



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**PAPEL DE LA UCP3 EN LA GENERACIÓN DEL ANIÓN  
SUPERÓXIDO EN MITOCONDRIAS DE CORAZÓN DE UN  
MODELO DE SÍNDROME METABÓLICO**

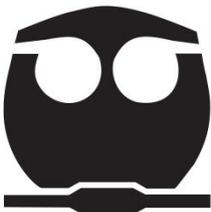
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

**DIANA RAFAEL DE LA CRUZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2011**



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre  
**VOCAL:** Dr. José Pedraza Chaverri  
**SECRETARIO:** Dr. Mohammed El Hafidi Bentlakder  
**1er. SUPLENTE:** Dra. Vanessa Rebeca Maya Ampudia  
**2° SUPLENTE:** Dra. Teresa Neri Gómez

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE  
CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"**

**ASESOR DEL TEMA: DR. MOHAMMED EL HAFIDI BENTLAKDER** \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE: DIANA RAFAEL DE LA CRUZ** \_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente apoyado por  
proyecto CONACyT No 106847

Responsable Técnico: Dr Mohammed El Hafidi

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mohammed El Hafidi Bentlakder por todas sus enseñanzas, su apoyo y ayuda en todo momento. Gracias por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo.

Al Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre y al Dr. Jesús Pedraza Chaverri por sus valiosas observaciones.

A la Dra. Vanessa Rebeca Maya Ampudia y a la Dra. Teresa Neri Gómez por su disposición y cordialidad.

Este trabajo se realizó en el departamento de Biomedicina Cardiovascular del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

## DEDICATORIAS

A mi mamá que ha sido el pilar de la familia, por ser la mejor mujer que conoceré, porque a pesar de la pérdida tan grande que tuvimos te encargaste de ocupar esos dos lugares para que siguiéramos llenos de amor y sin ninguna necesidad. Sé que tardé un poco en lograrlo pero aquí está lo que tanto esperábamos, una pequeña alegría de las tantas que se avecinan. Te quiero mucho mami.

A mi papá, que aunque en este momento no está a mi lado, en mi mente y corazón tengo todas sus enseñanzas. Todos los días intento hacerte sentir orgulloso, gracias por permitirme ser parte de ti.

A mi hermano Saúl, gracias por todo el esfuerzo que has puesto en apoyar a toda la familia, eres el hombre más importante para mi y quiero dedicarte este trabajo como muestra de que todo lo que has hecho no ha sido en vano, te quiero mucho.

A mi hermana Marisela, por estar siempre pendiente de mi, por permitirme conocerte un poco más y lo más importante, estar incondicionalmente a mi lado. Gracias por ser mi amiga. Te quiero mucho.

A mi hermana Sandivel, te quiero mucho, siempre serás una de las personas más importantes en mi vida, y doy gracias por el gran cariño que nos hemos tenido a lo largo de nuestras vidas, espero podamos continuar con lo que hemos descuidado últimamente.

A mi sobrina Natalia, eres la luz que vino a iluminar a nuestra hermosa familia, te quiero mucho.

A Angélica, además de ser mi maestra y compañera de laboratorio, has sido excelente amiga, a tu lado he vivido momentos inolvidables. Gracias por permitirme compartir este gran logro contigo y muchas, muchas gracias por el apoyo que me has brindado en estos dos años.

A Itzel, mi cómplice y mejor amiga, me has enseñado la importancia de ser mejor persona día con día, querer a las personas tal y como son, eres siempre un ejemplo para mi. Por ayudarme a vivir, disfrutando y sufriendo tantas cosas, que juntas es más fácil llevarlas a cabo. ¡Güerita por fin llegamos al final del camino!

A Noé, gracias por todo el tiempo compartido, por todo lo que has hecho por ayudarme en los momentos en los que he necesitado que alguien me empuje hacia delante.

A Dorita, por todos tus consejos, la diversión que siempre compartimos y por supuesto nuestra súper amistad.

A Luz y Esther por esas comidas inolvidables e inigualables, las quiero mucho amiguis, gracias por todo su apoyo y consejos, además por dejarme conocer lo increíbles y maravillosas que son.

A mis mejores amigos: Mauricio por ser el más noble y amoroso de todos, Pavel por nuestra increíble amistad, Baruch por enseñarme que los mejores momentos son los que no se planean, Marco porque siempre me alegras con tus ocurrencias, Bustillos por todo tu cariño, Erick por todos los momentos compartidos y Pedro por tenerme tanta paciencia. Los quiero muchísimo y siempre recordaré todas las aventuras que vivimos en la facultad y fuera de ella.

A Daniel, gracias por aceptarme y quererme durante todo este tiempo, Ñañelito mucho de lo que soy es debido a ti, te quiero mucho.

A Yaret, porque a pesar de la distancia nuestra amistad sigue intacta.

A Ely y Angelito, que en tan poco tiempo hemos logrado una bonita y muy divertida amistad, gracias por todo el apoyo chicos.

## Índice

I.	Resumen	1
II.	Antecedentes	3
	i. Definición de síndrome metabólico	3
	ii. Modelos experimentales de SM	6
	iii. El SM y la obesidad	7
	iv. Función mitocondrial	8
	v. Las especies reactivas de oxígeno	13
	vi. Antioxidantes	15
	vii. Sistemas generadores de EROs	16
	viii. SM, función mitocondrial y EROs	23
	ix. Estrés oxidante en el SM	24
	x. Ácidos grasos y función mitocondrial en el SM	24
	xi. Proteínas desacoplantes	26
III.	Justificación	28
IV.	Hipótesis	29
V.	Objetivos	29
VI.	Metodología	30
	i. Inducción del SM	30
	ii. Medición de peso corporal, grasa retroperitoneal y presión arterial sistólica	30
	iii. Determinación de triglicéridos, colesterol, glucosa e insulina	31
	iv. Preparación de mitocondrias	31

v.	Determinación de proteína	32
vi.	Análisis de la función mitocondrial por oximetría	33
vii.	Análisis del potencial transmembranal por fluorometría	34
viii.	Cuantificación de la generación de EROs	35
ix.	Análisis de la expresión de la UCP3 por Western Blot	37
x.	Análisis de los AGNEs por cromatografía de gases	38
xi.	Análisis estadístico	40
VII.	Resultados	41
i.	Características generales de los animales	41
ii.	Análisis de los AGNEs en el corazón	42
iii.	Efecto del SM sobre el consumo de O <sub>2</sub> y el potencial transmembranal en mitocondrias aisladas	43
iv.	Expresión de la UCP3 en mitocondrias aisladas de corazón	50
v.	Generación de EROs en mitocondrias aisladas de corazón	51
VIII.	Discusión	59
IX.	Conclusiones	68
X.	Bibliografía	69

## Símbolos y Abreviaturas

ADP	Adenosín difosfato
AGL	Ácidos grasos libres
AGNEs	Ácidos grasos no esterificados
AL	Ácido linoleico
ANT	Translocador de adenin nucleótidos
AO	Ácido oleico
ASB	Albúmina de suero bovino
ATP	Adenosín trifosfato
BHT	Butilhidroxitolueno
BMCP1	Proteína acarreadora mitocondrial en cerebro 1
CAT	Carboxiatractilósido
CCCP	Carbonil cianuro clorofenilhidrazona
Cit P <sub>450</sub>	Citocromo P <sub>450</sub>
CR	Control respiratorio
CRM	Cadena respiratoria mitocondrial
Cu/Zn – SOD	Superóxido dismutasa de cobre/zinc
DCF	2,7- dihidroclorofluoresceína
DHA	Ácido docosahexaenoico
DPA	Ácido docosapentaenoico
DT 2	Diabetes mellitus tipo 2
EC – SOD	Superóxido dismutasa extracelular
EGTA	Ácido etilen glicol-bis (β-aminoetileter-N,N,N',N'-tetraacético)
EPA	Ácido eicosapentanoico
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FAD	Flavín adenín dinucleótico
FMN	Flavín mononucleótido
GDP	Guanosín difosfato
GPx	Glutatió peroxidasa
GSH	Glutatió reducido
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazineetanosulfónico
IDF	Federación internacional de diabetes
IL – 6	Interleucina – 6
IMC	Índice de masa corporal
KMCP1	Proteína acarreadora mitocondrial en riñón 1
MAOs	Monoamina oxidasa
MEM	Membrana externa mitocondrial
MIM	Membrana interna mitocondrial
mitoK <sub>ATP</sub>	Canal de transporte de iones potasio
Mn – SOD	Superóxido dismutasa de manganeso
MOM	Monoxigenasas microsomales
MPO	Mieloperoxidasa
mPTP	Poros de la transición de la permeabilidad mitocondrial
mtEROs	Especies reactivas de oxígeno a nivel mitocondrial
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamin-adenín dinucleótido

NADH	Nicotinamin-adenín dinucleótido reducido
NCEP ATP III	Programa nacional de educación sobre colesterol, panel III para el tratamiento del adulto
NOx	NADPH oxidasa
OMS	Organización Mundial de Salud
P/M	Piruvato y malato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
POD	Peroxidasa
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RI	Resistencia a la insulina
SDH	Succinato deshidrogenasa
SDS – PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
SM	Síndrome metabólico
SOD	Superóxido dismutasa
Succ	Succinato
TBARS	Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico
TBS	Buffer tris salino
TDE	Transferencia directa de electrones
TG	Triglicéridos
TMRE	Tetrametilrodaminaetil ester
TMRM	Tetrametilrodaminametil ester
TNF – $\alpha$	Factor de necrosis tumoral
TPP	Tetrafenilfosfonium
TRE	Transferencia reversa de electrones
UCP1	Proteína desacoplante 1
UCP2	Proteína desacoplante 2
UCP3	Proteína desacoplante 3
UCPs	Proteínas desacoplantes
UQ (UQH <sub>2</sub> )	Ubiquinona
UQH (UQ•)	Semiquinona
XDH	Xantina deshidrogenasa
XO	Xantina oxidasa
XOR	Xantina oxidorreductasa
$\alpha$ – KGDH	$\alpha$ – cetoglutarato deshidrogenasa
$\Delta$ pH	Gradiente de pH a través de la MIM
$\Delta\Psi$	Potencial transmembranal

## I. RESUMEN

La obesidad intra-abdominal es un componente importante en el síndrome metabólico (SM) y participa activamente en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y degenerativas a través de desórdenes metabólicos como el aumento de ácidos grasos no esterificados (AGNEs) en la circulación y la acumulación de éstos en tejidos distintos al adiposo. Durante la respiración mitocondrial se generan especies reactivas de oxígeno (EROs) las cuales pueden aumentar en estados patológicos como el SM debido a la acumulación en exceso de AGNEs. La generación excesiva de EROs, ocasiona daños importantes a las biomoléculas (lípidos, proteínas, DNA) tanto a nivel mitocondrial como celular. Por otro lado existe un mecanismo de adaptación del organismo contra la toxicidad inducida por las EROs. En mitocondria, la sobre-expresión de las proteínas desacoplantes UCP2 y 3 está considerada como respuesta contra el estrés oxidativo.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la función mitocondrial en cuanto a la producción de EROs y la actividad de la proteína desacoplante UCP3 durante la fosforilación oxidativa en mitocondrias de corazón en un modelo experimental de SM (hipertensión, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, obesidad central) inducido por el consumo crónico de solución de sacarosa al 30%.

Se encontró que en el modelo de SM existe un aumento en la concentración de AGNEs tales como el ácido palmítico, palmitoleico y oleico tanto a nivel del corazón completo como en las mitocondrias. El ácido oleico y linoleico (AO y

AL) producen un aumento en el consumo de oxígeno y disminución del potencial transmembranal que se refleja en un aumento de fuga de protones en las mitocondrias con SM en comparación con las mitocondrias de corazón de rata control. La pre-incubación de las mitocondrias con GDP, inhibidor fisiológico de las UCP3, no revirtió el efecto desacoplante de los ácidos grasos. Sin embargo la pre-incubación de las mitocondrias con carboxiatractilósido, inhibidor del translocador de adenin nucleótidos (ANT) reduce el efecto desacoplante de los ácidos grasos. Estos resultados sugieren que el ANT participa de forma activa en la fuga inespecífica de protones durante la fosforilación oxidativa que la UCP3.

En cuando a la producción de EROs, las mitocondrias de corazón con SM producen  $H_2O_2$  con una mayor velocidad que las controles durante la transferencia de electrones tanto en forma directa (en presencia de succinato+rotenona) como reversa (succinato solo) tanto en el estado 4 como en el estado 3 (síntesis de ATP). La adición del AO durante la transferencia de electrones directa aumenta la producción de  $H_2O_2$  mientras la disminuye durante la transferencia de electrones reversa. La pre-incubación de las mitocondrias con GDP como inhibidor de la UCP3 aumenta la producción de  $H_2O_2$  en animales con y sin SM.

Conclusiones. El aumento en la concentración de AGNEs está relacionado con una disminución en la fosforilación oxidativa mediante una fuga de protones a través del ANT y con un aumento en la velocidad de producción de EROs en el estado 4 y en el estado 3 de respiración en el modelo de SM.

## II. ANTECEDENTES

### i. Definición de síndrome metabólico (SM)

En 1988 Reaven y col<sup>1</sup> observaron que habían muchas personas que presentaban al mismo tiempo enfermedades como intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, alta concentración de triglicéridos, una disminución de lipoproteínas de alta densidad (HDL) e hipertensión, las cuales son factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, fue entonces cuando postularon a esta enfermedad como “Síndrome X”, que más adelante se renombraría Síndrome Metabólico (SM), proponiendo a la resistencia a la insulina (RI) como común denominador<sup>2</sup>.

A través de los años, otras anomalías fueron tomando importancia dentro del síndrome en particular los estados crónicos de pro-inflamación y pro-trombóticos además de la obesidad central como núcleo de la patología<sup>3</sup>.

Debido a sus características, ha sido difícil su determinación a nivel clínico, es por esta razón que distintas organizaciones han establecido criterios con los cuales se obtenga un mayor control sobre su diagnóstico. A continuación se presentan las definiciones de mayor relevancia a nivel mundial.

En 1999 la Organización Mundial de Salud (OMS) estableció las características que debería poseer un individuo con SM, las cuales se presentan en la Tabla I<sup>2,4</sup>.

Tabla I. Definición del SM de acuerdo a la OMS
<p>Dos o más de los siguientes criterios:</p> <p>Hipertensión arterial (140/90) Hipertrigliceridemia (&gt;150 mg/dL) y/o colesterol HDL &lt;35 mg/dL en hombres o &lt;40 en mujeres Microalbuminuria &gt;20 µg/min Obesidad: IMC &gt;29.9 Kg/m<sup>2</sup> y/o relación cintura/cadera elevada (hombre &gt;0.9, mujer &gt;0.85)</p> <p>Más la presencia de una de las siguientes condiciones:</p> <p>Diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa o resistencia a la insulina (Insulina de ayuno &gt;percentil de la población en estudio)</p>

En el 2001 el Programa Nacional de Educación sobre Colesterol, Panel III para el tratamiento del Adulto (NCEP ATP III, por sus siglas en inglés) lo definió con las siguientes características<sup>3</sup>.

Tabla II. Definición del Programa Nacional de Educación en Colesterol del SM
<p>Tres o más de las siguientes condiciones:</p> <p>Obesidad (Perímetro de cintura &gt;88 cm en mujeres y &gt;102 cm en hombres) Hipertrigliceridemia (150 mg/dL) Colesterol HDL bajo (&lt;40 mg/dL en hombres y &lt;50 mg/dL en mujeres) Hipertensión arterial (130/85 mmHg o diagnóstico previo) Diabetes o glucosa anormal de ayuno (110 mg/dL)</p>

En el 2005 la Federación Internacional de Diabetes (IDF) propuso los siguientes criterios<sup>5</sup>:

Tabla III. Criterios diagnósticos de SM de la IDF
<p>Componente necesariamente presente:</p> <p>Obesidad central, definida como circunferencia de la cintura &gt;94 cm (hombres) y &gt;80 cm (mujeres)</p> <p>Más dos o más de los siguientes cuatro factores:</p> <p>Niveles de triglicéridos &gt;150 mg/dL, o tratamiento específico</p> <p>Niveles de colesterol HDL: &lt;40 mg/dL en hombres o &lt;50 mg/dL en mujeres, o tratamiento específico</p> <p>Presión arterial elevada: sistólica &gt;130 mmHg o diastólica &gt;85 mmHg, o tratamiento específico para hipertensión</p> <p>Glucemia plasmática en ayunas &gt;100 mg/dL o diabetes tipo 2 previamente diagnosticada</p>

Hoy en día se define al SM como una patología heterogénea cuya presentación clínica incluye dislipidemia, obesidad abdominal, resistencia a la insulina e hipertensión arterial; estos factores aumentan el riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2 (DT 2) y enfermedades cardiovasculares<sup>6</sup>.

Para explicar los mecanismos por los cuales se interrelacionan todas estas alteraciones citadas anteriormente, existen diferentes modelos animales con dietas hipercalóricas y que desarrollan alteraciones patológicas que se reflejan en la clínica.

## ii. Modelos experimentales de SM

- Modelo con dieta alta en fructosa

Existen evidencias tanto clínicas como epidemiológicas que sugieren una asociación entre el desarrollo del SM y un alto consumo de fructosa debido a que el metabolismo de ésta, tiene importantes efectos tanto en el metabolismo de la glucosa como en el de los lípidos. La fructosa absorbida se metaboliza en el hígado la cual se fosforila por la enzima llamada fructocinasa formándose así la fructosa-1-fosfato, ésta a su vez se rompe en dos triosas (gliceraldehído y dihidroxiacetona) la reacción es catalizada por la aldolasa B, las triosas pueden convertirse en gliceraldehído-3-fosfato evitando así el paso de mayor control en la glucólisis, la acción de la enzima fosfofructocinasa-1 para la bi-fosforilación de la fructosa-6-fosfato. Los metabolitos finales de la fructosa tomada por el hígado pueden ser glucosa, glucógeno, lactato y piruvato además puede proveer átomos de carbono tanto para la formación del glicerol como para la parte acil de las moléculas acilglicerol además de que es una fuente desregulada de acetil-CoA lo cual promoverá una sobreproducción de triglicéridos (TG)<sup>7</sup>. En estudios en humanos se ha demostrado que la ingesta de fructosa tiene como resultado un notable incremento en el índice de lipogénesis de novo, mientras que esto no sucede con una ingestión calórica mediante glucosa<sup>8</sup>.

- Modelo con dieta alta en sacarosa

En ratas, se ha inducido hipertensión moderada, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia, las cuales son características del SM<sup>9-11</sup>.

- Modelo con dieta tipo cafetería

Mediante una alimentación hipercalórica con alto contenido de sacarosa aunado a la ingesta de alimentos con alto contenido de ácidos grasos, durante determinados períodos se obtiene modelos experimentales del SM que reflejan el cuadro clínico que se observa en humanos<sup>12-14</sup>.

### iii. El SM y la obesidad

La obesidad es la patología más importante en el desarrollo del SM. Se ha propuesto que desencadena un sinfín de cambios metabólicos a nivel sistémico y local<sup>15</sup>.

El tejido adiposo es un órgano endócrino que tiene varias funciones importantes en el cuerpo humano incluyendo el almacenamiento y liberación de energía, conservación de la temperatura corporal, protección de estructuras vitales, almacenamiento de vitaminas liposolubles y aromatización de los esteroides sexuales; está compuesto por dos tipos, el subcutáneo y el visceral. El tejido adiposo subcutáneo se encuentra distribuido en los distintos tejidos mientras que el visceral o intra-abdominal se encuentra recubriendo las vísceras o en la cavidad intra-abdominal.

Actualmente se reconoce que la obesidad abdominal se encuentra relacionada estrechamente con la RI, el desarrollo de DT 2, entre otras, debido a su cercana localización con el drenaje venoso en el sistema porta lo que conduce a una concentración excesivamente alta en la secreción de ácidos grasos libres y hormonas, conocidas como adipocinas, además de la producción de algunas citocinas mediadoras de inflamación, entre las más importantes se encuentran la interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), y leptina, las cuales disminuyen la señalización del receptor de insulina y aumentan la RI, y adiponectina la cual se ha visto que tiene una relación inversa con la obesidad, la inflamación y la RI<sup>16</sup>.

Se ha reportado que el tejido adiposo visceral es metabólicamente más activo que el que se localiza en otros sitios y que en su exceso se presenta un aumento de especies reactivas de oxígeno (EROs) a través de la sobre-expresión de la NADPH-oxidasa y una disminución en la expresión de las enzimas antioxidantes, teniendo como consecuencia un estado de estrés oxidante<sup>17</sup>. En un estado de RI, la secreción excesiva de ácidos grasos no esterificados (AGNEs) a la circulación es debido a un aumento en la lipólisis de los TG almacenados en el tejido adiposo los cuales se acumulan en órganos blanco como el hígado causando daño<sup>18</sup>.

#### iv. Función mitocondrial

La mitocondria es un organelo subcelular que se encarga de transformar la energía proveniente de la oxidación de diferentes sustratos, como el piruvato, resultante de la glucólisis, y los ácidos grasos en la  $\beta$ -oxidación, para la

formación de ATP la cual es la única forma de energía que puede ser utilizada por la célula.

La mitocondria posee dos membranas, la membrana externa mitocondrial (MEM) que es permeable a casi todos los metabolitos que se encuentran en el citoplasma debido a su composición. La membrana interna mitocondrial (MIM), a diferencia de la externa, es rica en proteínas, lo que da como consecuencia, una membrana más selectiva y poco permeable, teniendo así en su interior un medio estrictamente controlado en cuanto a su constitución, este último se conoce como matriz mitocondrial, donde albergan las enzimas necesarias para que se lleven a cabo el ciclo de Krebs, la  $\beta$ -oxidación, el ciclo de la urea y síntesis de esteroides<sup>19</sup>. El espacio que se encuentra entre las dos membranas se llama espacio intermembranal.

La MIM forma pliegues llamados crestas los cuales varían dependiendo de qué tan activa es la célula o la mitocondria ya que en las crestas están los diferentes complejos de la cadena respiratoria mitocondrial por lo tanto entre más crestas tienen más energía producen.

#### *La cadena respiratoria mitocondrial (CRM)*

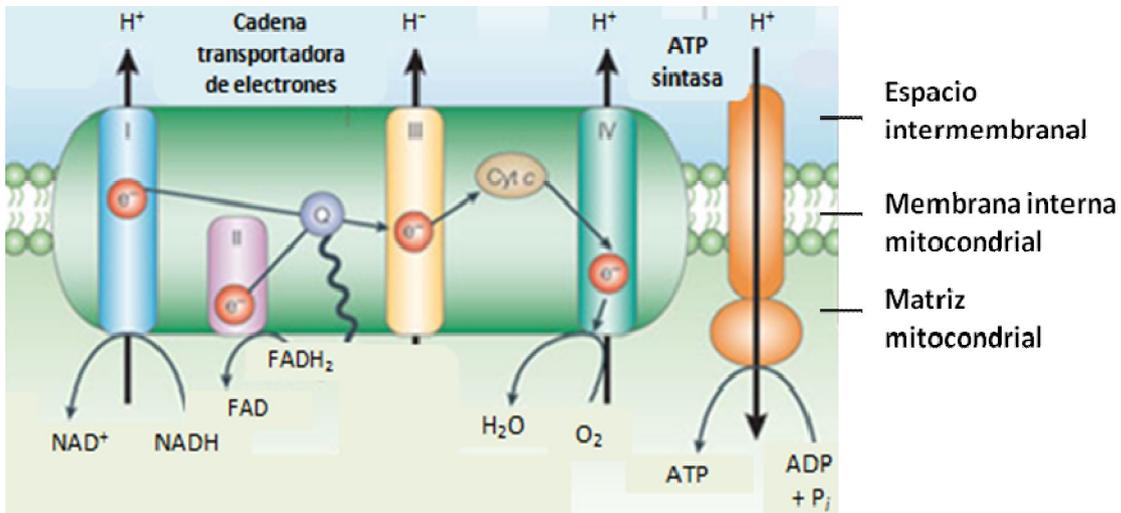
La membrana interna mitocondrial es el lugar en donde se encuentra la CRM, la cual es una cadena de óxido-reducción que tiene como finalidad la reducción tetravalente del oxígeno hasta agua para la síntesis de ATP. Para llegar a los compuestos finales es necesaria la oxidación de diferentes sustratos en los distintos complejos respiratorios<sup>20</sup>.

### Complejo I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa)

El complejo I pesa 907 kDa, con forma de “L”, con una parte hidrofóbica, la cual se encuentra inmersa en la membrana interna mitocondrial y una hidrofílica que está dirigida hacia la matriz mitocondrial. Está compuesto por un Flavín mononucleótido (FMN), dos centros hierro-azufre tetranucleados llamados N2, N3, N4 y N5 y dos especies distintas de ubisemiquinona fuertemente unidas<sup>21</sup>.

El complejo I cataliza la transferencia de electrones desde el NADH hasta la ubiquinona, acoplado a la translocación vectorial de protones (ver Figura 1), transloca cuatro protones por cada dos electrones<sup>22</sup>.

También conocido como NADH deshidrogenasa puede ser inhibido por los antibióticos llamados rotenona y piericidina<sup>23</sup>.



**Fig.1 Cadena respiratoria mitocondrial.** La figura muestra la dirección del flujo de electrones y la translocación de protones, comenzando por el complejo I (NADH deshidrogenasa) hacia el complejo III y IV (citocromo oxidasa) hasta la síntesis de ATP por la ATP sintasa a partir de ADP y fosfato. Modificado<sup>24</sup>.

### *Complejo II (Succinato: ubiquinona oxidoreductasa)*

La succinato deshidrogenasa, además de formar parte de la cadena respiratoria como complejo II, participa como enzima en la oxidación de succinato a fumarato dentro del ciclo de Krebs; está formada por cuatro subunidades proteínicas y cinco grupos prostéticos. Las dos subunidades mayores son hidrofílicas y se orientan hacia el lado de la matriz mitocondrial. Estas subunidades unen a los grupos prostéticos (FAD) y a tres centros fierro-azufre. El dominio membranal está compuesto de dos subunidades que contienen un hemo b como grupo prostético y confieren la reactividad de la enzima con la ubiquinona (UQ).

Este complejo, transporta electrones pero no transloca protones hacia el espacio intermembranal (ver Figura 1), por lo que no contribuye con el potencial transmembranal ( $\Delta\Psi$ ).

### *Complejo III o complejo $bc_1$ (ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa)*

El complejo  $bc_1$  transporta electrones desde el ubiquinol hasta el citocromo c a través de sus componentes de óxido-reducción:

1. El citocromo b, dos grupos hemo tipo b, denominados  $b_{566}$  o  $b_L$  y  $b_{562}$  o  $b_H$
2. El citocromo  $c_1$  con un grupo hemo tipo c que se encuentra unido covalentemente
3. El centro Rieske que es un centro fierro-azufre del tipo 2Fe-2S

En el ciclo Q propuesto inicialmente por Mitchell, la ubiquinona (UQ) juega un papel integral, sufriendo una oxidación y una reducción en dos fases, a través del radical libre semiquinona (UQH•). El flujo de electrones, se encuentra acoplado a la translocación de protones a través de la membrana<sup>25</sup> (ver Figura1). La antimicina A inhibe este complejo.

#### *Complejo IV (citocromo c oxidasa)*

Es el último complejo que forma parte de la cadena respiratoria, transfiere electrones desde el citocromo c reducido hasta el oxígeno y contribuye también a la generación del gradiente electroquímico de protones (ver Figura 1). Los cuatro protones que se requieren para la reducción de oxígeno diatómico en agua se toman de la matriz mitocondrial mientras que cuatro más son bombeados hacia el espacio intermembranal. Se inhibe con cianuro (CN<sup>-</sup>), azida (N<sub>3</sub><sup>-</sup>) y monóxido de carbono (CO).

#### *Complejo V (ATP sintasa)*

Esta enzima fosforila el ADP para generar ATP con ayuda del gradiente electroquímico formado a través de la cadena respiratoria, está compuesto por dos segmentos F<sub>1</sub>, es la parte hidrofílica la cual se encuentra del lado de la matriz mitocondrial y está compuesta por distintas subunidades ( $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) y mientras que F<sub>0</sub> se encuentra insertada, debido a su afinidad, en la bicapa lipídica, está compuesta por una subunidad a, dos subunidades b y un anillo de 9-15 subunidades c dependiendo de la especie. La síntesis de ATP se inhibe con oligomicina.

Durante la fosforilación oxidativa, los complejos I, III y IV bombean protones hacia el espacio intermembranal creando un potencial transmembranal ( $\Delta\Psi$ ), el cual es utilizado para la formación a ATP (ver Figura 1), además de un gradiente de pH a través de la membrana interna mitocondrial ( $\Delta\text{pH}$ )<sup>26</sup>.

El oxígeno que es el aceptor final de electrones de la cadena respiratoria para la formación de  $\text{H}_2\text{O}$  en el complejo IV, puede reducirse parcialmente generando anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ).

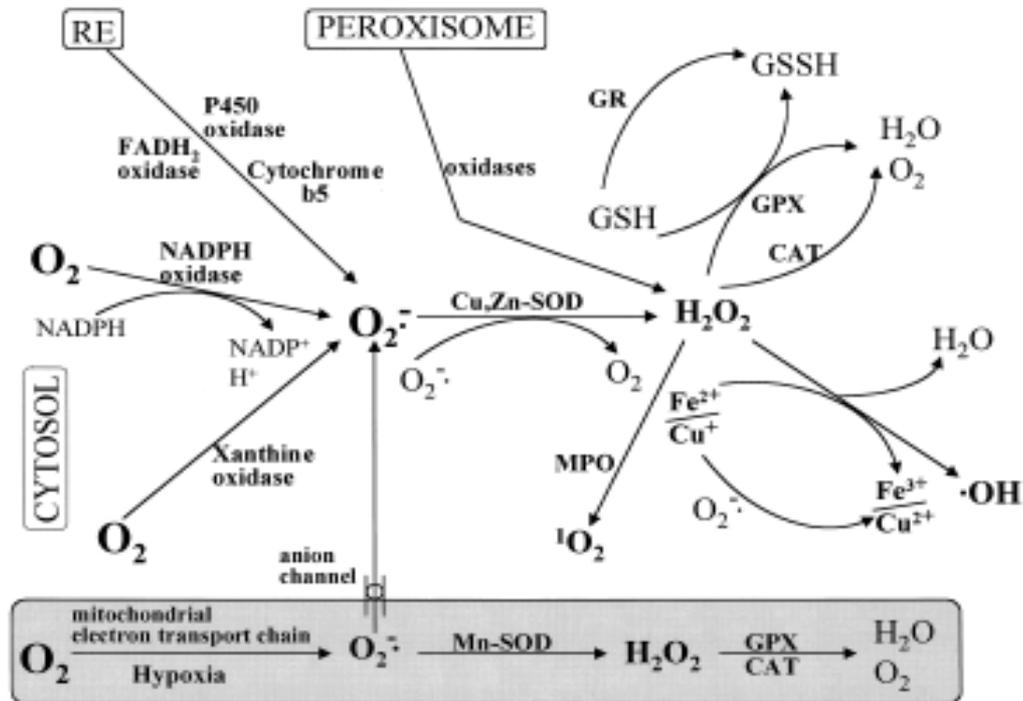
v. Las especies reactivas de oxígeno (EROs)

Durante el metabolismo celular de la mayoría de los seres vivos se generan EROs, como el  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\bullet}$ ). Estas especies tienen una capacidad oxidante mayor que el  $\text{O}_2$ . Su presencia en las células puede generar daños importantes a las biomoléculas (lípidos, proteínas, DNA) lo que permite el desarrollo de enfermedades degenerativas tales como aterosclerosis, cáncer, diabetes, artritis reumatoide, y enfermedades cardiovasculares, entre otras<sup>27</sup>.

Las EROs están relacionadas con procesos celulares importantes como el crecimiento, diferenciación, progresión y muerte celular. Bajas concentraciones de EROs pueden ser benéficas o hasta indispensables en procesos como una señal intracelular y la defensa en contra de microorganismos<sup>28</sup>.

Es por ello que las células cuentan con mecanismos antioxidantes que permiten la eliminación o previenen la formación de EROs (ver Figura 2). Existen antioxidantes tanto enzimáticos como no-enzimáticos, cuando se incrementa el estrés oxidante, el cual es un estado de daño celular debido a un

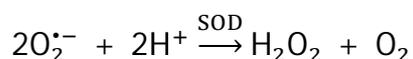
desequilibrio con aumento de oxidantes o disminución de antioxidantes, el sistema de defensa promueve la regulación y expresión de estas enzimas<sup>29</sup>.



**Fig. 2 Generación de especies reactivas de oxígeno y los mecanismos de defensa contra su daño.** Durante la hipoxia, el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> generado puede reaccionar con la SOD-Mn en la mitocondria o con la SOD-Cu/Zn en el citosol. En el retículo endoplásmico, la citocromo P<sub>450</sub>-NADH reductasa puede transferir electrones al oxígeno generando O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. En los peroxisomas, existen enzimas que producen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sin el intermediario O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Contrario al O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es capaz de atravesar las membranas celulares y dentro de ellas, pueden reaccionar con el Fe<sup>2+</sup> o Cu<sup>+</sup> para formar OH<sup>•</sup> vía reacción de Fenton<sup>29</sup>.

## vi. Antioxidantes enzimáticos

El  $O_2^{\bullet-}$  generado en la mitocondria o en otros sistemas es convertido en  $H_2O_2$  por medio de la superóxido dismutasa (SOD) de acuerdo a la siguiente reacción:

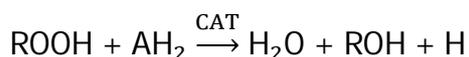
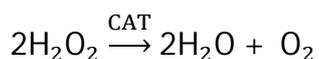


Existen tres tipos de SOD las cuales se encuentran localizadas en lugares específicos<sup>30</sup>:

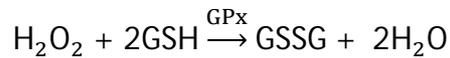
- Cu/Zn-SOD (SOD-1). Se encuentra en el citoplasma, núcleo, peroxisomas y en el espacio intermembranal de la mitocondria
- Mn-SOD (SOD-2). Se localiza en la matriz mitocondrial
- EC-SOD (SOD-3). Es una proteína extracelular

Una vez que el  $O_2^{\bullet-}$  se convierte en  $H_2O_2 + O_2$ , el  $H_2O_2$  es eliminado por la catalasa, enzima tetramérica la cual contiene cuatro subunidades de 60 kD y cada una contiene un grupo hemo como grupo prostético<sup>12</sup>. Descompone al  $H_2O_2$  directamente con donadores de protones (metanol, etanol, ácido fórmico o fenoles) con actividad de peroxidasa; su función primordial es eliminar las altas concentraciones de  $H_2O_2$  de la célula<sup>31</sup> y se encuentra en altas concentraciones en los peroxisomas y en el citosol.

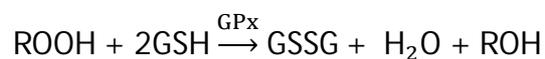
La catalasa actúa de la siguiente manera:



La glutatión peroxidasa (GPx) es una selenoproteína que cataliza la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> usando al glutatión reducido GSH<sup>32</sup>:



La GPx también cataliza la reducción dependiente del GSH de los hidroperóxidos de los ácidos grasos, en donde el grupo peróxido es reducido a alcohol<sup>33</sup>:



Existen cuatro isoenzimas mayoritarias en tejidos de mamíferos todas dependientes de Se: GPx clásica o citosólica (GPx-1 o cGPx), GPx gastrointestinal (GPx-2 o GPx-GI), GPx plasmática (GPx-3 o pGPx) y GPx de fosfolípidos (GPx-4 o PHGPx).

#### vii. Sistemas generadores de EROs

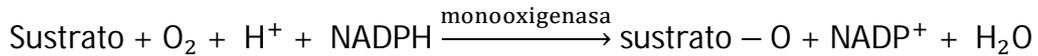
Dentro de la célula se llevan a cabo reacciones metabólicas necesarias para su sobrevivencia en donde se obtiene como subproducto EROs y en otros casos, sistemas que generan éstas especies como protección o defensa de la célula hacia agentes extraños; como en el caso de las células del sistema inmunológico<sup>34</sup>.

Entre los sistemas generadores de EROs se encuentran:

##### 1) Citocromo P<sub>450</sub>

Es miembro de la familia de las monooxigenasas, las cuales insertan un átomo de oxígeno en el sustrato a oxidar, mientras que el segundo átomo de oxígeno

es reducido con electrones que vienen de algún donador específico y generalmente generan como producto una molécula de agua:



Son una familia de proteínas hemotioladas que funcionan como oxidasas terminales, las funciones principales que se han descrito son dos, la primera relacionada con el metabolismo de los xenobióticos, ya sea degradando o transformando a compuestos polares para solubilizarlos y después excretarlos. La segunda se refiere a su participación en la biosíntesis de moléculas de señalización para el control del desarrollo y la homeostasia de los organismos<sup>35</sup>.

Las P<sub>450</sub> se encuentran dentro de lo que se conoce como el sistema de monooxigenasas microsomales (MOM), unidas a las membranas y se localiza principalmente en el retículo endoplásmico de la mayor parte de los tejidos animales, la generación de EROs a partir de citP<sub>450</sub> se da durante su ciclo catalítico, la primera reacción que lleva a la producción de EROs es la liberación del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> debido al decaimiento del complejo oxidado (oxicomplejo) [R - H - Fe (II) - O<sub>2</sub><sup>-</sup>]. La segunda fuente productora es la liberación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a partir del peroxicitocromo P<sub>450</sub>[F - H - Fe(III) - O - O<sup>-</sup>] al momento de su protonación.

## 2) NADPH oxidasa

Las EROs producidas por esta enzima tienen como objetivo eliminar a los agentes patógenos. La familia de enzimas NADPH oxidasa (NOX) se localiza en varios tejidos, siendo la que se encuentra en células fagocíticas la más

estudiada, éstas últimas también conocidas como células inflamatorias constituyen una de las defensas más poderosas del sistema inmunitario contra las bacterias, levaduras y hongos; pueden incluirse a los neutrófilos y eosinófilos, a los monocitos y macrófagos<sup>36</sup>.

La NOX, recibe un electrón de la NADPH que se encuentra en la superficie citosólica de la membrana del fagosoma, y lo dona al O<sub>2</sub> del otro lado del fagosoma, generando O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Éste a su vez puede convertirse más tarde en otras EROs, aunque la mayor parte se convierte por dismutación hacia H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, principalmente por acción de la enzima mieloperoxidasa (MPO)<sup>37</sup>.

### 3) Xantinaoxidorreductasa

La enzima xantinaoxidorreductasa (XOR) posee molibdeno (Mo) como grupo prostético, ésta enzima utiliza agua en lugar de O<sub>2</sub> como la fuente de la cual toma al átomo de oxígeno que se incorporará al sustrato determinado.

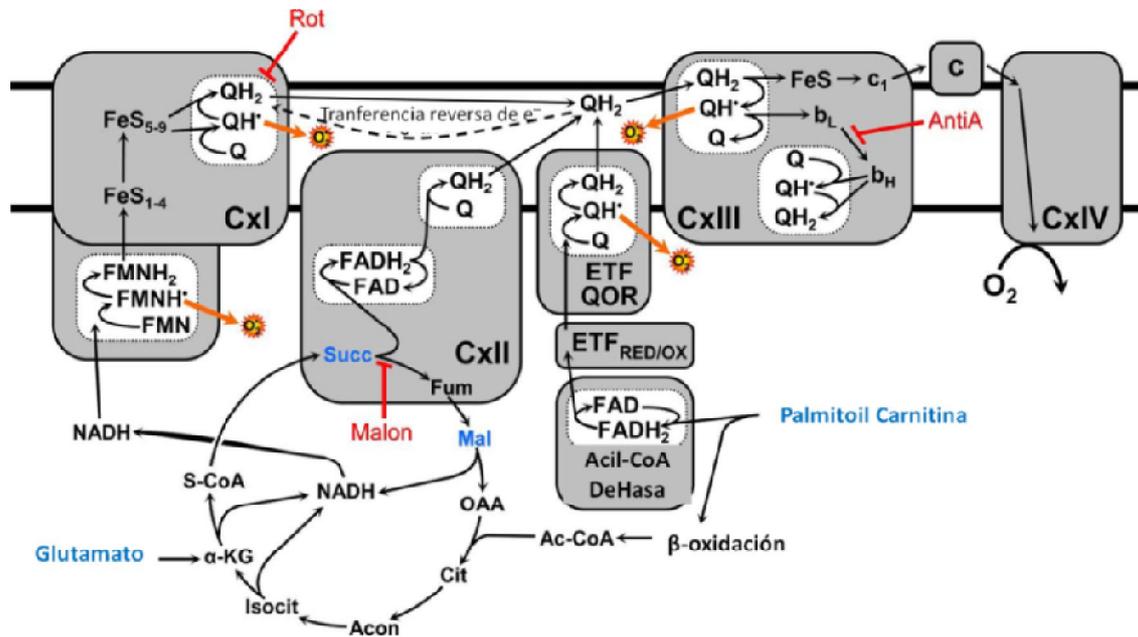
Está ampliamente distribuida en los tejidos de los mamíferos y en otros organismos, existen dos tipos de XOR, la xantina deshidrogenasa (XDH) la cual puede reducir tanto al oxígeno como al NADP<sup>+</sup> y la xantina oxidasa (XO) que puede reducir al oxígeno. Ambas formas participan en el catabolismo de los compuestos nitrogenados, particularmente en la degradación de las purinas (adenina y guanina) catalizando la oxidación y transfiriendo electrones al oxígeno molecular generando especies reactivas de oxígeno y después de nitrógeno<sup>28</sup>.

#### 4) Mitocondria

Desde hace varios años, se ha identificado a la mitocondria como la mayor fuente de  $O_2^{\bullet-}$ . A nivel de la matriz y del espacio intermembranal, la mayor parte del  $O_2^{\bullet-}$  formado en los dos compartimentos es convertido en  $H_2O_2$  por la SOD de manganeso (matriz) y de cobre/zinc (espacio intermembranal)<sup>38</sup>, una parte del  $O_2^{\bullet-}$  producido en el espacio intermembranal puede ser transportado al citoplasma mediante canales de aniones dependientes de voltaje.

La generación de radicales libres en la mitocondria, se da durante la reducción tetravalente de  $O_2$  a  $H_2O$ . La cadena respiratoria transfiere electrones a partir NADH al complejo I, el cual está conectado al complejo III a través de la UQ, y el complejo III a su vez está conectado al complejo IV a través del citocromo c, este transporte de electrones es definido como transferencia directa de electrones (TDE).

El  $FADH_2$  es el sustrato del complejo II de la CRM, los electrones son transferidos hacia la UQ. En este punto el transporte de electrones puede ser dirigido hacia el ciclo Q del complejo III y continuar hasta la reducción del  $O_2$  (ver Figura 3) o bien, el electrón puede transferirse hacia el complejo I a través de la  $UQH_2$  hasta el  $NAD^+$ , proveyendo así equivalentes reductores para la producción de EROs, a este flujo de electrones en sentido contrario se le denomina transferencia reversa de electrones (TRE), sin embargo el mecanismo por el cual se lleva a cabo aún no está dilucidado<sup>39</sup>.



**Fig. 3 Generación de  $O_2^{\cdot-}$  durante la transferencia de electrones en la CRM.** El glutamato/malato proveniente del ciclo de Krebs alimenta al complejo I, succinato es sustrato directo del complejo II y palmitoil-carnitina el cual puede entrar a la CRM mediante la acil-CoA deshidrogenasa o bien a través de la  $\beta$ -oxidación. La rotenona es inhibidor específico del complejo I, el malonato inhibidor competitivo del complejo II y la antimicina A inhibe el complejo II a través del ciclo Q. Modificado<sup>40</sup>.

La contribución de cada sitio a la producción general de  $O_2^{\cdot-}$  varía dependiendo del órgano y del tejido, además del estado en que se encuentren las mitocondrias, es decir que estén respirando de manera muy activa (estado 3) o están más bien en un estado altamente reducido (estado 4)<sup>41</sup>.

#### *Formación de $O_2^{\cdot-}$ en el complejo I*

Se ha reportado que en mitocondrias de diferentes tejidos en presencia de sustratos oxidables como el NADH, la producción de EROs en el complejo I es apenas detectable y que la liberación de  $O_2^{\cdot-}$  está dirigida hacia la matriz mitocondrial, donde es convertido a  $H_2O_2$  por la SOD-Mn.

A pesar que en el complejo II no hay generación de  $O_2^{\bullet-}$ , utilizando succinato como sustrato, se observa producción de  $H_2O_2$  a nivel de la matriz mitocondrial y que es debido al TRE. La adición de rotenona, un inhibidor del complejo I (el cual actúa bloqueando el flujo de electrones entre un centro [Fe-S] particular denominado N2 y la UQ)<sup>42</sup>, muestra una disminución en la producción de  $H_2O_2$  generado a partir del sustrato del complejo II.

No obstante, dado que la fuente principal de equivalentes reductores para la cadena respiratoria mitocondrial es el NADH más que el  $FADH_2$  o el succinato, la relevancia de esta producción de EROs no está clara.

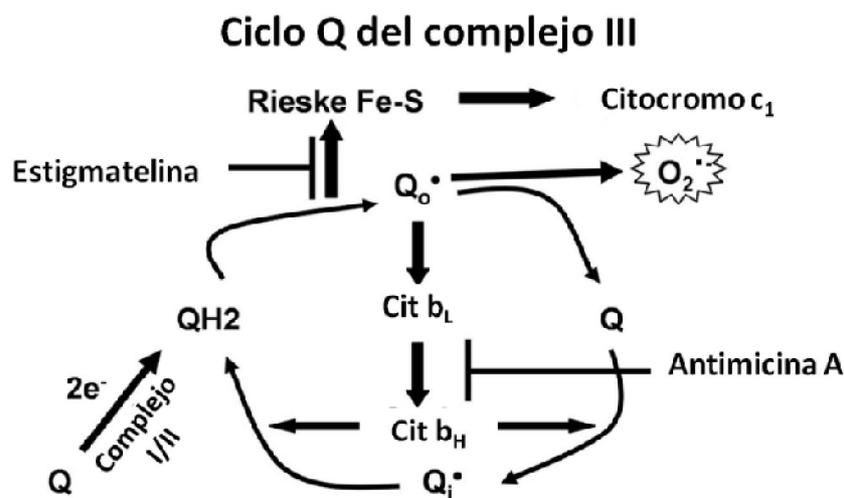
#### *Formación de $O_2^{\bullet-}$ en el complejo III*

En el caso del complejo III, se ha postulado que el  $O_2^{\bullet-}$  posiblemente se produzca como resultado de la auto-oxidación de la ubisemiquinona ( $UQ^{\bullet}$ ), un intermediario que se forma en el complejo III durante el ciclo Q para la translocación de  $H^+$ <sup>43</sup>.

Según el modelo del ciclo Q, la UQ es reducida totalmente del lado interior de la MIM ( $UQH_2$ ); una vez reducida viaja hacia el lado exterior de la MIM translocando o sacando  $2H^+$  que van a formar parte del  $\Delta\mu_H^+$ . En cuanto a los  $2e^-$ , el primero los transfiere al Fe-S de Rieske para que vaya hacia el citocromo  $c_1$ , de modo que la  $UQH_2$  quedaría ahora como el intermediario  $UQ^{\bullet}$ . El  $e^-$  que le queda lo transfiere a los hemo  $b_{566}$  y  $b_{562}$  para que recircule en el ciclo, de modo que al donar este último  $e^-$  quedará nuevamente oxidada (UQ) como se presenta en la figura 4. El hecho de que ya no tenga carga le permite moverse al lado interior de la membrana y recibir el  $e^-$  de  $b_{562}$ , para volver a

formar  $UQ^{\bullet}$ , que en este momento está en posibilidad de recibir otro  $e^{-}$  y  $2H^{+}$  para formar  $UQH_2$  y reiniciar el ciclo<sup>44</sup>.

Se ha propuesto que la especie  $UQ^{\bullet}$  pudiera acumularse y funcionar como un sitio de fuga para los electrones que estarían siendo recibidos por el  $O_2$  para formar  $O_2^{\bullet-}$ . En el caso de la inhibición por antimicina, lo que sucede es que este agente se une al hemo b, impidiéndole recibir los  $e^{-}$  provenientes de la  $UQ^{\bullet}$ , y favoreciendo el escape de ellos hacia el oxígeno<sup>45</sup>.



**Fig. 4 Ciclo Q del complejo III de la CRM.** El esquema muestra que, el ciclo Q es formador de EROs. Esto se corrobora al inhibir específicamente el complejo III con antimicina A y estigmatelina. Modificado<sup>46</sup>.

Además de la CRM, una concentración significativa de EROs pueden producirse por la enzima  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa ( $\alpha$ -KGDH) del ciclo de Krebs y por la monoamina oxidasa (MAOs) localizada en la membrana externa mitocondrial<sup>30, 35</sup>.

### viii. SM, función mitocondrial y EROs

La sobreproducción de EROs a nivel mitocondrial (mtEROs) daña y muta el DNA mitocondrial (mtDNA) además desencadena la liberación de proteínas proapoptóticas hacia el citosol perjudicando la viabilidad celular. Por esta razón, es importante mantener el balance del estado redox mitocondrial el cual está coordinado con los procesos relacionados a la síntesis de EROs, las defensas antioxidantes y la liberación de EROs<sup>47</sup>. El aumento de mtEROs puede contribuir al desarrollo de distintas patologías como lo son las enfermedades cardiovasculares (resistencia a la insulina y diabetes tipo II), el envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, entre otras). Se ha reportado que en diabetes existen desórdenes en la cadena transportadora de electrones mitocondrial, la sobreproducción de EROs y lipoperoxidación o desbalance de las defensas antioxidantes. El incremento de los niveles de EROs permite un daño oxidativo generalizado para todos los componentes mitocondriales<sup>48</sup>.

En un ambiente de hiperglicemia como lo es el SM, se ha reconocido que el incremento en la generación de EROs por la mitocondria es la mayor causa de complicaciones clínicas asociadas a diabetes y obesidad<sup>49</sup>.

La disfunción mitocondrial que desencadena la isquemia y reperfusión del corazón está asociado a la sobreproducción de EROs. El estrés oxidante, junto con la sobrecarga de calcio, induce la apertura del Poro de la Transición de la Permeabilidad mitocondrial (mPTP) el cual es un punto crítico en el daño por reperfusión causando muerte celular por necrosis característica de infarto al miocardio<sup>50</sup>.

En un estado de hipergliceridemia en el cual existe un desbalance en el estado redox debido a un exceso de AGNEs y acumulación de lípidos intracelulares<sup>51</sup>. Se ha propuesto una posible adaptación mitocondrial, la cual radica en la apertura del canal de mitoK<sub>ATP</sub> que funciona como sensor redox, incrementando así el estado 4 de respiración (sin síntesis de ATP) y el catabolismo de los AGNEs y disminuyendo la generación de EROs mitocondrial. Esta adaptación mitocondrial incrementa, en hígado y cerebro, el gasto de energía pudiendo ocurrir de forma similar en otros tejidos en donde se lleve a cabo el metabolismo de lípidos teniendo como resultado un aumento en el gasto general del metabolismo energético del cuerpo previniendo así la lipotoxicidad<sup>52</sup>.

#### ix. Estrés oxidante en el SM

Las enfermedades crónicas presentes en el SM están relacionadas con un aumento en la generación de EROs que conllevan al estrés oxidante, debido a una alta concentración de sustratos oxidativos, AGNEs y triglicéridos<sup>4</sup>.

En estudios realizados tanto en humanos como en ratas obesas y no diabéticas se ha encontrado incremento en la peroxidación lipídica, marcador de daño oxidante, el cual se observa por el aumento de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) las cuales están correlacionadas directamente con el índice de masa corporal (IMC) e indirectamente con la concentración de adiponectina<sup>17</sup>.

#### x. Ácidos grasos y función mitocondrial en el SM

En patologías como la obesidad y la diabetes tipo II existe, en corazón e hígado, una acumulación de AGNEs, los cuales desacoplan la mitocondria,

proceso que incluye la disminución del potencial electroquímico transmembranal e incremento del estado 4 de la respiración<sup>53</sup>.

Se han descrito dos formas en las cuales los ácidos grasos pueden ser transportados hacia el interior de las mitocondrias, la primera es por proteínas específicas como la carnitina aciltransferasa I localizadas en la MEM y la II localizada en la MIM. También la translocasa de ácidos grasos se encuentra en la MIM. La segunda es el llamado “flip – flop”, un transporte pasivo que debido al gradiente de protones ( $H^+$ ), los ácidos grasos protonados atraviesan la MIM rápidamente y espontáneamente hacia la matriz donde ocurre la desprotonación presentándose un desacoplamiento mitocondrial por el acarreo inespecífico de  $H^+$  hacia la matriz<sup>54</sup>.

También se ha reportado que los AGNEs interactúan con las proteínas desacoplantes (UCPs), con el translocador de adenin nucleótidos (ANT) y con los acarreadores de aspartato/glutamato, dicarboxilato; estos acarreadores pueden transportar ácidos grasos no sólo por pertenecer a la misma familia de transportadores, sino porque todos ellos tienen la habilidad de transportar  $Cl^-$ , piruvato y otros mono-aniones<sup>55</sup>.

Los AGNEs interactúan con las membranas mitocondriales de distintas maneras:

*Como protonóforos.* Los AGNEs tienen la habilidad de actuar como protonóforos dependiendo del largo de su cadena de carbonos y del grado de insaturación, este efecto se observa cuando los AGNEs se encuentran sólo en su forma protonada. A este efecto se le denomina “desacoplamiento”<sup>56</sup>.

*Como estimuladores de la generación de EROs.* Los AGNEs pueden inducir aumento en la generación de especies reactivas de distintas formas; una de ellas es por la inactivación en la regeneración de glutatión reducido de su forma oxidada, esto impide que haya remoción de  $H_2O_2$ <sup>57</sup>, otra forma es la interacción entre los ácidos grasos con los complejos respiratorios lo que puede generar inactivación de la cadena respiratoria<sup>37</sup>.

#### xi. Proteínas desacoplantes

Las UCPs forman parte de la familia de proteínas acarreadoras mitocondriales que se encuentran insertadas en la membrana interna mitocondrial y tienen como función translocar distintos metabolitos desde la matriz mitocondrial hacia el exterior y viceversa como por ejemplo ATP, calcio y fosfato<sup>58</sup>.

La UCP-1 es una proteína que se localiza únicamente en las mitocondrias del tejido adiposo café de mamíferos que hibernan y en los recién nacidos<sup>59</sup>. El término proteína desacoplante se utilizó por primera vez para describir la acción que tiene la UCP-1 al disipar la energía que se genera a través del gradiente electroquímico en forma de calor teniendo así una actividad termo regulatoria manteniendo la temperatura adecuada en todo el organismo, esto debido a que lleva a cabo una fuga de protones activada por ácidos grasos teniendo como consecuencia un desacoplamiento entre el transporte de electrones y la síntesis de ATP<sup>60</sup>.

Tiempo después se encontraron proteínas que presentaban similitud con la UCP-1, tanto en secuencia de aminoácidos como en su actividad<sup>61</sup>. Hasta ahora se han descrito seis diferentes isoformas incluyendo la UCP-1. El mRNA de la UCP-2 se encuentra en la gran mayoría de los órganos, la UCP-3 se

encuentra expresada en tejido esquelético y cardiaco, la UCP-4 en el sistema nervioso central, BMCP-1 (BrainMitochondrialCarrier Protein-1) en el cerebro y la KMCP-1(KidneyMitochondrialCarrier Protein-1) en el riñón<sup>62</sup>. A diferencia de la UCP-1, éstas no contribuyen a la termogénesis adaptativa pero si desacoplan la fosforilación oxidativa y se ha postulado que pueden estar participando en la protección contra el aumento de EROs debido a la disminución del estado reducido de la cadena respiratoria mitocondrial<sup>56</sup>, al igual que la UCP-1, se activan en presencia de distintos ácidos grasos polinsaturados y se inactivan por purin-nucleótidos<sup>63</sup>.

La sobreexpresión de la UCPs está asociada a distintas patologías tales como la DT 2, la aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas y el SM<sup>64</sup>. Se ha propuesto que funcionan como amortiguadores de EROs generadas por la mitocondria a través de los complejos respiratorios I y III<sup>65</sup>.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

El SM es una patología heterogénea cuya presentación clínica incluye dislipidemia, obesidad abdominal, resistencia a la insulina e hipertensión; estos factores aumentan el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares.

La prevalencia del SM en países desarrollados es alta y en países subdesarrollados ha ido aumentando en un período de tiempo muy corto.

Este tipo de padecimiento ha disminuido considerablemente la calidad y el tiempo de vida para el humano y se ha convertido en un problema de salud pública, es por ello que entender los mecanismos por lo cual el SM afecta el funcionamiento de distintos órganos es importante para el conocimiento científico.

#### **IV. HIPÓTESIS**

En el modelo de SM donde existe alta concentración de ácidos grasos libres, obesidad central, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina, la sobre expresión de la UCP-3 en mitocondrias aisladas, es una respuesta al estrés oxidante.

#### **V. OBJETIVO**

##### **i. General**

Investigar el efecto del SM en un modelo experimental sobre la expresión de la UCP-3, además de su relación con la producción de EROs en mitocondrias de corazón.

##### **ii. Particulares**

- Analizar la expresión y la función de la UCP-3 en mitocondrias de corazón en un modelo animal con SM.
- Evaluar el efecto de la UCP3 sobre la producción de EROs en mitocondrias de corazón en un modelo de SM utilizando AGL como activadores y GDP como inhibidor.

## VI. METODOLOGÍA

### i. Inducción del SM

Se utilizaron ratas Wistar macho recién destetadas que se dividieron en dos grupos al azar. El grupo control tuvo acceso libre al alimento sólido comercial (LabDiet, fórmula 5001) y agua de beber *ad libitum*.

El SM se indujo en el segundo grupo dándole una solución de sacarosa al 30% como agua de bebida y el mismo alimento que los animales controles durante 24 semanas. Una vez finalizado el tratamiento los animales se pusieron en ayuno durante una noche para realizar los experimentos.

### ii. Medición de peso corporal, grasa retroperitoneal y presión arterial sistólica

Al final del tratamiento y antes de sacrificar a los animales se les midió la presión arterial sistólica por medio de un pletismógrafo que consiste en un sistema que utiliza un sensor que se coloca en la cola del animal, conectado a un transductor de presión, que envía las señales a una computadora equipada con un programa para la captura y procesamiento de datos<sup>10</sup>.

Los animales se pesaron en una balanza granataria y posteriormente se sacrificaron por decapitación, se recuperó la sangre para posteriores análisis, en seguida se extirpó el corazón, el cual se colocó en una solución de aislamiento que contenía sacarosa 250 mM, Tris-base 10 mM, EGTA 1mM a pH 7.4 a 4°C. Se extrajo la grasa retroperitoneal y se pesó en una balanza analítica.

### iii. Determinación de triglicéridos, colesterol, glucosa e insulina

La sangre se centrifugó a 838 x g durante 15 min a 4°C para la obtención del plasma, en el cual se determinaron los siguientes componentes:

Los triglicéridos se determinaron por técnica enzimática en un auto analizador Abbott UP Serie II (Irving, Texas, Estados Unidos).

La insulina se determinó utilizando el método de radio-inmuno-análisis con un estuche comercial Coat-a-Cout (Diagnostic Products, L.A. California, Estados Unidos).

El colesterol y la glucosa se determinaron por un método colorimétrico con estuches comerciales, colesterol método CHOD-PAP randox y glucosa método GOD-PAP randox, respectivamente.

### iv. Preparación de mitocondrias

Los animales se sacrificaron por decapitación. Se extrajo el corazón y las mitocondrias se obtuvieron por centrifugación diferencial.

Se extrajo el corazón y se colocó en una solución de aislamiento que contenía sacarosa 250 mM, Tris-base 10 mM, EGTA 1mM a pH 7.4 a 4°C, se cortó finamente para facilitar la homogenización del tejido cardiaco, se incubó con 1 mg nagarsa, durante 5 minutos. El tejido se colocó en un homogeneizador tipo Potter con 30 mL de solución de aislamiento, se homogenizó y centrifugó a 13,404 x g durante 10 min a 4°C.

Se recuperó el pellet y se homogenizó de nuevo en las mismas condiciones para lograr una mayor extracción de mitocondrias, se centrifugó a 838 x g

durante 10 min a 4°C para sedimentar el tejido conjuntivo y restos celulares. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 13,404 x g durante 10 min obteniendo así la fracción mitocondrial. El pellet se resuspendió y se incubó durante 10 min con una solución de aislamiento suplementada con 0.1% de albúmina de suero bovino (ASB). Pasado este tiempo las muestras se centrifugaron a 13,404 x g para quitar el exceso de ASB y se obtuvo la fracción mitocondrial, la cual se resuspendió en 1 ml de solución de aislamiento.

#### v. Determinación de proteína

Las proteínas se cuantificaron según el método de Lowry modificado<sup>66</sup>.

Se utilizan tres soluciones: Sol. A (NaOH al 1%), Sol. B (tartrato de sodio y potasio al 1%) y Sol. C (CuSO<sub>4</sub> al 0.5%).

Las mitocondrias aisladas de corazón se diluyeron 1:100 en solución fisiológica (NaCl al 0.9%) y se determinó la proteína con 100 µL de esta solución por duplicado. Paralelamente se preparó una curva de calibración con ASB a una concentración de 1 µg/µL de la siguiente manera: se colocaron 0, 5, 10, 20 y 40 µL de la solución de ASB en tubos de ensayo y se llevó a un volumen final de 100 µL con solución salina, se adicionó 1 mL de la mezcla hecha con las soluciones A (10 mL), B (100 µL) y C (100 µL). Después de 10 min de incubación se adicionaron 100 µL de Follin 1 N (Sigma) y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. El registro de la absorbancia se realizó a 750 nm en un espectrofotómetro. La curva de calibración que corresponde a la absorbancia en función de las concentraciones utilizadas de

ASB es lineal y obedece a la ley de Beer Lambert, lo que permitió determinar la concentración de proteína presente en las muestras mitocondriales.

vi. Análisis de la función mitocondrial por oximetría

La respiración mitocondrial está acoplada a la síntesis de ATP (consumo de oxígeno)<sup>20</sup>, sin embargo, este proceso puede estar alterado por presencia de proteínas acarreadoras de protones o durante el aislamiento de las mitocondrias. Un método para verificar la integridad de las mitocondrias es el control respiratorio, en donde se determinan dos eventos, el estado 3 de la respiración (velocidad de respiración en presencia de ADP, es decir, cuando hay síntesis de ATP) y el estado 4 de la respiración (velocidad de respiración en ausencia de ADP, es decir, sin síntesis de ATP). Así pues el control respiratorio se puede calcular de la siguiente manera:

$$CR = \frac{(\text{Consumo de } O_2/\text{min}/\text{mg}_{\text{prot}}) \text{ en el edo 3}}{(\text{Consumo de } O_2/\text{min}/\text{mg}_{\text{prot}}) \text{ en el edo 4}}$$

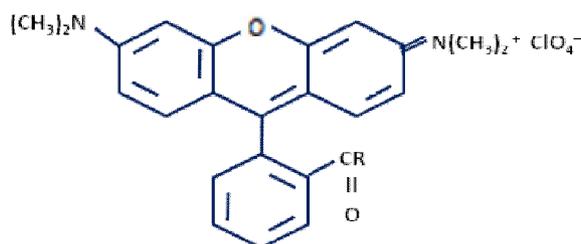
Se utilizó una cámara de vidrio de 1.5 mL equipada con un electrodo de oxígeno tipo Clark. El oxígeno se detectó con un monitor biológico YSI Modelo 5300 (oxímetro) al cual estaba conectado el electrodo. El registro se obtuvo en un graficador Kipp & Zonen.

La incubación de la mitocondria se llevó a cabo en una cámara equipada con agitación magnética y mantenida a 30°C en una solución de 1.45 mL que contenía: KCl 120 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, HEPES 3 mM, EGTA 10 µM a pH 7.4. Se adicionaron 0.25 mg/mL de proteína mitocondrial de corazón para cada experimento, el consumo de oxígeno se inició al adicionar succinato 10 mM en

presencia de rotenona 4  $\mu\text{M}$  (estado 4), después de 2 a 3 min se adicionó ADP 500  $\mu\text{M}$  que corresponde a un mayor consumo de oxígeno acoplado a la síntesis de ATP (estado 3).

vii. Análisis del potencial transmembranal por fluorometría

La tetrametilrodaminametiléster (TMRM) pertenece a un grupo de cationes lipofílicos tales como la rodamina 123, la tetrametilrodaminaéster (TMRE), la safranina, y el tetrafenilfosfonium (TPP), los cuales son compuestos que se acumulan en la matriz mitocondrial durante el consumo de  $\text{O}_2$  y la translocación de  $\text{H}^+$  de la matriz al espacio intermembranal<sup>67</sup>.



**Fig. 5 Estructura química de la tetrametilrodaminametiléster (TMRM)**

Cuando se activa la cadena respiratoria mitocondrial se forma un gradiente de protones y el lado interno de la matriz mitocondrial se carga negativamente, debido a la translocación de los  $\text{H}^+$  a través de los complejos I, III y IV hacia el espacio intermembranal. Esta diferencia de carga hace que la TMRM se desplace del espacio intermembranal hacia el lado interno de la membrana interna mitocondrial, lo que se traduce en un “quenching” o apagamiento de la fluorescencia. El cambio de la fluorescencia se detectó en un espectrofluorómetro marca Perkin-Elmer, modelo LS-50-B equipado con un software FL WinLab, con agitación magnética a 30°C. Las longitudes de onda

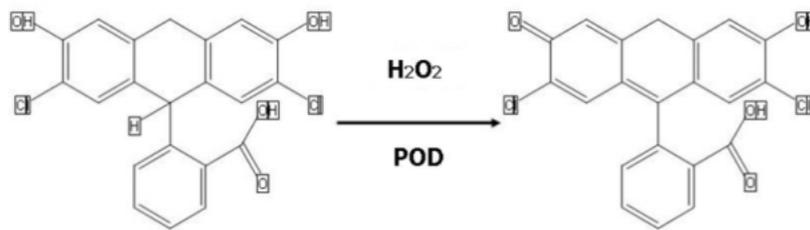
de excitación y emisión son 550 y 590 nm, respectivamente; las ranuras para el paso de luz (slit) fueron de 6 nm tanto en la emisión como en la excitación.

En una celda de cuarzo con 1.95 mL de una solución que contiene KCl 120mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mM, HEPES 3 mM, EGTA 10mM a pH 7.4; se adicionaron 0.25 mg/mL de proteína mitocondrial de corazón, 10  $\mu\text{M}$  de TMRM, 4  $\mu\text{M}$  de rotenona, 100ng de nigericina, 10ng/mL de oligomicina. Se inició la lectura de la fluorescencia y se obtuvo la línea basal en aproximadamente 2 min, posteriormente se adicionó succinato 10 mM como sustrato del complejo II de la cadena respiratoria generando así un potencial transmembranal y finalmente para abatir este potencial se adicionó CCCP a una concentración de 2  $\mu\text{M}$ .

Para poder medir la actividad de la UCP-3 por este método se adicionó GDP 500  $\mu\text{M}$ , como inhibidor de la proteína.

#### viii. Cuantificación de la generación de EROs

Durante la oxidación de sustratos como el succinato o el piruvato/malato por la CRM, se genera  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , el cual se convierte rápidamente a  $\text{H}_2\text{O}_2$  por la MnSOD el cual difunde libremente hacia afuera de la matriz mitocondrial. La detección del  $\text{H}_2\text{O}_2$  se realizó por medio de la oxidación del 2, 7 – dihidroclorofluoresceína en presencia de peroxidasa<sup>68</sup> (ver Figura 6).



**Fig. 6** El esquema muestra la manera que el DCF hidrolizado utiliza la peroxidasa (POD) para detectar el  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; en el momento que interacciona con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se oxida y emite fluorescencia.

El equipo que se utilizó fue un espectrofluorómetro Perkin-Elmer modelo LS-50-B con un software FL WinLab equipado con agitación magnética y baño maría de agua para mantener la temperatura de  $30^\circ\text{C}$ . Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 475 y 525 nm, respectivamente; las ranuras para el paso de luz se seleccionaron de 8 nm tanto en la excitación como en la emisión.

En una celda de cuarzo se adicionaron 1.95 mL de una solución que contenía KCl 120 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mM, HEPES 3 mM, EGTA 10  $\mu\text{M}$  a pH 7.4, se adicionaron 0.25 mg/mL de proteína mitocondrial de corazón, DCFhidrolizado y peroxidasa (POD). Se inició la medida de la fluorescencia y se obtuvo la línea basal después de un minuto, posteriormente se adicionó como sustrato succinato (10 mM) o piruvato/malato (5 mM y 2.5 mM, respectivamente) para inducir el estado 4 de respiración, después se adicionó ADP 250  $\mu\text{M}$  para determinar la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el estado 3.

Durante el estado 4 se observó el efecto del de ácido oleico (AO) hasta una concentración de 40  $\mu$ M. Para evidenciar la presencia de la UCP3 se incubó la mitocondria en presencia de GDP (500 $\mu$ M).

ix. Análisis de la expresión de la UCP-3 por western blot

Una vez obtenidas las mitocondrias se adicionó una mezcla de anti-proteasas (5 mg/ mL de PMSF, 1 mg/mL de leupeptina, 1 mg/mL de pepstatina y 1mg/mL de aprotonina A) para descartar la degradación de proteína. Posteriormente 80  $\mu$ g de proteína se depositaron en geles SDS-PAGE al 12% y se realizó la electroforesis a 120 V durante 3 horas en un amortiguador de tris-glicina-SDS a pH 8.3 a 4°C.

Después de la separación de la proteína por electroforesis, el gel se transfirió a una membrana de PVDF (Millipore) durante 70 min a 350 mA utilizando un amortiguador de tris-glicina y metanol al 10% a pH 8.5 a 4°C. Posteriormente la membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con solución bloqueadora que contiene TBS-T (tris-HCl 10 mM, NaCl 10 mM, tween-20 0.1%) y leche descremada al 5%. Al término del bloqueo se eliminó el exceso de leche con TBS-T y se incubó con el anticuerpo primario anti UCP-3 de cabra (Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:1,000 en solución de TBS y leche descremada al 3%, la membrana se incubó durante toda la noche a 4°C, posteriormente se lavó 3 veces con TBS-T y se incubó con el anticuerpo secundario IgG anti-cabra de conejo conjugado con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1:2,500 en solución de TBS-T y leche descremada al 3% durante 2 horas a temperatura ambiente. Concluido el tiempo de incubación, la membrana se lavó 5 veces con TBS-T y se cubrió

durante 3 min con una mezcla del reactivo para revelar por quimioluminiscencia (Chemiluminescent HRP Substrate Immobilon™ Western, Millipore), se eliminó el exceso de los reactivos y se expuso a una placa de autorradiografía (Biomax MR Film, Kodak) durante 3 min.

Para el control de carga, la membrana fue sometida a un stripping y posteriormente se bloqueó y se incubó con anti ANT de cabra (Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:3,000 y posteriormente con el anticuerpo secundario IgG anti-cabra de conejo conjugado con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1:5,000, como control de carga para determinar si las muestras fueron cargadas con la misma cantidad de proteína.

El análisis de imágenes se realiza por densitometría utilizando el programa de computo ImageJ, desarrollado por el National Institute of Health.

#### x. Análisis de los AGNEs por cromatografía de gases

La extracción de los AGNEs se realizó según el método de Folch<sup>69</sup> con una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v) que contenía 0.002% de BHT como antioxidante (Butil-hidroxitolueno, SIGMA) y se llevó a cabo en tres etapas:

1.- Extracción: Se utilizó 1 mg de proteína o 100 µl de plasma la cual se le adicionaron 20 µL y 50 µl de (C:19) como estándar interno (1 µg/µL) respectivamente, se llevó a un volumen final de 1 mL con solución salina al 0.9%. Posteriormente se adicionó 1 mL de metanol y se agitó con vortex durante 30 seg; se agregaron 2 mL de cloroformo y se agitó con vortex durante 30 seg. Las muestras se centrifugaron a 855 x g durante 5 min y se recuperó la fase de cloroformo (fase orgánica); la extracción se realizó dos veces. Se

adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de metanol para clarificar la muestra y sulfato de sodio para eliminar los residuos de agua; se filtró sobre algodón y se evaporó con gas nitrógeno de alta pureza. Todos los pasos excepto la evaporación se realizaron en hielo.

2.- Derivatización: Al residuo lipídico se le agregaron 1 mL de metanol, 200  $\mu\text{L}$  de 2,4-dimetoxipropano (Sigma) y 40  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico (Sigma) se agitó con vortex durante 30 seg; la reacción se realizó a temperatura ambiente durante 30 min agitando con vortex cada 5 min. Se agregó 1 mL de solución salina al 5%, 2 mL de hexano, se agitó con vortex durante 30 seg y se centrifugaron las muestras a 854.5 x g durante 3 min. Se recuperó la fase orgánica (hexano) y se repitió la extracción 2 veces. Finalmente se evaporó el hexano con gas nitrógeno a temperatura ambiente.

3.- Cromatografía de gas: El residuo lipídico se disolvió en 100  $\mu\text{L}$  de hexano se agitó con vortex y se analizó una fracción de esta solución por el cromatógrafo de gases. La temperatura del inyector y la columna se fijaron a 225°C y 200°C, respectivamente y se utilizó gas helio como acarreador de la muestra a una presión de 1.1 Kg/cm<sup>2</sup>. La detección se realizó por medio de la flama de H<sub>2</sub>. Los picos de cada ácido graso se cuantificaron gracias a la comparación de su tiempo de retención con el de los estándares. La cuantificación se realizó gracias a la presencia de un estándar interno, que en este caso fue el ácido nonadecanoico (C19:0).

## xi. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron aplicando la prueba de "t" de Student para grupos no pareados, para ello se utilizó el programa estadístico Sigma Plot 9.0. Los resultados numéricos se representaran como la media  $\pm$  desviación estándar. El número de animales utilizado está indicado abajo en las figuras y tablas.

## VII. RESULTADOS

### *Características generales de los animales*

Finalizado el tratamiento de 24 semanas con sacarosa al 30%, los animales con SM tuvieron un peso corporal mayor con respecto a los animales controles. Este aumento en el peso corporal está asociado con el aumento en la grasa retroperitoneal, la cual fue significativamente mayor en la rata con SM (Tabla IV). El consumo de sacarosa indujo también un incremento en la presión arterial y en los niveles plasmáticos de triglicéridos e insulina ( $p < 0.05$ ), mientras que los niveles de glucosa se mantuvieron normales.

**Tabla IV.** Características generales de los animales

Variables	Control	SM
Peso corporal (g)	440 ± 29	526 ± 57*
Grasa retroperitoneal (g)	2.87 ± 0.8	15.3 ± 5.2**
Presión arterial sistólica (mmHg)	117.4 ± 2.9	139.7 ± 2.2*
Triglicéridos (mg/dl)	43.1 ± 7.5	96.9 ± 7.1***
Colesterol (mg/dl)	38.4 ± 12.8	42.2 ± 13.2
Glucosa (mmol/L)	6.0 ± 1.0	5.9 ± 1.2
AGNEs palmáticos (mM)	0.67 ± 0.04	1.26 ± 0.08*
Insulina (μUI/mL)	8.1 ± 1.7	15.2 ± 3.1*

Los valores de todas las variables se obtuvieron al final del periodo de tratamiento. La insulina, los triglicéridos, el colesterol y la glucosa se determinaron en plasma. Estos valores representan la media ± DE; n= 5 animales diferentes. \*\*\*Significativamente diferente el grupo C del grupo SM  $p < 0.001$ , \*\* $p = 0.01$ , \* $p = 0.05$ .

Con estos datos podemos corroborar que las ratas con sacarosa cumplen con al menos tres características que definen el SM, tal como hipertensión, obesidad central, hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia.

#### *Análisis de los AGNEs en el corazón*

La composición de AGNEs tanto en homogenado como en mitocondrias de corazón de ratas controles y con SM se determinaron por cromatografía de gases. Se identificaron nueve ácidos grasos (Tabla V) de los cuales se obtuvo un incremento significativo en los ácidos palmítico, esteárico y DHA en el homogenado de corazón de animales con SM respecto a los controles. Para el caso de las mitocondrias de corazón, el análisis de los AGNEs muestra un aumento significativo en la concentración de los ácidos palmítico, palmitoleico y oleico mientras que los ácidos, linoleico, esteárico, araquidónico, EPA, DPA y DHA se mantuvieron similares en ambos grupos. Los AGNEs totales están ligeramente incrementados en las mitocondrias de corazón de ratas con SM en comparación con las ratas control sin embargo no es significativamente diferente mientras que en el homogenado no hubo diferencia significativa en los AGNEs totales entre ambos grupos.

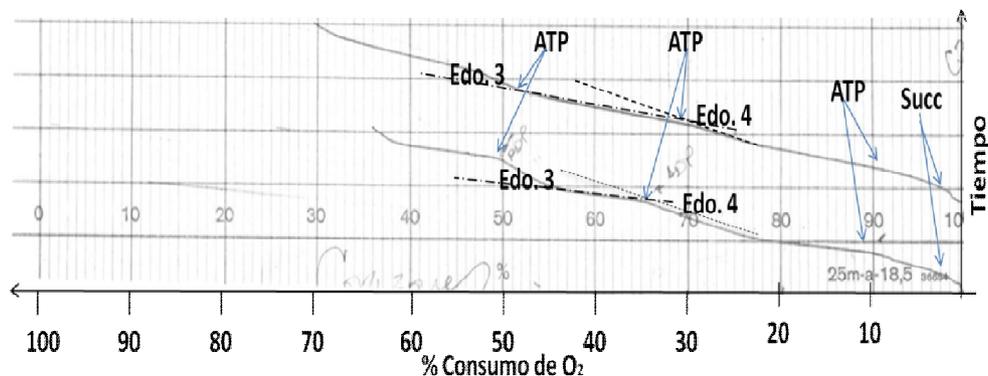
**Tabla V.** Ácidos grasos libres en homogenado y mitocondrias de corazón

AGNE	Homogenado		Mitocondria	
	Control	SM	Control	SM
Palmitico (C16:0)	13.5 ± 1.6	14.9 ± 2.0	12.3 ± 0.2	16.3 ± 1.2***
Palmitoleico (C16:1)	0.05 ± 0.015	0.4 ± 0.1*	0.04 ± 0.01	0.5 ± 0.2**
Esteárico (C18:0)	14.6 ± 2.7	9.1 ± 0.3*	20.4 ± 1.4	17.6 ± 1.9
Oleico (C18:1)	4.2 ± 1.2	6.3 ± 1.7	5.9 ± 8.4	12.4 ± 3.1**
Linoleico (C18:2)	8.4 ± 1.5	6.4 ± 0.9	18.7 ± 5.1	19.4 ± 6.2
Araquidónico (C20:4)	1.7 ± 0.5	1.8 ± 0.5	18.4 ± 2.3	19.6 ± 1.8
EPA (C20: 5n-3)	6.8 ± 1.8	6.4 ± 1.6	4.5 ± 0.6	4.9 ± 0.2
DPA (C22: 5n-3)	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.1	2.2 ± 0.1	1.5 ± 0.7
DHA (C22: 6n-3)	1.6 ± 0.5	0.7 ± 0.2*	18.6 ± 2.9	16.0 ± 1.4
Cantidad total	51.3 ± 4.1	46.7 ± 3.1	101.3 ± 5.8	108.2 ± 10.0

Los valores se expresan en nmol/mg de proteína. Los valores se expresan como la media ± DE; n=4 animales diferentes. \*\*\*Significativamente diferente el grupo C del grupo SM  $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.02$ .

#### *Efecto del SM sobre el consumo de O<sub>2</sub> y el potencial transmembranal en mitocondrias aisladas*

El consumo de oxígeno en las mitocondrias se determinó por medio de oximetría. El control respiratorio (CR) obtenido del cociente del estado 3 (síntesis de ATP) entre el estado 4 (sin síntesis de ATP) muestra el estado funcional de las mitocondrias aisladas en cuanto al acoplamiento del consumo de oxígeno durante la respiración a la síntesis de ATP. En la figura 7 se observa trazos típicos del consumo de oxígeno en función del tiempo de las mitocondrias de corazón de rata con SM y control.



**Fig. 7. Controles respiratorios.** Se muestran ejemplos de los trazos obtenidos como controles respiratorios de las mitocondrias aisladas de corazón de rata. En este caso, los trazos son de mitocondrias de SM (superior) y control (inferior). Se indican los puntos donde se llevan a cabo las adiciones del sustrato oxidativo, succinato (estado 4) y ADP (estado 3). El control respiratorio es el cociente resultante de las velocidades del estado 3 y el estado 4.

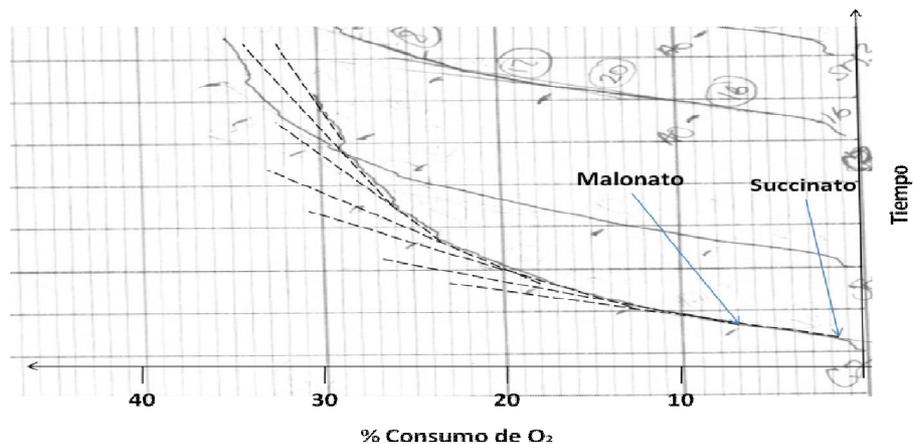
Las mitocondrias de SM consumen  $O_2$  con mayor velocidad en el estado 4 que las mitocondrias de corazón de los animales controles (Tabla VI). En el estado 3, las mitocondrias de SM consumen el  $O_2$  con una velocidad menor que las mitocondrias controles. Las mitocondrias con SM tienen menor control respiratorio que las mitocondrias controles.

**Tabla VI.** Variables respiratorias en mitocondrias de corazón

	Control	SM
CR	2.27 ± 0.20	1.33 ± 0.22**
Edo. 3 (natO <sub>2</sub> /min/mg prot)	214.01 ± 32.64	149.16 ± 24.83*
Edo. 4 (natO <sub>2</sub> /min/mg prot)	97.28 ± 7.48	110.25 ± 6.42

El control respiratorio (CR) carece de unidades. Los valores representan la media ± DE; n=5 animales diferentes. \*\*Significativamente diferente el grupo C del grupo SM  $p < 0.001$ , \*  $p < 0.02$ .

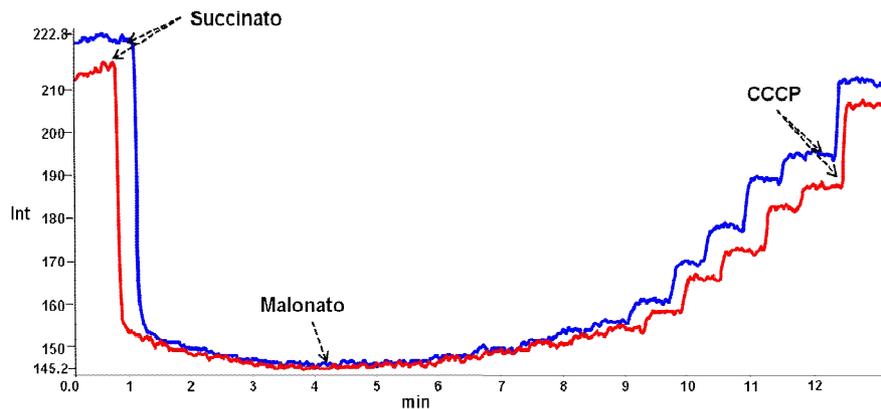
El consumo de oxígeno en mitocondria aisladas se realizó en presencia de succinato más rotenona como sustrato oxidativo en el estado 4, en ausencia de ADP. Para establecer la relación entre el consumo de  $O_2$  y el potencial transmembranal, se utilizó el malonato como inhibidor del complejo II, succinato deshidrogenasa (SDH). La inhibición del estado 4 por malonato se refleja en una disminución del consumo de  $O_2$  de una manera dosis-respuesta (Figura 8). Esta reducción de consumo de  $O_2$  está relacionada con la alteración en el potencial transmembranal en la mitocondria.



**Fig. 8 Trazo representativo del consumo de  $O_2$  en el estado 4.** Las mitocondrias de rata (0.25 mg/mL), fueron adicionadas al medio de incubación (KCl,  $KH_2PO_4$ , HEPES y EGTA) a 30 °C y pH 7.4, en presencia de rotenona (4  $\mu$ M) inhibidor del complejo I, oligomicina (100 ng/mL) inhibidor de la ATPasa y nigericina (100 ng) inhibidor del  $\Delta$ pH. La adición de succinato (10 mM) aumenta el consumo de  $O_2$  mientras que la adición de malonato, inhibidor del complejo II, induce una disminución en el consumo de este.

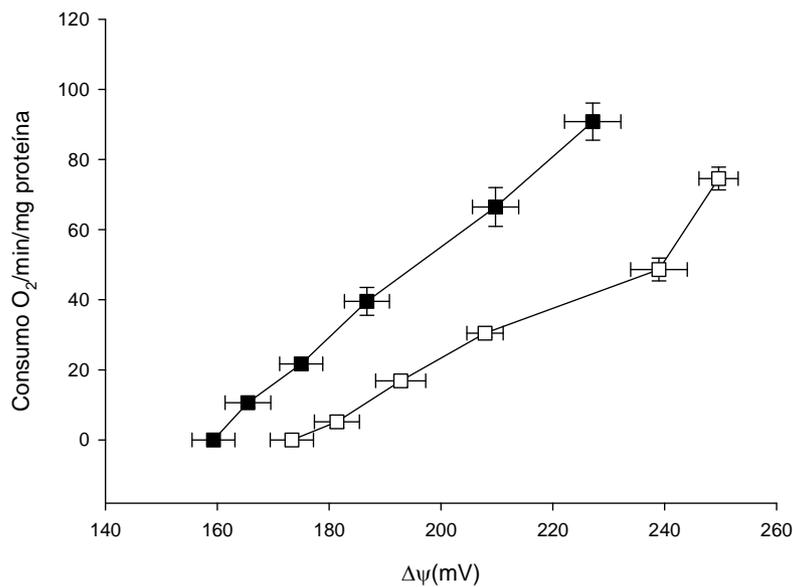
El potencial transmembranal mitocondrial se determinó midiendo la fluorescencia de la rodamina (TMRM). En la figura 9 se presenta una disminución rápida de la fluorescencia de la rodamina, (quenching) al momento de adicionar el succinato al medio de incubación, después la fluorescencia se

estabiliza. La diferencia entre la fluorescencia inicial (antes del succinato) y la fluorescencia final (después del succinato) corresponde al potencial transmembranal de la mitocondria. La adición del malonato, inhibidor de la SDH, induce una disminución dosis-respuesta en el potencial transmembranal. Al final, la adición del CCCP induce un colapso total del potencial.



**Fig. 9 Trazos obtenidos al determinar el potencial transmembranal mitocondrial por fluorescencia.** La mitocondria (0.25 mg/mL) fue adicionada a 30°C al medio de incubación (KCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , HEPES y EGTA) con pH 7.4 y en presencia del fluoróforo TMRM (10  $\mu\text{M}$ ), rotenona (4  $\mu\text{M}$ ) inhibidor del complejo I, oligomicina (10 ng/mL) el cual inhibe la síntesis de ATP y nigericina (100ng) que evita el  $\Delta\text{pH}$ , al adicionar succinato (10 mM) se forma un potencial, lo cual se refleja en la caída de la curva de fluorescencia. Posteriormente éste disminuye al adicionar de forma aditiva malonato (hasta 3.2 mM) inhibiendo así la SDH. Finalmente se adicionó el desacoplante CCCP (2  $\mu\text{M}$ ), abatiendo así el potencial transmembranal. El trazo negro muestra el potencial transmembranal de las mitocondrias de rata control mientras que el trazo gris representa con mitocondrias de corazón de rata con SM.

La figura 10 que representa el potencial transmembral en función del consumo de  $O_2$  muestra que la velocidad del consumo de  $O_2$  es mayor en las mitocondrias de los animales con SM que la mitocondrias controles por el mismo potencial transmembral. Este resultado indica que hay una fuga de protones en la mitocondrias con SM con respecto a los animales controles.



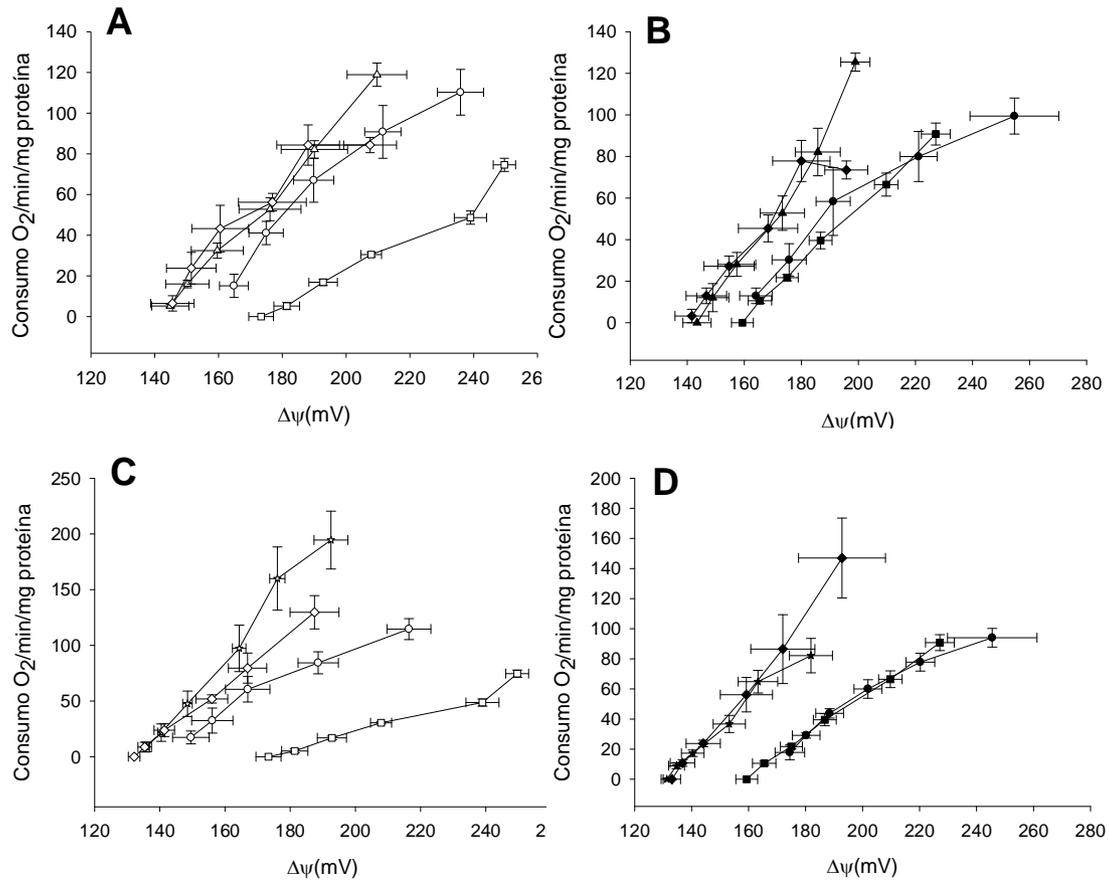
**Fig. 10 Efecto del SM sobre el consumo de  $O_2$  y sobre el potencial transmembral en mitocondrias aisladas de corazón de rata control (□) vs mitocondrias de corazón de rata con SM (■).** Las mitocondrias del grupo con SM muestran una fuga de protones con respecto al grupo control lo que se ve reflejado en un aumento en la respiración y una disminución en el potencial transmembral mitocondrial en cualquier punto del gráfico. Cada punto corresponde al promedio  $\pm$  DE;  $n=4$  experimentos, cada experimento corresponde a un animal diferente.

La figura 11A muestra el efecto del ácido linoleico (AL) en mitocondrias controles desplazando la curva hacia un mayor consumo de  $O_2$  y menor potencial transmembral en comparación con las mitocondrias sin AL. La preincubación de las mitocondria con GDP no tuvo efecto sobre el

desacoplamiento de la mitocondria inducido por el AL. Sin embargo la pre-incubación de la mitocondria con carboxiatractilósido (CAT) revierte el efecto desacoplante del AL. Cabe señalar que el GDP es inhibidor de la UCP3 y el CAT es inhibidor del translocador de adenin nucleótidos (ANT).

El efecto del AL en presencia y en ausencia de los dos inhibidores GDP y CAT sobre el funcionamiento de las mitocondria aisladas de corazón con SM se presenta en la figura 11B, se encontró que la mitocondria con SM es mucho más sensible al AL que la mitocondria control. Aunque el comportamiento de la mitocondria con SM es similar al del control en cuanto a la sensibilidad de inhibición con GDP y CAT (Figura 10B).

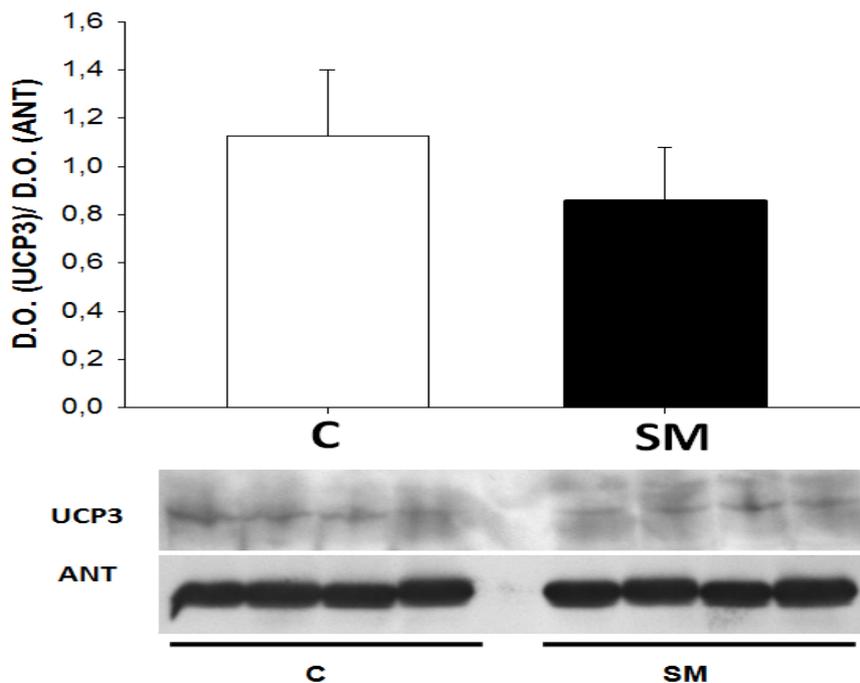
El efecto del ácido oleico (AO) sobre el consumo de  $O_2$  y sobre el potencial transmembranal en mitocondria controles o con SM respectivamente se presenta en las figuras 11C y 11D. Comparando la figura 11A con la 11B y la figura 11C con la 11D, se observa que el AO tiene un efecto desacoplante en ambas mitocondrias al doble de la concentración del AL. También se observa que el CAT revierte el efecto desacoplante del AO en ambas mitocondrias.



**Fig. 11 Efecto del ácido oleico, ácido linoleico, GDP y CAT sobre el consumo de  $O_2$  en función del potencial transmembranal en mitocondrias de corazón.** A y C muestran el comportamiento de las mitocondrias aisladas de rata control sobre los distintos activadores e inhibidores específicos tanto de la UCP3 como del ANT, mientras que, en B y D se expone el efecto que tiene el SM sobre la actividad de estos. La comparación entre el efecto del AL (A y B) y el AO (C y D) demuestra que se necesita, en concentración, 2.5 veces más del AO (5  $\mu$ M) para obtener el mismo efecto desacoplante que el AL (2  $\mu$ M) sobre las mitocondrias de ambos grupos. Las mitocondrias de corazón de rata control ( $\square$ ) así como las de rata con SM ( $\blacksquare$ ) fueron incubadas en presencia de los inhibidores nigericina y oligomicina además de succinato más rotenona como sustrato oxidativo, se adicionó malonato de forma aditiva, en presencia de 2  $\mu$ M de AL $\Delta$  (A y B); 5  $\mu$ M de AO $\star$ (C y D);  $\diamond$ , hubo pre-incubación con 500  $\mu$ M de GDP;  $\circ$ , se adicionó al medio de incubación 1 mM de CAT. Los datos representan la media  $\pm$  EE; n=4 diferentes experimentos, cada experimento corresponde a un animal diferente.

### Expresión de la UCP3 en mitocondrias aisladas de corazón

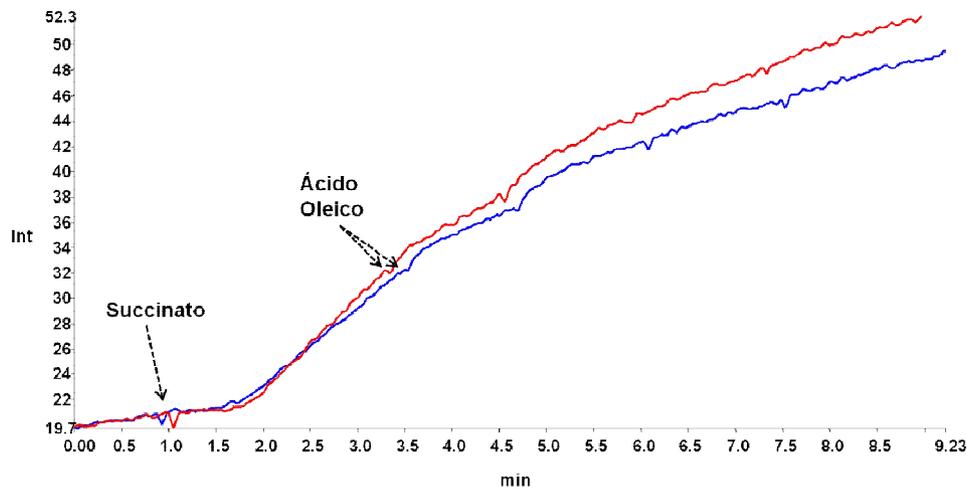
El análisis por Western Blot utilizando anticuerpos anti UCP3 reveló que no existe cambio significativo en la expresión de la UCP3 en mitocondrias de corazón de ambos grupos experimentales (Figura 12). Tampoco existen diferencias en la expresión del ANT utilizando anticuerpos anti ANT. El hecho que la expresión del ANT no se ha modificado, la proteína se tomó control de carga para evaluar la expresión de la UCP3.



**Fig. 12 Expresión de la UCP3 en mitocondrias aisladas de corazón de animales control (C) y con SM.** Se realizó el Western-Blot utilizando un anticuerpo policlonal contra la UCP3, como se describió anteriormente. Las bandas que se muestran corresponden al peso molecular de la proteína UCP3 (~34 KDa) y al ANT (~37 KDa). Las intensidades de las bandas de la UCP3 en las muestras controles son similares a las correspondientes al SM. En la gráfica de barras, presenta el cociente de las densidades ópticas (DO) de la UCP3 y del ANT el cual fue tomado como marcador de carga debido a que no hubo cambio alguno en su expresión. Aunque los valores medios son diferentes, no son estadísticamente significativos. Cada punto corresponde al promedio  $\pm$  DE de 4 experimentos; cada experimento corresponde a un 4 animales diferentes.

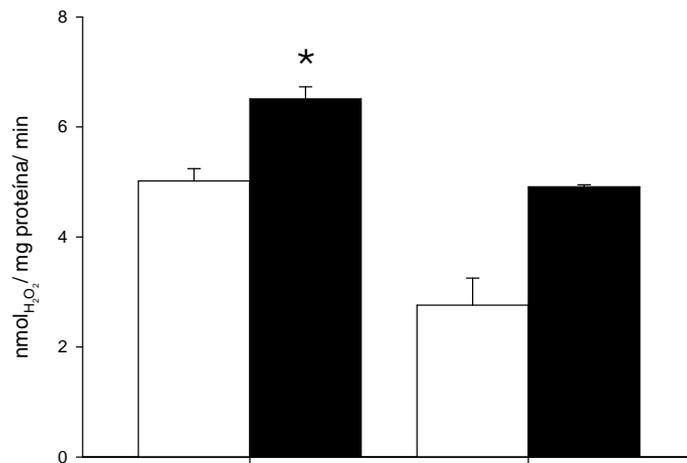
### *Generación de EROs en mitocondrias aisladas de corazón*

La generación de EROs por la mitocondria se determinó por medio de la fluorescencia del DCF en presencia de peroxidasa en el medio de incubación de las mitocondrias en presencia de sustrato oxidable como el piruvato/malato (condiciones de transferencia directa de electrones) o el succinato (condiciones de transferencia reversa de electrones). La presencia de peroxidasa permite amplificar la detección de  $H_2O_2$  que se forma a partir de la conversión del  $O_2^{\bullet-}$  por medio de SOD en la mitocondria. En la cadena respiratoria mitocondrial, la transferencia de electrones al  $O_2$  genera  $O_2^{\bullet-}$ . La figura 13 representa un trazo típico de la generación del  $H_2O_2$  en tiempo real por la mitocondria de corazón en el estado 4 en presencia de piruvato y malato. Después que la fluorescencia basal del DCF en presencia de mitocondrias se estabiliza, se adiciona el sustrato y se observa un aumento de la fluorescencia en función de tiempo que refleja la oxidación del DCF por los EROs generados durante la oxidación del sustrato. La adición del ácido graso aumenta la velocidad de generación de EROs por la mitocondria oxidando a los sustratos.



**Fig. 13 Trazos representativos del efecto del ácido oleico sobre la liberación de  $H_2O_2$**  Se determinó la velocidad de liberación de  $H_2O_2$  en mitocondrias aisladas de corazón (0.25 mg/mL) en el medio de incubación (KCl,  $KH_2PO_4$ , HEPES, EGTA) a  $30^\circ C$  y pH 7.4, DCF y POD; un minuto después de comenzado el trazo, se adicionó el sustrato oxidativo, en este caso fue piruvato/malato, y ácido oleico hasta  $40\mu M$ . Se muestra la comparación entre control (azul) y SM (rojo). El ácido graso indujo un aumento en la velocidad de liberación de  $H_2O_2$  en los dos grupos observándose siempre una mayor liberación de  $H_2O_2$  con respecto al tiempo en las mitocondrias aisladas de corazón de rata con SM en comparación con las mitocondrias de rata control.

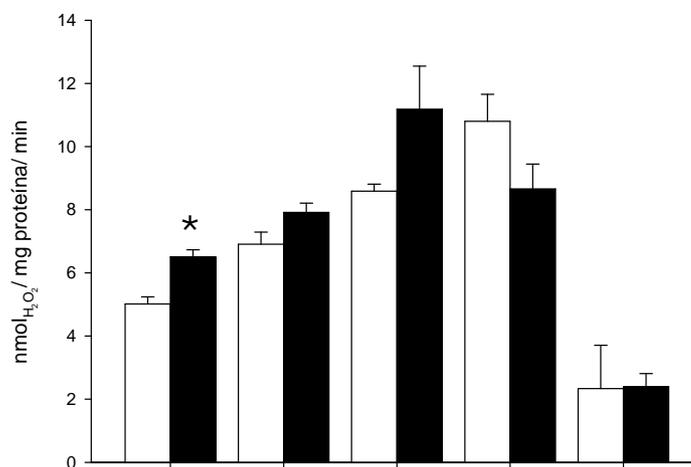
La figura 14 muestra que las mitocondrias de corazón con SM generan EROs con una velocidad mayor que la de mitocondrias controles en el estado 4 en presencia de P/M. La adición del ADP reduce la generación de EROs en ambas mitocondrias siendo siempre mayor la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las de SM.



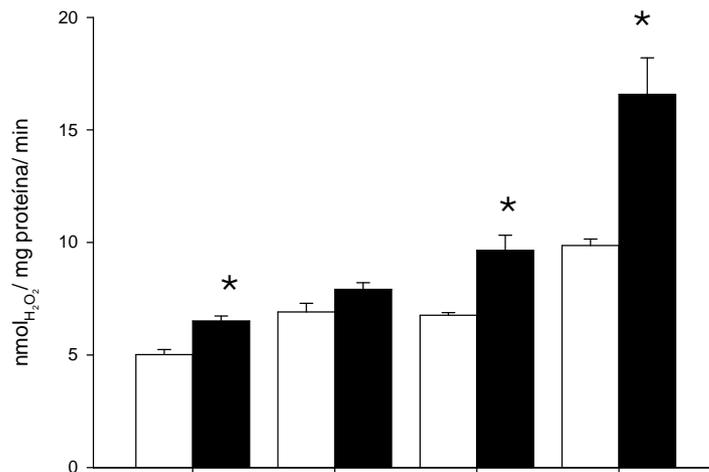
**Fig. 14 Velocidad de liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los estados 4 (P/M) y 3 (+ADP) de la respiración mitocondrial.** La velocidad se calculó construyendo una curva tipo utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de concentración conocida como estándar. Se observa que las mitocondrias de corazón de rata con SM (■) liberaron el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una mayor velocidad que las mitocondrias de corazón de rata control (□), en presencia de P/M, tanto en el estado 4 como en el estado 3 (en presencia de ADP). \*p<0.005. Las barras representan la media ± DE; n= 4 animales diferentes.

Los ácidos grasos libres pueden modular la generación de EROs en la mitocondria en el estado 4 ya sea a través del desacoplamiento o mediante la interacción con la cadena respiratoria. Se evaluó el efecto del ácido oleico como ácidos grasos libres en la generación de EROs en condiciones de transferencia directa de electrones (TDE) en presencia de P/M en mitocondrias

aisladas de corazón de ratas C y SM. Se observa que la generación de EROs aumenta con respecto a la adición de AO (Figura 15) aunque, a una alta concentración (40  $\mu$ M), ésta disminuye. La adición de GDP al medio de incubación indujo un aumento en la producción de EROs sólo en la mitocondria con SM (Figura 16). Este efecto se exagera en presencia de AO en ambas mitocondrias siendo más importante en las mitocondrias con SM.



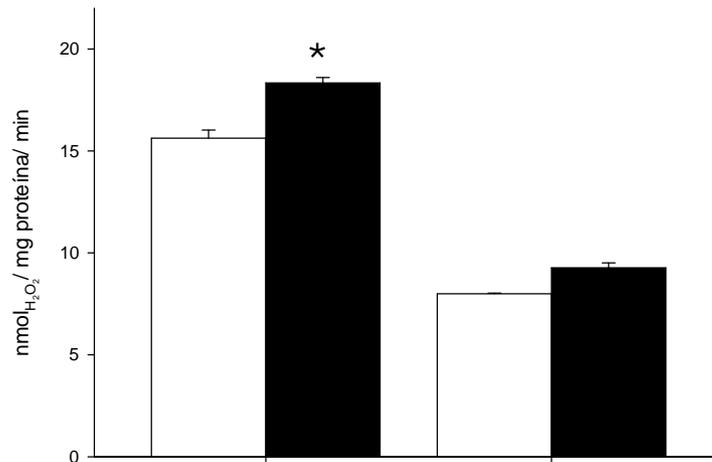
**Fig. 15 Efecto del ácido oleico sobre la velocidad de la liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en condiciones de transferencia directa de electrones.** En la gráfica de barras se observa que en presencia de P/M, la velocidad de liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en mitocondrias de corazón de rata con SM (■) es mayor en comparación con las mitocondrias de rata control (□). La adición de ácido oleico de manera aditiva genera un aumento en la liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en ambos grupos. Cuando se adiciona el ácido graso a la concentración de 40  $\mu$ M, la velocidad de la liberación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuye drásticamente en ambos grupos. Las barras representan la media  $\pm$  DE \*p<0.005; n=4 animales diferentes.



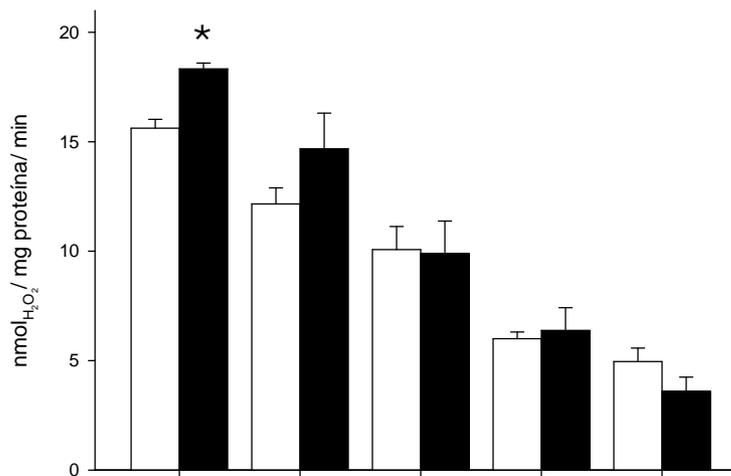
**Fig. 16 Efecto del GDP sobre la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en condiciones de transferencia directa de electrones.** Se utilizó GDP (500  $\mu$ M) con lo cual se observa que la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentó tanto en control (□) como en SM (■) y este aumento se exagera en presencia de AO (5  $\mu$ M), manteniéndose en ambos casos una mayor liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las mitocondrias de rata con SM que en las de rata control. Las barras representan la media  $\pm$  DE \* $p < 0.005$ ;  $n = 4$  animales diferentes.

De igual manera se evaluó el efecto del AO sobre la producción de EROs en condiciones de transferencia reversa de electrones (TRE) esto en presencia de succinato (Figura 17). Se observa un incremento en la producción de EROs con succinato con respecto al P/M (TDE) tanto en C y SM aunque la velocidad de generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiene tendencia a aumentar en SM. En cuanto al efecto del AO se observa lo contrario al experimento en presencia de P/M. La adición de AO disminuye la generación de EROs a dosis-respuesta (Figura 18). En presencia de GDP, la velocidad de generación de EROs aumenta en C y SM (Figura 19) siendo más importante en el SM. La adición del AO en presencia de GDP redujo la velocidad de generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estimulada por el GDP en

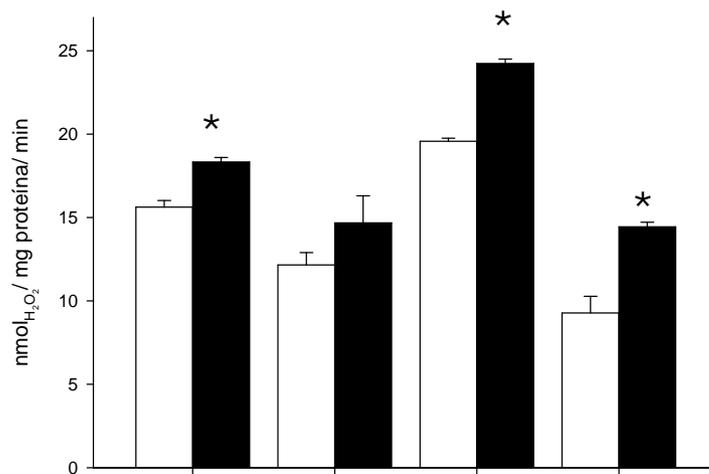
ambas mitocondrias siendo más alta en las mitocondria con SM que en el control.



**Fig. 17 Velocidad de liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los estados 4 y 3 de la respiración mitocondrial en condiciones de transferencia reversa de electrones.** En presencia de succinato, se observa que las mitocondrias de corazón de rata con SM (■) liberaron el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una mayor velocidad que las mitocondrias de corazón de rata control (□), tanto en el estado 3 (síntesis de ATP) como en el estado 4. \*p<0.005. Las barras representan la media ± DE; n=4 animales diferentes.



**Fig. 18 Efecto del AO sobre la liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> condiciones de transferencia reversa de electrones.** La adición de AO a las mitocondrias aisladas de corazón (0.25mg/mL) tanto de rata control (□) como de rata con SM (■) presentó un efecto de dosis-respuesta disminuyendo la velocidad de liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en ambos grupos, perdiendo la diferencia significativa que existía entre los dos grupos antes de la adición de ácido graso. \*p<0.005. Las barras representan la media ± DE; n=4 animales diferentes.



**Fig. 19 Efecto del GDP sobre la liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> condiciones de transferencia reversa de electrones.** Se utilizó GDP (500 μM) con lo cual se observa que la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentó tanto en control (□) como en SM (■) manteniendo una mayor velocidad sobre la liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en este último grupo. La adición de AO (5μM) al medio de incubación que contenía GDP, disminuyó la velocidad de liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en ambos grupos manteniendo la diferencia significativa entre los estos, lo que no se observa en presencia del AO y en ausencia del GDP. \*p<0.005. Las barras representan la media ± DE; n=4 animales diferentes.

## IX. DISCUSIÓN

El propósito de este estudio, fue investigar el efecto del SM sobre la expresión de la UCP3 y la generación de EROs mediante la administración de sacarosa al 30% en el agua de bebida durante 24 semanas. El consumo de sacarosa induce acumulación excesiva de grasa retroperitoneal, hipertensión, hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia que son características del SM.

### *Síndrome metabólico y metabolismo de los AGNEs*

En este modelo se ha descrito que el aumento de los triglicéridos circulantes está asociado con un aumento de éstos y de los AGNEs en el hígado favoreciendo la formación de hígado graso<sup>70</sup>. Los AGNEs en la circulación provienen de la alta actividad lipolítica en el tejido adiposo que se debe a su vez a la resistencia a la insulina. La acumulación del tejido adiposo en la cavidad abdominal refleja resistencia a la insulina que está asociada con hiperinsulinemia en las ratas alimentadas con sacarosa.

El mecanismo por el cual se acumula la grasa en el tejido adiposo está bien descrito en la literatura. Los ácidos grasos son activados mediante la formación del correspondiente acil-CoA por medio de una acil CoA sintetasa, y a continuación son esterificados con el glicerol 3-fosfato a triacilglicerol para ser almacenados. El glicerol-3-fosfato se genera a partir de la reducción de la hidroxacetona la cual aumenta durante la glucólisis.

El análisis por cromatografía de la composición de los ácidos grasos plasmático reveló un aumento en el ácido palmítico, palmitoleico y oleico que reflejan un aumento en la síntesis de novo de los ácidos grasos y una mayor actividad de

la  $\Delta$ -9-desaturasa<sup>71</sup> en el modelo de SM inducido por alto consumo de sacarosa. Las concentraciones fisiológicas de los AGNEs plasmáticos circulantes deben ser mantenidas dentro de un rango muy estrecho y un aumento anormal de ellos se asocia a diversas enfermedades entre ellas: obesidad, diabetes tipo 2, aterosclerosis y otras. Los mecanismos por los cuales los AGNEs conducen a estas y otras enfermedades, no están del todo establecidos pero su contribución a la generación de resistencia a la insulina parece ser uno de los más importantes.

La hipertrigliceridemia y la obesidad abdominal observada en el modelo están asociadas con un aumento en los niveles de AGNEs en tejidos distintos al tejido adiposo. En el corazón, el análisis por cromatografía de gases reveló un aumento en el contenido de algunos AGNEs como el ácido palmítico, palmitoleico y el ácido oleico en mitocondrias aisladas del corazón de animales con SM. Por otra parte existen enzimas llamadas desaturasas las cuales son claves en la síntesis de ácidos grasos mono-insaturados y poli-insaturados por lo cual contribuyen a su control, el aumento en la actividad de estas enzimas puede generar un cambio en la composición de la membrana debido a su contenido de ácidos grasos. El incremento significativo en la proporción del ácido palmitoleico así como el oleico, pueden reflejar un aumento en la actividad de la  $\Delta$ -9-desaturasa, reportes previos mencionan que la hiperinsulinemia está relacionada con un aumento en la actividad de esta enzima<sup>72</sup>.

La cantidad total de AGNEs en la mitocondria fue dos veces mayor que lo encontrado en el homogenado, esto puede deberse a que una gran proporción

de las mitocondrias aisladas son membranas y que a pesar de que en el modelo de SM existe una gran cantidad de AGNEs libres, los depósitos de triglicéridos de los adipocitos proporcionan ácidos grasos libres (AGL) así como glicerol, compuestos que son utilizados en la  $\beta$ -oxidación en mitocondrias para la generación de energía. La mayor parte de los ácidos grasos presentes en el corazón son transportados a través de la membrana citoplasmática hacia la mitocondria donde son utilizados como fuente de energía a través de la  $\beta$ -oxidación y posteriormente en la fosforilación oxidativa.

Los AGNEs están implicados en la generación del  $O_2^{\bullet-}$  en el hígado del modelo de SM<sup>73</sup>. Un exceso de formación del  $O_2^{\bullet-}$  en el SM está asociado con la hipertensión y la resistencia a la insulina por su reacción con el óxido nítrico para formar peroxinitrito<sup>74</sup>. Una disminución en la disponibilidad del óxido nítrico que es un factor vaso-relajante implicado en la regulación del tono vascular induce hipertensión en el modelo de SM<sup>75</sup>.

El corazón aunque tiene la capacidad de hacer lipogénesis su metabolismo es mayoritariamente oxidativo. Un aumento en la concentración de los ácidos palmítico, palmitoleico y oleico, reflejan alteración en el metabolismo de los ácidos grasos en el corazón. El ácido oleico ha sido relacionado con la hipertensión por el hecho que afecta la actividad de la síntetasa del óxido nítrico en las células endoteliales. En estudios se ha demostrado que el ácido palmítico genera estrés oxidante a nivel del retículo endoplásmico y además se encuentra relacionado con la apoptosis celular<sup>76</sup>. Se ha descrito que el ácido palmítico, en hepatocitos, induce la actividad de Bax, la permeabilización mitocondrial, la liberación de citocromo c y la actividad de las caspasas 3 y 7<sup>77</sup>.

Por lo tanto un aumento en la concentración de los AGNEs puede afectar la función mitocondria de corazones de los animales con SM.

#### *Función mitocondrial en el corazón con SM*

En este trabajo encontramos que el control respiratorio en las mitocondrias aisladas de corazón de ratas con SM es menor que la de mitocondrias aisladas de animales controles. Ésta alteración en el control respiratorio se debe a un aumento en el consumo de oxígeno por la mitocondria con SM en el estado 4 y una disminución en el estado 3 en comparación con las mitocondrias controles. El aumento en el consumo de oxígeno en el estado 4 puede atribuirse a la acumulación de AGNEs en la mitocondria. Se ha demostrado que los ácidos grasos de cadena larga como el ácido oleico tienen propiedad desacoplante en diferentes mitocondrias<sup>53</sup>. En los experimentos realizados para determinar el potencial transmembranal en paralelo con el consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de corazón y en diferentes condiciones, se ha demostrado que las mitocondrias de corazón con SM tienen disminuido el potencial transmembranal y aumentada la velocidad del consumo de oxígeno en comparación con el control. Este resultado indica que las mitocondrias de corazón con SM están afectadas por una fuga inespecífica de protones en comparación con el control. Esta fuga de protones puede ser mediada por la actividad de las proteínas desacoplantes UCP2, 3 o por el ANT. Para poner en evidencia la participación de estas proteínas en función mitocondrial se utilizaron el GDP y el CAT como inhibidores de las UCPs y del ANT, respectivamente. El desacoplamiento mitocondrial se encontró relacionado con la actividad del ANT y no con la UCP3.

El ANT es un acarreador transmembranal mitocondrial, el cual intercambia el ADP del citosol por ATP formado en la matriz mitocondrial, se ha visto que participa también como desacoplante de la fosforilación oxidativa en la mitocondria y puede ser activado, el igual que las UCPs, por ácidos grasos disminuyendo así el potencial transmembranal tanto en corazón y músculo esquelético, aunque se desconoce el mecanismo por el cual se lleva a cabo el desacoplamiento<sup>78,79</sup>.

En el modelo de SM, se ha observado que en el hígado, que además tiene la capacidad de glucogenogénesis, la sobre-expresión de la UCP2 está relacionada con un aumento en el consumo de oxígeno y una disminución del potencial transmembranal<sup>73</sup>. Además la sobre-expresión de la UCP2 en hígado de rata con obesidad y SM está considerada como respuesta al estrés oxidante. En mitocondrias de corazón el análisis por western blot de la expresión de la UCP3 no reveló diferencia entre el grupo con SM y el control. Se ha descrito que la UCP3 se expresa abundantemente en mitocondrias de músculo esquelético y en menor proporción en corazón y tejido adiposo<sup>80</sup> y que ésta puede aumentar conforme la edad. En experimentos realizados por Andrew y Horvath se demostró que el desacoplamiento mitocondrial mediante ácidos grasos se incrementaba durante el envejecimiento sumado a un aumento en los niveles de EROs y la peroxidación lipídica<sup>81</sup>. La incubación de las mitocondrias con AO o AL induce desplazamiento de la curva (Figura 11) hacia un mayor consumo de oxígeno y menor potencial transmembranal. Este desacoplamiento no fue sensible a GDP el cual es inhibidor de la UCP3. Sin embargo la adición del CAT, inhibidor del ANT, revirtió el efecto de los ácidos

grasos utilizado sobre el consumo de oxígeno y el potencial transmembranal. Estos resultados indican que el ANT participa en la fuga de protones inducida por ácidos grasos en ambas mitocondrias siendo más sensible las mitocondrias aisladas del corazón con SM aunque el análisis por Western Blot del ANT no reveló diferencia significativa entre control y SM.

Por otro lado existen diferencias entre el AO y el AL en sus efectos sobre el potencial transmembranal y sobre el consumo de oxígeno. Se sabe que entre más insaturaciones tengan los ácidos grasos libres interaccionan con mayor eficiencia con la membrana interna mitocondrial por lo cual podemos observar que se necesita el doble de concentración del AO, el cual tiene una doble ligadura, para obtener el mismo nivel de desacoplamiento que el AL, el cual es un ácido graso con dos dobles ligaduras. Esta diferencia también puede deberse a la diferencia en la solubilidad en la fase acuosa y en la fase lipídica (membrana) dependiendo del número de insaturación en el ácido graso<sup>82</sup>.

*SM y generación de  $O_2^{\cdot-}$  en mitocondrias aisladas de corazón.*

El exceso de sustratos oxidativos como los AGL a nivel mitocondrial hace que la mitocondria se considera como una fuente muy importante de generación de EROs en el corazón. Nuestro trabajo demuestra que las mitocondrias de corazón de animales con SM generan  $H_2O_2$  con mayor velocidad que las de los animales controles.

La generación de  $H_2O_2$  fue mayor en mitocondrias aisladas de corazón de ratas con SM en ambos estados 4 y 3 (en presencia de ATP) en comparación con la mitocondria control. La diferencia en la velocidad de generación de EROs entre

SM y control se mantiene en las dos condiciones de transferencia de electrones a nivel de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, la directa oxidación P/M y la reversa oxidando succinato. Además ambas mitocondrias producen  $H_2O_2$  con mayor velocidad en condiciones de transferencia de electrones inversa que en las condiciones de transferencia directa de electrones al nivel de la cadena respiratoria mitocondrial. Estos resultados sugieren que los complejos I y II participan de una manera muy importante en la generación de  $O_2^{\bullet-}$  en la mitocondria del corazón de los animales con SM.

No está establecido el mecanismo por el cual las mitocondrias de corazón con SM generan  $H_2O_2$  con mayor velocidad que los controles. Sin embargo, los AGL acumulados pueden tener un papel muy importante en la estimulación de generación de EROs en la mitocondria. Varios estudios han mostrado que los AGL tales como el palmítico, oleico y araquidónico estimulan la generación de  $H_2O_2$  en mitocondrias de corazón e hígado en condiciones de transferencia de electrones directa<sup>83</sup> mientras que en condiciones de transferencia reversa, los ácidos grasos adquieren la propiedad de protonóforos desacoplando el consumo de  $O_2$  de la fosforilación del ADP generando ATP en la mitocondria e inhibiendo la generación de EROs en mitocondrias de hígado así como de corazón<sup>84</sup>. El desacoplamiento por los ácidos grasos de la fosforilación oxidativa puede ser mediada por una fuga de protones a través de la membrana con un mecanismo pasivo que implica el flip-flop o por medio de proteínas desacoplantes tales como la UCP2 y la UCP3. En trabajo previo se ha reportado que el SM induce una sobre-expresión de la UCP2 en hígado de la rata en respuesta al estrés oxidativo<sup>85</sup> y la acumulación de AGL en la

mitocondria y en el homogenado de hígado. En este trabajo no se ha encontrado diferencia en la expresión de la UCP3 ni en la del ANT en mitocondria de corazón de los animales con SM. Por lo tanto la acumulación de AGL en la mitocondria con SM puede ser responsable del aumento en la generación de EROs.

La adición del AO a bajas concentraciones (5, 10, 20  $\mu\text{M}$ ) a las mitocondrias aisladas de corazón de los animales con y sin SM aumenta la velocidad de generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en condiciones de TDE (oxidando P/M) mientras inhiben la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en condiciones de TRE (oxidando succinato). En el caso de la transferencia directa de electrones, el mecanismo por el cual el ácido oleico estimula la generación de EROs puede ser mediado por su efecto inhibitor sobre la cadena respiratoria mitocondrial, interfiriendo con el transporte de electrones ocasionando que éstos no lleguen hasta la formación de agua y generando así  $\text{O}_2^{\bullet-}$  como se ha descrito en la literatura. Se ha descrito que los ácidos grasos inhiben el consumo de oxígeno en mitocondrias de hígado como en corazón<sup>38</sup>.

Por otro lado la estimulación de la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por adición del GDP (como inhibidor de la UCP3) indica que la presencia de la UCP3 en mitocondrias de corazón contribuye a amortiguar la exacerbación de los EROs inducida por el AO durante la TDE y la fosforilación oxidativa. En condición de TRE, el GDP también estimula la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Además en presencia de AO, el GDP exagera la velocidad de generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el SM y la aumenta con moderación en las mitocondrias de animales controles. Estos

resultados sugieren que la UCP3 contribuye en la modulación de la generación de EROs en la mitocondria de corazón con SM.

## **X. CONCLUSIONES**

El SM genera disfunción mitocondrial en el corazón de rata Wistar mediante el aumento en la concentración de AGNEs, los cuales, se encontraron relacionados con una disminución en la fosforilación oxidativa debido a una fuga de protones a través del ANT.

El exceso de sustratos oxidativos y la poca necesidad energética se refleja en un menor control respiratorio ocasionado por una menor velocidad del consumo de oxígeno durante la síntesis de ATP (estado 3) y la tendencia a aumentar del estado 4 en las mitocondrias de corazón con SM.

En el modelo de SM la velocidad de generación de EROs está mediada por la acción de los AGNEs, sobre la cadena respiratoria mitocondrial (TDE), o mediante su acción protonófora (TRE).

En el transporte de electrones reversa la producción de EROs es mayor que en el transporte de electrones directa. La UCP3 participa significativamente en la generación de EROs a nivel mitocondrial, no así en el potencial transmembranal ni el consumo de oxígeno.

## XI. REFERENCIAS

1. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988; 37: 1595 – 1607
2. Duvnjak L, Duvnjak M. The metabolic syndrome – an ongoing story. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2009; 60: 19 – 24
3. Muñoz MT. Síndrome Metabólico. *Pediatría Integral*. 2007; 11: 615 – 622
4. Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome; Report of the National Heart, Lung and Blood Institute/ American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. *Circulation*. 2004; 109: 433 – 438
5. Romero CE. El síndrome metabólico. *Revista Médica del Uruguay*. 2006; 22: 108 – 121
6. Aguilar Salinas CA, Rojas R, Gómez-Pérez FJ, Franco A, Olaiz G, Sepúlveda J. El síndrome metabólico: un concepto en evolución. *Gaceta Médica de México*. 2004; 140: S41 – S48
7. Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutrition & Metabolism*. 2005; 2: 5
8. Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff JS, Havel PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *American Society for Clinical Nutrition*. 2002; 76: 911 – 22
9. Reaven G, Ho H. Sugar induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *The American Journal of Hypertension*. 1992; 4: 610 – 614
10. El Hafidi M, Valdez R and Baños G. Possible relation between altered fatty acid composition of serum, platelets, and aorta and hypertension induced by sugar feeding in rats. *Clinical and Experimental Hypertension*. 2000; 22: 99 – 108
11. Dey A, Swaminathan K. Hyperglycemia – induced mitochondrial alterations in liver. *Life Sciences*. 2010; 87: 197 – 214
12. Ghezzi AC, Cambri LT, Riebeiro C, Botezelli JD, Mello MA. Impact of early fructose intake on metabolic profile and aerobic capacity of rats. *Lipids in Health an Disease*. 2011; 10: 3
13. Fried SK, Rao SP. Sugar, hypertriglyceridemia, and cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2003; 78: 873S – 80S

14. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high – fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004; 79: 537 – 43
15. Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004; 89: 2595 – 2600
16. Tesouro M, Canale MP, Rodia G, Di Daniele N, Lauro D, Scuteri A, Cardillo C. Metabolic Syndrome, chronic Kidney, and cardiovascular diseases: role of adipokines. *Cardiology Research and Practice*. 2011: 653182
17. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*. 2004; 114: 1752 – 1761
18. De Fronzo RA. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. *The Claude Bernard Lecture 2009*. *Diabetologia*. 2010; 53: 1270 – 1287
19. Manoli I, Alesci S, Blackman MR, Su YA, Rennert OM, Chrousos GP. Mitochondria as key components of the stress response. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2007; 18: 190 – 198
20. Sivitz WI and Yorek MA. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanism to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2010; 12: 537 – 577
21. Weiss Hanns, Friedrich T, Hofhaus G, Preis D. The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *European Journal of Biochemistry* 1991; 197: 563 – 576
22. Lenaz G, Fato R, Genova ML, Solaini G. Mitochondrial Complex I: structural and functional aspects. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006; 1757: 1406 – 1420
23. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical Journal*. 2009; 417: 1 – 13
24. Krauss S, Zhang CY, Lowell BB. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005; 6: 248 – 261
25. Forquer I, Covian R, Bowman MK, Trumpower BL, Kramer DM. Similar transition states mediate the Q – cycle and superoxide production by cytochrome bc<sub>1</sub> complex. *Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281: 38459 – 38465

26. Weber J. ATP synthasa: subunit – subunit interactions in the stator stalk. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006; 1757: 1162 – 1170
27. Ha HL, Shin HJ, Feitelson MA, Yu DY. Oxidative stress and antioxidants in hepatic pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*. 2010; 16: 6035 – 6043
28. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007; 39: 44 – 84
29. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*. 1999; 32: 595 – 603
30. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Reviews Biochemical*. 1995; 64: 97 – 112
31. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2004; 61: 192 – 208
32. Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2000; 57: 1825 – 1835
33. Imai H, Nakagawa Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003; 34: 145 – 169
34. Circu M, Yee Aw T. Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010; 48: 749 – 762
35. Halliwell B, Gutteridge. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford. 1999; 105 – 254
36. Murdoch CE, Grice DJ, Cave AC, Looi YH, Shah AM. NADPH oxidase and heart failure. *Current Opinion in Pharmacology*. 2006; 6: 148 – 153
37. Lambert DJ. NOX enzyme and the biology of reactive oxygen. *Immunology*. 2004; 4: 181 – 189
38. Andreyeu AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscu)*. 2005; 70: 200 – 214
39. Adam-Vizi V, Chinopoulos C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive species. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2006; 27: 639 – 645

40. Hoffman D and Brookes P. Oxygen sensitivity of mitochondrial reactive oxygen species generation depends on metabolic conditions. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284: 16236-16245
41. Nohl H, Gille L, Staniek K. Intracellular generation of oxygen species by mitochondria. *Biochemical Pharmacology*. 2005; 69: 719 – 23
42. Pryde KR, Hirst J. Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: a single, unified mechanism that applies during both forward and reverse electron transfer. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011; 286: 18056 – 18065
43. Adam-Vizi V, Starkov AA. Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: How to read the facts. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010; 20: S413 – S426
44. Hunte C, Palsdottir H, Trumppower BL. Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc1 complex. *FEBS Letters*. 2003; 545: 39 – 46
45. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria. Central role of complex III. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278: 36027 – 36031
46. Bell E, Klimova T, Eisenbart J, Moraes C, Murphy M, Budinger S, Chandel N. The Q<sub>o</sub> site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *The Journal of Cell Biology*. 2007; 177: 1029 – 1036
47. Chang JC, Kou SJ, Lin WT, Liu CS. Regulatory role of mitochondria in oxidative stress and atherosclerosis. *World Journal of Cardiology*. 2010; 2: 150 – 159
48. Dey A, Swaminathan K. Hyperglycemia – induced mitochondrial alterations in liver. *Life Sciences*. 2010; 87: 197 – 214
49. Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2006; 212: 167 – 178
50. Pasadois P, Parker JE, Griffiths E, Halestrap AP. The role of oxidized cytochrome c unregulating mitochondrial reactive oxygen species production and its perturbation in ischemia. *Biochemical Journal*. 2011; 436: 493 – 505
51. Després JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 2006; 444: 881 – 887

52. Alberici LC, Vercesi AE, Oliveira HC. Mitochondrial energy metabolism and redox responses to hypertriglyceridemia. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2011; 43: 19 – 23
53. Di Paola M, Lorusso M. Interaction of free fatty acid with mitochondria: coupling, uncoupling and permeability transition. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006; 1757: 1330 – 1337
54. Wojtczac L, Schönfel P. Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1993; 1183: 41 – 57
55. Skulachev VP. Anion carriers in fatty acid – mediated physiological uncoupling. *Journal of Bioenergetics and Membranes*. 1999; 31: 431 – 445
56. Skulachev VP. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Letters*. 1991; 249: 158 – 162
57. Aronis A, Madar Z, Tirosh O. Mechanism underlying oxidative stress-mediated lipotoxicity: Exposure of J774.2 macrophages to triacylglycerols facilitate mitochondrial reactive oxygen species production and cellular necrosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 2005; 38: 1221-1230
58. Sluse FE, Jarmuszkiwicz W, Navet R, Douette P, Mathy G, Sluse-Goffart CM. Mitochondrial UCPs: New insights into regulation and impact. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006; 1757: 480 – 485
59. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological Reviews*. 2004; 84: 277 – 359
60. Nicholls DG. A history of UCP I. *Biochemical Society Transactions*. 2001; 26: 751 – 755
61. Ricquier D, Bouillaud F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *Journal of Physiology*. 2000; 529: 3 – 10
62. Hauguenauer A, Raimbault S, Masscheleyn S, Gonzalez-Barroso Mdel M, Criscuolo F, Plamondon J, Miroux B, Ricquier D, Richard D, Bouillaud F, Pecqueur C. A new renal mitochondrial carrier, KMCP1, is up-regulated during tubular cell generation and induction of antioxidant enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280: 22036 – 22043
63. Dlasková A, Špaček T, Škobisová E, Santorová J, Jezek P. Certain aspects of uncoupling due to mitochondrial uncoupling proteins in vitro and in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006; 1757: 467 – 473

64. Woyda-Ploszczyca A, Jarmuszkiewicz W. Uncoupling protein in modulation of mitochondrial functions-therapeutic prospects. *Postepy Biochemii*. 2008; 54: 188 – 197
65. Dietrich MO, Horvath TL. The role of mitochondrial uncoupling proteins in lifespan. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*. 2010; 459: 269 – 275
66. Lowry H, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Follin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 1951; 193: 165 – 275
67. Russel CS and Lee WG. Measures of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodaminederivates. *Biophysical Journal*. 1999; 76: 469 – 477
68. Possel H, Noack H, Augustin W. 2, 7 – Dihydrodichlorofluoresceindiacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation. *FEBS Letters*. 1997; 416: 175 – 178.
69. Folch J, Lees M and Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 1957; 193: 265-275
70. Meshkani R, Adeli K. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clinical Biochemistry*. 2009; 42: 1331 – 1346
71. El Hafidi M, Cuéllar A, Ramírez J, Baños G. Effect of sucrose addition to drinking water, that induced hypertension in the rats, on liver microsomal  $\Delta 9$  and  $\Delta 5$ -desaturase activities. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2001; 12: 396 – 403
72. De Gómez Dumm IN, De Alaniz MJ, Brenner RR. Effect of insulin on the oxidative desaturation of fatty acids in non-diabetic rats in isolated liver cells. *Acta Physiologica et Pharmacologica Latinoamericana*. 1985; 35: 327 – 335
73. Janis SF, Warden C. Uncoupling proteins, dietary fat and the metabolic syndrome. *Nutrition and Metabolism*. 2006; 3: 38 – 44
74. Yamaguchi Y, Yoshikawa N, Kagota S, Nakamura K, Hahinaka J, Kunitomo M. Elevated circulating levels of markers of oxidative-nitrative stress and inflammation in a genetic rat model of metabolic syndrome. *Nitric Oxide Biology and Chemistry*. 2006; 15: 380 – 386
75. Beltowski J. Leptin and regulation of endothelial function in physiological and pathological conditions. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2011

76. Zhang Y, Yang X, Shi H, Dong L, Bai J. Effect of  $\alpha$ -linolenic acid on endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of palmitic acid lipotoxicity in primary rat hepatocytes. *Lipids in Health and Disease*. 2011; 10: 122
77. Malhi H, Gores G. Molecular Mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Seminars in Liver Disease*. 2008; 28: 360 – 369
78. Aguirre E, Cadenas S. GDP and carboxyatractylate inhibit 4-hydroxynonenal-activated proton conductance to differing degrees in mitochondria from skeletal muscle and heart. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010; 1797: 1716 – 1726
79. Komelina N, Amerkhanov Z. A comparative study of the inhibitory effects of purine nucleotides and carboxyatractylate on the uncoupling protein-3 and adenine nucleotide translocase. *Acta Biochimica Polonica*. 2010; 57: 413 – 419.
80. Boss O, Hagen T, Lowell BB. Uncoupling proteins 2 and 3 potential regulators of mitochondrial energy metabolism. *Diabetes*. 2000; 49: 143 – 156
81. Andrew ZB, Horvath TL. Uncoupling protein-2 regulates lifespan in mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 2009; 296: E621- E627
82. Stubbs CD, Kouyama T, Kinoshita K, Alkegami A. Effect of double bonds on the dynamic properties of the hydrocarbon region of lecithin bilayers. *Biochemistry*. 1981; 20: 4257 – 4262
83. Schönfeld P, Wojtczak L. Fatty acids decrease mitochondrial generation of reactive oxygen species at the reverse electron transport but increase it at the forward transport. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007; 1767: 1032 – 1040
84. Saborido A, Soblechero L, Megías A. Isolated respiring heart mitochondria release reactive oxygen species in states 4 and 3. *Free Radical Research*. 2005; 39: 921 – 931
85. Ruiz Ramírez A, Chávez Salgado M, Peñeda Flores JA, Zapata EG, Masso FR, El Hafidi M. High sucrose diet increases ROS generation, FFA accumulation, UCP2 level and proton leak in liver mitochondria. *American Journal of Physiology. Endocrinology Metabolism*. 2011 in press.