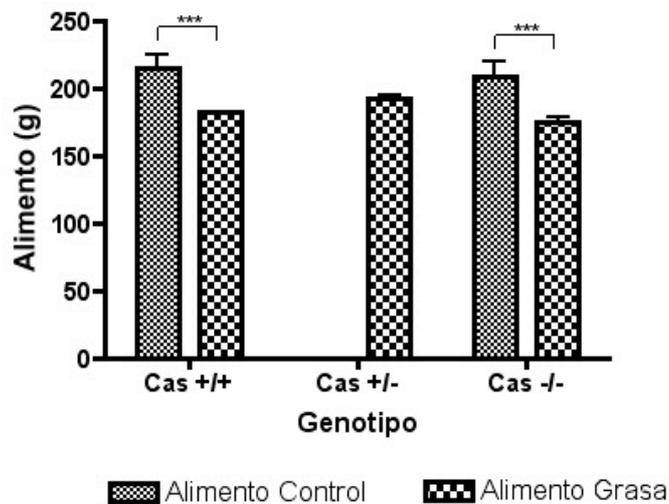
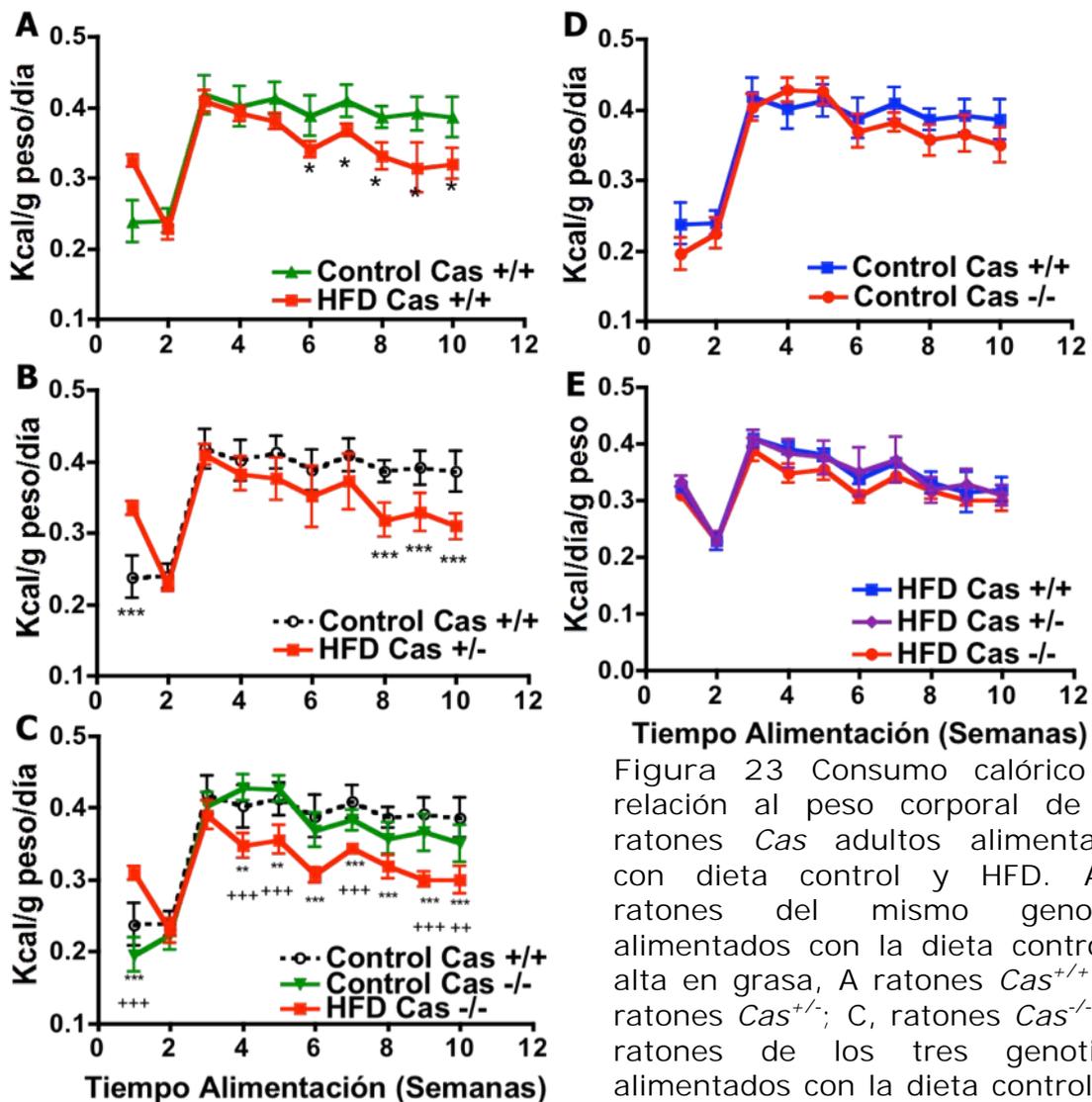


Figura 22 Consumo total de alimento de ratones *Cas* de 3 meses de edad alimentados con la dieta control y HFD. Media±SD; * p<0.05, **p<0.01 y ***p<.001, n = 6.



Tiempo Alimentación (Semanas)
 Figura 23 Consumo calórico en relación al peso corporal de los ratones *Cas* adultos alimentados con dieta control y HFD. A-C, ratones del mismo genotipo alimentados con la dieta control y alta en grasa, A ratones *Cas*^{+/+}; B, ratones *Cas*^{+/-}; C, ratones *Cas*^{-/-}. D, ratones de los tres genotipos alimentados con la dieta control; E, ratones de los tres genotipos alimentados con la dieta alta en grasa. Los datos ratones de la condición C. media±SD, *p<0.05, diferencia significativa con el control, *Cas*^{+/+} alimentado con dieta control; +p<0.05, diferencia significativa con los ratones del mismo genotipo alimentados con dieta control, n = 6.

V.4 Acumulación de grasa corporal e histología de los ratones *Cas*^{-/-} alimentados con una dieta alta en grasa

Después de que los ratones se alimentaron con la dieta control y alta en grasa se sacrificaron, se diseccionaron algunos órganos y tejidos para pesarlos y determinar si existían diferencias (Fig. 24, 25 y 26).

Al primer grupo de ratones de la condición A se les diseccionaron el hígado, corazón, cerebro, pulmón, bazo y riñones, así como también la grasa blanca y café escapular y la grasa del epidídimo. Aún cuando se

observa que en ratones $Cas^{-/-}$ el peso promedio del hígado fue menor en ambos casos (dieta control y alta en grasa), no hay diferencias significativas con los $Cas^{+/+}$ (Figura 24A). En los otros órganos, al igual que lo que sucede en el hígado, no se observan diferencias en su peso y cabe mencionar que los valores son muy homogéneos (Figura 24B-F).

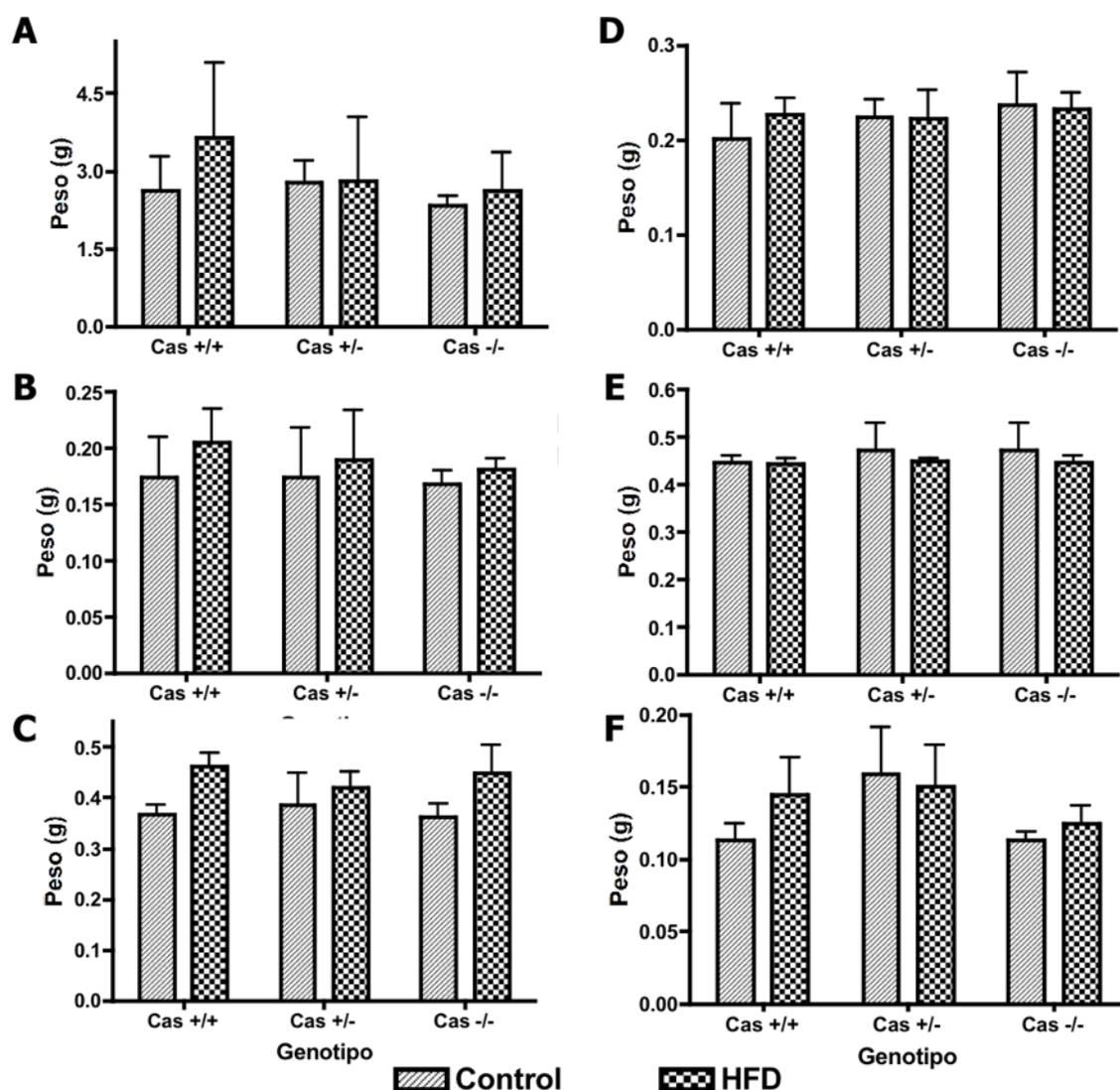
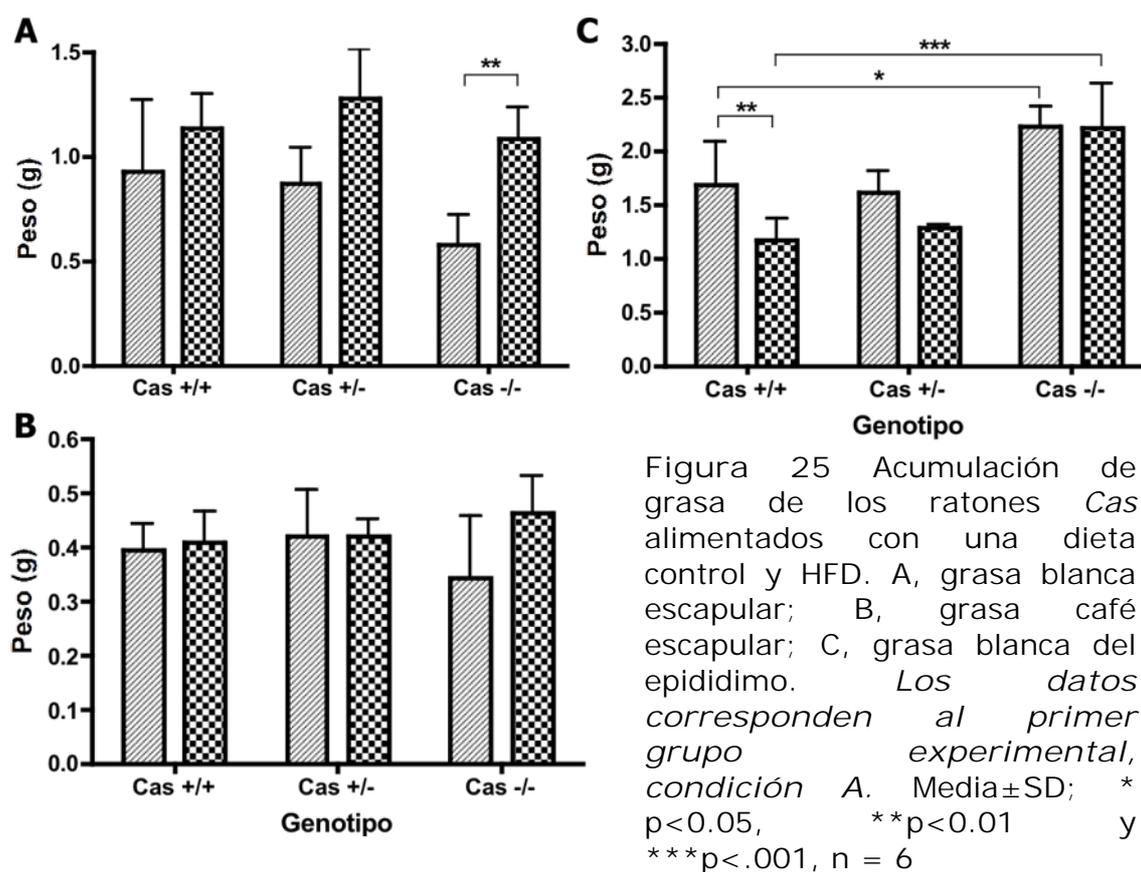


Figura 24 Peso de algunos órganos de los ratones Cas alimentados con una dieta control y HFD. A, hígado; B, corazón; C, riñón; D, pulmón; E, cerebro; F, Bazo. Los datos corresponden al primer grupo experimental, condición A. Media \pm SD; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < .001$, $n = 6$.

En la distribución de la grasa del blanca escapular, entre ratones silvestres y $Cas^{+/-}$ acumularon niveles similares de grasa independientemente de la dieta (Figura 25A). Los ratones $Cas^{-/-}$ alimentados con la dieta control acumularon 30% menos grasa que los silvestres y si se compara con los ratones silvestres y con los $Cas^{-/-}$

alimentados con la HFD este valor es un 50% menor (Figura 25A). Sin embargo, entre genotipos en la alimentación con HDF no hay diferencias (Figura 25A). En la grasa café, también escapular, no hay diferencias entre genotipos y la dieta, por lo que este tejido parece no afectarse (Figura 25B).

En la grasa blanca del epidídimo, los ratones $Cas^{-/-}$ acumularon la misma cantidad de grasa independientemente de la dieta, a diferencia de lo que pasó con los silvestres y $Cas^{+/-}$, en los que se observa que los alimentados con HDF acumulan menos grasa que los alimentados con la dieta control. Si se comparan la acumulación de grasa de los $Cas^{-/-}$ en ambas dietas con la de los silvestres se obtiene que acumularon un 15% más con respecto a los alimentados con la dieta control y 40% más si se compara con los alimentados con la HFD (Figura 25C).



En el segundo grupo experimental de ratones de la condición A, solo fue posible determinar el peso de la grasa blanca del epidídimo. En este grupo los ratones, tanto silvestres como los $Cas^{-/-}$ alimentados con la HFD,

acumularon un 40% menos grasa que los que consumieron la dieta control (Figura 26). Los ratones $Cas^{+/-}$ acumularon cantidades de grasa similar independientemente de la dieta, la cual fue mayor que la acumulada por los silvestres y $Cas^{-/-}$ alimentados con la dieta control pero menor a que acumularon cuando se alimentaron con HDF (Figura 26).

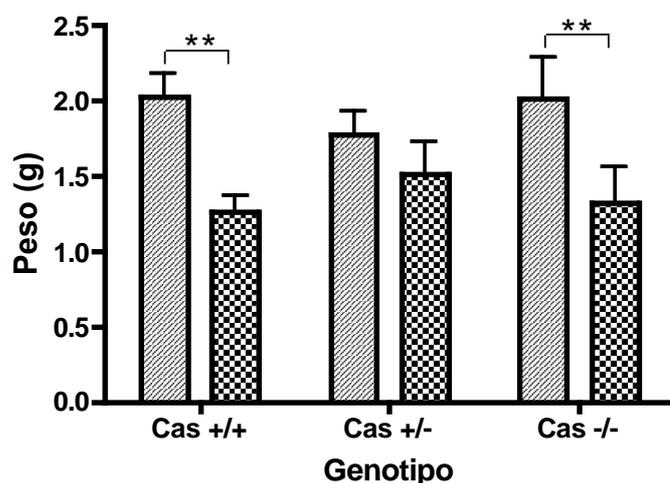


Figura 26 Acumulación de grasa del epididimo de los ratones Cas alimentados con una dieta control y HDF. Los datos corresponden al segundo grupo experimental, condición A. Media \pm SD; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < .001$, $n = 6$.

En ratones de la condición C solo se determinó el peso de algunos órganos y tejidos. En este diseño experimental en los ratones $Cas^{-/-}$ alimentados con HDF el peso del hígado es mayor a los que se alimentan con la dieta control, sin embargo, no se encontraron diferencias con los ratones silvestres alimentados con la dieta control (Figura 27A). En el peso de la grasa blanca del epidídimo no se encontraron diferencias en el peso independientemente de la dieta o el genotipo (Figura 27B). En la distribución de la grasa escapular si se encontraron algunas diferencias. Se observó que la acumulación de grasa blanca y café de este tipo es mayor en los ratones que se alimentan con HDF comparados con los que se alimentaron con la dieta control. Sin embargo, en relación al genotipo no hay diferencias, es decir, los ratones de los tres genotipos con la misma dieta se comportan similar (Figura 27C y D)

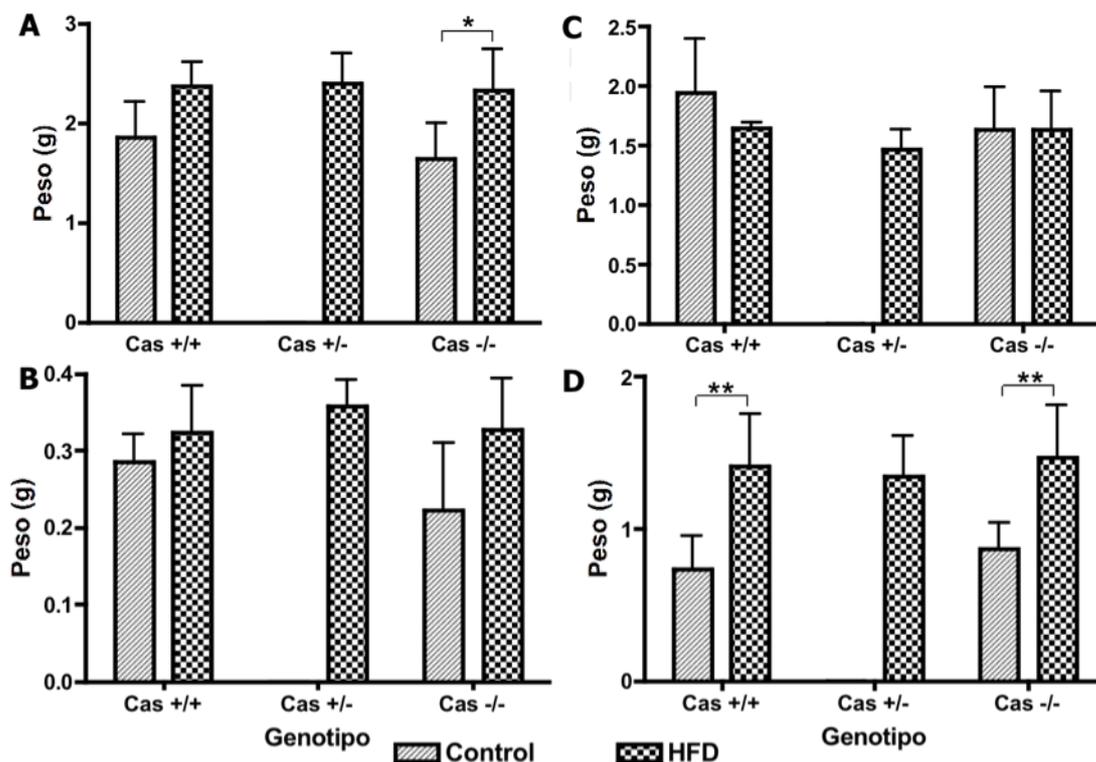


Figura 27 Peso del hígado y acumulación de grasa de ratones *Cas* adultos alimentados con una dieta control y HFD por 3 meses. A, hígado; B, grasa blanca del epididimo; C, grasa blanca escapular; D, grasa café escapular. Media±SD; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$, $n = 6$.

Se sabe que una dieta alta en grasa induce lo que se conoce como esteatosis en el hígado; este fenómeno se ha asociado con defectos en el metabolismo de los lípidos provocado por la dieta. La esteatosis generada en el hígado se puede observar en cortes histológicos teñidos con eosina-hematoxilina. Clásicamente se observa porque se forman una gran cantidad vesículas de grasa en los hepatocitos.

Para determinar si había esteatosis en el hígado de los ratones alimentados con las dietas, se hicieron cortes histológicos de 3 ratones *Cas*^{+/+} y 3 *Cas*^{-/-} de cada dieta y se tiñeron con eosina-hematoxilina (Figura 28). En los ratones silvestres y *Cas*^{-/-} que se alimentaron con la dieta control no se observa que desarrollen esteatosis, sin embargo, la morfología del los hepatocitos de los *Cas*^{-/-} no es exactamente igual a la de los silvestres; el hígado de ratones *Cas*^{-/-} muestran espacios en el citoplasma. En los ratones silvestres que se alimentaron con la HFD claramente hay desarrollo de esteatosis, se observan un gran número de vesículas de grasa

en los hepatocitos. Interesantemente en los ratones $Cas^{-/-}$ que se alimentaron con HFD no parecen haber desarrollado esteatosis como en los silvestres, si bien la morfología de los hepatocitos no es igual a los silvestres alimentados con al dieta control.

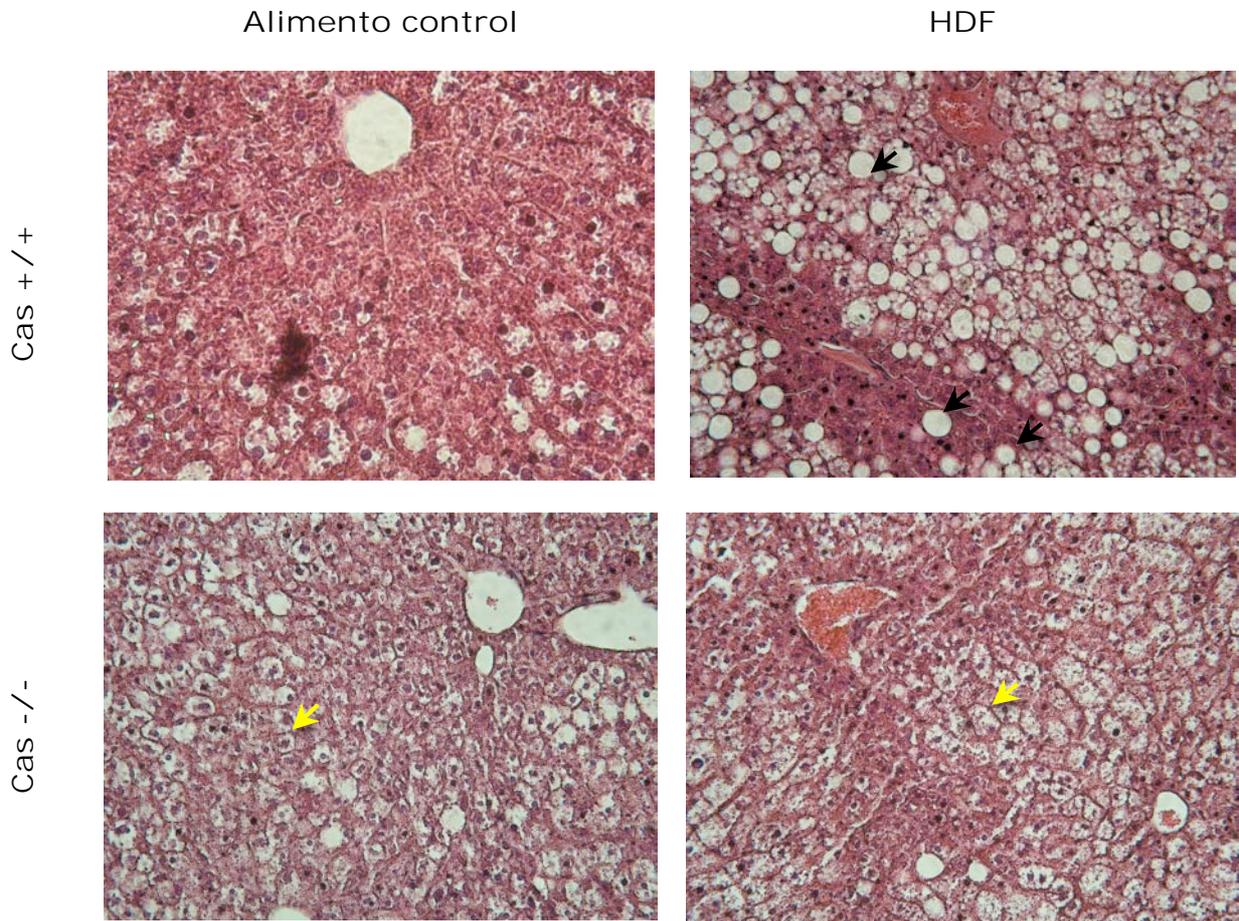


Figura 28 Cortes histológicos de hígado de ratones Cas alimentados con dieta control y alta en grasa teñidos con eosina-hematoxilina. Las flechas negras muestran las vesículas de grasa típicas de la esteatosis provocada por la HFD. Las flechas amarillas muestran células con un citoplasma más disperso pero sin vesículas de grasa observables.

V.5 Efecto de la dieta en la glucemia de los ratones Cas .

Para determinar si la dieta alta en grasa promovía hiperglucemia e intolerancia a glucosa en los ratones $Cas^{-/-}$, como ya se ha reportado para ratones silvestres, se realizó la prueba de tolerancia a glucosa. En el primer grupo experimental de la condición A, la prueba se realizó a los 30 y 60 días de alimentación obteniéndose resultados muy similares. Se observó que los ratones silvestres y $Cas^{+/-}$ desarrollaron hiperglucemia e intolerancia a glucosa cuando se alimentaron con la dieta alta en grasa. La primera se

manifiesta como una concentración mayor de glucosa en el tiempo cero y la segunda como un aumento mayor en la glucosa sanguínea después de la administración intraperitoneal (ip) de una solución de glucosa, comparado con los animales que se alimentan con la dieta control. En los ratones *Cas*^{-/-} parece que no desarrollaron hiperglucemia e intolerancia a glucosa cuando se alimentaban con la dieta alta en grasa, aunque solo para el tiempo cero hubo diferencias significativa (Figura 29).

En el segundo grupo experimental de ratones de la condición A, la prueba de tolerancia a glucosa solo se realizó al final del experimento (6 meses de alimentación). En este grupo interesantemente se observa que los ratones silvestres desarrollan intolerancia a glucosa cuando se alimentan con la HFD, lo cual no sucede con los *Cas*^{+/-} y *Cas*^{-/-}, incluso en estos ratones la tolerancia a glucosa es mejor que en los ratones alimentados con la dieta control, sin que haya diferencias en la glucemia al tiempo cero (Figura 30).

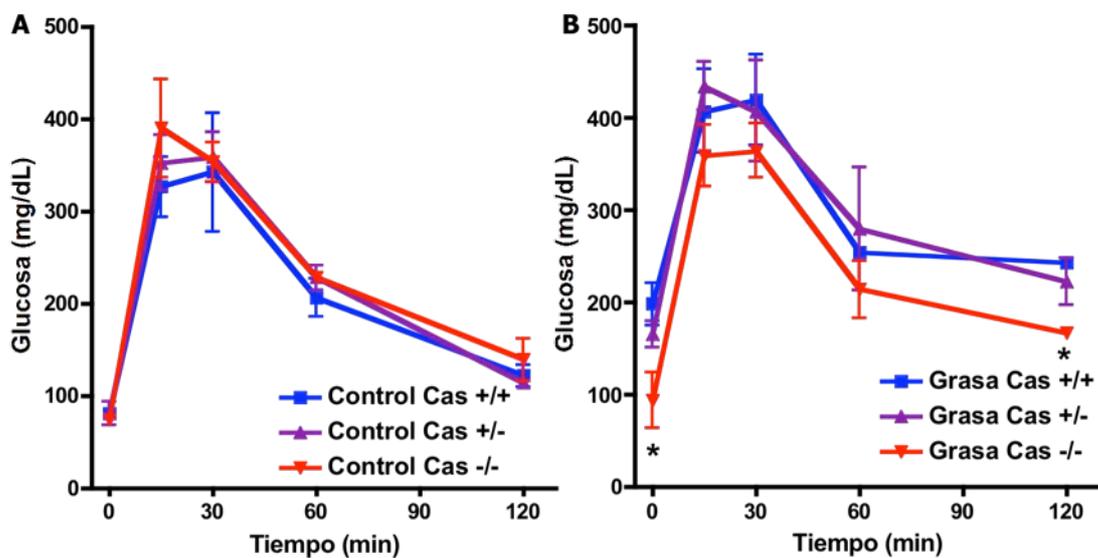


Figura 29 Prueba de tolerancia a glucosa de los ratones *Cas* de 21 días de edad alimentados con dieta control y HFD por 30 días. A, ratones alimentado con la dieta control; B, ratones alimentados con HFD. Media±SD; * p<0.05, **p<0.01 y ***p<.001

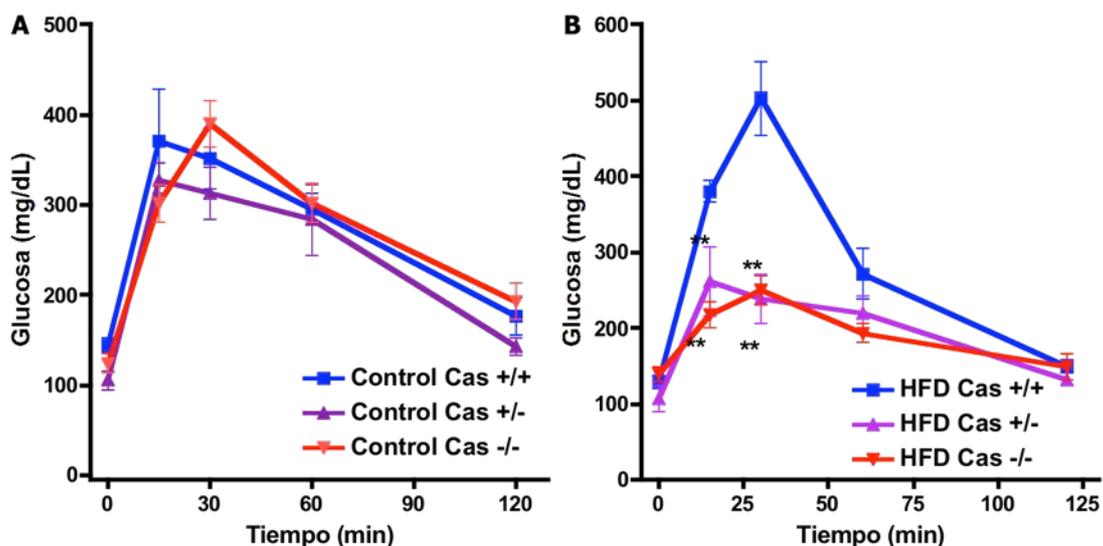


Figura 30 Prueba de tolerancia a glucosa de los ratones *Cas* de 21 días de edad alimentados con dieta control y HFD por 6 meses. A, ratones alimentado con la dieta control; B, ratones alimentados con HFD. Media±SD; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < .001$

En la condición C, se realizaron dos pruebas de tolerancia a glucosa, una a los 30 días de alimentación y al final del experimento, es decir, a los 3 meses. En la prueba de tolerancia a glucosa que se realizó a los 30 días de alimentación se encontró que los ratones de los tres genotipos se vuelven ligeramente hiperglucémicos e intolerantes a glucosa comparados con los que consumen la dieta control (Figura 31).

Cuando se realizó la prueba de tolerancia a glucosa a los tres meses de alimentación, se encontró que los ratones silvestre y *Cas*^{+/-} que se alimentan con la HFD desarrollan hiperglucemia e intolerancia a glucosa comparados con los que consumen alimento control. Interesantemente los ratone *Cas*^{-/-} que se alimentan con la HFD se comportaron igual que los que consumen alimento control y a los silvestres alimentados con la dieta control, es decir, no desarrollan hiperglucemia e intolerancia a glucosa (Figura 32).

Para tratar de determinar de manera rápida, y solo como una aproximación, si la razón de que los ratones *Cas*^{-/-} no desarrollen hiperglucemia e intolerancia glucosa sea porque haya más sensibilidad a la señalización por insulina en estos animales cuando se alimentan con una dieta alta en grasa, se determinó la tolerancia a insulina a los 3 meses de

alimentación con las dietas. Como se puede apreciar en la figura 33, mientras que en los ratones alimentados con la dieta control se comportan igual (silvestres y *Cas*^{-/-}), cuando se alimentan con la HFD el comportamiento de la concentración de glucosa de los ratones de los tres genotipos durante los primeros 60 minutos de la prueba son prácticamente iguales, por lo que no se pudo observar que en algún genotipo haya más sensibilidad a insulina. Sin embargo, es claro que solo el grupo de ratones *Cas*^{-/-} es capaz de volver casi a los niveles basales de glucosa más rápido (Figura 33).

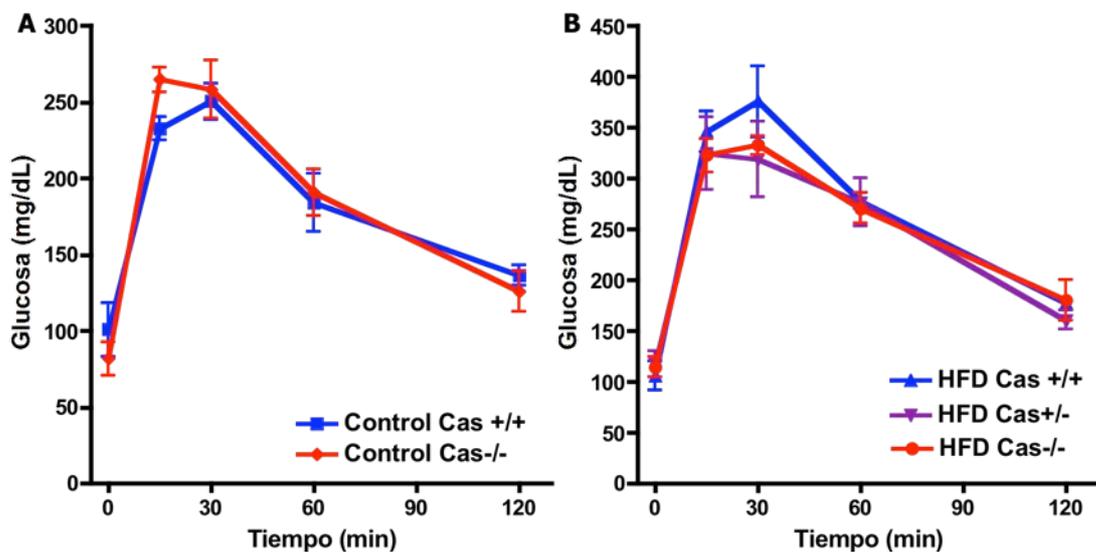


Figura 31 Prueba de tolerancia a glucosa de los ratones *Cas* de 3 meses de edad alimentados con dieta control y HFD por 30 días. A, ratones alimentado con la dieta control; B, ratones alimentados con HFD. Media±SD; * p<0.05, **p<0.01 y ***p<.001

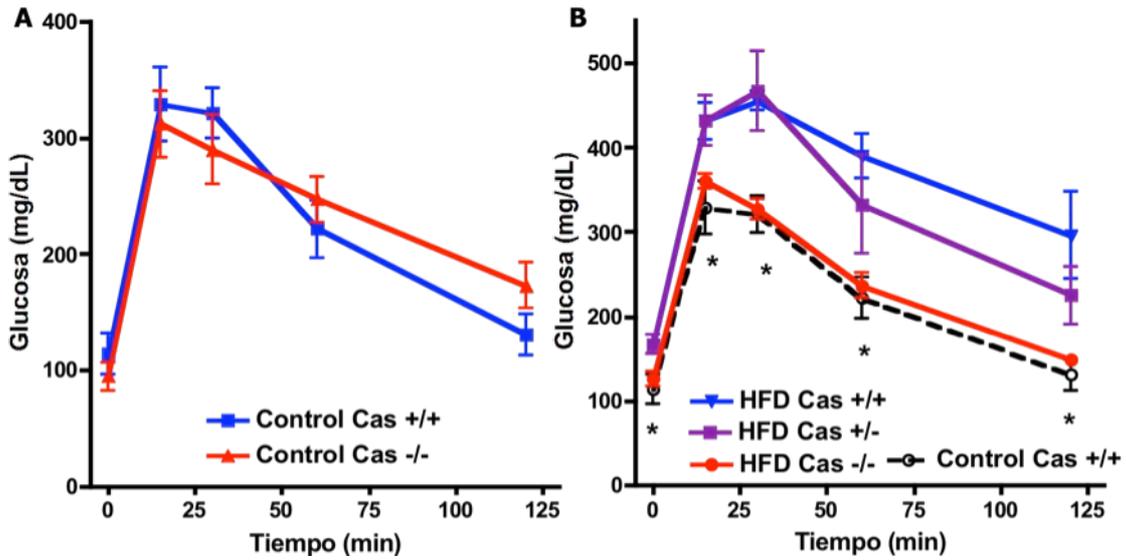


Figura 32 Prueba de tolerancia a glucosa de los ratones *Cas* de 3 meses de edad alimentados con dieta control y HFD por 3 meses. A, ratones alimentado con la dieta control; B, ratones alimentados con HFD. Media \pm SD; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < .001$

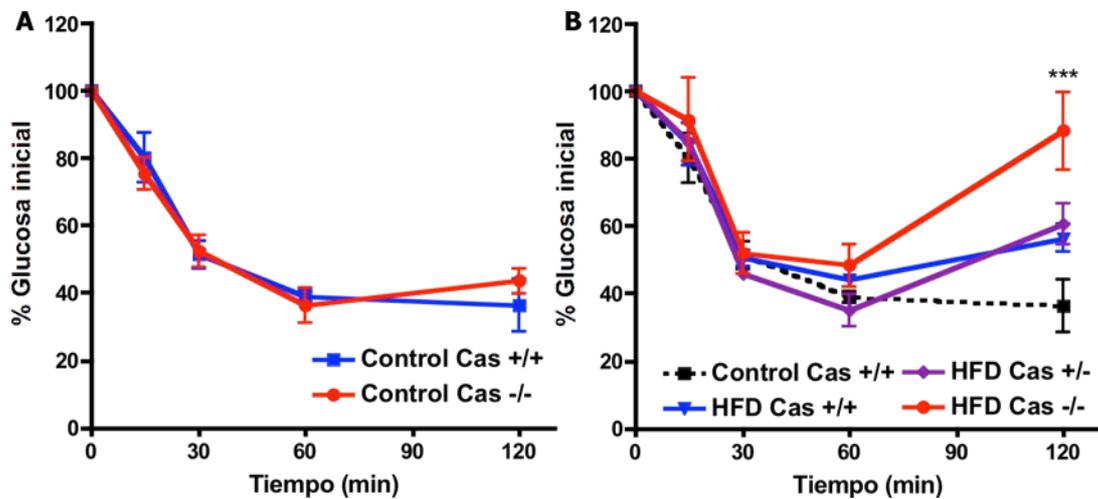


Figura 33 Prueba de tolerancia a insulina de los ratones *Cas* de 3 meses de edad alimentados con dieta control y HFD por 3 meses. A, ratones alimentado con la dieta control; B, ratones alimentados con HFD. Media \pm SD; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < .001$

VI Discusión

Con el fin de estudiar el estrés oxidativo y posible desarrollo de enfermedades generado por la falta de una enzima antioxidante, en nuestro laboratorio se generó una línea de ratones que llevan alelos no funcionales del gen que codifica la enzima catalasa. Los ratones *Cas*^{-/-} son viables y no presentan mayor daño oxidativo bajo condiciones normales en los tejidos analizados (hígado, corazón, cerebro, pulmón y riñón) comparados con los silvestres, al menos hasta los 12 meses de edad, sin embargo, los ratones *Cas*^{-/-} parecen tener menor esperanza de vida y no desarrollan algún fenotipo que indique envejecimiento prematuro o enfermedades degenerativas; los *Cas*^{+/-} tienen una esperanza de vida mayor a los *Cas*^{-/-} pero menor a los silvestres (Cuevas, 2007). Estos resultados sugieren que la función de la catalasa puede estar compensada por otros sistemas antioxidantes aunque a la fecha no se ha encontrado sobre expresión de otras enzimas antioxidantes en un modelo similar (Ho et al., 2004).

Debido a que los peroxisomas generan H₂O₂ como resultado la β -oxidación de ácidos grasos el cual es eliminado por la catalasa, en este proyecto planteamos la hipótesis que en los ratones *Cas*^{-/-} se induciría daño oxidativo, por acumulación de H₂O₂, cuando son alimentados con una dieta alta en grasa (HFD, 60% grasa del contenido calórico total). Se encontró que en ratones silvestres alimentados con HFD por 6 meses y 30 días hay una tendencia a tener mayor lipoperoxidación en el hígado, tanto en las mediciones de TBARS como DC (Fig. 9 y 10), estos resultados correlacionan con lo ya reportado, ya que en ratones alimentados con HDF hay aumento en TBARS del plasma y en la oxidación de la albúmina (Yamato et al., 2007), además bajo estas mismas condiciones de alimentación se ha visto que se promueve la expresión de NADPH oxidasas en el hígado (Sohet et al., 2009). En los ratones *Cas*^{+/-} hay mayor lipoperoxidación cuando se alimentan con HFD y esto no se observa con los *Cas*^{-/-}, en los cuales la lipoperoxidación en ambas dietas es similar a de los *Cas*^{+/+} alimentados con la dieta control. Esta tendencia se mantiene ratones alimentados por 30 días con las dieta control y HFD. Los resultados sugieren que la falta total de la catalasa no provoca efectos pro-oxidantes. Esto podría deberse a la

activación de mecanismos antioxidantes compensatorios en el caso de los *Cas^{-/-}*; en los *Cas^{+/-}* lo que podría estar sucediendo es que la presencia de la catalasa, aunque no en las concentraciones normales, no permita la activación de mecanismos compensatorios y por lo tanto lo que observamos en los ratones *Cas^{+/-}* son efectos pro-oxidantes provocados por insuficientes concentraciones de catalasa. Por otra parte, parece que la alimentación de los ratones por 30 días con HFD es suficiente para provocar cambios en el efecto pro-oxidante inducidos por diferentes concentraciones de catalasa.

Un órgano en el que hay poca expresión de catalasa, podría servir como un control de que el efecto que buscábamos solo se diera en el hígado, órgano que expresa abundantemente la enzima. Debido a este hecho decidimos explorar el daño oxidativo en el cerebro. En este órgano en general no se observan diferencias en el daño oxidativo entre genotipos y no se observa efecto en el tipo de dieta. Sin embargo, es claro que los valores tanto de TBARS como de DC, entre los dos grupos de animales que se alimentaron por 6 meses (dos repeticiones del mismo experimento) no correlacionó. Estos resultados no nos permiten concluir si hay un efecto de la dieta en este órgano o si las técnicas utilizadas para determinar efectos pro-oxidantes no fueron las adecuadas, por lo que sería interesante que en futuros experimentos se tratara de implementar metodologías alternas para determinar las ERO o el daño oxidativo que generan. Una posibilidad sería determinar la oxidación de DNA midiendo los niveles de 8-hidroxiguanina.

Además de los cambios en el estrés oxidativo de los ratones *Cas^{-/-}*, la alimentación con la dieta alta en grasa, en caso de que la catalasa fuera importante para la β oxidación de ácidos grasos en los peroxisomas, podría generar cambios en la ganancia del peso corporal de los animales. Al respecto, en base a los resultados, podemos decir que de manera global no hay diferencias entre genotipos alimentados con la misma dieta, aunque cabe mencionar que en ratones *Cas^{+/-}* y *Cas^{-/-}* hay una tendencia a haber más heterogeneidad entre individuos tanto en la dieta control como en la HFD. Sin embargo, una expectativa era que la acumulación de grasa se diera en proporciones distintas en los ratones *Cas^{-/-}*, ya que los adipocitos de grasa café que expresan *p66shc* acumulan más grasas que los *p66shc^{-/-}*

(Berniakovich et al., 2008). En nuestro modelo, encontramos diferencias en la acumulación en grasa del epidídimo en ratones alimentados con las dos dietas por 6 meses; en los *Cas^{+/+}* hay mayor acumulación de este tipo de grasa cuando se alimentan con la dieta control; este dato fue reproducible ya que se observó en los dos grupos analizados. En el caso de los *Cas^{+/-}* la acumulación de la grasa es similar en ambas dietas y se observa en los dos grupos analizados. En los *Cas^{-/-}*, un grupo se comportó como los silvestres y en el otro se observa que acumulan mucho mayor cantidad de grasa que el control y, además, es indistinta a la dieta. Estos datos de acumulación de grasa pudieran estar asociados al diferente estado pro-oxidante en los animales. Será necesario medir la lipoperoxidación en otros tejidos, por ejemplo el adiposo, para saber si se podría asociar un cambio en daño oxidativo por la falta de la catalasa.

Se sabe que la alimentación crónica con una dieta alta en grasa provoca desregulación en la ingesta de alimento, es decir, inicialmente cuando ratones se alimentan con una dieta alta en grasa el consumo de alimento es menor a los que consumen una dieta control; esto se asocia a la diferencia en el contenido calórico de la dieta. Una vez que la alimentación con la dieta es crónica, el consumo de alimento alto en grasa llega a ser similar a los que consumen alimento control. Este fenómeno se ha relacionado al desarrollo de resistencia a insulina y leptina en las células AGPR en el hipotálamo provocada por la activación de la vía IKKB/NF-kB inducida por la HFD (Zhang et al., 2008). En nuestro modelo encontramos que los ratones *Cas^{+/-}* y *Cas^{-/-}* hay una tendencia a comer menos alimento cuando se alimentan con la dieta alta en grasa por 6 meses, a diferencia de los alimentados con la dieta control y que los *Cas^{+/+}* alimentados con la dieta control. Este fenómeno es más claro cuando observamos el consumo total (durante 6 meses) de los ratones. En el grupo de ratones de la condición C, el consumo de alimento alto en grasa prácticamente en todo el periodo fue menor que el de los ratones alimentados con la dieta control, lo cual no está de acuerdo con lo observado en un modelo similar (Zhang et al., 2008). Esta observación sugiere que el comportamiento de consumo de alimento alto en grasa va a depender de la madurez de los animales; si se

alimentan en etapas jóvenes la desregulación del consumo de alimento puede ser mucho mayor que cuando ya son adultos.

A pesar de que observamos ligeras diferencias en el consumo, no hay diferencias marcadas que indiquen cambios contundentes entre los tres genotipos de ratones alimentados con la misma dieta, por lo que no podemos decir que la mutación de la catalasa tenga efectos en el consumo de alimento ya que tampoco fue posible observar cambios en el consumo calórico en relación al peso corporal de los animales.

Se ha observado que la obesidad puede provocar hiperglucemia y diabetes tipo II (Klein et al., 2004). Los mecanismos por los cuales esto sucede no se conocen con claridad, sin embargo, se sabe que previo al desarrollo de diabetes hay resistencia a insulina. La resistencia a insulina se puede definir como una condición en la cual grandes cantidades de insulina se requieren para que haya una respuesta biológica normal del organismo, así que, a medida que la resistencia a insulina aumenta, se induce una respuesta compensatoria que resulta en un estado de hiperinsulemia (Ceriello and Motz, 2004). Datos recientes muestran que, la activación de cinasa c-Jun amino terminal 1 (JNK1) específicamente en el tejido esta involucrado en la resistencia a insulina, ya que, animales *Jnk1^{-/-}* en el tejido adiposo no desarrollan esta resistencia en el hígado. La activación de JNK1 en tejido adiposo permite la secreción de IL-6 que su vez señala en el hígado y promueve la expresión de SOCS3 (Sabio et al., 2008). SOCS3 ya se ha descrito como un regulador negativo de la señalización por insulina debido a que inhibe al IR mediante una fosforilación en sitios inhibitorios (Ceriello and Motz, 2004). En los ratones *Cas^{-/-}* no se han realizado experimentos que nos indiquen si estas vías podrían estar afectadas, y aunque la actividad de la catalasa no se ha relacionado con estas vías de señalización, sería interesante saber si en los ratones *Cas^{-/-}* la obesidad induce los mismos cambios, como es el caso de la activación de la vía de JNK1, que en ratones silvestres.

Puesto que ya se sabía que la HFD provoca intolerancia a glucosa y resistencia a insulina en ratones (Sabio et al., 2008), determinamos la tolerancia a glucosa en ratones alimentados con la dieta normal y con la

HFD iniciando a los 21 días por 30 días de edad. Interesantemente y como algo no esperado, encontramos que, mientras que los ratones silvestres se vuelven intolerantes con la HDF esto no sucede en los *Cas^{-/-}*. Este fenómeno se observó claramente en los ratones que se alimentaron por 6 meses con las dietas. En ratones adultos que se alimentaron por 3 meses con las dietas también se observó que los ratones *Cas^{-/-}* no se vuelven intolerantes a glucosa por la HFD, como si sucedió con los silvestres y *Cas^{+/-}*.

La primera posibilidad en la que podemos pensar de porque los ratones *Cas^{-/-}* no se vuelvan hiperglucémicos e intolerantes a glucosa por la HFD, es que haya diferencias en señalización de insulina. Al respecto pueden estar sucediendo dos cosas. La primera es que haya más insulina y la segunda es que la sensibilidad a insulina sea mayor cuando falta la catalasa. Sin embargo, debido a que la expresión de la catalasa en células β del páncreas es prácticamente nula, es difícil pensar que la secreción de esta hormona puede estar alterada, por lo que es posible que sea la señalización. Para tratar de explicar lo que sucede con los ratones *Cas^{-/-}* es importante mencionar como es la señalización por insulina.

La insulina media sus efectos a través del IR (Figura 34), cuando esta hormona se une al IR se autofosforila en residuos de tirosina en las subunidades intracelulares β y este a su vez fosforila al IRS. Shc y Gab-1 también son blancos del IR. Una vez que los blancos del IR están fosforilados sirven de anclaje para interactuar con moléculas que contienen dominios SH2, permitiendo la inducción río abajo de la señal; una de las moléculas centrales río abajo es la fosfatidil inositol-3 cinasa (PI3K). PI3K fosforila fosfoinosítidos de la membrana plasmática, produciendo, entre ellos, fosfatidil inositol trifosfato (PIP3). El PIP3 se une y activa a la cinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK1). Uno de los principales blancos de la activación de la PI3K es la proteína cinasa B (PKB) o también conocida como Akt, Akt se recluta en la membrana y después es fosforilada por PDK1. En el hígado, Akt activo fosforila al factor transcripcional FoxO1 para mantener su localización en el citoplasma y así inhibir su actividad. FoxO1 es un regulador de la gluconeogénesis, ya que induce la expresión de varios genes de esta vía, que incluyen enzimas clave como la fosfoenol piruvato

carboxi cinasa (PEPCK) y la glucosa-6-fosfatasa. Otro de los blancos de Akt

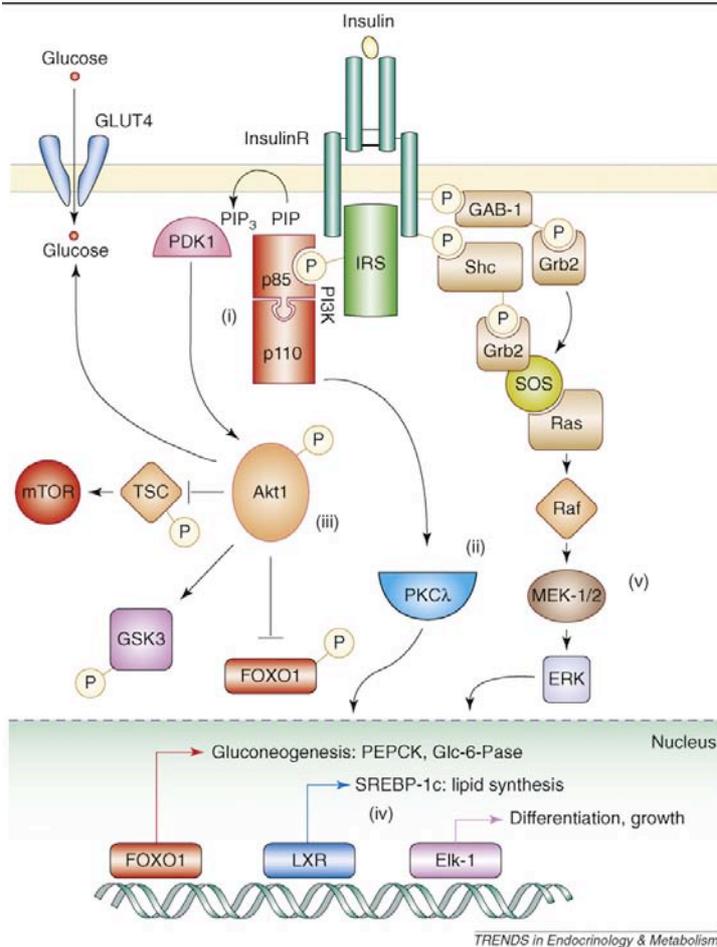


Figura 34 Vía de señalización de insulina.

Como ya se mencionó, el H_2O_2 está involucrado en la señalización de la insulina (Figura 7), además, en adipocitos la insulina induce la formación de H_2O_2 no solo por acción de las NADPH oxidasas, sino también a través de p66shc; p66shc funciona como una enzima redox inducible, se activa por estrés e induce apoptosis. p66shc se localiza en citoplasma cuando es inactiva; en el caso de su activación por insulina, se ha observado que la insulina promueve la fosforilación de p66shc en la Ser36, lo que le permite que se transloque a la mitocondria y produzca H_2O_2 . El H_2O_2 producido por p66shc parece ser importante para la fosforilación de Akt y para mantener en el citoplasma a FoxO1, además de promover la acumulación de grasa mediante la inhibición de la β oxidación de ácidos grasos en mitocondria. En ratones *p66shc*^{-/-} se ha encontrado que acumulan menos grasa perigonadal, abdominal y escapular, además de que cuando son alimentados con HFD desarrollan un grado menor de obesidad que los silvestres, efecto que se

es la glucógeno sintetasa cinasa (GSK3) que cuando es fosforilado se inactiva. La inactivación de GSK3 resulta en la activación de la glucógeno sintetasa y entonces se induce la síntesis de glucógeno. En el músculo y tejido adiposo, Akt promueve el transporte de glucosa hacia el espacio intracelular regulando el transporte vesicular del transportador de glucosa 4 (GLUT4).

explica por aumento en la termogénesis de los ratones *p66shc*^{-/-} (Berniakovich et al., 2008). Estos datos sugieren que la formación de ERO mitocondrial podría promover acumulación de grasa y obesidad. En base a lo anterior, la falta de la catalasa pudiera estar provocando acumulación de H₂O₂ y este a su vez interviniendo de manera positiva en la señalización de la insulina.

Para buscar de manera rápida y solo como una aproximación que la señalización de insulina pudiera estar afectada en los ratones *Cas*^{-/-}, tratamos de buscar si los ratones en nulos de catalasa pudieran ser más sensibles a la señalización por insulina realizando la prueba de tolerancia a insulina en ratones adultos alimentados con dieta control y HFD por 3 meses como primera aproximación. Esta prueba consiste en inyectar a los ratones 2U/kg de peso de insulina en ayunas y medir en un periodo de 2 horas como son los cambios en la concentración de glucosa sanguínea (ver métodos); si la concentración de glucosa durante los primeros minutos posterior a la inyección de insulina muestra una marcada disminución, se infiere que el ratón es más sensible a insulina. En este experimento no se observó que los ratones *Cas*^{-/-} o *Cas*^{+/-} alimentados fueran más sensibles a insulina comparado con los silvestres, sin embargo, algo interesante es que los ratones *Cas*^{-/-} prácticamente regresan a los valores de glucosa en sangre iniciales durante las dos horas posteriores a la inyección de insulina, cosa que no sucede con los silvestres (Figura 33). A pesar de no encontrar diferencias en la sensibilidad de insulina, aún es posible que hayan efectos que no pudieron ser evidenciados con el experimento que se realizó, por lo que es importante implementar futuros experimentos, como por ejemplo la determinar de los niveles de fosforilación de Akt y el IR en hígado y otros órganos, para así saber si hay mayor sensibilidad a insulina.

Recientemente se encontró que los fibroblastos de ratones *Gpx1*^{-/-} tienen mayor sensibilidad a insulina, manifestado por un aumento en Akt fosforilado, cuando se estimulan con insulina, comparado con las células silvestres. El estímulo con insulina induce la formación de ERO, que es mayor en el caso de fibroblastos *Gpx1*^{-/-}. Los ERO generados parecen tener la función de oxidar e inactivar a una PTPasa que se conoce como PTEN.

PTEN está encargada de desfosforilar al PIP3, impidiendo así la fosforilación de Akt por PDK y bloqueando la señalización de insulina (Figura 7). Se deduce entonces, que la acumulación de ERO en fibroblastos que carecen de Gpx1 permite que PTEN se inactive en mayor grado lo que resulta en mayor señalización de la insulina. El efecto del aumento de sensibilidad a insulina de los fibroblastos *Gpx1*^{-/-} se puede revertir utilizando ebselen, un compuesto que mimetiza la actividad de peroxidasa, y con la inhibición de las NADPH oxidasas con DPI (Loh et al., 2009).

Loh et al., 2009, reportaron que en los ratones *Gpx1*^{-/-}, se observa que al ser alimentados con HFD (40% del contenido calórico de la dieta proviene de la grasa) no desarrollan resistencia a insulina, medido por pruebas de tolerancia a insulina. Este efecto parece deberse a que en el músculo esquelético de ratones *Gpx1*^{-/-} hay aumento en los niveles de fosforilación de Akt y oxidación de PTEN, inducido por insulina, comparado con los silvestres; esto no se observa en otros órganos como hígado o tejido adiposo. En los ratones *Gpx1*^{-/-} la simple suplementación de la HFD con el antioxidante n-acetil cisteína (NAC) provoca resistencia a insulina al igual que en los silvestres. Cabe mencionar que en condiciones de alimentación normal no hay diferencia entre los ratones *Gpx1*^{-/-} y silvestres en las pruebas de tolerancia a insulina. Una observación importante es que, en pruebas de tolerancia a glucosa de ratones *Gpx1*^{-/-} y silvestres alimentados con HFD no hay diferencias, es decir, aun cuando estos animales parece que no desarrollan resistencia a insulina, si desarrollan intolerancia a glucosa e hiperglucemia cuando se alimentan con HDF (Loh et al., 2009).

Aunque parece haber similitudes en el fenotipo del ratón *Gpx1*^{-/-} y *Cas*^{-/-} cuando se alimentan con HFD, sumado a que ambas enzimas tienen como función la eliminación de peróxido de hidrógeno, también es cierto que existen claras diferencias. La Gpx1 es una enzima que se expresa casi de manera ubicua en mamíferos, y en la célula se localiza especialmente en la mitocondria y el citoplasma metabolizando el H₂O₂ a expensas de utilizar glutatión reducido (Brigelius-Flohe, 1999). La Gpx1 tiene una Km de afinidad por su sustrato de 1µM, mientras que en la catalasa es de 10 mM.

Estas diferencias podrían ser las responsables de que los ratones *Gpx1*^{-/-} sean más sensibles a insulina pero no más tolerantes a glucosa y sean protegidos de la hiperglucemia, como sucede con los *Cas*^{-/-} cuando se alimentan con HFD.

Debido a que los ratones *Cas*^{-/-} al ser alimentados con HFD no se vuelven intolerantes a glucosa e hiperglucémicos, pensamos que podría haber mayor sensibilidad a insulina en estos animales. En especial creemos que sería en el hígado donde principalmente se observaría este efecto, puesto que la catalasa se expresa en ese órgano abundantemente y se encontró que los ratones *Cas*^{-/-} no parecen desarrollar esteatosis hepática lo que sugiere que de alguna manera este órgano no se está afectando como normalmente sucede en la obesidad.

Lo anterior es posible porque, cuando hay grandes cantidades de glucosa en la sangre se induce la secreción de insulina por parte de las células β del páncreas para regular los niveles de glucosa a través dos procesos clave: por un lado, aumenta el transporte de glucosa hacia el citoplasma de los adipocitos y de las células del músculo esquelético, y por otro, en el hígado, se incrementa el uso de glucosa en la síntesis de glucógeno y ácidos grasos. En el hígado el transporte de glucosa prácticamente no es dependiente de insulina, y más bien en este órgano la señalización de insulina es necesaria para inducir la síntesis de glucógeno y ácidos grasos e inhibir la gluconeogénesis y, de esta manera contribuir a mantener la homeostasis de la glucosa. Por lo tanto, la resistencia a insulina en el hígado puede ser la causa de hiperglucemia, debido a la falta de una señal que inhiba la gluconeogénesis y que promueva el uso de glucosa en síntesis de glucógeno y ácidos grasos. Esto no parece estar sucediendo en los ratones *Cas*^{-/-} cuando se alimentan con HFD, ya que estos ratones mantienen sus niveles de glucosa normales a pesar de la dieta y la obesidad. Sin embargo, la tolerancia a glucosa que presentan los ratones *Cas*^{-/-} alimentados con HFD no podría depender del hígado, por lo que es necesario explorar que sucede con el tejido adiposo y músculo esquelético.

Es importante mencionar que, pueden haber otras vías de señalización afectadas en los ratones *Cas*^{-/-}. Recientemente se encontró que

en ratones que carecen de acetil-CoA deshidrogenasa de ácidos grasos de cadena larga (VLCAD) de la mitocondria, desarrollan menor grado de resistencia a insulina e intolerancia a glucosa cuando se alimentan con HFD que los ratones silvestres. Al parecer, lo que sucede en los ratones *Vlcad*^{-/-} es que hay sobre expresión de enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria como una respuesta a la falta de la VLCAD, esto provoca aumento en la respiración y oxidación de grasa. Entre las enzimas que se sobre-expresan se encontró a PPAR α (Zhang et al.). PPAR α se ha observado que se sobre-expresa en respuesta a la deficiencia acil-CoA oxidasa de los peroxisomas para promover la expresión de las maquinaria de oxidación de ácidos grasos en la mitocondrial (Fan et al., 1998). En ratón, los agonistas del PPAR α promueven la expresión de catalasa en el hígado y riñón (Hiuge et al., 2007) y en el tejido adiposo de humanos y ratón el PPAR γ , otro miembro de los PPARs, parece regular la expresión de la catalasa (Okuno et al., 2008; Okuno et al.). La falta de la catalasa, al ser una enzima principalmente del peroxisoma, también podría provocar cambios en los niveles de expresión de los PPARs. Por tal razón es importante no perder de vista que los efectos observados en los ratones *Cas*^{-/-} además podrían deberse a esto.

Con base en los resultados de este trabajo y con estudios que se han realizado en el campo, sugerimos que, la falta de la catalasa podría estar interviniendo en la señalización de la insulina positivamente como se muestra en la figura 35. Si bien, considerando la localización de la enzima en la célula, es aún difícil pensar cómo podría estar sucediendo esto, futuros experimentos serán necesarios para probar que esta sea la causa del fenotipo observado en los ratones *Cas*^{-/-}.

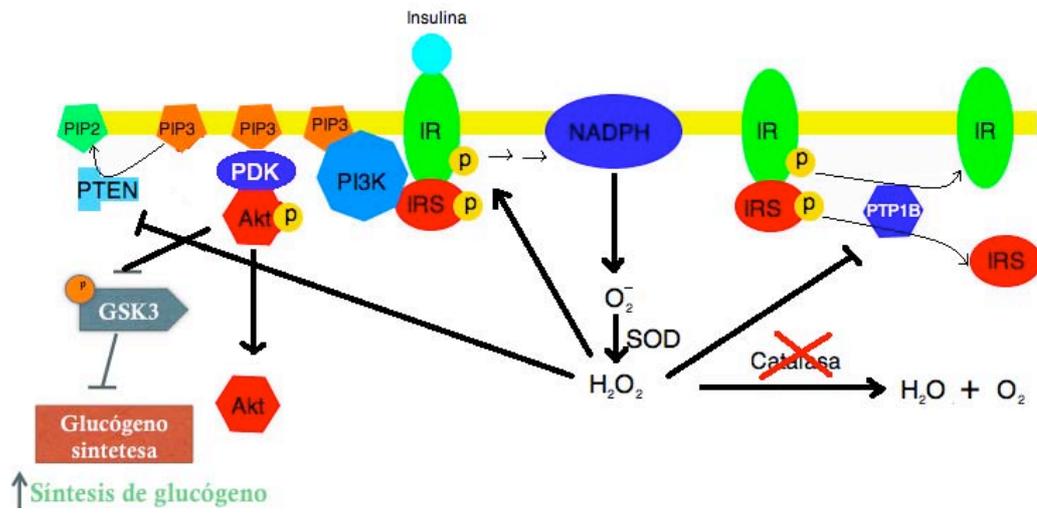


Figura 35 Mecanismo propuesto mediante el cual la falta de la catalasa participa positivamente la señalización de la insulina. La acumulación de H_2O_2 provocada por la falta de la catalasa sería capaz de inhibir la actividad de las PTPasas repercutiendo positivamente en la señalización de la insulina.

VII Conclusiones

- La alimentación con HFD induce un aumento en la lipoperoxidación del hígado en ratones $Cas^{+/+}$ y $Cas^{+/-}$.
- En los ratones $Cas^{-/-}$ no hay incremento de la lipoperoxidación en el hígado cuando se alimentan con HFD comparado con los ratones silvestres.
- Los ratones $Cas^{+/-}$ muestran un incremento en la lipoperoxidación en el hígado cuando se alimentan con HFD comparado con los ratones silvestres.
- La falta de la catalasa no mostró algún efecto en el grado de obesidad generado por una HFD.
- Los ratones $Cas^{-/-}$ no desarrollaron hiperglucemia e intolerancia a glucosa cuando se alimentan con una HFD a diferencia de los ratones silvestres.
- La HFD no provoca esteatosis hepática como sucede en los ratones silvestres.

VIII Perspectivas

- Es importante determinar si en los ratones *Cas^{-/-}* hay mayores niveles de insulina que en los ratones silvestres, y que esta sea la causa del fenotipo que se observa cuando se alimentan con una dieta alta en grasa. Para esto se pueden implementar experimentos de ELISA para medir en suero los niveles de insulina.
- En cultivo de hepatocitos y MEFs de ratones *Cas^{-/-}* y *Cas^{+/+}* determinar si hay diferencias en los niveles de fosforilación de Akt y GSK3 inducidos por insulina, para de esta manera determinar si la falta de la catalasa promueve sensibilidad a insulina.
- En ratones *Cas^{-/-}* y silvestres que se alimentan con HDF determinar la fosforilación de Akt, IR y GSK3 cuando se inyecta insulina, en hígado, tejido adiposo y tejido muscular, para observar si existen diferencias en la sensibilidad de insulina en los ratones nulos de catalasa y esta sea la razón del fenotipo que se observó.
- Implementar metodologías *in vivo* e *in vitro* que permitan medir si la falta de la catalasa en realidad está promoviendo aumento de las ERO. *In vitro* se podría hacer uso de fluoróforos sensibles a ERO, como por ejemplo DCF, para determinar si en MEFs o hepatocitos, la insulina induce mayor formación de ERO en células que carecen de catalasa. *In vivo*, una posibilidad es medir la acumulación de daño oxidativo en el DNA, como es el caso de la medición de 8-hidroxiguanina. Otra posibilidad es inyectar dihidroetidido, que es un compuesto que al oxidarse por ERO se convierte en etidio y se une al DNA, en los ratones y después de un tiempo sacrificar a los animales y en cortes histológicos observar si hay diferencias en la acumulación de etidio en los núcleos, lo que indicaría mayor o menor cantidad de ERO.
- En el hígado de ratones que se alimenten con HFD sería interesante determinar los niveles de expresión de las enzimas de

gluconoogénesis, PPAR γ y PPAR α , así como también enzimas involucradas en la β oxidación de ácidos grasos. Para de esta manera saber si la falta de catalasa pudiera afectando en las vías metabólicas.

IX Materiales y métodos

IX.1 Obtención de los ratones mutantes de catalasa de los diferentes genotipos

Los ratones mutantes de la catalasa fueron generados por manipulación genética en células troncales embriónicas, mediante *gene targeting* (D. H. y L. C., no publicado), dando como resultado la eliminación de los exones 3 al 7 en el alelo mutado (Figura 9)

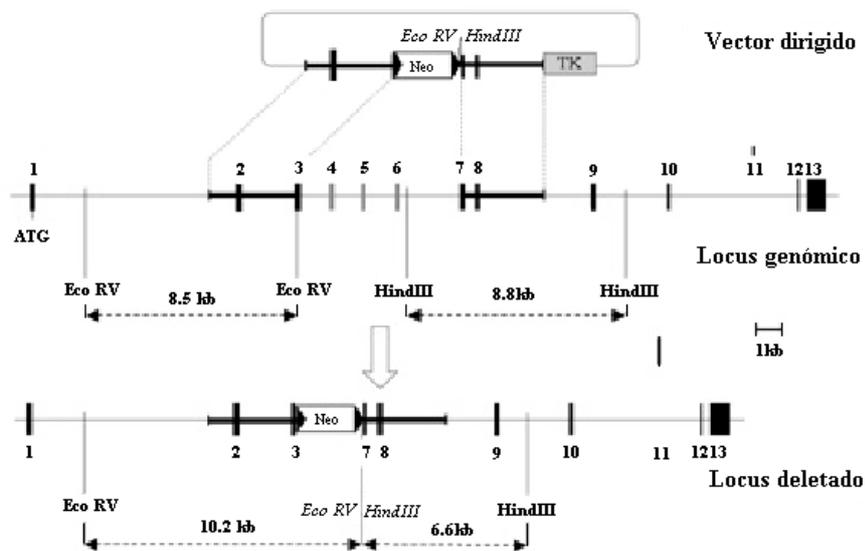


Figura 36 Escisión del gen *Cas* de ratón. Se muestra el vector dirigido (en la parte posterior), el mapa de restricción parcial del locus *Cas* del ratón (en medio) y el locus deletado (parte inferior). Los números corresponden a cada exón. La región que fue deletada carece de los exones 3 al 7. (Modificada de tesis de doctorado de David Hernández)

Para obtener ratones mutantes de catalasa de los tres genotipos ($Cas^{+/+}$, $Cas^{+/-}$ y $Cas^{-/-}$) se planearon las siguientes cruzas:

Cas	+	+
+	++	++
+	++	++

Cas	+	+
+	++	++
-	+ -	+ -

Cas	-	-
-	--	--
-	--	--

IX.2 Determinación del genotipo

Los ratones mutantes para catalasa no presentan algún fenotipo que los caracterice fácilmente de los silvestres, por lo que es necesario determinar su genotipo, para esto se usan dos métodos, el primero es midiendo la descomposición del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el otro mediante la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR).

IX.3 Determinación del genotipo por descomposición del peróxido de hidrógeno

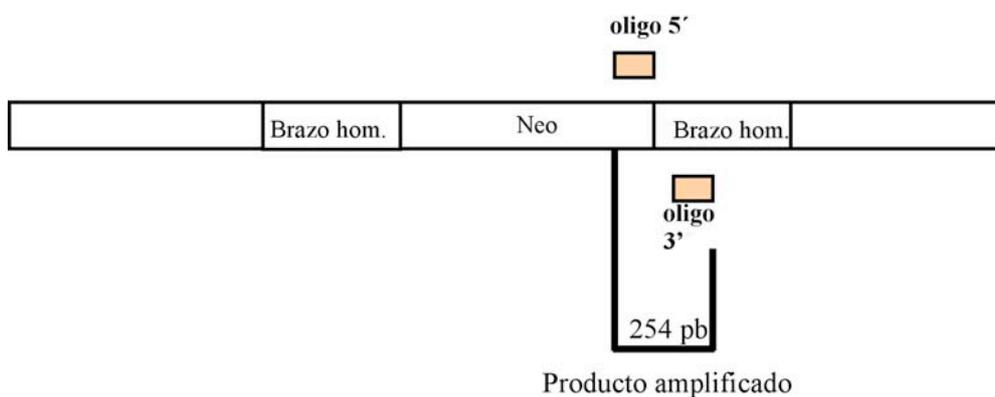
El genotipo de los ratones se hace a los 20 o 21 días de nacidos, para esto se obtienen 5 µL de sangre de la cola de los animales, cortando 5 mm de cola aproximadamente, y se colocan inmediatamente en un tubo eppendorf de 500 µL, graduado, que contiene 50 µL de H₂O₂ al 30% (v/v) (Sigma) y se tapa enseguida. Se observa el volumen generado de burbujas por la reacción (Cuevas, 2007).

IX.4 Determinación del genotipo mediante la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR)

Las condiciones y el diseño de los oligonucleótidos para éste método fue previamente desarrollado (Cuevas, 2006). La zona que se amplifica en la reacción se muestran en la Figura 37.

Las características de cada oligonucleótido son las siguientes:

A)



B)

B)

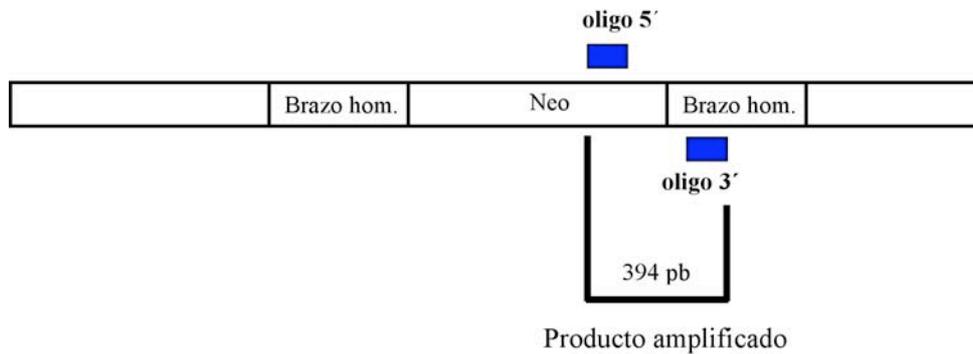


Figura 37 Mapa de restricción parcial del gen Cas del ratón para identificar por PCR el alelo mutado y no mutado. A) Se representa el producto amplificado que identifica el alelo no mutado. B) Representación de la región que amplifica una parte del caset Neo para identificar el alelo mutado Cas del ratón. Tomado de: (Cuevas, 2007)

Para el alelo mutado

Oligo 5'; Secuencia 5'-3': TGT CAT TCT ATT CTG GGG GG

Oligo 3'; Secuencia 5'-3': GGA CGA CAC TTA TGA AGC AAT C

Para el alelo no mutado

Oligo 5'; Secuencia 5'-3': TTG TTA CCG CTT TCC TAA ACT CC

Oligo 3'; Secuencia 5'-3': TGA CTT CCT TGG TCA GAT CAA ATG

IX.5 Extracción del DNA geonómico para la reacción de PCR

El DNA se obtiene de la cola de los ratones, para esto se colectan 3 mm, aproximadamente de la cola del ratón en un tubo eppendorf de 500 µL, se puede preservar por unos días a -20° C. Se agregan 200 ml de buffer de lisis a cada muestra y se incuba por 20' a 95° C, pasado el tiempo se dejan enfriar y se les agrega 5 ml de proteinasa K (20 mg/ml), se mezcla por inmersión para asegurarse de que el tejido quede sumergido en el buffer, se incuba a 55° C por 5 horas (se puede dejar incubando toda la noche), después se procede a agitar en vortex durante aproximadamente 5'' para disgregar el tejido, y se incuba a 95° C durante 5' para inactivar la

proteinasas K restante. Se centrifuga a 13000 *g* por 20 min a 4° C, se recupera el sobrenadante que es donde se encuentra el DNA. Éste se puede preservar a -20° C.

IX.6 Reacción de PCR

Se prepara una mezcla de reacción como se describe a continuación. El número de reacciones a realizarse (número de muestras) se multiplica por la cantidad de cada solución y/o reactivo, esta cantidad se coloca en un tubo eppendorf de 1 mL, lo último que se adiciona es la enzima, se mezcla. Posteriormente se adicionan 45 µL de la mezcla de reacción a cada muestra (5 µL de DNA en un tubo de 200 µL para PCR).

Mezcla de reacción:

1 µL	Oligonucleótido 5' (0.1 µg/µL)
1 µL	Oligonucleótido 3' (0.1 µg/µL)
1 µL	dNTP's 10mM (0.5 mM concentración final)
5 µL	Buffer 10x Tag
0.2 µL	Tag Planitum DNA polimerasa (Invitrogene)
5 µL	Muestra de DNA
36.8 µL	H ₂ O

La reacción se lleva a cabo en un termociclador Mastercycler® gradient, en las condiciones que se muestran en la tabla 3.

Tabla 3 Condiciones de PCR para identificar el genotipo de los ratones mutantes

Alelo mutado	Alelo no mutado	
94° C	94° C	3 min (desnaturalización inicial)
94° C	94° C	1 min
56° C	54° C	1 min (35 ciclos)
72° C	72° C	1 min
72° C	72° C	7 min (elongación final)

IX.7 Alimentación de los ratones con dieta alta en grasa

Se formaron dos grupos de al menos 6 ratones de cada genotipo los cuales se alimentaron con una dieta alta en grasas que se sabe induce obesidad y una dieta control (Diets Research, Inc.) (Tabla 4). La alimentación con éstas dietas inició a los 20 o 21 días del nacimiento, justo después de ser destetados (Tabla 1). Solo se utilizaron ratones macho para el ensayo. En otro diseño experimental se alimentaron ratones macho a partir de los 3 meses de edad con la dieta control o alta en grasa (Tabla 2). Se determinó el peso corporal de cada ratón 2 veces por semana y el consumo de alimento de cada individuo semanalmente. La alimentación fue *Ad limitum*.

Tabla 4 Composición de las dietas utilizadas

Dieta (#Catálogo)	D12450B (Control)		D12492	
	gm (%)	Kcal%	gm (%)	Kcal%
Proteína	19.2	20	26.2	20
Carbohidratos	67.3	70	26.3	20
Grasa	4.3	10	34.9	60

IX.8 Prueba de tolerancia a glucosa

Esta prueba se ha realizado a los 30 y 60 días desde que inició el ensayo con las dietas, así como al término de éste ensayo (6 meses de alimentación). A los ratones se les retira el alimento 12 horas antes del ensayo (19:00 Hrs del día anterior al ensayo) con el fin de que se encuentren en ayunas, lo que permite que tengamos menor variación en las mediciones de glucosa. A cada ratón se le administra 2 mg/Kg de peso corporal de glucosa vía intraperitoneal (ip), en el caso de los ratones alimentados solo por 30 o 60 días con las distintas dietas, y 1 mg/kg de peso corporal para los ratones que se alimentaron por 6 meses, esto es porque hemos observado que a medida que los ratones se hacen viejos

desarrollan intolerancia a glucosa de manera natural. Inmediatamente después de la inyección se mide la concentración de glucosa de la sangre obtenida de la cola, cortando aproximadamente 3 mm de cola, utilizando un glucómetro Asencia Countour®. La medición se hace al tiempo 0, 15, 30, 60 y 120 min posterior a la inyección de glucosa.

IX.9 Sacrificio de los ratones

Al término del ensayo los animales se sacrificaron por dislocación cervical aproximadamente a las 10:00 hrs. Inmediatamente después se prosiguió a la disección de los órganos de interés para posteriores análisis. Los órganos que se disecaron fueron corazón, riñón, cerebro, pulmón e hígado; del cerebro se extrajo el hipotálamo. También se obtuvieron el tejido adiposo localizado en el epidídimo así como la grasa blanca y café escapular. Inmediatamente después, los órganos o tejidos se pesaron y se congelaron en nitrógeno líquido. Las muestras se preservaron en un ultracongelador a -79° C para su posterior análisis.

IX.10 Determinación del daño oxidativo en los tejidos de ratón

IX.10.1 Homogenizado de tejidos

El tejido a utilizar y se pesa y se coloca en una solución de PBS con una relación 1:10 del tejido con el PBS (NaCl 136 mM, KCl 2.6 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.76 mM; todos Sigma, USA) se homogeniza en un homogenizador de vidrio con pistilo teniendo cuidado que tanto el PBS como el tejido deben estar fríos. El homogenizado se divide en alícuotas para las determinaciones posteriores y se guardan en el Revco, antes se toma una para la determinación de proteína.

IX.10.2 Determinación de proteína por el método de Lowry

En tubos de ensaye previamente etiquetados se colocan los volúmenes necesarios de solución C, así como del patrón (para la curva de calibración) en el que se utiliza albúmina (BSA) como referencia, ó de la muestra y el agua. Se deja 10 min y se agrega la solución D (reactivo de Folin diluido) y se deja 30 min para que se desarrolle el color. Pasado éste tiempo se mide la absorbancia de cada muestra en un espectrofotómetro a la longitud de onda de 600 nm ajustando a 0 con el blanco. El detalle de los volúmenes

utilizados se muestran la tabla 5 y 6. Ver la preparación de las soluciones en los anexos.

Se construye la curva de calibración. Los los valores de absorbancia de las muestras se interpolan en la curva de calibrado, los valores se expresan en mg de proteína/mL.

Tabla 5 Curva de calibración para determinar la concentración de proteína en los tejidos homogenizados.

No. tubo	H ₂ O	BSA (2 mg/ mL)	SOLUCION C	SOLUCION D
1	1.00 mL	0.000 mL	3 mL	0.3 mL
2	0.99 mL	0.010 mL	3 mL	0.3 mL
3	0.97 mL	0.030 mL	3 mL	0.3 mL
4	0.94 mL	0.060 mL	3 mL	0.3 mL
5	0.91 mL	0.090 mL	3 mL	0.3 mL
6	0.88 mL	0.120 mL	3 mL	0.3 mL
7	0.85 mL	0.150 mL	3 mL	0.3 mL
8	0.82 mL	0.180 mL	3 mL	0.3 mL
9	0.79 mL	0.210 mL	3 mL	0.3 mL

Tabla 6 Procedimiento para realizar el ensayo de cuantificación de la proteína por el método de Lowry.

	BLANCO	EXPERIMENTAL
Agua desionizada	1 mL	1 mL
Muestra (homogenado)		0.005 mL
Solución C	3 mL	3 mL
Mezclar en vortex y esperar 10 min		
Solución D (Reactivo de Folin)	0.3 mL	0.3 mL
Mezclar en vortex y esperar 30 min a temperatura ambiente en oscuridad		
Leer a 660 nm		

IX.10.3 Determinación de dienos conjugados

En un tubo de ensaye se coloca el volumen necesario de homogenado de cada muestra para tener 1 mg de proteína, el volumen se ajusta a 1 mL con agua. Posteriormente se agregan 4 mL de reactivo de Folch, se agita en vortex por 15 s, se centrifuga a 2000 g por 5 minutos. De las dos fases que

se forman se toma 1 mL de la inferior con ayuda de una pipeta Pasteur y se transfiere a otro tubo para evaporar hasta sequedad en un baño de agua a 37° C. una vez seco se agregan 1.5 mL de ciclohexano, se agita en vortex 15 s y se lee en un espectrofotómetro a 233 nm, se ajusta a 0 con ciclohexano. Los resultados se expresan como OD (abs a 233 nm)/mg de proteína.

IX.10.4 Determinación de lipoperoxidación por el método de TBARS

En un tubo de ensayo poner el volumen necesario de homogenado para tener 3 mg de proteína, ajustar el volumen con agua a 1 mL y agregar 1 mL de Tris HCl, en el caso de las muestras suplementadas con Fe, añadir 100µL de FeSO₄ 50 µM y 0.9 mL de Tris HCl, incubar por 30 min a 37° C; usar agua en lugar de homogenado.

Tomar 0.4 mL del incubado y ponerlo en un tubo de ensayo; agregar 1.5 de ácido acético, 1.5 mL de ácido tiobarbitúrico y 0.5 mL de agua, tapar los tubos con canicas y ponerlos a ebullición en baño maría durante 45 min. Enfriar los tubos con agua corriente y agregar 1 mL de KCl, mezclar en vortex. Agregar 5 mL de piridina-butanol y mezclar en vortex, tomar 3.5 mL de la fase superior y ponerlos en otro tubo de ensayo, centrifugar durante 5 min a 2000 g. Tomar 3 mL del sobrenadante y ponerlos en celdas de plástico. Medir la absorbancia en un espectrofotómetro a 532 nm, ajustar a 0 con el blanco. Los resultados se obtienen aplicando la siguiente fórmula:

Cálculos para determinar niveles de TBARS:

$$nmolas TBARS = \frac{vol\ medido(3ml) \times D.O.}{0.0156(coef\ ext\ molar) \times mg\ proteina(3mg)}$$

IX.11 Inclusión en parafina y cortes histológicos

Para incluir en parafina el hígado, se cortaron cubos de aproximadamente 3 mm del órgano disecado. Los tozos de hígado se fijaron en solución de paraformaldehído al 4% en PBS toda la noche a 4° C. Después del tiempo de fijación se hicieron 3 lavados de una hora cada uno con PBS. Una vez hecho los lavados se procedió a deshidratar el tejido

sumergiendo el mismo en una soluciones de etanol graduales, como se muestra a continuación:

1. Etanol 50% 1 hora
2. Etanol 70% 1 hora
3. Etanol 80% 1 hora
4. Etanol 90% 1 hora
5. Etanol 96% 1 hora
6. Etanol absoluto 1 hora
7. Etanol absoluto 1 hora

Después de los alcoholes, se dejaron los tejidos una hora en xileno-etanol 1:1, posteriormente xileno puro 1 hora, seguido de xileno-parafina 1:1 una hora a 57° C en una estufa. Por ultimo se colocaron los tejidos en parafina pura por 2 horas, también a 57° C, y después de este tiempo se cambió la parafina por nueva y se dejó por 5 horas a 57° C. Posterior a este tiempo se sacaron los tejidos de la estufa y se dejó que solidificara la parafina y se obtuvieron los bloques de tejidos ya incluidos en la parafina.

De los bloques se obtuvieron cortes histológicos de 10 µm de espesor con ayuda de un microtomo (Leica RM 2135) y se montaron en portaobjetos recubiertos de poli-D-lisina.

Todos los solventes son marca Merck, Germany.

IX.12 Tinción de eosina-hematoxilina

Para la tinción de eosina-hematoxilina primero se re-hidrataron los cortes de tejido sumergiendo las laminillas en soluciones de xilol y etanol como se muestra a continuación:

1. Xilol 100 % 5 min
2. Xilol 100 % 5 min
3. Etanol 100 % 5 min
4. Etanol 90 % 3 min
5. Etanol 70 % 3 min

6. Etanol 50 % 3 min
7. Agua destilada 1 min

Después de re-hidratados los tejidos, se realizó la tinción de eosina-hematoxilina sumergiendo las laminillas en diferentes soluciones como se muestra a continuación:

1. Agua corriente 5 min
2. Hematoxilina (Sigma) 5 min
3. Agua destilada 10 min (5 pases de 2 min)
4. Agua corriente 10 min (5 pases de 2 min)
5. Etanol 50% 3 min
6. Etanol 70% 3 min
7. Eosina (ver anexo) 1 min (máximo)
8. Etanol 96% 5 min
9. Etanol absoluto 3 min
10. Xileno 5 min

Finalmente se dejó que se evaporara el xileno y se montaron con resina (Estellan, Merck, Germany) con cubreobjetos.

Las laminillas se observaron al microscopio en campo claro (Olympus BX51) y se tomaron imágenes digitales con la cámara Olympus C-5050.

Todos los solventes son marca Merck, Germany.

IX.13 Análisis estadísticos

Se utilizaron las pruebas estadísticas de Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni para conocer las diferencias entre grupos, utilizando el programa GraphPad Prism versión 4.00 para Mac OS X. Se considero como mínimo una $p < 0.05$. En todas las figuras se muestra la media \pm desviación estándar.

X Anexos

X.1 reactivos para determinación de dienos conjugados

Ciclohexano

Reactivo de Folch: Mezcla Cloroformo:Metanol (2:1)

Para 100 mL:

Mezclar 66.7 ml de cloroformo y 33.3 ml de metanol

Todos los solventes son marca Merck, Germany.

X.2 Reactivos para TBARS

Ácido tiobarbitúrico (Merck, Germany) 0.8% (se prepara un par de minutos antes de utilizarlo):

Para 100 ml:

Agregar 0.8 g de Ácido tiobarbitúrico en 80 ml de agua desionizada.

Calentar y mezclar con agitador magnético hasta que se haya disuelto el polvo.

Aforar a 100 mL y usar inmediatamente.

Cloruro de potasio (Sigma, USA) 1.2% (para 100 mL):

Agregar 1.2 g de KCl (Sigma, USA) a 80 mL de agua desionizada.

Mezclar.

Aforar a 100 mL.

Ácido acético (Merck, Germany) 20% pH 3.5 (para 100 mL):

Mezclar 20 mL de ácido acético y 60ml de agua desionizada.

Ajustar pH a 3.5 con KOH.

Mezclar.

Aforar a 100 mL.

Tris HCl (Sigma, USA) 150mM pH 7.4 (para 100 mL):

Añadir 1.8 g de Tris HCl a 80ml de agua desionizada.

Ajustar pH a 7.4.

Aforar a 100 mL.

Solución piridina-butanol 1:15 (para 225 mL):

Mezclar 14.1 mL de piridina y 210.9 mL de butanol, en campana de extracción.

Usar el mismo día.

Todos los solventes son marca Merck, Germany.

XI Referencias

- Aebi, H., and Suter, H. (1971). Acatalasemia. *Adv Hum Genet* 2, 143-199.
- Armutcu, F., Ataymen, M., Atmaca, H., and Gurel, A. (2008). Oxidative stress markers, C-reactive protein and heat shock protein 70 levels in subjects with metabolic syndrome. *Clin Chem Lab Med* 46, 785-790.
- Bedard, K., and Krause, K.H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87, 245-313.
- Behl, C. (1997). Amyloid beta-protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Cell Tissue Res* 290, 471-480.
- Berniakovich, I., Trinei, M., Stendardo, M., Migliaccio, E., Minucci, S., Bernardi, P., Pelicci, P.G., and Giorgio, M. (2008). p66Shc-generated oxidative signal promotes fat accumulation. *J Biol Chem* 283, 34283-34293.
- Bonekamp, N.A., Volkl, A., Fahimi, H.D., and Schrader, M. (2009). Reactive oxygen species and peroxisomes: struggling for balance. *Biofactors* 35, 346-355.
- Boveris, A., Oshino, N., and Chance, B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128, 617-630.
- Brigelius-Flohe, R. (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 27, 951-965.
- Brown, F.R., 3rd, McAdams, A.J., Cummins, J.W., Konkol, R., Singh, I., Moser, A.B., and Moser, H.W. (1982). Cerebro-hepato-renal (Zellweger) syndrome and neonatal adrenoleukodystrophy: similarities in phenotype and accumulation of very long chain fatty acids. *Johns Hopkins Med J* 151, 344-351.
- Ceriello, A., and Motz, E. (2004). Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 816-823.
- Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., Henry-Berger, J., Vernet, P., Cadet, R., Saez, F., and Drevet, J.R. Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. *J Anim Sci* 88, 1321-1331.
- Chaudiere, J., and Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol* 37, 949-962.
- Cheeseman, K.H., and Slater, T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 49, 481-493.
- Commoner, B., Townsend, J., and Pake, G.E. (1954). Free radicals in biological materials. *Nature* 174, 689-691.
- Cuevas, O. (2007). Efecto de los niveles de catalasa sobre el estrés oxidativo, la senescencia replicativa, la muerte celular y el envejecimiento del organismo. Instituto de biotecnología/UNAM.
- Czech, M.P., and Fain, J.N. (1972). Cu ++ -dependent thiol stimulation of glucose metabolism in white fat cells. *J Biol Chem* 247, 6218-6223.

- Czech, M.P., Lawrence, J.C., Jr., and Lynn, W.S. (1974). Evidence for the involvement of sulfhydryl oxidation in the regulation of fat cell hexose transport by insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *71*, 4173-4177.
- DeGnore, J.P., Konig, S., Barrett, W.C., Chock, P.B., and Fales, H.M. (1998). Identification of the oxidation states of the active site cysteine in a recombinant protein tyrosine phosphatase by electrospray mass spectrometry using on-line desalting. *Rapid Commun Mass Spectrom* *12*, 1457-1462.
- Deisseroth, A., and Dounce, A.L. (1970). Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev* *50*, 319-375.
- Dinauer, M.C., Deck, M.B., and Unanue, E.R. (1997). Mice lacking reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity show increased susceptibility to early infection with *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* *158*, 5581-5583.
- Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A.L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C.C., *et al.* (1999). Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* *283*, 1544-1548.
- Fan, C.Y., Pan, J., Usuda, N., Yeldandi, A.V., Rao, M.S., and Reddy, J.K. (1998). Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Implications for peroxisome proliferator-activated receptor alpha natural ligand metabolism. *J Biol Chem* *273*, 15639-15645.
- Ford, E.S., Mokdad, A.H., Giles, W.H., and Brown, D.W. (2003). The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes* *52*, 2346-2352.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., and Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* *114*, 1752-1761.
- Goldstein, B.J. (2001). Protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B): a novel therapeutic target for type 2 diabetes mellitus, obesity and related states of insulin resistance. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* *1*, 265-275.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., and Cross, C.E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* *119*, 598-620.
- Hamanaka, R.B., and Chandel, N.S. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci*.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* *11*, 298-300.
- Henandez García Leandro David (2010). Participación del estrés oxidativo en la muerte celular programada. Instituto de biotecnología/UNAM.
- Hiuge, A., Tenenbaum, A., Maeda, N., Benderly, M., Kumada, M., Fisman, E.Z., Tanne, D., Matas, Z., Hibuse, T., Fujita, K., *et al.* (2007). Effects of peroxisome proliferator-activated receptor ligands, bezafibrate and

- fenofibrate, on adiponectin level. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 635-641.
- Ho, Y.S., Xiong, Y., Ma, W., Spector, A., and Ho, D.S. (2004). Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J Biol Chem* 279, 32804-32812.
- Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Milliman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75, 241-251.
- Hofmann, B., Hecht, H.J., and Flohe, L. (2002). Peroxiredoxins. *Biol Chem* 383, 347-364.
- Honda, Y., and Honda, S. (1999). The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J* 13, 1385-1393.
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., and Spiegelman, B.M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87-91.
- Hotamisligil, G.S., and Spiegelman, B.M. (1994). Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 43, 1271-1278.
- Ihara, Y., Kibata, M., Hayabara, T., Katayama, S., Konishi, H., Miura, K., Kohno, M., Kawai, M., Yokoi, I., and Mori, A. (1997). Free radicals in the cerebrospinal fluid are associated with neurological disorders including mitochondrial encephalomyopathy. *Biochem Mol Biol Int* 42, 937-947.
- Ishii, N. (2000). Oxidative stress and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Res* 33, 857-864.
- Kalinina, E.V., Chernov, N.N., and Saprin, A.N. (2008). Involvement of thio-, peroxi-, and glutaredoxins in cellular redox-dependent processes. *Biochemistry (Mosc)* 73, 1493-1510.
- Keisari, Y., Braun, L., and Flescher, E. (1983). The oxidative burst and related phenomena in mouse macrophages elicited by different sterile inflammatory stimuli. *Immunobiology* 165, 78-89.
- Klaman, L.D., Boss, O., Peroni, O.D., Kim, J.K., Martino, J.L., Zabolotny, J.M., Moghal, N., Lubkin, M., Kim, Y.B., Sharpe, A.H., *et al.* (2000). Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol Cell Biol* 20, 5479-5489.
- Klein, S., Fontana, L., Young, V.L., Coggan, A.R., Kilo, C., Patterson, B.W., and Mohammed, B.S. (2004). Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary heart disease. *N Engl J Med* 350, 2549-2557.
- Loh, K., Deng, H., Fukushima, A., Cai, X., Boivin, B., Galic, S., Bruce, C., Shields, B.J., Skiba, B., Ooms, L.M., *et al.* (2009). Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. *Cell Metab* 10, 260-272.
- Mahadev, K., Zilbering, A., Zhu, L., and Goldstein, B.J. (2001). Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo

- and enhances the early insulin action cascade. *J Biol Chem* 276, 21938-21942.
- Maier, C.M., and Chan, P.H. (2002). Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist* 8, 323-334.
- Masoro, E.J. (2000). Caloric restriction and aging: an update. *Exp Gerontol* 35, 299-305.
- Matsuzawa-Nagata, N., Takamura, T., Ando, H., Nakamura, S., Kurita, S., Misu, H., Ota, T., Yokoyama, M., Honda, M., Miyamoto, K., *et al.* (2008). Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism* 57, 1071-1077.
- Melov, S., Ravenscroft, J., Malik, S., Gill, M.S., Walker, D.W., Clayton, P.E., Wallace, D.C., Malfroy, B., Doctrow, S.R., and Lithgow, G.J. (2000). Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science* 289, 1567-1569.
- Migliaccio, E., Giorgio, M., Mele, S., Pelicci, G., Reboldi, P., Pandolfi, P.P., Lanfrancone, L., and Pelicci, P.G. (1999). The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* 402, 309-313.
- Niethammer, P., Grabher, C., Look, A.T., and Mitchison, T.J. (2009). A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* 459, 996-999.
- O'Donnell, V.B., Spycher, S., and Azzi, A. (1995). Involvement of oxidants and oxidant-generating enzyme(s) in tumour-necrosis-factor-alpha-mediated apoptosis: role for lipoxygenase pathway but not mitochondrial respiratory chain. *Biochem J* 310 (Pt 1), 133-141.
- Ogata, M. (1991). Acatlasemia. *Hum Genet* 86, 331-340.
- Okuno, Y., Matsuda, M., Kobayashi, H., Morita, K., Suzuki, E., Fukuhara, A., Komuro, R., Shimabukuro, M., and Shimomura, I. (2008). Adipose expression of catalase is regulated via a novel remote PPARgamma-responsive region. *Biochem Biophys Res Commun* 366, 698-704.
- Okuno, Y., Matsuda, M., Miyata, Y., Fukuhara, A., Komuro, R., Shimabukuro, M., and Shimomura, I. Human Catalase Gene is Regulated by Peroxisome Proliferator Activated Receptor-gamma through a Response Element Distinct from That of Mouse. *Endocr J*.
- Orr, W.C., and Sohal, R.S. (1994). Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 263, 1128-1130.
- Palmieri, V.O., Grattagliano, I., Portincasa, P., and Palasciano, G. (2006). Systemic oxidative alterations are associated with visceral adiposity and liver steatosis in patients with metabolic syndrome. *J Nutr* 136, 3022-3026.
- Parkes, T.L., Elia, A.J., Dickinson, D., Hilliker, A.J., Phillips, J.P., and Boulianne, G.L. (1998). Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motorneurons. *Nat Genet* 19, 171-174.

- Perez, V.I., Van Remmen, H., Bokov, A., Epstein, C.J., Vijg, J., and Richardson, A. (2009). The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice. *Aging Cell* 8, 73-75.
- Rebrin, I., and Sohal, R.S. (2008). Pro-oxidant shift in glutathione redox state during aging. *Adv Drug Deliv Rev* 60, 1545-1552.
- Rejraji, H., Vernet, P., and Drevet, J.R. (2002). GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymidis lumen at three different locations. *Mol Reprod Dev* 63, 96-103.
- Sabio, G., Das, M., Mora, A., Zhang, Z., Jun, J.Y., Ko, H.J., Barrett, T., Kim, J.K., and Davis, R.J. (2008). A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science* 322, 1539-1543.
- Sadek, C.M., Jimenez, A., Damdimopoulos, A.E., Kieselbach, T., Nord, M., Gustafsson, J.A., Spyrou, G., Davis, E.C., Oko, R., van der Hoorn, F.A., *et al.* (2003). Characterization of human thioredoxin-like 2. A novel microtubule-binding thioredoxin expressed predominantly in the cilia of lung airway epithelium and spermatid manchette and axoneme. *J Biol Chem* 278, 13133-13142.
- Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., and Elazar, Z. (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J* 26, 1749-1760.
- Schriner, S.E., Linford, N.J., Martin, G.M., Treuting, P., Ogburn, C.E., Emond, M., Coskun, P.E., Ladiges, W., Wolf, N., Van Remmen, H., *et al.* (2005). Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 308, 1909-1911.
- Schulze-Osthoff, K., Bakker, A.C., Vanhaesebroeck, B., Beyaert, R., Jacob, W.A., and Fiers, W. (1992). Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J Biol Chem* 267, 5317-5323.
- Sohal, R.S., Sohal, B.H., and Orr, W.C. (1995). Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage, and longevity in different species of flies. *Free Radic Biol Med* 19, 499-504.
- Sohet, F.M., Neyrinck, A.M., Dewulf, E.M., Bindels, L.B., Portois, L., Malaisse, W.J., Carpentier, Y.A., Cani, P.D., and Delzenne, N.M. (2009). Lipid peroxidation is not a prerequisite for the development of obesity and diabetes in high-fat-fed mice. *Br J Nutr* 102, 462-469.
- Takano, H., and Komuro, I. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cardiovascular diseases. *Circ J* 73, 214-220.
- Wanders, R.J., Ferdinandusse, S., Brites, P., and Kemp, S. Peroxisomes, lipid metabolism and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1801, 272-280.
- Wood, Z.A., Schroder, E., Robin Harris, J., and Poole, L.B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 28, 32-40.
- Xu, B., Moritz, J.T., and Epstein, P.N. (1999). Overexpression of catalase provides partial protection to transgenic mouse beta cells. *Free Radic Biol Med* 27, 830-837.

- Yamato, M., Shiba, T., Yoshida, M., Ide, T., Seri, N., Kudou, W., Kinugawa, S., and Tsutsui, H. (2007). Fatty acids increase the circulating levels of oxidative stress factors in mice with diet-induced obesity via redox changes of albumin. *FEBS J* 274, 3855-3863.
- Zhang, N., Fu, Z., Linke, S., Chicher, J., Gorman, J.J., Visk, D., Haddad, G.G., Poellinger, L., Peet, D.J., Powell, F., *et al.* The Asparaginyl Hydroxylase Factor Inhibiting HIF-1alpha Is an Essential Regulator of Metabolism. *Cell Metab.*
- Zhang, X., Zhang, G., Zhang, H., Karin, M., Bai, H., and Cai, D. (2008). Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 135, 61-73.