



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

EFFECTO DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DE LAS  
UCPS SOBRE LA LIBERACIÓN DEL  
CITOCROMO C EN UN MODELO DE SÍNDROME  
METABÓLICO

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

ANGÉLICA RUIZ RAMÍREZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MOHAMMED EL HAFIDI BENTLAKDER

COMITÉ TUTOR: DRA. ANA CECILIA ZAZUETA MENDIZÁBAL  
DR. SALVADOR URIBE CARVAJAL

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE, 2012



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 18 de junio de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **RUIZ RAMÍREZ ANGÉLICA** con número de cuenta **98175158** con la tesis titulada: **"EFECTO DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DE LAS UCPs SOBRE LA LIBERACIÓN DE CITOCROMO C EN UN MODELO DE SÍNDROME METABÓLICO"**, realizada bajo la dirección del: DR. MOHAMMED EL HAFIDI BENTLAKDER

Presidente: DRA. SELVA LUCÍA RIVAS ARANCIBIA  
Vocal: DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN  
Secretario: DR. MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA  
Suplente: DR. SALVADOR URIBE CARVAJAL  
Suplente: DRA. ANA CECILIA ZAZUETA MENDIZÁBAL

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 20 de septiembre de 2012

*M. del Coro Arizmendi*  
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA

## **AGRADECIMIENTOS**

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por proporcionar la BECA-  
TESIS al sustentante con número de becario 202583.

Al comité tutor integrado por la Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizábal, el Dr. Salvador  
Uribe Carvajal y el Dr. Mohammed El Hafidi Bentlakder.

### **AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL**

Al CONACyT por el apoyo parcial ofrecido del proyecto No. 106847 para la realización de este trabajo.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología del D.F. (INCyTDF) por el apoyo parcial recibido del proyecto PICDS08-67.

Al Jurado de Examen, integrado por la Dra. Selva Lucía Rivas Arancibia, el Dr. Diego González Halphen, el Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza, el Dr. Salvador Uribe Carvajal y la Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizábal, a quienes les agradezco su disposición y su valiosa opinión para la realización de este trabajo.

Al mi tutor, el Dr. Mohammed El Hafidi Bentlakder a quien agradezco infinitamente su apoyo, consejos y paciencia para realizar este trabajo.

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

## DEDICATORIAS

Quiero dedicar este trabajo en primer lugar a mi MAMÁ, quién es el ángel que ha estado a mi lado desde siempre cuidándome, apoyándome y guiándome en todo momento, sin duda esto no lo podría haber hecho sin tu apoyo, cariño y paciencia.

A mis hermanos Juan y Ana por darle un singular sentido del humor a mi vida, pero sobretodo por su amistad y cariño. A mi abuelo Evaristo, de quien siempre he tenido su apoyo y cariño. A mis cuñados, Erika y Hedgar por los momentos lindos que hemos pasados juntos como la familia que somos.

A todos mis amigos que han estado en las buenas y en las malas, por su paciencia durante esta travesía pero sobre todo por su amistad. A los de antaño: Dorita, no se como agradecer el apoyo, cariño y consejos que me has brindado todo este tiempo de amistad, te quiero y te admiro mucho; a Luz, a quien me ha tenido toda la paciencia del mundo y quien me apoya en todo momento. A los nuevos: Dianis, Ely, Ocarol, que aunque ha pasado un tiempo breve, me han estado apoyando en todo momento. ¡Chicos, gracias por su amistad!

## ÍNDICE

<b>I. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. ABSTRACT .....</b>	<b>4</b>
<b>III. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>IV. ANTECEDENTES .....</b>	<b>8</b>
<b>El Síndrome Metabólico (SM).....</b>	<b>8</b>
<b>Alteración en el metabolismo de los lípidos y carbohidratos en el SM.....</b>	<b>10</b>
<i>Metabolismo de los carbohidratos.....</i>	<i>10</i>
<i>Metabolismo de los lípidos .....</i>	<i>12</i>
<b>Hígado graso no-alcohólico y SM.....</b>	<b>13</b>
<b>La mitocondria como generadora de energía .....</b>	<b>14</b>
<b>Generación de especies reactivas del oxígeno (EROs) en el SM .....</b>	<b>17</b>
<b>Obesidad y estrés oxidante .....</b>	<b>21</b>
<b>La mitocondria y la generación de EROs.....</b>	<b>23</b>
<b>Las defensas antioxidantes.....</b>	<b>26</b>
<b>Las proteínas desacoplantes (UCPs).....</b>	<b>30</b>
<b>Regulación génica de la UCPs .....</b>	<b>33</b>
<b>Las UCPs y su participación en enfermedades metabólicas .....</b>	<b>34</b>
<b>Las EROs y la liberación del citocromo c (Cyt c) .....</b>	<b>36</b>
<b>V. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>39</b>
<b>VI. HIPÓTESIS .....</b>	<b>40</b>
<b>VII. OBJETIVOS .....</b>	<b>40</b>
<b>VIII. METODOLOGÍA .....</b>	<b>41</b>
<b>Desarrollo de un modelo experimental de Síndrome Metabólico.....</b>	<b>41</b>
<b>Obtención de muestras biológicas .....</b>	<b>41</b>

Análisis bioquímico de muestras plasmáticas .....	42
Obtención de mitocondrias aisladas de hígado .....	42
Determinación de proteína.....	43
Actividad de los complejos respiratorios .....	44
Consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas .....	45
Estimación del potencial transmembranal en mitocondrias aisladas .....	46
Cuantificación de la generación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en mitocondrias aisladas .....	48
Análisis de la UCP2 por <i>Western Blot</i> .....	49
Extracción de lípidos y análisis de ácidos grasos no esterificados .....	50
Cuantificación de malondialdehído (MDA) .....	52
Carbonilación de proteínas .....	53
Cuantificación de vitamina E y coenzima Q en mitocondrias aisladas .....	54
Cuantificación del contenido de glutatión .....	55
Detección de la actividad de la SOD en geles de poliacrilamida .....	56
Actividad de catalasa y glutatión peroxidasa.....	57
Liberación y detección de Cyt c de mitocondrias de hígado .....	57
Análisis de Bax por <i>Western Blot</i> .....	58
Análisis estadístico .....	59
<b>IX. RESULTADOS .....</b>	<b>60</b>
Características generales de los animales .....	60
Análisis de AGNEs en mitocondrias y homogenizado de hígado .....	61
Contenido de la UCP2 en mitocondrias de hígado .....	62
Efecto de la sobre-expresión de la UCP2 sobre la función mitocondrial.....	63
Generación de EROs por la CRM.....	66
Actividad antioxidante en el hígado.....	69
Marcadores de estrés oxidante.....	71
Función mitocondrial.....	72

Efecto del SM sobre el contenido de Cyt c en mitocondrias de hígado.....	73
<b>X. DISCUSIÓN .....</b>	<b>80</b>
<b>XI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>90</b>
<b>XII. ABREVIATURAS .....</b>	<b>91</b>
<b>XIII. REFERENCIAS .....</b>	<b>93</b>

## I. RESUMEN

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de alteraciones metabólicas cuya manifestación clínica incluye la dislipidemia, obesidad, resistencia a la insulina e hipertensión, que constituyen factores de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. El SM, también se caracteriza por un aumento del estrés oxidante que afecta diversas funciones celulares. Sin embargo, la relación que existe entre la disfunción mitocondrial, la generación de estrés oxidante y el desarrollo del SM aún no está del todo elucidada.

En un modelo del SM inducido por la ingesta de sacarosa al 30% en el agua de bebida durante 24 semanas, hay una acumulación de ácidos grasos no esterificados (AGNEs) en el homogenado y en las mitocondrias de hígado de los animales tratados. Este aumento en los AGNEs está asociado con un aumento en la velocidad de generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de animales con SM oxidando piruvato/malato como sustratos del complejo I. Además al adicionar albumina sérica de bovino (ASB) a las mitocondrias de animales tratados con sacarosa se reduce la velocidad de generación de EROs. En forma contraria, la adición de ácido oleico y linoleico indujo un aumento en la generación de EROs en mitocondrias de ambos grupos, siendo más sensibles las mitocondrias de animales con SM.

El incremento en la generación de EROs en las mitocondrias de animales con SM puede deberse, además de la disminución de moléculas antioxidantes como el

GSH y la vitamina E, al incremento en la actividad de la Cu/ZnSOD que se encuentra en el espacio intermembranal y que contribuye a la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hacia el citosol.

A pesar de la diferencia significativa encontrada en la generación de EROs mitocondriales entre ambos grupos, no se observó diferencia en el contenido de lípidos peroxidados y proteínas carboniladas a nivel mitocondrial, ni en la actividad de enzimas antioxidantes mitocondriales como la GPx y la MnSOD. Esta protección contra el estrés oxidante en la mitocondria puede ser debida a la sobre-expresión de la UCP2 en las mitocondrias de animales con SM considerada un mecanismo de adaptación de la mitocondria al ambiente hiperlipídico que genera EROs, sin alterar el estado redox y la generación de ATP en las mitocondrias de animales con SM.

Sin embargo, esto no parece contrarrestar el daño a nivel del tejido completo, ya que se encontró un aumento en los lípidos peroxidados y en las proteínas carboniladas, así como una disminución en el contenido de GSH y en la actividad de la catalasa en el homogenizado de hígado de animales con SM.

Por otro lado la liberación de citocromo c (Cyt c) de las mitocondrias de animales con SM en condiciones basales u oxidando succinato o piruvato/malato fue menor que en mitocondrias de animales controles. El ácido oleico disminuyó la liberación de Cyt c. Esta inhibición se revirtió en presencia de GDP, inhibidor de la UCP2. Este resultado sugiere que la sobre expresión de la UCP2 en respuesta al estrés oxidante en mitocondrias de animales SM reduce la liberación del Cyt c. Además, las mitocondrias de animales con SM contienen menos Bax, proteína pro-apoptótica e involucrada en la liberación de Cyt c. Nuestros resultados sugieren que la sobre-expresión de la UCP2 protege la mitocondria del estrés oxidante inducido

por un exceso de sustratos oxidativos (AGNEs), sin embargo reduce la liberación del Cyt *c* en las mitocondrias de hígado de animales con SM, un mecanismo necesario para la iniciación del proceso apoptótico.

## II. ABSTRACT

The metabolic syndrome (MS) is a cluster of metabolic disturbances such as dyslipidemia, obesity, insulin resistance and hypertension, and is a risk factor for developing type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. MS is associated with increased oxidative stress that affects several cellular functions. However, the relationship between mitochondrial dysfunction, oxidative stress generation and the development of MS is not yet completely elucidated.

An animal model of MS was induced by the intake of 30% sucrose in the drinking water and resulted in accumulation of non-esterified fatty acids (NEFAs) in liver homogenate and mitochondria. The increased levels of NEFAs in MS was associated with increased rate production of reactive oxygen species (ROS) in mitochondria isolated from MS animals, oxidizing pyruvate/malate as substrates for complex I. Furthermore, the addition of bovine serum albumin (BSA) to the mitochondria from MS animals reduced the generation rate of ROS. In contrast, adding oleic or linoleic acid exacerbated the rate of ROS generation in both MS and control mitochondria; the mitochondria from MS being more sensitive than those from the control rats.

Despite the significant difference found in the mitochondrial ROS generation between both groups, there was no difference observed between the levels of lipid peroxidation and protein carbonylation, and no difference between the activities of mitochondrial antioxidant enzymes such as MnSOD, GPx and catalase. The protection against oxidative stress in MS mitochondria may be due to over-expression of UCP2, which is considered a mitochondrial adaptive mechanism for oxidative

stress, to preserve their function and integrity without altering the redox status and generation of ATP.

However, in whole liver these adaptive mechanisms of the mitochondria were inefficient for counteracting redox imbalances and inhibiting oxidative stress outside the mitochondria.

On the other hand, the release of Cyt c from mitochondria from MS rats, under baseline conditions or oxidizing succinate or pyruvate/malate, was lower than that from control mitochondria. Oleic acid decreased the release of Cyt c, this inhibition was reverted by the incubation of mitochondria with GDP, a UCP2 inhibitor. This result suggests that over-expression of UCP2 in mitochondria of MS rats, as a response to oxidative stress, reduces the release of Cyt c. In addition, we found that mitochondria from MS rats have a decreased Bax content, a pro-apoptotic protein involved in the release of Cyt c. This condition and the over-expression of UCP2 may account for alterations in the release of Cyt c in mitochondria from MS rats.

### III. INTRODUCCIÓN

Las proteínas desacoplantes participan de manera importante en el metabolismo mitocondrial, llevando acabo el transporte de protones desde el espacio intermembranal hacia la matriz mitocondrial, reduciendo el potencial transmembranal y la síntesis de ATP.

La sobre-expresión de la UCP2 ha sido considerada como respuesta al estrés oxidante en diferentes patologías como la obesidad, la diabetes tipo, caquexia, envejecimiento y cáncer<sup>1, 2, 3, 4</sup>.

La fuga de protones a través de las UCPs que aumenta el consumo de oxígeno reduciendo la generación del anión superóxido es un mecanismo propuesto para el efecto protector de la UCP2 contra el estrés oxidante. Además los ácidos grasos no-esterificados de larga y muy larga cadena son considerados como activadores fisiológicos de las UCPs<sup>1</sup>. La obesidad asociada al SM provoca un aumento de los AGNEs en la circulación y en el hígado<sup>5</sup>. Por otra parte varios trabajos han mostrado el efecto estimulante de los AGNEs sobre la generación de anión superóxido en mitocondrias normales. En el SM el papel de estos AGNEs sobre la función mitocondrial no está del todo establecido. Por lo tanto el objetivo de nuestro trabajo fue investigar el efecto de los AGNE sobre la función de la mitocondria y su participación en la generación de estrés oxidante en el hígado en un modelo de SM. Por su parte, la mitocondria además de ser el organelo donde se genera la energía necesaria para las funciones celulares, juega un papel muy importante en la vía intrínseca de la muerte celular programada, siendo el punto clave en este evento la liberación del Cyt c hacia el citosol<sup>6</sup>. La liberación del Cyt c del espacio

intermembranal de la mitocondria hacia el citosol y su unión a proteínas apoptóticas como Apaf-1 y la caspasa 9 constituye un punto clave para la formación del apoptosoma<sup>7</sup>. El mecanismo por el cual el Cyt c es liberado de la mitocondria aún no se ha establecido; no obstante, hay evidencia de que el aumento en las especies reactivas del oxígeno está implicado en este evento. La disminución de la generación de especies reactivas del oxígeno causado por la fuga del protón y el abatimiento del potencial transmembranal a través de la UCP2, puede afectar la liberación del Cyt c de la mitocondria hacia el citosol, lo cual implicaría una alteración en la vía intrínseca de la apoptosis.

La liberación del Cyt c se produce a través de un poro formado por la oligomerización de proteínas pro-apoptóticas como Bax/Bak en la membrana externa mitocondrial<sup>8</sup>. La sobre expresión de la UCP2 así como su actividad en el SM puede afectar la liberación del Cyt c modulando la generación de EROs. En el SM, el efecto de la generación de EROs sobre la liberación del Cyt c no está conocido. Por lo tanto, en este trabajo nos propusimos investigar el efecto del SM sobre la liberación de Cyt c en mitocondrias aislada de hígado de rata.

## IV. ANTECEDENTES

### El Síndrome Metabólico (SM)

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de trastornos metabólicos como la resistencia a la insulina (RI), obesidad, hipertensión, dislipidemia, nefropatía, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia entre otros; todos constituyen factores de riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 (DT2) y Alzheimer<sup>9</sup>  
10,11 .

En 1923 Kylin describió al SM como la presencia de hipertensión, hipertrigliceridemia y gota<sup>12</sup>. En 1947, Vague observó que existía una asociación entre la acumulación de tejido adiposo de tipo androide con enfermedades cardiovasculares y DT2. Reaven, en 1988, lo nombró “Síndrome X” y lo describió como la presencia de RI, hiperglicemia, hipertensión, disminución de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y aumento de los triglicéridos (TGs)

Finalmente, en 1998, el concepto de síndrome metabólico fue aceptado. Las definiciones de la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) y del Programa Nacional de Educación sobre Colesterol en el Panel III para el Tratamiento del Adulto (NCEP: ATP III por sus siglas en inglés) son las más usuales cuando se trata de definir esta condición patológica (Tablas I y II)<sup>13,14</sup> .

**Tabla I. Criterios clínicos propuestos por la WHO para la identificación del SM**

<b>Factores de riesgo</b>
Resistencia a la insulina identificada por alguna de las siguientes condiciones: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Diabetes tipo 2</li> <li>• Alteración de la glucosa en ayuno</li> <li>• Alteración de la tolerancia a la glucosa o glucosa en ayuno &gt;110mg/dL para las personas con niveles normales</li> </ul>
Más de una de las siguientes condiciones: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Medicación antihipertensiva y/o presión sanguínea alta (<math>\geq 140</math> mmHg sistólica o <math>\geq 90</math> mm Hg diastólica)</li> <li>• Triglicéridos plasmáticos <math>\geq 150</math> mg/dL (<math>\geq 1.7</math> mmol/L)</li> <li>• Colesterol HDL &lt;35 mg/dL (&lt;0.9 mmol/L) en hombres y &lt;39 mg/dL (1.0 mmol/L) en mujeres</li> <li>• IMC &gt;30 kg/m<sup>2</sup> y/o índice cintura:cadera &gt;0.9 en hombres, &gt;0.85 en mujeres</li> <li>• Excreción de albúmina urinaria <math>\geq 20</math> mg/min o índice albúmina creatinina <math>\geq 30</math> mg/g</li> </ul>

**Tabla II. Criterios clínicos de la NCEP: ATP III para la identificación clínica del SM**

<b>Factores de riesgo</b>	
Obesidad abdominal (circunferencia de la cintura)	
• Hombres	>102 cm (>40 in)
• Mujeres	> 88 cm (>35 in)
Triglicéridos	$\geq 150$ mg/dL
Colesterol HDL	
• Hombres	<40 mg/dL
• Mujeres	<50 mg/dL
Presión sanguínea	$\geq 130/\geq 85$ mm Hg
Glucosa	$\geq 110$ mg/dL

## **Alteración en el metabolismo de los lípidos y carbohidratos en el SM**

### *Metabolismo de los carbohidratos*

Junto con la información genética que cada individuo manifiesta en el desarrollo de determinada enfermedad; los factores ambientales como la nutrición y el sedentarismo juegan un papel fundamental en el SM<sup>15</sup>. El incremento en el consumo de dietas hipercalóricas ya sea por carbohidratos o lípidos se asocia con el desarrollo de SM tanto en humanos como en modelos experimentales<sup>16, 17</sup>.

El consumo excesivo de azúcares, especialmente aquellos compuestos por fructosa o sacarosa, están asociadas al aumento de TGs, al desarrollo de resistencia a la insulina y al incremento en la presión sanguínea; así se evidencia tanto en humanos como en modelos experimentales<sup>18, 19, 20, 21</sup>.

En condiciones fisiológicas, los polisacáridos ingeridos en la dieta se hidrolizan por acción de las enzimas presentes en la saliva y por la amilasa pancreática, principalmente en el intestino delgado, en la parte del duodeno. La sacarosa es hidrolizada por la sacarasa en fructosa y glucosa<sup>22</sup>.

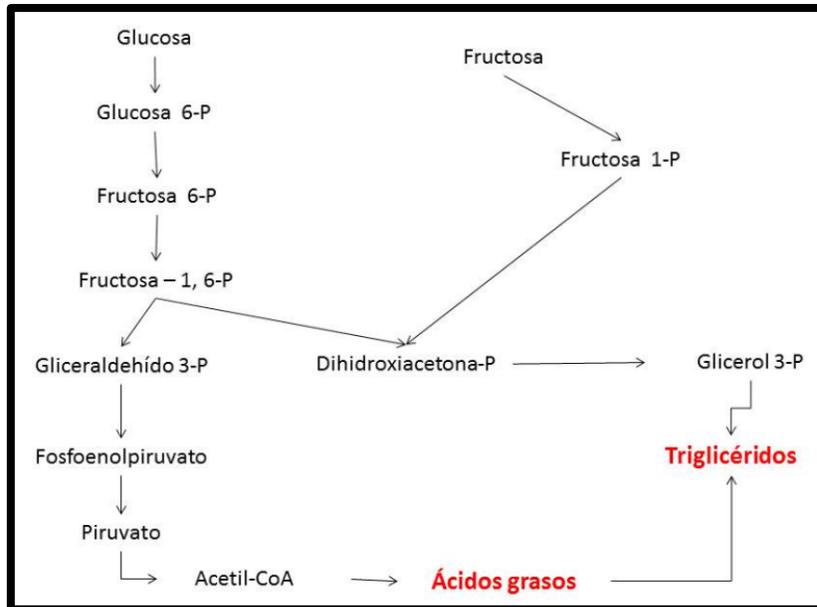
La glucosa es utilizada como la principal fuente de energía y puede ser almacenada en el hígado y en el músculo esquelético en forma de glucógeno o convertido en ácidos grasos en el tejido adiposo. En condiciones de exceso energético (dieta alta en carbohidratos), el hígado puede convertir la glucosa en ácidos grasos y almacenarlos como TGs. Esto es posible ya que la glucosa internalizada a los hepatocitos a través del Glut 2, entra a la vía glucolítica y es metabolizada por la glucocinasa e isomerizada a fructosa-6-fosfato en el citosol para formar piruvato y acetil CoA en la mitocondria como productos finales. La continuidad

de la glucólisis depende de la actividad de la fosfofructocinasa, una enzima altamente regulada. Ya que la acetil-CoA proporciona los carbonos necesarios para la síntesis de ácidos grasos, TGs y colesterol<sup>16</sup>, cuando existe exceso de glucosa, la vía lipogénica se ve favorecida.

Por su parte, la fructosa es transportada a través del torrente sanguíneo hasta el hígado, donde es fosforilada por la fosfofructocinasa 1, que la convierte en fructosa 1 fosfato para después formar gliceraldehído y dihidroxiacetona fosfato mediante la acción de la fructosa bis-fosfato aldolasa, siendo la dihidroxiacetona la estructura primaria para la formación de TGs<sup>21</sup>. Ya que el metabolismo de la fructosa no es inhibida a nivel de la fosfofructocinasa, la isomerización de la glucosa 6- fosfato a fructosa 6-fosfato contribuye de manera importante a alimentar la vía de síntesis de TGs y la producción de VLDL<sup>23</sup>.

Además, la síntesis de ácidos grasos *de novo* como consecuencia de una gran disponibilidad de glucosa o fructosa, contribuye al aumento de la lipólisis en el tejido adiposo visceral, lo cual contribuye al aumento en la disponibilidad de ácidos grasos no esterificados, que induce la síntesis de TGs hepáticos.

Es por ello que el consumo de dietas con alto contenido en fructosa y sacarosa contribuye de manera importante al desarrollo de SM (Figura 1)<sup>16, 20, 21</sup>.



**Figura 1.** Vía del metabolismo de la glucosa y la fructosa para la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos.

### Metabolismo de los lípidos

La mayor parte de los lípidos que se ingieren en la dieta están en forma de TGs; estas moléculas son degradadas, en el intestino, a ácidos grasos no esterificados (AGNEs). En el lumen intestinal, los TGs son incorporados en micelas con ayuda de las sales biliares e hidrolizadas por la lipasa pancreática. Las micelas que contienen los ácidos grasos y los monoacilglicéridos producto de la hidrolisis de los TGs son absorbidos por la mucosa intestinal, donde son re-esterificados a TGs para ser transportados en lipoproteínas llamadas quilomicrones<sup>24</sup>.

Los lípidos son la segunda fuente de energía para las células después de la glucosa; se almacenan preferencialmente en el tejido adiposo y en condiciones de exceso, se pueden acumular en el hígado y músculo esquelético en forma de TGs. Esta acumulación excesiva de los lípidos en el hígado genera un cambio en el metabolismo de la célula haciéndola más lipogénica, aumentando la síntesis *de novo*

de los AGNEs. Este resultado es causado en parte, por el aumento de factores de transcripción envueltos en la vía lipogénica como el PPAR $\gamma$  (receptores activados por proliferadores peroxisomales  $\gamma$ ), ChREBP (proteína de unión a elementos de respuesta a carbohidratos) y SREBP-1c (proteínas de unión a elementos de respuesta a esteroides), todos ellos moduladores positivos del contenido de TGs hepáticos y que regulan acciones como la síntesis de lípidos. Por lo que el consumo excesivo de lípidos contribuye al desarrollo de condiciones patológicas como la obesidad, la hipertrigliceridemia, el hígado graso no alcohólico, la hipercolesterolemia, los cuales forman parte del SM y constituyen factores de riesgo para el desarrollo de DT2 y enfermedades cardiovasculares.

## **Hígado graso no-alcohólico y SM**

El hígado graso no-alcohólico, está asociado directamente a la obesidad y la RI; además, los datos clínicos y experimentales lo describen como una manifestación del SM<sup>5, 25</sup>.

La RI estimula la lipólisis por medio de la desfosforilación de la lipasa hormono sensible produciendo AGNEs en el tejido adiposo. Estos AGNEs se liberan a la circulación y son acumulados en el hígado<sup>26</sup>.

En un estado de RI, la síntesis hepática de TGs es estimulada por el aumento de los AGNEs que favorece la disminución en los niveles de adiponectina, la cual se encarga entre otras cosas de aumentar la sensibilidad de la insulina en diferentes

tejidos incluyendo el hígado; y por inhibición de la lipólisis, la cual está regulada por la acción de la insulina en el hígado.

La esteatosis hepática, es decir, la acumulación de ácidos grasos y triglicéridos en el hígado, puede progresar a cirrosis, que se caracteriza por el depósito en el hígado de fibras de colágeno alterando completamente el funcionamiento del hígado. Así pues, se ha sugerido que la obesidad y el SM son factores de riesgo para desarrollar hígado graso no-alcohólico que puede desencadenar cuadros más crónicos como el carcinoma hepatocelular<sup>27</sup>.

### **La mitocondria como generadora de energía**

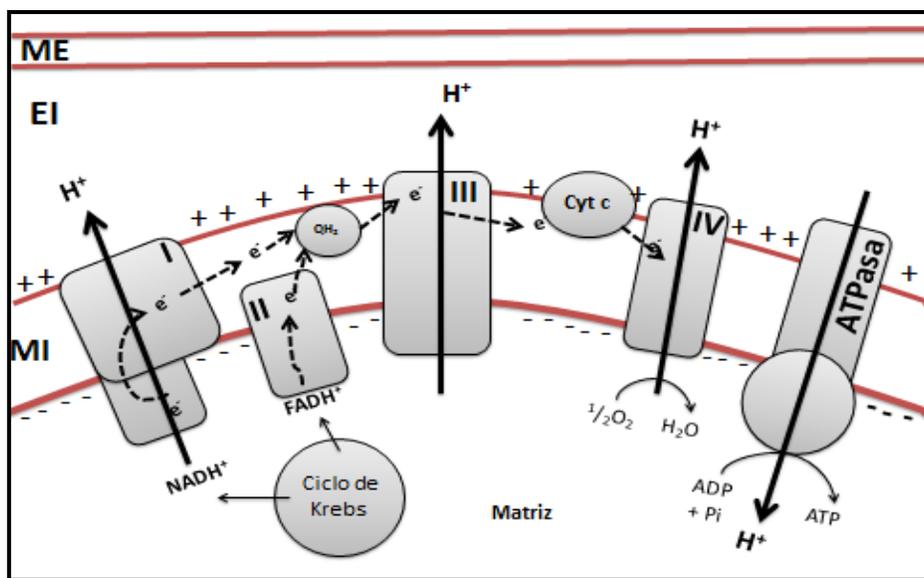
La mitocondria es un organelo característico de la mayoría de las células eucariotas y su principal función es la generación de ATP, mediante la cadena respiratoria mitocondrial (CRM), en un proceso llamado fosforilación oxidativa (Figura 2)<sup>3</sup>.

La mitocondria cuenta con una membrana externa, permeable a distintas moléculas y con la membrana interna, impermeable y muy selectiva. En esta última se encuentra localizada la CRM, compuesta por 4 complejos y la ATP sintasa para llevar a cabo la fosforilación oxidativa, proceso en el que la energía derivada de la oxidación de sustratos y que lleva a la reducción tetravalente del oxígeno hasta agua, está acoplada a la síntesis de ATP<sup>24</sup>.

Los electrones son donados a la CRM por el NADH o FADH, equivalentes reducidos provenientes del ciclo de Krebs. El complejo NADH deshidrogenasa

(Complejo I), acepta los electrones del NADH y los transfiere a la ubiquinona mientras transloca 4 protones ( $H^+$ ) desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal generando un gradiente de  $H^+$ <sup>28</sup>.

El complejo succinato deshidrogenasa (Complejo II) recibe electrones desde el FADH que proviene del succinato o bien, de la flavoproteína transportadora de electrones procedentes de la  $\beta$ -oxidación y la  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa, que cataliza la oxidación extramitocondrial del  $\alpha$ -glicerofosfato a fosfato de hidroxiacetona. El complejo II, dona los electrones a la posa de quinonas sin translocar  $H^+$ .



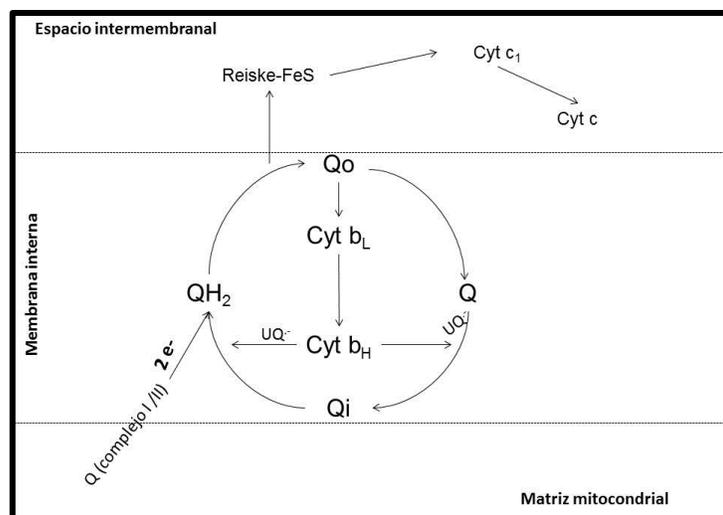
**Figura 2. Cadena respiratoria mitocondrial.** Compuesta por 4 complejos respiratorios (I-IV) y una ATPasa, localizados en la membrana interna mitocondrial (MI). Durante la oxidación del  $NADH^+$  y el  $FADH$ , los cuales provienen del ciclo de Krebs se transfieren los electrones en el complejo I y II respectivamente. El transporte de  $e^-$  está acoplado al bombeo de protones ( $H^+$ ) por el complejo I, III y IV desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal (EI) creando un gradiente electroquímico ( $\Delta\psi$ ). El regreso de los  $H^+$  por la ATPasa permite la síntesis de ATP.

La ubiquinona es el componente redox más pequeño de la cadena respiratoria y es un transportador móvil de  $2H^+ + 2e^-$  que transfiere los electrones del complejo I al

III. La oxidación de la coenzima Q ocurre en una serie de reacciones conocidas como “ciclo Q” en el complejo citocromo *bc1* (Complejo III), donde se llevan a cabo dos semireacciones de reducción a ubisemiquinona ( $UQ^{\cdot-}$ ) y a ubiquinol ( $QH_2$ ) respectivamente, recibiendo un electrón a la vez<sup>29</sup>. Esta transferencia de electrones son utilizados para la translocación de 4  $H^+$  desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranal.

La quinona es reducida a  $QH_2$  en el sitio  $Q_i$  del complejo III, el cual está orientado hacia la matriz mitocondrial. Ya que el  $QH_2$  no tiene carga, se desplaza a través de la membrana interna hacia el sitio  $Q_o$ , el cual se encuentra orientado hacia el lado del espacio intermembranal y ahí dona un electrón hacia uno de los centros de alto potencial, compuesto por la proteína de Reiske y el Cyt *c1* y Cyt *c*. El resultado de esta transferencia de electrones es la formación  $UQ^{\cdot-}$  la cual queda con una carga negativa y transfiere fácilmente otro electrón al centro de bajo potencial compuesto por los citocromos  $b_L$  y  $b_H$ . La quinona queda nuevamente como  $QH_2$  y regresa al sitio  $Q_i$  para recibir un electrón desde del citocromo  $b_L$  y  $b_H$  formando nuevamente  $UQ^{\cdot-}$ . El grupo hemo del Cyt *b* se queda con los electrones mientras comienza nuevamente el ciclo con la formación de  $QH_2$ <sup>30</sup> (Figura 3).

Posteriormente, los electrones son trasferidos al Cyt *c* y de éste al complejo citocromo *c* oxidasa (complejo IV), donde se lleva a cabo la reducción del oxígeno hasta agua<sup>31</sup>.



**Figura.3.** Ciclo Q, localizado en el complejo III de la CRM. El ciclo inicia cuando un electrón ( $e^-$ ) proveniente del ubiquinol ( $QH_2$ ) es donado a la proteína de Rieske (R-FeS) y un segundo electrón es donado al citocromo b. El radical ubisemiquinona ( $UQ\cdot^-$ ) es capaz de donar el electrón al oxígeno molecular y generar  $O_2\cdot^-$  en dos sitios diferentes, uno orientado hacia la matriz mitocondrial ( $Q_o$ , outside) y otro orientado hacia el espacio intermembranal ( $Q_i$ , inside).

Finalmente, los protones regresan a la matriz mitocondrial a través de la ATP sintasa, la cual utiliza el gradiente electroquímico generado por los complejos I, III y IV para la síntesis de ATP<sup>32, 33</sup>.

### Generación de especies reactivas del oxígeno (EROs) en el SM

En el SM, el estado de estrés oxidante está generado por un aumento en la generación de EROs y una disminución en la capacidad antioxidante de la célula para contrarrestar el daño por estas especies reactivas. Existen distintas fuentes generadoras de EROs en las células que al perder su regulación pueden contribuir al desarrollo de SM. Los sistemas celulares generadores de EROs son aquellos donde se lleva a cabo la reducción del oxígeno univalentemente como la NADPH oxidasa,

compuesta por distintas subunidades y que se encuentra en la membrana plasmática de células polimorfonucleares, macrófagos y células del endotelio<sup>34</sup>.

Se ha observado que la activación de la NADPH oxidasa produce la mayor parte del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en la pared vascular de las arterias; es por eso que se ha asociado la pérdida en la regulación de esta enzima con el desarrollo de la hipertensión. Por una parte, la sobre-expresión de las subunidades p47<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup> de la enzima contribuye al aumento de la formación de  $O_2^{\cdot-}$  y, por la otra, la disminución de las defensas antioxidantes como la SOD, el GSH y la Vitamina E en el endotelio vascular tanto en modelos experimentales como en pacientes, contribuyen de manera significativa al estado de estrés oxidante<sup>35</sup>.

La óxido nítrico sintasa (NOS) es la enzima encargada de la formación de óxido nítrico (NO), el cual es fundamental para la regulación del tono vascular. Sin embargo, la ausencia de cofactores de la NOS, como la tetrahydrobiopterina puede desacoplar a la enzima y reducir al oxígeno molecular en lugar de transferir los electrones a la arginina y por lo tanto generar  $O_2^{\cdot-}$  que contribuye al desarrollo de la hipertensión<sup>34</sup>.

La mayor fuente de EROs en la célula y que está asociada a múltiples padecimientos, entre ellos el SM, es la mitocondria. El metabolismo oxidativo que se lleva a cabo en este organelo es fundamental para mantener la homeostasis energética de las células que metaboliza los nutrientes para producir ATP, por lo que las alteraciones en el metabolismo energético pueden desencadenar eventos patológicos como es el SM y la DT2<sup>36</sup>.

Concurren dos puntos importantes relacionados con la falla mitocondrial y el desarrollo de patologías; el primero hace referencia a defectos en la biogénesis mitocondrial y el segundo a las alteraciones en la fosforilación oxidativa<sup>37</sup>.

### *Biogénesis mitocondrial*

La biogénesis mitocondrial está regulada en gran parte por la acción del PGC-1 $\alpha$  (coactivador-1 $\alpha$  del receptor activador de proliferadores peroxisomales) que activa otros factores transcripcionales relacionados con el metabolismo energético como PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ . Estos promueven la transcripción de genes que codifican proteínas para la  $\beta$ -oxidación y el almacenamiento de lípidos y metabolismo de la glucosa, respectivamente<sup>38</sup>; mientras que el NRF-1 (factor nuclear de la respiración) se encarga, entre otras funciones, de la transcripción de genes nucleares que codifican proteínas para la síntesis de glutatión<sup>39</sup>.

La AMPK (proteína cinasa activada por AMP) promueve la regulación de la biogénesis mitocondrial vía PGC-1 $\alpha$  y NRF-1. Se ha observado que durante el ejercicio, la AMPK activa a la PGC-1 $\alpha$  por la fosforilación en residuos de treoninas y serinas que conlleva a la biogénesis. Sin embargo, en condiciones patológicas como la obesidad y la DT2, se ha observado que en el músculo esquelético hay una disminución en el tamaño y número de mitocondrias dada la disminución en los factores transcripcionales como PGC-1 $\alpha$ , NRF-1, PPARs y TFAM (factor transcripcional mitocondrial), fundamentales para la replicación del genoma<sup>40</sup>.

Caso contrario sucede en el músculo cardiaco de ratones ob/ob (deficientes en leptina) y db/db (deficientes del receptor de leptina) donde se ha observado que el

número de mitocondrias de corazón y el DNA mitocondrial aumentan, aunque disminuye la respiración y la síntesis de ATP inducida por ADP<sup>41</sup>.

Un punto clave en la regulación de la biogénesis mitocondrial son los niveles de NO derivados de la actividad de la NOS endotelial (eNOS), que modula a PGC-1 $\alpha$  mediante procesos dependientes de cGMP aún no esclarecidos<sup>39</sup>. Sin embargo, se ha observado que hay una disminución en la disponibilidad de NO en ratones hipertensos y con RI, lo que se ha asociado a alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos a nivel mitocondrial así como a la disminución de mitocondrias<sup>42</sup>.

#### *Generación de estrés oxidante*

La producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> se lleva a cabo durante la respiración mitocondrial como consecuencia de la transferencia de electrones; esta especie reactiva es neutralizada por la acción de las enzimas antioxidantes endógenas presentes en la mitocondria y por las moléculas antioxidantes exógenas. No obstante, un aumento en la generación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> desencadena un cascada de daño a moléculas como lípidos, proteínas y DNA mitocondrial<sup>43</sup>.

La disfunción mitocondrial puede ser considerada como una alteración en el flujo de electrones a través de la CRM, lo que conlleva al incremento en la generación de EROs y disminución en la síntesis de ATP<sup>44</sup>.

La alteración en los complejos respiratorios, específicamente en los complejos I y III puede conducir a un estado de estrés oxidante ya que estos complejos son los principales formadores de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. En la obesidad, la oxidación y el almacenamiento de la glucosa están disminuidos, así como la actividad de las enzimas del ciclo de

Krebs, la  $\beta$ -oxidación y la expresión de proteínas de la CRM, específicamente del complejo I<sup>35</sup>.

## **Obesidad y estrés oxidante**

La obesidad se define como un desequilibrio entre el aporte y el gasto energético, producido por alteraciones genéticas, bioquímicas, dietéticas y conductuales, lo que provoca una acumulación de grasa, sobre todo en la cavidad intra-abdominal<sup>45, 46</sup>.

La acumulación de TGs y de AGNEs en el citosol y en las mitocondrias que se observa en la obesidad, está asociada con un estado de estrés oxidante en células de tejido adiposo así como en el plasma de pacientes obesos. Se ha reportado que existe una correlación entre el aumento de lípidos peroxidados como marcadores de estrés oxidante y una disminución de enzimas antioxidantes como la catalasa, la peroxidasa y la superóxido dismutasa en estos pacientes<sup>47</sup>.

En ratas genéticamente obesas se ha observado que el hígado acumula TGs y AGNEs; estos propician un aumento en la generación de EROs a nivel mitocondrial<sup>48</sup>. Cocco y colaboradores<sup>49</sup> han reportado que el ácido araquidónico y otros AGNEs, en concentraciones micromolares, inhiben la actividad de los complejos respiratorios I, I+III y III, además de promover la formación de EROs en mitocondrias aisladas de corazón de bovino.

Hasta este punto se ha descrito la manera en la que los AGNEs pueden generar un aumento en la formación de EROs a distintos niveles, a saber:

- I. *Inactivando la cadena transportadora de electrones (CTE).* La evidencia experimental revela que los ácidos grasos poli-insaturados (PUFAs) son más potentes que los monoinsaturados y saturados para generar EROs, inactivando parcialmente los complejos I y III de la CTE<sup>50</sup>.

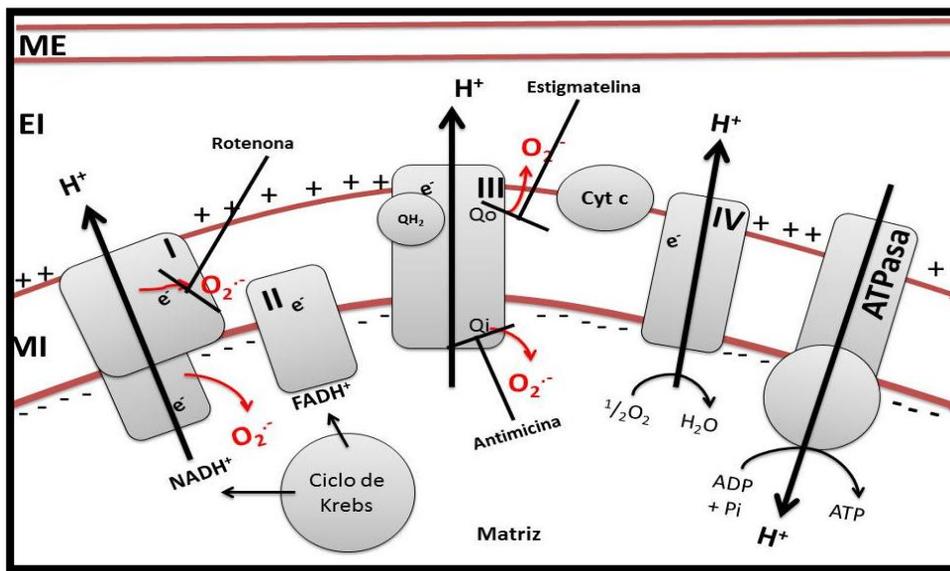
En células  $\beta$ -pancreáticas se evaluó el efecto del ácido oleico sobre diversas funciones celulares y se encontró que incrementa el estado 4 de la respiración mitocondrial, disminuye el ATP celular, incrementa la generación de  $H_2O_2$  y altera la secreción de insulina inducida por glucosa<sup>51</sup>

En macrófagos expuestos a altas concentraciones de TGs se observó un aumento en la generación de EROs, específicamente de  $O_2^{\cdot-}$  que provocó muerte celular; el mecanismo propuesto es la activación del complejo I, sensible a rotenona<sup>52</sup>.

- II. *Activando la NADPH oxidasa.* El ácido araquidónico a concentraciones altas entre 50 y 100  $\mu M$  induce directamente la interacción de la subunidad  $p47^{phox}$  con la subunidad  $p22^{phox}$ , lo cual conlleva al aumento en la generación de  $O_2^{\cdot-}$ , mientras que a concentraciones menores entre 1 y 5  $\mu M$  induce esta asociación de manera sinérgica<sup>53</sup>

## La mitocondria y la generación de EROs

Del total del oxígeno consumido por las mitocondrias, aproximadamente entre el 0.1% y el 2%, no se reduce a agua<sup>54</sup>. La reducción del  $O_2$  a  $H_2O$  univalentemente, implica la formación de  $O_2^{\cdot-}$ <sup>55</sup>.



**Figura 4. Formación de EROs por la mitocondria.** La inhibición de los complejos I y III induce la formación de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). El complejo I y el sitio  $Q_o$  (outside) del complejo III generan  $O_2^{\cdot-}$  del lado del espacio intermembranal (EI), mientras que el sitio  $Q_i$  (inside) lo hace hacia la matriz mitocondrial. Rotenona, inhibidor del complejo I; estigmatelina, inhibidor del sitio  $Q_o$  del complejo III; Antimicina, inhibidor del sitio  $Q_i$  de complejo III.

El  $O_2^{\cdot-}$  es la primera especie reactiva que se forma durante la fosforilación oxidativa y es generada por el complejo I; el  $O_2^{\cdot-}$  se convierte en  $H_2O_2$  por acción de la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) que se encuentra en la matriz mitocondrial<sup>56</sup>. En el ciclo Q a nivel del complejo III, por reducción de la coenzima Q, se forma el radical  $UQ^{\cdot-}$ , la cual reacciona rápidamente con el  $O_2$  para generar  $O_2^{\cdot-}$ ; de la misma manera, la  $UQ^{\cdot-}$  puede sufrir auto-reducción y generar  $H_2O_2$ <sup>57, 58</sup>.

Los sitios formadores de EROs en la CRM, son el complejo I, III y el ciclo Q (Figura 4):

**Complejo I:** Está constituido por subunidades hidrofóbicas denominadas N1-N6, ND4L (centros Fe-S) y FMN; al aplicar rotenona como inhibidor específico de este complejo, se ha determinado que un centro hierro-azufre, específicamente el N2, puede ser el sitio de fuga del electrón hacia el  $O_2$  y formar  $O_2^{\cdot-}$ , sólo del lado de la matriz mitocondrial<sup>59, 60, 61</sup>.

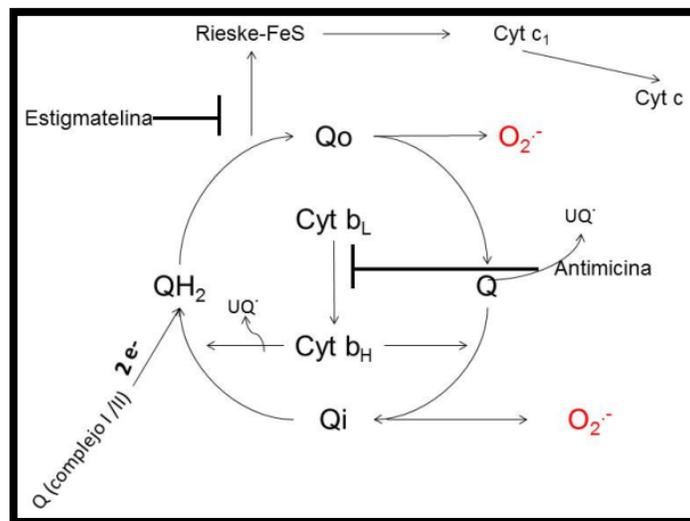
Hay evidencia de que el  $O_2^{\cdot-}$  aumenta cuando se presentan defectos estructurales del complejo I, los que probablemente juegan un papel en la generación de estrés oxidante<sup>62</sup>. La producción de  $O_2^{\cdot-}$  por el complejo I aumenta durante el transporte de electrones en reversa (en presencia de succinato), mientras que el transporte de electrones directo es mucho más bajo<sup>56, 63</sup>.

**Complejo III:** Tiene dos componentes formadores de  $O_2^{\cdot-}$ , el centro Qo orientado hacia el espacio intermembranaral y el centro Qi encauzado hacia la matriz mitocondrial, generando el  $O_2^{\cdot-}$  hacia ambos compartimentos de la mitocondria<sup>64, 65</sup>. Los centros Qo y Qi son sitios de unión de la quinona, donde se lleva a cabo el transporte de electrones desde la coenzima Q (forma reducida) hasta el Cyt c (Figura 5).

El ciclo comienza desde el  $QH_2$  que se une al sitio Qo y transfiere los electrones de uno en uno. Un electrón se transfiere a la proteína de Rieske 2Fe-2S, después al citocromo  $c_1$  y finalmente a una molécula de Cyt c oxidado, lo cual lo convierte en su forma reducida. El siguiente electrón es transferido al citocromo  $b_L$ , después al citocromo  $b_H$  y, por último, a la ubiquinona en estado oxidado que se encuentra unida

al sitio Qi. La reducción de la quinona produce un radical intermediario: el  $UQ^{\cdot-}$ , cuya reacción es muy rápida con el  $O_2$  y forma  $O_2^{\cdot-}$  a nivel de la matriz mitocondrial<sup>29</sup>. Una segunda molécula de  $QH_2$  se une al sitio Qo y reacciona de la misma forma que la primera, es decir, un electrón se transfiere de la proteína de Rieske hasta el Cyt c, mientras que el otro electrón se transfiere a la  $UQ^{\cdot-}$  unida al sitio Qi, donde genera  $O_2^{\cdot-}$  hacia el espacio intermembranal<sup>57</sup>.

La inhibición del centro Qi con antimicina A aumenta la generación de  $O_2^{\cdot-}$  por el centro Qo; la inhibición del centro Qo con estigmatelina disminuye la generación de  $O_2^{\cdot-}$  casi de la misma manera que cuando es bloqueado el centro Qi<sup>57</sup>. En mitocondrias de corazón, la inhibición del complejo III con antimicina A aumenta la generación de  $O_2^{\cdot-}$ , lo que sugiere que las EROs formadas por el centro Qo no son disminuidas por las defensas antioxidantes de la matriz mitocondrial<sup>56, 63</sup>.



**Figura 5.** Formación de  $O_2^{\cdot-}$  durante el ciclo Q. Durante la transferencia de electrones se lleva a cabo una serie de reacciones de oxido-reducción de la coenzima Q, lo cual genera tanto radical ubisemiquinona ( $UQ^{\cdot-}$ ), como  $O_2^{\cdot-}$  a dos niveles, el sitio orientado hacia el interior de la matriz mitocondrial ( $Q_i$ ) y otro sitio orientado hacia el espacio intermembranal ( $Q_o$ ). La inhibición específica de estos dos sitios ha ayudado a entender la vía de formación de estos radicales libres

## Las defensas antioxidantes

Todas las células con metabolismo aeróbico se encuentran expuestas a radicales libres por lo que han desarrollado sistemas antioxidantes para mantener un equilibrio redox; estos antioxidantes se pueden clasificar en enzimáticos<sup>66, 67</sup> y no enzimáticos. Entre los primeros se encuentra:

- a) La superóxido dismutasa (SOD), proteína que pertenece a la familia de las metaloenzimas y que cataliza la dismutación del  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$  y  $O_2$ . Estas proteínas tienen en su centro activo un metal como fierro, cobre/zinc o manganeso.

La Cu/ZnSOD tiene dos subunidades idénticas de aproximadamente 32 kDa y cada una de ellas tiene en su sitio activo, un átomo de cobre y un átomo de zinc unidos por un residuo de histamina. Se expresa solo en eucariontes y se localiza en el citosol y en el espacio intermembranal de la mitocondria.

La MnSOD es un homotetrámero de 96 kDa y en su centro activo contiene un átomo de manganeso el cual, durante la reacción de dismutación del  $O_2^{\cdot-}$ , cambia su estado de oxidación ( $Mn^{+3} \rightarrow Mn^{+2} \rightarrow Mn^{+3}$ ). Dicha enzima se encuentra en bacterias, plantas y animales; en estos últimos se ubica en la matriz mitocondrial.

La EC-SOD (superóxido dismutasa extracelular), es una glucoproteína tetramérica que contiene un átomo de cobre y un átomo de zinc; es muy afín a ciertos glucosaminoglicanos como la heparina; su regulación en órganos de mamíferos no está inducida por su sustrato sino como respuesta a las citocinas.

La FeSOD es una isoforma presente sólo en bacterias y en cloroplastos de plantas superiores.

b) La catalasa (CAT) es una enzima tetramérica que consta de 4 subunidades idénticas de 60 kDa cada una. Contiene un grupo de protoporfirina en su sitio activo; allí cataliza la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{O}_2$  y  $2\text{H}_2\text{O}$ <sup>67</sup>. Se localiza principalmente en los peroxisomas, organelos donde se lleva a cabo la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga, es decir aquellos que tienen una cadena de más de 20 carbonos. En este proceso intervienen enzimas que generan  $\text{H}_2\text{O}_2$  como subproducto, tal como las flavoproteínas deshidrogenasas. La CAT también se ha descrito, en menor cantidad, en retículo endoplasmático, cloroplastos y mitocondrias. La expresión de la catalasa en el humano se ha descrito en hígado, eritrocitos, riñón, corazón, nodo linfático, pulmón, músculo esquelético, cerebro, tejido adiposo y páncreas.

c) La glutatión peroxidasa (GPx) es una enzima que pertenece a la familia de las selenoproteínas, cuyo contenido es, como su nombre lo indica, un átomo de selenio unido a un residuo de cisteína en cada una de sus cuatro subunidades. Tiene una masa molecular de aproximadamente 80 kDa y su principal función es la degradación de peróxidos formados de forma endógena en la célula. La GPx reduce el  $\text{H}_2\text{O}_2$  hasta  $\text{H}_2\text{O}$  utilizando el glutatión reducido (GSH) como donador de electrones y forma glutatión oxidado (GSSG) que es regenerado por la

glutación reductasa (GR) utilizando NADPH como donador de electrones. La GPx se encuentra presente en bacterias aeróbicas, plantas y animales.

Se han reportado 8 isoformas de la GPx:

- la GPx1 se encuentra en los eritrocitos y se encarga de proteger a la hemoglobina de la oxidación;
- la GPx2 elimina los hidroperóxidos orgánicos ingeridos en la dieta y puede actuar aceptando al ter-butilhidroperóxido e hidroperóxidos del ácido linoleico; se localiza en el citoplasma y núcleo de células de hígado y epitelio del tracto gastrointestinal;
- la GPx3 es una isoforma citosólica y se encarga de eliminar lipoperóxidos e hidroperóxidos orgánicos; se halla en hígado, riñón, corazón y gónadas; también se puede encontrar en suero, plasma y fluido cerebroespinal;
- la GPx4, a diferencia de las demás, es una proteína monomérica y reduce peróxidos de fosfolípidos y colesterol; se encuentra en núcleo, mitocondrias y citoplasma<sup>68</sup>,
- la GPx5 protege contra el daño por lipoperóxidos y se encuentra en el tracto reproductor masculino y epidídimo; en comparación con las otras, ésta isoforma tiene un residuo de cisteína en lugar de residuo de selenocisteína;
- de GPx6, GPx7 y GPx8 aún no se tiene información suficiente, ni de estructura ni de localización<sup>69</sup>.

Los sistemas no enzimáticos incluyen:

a) El glutatión (GSH), un tripéptido no proteico que deriva de tres aminoácidos:  $\gamma$ -glutamato, L- cisteína y glicina. La síntesis del GSH es una reacción dependiente de ATP y comienza con la síntesis de la  $\gamma$ -glutamil cisteína a partir del L- glutamato y la cisteína, mediante la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa, llamada también glutamato cisteína ligasa (GCL). Después la glicina se añade al carboxilo terminal de la  $\gamma$ -glutamil cisteína mediante la glutatión sintetasa<sup>24</sup>.

Funciona como el mejor antioxidante en la célula, además de ser el más abundante. En el citosol su concentración es de 1 a 11 mM, en núcleo de 3 a 15 mM y en mitocondria 5 a 11 mM, mientras que en matriz mitocondrial es de 8 mM<sup>67</sup>.

El GSH es un cofactor de la GPx, que reduce el  $H_2O_2$  a  $H_2O$  generando GSSG. Su exceso, acumulado dentro de la mitocondria induce un cambio en el cociente GSH/GSSG que se considera como índice para determinar estrés oxidante dentro de la mitocondria<sup>68</sup>.

Además de participar como cofactor de la GPx y la glutatión transferasa puede, por sí mismo, actuar como atrapador del radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ) y del singulete de oxígeno ( $^1O_2$ ) y capaz de regenerar otras moléculas como la vitamina C y E.

Existen otras moléculas endógenas que son atrapadores directos de radicales libres como, el ascorbato (vitamina C), el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) y los fenoles, todos ellos deben adquirirse de la dieta<sup>66, 67</sup>.

Los sistemas antioxidantes más importantes a nivel mitocondrial son la MnSOD, Cu/ZnSOD, la catalasa y el sistema GSH/GPx; estos mantienen el equilibrio entre pro-oxidantes y antioxidantes. La mitocondria cuenta, además, con otra estrategia

evolutiva para protegerse del daño por EROs, un mecanismo de desacoplamiento de la fosforilación oxidativa a través de la fuga de protones mediada por las proteínas desacoplantes<sup>70</sup>.

### **Las proteínas desacoplantes (UCPs)**

La síntesis de ATP puede ser afectada por la translocación de los H<sup>+</sup> a través de las UCPs, lo que provoca el desacoplamiento entre el flujo de electrones y la síntesis de ATP<sup>71</sup>; este mecanismo induce un aumento en el consumo de oxígeno que está implicado en la disminución en la generación de EROs<sup>4</sup>.

Las UCPs forman parte de la familia de acarreadores mitocondriales, se localizan en la membrana interna mitocondrial de distintos organismos como levaduras, protozoarios, plantas, aves y mamíferos<sup>72, 73</sup>. Existen 5 isoformas de estas proteínas: UCP1, UCP2, UCP3, UCP4 y UCP5 (BMCP1)<sup>3, 74, 75</sup>.

Su función principal radica en el transporte de protones desde el espacio intermembranal aunque también reduce el gradiente electroquímico generado por la CTE, aumenta el consumo de oxígeno y reduce la síntesis de ATP<sup>22, 76</sup>. Se ha descrito que sus reguladores positivos son los ácidos grasos insaturados y sus reguladores negativos, los purín nucleótidos<sup>77</sup>.

El desacoplamiento que llevan a cabo las UCPs tiene un papel fisiológico, regulando eventos como la termogénesis en mamíferos que hibernan, utilizando el gradiente electroquímico para la generación de calor<sup>78, 79, 80</sup>, así como en la

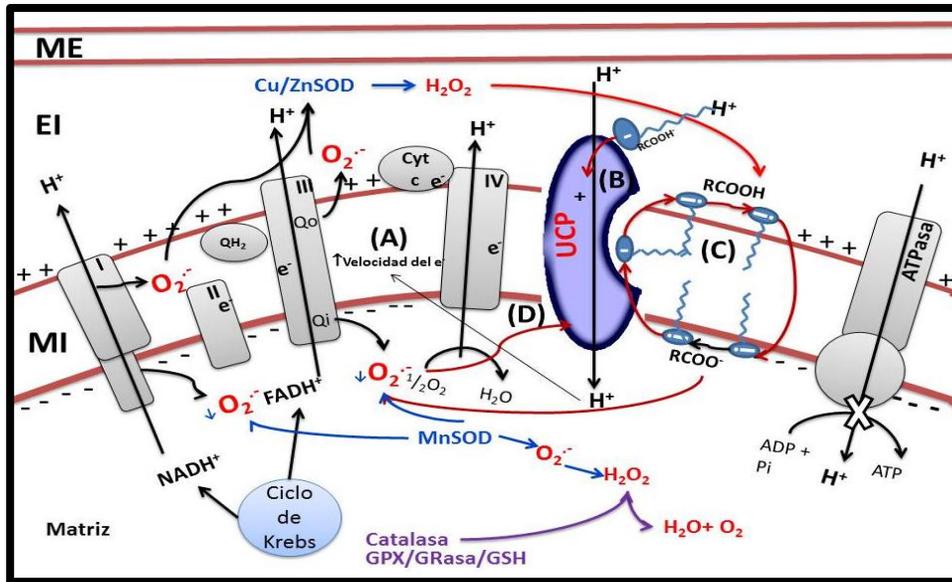
regulación de la generación de EROs por la mitocondria; estas últimas están relacionadas con distintas patologías degenerativas<sup>3, 4</sup>.

En 1978, Nicholls y colaboradores<sup>79</sup> identificaron y describieron el primer miembro de la familia denominada UCP1 que lleva a cabo el proceso de termogénesis en mamíferos recién nacidos y en aquellos adaptados al proceso de hibernación<sup>81</sup>. Esta proteína incrementa la conductancia de los H<sup>+</sup> inducida por ácidos grasos poliinsaturados<sup>82</sup>, disipando el gradiente electroquímico en forma de calor<sup>70, 75, 76</sup>.

La UCP2 y UCP3 fueron identificadas en 1997; éstas muestran entre el 54% y 59% de identidad con la UCP1<sup>11</sup>. Ambas proteínas juegan un papel importante en la regulación de las EROs generadas por la mitocondria en eventos patológicos como el proceso inflamatorio presente en la obesidad, así como en la regulación negativa de la secreción de insulina estimulada por glucosa, entre otras funciones<sup>83, 84</sup>.

El desacoplamiento generado por estas proteínas provoca un aumento en el consumo de oxígeno y en la transferencia de electrones a través de los complejos respiratorios, por lo que disminuye la generación de EROs<sup>77</sup>.

El aumento en el flujo de electrones permite que no haya fuga de estos hacia la formación de EROs, específicamente a nivel del ciclo Q, donde se forma el radical ubisemiquinona, mismo que reacciona rápidamente con el O<sub>2</sub> para formar O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Figura 6)<sup>85</sup>.



**Figura 6. Fuga de H<sup>+</sup> mediada por la UCP2.** La UCP2 cataliza el transporte del H<sup>+</sup>, lo cual resulta en la aceleración del transporte de electrones (e<sup>-</sup>) a través de los complejos respiratorios (I-IV) y la reducción del O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O y ½ O<sub>2</sub> de manera tetravalente, lo que provoca, que no exista fuga de e<sup>-</sup> hacia la formación de EROs (A). El ácido graso en su forma protonada (RCOOH) puede activar a la UCP2 en el espacio intermembranar (EI) y ceder el H<sup>+</sup> a un aminoácido que forma parte del canal de la UCP2, el cual lo transporta hacia la matriz (B). El ácido graso, también puede difundir a través de la membrana interna mitocondrial (MIM) por un mecanismo de *flip-flop* (transporte pasivo) en forma de RCOOH desde el EI hacia la matriz, donde libera el H<sup>+</sup> (C), una vez que liberado el protón, el ácido graso en su forma aniónica (RCOO<sup>-</sup>) pasa a través de la UCP2 desde la matriz hacia el EI y provoca el desacoplamiento. El O<sub>2</sub><sup>•-</sup> puede activar a la UCP directamente (D) como un mecanismo de retroalimentación.

En modelos murinos, las células β del páncreas que carecen de la UCP2 (*ucp2*<sup>-/-</sup>) se manifiesta una disminución en el glutatión reducido y un aumento en el glutatión oxidado, así como el incremento en los marcadores de estrés oxidante como las proteínas nitrosiladas<sup>86</sup>.

La UCP2 y UCP3, pueden ser activadas no sólo por AGNEs sino también por O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y por productos de lipoperoxidación como el 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE)<sup>87</sup>. Se ha propuesto que la activación de las UCPs por EROs es un mecanismo de retroalimentación, sin embargo, el mecanismo exacto aún no está bien descrito<sup>88</sup>.

La UCP3 puede ser activada de igual manera que la UCP2 por productos de lipoperoxidación como el 4-HNE, disipando el potencial transmembranal y disminuyendo las EROs<sup>89</sup>. Este evento está particularmente presente durante el ejercicio, ya que en tal estado hay aumento en las EROs asociado a la sobre-expresión de la UCP3 en el músculo esquelético<sup>84</sup>.

Asimismo, en el SM y la DT2, se ha observado que se presenta un aumento de EROs, resultado de la disfunción mitocondrial. Esta condición genera una respuesta de adaptación al cambio en el metabolismo energético, lo que se refleja en la expresión de proteínas desacoplantes en la membrana interna mitocondrial; estas proteínas pueden regular la generación de EROs afectando el potencial transmembranal y la síntesis de ATP. Esto se ha observado en órganos como el músculo cardíaco, el esquelético y en células  $\beta$  del páncreas<sup>48</sup>.

### **Regulación génica de la UCPs**

Tanto para el gen *ucp2* como *ucp3* se han identificado elementos de respuesta a receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs), PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  y PPAR $\delta$  en la región promotora<sup>90</sup>.

En el hígado, como en otros órganos, los PPARs juegan un papel importante en la expresión de la UCP2; el PPAR $\alpha$  favorece la vía de oxidación de los ácidos grasos y la activación de la lipoproteína lipasa, reduciendo las concentraciones de triglicéridos plasmáticos, incrementa su expresión durante el ayuno y en distintos modelos experimentales de obesidad, lo que se ha corroborado por el tratamiento

con fármacos agonistas de este receptor como los fenofibratos (fármacos que activan al PPAR $\alpha$ )<sup>91</sup>.

Los ácidos grasos poli-insaturados como el ácido araquidónico, el ácido linoleico y sus derivados oxigenados (prostaglandinas) incrementaron la expresión de RNAm de la UCP2 en una línea celular del músculo esquelético humano. En este reporte se observó que la incubación con ácido araquidónico (100  $\mu$ M) aumentó 150 veces la prostaglandina PGE2 y 15 veces a la prostaciclina PGI2; ambas prostaglandinas indujeron un aumento en los niveles de AMP cíclico y de la proteína cinasa A (PKA) lo que correlacionó con el aumento del RNAm de la UCP2; sin embargo, cuando se inactivó a la PKA, se inhibió la PGE2, por lo que el ácido araquidónico y la PGI2 no causaron un aumento en la expresión génica de esta proteína<sup>92</sup>.

El gen *ucp3* cuenta con una región proximal de respuesta a MyoD (proteína de diferenciación miogénica), PPAR $\alpha$  y PPAR $\delta$  que forman heterodímeros con el receptor X de retinoides (RXR) (PPAR/RXR) en respuesta a una acumulación de AGNES y agonistas de los PPARs como las tiazolidinedionas, tanto en músculo esquelético como en corazón. En células miogénicas, el ácido 9-cis retinoico promueve la expresión de la UCP3 vía PPARs<sup>86</sup>.

### **Las UCPs y su participación en enfermedades metabólicas**

Se ha reportado que las dietas altas en grasas o carbohidratos están relacionadas con el aumento del RNAm de la UCP2 en hígado en modelos

experimentales<sup>93</sup>. Los mismos activadores de la proteína como el  $O_2^{\cdot-}$  y el 4-HNE también incrementan el transcrito de esta proteína<sup>94</sup>.

Distintos factores transcripcionales que participan en el metabolismo de los ácidos grasos regulan positivamente la expresión de la UCP2. En condiciones patológicas como obesidad, diabetes tipo 2, SM, hígado graso no alcohólico y en ratas pancreatectomizadas se observa una sobre-expresión de la proteína<sup>86, 95</sup>.

En el hígado, la expresión de la UCP2 en condiciones fisiológicas es detectable sólo en las células de Kupffer; sin embargo, en condiciones patológicas como la obesidad, la expresión de la proteína aumenta en todas las poblaciones celulares del hígado<sup>83</sup>. La UCP2 juega un papel muy importante en la regulación de la secreción de insulina; una alteración en su función constituye un factor de riesgo importante para el desarrollo de SM<sup>86</sup>.

Cuando los niveles de glucosa aumentan en el plasma (>5 mM), la célula  $\beta$  del páncreas secreta insulina, lo que conduce a un concomitante incremento en el metabolismo mitocondrial de la célula- $\beta$ . Este proceso se ve reflejado en el ascenso de las concentraciones intracelulares de ATP, cuya consecuencia es que inhibe los canales de  $K^+_{ATP}$ , lo que resulta en la despolarización de la membrana plasmática y la apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje. La entrada de  $Ca^{2+}$  al citosol facilita la migración de los gránulos que contienen a la insulina hacia la membrana plasmática conduciendo su liberación hacia la circulación<sup>95</sup>.

Se ha observado, en un modelo de secreción de insulina estimulado por glucosa en islotes pancreáticos, que la UCP2 tiene un papel importante en la regulación de la secreción de la hormona, ya que su expresión reduce la eficiencia

de la fosforilación oxidativa y, por lo tanto, las concentraciones de ATP<sup>96</sup>. Esta disminución en las concentraciones de ATP reduce la secreción de insulina.

En un estado de alimentación balanceada, la expresión de la UCP2 es baja, sin embargo, cuando la dieta es alta en carbohidratos o ácidos grasos, la generación de EROs y los niveles de ATP aumentan en la célula  $\beta$ . Esto induce la sobre-expresión de la UCP2 que, al reducir el potencial transmembranal, disminuye la síntesis de ATP y la formación de EROs<sup>95</sup>. La expresión de la UCP3 está asociada al estrés oxidante a nivel mitocondrial y al metabolismo oxidativo de los ácidos grasos, regulando el peso corporal<sup>97</sup>.

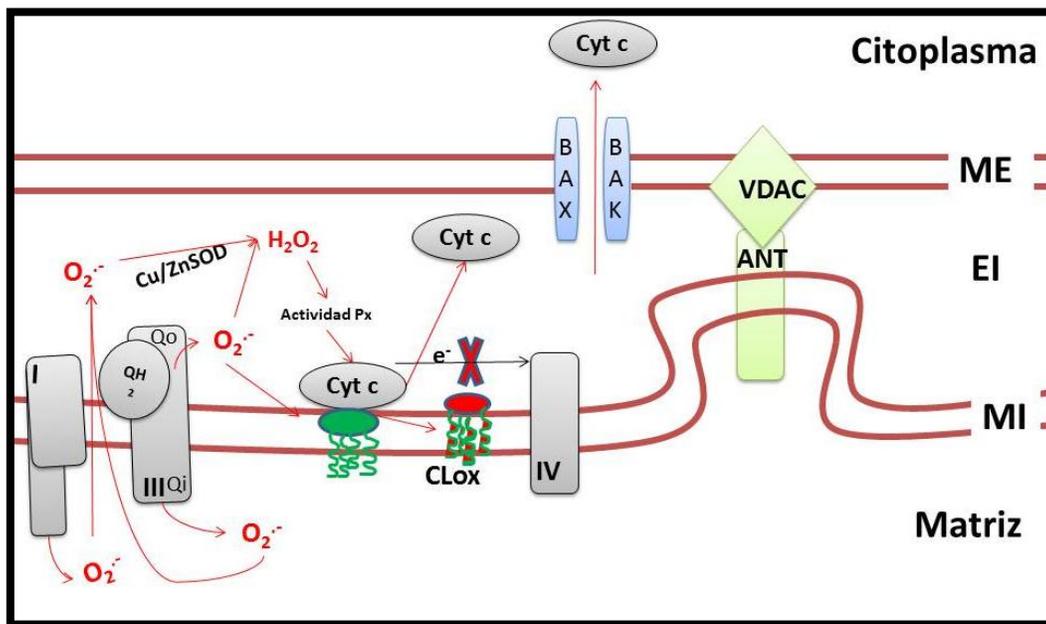
### **Las EROs y la liberación del citocromo c (Cyt c)**

El Cyt c es una proteína soluble cargada positivamente que está unida a la membrana interna mitocondrial por su asociación con el fosfolípido cardiolipina mediante fuerzas electrostáticas y puentes de hidrógeno<sup>98</sup>. Esta proteína funciona como acarreador de electrones entre el complejo III y IV de la CRM.

Además de participar en el transporte de electrones, el Cyt c juega un papel crucial en el mecanismo de muerte celular programada; la liberación del Cyt c del espacio intermembranal hacia el citoplasma y su interacción con Apaf-1 establece el punto sin regreso hacia la apoptosis. Ya se ha demostrado que la pérdida en el plegamiento del Cyt c le confiere actividad de peroxidasa cuando se encuentra asociado a fosfolípidos aniónicos como la cardiolipina<sup>99</sup>. La cardiolipina, por su composición lipídica, confiere mayor fluidez a la membrana interna mitocondrial así

como a los sitios de contacto entre ésta y la membrana externa mitocondrial. También induce mayor estabilidad a los complejos respiratorios y participa en el transporte de electrones, la translocación de ADP/ATP y la permeabilidad de iones<sup>100</sup>.

El mecanismo de liberación de Cyt c al citosol aún no es del todo claro, sin embargo existe la hipótesis de que las EROs participan en éste (Figura 7)<sup>101</sup>.



**Figura 7. Mecanismo de liberación del Cyt c.** La generación de EROs por los complejos I y III de la CRM pueden oxidar a la cardiolipina (CLOx) y liberar al Cyt c. Así mismo el  $O_2^{\cdot-}$  puede generar  $H_2O_2$ , el cual confiere actividad de peroxidasa (PX) al Cyt c, oxidando a la cardiolipina y liberándose al espacio intermembranal (EI). El Cyt c también puede salir al citosol a través de poros formados por Bax/Bak.

La lipoperoxidación de la cardiolipina es uno de los mecanismos propuestos para la liberación del Cyt c. Dicho fosfolípido es susceptible a la oxidación por su composición en ácidos grasos poli-insaturados, en su mayoría por ácido linoleico y araquidónico<sup>8, 102</sup>

El Cyt c en presencia de  $H_2O_2$  puede adquirir actividad de peroxidasa y tomar como sustrato a la cardiolipina para oxidarla y así liberarse de la membrana interna mitocondrial hacia el citosol<sup>7, 8, 103</sup>. El  $H_2O_2$  se genera a partir de la dismutación realizada por la MnSOD y la Cu/ZnSOD del  $O_2^{\cdot-}$  que se forma en los complejos I y III de la cadena respiratoria mitocondrial<sup>8</sup>

La expresión de UCPs puede disminuir la generación de EROs, lo cual puede afectar la liberación de Cyt c. La sobre-expresión de la UCP2 revirtió el daño neuronal en ratones transgénicos mediante la inhibición de la generación de especies reactivas del oxígeno y la liberación del Cyt c por la mitocondrias, evitando la iniciación de la apoptosis<sup>104</sup>.

## V. JUSTIFICACIÓN

En el síndrome metabólico asociado con la obesidad, el exceso de sustratos oxidativos como los AGNEs, propician la generación de EROs en la mitocondria. Sin embargo, este tiene la capacidad de desarrollar varios sistemas de defensa contra la lipotoxicidad, para el mantenimiento de la homeostasis energética. El hígado es uno de los primeros órganos expuesto directamente a la movilización de AGNEs desde el tejido adiposo. Estos AGNEs pueden contribuir a la sobre expresión de la UCP2 en el hígado como respuesta a la lipotoxicidad y el estrés oxidante en el SM. Por otro lado, la UCP2 como proteína desacoplante puede inducir un disminución en la síntesis de ATP mitocondrial. El estrés oxidante generado por la mitocondria participa en el inicio del proceso apoptótico. Este proceso aparentemente involucra la liberación de un número de proteínas proapoptóticas incluyendo el Cyt c y el factor inductor de apoptosis, desde el espacio intermembranal hacia el citosol. Un aumento en el contenido de la UCP2 en respuesta al estrés oxidante puede alterar la liberación del Cyt c y afectar la iniciación del proceso apoptótico. Por lo tanto, en este proyecto nos propusimos investigar si el hígado de ratas con SM, donde coexisten diferentes alteraciones fisiológicas relacionadas con un aumento en los marcadores de estrés oxidante, se activan sistemas de defensa que logren mantener la homeostasis energética. Para hacerlo evaluamos los sistemas antioxidantes en tejido y mitocondrias, así como la posible sobre-expresión de UCPs y su efecto sobre la función mitocondrial y sobre la liberación de Cyt c.

## **VI. HIPÓTESIS**

En el modelo de síndrome metabólico, la sobre-expresión de las UCP2 en mitocondrias de hígado es una respuesta al estrés oxidante que reducirá la liberación de Cyt c.

## **VII. OBJETIVOS**

### **General**

- Evaluar el efecto de la sobre-expresión de UCP2 sobre la generación de EROs y la liberación de Cyt c en mitocondrias de hígado en un modelo de SM.

### **Particulares**

- Analizar la participación de la mitocondria en la generación de EROs en mitocondrias de hígado en un modelo de SM.
- Analizar la función y actividad de la UCP2 y evaluar el efecto de su expresión sobre la generación de EROs en mitocondrias aisladas de hígado.
- Analizar la participación de la UCP2 sobre la liberación de Cyt c inducida por estrés oxidante.

## VIII. METODOLOGÍA

### **Desarrollo de un modelo experimental de Síndrome Metabólico**

Se utilizaron ratas machos recién destetados de la cepa Wistar. Se formaron dos grupos al azar, de 12 animales cada uno. El grupo control tuvo acceso libre al alimento sólido comercial (*Lab Diet*, fórmula 5008) y agua de beber *ad libitum*, mientras que al otro grupo se le indujo el síndrome metabólico mediante la administración de solución de sacarosa al 30% y se le proveyó el mismo alimento que a los animales control; la finalidad fue desarrollar las características clínicas del síndrome metabólico durante 24 semanas para obtener muestras biológicas.

### **Obtención de muestras biológicas**

Una vez finalizado el tratamiento, los animales se pusieron en ayuno de 12 horas para ser decapitados y coleccionar muestras de sangre y tejidos para realizar los experimentos.

La sangre fue coleccionada en un tubo que contenía 0.1% EDTA y se centrifugó a 600 x g durante 20 minutos a 4°C. El plasma se suplementó con 0.005% de BHT como antioxidante y se almacenó a -70°C para posteriormente analizar el contenido lipídico.

El hígado se homogenizó en 50 ml de una solución que contenía 250 mM sacarosa, 10 mM Tris-base, 1mM EGTA, pH 7.4 a 4°C; posteriormente se centrifugó

a 600 x g durante 5 minutos a 4°C y el sobrenadante fue recolectado y almacenado a -70°C para el posterior análisis de su contenido lipídico.

La grasa intra-abdominal fue disectada de la cavidad retroperitoneal y de alrededor de los dos riñones y se pesó inmediatamente.

### **Análisis bioquímico de muestras plasmáticas**

Los triglicéridos plasmáticos fueron cuantificados conforme al método de Nägele y colaboradores<sup>105</sup>. La concentración de insulina plasmática se determinó por radioinmunoensayo utilizando un sistema comercial (*Coat-a-Count*, *Diagnostic Products*, Los Ángeles, CA.)

Para determinar los triglicéridos hepáticos se tomaron 50 mg de tejido y fueron homogenizados en 2 ml de isopropanol. El homogenado se centrifugó a 2000 x g durante 10 minutos y el sobrenadante fue recolectado. Los triglicéridos fueron cuantificados en el sobrenadante utilizando un sistema comercial (*Wako Diagnostic*).

### **Obtención de mitocondrias aisladas de hígado**

La obtención de mitocondrias se realizó por centrifugación diferencial extrayendo el hígado de los animales y colocándolos en solución de aislamiento A que contenía 250 mM sacarosa, 10 mM Tris-base, 1mM EGTA, pH 7.4 y a 4°C . El hígado fue triturado finamente y homogenizado en 30 ml de esta solución en un homogenizador tipo Potter.

El homogenizado fue centrifugado a  $600 \times g$  durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  para sedimentar el tejido conjuntivo y los restos celulares. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a  $8000 \times g$  durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  para obtener la fracción mitocondrial. La pastilla resultante se resuspendió en solución B que contenía 250 mM sacarosa, 10 mM Tris-base, pH 7.4, suplementada con albúmina de suero bovino (ABS) al 0.1% y se incubó durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Después de la incubación, se adicionaron 20 ml de solución B y se centrifugó a  $8000 \times g$  durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . La fracción mitocondrial se resuspendió en 1 ml de solución B y las muestras se mantuvieron a  $4^{\circ}\text{C}$  durante el tiempo que duraron los experimentos.

### **Determinación de proteína**

La proteína tanto en homogenizado como en mitocondrias, se cuantificó con el método de Lowry modificado<sup>106</sup>.

Se prepararon tres soluciones: Sol A (NaOH al 1%), Sol B ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  al 1%) y Sol C ( $\text{CuSO}_4$  al 0.5%); se hizo una mezcla (Sol D) que por cada mililitro de Sol A contenía 10  $\mu\text{l}$  de Sol B y 10  $\mu\text{l}$  de Sol C (v/v).

Se realizó una dilución 1:100 del extracto mitocondrial y del homogenizado total en NaCl al 0.9%; de ésta solución se tomaron 100  $\mu\text{l}$  y se adicionaron 900  $\mu\text{l}$  de la Sol D por duplicado y se agitaron con vórtex.

Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, se adicionaron 100  $\mu\text{l}$  de Folin 1N (SIGMA) y se incubaron las muestras durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

Paralelamente se realizó una curva de calibración utilizando albúmina de suero bovino (ABS) a 0, 10, 20 40 y 60  $\mu\text{g}$  y se trataron de la misma forma que las muestras.

Después de la incubación con Folin se registró la absorbancia en un espectrofotómetro a 750 nm. La curva de calibración que corresponde a la absorbancia en función de las concentraciones de ASB es lineal y obedece a la ley de Beer Lambert, lo que permitió determinar la concentración de proteína presente en las muestras de mitocondrias.

### **Actividad de los complejos respiratorios**

La determinación de las actividades enzimáticas de los complejos respiratorios se determinó en mitocondrias aisladas<sup>107</sup>.

La actividad del complejo I se determinó midiendo la oxidación de NADH en una solución que contenía 35 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.5), 0.2 mM NADH y 1.7 mM  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Los cambios de absorbancia fueron seguidos a 340 nm utilizando el coeficiente de extinción del NADH que es de  $6.22 \text{ mM}^{-1}$ .

La actividad del complejo II se determinó midiendo la absorbancia del diclorofenolindofenol en una solución que contenía 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.0), 1 mM KCN, 0.05 mM diclorofenolindofenol y 16 mM succinato; el cambio de absorbancia

fue seguido a 600 nm utilizando el coeficiente de extinción del diclorofenolindofenol que es de  $19.1 \text{ mM}^{-1}$ .

La actividad del complejo III se determinó por la reducción del Cyt c en una solución que contenía 0.1 mM Cyt c, 0.5 mM KCN, 3 mM succinato y 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.5).

La actividad del complejo IV se midió siguiendo la oxidación de Cyt c en una solución que contenía 0.1% de Cyt c en 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7). El cambio de la absorbancia se midió a 550 nm utilizando el coeficiente de extinción para el Cyt c que es de  $18 \text{ mM}^{-1}$ .

### **Consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas**

El consumo de oxígeno se midió con un electrodo tipo Clark. Se incubaron 0.5 mg/ml de proteína mitocondrial a  $30^\circ\text{C}$  en un medio que contenía 25 mM KCl, 10 mM HEPES (pH 7.4), 10 mM EGTA, 2 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$  y 5 mM succinato como sustrato oxidativo en presencia de rotenona. Las mitocondrias fueron incubadas con 250  $\mu\text{M}$  ADP para inducir el estado 3 de la respiración (consumo de  $\text{O}_2$  acoplada a la síntesis de ATP), mientras que el estado 4 (consumo de  $\text{O}_2$  en ausencia de ADP) se determinó sólo en presencia de succinato y rotenona.

## Estimación del potencial transmembranal en mitocondrias aisladas

El potencial transmembranal se determinó utilizando el fluoróforo tetrametilrodamina metil-éster (TMRM), catión lipofílico que se acumula en la matriz mitocondrial (Figura 8). Cuando se activa la cadena respiratoria mitocondrial se bombean protones al espacio intermembranal a través de los complejos I, III y IV dejando a la matriz mitocondrial con carga negativa y el espacio intermembranal con carga positiva. Esta diferencia de carga permite que la TMRM se desplace del espacio intermembranal hacia el lado interno de la membrana interna mitocondrial, lo que resulta en un “*quenching*” de la fluorescencia que es proporcional al potencial generado por la mitocondria<sup>108</sup>.

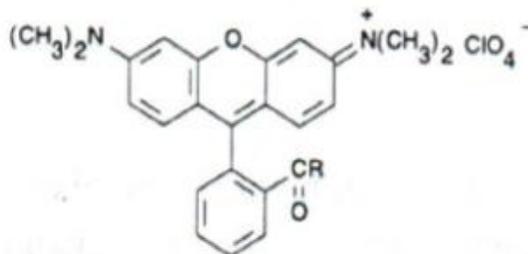


Fig.8. Estructura química de la tetrametilrodamina metil-éster (TMRM)

En una celda de cuarzo se incubaron 0.5 mg/ml de proteína mitocondrial en una solución que contenía 125 mM KCl, 10 mM EGTA, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. La concentración final de TMRM (*Molecular Probes*®) fue de 0.25 μM en presencia de 2 μM oligomicina, 3 μM rotenona y 80 ng/ml de nigericina. La reacción comenzó con la adición de 5 mM de succinato y el potencial se colapsó con la adición de concentraciones crecientes de malonato (inhibidor específico de la succinato deshidrogenasa) que fueron de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 mM. Para visualizar el efecto de la

actividad de la UCP2 sobre el potencial transmembranal se adicionó 0.5 mM de GDP como inhibidor específico de la proteína y 2.5 mM de ácido oleico como activador.

El cambio de la fluorescencia se detectó en un espectrofluorómetro marca *Perkin-Elmer* modelo LS-50-B con software FL WinLab y agitación magnética y a 37°C. Las longitudes de onda de excitación y emisión para la TMRM fueron 550 y 590 nm respectivamente. Los experimentos se realizaron a 37°C.

Para determinar la concentración de la TMRM en la mitocondria se utilizó la siguiente ecuación<sup>109</sup>:

$$(TMRM)_t = K_i(TMRM)_m + K_o(TMRM)_o, \text{ donde}$$

- (TMRM)<sub>t</sub>, total de TMRM acumulada en la mitocondria energizada
- (TMRM)<sub>m</sub>, cantidad de TMRM dentro de la matriz mitocondrial (nmol/μl)
- (TMRM)<sub>o</sub>, cantidad de TMRM fuera de la matriz mitocondrial (nmol/μl)
- $K_o = 88$  (μl/mg)
- $K_i = 33$  (μl/ mg)

Para calcular (TMRM)<sub>t</sub> se incubaron las mitocondrias en presencia y ausencia de sustrato; posteriormente las muestras fueron centrifugadas y se registró la fluorescencia del sobrenadante que fue restada de la fluorescencia que se obtuvo del sobrenadante de las muestras sin sustrato. Para determinar (TMRM)<sub>o</sub> se energizaron las mitocondrias y se adicionó carbonil- cianuro p-(trifluorometoxi) fenilhidrazona para colapsar el potencial. Una vez que se obtuvo un estado de equilibrio se centrifugaron las muestras y se registró la fluorescencia del sobrenadante.

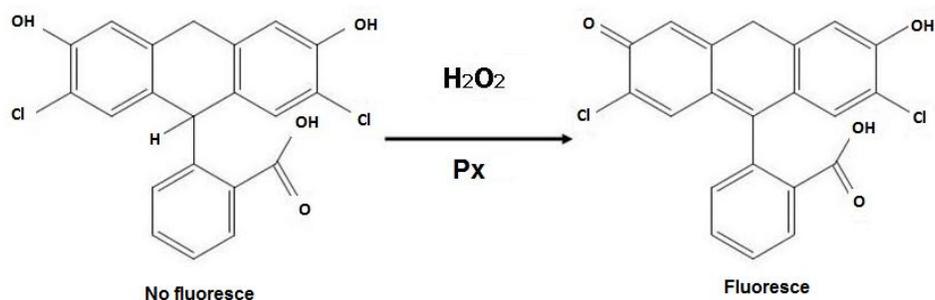
Los valores de  $K_o$  y  $K_i$  fueron tomados de Scaduto RC Jr *et al*<sup>109</sup>, tomando en cuenta que los experimentos fueron realizados en las mismas condiciones que en la literatura.

El valor calculado para (TMRM)<sub>m</sub> y el de (TMRM)<sub>o</sub> se utilizaron para determinar el potencial transmembranal ( $\Delta\psi$ ) mediante la ecuación de Nernst

$$\Delta\psi = 60.1 \log \frac{(\text{TMRM})_o}{(\text{TMRM})_m}$$

### Cuantificación de la generación de $\text{H}_2\text{O}_2$ en mitocondrias aisladas

Se cuantificó la producción de EROs generados por la cadena respiratoria utilizando, el 2, 7-dihidrodiclorofluoresceína (DCF), el cual se oxida en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 9)<sup>110</sup>.



**Figura 9. Estructura química del DCF.** La figura muestra el cambio en la estructura del fluoróforo al interactuar con la peroxidasa (Px) y oxidarse con el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La interacción con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  provoca la oxidación y fluorescencia del DCF.

Durante la oxidación de piruvato-malato o succinato, sustratos del complejo I y II de la CRM, respectivamente, se genera  $\text{O}_2^{\cdot-}$  en los complejos I y III, que puede generar  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediante la acción de la MnSOD en la matriz mitocondrial o por la Cu/ZnSOD en el espacio intermembranal. El peróxido difunde hacia el espacio intermembranal donde oxida al DCF generando una señal de fluorescencia.

Se utilizaron 0.5 mg/ml de proteína mitocondrial y se incubaron en una solución que contenía 125 mM KCl, 10 mM EGTA, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en presencia de 0.1 μM de DCF (SIGMA) y 1 U/ml de peroxidasa de caballo (SIGMA) para que se llevará a cabo la reacción. Los experimentos se realizaron en presencia de 2 μM oligomicina, 3 μM rotenona y 80 ng/ml de nigericina y como sustrato oxidativo se utilizó piruvato/malato (5/3 mM). Todos los experimentos se realizaron en agitación constante y a 30°C.

La fluorescencia del DCF fue medida en un fluorómetro marca Perkin Elmer LS50B utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de 484 nm y 525 nm, respectivamente, y con un paso de banda de 6 nm para ambas longitudes.

### **Análisis de la UCP2 por *Western Blot***

Las muestras mitocondriales utilizadas para este análisis contenían una mezcla de inhibidores de proteasas (PMSF 5 μg/ml, leupeptina 5 μg/ml, pepstatina 2 μg/ml y aprotinina A 1 μg/ml) para evitar la degradación proteica.

Sesenta microgramos de proteína mitocondrial fueron separados por electroforesis en un gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) al 12% a 120 V durante 3 horas en una solución de corrida que contenía 25 mM Tris, 192 mM glicina y 0.1% SDS, pH 8.3. A continuación, la proteína en los geles, se transfirió en una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore) en una solución que contenía 25 mM Tris, 192 mM glicina y 10% de metanol a pH 8.5, durante 60 minutos a 350 mA. Posteriormente, las membranas se bloquearon con leche libre de grasa al 5 % en TBS-T (10 mM Tris, 10 mM NaCl y 0.1% de Tween-20) durante 2 horas a temperatura ambiente.

Finalizado este tiempo, las membranas se lavaron con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo primario anti-UCP2 en una dilución 1:400, o con anti-translocador de adenin nucleótidos (TAN), el cual se utilizó como control de carga en una dilución 1:1,000 durante toda la noche a 4°C (todos los anticuerpos se adquirieron en *Santa Cruz Biotechnology*).

Las membranas fueron lavadas con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-cabra conjugado con peroxidasa (*Santa Cruz Biotechnology*) en una dilución 1:5,000. Al finalizar este tiempo, las membranas fueron lavadas y se visualizaron las bandas por quimioluminiscencia utilizando un sistema de revelado (*Millipore*). Las membranas finalmente se expusieron a placas radiográficas *Kodak Biomax ML*. Finalmente las bandas en las placas radiográficas se analizaron con un escáner *Gel Doc (Bio-Rad)* y la cuantificación se hizo con el software *Image Quant (GE Healthcare)*.

### **Extracción de lípidos y análisis de ácidos grasos no esterificados**

Los ácidos grasos no esterificados fueron extraídos de mitocondrias y de homogenizado total de hígados de animales controles y con SM. La extracción se realizó con el método de Folch<sup>111</sup> y se llevó a cabo en 3 fases:

#### **I. Extracción.**

A 10 mg de proteína mitocondrial y 10 mg de proteína del hígado total se adicionaron 10 y 100 µg de ácido heptadecanoico (C:17) respectivamente, como

estándar interno. El volumen se ajustó a 1 ml con solución salina al 0.9% y se adicionaron 2 ml de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v) y 0.002% de BHT (Butil-hidroxi-tolueno, SIGMA); se agitó con vórtex durante 30 segundos. Las muestras se centrifugaron a 600 x g durante 5 minutos y se recuperó la fase orgánica (cloroformo); este paso de extracción se repitió dos veces. A la fase orgánica, se le adicionaron 200 µl de metanol para clarificar la muestra y sulfato de sodio anhidro para eliminar los residuos de agua. Las muestras fueron filtradas a través de algodón para eliminar el exceso de sulfato de sodio. Posteriormente se evaporó el metanol y cloroformo con gas nitrógeno de alta pureza. Todos los pasos, excepto la evaporación, se realizaron en hielo.

II. **Derivatización.** Al residuo lipídico se le adicionó 1 ml de metanol con 0.002% de BHT, 100 µl de 2, 4-dimetoxipropano (SIGMA) y 18 µmoles de ácido sulfúrico (SIGMA); se agitó con vórtex durante 30 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos, con agitación cada 5 minutos. Para detener la reacción, se colocaron las muestras en hielo y se agregó 1 ml de solución salina al 5%, 2 ml de hexano, se agitó con vórtex durante 30 segundos y las muestras se centrifugaron a 600 x g durante 2 minutos. Se recuperó la fase orgánica y se evaporó el hexano con gas nitrógeno de alta pureza a temperatura ambiente.

III. **Cromatografía de gases.** El residuo lipídico se disolvió en 100 µl de hexano, se agitó con vórtex y se analizaron 50 µl en un cromatógrafo de gases GC-2010 marca *Shimadzu* equipado con un detector de ionización por flama (FID) y una

columna SP2330 (30 m x 0.25 mm DI, Supelco). La temperatura del inyector y la columna fueron de 250°C y 195°C respectivamente, se utilizó gas helio como acarreador de la muestra a una presión de 2 kg/cm<sup>2</sup> y se detectó a través de la flama de H<sub>2</sub>. Los picos de cada ácido graso fueron identificados tomando en cuenta el tiempo de retención para cada uno y fueron cuantificados con un estándar interno calculando el área de la curva de éste.

### **Cuantificación de malondialdehído (MDA)**

El índice de lipoperoxidación para el plasma, el homogenado y la mitocondria fue determinado por la técnica convencional de TBARS (ácido tiobarbitúrico). Se tomaron 2 mg de proteína para todos los casos y se adicionaron 50 µl de metanol con 4% de BHT más 1 ml de una solución que contenía 150 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4 y se agitaron con vórtex durante 30 segundos.

Esta mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos en baño María y al finalizar se adicionó 1 ml de ácido acético al 20% a pH 2.5 más 1.5 ml de ácido tiobarbitúrico al 0.8% y se incubó en agua hirviendo durante una hora para la formación de TBARS. La reacción se detuvo colocando las muestras en hielo y se adicionó 1 ml de KCl al 5% y 5 ml de n-butanol (SIGMA); las muestras se agitaron con vórtex durante 30 segundos; finalmente, se centrifugaron a 600 x g durante 2 minutos a temperatura ambiente y se recuperó la fase orgánica.

Paralelamente se realizó una curva de calibración utilizando tetraetoxipropano como estándar<sup>112</sup>, el cual se convirtió en MDA con el tratamiento anteriormente mencionado.

La concentración de TBARS formado se determinó por la fluorescencia del reactivo a una longitud de onda de excitación 513 nm y 553 nm de emisión.

### **Carbonilación de proteínas**

Para la determinación de proteínas carboniladas se utilizó en ensayo del 2, 4 dinitrofenilhidrazina (2, 4-DNPH)<sup>113</sup>.

Se tomaron 5 mg de proteína mitocondrial y 5 mg de proteína total del homogenado de hígado y se llevaron a 400  $\mu$ l con solución fisiológica (NaCl 0.9%), se adicionaron 100  $\mu$ l de sulfato de estreptomicina al 10% para precipitar el DNA. Las muestras se agitaron con vórtex y se centrifugaron a 8000 x *g* durante 10 minutos.

Después de la centrifugación, se recuperó el sobrenadante y se le agregaron 500  $\mu$ l de ácido tricloroacético (TCA) al 20%, las muestras se agitaron con vórtex y se centrifugaron a 8000 x *g* durante 10 minutos. Se recuperó la pastilla resultante y se adicionaron 500  $\mu$ l de una solución 10 mM (en HCL 1N) del 2, 4-DNPH. Esta mezcla se incubó una hora a temperatura ambiente y se agitó con vórtex cada 15 minutos durante este tiempo.

Posteriormente se agregaron 500  $\mu$ l de TCA al 20% a las muestras, se agitaron en vórtex y se centrifugaron a 8000 x *g* durante 3 minutos. Se recuperó la pastilla resultante y se lavó 3 veces con 1 ml de una solución que contenía etanol/acetato

etílico (1:1 v/v) durante 10 minutos cada vez para eliminar el exceso de 2,4-DNPH. Las muestras se centrifugaron a 8000 x *g* durante 3 minutos y se recuperó la pastilla.

La proteína obtenida después del proceso anterior se desnaturalizó, agregando 1 ml de urea 6 M durante 15 minutos a 37°C. La muestra no solubilizada se eliminó por centrifugación a 8000 x *g* durante 3 minutos. Finalmente, la absorbancia del sobrenadante se determinó en un espectrofotómetro entre 360 y 390 nm.

La concentración de proteínas carboniladas se determinó utilizando el coeficiente de extinción del 2,4-DNPH que es  $2 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

### **Cuantificación de vitamina E y coenzima Q en mitocondrias aisladas**

La cuantificación de vitamina E y coenzima Q tanto para mitocondrias como para homogenado total de hígado se realizó por HPLC<sup>114</sup>.

La extracción de la vitamina E y la coenzima Q se realizó simultáneamente. Se tomaron 5 mg de proteína mitocondrial y se adicionaron 4 ml de metanol con 0.002% de BHT y se agitó con vórtex durante un minuto. Posteriormente se adicionaron 3 ml de éter de petróleo (-20°C) y se agitó con vórtex durante un minuto. Las muestras se centrifugaron a 600 x *g* durante 5 minutos y se recuperó la fase orgánica (éter de petróleo) que posteriormente fue evaporada con gas nitrógeno de alta pureza.

Los extractos se disolvieron en 1 ml de metanol-etanol (1:1 v/v) y se agitaron la muestras con vórtex suavemente durante 30 segundos y la muestra se filtró a través de una membrana de nylon y con poro de 0.22  $\mu\text{m}$ . Cincuenta microlitros de la muestra filtrada fue inyectada en un cromatógrafo de líquidos para su análisis.

La detección en el cromatógrafo se realizó utilizando una columna C18 de fase reversa *Nova-Pak®* de 3.9 x 150 mm x 5  $\mu$ m (*Waters*) acoplada a un detector electroquímico ajustado a +550 mV para la coenzima Q reducida y simultáneamente para la vitamina E. La fase móvil fue una solución que contenía 50 mM de acetato de sodio y 250 mM ácido acético, con un flujo de 1 ml/ min.

Para cuantificar la concentración de ubiquinol y vitamina E se realizó una curva estándar con concentraciones conocidas de ambos compuestos.

### **Cuantificación del contenido de glutatión**

Se tomaron 1 y 10 mg de proteína mitocondrial y de homogenado total de hígado respectivamente y se adicionó 1 ml de una solución que contenía 200 mM ácido metanosulfónico y 5 mM DETAPAC<sup>115</sup>. Esta mezcla se agitó con vórtex durante un minuto y se centrifugó a 8000 x g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó para su análisis por cromatografía de líquidos.

Quinientos  $\mu$ l de la muestra fueron diluidos 1:1 (v/v) con la fase móvil que contenía 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 0.05 mM ácido octanosulfónico pH 3.0 (ajustado con ácido fosfórico). El extracto fue filtrado a través de una membrana de PVDF con poro de 45  $\mu$ m y se inyectaron 50  $\mu$ l al HPLC. Para su análisis se utilizó una columna C18 de fase reversa *Nova-Pak®* de 3.9 x 150 mm x 5  $\mu$ m (*Waters*) acoplada a un detector electroquímico ajustado a +700 mV y con un flujo de 1 ml/min a 30°C.

La concentración del glutatión se estimó comparando el área de los picos de las muestras con el área del pico de concentraciones conocidas de glutatión comercial tomadas como estándar.

### **Detección de la actividad de la SOD en geles de poliacrilamida**

La detección de la MnSOD y Cu/ZnSOD en muestras de mitocondrias aisladas de hígado se realizó mediante geles nativos de poliacrilamida<sup>116</sup>.

Dos mg de proteína mitocondrial fueron separados por electroforesis en un gel de poliacrilamida (sin SDS) al 8% en una solución que contenía 25 mM Tris y 192 mM glicina a pH 8.3 y se corrió durante 3 horas a 120 V a 4°C.

Terminada la electroforesis, los geles se incubaron en una solución que contenía 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7.8 durante 10 minutos. Posteriormente se incubaron durante 15 minutos en la oscuridad en una solución que contenía 275  $\mu\text{g/ml}$  de azul de nitro-tetrazolio, 65  $\mu\text{g/ml}$  de rivo flavina y 0.25% de tetrametilenediamina (TEMED).

Después de este tiempo, el gel se expuso a la luz UV durante 15 minutos; en el transcurso se fue matizando de azul por la reacción entre el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  el azul de tetrazolio, mientras que las bandas en las que se encontró la SOD quedaron sin teñirse. La reacción se detuvo lavando varias veces los geles con agua destilada.

Las bandas sobre los geles se analizaron con un escáner *Gel Doc (Bio-Rad)* y la cuantificación fue hecho con el software *Image Quant (GE Healthcare)*. Los resultados se reportaron como porcentaje de pixeles.

## **Actividad de catalasa y glutatión peroxidasa**

La actividad de la catalasa se determinó utilizando 50  $\mu\text{g}$  de proteína del homogenado total de hígado y 50  $\mu\text{g}$  de proteína mitocondrial. Se midió el decaimiento exponencial del 10 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tomando en cuenta su coeficiente de extinción ( $\Delta\epsilon_{249} = 39.4 \text{ M/cm}$ ) en 50 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a pH 7.4. La lectura se realizó por espectrofotometría a una longitud de onda de 240 nm y la actividad fue expresada en nanomoles por minuto por miligramo de proteína.

Para determinar la actividad de la glutatión peroxidasa se tomaron 50  $\mu\text{g}$  de proteína mitocondrial y se resuspendieron en 1 ml de una solución que contenía 50 mM Tris-HCL, pH 7.6, 5 mM EDTA, 1 mM GSH, 0.22 mM NADPH y 0.4 U de glutatión reductasa. La reacción se inició adicionando tert-butil hidroperóxido en una concentración final de 0.22 mM. Durante la reacción se consumió el NADPH, lo cual fue monitoreado en un espectrofotómetro continuamente durante tres minutos a una longitud de onda de 340 nm.

Los resultados fueron expresados en nanomoles por minuto por miligramo de proteína mitocondrial.

## **Liberación y detección de Cyt c de mitocondrias de hígado**

Un mg de proteína mitocondrial se incubó en 2 ml de una solución que contenía 100 mM sacarosa, 75 mM, KCl, 5 mM Tris (pH7.4), 10  $\mu\text{M}$  EGTA y 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  durante 10 minutos a 37°C en agitación constante.

Después de este tiempo, las muestras se centrifugaron a 8000 x *g* durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante, el cual fue posteriormente analizado por cromatografía de líquidos.

Las muestras se filtraron a través de una membrana de PVDF con un poro de 0.45  $\mu\text{m}$  y se inyectaron 200  $\mu\text{l}$  al HPLC. Para su detección, se utilizó una columna DELTA PACK 5  $\mu\text{m}$  C4 (300Å) de *Waters*. El detector de absorbancia se ajustó a una longitud de onda de 393 nm y se utilizó como fase móvil una solución A que contenía H<sub>2</sub>O y 0.1% TFA (ácido trifloro acético) y una solución B que contenía acetonitrilo-A (80-20, v/v).

Para la cuantificación se utilizó un estándar comercial de Cyt c de corazón de bovino (SIGMA).

### **Análisis de Bax por *Western Blot***

La detección de Bax, se realizó en la proteína mitocondrial, en el homogenizado total del hígado y en el segundo sobrenadante recuperado durante la extracción mitocondrial utilizando 120  $\mu\text{g}$ , 60  $\mu\text{g}$  y 60  $\mu\text{g}$  de proteína respectivamente. Estos fueron separados por electroforesis en un PAGE-SDS al 12% a 120 V durante 3 horas en una solución que contenía 25 mM Tris, 192 mM glicina y 0.1% SDS, pH 8.3. A continuación, la proteína en los geles, se transfirió en una membrana de PVDF (*Immobilon-P, Millipore*) en una solución que contenía 25 mM Tris, 192 mM glicina y 10% de metanol a pH 8.5, durante 60 minutos a 350 mA. Posteriormente, las membranas se bloquearon con caseína al 0.1 % en PBS-T pH 7.6 (10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,

138 mM, NaCl, 2.7 mM KCl y 0.1% de Tween-20) durante dos horas a temperatura ambiente.

Finalizado este lapso, las membranas se lavaron con PBS-T y se incubaron con el anticuerpo primario anti-Bax (*Santa Cruz Biotechnology, C.A*) en una dilución 1:500, o con anti- $\beta$ -actina (*abcam®*) que se utilizó como control de carga en una dilución 1:5,000 durante toda la noche a 4°C.

Las membranas fueron lavadas con PBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-cabra conjugado con peroxidasa (*Santa Cruz Biotechnology, C.A*) en una dilución 1:5,000. Al finalizar este tiempo, las membranas fueron lavadas y se visualizaron las bandas mediante quimioluminiscencia utilizando un sistema de revelado (*Millipore*). Las membranas finalmente se expusieron a placas radiográficas *Kodak Biomax ML*.

Las bandas en las placas radiográficas se analizaron con un escáner *Gel Doc* (*Bio-Rad*) y la cuantificación se hizo con el software *Image Quant* (*GE Healthcare*).

### **Análisis estadístico**

Todos los valores están expresados como el media  $\pm$  error estándar (EE).

Las diferencias entre los grupos experimentales para las variables seleccionadas fueron calculadas utilizando un ANOVA de una vía. Las diferencias se consideraron significativas con una  $p < 0.05$ , valor calculado estadísticamente con el programa *SigmaPlot 11 Inc*.

## IX. RESULTADOS

### Características generales de los animales

Al finalizar el tratamiento, se observó que la ingesta de sacarosa al 30% indujo un aumento significativo ( $P<0.05$ ) en el peso corporal, en la grasa intra-abdominal, AGNEs, TGs plasmáticos y TGs del homogenado de hígado ( $P<0.01$ ), así como en las concentraciones de insulina ( $P<0.001$ ) de animales tratados en comparación con los animales controles. La glucosa plasmática no tuvo cambios significativos entre ambos grupos (Tabla 3).

Todos los cambios observados en los animales tratados con sacarosa son marcadores clínicos del síndrome metabólico.

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

Variabes	Controles	SM
Peso corporal (gr)	440 ± 29	526 ± 57*
Grasa intra-abdominal (gr)	2.9 ± 0.8	15.3 ± 5.2**
Triglicéridos plasmáticos (mM)	0.5 ± 0.1	1.2 ± 0.3**
Triglicéridos en hígado ( $\mu\text{mol/mg}$ )	65.5 ± 5.5	225.7 ± 30.6**
Glucosa plasmática (mM)	6.2 ± 0.1	5.6 ± 0.5
AGNES plasmáticos (mM)	0.67 ± 0.04	1.26 ± 0.08**
Insulina plasmática (pM)	106.8 ± 17.4	285.2 ± 53.5***

Los valores fueron expresados como la media  $\pm$  EE (n= 7 animales diferentes). Los triglicéridos en el hígado están expresados en  $\mu\text{mol/mg}$  de proteína del homogenado total. Los valores de todas las variables fueron obtenidas al final del período de tratamiento con sacarosa. \*\*\*Diferencia significativa del grupo control ( $P<0.001$ ); \*\* $P<0.001$ ; \* $P<0.05$ .

## Análisis de AGNEs en mitocondrias y homogenizado de hígado

Se analizó la concentración de 6 diferentes AGNEs tanto en mitocondrias como en el homogenado total de hígado de ambos grupos. La tabla IV muestra que en la mitocondria de hígados de animales SM se manifiesta un aumento significativo en las concentraciones del ácido palmítico, palmitoleico, oleico y una reducción significativa en las concentraciones del araquidónico en contraste con el grupo control. En el homogenizado total se encontró un aumento significativo en el ácido palmítico, palmitoleico y oleico.

La concentración total de AGNEs fue significativamente mayor tanto en mitocondrias como en homogenizado de hígado de animales SM en comparación con el grupo control.

**Tabla IV. Composición de AGNEs en mitocondrias y homogenizado de hígado**

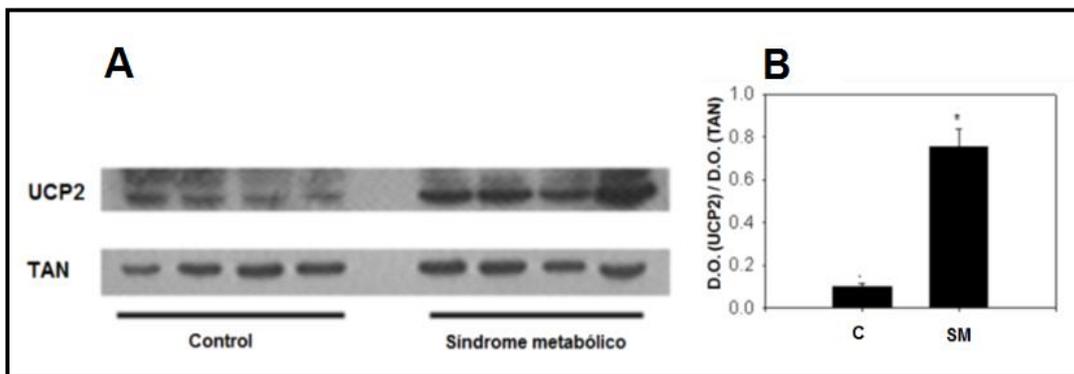
AGNES	Mitocondria		Homogenado de hígado	
	Control	SM	Control	SM
Palmítico (C16:0)	14.5 ± 0.7	21.8 ± 1.1**	29.8 ± 2.7	35.8 ± 3.1*
Palmitoleico (C16:1)	0.6 ± 0.5	3.2 ± 0.8***	1.6 ± 0.8	6.3 ± 1.1**
Estearico (C:18:0)	13.8 ± 0.8	11.7 ± 0.4	12.2 ± 1.9	13.3 ± 1.2
Oleico (C18:1)	3.4 ± 0.2	10.8 ± 0.7**	11.1 ± 1.8	32.1 ± 3.7***
Linoleico (C18:2)	6.7 ± 1.17	5.2 ± 1.1	14.3 ± 2.8	17.9 ± 2.2
Araquidónico (C20:4)	7.0 ± 1.1	4.9 ± 0.9*	10.2 ± 2.9	11.9 ± 1.9
<b>AGNEs totales</b>	<b>55.1 ± 2.7</b>	<b>62 ± 2.3*</b>	<b>78.5 ± 3.2</b>	<b>117.5 ± 3.8***</b>

Los datos son la media ± EE y representan las concentraciones en  $\mu\text{mol/mg}$  de proteína en el homogenado de hígado y en  $\text{nmol/mg}$  de proteína en mitocondrias (n= 7 animales diferentes). \*\*\* diferencias significativa.

## Contenido de la UCP2 en mitocondrias de hígado

Está bien establecido que los ácidos grasos insaturados y poli-insaturados como el ácido oleico y linoleico son reguladores positivos de la expresión y actividad de la UCPs. Utilizando anticuerpos específicos contra la UCP2, se detectaron los niveles de expresión de ésta proteína en mitocondrias de hígado de ambos grupos experimentales. Se utilizó el TAN como control de carga.

El ensayo por *Western Blot* (Figura 10A) mostró que existe un nivel basal de la UCP2 en mitocondrias de animales control; sin embargo el contenido fue significativamente mayor en las mitocondrias de hígado de animales SM. El aumento en la expresión de la UCP2 es significativo, tal como se muestra en la figura 10B, que muestra el cociente de los valores de D.O. de la UCP2 entre los valores de D.O. del TAN.



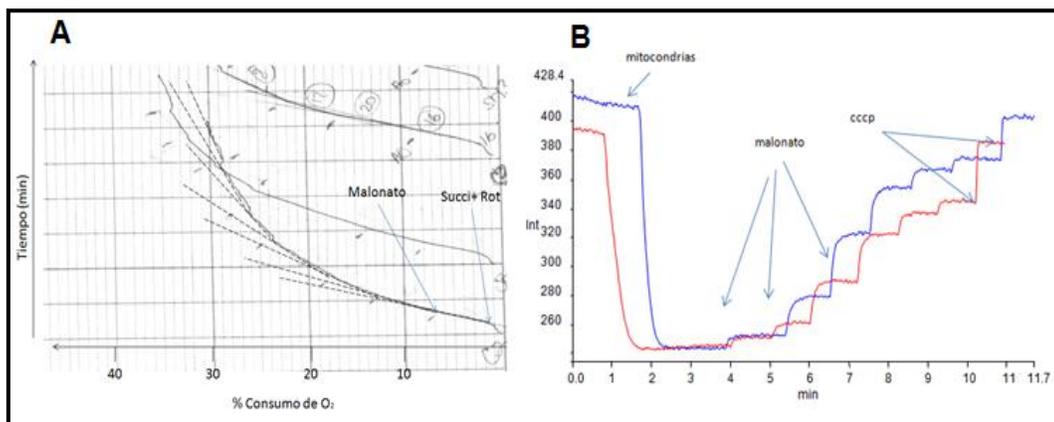
**Figura 10. Contenido de UCP2 en mitocondrias de hígado.** A. El *Western Blot* muestra un aumento en el contenido de la UCP2 en mitocondrias de animales SM. B. El análisis estadístico muestra que el aumento en el contenido de la UCP2 es significativamente mayor en las mitocondrias de animales SM respecto a los controles (\*  $p < 0.05$  C vs SM). Los valores presentan el media  $\pm$  EE de 4 animales diferentes.

## Efecto de la sobre-expresión de la UCP2 sobre la función mitocondrial

Las proteínas desacoplantes funcionan como translocadores de protones desde el espacio intermembranal hacia la matriz mitocondrial. Este mecanismo llamado “*proton leak*” o fuga de protones se determinó midiendo el consumo de oxígeno y el potencial transmembranal simultáneamente en mitocondrias aisladas de ambos grupos experimentales.

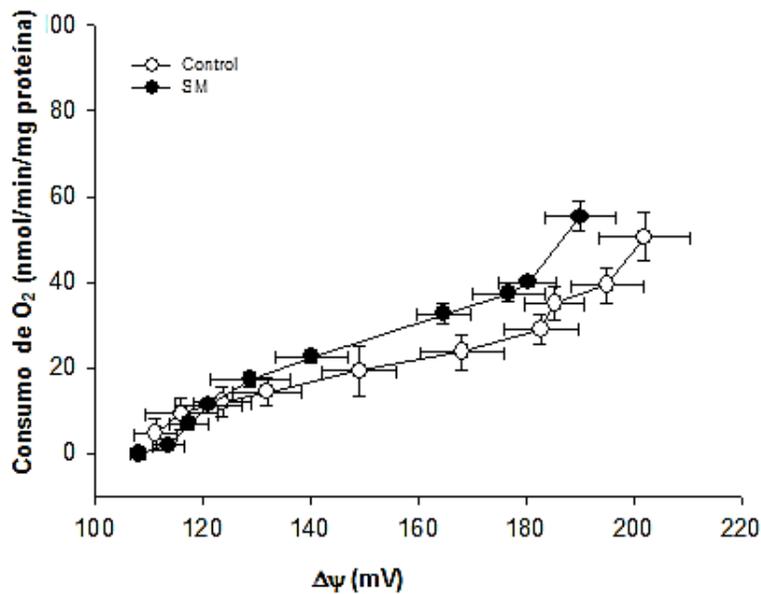
La figura 11A muestra un trazo representativo del experimento realizado para determinar el consumo de oxígeno por las mitocondrias en presencia de succinato y rotenona. La inhibición del complejo II por la adición de malonato se refleja en la disminución del consumo de oxígeno.

Por otra parte, en la figura 11B se observa el cambio de la fluorescencia. La disminución de la fluorescencia indica la entrada de la TMRM a la mitocondria como efecto de un cambio de cargas generado por el potencial transmembranal por la oxidación del succinato. La inhibición el complejo II aumenta la fluorescencia y disminuye el potencial transmembranal.



**Figura 11.** Trazos representativos del consumo de oxígeno (A) y del potencial transmembranal (B). Todos los experimentos se realizaron simultáneamente y en presencia de 5 mM succinato, 4  $\mu$ M rotenona, 2  $\mu$ M oligomicina y 80 ng/ml nigericina. (— control; — SM).

En la figura 12 se observa que las mitocondrias de hígado de animales SM presentan un aumento significativo en el consumo de oxígeno en comparación con los controles, generando el mismo  $\Delta\psi$  ( $P < 0.01$ ), lo cual indica que las mitocondrias de los primeros tienen un índice de respiración más alto que los controles y un potencial de membrana menor.

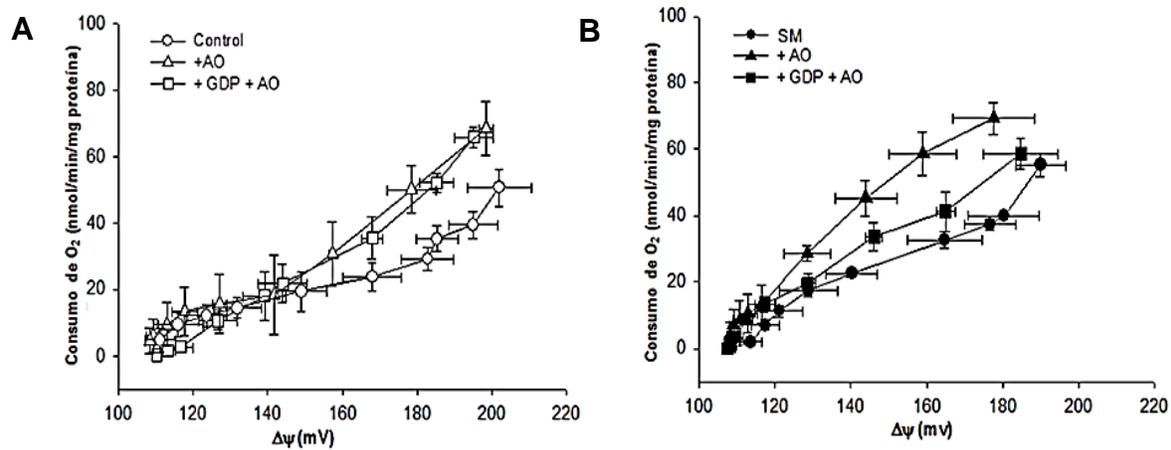


**Figura 12. Fuga de protones.** La gráfica muestra la relación entre el consumo de oxígeno y el potencial transmembranal ( $\Delta\psi$ ). Las mitocondrias de hígado de animales SM (●) tienen un aumento en el consumo de O<sub>2</sub> con respecto a los controles (○) a un mismo potencial. Los valores representan la media  $\pm$  EE de 5 diferentes experimentos de 6 animales diferentes.

Para evidenciar la participación de la UCP2 en la fuga de protones se realizaron experimentos en presencia de activadores e inhibidores fisiológicos de la proteína, tal como el ácido oleico (AO) y el GDP respectivamente.

La adición de 2.5  $\mu$ M de AO al medio de incubación indujo un aumento en el consumo de oxígeno y una disminución en el potencial transmembranal en mitocondrias de hígado de ambos grupos.

La figura B muestra que la fuga de protones inducida por el AO es significativamente mayor ( $P < 0.01$ ) en las mitocondrias de animales SM (figura 13B) con relación a los controles (figura 13A). La incubación con 0.5 mM de GDP (inhibidor fisiológico de la UCP2) en presencia de AO provocó una disminución del efecto desacoplante del ácido graso en mitocondrias de hígado de animales SM, no así en las controles (figura 13A y 13B).



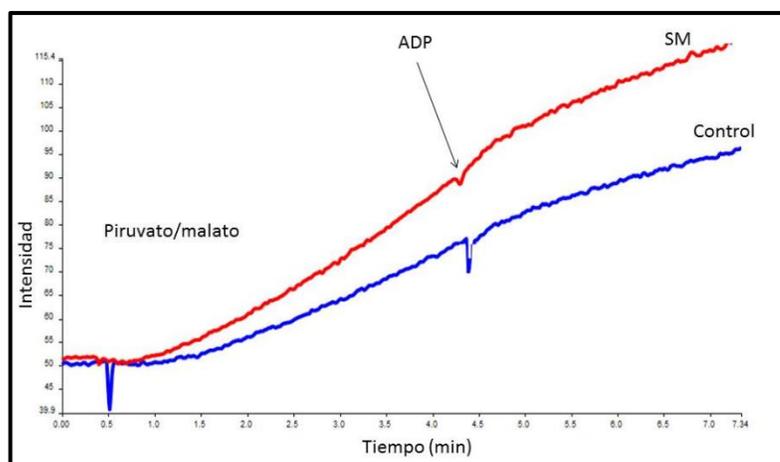
**Figura 13 A.** Efecto de ácido graso sobre el consumo de oxígeno y el  $\Delta\psi$  en mitocondrias control ( $\Delta$ ) y con SM ( $\blacktriangle$ ). **B.** Efecto de GDP sobre el efecto de desacoplamiento por AO en mitocondrias control ( $\square$ ) y con SM ( $\blacksquare$ ). Los valores representan la media  $\pm$  EE de 5 diferentes experimentos de 6 animales diferentes.

Estos resultados sugieren que el efecto del GDP sobre el acoplamiento y eficiencia en la mitocondria de los animales SM implica la participación de la UCP2.

## Generación de EROs por la CRM

Durante la oxidación de un sustrato, la CRM genera  $O_2^{\cdot -}$  que se convierte en  $H_2O_2$  por la MnSOD y la CuZnSOD en la matriz mitocondrial y en el espacio intermembranal respectivamente. El  $H_2O_2$ , fue detectado por la oxidación del DCF.

La figura 14 muestra un trazo representativo de los experimentos de generación de  $H_2O_2$  en tiempo real. El trazo muestra el cambio en la fluorescencia del DCF oxidado en función del tiempo. Después de aproximadamente 2 minutos, la fluorescencia del DCF en presencia de mitocondrias, peroxidasa y algunos inhibidores se estabiliza y la adición de sustratos oxidativos cambian la fluorescencia en función del tiempo. El cambio de la pendiente corresponde a la generación de  $H_2O_2$  por las mitocondrias.

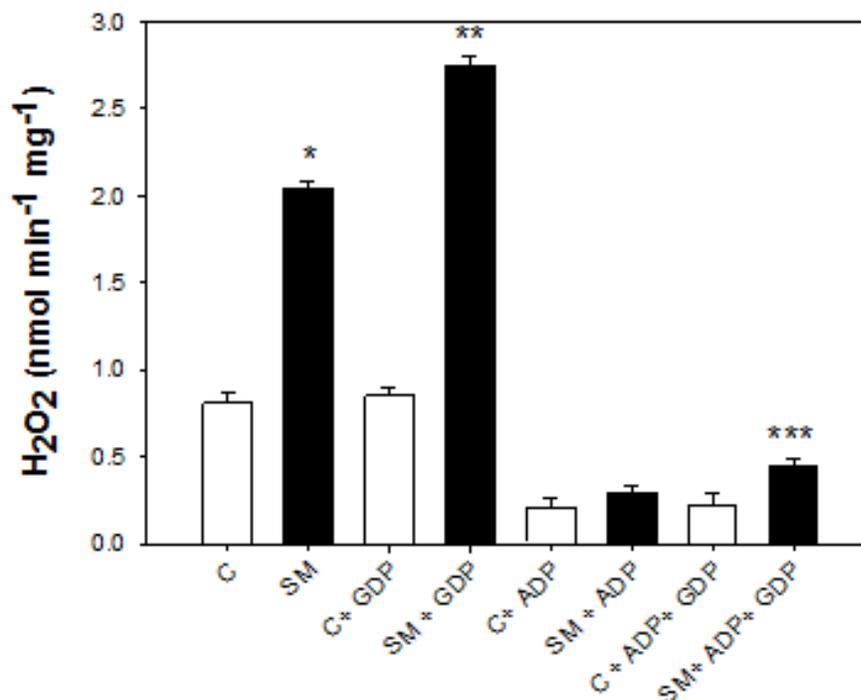


**Figura 14. Cambio de la fluorescencia del DCF.** La oxidación del DCF refleja la generación de  $H_2O_2$  por las mitocondrias aisladas de hígado cuando se adiciona un sustrato oxidativo.

Las mitocondrias de hígado de animales SM durante el estado 4 de la respiración (ausencia de ADP) y oxidando piruvato/malato, generan  $H_2O_2$  con significativamente mayor velocidad con respecto a los controles ( $2.04 \pm 0.05$  vs  $0.8 \pm 0.05$   $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína). Durante el estado 3 (presencia de ADP), la

generación de  $H_2O_2$  fue significativamente menor que en condiciones fosforilantes ( $0.29 \pm 0.07$  vs  $2.04 \pm 0.05$   $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína) además de no mostrar diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 15).

La incubación de las mitocondrias con 0.5 mM de GDP como inhibidor de la UCP2, resultó en un aumento significativo ( $P<0.01$ ) de la velocidad de generación de  $H_2O_2$  en mitocondrias de animales SM, en comparación con los controles. Esta diferencia significativa ( $P<0.01$ ) entre ambos grupos se mantuvo durante el estado III, aunque disminuyó respecto al estado IV.



**Figura.15. Velocidad de generación de  $H_2O_2$ .** Las barras muestran la generación de  $H_2O_2$  por las mitocondrias de hígado de animales control (C) y síndrome metabólico (SM), durante la oxidación de piruvato/malato en presencia y ausencia de ADP. Los asteriscos muestran las diferencias significativas obtenidas estadísticamente. \* $P<0.01$  C vs SM, \*\* $P<0.01$  SM+GDP vs SM y \*\*\*SM + GDP + ADP vs SM+ADP. Los valores representan la media  $\pm$  EE de 6 diferentes experimentos de 6 animales diferentes. (□) control, (■) SM.

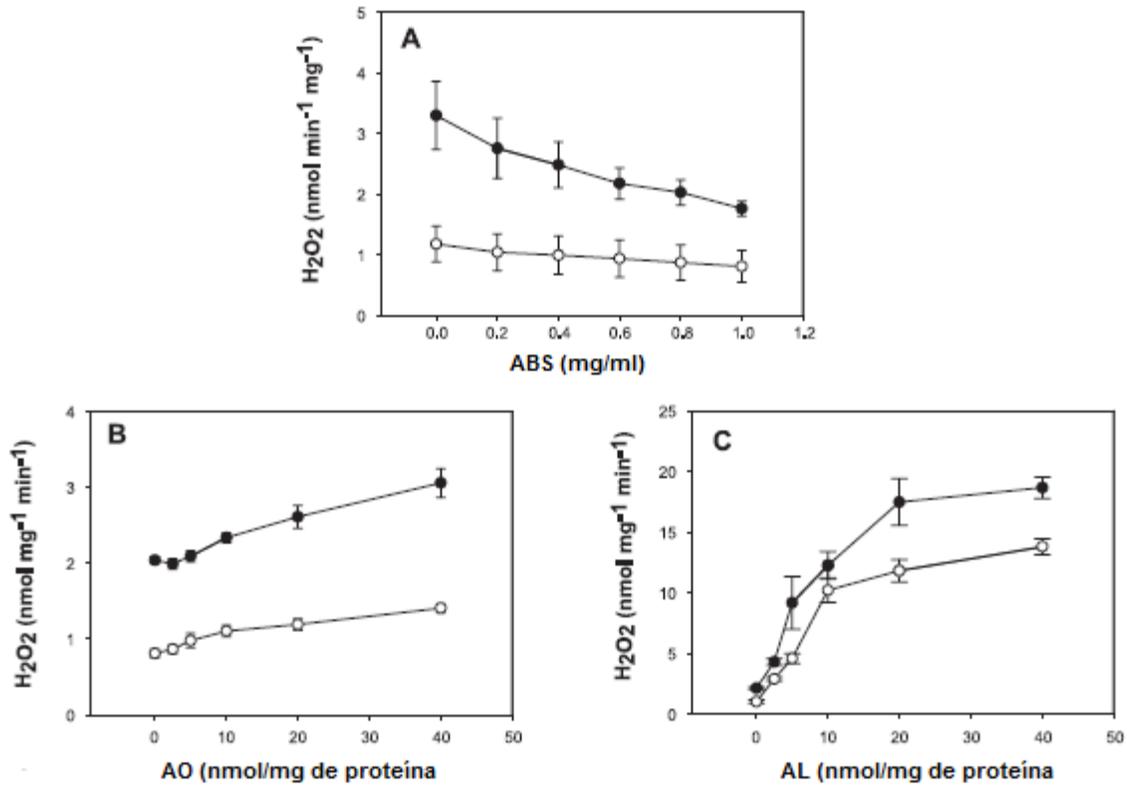
La adición de albúmina al medio de incubación disminuyó la velocidad de generación de  $H_2O_2$  (figura 16 A). Entre 0.2 y 0.4 mg/ml de ASB, la velocidad de

generación de  $H_2O_2$  disminuyó rápidamente en las mitocondrias de animales SM en comparación con los controles; en tanto la concentración de ASB fue aumentando, la velocidad de generación de  $H_2O_2$  disminuyó.

Estos resultados muestran cómo la ASB atrapa eficientemente a los ácidos grasos que intervienen en la generación de EROs durante el metabolismo mitocondrial. La ASB reduce eficientemente la generación de los mismos en las mitocondrias de animales SM; sin embargo, no es suficiente para reducirla a los niveles de las mitocondrias controles.

La adición de ácido oleico a bajas concentraciones (2.5 y 5 nmol/mg proteína) no afecta la generación de EROs de ambos grupos; no obstante, a concentraciones altas (10 a 40 nmol/ mg de proteína) el AO incrementa más la velocidad de generación de EROs en mitocondrias de animales con SM en contraste con los controles (Figura 16B). Estos resultados indican que las mitocondrias de animales SM son más sensibles al ácido graso en comparación a las mitocondrias controles.

La incubación de las mitocondrias con ácido linoleico (2-40 nmol/mg proteína) incrementó la velocidad de generación de  $H_2O_2$  tanto en mitocondrias de animales control como en SM. El AL a concentraciones  $\geq 30$  nmol/ mg de proteína no produjo cambios en los grupos, sin embargo, a concentraciones  $< 30$  nmol/ mg de proteína, ambas mitocondrias mostraron un aumento en la generación de  $H_2O_2$ , siendo significativamente mayor en las mitocondrias de animales SM en comparación con las del grupo control. (Figura 16C).



**Figura 16. Efecto de la ASB (A), el ácido oleico (B) y el ácido linoleico (C) sobre la generación de EROS.** La generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se realizó oxidando piruvato/malato (5 y 3 mM) en presencia de 4 μM rotenona, 2 μM oligomicina y 80 μg/ml nigericina. (○) controles y (●) SM. Los datos corresponden a la media ± EE de 6 diferentes animales.

### Actividad antioxidante en el hígado

El estrés oxidante se define como el aumento en la generación de EROs y una disminución en las defensas antioxidantes. La determinación de las actividades de enzimas antioxidantes así como algunas moléculas atrapadoras de radicales libres se realizaron en mitocondrias y en homogenado de hígado.

La tabla V muestra que la vitamina E, los niveles de CoQ<sub>9</sub> y CoQ<sub>10</sub> en su estado reducido fueron significativamente menores ( $P < 0.05$ ) en las mitocondrias SM respecto a los controles. En cuanto al glutatión reducido (GSH), su concentración

disminuyó ~60% en el homogenizado de hígado y de 28% en mitocondrias de animales SM ( $P<0.05$ ) en comparación con los controles.

La tabla V muestra también las actividades de la catalasa y la GPx. En mitocondrias aisladas no se observó diferencia en lo que se refiere a la actividad de estas enzimas entre mitocondrias controles y SM; sin embargo, en el homogenizado, solamente la actividad de la catalasa disminuyó significativamente ( $P<0.05$ ) en el SM.

**Tabla V. Actividades antioxidantes en el homogenizado y mitocondrias de hígado**

Variables	C	SM
<b>➤ Mitocondria</b>		
VitE (mmol/mg proteína)	0.92 ± 0.09	0.32 ± 0.028**
CoQ <sub>9red</sub> (nmol/mg proteína)	0.46 ± 0.05	0.38 ± 0.04*
CoQ <sub>10red</sub> (nmol/mg proteína)	0.13 ± 0.01	0.09 ± 0.02*
GSH (nmol/mg proteína)	2.5 ± 0.18	1.8 ± 0.02*
Catalasa (nmol/min/mg proteína)	350 ± 50	285 ± 35
GPx (nmol/min/mg proteína)	69 ± 8	57 ± 9
<b>➤ Homogenado de hígado</b>		
GSH (nmol/mg proteína)	45.5 ± 8.53	17.5 ± 4.56**
Catalasa (nmol/min/mg proteína)	477 ± 26	389 ± 29*
GPx (nmol/min/mg proteína)	56 ± 6	46 ± 5

Los valores fueron expresados como la media ± EE (n=6 animales diferentes). Los valores de todas las variables fueron obtenidos al final del período de tratamiento. Las actividades de la catalasa y la GPx fueron determinadas tanto en mitocondrias como en homogenizado total de hígado.

## Marcadores de estrés oxidante

El estrés oxidante fue evaluado con el método de TBARS (formación de MDA). Se observó que el índice de lipoperoxidación es significativamente más alto en plasma ( $P<0.05$ ) y homogenizado de hígado ( $P<0.01$ ) de animales SM en comparación con los controles, mientras que en las mitocondrias no se encontró diferencia en la concentración de TBARS entre ambos grupos experimentales (Tabla VI).

Las modificaciones de las proteínas por carbonilación también se consideran como índice de estrés oxidante. Los niveles de carbonilos en proteínas fueron significativamente más altos ( $P<0.05$ ) en el homogenado de hígado de animales SM en comparación con los controles. Sin embargo, a nivel mitocondrial no se observan cambios significativos entre ambos grupos (tabla VI).

**Tabla VI. Marcadores de estrés oxidante en mitocondrias y homogenado**

Variables	Control	SM
<b>➤ TBARS (nmol/mg proteína)</b>		
Homogenado de hígado	12.4 ± 2.2	23.0 ± 1.2 **
Mitocondria	0.12 ± 0.5	0.15 ± 0.03
Plasma (μM)	3.8 ± 0.5	7.1 ± 1.3*
<b>➤ Carbonilos en proteínas (nmol/mg proteína)</b>		
Homogenado de hígado	0.64 ± 0.05	0.82 ± 0.05*
Mitocondria	1.5 ± 0.086	1.63 ± 0.13

Los valores fueron expresados como la media ± EE (n= 6 animales diferentes). TBARS, substancia reactiva-ácido tiobarbitúrico. Los valores de todas las variables fueron obtenidas al final del período de tratamiento. \*\* Diferencia significativa  $p< 0.01$ ; \*  $p< 0.05$ .

## Función mitocondrial

El control respiratorio indica el estado funcional de las mitocondrias aisladas; es representado por el cociente del consumo de oxígeno durante el estado III/estado IV.

La tabla VII muestra que no se encuentran diferencias significativas en el control respiratorio entre ambos grupos experimentales. Sin embargo, tanto el estado III como el estado IV de la respiración mitocondrial son significativamente más altos ( $P < 0.05$ ) en las mitocondrias de animales SM que en los controles.

**Tabla VII. Consumo de oxígeno y actividad enzimática de los complejos respiratorios.**

	Controles	SM
CR	7.2 ± 0.5	7.4 ± 1.06
Estado III	110.9 ± 9.2	133.4 ± 9.2*
Estado IV	15.3 ± 0.7	19.7 ± 2.7*
NADH-DH (CI)	619 ± 36.4	683.5 ± 64.9
SDH (CII)	22.6 ± 1.5	32.9 ± 4.5*
SCCR (CIII)	38.5 ± 3.14	40.7 ± 4.8
COX (CIV)	297.5 ± 29.4	330.2 ± 29.15

Los valores están expresados como la media ± EE (n= 6 animales diferentes). CR, control respiratorio; NADH-DH (CI), NADH-deshidrogenasa (complejo I), SDH (CII), succinato deshidrogenasa (complejo II); SCCR (CIII), succinato-citocromo c oxidoreductasa (complejo III); COX (CIV), citocromo c oxidasa (complejo IV). El índice del consumo de oxígeno fue expresado como  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$ , y esto fue realizado en presencia de 5 mM de succinato + rotenona. CR corresponde al cociente del estado III entre el estado IV. La actividad de los complejos enzimáticos fueron expresados como  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$ . \* $p < 0.05$ , control vs SM. El estado IV de la respiración está definido como el consumo de oxígeno por la mitocondria aislada oxidando un sustrato particular en ausencia de ADP o algún veneno o inhibidor metabólico. El estado III de la respiración es definido como la respiración estimulada con ADP.

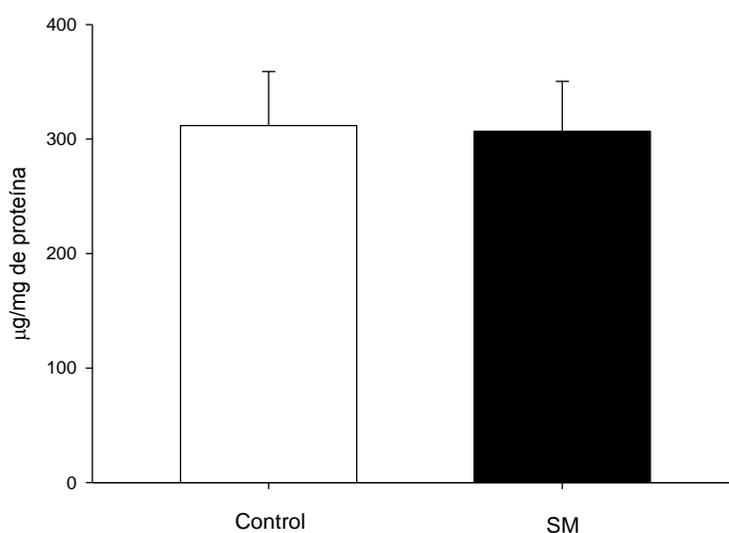
Al determinar la actividad enzimática de los complejos mitocondriales no se encontró diferencia significativa entre ambos grupos, excepto en la actividad del

complejo II, que resultó significativamente mayor en las mitocondrias de hígado de animales SM.

### **Efecto del SM sobre el contenido de Cyt c en mitocondrias de hígado**

El Cyt c es un componente de gran importancia en la cadena respiratoria mitocondrial y también tiene un papel primordial en la iniciación del proceso apoptótico. La cuantificación de la concentración total de Cyt c por miligramo de proteína mitocondrial se realizó congelando y descongelando las mitocondrias 3 veces.

La figura 17 no muestra diferencia significativa en el contenido de la proteína entre ambos grupos experimentales. La concentración de Cyt c para las mitocondrias de hígado control fue de  $311.77 \pm 19.27 \mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína, mientras que para las mitocondrias SM fue de  $306.8 \pm 43.51 \mu\text{g}/\text{mg}$ .



**Figura 17. Contenido de Cyt c en mitocondrias de hígado.** El contenido total de Cyt c presente en ambas mitocondrias por miligramo de proteína se obtuvo después de congelar

y descongelar el extracto en nitrógeno líquido y posteriormente centrifugar las muestras para recuperar el sobrenadante. La cuantificación del Cyt c en el sobrenadante obtenido se determinó por HPLC y no mostro diferencia significativa entre ambas mitocondrias. (□) control, (■) SM.

## **Libración de Cyt c de la mitocondria**

Aunque el contenido de Cyt c no difiere entre ambas mitocondrias, el estrés oxidante puede influir sobre el mecanismo de liberación desde el espacio intermembranal hacia el citosol de la célula. Además, las EROs generadas por los complejos respiratorios I y III, están implicadas en el mecanismo de liberación del Cyt c.

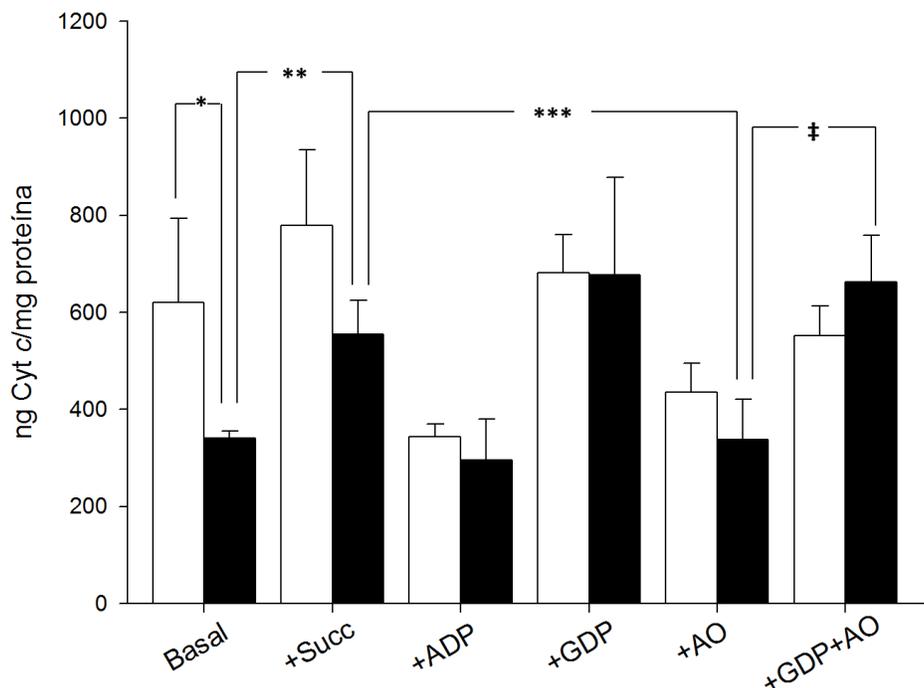
Por lo tanto, la evaluación de la liberación del Cyt c se realizó en las mismas condiciones de generación de EROs por mitocondrias aisladas de ambos grupos experimentales. Los experimentos se realizaron en presencia de succinato (transporte de electrones en reversa) y en presencia de piruvato/malato (transporte de electrones directo).

Se ha descrito que la generación de EROs durante la oxidación de succinato en mitocondrias controles es mayor que en condiciones de oxidación de piruvato/malato<sup>45</sup>. Este aumento en las EROs podría contribuir a la liberación del Cyt c, por lo que los experimentos se realizaron en presencia de succinato.

La gráfica 18 muestra que la liberación basal (sin sustrato) en las mitocondrias de hígado de animales con SM es significativamente menor ( $P < 0.01$ ) en relación a las del grupo control. En presencia de succinato, la concentración de Cyt c liberado

es significativamente mayor en comparación con la basal, solo en mitocondrias SM ( $P<0.01$ ).

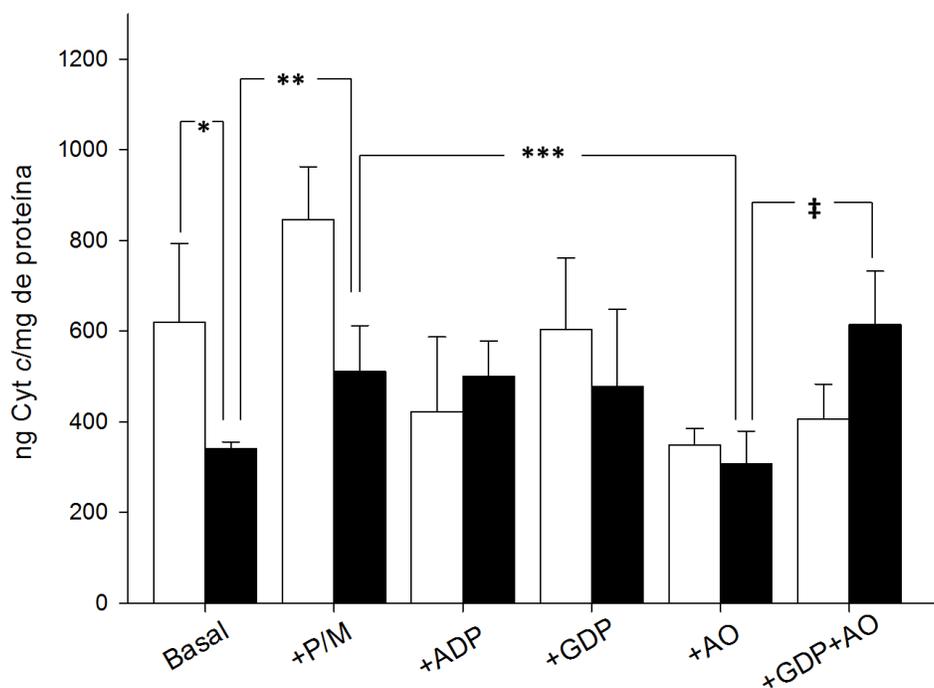
La incubación con ADP reduce significativamente ( $P<0.01$ ) la liberación de Cyt c en las mitocondrias de ambos grupos. La adición de AO a  $40 \mu\text{M}$  en presencia de succinato reduce la liberación de Cyt en ambos grupos, sin embargo la adición de AO más GDP como inhibidor de la UCP2 aumenta significativamente ( $P<0.01$ ) la liberación de Cyt c en el SM mientras en las mitocondrias controles el aumento no alcanza diferencia significativa en comparación con el AO sin GDP (Figura 18).



**Figura 18. Liberación de Cyt c en mitocondrias de hígado en presencia de succinato.** Se utilizaron, 5 mM succinato,  $250 \mu\text{M}$  ADP, 0.5 mM GDP como inhibidor de la UCP2 y  $40 \mu\text{M}$  de AO. Los asteriscos muestran las diferencias significativas obtenidas estadísticamente. \* $P<0.01$   $C_{\text{basal}}$  vs  $SM_{\text{basal}}$ , \*\*  $SM_{\text{basal}}$  vs  $SM+\text{succ}$ , \*\*\* $SM+\text{succ}$  vs  $SM+\text{AO}$ , ‡ $SM+\text{AO}$  vs  $SM+\text{GDP}$ . Los valores están expresados como la media  $\pm$  EE ( $n=6$  animales diferentes). (□) Control, (■) SM.

La figura 19 muestra que la liberación basal (sin sustrato) en las mitocondrias de hígado de animales SM es significativamente menor ( $P<0.01$ ) respecto a las

controles. La adición de piruvato/malato induce un aumento significativo ( $P<0.01$ ) en la liberación de Cyt c en ambos grupos, sin embargo se mantuvo la diferencia entre ambos grupos. La adición de ADP induce una disminución significativa en la liberación de Cyt c ( $P<0.01$ ) en mitocondrias controles, mientras que a las mitocondrias SM no muestran cambio. La incubación con  $40 \mu\text{M}$  de AO induce una disminución significativa en la liberación de Cyt c en ambas mitocondrias, mientras que la incubación con AO más GDP como inhibidor de la UCP2 aumenta significativamente ( $P<0.01$ ) la liberación solo en las mitocondrias SM y no en las controles (Figura 19).

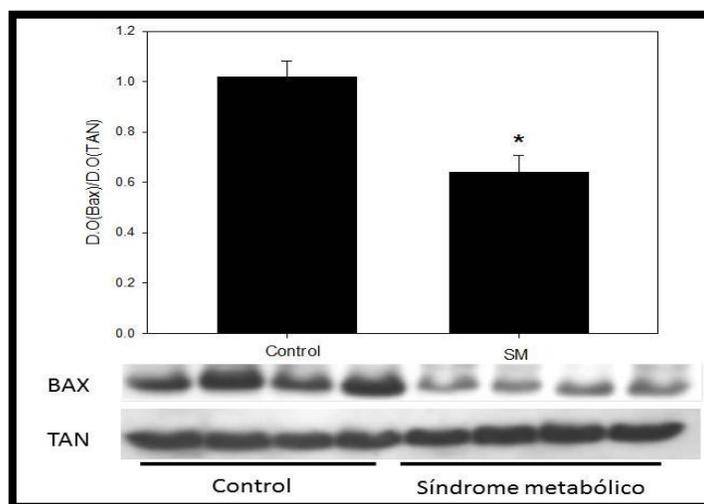


**Figura 19. Liberación de Cyt c de mitocondrias de hígado en presencia de piruvato-malato.** Se utilizó ADP ( $250 \mu\text{M}$ ), GDP ( $0.5 \text{ mM}$ ) como inhibidor de la UCP2 y AO ( $40 \mu\text{M}$ ). Los asteriscos muestran las diferencias significativas obtenidas estadísticamente. \* $P<0.01$   $C_{\text{basal}}$  vs  $SM_{\text{basal}}$ ; \*\* $SM+SM+P/M$ ; \*\*\* $SM+P/M$  vs  $SM+AO$ ; ‡ $SM+AO$  vs  $SM+GDP$ . Los valores están expresados como la media  $\pm$  EE ( $n=6$  animales diferentes). (□) Control, (■) SM.

## Efecto del SM sobre el contenido de Bax

Uno de los mecanismos involucrado en la liberación de Cyt c hacia el espacio citosólico es la inserción de Bax en la membrana mitocondrial externa. La inserción de Bax con Bak forman un poro en la membrana por lo cual el Cyt c sale de la mitocondria hacia el citosol.

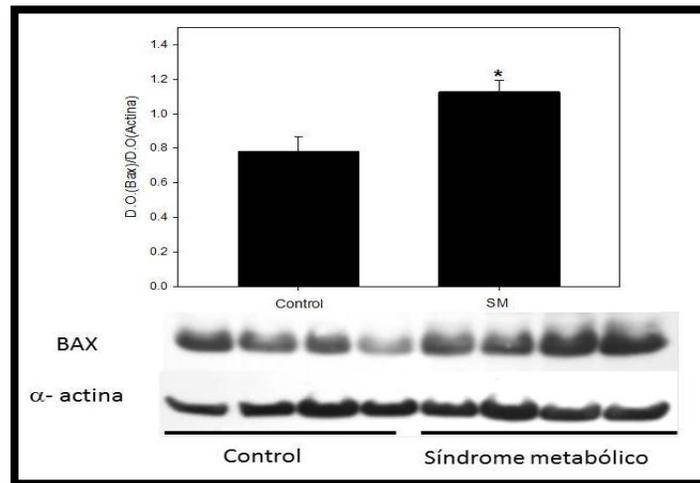
El análisis por *Western blot* para la determinación del contenido de Bax en la mitocondrias utilizando anticuerpo anti-Bax muestra que existe una disminución significativa en la D.O. de las bandas correspondientes a Bax en la mitocondria con SM (Figura 20) en comparación con los controles.



**Figura 20. Contenido de Bax en mitocondrias de hígado.** La figura muestra que existe una disminución significativa de la proteína en las mitocondrias de hígados de animales SM con respecto a los controles. El translocador de adenín nucleótidos (TAN) se utilizó como control de carga. Los valores están expresados como la media  $\pm$  EE (n= 4 animales diferentes)

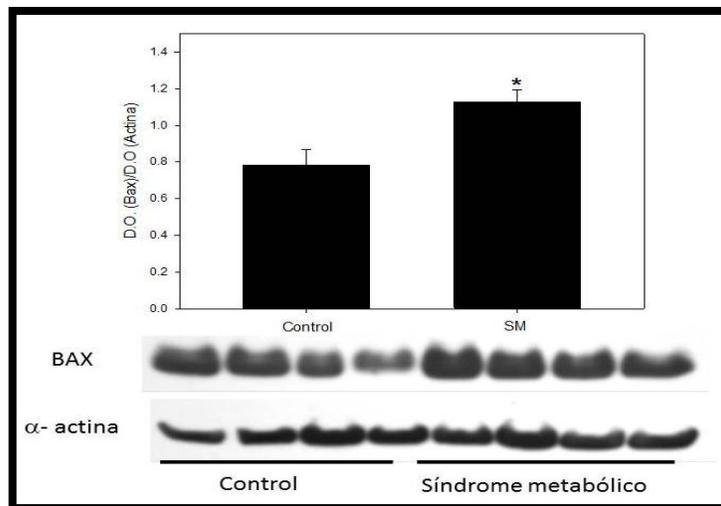
Asímismo, se determinó el contenido de Bax en el sobrenadante que resulta de centrifugar el homogenizado total para la obtención de la fracción mitocondrial. La figura 21 muestra que Bax aparece en mayor cantidad en el sobrenadante de las

mitocondrias de hígado de animales con SM comparado con los controles. Estos resultados son consistentes con lo que se obtuvo en cuanto al contenido de Bax en la mitocondria, sugiriendo que el contenido de Bax que se inserta en la mitocondria es menor en los animales con SM en comparación con los controles.



**Figura 21. Contenido de Bax en el sobrenadante.** La figura muestra el aumento significativo en el contenido de Bax en el sobrenadante de hígados de animales SM. Este sobrenadante, se recuperó al aislar las mitocondrias y corresponde a la cantidad de Bax que se no está insertada a la membrana externa mitocondrial. La identificación de  $\alpha$ -actina se utilizó como control de carga en el experimento. Los valores están expresados como la media  $\pm$  EE (n= 4 animales diferentes)

En cuanto al análisis de Bax por *Western blot*, la figura 22 muestra que en el homogenizado total de hígado de animales SM hay aumento significativo de Bax en comparación con los controles.



**Figura 22. Contenido de Bax en el homogenizado total de hígado.** El Western Blot muestra que el contenido de Bax en el homogenizado de hígado de animales SM es significativamente mayor con respecto a los controles. Como control de carga se utilizó el anticuerpo contra  $\alpha$ -actina. Los valores están expresados como la media  $\pm$  EE (n= 4 animales diferentes)

## X. DISCUSIÓN

El síndrome metabólico inducido en los animales por la dieta alta en sacarosa está asociado con un aumento en los niveles de AGNEs y TGs tanto en plasma como en el hígado completo<sup>117</sup>. Esta acumulación de TGs y de AGNEs en el hígado resulta de una mayor movilización de los AGNEs desde el tejido adiposo o resulta de la biosíntesis de *novo* debido a la alta actividad glucolítica en el hígado o a la resistencia a la insulina que se refleja en la acumulación de grasa intra-abdominal<sup>105</sup>. Los AGNEs y TGs acumulados en el hígado juegan un papel central en el desarrollo de hígado graso no alcohólico en el modelo<sup>118, 119</sup>.

Si bien es cierto que la glucosa no muestra cambios significativos en las concentraciones de glucosa plasmática, aun cuando existe un estado de hiperinsulinemia. Sin embargo, experimentos previos de nuestro grupo de trabajo demostró que mediante la técnica del clamp o “pinza hiperinsulinémica-euglicémica”, la cual consiste en una infusión de glucosa e insulina a concentraciones altas para determinar la velocidad con la que la glucosa es internalizada a los tejidos blanco en respuesta a las altas concentraciones de insulina.

Los resultados mostraron que las ratas con SM internalizaban menores concentraciones de glucosa por minuto con respecto a las ratas controles, por lo que estos resultados muestran que aun cuando no se reflejan cambios a nivel plasmático en las concentraciones de glucosa, los tejidos blanco muestran una disminución en la capacidad de internalizar la glucosa debido a un estado de RI<sup>120</sup>.

## **AGNEs y generación de EROs en mitocondrias**

Se ha demostrado que tanto los AGNEs como los TGs son capaces de inducir un aumento en las EROs y provocar daño celular<sup>121</sup>. El incremento de proteínas carboniladas y lípidos peroxidados que se observó en el homogeneizado de hígado de los animales SM puede atribuirse a un mecanismo que involucra el aumento de los AGNEs, tales como el ácido palmítico y el ácido oleico. Se ha reportado que el ácido palmítico induce resistencia a la insulina en el hígado, estimulando la producción de EROs<sup>122</sup>.

El aumento en la disponibilidad de los AGNEs y TGs como sustratos oxidativos convierte a la mitocondria en una fuente importante de EROs que puede contribuir al estrés oxidante observado en el hígado de animales SM. Los AGNEs pueden inducir la generación de EROs a nivel mitocondrial inhibiendo los complejos I y III de la CRM<sup>46</sup> o alimentando la  $\beta$ -oxidación y transfiriendo los electrones no solo a través de los complejos respiratorios sino mediante la flavoproteína transportadora de electrones, que transfiere los electrones directamente al complejo III, aumentando las probabilidades de formación de  $O_2^{\cdot-}$  a nivel del ciclo Q<sup>57</sup>.

Las mitocondrias de hígados de animales SM generan EROs con una velocidad mayor que las mitocondrias controles cuando se utiliza piruvato/malato como sustrato oxidativo, es decir, cuando se lleva a cabo el transporte directo de electrones. La diferencia en la velocidad de generación de EROs entre ambos grupos puede deberse a la acumulación de AGNEs en las mitocondrias de hígado de animales SM. Así se comprobó con la adición de ASB que se une a los AGNEs y reduce la capacidad de estos para generar EROs en las mitocondrias de animales SM.

Es importante precisar que la adición de ASB se aplicó solo durante la extracción de las mitocondrias, pero no se llevó a cabo durante los ensayos para determinar el metabolismo mitocondrial, ya que la adición del ASB a las mitocondrias aisladas puede ocultar la participación de los ácidos grasos como moléculas clave en el desarrollo de estados patológicos, tal como se ha observado en mitocondrias aisladas de hígado isquémico<sup>123, 124</sup>

El incremento en la sensibilidad a ASB de las mitocondrias de hígado de animales SM indica la presencia de concentraciones más altas de AGNEs respecto a los controles. Estos resultados concuerdan con el aumento en los ácidos palmítico, palmitoleico y oleico en las mitocondrias de animales SM. Así pues, la velocidad de generación de EROs determinados *in vitro* puede ser producto de la diferencia en la acumulación de AGNEs en las mitocondrias de ambos grupos experimentales.

Los AGNEs incrementan la generación de EROs durante el transporte de electrones directo, es decir, en presencia de sustratos como piruvato y malato<sup>46</sup>. En los experimentos realizados en este trabajo, la concentración mínima requerida de ácido oleico para generar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por las mitocondrias de animales SM fue de ~10 nmol/mg de proteína, mientras que la concentración de ácido linoleico para generar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue mucho menor que la del ácido oleico (~2 nmol/mg de proteína). La sensibilidad de ambas mitocondrias al ácido linoleico para generar EROs fue significativamente mayor respecto al ácido oleico.

La diferencia en la sensibilidad a estos dos ácidos grasos puede explicarse por la posición y número de dobles ligaduras presentes en las cadenas de carbono de cada ácido graso. El mecanismo por el cual las dobles ligaduras y la posición de

éstas pueden contribuir a la generación de EROs por la mitocondria aún no se ha establecido.

Una explicación sería la interacción de estos ácidos grasos con los complejos respiratorios, dada la solubilidad de cada uno de ellos que depende del número de carbonos y de dobles ligaduras. Se ha reportado que existe una pequeña diferencia entre la afinidad de unión para el ácido oleico y linoleico a la proteína de unión a ácidos grasos (FABP por sus siglas en inglés) del hígado de rata, la cual depende de los sitios de unión del ácido graso a la proteína<sup>125</sup>. La diferencia en la solubilidad acuosa de los ácidos grasos dependiente de las cadenas insaturadas juega un papel importante en la diferencia que existe en la capacidad del ácido oleico y el ácido linoleico para generar EROs a nivel mitocondrial en el hígado de animales SM. Existen otros estudios cuyos resultados reportan que los ácidos grasos insaturados como el ácido araquidónico, estimulan la generación de EROs en mitocondrias de hígado y corazón con más eficacia que el ácido oleico y palmítico<sup>48</sup>.

### **UCP2 y estrés oxidante en las mitocondrias**

Las mitocondrias de hígado de animales SM que generan EROs con mayor velocidad también muestran un aumento en la expresión de la UCP2. La función específica de esta proteína es poco clara, sin embargo, existe evidencia de su participación en la disminución de EROs producidos por la mitocondria en distintos tipos celulares como músculo, hígado y células neuronales<sup>72, 104, 126</sup> y de la asociación de su expresión con la acumulación de AGNEs<sup>127</sup>. En este trabajo se mostró que la

inhibición de la UCP2 por GDP aumenta la velocidad de generación de EROs por las mitocondrias SM en el estado III como en el estado VI oxidando piruvato/malato, lo que sugiere que la expresión de la UCP2 protege contra la generación de EROs reduciendo el estrés oxidante en la mitocondria.

El transporte de protones que se realiza a través de la UCP2 permite que se acelere el transporte de electrones y se lleve a cabo un desacoplamiento que reduce la generación de EROs.

### **UCP2 y función mitocondrial**

La fuga de protones que se observó en las mitocondrias de hígado SM es sensible a GDP y al ácido oleico respecto a las mitocondrias controles y se atribuye a la sobre-expresión de la UCP2 y al incremento de los AGNEs en estas mitocondrias. Este desacoplamiento se reflejó en el incremento del estado III y IV de la respiración; no obstante, esto no se manifestó en el control respiratorio (CR).

El que no se registre diferencia en el CR indica que las mitocondrias de hígado de animales SM que presentan un aumento en la expresión de la UCP2 y un alto índice de consumo de oxígeno en ambos estados III y IV, están bien acopladas a la fosforilación del ADP para la formación de ATP, tal como las mitocondrias controles.

Este fenómeno ya se ha observado en mitocondrias de otros tejidos como el corazón, donde la sobre-expresión de la UCP3 (2-4 veces) no está asociada al colapso del potencial por lo que la respiración y la expresión de las UCPs no están totalmente interconectadas<sup>128</sup>. Además, las actividades de los complejos respiratorios

I y III de mitocondrias de hígado de animales SM no muestran cambios respecto a los controles. Se ha reportado que una alteración en los complejos respiratorios, sobre todo del I y III, desencadena un aumento en la formación de EROs y un estado de estrés oxidante<sup>129</sup>.

En distintas patologías como la diabetes tipo 2 las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas se ha observado que la inactivación o alteración en el funcionamiento de los complejos respiratorios (complejo I y III) participan en la generación de EROs<sup>130</sup>. Estos resultados sugieren que la sobre-expresión de la UCP2 en mitocondria de hígado con SM es un proceso adaptativo de protección contra un estado de estrés oxidante sin afectar la función principal de la mitocondria que es la síntesis de ATP. Hay que agregar que esta observación es consistente con una asociación entre la acumulación de AGNEs y el incremento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en mitocondrias de hígado de animales SM.

### **Generación de EROs y sistema antioxidante mitocondrial**

El aumento en la velocidad de generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en mitocondrias SM puede explicarse por incremento en la actividad de la Cu/ZnSOD que se encuentra en el espacio intermembranal. Este incremento en la actividad de la Cu/ZnSOD puede ser una respuesta antioxidante para prevenir la acumulación del daño oxidativo en la mitocondria de hígado SM. Sin embargo, se ha reportado que el aumento en la actividad de la Cu/ZnSOD, paradójicamente, induce el aumento del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a nivel del espacio intermembranal en mitocondrias de hígado<sup>131</sup>. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se neutraliza por

medio de la actividad de catalasa y la GPx que no fueron modificados por el SM en las mitocondrias de hígado de los animales.

Las actividades intactas de la MnSOD, la GPx y la catalasa en mitocondrias controles y SM sugieren que las defensas antioxidantes en las mitocondrias SM fueron capaces de prevenir la acumulación de EROs como el  $H_2O_2$  y generación de daños a macromoléculas, tal y como se mostró al evaluar los niveles de ácidos grasos peroxidados y proteínas carboniladas, los cuales no tuvieron cambios en ninguno de los grupos experimentales a nivel mitocondrial.

### **Estado redox de la mitocondria y el homogenado de hígado**

El exceso de  $H_2O_2$  puede alterar el estado redox del hígado completo, lo que se ve reflejado en la disminución del GSH<sup>132</sup>. Nuestros resultados muestran que el contenido de GSH (glutati3n reducido) en el homogenado de hígado de animales SM es ~60% menor que en los controles y solo se reduce ~28% a nivel mitocondrial. La disminuci3n del contenido de glutati3n en su forma reducida es un indicador de la alteraci3n en el estatus redox del hígado de animales SM.

El aumento en la actividad de la Cu/ZnSOD y la disminuci3n de la catalasa en el homogenado de hígado contribuyen tambi3n a la acumulaci3n de  $H_2O_2$ . El  $H_2O_2$  en el citoplasma puede interaccionar con metales como el fierro y mediante la reacci3n de Fenton producir radical hidroxil ( $OH^\bullet$ ), lo cual explica los altos índices de MDA como producto final de la lipoperoxidaci3n y del aumento de prote3nas carboniladas, encontrados en homogenizado total de hígado SM.

De igual forma, la disminución de CoQ<sub>10</sub>, vitamina E y GSH puede contribuir al incremento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y al estado de estrés oxidante en el homogenizado de hígado de animales con SM. Cabe mencionar que tanto el GSH, la vitamina E y la CoQ<sub>10</sub> intracelular son las primeras defensas antioxidantes que contrarrestan la presencia o acumulación de EROs en la célula, por lo que la reducción de su contenido en el homogenado de hígado SM contribuye en forma importante al aumento de EROs en este órgano<sup>133, 134</sup>.

La propuesta de un proceso adaptativo de protección por parte de la mitocondria se debe a los resultados obtenidos en las actividades enzimáticas de proteínas antioxidantes.

### **EROs y liberación de Cyt c**

El estrés oxidante en la mitocondria es un mecanismo por el que el Cyt c puede liberarse de la mitocondria hacia el citosol<sup>8</sup>. La liberación del Cyt c es parte de la vía intrínseca en el proceso de iniciación de la apoptosis<sup>100</sup>. Los resultados muestran que la liberación de Cyt c en animales con SM es significativamente menor que en los controles, aun cuando las mitocondrias de estos animales generan mayor cantidad de EROs.

Asímismo, la disminución en la liberación de Cyt c por las mitocondrias de animales con SM se observó tanto en condiciones basales como durante la oxidación de succinato o piruvato/malato; pero en presencia de AO, la liberación del Cyt c

disminuye probablemente por el efecto protonóforo del AO a través la membrana o a través de la UCP2.

La sobre-expresión de la UCP2 en mitocondrias SM está participando en la disminución de la liberación del Cyt c, cuando es activada por AO, tal como lo muestra el aumento en la liberación en presencia del ácido graso y del GDP como inhibidor de la proteína desacoplante. Además, en la vía apoptótica, la inserción de Bax en la membrana mitocondrial está considerada como punto clave en la liberación de Cyt c a través del poro formado por Bax/Bak.

El análisis por *Western Blot* muestra que la mitocondrias con SM tienen menos Bax que los controles. La disminución de Bax en la membrana externa de mitocondrias de hígado de animales SM puede contribuir a que no se libere el Cyt c al citosol, ya que la inserción de Bax a la mitocondria es indispensable para que se lleve a cabo este proceso<sup>135, 136</sup>. El aumento en el contenido de Bax tanto en el sobrenadante como en el homogenizado total de hígado de los animales SM sugiere alteraciones en el mecanismo de inserción de Bax a la membrana externa mitocondrial.

Parece que la inserción de Bax a la membrana externa mitocondrial depende de la composición lipídica de dicha membrana. Así lo demuestran experimentos realizados en mitocondrias de corazón de ratas en un modelo de isquemia-reperfusión. Los resultados de este trabajo, demostraron que el aumento en el contenido de colesterol y ceramidas en la membrana externa mitocondrial después de la maniobra de la isquemia-reperfusión, favorece la inserción de la proteína a la mitocondria como parte de la vía intrínseca de apoptosis<sup>137</sup>. Por lo que una causa posible de la no inserción de Bax en la membrana externa de las mitocondrias de

animales con SM podría deberse a alteraciones en el mecanismo de inserción relacionados a la disminución o inexistencia de microdominios lipídicos.

Los resultados muestran que el desacoplamiento generado por la sobreexpresión de la UCP2 está asociado con la liberación de Cyt c en las mitocondrias de animales SM.

## XI. CONCLUSIONES

1. El consumo de sacarosa al 30% indujo un aumento en las concentraciones de AGNEs en mitocondrias y en el homogenado total de hígado.
2. El aumento en los AGNEs, está asociado al aumento en la generación de EROs en la mitocondria.
3. Tanto los el UCP2 en las mitocondrias de hígados de animales SM.
4. La sobre-expresión de la UCP2 en estas mitocondrias explica la fuga de protones en estas mitocondrias, proceso que fue activado con ácido oleico e inhibido con GDP.
5. Existe una disminución significativa en la liberación de Cyt c en las mitocondrias de hígados de animales SM.
6. La UCP2 participa en la liberación del Cyt c de la mitocondria al citosol cuando es activada por ácido oleico.
7. La disminución en la inserción de Bax en las mitocondrias de hígado de animales SM, podría explicar la disminución en la liberación de Cyt c.

## XII. ABREVIATURAS

<b><math>^1O^2</math></b> - Singulete de oxígeno	<b>DETAPAC</b> - Ácido dietilenetriaminapenta-acético
<b>2, 4-DNPH</b> - 2, 4-dinitrofenilhidrazina	<b>DT2</b> - Diabetes mellitus tipo 2
<b>4-HNE</b> - 4-hidroxinonenal	<b>EROs</b> - Especies reactivas del oxígeno
<b>ABS</b> - Albúmina de suero bovino	<b>FADH2</b> - Flavín adenín dinucleótido reducido
<b>ADN</b> - Ácido desoxirribonucleico	<b>FMN</b> - Flavín mononucleótido
<b>ADP</b> - Adenosín difosfato	<b>GCL</b> - Glutamato cistein ligasa
<b>AGNEs</b> - Ácidos grasos no esterificados	<b>GDP</b> - Guanosin di-fosfato
<b>AL</b> - Ácido linoleico	<b>Glut 2</b> - Transportador de glucosa 2
<b>AMPK</b> - Proteína cinasa activada por AMP	<b>GPx</b> - Glutati3n peroxidasa
<b>AO</b> - Ácido oleico	<b>GR</b> - Glutati3n reductasa
<b>Apaf 1</b> - Factor 1 activador de la proteasa apopt3tica	<b>GSH</b> - Glutati3n reducido
<b>RNA</b> - Ácido ribonucleico	<b>GSSG</b> - Glutati3n oxidado
<b>ATP</b> - Adenosín trifosfato	<b>H<sup>+</sup></b> - Prot3n
<b>BHT</b> - Butilhidroxitolueno	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> - Per3xido de hidr3geno
<b>CAT</b> - Catalasa	<b>HDL</b> - Lipoproteínas de alta densidad
<b>cGMP</b> - Guanosín monofosfato cíclico	<b>MDA</b> - Malondialdehído
<b>CRM</b> - Cadena respiratoria mitocondrial	<b>NADH</b> - Dinucleótido de nicotinamida y adenina
<b>CTE</b> - Cadena respiratoria mitocondrial	<b>NADPH<sup>+</sup></b> - Nicotinamida adenina di-nucleótido fosfato reducido
<b>Cyt c</b> - Citocromo c	
<b>DCF</b> - 2, 7- dihidrodiclorofluoresceína	

**NCEP: ATP III** - Panel III para el tratamiento del Adulto del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol

**NO** - Óxido nítrico

**NOS** - Óxido nítrico sintasa

**NRF 1** - Factor nuclear de la respiración 1

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** -Anión superóxido

**OH<sup>•</sup>** - Radical hidroxil

**OMS** - Organización Mundial de la Salud

**PGC-1 $\alpha$**  - Coactivador-1 $\alpha$  del receptor activador de proliferadores peroxisomales

**PGE** -Prostaglandina 2

**PKA** - Proteína cinasa A

**PPARs** - Receptor activado por proliferadores peroxisomales

**PUFAs** - Ácidos grasos poliinsaturados

**PVDF** - Polivinilidenol de difluorido

**QH2** - Coenzima Q reducida o Ubiquinol

**RI** - Resistencia a la insulina

**RXR** - Receptor X de retinoides

**SM** - síndrome metabólico

**SOD** - Superóxido dismutasa

**TAN** - Translocador de adenín nucleótido

**TBARS** - Reactivo de ácido tiobarbitúrico

**TCA** - Ácido tricloroacético

**TFA** - Ácido trifluoroacético

**TFAM** - Factor transcripcional mitocondrial

**TGs** - Triglicérido

**TMRM** - Tetrametilrodamina metil-ester

**UCPs** - Proteínas desacoplantes

**UQ<sup>••</sup>** - Radical ubisemiquinona

$\Delta\psi$  - Potencial transmembranal

### XIII. REFERENCIAS

- 
1. Woyda-Ploszczyca A and Jarmuszkiewicz W. Uncoupling protein in modulation of mitochondrial functions - therapeutic prospects. *Postepy Biochem.* 2008; 54: 188-197.
  2. Nübel T and Ricquier D. Respiration under control of uncoupling proteins: clinical perspective. *Horm Res.* 2006; 65: 300-310.
  3. Rousser S, Alves-Guerra MC, Mozo J, *et al.* The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes.* 2004; 53: S130-S135.
  4. Cannon B, Shabalina I, Kramarova T, *et al.* Uncoupling proteins: A role in protection against reactive oxygen species-or not?. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1757: 449-458.
  5. Souza MR, Diniz M de F, Medeiros-Filho JE and Araújo MS. Metabolic syndrome and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease. *Arq Gastroenterol.* 2012; 49: 89-96.
  6. Kagan V.E, Bayir HA, Belikova NA, *et al.* Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death. *Free Radic Biol Med.* 2009; 46: 1439-1453.
  7. Li Q, Sato EF, Kira Y, *et al.* A possible cooperation of SOD1 and cytochrome c in mitochondria-depend apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40: 173-181.
  8. Bayir H and Kagan VE. Bench-to-beside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis-there is nothing more practical than a good theory. *Crit care.* 2008; 12: 1-11.
  9. Eckel R.H, Grundy SM and Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet.* 2005; 365: 1415-1428.

- 
10. Grundy S.M, Brewer HB, Cleeman JI, *et al.* 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.
  11. Vilalt-Franch J, López-Pousa S, Garre-Olmo J, *et al.* Metabolic syndrome in Alzheimer's disease: clinical and developmental influences. *Rev Neurol*. 2008; 46:13-17.
  12. Kylin E. Studien. Hipertonie-hyperglykaemie-hyperurikamiesyndrome. *Zentralblatt fur innere Medizin*. 1923; 44: 105-127.
  13. Duvnjav J and Dunjak M. The metabolic syndrome- An ongoing story. *J Physiol Pharmacol*. 2009; Suppl 7: 19-24.
  14. Cornier MA, Dabelea D, Hernández T. *et al.* The metabolic syndrome. *Endocr Rev*. 2008; 29: 777-822.
  15. Frayn KN and Kingman SM. Dietary sugars and lipid metabolism in human. *Am J Clin Nutr*. 1995; 62: 250S-263S.
  16. Samuelsson M, Matthews P, Argenton M, *et al.* Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension and insulin resistance. *Hypertension*. 2008; 51: 383-392.
  17. Storlien LH, Higgings JA, Thomas TC, *et al.* Diet composition and insulin action in animal models. *Br J Nutr*. 2000; 83: S85-S90.
  18. Stern MP, Hunt KJ, Williams K, *et al.* Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease?. *Diabetes Care*. 2004; 27: 2676-2681.

- 
19. Susan KF and Rao SP. Sugars, hypertriglyceridemia, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2003; 78: 873S-80S.
  20. Esquivel V and Gómez G. Implicaciones metabólicas del consumo excesivo de fructosa. *Academia Mexicana de Ciencias.* 2007; 49:198-202.
  21. Elliot SJ, Keim NL, Stern JS, *et al.* Fructose, weight gain and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76: 911-922.
  22. Levin RS. Digestion and absorption of carbohydrates-from molecules and membrane to human. *Am J Clin Nutr.* 1994; 59: 690S-698S.
  23. Shaefer EJ, Gleason JA and Dansinger M. Dietary fructose and glucose differentially affect lipid and glucose homeostasis. *J Nutr.* 2009; 139: 1257S- 1262S.
  24. Murray R, Bender D, Kennedy P, *et al.* Harper. *Bioquímica ilustrada.* Mc Graw Hill Interamericana. 2010. Pp 92-212.
  25. Kotronen A and Yki-Järvinen H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: 27-38
  26. Liu Q, Bengmark S and Qu S. The role of hepatic fat accumulation in pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Lipids Health Dis.* 2010; 28:9:42.
  27. Kim CH and Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver disease: a manifestation of the metabolic syndrome. *Cleve Clin J Med.* 2008;75:721-728.
  28. Nicholls DG. *Bioenergética: introducción a la teoría quimiosmótica.* Editorial Reverté. Barcelona, 1987. pp. 71-135.

- 
29. Cape JL, Bowman MK and Kramer DM. A semiquinone intermediate generated at the Qo site of the cytochrome bc<sub>1</sub> complex: important for the Q-cycle and superoxide production. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 30: 82-89.
30. Zhang H, Chobot S, Osyckza A, et al. Quinone and non-quinone redox couples in Complex III. *J Bioenerg Biomembr*. 2008; 40: 493-499.
31. Seifert EL, Estey C, Xuan JX. et al. Electron transport chain-dependent and-independent mechanisms of mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission during long chain fatty acid oxidation. *J Biol Chem*. 2010; 285: 5748-5758.
32. Kocherginsky N. Acidic lipids, H<sup>+</sup>-ATPases, and mechanism of oxidative phosphorylation. Physico-chemical ideas 30 years after P. Mitchell's Nobel Prize award. *Prog Biophys Mol Biol*. 2009; 99:20-41.
33. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive species. *J Physiol*. 2003; 552: 335-344.
34. Lambert DJ. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Immunology*. 2004; 4: 181-189.
35. Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension. What is the clinical significance?. *Hypertension*. 2004; 44: 248-252.
36. Kim J, Wei Y and Sowers JS. Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ Res*. 2008; 102: 401-414.
37. Petersen K, Befroy D, Dufour S. et al. Mitochondrial dysfunction in the elderly: Possible role in insulin resistance. *Science*. 2003; 300: 1140-1142.

- 
38. Guan Y and Breyer MD. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): novel therapeutic targets in renal disease. *Kidney Int.* 2001; 60: 14-30.
39. Biswas M and Chan JY. Role of Nrf 1 in antioxidant response element-mediated gene expression and beyond. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010; 244: 16-20.
40. Nisoli E, Clementi E, Camba O. *et al.* Defective mitochondrial biogenesis: A hallmark the high cardiovascular risk in the metabolic syndrome. *Circ Res.* 2007; 100: 795-806.
41. Bugger H and Abel D. Molecular mechanisms for myocardial mitochondrial dysfunction in the metabolic syndrome. *Clin Sci.* 2008; 114: 195-210.
42. Nisoli E, Clementi E, Paslucci C. *et al.* Mitochondrial biogenesis in mammals: The role of endogenous nitric oxide. *Science.* 2008; 299: 896-899.
43. Nicolson GL. Metabolic syndrome and mitochondrial function: molecular replacement and antioxidant supplements to prevent membrane peroxidation and restore mitochondrial function. *J Cell Biochem.* 2007; 100:1352-1369.
44. Roede J and Jones D. Reactive species and mitochondrial dysfunction: mechanistic significance of mitochondrial 4-hydroxynonenal. *Environ Mol Mutagen.* 2010; 51: 380-390.
45. Hernández- Jiménez S. Fisiopatología de la obesidad. *Gaceta Médica México.* 2004; 140: S27-S32.
46. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004; 114:1752-1761.

- 
47. Bakker SJ, Jzerman RG, Teerlink T, *et al.* Cytosolic triglycerides and oxidative stress in central obesity: the missing link between excessive atherosclerosis, endothelial dysfunction, and  $\beta$ -cell failure?. *Atherosclerosis*. 2000; 148: 17-21.
48. Yang S, Zhu H, Li Y, *et al.* Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress. *Arch Biochim Biophys*. 2000; 378: 259-268.
49. Cocco T, Di Paola M, Papa S and Lorusso M. Arachidonic acid interaction with the mitochondrial electron transport chain promotes reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med*. 1999; 27: 51-59.
50. Shönfeld P and Wojtczak J. Fatty acids decrease mitochondrial generation of reactive oxygen species at the reverse electron transport but increased it at the forward transport. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1767: 1031-1040.
51. Koshkin V, Wang X, Scherer PE. *et al.* Mitochondrial functional state in clonal pancreatic beta-cells exposed to free fatty acids. *J Biol Chem*. 2003; 278: 19709-19715.
52. Aronis A, Madar Z and 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 Radic Biol Med*. 2005; 38: 1221-1230.
53. Shiose A and Sumimoto H. Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47<sup>phos</sup> to activate the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem*. 2000; 275: 13793-13801.
54. Murphy MP. How mitochondria produce reactive species oxygen. *Biochem J*. 2009; 417: 1-13.

- 
55. St-Pierre J, Buckinham JA, Roebuck S, *et al.* Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem.* 2002; 277: 4478-4480.
56. Adam-Vizi V and Chinopoulos Ch. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci.* 2006; 27: 639-645.
57. Watanabe N, Dickson DA, Liu RM. *et al.* Quinones and glutathione metabolism. *Methods Enzymol.* 2004; 378: 319-340.
58. Genova ML, Ventura B, Giuliano G. *et al.* The site of production of superoxide radical in mitochondrial complex I is not bound ubiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Letters.* 2001; 55: 364-368.
59. Grivennikova VG and Vinogradov AD. Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochim Biophys Act.* 2006; 1757: 553-561.
60. Lambert AJ and Brand MD. Inhibitors of the quinone –binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADPH: ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *J Biol Chem.* 2004; 279: 39414-39420.
61. Treberg JR, Quinlan CL. and Brand M. Evidence for two sites of superoxide production by mitochondrial NADH-Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I). *J Biol Chem.* 2011; 286: 27103-27110.
62. Petrosillo G, Matera M, Ruggiero FM. and Paradies G. Mitochondrial dysfunction in rat brain with aging involvement of complex I, reactive species and cardiolipina. *Neurochem Int.* 2008; 53: 126-131.

- 
63. Forquer I, Covian R, Bowman MK. *et al.* Similar transition states mediate the Q-cycle and superoxide production by the cytochrome bc<sub>1</sub> complex. *J Biol Chem.* 2005; 281: 38459-38465.
64. Cape JL, Aidasani D, Kramer DM. *et al.* Substrate redox potential controls superoxide production kinetics in the cytochrome bc complex. *Biochemistry.* 2009; 48: 10716-10723.
65. Chen Q, Vazquez EJ and Mohgaddas S. Production of reactive species by mitochondrial: Central role of complex III. *J Biol Chem.* 2003; 278: 36027-36031.
66. Matés JM, Pérez-Gómez C and Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999; 32: 595-603.
67. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39: 44-89.
68. Chu FF. The human glutathione peroxidase genes GPX2, GPX3, and GPX4 map to chromosomes 14, 5, and 19, respectively. *Cytogen Cell Genet.* 1994; 66: 96-98.
69. Utomo A, Jiang X and Furutas S. Identification of a Novel Putative Non-selenocysteine Containing Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress regenerated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2004; 279: 43522-43529.
70. Sluse FE, Jarmuszkiewicz W, Navet R. *et al.* Mitochondrial UCPs: new insights into regulation and impact. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1757: 480:485.
71. Wolkow C and Iser W. Uncoupling proteins homolog may provide a link between mitochondria, metabolism and lifespan. *Ageing Res Rev.* 2006; 5: 196-208.

- 
72. Ledesma A, García de Lacoba M, *et al.* The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biol.* 2002; 3: 1-9.
73. Riquier D and Bouillaud F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J.* 2000; 345: 161-179.
74. Echaty KS. Mitochondrial uncoupling proteins-What is their physiological role? *Free Radic Biol Med.* 2007; 43: 1351-1371.
75. Sokolova IM and Sokolov EP. Evolution of mitochondrial uncoupling proteins: novel invertebrate UCP homologues suggest early evolutionary divergence of the UCP family. *FEBS Lett.* 2005; 579: 313-317.
76. Kozak LP and Harper ME. Mitochondrial uncoupling proteins in energy expenditure. *Annu Rev Nutr.* 2000; 20: 339-363.
77. Riquier D and Bouillaud F. Mitochondria uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol.* 2000; 529: 3-10.
78. Golozoubova V, Cannon B and Nedergaard J. UCP1 is essential for adaptive adrenergic nonshivering thermogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006; 291: E350- E357.
79. Nicholls DG. A history of UCP1. *Biochem Soc Trans.* 2001; 29: 751-755.
80. Rial E and González MM. Physiological regulation of the transport activity in the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1504: 70-81.
81. Azzu V, Jastroch M, Divakaruni AS. and Brand MD. The regulation and turnover of mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1797: 785-791.
82. Beck V, Jabůrek M, Demina T. *et al.* Polyunsaturated fatty acids activate human uncoupling proteins 1 and 2 in planar lipid bilayers. *FASEB J.* 2007; 21: 1137-1144.

- 
83. Saleh MC, Wheeler MB and Chan CB. Uncoupling protein-2: evidence for its function as a metabolic regulator. *Diabetologia*. 2002; 45: 174-187.
84. Chan CB and Harper ME. Uncoupling proteins: Role in insulin resistance and insulin insufficiency. *Curr Diabetes Rev*. 2006; 2: 271-283.
85. Brookes PS. Mitochondrial H<sup>+</sup> leak and ROS generation: An odd couple. *Free Radic Biol Med*. 2005; 38: 12-23.
86. Diao J, Allister EM, Koshkin V, *et al*. UCP2 is highly expressed in pancreatic alpha-cell and influences secretion and survival. *Proc Natl Acad Sci*. 2008; 105: 12057-12062.
87. Echtay KS, Esteves TC, Pakay JL, *et al*. A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *EMBO J*. 2003; 22: 4103-4110.
88. Dietrich MO and Horvath TL. The role of mitochondrial uncoupling proteins in lifespan. *Pflugers Arch*. 2010; 459: 269-275.
89. Echtay KS and Brand MD. 4-Hydroxy-2-nonenal and uncoupling proteins: an approach for regulation of mitochondrial ROS production. *Redox Resp*. 2007; 12: 19-26.
90. Villarroya F, Iglesias R and Giral M. PPARs in the control of uncoupling proteins gene expression. *PPAR Res*. 2007; 2007: 1-12.
91. Alargona P. Fenofibric acid: a new fibrate approved for use in combination with statin for the treatment of mixed dyslipidemia. *Vasc Health Risk Manag*. 2010; 6: 351-361.
92. Chevillotte E, Rieusset J, Roques M, *et al*. The regulation of uncoupling protein-2 gene expression by  $\omega$ -6 polyunsaturated fatty acids in human skeletal muscle cells

---

involves multiple pathways, including the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta$ . *J Biol Chem.* 2001; 276: 10853-10860.

93. Pi J and Collins S. Reactive oxygen species and uncoupling protein 2 in pancreas  $\beta$ -cell function. *Diabetes Obes Metab.* 2010; 12: 141-148.

94. Brand MD, Parker N, Affouret C, *et al.* Mitochondrial uncoupling protein 2 in pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes Obes Metab.* 2010; 12: 134-140.

95. Fisler JS and Warden CH. Uncoupling proteins, dietary fat and the metabolic syndrome. *Nutr Metab.* 2006; 3: 38-44.

96. Affouret JS and Brand MD. On the role of uncoupling protein -2 in pancreatic beta cells. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1777: 973-979.

97. Seifert EL, Bézaire V, Estey C and Harper ME. Essential role of uncoupling protein-3 in mitochondrial adaptation to fasting but not in fatty acid oxidation or fatty acid anion export. *J Biol Chem.* 2008; 283: 25124-25131.

98. Iverson LS and Orrenius S. The cardiolipin-cytochrome c interaction and the mitochondrial regulation of apoptosis. *Arch Biochem Biophys.* 2004; 423: 37-46.

99. Belikova N, Vladimirov YA, Osipov AN, *et al.* Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes. *Biochemistry.* 2006; 45: 4998-5009.

100. Jiang J, Huang Z, Zhao Q, *et al.* Interplay between bax, reactive oxygen species production, and cardiolipin oxidation during apoptosis. *Biochem and Biophys Res Comm.* 2008; 368: 145-150.

- 
101. Petrosillo G, Ruggiero FM and Paradies G. Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. *FEBS J.* 2003; 17: 2202-2208.
102. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, *et al.* Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* 2006; 13: 1423-1433.
103. Scorrano L and Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 304: 437-444.
104. Bechmann I, Diano S, Warden CH, *et al.* Brain mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP 2): a protective stress signal in neuronal injury. *Biochem Pharmacol.* 2002; 64: 363-367.
105. Nägele U, Hägele EO, Sauer G, *et al.* Reagent for the enzymatic determination of serum total triglycerides with improved lipolytic efficiency. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1984; 22: 165-174.
106. Lowry H, Rosebrough NJ, Farr A, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-275.
107. Vázquez-Memije ME, Cárdenas-Méndez MJ, Tolosa MJ, *et al.* Respiratory chain complexes and membrane fatty acids composition in rat testis mitochondria throughout development and ageing. *Exp Gerontol.* 2005; 40: 482-490.
108. Russel CS and Lee WG. Measures of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivates. *Biophys J.* 1999; 76: 469-477.
109. Scaduto RC Jr and Grotyohann LW. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivates. *Biphys J.* 1999; 76: 469-477.

- 
110. Possel H, Noack H and Augustin W. 2, 7- Dihydrodichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation. *FEBS L.* 1997; 416: 175-178.
111. Folch J, Lees M and Slocne-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957; 193: 265-275.
112. El Hafidi M. and Baños G. In vivo plasma lipid oxidation in sugar-induced rat hypertriglyceridemia and hypertension. *Hypertension.* 1997; 30: 624-628.
113. Levine RL, Garland D, Oliver CN, *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 464-478.
114. Tan HD, Miles YM and DeGrauw A. HPLC analysis of reduced on oxidized coenzyme Q (10) in human plasma. *Clin chem.* 2002; 47: 256-265.
115. Lakritz J, Plopper CG and Buckpitt AR. Validated high-performance liquid chromatography-electrochemical method for determination of glutathione and glutathione disulfide in small tissue samples. *Anal Biochem.* 1997; 247: 63-68.
116. Flohé L and Otting F. Superoxide dismutase assay. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 93-104.
117. El Hafidi M, Pérez I, Zamora J, *et al.* Glycine intake decrease plasma free fatty acids, adipose cell size, and blood pressure in sucrose-fed rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004; 287: R1387-R1393.
118. Wree A, Kahraman A, Gerken G, *et al.* Obesity affects the liver-the link between adipocytes and hepatocytes. *Digestion.* 2011; 83: 124-133.
119. Anderson N and Borlak J. Mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. *Pharmacol Rev.* 2008; 60: 311-357.

- 
120. Carrillo Silvia. Efecto de los ácidos grasos no esterificados sobre la sensibilidad a la insulina en un modelo experimental de síndrome metabólico inducido por alto consume de sacarasa. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. 2007.
121. Shönfeld P and Wojtczak L. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2008; 45: 231-241.
122. Gao D, Nong S, Huang X, et al. The effects of palmitate on hepatic insulin resistance are mediated by NADPH oxidase 3-derived reactive oxygen species through JNK y p38MAPK pathways. *J Biol Chem.* 2010; 285: 29965-29973.
123. Boime I, Smith EE and Hunter FE Jr. The role of fatty acids in mitochondrial changes during liver ischemia. *Arch Biochem Biophys.* 1970; 139: 425-443.
124. Feldkamp T, Kribben A, Roeser NF, et al. Accumulation of nonesterified fatty acids causes the sustained energetic deficit in kidney proximal tubules after hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006; 290: F465-F477.
125. Richieri GV, Ogata RT and Kleinfeld A. Thermodynamic and kinetic properties of fatty acid interactions with rat liver fatty acid-binding protein. *J Biol Chem.* 1996; 271: 31068- 31074.
126. Nègre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, et al. A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J.* 1997; 11: 809-815.
127. Di Paola M and Lorusso M. Interaction of free fatty acid with mitochondria: coupling, uncoupling and permeability transition. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1757: 1330-1337.

- 
128. MacLellan DJ, Gerrits M, Gowing A, et al. Physiological increases in uncoupling protein 3 augment fatty acid oxidation and decrease reactive oxygen species production without uncoupling respiration in muscle cells. *Diabetes*. 2005; 54: 2343-2350.
129. Aroor AR, Mandavia C, Ren J, et al. Mitochondrial and oxidative stress in the cardiorenal metabolic syndrome. *Cardiorenal Med*. 2012; 2: 87-109.
130. Lee HK, Cho YM, Kwak S, et al. Mitochondrial dysfunction and metabolic syndrome—looking for environmental factors. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1800: 282-289.
131. Goldsteins G, Keksa-Goldesteine V, Ahtoniemi T, et al. Deleterious role of superoxide dismutase in the mitochondrial intermembrane space. *J Biol Chem*. 2008; 283: 8446-8452.
132. Cesaratto L, Vascotto C, Calligaris S, et al. The importance of redox state in liver damage. *Ann Hepatol*. 2004; 3: 86-92.
133. García-Ruiz C and Fernández-Checa JC. Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006; 3: S3-S6.
134. González R, Ferrín G, Hidalgo AB, et al. N-acetylcysteine, coenzyme Q10 and superoxide dismutase mimetic prevent mitochondrial cell dysfunction and cell death induced by D-galactosamine in primary culture of human hepatocytes. *Chem Biol Interact*. 2009; 181: 95-106.
135. Narita M, Shigeomi S, Ito T, et al. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci*. 1998; 95: 14681-14686.

---

136. Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, et al. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ.* 2000; 7: 1166-73.

137. Martínez-Abundis E, Correa F, Pavón N and Zazueta C. Bax distribution into mitochondrial detergents-resistant microdomains is related to ceramide and cholesterol content in postischemic hearts. *FEBS J.* 2009; 276: 5579-5588.

# High-sucrose diet increases ROS generation, FFA accumulation, UCP2 level, and proton leak in liver mitochondria

Angélica Ruiz-Ramírez, Monserrath Chávez-Salgado, José Antonio Peñeda-Flores, Estrella Zapata, Felipe Masso and Mohammed El-Hafidi

*Am J Physiol Endocrinol Metab* 301:E1198-E1207, 2011. First published 13 September 2011;  
doi:10.1152/ajpendo.00631.2010

**You might find this additional info useful...**

---

This article cites 59 articles, 21 of which can be accessed free at:

<http://ajpendo.physiology.org/content/301/6/E1198.full.html#ref-list-1>

Updated information and services including high resolution figures, can be found at:

<http://ajpendo.physiology.org/content/301/6/E1198.full.html>

Additional material and information about *AJP - Endocrinology and Metabolism* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajpendo>

---

This information is current as of December 2, 2011.

# High-sucrose diet increases ROS generation, FFA accumulation, UCP2 level, and proton leak in liver mitochondria

Angélica Ruiz-Ramírez, Monserrath Chávez-Salgado, José Antonio Peñeda-Flores, Estrella Zapata, Felipe Masso, and Mohammed El-Hafidi

Cardiovascular Biomedicine, Cellular Biology, National Institute of Cardiology Ignacio Chávez, Tlalpan, Mexico

Submitted 3 December 2010; accepted in final form 7 September 2011

**Ruiz-Ramírez A, Chávez-Salgado M, Peñeda-Flores JA, Zapata E, Masso F, El-Hafidi M.** High-sucrose diet increases ROS generation, FFA accumulation, UCP2 level, and proton leak in liver mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301: E1198–E1207, 2011. First published September 13, 2011; doi:10.1152/ajpendo.00631.2010.—Obesity, a risk factor for insulin resistance, contributes to the development of type 2 diabetes and cardiovascular diseases. The relationship between increased levels of free fatty acids in the liver mitochondria, mitochondrial function, and ROS generation in rat model of obesity induced by a high-sucrose diet was not sufficiently established. We determined how the bioenergetic functions and ROS generation of the mitochondria respond to a hyperlipidemic environment. Mitochondria from sucrose-fed rats generated  $H_2O_2$  at a higher rate than the control mitochondria. Adding fatty acid-free bovine serum albumin to mitochondria from sucrose-fed rats significantly reduced the rate of  $H_2O_2$  generation. In contrast, adding exogenous oleic or linoleic acid exacerbated the rate of  $H_2O_2$  generation in both sucrose-fed and control mitochondria, and the mitochondria from sucrose-fed rats were more sensitive than the control mitochondria. The increased rate of  $H_2O_2$  generation in sucrose-fed mitochondria corresponded to decreased levels of reduced GSH and vitamin E and increased levels of Cu/Zn-SOD in the intermembrane space. There was no difference between the levels of lipid peroxidation and protein carbonylation in the two types of mitochondria. In addition to the normal activity of Mn-SOD, GPX and catalase detected an increased activity of complex II, and upregulation of UCP2 was observed in mitochondria from sucrose-fed rats, all of which may accelerate respiration rates and reduce generation of ROS. In turn, these effects may protect the mitochondria of sucrose-fed rats from oxidative stress and preserve their function and integrity. However, in whole liver these adaptive mechanisms of the mitochondria were inefficient at counteracting redox imbalances and inhibiting oxidative stress outside of the mitochondria.

reactive oxygen species; free fatty acid; metabolic syndrome; mitochondrial function; oxidative stress; uncoupling protein 2

ABDOMINAL OBESITY AND HIGH LEVELS of circulating free fatty acids (FFAs) have been indicated as primary contributors to acquired insulin resistance and hypertension because they induce oxidative stress that affects insulin signaling and nitric oxide availability (30, 11). Insulin resistance leads to continuous lipolysis within adipocytes, releasing FFAs into the local circulation, where they are transported into the liver. In the liver, FFAs can be incorporated into triglycerides that accumulate and lead to nonalcoholic fatty liver disease, the primary hepatic complication of obesity (13, 57). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction have been shown to play a critical role in the initiation and progression of fatty liver to the more

serious condition of nonalcoholic steatohepatitis in obesity models (15, 21, 38). Several studies using an animal model of fatty liver induced by a high-fat diet suggest that chronic exposure to a high-fat diet negatively affects the bioenergetics of the liver (39, 58). However, recent studies of high-fat diet-induced insulin resistance in rodents have reported fatty acid accumulation and oxidative stress in the liver without significant effects on mitochondrial function (9, 55). Tissues and cells affected by metabolic diseases such as diabetes have been described as developing an adaptive mechanism to defend against oxidative stress and mitochondrial dysfunction (1). One putative mechanism is a mild physiological uncoupling of oxidative phosphorylation that would reduce superoxide generation by reducing the mitochondrial membrane potential (6, 32).

The overexpression of mitochondrial uncoupling protein (UCP2) in fatty hepatocytes of genetically obese mice has been suggested to be an adaptation of mitochondria to obesity-related oxidative stress (60). Because the primary function of UCP2 is to mediate proton leak, the overexpression of UCP2 in fatty liver may compromise ATP biosynthesis (8). In a model of abdominal obesity induced by a high-sucrose diet, the increased FFA level in both plasma and the liver (17–19) suggests mitochondrial dysfunction accompanied by high reactive oxygen species (ROS) generation and oxidative stress in the liver. Generation of ROS in response to a hyperlipidemic environment may also contribute to the maintenance of a normal or altered redox status of the liver in this model of abdominal obesity. We hypothesized that mitochondria might adapt to prolonged exposure to increased concentrations of FFA *in vivo* by altering the activity levels of antioxidant enzymes and enzymes that can affect oxidative phosphorylation, such as UCP2.

We explored these questions by examining the relationship between  $H_2O_2$  generation, endogenous FFA accumulation, and proton leak in isolated mitochondria from sucrose-fed rats (SFR). We also examined the redox status of liver homogenate and isolated mitochondria from SFR by determining the activities of some antioxidant enzymes and the levels of antioxidant molecules such as reduced glutathione, vitamin E, and reduced coenzyme Q.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** Solvents were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO) and were of HPLC grade. Butylated hydroxytoluene (BHT), fatty acid-free bovine serum albumin (BSA), tetraethoxypropane (TEP), reduced glutathione (GSH), vitamin E, ubiquinone-9, and ubiquinone-10 were also purchased from Sigma Chemical. Ubiquinol-9 (CoQ<sub>9</sub>) and ubiquinol-10 (CoQ<sub>10</sub>) were prepared by reducing the corresponding quinones with sodium borohydride (Sigma Chemical), as described by Takada et al. (52).

**Animals.** The animal experiments were approved by the Laboratory and Animal Care Committee of the National Institute of Cardiology

Address for reprint requests and other correspondence: M. El-Hafidi, Cardiovascular Biomedicine Dept., National Institute of Cardiology Ignacio Chavez, Juan Badiano No. 1, Colonia Sección XVI, Tlalpan 14080, Mexico D. F., Mexico (e-mail: medelhafidi@yahoo.com).

Ignacio Chávez and conducted in compliance with the institution's ethical guidelines for animal research.

Male Wistar rats, aged 28 days and weighing  $\sim 45 \pm 2$  g, were housed with a 12:12-h light-dark cycle and randomly separated into two groups of eight to 10 animals: *group 1* (control) rats, given tap water for drinking; and *group 2* (SFR) rats, given drinking water containing 30% sucrose for  $\sim 20$  wk. All animals were fed ad libitum with commercial rat chow (LabDiet 5008; PMI Nutrition International, Richmond, IN).

**Plasma and tissue sampling.** After overnight fasting, the animals were decapitated. The blood was immediately collected in a tube containing EDTA (0.1%) and centrifuged at 600 g for 20 min at 4°C. The plasma was supplemented with 0.005% BHT as an antioxidant and stored at  $-70^\circ\text{C}$  until the lipid analysis could be performed.

The liver was homogenized in 50 ml of cold buffer (250 mM sucrose, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, adjusted to pH 7.4 with KOH) and kept on ice. The homogenate was centrifuged at 600 g for 5 min at 4°C, and the supernatant was withdrawn and stored at  $-70^\circ\text{C}$  until required for lipid analysis.

Intra-abdominal fat, an important characteristic of metabolic syndrome, a marker of insulin resistance, and a source of free fatty acids, was dissected from the retroperitoneal cavity and around both kidneys and immediately weighed. Visceral and duodenal fat were not included in this procedure.

**Biochemical analyses of plasma samples.** The plasma triglyceride (TG) concentration was measured according to the method described by Nägele et al. (40). The plasma insulin level was determined by radioimmunoassay (Coat-a-Count; Diagnostic Products, Los Angeles, CA).

**Measurement of liver triglycerides.** For determination of hepatic triglycerides, liver tissue (50 mg) was homogenized in 2 ml of isopropanol with a Polytron disrupter. The homogenate was centrifuged at 2,000 g for 10 min, and the supernatant was collected. Supernatant triglycerides were measured with a Triglyceride Kit (Wako Diagnostics), as described elsewhere (5).

**Preparation of mitochondria.** Mitochondria were isolated from rat liver tissue by conventional differential centrifugation. The tissue was homogenized in 30–40 ml of cold buffer (250 mM sucrose, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, adjusted to pH 7.4 with KOH) and kept on ice. The homogenate was centrifuged at 600 g for 10 min at 4°C. The pellet, containing cell debris and no homogenized tissue, was discarded, and one aliquot of liver homogenate was frozen for later analysis of antioxidant enzyme activities and FFA content. The rest of the supernatant was centrifuged at 8,000 g for 10 min at 4°C to pellet the mitochondria. The mitochondria were washed with a buffer containing 0.1% fatty acid-free BSA and finally resuspended in the same buffer without BSA. Prior to experimentation, the mitochondria were stored on ice at a final concentration of 30–40 mg/ml protein. The protein concentration was determined by the modified method of Lowry et al. (37). Mitochondria prepared in this way were active for 5–6 h, as determined by their ability to maintain transmembrane potential in the presence of oxidizable substrates.

**Mitochondrial oxygen uptake and respiratory complex enzyme activities.** Mitochondrial respiratory rates were measured with a Clark-type  $\text{O}_2$  electrode by incubating 0.50 mg protein/ml of fresh mitochondria at 30°C in an air-saturated medium containing 125 mM KCl, 10 mM HEPES (pH adjusted to 7.4 with KOH), 10 mM EGTA, 2 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$  and 5 mM succinate (oxidative substrate) in the presence of rotenone.

The activities of NADH-dehydrogenase (CI), succinate dehydrogenase (CII), succinate-cytochrome *c* oxidoreductase (CIII), and cytochrome *c* oxidase (CIV) were determined as described previously (56). Briefly, the activity of CI was measured by monitoring the oxidation of NADH in a solution containing 35 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), 0.2 mM NADH, and 1.7 mM potassium ferricyanide. Absorbance changes were followed at 340 nm, using an extinction coefficient of 6.22 mM/cm for NADH.

The activity of CII was measured by monitoring the absorbance of dichlorophenolindophenol in a solution containing 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 1 mM KCN, 0.05 mM dichlorophenolindophenol, and 16 mM succinate. Absorbance changes were followed at 600 nm, using an extinction coefficient of 19.1 mM/cm for dichlorophenolindophenol.

The activity of CIII was measured by following the reduction of cytochrome *c* in a solution containing 0.1 mM cytochrome *c*, 0.5 mM KCN, 3 mM succinate, and potassium phosphate buffer (pH 7.5).

The activity of CIV was determined by following the oxidation of cytochrome *c* in a solution containing 0.1% reduced cytochrome *c* and 10 mM potassium buffer (pH 7.0). Absorbance changes were followed at 550 nm, using an extinction coefficient of 18 mM/cm for cytochrome *c*.

**Proton leak.** Oxygen consumption and the inner transmembrane potential were recorded in parallel using a Clark-type oxygen electrode and the fluorescence of tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM), respectively. The transmembrane potential was estimated from the fluorescence quenching of the cationic dye TMRM (47), which accumulated and was quenched inside energized mitochondria, in the solution described above for the measurement of oxygen uptake. The excitation wavelength was 548 nm (6-nm slit), and the emission wavelength was 573 nm (6-nm slit). The final concentration of the dye was 0.25  $\mu\text{M}$ . Fluorescence measurements were performed with a PerkinElmer LS50B spectrofluorometer, using a stirred cuvette maintained at 30°C. Liver mitochondria (1 mg) were incubated in 2 ml of reaction medium containing 2  $\mu\text{M}$  oligomycin, 3  $\mu\text{M}$  rotenone, and 80 ng/ml of nigericin (added to abolish  $\Delta\text{pH}$  so that the total proton motive force would be equal to  $\Delta\Psi$ ). The reaction was started by adding succinate (5 mM). Oxygen consumption and the membrane potential were progressively inhibited by sequential additions of malonate in increasing amounts (final concentrations: 0.5, 1, 2, 3, 4, and 5 mM), which inhibited succinate dehydrogenase, thereby decreasing electron availability in the system and creating a range of membrane potentials. At the end of each experiment, carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone was added to dissipate the  $\Delta\Psi$ . In some experiments, 0.5 mM GDP (a known UCP2 inhibitor) and 5  $\mu\text{M}$  oleic acid [a UCP2 activator (10 nmol/mg protein)] were added to the incubation medium before the malonate additions to study the participation of UCP2 in the proton leak.

The calibration procedure was performed as described elsewhere (47). The partitioning of the dye was calculated from the equation  $(\text{TMRM})_t = K_i(\text{TMRM})_m + K_o(\text{TMRM})_o$ , where  $(\text{TMRM})_t$  corresponds to the total TMRM accumulated by energized mitochondria,  $(\text{TMRM})_m$  is the amount of dye inside the matrix (nmol/ $\mu\text{l}$ ), and  $(\text{TMRM})_o$  is the amount of dye outside the matrix (nmol/ $\mu\text{l}$ ). To determine  $(\text{TMRM})_t$ , mitochondria that had been incubated with TMRM in the presence and absence of substrate were centrifuged, and the fluorescence of the supernatant with substrate was subtracted from the initial fluorescence of the supernatant without substrate. To determine  $(\text{TMRM})_o$ , the mitochondria were energized, and carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone was added to attain a target membrane potential. After a steady state was reached, the fluorescence of the medium was recorded, and the contents of the cuvette were centrifuged to separate the mitochondria. The value of  $(\text{TMRM})_o$  was calculated from the fluorescence of the supernatant. The value of  $(\text{TMRM})_m$  was calculated using the equation described above with  $K_o = 88$  ( $\mu\text{l}/\text{mg}$ ) and  $K_i = 33$  ( $\mu\text{l}/\text{mg}$ ) at 30°C.  $\Delta\Psi$  was estimated from the Nernst equation [ $\Delta\Psi = 60.1 \log (\text{TMRM})_o/(\text{TMRM})_m$ ].

**Measurement of  $\text{H}_2\text{O}_2$  generation by the mitochondria.** The fluorescence of oxidized dihydrodichlorofluorescein (DCF) was measured with a Perkin Elmer LS50B spectrofluorometer, using a stirred cuvette maintained at 30°C. The mitochondria (0.5 mg/ml) were incubated in the solution described above for the measurement of oxygen uptake, with the addition of 0.1  $\mu\text{M}$  DCF and 1 U/ml horseradish peroxidase. The fluorescence signal was amplified by electron transfer from

peroxidase to DCF during the reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which is produced by superoxide anion dismutation. The forward electron transport mode was assessed by energizing the mitochondria with pyruvate/malate (5 mM/3 mM). The oxidation of DCF was detected using excitation/emission wavelengths of 484 nm (6-nm slit)/525 nm (6-nm slit). The rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation was calibrated by constructing standard curves from known concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in solutions consisting of the standard incubation buffer, the appropriate dye, horseradish peroxidase, and mitochondria. The effect of ADP (50  $\mu$ M), GDP (0.5 mM), and various concentrations of oleic or linoleic acid on the generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was examined using the same buffer described above for the measurement of oxygen uptake and membrane potential, with the addition of 2  $\mu$ M oligomycin and 80 ng/ml nigericin.

**Western blotting of UCP2.** Mitochondrial proteins (100  $\mu$ g) were separated by electrophoresis on a 12.5% polyacrylamide gel and then electrotransferred to an immobilon-P membrane (Millipore) and blocked with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20 for 2 h at room temperature. The blocked membrane was incubated overnight at 4°C in the same buffer containing goat polyclonal antibody to the NH<sub>2</sub>-terminal domain of UCP2 (1/400) or goat polyclonal anti-adenine nucleotide translocase (ANT; 1/1,000) for load control (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The membranes were rinsed with Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20 and then incubated with horseradish peroxidase-coupled anti-goat IgG as a secondary antibody (1/5,000) (Santa Cruz Biotechnology). The bands were visualized using enhanced chemiluminescence detection reagent (Millipore) and exposed on Kodak Biomax ML scientific image film for 5–10 min.

**Lipid extraction and analysis of FFA composition.** FFAs were extracted from 10 mg of mitochondrial protein or from 10 mg of protein from liver homogenate in the presence of 10 and 100  $\mu$ g of heptadecanoic acid (internal standard), respectively, using chloroform-methanol (2:1, vol/vol) containing 0.002% BHT, as described by Folch et al. (23). The obtained lipid residue was dissolved in 1 ml of methanol containing 0.1 ml of 2,2-dimethoxypropane and 0.01 ml of concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to esterify FFAs to their corresponding methyl esters at room temperature for 15 min, as described by Tserng et al. (54) and modified in our laboratory (18). These reaction conditions are necessary to avoid the esterification of fatty acids from phospholipids, cholesterol esters, and triglycerides. This method was compared with the method using thin-layer chromatography to separate FFAs from the other lipid components of total lipid extract, and no significant difference was found between the two methods. The method used in this work has the advantage of limiting the time of lipid extract exposure to autooxidation. The concentration and composition of FFA methyl esters were evaluated by gas liquid chromatography, as described previously (17).

**Oxidative stress markers.** For lipid peroxidation, plasma, liver homogenate, and mitochondrial fraction were treated at 90°C for 30 min with 0.8% thiobarbituric acid (TBA) in 20% acetic acid (pH 2.5). The tubes were then placed in an ice bath for 10 min before extraction with *n*-butanol. The amount of TBA-reactive substances (TBARS) in each sample was calculated from the fluorescence intensity at an excitation wavelength of 513 nm and an emission wavelength of 553 nm, using malondialdehyde (MDA) derived from TEP as standard (16).

For protein carbonylation assay, the carbonyl level was determined in 5 mg of liver homogenate protein and 5 mg of mitochondria protein using the 2,4-dinitrophenylhydrazine to derivatize the carbonyl function according to the method described elsewhere (36). The extension coefficient used to evaluate the concentration of carbonylated protein was 22,000 M/cm at a wavelength of 390 nm.

**HPLC analysis of mitochondrial vitamin E and CoQ.** Reduced CoQ and vitamin E were simultaneously extracted from liver mitochondria and analyzed by HPLC, as described elsewhere (51). Five milligrams of mitochondrial protein, in the presence of 25  $\mu$ g BHT (to prevent

autooxidation), was mixed in a glass tube with 4 ml of cold methanol for 1 min, using a vortex mixer, and then 3 ml of cold petroleum ether was added to the mixture. The resulting solution was centrifuged at 1,200 g, and the petroleum ether layer was collected and dried under nitrogen. The residue was dissolved in 1 ml of methanol-ethanol (1:1) and filtered through a nylon membrane with 0.22- $\mu$ m pore size. It was then separated on reverse-phase C18 HPLC column (Nova Pack, 3.9  $\times$  150 mm, 5  $\mu$ m; Waters), using a methanol-ethanol mixture (1:1 by vol) containing 50 mM sodium acetate and 250 mM acetic acid as a mobile phase at a flow rate of 1 ml/min. Analysis was carried out by a digital electrochemical detector equipped with glassy carbon as a working electrode and a hydrogen electrode as a reference. The working electrode was set at 550 mV. The concentration of ubiquinol and vitamin E was estimated by using a calibration curve with standard solutions of known concentration.

**Mitochondrial and liver homogenate GSH content.** Acid extraction of GSH was performed using 1 and 10 mg of mitochondrial and liver homogenate protein, respectively, in 1 ml of solution containing 200 mM metansulfonic acid and 5 mM diethylenetriaminepentaacetic acid (34). The mixture was agitated in a vortex for 1 min and centrifuged at 21,000 g for 30 min at 4°C. Five hundred microliters of the supernatant was diluted 1:1 with the mobile phase (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05 mM octanesulfonic acid adjusted to pH 3 with phosphoric acid); this extract was filtered through a membrane of 45- $\mu$ m pore size; 50  $\mu$ l was analyzed by HPLC equipped with the same column as that described above and an electrochemical detector with a glassy carbon as a working electrode (+700 mV). The analysis was performed at a mobile phase flow rate of 1 ml/min. The concentration of GSH was estimated by comparison of the peak area with those of standard solutions of known concentration.

**Superoxide dismutase activity staining.** The technique using the native polyacrylamide gel is 10 times more efficient than the spectrophotometric method. It can assay the activity of a single superoxide dismutase (SOD) isoform on the polyacrylamide gel and excludes the interference coming from non-SOD molecules in the crude tissue extract, which is not possible to discard when the spectrophotometric method is used. SOD activity in mitochondria preparation was assessed as described (22). Briefly, 10  $\mu$ l of each sample (containing 2 mg/ml total protein) was loaded onto 5% stacking an 8% native polyacrylamide gel bathed in 1 $\times$  Tris-glycine buffer (pH 8.3), and the proteins were separated at constant current (120 V) at 4°C for 3 h. After electrophoresis, the gels were washed with 50 mM phosphate buffer, pH 7.8, for 10 min and then incubated in a solution containing 50 mM potassium phosphate (pH 7.8), 275  $\mu$ g/ml nitroblue tetrazolium, 65  $\mu$ g/ml riboflavin, and 0.25% tetramethylenediamine. After a 15-min incubation in the dark, the blue nitroblue tetrazolium stain for O<sub>2</sub><sup>-</sup> was rinsed in phosphate buffer and illuminated for 15 min with a UV light source. SOD activity appeared as clear bands on a blue background. The gels were then immediately scanned with a Gel Doc scanner (Bio-Rad), and the bands were quantified with Image Quant software (GE Healthcare). The results are reported as percentage of pixels.

**Catalase and glutathione peroxidase activities.** Catalase activity was determined using 50  $\mu$ g of liver homogenates and mitochondria by measuring the exponential decay of 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\Delta\epsilon_{240} = 39.4$  M/cm) in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0 monitored at 240 nm, and the activity was expressed as nanomoles per minute per milligram of protein, as described previously (60).

For glutathione peroxidase (GPx), 50  $\mu$ g of protein from isolated liver mitochondria from each animal was suspended in 1 ml of buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 5 mM EDTA, 1 mM GSH, 0.22 mM NADPH, and 0.4 U of glutathione reductase), and the reaction was initiated by adding *tert*-butyl hydroperoxide to a final concentration of 0.22 mM. NADPH consumption was monitored continuously over 3 min at 340 nm in a spectrophotometer. Final results were expressed as nanomoles per minute per milligram of mitochondrial protein.

**Statistical analysis.** All values are presented as means  $\pm$  SE. Between-group differences for selected variables were calculated

using one-way ANOVA. Differences were considered statistically significant at  $P < 0.05$ , calculated by a statistical and graphic system (SigmaPlot; Jandel).

## RESULTS

**Changes in insulin, TGs, FFAs, and intra-abdominal fat accumulation.** In the SFR model, obesity was induced by supplementing the animals' drinking water with sucrose. Both the body weight and the amount of intra-abdominal fat, an important characteristic of metabolic syndrome, a marker of insulin resistance, and a source of FFAs, increased in SFR. The levels of fasting plasma insulin, TGs, and FFAs also significantly increased in SFR relative to the control rats (CR), as described previously (18). However, the level of plasma glucose in SFR was not significantly different from that of CR (Table 1). The concentration of TG in the liver homogenate of SFR was significantly higher than that of CR.

**Mitochondrial oxygen uptake and respiratory complex activity.** The mitochondria from SFR exhibited significantly higher rates of oxygen uptake while oxidizing succinate/rotenone in the presence (state III) and absence (state IV) of ADP than the mitochondria from CR (Table 2). Although SFR mitochondria exhibited increased rates of oxygen uptake in both states, the ratio between the rates in state III and IV was not significantly different from that of the CR mitochondria.

The activities of the mitochondrial respiratory complexes CI, CIII, and CIV ( $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ ) from SFR did not differ significantly from those of CR. The activity of CII increased significantly in SFR mitochondria relative to CR mitochondria (Table 2).

**Proton leak.** Figure 1 illustrates the relationship between the respiration rate and membrane potential in liver mitochondria. SFR mitochondria consume more oxygen than CR mitochondria but generate the same  $\Delta\Psi$  ( $P < 0.01$ ). This result suggests that SFR mitochondria have a higher respiration rate and a lower membrane potential than CR mitochondria (Fig. 1A).

Oleic acid (2.5  $\mu\text{M}$ ) increased the respiration rate and decreased the membrane potential of both types of mitochondria (Fig. 1, B and C). The stimulation of proton leak by oleic acid appears to be larger ( $P < 0.01$ ) in SFR mitochondria (Fig. 1C) than in CR mitochondria (Fig. 1B).

We examined the possibility that UCP2 might be involved in the effect of oleate on mitochondrial respiration and membrane potential by adding GDP, an inhibitor of UCP2. GDP decreased the uncoupling effect of oleic acid on SFR mitochondria (Fig. 1C) and had no effect on CR mitochondria (Fig. 1B).

Table 1. General characteristics of animals

Variables	CR	SFR
Body mass, g	440 $\pm$ 29	526 $\pm$ 57*
Intra-abdominal fat, g	2.9 $\pm$ 0.8	15.3 $\pm$ 5.2**
Plasma triglycerides, mM	0.5 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.3**
Liver triglycerides, $\mu\text{mol}/\text{mg}$	65.5 $\pm$ 5.5	225.7 $\pm$ 30.6**
Plasma glucose, mM	6.2 $\pm$ 0.1	5.6 $\pm$ 0.5
Plasma insulin, pM	106.8 $\pm$ 17.4	285.2 $\pm$ 53.5***
Plasma FFA, mM	0.67 $\pm$ 0.04	1.26 $\pm$ 0.08**

Values are expressed as means  $\pm$  SE ( $n = 7$  different animals). CR, control rats; SFR, sucrose-fed rats; FFA, free fatty acids. Triglycerides in liver are expressed in  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein of liver homogenate. The values for all variables were obtained at the end of the treatment period. \*\*\*Significantly different from CR group ( $P < 0.001$ ); \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ .

Table 2. Mitochondria oxygen uptake and respiratory complex enzyme activities

	CR	SFR
RC	7.2 $\pm$ 0.5	7.4 $\pm$ 1.06
State III	110.9 $\pm$ 9.2	133.4 $\pm$ 9.2*
State IV	15.3 $\pm$ 0.7	19.7 $\pm$ 2.7*
NADH-DH (CI)	619.2 $\pm$ 36.4	683.5 $\pm$ 64.9
SDH (CII)	22.6 $\pm$ 1.5	32.9 $\pm$ 4.5*
SCCR (CIII)	38.5 $\pm$ 3.14	40.7 $\pm$ 4.8
COX (CIV)	297.5 $\pm$ 29.4	330.2 $\pm$ 29.15

Values are expressed as means  $\pm$  SE ( $n = 6$  different animals). RC, respiratory control; NADH-DH (CI), NADH-dehydrogenase (complex I); SDH (CII), succinate dehydrogenase (complex II); SCCR (CIII), succinate-cytochrome *c* oxidoreductase (complex III); COX (CIV), cytochrome *c* oxidase (complex IV). The rate of  $\text{O}_2$  consumption was expressed as  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ , and it was performed in the presence of 5 mM of succinate + rotenone. RC corresponds to the ratio of state III to state IV. Complex enzyme activities were expressed as  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ . \* $P < 0.05$ , CR vs. SFR. State IV respiration is defined as oxygen consumption by isolated mitochondria on a particular substrate in the absence of ADP or any metabolic poisons or inhibitors. State III respiration is defined as ADP-stimulated respiration.

This result suggests that the effect of GDP on the coupling efficiency in mitochondria from SFR may be mediated by an uncoupling protein such as UCP2.

**Generation of ROS by the mitochondria.** The mitochondrial electron transport chain produces the superoxide anion, which is converted by mitochondrial SOD to  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a more stable and more lipid-soluble metabolite than the superoxide anion.  $\text{H}_2\text{O}_2$  can be detected by the oxidation of DCF in the presence of peroxidase. In the absence of ADP (state IV), the SFR mitochondria that metabolized pyruvate/malate generated  $\text{H}_2\text{O}_2$  at a significantly greater rate than the CR mitochondria ( $2.04 \pm 0.05$  vs.  $0.8 \pm 0.05$   $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  protein; Fig. 2). In the presence of ADP (state III), SFR mitochondria generated much less  $\text{H}_2\text{O}_2$  than in state IV ( $0.29 \pm 0.07$  vs.  $2.04 \pm 0.05$   $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), and no statistically significant difference was observed between the SFR and CR mitochondria ( $0.29 \pm 0.07$  vs.  $0.21 \pm 0.06$   $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ).

Preincubation of the mitochondria with 0.5 mM GDP (an inhibitor of UCP2) resulted in increased ROS generation in SFR mitochondria but not in CR mitochondria. Adding GDP stimulated  $\text{H}_2\text{O}_2$  generation in SFR mitochondria under both conditions with and without ADP.

The addition of BSA to the incubation medium reduced the rate at which the mitochondria generated  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fig. 3A). At low concentrations of BSA (0.2 and 0.4 mg/ml), the rate of  $\text{H}_2\text{O}_2$  generation decreased faster in SFR mitochondria than in CR mitochondria. Increasing the concentration of BSA slowly decreased the generation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in SFR mitochondria but did not affect the CR mitochondria. These results show that BSA effectively traps mitochondria-associated FFA and reduces  $\text{H}_2\text{O}_2$  generation in SFR mitochondria. BSA significantly affected the rate of ROS generation in SFR mitochondria but did not completely recover the rate of ROS generation observed in CR mitochondria. Therefore, the addition of BSA partially protected CR mitochondria against the generation of ROS.

The addition of low concentrations of oleic acid (2.5 and 5 nmol/mg protein) did not affect the rate of ROS generation in the mitochondria of either group (Fig. 3B). At higher concentrations (10 nmol to 40 nmol/mg protein), oleic acid addition

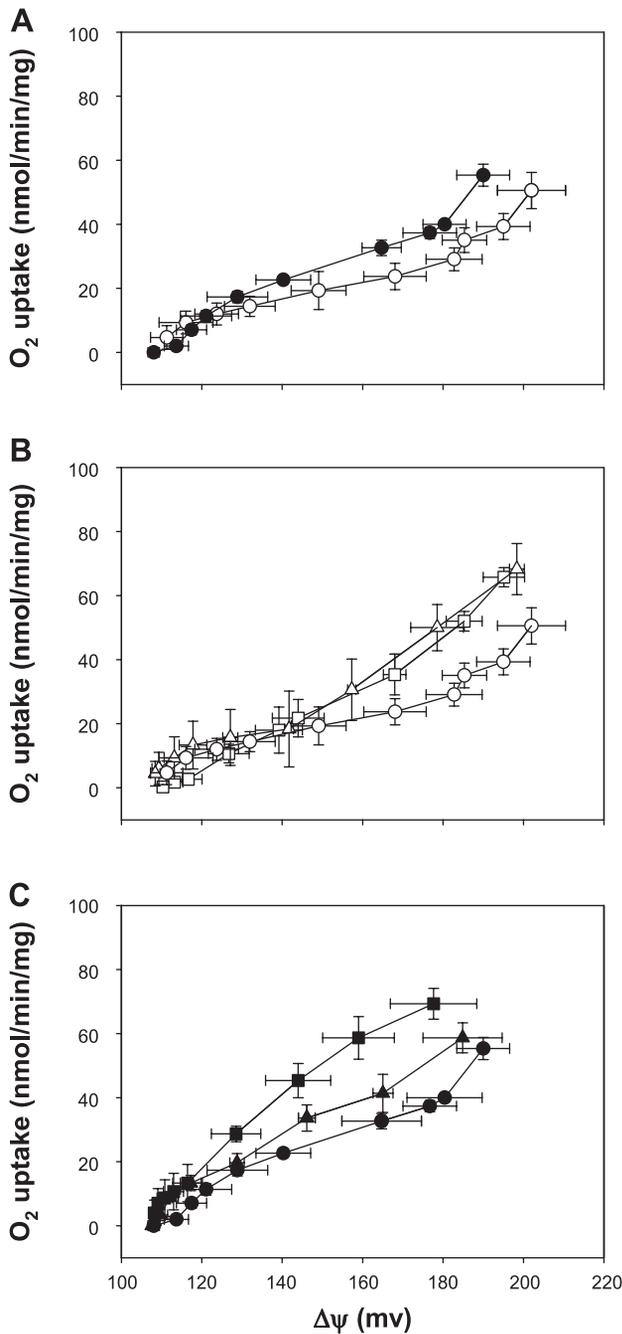


Fig. 1. A: oxygen uptake as a function of membrane potential in sucrose-fed rat (SFR; ●) and control rat (CR; ○) liver mitochondria. B: effect of oleic acid (□) and GDP (△) on proton leak in CR liver mitochondria. C: effect of oleic acid (■) and GDP (▲) on proton leak in SFR liver mitochondria. Data are expressed as the means ± SE (n = 5; different mitochondria preparations). The addition of 0.5 mM GDP, an uncoupling protein 2 (UCP2) inhibitor, reduced the effect of 2.5 μM oleic acid in SFR and did not affect it in CR. All experiments were performed in the presence of 5 mM succinate, 4 μM rotenone, 2 μM oligomycin, and 80 ng/ml nigericin, as described in MATERIALS AND METHODS. The difference between the entire SFR curve and CR is statistically significant (P < 0.05; estimated by Prism Pad software).

increased the rate of ROS generation in both types of mitochondria. The increased slope of the SFR curve at high concentrations of oleic acid suggests that the SFR mitochondria were more sensitive to oleic acid than the CR mitochondria. Similarly, linoleic acid addition, at the same concentrations, to

the mitochondria increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in both the SFR and CR mitochondria (Fig. 3C). At concentrations of linoleic acid with <30 nmol/mg protein, this increase was more pronounced in the SFR than in the CR mitochondria. At concentrations ≥30 nmol/mg protein, the rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation plateaued in both types of mitochondria. Linoleic acid stimulated the rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation to a much greater extent and at lower concentrations than oleic acid in both types of mitochondria (compare Fig. 3, B and C).

**Western blot of UCP2.** The expression level of UCP2 was higher in SFR mitochondria than in CR mitochondria, where it was very low (Fig. 4). No difference in the expression of ANT was observed between SFR and CR. Therefore, the level of ANT was used as a loading control.

**Liver homogenate and mitochondria FFA composition.** The total FFA concentration was increased significantly in both liver homogenate and mitochondria from SFR compared with those from CR (Table 3). Both tissues also exhibited a change in FFA composition. In SFR mitochondria, the concentrations of palmitic (P < 0.01), palmitoleic (P < 0.001), and oleic acid (P < 0.01) increased significantly, the concentration of arachidonic acid (P < 0.05) decreased, and the concentrations of stearic and linoleic acids did not change significantly. The concentrations of palmitic, palmitoleic, and oleic acid increased significantly in SFR liver homogenate, whereas the concentrations of polyunsaturated fatty acids, such as linoleic and arachidonic acids, did not change in either group of animals. The difference between the total FFA concentrations of the liver homogenate from SFR and CR animals was more important than the difference between the total FFA concentrations of the mitochondria of the two groups. This discrepancy might result from the mitochondria preparation procedure.

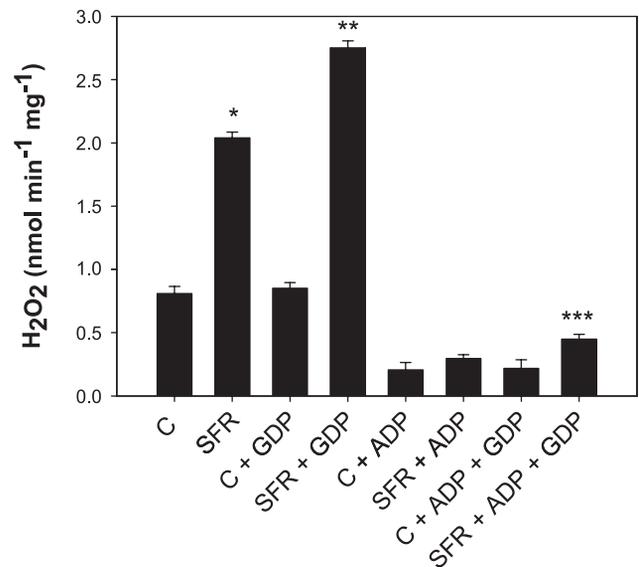


Fig. 2. Rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in the presence (state III) and absence (state IV) of ADP during mitochondrial respiration. A mixture of pyruvate and malate (5 and 3 mM, respectively) was used as the oxidative substrate, and GDP was used at 0.5 mM. The rate was calculated from a calibration curve of known concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as described in MATERIALS AND METHODS. The results are presented as the mean ± SE of 6 different experiments from 6 different animals in each group. \*P < 0.01 corresponds to SFR vs. CR; \*\*P < 0.01 corresponds to SFR + GDP vs. SFR; \*\*\*SFR + GDP + ADP vs. SFR + ADP. C, control.

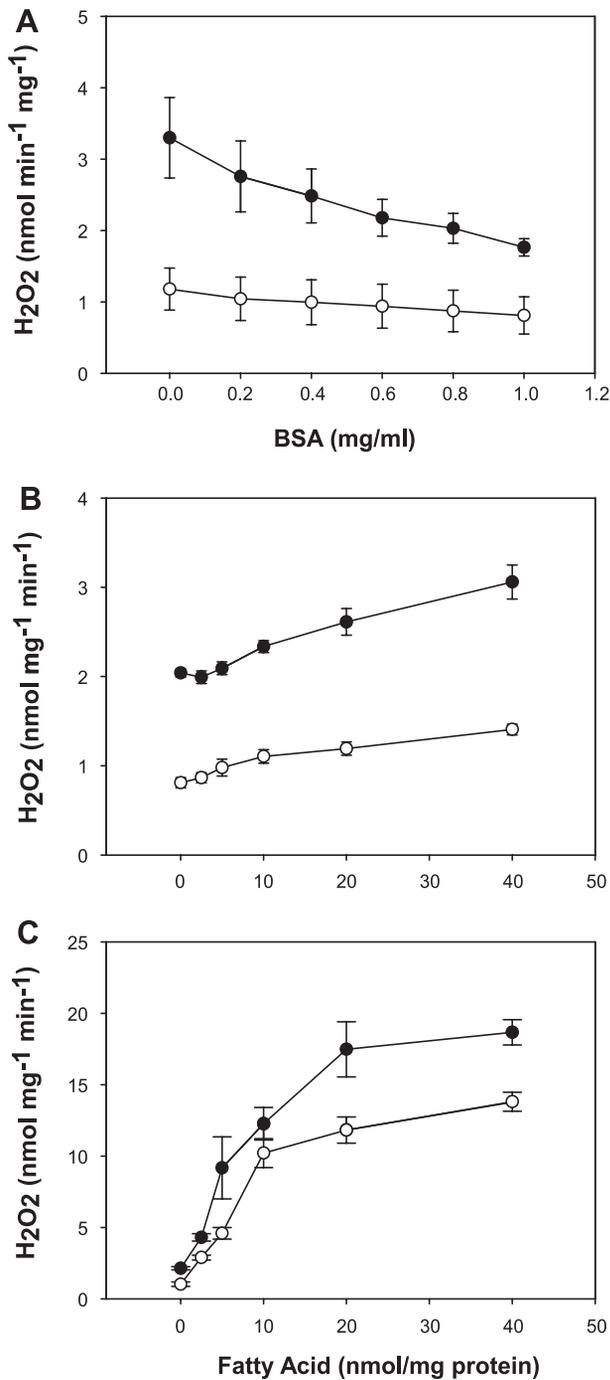


Fig. 3. Effects of fatty acid-free BSA (A), oleic acid (B), and linoleic acid (C) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. All experiments were performed in the presence of 2 μM oligomycin and 80 ng/ml nigericin. The mitochondria from CR (○) and SFR (●) rats were energized with a mixture of pyruvate and malate (5 and 3 mM each, respectively) and treated with different concentrations of BSA or FFA. Data correspond to the mean ± SE of 6 different animals.

procedure, which includes incubation step with 0.1% BSA to stabilize the mitochondrial membrane and remove any excess fat from the external membrane.

**Plasma, liver, and mitochondrial oxidative stress parameters.** The levels of lipid oxidation products, as measured by the TBARS assay, were significantly higher in both plasma ( $P < 0.05$ ) and liver homogenate ( $P < 0.01$ ) from SFR than in

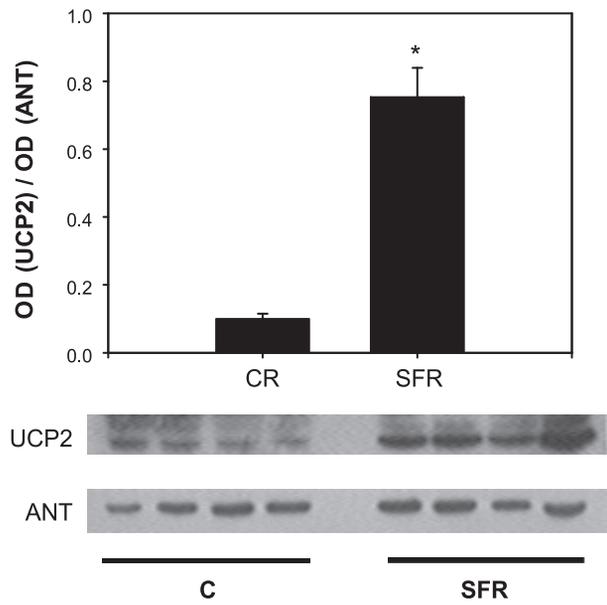


Fig. 4. Western blotting of UCP2. The membrane was incubated with goat polyclonal antibody to the NH<sub>2</sub>-terminal domain of UCP2 and with goat polyclonal anti-adenine nucleotide translocase (ANT; 1/1,000) after stripping for control load, as described in MATERIALS AND METHODS. Data correspond to means ± SE of 6 different mitochondria preparations from each animal. \* $P < 0.001$ . The Western blot is representative of 1 experiment, and each band corresponds to 1 mitochondria preparation from each animal. OD, optical density.

samples from CR. In contrast, no statistically significant change in the concentration of TBARS was observed in the mitochondria from either group (Table 4). The protein oxidation level, measured as protein carbonylation, was significantly greater ( $P < 0.05$ ) in the liver homogenate of SFR than in the homogenate of CR, whereas no difference was observed between the mitochondria of the two groups.

**Mitochondrial vitamin E, ubiquinols, and reduced glutathione.** The concentration of vitamin E was significantly smaller ( $P < 0.01$ ) in SFR mitochondria than in CR mitochondria (Table 5). The levels of reduced CoQ<sub>9</sub> and CoQ<sub>10</sub> were both significantly lower in SFR mitochondria ( $P < 0.05$ ). The amount of GSH decreased by ~60% in SFR liver homogenate and by ~28% in SFR mitochondria relative to CR tissues ( $P < 0.05$ ; Table 5).

**Activity of GPx, catalase, and mitSOD.** The activity of GPx in both total liver homogenate and mitochondria from SFR was

Table 3. FFA composition of mitochondria and liver homogenate

FFA	Mitochondria		Liver Homogenate	
	CR	SFR	CR	SFR
Palmitic	14.5 ± 0.7	21.8 ± 1.1**	29.8 ± 2.7	35.8 ± 3.1*
Palmitoleic	0.6 ± 0.5	3.2 ± 0.8***	1.6 ± 0.8	6.3 ± 1.1**
Stearic	13.8 ± 0.8	11.7 ± 0.4	12.2 ± 1.9	13.3 ± 1.2
Oleic	3.4 ± 0.2	10.8 ± 0.7**	11.1 ± 1.8	32.1 ± 3.7***
Linoleic	6.7 ± 1.17	5.2 ± 1.1	14.3 ± 2.8	17.9 ± 2.2
Araquidonic	7.0 ± 1.1	4.9 ± 0.9*	10.2 ± 2.9	11.9 ± 1.9
Total FFA	55.1 ± 2.7	62.6 ± 2.3*	78.5 ± 3.2	117.5 ± 3.8***

Data are means ± SE and represent the concentration in μmol/mg protein in liver homogenate and in nmol/mg protein in mitochondria ( $n = 7$  different animals). \*\*\*Significantly different from CR group ( $P < 0.001$ ); \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ .

Table 4. Oxidative stress markers

Variables	CR	SFR
TBARS, nmol/mg protein		
Liver homogenate	12.4 ± 2.2	23.0 ± 1.2**
Mitochondria	0.12 ± 0.5	0.15 ± 0.03
Plasma, μM	3.8 ± 0.5	7.1 ± 1.3*
Protein carbonyls, nmol/mg protein		
Liver homogenate	0.64 ± 0.05	0.82 ± 0.05*
Mitochondria	1.5 ± 0.086	1.63 ± 0.13

Values are expressed as means ± SE ( $n = 6$  different animals). TBARS, thiobarbituric acid-reactive substances. The values for all variables were obtained at the end of the treatment period. \*\*Significantly different from CR group ( $P < 0.01$ ); \* $P < 0.05$ .

no different from that of CR. The activity of catalase was significantly lower in both liver homogenate and mitochondria from SFR than in CR tissues (Table 5).

The technique used to assay SOD (mitSOD) activity, a combination of polyacrylamide gel electrophoresis and densitometry, allowed good separation of MnSOD from Cu/Zn-SOD. The band profile of MnSOD from the SFR mitochondria was no different from that of the CR mitochondria (Fig. 5). The density of bands corresponding to the activity of Cu/Zn-SOD from the SFR mitochondria appeared to be higher than that from the CR mitochondria. This band completely disappeared when the gel was preincubated with sodium cyanide, an inhibitor of Cu/Zn-SOD (data not shown).

## DISCUSSION

**Oxidative stress markers in fatty liver.** Supplementing the animals' drinking water with sucrose resulted in increased levels of FFAs and TGs in both plasma and the liver, as described previously (18). The accumulation of TGs in the liver could arise from the esterification of fatty acids taken up in the circulation, from de novo lipogenesis, or both, as reviewed elsewhere (41). In our model, the accumulation of FFAs and TGs in the liver could result from insulin resistance, which is reflected in the accumulation of fat in the intra-abdominal cavity. It has been suggested that FFAs secreted

Table 5. Antioxidant activities in liver homogenate and mitochondria

Variables	CR	SFR
Mitochondria		
Vitamin E, μmol/mg protein	0.92 ± 0.09	0.32 ± 0.028**
CoQ <sub>9red</sub> , nmol/mg protein	0.46 ± 0.05	0.38 ± 0.04*
CoQ <sub>10red</sub> , nmol/mg protein	0.13 ± 0.01	0.09 ± 0.02*
GSH, nmol/mg protein		
Mitochondria	2.5 ± 0.18	1.8 ± 0.02*
Liver homogenate	45.5 ± 8.53	17.5 ± 4.56**
Catalase, nmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup>		
Liver homogenate	477 ± 26	389 ± 29*
Mitochondria	350 ± 50	285 ± 35
GPx, nmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup>		
Liver homogenate	56 ± 6	46 ± 5
Mitochondria	69 ± 8	57 ± 9

Values are expressed as means ± SE ( $n = 6$  different animals). GPx, glutathione peroxidase. The values for all variables were obtained at the end of the treatment period. Catalase and GPx activities were determined in both liver homogenate and mitochondria. Vitamin E, CoQ<sub>9red</sub>, and CoQ<sub>10red</sub> were analyzed in liver mitochondria. \*\*Significantly different from control group ( $P < 0.01$ ); \* $P < 0.05$ .

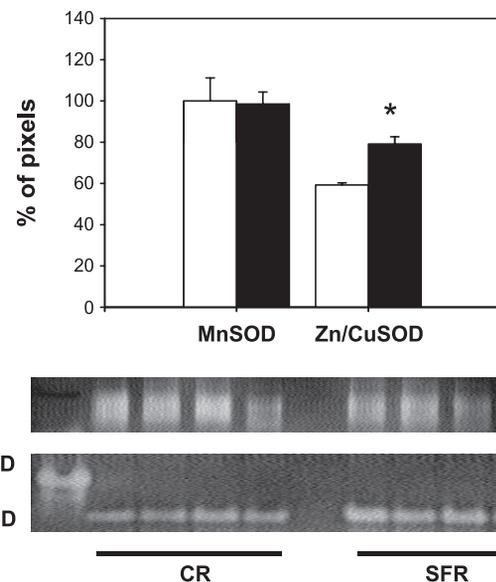


Fig. 5. Superoxide dismutase (SOD) activity staining in the mitochondria from SFR (black bars) and CR (open bars). A total of 10 μl of each sample (containing 2 mg/ml total protein) was loaded onto a 10% native polyacrylamide gel. The activity of SOD was detected as described in MATERIALS AND METHODS. The gel was scanned with a Gel Doc scanner (Bio-Rad), and the bands were quantified with Image Quant software (GE Healthcare). One hundred percent corresponds to the mean of pixels in the Mn-SOD activity band from control animals. Data correspond to means ± SE of 6 different mitochondria preparations from each animal. \* $P < 0.05$ , CR Zn/Cu-SOD vs. SFR Zn/Cu-SOD. The gel is representative of 1 experiment. Each band corresponds to 1 mitochondria preparation from each animal. The band corresponding to 100 ng of Bovine Cu/Zn-SOD, purchased from Sigma, is considered as a positive control of SOD activity.

into the local circulation by accumulated intra-abdominal adipose tissue play a major role in the development of fatty liver (59).

TGs and FFAs have been shown to induce ROS production and cellular necrosis (2, 48). The increased levels of lipid peroxidation (TBARS) and protein carbonylation that we observed in SFR liver homogenate can be attributed to increased levels of FFAs, such as palmitic acid and oleic acid. Palmitic acid may induce hepatic insulin resistance by stimulating the production of superoxide anions by NADPH oxidase (24). The generation of ROS via the NADPH oxidase system has been shown to contribute to oxidative stress in several pathologies. Nevertheless, further study is needed to clarify the contribution of this system to the development of oxidative stress in the liver in the context of our model of abdominal obesity.

The high availability of TGs and FFAs as energetic substrates for oxidation makes the mitochondria one of the major sources of ROS, which can then contribute to the oxidative stress observed in the liver homogenate. FFAs can induce superoxide anion generation by directly interacting with mitochondrial complexes I or III, inhibiting their activities and affecting the mitochondrial electron transport chain (48, 49).

**Mitochondrial ROS generation and FFAs.** The mitochondria isolated from SFR generated ROS at a higher rate than the CR mitochondria when pyruvate and malate were used as the oxidizable substrates (forward electron transport mode). The difference in the rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation between isolated mitochondria from SFR and CR may arise from the increased levels of FFAs found in SFR mitochondria. Accordingly, the

addition of BSA to the mitochondria incubation medium reduced the  $H_2O_2$  generation rate of the SFR mitochondria more than that of the CR mitochondria. BSA may bind FFAs and reduce their ability to stimulate the rate of ROS generation in SFR mitochondria. In this research, BSA was included during the preparation of mitochondria but not in the media used for the experimental analyses. The presence of BSA in the assay of mitochondrial function may obscure the contribution of FFAs to pathological states. In several studies of mitochondria isolated from ischemic liver tissue, the inclusion of BSA reversed mitochondrial dysfunction entirely (4, 20). The increased sensitivity of the SFR mitochondria to BSA indicates the presence of higher levels of FFAs than in the CR mitochondria. Analysis of the FFA composition revealed increased amounts of palmitic, palmitoleic, and oleic acids in SFR mitochondria. Thus, the difference in the rate of in vitro ROS generation between the two groups of mitochondria may arise from differing levels of FFA accumulation in the mitochondria. FFAs have been shown to increase the rate of ROS generation by the forward mode of electron transport when pyruvate and malate are used as substrates (49). In our experiments, the minimal concentration required for oleic acid to stimulate the rate of  $H_2O_2$  generation was similar to that found in isolated mitochondria from SFR rats ( $\sim 10$  nmol/mg protein). Linoleic acid stimulated the rate of  $H_2O_2$  generation at much lower concentrations than oleic acid in both types of mitochondria. In general, mitochondria from both SFR and control animals were more sensitive to exogenous linoleic than oleic acid in generating ROS. This difference in sensitivity may arise from the difference in the number and position of double bonds present in the carbon chain of each fatty acid. The mechanism by which the number and position of double bonds of FFA may affect mitochondrial ROS generation is not known. Any explanation of fatty acid interaction with mitochondrial respiratory complex proteins will necessarily be speculative because studies on the interaction of these protein structures with FFAs are not yet available. For a given FFA chain length, the aqueous solubility of a fatty acid increases exponentially with the level of unsaturation in the chain (53). Richieri et al. (45) reported that there is little difference between the binding affinities of oleic and linoleic acids for liver fatty acid-binding protein. Thus, the increasing aqueous solubility of fatty acids with increasing carbon chain unsaturation may indicate that water solubility plays an important role in determining the difference between the effects of oleic and linoleic acids on mitochondrial ROS generation. Furthermore, other studies have shown that arachidonic acid, a polyunsaturated FFA, stimulates ROS generation in the mitochondria from the liver and heart more strongly than oleic and palmitic acids (10).

**Function of mitochondria and UCP2.** SFR mitochondria exhibited increased ROS generation despite simultaneously overexpressing UCP2. Although the function of UCP2 is still unclear, it has been linked to the accumulation of FFAs in hepatocytes and muscle cells (12, 46) and to mitochondrial ROS production (43). The mild uncoupling mediated by UCP2 may accelerate respiration rates and reduce the generation of ROS.

The increased proton leak rate exhibited by isolated mitochondria from SFR may arise from the upregulation of UCP2 and the increased FFA levels in the mitochondria. In SFR mitochondria, the proton leak was associated with increases in

both state III and state IV respiration rates, although the ratio corresponding to the respiratory control (for RC see Table 2) did not differ between the two groups of mitochondria. This result indicates that mitochondria from the SFR liver, which consume oxygen at a high rate, are as well coupled to the phosphorylation of ADP to produce ATP as the mitochondria from CR liver despite the overexpression of UCP2. This phenomenon is not unique to our system. The mitochondrial oxygen uptake of heart and muscle tissue from diabetic animals has been shown to be more coupled to ATP synthesis in the presence of ADP than from control animals despite an approximately two- to fourfold increase in UCP3 content. These results suggest that the expression of UCPs and respiration are not completely interconnected (28).

**Oxidative stress and activity of mitochondrial respiratory complexes.** The normal activities of mitochondrial respiratory complexes I and III and the increased activity of complex II suggest that SFR mitochondria have developed an adaptive mechanism to protect the mitochondrial respiratory complexes from oxidative stress. The mitochondrial respiratory complex activities have been shown to be highly susceptible to oxidative stress (56).

This protection can be attributed to normal activity levels of mitochondrial antioxidant enzymes such as catalase, GPx, and Mn-SOD, which prevent the accumulation of  $H_2O_2$  and oxidative stress that may damage respiratory complex proteins. In mice given a high-fat diet, overexpression of catalase in muscle mitochondria attenuated  $H_2O_2$  generation and completely preserved insulin resistance (2).

In several pathologies, such as diabetes, vascular and neurodegenerative diseases, and aging, the inactivation of mitochondrial respiratory complexes or alterations of critical subunits are also thought to produce ROS (31, 35, 44). We did not observe any significant difference in the activities of mitochondrial respiratory complexes I and III (the main source of superoxide anion generation) between the two types of mitochondria. This result suggests that mitochondrial respiratory electron transfer did not accumulate electrons, which are transferred to oxygen by monovalent reduction to form a superoxide anion. This observation is consistent with an association between FFA accumulation and increased  $H_2O_2$  generation in SFR mitochondria.

**Redox status of mitochondria and liver homogenate.** The increased rate of  $H_2O_2$  generation could also result from the higher activity of Cu/Zn-SOD in the intermembrane space of the mitochondria. The increased activity of this enzyme may be a response to prevent the accumulation of oxidative damage in mitochondria. Paradoxically, increased activity of Cu/Zn-SOD has also been suggested to boost the production of toxic  $H_2O_2$  in the intermembrane space of liver mitochondria (26). The excess  $H_2O_2$  may affect the redox state of the entire liver and decrease the concentration of reduced GSH, as reviewed elsewhere (7). In our model of high-sucrose diet-induced obesity, the amount of reduced GSH decreased by  $\sim 60\%$  in the liver homogenate, but it decreased by only 28% in the mitochondria. The decreased level of GSH is a good indicator of altered redox status in the liver of SFR animals. The elevated activity of Cu/Zn-SOD in the intermembrane space of the mitochondria and the reduced activity of catalase in the liver homogenate may contribute to the accumulation of  $H_2O_2$ .  $H_2O_2$  can be degraded to hydroxyl radical (HO) by the Fenton reaction,

ultimately producing high levels of MDA (a final product of lipid peroxidation) and protein carbonylation in liver homogenate from SFR. Furthermore, the decreased levels of reduced CoQ<sub>10</sub>, vitamin E, and reduced glutathione could also contribute to the increased rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by SFR mitochondria. Reduced glutathione, vitamin E, and CoQ<sub>10</sub> are primary intracellular antioxidants; reduction of the intracellular content of or depletion of the levels of these compounds has been shown to reflect the generation of ROS (25, 27).

**Summary.** The high-sucrose diet-induced accumulation of fat in the liver did not affect the oxidative phosphorylation capacity of the mitochondria despite the increased levels of FFAs in the mitochondria and the overexpression of UCP2. In addition, the mitochondria from SFR did not exhibit increased levels of oxidative markers such as MDA and protein carbonylation despite displaying an increased rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in vitro. The increased rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation could also result from decreased levels of reduced CoQ<sub>10</sub>, vitamin E, and reduced glutathione and elevated activity of Cu/Zn-SOD in the mitochondrial intermembrane space. The excess H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the intermembrane space may cross the external mitochondrial membrane and affect the redox state of the entire liver by decreasing the concentration of reduced GSH. Additionally, the reduced activity of catalase observed in the SFR liver homogenate may contribute to increased levels of lipid peroxidation and protein carbonylation in whole liver cells.

Together, our observations indicate that although mitochondria develop an internal adaptive mechanism against oxidative stress and hyperlipidemia, they are inefficient at counteracting redox imbalances and inhibiting FFA-induced extramitochondrial oxidative stress in whole fatty liver cells challenged by obesity resulting from long-term exposure to a high-sucrose diet.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We greatly acknowledge the partial support from the doctorate program in Biological Sciences of the National Autonomous University of Mexico to Angélica Ruiz-Ramirez.

#### GRANTS

This work was supported in part by the Institute of Science and Technology of the Federal District, Mexico City (ICyTDF), Mexico (Grant No. PICDS08-67).

#### DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.R.R., M.C.S., J.A.P.F., E.G.Z., F.R.M., and M.E.H. performed the experiments; A.R.R., M.C.S., J.A.P.F., F.R.M., and M.E.H. analyzed the data; A.R.R. and M.E.H. interpreted the results of the experiments; A.R.R. and M.E.H. prepared the figures; A.R.R., M.C.S., J.A.P.F., E.G.Z., F.R.M., and M.E.H. approved the final version of the manuscript; M.E.H. did the conception and design of the research; M.E.H. drafted the manuscript; M.E.H. edited and revised the manuscript.

#### REFERENCES

- Alberici LC, Vercesi AE, Oliveira HC. Mitochondrial energy metabolism and redox responses to hypertriglyceridemia. *J Bioenerg Biomembr* 43: 19–23, 2011.
- Anderson EJ, Lustig ME, Boyle KE, Woodlief TL, Kane DA, Lin CT, Price JW 3rd, Kang L, Rabinovitch PS, Szeto HH, Houmard JA, Cortright RN, Wasserman DH, Neuffer PD. Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J Clin Invest* 119: 573–581, 2009.
- Aronis A, Madar Z, Tirosh O. Mechanism underlying oxidative stress-mediated lipotoxicity: exposure of J774.2 macrophages to triacylglycerols facilitates mitochondrial reactive oxygen species production and cellular necrosis. *Free Radic Biol Med* 38: 1221–1230, 2005.
- Boime I, Smith EE, Hunter FE Jr. The role of fatty acids in mitochondrial changes during liver ischemia. *Arch Biochem Biophys* 139: 425–443, 1970.
- Bose M, Lambert JD, Ju J, Reuhl KR, Shapses SA, Yang CS. The major green tea polyphenol, (–)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome and fatty liver disease in high-fat-fed mice. *J Nutr* 138: 1677–1683, 2008.
- Boss O, Hagen T, Lowell BB. Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism. *Diabetes* 49: 143–156, 2000.
- Cesaratto L, Vascotto C, Calligaris S, Tell G. The importance of redox state in liver damage. *Ann Hepatol* 3: 86–92, 2004.
- Chavin KD, Yang S, Lin HZ, Chatham J, Chacko VP, Hoek JB, Walajjys-Rode E, Rashid A, Chen CH, Huang CC, Wu TC, Lane MD, Diehl AM. Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. *J Biol Chem* 274: 5692–5700, 1999.
- Ciapaite J, Bakker SJ, Van Eikenhorst G, Wagner MJ, Teerlink T, Schalkwijk CG, Fodor M, Ouwens DM, Diamant M, Heine RJ, Westerhoff HV, Krab K. Functioning of oxidative phosphorylation in liver mitochondria of high-fat diet fed rats. *Biochim Biophys Acta* 1772: 307–316, 2007.
- Cocco T, Di Paola M, Papa S, Lorusso M. Arachidonic acid interaction with the mitochondrial electron transport chain promotes reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med* 27: 51–59, 1999.
- Delarue J, Magnan C. Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10: 142–148, 2007.
- Di Paola M, Lorusso M. Interaction of free fatty acid with mitochondria: coupling, uncoupling and permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1757: 1330–1337, 2006.
- Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 115: 1343–1351, 2005.
- Duval C, Negre-Salvayre A, Dogilo A, Salvayre R, Penicaud L, Casteilla L. Increased reactive oxygen species production with antisense oligonucleotides directed against uncoupling protein 2 in murine endothelial cells. *Biochem Cell Biol* 80: 757–764, 2002.
- Eccleston HB, Andringa KK, Betancourt AM, King AL, Mantena SK, Swain TM, Tinsley HN, Nolte RN, Nagy TR, Abrams GA, Bailey SM. Chronic exposure to a high-fat diet induces hepatic steatosis, impairs nitric oxide bioavailability, and modifies the mitochondrial proteome in mice. *Antioxid Redox Signal* 15: 447–459, 2011.
- El Hafidi M, Baños G. In vivo plasma lipid oxidation in sugar-induced rat hypertriglyceridemia and hypertension. *Hypertension* 30: 624–628, 1997.
- El Hafidi M, Cuéllar A, Ramírez J, Baños G. Effect of sucrose addition to drinking water, that induces hypertension in the rats, on liver microsomal Delta9 and Delta5-desaturase activities. *J Nutr Biochem* 12: 396–403, 2001.
- El Hafidi M, Pérez I, Zamora J, Soto V, Carvajal-Sandoval G, Baños G. Glycine intake decreases plasma free fatty acids, adipose cell size, and blood pressure in sucrose-fed rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R1387–R1393, 2004.
- Feillet-Coudray C, Sutra T, Fouret G, Ramos J, Wrutniak-Cabello C, Cabello G, Cristol JP, Coudray C. Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effect of polyphenols: Involvement of mitochondrial and NAD(P)H oxidase systems. *Free Radic Biol Med* 46: 624–632, 2009.
- Feldkamp T, Kribben A, Roeser NF, Senter RA, Weinberg JM. Accumulation of nonesterified fatty acids causes the sustained energetic deficit in kidney proximal tubules after hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F465–F477, 2006.
- Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, Burgart LJ, Gores GJ. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- $\alpha$  expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 40: 185–194, 2004.
- Flohé L, Otting F. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol* 105: 93–104, 1984.

23. Folch L, Lees M, Sloane-Stanley CH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 22: 697–709, 1957.
24. Gao D, Nong S, Huang X, Lu Y, Zhao H, Lin Y, Man Y, Wang S, Yang J, Li J. The effects of palmitate on hepatic insulin resistance are mediated by NADPH Oxidase 3-derived reactive oxygen species through JNK and p38MAPK pathways. *J Biol Chem* 285: 29965–29973, 2010.
25. Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch. *J Gastroenterol Hepatol* 3: S3–S6, 2006.
26. Goldsteins G, Keksa-Goldsteine V, Ahtoniemi T, Jaronen M, Arens E, Åkeman K, Chan PH, Koistinaho J. Deleterious role of superoxide dismutase in the mitochondrial intermembrane space. *J Biol Chem* 283: 8446–8452, 2008.
27. González R, Ferrín G, Hidalgo AB, Ranchal I, López-Cillero P, Santos-González M, López-Lluch G, Briceño J, Gómez MA, Poyato A, Villalba JM, Navas P, de la Mata M, Muntané J. N-acetylcysteine, coenzyme Q10 and superoxide dismutase mimetic prevent mitochondrial cell dysfunction and cell death induced by D-galactosamine in primary culture of human hepatocytes. *Chem Biol Interact* 181: 95–106, 2009.
28. Herlein JA, Fink BD, O'Malley Y, Sivitz WI. Superoxide and respiratory coupling in mitochondria of insulin-deficient diabetic rats. *Endocrinology* 150: 46–55, 2009.
29. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 49: 1939–1945, 2000.
30. Kim F, Tysseling KA, Rice J, Pham M, Haji L, Gallis BM, Baas AS, Paramsothy P, Giachelli CM, Corson MA, Raines EW. Free fatty acid impairment of nitric oxide production in endothelial cells is mediated by IKKbeta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 989–994, 2005.
31. Kim HY, Chung JM, Chung K. Increased production of mitochondrial superoxide in the spinal cord induces pain behaviors in mice: the effect of mitochondrial electron transport complex inhibitors. *Neurosci Lett* 447: 87–91, 2008.
32. Krauss S, Zhang CY, Lowell BB. A significant portion of mitochondrial proton leak in intact thymocytes depends on expression of UCP2. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 118–122, 2002.
33. Kussmaul L, Hirst J. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 7607–7612, 2006.
34. Lakritz J, Plopper CG, Buckpitt AR. Validated high-performance liquid chromatography-electrochemical method for determination of glutathione and glutathione disulfide in small tissue samples. *Anal Biochem* 247: 63–68, 1997.
35. Lee HK, Cho YM, Kwak SH, Lim S, Park KS, Shim EB. Mitochondrial dysfunction and metabolic syndrome—looking for environmental factors. *Biochim Biophys Acta* 1800: 282–289, 2010.
36. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman E. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186: 464–478, 1990.
37. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr A, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275, 1951.
38. Mantena SK, King AL, Andringa KK, Eccleston HB, Bailey SM. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol and obesity-induced fatty liver diseases. *Free Radic Biol Med* 44: 1259–1272, 2008.
39. Mantena SK, Vaughn DP, Andringa KK, Eccleston HB, King AL, Abrams GA, Doeller JE, Kraus DW, Darley-Usmar VM, Bailey SM. High fat diet induces dysregulation of hepatic oxygen gradients and mitochondrial function in vivo. *Biochem J* 417: 183–193, 2009.
40. Nägele U, Hägele EO, Sauer G, Wiedemann E, Lehmann P, Wahlefeld AW, Gruber W. Reagent for the enzymatic determination of serum total triglycerides with improved lipolytic efficiency. *J Clin Chem Clin Biochem* 22: 165–174, 1984.
41. Nagle CA, Klett EL, Coleman RA. Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance. *J Lipid Res* 50: S74–S79, 2009.
42. Nakamura S, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Takayama H, Misu H, Noda H, Nabemoto S, Kurita S, Ota T, Ando H, Miyamoto K. Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J Biol Chem* 284: 14809–14818, 2009.
43. Nègre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, Cazenave R, Troly M, Salvayre R, Pénicaud L, Casteilla L. A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J* 11: 809–815, 1997.
44. Petrosillo G, Matera M, Moro N, Ruggiero FM, Paradies G. Mitochondrial complex I dysfunction in rat heart with aging: critical role of reactive oxygen species and cardiolipin. *Free Radic Biol Med* 46: 88–94, 2009.
45. Richieri GV, Ogata RT, Kleinfeld AM. Thermodynamic and kinetic properties of fatty acid interactions with rat liver fatty acid-binding protein. *J Biol Chem* 271: 31068–31074, 1996.
46. Rodríguez AM, Sánchez J, Tobaruela A, Priego T, Picó C, Palou A. Time-course effects of increased fatty acid supply on the expression of genes involved in lipid/glucose metabolism in muscle cells. *Cell Physiol Biochem* 25: 337–346, 2010.
47. Scaduto RC Jr, Grotyohann LW. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J* 76: 469–477, 1999.
48. Schönfeld P, Wojtczak L. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 45: 231–241, 2008.
49. Schönfeld P, Wojtczak L. Fatty acids decrease mitochondrial generation of reactive species at the reverse electron transport but increase it at the forward transport. *Biochim Biophys Acta* 1767: 1032–1040, 2007.
50. Schönfeld P, Reiser G. Rotenone-like action of the branched-chain phytanic acid induces oxidative stress in mitochondria. *J Biol Chem* 281: 7136–7142, 2006.
51. Tang HP, Miles VM, DeGrauw A. HPLC analysis of reduced and oxidized coenzyme Q10 in human plasma. *Anal Biochem* 47: 256–265, 2002.
52. Takada M, Ikenoya S, Yuzuriha T, Katayama K. Simultaneous determination of reduced and oxidized ubiquinones. *Methods Enzymol* 105: 147–155, 1984.
53. Tanford C. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*. New York: John Wiley and Sons, 1973, p. 6–14.
54. Tserng KI, Kleigman RM, Mietenen EL, Kalham SC. A rapid, simple and sensitive procedure for the determination of free fatty acid in plasma using glass capillary column liquid chromatography. *J Lipid Res* 22: 852–858, 1981.
55. van den Broek NM, Ciapaite J, De Feyter HM, Houten SM, Wanders RJ, Jeneson JA, Nicolay K, Prompers JJ. Increased mitochondrial content rescues in vivo muscle oxidative capacity in long-term high-fat-diet-fed rats. *FASEB J* 24: 1354–1364, 2010.
56. Vázquez-Memije ME, Cárdenas-Méndez MJ, Tolosa A, Hafidi ME. Respiratory chain complexes and membrane fatty acids composition in rat testis mitochondria throughout development and ageing. *Exp Gerontol* 40: 482–490, 2005.
57. Verrijken A, Francque S, Van Gaal L. The metabolic syndrome and the liver. *Acta Gastroenterol Belg* 71: 48–59, 2008.
58. Watanabe S, Yaginuma R, Ikejima K, Miyazaki A. Liver diseases and metabolic syndrome. *J Gastroenterol* 43: 509–518, 2008.
59. Wree A, Kahraman A, Gerken G, Canbay A. Obesity affects the liver—the link between adipocytes and hepatocytes. *Digestion* 83: 124–133, 2011.
60. Yang S, Zhu H, Li Y, Lin HZ, Gabrielson K, Trush MA, Diehl AM. Mitochondrial adaptation to obesity-related oxidant stress. *Arch Biochem Biophys* 387: 259–268, 2000.