



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO DE LOS SUSTRATOS DE LA BETA OXIDACIÓN
SOBRE LA LIBERACIÓN DEL CITOCROMO C EN MITOCONDRIAS AISLADAS
DE UN MODELO CON SÍNDROME METABÓLICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

AZUCENA PÉREZ SALDAÑA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Jesús Fernando Montiel Aguirre**
VOCAL: **Profesor: Mohammed El-Hafidi Bentlakder**
SECRETARIO: **Profesor: Perla Deyanira Maldonado Jiménez**
1er. SUPLENTE: **Profesor: Laura Carmona Salazar**
2º SUPLENTE: **Profesor: Aurora Lara Núñez**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE
CARDIOLOGÍA “IGNACIO CHÁVEZ” DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA
CARDIOVASCULAR**

ASESOR DEL TEMA:

Mohammed El Hafidi Bentlakder

SUSTENTANTE:

Azucena Pérez Saldaña

Agradecimientos:

***Este trabajo fue apoyado por el proyecto No. 106845 de CONACyT;
Responsable técnico Dr. Mohammed El Hafidi BentLakder***

***Gracias al Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez por el espacio y
el apoyo brindado durante mi estancia.***

Agradecimientos:

Quiero agradecer a mis padres Lucia Saldaña de la Riva y Edmundo Pérez Ramos, los quiero mucho, gracias por todo su amor, cariño, por toda su entrega para que mis hermanas y yo estemos bien, gracias por escuchar me y dar me consejos. También les agradezco su apoyo a lo largo de mi trayectoria escolar por sus explicaciones, por las veces en las que me ayudaron a preparar un examen o a preparar un trabajo escolar. Gracia por siempre estar a mi lado y querer me mucho.

También doy las gracias a mi hermana mayor Olivia y a mi gemela Alhelí, ustedes siempre me apoyaron y hemos vivido muchas cosas juntas, son mis mejores amigas y las quiero mucho.

**

Agradezco también a mi tutor de licenciatura el Dr. Mohammed pues siempre estuvo ahí enseñándome las técnicas y la teoría, siempre aclarando mis dudas y confiando en mi trabajo.

ÍNDICE	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	8
ABREVIATURAS	9
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	12
1. ANTECEDENTES	14
1.1 El Síndrome Metabólico	14
1.1.1 Diagnóstico del SM.....	16
1.1.2 Modelos animales de SM.....	17
1.2 El hígado graso no alcohólico (HGNA)	22
1.3 Metabolismo de hidratos de carbono	23
1.4 Lipogénesis en el SM	25
1.5 Disfunción mitocondrial en el HGNA	27
1.6 Muerte celular programada (apoptosis) e HGNA	32
1.7 Liberación del citocromo c mitocondrial	33
2. JUSTIFICACIÓN	35
3. HIPÓTESIS	36
4. OBJETIVOS	36
5. METODOLOGÍA	37
5.1 Reactivos utilizados en los diferentes experimentos	37
5.2 Desarrollo del modelo con SM	37
5.3 Análisis de los parámetros bioquímicos plasmáticos	38
5.4 Extracción de mitocondrias de hígado	38
5.5 Determinación de proteína	39
5.6 Función mitocondrial	40

5.7 Análisis de ácidos grasos no esterificados en plasma, en homogenado y en mitocondrias aisladas de hígado	40
5.8 Liberación de citocromo c	41
5.9 Potencial transmambranal.....	42
5.10 Análisis estadístico.....	43
6. RESULTADOS	44
7. DISCUSION	57
8. CONCLUSIONES	61
9. PERSPECTIVAS	61
10. LITERATURA CITADA	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Concepto del Síndrome Metabólico (Figura 1)	15
Los modelos animales de SM (Figura 2)	19
Metabolismo de la fructosa y glucosa (Figura 3).....	24
Síntesis de <i>novo</i> de triacilgliceroles y glicerofosfolípidos por la ruta del glicerol fosfato (Figura 4)	26
Activación y transporte de ácidos grasos, del citosol al espacio intermembranal (Figura 5).....	30
Transporte, activación y oxidación de ácidos grasos, del espacio intermembranal a la matriz mitocondrial. Acoplado la síntesis de ATP en la matriz mitocondrial (Figura 6).....	31
Liberación de citocromo c. (Figura 7)	34
Efecto del palmitoil-CoA (PCoA) y malonil-CoA (MalCoA) a diferentes concentraciones sobre la liberación del cit c, en mitocondrias asiladas de (Figura 8)	49
Efecto del ácido palmítico (C16:0) en presencia de CoA y de ATP como cofactores de la β -oxidación sobre la liberación del citocromo c en mitocondrias aisladas de hígado (Figura 9).....	50
Efecto del ácido linoleico C18:(2n-6) en presencia de cofactores de la β -oxidación sobre la liberación del citocromo c en mitocondrias aisladas de hígado (Figura 10)	51
Efecto de la Palmitoil-Carnitina (PC) a diferentes concentraciones sobre la liberación de cit c en mitocondrias aisladas de hígado en un modelo con SM y C (Figura 11).....	52

Potencial transmembranal en mitocondrias aisladas de hígado: efecto del ácido palmítico en mitocondrias aisladas de hígado del grupo C (Figura12A) y mitocondrias aisladas de hígado del grupo con SM (Figura12B).....	54
Efecto del ácido palmítico sobre el potencial transmembranal de mitocondrias aisladas de hígado de animales controles y animales con SM (Figura 13).....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Características generales de las cepas de modelos animales para el estudio de SM(Tabla 1).....	20
Antecedentes del modelo experimental, utilizado en este trabajo (Tabla 2)	21
Características generales del modelo experimental(Tabla 3).....	44
Composición de AG no esterificados en el suero de animales con SM y controles (Tabla 4)	45
Composición de AG no esterificados en sobrenadante de homogenizado de hígado de animales con SM y controles (Tabla 5)	46
Composición de AG no esterificados en mitocondrias aisladas de hígado de animales con SM y controles (Tabla 6)	47
Controles respiratorios de mitocondrias aisladas de hígado (Tabla 7).....	48

ABREVIATURAS

AG	ácidos grasos
cit <i>c</i>	citocromo <i>c</i>
CL	cardiolipina
CoA	coenzima A
CPT I	carnitina palmitoil transferasa I
DAG	diacilglicerol
ERO	especies reactivas de oxígeno
FABP	proteína de unión de los ácidos grasos
FAD	flavín adenín dinucleótido
HGNA	hígado graso no alcohólico
HDL	lipoproteína de alta densidad
NAD	nicotinamida adenina dinucleótido
O ₂ ⁻	Superoxido
SM	síndrome metabólico
TAG	triacilgliceroles
VLDL	lipoproteínas de muy baja densidad.
VDAC	canal de aniones dependiente de voltaje
Δψ	potencial transmembranal

Resumen

La liberación de citocromo *c* (cit *c*) del espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citosol es un proceso clave en la iniciación de la muerte celular programada (apoptosis) en diferentes tipos de células. En el hígado este proceso está asociado con el desarrollo de enfermedades hepáticas que llevan a la insuficiencia por pérdida de la masa hepática. El hígado graso no alcohólico (HGNA) que es una manifestación del síndrome metabólico (SM), se caracteriza por la acumulación de ácidos grasos libres (AGL) y triglicéridos (TG), en los hepatocitos. La transición del HGNA hacia la esteatosis hepática involucra la apoptosis. Por lo tanto el objetivo de este trabajo es investigar la participación del ácido palmítico y linoleico como sustratos de la β -oxidación sobre la liberación de cit *c* en mitocondria aisladas de un modelo con SM. Los animales tratados con sacarosa desarrollan varias características del SM tales como obesidad intra-abdominal, hipertensión, hiperlipidemia así como la acumulación de los AGL en el suero, homogenado de hígado y mitocondrias. Sin embargo no se observó cambios en el consumo de oxígeno entre las mitocondrias con y sin SM. Tampoco se observó cambios en el potencial tras-membranal en mitocondrias de hígado de los animales con y sin SM. Pero al incubar a las mitocondrias con ácido palmito o linoleico se observa un colapso en el potencial tras-membranal en ambas mitocondrias. Sin embargo, experimentos con el ácido palmítico en presencia de los cofactores ATP y coenzima-A, necesarios para su activación, se observó que al añadir carnitina se revierte la pérdida del potencial. La incubación de las mitocondrias con el ácido palmítico o linoleico en presencia de ATP y Coenzima A induce un aumento en la liberación del cit *c* en ambas mitocondrias siendo más sensible las mitocondrias con SM. En presencia de carnitina, ambos ácidos grasos exacerbaban la liberación de cit *c* en ambas mitocondrias siendo más eficaz el ácido linoleico. En presencia del palmitoil-CoA y palmitoil-carnitina que son productos de la activación del palmítico, la liberación del cit *c* aumenta en dosis respuesta. Además esta liberación es sensible a malonil-CoA inhibidor fisiológico de la carnitina palmitoil transferasa I, enzima clave en el transporte de AG hacia la beta

oxidación. Los resultados sugieren la participación del ácido palmítico y linoleico como sustrato de la β -oxidación en la liberación de cit c en mitocondria con SM.

INTRODUCCIÓN

El Síndrome Metabólico (SM), es un conjunto de factores de riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo II, es cada vez más frecuente en la población mundial, debido al estilo de vida sedentario acompañado de un exceso de consumo de alimentos hipercalóricos (Kaur, 2014; Vilchis *et al.*, 2015). Esta situación resulta en una acumulación de grasa no solamente en la cavidad intra-abdominal, también en el hígado y el corazón, tanto en humanos como en modelos animales (Morelli *et al.*, 2013).

Recientemente se ha reconocido que el tejido adiposo es un órgano con gran actividad endocrina, liberando diversas sustancias como ácidos grasos libres (AGL) (Donnelly *et al.*, 2005) y diferentes hormonas que regulan el metabolismo (Bairwa *et al.*, 2016). Dichas características se añaden a su función como almacén de energía bajo forma de triacilgliceroles (TAG) (Ahima, 2006; Coelho *et al.*, 2013). En condiciones fisiológicas, los AGL liberados a la circulación son fuentes de energía (ATP), a través de su β -oxidación en la mitocondria. En condición patológicas como el SM asociado con resistencia a la insulina, el exceso de AGL y de TAG se acumulan en los hepatocitos generando hígado graso no alcohólico (HGNA) manifestación del SM (Cohen *et al.*, 2011).

La acumulación excesiva de AGL y TAG en los hepatocitos, puede ser debido a una disminución en la β -oxidación de los AG, una mayor actividad lipolítica a nivel del tejido adiposo y un aumento en la lipogénesis hepática de *novo* (Postic y Girard, 2008; Bechmann *et al.*, 2012). Esta situación resulta en una disminución de la función mitocondrial, por desacoplamiento del consumo de oxígeno en la cadena respiratoria mitocondrial y en la síntesis de ATP. La disfunción mitocondrial generalmente se asocia con la muerte celular por necrosis o apoptosis (Wei *et al.*, 2008).

En el hígado, un aumento en la actividad apoptótica induce una disminución de la población de hepatocitos y por ende insuficiencia hepática (Sanyal, 2005; Alkhoury *et al.*, 2011; Cichoż-Lach *et al.*, 2014).

El HGNA se caracteriza por un incremento de especies reactivas de oxígeno (ERO) que lleva a la célula a un estado de estrés oxidante (Sanyal *et al.*, 2001; Neuschwander-Tetriy, 2010; Fu *et al.*, 2011). Estudios recientes han demostrado que existe una relación entre el aumento en la concentración de ERO y la liberación del citocromo *c* (cit *c*) (Li Q *et al.*, 2006). El cit *c* es una proteína clave en el proceso apoptótico, dado que su liberación del espacio intermembranal mitocondrial hacia el citosol y su unión a proteínas apoptóticas como Apaf-1 y caspasa 9, constituye un punto clave para la formación del apoptosoma.

En este trabajo se relaciona la acumulación excesiva de AGL que son sustratos de la β -oxidación en el HGNA de un modelo con SM y la liberación de cit *c*, un proceso clave en la muerte celular programada. Por lo tanto, se analizó el efecto del ácido palmítico y linoléico en presencia y en ausencia de ATP y Coenzima-A, cofactores necesarios para formar el palmitoil CoA y linoleil CoA activos, para su posterior oxidación, sobre la liberación del cit *c* en mitocondrias aisladas de hígado de animales con y sin SM. La β -oxidación del ácido palmítico genera 8 moléculas de acetil-CoA que entran al ciclo del ácido tricarbóxico, para su oxidación y generación de NADH y FADH₂ que son agentes reductores y donadores de electrones para la cadena respiratoria mitocondrial, proceso clave para la generación de ATP. Los resultados de este trabajo mostraron que el palmitoil-carnitina y el palmitoil-CoA sustratos de la β -oxidación, inducen la liberación del cit *c* dosis respuesta y que el malonil-CoA inhibidor de la carnitina acil-transferasa I reduce la liberación de cit *c*.

1. ANTECEDENTES

1.1 El Síndrome Metabólico (SM)

En la década de los 60's se definía como "síndrome plurimetabólico", a la presencia simultánea de la obesidad, hiperlipidemia, diabetes e hipertensión; considerados como factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad arterial coronaria. En los 80's Vague propuso que el tejido adiposo en exceso está implicado en el progreso de la obesidad hacia la diabetes (Adaptación de Eckel *et al.*, 2005). Actualmente se sabe que el exceso de grasa abdominal genera diabetes y aterosclerosis, y que esta obesidad central afecta a la secreción de insulina y su acción para el transporte de glucosa (Crepaldi *et al.*, 2006; Samuel *et al.*, 2010).

En 1988, Gerald M. Reaven, introdujo el concepto de "síndrome X" en la conferencia de Banting, refiriendo el papel que tiene la resistencia a la insulina en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Adaptación de Reaven, 2014).

Ferranini y colaboradores coincidieron en afirmar que dicha conjunción está causada por la insensibilidad a la insulina y pocos años después, adoptaron el término "síndrome de resistencia a la insulina" (Adaptación de Crepaldi *et al.*, 2006).

Desde el concepto y términos de los 60's hasta los 80's, la definición de SM sigue siendo un debate. Pues el SM es en sí un conjunto de problemas de salud, causados por factores genéticos y ambientales, los cuales pueden producirse en un individuo simultáneamente o uno por uno, y al estar presentes en una persona, es más propensa a las enfermedades cardiovasculares en general y coronarias en particular (Amaya *et al.*, 2009).

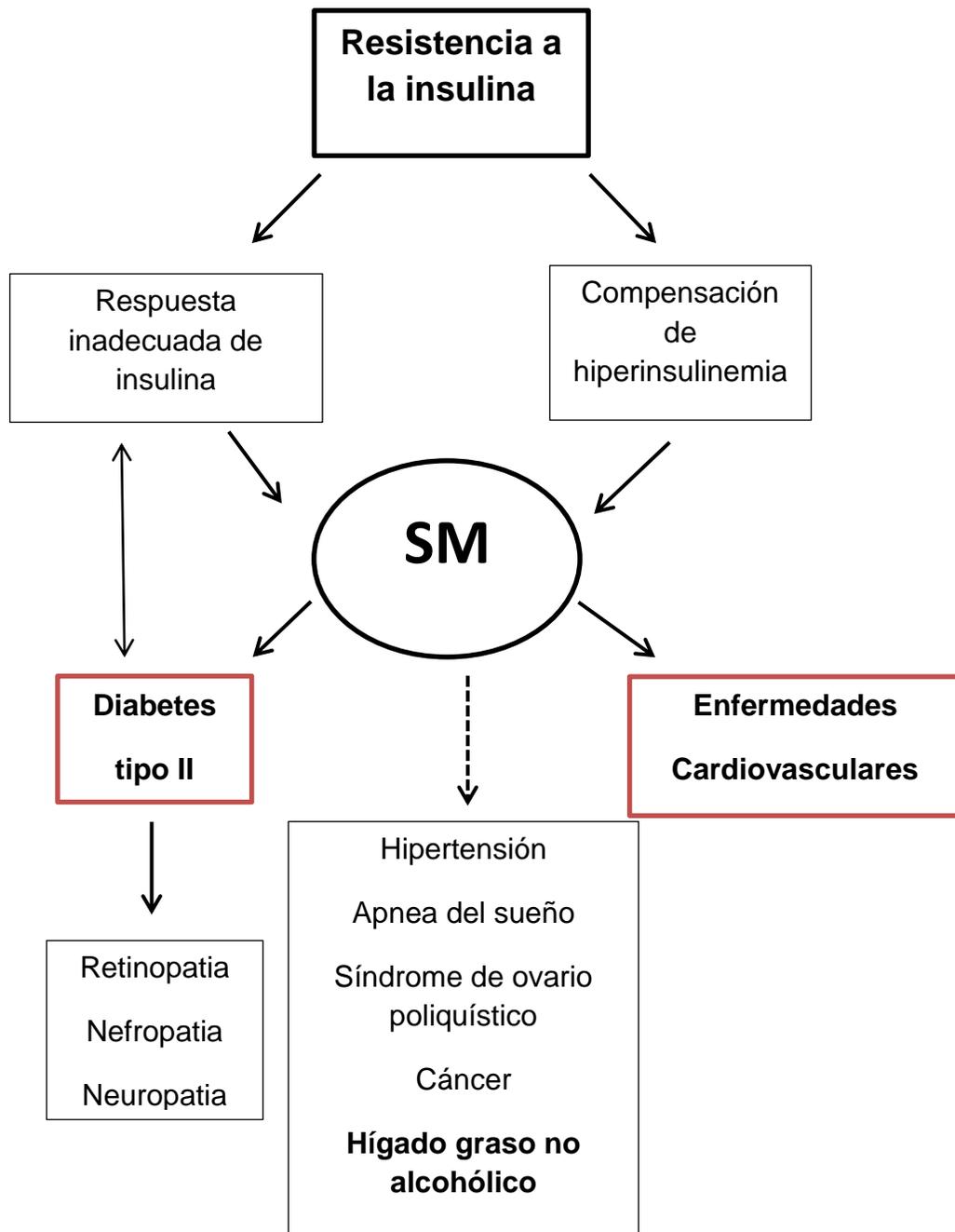


Figura 1. Concepto del Síndrome Metabólico.

La flecha punteada, indica las manifestaciones del SM y la flecha con dos direcciones indica, que la respuesta inadecuada de insulina es un tronco común fisiopatológico de diabetes tipo II. Adaptación: Reaven, 2005.

El principal factor de riesgo para el desarrollo de SM es la resistencia a la insulina, la cual se describe como una respuesta tisular menor a la esperada y, por consiguiente, condiciona aumento a de la insulina sérica (hiperinsulinemia), para compensar la ineficiencia de la hormona, o provoca un aumento en la concentración de la glucosa sanguínea, disminuyendo el transporte a través de la membrana plasmática del azúcar, la cual conlleva al padecimiento de diabetes tipo II (Reaven, 2005). Las principales manifestaciones de la diabetes tipo II son la retinopatía, nefropatía y neuropatía. El desarrollo del SM induce tanto el padecimiento de diabetes tipo II, como el de enfermedades cardiovasculares y tiene como principales manifestaciones hipertensión, apnea del sueño, síndrome de ovario poliquístico, cáncer e HGNA (Figura 1).

1.1.1 Diagnóstico del Síndrome Metabólico

Para el diagnóstico del SM existen diferentes criterios los cuales dependen del género, la edad y la etnia, así como también de otros factores genéticos y endócrinos como la inactividad física (Islas *et al.*, 2015).

La Federación Internacional de Diabetes, IDF (por sus siglas en inglés), describe al SM como:

“El conjunto de los más dañinos o peligrosos factores de riesgo tales como la obesidad abdominal, el colesterol alto, la presión arterial alta y la diabetes tipo II”.

➤ Para que una persona sea diagnosticada con SM según los criterios de la IDF, debe presentar:

1. Obesidad Central: circunferencia de cintura ≥ 94 cm para varones de origen europeo y ≥ 80 cm para mujeres de origen europeo, con valores específicos para otros grupos étnicos.*

*Cuando el índice de masa corporal (IMC) es >30 kg/m², es indicador de la obesidad central y no hay que medir la circunferencia de cintura.

2. Más 2 de cualquiera de los siguientes parámetros:

- Triglicéridos elevados: ≥ 150 mg/dl (1.7 mmol/L)*
- Colesterol HDL disminuido: < 40 mg/dl (1.03 mmol/L) en varones y < 50 mg/dl (1.29 mmol/L) en mujeres*
- Elevación de la Presión Arterial: Sistólica ≥ 130 o Diastólica ≥ 85 mmHg, o tratamiento de hipertensión diagnosticada previamente*
- Aumento de la glucosa plasmática en ayuna ≥ 100 mg/dl (5.6 mmol/L) o diabetes tipo II diagnosticada previamente.

*Estos valores varían dependiendo del género, la edad y la etnia.

1.1.2 Modelos animales de SM

La información sobre el mecanismo de desarrollo y la comprensión de las causas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan al humano así como el mecanismo de acción de medicamentos, nutrientes, alimentos y otros insumos, han sido evidenciados gracias al uso de animales de laboratorio para la investigación (Hernández, 2006).

Las diferentes ventajas de los modelos animales son el ser sistemas más simples que el humano, donde se pueden aislar acciones específicas, permitiendo la manipulación controlada de ciertas características además de llevar a cabo procedimientos que no son posibles en humanos pues los tiempos de generación y ciclos de vida son más cortos por lo que se puede responder antes la pregunta de investigación (Yunta, 2012).

Los modelos animales se clasifican en dos grupos (Ayala *et al.*, 2008):

1. Los inducidos por agentes externos

- Dieta
- Fármacos
- Toxinas

2. Los que son el resultado de modificaciones genéticas

- Espontaneas
- Artificiales

En ocasiones se combinan ambos grupos.

El SM es una condición multifactorial, no es consecuencia de una sola enfermedad y presenta más de un diagnóstico. Estas características hacen que la búsqueda de un modelo que caracterice al SM sea difícil. (Aleixandre de Artiñano y Castro, 2009).

En la actualidad se encuentran una gran variedad de modelos que son utilizados para investigar las causas y el desarrollo de SM en diferentes circunstancias. Algunos modelos son mencionados en la Figura 2, en la cual se observa que los modelos con SM se dividen en dos grandes grupos: los inducidos por agentes externos y los que son el resultado de modificaciones genéticas. Si bien ambos grupos tiene sus pros y sus contras, muchas de las investigaciones en la actualidad se basan en el desarrollo de modelos experimentales inducidos por agentes externos como la dieta alta en grasa y alta en carbohidratos o alta en ambas biomoléculas. Estos modelos en particular con dietas hipercalóricas, se caracterizan por el desarrollo de todas las alteraciones metabólicas tales como obesidad, hipertensión, hiperlipidemia y resistencia a la insulina, que coinciden con el diagnóstico del SM a nivel clínico. También presentan acumulación de lípidos en el hígado considerado como una manifestación del SM. Por tanto, el consumo en exceso de azúcares en la dieta, está asociado con el aumento de TAG, con el desarrollo de resistencia a la insulina y con el incremento de la presión sanguínea, tanto en humanos como en animales (Storlien *et al.*, 2000).

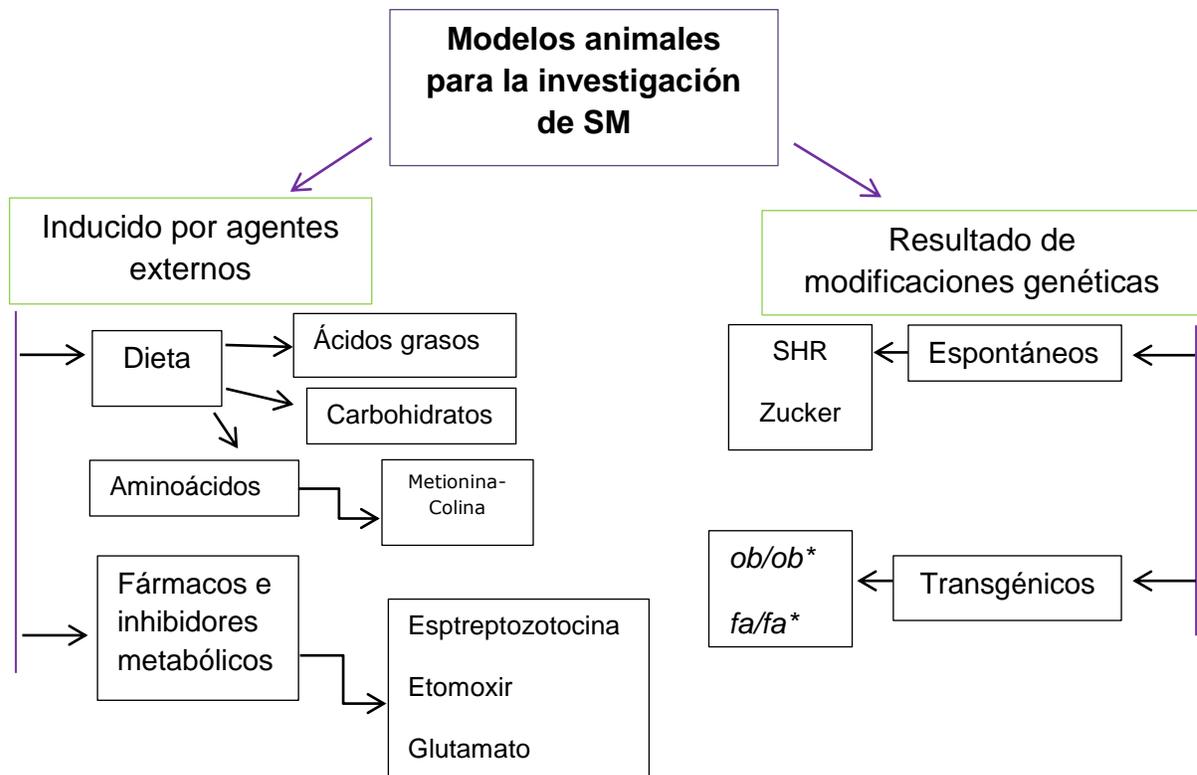


Figura 2. Modelos animales de SM.

*Deficiencia en leptina por mutación del gen que la codifica (*ob/ob* -ratón) o inactividad de los receptores de leptina (*fa/fa* -rata) Adaptación: Carvajal, 2009. La leptina es una hormona producida por el tejido adiposo y que regula el consumo de alimentos.

En la Tabla 1 se describen factores de riesgo de algunos modelos animales, para el estudio del HGNA en el SM y que presentan más de tres factores característicos del SM.

Tabla 1. Características generales de las cepas de modelos animales para el estudio de SM.

Cepa de animal	Factores de riesgo
Zucker	Obesidad Hiperfagia Dislipidemia Leve intolerancia a la glucosa Resistencia a la insulina Hiperinsulinemia Hiperleptinemia Aumento en la expresión de grelina Hipertensión Disfunción endotelial en animales de edad avanzada Estado oxidante
Ratas espontáneamente Hipertensas (SHR: por sus siglas en inglés)	Hipertensión Hígado graso Esteatosis hepática Hiperinsulinemia Hiperglucemia Hipertriacilglicerolemia
Wistar Ottawa Karlsburg W	Obesidad Hipertención moderada Hiperfagia Resistencia a la insulina Dislipidemia Hiperinsulinemia Leve tolerancia a la glucosa

Adaptación (Amaya *et al.*, 2009).

Los antecedentes del modelo experimental de SM utilizado en este trabajo, se presentan en la Tabla 2, y se observa que el consumo de sacarosa en el agua de beber de las ratas Wistar induce al menos tres de las alteraciones metabólicas que se requieren para el diagnóstico de SM en humanos.

Tabla 2. Antecedentes del modelo experimental, utilizado en este trabajo.

Factores de Riesgo	Características	Referencias
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hipertrigliceridemia ▪ Hipertensión 	Cepa Wistar ambos sexos: Suministro de sacarosa (30%) en agua de beber por un periodo de 12 - 17 semanas.	<p>Baños <i>et al.</i>, 1996</p> <p>El Hafidi <i>et al.</i>, 1997</p>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Alteraciones en el metabolismo de AGL 	Cepa Wistar macho. Suministro de sacarosa (30%) en agua de beber durante 20 semanas.	<p>Pérez <i>et al.</i>, 1999</p> <p>El Hafidi <i>et al.</i>, 2001</p>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Función mitocondrial y generación de ROS 	Cepa Wistar macho. Suministro de sacarosa (30%) en agua de beber durante 20-24 semanas.	Ruiz <i>et al.</i>, 2012

1.2 El hígado graso no alcohólico (HGNA)

El HGNA se considera como una manifestación del síndrome metabólico (Reaven, 1999; Chen *et al.*, 2011).

La *Organización Mundial de Gastroenterología* WGO (por sus siglas en inglés) en el 2006 definió a esta enfermedad como una acumulación excesiva de grasa en forma de triglicéridos en los hepatocitos (histológicamente >5% de los hepatocitos) y sin inflamación (esteatosis).

El primero en utilizar el término fue Ludwig en 1980 para describir los resultados de la biopsia de un hígado que histológicamente imitaba la hepatitis alcohólica, pero se producía en individuos que no se exceden en el consumo de alcohol. Además del exceso de grasa, un subgrupo de pacientes con HGNA presentó daño e inflamación de los hepatocitos asociado con una alta actividad apoptótica que se refleja en una disminución en la población de hepatocitos y por ende en la insuficiencia hepática y se denomina esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) (Wanless y Lentz, 1990). Mientras que la esteatosis simple que se observa en HGNA no presenta un aumento de la morbilidad o mortalidad a corto plazo de las células hepáticas, la progresión de esta condición a esteatohepatitis no alcohólica aumenta drásticamente el riesgo de cirrosis, falla hepática, y carcinoma hepatocelular que frecuentemente requieren de trasplante hepático (Hui *et al.*, 2003).

Los procesos por los cuales la enfermedad del HGNA se agrava a esteatohepatitis no están del todo esclarecidos (Ganzetti *et al.*, 2015). Por lo que es necesario elucidarlos, dado que su prevalencia en la población va en aumento.

A pesar de que hacen falta más estudios epidemiológicos, el HGNA es la enfermedad hepática más frecuente en el mundo desde hace décadas y la causa más común de alteraciones en las pruebas de funcionamiento hepático al menos en Estados Unidos (Clark *et al.*, 2003; Satyajit *et al.*, 1999). El HGNA afecta tanto a niños como a adultos y su prevalencia en la población general se

estima entre 2.8 y 24% (Baldrige *et al.*, 1995; Rashid-Roberts, 2000). En México estudios poblacionales han estimado una prevalencia de alrededor de 17.05% en población asintomática (Lizardi-Cervera *et al.*, 2006). En la serie de 351 autopsias de pacientes obesos y no obesos publicada por Wanless y colaboradores se encontró esteatosis hepática en el 70% de los primeros y en el 35% de los no obesos. La prevalencia de EHNA fue de 6.5% (Wanless- Lentz; 1990). Diversos estudios muestran que en Estados Unidos la prevalencia de HGNA es mayor en la población hispana y mexicano-americana. Y su entera relación con el SM agrava el problema, pues este es un factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo II. Principales causas de muerte en México (INEGI, 2015).

1.3 Metabolismo de hidratos de carbono

La gran disponibilidad de glucosa o fructosa, inducida por una dieta alta en hidratos de carbono, incrementa la síntesis de AG de *novo* y la lipólisis en el tejido adiposo intra-abdominal, lo cual contribuye al aumento en la disponibilidad de AG no esterificados precursores de los TAG hepáticos (Elliot *et al.*, 2002; Hu y Malik, 2010).

Al masticar un alimento rico en carbohidratos, se reduce el tamaño de partícula y los polisacáridos presentes son hidrolizados a nivel de los enlaces α 1,4 glucosídicos por la amilasa salival (ptialina). La acción de la enzima termina cuando el bolo alimenticio formado en el paso anterior llega al estómago mezclándose con el jugo gástrico y disminuyendo el pH del mismo. El quimo recién formado llega al intestino delgado principalmente en el duodeno y el yeyuno, con la acción de la amilasa pancreática continua el proceso de hidrolisis de los polisacáridos. Donde las enzimas de las células de la mucosa en borde en cepillo del intestino completan la digestión. Es en este lugar donde la sacarosa es hidrolizada por la sacarasa, dando así fructosa y glucosa. Estos monosacáridos pueden ahora ser metabolizados (Soriano del Castillo *et al.*, 2006).

El metabolismo catabólico de los monosacáridos provenientes de la dieta comienza con su fosforilación dependiente de ATP, catalizada por un hexoquinasa (Figura 3). En el caso de la α -D-glucosa el producto formado de su fosforilación es la α -D-glucosa-6-fosfato, la cual se isomeriza vía la fosfoglucoisomerasa, formando el isómero D-fructosa-6-fosfato. En el hígado la fosfofructoquinasa lleva a cabo una segunda fosforilación dependiente de ATP para producir un derivado de hexosa fosforilado en los carbonos 1 y 6, la D-fructosa-1,6-bisfosfato. La fragmentación en dos triosas fosfato catalizada por la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa da lugar a dos intermediarios de tres carbonos, el gliceraldehído-3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato. Estos productos son piezas clave para la síntesis de AGL y TAG. La fructosa, por otro lado, no pasa por el punto de control en el cual el metabolismo está limitado por la retroalimentación de citrato y ATP. Esto permite que la fructosa sea una fuente no regulada de glicerol-3-fosfato y acetil-CoA, para la lipogénesis hepática. Por otro lado, otra de las funciones principales del hígado consiste en regular las concentraciones sanguíneas de glucosa (Feduchi *et al.*, 2011).

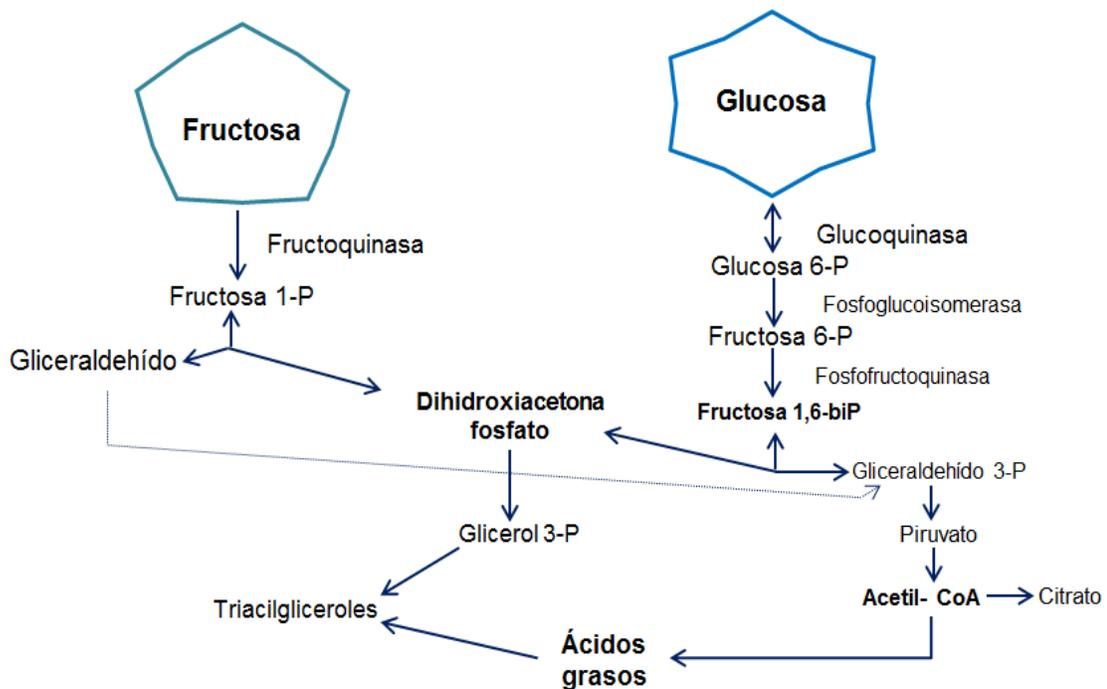


Figura 3. Metabolismo de la glucosa y la fructosa. Adaptación: Elliot *et al.*, 2002.

1.4 Lipogénesis en el SM

Los cambios dietéticos afectan directamente a la lipogénesis, los AG poliinsaturados reducen la lipogénesis en el hígado disminuyendo la expresión de proteínas responsables de la biosíntesis de AG como la sintetasa de ácidos grasos (FAS, por su siglas en inglés) y la Δ -9-desaturasa (Saponaro *et al.*, 2015). Al contrario, el consumo de carbohidratos en exceso promueve la lipogénesis en el hígado y en el tejido adiposo (Kersten, 2001). Durante el proceso de la glucólisis se genera glicerol y piruvato como precursor de la acetil-CoA que es sustrato de la acetil-CoA carboxilasa (ACC), enzima clave de la biosíntesis de *novo* de AG de larga cadena como el ácido palmítico. También la glucosa induce la expresión de genes de lipogénesis (Cohen *et al.*, 2011). Además la glucosa aumenta la secreción de la insulina y disminuye la del glucagón en el páncreas induciendo la lipogénesis. Para la lipogénesis de *novo*, la glucosa se convierte en acetil-CoA a través de la glucólisis y la oxidación de piruvato (Riu, 2014). La acetil-CoA se convierte después en malonil-CoA por la acción de acetil-CoA carboxilasa. La FAS cataliza la condensación del acetil-CoA y el malonil-CoA durante varios ciclos para la formación del ácido palmítico. El ácido palmítico es entonces alargado y desaturado vía una elongasa (ELOVL6) y la esteroil-CoA desaturasa 1 (SCD1) para generar ácidos grasos monoinsaturados, que son los principales componentes de los TAG. La aciltransferasa de glicerol-3-fosfato (GPAT) cataliza la esterificación de glicerol-3-fosfato con el acil CoA, un AG recién sintetizado y activado por medio de la acil CoA sintetasa generando ácidos lisofosfatídicos precursores de los TAGs por la acción de aciltransferasa 1-acilglicerol-3-fosfato (AGPAT) que cataliza la formación de ácidos fosfatídicos.

Los ácidos fosfatídicos se desfosforilan en diacilgliceroles por las fosfatasas de ácido fosfatídico, entre las que se encuentran la familia de las lipinas. Se ha visto que las lipinas controlan el metabolismo de los lípidos en células mamíferas (Holland y Summers, 2008). La lipina 1 es encargada en el hígado graso de convertir los ácidos fosfatídicos en diacilgliceroles. En un estudio en ratones *fld* (distrofia del hígado graso, por sus siglas en inglés), la falta de lipina previene el

desarrollo normal del tejido adiposo, y por ello, se produce lipodistrofia (tejido adiposo reducido, hígado graso transitorio, altos niveles de triglicéridos y aterosclerosis), resistencia a la insulina y neuropatía periférica progresiva; mientras que el exceso de lipina produce obesidad (Péterfy *et al.*, 2001). La formación de diacilgliceroles es seguida por la formación de triglicéridos a través de la acilCoA: diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) (Yamashita *et al.*, 2014).

La Figura 4 muestra la ruta de la síntesis de *ново* de triglicéridos y glicerofosfolípidos a partir del precursor glicerol fosfato.

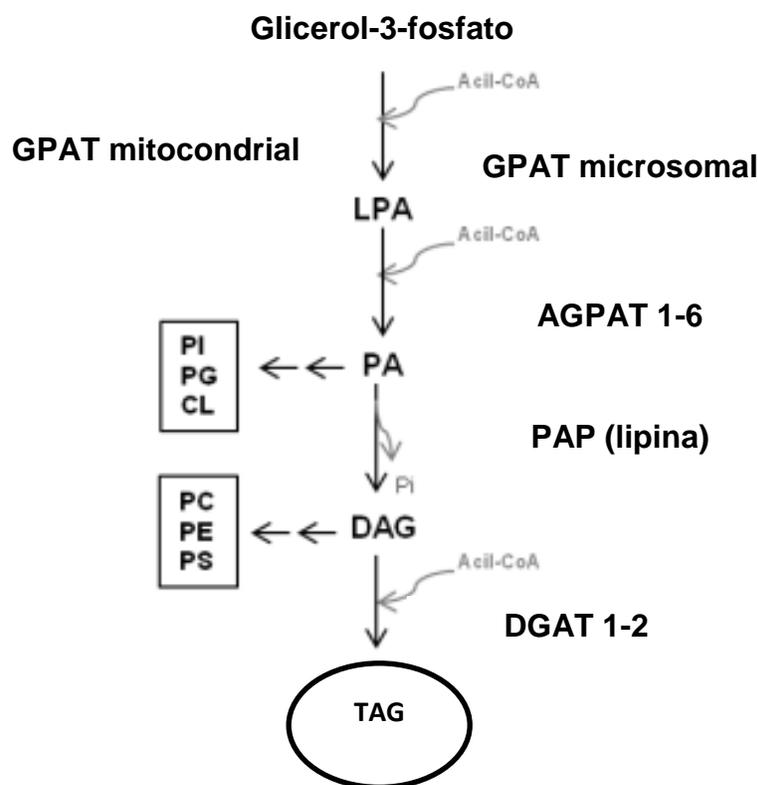


Figura 4. Síntesis de *ново* de triacilgliceroles y glicerofosfolípidos por la ruta del glicerol fosfato.

El punto de partida de la síntesis de novo de triacilgliceroles y glicerofosfolípidos es el glicerol-3-fosfato que proviene del metabolismo de la glucosa. El primer paso consiste en la acilación del G-3-P por las enzimas glicerolfosfato-aciltransferasa (GPAT) que residen en el retículo endoplásmico (RE) y mitocondria. A continuación se transfiere un nuevo ácido graso al ácido lisofostático (LPA) por acción de las acilglicerol-fosfato-acil transferasa (AGPAT) para producir ácido fosfatídico (AP). El AP puede ser utilizado para

la síntesis de fosfolípidos, como fosfatidilinositol (PI), fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipinas (CL), o ser defosforilado por las lipinas. Finalmente el diacilglicerol (DAG) se convierte en triacilglicerol (TAG) a través de la acción de las diacilglicerol-acil transferasas (DGAT). Además el DAG es también precursor de la síntesis de fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS).

1.5 Disfunción mitocondrial en el HGNA

Las mitocondrias (del griego *mitos* [hilos] y *chondros* [gránulos] o “gránulos en forma de hilos” por su morfología vista por microscopía electrónica) son orgánulos de forma ovalar generalmente, y altamente dinámicos, los cuales se encuentran formando una red, estrictamente regulada y compleja dentro de la célula (Dupuis, 2013) y son de gran importancia en eucariontes, ya que son el lugar donde se lleva a cabo la síntesis de ATP (energía). Contienen las enzimas del ciclo del ácido cítrico, enzimas que catalizan la oxidación de AG, enzimas y proteínas redox involucradas en el transporte electrónico y en la fosforilación oxidativa (Voet, 2007). Están formadas por dos bicapas lipídicas, una externa y otra interna, cada una de 5-7 nm de grosor, la membrana externa mitocondrial (MEM) es altamente permeable a sustancias de 10 KDa o menos, debido a la presencia de poros aproximadamente de 2 nm de diámetro, mientras que la membrana interna mitocondrial (MIM) es altamente impermeable, solo moléculas neutras de <150 Da pueden atravesarla, estando altamente regulada la entrada de iones como H^+ , K^+ , Na^+ y Cl^- (Metzler, 2003).

Una célula eucarionte contiene de 200 a 2000 mitocondrias, dependiendo del tipo celular. Por ejemplo, una célula hepática puede contener del orden de 800 mitocondrias por célula (Armstrong y Bennett, 1982). El mayor número de mitocondrias se encuentra en células metabólicamente activas tales como el músculo esquelético y cardíaco, el hígado y el cerebro (Pieczenik y Neustadt, 2007; Serviddio *et al.*, 2008).

Un funcionamiento adecuado de las mitocondrias de hígado se basa en la degradación u oxidación de los AG, para la producción de energía. En las Figuras

5 y 6, se presenta un esquema general de la β -oxidación de los AGL no esterificados en el hígado, provenientes de la hidrólisis de los quilomicrones, del tejido adiposo o de la síntesis de *novo*. También muestran los diferentes complejos de la cadena respiratoria mitocondrial responsable de la transferencia de los electrones y la síntesis de ATP por medio de la ATPasa. En condiciones de alta demanda de energía en el organismo, los AG y la glucosa convertida en piruvato son oxidados en la mitocondria para la síntesis de ATP. Una demanda baja de energía conlleva al almacenamiento de los AG en el citosol o a la formación de TAG que se secretan como lipoproteínas de muy baja densidad (Riu, 2014).

En el caso de necesidades de energía, los AGL provenientes de la hidrólisis de TAG en el tejido adiposo, son transportados en el torrente sanguíneo formando complejos con albúmina (Figura 5). Los AGL atraviesan la membrana plasmática por medio de transporte activo, acoplado a proteínas, como la proteína de unión de los AG (FABP, por sus siglas en inglés) y/o por medio de la translocasa de AG (FAT/CD36) o mediante un transporte pasivo conocido como Flip-Flop (Kischkel *et al.*, 1995). La expresión basal de CD36 en hígado es baja, pero aumenta en modelos experimentales de esteatosis hepática inducida por una dieta con alto contenido de carbohidratos y grasa (Bonen *et al.*, 2006).

A nivel mitocondrial, los AG son activados en la membrana externa mitocondrial en una reacción catalizada por la acil-CoA sintetasa de AG, formando acil-CoA. Los acil-CoA no atraviesan la membrana interna mitocondrial porque requieren un mecanismo especial de transporte (Rosenthal y Glew, 2009) que consiste en la transferencia del grupo acil del acil-CoA a la carnitina por medio de la carnitina aciltransferasa I (CPT I), la cual está unida a la membrana externa mitocondrial y forma acil-carnitina (Figura 5) (Rosenthal y Glew, 2009).

La acil-carnitina es transportada entonces a través de la membrana interna mitocondrial por una translocasa de carnitina (también conocida como transportador acilcarnitina/carnitina). En la MIM del lado de la matriz mitocondrial

el grupo acilo es transferido nuevamente a la CoA. Esta reacción es catalizada por carnitina acil transferasa II (CPTII), localizada en la MIM (Figura 6).

Una vez en la matriz mitocondrial, la β -oxidación de los AG se basa en cuatro reacciones generales, que se llevan a cabo por diferentes ciclos hasta la oxidación total y completa de un ácido graso de larga cadena (Rosenthal y Glew, 2009):

- (1) Deshidrogenación enlazada a FAD (Acil CoA deshidrogenasa).
- (2) Hidratación (trans Δ -2-enoil CoA hidratasa)
- (3) Deshidrogenación enlazada a NAD (L-3 hidroxiacil CoA deshidrogenasa)
- (4) Tiólisis y liberación de acetil-CoA (β -ceto tiolasa)

En el SM relacionado con obesidad, la lipotoxicidad inducida por la acumulación de los ácidos grasos libres o activados es considerada como una causa importante de la disfunción mitocondrial en la esteatosis y esteatohepatitis (Nassir y Ibdah, 2014). La disfunción mitocondrial no sólo afecta la homeostasis de grasa en el hígado, también conduce a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO's) que desencadenan la peroxidación lipídica, la sobreproducción de citoquinas y por ende la muerte celular (Fromenty *et al.*, 2004).

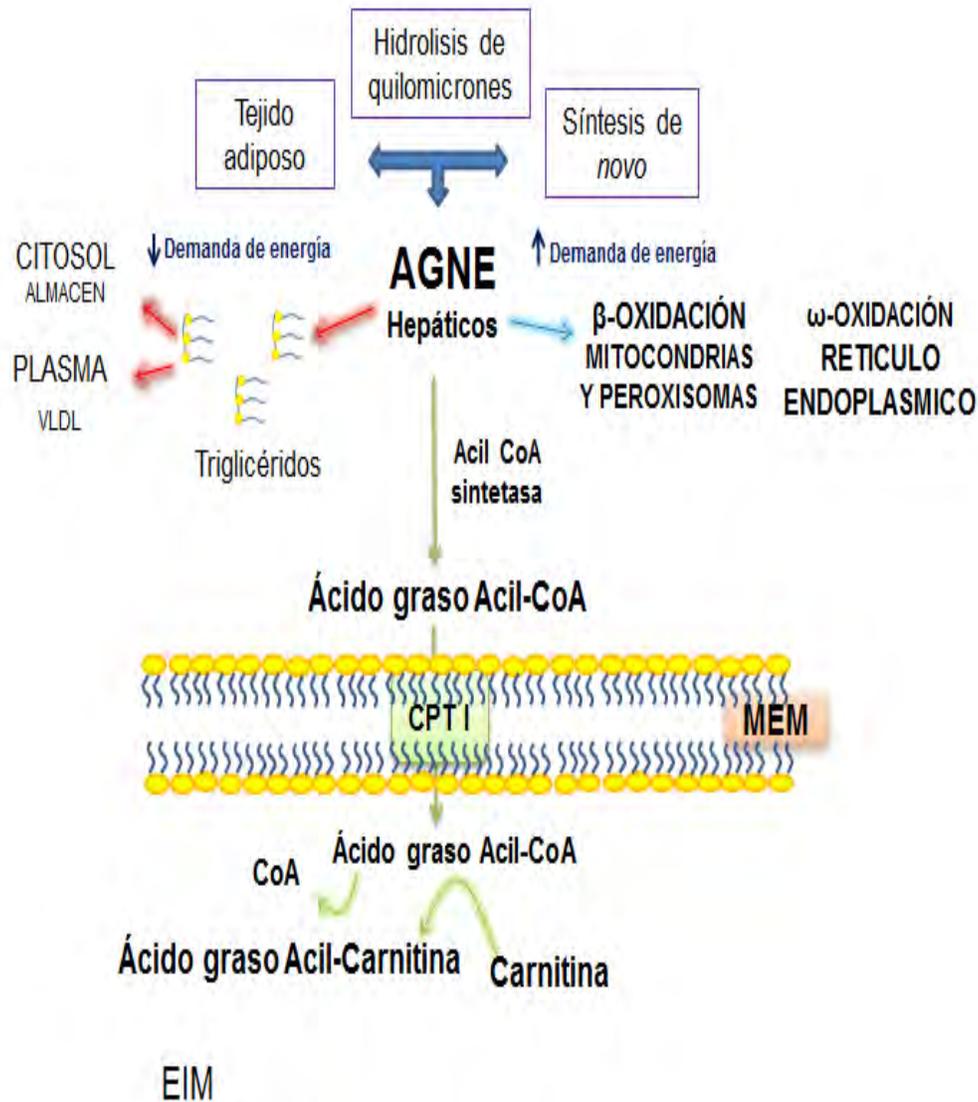


Figura 5. Transporte, activación y oxidación de ácidos grasos, del citosol al espacio intermembranal. Adaptación: Serviddio *et al.*, 2008. AGNE: ácidos grasos no esterificados; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad; MEM: membrana interna mitocondrial; CPT I: carnitina acil transferasa I; CoA: coenzima A; EIM: espacio intermembranal.

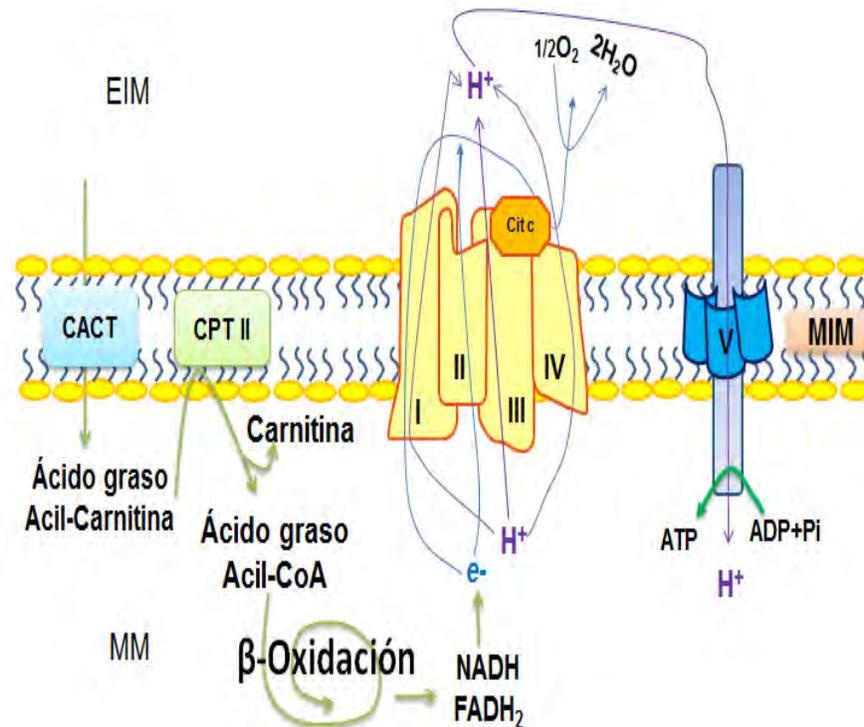


Figura 6. Transporte, activación y oxidación de ácidos grasos, del espacio intermembrana a la matriz mitocondrial y síntesis de ATP en la matriz mitocondrial. Adaptación: Serviddio *et al.*, 2008. EIM: espacio intermembranal; MIM: Membrana Interna Mitocondrial; CACT: transportador acilcarnitina-carnitina; CPT II: carnitina acil transferasa II; NADH: nicotinamida adenina dinucleótido reducido; Cit c: citocromo c; FADH₂: flavín adenín dinucleótido reducido; H⁺: Protón; ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato; e⁻: electrón; Pi: fosfato inorgánico; MM: matriz mitocondrial.

Y si bien, en el desarrollo del HGNA faltan muchos mecanismos que aún no están esclarecidos. Se ha propuesto que la enfermedad se desarrolla en dos “hits” fisiopatológicos:

En el primer “hit” que comienza con la resistencia a la insulina la cual aumenta la cantidad de AGL aunado a la lipólisis que se desarrolla principalmente en el tejido adiposo y el transporte de éstos AGL al hígado que conduce a la esteatosis. El segundo “hit” incluye el estrés oxidante, la disminución de la síntesis de ATP y la secreción de citoquinas proinflamatorias que conducen a la esteatohepatitis (Day y James, 1998).

1.6 Muerte celular programada (apoptosis) e HGNA

Las mitocondrias han desarrollado la capacidad de reaccionar ante múltiples situaciones de estrés celular, por ejemplo una infección viral. También emiten señales de peligro que alteran la célula o el organismo entero de las perturbaciones en la homeostasis, por ende promueven respuestas de adaptación celular intrínsecas o sistemáticas. Por tanto, se considera a la mitocondria el centro de la regulación y daño vía señalización (Galluzzi *et al.*, 2012). En la disfunción mitocondrial, la disipación del potencial transmembranal mitocondrial ($\Delta\psi_m$) constituye un paso temprano e irreversible en la cascada de eventos que conduce a la muerte celular por apoptosis (Zamzami *et al.*, 1995).

La apoptosis, palabra adoptada por Kerr y colaboradores en 1972, con ausencia de respuesta inflamatoria (Kerr *et al.*, 1972), es un proceso fisiológico de muerte celular, altamente regulado por diversos pasos enzimáticos y se caracteriza principalmente por la liberación de cit c, la fragmentación del DNA (mono y oligonucleosomal), la ausencia de respuesta inflamatoria y la dependencia de ATP (Hetts, 1998; Green, 2003; Hail *et al.*, 2006).

Existen dos vías principales de apoptosis: la vía extrínseca provocada por estímulos externos y la vía intrínseca provocada por estímulos internos (Budihardjo *et al.*, 1999; Debatin, 2000; Degterey *et al.*, 2003; Hengartner, 2000; Kohler *et al.*, 2002).

La vía extrínseca involucra la interacción entre receptores de muerte anclados en la membrana celular y las señales de muerte, lo que da pie a que las proteínas adaptadoras situadas en el citoplasma, las cuales transfieren la señal dentro de la célula y reclutan otras moléculas, entre ellas las caspasas 8 y/o 10, que una vez activadas desencadenan el proceso apoptótico (Kischkel *et al.*, 1995; Fischer y Schulze-Osthoff, 2005).

La vía intrínseca ocurre por un daño intracelular. Generalmente comienza con la permeabilización de la membrana mitocondrial, que se produce como respuesta a

proteínas activadas por daños celulares, causando por ende la liberación del cit *c* y en conjunto con Apaf-1 (factor apoptótico activador de proteasas -1) y la procaspasa 9, forma el apoptosoma activando la caspasa 9, la cual induce la iniciación de la apoptosis (Li *et al.*, 1997; Hetts, 1998; Launay *et al.*, 2005).

1.7 Liberación del citocromo *c* mitocondrial

El cit *c*, una proteína globular hidrofílica con una masa molecular de aproximadamente 13 kDa, la cual contiene un grupo hemo plano situado en el centro de la proteína rodeada por residuos hidrofóbicos. Al igual que la ubiquinona, funciona como un transportador móvil en la cadena transportadora de electrones del complejo III o Ubiquinona: citocromo *c* oxidorreductasa, al complejo IV o citocromo *c* oxidasa. El cit *c* está unido al cit *c*₁ del complejo III y acepta electrones, el cit *c* reducido se desplaza a continuación a lo largo de la superficie de la MIM en donde interacciona con la subunidad 2 de la citocromo *c* oxidasa y cede sus electrones al sitio Cu_A. Así mismo el cit *c* es uno de los activadores más fuertes de la apoptosis (Hikita *et al.*, 2011).

La liberación del cit *c* de las mitocondrias es una de las etapas iniciales de la apoptosis, los mecanismos precisos que regulan este evento siguen sin estar del todo esclarecidos. El cit *c* está fuertemente unido a la membrana interna mitocondrial por su asociación con la cardiolipina (CL), fosfolípido exclusivo de la mitocondria, mediante uniones hidrofóbicas que implican las cadenas de acilo graso de la CL y uniones electrostáticas dadas por las interacciones de las cargas positivas del cit *c* y las cargas negativas de la CL (Abe *et al.*, 2011; Belikova *et al.*, 2006).

La liberación del cit *c* esta mediada por dos posibles pasos (Ott *et al.*, 2002):

- 1.- La ruptura de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas que mantienen unidos al cit *c* y a la CL. Esta desunión sucede cuando la cardiolipina se oxida, vía H₂O₂ por ejemplo. Por lo que juegan un papel importante las ERO que se generan dentro de la mitocondria.

2.- La salida al citosol del cit c a través del poro formado por proteínas proapoptóticas, en un estado de oligomerización de Bak y Bax (integrantes de la familia Bcl-2) que se insertan en la membrana externa mitocondrial.

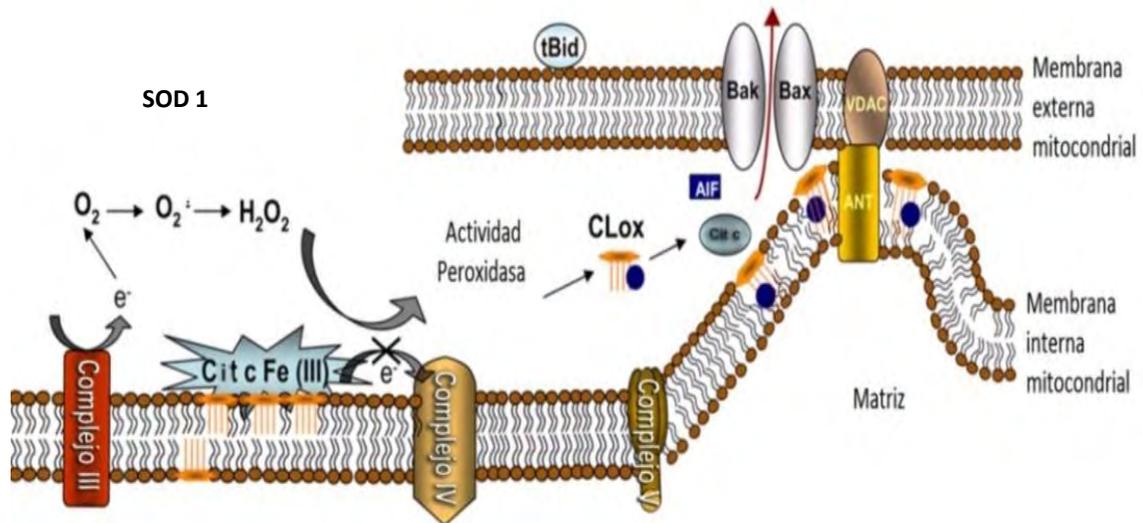


Figura 7. Liberación de citocromo *c*. Adaptación de: (Madesh *et al.*, 2001; Renault *et al.*, 2013).

AIF: factor inductor de apoptosis, ANT: transportador de nucleótidos de adenina, CLOx: cardiopina oxidada, VDAC: canal de aniones dependiente de voltaje, SOD 1: superóxido dismutasa, Bak/Bax: proteínas homólogas (pro-apoptóticas) de la familia *Bcl-2*. tBid: proteína homóloga (pro-apoptótica) truncada.

La Figura 7, esquematiza un posible mecanismo por el cual el cit *c* se libera del espacio intermembranal hacia el citosol y donde el radical superóxido (O₂⁻) desencadena la apoptosis mediante la permeabilización a través del poro formado por Bax y Bak. Así como también se caracteriza, el canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) en la membrana mitocondrial externa, el cual media la entrada de calcio a la mitocondria, mecanismo que está involucrado con la permeabilidad del poro de transición de la permeabilidad, por ende el hinchamiento mitocondrial; característico de los inicios de la apoptosis (Noshita *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2016).

2. JUSTIFICACIÓN

El síndrome metabólico y los factores de riesgo que lo integran son actualmente las principales causas de morbilidad en México y a nivel mundial. De acuerdo con la OMS, en 2014, más de 1,900 millones de adultos de 18 años en adelante, tenían sobrepeso de los cuales, más de 600 millones eran obesos. Además en este mismo año más de 42 millones de niños menores de cinco años de edad tenían sobrepeso. Queda establecido, también que en el 2013 la diabetes mellitus ocupaba el lugar número 1 de morbilidad hospitalaria en México (OMS, 2015; INGI, 2013)

Una manifestación del SM con obesidad central, que en las últimas dos décadas y en la actualidad es la causa más frecuente de enfermedad hepática en los países de occidente es el HGNA y sus afectaciones como la EHNA cuyo mecanismo de progreso esta relacionado con el exceso de lipidos y la muerte programada de los hepatocitos.

Por lo tanto, elucidar el mecanismo por el cual las células hepáticas entran a la muerte celular programada permitirá un análisis del progreso del HGNA en el SM hacia una situación más complicada la EHNA. Además, se busca como objetivo establecer el mecanismo por el cual la acumulación de los AG no esterificados sustratos de la β -oxidación tal como, el ácido palmitico y el ácido linoleico, participan en la liberación de cit c, proteína clave en el proceso de la apoptosis, uno de los mecanismos involucrado en la muerte de hepatocitos, la perdida de la masa hepática y por ende la insuficiencia hepática.

3. HIPÓTESIS

El exceso de AGL (sustratos de la β -oxidación) y la activación de estos, lleva a la disfunción mitocondrial en el HGNA de un modelo con SM. Lo que incrementa la liberación de cit c y lleva a la célula a la apoptosis.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Investigar el efecto que tienen los sustratos de la β -oxidación tal como el ácido palmítico y linoleico sobre la liberación del cit c en mitocondrias aisladas de hígado de un modelo de SM.

Objetivos particulares

- Investigar el efecto del SM sobre la función mitocondrial (consumo de oxígeno en presencia de succinato y piruvato/malato en los estados III y IV en mitocondrias aisladas de hígado de animales con y sin SM.
- Determinar el efecto que tienen los ácidos grasos palmítico y linoleico activados sobre el potencial transmembranal mitocondrial.
- Analizar la composición de AG no esterificados de las mitocondrias aisladas de hígado y en el suero de animales con y sin SM.
- Evaluar el efecto del ácido palmítico y linoleico en presencia de Coenzima A y ATP como cofactores de la β -oxidación sobre la liberación de citocromo c en mitocondrias aisladas de un modelo con y sin SM.

5. METODOLOGIA

5.1 Recativos utilizados en los diferentes experimentos:

ADP _(s) (SIGMA)	EDTA _(s) (SIGMA)	Na ₂ CO _{3(s)} (SIGMA)
ATP _(s) (SIGMA)	EGTA _(s) (SIGMA)	Na ₂ SO _{4(s)} (SIGMA)
Ácido palmítico _(l) (SIGMA)	H ₂ SO _{4(l)} (SIGMA)	Piruvato _(s) (SIGMA)
Ácido linoleico _(l) (SIGMA)	HEPES _(s) (GoldBio)	PC _(s) (SIGMA)
BSA _(s) (Amresco)	Hexano _(l) (SIGMA)	Sacarosa _(s) (SIGMA)
Carnitina _(s) (SIGMA)	KCl _(s) (SIGMA)	Succinato _(s) (SIGMA)
CCCP _(s) (SIGMA)	K ₂ HPO ₄ (SIGMA)	Tris-Base _(s) (SIGMA)
CuSO _{4(s)} (SIGMA)	Malato _(s) (SIGMA)	TFA _(s) (SIGMA)
CoA _(s) (SIGMA)	Malonil-CoA _(s) (SIGMA)	TMRM _(l) (Molecular
Cloroformo _(l) (J.T. Baker)	Manitol _(s) (Biomedicals)	Probes)
2,4-Dimetoxipropano _(l) (SIGMA)	Metanol _(l) (Fermont)	
	MgCl _{2(s)} (J.T. Baker)	
Folin-Ciocalteu _(l) (SIGMA)	NaOH _(s) (SIGMA)	

5.2 Desarrollo del modelo con SM

Se utilizaron ratas machos recién destetadas de la cepa Wistar. De 24 animales se formaron dos grupos de 12 cada uno, el grupo “control” y el grupo “síndrome metabólico” (SM). El grupo “control” contó con acceso libre al alimento sólido comercial (LabDiet, formula 5001) y agua potable. Mientras que al otro grupo se le indujo el SM mediante la administración de una solución de sacarosa al 30% junto con el mismo alimento suministrado al primer grupo (Ruiz, 2012).

Finalizado el tratamiento de 24 semanas, los animales se pusieron en ayuno de 12 h para ser decapitados, se colectó muestra de sangre para aislar plasma, se cuantificó la grasa intra-abdominal, se extrajo el hígado para preparar mitocondrias y realizar los experimentos.

5.3 Análisis de los parámetros bioquímicos plasmáticos

La sangre fue colectada en un tubo que contenía 0.1% EDTA y se centrifugó a 600 x g durante 20 min 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 y realizar el análisis químico sanguíneo.

Nota: el butil-hidroxitolueno (BHT), tiene una concentración de 4 veces menor en orden de magnitud respecto al volumen de los amortiguadores, por lo que su uso, no produce efectos adversos en las determinaciones experimentales.

Los TG, la glucosa y el colesterol plasmáticos fueron cuantificados utilizando kits comerciales (*Coat-a-Count*, *DiagnosticProducts*, Los Ángeles, CA. USA) en colaboración con el Departamento de Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

La grasa intra-abdominal fue extraída de la cavidad retroperitoneal y de alrededor de los dos riñones y se pesó inmediatamente utilizando una balanza gravimétrica (OHAUS, EUA).

Previo a la decapitación de los animales, estos se pesaron, utilizando una balanza gravimétrica (OHAUS, EUA).

5.4 Extracción de mitocondrias de hígado

Se extrajo el hígado de los animales, se homogenizó en una solución amortiguadora que contenía manitol 210 mM, sacarosa 70 mM, HEPES 5 mM y EDTA 1 mM a pH=7.4 y a 4°C. El hígado macerado se colocó en un homogenizador tipo Potter. Posteriormente, se aislaron las mitocondrias mediante centrifugación diferencial, de la siguiente manera:

Se realizó una primera centrifugación del homogenado a 747 x g utilizando una centrifuga (Sorvall Superspeed RC2-B equipado con rotor SS 34, EUA) durante 10 min a 4°C. En esta etapa se guardó 1 mL del homogenizado en un tubo tipo Eppendorf de 1.5 mL y se guardó a -70°C para posteriormente realizar un análisis

lipídico de este y el resto del sobre nadante se centrifugó a 11,952 x g durante 10 min a 4°C. El precipitado se suspendió en la misma solución de extracción conteniendo albúmina sérica bovina (BSA) al 0.1% y se incubó a 4°C durante 10 min. Posteriormente, se centrifugó a 11,952 x g durante 10 min a 4°C. El precipitado se suspendió en amortiguador de sacarosa 250 mM y Tris 10 mM en un tubo tipo Eppendorf de 1.5 mL. (El Hafidi *et al.*, 2006).

5.5 Determinación de proteína

La proteína de las mitocondrias aisladas de hígado, fue cuantificada con el método desarrollado por Lowry en 1951 (Lowry *et al.*, 1951) el cual fue modificado como se describe a continuación.

Se prepararon tres soluciones: Solución A (NaOH 1%), Solución B (Na₂CO₃ 1%) y Solución C (CuSO₄ 0.5%). Se realizó una mezcla (Solución D) compuesta por la solución A, B y C en relación 98:1:1 (%). Se realizó una dilución 1:100 del extracto mitocondrial y del homogenizado total en NaCl al 0.9%. Posteriormente, se hizo por triplicado lo siguiente: de esta solución se tomaron 100 µL y se adicionaron 900 µL de la solución D y se agitaron con vórtex. Después de 10 min de incubación a temperatura ambiente (T_{amb}), se adicionaron 100 µL del reactivo Folin-Ciocalteu 1N y se incubaron las muestras durante 30 min a T_{amb} en la oscuridad. Paralelamente se realizó una curva de calibración utilizando BSA a 0, 10, 20, 40 y 60 µg y se trataron de la misma forma que las muestras. Después de la incubación con Folin-Ciocalteu se registró la absorbancia en un espectrofotómetro (Beckman DU640 UV-Vis, Kraemer CA. USA) a una longitud de onda de 750 nm. La curva de calibración que corresponde a la absorbancia en función de las concentraciones de BSA es lineal y obedece la ley de Beer Lambert, lo que permitió determinar la concentración de proteína presente en las muestras de mitocondrias.

5.6. Función mitocondrial

El consumo de oxígeno se basa en la lectura polarográfica del consumo de oxígeno por medio de un electrodo tipo Clark. Este electrodo está constituido por un cátodo de platino y un ánodo de Ag/AgCl. El cátodo de platino está separado de la muestra por una membrana permeable al oxígeno (por ejemplo de polipropileno). El potencial del cátodo se mantiene constante a -0,65 V. En ausencia de oxígeno, la intensidad de corriente es casi cero. A medida que el oxígeno de la muestra difunde a través de la membrana del electrodo, se va reduciendo en el cátodo, lo que origina un aumento de la corriente eléctrica que es proporcional a la presencia de oxígeno en la muestra (Fuentes *et al.*, 1998).

Se incubaron 500 μ g de proteína mitocondrial a 30°C en un 1.5 mL de medio KHE que contenía KCl 125 mM, HEPES 10 mM, EGTA 1 mM, K₂HPO₄ 2 mM y MgCl₂ 5 mM y succinato (succ) 10 mM o malato/piruvato (M/P) al 5/3mM, respectivamente como sustratos oxidativos. Las mitocondrias fueron incubadas con ADP 250 μ M para inducir el estado III de la respiración (consumo de O₂ acoplada a la síntesis de ATP), mientras que el estado 4 corresponde al consumo de O₂ después del agotamiento de la ADP con succ o M/P. Por último se calculó el control respiratorio, el cual es un indicador de la integridad mitocondrial y se calcula dividiendo la velocidad en nmol O₂/ min/ mg de proteína del estado 3 entre la velocidad en nmol O₂/ min/ mg de proteína del estado 4 (Ruiz, 2012; Vázquez *et al.*, 2005).

5.7 Análisis de AG no esterificados en plasma, en homogenado y en mitocondrias aisladas de hígado.

En tubos de vidrio de 100 x 13 mm (PIREX) se colocaron 10 mg de proteína mitocondrial o 10 mg de proteína sobrenadante o 100 μ L de suero, para la extracción de AG de cada muestra por separado. Se adicionaron 50 μ L de ácido margárico (1mg/ml) como estándar interno a 4°C y se ajustó a 1 mL con solución salina. A la mezcla se le agregó 1 mL de metanol grado HPLC con BHT 0.002% como protector de los ácidos grasos poliinsaturados de la oxidación, se agito con

vortex durante 30 s. El siguiente paso se realizó 3 veces: se agregaron 2 mL de cloroformo grado HPLC con BHT 0.002%. Posteriormente, se realizó una centrifugación a $956 \times g$ por 2 min a T_{amb} . Se recuperó la fase orgánica (inferior) en tubos limpios. Se agregó 1 g de Na_2SO_4 anhidro para eliminar el exceso de agua, se filtró el sobrenadante usando un algodón y se evaporó con $N_2(g)$. Una vez evaporado el solvente y obtenido el extracto lipídico se derivatizó colocando 1 mL de metanol con BHT 0.002%, 100 μL de 2,4-Dimetoxipropano y 10 μL de H_2SO_4 grado analítico se agitó con vortex durante 30 s y se incubó durante 15 min a T_{amb} . Posterior a la incubación se colocó 1 mL de NaCl al 5% y 2 mL de hexano grado HPLC con BHT 0.002% y se agitó con vortex durante 30 s. La mezcla se centrifugó a $956 \times g$ durante 3 min a T_{amb} . Terminada la centrifugación se recuperó en tubos limpios la fase orgánica (superior) y se evaporó con $N_2(g)$. Los tubos con el extracto lipídico se colocaron a $-20^\circ C$ hasta su análisis.

Para la cuantificación del contenido de los AG no esterificados, al extracto lipídico se le agregaron 50 μL de hexano grado HPLC y se inyectó 1 μL de esta solución en un cromatógrafo de gases (Shimadzu) con detector de ionización de flama (FID, por sus siglas en inglés), $He(g)$ como gas vector y columna capilar de sílica fundida tipo SP2300 de 30 m y 0.25 mm de diámetro interior. Utilizando una temperatura de $250^\circ C$ para el inyector/detector y una temperatura inicial de $170^\circ C$ y $220^\circ C$ final para la columna. El tiempo de corrida fue de 25 min con un flujo de 1 mL/min de $He(g)$ (Vázquez *et al.*, 2005).

5.8 Liberación de citocromo c

Se incubaron 500 μg de mitocondrias aisladas de hígado de animales controles y SM, a $30^\circ C$ y a 100 rpm durante 10 min en un amortiguador con sacarosa 150 mM, KCl 50 mM, Tris-Base 5mM, EGTA 10 μM y KH_2PO_4 250 μM a pH 7.4 y diferentes cofactores, tales con palmitoil-carnitina (PC), palmitoil-CoA y malonil-CoA, AGL, ATP y CoA.

Al final de la incubación las mitocondrias aisladas fueron centrifugadas a $13,416 \times g$ durante 10 min a $4^\circ C$, se recuperó el sobrenadante que se analizó por HPLC

para la cuantificación del cit c. Se utilizó una columna fase reversa NOVA PACK C4 de un tamaño de partícula de 5 micras y un poro de 300 Å y de tamaño de 150 x 4.5 mm. Una fase móvil que consistió en una mezcla de A: H₂O con ácido trifluoroacético (TFA) 0.1% y B: acetonitrilo-H₂O 80-20% (v/v) con TFA 0.1 %. El cit c fue eluido con un gradiente en la fase A/B (65:35% (v/v)) a la A/B (30:70%(v/v)) durante 15 min con un flujo de 1 mL/ min. La cuantificación del cit c se realizó por medio de una curva estándar analizando cit c de bovino comercial a diferentes concentraciones de 50 ng hasta 250 ng. Existen diferentes otros metodos para analizar el cit c pero requieren diferentes etapas extra para la preparación de la muestra. Además no son mas sensibles y cuantitativos que el HPLC.

5.9. Potencial Transmembranal

El equipo empleado para determinar el potencial transmembranal en mitocondrias aisladas del modelo, fue un espectrofluorómetro Perkin Elmer modelo LS-50-B con software FL WinLab y agitación magnética, manteniendo una temperatura de 30°C, durante todo el experimento. Se utilizó el fluoróforo tetrametilrodamina metil-ester (TMRM) a una concentración de 0.125 µM, el cuál es un catión lipofílico que se acumula en la matriz mitocondrial. El bombeo de protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal, a través de los complejos I, III y IV deja a la matriz con carga negativa y el espacio intermembranal con carga positiva. Esta diferencia de carga permite que el tetrametilrodamina metil-ester traspasa 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 eléctrico generado por la mitocondria. Las longitudes de onda utilizadas fueron 550 nm excitación y 590 nm emisión. El potencial se disipó al adicionar cianocarbonil-m-cloro-fenilhidrazona (CCCP). En una celda de cuarzo se incubó 500 µg de proteína mitocondrial en amortiguador con KCl 125mM, EGTA 10 mM, KH₂PO₄ 2mM, junto con el fluoróforo TMRM después de un minuto necesario para estabilizar la fluorescencia inicial se adicionan cofactores de la β-oxidación y los AG (ác. palmitico o ác. linoleico) dependiendo del experimento a realizar. Inicialmente se determinó el potencial transmembranal total, adicionando succinato 10 mM o P/M 5/3 mM respectivamente al primer minuto, y a los 5 min

aproximadamente se agregó CCCP 0.25 mM. Para los experimentos que implican los AG no esterificados en presencia de los cofactores de la β -oxidación se utilizó ATP 0.0625 mM, CoA 0.0125 mM, ácido palmítico 0.002 mM o ácido linoléico 0.0016 mM. Adicional a esto, a los 5 min aproximadamente se agregó carnitina 0.0125 mM y ADP 0.25 mM.

5.10. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SigmaPlot versión 11. Todos los valores están expresados como la media \pm error estándar (EE). Se realizó el estudio comparativo, entre los animales con tratamiento y los animales controles utilizando ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples Turkey. Las diferencias significativas de las variables implicadas, fueron consideradas a un valor de $p < 0.05$, por lo tanto se puede rechazar para estos valores la suposición de que las diferencias sean debidas a la variabilidad biológica.

6. RESULTADOS

6.1. Características generales del modelo

La Tabla 3 muestra los parámetros bioquímicos sanguíneos analizados del plasma de los animales con SM y animales controles (C), al final de las 24 semanas del tratamiento con sacarosa.

La grasa intra-abdominal, los TG plasmáticos así como la presión arterial se encuentran significativamente aumentados en los animales con SM en comparación con los animales C. En cuanto al peso corporal, la glucosa y el colesterol no presentaron diferencias significativas entre los animales con SM y C. El colesterol-HDL es ligeramente menor en los animales con SM pero no alcanza diferencia significativa.

Tabla 3. Características generales del modelo experimental.

VARIABLES	C	SM
Peso corporal (g)	524 ± 16	520 ± 15
Grasa intra-abdominal (g)	5.14 ± 0.4	12.19 ± 0.9 *
TG Plasma (mg/ dL)	66.64 ± 7.2	102.14 ± 12.5*
Presión arterial (mmHg)	121.0 ± 2.2	148.2 ± 4.2*
Colesterol Total (mg/ dL)	57.28 ± 3.9	57.77 ± 2.37
Colesterol-HDL (mg/ dL)	43.90 ± 3.4	37.42 ± 1.7
Glucosa (mg/ dL)	112.97 ± 5.4	101.82 ± 4.5

Los valores están expresados como la media ± EE (n=9 animales diferentes). Estos valores fueron obtenidos al final del tratamiento. *p<0.05 vs el grupo C.

6.2 Composición de AG no esterificados en el suero, homogenado y mitocondrias aisladas de hígado de animales con SM y C.

6.2.1 Analisis de suero de animales con SM y C

La Tabla 4 muestra un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$ vs C) en contenido de los ácidos saturados: palmítico y esteárico. También se observa un aumento en el contenido de AG no esterificados monoinsaturados como son: el ácido palmitoléico (C16:1n-7), el ácido oléico (C18:1n-9).

El AG no esterificado poliinsaturado araquidónico (20:4n-6) presenta un incremento significativo en el suero de los animales con SM en comparación con los animales C.

Mientras el ácido docosahexaenoico presenta una disminución significativa en los animales con SM en comparación con los animales controles. El aumento observado en los diferentes AG se refleja en un aumento del contenido total de AG no esterificados en suero de animales tratados con sacarosa que en animales controles y presenta diferencia significativa estadísticamente ($p < 0.05$).

Tabla 4. Composición de AGNE en el suero de animales con SM y controles

AG no estrificados	C	SM
Palmítico	0.177 ± 0.006	0.260 ± 0.025*
Palmitoléico	<i>0.007 ± 0.003</i>	<i>0.031 ± 0.011*</i>
Esteárico	<i>0.074 ± 0.006</i>	<i>0.101 ± 0.011*</i>
Oléico	<i>0.041 ± 0.006</i>	<i>0.055 ± 0.007*</i>
Linoleico	<i>0.033 ± 0.005</i>	<i>0.028 ± 0.004</i>
Araquidónico	<i>0.013 ± 0.004</i>	<i>0.040 ± 0.006*</i>
DHA	<i>0.018 ± 0.008 &</i>	<i>0.003 ± 0.001</i>
TOTAL	0.366 ± 0.018	0.518 ± 0.044*

Los valores están expresados en mM de AG en suero y como la media ± EE (n= 6 animales diferentes). Estos valores fueron obtenidos al final del tratamiento.

* $p < 0.05$ vs el grupo C. DHA: ácido docosahexaenoico.

6.2.2. Analisis de sobrenadante de hígado de animales con SM y controles

El sobrenadante del homogenizado de hígado corresponde a la fracción obtenida después de sedimentar las mitocondrias del homogenizado de hígado de animales con SM y C.

Se observa en la Tabla 5 que la concentración total de AG no esterificados en el sobrenadante es reducida comparada con la concentración de estos en las mitocondrias. Pero de igual manera que las mitocondrias el contenido en ácido palmítico, palmitoléico y oléico es significativamente ($p < 0.050$) mayor en animales con SM que en controles.

Tabla 5. Composición de AGNE en sobrenadante de homogenizado de hígado de animales con SM y controles.

AG no esterificados	C	SM
Palmítico	12.62 ± 0.42	20.48 ± 1.20 *
Palmitoléico	0.36 ± 0.06	2.31 ± 0.76 -
Estearico	10.54 ± 1.07	8.28 ± 0.63
Oléico	3.84 ± 0.42	8.49 ± 1.17 *
Linoléico	4.65 ± 0.21	5.12 ± 0.87
Araquidónico	4.48 ± 0.54	3.07 ± 0.29
DHA	1.38 ± 0.14	1.45 ± 0.08
TOTAL	37.87 ± 2.00	50.19 ± 3.62 *

Los valores están expresados en nmol /mg proteína y como la media ± EE (n= 6 animales diferentes). Estos valores fueron obtenidos al final del tratamiento.

* $p < 0.05$ vs el grupo C. DHA: ácido docosahexaenoico.

6.2.3 Analisis de mitocondrias de animales con SM y controles

En mitocondrias aisladas de hígado de animales con SM y controles, se observó diferencia significativa ($p < 0.05$ C vs SM) en los ácidos: palmítico, palmitoleico, oleico, docosahexaenoico (DHA) y en la cantidad total de los ácidos grasos no esterificados los cuales se encuentran en mayor cantidad en mitocondrias de animales con SM que en mitocondrias de animales controles (Tabla 6).

Tabla 6. Composición de AGNE en mitocondrias aisladas de hígado de animales con SM y controles.

AG no esterificados	C	SM
Palmítico	14.03 ± 0.64	21.22 ± 2.80*
Palmitoleico	<i>0.24 ± 0.06</i>	<i>1.85 ± 0.43*</i>
Esteárico	13.69 ± 1.01	13.56 ± 1.57
Oleico	<i>2.73 ± 0.30</i>	<i>6.12 ± 0.89*</i>
Linoleico	6.91 ± 0.62	8.36 ± 0.51
Araquidonico	10.20 ± 1.04	10.11 ± 0.73
DHA	<i>3.66 ± 0.71</i>	<i>5.73 ± 0.96*</i>
TOTAL	51.47 ± 3.76	66.94 ± 7.06*

Los valores están expresados en nmol/mg proteína y como la media ± EE (n= 6 animales diferentes). Estos valores fueron obtenidos al final del tratamiento.

* p<0.05 vs el grupo C. DHA: ácido docosahexaenoico.

6.3 Función mitocondrial. Control Respiratorio

El control respiratorio (CR) indica el estado funcional de las mitocondrias aisladas y representa el cociente del consumo de oxígeno durante el estado III (en presencia de ADP) y el estado IV que corresponde al consumo de oxígeno después del agotamiento del ADP. En la Tabla 7 se observa que en las mitocondrias con SM, el consumo de oxígeno en el estado III y IV y en presencia de piruvato/malato como sustrato oxidativo, no difiere del consumo de oxígeno por las mitocondrias controles. Por consecuencia no hubo diferencia significativa el CR entre ambos grupos. Por otro lado la oxidación del malato induce mayor consumo de oxígeno en el estado III y IV en mitocondrias con SM en comparación con las controles. Sin embargo el CR no muestra diferencia significativa entre ambos grupos.

Tabla 7. Controles respiratorios de mitocondrias aisladas de hígado.

Variables	C	SM
CR (P/M)	7.24±0.3	7.9±0.3
Estado III	98.7±15.8	92.4±14.8
Estado IV	13.5±1.8	11.7±2.1
CR (Malato)	7.5±0.5	7.4±1.06
Estado III	67.8±6.8	133.4±9.2*
Estado IV	9.3±1.3	19.7±2.7*

Los valores están expresados como la media \pm EE (n=5 animales diferentes). El consumo de oxígeno en los estados III y IV esta expresado como nmol O₂/ min/ mg de proteína y esto fue realizado en presencia de de piruvato/malato (P/M: 5/3 mM) o en presencia de 1 mM de malato (M). *p< 0.050 vs el grupo C.

6.4. Liberación del cit c de mitocondrias aisladas de hígado de un modelo con SM y el grupo C.

En la Figura 8 se observa que en condiciones basales (sin sustrato) la liberación del cit c en mitocondrias con SM es menor que en controles, y que la incubación de las mitocondrias con el palmitoil-CoA sustrato de la β -oxidación (PCoA) a diferentes concentraciones (40 y 80 nM) aumenta moderadamente la liberación del cit-c en controles pero en mitocondrias con SM el PCoA exacerba la liberación de cit c a 80 nM. Este efecto fue inhibido por el malCoA a altas concentraciones (80 y 120 nM) en ambas mitocondrias.

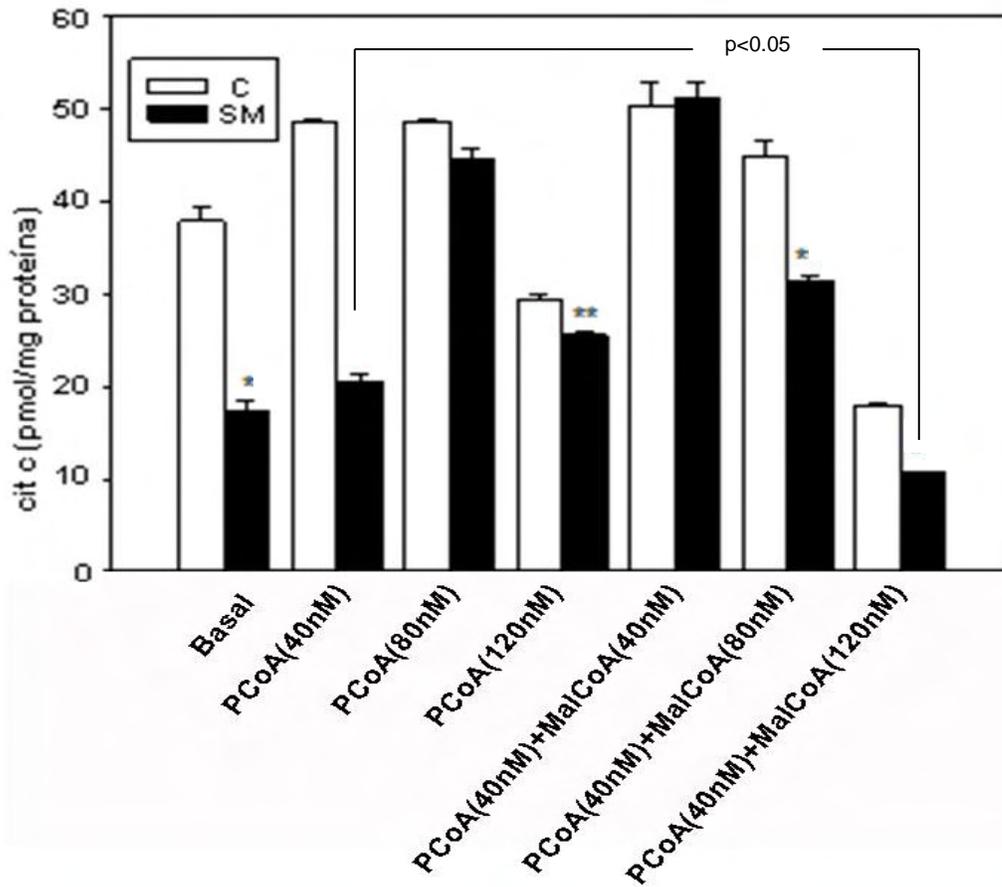


Figura 8. Efecto del palmitoil-CoA (PCoA) y malonil-CoA (MalCoA) a diferentes concentraciones sobre la liberación del cit c, en mitocondrias aisladas de hígado de un modelo con SM (barras negras) y C (barras blancas). Los valores están expresados como la media \pm EE (n=3 animales diferentes). *p<0.05 vs el grupo C respecto a cada experimento.

La Figura 9 muestra que en condiciones basales (sin sustrato) las mitocondrias con SM liberan menos cit c que las mitocondrias del grupo C. Sin embargo, la incubación de las mitocondrias con el ácido palmítico en presencia de ATP y Coenzima-A (cofactores necesarios para activar el ácido palmítico para el transporte y su β -oxidación en la mitocondria), aumenta la liberación de cit c en mitocondrias aisladas de hígado con SM en comparación a las del grupo C. Cabe aclarar, la liberación del cit c no se ve exacerbada al incubar las mitocondrias con

el solvente dimetil sulfoxido (DMSO) como vehículo del ácido palmítico y con los cofactores (ATP y CoA) solos o en conjunto. Sin embargo, la liberación del cit *c* se exagera al adicionar la carnitina a los cofactores y el ácido palmítico, en mitocondrias con SM comparándola con la cantidad total del cit *c* liberado en condiciones basales de estas mismas mitocondrias.

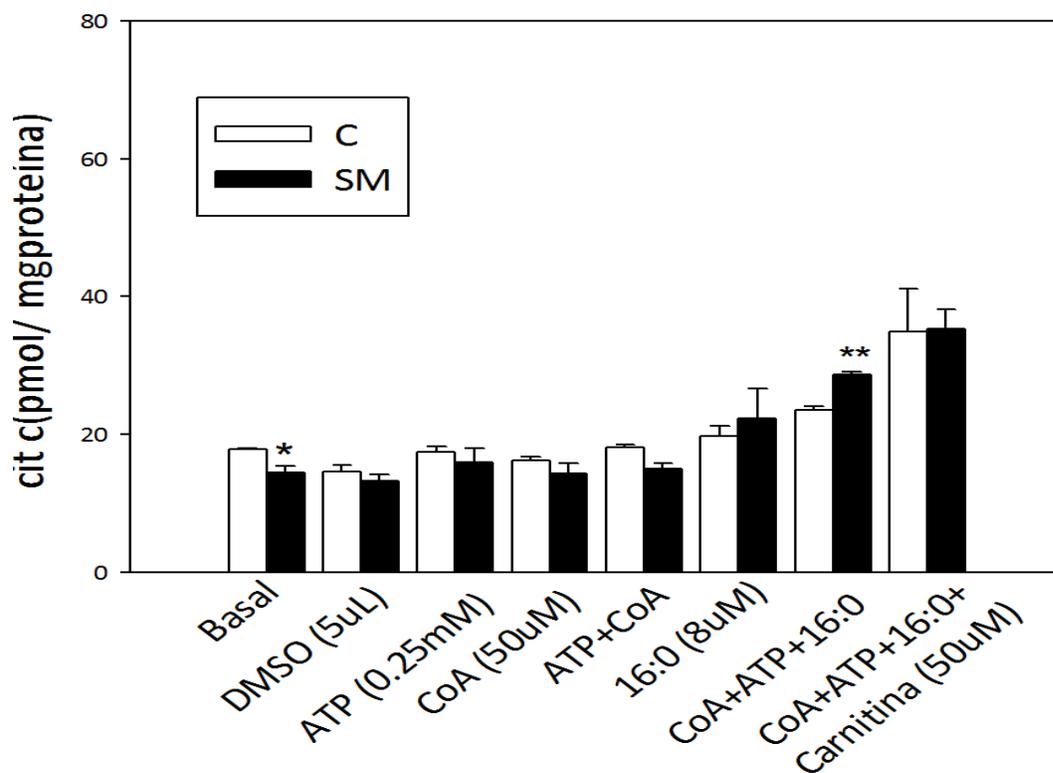


Figura 9. Efecto del ácido palmítico (C16:0) en presencia de cofactores de la β -oxidación sobre la liberación del cit *c* en mitocondrias aisladas de hígado en un modelo con SM (barras negras) y control (barras blancas). Los valores del cit *c*, están expresados en pmol/mg de proteína mitocondrial y están expresados como la media \pm EE (n=3 animales diferentes). * $p < 0.05$ vs el grupo C (condición basal) y ** $p < 0.05$ vs SM+CoA+ATP+C16:0.

La Figura 10 muestra que el ácido linoléico en presencia de cofactores de la β -oxidación inducen mayor liberación de cit *c* en mitocondrias aisladas de hígado de ambos animales con y sin SM.

En presencia de carnitina la liberación de cit c es aún mucho más pronunciada siendo más sensibles las mitocondrias aisladas de los animales con SM.

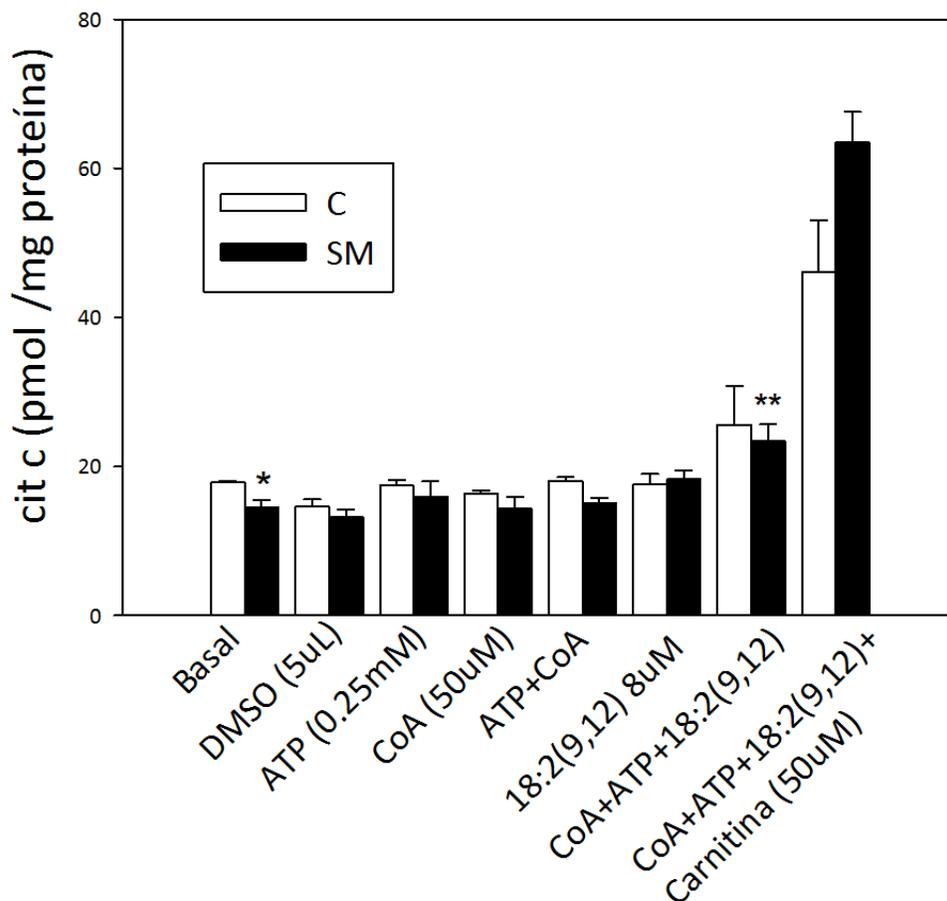


Figura 10. Efecto del ácido linoléico 18:2 (9,12) en presencia de cofactores de la β -oxidación sobre la liberación del cit c en mitocondrias aisladas de hígado en un modelo con SM (barras negras) y control (barras blancas). Los valores del cit c, están expresados en pmol/mg de proteína mitocondrial y están expresados como la media \pm EE (n=3 animales diferentes). *p< 0.05 vs el grupo C y **p< 0.050 vs SM CoA+ATP+18:2 n-9,12.

En cuanto al palmitoil-carnitina (PC) un producto de la transferencia del grupo palmitoil del palmitoilCoA a carnitina por medio de la CPT1, la Figura 11 muestra un efecto dosis respuesta del PC sobre la liberación del cit c tanto en mitocondrias

aisladas de hígado de animales con SM como las de animales controles (C). Además este efecto no depende del malato como sustrato del ciclo de Krebs. Se observa que a baja concentración de PC el aumento en la liberación del cit c es menor en las mitocondrias con SM en comparación con las controles. Sin embargo, a alta concentración de PC 100 μM se induce la liberación de cit c con la misma magnitud en ambas mitocondrias (Figura 11).

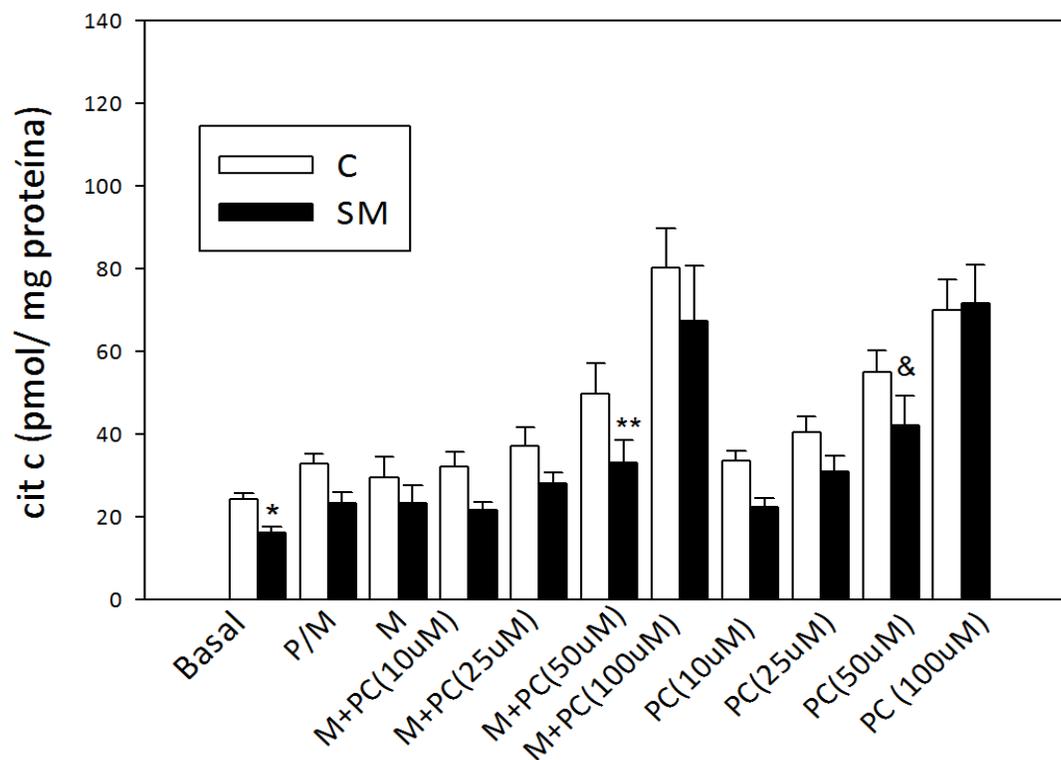


Figura 11. Efecto de la Palmitoil-Carnitina (PC) a diferentes concentraciones sobre la liberación de cit c en mitocondrias aisladas de hígado en un modelo con SM (barras negras) y control (barras blancas). Los valores están expresados como la media \pm EE ($n=3$ animales diferentes) y están expresados en pmol de cit c/mg de proteína mitocondrial. * $p < 0.05$ vs el grupo C; ** $p < 0.05$ vs SM+ PC ($50\mu\text{M}$) + Malato y & $p < 0.05$ vs PC ($50\mu\text{M}$).

6.5 Función mitocondrial. Potencial transmembranal

En presencia de sustratos oxidativos tales como succinato o P/M, las mitocondrias generan una fuerza protonmotora que se refleja en una disminución de la fluorescencia del TMRM. Esta variación de fluorescencia es indicadora de la translocación de protones de la matriz hacia el espacio intermembranal por medio de los complejos I, III y IV. Ese proceso induce un “quenching” de la fluorescencia del TMRM debido a su atracción por la carga negativa del lado interno de la MIM. La adición del CCCP induce la translocación de los protones desde el espacio intermembranal hacia la matriz produciendo un colapso del potencial transmembranal mitocondrial y un aumento en la fluorescencia debido al movimiento del TMRM hacia el espacio intermembranal. La Figura 12, ilustra el cambio de la fluorescencia del TMRM en diferentes condiciones experimentales.

- 1) Trazo azul: oxidación del sustrato succinato \rightarrow ADP \rightarrow CCCP.
- 2) Trazo verde: desacoplamiento en la mitocondria debido al ácido palmítico + ATP y CoA (inducción de la activación del ácido palmítico) \rightarrow entrada del ácido palmítico a la matriz mitocondrial con la adición de carnitina (recuperación del potencial transmembranal) \rightarrow CCCP.
- 3) Trazo rojo: desacoplamiento en la mitocondria debido al ácido linoleico + ATP y CoA (inducción de la activación del ácido linoleico) \rightarrow entrada del ácido palmítico a la matriz mitocondrial con la adición de carnitina (recuperación del potencial transmembranal) \rightarrow CCCP

La Figura 12A muestra el cambio del potencial en mitocondrias aisladas de hígado de animales controles y la figura 12B muestra el cambio en mitocondrias aisladas de hígado de animales SM.

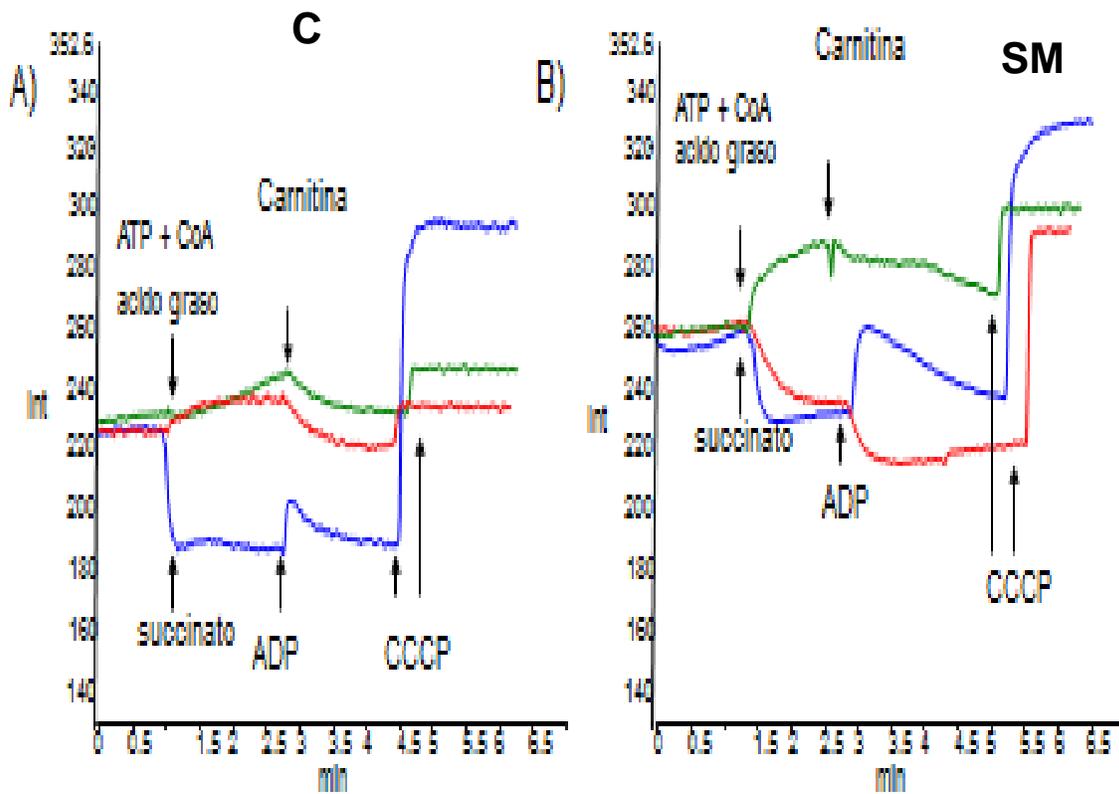


Figura 12. Potencial transmembranal en mitocondrias aisladas de hígado: efecto del ácido palmítico en mitocondrias aisladas de hígado del grupo C (Figura12A) y mitocondrias aisladas de hígado del grupo con SM (Figura12B).

El tratamiento de los animales con SM, no alteró significativamente ΔF que se refleja en el potencial transmembranal de la mitocondria oxidando succinato. En presencia de ADP el ΔF disminuye pero no alcanza diferencia significativa. La reducción de ΔF se relaciona con una disipación del potencial por translocación del protón a través del complejo V fosforilando el ADP y la formación de ATP (Figura 13).

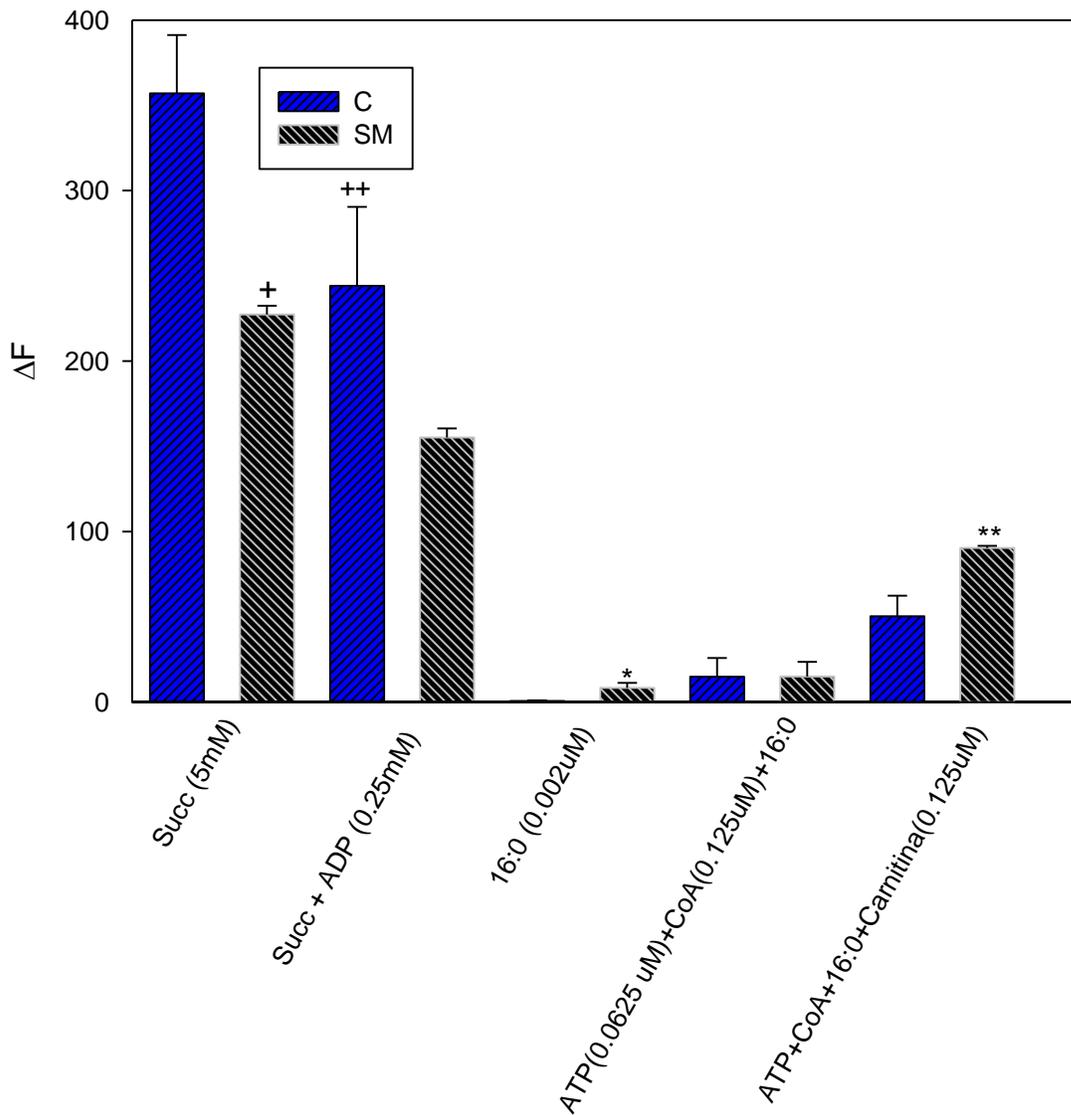


Figura 13. Efecto del ácido palmítico sobre el potencial transmembranal de mitocondrias aisladas de hígado de animales controles (barras azules) y animales con SM (barras negras). Los valores están expresados como el ΔF del potencial transmembranal y como la media \pm EE ($n=3$ animales diferentes). $^+p<0.05$ vs succ SM, $^{++}p<0.05$ vs succ + ADP C $^*p<0.05$ vs 16:0 SM y $^{**}p<0.05$ vs ATP + CoA + Carnitina SM.

La incubación de las mitocondrias con ácido palmítico induce una disminución en la fluorescencia del TMRM que se refleja en un colapso del potencial transmembranal en ambas mitocondrias siendo más sensibles las mitocondrias controles (Figura 13). Sin embargo, en presencia de los cofactores de la β -oxidación (CoA y ATP) se observa un aumento en la fluorescencia que indica una generación de un potencial menor pero significativo en comparación con el colapso inducido por el palmítico solo. Por otro lado, la adición de ADP o carnitina aumenta la fluorescencia de una manera mucho más importante que en ausencia de ADP y carnitina (Figura 13).

7. DISCUSIÓN

Las mitocondrias desempeñan un papel importante en la sobre-vivencia de las células por la síntesis de ATP y en el proceso de la muerte celular programada por la liberación de diferentes proteínas pro-apoptóticas (Granville y Gottlieb, 2002; Müller *et al.*, 2012). Por lo tanto, las mitocondrias son un orgánulo central en diversas condiciones patológicas como el cáncer, la diabetes, la obesidad, la isquemia/reperfusión, o los trastornos neurodegenerativos como las enfermedades de Parkinson y Alzheimer (Bouchier-Hayes *et al.*, 2005). Dando a este orgánulo un objetivo potencial para la intervención terapéutica (Bouchier *et al.*, 2005; Camara *et al.*, 2010).

En este trabajo se observó que el consumo de sacarosa induce acumulación de grasa en la cavidad intra-abdominal así como un aumento de los TAG en el torrente sanguíneo. Además se observó un aumento en los AG no esterificados circulantes en homogenizado de hígado y en las mitocondrias. La acumulación de AG no esterificados en el hígado es probablemente debida a una mayor actividad lipogénica y una mayor actividad glucolítica.

Por lo tanto, la acumulación de TAG y AG no esterificados en los hepatocitos caracterizan el HGNA, que es una manifestación del SM. Los AG no esterificados han sido descritos como lipotóxicos por sus interacciones con la mitocondria induciendo estrés oxidativo y desacoplamiento de la síntesis de ATP así como la liberación de proteínas pro-apoptóticas tales como el cit *c* (Yong-Ling *et al.*, 2008; Mantzaris *et al.*, 2011).

Se ha propuesto que la muerte celular programada de los hepatocitos, es el mecanismo del progreso del hígado graso hacia un estado de insuficiencia hepática inducido por la pérdida de la masa hepática (Browning y Horton, 2004).

El hígado es un actor central en la homeostasis de la energía de todo el cuerpo por su capacidad de metabolizar glucosa y AG. En condiciones de exceso de ingesta de hidratos de carbono para generar ATP y después de la reposición de las reservas de glucógeno, los hidratos de carbono se convierten en AG (lipogénesis) para su uso en la síntesis y almacenamiento de TG en el tejido

adiposo (Reddy y Rao, 2005). Así mismo, aunque la función del tejido adiposo blanco es esencialmente el depósito de TG, el hígado también es capaz de almacenar cantidades significativas de los lípidos en condiciones de consumo prolongado de dieta hipercalórica o por alteraciones metabólicas. La oxidación de AG es aproximadamente proporcional a la concentración plasmática de AGL movilizados desde del tejido adiposo al torrente sanguíneo. La movilización de AG es estimulada por glucagón y otras hormonas e inhibida por la insulina. Nuestros animales con sacarosa presentan alta concentración de AG no esterificados en la circulación y sobre todo en el hígado, que reflejan la resistencia a la insulina pues esta, es asociada con una mayor movilización de los AG no esterificados. Cabe mencionar que los AG no esterificados son productos de una alta actividad lipolítica en el tejido adiposo. Debido a esto en el SM, los AG no esterificados son un denominador común entre la obesidad, la hipertensión y la resistencia a la insulina (Martínez *et al.*, 2005).

La alta concentración de AG no esterificados en el hígado de los animales con sacarosa puede ser debido a una mayor movilización de AG no esterificados del tejido adiposo debido a la resistencia a la insulina. También puede ser debida a una mayor actividad lipogénica en el hígado por la disponibilidad del acetil-CoA y malonil-CoA que son precursor de la biosíntesis de AG e inhibidor del transporte de AG en la mitocondria respectivamente. La β -oxidación de AG en las mitocondria requiere de la actividad de la carnitina palmitoil transferasa I (CPTI) sensible a inhibición por el malonil-CoA. Las perturbaciones en la oxidación de los AG también contribuyen en el almacenamiento excesivo de lípidos en el hígado. La β -oxidación está regulada por la actividad de la carnitina palmitoiltransferasa I (CPTI), la concentración de carnitina y por el malonil-CoA que inhibe la CPTI (Reddy y Hashimoto, 2001; Rao y Reddy, 2004).

El HGNA se caracteriza por alteraciones en el metabolismo de los AG, donde la alta acumulación de AGL puede provenir también de la hidrólisis de triacilglicerolos almacenados en el hígado. Esta hidrolisis contribuye al aumento en la concentración de ácidos grasos en el homogenizado y en la mitocondria. La β -

oxidación de los AG no esterificados es fuente de energía para tejidos tales como el corazón, hígado, músculo esquelético y riñón (Kawano y Cohen, 2013).

En el hígado, la acumulación de AG no esterificados está asociada con acumulación de sus productos de activación los acil-CoA que son precursores de acil-carnitina, los cuales atraviesan la membrana mitocondrial por medio del translocador de acil carnitina que se convierte en acil-CoA de nuevo por medio de la carnitina-palmitoil-aciltransferasa II (CPTII) (Yan *et al.*, 2015). Por otro lado, se ha descrito que la sobre expresión de la acil-CoA sintetasa promueve la muerte celular programada (Reinartz *et al.*, 2010) probablemente debido a una mayor acumulación de los AG acil-coA. En este trabajo no se ha determinado el nivel de acil-CoA en los animales alimentados con sacarosa; sin embargo, la acumulación de AG no esterificados predice un aumento en los acil-CoA. Al incubar la mitocondrias aisladas de hígado con bajas concentraciones de ácido palmítico libre en presencia de ATP y CoA para la biosíntesis de palmitoil-CoA aumenta la liberación de cit c, una proteína clave en el proceso de la muerte celular programada. Este resultado sugiere que el palmitoil-CoA tiene un efecto directo sobre la liberación de cit c. Sin embargo, en presencia de carnitina la liberación exacerbada del cit c en mitocondrias aisladas de hígado de animales con SM en comparación con las mitocondrias controles, sugiere también la implicación de la palmitoil-carnitina (PC).

La carnitina mitocondrial juega un papel importante en el transporte del palmitoil-CoA como PC a través de la membrana interna mitocondrial para convertirse en palmitoil-CoA por la CPTII sustrato directo de la β -oxidación en la matriz mitocondrial (Kerne y Hoppel, 2013).

En trabajos previos se ha reportado que el consumo de sacarosa induce cambios en la composición de los lípidos de la membrana mitocondrial. Estos cambios están relacionados con la acumulación de los AG saturados y mono-insaturados y con un cambio en la composición de la cardiolipina, un fosfolípido de carácter aniónico y específico de la membrana interna mitocondrial (MIM) (Ruiz *et al.*, 2015). En condiciones fisiológicas, más del 90% de la cardiolipina está compuesta de ácido linoléico, un ácido graso poliinsaturado susceptible a la oxidación por las

ERO que se generan en la mitocondria durante la transferencia de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial. La peroxidación de la cardiolipina juega un papel fundamental en la liberación del cit c. Se ha descrito que las mitocondrias aisladas de los animales con SM generan mayor cantidad de H₂O₂ pero liberan cit c en cantidades menores que las mitocondrias controles (Ruiz *et al.*, 2015) probablemente debido a un cambio en la composición de la cardiolipina que es enriquecida en ácidos saturados y mono-insaturados tal como el palmítico y el palmitoléico, y que son menos susceptibles a la oxidación en condiciones de SM. Sin embargo, el aumento en la liberación de cit c inducido por el ácido palmítico o linoléico, en presencia de Co-enzima A y en presencia de ATP sugiere un mecanismo que implica interacciones directas entre los acil-CoA u acil-carnitina y con el cit c, induciendo su disociación de la membrana interna mitocondrial y su salida a través de la membrana externa mitocondrial. Los AG activados atraviesan la membrana externa e interna para ser oxidados vía la β-oxidación, pero también interactúan con la membrana induciendo cambios en el potencial transmembranal evaluado por el movimiento de los protones de la matriz hacia el espacio intermembranal por medio de la fluorescencia de la rodamina que es un catión lipofílico. Los ácidos palmítico y linoléico han sido descritos como agentes desacoplantes (Murray *et al.*, 2014) y también juegan papeles estructurales y funcionales complejos en las células eucariotas. Los AG tienen efectos prominentes en la membrana interna mitocondrial, donde inducen una disipación del gradiente electroquímico de protones generado por la cadena respiratoria mitocondrial a través del complejo I, III y IV (Wojtczak y Wieckowski, 1999) y promueven la apertura del poro de transición de permeabilidad (PTP), un canal de alta conductancia (Giorgio *et al.*, 2012) que induce la liberación de proteínas mitocondriales apoptogénicas en el citosol. Por lo tanto, los AG no esterificados son previsiblemente complejos, debido a su papel como agentes desacoplantes y reguladores de canales iónicos (Penzo *et al.*, 2002).

La adición de carnitina, Co-enzima A y ATP en presencia de los ácidos grasos palmítico y linoléico y su efecto protector contra el colapso del potencial transmembranal inducido por los ácido grasos sin cofactores sugiere que el

transporte y la β -oxidación de los ácidos grasos en presencia de los diferentes cofactores generan sustratos oxidativos como acetil-CoA que entra en el ciclo de Krebs para la generación de donadores de electrones que se transfieren a través de la cadena respiratoria mitocondrial evitando el colapso del potencial transmembranal inducido por los AGNE.

8. CONCLUSIONES

- ❖ La liberación de citocromo *c* de las mitocondrias aisladas de hígado del modelo con SM es menor que la de mitocondrias controles oxidando piruvato/malato o malato.
- ❖ El ácido palmítico y linoléico en presencia de CoA y ATP induce un aumento en la liberación de cit *c* en ambas mitocondrias, siendo más sensibles las mitocondrias con SM.
- ❖ El palmitoil-carnitina (PC) sustrato directo de la carnitina translocasa y de la beta-oxidación induce un aumento dosis-respuesta en la liberación de cit *c*.
- ❖ Estos resultados sugieren que el efecto del ácido palmítico y del linoléico requiere de su activación y translocación hacia la matriz mitocondrial, para inducir la liberación del cit *c*.
- ❖ La adición de Co-enzima A y ATP en presencia de ácido palmítico protege contra el colapso del potencial transmembranal inducido por el ácido graso sin cofactores y esto se ve favorecido cuando el ácido graso esta presente como palmitoil-carnitina.

9. PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto que tienen los ácidos grasos libres sobre el control respiratorio mitocondrial.
- Estandarizar con una curva de calibración concentración de TMRM vs fluorescencia, para conocer el valor del potencial transmembranal ($\Delta\Psi$) cuando se agregan los AG libres y cuando estos son activados e indicidos a su oxidación.

10. LITERATURA CITADA

- ♣ Abe, M., Niibayashi, R., Koubori, S., Moriyama, I., y Miyoshi, H. (2011). Molecular mechanisms for the induction of peroxidase activity of the cytochrome *c*-cardiolipin complex. *Biochemistry*, 50(39), 8383–91.
- ♣ Abundis, E., Sánchez, S. y El-Hafidi, M. (2005). Participación de la mitocondria en el estrés oxidativo en hígado de rata con Síndrome Metabólico. *Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas*. [en línea] 13 al 18 noviembre 2005. [fecha de consulta: 9 de mayo del 2015]. Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57630304>>
- ♣ Ahima, R. (2006). Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity*, 14(S8), 242S-249S.
- ♣ Alkhoury, N., Dixon, J., y Feldstein, E. (2009). Lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease: not all lipids are created equal. *Expert Review Gastroenterology Hepatology*, 3(4), 445-51.
- ♣ Alkhoury, N., Carter-Kent, C., y Feldstein, A. (2011). Apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease: diagnostic and therapeutic implications. *Expert Review Gastroenterology Hepatology*, 5(2), 201-12.
- ♣ Aleixandre de Artiñano, A., y Castro, M. (2009). Experimental rat models to study the metabolic syndrome. *British Journal of Nutrition*, 102(9), 1246–53.
- ♣ Amstrong, F., Bennett P. (1982). *Bioquímica*. España, Barcelona: Reverté. 55-56.
- ♣ Asiedu, D., Skorve, J., Willumsen, N., Demoz, A., y Rolf, K. (1993). Early effects on mitochondrial and peroxisomal β -oxidation by the hypolipidemic 3-thia fatty acids in rat livers. *Elsevier Science*, 1166, 73-76.
- ♣ Ayala, I., Camara, P., y Fernández-Pardo, J. (2008). Modelos animales experimentales de enfermedades de hígado graso y síndrome metabólico. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 24, 5-16.
- ♣ Bairwa, S., Rajapurohitam, V., Gan, X., Mangat, R., Proctor, S., y Karmazyn, M. (2016). Cardiomyocyte Antihypertrophic Effect of Adipose Tissue Conditioned Medium from Rats and Its Abrogation by Obesity is

Mediated by the Leptin to Adiponectin Ratio. *PLoS One*, 11(1), doi:10.1371/journal.pone.0145992.

- ♣ Baldrige, A., Pérez, A., Graeme-Cook, F., Higgins, L., y Lavine, J. (1995). Idiopathic steatohepatitis in childhood: a multicenter retrospective study. *Journal of Pediatrics*, 127 (5), 700-704.
- ♣ Baños, G., Carvajal, K., Cardoso, G., Zamora, J., y Franco, M. (1996). Vascular Reactivity and Effect of Serum in a Rat Model of Hypertriglyceridemia and Hypertension. *American J of Hypertension*, 4(10): 379-88.
- ♣ Bechmann, L., Hannivoort, R., Gerken, G., Hotamisligil, G., Trauner, M., y Canbay, A. (2012). The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *Journal of Hepatology*, 56(4), 952-964.
- ♣ Belikova, N., Vladimirov, Y., Osipov, A., Kapralov, A., Tyurin, V., Potapovich, M., Basova, L., Peterson, J., Kurnikov, I., y Kagan, V. (2005). Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes. *Biochemistry*, 45(15), 4998-5009.
- ♣ Begriche, K., Igoudjil, A., Pessayre, D., y Fromenty, B. (2006). Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it Mitochondrion. *Elsevier Science*, 6(1), 1–28.
- ♣ Bouchier, H., Lartigue, L., y Newmeyer, D. (2005). Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death. *Clinical Investigation*, 115(10), 2640 –2647.
- ♣ Browning, J., y Horton, J. (2004). Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *Clinical Investigation*, 114(2), 147–52.
- ♣ Bonen, A., Tandon, N., Glatz, F., Luiken, J., y Heigenhauser, J. (2006). The fatty acid transporter FAT/CD36 is upregulated in subcutaneous and visceral adipose tissues in human obesity and type 2 diabetes. *International Journal of Obesity*, 30(6), 877-83.
- ♣ Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., y Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15, 269-90.

- ♣ Camara, A., Lesnefsky, E., y Stowe, D. (2010). Potential Therapeutic Benefits of Strategies Directed to Mitochondria. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(3): 279–347.
- ♣ Carvajal, K. (2005). *¿Cómo Podemos estudiar las Enfermedades Metabólicas con Modelos Experimentales?* Recuperado el: 12 de octubre del 2015, del sitio web: Facultad de Química Dpto. Biología, Universidad Nacional Autónoma de México: http://www.quimica.unam.mx/IMG/pdf/Dra._Karla_Caarvajal.pdf
- ♣ Cichoż-Lach, H., y Michalak, A. (2014). Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World Journal Gastroenterol*, 20(25), 8082-91.
- ♣ Chen, S., Fan, H., Zhou, H., Wu, H., Xia, C., y Li, Y. (2011). Relationship between nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Digestive Diseases*, 12, 125–30.
- ♣ Clark, J., Brancati, F., y Diehl, A. (2003). The prevalence and etiology of elevated amino-transferase levels in the United States. *The American Journal of Gastroenterology*, 98(5), 960-67.
- ♣ Crepaldi, G., y Stefania, M. (2006). El Síndrome Metabólico un Contexto Histórico. *Diabetes Voice*, 51, 8-9.
- ♣ Coelho, M., Oliveira, T., y Fernandes, R. (2013). Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Archives of Medical Science*, 9(2), 191–200.
- ♣ Cohen, J., Horton, J., y Hobbs, H. (2011). Human fatty liver: old questions and new insights. *Science*, 332(6037), 1519-23.
- ♣ Day, C., y James, O. (1998). Steatohepatitis: a tale of two hits? *Clinical Gastroenterology Hepatology*, 114(4), 842–45.
- ♣ Debatin, K. (2000). Activation of apoptosis pathways by anticancer treatment. *Toxicology Letters*, 112(113), 41-48.
- ♣ Degterev, A., Boyce, M., y Yuang, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene*, 22(53), 8543-67.
- ♣ Donnelly, L., Smith, I., Schwarzenberg, J., Jessurun, J., Boldt, D., y Parks, J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins

in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical Investigation*, 115(5), 1343–51.

- ♣ Dupuis, L. (2013). Mitochondrial quality control in neurodegenerative diseases: focus on mitochondrial. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acid*, 88(1), 105-14.
- ♣ Eckel, R., Grundy, S., y Zimmet, P. (2005). The metabolic syndrome. *The Lancet*, 365(9468), 1415-1428.
- ♣ El-Hafidi, M., y Baños, G. (1997). In Vivo Plasma Lipid Oxidation in Sugar-Induced Rat Hypertriglyceridemia and Hypertension. *American heart*, 30 (3 Pt 2), 624-628.
- ♣ El-Hafidi, M., Cuéllar, A., Ramírez, J., y Baños, G. (2001). Effect of sucrose addition to drinking water that induces hypertension in rats on liver microsomal $\Delta 9$ and $\Delta 5$ desaturase activities. *Journal Nutritional Biochemistry*, 12(7), 396-403.
- ♣ El-Hafidi, M., Pérez, I., Carrillo, S., Cardoso, G., Zamora, J., Chavira, R., Baños, G. (2006). Effect of sex hormones on non-esterified fatty acids, intra-abdominal fat accumulation, and hypertension induced by sucrose diet in male rats. *Clinical and Experimental Hypertension*, 28(8), 669-81.
- ♣ Elliot, S., Keim, N., Stern, J., Teff, K., y Havel, P. (2002). Fructose, weight gain and the insulin resistance syndrome. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(5), 911-22 pp.
- ♣ Esquinas, M. (2012). Instituto de biología y genética molecular. Localización y función de la lipina-1 en macrófagos (Tesis doctoral). Universidad de Valladolid. Facultad de Medicina.
- ♣ Feduchi, E., Romero, M., Conde, C., Blasco, C., y García-Hoz, J. (2011). *Bioquímica conceptos esenciales*. España, Madrid: Médica Panamericana. 272-80.
- ♣ Fischer, U., y Schulze-Osthoff, K. (2005). Apoptosis-based therapies and drug target. *Cell Death Differentiation*, 12(1), 942–961.

- ♣ Fromenty, B., Robin, A., Igoudjil, A., Mansouri, A., y Pessayre, D. (2004). The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes & Metabolism*, 30(2), 121-138.
- ♣ Fu, S., Yang, L., Li, P., Hofmann, O., Dicker, L., Hide, W., Lin, X., Watkins, M., Ivanov, R., y Hotamisligil, S. (2011). Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature*, 473(7348), 528-31.
- ♣ Fuetes, A., Castiñeiras, J., y Queraltó, M. (1998). *Técnicas electroquímicas. Bioquímica clínica y patología molecular*. España, Barcelona: Reverté. 565.
- ♣ Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., et al. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Clinical Investigation*, 114(12), 1752-61.
- ♣ Galluzzi, L., Kepp, O., y Kroemer, G. (2012). Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Molecular Cell Biology*, 13(12), 780-88.
- ♣ Ganzetti, G., Campanati, A., y Offidani, A. (2015). Non-alcoholic fatty liver disease and psoriasis: So far, so near. *World Journal Hepatology*, 7(3), 315-26.
- ♣ Giorgio, V., Petronilli, V., Ghelli, A., Carelli, V., Rugolo, M., Lenaz, G., y Bernardi, P. (2012). The effects of idebenone on mitochondrial bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1817(2), 363-369.
- ♣ Granville, J., y Gottlieb, A. (2002). Mitochondria: Regulators of Cell Death and Survival. *The Scientific World Journal*, 2, 1569-78.
- ♣ Green, R. (2003). Overview: apoptotic signaling pathways in the immune system. *Immunological Reviews*, 193, 5–9.
- ♣ Hail, N., Carter, Z., Konopleva, M., y Andreeff, M. (2006). Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 11(6), 889-904.
- ♣ Hengartner, O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770-776.

- ♣ Hetts, W. (1998). To die or not to die: An Overview of Apoptosis and its Role in Disease. *JAMA*, 279(4), 300-307.
- ♣ Hernández, S. El modelo animal en las investigaciones biomédicas. (2006). *Centro de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Montevideo*, 2(3): 252-256.
- ♣ Hikita, E., Arai, M., Tanaka, S., Onda, K., Utsumi, H., Yuan, B., Toyoda, H., y Hirano, T. (2011). Effects of inorganic an organic arsenic compounds on growth and apoptosis of human T-lymphoblastoid leukemia cells. *Anticancer Research*, 31(12), 4169-78.
- ♣ Holland, L., y Summers, A. (2008). Sphingolipids, Insulin Resistance, and Metabolic Disease: New Insights from in Vivo Manipulation of Sphingolipid. *Metabolism Reviews*, 29(4), 381–402.
- ♣ Hu, B., y Malik, S. (2010). Sugar-sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: epidemiologic evidence. *Physiology & Behavior Journal*, 100(1), 47-54.
- ♣ Hui, M., Kench, G., Chitturi, S., Sud, A., Farrell, C., Byth, K., Hall, P., Khan, M., y Gorge, J. (2003). Long-term outcomes of cirrhosis in nonalcoholic steatohepatitis compared with hepatitis C. *Hepatology*, 38(2), 420–427.
- ♣ *The IDF consensus worldwide definition of the METABOLIC SYNDROME.* (s.f.).Recuperado el 14 de septiembre del 2015, de http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Meta_def_final.pdf
- ♣ Islas, A., Revilla, C., Monsalve, E., y Caballero, A. *Síndrome Metabólico. Un punto de vista en México y en Latinoamérica.* [en línea]. Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, México. [Fecha de consulta: 26 de diciembre del 2015]. Disponible en:<http://www.amc.org.mx/web2/images/media/enfermedad/sindromemetabolico.pdf>
- ♣ INEGI. *Egresos hospitalarios 2002-2013* [en línea] Méxcio [fecha de consulta: 13 de septiembre del 2015]. Base de datos disponible en:

<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/default.aspx?t=msal04&s=est&c=35136>.

- ♣ INEGI. *Principales causas de muerte en México, estadísticas de mortandad* [en línea] Méxicio [fecha de consulta: 6 de febrero del 2017]. Base de datos disponible en:
<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo125&s=est>
- ♣ Kaur, J. (2014). A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology Research and Practice*, 2014, 21.
- ♣ Kawano, Y., y Cohen, D. (2013). Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal Gastroenterology.*, 48(4): 434–41.
- ♣ Kerr, R., Wyllie, H., y Currie, R. (1972). Apoptosis: a basic biology phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-57.
- ♣ Kersten, S. (2001). Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Reports.*, 2(4), 282–286.
- ♣ Kischkel, C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, H., y Peter, E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO Journal.*, 14(22), 5579–5588.
- ♣ Kohler, C., Orrenius, S., y Zhivotovsky, B. (2002). Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *Journal of Immunological Methods*, 265 (1-2), 97–110.
- ♣ Launay, S., Hermine, O., Fontenay, M., Kroemer, G., Solary, E., y Garrido, C. (2005). Vital functions for lethal caspasas. *Oncogene*, 24(33), 5137–5148.
- ♣ LaBrecque, D., *et al.* Enfermedad del hígado graso no alcohólico y esteatohepatitis no alcohólica. *Guías de la Organización Mundial de Gastroenterología* [en línea]. Recuperado el: 2 de septiembre del 2015 de,

<http://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/naflid-nash/naflid-nash-spanish>

- ♣ Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, M., Ahmad, M., Alnemri, S., y Wang, X. (1997). Cytochrome *c* and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4), 479–489.
- ♣ Li, Q., Kira, Y., *et al.* (2006). A possible cooperation of SOD1 and cytochrome *c* in mitochondria-dependent apoptosis. *Free Radic Biology and Medicine*, 40, 173-181.
- ♣ Lizardi-Cervera, J., Laparra, I., Chavez-Tapia, C., Ostos, E., y Esquivel, U. (2006). Prevalence of NAFLD and Metabolic Syndrome in Asymptomatic Subjects. *Annals of hepatology: official journal of the Mexican Association of Hepatology*, 13(2), 453-9.
- ♣ Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., y Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- ♣ Mantzaris, D., Tsianos, V., y Galaris, D. (2011). Interruption of triacylglycerol synthesis in the endoplasmic reticulum is the initiating event for saturated fatty acid-induced lipotoxicity in liver cells. *FEBS Journal*, 278(3), 519-30.
- ♣ Martínez, E., Carrillo, S., y El-Hafidi, M. (2005). Participación de la mitocondria en el estrés oxidativo en hígado de rata con síndrome metabólico. *Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas*. [en línea]. Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. Oaxaca, Oaxaca. [fecha de consulta: 23 de septiembre 2016]. Disponible en: <http://docplayer.es/8034365-Participacion-de-la-mitocondria-en-el-estres-oxidativo-en-higado-de-rata-con-sindrome-metabolico.html>
- ♣ Metzler, D. *Biochemistry*. (2003). The chemical reactions of living cells. Estados Unidos, Massachusetts: Academic press. 1977.
- ♣ Morelli, M., Gaggini, M., Daniele, G., Marraccini, P., Sicari, R., y Gastaldelli, A. (2013). Ectopic fat: The true culprit linking obesity and cardiovascular disease? *Thrombosis and Haemostasis*, 110(4), 623-856.

- ♣ Murray, M., Eziwar, D., Allison, E., y Rawling, T. (2014). Lipid analogues as potential drugs for the regulation of mitochondrial cell death. *British Journal Pharmacology*, 171(8), 2051–2066.
- ♣ Müller, M., Mentel, M., Jaap, J., Henze, K., Woehle, C., Sven, B., Yu, R., van der Giezen, M., Aloysius, M., y William, M. (2012). Biochemistry and Evolution of Anaerobic Energy Metabolism in Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 76(2), 444–495.
- ♣ Nassir, F., y Ibdah, A. (2014). Role of mitochondria in alcoholic liver disease. *World Journal Gastroenterology*, 20(9), 2136-42.
- ♣ Nassir, F., y Ibdah, A. (2014). Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(5), 8713-42.
- ♣ Neuschwander-Tetri, A. (2010). Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 52, 774–788.
- ♣ Noshita, N., Sugawara, T., Fujimura, M., Morita-Fujimura, Y., y Chan, H. (2001). Manganese superoxide dismutase affects cytochrome c release and caspase-9 activation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Journal Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 21(5), 557-67.
- ♣ *Obesidad y sobrepeso. Nota descriptiva N° 311*. 2015. [en línea]. Recuperado el 14 de abril del 2016, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
- ♣ Peterson, L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83(2), 346-356.
- ♣ Penzo, D., Tagliapietra, C., Colonna, R., Petronilli, V., y Bernardi, P. (2002). Effects of fatty acids on mitochondria: implications for cell death. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1555(1-3), 160–165.
- ♣ Pérez, I., Nava, P., Guarner, V., Posadas, R., y Baños, G. (1999). Insulin induced endothelin release and vasoreactivity in hypertriglyceridemic and

- hypertensive rats. *American Heart Jnl and Circulatory Phyiology*, 277(1), H399-404.
- ♣ Pieczenik, R., y Neustadt, J. (2007). Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Experimental and molecular pathology*, 83(1), 84-92.
 - ♣ Postic, C., y Girard, J. (2008). Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *Clinical Investigation*, 118(3), 829–38.
 - ♣ Rao, S., y Reddy, K. (2004). PPAR_α in the pathogenesis of fatty liver disease. *Hepatology*, 40(20), 783–786.
 - ♣ Rashid, M., y Roberts, E. (2000). Nonalcoholic steatohepatitis in children. *Journal of Pediatric Gastroenterology Nutrition*, 30(1), 48-53.
 - ♣ Reaven, M. (1999). Syndrome X: 10 years after. *Drugs*, 58(1), 19-20.
 - ♣ Reaven, M. (2005). Why Syndrome X? From Harold Himsworth to the Insulin Resistance Syndrome Cell Metabolims. *Elsevier*, 20(1), 9-12.
 - ♣ Reaven, M. (2014). Demonstration of the Central Role of Insulin Resistance in Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease. *Diabetes Care*, 37, 1178-118.
 - ♣ Reinartz, A., Ehling, J., Leue, A., Liedtke, C., Schneider, U., Kopitz, J., Weiss, T., Hellerbrand, C., Weiskirchen, R., Knüchel, R., y Gassler, N. (2010). Lipid-induced up-regulation of human acyl-CoA synthetase 5 promotes hepatocellular apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1801(9), 1025-35.
 - ♣ Reddy, K., y Rao, M. (2006). Lipid Metabolism and Liver Inflammation II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *American Journal Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*, 290, G852–G858.
 - ♣ Reddy, K., y Hashimoto, T. (2001). Peroxisomal β -oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor α : an adaptive metabolic system. *Annual Review of Nutrition*, 21, 193–230.
 - ♣ Rosenthal, D., y Glew, H. (2011). Medical Biochemistry. Human metabolism in health and disease. Estados Unidos: Wiley. 289.

- ♣ Rui, L. (2014). Energy Metabolism in the Liver. *Comprehensive Physiology*, 4(1), 177–197.
- ♣ Ruiz R. (2012). Efecto del sobre-expresión de las UCPS sobre la liberación del citocromo c en un modelo de síndrome metabólico (*Tesis de doctoral*) [en línea]. *Universidad Autónoma de México. Facultad de Medicina. Posgrado en Ciencias Biológicas*. Octubre 2012.
- ♣ Ruiz, A., Barrios, M., López, O., Molina, D., y El-Hafidi, M. (2015). Cytochrome release from rat liver mitochondria is compromised by increased saturated cardiolipin species induced by sucrose feeding. *The American Journal Physiology Endocrinology*, 309, E777–E786.
- ♣ Samuel, T., Petersen, F., y Shulman, I. (2010). Lipid-induced insulin resistance unravelling the mechanism. *Lancet*, 375, 2267–2277.
- ♣ Sanyal, A., Campbell-Sargent, C., Mirshahi, F., Rizzo, W., Contos, M., Sterling, R., Luketic, V., Shiffman, M., y Clore, J. (2001). Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*, 120(5), 1183–92.
- ♣ Sanyal, J. (2005). Mechanisms of disease: pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*, 2(1), 46-53.
- ♣ Sanderson, T., Reynolds, C., Kumor, R., Przyklenk, K., y Hüttemann, M. (2013). Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membranepotential in reactive oxygen species generation. *Molecular Neurobiology*, 47(1), 9-23.
- ♣ Saponaro, C., Gaggini, M., Carli, F., y Gastaldelli, A. (2015). The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: a Critical Point in Metabolic Homeostasis. *Nutrients*, 7(11), 9453–9474.
- ♣ Satyajit, M., Ben-Mrnachem, T., Gopikrishnan, V., Chan K., y Blumenkehl, M. (1999). Perspective evaluation of unexplained chronic liver transaminase abnormalities in asymptomatic and symptomatic patients. *American Journal of Gastroenterology*, 94, 3010-14.

- ♣ Serviddio, G., Sastre, J., Bellanti, F., Viña, J., Vendemiale, G., y Altomare, E. (2008). Mitochondrial involvement in non-alcoholic steatohepatitis. *Molecular Aspects of Medicine*, 29(1-2), 22–35.
- ♣ Storlien, H., Higgins, A., Thomas, C., Brown, A., Wang, Q., y Huang, F. (2000) Diet composition and insulin action in animal models. *Else British Journal of Nutrition*, 83(1), S85–S90.
- ♣ Targher, G., Bertolini, L., Padovani, R., Rodella, S., Tessari, R., Zenari, L., et al. (2007). Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes*, 30, 1212-1218.
- ♣ Vázquez, E., Cárdenas, J., Tolosa, A., El-Hafidi, E. (2005). Respiratory chain complexes and membrane fatty acids composition in rat testis mitochondria throughout development and ageing. *Experimental Gerontology Journal*, 40(6), 482-90.
- ♣ Vilchis, G., Galván, M., Klünder, M., Cruz M., y Flores, S. (2015). Food habits, physical activities and sedentary lifestyles of eutrophic and obese school children: a case-control study. *BMC Public Health*, 15, 124 pp.
- ♣ Voet, D., Voet, G., y Pratt, W. (2007). *Fundamentos de bioquímica*. 2da edición. Madrid, España. Médica Panamericana. 1023.
- ♣ Wei, Y., Rector, R., Thyfault, J., y Ibdah, J. (2008). Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World Journal of Gastroenterology*, 14(2), 193-9 pp.
- ♣ *Guías de la Organización Mundial de Gastroenterología Enfermedad del hígado graso no alcohólico y esteatohepatitis no alcohólica*. Junio de 2012. Recuperado el 23 de noviembre del 2015, de: <http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/naflid-nash-spanish-2013.pdf>
- ♣ Wanless, I., Lentz, J. (1999). Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology*, 12(5), 1106-1110.

- ♣ Wojtczak, L., y Wieckowski, R. (1999). The Mechanisms of Fatty Acid-Induced Proton Permeability of the Inner Mitochondrial Membrane. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 31(5), 447–455.
- ♣ Wurtman, J. (2011). Non-nutritional uses of nutrients. *European Journal of Pharmacology*, 668, S10-S15.
- ♣ Xu, Z., Zhang, D., He, X., Hung, Y., y Shao, H. (2016). Transport of Calcium Ions Mitochondria. *Current Genomics*, 3, 215-9.
- ♣ Yamashita, A. (2014). Glycerophosphate/Acylglycerophosphate Acyltransferase. *Biology (Basel)*, 3(4), 801–830.
- ♣ Yan, S., Yang, F., Liu, H., Fu, N., Ouyang, Y., y Qing, K. (2015). Long-chain acyl-CoA synthetase in fatty acid metabolism involved in liver and other diseases: an update. *World Journal Gastroenterol*, 28: 21(12), 3492-8.
- ♣ Yong-Ling, P., Douglas, R., Zhenyue, H., y Tak, M. (2008). Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 532-542.
- ♣ Yunta, R. (2012). Desafíos éticos de la investigación con animales, manipulación genética. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 29(4), 535–540.
- ♣ Zhang, Y., Xue, R., Zhang, Z., Yang, X., y Shi, H. (2012). Palmitic and linoleic acids induce ER stress and apoptosis in hepatoma cells. *Lipids in Health and Disease*, (11)1, DOI: 10.1186/1476-511X-11-1.
- ♣ Zamzami, N., *et al.* (1995). Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death *in vivo*. *The Journal Experimental Medicine*, 181, 1661–1672.