



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Estudio sobre la liberación de enzimas de la matriz de mitocondrias de hígado de ratas intactas y en regeneración inducida por hepatectomía parcial

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Aurora Angélica Castañeda Arroyo

Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz  
Instituto de Fisiología Celular

Dra. Xóchitl Pérez Martínez  
Instituto de Fisiología Celular

Dra. María Elena Ibarra Rubio  
Facultad de Química

Ciudad de México. Septiembre, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**Castañeda Arroyo Aurora Angélica**  
**Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas**  
**P r e s e n t e**

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 21 de mayo del presente año, revisaron su solicitud de **RATIFICACIÓN de JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Estudio sobre la liberación de enzimas de la matriz de mitocondrias de hígado de ratas intactas y en regeneración inducida por hepatectomía parcial**", dirigida por el/la Dr(a). **Hernández Muñoz Rolando Efraín**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	González Halphen Diego
VOCAL	Uribe Carvajal Salvador
VOCAL	García Trejo José de Jesús
VOCAL	Peraza Reyes Carlos Leonardo
SECRETARIO	Funes Argüello María Soledad

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 21 de mayo de 2018.  
**COORDINADORA**



**Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ**

## **Reconocimientos**

El presente trabajo se realizó en el departamento de Biología Celular y del Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular, bajo la dirección del Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz.

Mi comité tutorial:

Dra. Xóchitl Pérez Martínez

Dra. María Elena Ibarra Rubio

Por sus comentarios, que hicieron posible enriquecer el proyecto durante su desarrollo y fortalecer mi formación durante el posgrado.

A Lourdes Sánchez Sevilla, por la asesoría técnica para la realización de este trabajo, en el uso del equipo del laboratorio y manejo de los animales para la experimentación.

Para la realización de los estudios de Maestría en el programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas se recibió el apoyo de la Dirección de Formación de Científicos y Tecnólogos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de CVU/Becario: 288780/254213. También se reconoce al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por los recursos brindados para participar en el XXIX Congreso de la Sociedad Mexicana de Bioquímica.

## **Dedicatorias**

A mi Padre Dios y a mi Señor Jesucristo, pues sin su gracia salvadora y su perdón yo estaría perdida. Porque nunca me dejó y ha guiado mi vida hasta el día de hoy para crecer y terminar en mí la obra que empezó hace más de 14 años. Porque su perdón, su paciencia y su constancia en mi vida es lo que me ha dado la fuerza y el valor necesario para terminar esta tesis a pesar de que ha pasado mucho tiempo y de que parecía que ya se había perdido. Porque en mi debilidad su amor y su gloria resplandece aún más.

A mi esposo Enrique De La Cruz, mi ayuda idónea. Gracias por acompañarme y participar todo el tiempo de esta lucha y aún más cuando soy difícil. Gracias por tu amor y tus palabras, por tu consuelo, por reprenderme cuando lo necesito, por tu paciencia y tus oraciones.

A mis padres Alejandro y Evangelina. Sepan que todo su amor y su sacrificio no ha sido en vano, y que de ustedes sólo he recibido el bien. Quisiera poder regresarles un granito de todo lo que han hecho por mí. Gracias por animarme a seguir adelante.

A mis hermanitos Ale y Bere. Dios es bueno todo el tiempo. Gracias por todos los buenos momentos compartidos, y porque me hacían siempre querer llegar a casa con ustedes.

## **Agradecimientos**

Al Dr. Rolando Hernández, muchas gracias por haberme dado la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo y desarrollar el proyecto hasta obtener el grado. Le agradezco enormemente su apoyo incondicional en cada ocasión. Ahora entiendo por qué me insistía en que sólo haciendo los experimentos podíamos conocer el resultado real. Gracias por sus buenos consejos, paciencia, y animarme a continuar haciendo preguntas.

A María de Lourdes Sánchez Sevilla y Martha Lucinda Contreras Zentella, por su ayuda y disponibilidad para poder trabajar cada día. A mis compañeros del 326N: Carmen, Edgar, Armando, Marisela y Diego.

A Karyna, Moi, Lilia, Miguel, Mau, Rubí, y la Dra. Laura Padierna. A Luis, Alba y Érika.  
Al fin...

A todos aquellos que oraron por mí.

“Cuando veo tus cielos, obra de tus dedos, la luna y las estrellas que tú formaste, digo: ¿Qué es el hombre, para que tengas de él memoria, y el hijo del hombre, para que lo visites? Le has hecho poco menor que los ángeles, y lo coronaste de gloria y de honra” (Salmos 8:3-5)

## Contenido

Abreviaturas y Fórmulas .....	8
Resumen .....	11
I. El hígado .....	13
Generalidades.....	13
Anatomía.....	13
II. Regeneración Hepática inducida por Hepatectomía Parcial .....	19
Generalidades de la regeneración hepática .....	19
El modelo de la hepatectomía parcial (HP) .....	20
III. Fisiología Mitocondrial en la regeneración hepática .....	26
Generalidades de las mitocondrias .....	26
Cambios en las mitocondrias durante la regeneración hepática .....	30
III. Antecedentes.....	33
IV. Justificación .....	37
V. Hipótesis .....	38
VI. Objetivo General.....	38
VII. Materiales y Métodos.....	39
VII.1 Animales.....	39
VII.2 Extracción del hígado.....	39
VII.3 Aislamiento de mitocondrias .....	39
VII.4 Oximetría .....	40
VII.5 Metabolitos .....	40
VII.6 Determinación de actividades enzimáticas.....	42
VII.7 Ensayo de liberación de enzimas mitocondriales .....	47
VII.8 Cálculos del porcentaje de actividad enzimática en el medio extramitocondrial ...	49
VII.9 Análisis estadístico.....	49
VIII. Resultados.....	50
Efecto de diversos agentes químicos sobre la liberación de las enzimas .....	55
Glutamato Deshidrogenasa (GDH) .....	55
Ornitina Transcarbamilasa (OTC).....	58
Malato Deshidrogenasa (MDH).....	61
Aspartato Aminotransferasa (AST).....	64

Efecto del tiempo de incubación sobre la liberación <i>in vitro</i> de las enzimas al medio extramitocondrial .....	67
Efecto de la temperatura de incubación sobre la liberación <i>in vitro</i> de las enzimas al medio extramitocondrial .....	72
Efecto de la concentración de mitocondrias sobre la liberación <i>in vitro</i> de las enzimas al medio extramitocondrial .....	77
IX. DISCUSIÓN.....	82
X. CONCLUSIONES .....	89
XI. PERSPECTIVAS .....	91
XII. REFERENCIAS .....	92
Anexo I. Actividad <i>in vitro</i> de las enzimas GDH, OTC, MDH y AST. ....	97

## Abreviaturas y Fórmulas

ADNmt	ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ADP	adenosina difosfato
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia
ALT	alanina aminotransferasa
AST	aspartato aminotransferasa
ATP	adenosina trifosfato
BHT	butil-hidroxitolueno
CCl <sub>4</sub>	tetracloruro de carbono
CCCP	carbonil cianuro m-clorofenil hidrazona
CR	control respiratorio
CsA	ciclosporina A
CTE	cadena transportadora de electrones
CYP450	citocromo P450
Cyt <i>c</i>	citocromo <i>c</i>
DEA	dietanolamina
EGF	factor de crecimiento epidérmico (por las siglas en inglés de: epidermal growth factor)
EGFR	receptor del factor de crecimiento epidérmico (por las siglas en inglés de: epidermal growth factor receptor)
EIM	espacio intermembranal mitocondrial
F1,6biPasa	fructosa 1,6 bifosfatasa
FAD	dinucleótido de adenina flavina oxidado (por las siglas en inglés de: flavin adenine dinucleotide)
FADH	dinucleótido de adenina flavina reducido (por las siglas en inglés de: flavin adenine dinucleotide)
Fe-NTA	nitrilotriacetato férrico

FGF1 y 2	factor de crecimiento de fibroblastos 1 y 2 (por las siglas en inglés de: fibroblast growth factor 1 y 2)
FMN	flavina mononucleótido
G6Pasa	glucosa 6 fosfatasa
GDH	glutamato deshidrogenasa
GSH	glutación reducido
GSSG	glutación oxidado
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrógeno
HGF	factor de crecimiento de hepatocitos (por las siglas en inglés de: hepatocyte growth factor)
HK	hexocinasa
HO-1	oxigenasa de hemo 1 (por las siglas en inglés de: heme oxygenase-1)
HP	hepatectomía parcial
IL-1 y 6	interleucina 1 y 6
kDa	kilodaltones
LPS	lipopolisacárido
MDH	malato deshidrogenasa
ME	membrana externa mitocondrial
MI	membrana interna mitocondrial
MPTp	poro de transición de la permeabilidad de la membrana (por las siglas en inglés de: membrane permeability transition pore)
NAD(P)	nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato)
NK	células asesinas naturales (por las siglas en inglés de: natural killer)
ODC	ornitina descarboxilasa
OTC	ornitina transcarbamilasa
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas

	(por las siglas en inglés de: platelet-derived growth factor)
PEPCK	fosfoenolpiruvato carboxicinas (por las siglas en inglés de: phosphoenol pyruvate carboxikinase)
PyrK	piruvato cinasa (por las siglas en inglés de: pyruvate kinase)
S3 y S4	estado 3 y 4 de la respiración mitocondrial
TGF $\alpha/\beta$	factor de crecimiento transformante $\alpha/\beta$ (por las siglas en inglés de: tumor growth factor $\alpha/\beta$ )
TNF	factor de necrosis tumoral (por las siglas en inglés de: tumor necrosis factor)
uPA	urocinasa activadora de plasminógeno (por las siglas en inglés de: urokinase plasminogen activator)
VEGF	factor de crecimiento vascular endotelial (por las siglas en inglés de: vascular endotelial growth factor)

## Resumen

Cada uno de los agentes que dañan al hígado produce un patrón característico de actividad enzimática en suero. En la práctica clínica, los diferentes patrones enzimáticos se utilizan como biomarcadores de la función hepática y para distinguir el agente causante del daño. Tradicionalmente se ha pensado que el aumento de las enzimas en el suero se debe únicamente a que las enzimas más abundantes en cada zona del hígado dañado son vertidas de las células necróticas al torrente sanguíneo; sin embargo, no sucede así en todos los casos. En el modelo de regeneración inducida por hepatectomía parcial (HP) también se ha observado la liberación selectiva de enzimas hepáticas al torrente sanguíneo a pesar de que no hay un aumento del número de cuerpos necróticos ni apoptóticos en el tejido remanente, y es similar a los que se observan en hígados intactos. También en el caso en el que se administra un agente hepatotóxico de manera aguda durante la HP como el alcohol, en lugar de observarse un aumento de enzimas en el suero éstas disminuyen y correlaciona con un retraso en el proceso de regeneración del hígado. Por lo tanto, existen varias situaciones en las que no se observa una correlación entre la necrosis del tejido hepático y el aumento de la actividad de enzimas hepáticas en el suero. Existe la posibilidad de que la liberación selectiva de enzimas del hígado tenga un papel fisiológico que se asocie al establecimiento de la regeneración hepática durante la fase prereplicativa; especialmente de las enzimas de localización mitocondrial.

Estudios realizados en el laboratorio del Dr. Rolando Hernández se han centrado en conocer los mecanismos que regulan la liberación de enzimas hepáticas al suero durante la HP en ratas. Utilizando varios modelos como el hígado perfundido, rebanadas o hepatocitos, se ha encontrado que la liberación de enzimas hepáticas al suero durante la HP tiene dos componentes. El primero es dependiente de los cambios hemodinámicos que ocurren después de la resección de una parte del hígado. El segundo componente es independiente de los cambios hemodinámicos y está relacionado a la disponibilidad de energía metabólica, la transcripción, y la integridad de los microtúbulos. Ya que algunas de las enzimas que aumentan en el suero son típicamente de localización mitocondrial, y que se observó que una parte depende de la disponibilidad de energía metabólica, se decidió estudiar el papel que juegan las mitocondrias en la liberación de enzimas al suero durante la regeneración inducida por HP.

En este trabajo se estudió la capacidad de las mitocondrias para regular la liberación de enzimas matriciales al medio en ausencia de otros componentes celulares. A pesar de que la morfología de un porcentaje de la población mitocondrial se ve afectada 24 h después de la HP,

varios indicadores del metabolismo y de la integridad de la mitocondria se mantienen como en los controles, e incluso aumentan durante esta fase de la regeneración. En ensayos *in vitro* se encontró que las mitocondrias hepáticas aisladas en diferentes tiempos posteriores a la HP son capaces de liberar enzimas de la matriz al medio sin que haya liberación de citocromo *c*, por lo que las membranas se mantienen funcionales. Se analizaron dos enzimas de localización dual (mitocondria y citoplasma): malato deshidrogenasa (MDH) y aspartato aminotransferasa (AST), junto con dos enzimas de localización exclusivamente mitocondrial: ornitina transcarbamilasa (OTC) y glutamato deshidrogenasa (GDH). Estas enzimas son muy diferentes en cuanto a su masa molecular y a la magnitud del incremento de su actividad en suero durante la regeneración hepática inducida por HP.

Se encontró que la liberación de enzimas de la matriz mitocondrial al medio puede ser regulada por la misma mitocondria en ausencia de otros componentes celulares. La capacidad de los tratamientos para modificar el porcentaje de actividad en el medio depende de la manipulación que se haya hecho del animal previa al aislamiento de los organelos. La salida es un proceso dependiente de energía que no depende de la masa molecular de la enzima funcional ni de su abundancia en la mitocondria. El tamaño de las enzimas estudiadas fue: GDH>OTC>AST>MDH, mientras que el porcentaje aproximado de actividad en el medio extramitocondrial en condiciones fosforilantes fue: GDH (20%)>MDH y AST (15%)>OTC (3-15%). También se encontró que la liberación de enzimas es un proceso rápido que ocurre durante los primeros 20 min. de incubación. Al modificar la fluidez de las membranas incubando a las mitocondrias en diferentes temperaturas, se observa un aumento en la salida de proteínas a partir de los 20 o 25°C. Asimismo, la cantidad de mitocondrias en el ensayo también modifica la liberación de enzimas matriciales. Por lo tanto, en nuestras condiciones de estudio, la liberación de enzimas de la matriz depende de la dinámica de la membrana mitocondrial.

## I. El hígado

### Generalidades

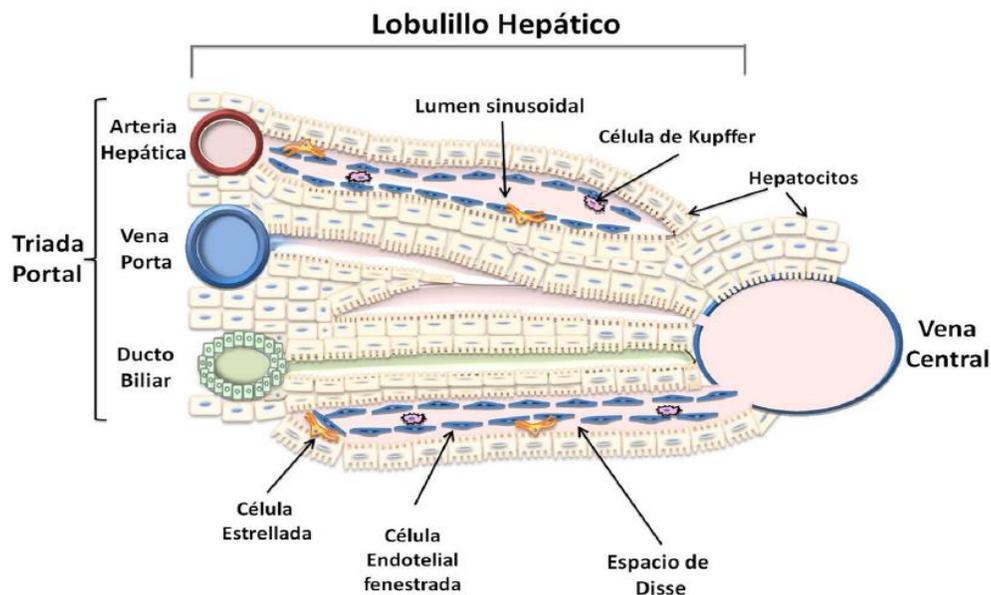
El hígado es la glándula más grande del cuerpo. En mamíferos adultos constituye entre el 3-5% del peso corporal y posee cuatro lóbulos: izquierdo, medio, derecho y caudado. A su vez, los tres últimos están compuestos por dos sublóbulos (Cascales, 2008). Este órgano se encuentra fisiológicamente interpuesto entre el tracto digestivo y el resto del cuerpo, por lo cual es el encargado de la incorporación, almacenamiento, conversión metabólica y liberación a la sangre y a la bilis, de aminoácidos, carbohidratos, lípidos y vitaminas (Michalopoulos, 2007; Cascales, 2008). Los hepatocitos (especialmente de la zona perivenosa) utilizan a la familia de citocromos P450 (CYP450) y el glutatión entre otros, para llevar a cabo los procesos de biotransformación de sustancias hidrofóbicas en derivados hidrosolubles que pueden ser excretados por bilis u orina para la detoxificación del organismo (Cascales, 2008). Por otra parte, los macrófagos residentes (células de Kupffer) detienen a las bacterias, endotoxinas, parásitos y glóbulos rojos envejecidos, sirviendo como parte del mecanismo de filtrado de la sangre (Boron y Boulpaep, 2012). Las diversas funciones que el hígado desempeña le convierten en un órgano vital.

### Anatomía

Entre el 80-85% del hígado está conformado por hepatocitos; también llamados células parenquimatosas. En éstos se llevan a cabo la mayor parte de los procesos metabólicos. Son células poliédricas que suelen presentar seis caras ya sea en contacto con el espacio sinusoidal o con otro hepatocito. Son células grandes, de 15 a 30  $\mu\text{m}$  de diámetro, con núcleos redondeados al centro de la célula. Existe un porcentaje de células poliploides y binucleadas en el tejido sano que varía en las diferentes especies, y se relaciona con la capacidad proliferativa de las células y su estado metabólico. En rata, alrededor de 30% de los hepatocitos maduros en estado quiescente son binucleados y más del 80% son poliploides (Seglen, 1997). Durante el desarrollo del hígado, la población poliploide y binucleada aumenta. Por el contrario, la binucleación *de novo* y la poliploidía se detienen por un momento durante la regeneración, y en todas las etapas de carcinogénesis aproximadamente el 70% de los hepatocitos son diploides (Seglen, 1997). Esto muestra la capacidad plástica de los hepatocitos para adaptarse a las necesidades metabólicas con las que se encuentran.

El hígado también contiene otros tipos celulares que constituyen el 15-20% restante y se les denomina en conjunto células no parenquimatosas. En su mayoría se trata de células endoteliales sinusoidales y del ducto biliar (60%), células de Kupffer (30%), células Pitt (1%), y

células estrelladas o de Ito (9%) (Fig. 1.1) (Boron y Boulpaep, 2012; Delgado-Coello y Mas-Oliva, 2017). Las células endoteliales son aplanadas y conforman la delgada pared de los sinusoides. Esta pared es discontinua con fenestras de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro en promedio y carece de lámina basal, por lo cual retiene únicamente a partículas grandes y células de la sangre; posee capacidad contráctil sensible a la acción de hormonas. Las células de Kupffer son los macrófagos residentes del hígado. Además de fagocitar eritrocitos envejecidos, tienen la función de eliminar virus y bacterias transportados por la sangre. Secretan citocinas y eicosanoides que sirven como moléculas para la comunicación entre las células hepáticas. Se depositan sobre el endotelio, en la luz del sinusoides y a menudo en los sitios de división de éstos. Las células Pitt son células NK (natural killer) específicas de hígado. Son ricas en gránulos y junto con las células de Kupffer ejercen su toxicidad contra células tumorales e infectadas con virus (como en el caso de hepatitis) (Luo y colaboradores, 2000). Las células estrelladas son lipocitos que almacenan lípidos y vitamina A, y también se les llama perisinusoidales por ubicarse alrededor del sinusoides. Poseen prolongaciones citoplasmáticas que rodean al sinusoides, con lo que regulan el flujo sanguíneo. Bajo ciertas condiciones remodelan la matriz extracelular depositando colágeno tipo I por lo que desempeñan un rol importante en el desarrollo de la fibrosis hepática (Geneser, 2005; Cascales, 2008; Boron y Boulpaep, 2012). El esquema de la Figura 1.1 muestra las posiciones relativas de las diferentes poblaciones celulares presentes en el lobulillo hepático.



**Figura 1.1 Estructura del lobulillo hepático.** En el esquema se indican las distintas poblaciones celulares del hígado y sus posiciones relativas en el lobulillo hepático. La orientación que cada tipo celular posee le permite llevar a cabo las funciones descritas en el texto. Tomada de Delgado-Coello y Mas-Oliva, 2017.

Los distintos tipos celulares interactúan dentro del hígado para llevar a cabo sus funciones. Por ejemplo, las células estelares secretan HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) y TGF $\beta$  (factor de crecimiento transformante  $\beta$ ); mientras que las células de Kupffer secretan citocinas (factor de necrosis tumoral TNF e interleucina 6 IL-6 entre otras) que regulan de manera parácrina el metabolismo de los hepatocitos (Cascales, 2008). Éstos a su vez secretan PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) que funciona como mitógeno para los lipocitos (Michalopoulos, 2007). Las interacciones célula-célula y el aporte de nutrientes y oxígeno desde la triada de Glisson o triada portal, también afectan el metabolismo. Así, el hígado es capaz de ajustarse a las necesidades fisiológicas cambiantes. Incluso el espacio que existe entre los hepatocitos y las células endoteliales sinusoidales, también conocido como espacio de Disse (0.5-1  $\mu$ m) sirve para la señalización autócrina y parácrina así como el intercambio de nutrientes entre los tipos celulares hepáticos. Por consiguiente, el funcionamiento del hígado depende de estímulos exteriores como los nutrimentos recibidos en la dieta, estímulos interiores secretables como las señales parácrinas, y asociaciones entre las diferentes poblaciones celulares por medio de uniones intercelulares.

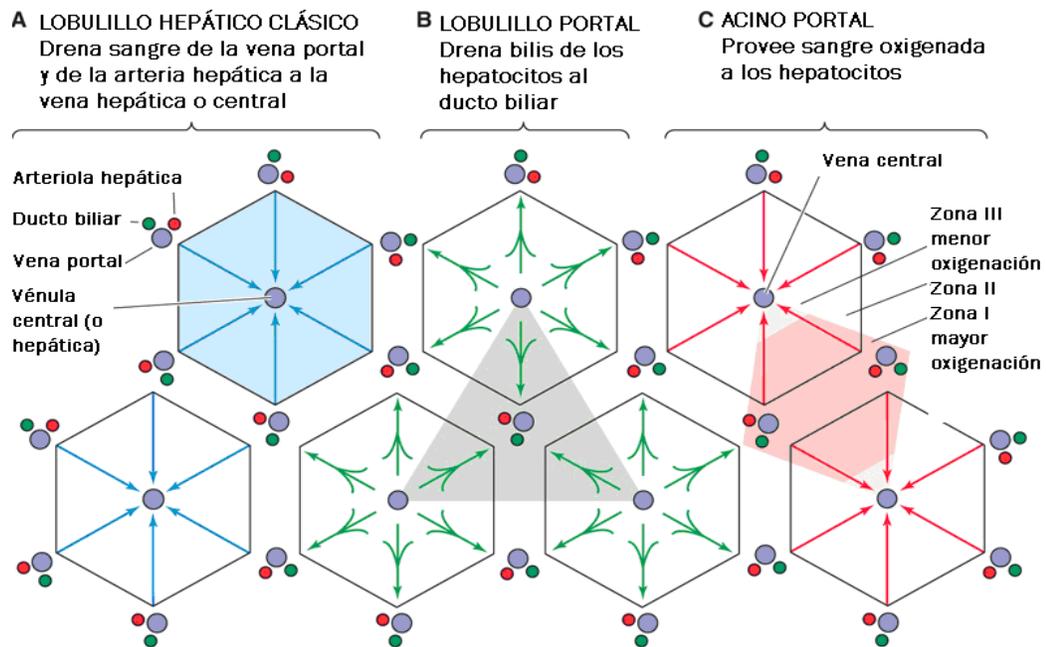
Existen tres maneras funcionales de estudiar anatómicamente al hígado: dependiendo del énfasis en la irrigación sanguínea, o en la excreción y secreción de metabolitos o bilis (Figura 1.2).

**A) Lobulillo hepático clásico.** Incluye a todos los hepatocitos drenados por una vena central. Se observa como un prisma hexagonal, delimitado por tejido conectivo. En medio se encuentra la vena central, y en las esquinas la triada de Glisson (rama de la vena porta, vía biliar y rama de la arteria hepática) (Cascales, 2008). Los lobulillos están compuestos por cordones de hepatocitos de una célula de espesor que irradian hacia la periferia desde la vena central. Entre los cordones de hepatocitos se encuentran los sinusoides, que comunican las ramificaciones terminales de la arteria hepática y la vena porta (en la periferia) con la vena central. Entre los hepatocitos y los sinusoides se encuentra el espacio perisinusoidal o de Disse (Figura 1.2).

**B) Lobulillo Portal.** Compuesto por la triada de Glisson en medio y una vena central en cada uno de los vértices. Enfatiza la dirección en que se drena la bilis de los hepatocitos hacia el ducto biliar (Flechas verdes en la Figura 1.2). Los hepatocitos son los responsables de la producción *de novo* de esta sustancia, así como del

procesamiento y reciclaje de la bilis proveniente del tracto gastrointestinal (Cascales, 2008; Boron y Boulpaep, 2012).

**C) Acino Portal.** Se compone de los hepatocitos presentes entre dos venas centrales e incluye a la triada de Glisson como ejes. En este caso, el énfasis se encuentra en la circulación sanguínea. La vena porta hepática contribuye con 70-75% del flujo sanguíneo del hígado, transporta sangre poco oxigenada y rica en nutrientes proveniente del sistema digestivo y del bazo. Simultáneamente, la arteria hepática aporta el 25% de la sangre hepática restante, y posee una elevada presión y concentración de oxígeno. La sangre de ambas fuentes se mezcla y fluye desde la triada de Glisson a través de los hepatocitos hasta la vena central donde se drena el resultado de la actividad de las células hepáticas, formando un gradiente de oxígeno y de nutrientes en esa dirección (Flechas rojas y zonas I a III en la Figura 1.2) (Geneser, 2005).



**Figura 1.2 Diagrama de la anatomía hepática.** Se muestran tres diferentes definiciones de la unidad hepática funcional. A) Lobulillo hepático clásico (hexágono azul). Incluye desde la triada de Glisson a la vena central. Los hepatocitos están rodeados por tejido conectivo (borde negro del hexágono) B) Lobulillo portal (triángulo gris). Enfatiza el flujo de los ácidos biliares de los hepatocitos pericentrales hacia el ducto biliar (círculo verde). C) Acino portal (hexágono rojo). Enfatiza el flujo de oxígeno y nutrientes hacia la vena central. Las flechas indican el flujo de sangre (flechas azules), bilis (flechas verdes), nutrientes y oxígeno (flechas rojas), según sea el caso. Modificado de Boron y Boulpaep, 2012.

Las células presentan diferentes características morfométricas, metabólicas y proliferativas dependiendo de su posición en el acino hepático. Con base en estas diferencias se han establecido tres zonas para un mejor estudio (Figura 1.2C): periportal (I), intermedia (II) y perivenosa (III). En la zona I o periportal se ha encontrado de dos a tres veces mayor actividad de enzimas involucradas en gluconeogénesis (glucosa-6 fosfatasa G6Pasa, fructosa 1,6-bifosfatasa F1,6biPasa y fosfoenolpiruvato carboxicinaasa PEPCK),  $\beta$ -oxidación y aminotransferasas. En contraste, la zona III o perivenosa presenta mayor actividad de enzimas glucolíticas como la hexocinasa (HK) y la piruvato cinasa (PyrK), enzimas lipogénicas, y se expresa casi de manera exclusiva la glutamina sintetasa (Katz, 1992). Asimismo, los hepatocitos que se encuentran en la zona I son resistentes a muerte celular cuando la circulación sanguínea está comprometida o existe deficiencia nutricional, a diferencia de los hepatocitos de la zona III que son más sensibles. Por otra parte, cuando ocurre la regeneración del hígado, la proliferación ocurre desde la zona I periportal hacia la zona III perivenosa (Boron y Boulpaep, 2012). La zona II es de transición, con metabolismo y características proliferativas de ambas zonas. En la Tabla 1 se resumen las vías metabólicas con mayor actividad en cada zona del acino portal.

Tabla 1. Vías metabólicas predominantes en el acino hepático

Zona I Periportal	Zona III Perivenosa
Gluconeogénesis	Glucólisis
Oxidación de ácidos grasos	Lipogénesis
Ureagénesis	Síntesis de glutamina
Catabolismo de aminoácidos	Bio-transformación
Síntesis de colesterol	
Formación de ácidos biliares	

Se ha estudiado ampliamente la influencia de los factores difusibles en las características de las células hepáticas. En el caso del metabolismo de carbohidratos se encontró que después de 24 h de exposición de cultivos primarios de hepatocitos al glucagón (abundante en la región periportal) se observó inducción de PEPCK y disminución en la actividad de HK, mientras que al incubar los hepatocitos con insulina se encontró lo opuesto (como en la zona perivenosa) (Katz, 1992; Jungermann y Kietzmann, 2000). Se obtuvo el mismo efecto al variar las concentraciones de oxígeno en la incubadora ya que la región periportal se irriga por sangre rica en oxígeno (104-146  $\mu\text{mol/L}$ ), sustratos y hormonas (p. ej. glucagón); mientras que la región perivenosa recibe

sangre con menor concentración de oxígeno (48-64  $\mu\text{mol/L}$ ), sustratos y hormonas, pero rica en  $\text{CO}_2$  y otros productos del metabolismo hepático (p. ej. insulina) (Jungermann y Kietzmann, 2000; Cascales, 2008).

Las interacciones de los hepatocitos con la matriz extracelular y con otros tipos celulares en el hígado también influyen en sus características. La matriz extracelular (ME) brinda soporte para las células, lo que les permite movilizarse, proliferar, y afecta incluso a la polaridad celular. Además, la ME contiene factores de crecimiento y citocinas entre otros compuestos, cuya disponibilidad cambia cuando se remodela, por ejemplo, durante la regeneración o la fibrosis. En condiciones normales, la zona periportal es rica en colágeno tipo I, II, y IV y en fibronectina, y la zona perivenosa contiene colágeno tipo IV y V y laminina (Jungermann y Kietzmann, 1996). Por otra parte, el metabolismo del amonio depende de las interacciones entre los distintos tipos celulares en el hígado pues cuando se co-cultivan células epiteliales de manera localizada con hepatocitos primarios sólo se observa la inducción de la expresión de glutamina sintetasa en los hepatocitos más cercanos, y no en todo el cultivo (Jungermann y Kietzmann, 1996).

Todas las poblaciones celulares muestran diferentes propiedades a lo largo del acino hepático. Por ejemplo, las fenestras de las células endoteliales en la zona perivenosa poseen poros más pequeños y numerosos que aumentan la capacidad de filtrado en esa región. Las células de Kupffer de la zona periportal son más numerosas y con mayor capacidad endocítica y actividad lisosómica; mientras que en la zona perivenosa poseen mayor actividad citotóxica. Los lipocitos son más abundantes en la zona periportal, donde se concentra la formación de matriz extracelular y el almacenamiento de vitamina A. Las células Pitt ejercen su toxicidad sobre células tumorales principalmente en el área periportal (Jungermann y Kietzmann, 1996; Cascales, 2008). De esta forma, el hígado es un órgano heterogéneo que le permite llevar a cabo todas sus funciones y ajustarse a las necesidades del organismo con la participación de todos los tipos celulares que lo conforman.

## **II. Regeneración Hepática inducida por Hepatectomía Parcial**

### **Generalidades de la regeneración hepática**

Mantener la proporción de masa funcional hepática respecto al resto del cuerpo es esencial para la vida por lo que el hígado posee un sistema para preservar esa relación, al que se le conoce como hepatostato. Desde los primeros experimentos realizados en animales se observó que al transplantar hígados de animales pequeños a reservorios más grandes de la misma especie el órgano se ajustaba, aumentando de tamaño. Mientras tanto, en la situación inversa (un órgano grande transplantado a un reservorio pequeño) ocurre apoptosis y la disminución de la masa hepática (Michalopoulos, 2007; Cascales, 2008). Asimismo, cuando el hígado es expuesto a estímulos químicos (p. ej. CCl<sub>4</sub>, tioacetamida), físicos (p. ej. hepatectomía parcial) o infecciosos (p. ej. virus de hepatitis A/B/C) que alteran la masa funcional, las células hepáticas que suelen estar en estado quiescente se activan y comienzan a proliferar. Las divisiones se detienen cuando se ha restaurado la masa funcional hepática y se recupera la proporción entre el órgano y el cuerpo del individuo.

La regeneración del hígado ocurre en todos los vertebrados, desde los peces hasta los seres humanos. Aunque estrictamente se trata de hiperplasia compensatoria, es decir, el tejido que no es funcional o fue removido no se regenera, sino que el tejido funcional restante aumenta hasta recuperar la masa original (Delgado-Coello y Mas-Oliva, 2017). Inmediatamente después del estímulo, las células que componen el hígado aumentan su volumen (hipertrofia) para recuperar la masa funcional perdida y posteriormente, comienzan a proliferar. En este proceso intervienen factores solubles intra- y extrahepáticos, factores físicos como los cambios hemodinámicos debidos a la disminución de la masa del órgano que promueven eventos de mecanotransducción, así como los hepatocitos, las células no parenquimatosas e incluso células del sistema inmune.

La regeneración del hígado se lleva a cabo principalmente por los hepatocitos, en lugar de células progenitoras. En condiciones normales, sólo uno de cada 20 000 hepatocitos realiza la mitosis (Delgado-Coello y Mas-Oliva, 2017) a pesar de que poseen una gran capacidad proliferativa. En experimentos donde se realizaron hepatectomías parciales secuenciales, el hígado de rata pudo regenerarse incluso después de 12 cirugías. Además, en modelos de ratones donde la regeneración es deficiente, se ha logrado repoblar el hígado al injertar un pequeño número de hepatocitos (aproximadamente 1 000) (Michalopoulos, 2007; Cascales, 2008). Sin embargo, cuando la proliferación de los hepatocitos es deficiente se ha observado en ratas y

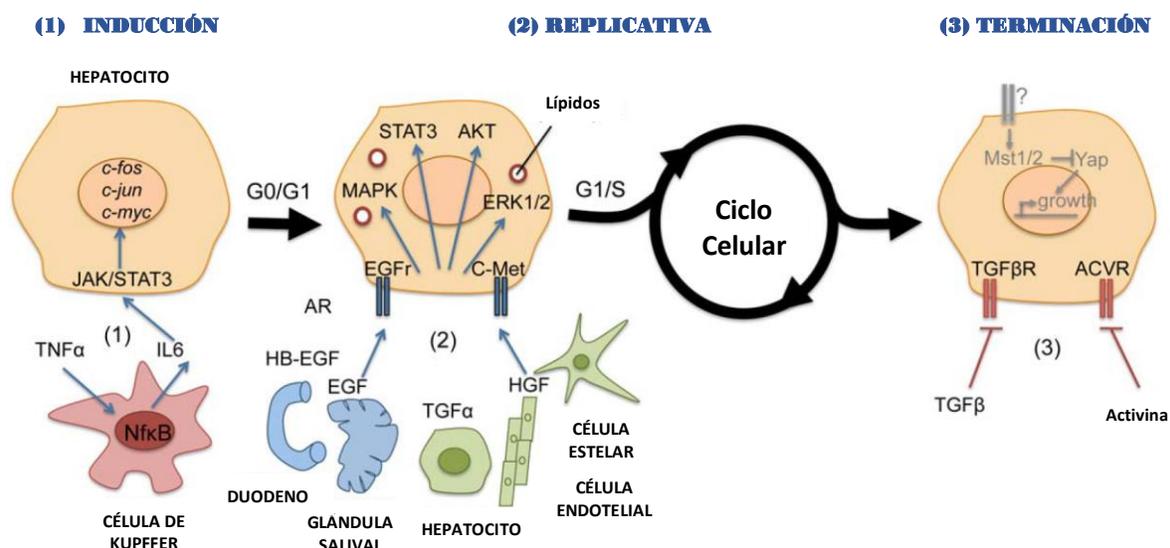
humanos la aparición de células ovales (llamadas así por la forma de su núcleo) cerca de los canales de Hering. Las células ovales expresan marcadores presentes en hepatocitos maduros y en células biliares, y poseen capacidad bipotencial *in vitro* para generar ambos tipos celulares. Aún resulta necesario estudiar estas células con más detalle ya que desaparecen al término de la regeneración del hígado (Michalopoulos, 2007). Todo lo anterior indica que la regeneración hepática es un fenómeno que se encuentra extremadamente regulado, y aún se desconocen muchos de los mecanismos involucrados en el proceso.

Experimentalmente se puede inducir la regeneración del hígado por métodos genéticos (utilizando ratones *knockout*), químicos y quirúrgicos. En el segundo caso, se utilizan químicos hepatotóxicos (tetracloruro de carbono, tioacetamida, dimetil- y dietilnitrosamina, entre otros) que dañan el tejido e inducen fibrosis, cirrosis e incluso cáncer. Se produce una respuesta inflamatoria, seguida de necrosis o apoptosis de las células más afectadas, cambios en la estructura del hígado (hay mayor deposición de matriz extracelular y formación de una cicatriz, así como aumento en el número de fibroblastos), aumento de la lipoperoxidación y calcio citoplasmático, disminución del glutatión reducido, el glucógeno, el ATP y el estado energético de la célula. La proliferación de los hepatocitos inicia aproximadamente seis horas posteriores a la administración del agente xenobiótico (Cascales, 2008). Por otra parte, entre los métodos quirúrgicos existe la ligación de los ductos biliares que también induce inflamación y fibrosis, y la hepatectomía parcial (HP), que se describe más adelante. En todos los casos, el proceso de regeneración hepática se encuentra mejor caracterizado en roedores, utilizando el animal completo, rebanadas del órgano o cultivos primarios.

### **El modelo de la hepatectomía parcial (HP)**

El modelo más utilizado para estudiar la regeneración hepática es la hepatectomía parcial en ratas, debido a que la masa removida y la cronología de los eventos que ocurren durante la regeneración son fácilmente reproducibles. El tiempo cero corresponde al momento posterior a la resección del tejido. La masa hepática se recupera entre 5-7 días en ratas y después de 10 días se ha recuperado por completo la morfología del órgano. La hepatectomía parcial consiste en remover uno o varios lóbulos del hígado, mientras que el resto del tejido se mantiene intacto y por ello no se observa necrosis o inflamación aguda (Mendieta-Condado y colaboradores, 2009). El porcentaje de hígado removido puede variar entre el 30-90%; sin embargo, en el caso de hepatectomía parcial del 30% (HP 30%) se induce la síntesis de ADN a baja velocidad durante un periodo prolongado de tiempo. Por otro lado, en hepatectomía parcial del 90% (HP 90%) o

mayores se corre el riesgo de provocar encefalopatía, coagulopatía e incluso la muerte (Delgado-Coello y Mas-Oliva, 2017). Por lo tanto, la mayoría de los estudios se han realizado con hepatectomía del 70%, donde se extirpa el lóbulo central e izquierdo del hígado. Además, se han establecido tres etapas de la regeneración hepática para facilitar su estudio: 1) Fase de iniciación o prereplicativa, 2) Fase de proliferación o replicativa, y 3) Fase de terminación (Figura 2.1).



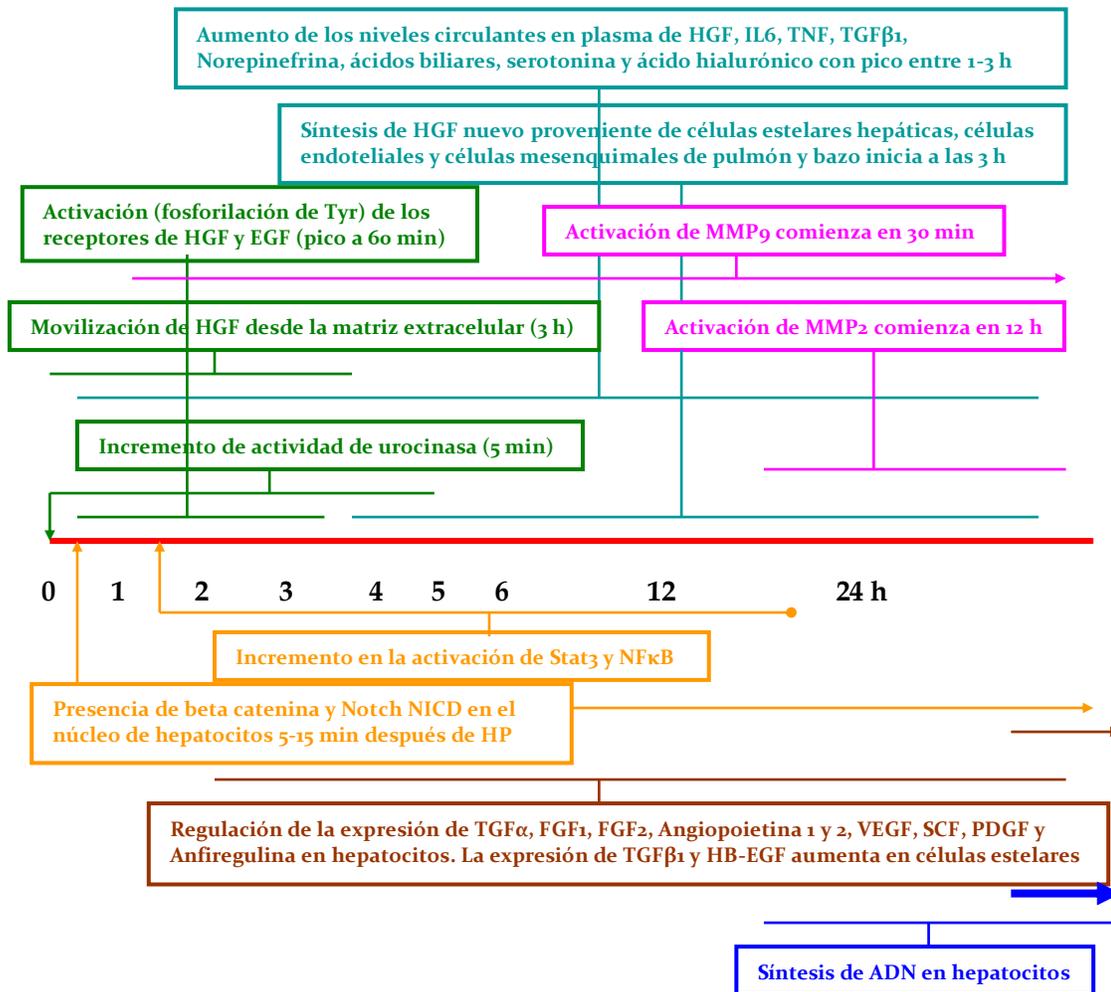
**Figura 2.1 Fases de la regeneración hepática inducida por hepatectomía parcial.** En la fase de inducción (1) se liberan factores que promueven la transición de los hepatocitos del estado quiescente a proliferativo. Algunos de estos factores son secretados por células no parenquimatosas como las células de Kupffer. En la fase replicativa (2) los hepatocitos entran al ciclo celular. El número de células aumenta para recuperar el tejido que se perdió. En esta fase intervienen factores secretados por las células no parenquimatosas y otros provenientes de todo el organismo. Finalmente, en la terminación (3) se detiene la proliferación y se reestablece la arquitectura normal del hígado. El factor más estudiado en esa fase es el TGF $\beta$ . Las flechas negras indican los cambios en el estado proliferativo de los hepatocitos. Las flechas azules indican los factores que son activados y las líneas rojas las vías que son inhibidas. En la parte inferior de la figura se muestra la intervención de las células no parenquimatosas y otros órganos, por medio de los factores que secretan. En el texto se brinda una información más detallada. Modificado de Gilgenkrantz y Collin de l'Hortet, 2011.

La fase de inducción o prereplicativa comienza después de que el tejido hepático es removido y aproximadamente hasta las primeras 24 horas en rata (Figuras 2.1 y 2.2). Durante esta etapa se induce la expresión de más de 100 genes que no se expresan en las células hepáticas maduras en estado quiescente, y están relacionados con: a) la entrada de los hepatocitos a la fase G1 y la regulación del ciclo celular; y b) el mantenimiento de las funciones esenciales del hígado

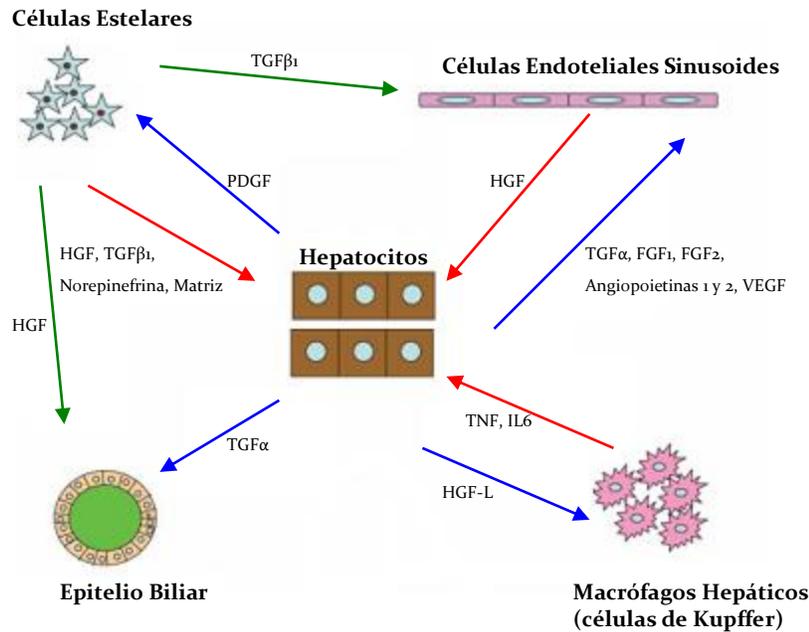
para procurar la supervivencia del organismo (Michalopoulos, 2007; Gilgenkrantz y Collin de l' Hortet, 2011). Los factores responsables de promover la transición de los hepatocitos del estado quiescente al proliferativo se encuentran en la circulación y de manera local en el tejido. La mayoría de los estudios se han enfocado en eliminar o disminuir la actividad de una molécula en específico. Sin embargo, sólo se ha logrado retardar la regeneración, pero no detenerla.

Inmediatamente después de retirar el tejido hepático, la presión sanguínea aumenta en los lóbulos restantes, y con ello la concentración de nutrientes, citocinas y factores de crecimiento y oxígeno provenientes de la vena porta y arteria hepática, respectivamente. El aumento de la presión también produce estrés mecánico que afecta la integridad de las uniones intercelulares y provoca la remodelación de la matriz extracelular y la liberación de factores de crecimiento antes unidos a ella (Michalopoulos, 2007). Entre los factores que más se han estudiado se encuentran mitógenos (HGF, EGF, TGF $\alpha$ , PDGF, FGF1 y 2), citocinas (TNF, IL-1 y 6, TGF $\beta$ ), neurotransmisores (norepinefrina, serotonina), hormonas (insulina) y otras moléculas (ATP, ácidos biliares, componentes del sistema de complemento de la respuesta inmune innata) (Michalopoulos, 2007; Crumm y colaboradores, 2008). En la Figura 2.2 se muestran algunos de los eventos que ocurren dentro de las primeras 24 h posteriores a la HP, correspondientes a la etapa de inducción.

En la fase replicativa, los hepatocitos y las células parenquimatosas proliferan de manera ordenada y regulada para restaurar el volumen de tejido que se perdió en la hepatectomía. Aproximadamente el 95% de los hepatocitos comienzan a proliferar de manera gradual desde la región periportal en dirección de la región perivenosa, observándose un punto máximo de síntesis de ADN a las 24 h. Las células no parenquimatosas regulan de manera parácrina el proceso produciendo y secretando diversos factores de crecimiento (Figura 2.3). Por ejemplo, la destrucción de las células de Kupffer con cloruro de gadolinio (GD) provoca retraso y atenuación de la regeneración. Estas células son responsables de la producción de TNF e IL-6 para la activación de Stat3 y la regulación del ciclo celular en los hepatocitos (Gilgenkrantz y Collin de l' Hortet, 2011). A su vez, los hepatocitos producen VEGF, que regula la proliferación y la migración de células endoteliales a sitios no vascularizados donde los hepatocitos están proliferando (Michalopoulos, 2007). En respuesta a todos estos estímulos los conductos biliares, las células de Kupffer, y las células estrelladas comienzan a proliferar también, mostrando un punto máximo de síntesis de ADN 48 h posteriores a la HP, seguidas de las células endoteliales que proliferan 96 h después (Cascales, 2008; Baddour y colaboradores, 2012; Delgado-Coello y Mas-Oliva, 2017).



**Figura 2.2 Cronología de los eventos que ocurren durante la fase de inducción o prereplicativa en la regeneración hepática inducida por HP.** En la fase de inducción ocurren cambios a nivel celular, sanguíneo, y del tejido que preparan al hígado para entrar al ciclo celular mientras mantiene sus funciones normales. En verde, se indican los eventos relacionados a factores de crecimiento. En azul cielo, se muestran los cambios ocurridos en la sangre. En magenta, se indican los eventos que ocurren en la matriz extracelular. En amarillo, se señalan los cambios involucrados en la transducción de señales. En café, se denotan los cambios relacionados a la regulación genética en el tejido. En azul marino, se señala el comienzo de la síntesis de ADN. Modificado de Michalopoulos, 2007.



**Figura 2.3 Comunicación parácrina entre las poblaciones de células hepáticas durante la regeneración del hígado.** Todas las poblaciones celulares intervienen en la regeneración del hígado; secretan y producen factores que afectan el funcionamiento y la proliferación de las células que las rodean. Las flechas azules indican algunos factores producidos por los hepatocitos que afectan a las células no parenquimatosas. Las flechas rojas indican los factores producidos por las células no parenquimatosas que afectan el funcionamiento de los hepatocitos. Las flechas verdes indican las interacciones entre células no parenquimatosas. Algunos factores afectan a varios tipos celulares. Tomada de Michalopoulos, 2007.

Durante la etapa de terminación se reconoce que el tamaño del hígado es el adecuado en proporción al resto del cuerpo, se restaura la estructura original del tejido y las células regresan al estado quiescente. Después de varios ciclos de replicación, la masa del hígado llega a ser ligeramente mayor que la del tejido original. Por lo tanto, se inicia una ronda de apoptosis para eliminar las células excedentes. Este proceso debe suceder de manera controlada, aunque aún se desconoce el mecanismo por el cual se lleva a cabo. La molécula más estudiada de la fase de terminación es el  $TGF\beta$  ya que se ha observado que inhibe la proliferación de hepatocitos en cultivo y su presencia en el tejido disminuye al inicio de la regeneración, cuando las células entran al ciclo celular (Michalopoulos, 2007). El  $TGF\beta$  estimula a los lipocitos para producir componentes de la matriz extracelular, la cual se ha observado que inhibe la proliferación de los hepatocitos en cultivo y promueve su diferenciación. Sin embargo, ratones transgénicos *knockout* o con sobreexpresión de  $TGF\beta$  tienen una terminación de la regeneración normal (Michalopoulos,

2007), indicando que esta fase involucra múltiples factores aún desconocidos. Dadas las funciones que desempeña el hígado y la variedad de poblaciones celulares que lo componen, la regeneración hepática inducida por HP es un proceso multifactorial que involucra a todo el organismo.

### III. Fisiología Mitocondrial en la regeneración hepática

#### Generalidades de las mitocondrias

Las mitocondrias están involucradas en varios procesos celulares tales como la producción de energía en forma de ATP, la síntesis y degradación de macromoléculas, así como la transducción de señales. En las mitocondrias hepáticas se lleva a cabo la síntesis de aminoácidos, pirimidinas, lípidos, grupos hemo, hormonas y otros metabolitos. Además, son muy importantes para mantener el potencial redox y la homeostasis del calcio. Algunas moléculas que se encuentran en las mitocondrias, como el citocromo *c*, están involucradas en la muerte o supervivencia de la célula. Las mitocondrias pueden provocar daño a los tejidos debido a la disminución del estatus energético, la producción de especies reactivas de oxígeno, el desequilibrio iónico y la inducción de apoptosis, entre otros (Kuznetsov y colaboradores, 2004). En las mitocondrias, la composición de proteínas y lípidos, su abundancia y distribución en la célula, son afectadas por las necesidades celulares y del tejido. Por lo tanto, resulta de gran valor estudiar su comportamiento en diferentes condiciones fisiológicas normales y de estrés, como en el caso de la regeneración inducida por hepatectomía parcial.

Las mitocondrias están formadas por la membrana externa (ME), la membrana interna (MI), el espacio intermembranal (EIM) y la matriz mitocondrial. La membrana externa se observa en el microscopio como una estructura lisa continua y delimita al organelo. Es rica en colesterol y altamente permeable a moléculas de hasta 10 000 daltones. La alta permeabilidad de la membrana externa se debe en parte a la presencia de proteínas con estructura de barril  $\beta$  que se integran a la membrana y forman poros, así como a la presencia de proteínas traslocadoras y de los receptores de las proteínas de importación. Otras de las enzimas presentes en la membrana externa son: la monoamino oxidasa, el citocromo *b5*, la sintasa de ácidos grasos y las enzimas de la síntesis de cardiolipina. La membrana interna presenta pliegues al interior de la mitocondria, conocidos como crestas mitocondriales. La composición lipídica de la membrana interna consiste en fosfatidilcolina, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina (aproximadamente 80% de los lípidos) y es rica en cardiolipina (aproximadamente 20% del total), que es un fosfolípido con cuatro ácidos grasos en lugar de dos, lo que probablemente ayuda a que la membrana sea altamente impermeable a iones. El fosfatidilinositol y la cardiolipina, que se encuentran cargados negativamente, se encuentran arreglados hacia el interior de la membrana y se ha sugerido que sirven de sitio de fijación de calcio en la matriz. A diferencia de la membrana externa, la membrana interna es altamente selectiva a aniones (piruvato, adenín nucleótidos, etc.) y cationes

(potasio, calcio, protones, entre otros), por lo que posee transportadores específicos que permiten el intercambio de metabolitos entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembranal (Vázquez-Memije y Tuena, 2002). El espacio presente entre la membrana interna y la membrana externa es el espacio intermembranal. No presenta ninguna estructura u organización especial, y su composición es muy similar a la del citosol. Contiene proteínas solubles importantes para la función mitocondrial como la isoenzima III de la adenilato cinasa, que es importante para mantener el equilibrio de ATP, AMP y ADP en la mitocondria; la sulfito oxidasa y varias cinasas. Finalmente, el espacio contenido dentro de la membrana interna se conoce como matriz mitocondrial. La matriz mitocondrial contiene varias copias del ADN mitocondrial (ADNmt), ribosomas mitocondriales, moléculas de ARN de transferencia (ARNt) especializados, y todos los elementos necesarios para la expresión de los genes mitocondriales. También contiene cientos de enzimas del metabolismo, como las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (o ciclo de Krebs), las enzimas responsables de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, el catabolismo de aminoácidos, y el ciclo de la urea (en el caso de las mitocondrias hepáticas), entre otros. En la matriz mitocondrial también se observan gránulos electrodensos que son formas de almacenamiento de cationes divalentes, principalmente calcio. Se estima que, en las mitocondrias del hígado, 67% de las proteínas se localizan en la matriz, 21% en la membrana interna, 6% en la membrana externa y 6% en el espacio intermembranal (Alberts y colaboradores, 2002).

Una de las funciones más conocidas de las mitocondrias es la fosforilación oxidativa. En este proceso, la energía contenida en las moléculas es liberada a través de reacciones de oxidación de sustratos en la matriz mitocondrial para bombear protones al espacio intermembranal, al mismo tiempo que se transfieren electrones a través de la cadena transportadora de electrones para la reducción de oxígeno en agua. La alta impermeabilidad de la membrana interna permite la formación de un gradiente de protones, que se conoce como fuerza protón-motriz. Los protones regresan de manera pasiva a través de la ATP sintasa siguiendo el gradiente electroquímico, y produciendo cambios conformacionales en el complejo que permiten la formación de ATP a partir de ADP y fosfato en la matriz mitocondrial (Vázquez-Memije y Tuena, 2002; Alberts y colaboradores, 2002).

Cuatro complejos multiproteicos (I a IV) localizados dentro de la membrana interna mitocondrial, componen la cadena transportadora de electrones: la NADH:ubiquinona oxidoreductasa (NADH deshidrogenasa, complejo I o CI), la succinato:ubiquinona oxidoreductasa (succinato deshidrogenasa, complejo II o CII), la ubiquinol:citocromo *c* oxidoreductasa (citocromo *bc<sub>1</sub>*, complejo III o CIII) y la ferricitocromo *c*:oxígeno oxidoreductasa

(citocromo oxidasa, complejo IV o CIV). Sólo tres de los complejos (CI, CIII y CIV) funcionan como bombas de protones hacia el espacio intermembranal. En ocasiones al complejo de la ATP sintasa se le llama complejo V. La ubiquinona (o coenzima Q) y el citocromo *c* también forman parte de la cadena transportadora de electrones (CTE), y sirven como conexión entre los complejos. La coenzima Q es una benzoquinona soluble en lípidos que difunde lateralmente en la membrana interna y transporta los electrones desde los complejos I y II hasta el CIII. El citocromo *c*, por otra parte, se encuentra en el espacio intermembranal y transporta electrones entre el complejo III y IV (Alberts y colaboradores, 2002; Nelson y Cox, 2008).

Para que la cadena transportadora de electrones funcione se necesita de moléculas que transfieran los electrones al CI o CII; principalmente los nucleótidos de nicotinamida (NAD y NADP) y los nucleótidos de flavina (FAD y FMN). Ambos provienen principalmente de las reacciones de oxidación que tienen lugar en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, por lo cual la estrategia para estudiar el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones involucra incubación a las mitocondrias en presencia de sustratos oxidables como el glutamato, el malato y el succinato. Estos sustratos entran a la matriz mitocondrial a través de los transportadores específicos en la membrana interna. Una vez que se encuentran en la matriz mitocondrial son oxidados a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, con la formación de ATP, NADH y FADH en la matriz mitocondrial al mismo tiempo que se genera el gradiente electroquímico de protones en el espacio intermembranal. Si se agrega ADP, el gradiente electroquímico se acopla a la síntesis de ATP por la enzima ATP sintasa (Alberts y colaboradores, 2002; Nelson y Cox, 2008; Vázquez-Memije y Tuena, 2002).

La velocidad del transporte de electrones en la cadena respiratoria depende de varios factores: la concentración de los equivalentes reductores que van a ser oxidados, el oxígeno que sirve como aceptor final de los electrones para ser convertido en agua, y el acoplamiento del transporte de electrones con la formación del gradiente de protones y la síntesis de ATP. Una fracción importante de los equivalentes reductores que utiliza la CTE (NAD(P)<sup>+</sup>/NAD(P)H y FAD<sup>+</sup>/FADH<sub>2</sub>) son generados por el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la otra parte depende de la velocidad de transporte de las lanzaderas mitocondriales (como la lanzadera de malato/aspartato). Si disminuye la concentración de los equivalentes reductores (estado redox mitocondrial), debido a la velocidad del ciclo y la disponibilidad de los metabolitos que son transportados desde el citosol, la velocidad de la cadena transportadora también disminuye. De igual manera, si disminuye la concentración de oxígeno, la velocidad de la cadena transportadora de electrones disminuye ya que no hay un aceptor de los electrones. Por otro lado, mientras el

gradiente electroquímico de protones en el espacio intermembranal se encuentra en formación o es consumido, por ejemplo para la síntesis de ATP, la velocidad de la CTE es alta. Pero una vez que se alcanza el máximo del gradiente o se desacopla de la síntesis de ATP, la velocidad disminuye (Alberts y colaboradores, 2002; Nelson y Cox, 2008; Vázquez-Memije y Tuena, 2002).

Existen otras sustancias que afectan el funcionamiento de la CTE de manera directa o indirecta:

- Rotenona. Bloquea la transferencia de electrones desde el último centro hierro-azufre del complejo I de la CTE a la ubiquinona, ya que probablemente funciona como un análogo de la ubiquinona. El transporte de electrones continúa a través del CII (Vázquez-Memije y Tuena, 2002).
- Cianuro. Inhibe la transferencia de electrones del hemo *a* al centro binuclear (formado por el hemo *a*<sub>3</sub> y el Cu<sub>B</sub>) del complejo IV y finalmente al oxígeno (Vázquez-Memije y Tuena, 2002).
- Carbonilo cianuro-*m*-clorometil hidrazina (CCCP). Forma parte de los ionóforos, que son moléculas solubles en lípidos que permiten el paso de iones a través de las membranas, interfiriendo en la formación del gradiente electroquímico en el espacio intermembranal. El CCCP es un ionóforo de protones, por lo que afecta el componente químico y eléctrico del gradiente. En presencia de ionóforos, la respiración celular alcanza la máxima velocidad ya que no se afecta el funcionamiento de los complejos, pero se “desacopla” de la fosforilación de ADP por la ATP sintasa debido a que el gradiente electroquímico no se forma (Nelson y Cox, 2008).
- Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Es un oxidante potente. En las mitocondrias la enzima glutatión peroxidasa metaboliza el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y genera H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>. Sin embargo, cuando se acumula puede generar especies reactivas de oxígeno, las cuales reaccionan con las macromoléculas adyacentes e inician reacciones en cadena que pueden llevar incluso a la muerte celular (Rivera -Valerdi, 1997). Experimentalmente se utiliza para generar estrés oxidativo, aumentando la carbonilación de proteínas y la lipoperoxidación. También se ha observado que puede modular la actividad de enzimas del ciclo de Krebs de manera indirecta (Nulton-Persson y Szweda, 2001).
- Manitol. Es un sólido cristalino blanco, soluble en agua que se encuentra de manera natural en plantas. Se utiliza ampliamente para eliminar a las especies reactivas de

oxígeno, especialmente a los radicales hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ). Se ha observado que puede contrarrestar los efectos oxidantes del peróxido de hidrógeno (Liu y colaboradores, 2010).

- Butilhidroxitolueno (BHT,  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$ ). Es un antioxidante fenólico sintético liposoluble utilizado en la industria de alimentos, originalmente desarrollado para preservar manteca de cerdo y otros productos grasosos y oleosos (Hughes, 1987; Lü y colaboradores, 2010). Funciona como aceptor de radicales libres, por lo cual inhibe la propagación de la lipoperoxidación. El tratamiento previo con BHT reduce la carbonilación de proteínas y la lipoperoxidación producido por el Fe-NTA, y aumenta la actividad de las enzimas del metabolismo del glutatión reducido (GSH) así como de enzimas antioxidantes como la catalasa y la GSH-peroxidasa. También disminuye la actividad de la ornitina descarboxilasa (ODC) (Ansar y colaboradores, 2013).

### **Cambios en las mitocondrias durante la regeneración hepática**

Los procesos que controlan la cantidad (biogénesis y degradación), la forma (fusión y fisión) y la distribución de las mitocondrias en las células suceden de manera independiente al ciclo celular; sin embargo, sus funciones se encuentran completamente integradas a la fisiología celular. Las mitocondrias son organelos muy dinámicos; su número y distribución intracelular es específica para cada tipo celular y cambia para ajustarse a las necesidades metabólicas. El hígado de rata contiene aproximadamente  $16.1 \pm 6.1$  mg de proteína de mitocondrias por gramo de peso húmedo de tejido (Schmitt y colaboradores, 2014) o entre 800 y 2 500 mitocondrias por hepatocito, que corresponde aproximadamente al 25% de su volumen (Geneser, 2005; Vázquez-Memije y Tuena, 2002). Durante la regeneración hepática inducida por hepatectomía parcial las mitocondrias sufren cambios para responder a la situación de estrés en la que se encuentra el hígado.

Se ha reportado que la morfología de las mitocondrias se altera posterior a la hepatectomía parcial. Utilizando microscopía de luz y electrónica en cortes de hígados de rata en regeneración. Guerrieri y colaboradores (2002) observaron que 24 h después de una hepatectomía parcial, aproximadamente el 41% de las mitocondrias presentan alteraciones morfológicas entre las que se encuentran: aumento de volumen, ausencia de gránulos densos, desestructuración de las crestas y en algunos casos vacuolización de la matriz, sin que exista ruptura de la membrana externa mitocondrial. Incluso se reportó una disminución del 11% en el número de mitocondrias de los hígados en regeneración con respecto a los controles quirúrgicos (con laparotomía); principalmente en la zona periportal mientras que las mitocondrias de la zona pericentral se

mantienen muy similares al control (Ferri y colaboradores, 2005). Además, 24 h después de la HP, hay un aumento en la lipoperoxidación de la membrana, aumento en la carbonilación de proteínas, disminución del glutatión reducido mitocondrial y el estado redox se vuelve a un estado más oxidado respecto al control (Hernández-Muñoz y colaboradores, 2003; Guerrieri y colaboradores, 1999). Estos cambios son transitorios, pues la estructura mitocondrial se recupera en tiempos tardíos (96-120 h posteriores a la hepatectomía parcial) (Guerrieri y colaboradores, 2002; Ferri y colaboradores, 2005; Zhou y colaboradores, 2008).

A pesar de la magnitud de los cambios morfológicos, el índice apoptótico en el hígado no aumenta, y la función mitocondrial no se ve disminuida. Hernández-Muñoz y colaboradores (2003) encontraron que la oxidación de glutamato y succinato en presencia de ADP (estado 3) aumenta desde 6 hasta 48 h pHP (posteriores a la hepatectomía parcial) con respecto a las mitocondrias de hígados control. El estado 4, que se refiere al consumo de oxígeno después de que se ha consumido todo el ADP agregado, se mantiene desde 6 hasta 72 h con ambos sustratos. El coeficiente ADP/O (que relaciona la síntesis de ATP con el consumo de oxígeno) se mantuvo durante toda la regeneración del hígado: 2.8 para glutamato-malato y 1.7 para succinato. Por lo tanto, el control respiratorio (estado 3/estado 4), que indica el grado de acoplamiento entre la respiración y la fosforilación, aumenta desde las 6 hasta las 24 h pHP en las mitocondrias aisladas de hígados en regeneración. Asimismo, la velocidad del transporte de electrones medida como el consumo de oxígeno en presencia de un desacoplante, aumenta desde 12 hasta 48 h pHP. Finalmente, el aumento de la respiración estimulada por ADP se encontró acompañada por un aumento en la síntesis de ATP en las ratas sujetas a HP, principalmente con los sustratos para el CI. Estos parámetros muestran que posterior a la hepatectomía parcial, las mitocondrias de ratas poseen una actividad fosforilativa mayor que los grupos control, la cual es necesaria debido a que la proliferación de las células hepáticas durante la regeneración se traduce en un aumento de la demanda metabólica.

La permeabilidad de las mitocondrias es alterada durante la regeneración hepática inducida por HP. Por medio de examinar *in vitro* la permeabilidad a sacarosa de mitocondrias aisladas de hígados de rata en diferentes tiempos posteriores a la HP, varios grupos han encontrado que la permeabilidad de las mitocondrias hepáticas sufre cambios transitorios los cuales son inhibidos parcialmente por ciclosporina A (CsA). Sin embargo, existen discrepancias en cuanto a la temporalidad de este fenómeno. Guerrieri y colaboradores (2002), Greco y colaboradores (1998) encontraron que la permeabilidad a sacarosa es mayor en mitocondrias aisladas 24h pHP y correlaciona con la acumulación de calcio en este organelo. En cambio,

Hernández-Muñoz y colaboradores (2003) encontraron que la permeabilidad mitocondrial aumenta hasta 72 h pHP, por lo que se ha sugerido que está más relacionada con la terminación de la regeneración.

Los cambios en la permeabilidad mitocondrial conllevan a que enzimas que se localizan en la matriz mitocondrial cambien su distribución hacia el citoplasma e incluso a la circulación sanguínea. Utilizando fraccionamiento subcelular de hígados en regeneración inducida por HP entre 3 y 168 h posteriores a la resección de 70% del tejido, se midió la actividad de las enzimas glutamato deshidrogenasa (GDH), malato deshidrogenasa (MDH) y la isoforma mitocondrial de la enzima aspartato transaminasa (mAST) tanto en la fracción mitocondrial como en la citosólica. 24 h pHP la actividad de la enzima GDH disminuye aproximadamente 3.1 veces en las mitocondrias, y su actividad aumenta de 3 a 4.8 veces en la fracción citosólica respecto al control con laparotomía (Guerrieri y colaboradores, 2002; Zhou y colaboradores, 2008). La actividad de la enzima mAST disminuye cerca de 1.7 veces en la fracción mitocondrial y aumenta entre 2.5 y 5 veces en la fracción citosólica (Guerrieri y colaboradores, 2002; Zhou y colaboradores, 2008). Mientras que la actividad de la enzima MDH en las mitocondrias disminuyó 1.1 veces y aumentó en el citoplasma en la misma proporción (Greco y colaboradores, 1998). Las enzimas que se encuentran en el citoplasma probablemente fueron liberadas de las mitocondrias ya que al incubar mitocondrias aisladas de hígados de ratas en regeneración 24 h pHP en medio que provoca hinchamiento mitocondrial, se encontró un incremento de aproximadamente 3.1 veces en la actividad de GDH, AST y MDH en el medio de incubación respecto a las mitocondrias de hígados control (Guerrieri y colaboradores, 2002; Greco y colaboradores, 1998). La liberación de las enzimas de la matriz mitocondrial al citoplasma y al medio de incubación ocurre sin que haya liberación de citocromo *c* (Guerrieri y colaboradores, 2002), y disminuye durante la progresión de la regeneración hepática. A partir de 72 h pHP se recupera la distribución de las enzimas en los compartimentos celulares y las mitocondrias pierden la capacidad de liberar enzimas al medio de incubación (Greco y colaboradores, 1998; Guerrieri y colaboradores, 2002; Zhou y colaboradores, 2008). Por lo tanto, durante la regeneración inducida por HP, las mitocondrias sufren cambios morfológicos y bioquímicos que las preparan para cubrir las necesidades metabólicas para la restauración del tejido posterior a la HP.

### III. Antecedentes

Durante muchos años se ha utilizado la medición de la actividad de enzimas específicas en suero como un marcador no invasivo de daño hepático. La enzima ornitina transcarbamilasa (OTC) corresponde aproximadamente a 0.6% de la proteína hepática total, muy similar a las aminotransferasas, que corresponden aproximadamente al 0.7%; por lo cual, es de esperarse que se encuentren en proporciones similares en el suero cuando se daña al hígado. Sin embargo, los agentes hepatotóxicos dañan diferentes regiones del hígado (periportal o pericentral) por lo cual el patrón de enzimas en suero dependerá del área afectada, así como de la abundancia de las enzimas en esa región debida a la heterogeneidad zonal del órgano. Por ejemplo, el cociente glutamato deshidrogenasa/ornitina transcarbamilasa (GDH/OTC) se utiliza como marcador de daño producido por alcohol, ya que durante la ingesta de alcohol se observa muerte celular en la zona pericentral del hígado, donde la GDH es más abundante mientras que la OTC se localiza predominantemente en la región periportal. La relación ornitina transcarbamilasa/alanina aminotransferasa (OTC/ALT) permite distinguir la presencia de hepatocarcinoma respecto a la cirrosis o la hepatitis crónica. También se ha descrito que los cocientes de OTC/ALT y ornitina transcarbamilasa/aspartato aminotransferasa (OTC/AST) aumentan de manera paralela durante la progresión de la esteatohepatitis no alcohólica (Díaz-Muñoz y Hernández-Muñoz, 2010). Sin embargo, el uso del cociente OTC/ALT no puede ser explicado por la distribución zonal de las enzimas ya que ambas se expresan preferencialmente en la región periportal, aunque en diferentes compartimentos subcelulares: OTC en la mitocondria y ALT en el citosol. Por otra parte, durante la regeneración inducida por HP también se ha detectado la actividad de enzimas de origen hepático en suero. Sin embargo, el número de cuerpos necróticos y apoptóticos observados por microscopía de luz es muy similar en el tejido remanente posterior a la HP y los animales control con laparotomía (Guerrieri y colaboradores, 2002). Por lo tanto, existen otros factores que promueven la liberación de las enzimas de los tejidos al torrente sanguíneo.

Además de la abundancia de las enzimas en el tejido, la presencia de una enzima hepática en el suero depende de su capacidad para ser liberada y de los mecanismos que permiten su remoción del suero. Si se administran sustancias que disminuyen la capacidad fagocítica del sistema retículo-endotelial, ocurre remoción selectiva de enzimas del suero: lactato deshidrogenasa (LDH), isocitrato deshidrogenasa (IDH), malato deshidrogenasa (MDH) y aspartato aminotransferasa (AST); pero la actividad de alanina aminotransferasa (ALT) no se ve afectada (lo que explicaría su larga vida media en suero: 41h) (Díaz-Muñoz y Hernández-Muñoz,

2010). Murayama y colaboradores encontraron que el estado de activación de las células de Kupffer regula la presencia de OTC en el suero de ratas, en un modelo de hepatitis inducida por tioacetamida. Cuando se administra lipopolisacárido (LPS) para activar a las células de Kupffer, se observa menor actividad de OTC en suero; mientras que si se administra cloruro de gadolinio (GD) para inactivarlas, la actividad de OTC en suero aumenta. La inactivación de las células de Kupffer prolonga la remoción de OTC del suero de manera exclusiva, en ratas administradas con GD e inyectadas vía intravenosa con OTC, GDH y ALT. En un modelo de choque séptico donde se administra una dosis alta de LPS a las ratas, es posible modificar la temporalidad de la liberación de enzimas al suero. Entre tres y 12 horas posteriores a la administración de LPS, la cantidad de enzima carbamoil fosfato sintasa-1 (CPS-1) y de OTC disminuyen en el hígado y se incrementan en el suero. La liberación ocurre de manera selectiva ya que CPS-1, una enzima de localización mitocondrial, se libera antes que ALT, una enzima de localización citosólica; es decir, CPS-1 se libera al suero mientras que la membrana celular se encuentra íntegra. Si se induce la sobreexpresión de oxigenasa de hemo-1 (HO-1), una proteína de localización mitocondrial que participa en la eliminación de especies reactivas de oxígeno, se adelanta la liberación de CPS-1 hasta 1 h posterior a la administración de LPS. Asimismo, la administración de inhibidores lisosomales inhibe la liberación de CPS-1 al suero, sugiriendo que la liberación de CPS-1 al suero ocurre de manera activa e involucra a los lisosomas (Unuma y colaboradores, 2013). Por lo tanto, la actividad de enzimas hepáticas en suero es un proceso regulado y no es resultado únicamente de la muerte celular.

En el laboratorio del Dr. Rolando Hernández se han realizado varios estudios para descifrar las condiciones que afectan la liberación de enzimas del hígado en regeneración inducida por HP. En 2006, Díaz-Juárez y colaboradores evaluaron el efecto de los cambios hemodinámicos sobre la liberación de enzimas hepáticas al medio, al modificar los flujos de perfusión en hígados de ratas con diferentes porcentajes de hepatectomía, 24 h posteriores a la cirugía. En el estudio se encontró lo siguiente: 1) las enzimas encontradas posterior a la HP en el medio de perfusión y por lo tanto en el suero son de origen hepático, sin que exista interferencia por otros órganos. 2) La liberación de algunas enzimas depende del porcentaje de tejido cortado. La actividad de LDH en el medio de perfusión se mantiene muy similar a las ratas control con laparotomía en todas las condiciones, mientras que en el caso de ALT y AST se observa un ligero incremento lineal de la actividad en el medio de perfusión desde HP 10-70%. En cambio, para el caso de OTC y GDH se observa un incremento abrupto en la actividad enzimática en suero en HP mayores al 40%. 3) Al modificar experimentalmente el flujo de perfusión en un hígado

aislado 24 h posteriores a HP70, se observan cambios en la liberación de varias enzimas. Si se aumenta de una a tres veces la velocidad de perfusión del hígado, se observa un aumento lineal en la actividad de OTC, GDH, ALT y LDH en el medio de perfusión. Sin embargo, la actividad de OTC aumenta más (cuatro o cinco veces) que la actividad de LDH (tan sólo dos veces respecto al control con laparotomía). El aumento del flujo de perfusión no provoca que las enzimas se liberen por muerte celular ya que, si se disminuye nuevamente el flujo del amortiguador, la actividad enzimática en el medio disminuye también. Finalmente, si se obtiene el hígado de una rata control y se realiza HP *ex vivo*, también es posible encontrar actividad de OTC, GDH, AST y ALT en el medio de perfusión, lo cual indica que este fenómeno es independiente de factores extrahepáticos (Díaz-Juárez y colaboradores, 2006). Esto sugiere que la liberación de enzimas mitocondriales durante la regeneración hepática es selectiva y es regulada en parte por los cambios hemodinámicos posteriores a la HP, por medio de un posible mecanoreceptor en el endotelio hepático cuya naturaleza aún se desconoce.

Existen otros factores que afectan la liberación de enzimas en el hígado en regeneración inducida por HP, que son independientes de los cambios hemodinámicos. Rivera-Valerdi (1997) utilizó rebanadas de hígados en regeneración 24 h posteriores a la HP, incubadas con fármacos inhibidores de la síntesis de proteínas, la duplicación de ADN, transcripción, energía metabólica, y de transporte, así como oxidantes productores de radicales libres y antioxidantes atrapadores de radicales libres. Se encontró que los fármacos que regulan la liberación de LDH, AST, ALT, GDH y OTC del tejido hepático al medio, son diferentes para cada enzima. Sin embargo, de manera general, la liberación de enzimas al medio depende de la disponibilidad de energía metabólica, la transcripción, y la integridad de los microtúbulos. Al probar los mismos fármacos en hepatocitos aislados, la actividad extrahepática de las enzimas arriba mencionadas disminuye de manera importante, por lo cual se concluyó que la liberación de enzimas al medio en el hígado en regeneración inducida por HP depende del mantenimiento de la estructura hepática, posiblemente a través de las interacciones intercelulares en el tejido.

Se ha especulado que la liberación de enzimas hepáticas al medio juega un papel importante en el progreso de la regeneración inducida por HP. En ratas tratadas con una dosis aguda de etanol y sometidas a HP se promueve la remoción de las enzimas hepáticas del suero, en lugar de que haya un aumento de éstas como se esperaría por el efecto tóxico del etanol (Morales-González y colaboradores, 1999). La disminución de las enzimas en suero correlaciona con un retraso en la temporalidad de la regeneración cuando se compara con animales sometidos únicamente a HP. Por otra parte, cuando se administra OTC heteróloga por vía intravenosa en

ratas con HP del 30 y 70 %, se observa un incremento en la actividad de OTC en el suero. En cambio, la enzima administrada es rápidamente removida del suero en los animales control, los cuales no han sido iniciados para la regeneración (Díaz-Muñoz y Hernández-Muñoz, 2010). La actividad de OTC en el suero aumenta especialmente en ratas con 30% de HP donde no se ha alcanzado la máxima capacidad de regeneración, mientras que en los animales con 70% de HP donde se encuentra la máxima capacidad de regeneración, los niveles séricos de OTC alcanzan los niveles previamente reportados. También se observó que la administración intravenosa de OTC en ratas con 30% de HP correlaciona con un aumento de la actividad de la timidina cinasa (TK, un marcador de síntesis de ADN) y del índice mitótico en el hígado. Por lo tanto, la liberación selectiva de enzimas del hígado parece ser un evento asociado al establecimiento de la regeneración hepática en la fase prereplicativa, aunque los mecanismos de este fenómeno aún se desconocen.

A pesar de que la liberación de enzimas al suero se ha descrito desde hace tiempo en diversos procesos (regeneración hepática, re-oxigenación de hígado hipóxico) (Greco y colaboradores, 1998) aún no se conoce el mecanismo por el cual se lleva a cabo. Anteriormente, se pensaba que era consecuencia de la muerte celular debida al daño hepático; sin embargo, este proceso sucede de manera regulada por un mecanismo desconocido. En el caso de la regeneración hepática inducida por HP se ha observado un aumento preferencial de enzimas de localización mitocondrial en el suero, posterior a la resección del tejido. Esto no se debe a la disfunción mitocondrial del hígado y hasta la fecha no se ha descrito ningún sistema de exportación de proteínas desde la mitocondria. La liberación de enzimas durante la regeneración inducida por HP tiene diferentes niveles de regulación, por lo cual resulta interesante estudiar si las mitocondrias por sí mismas son capaces de modular la liberación de las enzimas presentes en su matriz.

#### **IV. Justificación**

La liberación de enzimas al suero se ha considerado durante muchos años como resultado del daño al tejido y muerte celular, por lo cual no se han estudiado a profundidad los mecanismos que controlan este fenómeno. Durante la regeneración hepática inducida por HP se observa un incremento de la actividad de enzimas hepáticas en el suero, a pesar de que el número de cuerpos necróticos no aumenta. Por medio de varios modelos (animal completo, hígado perfundido, rebanadas, hepatocitos) se han logrado dilucidar algunos de los mecanismos que regulan este fenómeno a varios niveles. Rivera-Valerdi (1997) encontró que en un modelo de rebanadas hepáticas la liberación de enzimas al exterior del tejido depende de la disposición de energía metabólica utilizando inhibidores de la cadena transportadora de electrones. Por lo tanto, en este trabajo nos interesó estudiar la capacidad de las mitocondrias para regular la liberación de enzimas de su matriz al medio en ausencia de otros componentes celulares. Ensayos *in vitro* con mitocondrias aisladas después de la HP por Greco y colaboradores (1998) y Guerrieri y colaboradores (2002) analizaron únicamente los cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial sobre la liberación de MDH, AST y GDH. Resulta importante incluir otras enzimas como la OTC, cuya actividad en suero aumenta de manera importante durante la regeneración inducida por HP en otros modelos experimentales (Díaz-Juárez y colaboradores, 2006). Por lo tanto, un ensayo *in vitro* con mitocondrias aisladas en tiempos posteriores a la HP permitirá utilizar compuestos y condiciones que modifiquen el metabolismo mitocondrial con el propósito de esbozar si las mitocondrias poseen mecanismos que regulen la liberación de enzimas de la matriz al medio durante la regeneración hepática inducida por HP.

## V. Hipótesis

En respuesta a una hepatectomía parcial, las mitocondrias del hígado poseen mecanismos que regulan a las enzimas de la matriz que deben ser exportadas al medio extramitocondrial, independientemente de factores extrahepáticos o citoplásmicos.

## VI. Objetivo General

Estudiar la liberación de glutamato deshidrogenasa y ornitina transcarbamilasa (enzimas de localización exclusivamente mitocondrial), así como malato deshidrogenasa y aspartato aminotransferasa (enzimas de localización dual: mitocondria y citosol) al medio de incubación de mitocondrias de hígado de rata incubadas *in vitro* en condiciones libres de factores extrahepáticos o citosólicos, en respuesta a hepatectomía parcial.

## Objetivos Particulares

- Evaluar el efecto de compuestos que modifican el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones sobre la liberación de glutamato deshidrogenasa, ornitina transcarbamilasa, malato deshidrogenasa y aspartato transaminasa, al medio de incubación de mitocondrias de hígados de ratas intactas y 24h después de laparotomía o de una hepatectomía parcial del 70%.
- Evaluar el efecto de dos antioxidantes (manitol y butilhidroxitolueno) y un oxidante (peróxido de hidrógeno) sobre la liberación de glutamato deshidrogenasa, ornitina transcarbamilasa, malato deshidrogenasa y aspartato transaminasa, al medio de incubación de mitocondrias de hígados de ratas intactas y 24h después de laparotomía o de una hepatectomía parcial del 70%.
- Estudiar el efecto del tiempo, temperatura y la cantidad de mitocondrias en el ensayo *in vitro* sobre la liberación de glutamato deshidrogenasa, ornitina transcarbamilasa, malato deshidrogenasa y aspartato transaminasa de las mitocondrias de hígado de rata al medio de incubación.

## VII. Materiales y Métodos

### VII.1 Animales

Se obtuvieron ratas Wistar macho de 250-270 g del bioterio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Las ratas se mantuvieron con alimento y agua *ad libitum* durante todo el procedimiento. Se separaron en tres grupos: intactas, control quirúrgico (laparotomía) y hepatectomía parcial.

Los animales intervenidos quirúrgicamente se anestesiaron en cámara de gas utilizando éter. Para la hepatectomía parcial se hizo una incisión en el plano medio ventral de la rata hasta acceder a la cavidad abdominal. El hígado se expuso, y se ligaron y cortaron los lóbulos central e izquierdo que corresponden aproximadamente a 70% de la masa hepática, de acuerdo con el método descrito por Higgins y Anderson (1931). La incisión se cerró por capas utilizando sutura continua.

Al grupo control se le practicó una laparotomía. Se anestesió al animal con éter, se hizo la incisión en el plano medio ventral de la rata y se expusieron los lóbulos. Se palpó el órgano suavemente por unos segundos para simular la manipulación que ocurre durante la hepatectomía, y se reintrodujo a la cavidad abdominal. La incisión se cerró por capas utilizando sutura continua. Las ratas intactas no fueron intervenidas en ningún aspecto.

### VII.2 Extracción del hígado

Los animales se anestesiaron por inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico y se sacrificaron por decapitación. Esto se llevó a cabo 24 h después de la intervención quirúrgica en el caso de los grupos control y con hepatectomía parcial. La sangre se recuperó en tubos heparinizados y el hígado se extrajo lo más rápido posible. Todo el tejido recuperado se utilizó para aislar mitocondrias.

### VII.3 Aislamiento de mitocondrias

Se prepararon las siguientes soluciones:

- **Amortiguador de fraccionamiento pH 7.4.** 250 mM sacarosa, 10 mM Tris-Base, 1 mM EDTA

Las mitocondrias se aislaron por centrifugación diferencial. Brevemente: el hígado se lavó en amortiguador de fraccionamiento para quitar el exceso de sangre y se pesó. Inmediatamente se homogenizó mecánicamente en un homogenizador con pistilo de teflón en tres volúmenes de amortiguador de fraccionamiento por cada gramo de tejido. El homogenado

se centrifugó a 1,750 x g durante 15 minutos; se recuperó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 6,500 x g durante 15 minutos. El botón se resuspendió en amortiguador de fraccionamiento nuevo y se centrifugó 15 minutos a 9,500 x g en dos ocasiones para limpiar las mitocondrias. El botón final se resuspendió cuidadosamente para no dañar a las mitocondrias en un volumen pequeño de amortiguador de fraccionamiento. Todo el procedimiento se realizó en frío a 4 °C.

#### **VII.4 Oximetría**

Se prepararon las siguientes soluciones:

- **Medio respiratorio.** 225 mM sacarosa, 10 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl.

La función mitocondrial se evaluó por medio de polarografía usando un electrodo para oxígeno tipo Clark. Se colocó 1 mg de proteína de mitocondrias aisladas en fresco, en 3 mL de medio respiratorio, y se mantuvo en agitación constante. Se utilizó 10 mM glutamato-1 mM malato como sustratos para el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial y 10 mM succinato para el complejo II. El consumo de oxígeno se midió en ausencia (estado 4) y en presencia (estado 3) de 30 mM ADP. Se calcularon los nanoátomos de oxígeno por minuto por miligramo de proteína mitocondrial consumidos en cada estado, así como el grado de acoplamiento CR (control respiratorio S3/S4) para cada sustrato.

#### **VII.5 Metabolitos**

##### **Cuantificación de proteína mitocondrial. Método de Lowry**

Se prepararon las siguientes soluciones de acuerdo con el método de Lowry y colaboradores (1951):

- **Solución A:** 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.4% NaOH, 0.16% tartrato de Na<sub>2</sub>K.
- **Solución B:** 4% CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O.
- **Solución C:** A+B en proporción 100:1
- **Solución D:** Reactivo de Folin-Cicocalteau y H<sub>2</sub>O en proporción 1:1.

En tubos de ensayo se colocó 1 mL de muestra (agua bidestilada para el blanco o 990 µL de agua + 10 µL de fracción mitocondrial), mezclado con 3 mL de solución C. Después de 10 minutos de incubación se añadieron 300 µL de solución D, agitando vigorosamente. Al

transcurrir 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro.

### **Extractos ácidos**

En un tubo de ensayo se agregaron 4 mg de proteína de la fracción mitocondrial y 2.5 mL de  $\text{HClO}_4$  al 8%. Tras una fuerte agitación, se centrifugó a  $9,700 \times g$  durante 5 minutos. El sobrenadante, que corresponde al extracto ácido con los metabolitos, se guardó en congelación y el botón fue desechado. Antes de realizar las determinaciones de los metabolitos, se ajustó el pH de cada muestra entre 7 y 8 utilizando NaOH o HCl.

### **Citrulina**

Se preparó el reactivo cromogénico utilizado en el método de Ceriotti (1973) para determinar la actividad de la enzima ornitina transcarbamilasa (OTC).

- **Reactivo cromogénico.** Se preparan por separado: diacetilmonoxima 0.5% p/v en  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ , y antipirina 4 g,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)9\text{H}_2\text{O}$  50 mg en 1 L de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 10%.

Las soluciones se almacenaron a  $4^\circ\text{C}$ . El reactivo se preparó al momento de usarse, mezclando las soluciones en volúmenes iguales.

En un tubo de ensayo se mezclaron 200  $\mu\text{L}$  de extracto ácido neutralizado y 3 mL del reactivo cromogénico. Se cubrió la boca de cada tubo para evitar la evaporación de la mezcla y los ensayos se hirvieron en baño María durante 15 minutos. Después de enfriarse, se determinó la absorbancia a 460 nm en un espectrofotómetro.

### **Ornitina**

Se prepararon las siguientes soluciones:

- **Reactivo de ninhidrina** (para 20 muestras). Se disolvieron 250 mg de ninhidrina ( $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$ ) en 6 mL de  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$  y 4 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0.6 M. El reactivo se almacenó en oscuridad.

En un tubo de ensayo se mezclaron: 300  $\mu\text{L}$  de extracto ácido neutralizado, 700  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 500  $\mu\text{L}$  de reactivo de ninhidrina y 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$  glacial. Se hirvió la muestra en baño María durante 10 minutos y se enfrió con agua corriente. Se agregaron 3 mL de etanol

al 95% y se agitó vigorosamente para homogenizar la solución. Se determinó la absorbancia a 515 nm con un espectrofotómetro.

### **Cisteína**

Se prepararon las siguientes soluciones:

- **Reactivo de ninhidrina** (para 20 muestras). Se disolvieron 250 mg de  $C_9H_6O_4$  en 6 mL de  $C_2H_4O_2$  y 4 mL de HCl 0.6 M. El reactivo se almacenó en obscuridad.

En un tubo de ensayo se mezclaron: 300  $\mu$ L de extracto ácido neutralizado, 700  $\mu$ L de agua destilada, 500  $\mu$ L de reactivo de ninhidrina y 500  $\mu$ L de  $C_2H_4O_2$  glacial. Se hirvió la muestra en baño María durante 10 minutos y se enfrió con agua corriente. Se agregaron 3 mL de etanol al 95% y se agitó vigorosamente para homogenizar la solución. Se determinó la absorbancia a 560 nm con un espectrofotómetro.

### **Nitritos**

Se prepararon las siguientes soluciones:

- **Naphthylethylenediamine dihydrochloride ( $C_{11}H_{12}N_2$ ) al 0.1% p/v en agua.** Se disolvieron 5 mg en 5 mL de agua.
- **Sulfanilamida ( $C_6H_8N_2O_2S$ ) 1% p/v en ácido fosfórico al 5%.** 50 mg de  $C_6H_8N_2O_2S$  en 5 mL de  $H_3PO_4$  al 5%.

Se preparó el reactivo de Griess mezclando las dos soluciones en proporciones iguales.

En un tubo de ensayo se mezclaron 300  $\mu$ L de extracto ácido neutralizado, 200  $\mu$ L de agua y 500  $\mu$ L del reactivo de Griess. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se determinó la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro.

## **VII.6 Determinación de actividades enzimáticas**

### **OTC (ornitina transcarbamilasa)**

En el interior de las mitocondrias hepáticas, la OTC sintetiza citrulina a partir de ornitina y carbamoil fosfato como parte del ciclo de la urea. La actividad de esta enzima en las muestras se calculó a partir de la producción de citrulina *in vitro*. Cuando la citrulina reacciona con la diacetilmonoxima-antipirina, cambia de coloración. Dado que la intensidad del color es

dependiente de la cantidad de compuesto, se puede determinar la producción de citrulina midiendo la absorbancia de la luz en cada ensayo, utilizando un espectrofotómetro. Para evitar sobreestimaciones se destruye la urea en los ensayos utilizando ureasa y se preparan blancos individuales para cada una de las muestras. Los ensayos se realizaron de acuerdo con el método de Ceriotti (1973).

Se prepararon las siguientes soluciones:

- **Amortiguador de barbital ( $C_8H_{12}N_2O_3$ ) /acetato de sodio ( $C_2H_3NaO_2$ )** 70 mM pH 7.0.
- **Solución de ureasa.** Se disolvió 1 mg de ureasa en 6 mL de amortiguador de  $C_8H_{12}N_2O_3/C_2H_3NaO_2$ .
- **Sustrato-ureasa.** Se preparó una solución de carbamoil-fosfato 23 mM y ornitina 2.5 mM utilizando la solución de ureasa como disolvente.
- **Reactivo cromogénico.** Se prepararon dos soluciones: **Diacetilmonoxima** 0.5% p/v en  $C_2H_4O_2$ . **Antipirina** 4 g,  $Fe_2(SO_4)9H_2O$  50 mg en 1 L de  $H_2SO_4$  al 10%. Las soluciones se almacenaron a 4°C. El reactivo se preparó al momento de usarse, mezclando las soluciones en volúmenes iguales.

Se utilizaron dos tubos de ensayo para cada muestra. En el blanco de la muestra se colocó 50  $\mu$ L de solución de ureasa, mientras que para determinar la citrulina total se colocaron 50  $\mu$ L de solución sustrato-ureasa. Posteriormente se agregó 25  $\mu$ L de muestra a cada tubo: se utilizaron 2  $\mu$ g de proteína de la fracción mitocondrial o 10  $\mu$ L de medio extramitocondrial y se completó el volumen con agua. Adicionalmente se preparó un blanco de reactivos con 50  $\mu$ L de solución sustrato-ureasa y 25  $\mu$ L de agua, que sirvió como blanco para todo el experimento. Se cubrió cada tubo para evitar la evaporación de la mezcla y los ensayos se incubaron en baño María a 37°C durante 30 minutos para generar la citrulina. Se añadió 3 mL de reactivo cromogénico y los tubos se sometieron a ebullición en baño María durante 15 minutos. Después de enfriarse, se determinó la absorbancia a 460 nm en un espectrofotómetro. La actividad de la enzima OTC se determinó con la diferencia de la absorbancia entre el total de citrulina y el blanco para cada muestra.

### **GDH (Glutamato Deshidrogenasa)**

En la matriz mitocondrial, la GDH cataliza la formación de glutamato a partir de  $\alpha$ -cetoglutarato y amonio junto con la oxidación de NADH. Esta enzima funciona como puente entre el metabolismo nitrogenado y el de carbono. La actividad de GDH en las muestras se calculó por medio de medir el cambio en la absorbancia a 340 nm que ocurre cuando el NADH se oxida.

Se prepararon las siguientes soluciones:

- **Amortiguador de fosfatos.** 75 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7.2
- **Acetato de amonio** ( $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$ ) 1.2 M
- **NADH** 9 mM
- **ADP** 90 mM
- **$\alpha$ -cetoglutarato** 480 mM

Los ensayos se prepararon directamente en celdas para espectrofotómetro. Se agregaron 2 mL de amortiguador de fosfatos, 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$ , 50  $\mu\text{L}$  de NADH, 50  $\mu\text{L}$  de ADP, la muestra, y agua hasta completar un volumen final de 3 mL. Se utilizaron 50  $\mu\text{g}$  de proteína de la fracción mitocondrial o 150  $\mu\text{L}$  del medio extramitocondrial. Para determinar la actividad de GDH se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -cetoglutarato y se mezcló por inversión. Se midió la absorbancia a 340 nm durante la fase lineal de la reacción, cada minuto a lo largo de 5 minutos.

### **MDH (Malato Deshidrogenasa)**

La MDH cataliza la conversión de malato a oxaloacetato junto con la reducción de  $\text{NAD}^+$ . Existen dos isoenzimas en las células de mamíferos: la enzima mitocondrial forma parte del ciclo de Krebs; la enzima citosólica interviene en el equilibrio de equivalentes reductores e intermediarios metabólicos entre el citoplasma y la mitocondria ya que forma parte de la lanzadera de aspartato-malato. La actividad de esta enzima se determinó espectrofotométricamente por el cambio en la absorbancia a 340 nm que genera la reducción de  $\text{NAD}^+$ .

Se prepararon las siguientes soluciones:

- **Amortiguador de dietanolamina.** ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_2$ ).  $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_2$  0.1 M y  $\text{MgCl}_2$  5 mM, pH 9.2
- **$\text{NAD}^+$**  3.6 mM en amortiguador de  $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_2$ . Prepararlo en fresco.

- **L-malato** 250 mM pH 9.2 en amortiguador de  $C_4H_{11}NO_2$ .

En un tubo de ensayo se agregaron 2 mL de solución de  $NAD^+$  y la muestra, completando con agua para obtener un volumen final de 2.5mL. Se utilizaron 50  $\mu$ g de proteína de la fracción mitocondrial o 150  $\mu$ L de medio extramitocondrial. Se tapó cada tubo para evitar la evaporación de la mezcla. Los tubos se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente y después a 37 °C durante 15 minutos. Para determinar la actividad de MDH se agregaron 250  $\mu$ L de malato y se mezcló por inversión. Se midió la absorbancia a 340 nm durante la fase lineal de la reacción, cada 30 segundos a lo largo de 3 minutos.

### **AST (Aspartato Aminotransferasa)**

La enzima AST utiliza piridoxal-5-fosfato como cofactor para transferir un grupo amino del aspartato al  $\alpha$ -cetoglutarato, formando glutamato y oxaloacetato. Existen dos isoenzimas en hígado, una en el citosol y la otra en la matriz mitocondrial. Ambas forman parte de la lanzadera de aspartato-malato, que ayuda a mantener el equilibrio de equivalentes reductores e intermediarios metabólicos entre la mitocondria y el citoplasma. Se determinó la actividad de AST de manera indirecta, agregando MDH a los ensayos. El oxaloacetato que generó la actividad de AST sirvió de sustrato para MDH, que a su vez oxidó NADH a  $NAD^+$  lo que produjo un cambio en la absorbancia que se monitoreó a 340 nm. Dado que el único oxaloacetato en el ensayo provino de la actividad de AST, el cambio en la absorbancia reflejó la actividad de la transaminasa.

Se prepararon las siguientes soluciones:

- **Amortiguador Tris.** 100 mM pH 7.8.
- **Solución aspartato/Tris.** Aspartato 297 mM, Tris 100 mM pH 7.8.
- **MDH/LDH/glicerol.** Malato deshidrogenasa 230 kU/L, lactato deshidrogenasa 105 kU/L, glicerol 50% v/v.
- **Piridoxal-5-fosfato/Tris.** Piridoxal-5-fosfato 5.44 mM, Tris 100 mM. Se almacenó a  $-20^{\circ}C$  en condiciones de obscuridad.
- **$\alpha$ -cetoglutarato/Tris.**  $\alpha$ -cetoglutarato 144 mM, Tris 100 mM pH 7.8.
- **Solución de trabajo.** Se preparó antes de cada experimento. Para 100 muestras se mezcló: 200 mL de solución de aspartato/Tris, 1 mL de MDH/LDH/glicerol, 5 mL de solución de piridoxal-5-fosfato y 30 mg NADH, y se ajustó el pH a 7.8.

En un tubo de ensayo se agregaron 2 mL de la solución de trabajo y la muestra en un volumen final de 200  $\mu$ L. Se utilizaron 50  $\mu$ g de proteína de la fracción mitocondrial o 200  $\mu$ L de medio extramitocondrial. Se tapó cada tubo para evitar la evaporación de la mezcla. Los tubos se incubaron en baño María a 30 °C durante 30 minutos. Para medir la actividad de AST se transfirió la mezcla a una celda para espectrofotómetro, se añadieron 200  $\mu$ L de  $\alpha$ -cetoglutarato y se mezcló por inversión. Se midió la absorbancia a 340 nm durante la fase lineal de la reacción cada 30 segundos a lo largo de 3 minutos.

### **SDH (Succinato deshidrogenasa)**

SDH es una proteína integral de la membrana interna mitocondrial y un componente tanto de la cadena transportadora de electrones como del ciclo del ácido tricarboxílico. También se le conoce como complejo II mitocondrial (CII). Lleva a cabo la conversión de succinato a fumarato, junto con el transporte de electrones a la poza de quinonas en la membrana interna mitocondrial. Debido a que no es posible detectar los productos de la reacción directamente, la técnica para medir la actividad de esta enzima se basa en interrumpir el transporte normal de los electrones en la cadena respiratoria y desviarlos a otra molécula. Para esto, a los ensayos sólo se añadió succinato como sustrato para la SDH, cianuro de potasio como inhibidor del complejo III mitocondrial, y un aceptor artificial de electrones: el 2,6 diclorofenolindofenol (DCIP). El DCIP se vuelve incoloro cuando se reduce, por lo cual se monitoreó el cambio en la absorbancia a 600 nm durante la fase lineal de la reacción cada minuto a lo largo de 5 minutos.

Se prepararon las siguientes soluciones:

- **Amortiguador de fosfatos.** 75 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7.4.
- **Succinato.** 600 mM pH 7.4. Disuelto en agua.
- **Fenacina metosulfato (PMS).** 27 mM. Se preparó antes de cada experimento, se disolvió en agua y se mantuvo en condiciones de obscuridad.
- **Diclorofenol-indofenol (DCIP)** 1.5 mM. Se preparó antes de cada experimento, se disolvió en agua y se mantuvo en condiciones de obscuridad.
- **Albumina sérica bovina (BSA) 1.5% p/v**, se disolvió en agua.
- **Cianuro de potasio.** 45 mM KCN, se preparó antes de cada experimento.

En una celda para espectrofotómetro se agregaron 2 mL del amortiguador de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 200  $\mu\text{L}$  de succinato, 200  $\mu\text{L}$  de BSA, 100  $\mu\text{L}$  de DCIP, 100  $\mu\text{L}$  PMS y 100  $\mu\text{L}$  KCN. Finalmente se agregó la muestra en un volumen final de 300  $\mu\text{L}$  y se mezcló por inversión. Se utilizaron 10  $\mu\text{g}$  de proteína de la fracción mitocondrial o entre 150-200  $\mu\text{L}$  de medio extramitocondrial. Se midió la absorbancia a 660 nm durante la fase lineal de la reacción, cada minuto a lo largo de 5 minutos.

## VII.7 Ensayo de liberación de enzimas mitocondriales

### En presencia de agentes químicos

Se prepararon las siguientes soluciones:

- **Medio respiratorio.** 225 mM sacarosa, 10 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris-HCl.
- **Sustratos.** Glutamato 10 mM, malato 1 mM, succinato 10 mM.
- **ADP** 30 mM.
- **Rotenona** 1 mM.
- **Cianuro (KCN)** 500  $\mu\text{M}$ .
- **m-clorocarbonilcianuro fenilhidrazona (CCCP)** 20  $\mu\text{M}$ .
- **Peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )** 50  $\mu\text{M}$ .
- **Manitol ( $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$ )** 100 mM.
- **Butil hidroxitolueno (BHT)** 400  $\mu\text{M}$ .

**Condiciones basales.** 3 mL de medio respiratorio.

**Con sustratos.** Se mezclaron 100  $\mu\text{L}$  de sustratos y 2.9 mL de medio respiratorio.

**Condiciones fosforilantes.** Se mezclaron 100  $\mu\text{L}$  de sustratos, 50  $\mu\text{L}$  de ADP y se utilizó medio respiratorio para completar un volumen final de 3 mL.

**Agentes químicos.** Al medio en condiciones energizantes se les agregó, según el caso: 6  $\mu\text{L}$  de rotenona, 1.5 mL de manitol, o 50  $\mu\text{L}$  de cianuro, CCCP,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y BHT.

En un vaso de precipitados con agitación constante, se colocó un volumen final de 3 mL de medio en condiciones basales, con sustratos, en condiciones fosforilantes, o con agentes químicos, según fuera el caso. Se agregó 1 mg de proteína de mitocondrias recién aisladas y en buen estado (determinado por oximetría). Después de 7 minutos de incubación, se separaron las

fracciones por centrifugación a 17 400 x g durante 5 minutos. Se recuperó el medio extramitocondrial, y la fracción mitocondrial se resuspendió en medio respiratorio. Ambos se almacenaron a -20 °C hasta el momento de su uso.

### **Dependencia del tiempo**

Se utilizaron las mismas soluciones que en el ensayo con agentes químicos. Se prepararon 30 mL de medio en condiciones basales o fosforilantes.

En un vaso de precipitados con agitación constante, se colocaron 30 mL de medio en las condiciones anteriormente descritas, y 10 mg de proteína de mitocondrias recién aisladas y en buen estado (determinado por oximetría). Se tomaron muestras de 3 mL en los minutos 2, 5, 7.5, 10, 15, 20, 30 y 60, posteriores a la adición de las mitocondrias. Se separaron las fracciones de cada muestra por centrifugación a 17 400 x g durante 90 s. Se recuperó el medio extramitocondrial, y la fracción mitocondrial se resuspendió en medio respiratorio. Ambos se almacenaron a -20 °C hasta el momento de su uso.

### **Dependencia de la temperatura**

Se utilizaron las mismas soluciones que en el ensayo con agentes químicos.

La temperatura se controló realizando los ensayos en un baño María con agitación. Las temperaturas de incubación fueron: 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 37 y 45 °C. En un vaso de precipitados se colocaron 3 mL de medio en condiciones basales o energizantes. Se agregó 1 mg de proteína de mitocondrias recién aisladas y en buen estado (determinado por oximetría). Después de 10 minutos, se separaron las fracciones por centrifugación a 17 400 x g durante 90 s. Se recuperó el medio extramitocondrial, y la fracción mitocondrial se resuspendió en medio respiratorio. Ambos se almacenaron a -20 °C hasta el momento de su uso.

### **Dependencia de la concentración de mitocondrias**

Se utilizaron las mismas soluciones que en el ensayo con agentes químicos.

Los ensayos se realizaron en un baño María con agitación y temperatura constante a 37 °C. En un vaso de precipitados con 3 mL de medio en condiciones basales o fosforilantes, se agregaron las mitocondrias recién aisladas y en buen estado (determinado por oximetría). Los

ensayos se realizaron incubando 0.5, 1, 2, 3 o 5 mg de proteína mitocondrial durante 10 minutos. Al finalizar, las fracciones se separaron por centrifugación a 17 400 x g durante 90 s. Se recuperó el medio extramitocondrial, y la fracción mitocondrial se resuspendió en medio respiratorio. Ambos se almacenaron a -20 °C hasta el momento de su uso.

#### **VII.8 Cálculos del porcentaje de actividad enzimática en el medio extramitocondrial**

Se determinó la actividad de AST, ALT, GDH y OTC tanto en la fracción mitocondrial como en el medio de incubación de cada experimento. Se sumaron ambos resultados para obtener la actividad total en cada ensayo. Se calculó el porcentaje de actividad enzimática en el medio extramitocondrial con respecto a la actividad total de cada ensayo.

#### **VII.9 Análisis estadístico**

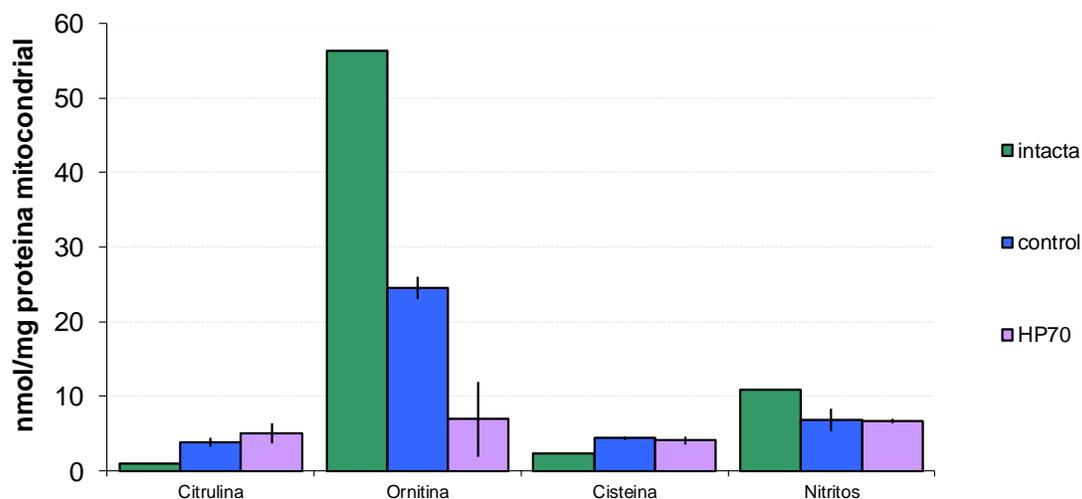
Los datos se analizaron por t de student y ANOVA de dos factores con un nivel de significancia de 0.05 o 0.1 según se indica en cada figura.

## VIII. Resultados

Trabajos previos realizados en el laboratorio del Dr. Rolando Hernández se enfocaron en estudiar diversos aspectos del metabolismo mitocondrial durante la regeneración hepática: la capacidad fosforilativa, el rol del estrés oxidativo, los cambios en el contenido de ATP, los cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Hernández-Muñoz y colaboradores, 2003), entre otros, en mitocondrias hepáticas de rata, aisladas por centrifugación diferencial. Sin embargo, se desconocía si las mitocondrias aisladas con este método eran capaces de liberar enzimas de la matriz al medio de incubación en un ensayo *in vitro*. Por lo tanto, inicialmente se aislaron mitocondrias hepáticas de ratas 48 horas posteriores a que se les realizara hepatectomía parcial del 70%, ya que en ese momento de la regeneración los hepatocitos no han alcanzado su estado quiescente y se cuenta con suficiente tejido para realizar varias mediciones. En la Figura 8.1 se muestran los resultados obtenidos al determinar la presencia de citrulina, cisteína, ornitina y nitritos en extractos ácidos de mitocondrias aisladas de hígados de ratas intactas, control (con laparotomía) y con 48 h posteriores a HP del 70%. En el caso de la ornitina, se observó una menor presencia del metabolito en las mitocondrias de ratas hepatectomizadas con respecto a las ratas intactas y al control quirúrgico. No se hallaron diferencias significativas entre los tres grupos para los otros metabolitos. Los niveles de nitritos en las mitocondrias de todos los tratamientos son muy similares, indicando que el metabolismo del nitrógeno no se encuentra afectado. De igual manera sucede con los niveles de cisteína, que indica el estado oxidativo de las mitocondrias al servir como precursor del glutatión. La citrulina se produce en la matriz mitocondrial a partir de ornitina y carbamoil-fosfato, y es exportada al citosol, lo que podría explicar los bajos niveles del metabolito en las mitocondrias, y que no se hayan encontrado diferencias entre los grupos.

Posteriormente se evaluó el estado metabólico de las mitocondrias al energizarlas con sustratos oxidables y ADP en ensayos *in vitro*. Mitocondrias recién aisladas (1 mg de proteína) se colocaron en 3 mL de medio respiratorio y se agregó glutamato y malato como sustrato para el complejo I (CI) de la cadena transportadora de electrones (CTE) o succinato para el complejo II (CII), además de ADP. Una vez que se consumió todo el ADP, se separó la fracción mitocondrial del medio extramitocondrial por centrifugación y se midió la presencia de ornitina, citrulina, cisteína y nitritos en cada fracción. La suma de los metabolitos en las dos fracciones corresponde al 100 % de actividad. En estas condiciones se encontraron niveles muy altos de ornitina (Figura 8.2a) en el interior de las mitocondrias energizadas como era de esperarse, independientemente del sustrato utilizado. También se encontraron niveles altos de citrulina

(Figura 8.2b) en el medio de incubación de las mitocondrias energizadas, independientemente del sustrato utilizado. Estos resultados sugieren que la enzima responsable de la conversión de ornitina a citrulina podría encontrarse activa en las mitocondrias aisladas. En el caso de la cisteína, se localizó principalmente en el medio, mientras que los nitritos se distribuyeron de manera homogénea cuando se agregó glutamato y malato, pero no succinato. La distribución de los metabolitos sugiere que, al término del ensayo, las membranas de las mitocondrias se encuentran en buen estado, y los transportadores de metabolitos funcionan adecuadamente. No se observaron diferencias entre el grupo control y el hepatectomizado.

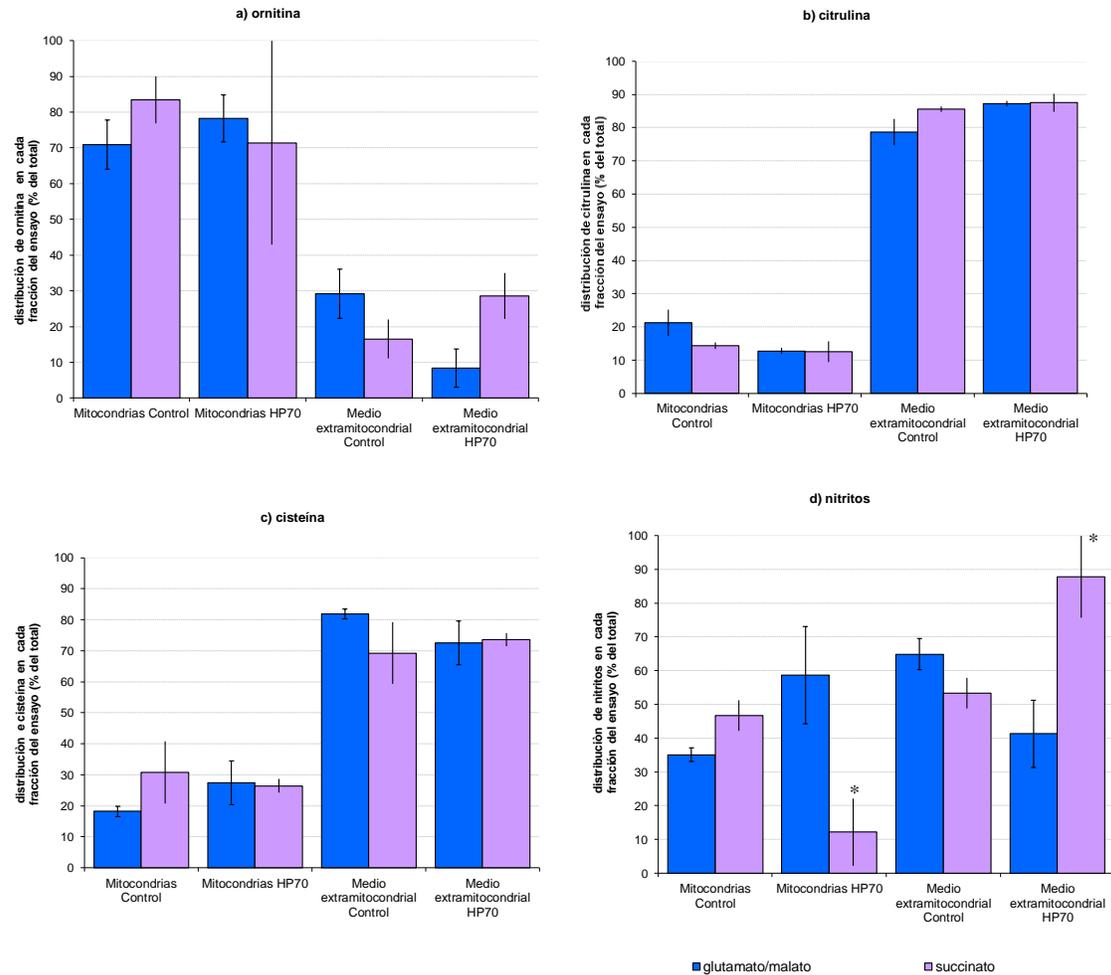


**Figura 8.1 Metabolitos en mitocondrias aisladas de hígados de ratas intactas, control (con laparotomía) y 48 h posteriores a 70% de hepatectomía parcial.** Se aislaron por centrifugación diferencial, mitocondrias hepáticas de ratas sometidas a diferentes tratamientos, y se determinó la cantidad de nanomoles de citrulina, ornitina, cisteína y nitritos por miligramo de proteína en extractos ácidos de mitocondrias. Los niveles de citrulina, cisteína y nitritos fueron similares en los tres tratamientos. Sólo se encontró que la cantidad de ornitina es menor en ratas hepatectomizadas con respecto a los otros dos grupos. Los resultados corresponden a una determinación en el grupo intacto y al menos tres mediciones independientes en los grupos control y con HP.

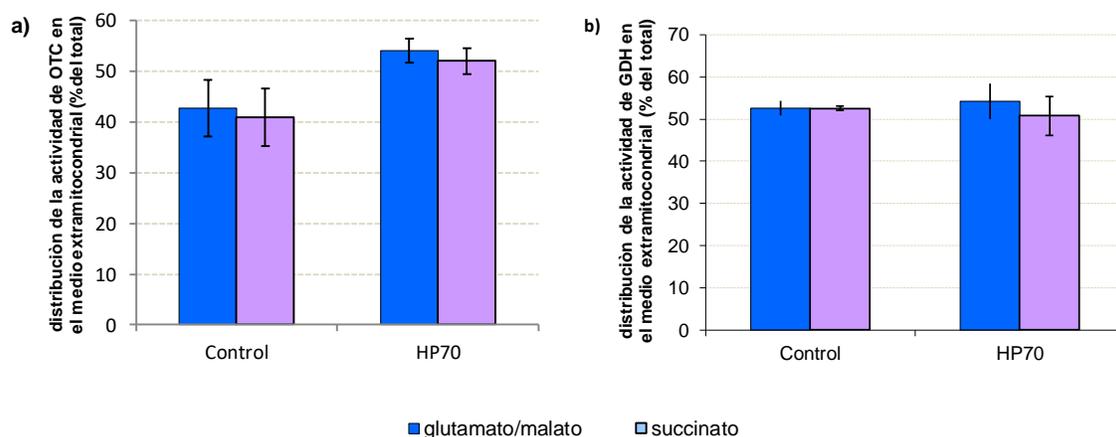
Se encontró actividad de OTC y GDH en el medio de incubación de las mitocondrias energizadas (Figura 8.3). El porcentaje de actividad de OTC en el medio extramitocondrial fue mayor del 40% tanto en el grupo control como en el de hepatectomía parcial (HP70) (Figura 8.3a). No hubo diferencias dentro de cada grupo al usar sustratos para el complejo I o II de la CTE; sin embargo, el tratamiento quirúrgico muestra una tendencia en el caso de OTC. El

porcentaje de actividad extramitocondrial del grupo con hepatectomía parcial es mayor que el del grupo control (51% contra 41% respectivamente). En el caso de la GDH (Figura 8.3b), el porcentaje de actividad en el medio de incubación de las mitocondrias energizadas no se afectó por la hepatectomía parcial (que fue alrededor del 51% en ambos grupos). Tampoco se observó un efecto sobre la actividad de la enzima en el sobrenadante debido al uso de diferentes sustratos. Finalmente se midió la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), que se encuentra integrada a la membrana interna mitocondrial. No se encontró actividad de SDH en el medio de incubación (datos no mostrados). La causa de encontrar enzimas en el medio de incubación no parece ser la ruptura de la membrana de las mitocondrias aisladas de las ratas con HP70, como sucedería si estuvieran dañadas, ya que se obtuvieron coeficientes respiratorios similares a los de mitocondrias de ratas control. Control vs HP. Glutamato/Malato:  $2.46 \pm 0.49$  vs  $3.56 \pm 0.9$ . Succinato:  $2.29 \pm 0.33$  vs  $2.46 \pm 0.47$ . Esto sugiere que en las condiciones ensayadas podría ocurrir la liberación de enzimas de la matriz mitocondrial al medio de incubación.

Bajo las mismas condiciones, la OTC y GDH muestran comportamientos distintos. A pesar de que OTC es casi 3 veces más pequeña que GDH (OTC es un trímero de 120kDa, GDH es un hexámero de 360kDa), ésta se encuentra en menor porcentaje que la segunda en el medio de incubación del grupo control. A partir de estos datos y los de CR se infiere que los resultados encontrados no se deben simplemente a que las moléculas se equilibran entre las dos fracciones estudiadas por la ruptura de las membranas mitocondriales, sino que es posible que este fenómeno sea regulado por las mitocondrias y dependa del estado metabólico en que se encuentran al momento de aislarlas. Por lo tanto, además de las señales mecánicas y químicas provenientes de todo el hígado, las mitocondrias parecen poseer mecanismos intrínsecos, aún desconocidos, para regular la liberación de enzimas de la matriz al medio exterior.



**Figura 8.2 Distribución de ornitina, citrulina, cisteína y nitritos en la fracción mitocondrial y en el medio de mitocondrias energizadas *in vitro*.** Mitocondrias (1 mg de proteína) recién aisladas de hígados de ratas control (con laparotomía) y 48 h posteriores a HP del 70% se incubaron en 3 mL de medio respiratorio en presencia de glutamato y malato como sustratos del CI o succinato como sustrato del CII de la cadena transportadora de electrones, y ADP. El 100% de los metabolitos se refiere a la suma de los metabolitos en la fracción mitocondrial y en el medio extramitocondrial. Se muestra la distribución de los metabolitos en las dos fracciones del ensayo, como porcentaje del total. La ornitina se encuentra principalmente en la fracción mitocondrial, mientras que la citrulina y la cisteína se encuentran en el medio. Los nitritos se encuentran distribuidos de manera similar en ambas fracciones. Los resultados sugieren que las membranas mitocondriales no se encuentran afectadas, y que las enzimas del metabolismo se encuentran activas. No se observaron diferencias entre el grupo control y el grupo hepatectomizado. Los resultados corresponden al menos a tres determinaciones independientes para cada grupo, \*  $p < 0.05$ .



**Figura 8.3 Distribución de la actividad de OTC y GDH en el medio de incubación de mitocondrias energizadas *in vitro*.** Mitocondrias (1 mg de proteína) recién aisladas de hígados de ratas control (con laparotomía) y 48 h posteriores a HP del 70% se incubaron en 3 mL de medio respiratorio en presencia de glutamato y malato como sustratos del CI o succinato como sustrato del CII de la cadena transportadora de electrones, y ADP. El 100% se refiere a la suma de la actividad de las enzimas en la fracción mitocondrial y en el medio extramitocondrial. Se muestra la actividad de las enzimas en el medio de incubación respecto al total del ensayo. Tanto OTC como GDH se encuentran en la misma proporción en el medio, independientemente de los sustratos usados para energizar a las mitocondrias. Los resultados corresponden al menos a tres determinaciones independientes para cada grupo, \*  $p < 0.05$ .

### Liberación *in vitro* de enzimas de la matriz mitocondrial

Con el propósito de profundizar en el estudio de la liberación de enzimas de la matriz mitocondrial, se determinó el porcentaje de actividad de algunas proteínas en el medio de incubación de ensayos *in vitro* con mitocondrias aisladas del hígado de ratas intactas, control quirúrgico (con laparotomía) o de 70% de hepatectomía parcial. Con base en el trabajo de Rivera-Valerdi (1997) con rebanadas hepáticas y hepatocitos, se estudió el efecto sobre la liberación de enzimas de varios compuestos que podían afectar las funciones mitocondriales. Principalmente se evaluó la disponibilidad de energía metabólica a través de incubar a las mitocondrias con sustratos oxidables e inhibidores de la cadena transportadora de electrones. También se intentó evaluar el estado redox por medio de utilizar dos antioxidantes y un oxidante en el medio de incubación. En el presente trabajo se utilizaron mitocondrias 24 h posteriores al tratamiento quirúrgico, debido a que es el punto temporal durante la regeneración en que se ha encontrado mayor actividad de las enzimas en el suero de ratas con HP.

Se estudiaron algunas enzimas que se ha reportado que salen de la matriz mitocondrial. Greco y colaboradores (1998) reportaron que la malato deshidrogenasa (MDH) y la isoforma

mitocondrial de la aspartato aminotransferasa (AST) son liberadas de la matriz en condiciones que favorecen la permeabilización de las membranas. Díaz-Juárez y colaboradores (2006) reportaron que la actividad de la glutamato deshidrogenasa (GDH) y la ornitina carbamoil-fosfato transferasa (OTC) aumenta en mayor proporción en el suero de ratas con HP. Estas últimas son de localización exclusivamente mitocondrial. Todas las enzimas estudiadas se encuentran codificadas en el ADN nuclear y son importadas a la mitocondria desde el citosol.

## **Efecto de diversos agentes químicos sobre la liberación de las enzimas**

### **Glutamato Deshidrogenasa (GDH)**

Esta enzima de la matriz mitocondrial produce  $\alpha$ -cetoglutarato y amonio a partir de glutamato, por lo cual sirve de enlace entre el metabolismo nitrogenado y el de los esqueletos de carbono. La Figura 8.4 muestra la actividad de GDH en el medio extramitocondrial después de la incubación con varios compuestos. En las mitocondrias de ratas intactas se observó un aumento significativo de la actividad de GDH en el medio extramitocondrial con respecto al basal, al energizar las mitocondrias; sin embargo, parece que no es necesario que se realice la fosforilación del ADP para que GDH sea liberada al medio. No hay diferencia entre la incubación con los sustratos (barra amarilla) y la incubación con sustratos y ADP (barra azul). Además, al utilizar cianuro o un desacoplante, la actividad permanece por arriba del basal.

Tampoco queda muy claro el papel de la cadena transportadora de electrones en la liberación *in vitro* de GDH. En presencia de sustratos (barra amarilla) o cianuro (barra morada) la velocidad de la cadena es lenta debido a que el gradiente electroquímico no es consumido y se satura. En cambio, en presencia de sustratos y ADP (azul) o desacoplante (café) la velocidad es alta debido a que el gradiente electroquímico es disipado y necesita formarse nuevamente. Sin embargo, en todas estas condiciones el porcentaje de liberación de GDH fue similar. Si la liberación de GDH dependiera de la formación del gradiente electroquímico, el porcentaje de actividad en el medio extramitocondrial debería de disminuir en presencia de CCCP. Tampoco se debe a la presencia de ADP en las muestras (la barra amarilla no tiene ADP). La presencia de los sustratos puede ser el factor determinante. Sin embargo, los porcentajes de actividad con cianuro (morado) y rotenona (verde) son estadísticamente significativos con respecto al porcentaje sólo en presencia de sustratos (amarillo). Estos resultados sugieren que, en las

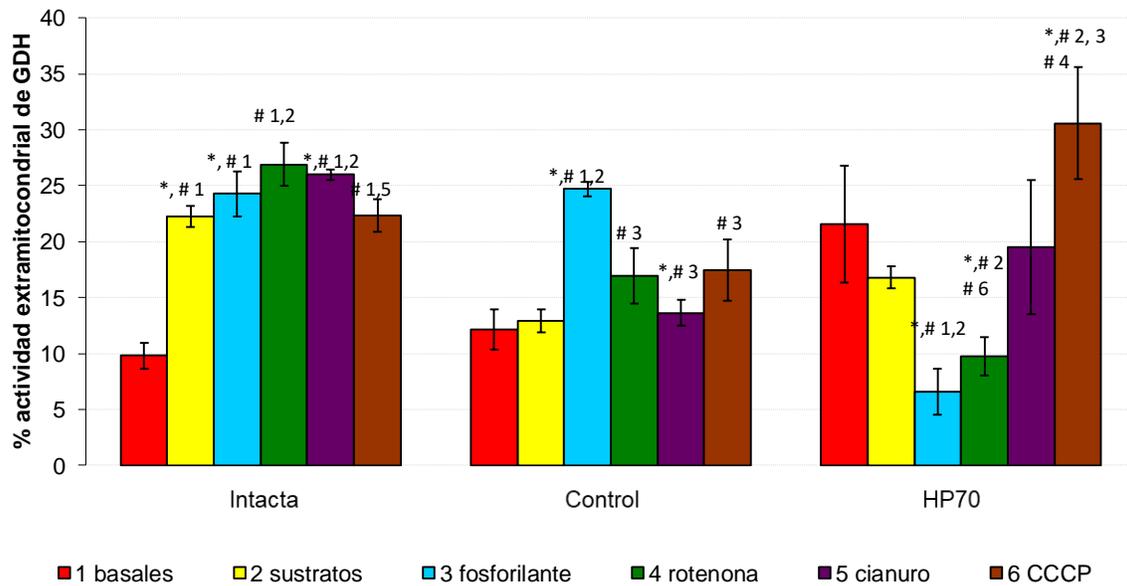
mitocondrias hepáticas de ratas intactas, la liberación de GDH al medio extramitocondrial requiere de la activación del metabolismo por la presencia de sustratos oxidables.

Para que en las ratas control GDH sea liberada al medio de las mitocondrias, fue necesario que la fosforilación de ADP se encuentre acoplada a la oxidación de los sustratos de la cadena transportadora de electrones (Figura 8.4 control). Esto se confirma al utilizar inhibidores de la cadena y el desacoplante, ya que en todos los casos el porcentaje de actividad de GDH en el medio fue menor que en condiciones fosforilantes.

La velocidad de la cadena transportadora de electrones no parece ser determinante. Con sustratos (amarillo) y con cianuro (morado) el flujo de la cadena es lento; con sustratos y ADP (azul) o con CCCP (café) es rápida. Tanto la velocidad de la CTE como la formación del gradiente electroquímico no parecen ser importantes para la liberación de GDH de las mitocondrias de ratas control. Los porcentajes de actividad en el medio extramitocondrial son muy similares cuando el flujo de electrones es lento y se forma el gradiente usando sustratos (amarillo) o cianuro (morado) o cuando el flujo de electrones es rápido y el gradiente se disipa con el desacoplante CCCP (café). Sin embargo, la liberación de GDH al medio extramitocondrial requiere de la actividad del CI de la CTE, ya que si se le inhibe con rotenona (barra verde) se observa una disminución de la actividad de GDH.

El comportamiento de las mitocondrias de ratas intactas y controles fue similar. Sin embargo, las intactas son menos sensibles a los moduladores de las condiciones fosforilantes que las que fueron manipuladas quirúrgicamente. Cabe notar que los porcentajes de actividad en el medio son similares en ambos grupos para las condiciones fosforilantes (barras azules).

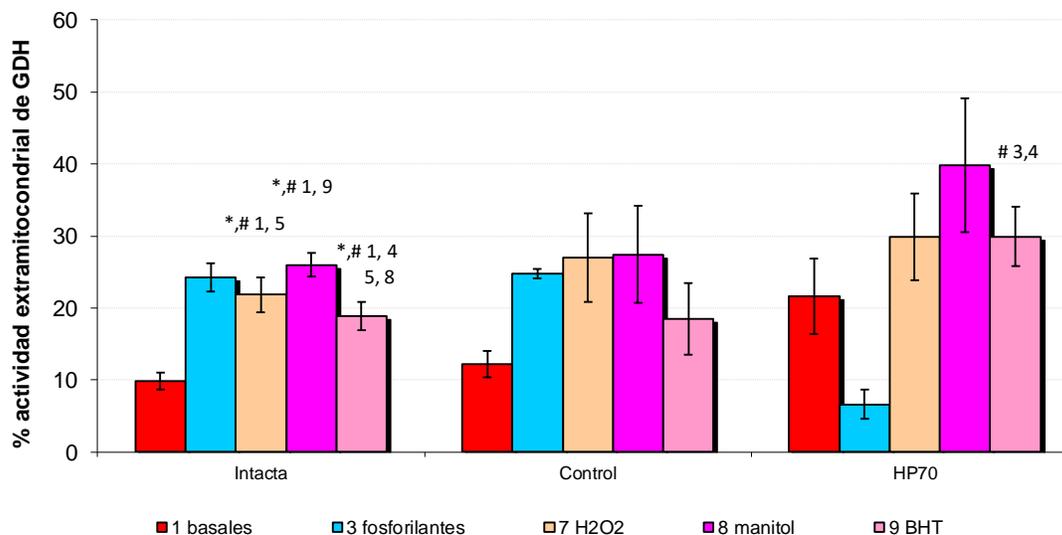
En el grupo con HP70 los tratamientos tuvieron el efecto contrario que en el control quirúrgico (Figura 8.4, HP70). El porcentaje de actividad de GDH en el medio extramitocondrial fue mayor en la condición basal (rojo) y con CCCP (café), cuando no hay gradiente electroquímico. Al generar un potencial transmembranal con sustratos (amarillo) y cianuro (morado), la salida de GDH al medio es menor. En presencia de rotenona (verde) también se encontró diferencia significativa con respecto a las condiciones no fosforilantes teniendo sólo el CII como fuente de alimentación de la cadena respiratoria. El acoplamiento de la respiración con la fosforilación de ADP (azul) parece inhibir la liberación de GDH al medio de mitocondrias de ratas sometidas a hepatectomía parcial. Finalmente, la liberación de GDH de las mitocondrias de las ratas hepatectomizadas fue más sensible que las intactas.



**Figura 8.4 Porcentaje de actividad de GDH en el medio extramitocondrial de mitocondrias incubadas en presencia de agentes químicos que afectan a la cadena transportadora de electrones.** 1 mg de mitocondrias aisladas del hígado de ratas intactas, control (laparotomía) o con HP70 fueron incubadas en 3 mL de medio, durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) bajo las condiciones que se indican en la leyenda. 1 (rojo): Mitocondrias sin estímulo. 2 (amarillo): Mitocondrias en el medio de incubación con sustratos oxidables: glutamato/malato/succinato. 3 (azul): Mitocondrias en el medio de incubación con sustratos oxidables y ADP (condiciones fosforilantes). 4 (verde): Mitocondrias en medio bajo condiciones fosforilantes y rotenona. 5 (morado): Mitocondrias en medio bajo condiciones fosforilantes y cianuro. 6 (café): Mitocondrias en medio bajo condiciones fosforilantes y CCCP. El 100% de GDH se refiere a la suma de la actividad enzimática en la fracción mitocondrial y en el medio extramitocondrial. Se muestra la distribución de la actividad de GDH en la fracción extramitocondrial del ensayo, como porcentaje del total. La actividad de GDH en el medio extramitocondrial es afectada de diferente manera dependiendo de su origen. Sin embargo, en los tres grupos se puede observar el efecto de los inhibidores y de las condiciones fosforilantes sobre la actividad de GDH en el medio extramitocondrial. Los números en la leyenda hacen referencia a las condiciones de incubación \*  $p < 0.05$ , #  $p < 0.1$  los números en la gráfica indican con cuál de los tratamientos se realizó la comparación.

La presencia de oxidantes y antioxidantes en el medio de incubación no afectó la liberación de enzimas de la matriz de mitocondrias intactas y control (Figura 8.5). En ambos casos los porcentajes fueron mayores al basal, pero no son diferentes a los encontrados para las condiciones fosforilantes. Únicamente el tratamiento con BHT tiende a disminuir la actividad de GDH en el medio, siendo significativa para el grupo intacto respecto al tratamiento con rotenona. Por otra parte, en el grupo con HP los oxidantes y antioxidantes tienden a promover la salida de GDH al medio; esto fue significativo sólo al utilizar BHT. La discrepancia en los efectos

provocados por los dos antioxidantes puede deberse a que sus mecanismos de acción son distintos: mientras que el manitol se mantiene soluble en el medio, el BHT es liposoluble y se inserta en la membrana mitocondrial. Como también se observa, mientras que en los grupos intacto y control el tratamiento disminuyó la actividad de GDH, en el grupo con HP lo aumentó. Esto sugiere que las mitocondrias regulan la salida de enzimas de su matriz dependiendo del estado metabólico en que se encuentran.



**Figura 8.5 Porcentaje de actividad de GDH en el medio extramitocondrial de mitocondrias incubadas en condiciones oxidantes y antioxidantes.** 1 mg de mitocondrias aisladas del hígado de ratas intactas, control (laparotomía) o con HP70 fueron incubadas en 3 mL de medio, durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) bajo las condiciones que se indican en la leyenda. 1 (rojo): Mitocondrias sin estímulo. 3 (azul): Mitocondrias en el medio de incubación con sustratos oxidables y ADP (condiciones fosforilantes). 7 (rosa claro): Mitocondrias en medio bajo condiciones fosforilantes y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 8 (magenta): Mitocondrias en medio bajo condiciones fosforilantes y manitol. 9 (rosa): Mitocondrias en medio bajo condiciones fosforilantes y BHT. El 100% de GDH se refiere a la suma de la actividad enzimática en la fracción mitocondrial y en el medio extramitocondrial. Se muestra la distribución de la actividad de GDH en la fracción extramitocondrial del ensayo, como porcentaje del total. La actividad de GDH en el medio extramitocondrial es afectada de diferente manera dependiendo de su origen. Únicamente la presencia de BHT provocó el aumento de la actividad de GDH en el medio extramitocondrial con respecto a las mitocondrias con sustratos oxidables y ADP. Los números en la leyenda hacen referencia a las condiciones de incubación. \* p<0.05, # p<0.1 los números en la gráfica indican con cuál de los tratamientos se realizó la comparación.

### Ornitina Transcarbamilasa (OTC)

La OTC transfiere el grupo carbamoil del carbamoilfosfato a la ornitina, formando citrulina; un intermediario del ciclo de la urea. Al energizar a las mitocondrias de ratas intactas

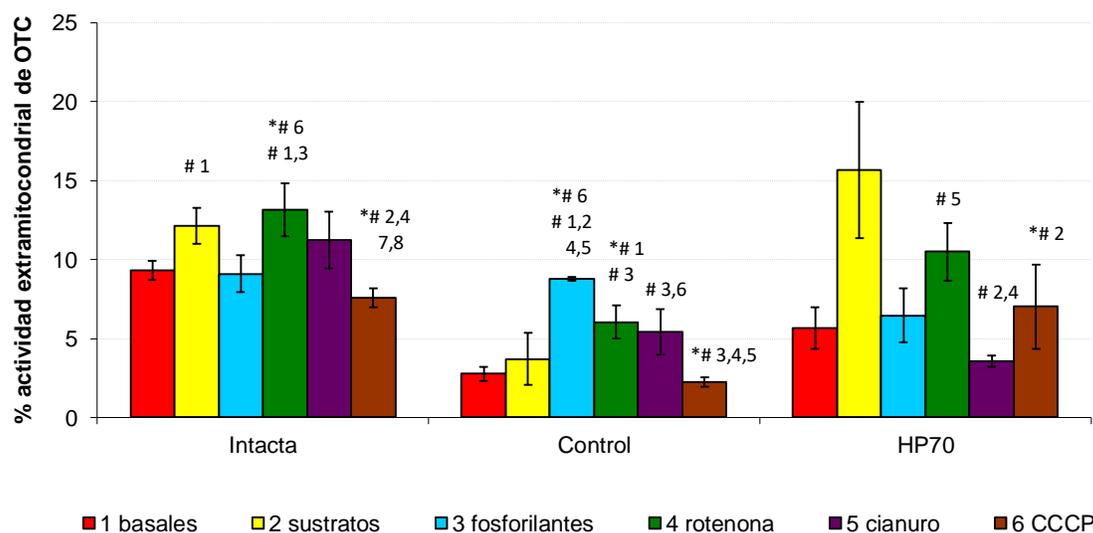
(Figura 8.6, intacta), se aumentó la liberación de OTC de la matriz al medio extramitocondrial. Al parecer, el factor más importante fue la formación del gradiente electroquímico ya que al utilizar únicamente sustratos (amarillo) el porcentaje de OTC en el medio fue mayor que el basal (rojo). Sin embargo, el porcentaje de actividad se abatió al tratar las mitocondrias con el desacoplante CCCP (café). En las condiciones donde puede ocurrir fosforilación de ADP (azul y verde) se observaron resultados opuestos. Al utilizar los cuatro complejos de la CTE (azul) el porcentaje de actividad de OTC en el medio fue similar al basal, pero aumentó de manera significativa con respecto al basal al inhibir el CI con rotenona (verde) tal como se observó con GDH (Figura 8.4, intacta). Podría ser que la liberación de OTC al medio se debiera a un efecto sobre el consumo de NADH/NAD<sup>+</sup> u otra vía del metabolismo mitocondrial, y no necesariamente a la fosforilación oxidativa, para lo cual resulta necesario realizar más experimentos.

La actividad de OTC en el medio extramitocondrial fue más sensible a los tratamientos en las mitocondrias de ratas control que en las intactas (Figura 8.6, control). Sólo se observó aumento en el porcentaje de OTC en el medio extramitocondrial al incubar las mitocondrias en condiciones fosforilantes utilizando sustratos y ADP (azul). Cuando las mitocondrias únicamente se energizan (sustratos-amarillo y cianuro-morado) el porcentaje fue menor. También se observó disminución del porcentaje de la actividad de OTC en el medio extramitocondrial al colapsar el potencial electroquímico con CCCP. Cabe notar que para este grupo fue necesaria la participación del CI de la CTE para que hubiera más liberación de OTC al medio, ya que el porcentaje disminuyó al agregar rotenona (verde). Este fenómeno también se observó en el grupo control con GDH (Figura 8.4, control). Para las mitocondrias de los grupos control resultó importante la formación del gradiente electroquímico en presencia de ADP para la liberación de OTC al medio. En general, los porcentajes de liberación de este grupo fueron menores respecto a los de mitocondrias de ratas intactas.

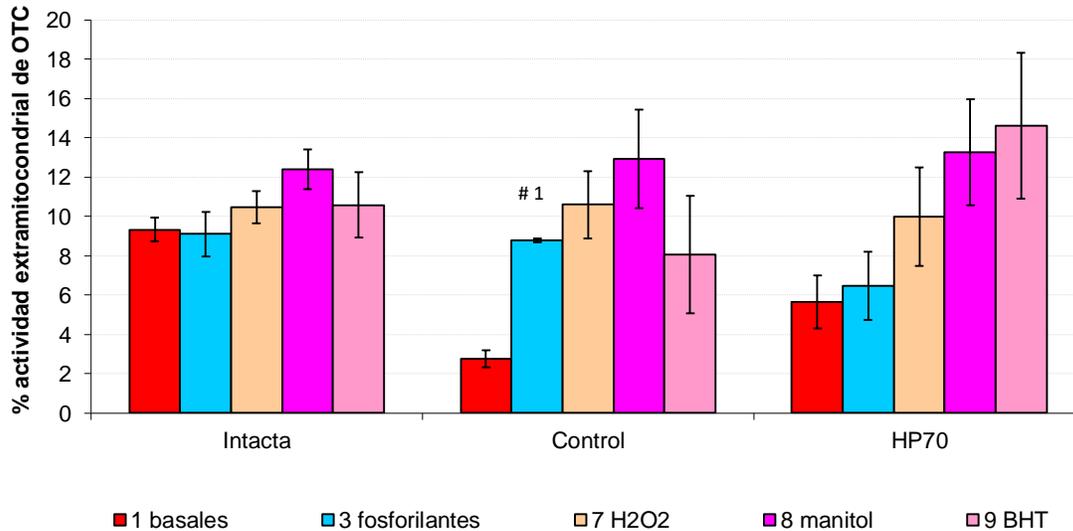
La liberación de OTC de la matriz de mitocondrias de ratas con hepatectomía parcial (Figura 8.6, HP70) sucedió en condiciones similares a las del grupo de ratas intactas. El porcentaje de OTC en el medio extramitocondrial tiende a aumentar al energizar a las mitocondrias con sustratos (amarillo) pero ésta disminuyó al agregar ADP al medio (azul). Al inhibir el flujo de electrones con cianuro (morado) y disipar el potencial electroquímico con CCCP (café) la actividad fue menor que con sustratos. Parece que el CII de la CTE fue suficiente para que aumentara la actividad de OTC en el medio (rotenona-verde), similar a lo observado en el grupo intacto. Cabe notar que los ensayos *in vitro* realizados anteriormente para medir la salida

de las enzimas al medio utilizan estas condiciones de incubación de las mitocondrias (con glutamato, malato y succinato como sustratos, y rotenona para inhibir al CI de la CTE).

La actividad de OTC en el medio extramitocondrial no se vio afectada al incubar a las mitocondrias con antioxidantes u oxidantes en los grupos de ratas intactas o control con respecto a las condiciones fosforilantes (azul) (Figura 8.7). Por otra parte, en el grupo con HP70 se observa una tendencia en los tratamientos con antioxidantes para favorecer la liberación de OTC al medio, aunque no llega a ser significativo.



**Figura 8.6 Porcentaje de actividad de OTC en el medio extramitocondrial de mitocondrias incubadas en presencia de agentes químicos que afectan a la cadena transportadora de electrones.** 1 mg de mitocondrias aisladas del hígado de ratas intactas, control (laparotomía) o con HP70 fueron incubadas en 3 mL de medio, durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) bajo las condiciones que se indican en la leyenda. 1 (rojo): Mitocondrias sin estímulo. 2 (amarillo): Mitocondrias en el medio de incubación con sustratos oxidables: glutamato/malato/succinato. 3 (azul): Mitocondrias en el medio de incubación con sustratos oxidables y ADP (condiciones fosforilantes). 4 (verde): Mitocondrias en medio bajo condiciones fosforilantes y rotenona. 5 (morado): Mitocondrias en medio bajo condiciones fosforilantes y cianuro. 6 (café): Mitocondrias en medio bajo condiciones fosforilantes y CCCP. El 100% de OTC se refiere a la suma de la actividad enzimática en la fracción mitocondrial y en el medio extramitocondrial. Se muestra la distribución de la actividad de OTC en la fracción extramitocondrial del ensayo, como porcentaje del total. La actividad de OTC en el medio extramitocondrial fue afectada de diferente manera dependiendo de su origen. En las mitocondrias de ratas del grupo control se observó un claro efecto de los sustratos y los inhibidores sobre la actividad de OTC en el medio extramitocondrial. Los números en la leyenda hacen referencia a las condiciones de incubación. \*  $p < 0.05$ , #  $p < 0.1$  los números en la gráfica indican con cuál de los tratamientos se realizó la comparación.



**Figura 8.7 Porcentaje de actividad de OTC en el medio extramitocondrial de mitocondrias incubadas en condiciones oxidantes y antioxidantes.** 1 mg de mitocondrias aisladas del hígado de ratas intactas, control (laparotomía) o con HP70 fueron incubadas en 3 mL de medio, durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) bajo las condiciones que se indican en la leyenda. 1 (rojo): Mitocondrias sin estímulo. 3 (azul): Mitocondrias en el medio de incubación con sustratos oxidables y ADP (condiciones fosforilantes). 7 (rosa claro): Mitocondrias en medio bajo condiciones fosforilantes y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 8 (magenta): Mitocondrias en medio bajo condiciones fosforilantes y manitol. 9 (rosa): Mitocondrias en medio bajo condiciones fosforilantes y BHT. El 100% de OTC se refiere a la suma de la actividad enzimática en la fracción mitocondrial y en el medio extramitocondrial. Se muestra la distribución de la actividad de OTC en la fracción extramitocondrial del ensayo, como porcentaje del total. La actividad de OTC en el medio extramitocondrial no fue afectada por las condiciones oxidantes o antioxidantes. Sólo BHT mostró una tendencia a aumentar la actividad de OTC en el medio en ratas con HP70. Los números en la leyenda hacen referencia a las condiciones de incubación. \* p<0.05, # p<0.1 Los números en la gráfica indican con cuál de los tratamientos se realizó la comparación.

### Malato Deshidrogenasa (MDH)

La MDH es un dímero que oxida malato a oxalacetato utilizando NAD<sup>+</sup> como aceptor de electrones. El peso molecular aproximado de cada subunidad es de 36 kDa. En la Figura 8.8 se observa que la presencia de sustratos oxidables para los complejos respiratorios promovió la liberación de MDH al medio extramitocondrial en el grupo de ratas intactas. Al agregar ADP al medio, con el CI y CII de la CTE (azul) disponibles, la actividad de MDH fue la misma que en condiciones basales; sin embargo, al inhibir al CI con rotenona (verde) un mayor porcentaje de MDH se liberó al medio, con respecto al basal. De igual manera se había observado un aumento en la actividad de GDH y OTC en las mitocondrias de ratas intactas incubadas en condiciones fosforilantes y con rotenona (Figuras 8.4 y 8.6 respectivamente). Por otra parte, contrario a lo

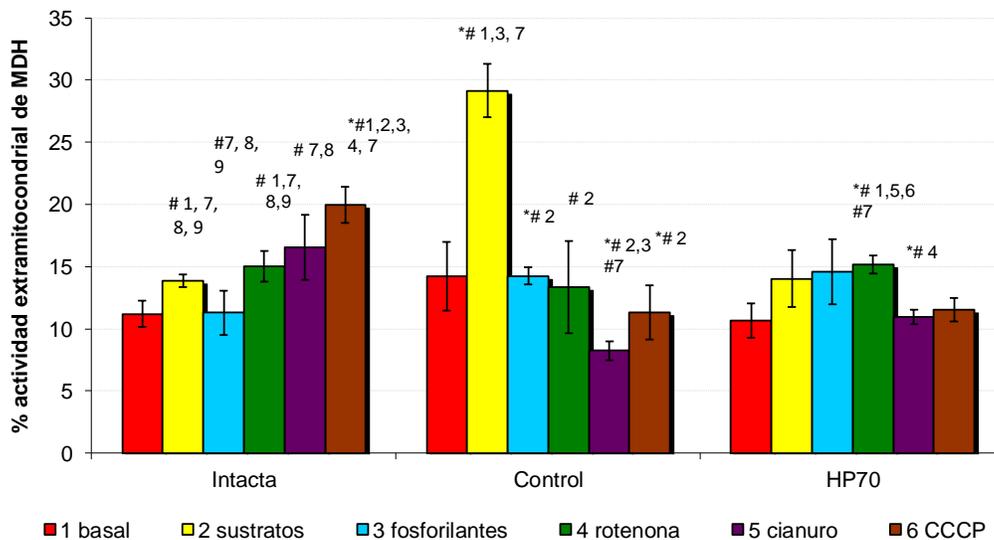
observado con las otras enzimas, la presencia de cianuro (morado) y CCCP (café) provocaron que aumentara la actividad de MDH en el medio extramitocondrial. Por esta causa, parece que no es necesario que las mitocondrias estén acopladas o que el gradiente electroquímico se mantenga para que la MDH sea liberada al medio. La salida de MDH al medio parece requerir de la activación del metabolismo mitocondrial.

En el grupo control no se observaron muchas diferencias en la actividad de MDH en el medio extramitocondrial con los distintos tratamientos (Figura 8.8). En todas las condiciones donde se incubó con ADP (con/sin inhibidores o el desacoplante), la actividad extramitocondrial de MDH fue similar a la basal. Sólo cuando se incubaron las mitocondrias con sustratos (amarillo) aumentó la actividad de MDH de manera muy importante, a diferencia de lo observado con GDH y OTC donde el aumento de la actividad extramitocondrial de las enzimas requería de sustratos y ADP (Figuras 8.4 y 8.6, respectivamente). No hubo diferencia entre utilizar sólo el CII (inhibiendo el CI con rotenona) de la CTE o también el CI (condiciones fosforilantes sin inhibidores-azul). El cianuro (morado) disminuyó el porcentaje de actividad de MDH en el medio extramitocondrial con respecto a las condiciones fosforilantes (azul). En el caso de CCCP (café) también podría existir inhibición de la actividad extramitocondrial de MDH. A pesar de que la diferencia no es significativa, al menos parece consistente en los dos grupos de ratas intervenidas mientras que en las intactas, el uso de CCCP favorece la actividad de MDH en el medio. Es posible que la intervención quirúrgica altere la sensibilidad y el metabolismo mitocondrial.

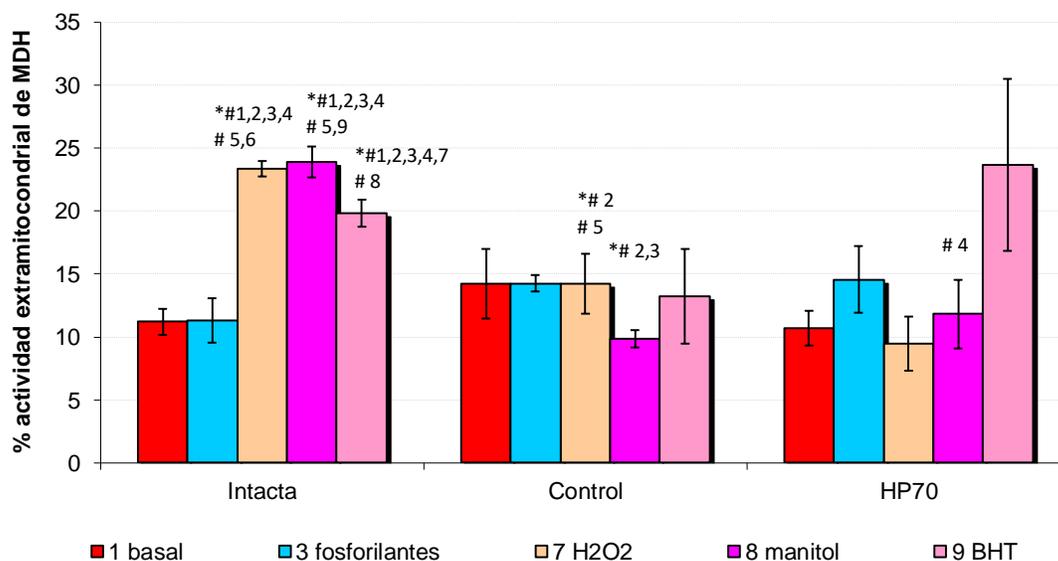
Cuando se añadieron sustratos (amarillo) y ADP (azul) a las mitocondrias del grupo con hepatectomía (Figura 8.8, HP70) no hubo diferencias con respecto al basal (rojo). Pero al inhibir el CI con rotenona (verde) el porcentaje fue mayor, al igual que lo observado con GDH y OTC (Figuras 8.4 y 8.6 respectivamente, grupo control). Cuando se utilizó cianuro (morado) o CCCP (café) el porcentaje disminuyó de manera significativa con respecto al ensayo con rotenona (verde). Los datos sugieren que para que MDH sea liberada de mitocondrias de ratas con HP70 se requiere energizar a las mitocondrias y mantener el potencial electroquímico.

La liberación de MDH de la matriz mitocondrial sí fue modificada al incubar a las mitocondrias con antioxidantes y un oxidante (Figura 8.9). La actividad extramitocondrial de MDH en ratas intactas aumentó, al comparar los porcentajes con el basal (rojo), al utilizar sustratos y ADP (Figura 8.8 amarillo) y al tratamiento con rotenona (Figura 8.8 verde). Por el contrario, al incubar a las mitocondrias del grupo control con manitol se observó una disminución de la actividad de MDH en el medio extramitocondrial, similar a lo que sucedió con cianuro (Figura 8.8 morado). Por otro lado, en el grupo con HP70 los compuestos no modificaron los

niveles de actividad de MDH en el medio extramitocondrial con respecto al basal (rojo). A pesar de la variación en los datos, estos compuestos tienen diferentes efectos sobre la liberación de MDH dependiendo del grupo metabólico que se analiza.



**Figura 8.8 Porcentaje de actividad de MDH en el medio extramitocondrial de mitocondrias incubadas en presencia de agentes químicos que afectan a la cadena transportadora de electrones.** 1 mg de mitocondrias aisladas del hígado de ratas intactas, control (laparotomía) o con HP70 fueron incubadas en 3 mL de medio, durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) bajo las condiciones que se indican en la leyenda. 1 (rojo): Mitocondrias sin estímulo. 2 (amarillo): Mitocondrias en el medio de incubación con sustratos oxidables: glutamato/malato/succinato. 3 (azul): Mitocondrias en el medio de incubación con sustratos oxidables y ADP (condiciones fosforilantes). 4 (verde): Mitocondrias en medio bajo condiciones fosforilantes y rotenona. 5 (morado): Mitocondrias en medio bajo condiciones fosforilantes y cianuro. 6 (café): Mitocondrias en medio bajo condiciones fosforilantes y CCCP. El 100% de MDH se refiere a la suma de la actividad enzimática en la fracción mitocondrial y en el medio extramitocondrial. Se muestra la distribución de la actividad de MDH en la fracción extramitocondrial del ensayo, como porcentaje del total. La actividad de MDH en el medio extramitocondrial es afectada de diferente manera dependiendo de su origen. En las mitocondrias de ratas intactas se observa que la presencia de sustratos oxidables en el medio promueve el aumento de la actividad de MDH extramitocondrial, independientemente del uso de inhibidores o del desacoplante de la CTE. En el grupo control se encontraron niveles similares a los basales en todas las condiciones en las que había ADP en el medio. La sola presencia de sustratos oxidables aumenta la actividad extramitocondrial de MDH. Finalmente, en las mitocondrias de ratas con HP70 sólo se observó un aumento en la actividad extramitocondrial de MDH en condiciones fosforilantes e inhibición del CI de la CTE. Los números en la leyenda hacen referencia a las condiciones de incubación. \*  $p < 0.05$ , #  $p < 0.1$  los números en la gráfica indican con cuál de los tratamientos se realizó la comparación.



**Figura 8.9 Porcentaje de actividad de MDH en el medio extramitocondrial de mitocondrias incubadas en condiciones oxidantes y antioxidantes.** 1 mg de mitocondrias aisladas del hígado de ratas intactas, control (laparotomía) o con HP70 fueron incubadas en 3 mL de medio, durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) bajo las condiciones que se indican en la leyenda. 1 (rojo): Mitocondrias sin estímulo. 3 (azul): Mitocondrias en el medio de incubación con sustratos oxidables y ADP (condiciones fosforilantes). 7 (rosa claro): Mitocondrias en medio bajo condiciones fosforilantes y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 8 (magenta): Mitocondrias en medio bajo condiciones fosforilantes y manitol. 9 (rosa): Mitocondrias en medio bajo condiciones fosforilantes y BHT. El 100% de MDH se refiere a la suma de la actividad enzimática en la fracción mitocondrial y en el medio extramitocondrial. Se muestra la distribución de la actividad de MDH en la fracción extramitocondrial del ensayo, como porcentaje del total. La incubación de mitocondrias de ratas intactas con los oxidantes y antioxidantes incrementó la actividad de MDH en el medio extramitocondrial. En el grupo control, el manitol provocó que la actividad de MDH disminuyera con respecto a las condiciones fosforilantes. En el grupo con HP70 la actividad extramitocondrial de MDH no se vio afectada por los tratamientos. Los números en la leyenda hacen referencia a las condiciones de incubación. \* p<0.05, # p<0.1 Los números en la gráfica indican con cuál de los tratamientos se realizó la comparación.

### Aspartato Aminotransferasa (AST)

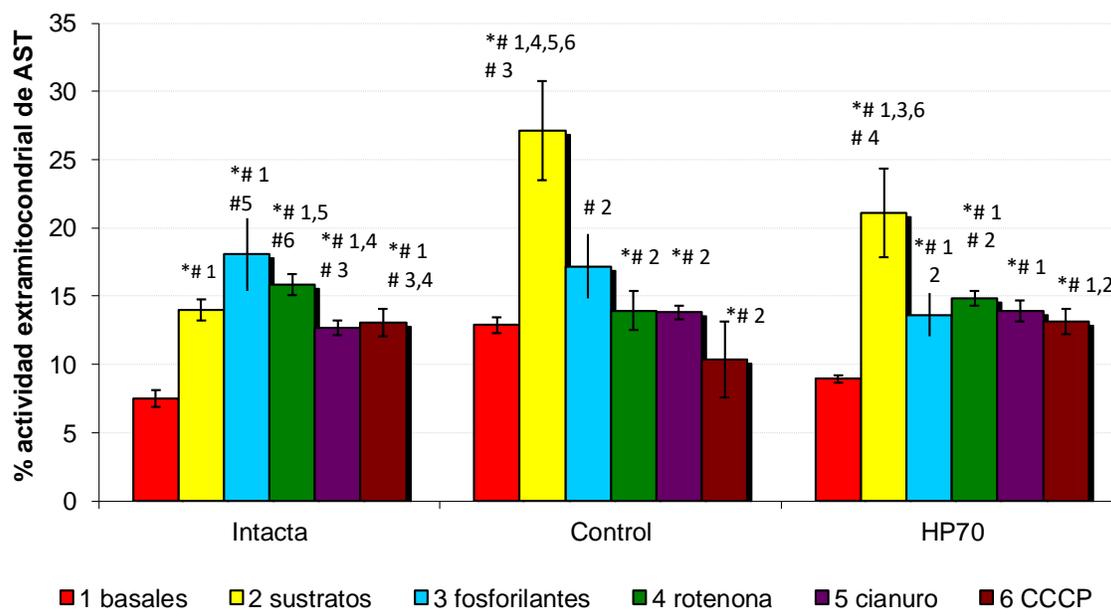
La Figura 8.10 muestra los porcentajes de actividad obtenidos para AST. Esta enzima transfiere un grupo amino desde el L-aspartato al 2-oxoglutarato formando L-glutamato y oxalacetato. La presencia de sustratos para el CI y CII de la CTE promovió la liberación de AST de las mitocondrias de ratas intactas al medio, por encima del basal, alcanzando el porcentaje máximo en condiciones fosforilantes independientemente de si se utilizan el CI y CII de la CTE (azul) o se inhibe el CI con rotenona (verde). Usando cianuro (morado) o CCCP (café) la actividad extramitocondrial de AST disminuye a los niveles de la incubación con sustratos (amarillo) pero continúa siendo mayor a la actividad basal (rojo). Estos datos sugieren que, en

las mitocondrias de ratas intactas, se requiere que el ADP sea fosforilado para que AST sea liberada al medio, pero también existen otros factores del metabolismo mitocondrial que requieren de los sustratos oxidables y ADP que provocan que AST sea liberada al medio.

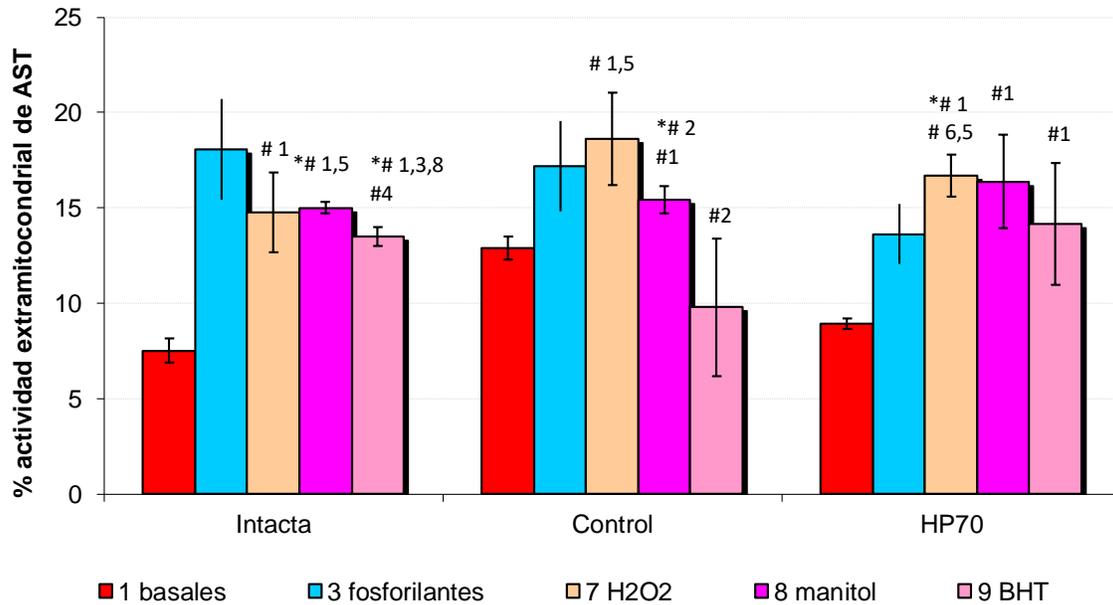
En el grupo control los porcentajes de actividad extramitocondrial de AST fueron muy semejantes a los basales (Figura 8.10, control) al utilizar los inhibidores de la CTE y el desacoplante. El máximo porcentaje de actividad extramitocondrial de AST se observó al incubar las mitocondrias con los sustratos oxidables (amarillo). El porcentaje de actividad extramitocondrial de AST disminuyó hasta los niveles del basal en presencia de ADP independientemente de que se inhibiera el CI con rotenona (verde) o el CIV con cianuro (morado) de la CTE, o de que se disipara el gradiente electroquímico con CCCP (café). La salida de AST al medio extramitocondrial depende de que la mitocondria esté energizada. Al parecer otros factores del metabolismo mitocondrial, independientes de la fosforilación oxidativa regulan la liberación de AST al medio extramitocondrial y requieren de la presencia de los sustratos oxidables.

Los porcentajes de la actividad extramitocondrial de AST en las ratas con HP70 siguieron la misma tendencia que en el grupo control (Figura 8.10, HP70). La actividad fue máxima en presencia de sustratos oxidables (amarillo) y disminuyó en todas las condiciones en las que se incubaron las mitocondrias con ADP. No hubo diferencias si se utilizaban el CI y CII de la CTE (azul), si se utilizó rotenona (verde), si se inhibió el CIV con cianuro (morado) o si se utilizó el desacoplante CCCP (café). Sin embargo, a diferencia del grupo control, en todas las condiciones ensayadas el porcentaje extramitocondrial de AST fue mayor que el basal. La activación del metabolismo mitocondrial parece ser responsable de la liberación de AST al medio extramitocondrial.

En los tres grupos, los tratamientos con antioxidantes y el oxidante promovieron la liberación de AST al medio por encima del basal (Figura 8.11). En el grupo intacto, BHT (rosa) disminuyó la actividad de AST en el medio con respecto a las condiciones fosforilantes sin (azul) y con inhibición del CI de la CTE con rotenona (Figura 8.10, verde). A su vez, el manitol (magenta) incrementó la actividad extramitocondrial de AST en el grupo intacto con respecto a la condición con cianuro (Figura 8.10, morado). Mientras tanto, en los grupos control y con HP70, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el manitol incrementaron los porcentajes de actividad extramitocondrial de AST con respecto al basal (rojo). Asimismo, en la incubación con peróxido de hidrógeno (rosa claro), la actividad extramitocondrial de AST es mayor con respecto al tratamiento con cianuro (morado), pero no respecto a las condiciones fosforilantes (azul y verde).



**Figura 8.10 Porcentaje de actividad de AST en el medio extramitocondrial de mitocondrias incubadas en presencia de agentes químicos que afectan a la cadena transportadora de electrones.** 1 mg de mitocondrias aisladas del hígado de ratas intactas, control (laparotomía) o con HP70 fueron incubadas en 3 mL de medio, durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) bajo las condiciones que se indican en la leyenda. 1 (rojo): Mitocondrias sin estímulo. 2 (amarillo): Mitocondrias en el medio de incubación con sustratos oxidables: glutamato/malato/succinato. 3 (azul): Mitocondrias en el medio de incubación con sustratos oxidables y ADP (condiciones fosforilantes). 4 (verde): Mitocondrias en medio bajo condiciones fosforilantes y rotenona. 5 (morado): Mitocondrias en medio bajo condiciones fosforilantes y cianuro. 6 (café): Mitocondrias en medio bajo condiciones fosforilantes y CCCP. El 100% de AST se refiere a la suma de la actividad enzimática en la fracción mitocondrial y en el medio extramitocondrial. Se muestra la distribución de la actividad de AST en la fracción extramitocondrial del ensayo, como porcentaje del total. La actividad de AST en el medio extramitocondrial es afectada de diferente manera dependiendo de su origen. En las mitocondrias de las ratas intactas la actividad extramitocondrial de AST en el medio aumenta en condiciones fosforilantes (azul) y disminuye cuando se agregan inhibidores que afectan el flujo de electrones hacia la fosforilación de ADP (cianuro y CCCP). En cambio, la actividad extramitocondrial de AST en las mitocondrias de ratas de los grupos control y con HP70 aumenta principalmente por la presencia de sustratos oxidables y disminuye en presencia de ADP. Los números en la leyenda hacen referencia a las condiciones de incubación. \*  $p < 0.05$ , #  $p < 0.1$  los números en la gráfica indican con cuál de los tratamientos se realizó la comparación.



**Figura 8.11 Porcentaje de actividad de AST en el medio extramitocondrial de mitocondrias incubadas en condiciones oxidantes y antioxidantes.** 1 mg de mitocondrias aisladas del hígado de ratas intactas, control (laparotomía) o con HP70 fueron incubadas en 3 mL de medio, durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) bajo las condiciones que se indican en la leyenda. 1 (rojo): Mitocondrias sin estímulo. 3 (azul): Mitocondrias en el medio de incubación con sustratos oxidables y ADP (condiciones fosforilantes). 7 (rosa claro): Mitocondrias en medio bajo condiciones fosforilantes y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 8 (magenta): Mitocondrias en medio bajo condiciones fosforilantes y manitol. 9 (rosa): Mitocondrias en medio bajo condiciones fosforilantes y BHT. El 100% de AST se refiere a la suma de la actividad enzimática en la fracción mitocondrial y en el medio extramitocondrial. Se muestra la distribución de la actividad de AST en la fracción extramitocondrial del ensayo, como porcentaje del total. La actividad extramitocondrial de AST fue mayor que la actividad basal en las mitocondrias del grupo intacto con peróxido de hidrógeno (rosa claro), manitol (magenta) y BHT (rosa). Sólo el BHT disminuyó la actividad extramitocondrial de AST con respecto a las condiciones fosforilantes. El tratamiento con BHT también disminuyó la actividad extramitocondrial de AST en el grupo control; sin embargo, no sucedió así en el grupo con HP70. Los números en la leyenda hacen referencia a las condiciones de incubación. \* p<0.05, # p<0.1 Los números en la gráfica indican con cuál de los tratamientos se realizó la comparación.

### Efecto del tiempo de incubación sobre la liberación *in vitro* de las enzimas al medio extramitocondrial

Al observar que existe liberación de enzimas de la matriz mitocondrial *in vitro* y que es modulable por agentes químicos, se realizó un estudio temporal de este fenómeno en mitocondrias de hígados de ratas intactas. Se utilizaron las mismas condiciones de incubación que en los ensayos con los agentes químicos: 10 mg de proteínas de mitocondrias intactas fueron

incubadas en 30 mL de medio respiratorio (concentración: 1 mg/3 mL) durante el tiempo indicado en cada ensayo, a temperatura ambiente (20-25 °C) y en agitación. El 100% de la actividad en cada condición se refiere a la suma de la actividad enzimática en la fracción mitocondrial y en el medio extramitocondrial.

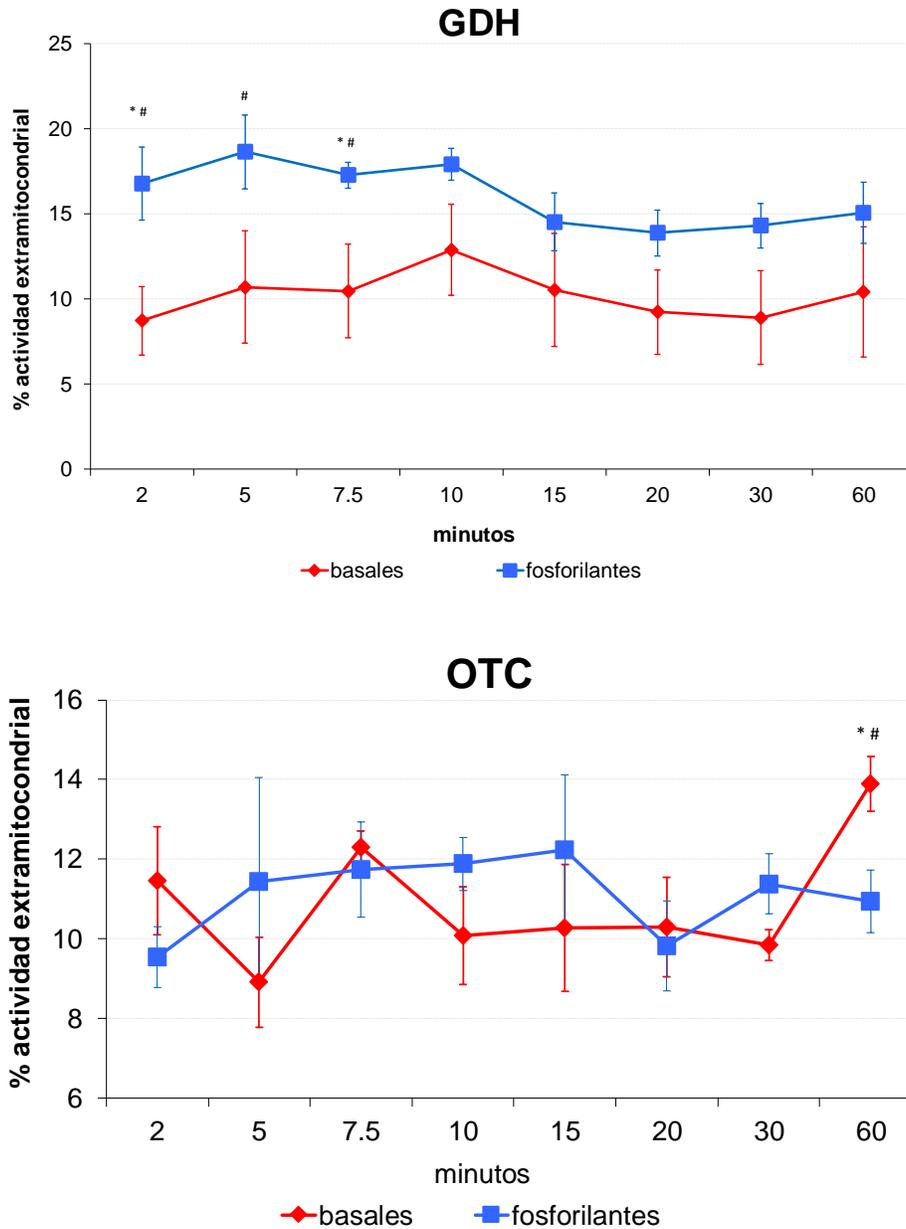
En la Figura 8.12 se muestra el porcentaje de actividad de GDH en el medio extramitocondrial a lo largo del tiempo tanto en condiciones basales (línea roja) como fosforilantes (línea azul). Se encontró actividad de GDH en el medio extramitocondrial desde los 2 minutos de incubación de las mitocondrias tanto en condiciones basales como fosforilantes. Al incubar a las mitocondrias en medio respiratorio (condiciones basales) no hubo cambios en la actividad extramitocondrial de GDH a lo largo del tiempo. En condiciones fosforilantes (medio respiratorio con sustratos y ADP), hubo mayor actividad extramitocondrial de GDH con respecto a las condiciones basales entre los minutos 2 a 7.5 de incubación. Durante los primeros minutos de incubación, el estado energético de las mitocondrias fue importante para la liberación de GDH al medio. A partir de los 20 minutos de incubación el porcentaje de actividad en el medio extramitocondrial disminuyó y fue similar en ambas condiciones. La disminución de la actividad no se debió a degradación o inactivación de la enzima, ya que la actividad total no cambió en los ensayos a través del tiempo (Anexo I, Tablas 8.5 y 8.6). Estos resultados son consistentes con los ensayos de los tratamientos químicos en las ratas intactas (Figura 8.4, barras roja y azul). También los porcentajes fueron similares. Basal: 9.8 (tratamientos) vs 10.5 (tiempo). Fosforilantes: 24.3 (tratamientos) vs 17.3 (tiempo).

La actividad de OTC en el medio extramitocondrial no cambió con el tiempo (Figura 8.12). La salida de la enzima de la matriz mitocondrial en condiciones basales (línea roja) fue muy variable al principio, y se estabilizó desde los 10 hasta los 30 minutos. La única diferencia estadísticamente significativa se observó después de 60 minutos de incubación. En condiciones fosforilantes (línea azul), el porcentaje de actividad de OTC en el medio aumentó gradualmente durante los primeros 10 minutos, donde la diferencia fue significativa con respecto a los primeros 2 minutos de incubación. Al igual que para GDH, la actividad de OTC en el medio extramitocondrial disminuyó después de 20 minutos de incubación, a pesar de que la actividad total en los ensayos se mantuvo a través del tiempo (Anexo I, Tablas 8.5 y 8.6). No hubo diferencias entre los porcentajes de actividad extramitocondrial al comparar la actividad de OTC en el medio de mitocondrias incubadas en condiciones basales (rojo) o fosforilantes (azul); lo cual es consistente con lo observado en la sección de tratamientos con agentes químicos (Figura 8.6, barras roja y azul del grupo intacto). Sin embargo, el proceso de salida de OTC parece ser

diferente para ambas condiciones. La actividad de OTC en el medio aumentó de manera gradual en mitocondrias en condiciones fosforilantes hasta los 10 minutos de incubación; a diferencia de lo observado en condiciones basales, donde la salida no depende del tiempo. Basal: 9.3 (tratamientos) vs. 11.7 (tiempo). Fosforilantes: 9.1 (tratamientos) vs. 12.3 (tiempo).

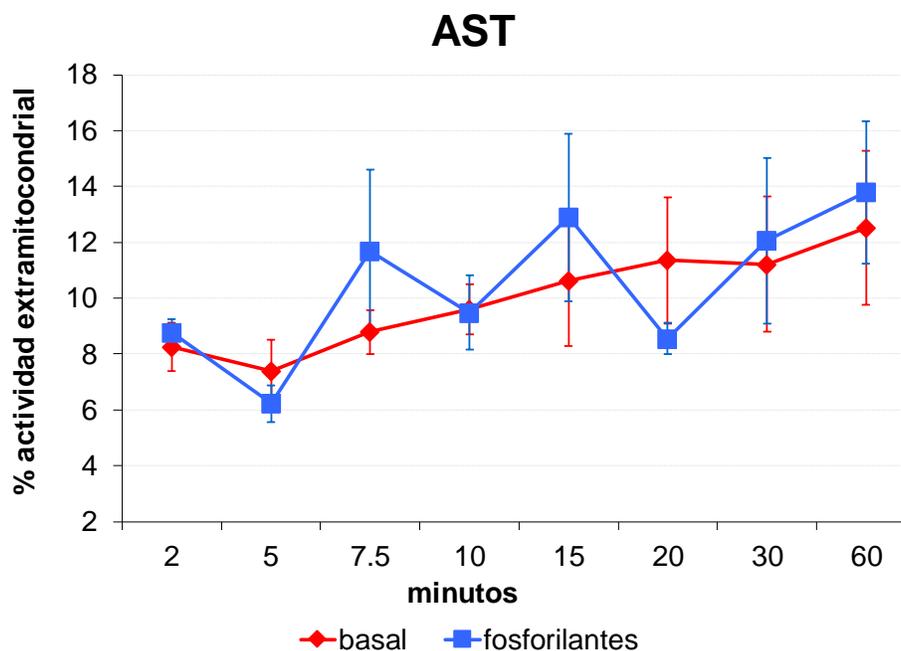
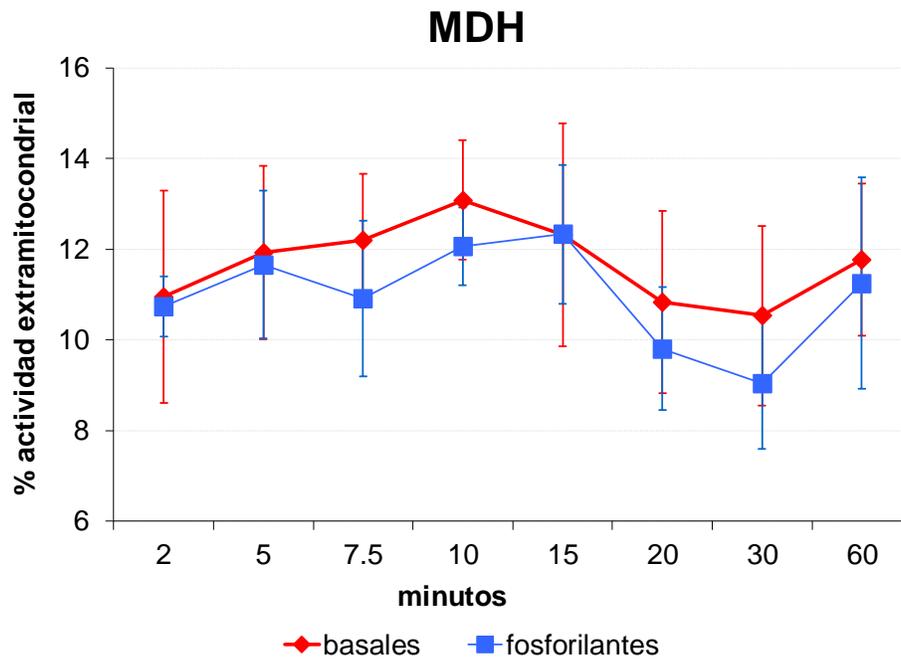
La MDH tuvo un comportamiento distinto al de GDH y OTC. El porcentaje de actividad de MDH en el medio fue similar al incubar a las mitocondrias en condiciones basales (línea roja) o fosforilantes (línea azul), de manera consistente con los resultados obtenidos en la sección con los tratamientos químicos (Figura 8.8, barras roja y azul). Incluso al comparar los porcentajes de actividad extramitocondrial, en ambos casos fueron muy cercanos. Basal: 11.2 (tratamientos) vs 12.2 (tiempo). Fosforilantes: 11.3 (tratamientos) vs 10.9 (tiempo). Se observó una tendencia de aumento del porcentaje de actividad de MDH en el medio extramitocondrial que fue desde 2 hasta 10 minutos de incubación y disminuyó a partir de 20 minutos de incubación; sin embargo, no hubo cambios significativos a lo largo del tiempo en ninguna de las dos condiciones. Por lo tanto, la salida de MDH desde la matriz mitocondrial no fue afectada por el tiempo de incubación ni el estado energético de la mitocondria.

La actividad de AST en el medio no cambió con el tiempo al incubar a las mitocondrias en condiciones basales (Figura 8.13, línea roja). Se observó una tendencia donde el porcentaje aumentó de manera gradual a partir de los 5 minutos y hasta los 60 minutos de la incubación; sin embargo, no hubo diferencia estadísticamente significativa. Por el contrario, al incubar a las mitocondrias en condiciones fosforilantes (línea azul), el porcentaje de actividad extramitocondrial de AST fue mayor a los 10, 15, 20 y 60 minutos de incubación, en comparación con el minuto 5. A simple vista, la liberación de AST en ambas condiciones fue igual; mas como en el caso de OTC, el proceso de salida de AST de la matriz al medio extramitocondrial fue diferente dependiendo de las condiciones de incubación de las mitocondrias. La salida de AST parece ser dependiente del tiempo en condiciones fosforilantes. Los porcentajes de actividad extramitocondrial de AST obtenidos en estos experimentos fueron diferentes a los que se determinaron con los tratamientos químicos. Basal: 7.5 (tratamientos) vs. 8.8 (tiempo). Fosforilantes: 18.1 (tratamientos) vs. 11.7 (tiempo).



**Figura 8.12 Efecto del tiempo de incubación de mitocondrias aisladas de ratas intactas en condiciones basales y fosforilantes, sobre el porcentaje de actividad extramitocondrial de GDH y OTC *in vitro*.** Se incubó en agitación, una suspensión de 1mg de mitocondrias aisladas de hígados de ratas intactas por cada 3mL de medio respiratorio sin (basal-línea roja) o con sustratos y ADP (condiciones fosforilantes-línea azul). Se tomaron 3mL de la suspensión en los tiempos que se indican en las gráficas, y se separaron el botón mitocondrial y el medio por centrifugación. El 100% de GDH u OTC se refiere a la suma de la actividad enzimática en la fracción mitocondrial y en el medio extramitocondrial. Se muestra la distribución de la actividad de las enzimas en la fracción extramitocondrial del ensayo, como porcentaje del total en cada uno de los tiempos de muestreo. La actividad extramitocondrial de GDH es mayor en condiciones fosforilantes que en condiciones basales durante los primeros 10 minutos de la incubación. En el caso de OTC sólo se observa mayor actividad extramitocondrial 60 minutos

después de la incubación en condiciones basales. Por otro lado, en condiciones fosforilantes se observa un incremento gradual de la actividad extramitocondrial de OTC hasta los primeros 10 minutos. Sin embargo, no hubo diferencias entre las condiciones de incubación. La actividad extramitocondrial de ambas enzimas disminuye después de 20 minutos de incubación sin que la actividad total se viera afectada (ver el texto). Los resultados corresponden a cuatro determinaciones independientes. \*  $p < 0.05$ , #  $p < 0.1$  al comparar las actividades de las enzimas en condiciones basales y fosforilantes en el mismo tiempo de muestreo.



**Figura 8.13 Efecto del tiempo de incubación de mitocondrias aisladas de ratas intactas en condiciones basales y fosforilantes, sobre el porcentaje de actividad extramitocondrial de MDH y AST *in vitro*.** Se incubó en agitación, una suspensión de 1mg de mitocondrias de hígados de ratas intactas por cada 3mL de medio respiratorio sin (basal-línea roja) o con sustratos y ADP (condiciones fosforilantes-línea azul). Se tomaron 3mL de la suspensión en los tiempos que se indican en las gráficas, y se separaron el botón mitocondrial y el medio por centrifugación. El 100% de MDH o AST se refiere a la suma de la actividad enzimática en la fracción mitocondrial y en el medio extramitocondrial. Se muestra la distribución de la actividad de las enzimas en la fracción extramitocondrial del ensayo, como porcentaje del total en cada uno de los tiempos de muestreo. La actividad extramitocondrial de MDH no cambió con el estado energético de las mitocondrias, ni el tiempo. Se observó una disminución del porcentaje de actividad de MDH en el medio a partir de los 20 minutos de incubación, a pesar de que no cambió la actividad total en la muestra (ver el texto). Por otra parte, en condiciones fosforilantes se observa un incremento gradual de la actividad extramitocondrial de AST con respecto a los 5 minutos de incubación, siendo estadísticamente diferente a los minutos 10, 15, 20 y 60. No hubo diferencia significativa entre las condiciones basal y fosforilantes a lo largo de la incubación. No se observó que el porcentaje de actividad extramitocondrial de AST disminuyera a los 20 minutos de incubación como en el caso de las otras enzimas. Los resultados corresponden a cuatro determinaciones independientes. \*  $p < 0.05$ , #  $p < 0.1$  al comparar las actividades de las enzimas en condiciones basales y fosforilantes en el mismo tiempo de muestreo.

La actividad extramitocondrial de OTC y AST en condiciones fosforilantes parece ser dependiente del tiempo de incubación de las mitocondrias, a diferencia de lo que se observó con GDH y MDH. A pesar de que GDH es la enzima de mayor peso molecular se encontró actividad extramitocondrial a partir de los 2 minutos de incubación. La liberación de GDH parece depender más del estado energético de las mitocondrias que del tiempo. En cambio, la salida de MDH que es la enzima más pequeña del estudio, es independiente del tiempo y del estado energético de la mitocondria. Finalmente, las observaciones no parecen deberse a que las mitocondrias se encuentren dañadas ya que de ser así se observaría un aumento en la actividad extramitocondrial de todas las enzimas en los últimos tiempos de incubación. En cambio, lo que se observa es una disminución del porcentaje de actividad extramitocondrial a los 20 minutos de incubación en todas las enzimas, a pesar de que la actividad total (suma de las actividades en la fracción mitocondrial y en el medio extramitocondrial) no cambia (Anexo I, Tablas 8.5 y 8.6).

### **Efecto de la temperatura de incubación sobre la liberación *in vitro* de las enzimas al medio extramitocondrial**

Controlando la temperatura de incubación en los ensayos es posible modular la fluidez de la membrana mitocondrial, sin que sea necesario modificar su composición. Considerando los resultados obtenidos en la curva temporal y los ensayos con los tratamientos químicos, se

incubaron las mitocondrias (1 mg de proteína por cada 3 mL de medio) durante 10 minutos y en agitación, para realizar estos ensayos.

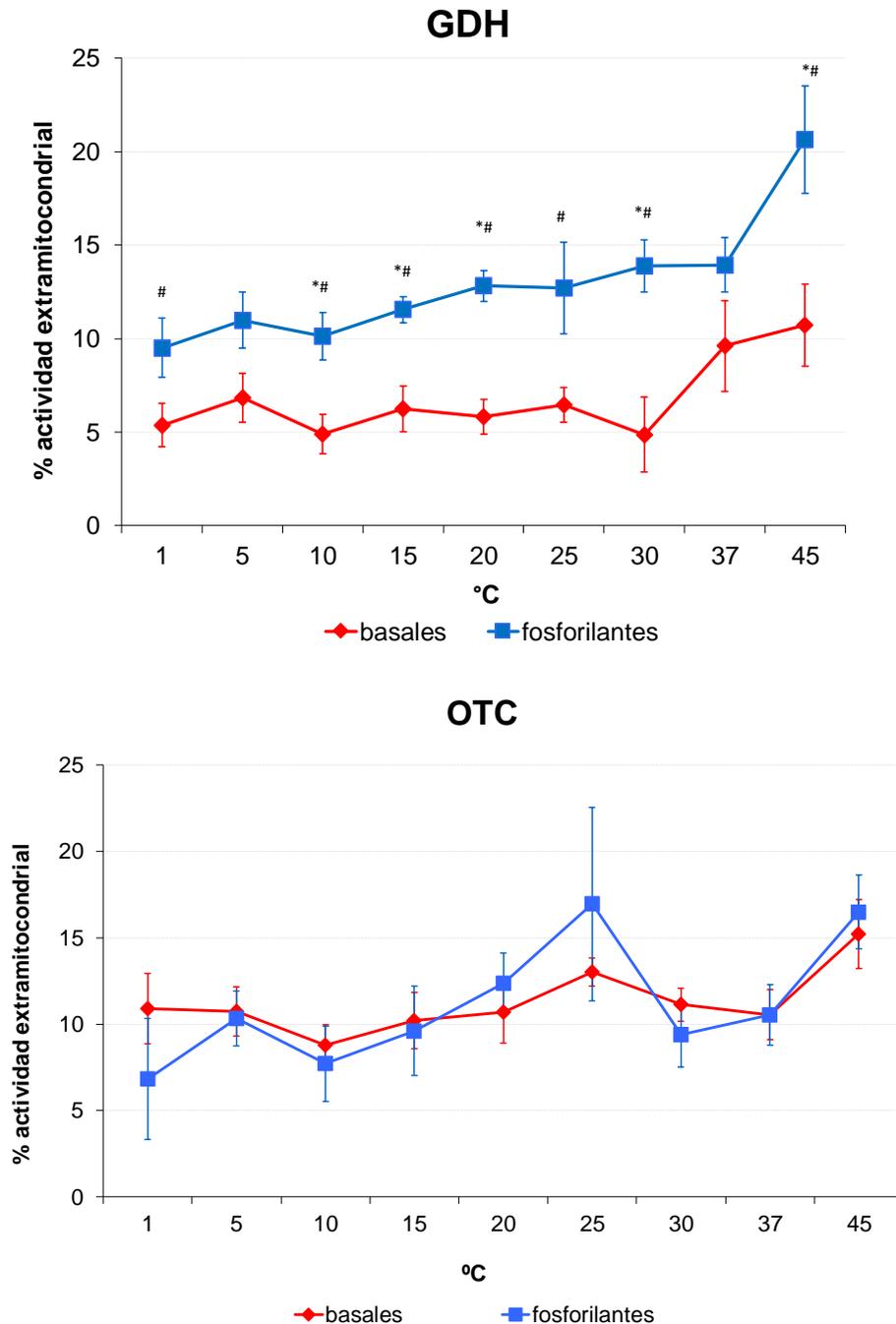
En condiciones basales (línea roja), la liberación de GDH de la matriz mitocondrial ocurrió de manera independiente de la temperatura. Sólo se observó un aumento de la actividad extramitocondrial de GDH en las incubaciones a 37 y 45°C (Figura 8.14). Por otra parte, al energizar a las mitocondrias (línea azul), la actividad extramitocondrial de GDH fue mayor con respecto a las condiciones basales desde temperaturas bajas. Además, entre 10 y 37 °C se observó un incremento gradual en la actividad extramitocondrial de GDH, y posteriormente una elevación abrupta al incubar a las mitocondrias a 45 °C (al igual que en las condiciones basales). Los porcentajes fueron menores a los que se encontraron en los experimentos de tiempo. Basal: 12.9 (tiempo) vs. 6.5% (temperatura) y fosforilantes: 17.9 (tiempo) vs. 12.7% (temperatura); sin embargo, las proporciones se mantuvieron. Lo anterior sugiere que la liberación de GDH al medio es un proceso dependiente de la temperatura de incubación sólo en mitocondrias incubadas en condiciones fosforilantes.

El porcentaje de actividad extramitocondrial de OTC (Figura 8.14) fue similar al incubar a las mitocondrias en condiciones fosforilantes (línea azul) o basales (línea roja). En condiciones basales, la actividad extramitocondrial de OTC se mantiene en porcentajes similares en todas las temperaturas, excepto a los 45 °C donde aumenta de manera abrupta. En cambio, en condiciones fosforilantes, el porcentaje de la actividad extramitocondrial de OTC tiende a aumentar de manera dependiente de la temperatura al incubar a las mitocondrias entre 10 y 25 °C, aunque no se encontraron diferencias significativas con el basal. También en estas condiciones hubo un aumento abrupto de la actividad extramitocondrial de OTC a los 45 °C de incubación. Al igual que en los ensayos anteriores (tratamientos y tiempo), la actividad extramitocondrial de OTC no depende del estado energético de las mitocondrias en ratas intactas. Basal: 10 (tiempo) vs. 13% (temperatura) y fosforilantes: 12 (tiempo) vs. 17% (temperatura).

La salida de MDH de la matriz mitocondrial es independiente de la temperatura de incubación por debajo de los 20 °C (Figura 8.15). A partir de los 25 °C se observa un incremento gradual en el porcentaje de actividad extramitocondrial de MDH tanto en condiciones basales (línea roja) como fosforilantes (línea azul). Este incremento es significativo a los 45 °C con respecto a la temperatura de 25 °C en ambas condiciones. De manera consistente con los resultados obtenidos en los ensayos de tiempo y tratamientos, la salida de MDH no dependió del estado energético de las mitocondrias. Basal: 12.1 (tiempo) vs. 8.8% (temperatura). Fosforilantes: 13.1 (tiempo) vs. 10.3% (temperatura).

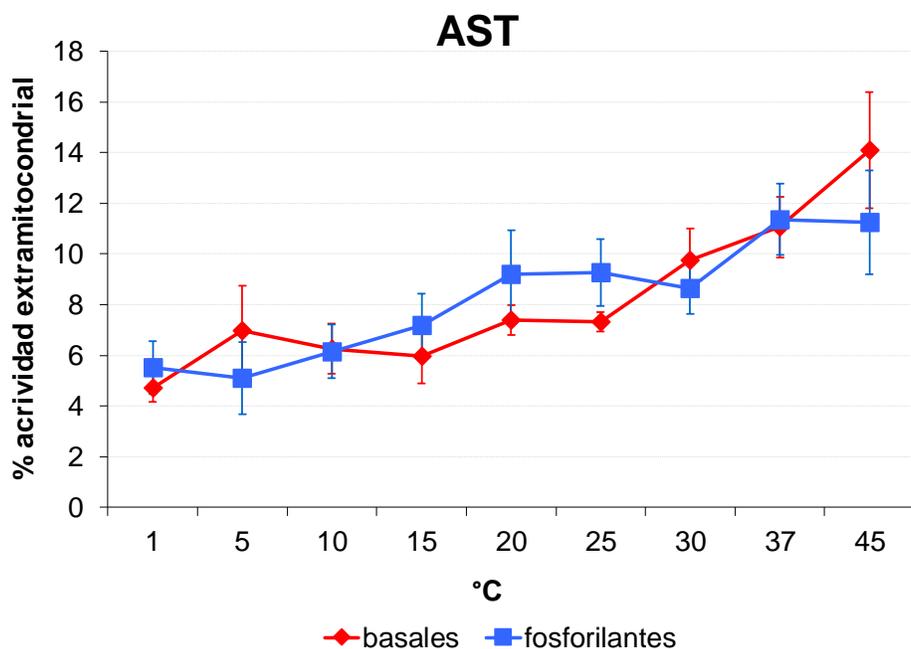
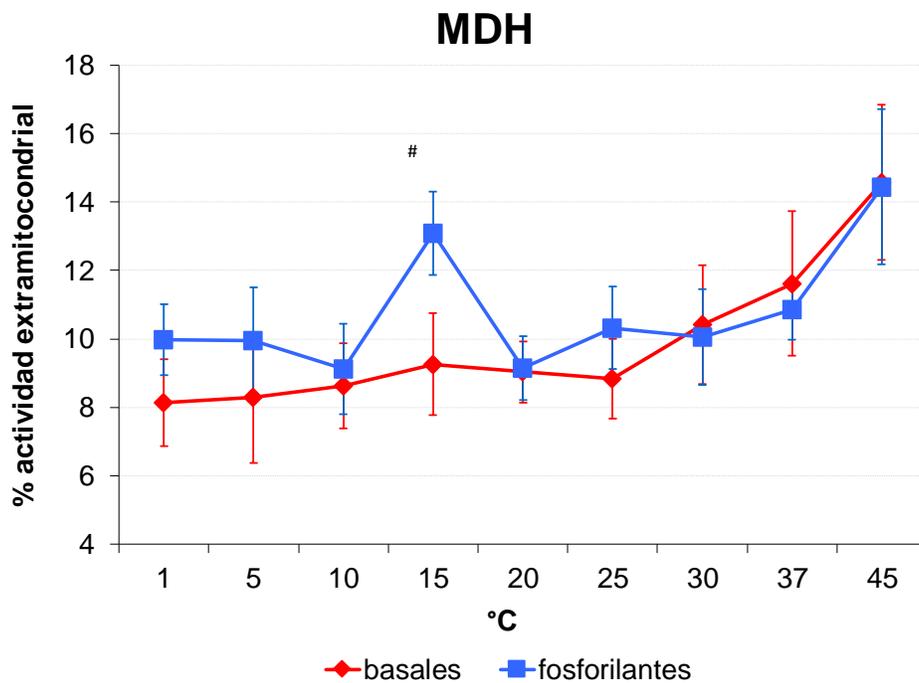
Al igual que para la enzima MDH, la actividad extramitocondrial de AST no se afectó a temperaturas bajas (Figura 8.15). Tanto en condiciones basales (línea roja) como en condiciones fosforilantes (línea azul), el porcentaje de actividad extramitocondrial de AST aumentó de manera gradual desde 15 hasta 25 °C. En cambio, a partir de 30 y hasta 45 °C, la actividad extramitocondrial aumentó de manera abrupta, aunque los porcentajes de actividad en ambas condiciones fueron muy similares. Sólo hubo una diferencia significativa a los 45 °C con respecto a las temperaturas bajas en condiciones basales. Tal como se observó en los ensayos de tiempo, y contrario a la observación bajo los tratamientos, parece que la actividad extramitocondrial de AST no depende del estado energético de las mitocondrias. Basal: 9.5 (tiempo) vs. 7.5% (temperatura). Fosforilantes: 9.5 (tiempo) vs. 9.5 (temperatura).

Estos experimentos sugieren que la liberación de las enzimas de la matriz mitocondrial al medio es un fenómeno que es afectado por la fluidez y la integridad de las membranas mitocondriales. A temperaturas de incubación menores de 15 °C, la actividad extramitocondrial de GDH, MDH y AST no se modificó. Pero al incubar a las mitocondrias a partir de 20-25 °C la actividad extramitocondrial tendió a aumentar de manera gradual. Este aumento se observó para GDH en condiciones fosforilantes (Figura 8.14, línea azul); y para MDH y AST fue independiente del estado energético de las mitocondrias ya que se observó tanto en condiciones basales como fosforilantes (Figura 8.15). El caso de OTC fue distinto, ya que la actividad extramitocondrial tendió a aumentar desde los 10 hasta los 25 °C, pero sin ser significativo. Este efecto no parece deberse al tamaño de OTC ya que MDH y AST tienen un tamaño molecular menor y la salida se observó a temperaturas más altas (Figura 8.15).



**Figura 8.14** Efecto de la temperatura de incubación de mitocondrias aisladas de ratas intactas en condiciones basales y fosforilantes, sobre el porcentaje de actividad extramitocondrial de GDH y OTC *in vitro*. Se incubó a la temperatura indicada en la gráfica en agitación, una suspensión de 1 mg de mitocondrias de hígados de ratas intactas en 3 mL de medio respiratorio sin (basal-línea roja) o con sustratos y ADP (condiciones fosforilantes-línea azul). Después de 10 minutos de incubación, se separaron el botón mitocondrial y el medio por centrifugación. El 100% de GDH y OTC se refiere a la suma de la actividad enzimática en la fracción mitocondrial y en el medio extramitocondrial. Se muestra la distribución de la actividad de las enzimas en la fracción extramitocondrial del ensayo, como porcentaje del total en cada una

de las temperaturas de incubación. La actividad extramitocondrial de GDH aumentó de manera dependiente de la temperatura bajo condiciones fosforilantes (línea azul) a partir de los 10 °C. En cambio, la actividad extramitocondrial de OTC no se vio afectada por la temperatura en condiciones basales. Se observó un aumento gradual de la actividad extramitocondrial de OTC entre 10 y 25 °C, ni por el estado energético de las mitocondrias en ratas intactas. Los resultados corresponden a cuatro determinaciones independientes. \*  $p < 0.05$ , #  $p < 0.1$  al comparar las actividades de las enzimas en condiciones basales y fosforilantes en la misma temperatura de incubación.



**Figura 8.15 Efecto de la temperatura de incubación de mitocondrias aisladas de ratas intactas en condiciones basales y fosforilantes, sobre el porcentaje de actividad extramitocondrial de MDH y AST *in vitro*.** Se incubó a la temperatura indicada en la gráfica en agitación, una suspensión de 1 mg de mitocondrias de hígados de ratas intactas en 3 mL de medio respiratorio sin (basal-línea roja) o con sustratos y ADP (condiciones fosforilantes-línea azul). Después de 10 minutos de incubación, se separaron el botón mitocondrial y el medio por centrifugación. El 100% de MDH y AST se refiere a la suma de la actividad enzimática en la fracción mitocondrial y en el medio extramitocondrial. Se muestra la distribución de la actividad de las enzimas en la fracción extramitocondrial del ensayo, como porcentaje del total en cada una de las temperaturas de incubación. La actividad extramitocondrial de MDH y AST es similar tanto en condiciones basales (línea roja) como en condiciones fosforilantes (línea azul) en todas las temperaturas que se probaron. La actividad extramitocondrial de MDH aumentó únicamente entre 30 y 45 °C. En el caso de AST, se observó un aumento gradual desde 10 a 25 °C, y aumentó abruptamente entre 30 y 45 °C. Los resultados corresponden a cuatro determinaciones independientes. \*  $p < 0.05$ , #  $p < 0.1$  al comparar las actividades de las enzimas en condiciones basales y fosforilantes en la misma temperatura de incubación.

#### **Efecto de la concentración de mitocondrias sobre la liberación *in vitro* de las enzimas al medio extramitocondrial**

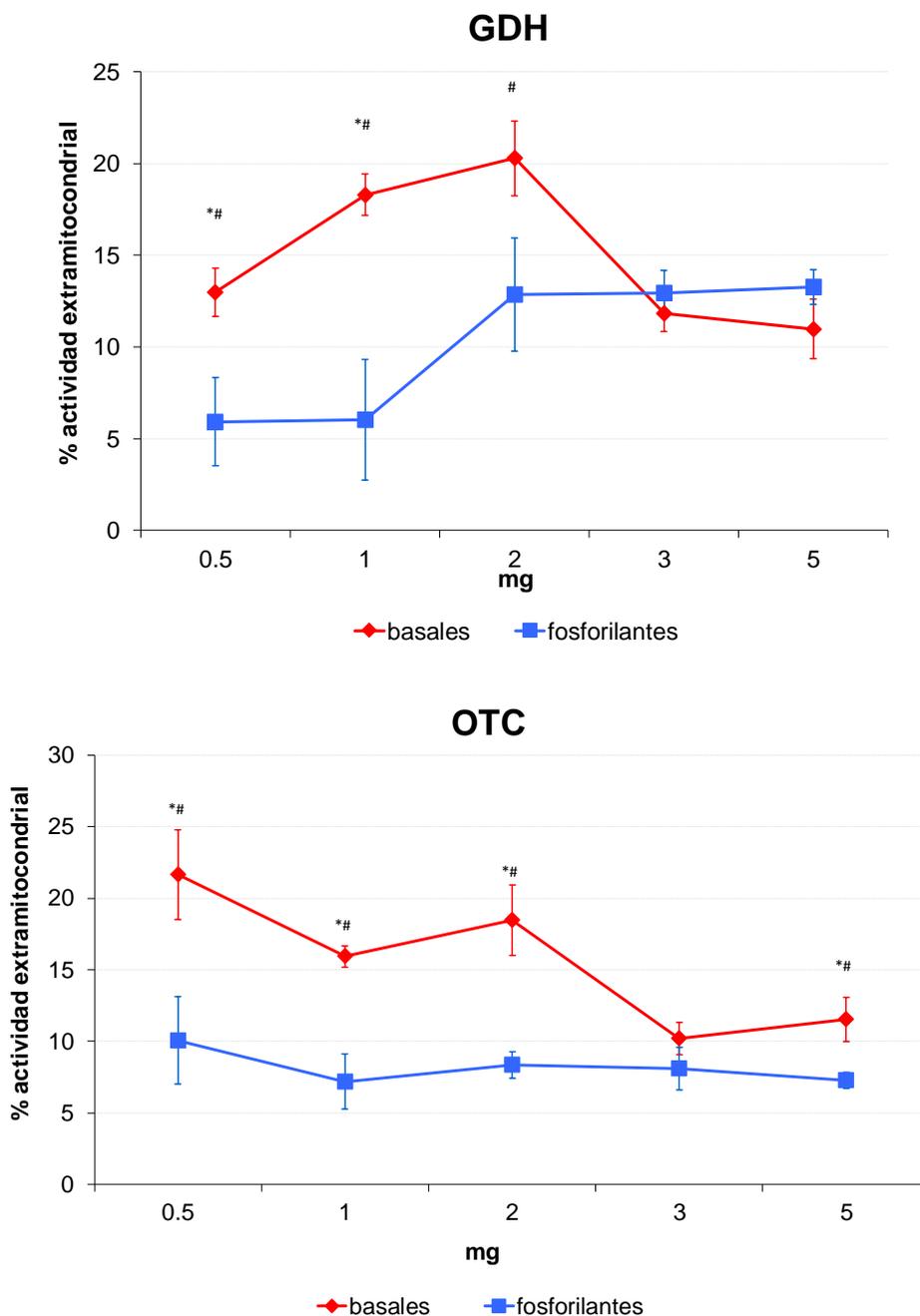
Finalmente se midió la actividad extramitocondrial de las cuatro enzimas (GDH, OTC, MDH y AST) al utilizar diferentes cantidades de mitocondrias en los ensayos *in vitro*. Al incubar a las mitocondrias en diferentes temperaturas (Figuras 8.14 y 8.15) se observó un efecto sobre el porcentaje de actividad extramitocondrial de las cuatro enzimas estudiadas. Por otra parte, en los ensayos temporales (Figuras 8.12 y 8.13) se observó que la actividad extramitocondrial disminuye después de 20 minutos de incubación a pesar de que la actividad total de las enzimas en el ensayo se mantiene. Tanto la temperatura como el tiempo de incubación podrían estar modificando las interacciones entre las membranas mitocondriales y esto a su vez, afectar la distribución de las enzimas estudiadas en la fracción extramitocondrial del ensayo. De tal manera, otra forma de modificar las interacciones entre las membranas mitocondriales es por medio de controlar la cantidad de mitocondrias en el ensayo. Se esperaba que, al haber mayor cantidad de mitocondrias, aumentaría la probabilidad de que hubiera interacciones entre ellas. Asimismo, la probabilidad de interacciones disminuiría usando una menor cantidad de mitocondrias en el ensayo. Estos consistieron en mantener una solución de 3 mL de medio en condiciones basales o fosforilantes a 37 °C durante 10 minutos, e incubar diferentes cantidades de mitocondrias (0.5, 1, 2, 3, o 5 mg de proteína mitocondrial) en agitación constante.

La actividad extramitocondrial de GDH se vio afectada por la cantidad de mitocondrias en el ensayo al utilizar entre 0.5 y 2 mg y posteriormente se mantuvo (Figura 8.16). En condiciones basales se observó un aumento gradual de la actividad extramitocondrial de GDH al incrementar la cantidad de proteína utilizada en el ensayo. Sin embargo, disminuyó de manera significativa al usar 3 mg y se mantuvo con 5 mg (línea roja). En condiciones fosforilantes (línea azul) también se observó un aumento en la actividad extramitocondrial de GDH al incrementar la cantidad de proteína mitocondrial desde 0.5 mg, llegando al máximo en 2 mg y manteniéndose hasta 5 mg. La diferencia entre los porcentajes de actividad extramitocondrial de GDH en condiciones basales y fosforilantes en el intervalo de 0.5 a 2 mg fue significativa, pero al utilizar entre 3 y 5 mg se comportaron igual. Esto no se debió a que hubiera menor actividad o inactivación de GDH, pues las actividades totales (suma de la actividad de GDH en las fracciones mitocondrial y extramitocondrial) aumentaron proporcionalmente a la cantidad de mitocondrias en el ensayo (Anexo I, Tablas 8.9 y 8.10).

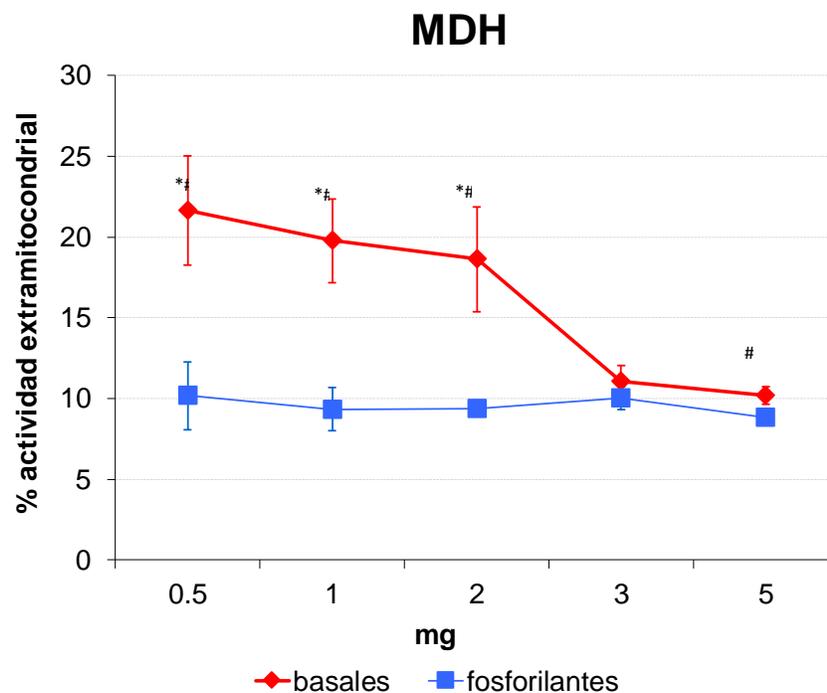
OTC, MDH y AST mostraron el mismo comportamiento al utilizar diferentes cantidades de mitocondrias en los ensayos (Figuras 8.16 y 8.17). En condiciones basales, la actividad extramitocondrial de las tres enzimas fue máxima utilizando 0.5 mg de proteína y disminuyó de manera gradual hasta los 2 mg (línea roja). Al utilizar 3 y 5 mg de proteína mitocondrial la actividad extramitocondrial de las tres enzimas fue independiente de la cantidad de proteína en los ensayos. Por otro lado, en condiciones fosforilantes, la actividad extramitocondrial de OTC, MDH y AST se mantuvo constante, independiente de la cantidad de proteínas en los ensayos y por debajo de las condiciones basales (línea azul). Además, los niveles de actividad extramitocondrial de las tres enzimas fue igual tanto en condiciones basales como fosforilantes al utilizar 3 y 5 mg de proteína mitocondrial, mientras que usando cantidades menores existieron diferencias significativas.

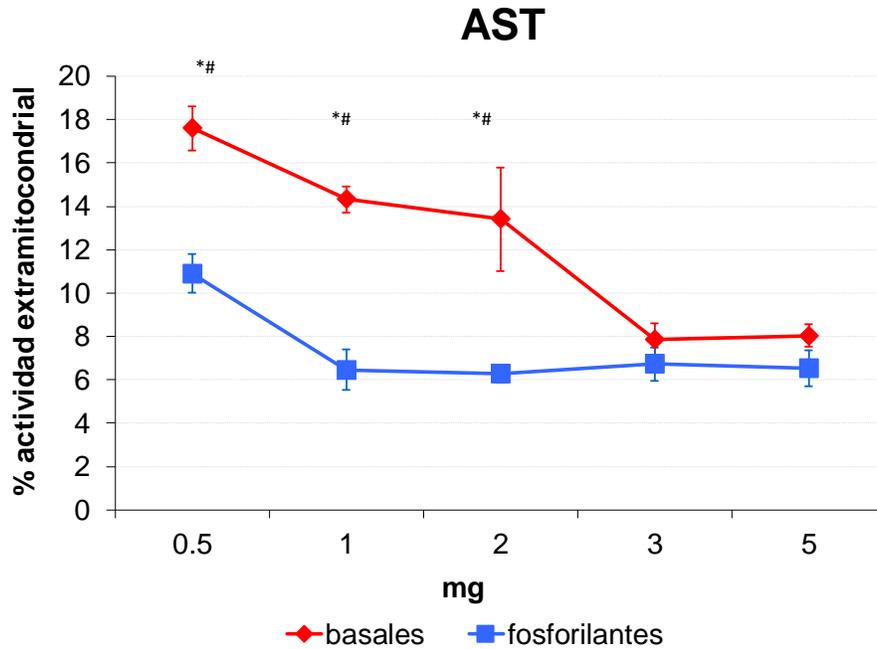
La actividad extramitocondrial de GDH, OTC, MDH y AST fue independiente de la cantidad de mitocondrias en el ensayo a partir de 3 y 5 mg de proteína. Además, ya no se observó diferencia entre las condiciones basales (línea roja) y fosforilantes (línea azul). La disminución de la actividad extramitocondrial de las enzimas no se debió a inactivación o degradación de estas, ya que la actividad total en cada ensayo aumentó de manera proporcional con la cantidad de proteína mitocondrial agregada. En el caso de que las mitocondrias hubieran sufrido algún daño y el contenido hubiera sido liberado al medio, se habría visto un incremento en la actividad extramitocondrial de las enzimas. Sin embargo, la actividad extramitocondrial disminuyó, lo que sugiere que al encontrarse en mayor concentración, las mitocondrias interactúan de manera

diferente a cuando se encuentran en menor densidad, y esto afecta la actividad de las enzimas en el medio. Cabe notar que todos los ensayos anteriores se realizaron con 1 mg de proteína, donde las mitocondrias se comportan de manera diferente en condiciones basales y fosforilantes. Considerando los resultados obtenidos en este trabajo es posible que los cambios en la actividad extramitocondrial de las enzimas estudiadas se deba a que se están modificando las interacciones entre las membranas mitocondriales; sin embargo, es necesario realizar pruebas más específicas para mostrar que realmente se están modificando las interacciones entre las mitocondrias.



**Figura 8.16 Efecto de la concentración de mitocondrias aisladas de ratas intactas al incubarlas en condiciones basales y fosforilantes, sobre el porcentaje de la actividad extramitocondrial de GDH y OTC *in vitro*.** Se colocaron 3 mL de medio respiratorio a 37 °C y en agitación, sin (condiciones basales- línea roja) o con sustratos y ADP (condiciones fosforilantes-línea azul). Se agregaron diferentes cantidades de mitocondrias de ratas intactas como se indica en la gráfica: 0.5, 1, 2, 3 y 5 mg de proteína mitocondrial. Después de 10 minutos de incubación, se separaron el botón mitocondrial y el medio por centrifugación. El 100% de GDH y OTC se refiere a la suma de la actividad enzimática en la fracción mitocondrial y en el medio extramitocondrial. Se muestra la distribución de la actividad de las enzimas en la fracción extramitocondrial del ensayo, como porcentaje del total en cada una de las concentraciones de mitocondrias probadas. La actividad extramitocondrial de GDH aumentó tanto en condiciones basales como fosforilantes al incrementar la cantidad de mitocondrias en el ensayo desde 0.5 a 2 mg. En condiciones basales la actividad desciende con 3 mg y se mantiene con 5 mg, mientras que en condiciones fosforilantes alcanza el porcentaje máximo en 3 mg y se mantiene en 5 mg. Por otra parte, la actividad extramitocondrial de OTC disminuye al incrementar la cantidad de mitocondrias en el ensayo de 0.5 a 2 mg de proteína mitocondrial en condiciones basales (línea roja), y se mantiene hasta los 5 mg. En condiciones fosforilantes (línea azul) la cantidad de mitocondrias en el medio no afecta el porcentaje de actividad extramitocondrial de OTC. Cuando se utilizan 3 y 5 mg de proteína mitocondrial en los ensayos el porcentaje de actividad extramitocondrial de GDH y OTC es muy similar en condiciones basales y fosforilantes. Los resultados corresponden a cinco determinaciones independientes. \*  $p < 0.05$ , #  $p < 0.1$  al comparar las actividades de las enzimas en condiciones basales y fosforilantes utilizando la misma cantidad de mitocondrias por ensayo.





**Figura 8.17 Efecto de la concentración de mitocondrias aisladas de ratas intactas al incubarlas en condiciones basales y fosforilantes, sobre el porcentaje de la actividad extramitocondrial de MDH y AST.** Se colocaron 3 mL de medio respiratorio a 37 °C y en agitación, sin (condiciones basales- línea roja) o con sustratos y ADP (condiciones fosforilantes- línea azul). Se agregaron diferentes cantidades de mitocondrias de ratas intactas como se indica en la gráfica: 0.5, 1, 2, 3 y 5 mg de proteína mitocondrial. Después de 10 minutos de incubación, se separaron el botón mitocondrial y el medio por centrifugación. El 100% de MDH y AST se refiere a la suma de la actividad enzimática en la fracción mitocondrial y en el medio extramitocondrial. Se muestra la distribución de la actividad de las enzimas en la fracción extramitocondrial del ensayo, como porcentaje del total en cada una de las concentraciones de mitocondrias probadas. En condiciones basales la actividad extramitocondrial de MDH y AST disminuye al aumentar la cantidad de mitocondrias en el ensayo, desde 0.5 hasta 3 mg y se mantiene con 5 mg de proteína mitocondrial. En condiciones fosforilantes (línea azul) la actividad extramitocondrial de MDH y AST se mantienen constantes independientemente de la cantidad de mitocondrias presentes en el ensayo. Los resultados corresponden a cinco determinaciones independientes. \*  $p < 0.05$ , #  $p < 0.1$  al comparar las actividades de las enzimas en condiciones basales y fosforilantes utilizando la misma cantidad de mitocondrias por ensayo.

## IX. DISCUSIÓN

En estudios previos realizados en el laboratorio del Dr. Hernández Muñoz se encontró que el fenómeno de liberación de enzimas del hígado en regeneración ocurre en modelos *in vitro* y es parcialmente independiente de factores extrahepáticos. Por otra parte, Greco y colaboradores (1998) observaron que las mitocondrias hepáticas aisladas 24h post-HP, poseen la capacidad de liberar enzimas de la matriz al medio extramitocondrial *in vitro*, y esta capacidad puede ser inhibida por ciclosporina A. Bajo nuestras condiciones de estudio también se encontró que ocurre liberación de enzimas de la matriz en mitocondrias hepáticas aisladas. Este fenómeno puede ser modificado *in vitro* con sustratos e inhibidores de la cadena transportadora de electrones, así como por la adición de antioxidantes y oxidantes al medio. Esto sugiere que la liberación de enzimas de la matriz mitocondrial al exterior es un proceso controlado por mecanismos aún desconocidos de las mitocondrias, parcialmente independientes de factores extrahepáticos y de las interacciones intercelulares presentes en el tejido. Con el propósito de conocer los mecanismos que regulan la liberación de enzimas desde la matriz mitocondrial, se calcularon las actividades de GDH, OTC, MDH y AST como porcentaje de actividad en el medio extramitocondrial con respecto al total (mitocondria más medio) de cada ensayo.

La manipulación previa de las ratas afecta la liberación de las enzimas *in vitro*. A pesar de que tanto en el grupo de ratas intactas como en el grupo control el hígado no sufre daño, la liberación de enzimas de la matriz al medio fue diferente en los dos grupos. Por ejemplo, para que OTC salga de mitocondrias intactas es necesario incubarlas en condiciones fosforilantes e inhibir el complejo I de la cadena respiratoria (Figura 8.6, incubación con rotenona). En cambio, el mayor porcentaje de actividad extramitocondrial de OTC en el grupo control se observa cuando todos los complejos respiratorios se encuentran en funcionamiento, en condiciones fosforilantes (Figura 8.6, condiciones fosforilantes). Lo notable de la OTC es que la respuesta de las mitocondrias con HP es más parecida a las intactas, en lugar del control quirúrgico. Además, contrario a lo que se esperaba por las observaciones *in vivo*, las mitocondrias de ratas hepatectomizadas no liberan más enzimas al medio *in vitro*. Esto no puede explicarse por cambios en la composición de los complejos en las mitocondrias debidos a la laparotomía. Yang y colaboradores (2004) midieron la actividad de los complejos respiratorios y encontraron que la actividad del CI no disminuye 24h post-HP. De esta manera, los datos sugieren que la capacidad de liberar enzimas de la matriz mitocondrial al medio refleja de manera más general, el estado del hígado y no necesariamente sucede debido a un daño en el tejido.

El porcentaje de salida no depende de la abundancia de la enzima. A pesar de que en todos los ensayos se colocó 1 mg de proteína de mitocondrias, la actividad total por ensayo de las enzimas estudiadas es mayor en el grupo control que en el grupo de ratas intactas y con HP. Se sabe que el proteoma del hígado cambia después de una HP (Deng X y colaboradores, 2009), lo que podría explicar las diferencias en las actividades enzimáticas entre los grupos. A pesar de esto, los porcentajes de actividad de OTC (Figura 8.6) y GDH (Figura 8.4) en el medio extramitocondrial son mayores en ratas intactas que en ratas control y con HP (Anexo I, Tablas 8.1 y 8.2). El porcentaje de actividad de GDH es menor en ratas con HP con respecto al grupo control; contrario a lo que sucede con OTC, donde el porcentaje de actividad extramitocondrial es mayor en el grupo con HP con respecto al grupo control. En el caso de MDH (Figura 8.8) y AST (Figura 8.10) los porcentajes en el medio extramitocondrial son muy similares para los tres grupos, y las actividades totales son mayores sólo en el grupo control (Anexo I, Tablas 8.3 y 8.4). En los estudios realizados por Greco y colaboradores (1998), y Guerrieri y colaboradores (2002), también se estudió a las enzimas GDH, MDH y AST. Sin embargo, en estos trabajos sólo se utilizó succinato como sustrato y rotenona como inhibidor del CI de la CTE. Además, los ensayos *in vitro* se realizaron con 10 mg de mitocondrias y sin calcular los porcentajes de actividad respecto al total. Tal vez por esto se haya reportado mayor liberación de enzimas de las mitocondrias de ratas con hepatectomía parcial que de las mitocondrias control. En cambio, en el presente estudio permite evaluar la salida de las enzimas con respecto a la actividad presente en cada condición.

Si la enzima funcional tiene un tamaño pequeño no significa que el porcentaje de actividad extramitocondrial sea mayor. Ordenando las enzimas estudiadas de mayor a menor tamaño queda como sigue (Protein Data Bank): GDH 360kDa > OTC 120kDa > AST 90.4kDa > MDH 70kDa. El porcentaje de actividad de GDH en el medio extramitocondrial de los ensayos es el mayor en los tres grupos (desde 10 hasta 30%). El porcentaje de OTC es el menor de todos, entre 3 y 15% para los tres grupos. MDH y AST salen en porcentajes similares y mayores a OTC (entre 10 y 20%).

Las enzimas que sólo tienen isoformas mitocondriales (GDH y OTC) se comportan de manera diferente a las enzimas que tienen isoformas también citosólicas (MDH y AST). En el grupo de ratas intactas la actividad de GDH aumenta en todas las condiciones que tienen sustratos; en cambio, la actividad extramitocondrial de OTC no cambia. La actividad extramitocondrial de OTC y GDH no se ve afectada por los inhibidores de la cadena transportadora de electrones. Por otra parte, en el grupo de ratas control las mitocondrias son muy

sensibles a los tratamientos con los inhibidores de la CTE y la mayor liberación de las enzimas se observa en condiciones fosforilantes; contrario al grupo con HP, donde las condiciones fosforilantes son en las que hay menor actividad extramitocondrial de GDH y OTC. En cuanto a las enzimas con isoformas citosólicas, en el trabajo realizado por Greco y colaboradores (1998) se estudió la liberación de MDH y AST de mitocondrias control y con HP. Sólo se midió la actividad extramitocondrial y no el porcentaje con respecto al total de la actividad en el ensayo. En el grupo de ratas intactas MDH se comporta similar a OTC, mientras que AST se parece más a GDH, mostrando un aumento de la actividad extramitocondrial en condiciones fosforilantes. En el grupo control, MDH y AST responden sólo a la presencia de sustratos para la CTE. Lo mismo se observa con AST en las ratas con HP, pero la actividad extramitocondrial de MDH es mayor en condiciones fosforilantes y rotenona, para este grupo. Estas últimas son las condiciones en las que se llevan a cabo la mayoría de los ensayos con mitocondrias *in vitro*, y en las que también se ha observado liberación de enzimas al medio de incubación. El presente panel de compuestos que afectan al metabolismo de la cadena transportadora de electrones proporciona una visión más amplia del fenómeno de liberación de enzimas de la matriz mitocondrial. Las diferencias observadas entre las enzimas y los grupos de estudio sugieren nuevamente que no se trata de un efecto general en la membrana mitocondrial, sino que es posible que exista un mecanismo selección y liberación de las enzimas.

Se incubaron a las mitocondrias con un agente oxidante y dos antioxidantes para investigar si la liberación de enzimas de la matriz se debía a la pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial. Así, el oxidante dañaría la integridad de la membrana y los antioxidantes la protegerían. Contrario a lo que se esperaba, los antioxidantes no disminuyen la salida de enzimas de las mitocondrias y los oxidantes no la promueven. El efecto que tienen estos compuestos es diferente para cada una de las enzimas estudiadas.

Los porcentajes obtenidos en el estudio temporal corresponden con los obtenidos al incubar las mitocondrias con los agentes químicos. La liberación de GDH y OTC de la matriz mitocondrial en función del tiempo depende de condiciones fosforilantes mientras que la MDH no mostró tal comportamiento, tal como se observó con los tratamientos químicos; el caso de AST no es tan claro. GDH sigue saliendo más desde el principio, a pesar de ser la enzima de mayor tamaño, y no se ve afectada por el tiempo. Asimismo, aunque MDH es la enzima más pequeña, el porcentaje de actividad en el medio extramitocondrial es menor que el de GDH, y parece haber una disminución de la actividad extramitocondrial a los 20 minutos de incubación al igual que GDH. Por otra parte, la salida de las enzimas en condiciones *in vitro* ocurre desde

tiempos muy tempranos y de mitocondrias de ratas intactas las cuales no tienen alteraciones debidas a daño hepático. Cabe notar también, que las enzimas estudiadas muestran diferentes comportamientos de salida, lo que sugiere que al menos una parte de la salida de las enzimas ocurre de manera activa y selectiva, por un mecanismo aún desconocido el cual podría sentir la actividad que se encuentre en el exterior o en el interior de la mitocondria. Incluso después de 60 minutos de incubación, la mayoría de la actividad enzimática se encuentra en el botón mitocondrial.

Las enzimas responden de diferente manera a los cambios en la temperatura de incubación. Sólo GDH requiere de condiciones fosforilantes para que sea liberada al medio. El hecho de que no se encuentre alta actividad en las bajas temperaturas, y de que sea incluso menor a la de los ensayos anteriores, sugiere que las membranas de las mitocondrias se encuentran íntegras y son capaces de mantener su contenido al interior. El mecanismo de liberación de las enzimas reduce su capacidad *in vitro* probablemente debido a una disminución en la movilidad de los componentes de las membranas mitocondriales. Sin embargo, la salida de GDH y OTC, que son más grandes y de localización exclusivamente mitocondrial, comienza desde temperaturas más bajas (aproximadamente 10°C). A pesar de que las enzimas son muy diferentes en cuanto al tamaño y número de subunidades que las conforman, los porcentajes de liberación son muy similares entre ellos. Las más pequeñas: AST y MDH no salen más al medio comparándolas con GDH y OTC; y son liberadas a temperaturas más altas. En el caso de MDH y AST se observó un aumento gradual en el porcentaje de actividad en el medio comenzando entre 20 y 25°C. Estas temperaturas “ambiente” son en las que generalmente se realizan los experimentos con mitocondrias *in vitro*. Sin embargo, *in vivo* el hígado se encuentra cercano a la temperatura corporal, y por sus funciones se calcula que la temperatura de las mitocondrias es aún mayor (Lane N, 2018). Por arriba de los 37 °C, la actividad extramitocondrial de las enzimas aumenta de manera importante en todos los casos, lo que podría explicar que las enzimas mitocondriales sean expulsadas con mayor rapidez *in vivo*. Así, nuevamente se sugiere que las mitocondrias poseen mecanismos de selección de las enzimas que deben ser liberadas.

Al variar la cantidad de mitocondrias usadas en el ensayo OTC, MDH y AST mostraron el mismo comportamiento. Entre 0.5 y 2 mg todas muestran mayor actividad en el medio extramitocondrial en condiciones basales que en fosforilantes, y después (entre 3 y 5 mg) las actividades son muy similares; esto último sucedió también con GDH. Es probable que la salida de las enzimas de la matriz suceda como consecuencia de la dinámica mitocondrial. Por esta causa, es necesario que haya cierta densidad de mitocondrias en el ensayo para asegurar el

contacto entre ellas. En los estudios de fusión mitocondrial *in vitro* las mitocondrias se incuban un tiempo después de centrifugarse para promover el contacto entre las membranas y favorecer la fusión antes de resuspenderlas (Legros y colaboradores, 2002; Ingerman y colaboradores, 2007). A pesar de que no se realizaron los ensayos con mitocondrias aisladas de ratas con HP, la liberación de enzimas de la matriz mitocondrial *in vivo* podría deberse a que durante la regeneración inducida por hepatectomía parcial disminuye el número de mitocondrias en el hígado de manera transitoria (Ferri y colaboradores, 2005) sin que se altere su capacidad de fosforilación oxidativa (Hernández-Muñoz y colaboradores, 2003). Esto disminuiría la cantidad de puntos de contacto y favorecería la salida de las enzimas al citoplasma y eventualmente al suero, lo cual no sucede en ratas intactas *in vivo*, donde la densidad mitocondrial se mantiene. De manera adicional, los complejos que intervienen en la dinámica mitocondrial requieren de energía, y en los ensayos se observó que hay mayor actividad extramitocondrial en condiciones basales que en condiciones fosforilantes, aún utilizando pocas mitocondrias en los ensayos. Finalmente, las mitocondrias aisladas de ratas intactas no presentan alteraciones, por lo que la salida de enzimas de la matriz mitocondrial no se debe a daño de la integridad mitocondrial.

En las cuatro enzimas estudiadas se observa también, que el porcentaje de actividad en el medio extramitocondrial disminuye a los 20 minutos de incubación, a pesar de que la actividad total en los ensayos no cambia. Usando varias cantidades de proteína mitocondrial se observó que la actividad en el medio extramitocondrial disminuye utilizando 3 mg de proteína. Esto no se debe al tiempo, sino a la cantidad de mitocondrias utilizadas. Por lo tanto, el fenómeno observado en los ensayos de tiempo puede deberse a que las mitocondrias se amontonan y atrapan las enzimas. Debido a que hay más contactos entre ellas, se precipitan al botón mitocondrial durante la centrifugación. De esta manera, las interacciones entre las membranas mitocondriales y por tanto la dinámica del organelo también resultaría importante para la liberación de enzimas de la matriz al exterior.

En los experimentos de concentración sucedió que siempre el porcentaje de actividad en el medio fue mayor para las condiciones basales, contrario a las observaciones en los experimentos anteriores. A pesar de ello, podemos considerar los resultados obtenidos dado que GDH se comportó de manera diferente a las otras enzimas. Ésta es la única entre las enzimas estudiadas cuya actividad en el medio extramitocondrial aumenta con la cantidad de mitocondrias usadas en condiciones fosforilantes y basales entre 0.5 y 2mg. El punto crítico para GDH se encuentra cerca de los 2mg, donde se observa la mayor actividad. En todos los ensayos se observó que la liberación de esta enzima al medio depende de energía, pero aún desconocemos el

mecanismo de salida de esta enzima. También puede deberse a que estos experimentos se realizaron a 37°C.

Se sabe que *in vivo* las tasas de fusión/fisión exceden las que se necesitan para mantener la morfología mitocondrial. Si se conserva la relación entre los dos procesos, por ejemplo, disminuyendo ambos, la morfología se mantiene. Pero si existe deficiencia en los procesos de fusión, las células poseen tasas de crecimiento reducidas, reducción de la respiración, y aparición de poblaciones heterogéneas de mitocondrias (Chen y colaboradores, 2005). Esto sugiere que la dinámica mitocondrial está implicada en otros procesos celulares distintos al mantenimiento del organelo. Legros y colaboradores (2002) encontraron que en células HeLa la fusión requiere de la formación del potencial transmembranal. También se sabe que la capacidad de las mitocondrias de levadura para fusionarse *in vitro* se ve afectada por: el estatus respiratorio *in vivo* antes de aislar el organelo, el potencial transmembranal, la temperatura, tiempo y cantidad de mitocondrias usadas (Ingerman y colaboradores, 2007). También requiere de otros factores como un sistema regenerante de GTP y de un medio de incubación especial. Algunos de los resultados obtenidos en este trabajo sugieren este mecanismo para la liberación de las enzimas de la matriz. Sin embargo, puede no ser tan claro ya que en nuestros ensayos no se cumplen todas las condiciones utilizadas para estudiar la dinámica mitocondrial.

*In vivo* también deben existir procesos celulares que controlen la salida de las enzimas de la mitocondria. Se sabe que en el hígado en regeneración ocurre mitofagia y que la composición de lisosomas se ve alterada (Fernández y colaboradores, 2004). Posiblemente este sea el mecanismo por el cual las enzimas llegan de la matriz mitocondrial al suero. Esto sería consistente con los estudios de Rivera-Valerdi (1997) en las que se observó disminución de la salida de enzimas al medio al agregar inhibidores de la formación del citoesqueleto en rebanadas hepáticas. Sin embargo, para confirmar esto aún es necesario realizar muchos estudios, probando específicamente el papel de la dinámica mitocondrial y del tráfico intracelular en el proceso de liberación de enzimas de las mitocondrias hepáticas al suero.

Aún se desconoce el significado de la liberación de enzimas hepáticas a la sangre durante la HP, especialmente de las enzimas de la matriz mitocondrial. La actividad de enzimas específicas del hígado en suero se ha utilizado ampliamente como biomarcador de daño hepático. De esta manera, se sabe que, en el caso de daño agudo inducido por etanol, la regeneración hepática sufre un retraso que correlaciona con una menor elevación de los niveles de enzimas hepáticas al suero (Morales-González y colaboradores, 1999). Furihata y colaboradores (2016) probaron fármacos con diversos mecanismos de acción en cultivos de hepatocitos primarios y

observaron que al medir a la OTC y CPS-1 (proteínas de la matriz mitocondrial) en el medio de cultivo, presentaban un mejor intervalo dinámico que otros marcadores clásicos de localización citosólica (ALT), y permitían diferenciar entre los fármacos utilizados. Además, la temporalidad de la actividad de OTC y ALT en el medio de cultivo era la misma, a pesar de la compartimentalización de las enzimas. Finalmente, al igual que en este trabajo, no se encontró actividad de enzimas de las membranas mitocondriales en el medio de cultivo (SDH, COXIV, Tom20). Por otra parte, se utilizaron mitocondrias de ratas intactas en los ensayos realizados en el presente trabajo, probando diferentes tiempos y temperaturas de incubación, así como cantidades de mitocondrias. Por lo cual, la presencia de enzimas hepáticas de la matriz mitocondrial en el medio o en el suero parece reflejar el estatus metabólico del hígado y no necesariamente un estado de necrosis o muerte celular.

## X. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de estudio, las enzimas localizadas en la matriz de mitocondrias hepáticas aisladas son liberadas al medio extramitocondrial. La liberación de estas enzimas está regulada por mecanismos intrínsecos de las mitocondrias ya que el porcentaje de liberación al medio puede ser modificado *in vitro* por compuestos que afectan la actividad de la cadena transportadora de electrones, y son parcialmente independientes de estímulos extrahepáticos y de las interacciones intercelulares.

El peso molecular y la abundancia de las enzimas de la matriz mitocondrial no son el único factor que determina la liberación al medio extramitocondrial. GDH es la enzima estudiada con mayor peso molecular; sin embargo, presentó el mayor porcentaje de actividad extramitocondrial en la mayoría de las condiciones estudiadas.

La liberación de las enzimas no sucede por la ruptura de las membranas, ya que no hay actividad de SDH en el medio. En los ensayos de tiempo, el porcentaje de actividad extramitocondrial de las enzimas estudiadas baja a los 20 min. y después de 1 hora de incubación la mayoría de la actividad se encuentra en la fracción mitocondrial.

La liberación de enzimas depende del estado funcional de las mitocondrias. El porcentaje de GDH, OTC y MDH fue mayor en los grupos intacto y con hepatectomía parcial al usar sustratos para los complejos respiratorios I y II junto con rotenona. Sólo en algunos casos fue mayor con sustratos para los dos complejos (GDH y OTC-control; AST-intacta). Contrario a lo que se esperaba, las mitocondrias de ratas hepatectomizadas no mostraron mayor porcentaje de actividad en el medio extramitocondrial con respecto a las intactas o al control. La liberación de algunas enzimas mostró dependencia con la energización de la membrana interna mitocondrial como se observó con los experimentos en presencia y ausencia de desacoplante. Contrario a lo que se esperaba, los antioxidantes no disminuyen la salida de enzimas de las mitocondrias y los oxidantes no la promueven. Ambos muestran tendencia de aumentar el porcentaje de actividad en sobrenadante.

Probablemente las interacciones entre las membranas mitocondriales, a través de la dinámica mitocondrial, sean las responsables de regular la liberación de las enzimas de la matriz

al medio extramitocondrial. La liberación de las enzimas estudiadas ocurre rápidamente (hasta los 20 minutos de incubación) y es dependiente de la temperatura de incubación y la cantidad de mitocondrias presentes en el ensayo. Las enzimas de localización exclusivamente mitocondrial y las de mayor tamaño entre las estudiadas (GDH y OTC) empiezan a salir a partir de temperaturas más bajas (aproximadamente 10°C) que MDH y AST (20-25°C). La salida de enzimas de la matriz mitocondrial disminuye al aumentar la concentración de proteína mitocondrial en los ensayos.

## XI. PERSPECTIVAS

Estudiar el efecto del tiempo y temperatura de incubación, así como de la cantidad de proteína mitocondrial sobre la liberación de las enzimas GDH, OTC, MDH y AST *in vitro* en ratas con laparotomía y hepatectomía parcial del 70%, y así conocer si se comportan de manera diferente a las mitocondrias de ratas intactas.

Determinar el porcentaje de enzima (cantidad de la proteína) en el medio extramitocondrial, ya que únicamente se consideró la actividad enzimática en el presente estudio.

Determinar si las enzimas en el medio extramitocondrial se encuentran solubles o en asociación con lípidos, ya que durante regeneración inducida por hepatectomía parcial se han observado cambios en la distribución de las enzimas hepáticas y aumento de vesículas en el citoplasma.

Estudiar la liberación de las enzimas de la matriz durante los eventos de fusión y fisión mitocondrial, como posible mecanismo por el cual los polímeros de proteínas salgan de la matriz mitocondrial al medio de incubación o la circulación.

Determinar si la liberación de enzimas de la matriz puede ser modulada *in vitro* por componentes del citosol, con el propósito de entender los factores que regulan la liberación de enzimas de la matriz mitocondrial *in vivo*.

## XII. REFERENCIAS

1. Alberts B, Johnson A, Lewis A, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) *Molecular biology of the cell*, 4<sup>th</sup> edition. Garland Science: New York.
2. Ansar S, Tabassum H, Jameil Nal (2013) *Protective effect of butylated hydroxytoluene on ferric nitriloacetate induced hepatotoxicity and oxidative stress in mice*. **Human and Experimental Toxicology** **32(5):513-521**.
3. Atlas de Histología Vegetal y Animal. Facultad de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Facultad de Biología, Universidad de Vigo, España. [WWW] Recuperado de: <https://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html> en febrero de 2017.
4. Baddour JA, Sousounis K, Tsonis PA (2012) *Organ repair and regeneration: an overview*. **Birth Defects Res (Part C)** **96**: 1-29.
5. Bergmeyer HU (editor) (1974) **Methods of enzymatic analysis 2da. edición**. USA: Academic Press. Pp: 837-845.
6. Boron WF, Boulpaep EL (2012) *Medical Physiology 2nd updated edition. A cellular and molecular approach*. USA: Elsevier.
7. Cascales M (2008) *Bases celulares y moleculares de la regeneración hepática*. España: Real Academia Nacional de Farmacia.
8. Ceriotti G (1973) *Optimal conditions for ornithine carbamoyl transferase determination. A simple micro method without deproteinization*. **Clin Chim Acta** **47**: 97-105.
9. Chen H, Chomyn A, Chan DC (2005) *Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction*. **J Biol Chem** **280(28)**: 26185-26192.
10. Colnot S, Perret C (2011) *Chapter 2. Liver Zonation* en: *Molecular pathology of liver diseases*. Monga SPS (ed). USA: Springer. Pp: 931.
11. Crumm S, Cofan M, Juskeviciute E, Hoek J (2008) *Adenine nucleotide changes in the remnant liver: an early signal for regeneration after partial hepatectomy* **Hepatology** **48(3)**: 898-908.
12. Delgado-Coello B, Mas-Oliva J (2017). **Avances en el estudio experimental de la bioquímica hepática**. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México. Pp: 189.
13. Deng X, Li W, Chen N, Sun Y, Wei H, Jiang Y, He F (2009). *Exploring the priming mechanism of liver regeneration: proteins and protein complexes*. **Proteomics** **9**: 2202-2216.

14. Díaz-Juárez J, Rivera-Valerdi L, Bernal-Cerrillo DE, Hernández-Muñoz R (2006) *Predominance of released mitochondrial enzymes by partial hepatectomy-induced rat regenerating liver is controlled by hemodynamic changes and not related to mitochondrial damage.* **Scand J Gastr** **41**: 223-233.
15. Diaz-Muñoz M, Hernández-Muñoz R (2010) *Molecular and biochemical features of the mitochondrial enzyme Ornithine Transcarbamylase: a possible new role as a signaling factor.* **Cur Med Chem** **17**: 2253-2260.
16. Ellis G, Goldberg DM (1972) *Optimal conditions for the kinetic assay of serum glutamate dehydrogenase activity at 37°C.* **Clin Chem** **18(6)**: 523-527.
17. Fernández MA, Torres S, Ingelmo-Torres M, Enrich C, Pol A (2004) *Intracellular trafficking during liver regeneration. Alterations in late endocytic and transcytotic pathways.* **J Hepatol** **40**:132-139.
18. Ferri D, Moro L, Mastrodonato M, Capuano F, Marra E, Liquori GE, Greco M (2005) *Ultrastructural zonal heterogeneity of hepatocytes and mitochondria within the hepatic acinus during liver regeneration after partial hepatectomy.* **Biol Cell** **97**: 277-288.
19. Furihata T, Aizawa T, Koibuchi A, Zhu M, Yamasaki Y, Shibuya M, Chiba K (2016) *Characterization of release profile of ornithine carbamoyltransferase from primary rat hepatocytes treated with hepatotoxic drugs: Implications for its unique potential as a drug-induced liver injury biomarker.* **Drug metabolism and pharmacokinetics** **31**: 102-105.
20. Gaitonde MK (1967) *A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids.* **Biochem J** **104(2)**:627-633.
21. Geneser F (2005) *Histología. Tercera edición.* Buenos Aires: Médica Panamericana.
22. Gilgenkrantz H, Collin de l'Hortet A (2011). *New insights into liver regeneration.* **Clin Res in Hep and Gastr** **35**: 623-629.
23. Gonzales E, Julien B, Serrière-Lanneau V, Nicou A, Doignon I, Lagoudakis L, Garcin I, Azoulay D, Duclos-Vallée JC, Castaing D, Samuel D, Hernandez-Garcia A, Awad SS, Combettes L, Thevananther S, Tordjmann T (2010) *ATP release after partial hepatectomy regulates liver regeneration in the rat.* **J Hepatol** **52**: 54-62
24. Greco M, Moro L, Pellicchia G, Di Pede S, Guerrieri F (1998) *Release of matrix proteins from mitochondria to cytosol during the prereplicative phase of liver regeneration.* **FEBS Letters** **427**: 179-182.

25. Guerrieri F, Vendemiale G, Grattagliano I, Cocco T, Pellecchia G, Altomare E (1999) *Mitochondrial oxidative alterations following partial hepatectomy* **Free Rad Biol Med** **26** (1/2): 34-41.
26. Guerrieri F, Pellecchia G, Lopriore B, Papa S, Liquori GE, Ferri D, Moro L, Marra E, Greco M (2002) *Changes in ultrastructure and the occurrence of permeability transition in mitochondria during rat liver regeneration.* **Eur J Biochem** **269**: 3304-3312.
27. Gutiérrez-Salinas J, Miranda-Garduño L, Trejo-Izquierdo E, Díaz-Muñoz M, Vidrio S, Morales-González JA, Hernández-Muñoz R (1999) *Redox state and energy metabolism during liver regeneration. Alterations produced by acute ethanol administration.* **Biochem Pharm** **58**: 1831-1839.
28. Hernández-Muñoz R, Sánchez-Sevilla L, Martínez-Gómez A, Dent MAR (2003) *Changes in mitochondrial adenine nucleotides and in permeability transition in two models of rat liver regeneration.* **Hepatology** **37**(4): 842-851.
29. Hughes C (1987) *The additives guide*. Great Britain: John Wiley and Sons.
30. Ingerman E, Meeusen S, DeVay R, Nunnari J (2007) *In vitro assays for mitochondrial fusion and division.* **Methods in Cell Biology** **80**: 707-720.
31. Jungermann K, Kietzmann T (1996) *Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver.* **Annu Rev Nutr** **16**: 179-203.
32. Jungermann K, Kietzmann T (2000) *Oxygen: Modulator of metabolic zonation and disease of the liver.* **Hepatology** **31**(2): 255-260.
33. Katz N (1992) *Metabolic heterogeneity of hepatocytes across the liver acinus (Conference).* **J Nutr** **122**: 843-849.
34. Kuznetsov AV, Usson Y, Leverve X, Margreiter R (2004) *Subcellular heterogeneity of mitochondrial function and dysfunction: Evidence obtained by confocal imaging.* **Mol Cell Biochem** **256/257**: 359-365.
35. Lane N (2018) *Hot mitochondria?* **PLoS Biol** **16**(1): e2005113.
36. Legros F, Lombès A, Frachon P, Rojo M (2002) *Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins.* **Mol Biol Cell** **13**(12): 4343-4354.
37. Lü JM, Lin PH, Yao Q, Chen C (2010) *Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems.* **J Cell Mol Med** **14**(4): 840-860.
38. Liu JH, Chen MM, Huang JW, Wann H, Ho LK, Pan WH, Chen YC, Liu CM, Yeh MY, Tsai SK, Young MS, Ho LT, Kuo CD, Chuang HY, Chao FP, Chao HM (2010) *Therapeutic effects*

- and mechanisms of action of mannitol during H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in human retinal pigment epithelium cells. J Ocul Pharmacol Ther* **26(3)**: 249-257.
39. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) *Protein measurement with the Folin Pheno, reagent. J Biol Chem* **193**: 265-275.
  40. Luo DZ, Vermijlen D, Ahishali B, Triantis V, Plakoutsi, Braet F, Vanderkerken K, Wisse E (2000) *On the cell biology of pit cells, the liver-specific NK cells W J Gastroenterol* **6(1)**: 1-11.
  41. Mahy BWJ, Rowson KEK, Parr CW (1967) *Studies on the mechanism of action of Reily Virus. IV The reticuloendothelial system and impaired plasma enzyme clearance in infected mice. J Exp Med* **125(2)**: 277-288.
  42. Mendieta-Condado E, Pichardo-Olvera M, Sánchez-Sevilla L, Chagoya de Sánchez V, Hernández-Muñoz R (2009) *Adenosine administration accelerates progression of the cell cycle during rat liver regeneration induced by one-third hepatectomy. J Pharm Exp Ther* **331(1)**: 122-132.
  43. Michalopoulos G (2007) *Liver regeneration. J Cell Phys* **213**: 286-300.
  44. Morales-Gonzalez JA, Gutiérrez-Salinas J, Yañez L, Villagómez-Rico C, Badillo-Romero J, Hernández-Muñoz R (1999) *Morphological and biochemical effects of a low ethanol dose on rat liver regeneration. Role of route and timing of administration. Dig Dis Sci* **44(10)**: 1963-1974.
  45. Morales-González JA, Gutiérrez-Salinas J, Piña E (2004) *Release of mitochondrial rather than cytosolic enzymes during liver regeneration in ethanol-intoxicated rats. Arch Med Res* **35**: 263-270.
  46. Murayama H, Ikemoto M, Fukuda Y, Tsunekawa S, Nagata A (2007) *Serum level of ornithine carbamoyltransferase is influenced by the state of Kupffer cells. Clin Chim Acta* **380**: 170-174.
  47. Nelson D, Cox M (2008) *Lehninger. Principles of biochemistry. 5<sup>th</sup> edition. USA: Freeman and Company.*
  48. Nulton-Persson AC, Szweda L (2001) *Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. J Biol Chem* **276**: 23357-23361.
  49. Protein Data Bank <http://www.rcsb.org/> Recuperado de WWW en Octubre de 2018.
  50. Rivera-Valerdi SL (1997) *Liberación de enzimas intracelulares como posibles señales moduladoras para la iniciación del proceso de la regeneración hepática. Tesis de*

Licenciatura. UNAM-IFC. BUAP- Escuela de Biología. Dirección: Dr. Rolando Hernández Muñoz.

51. Rodríguez-Enriquez S, He L, Lemasters JJ (2004) *Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy*. **Int J Biochem Cell Biol** **36**: 2463-2472.
52. Schmitt S, Schulz S, Schropp EM, Eberhagen C, Simmons A, Beisker W, Aichler M, Zischka H (2014) *Why to compare absolute numbers of mitochondria*. **Mitochondrion** **19(A)**:113-123.
53. Seglen PO (1997) *DNA ploidy and autophagic protein degradation as determinants of hepatocellular growth and survival*. **Cell Biol Tox** **13**: 301-315.
54. Soltys BJ, Gupta RS (1999) *Mitochondrial-matrix proteins at unexpected locations: are they exported?* **TIBS** **24**: 174-177.
55. Tokushige K, Hashimoto E, Noto H, Yatsuji S, Tobari M, Torii N, Tani ai M, Shiratoi K, Murayama H (2009) *Clinical significance of serum ornithine carbamoyltransferase in patients with non-alcoholic steatohepatitis*. **Hep Res** **39**: 939-943.
56. Unuma K, Aki T, Matsuda S, Funakoshi T, Yoshida K, Uemura K (2013) *Elimination and active extrusion of liver mitochondrial proteins during lipopolysaccharide administration in rat*. **Hepatology Res** **43**:526-534.
57. Vázquez-Memije ME, Tuena de Gómez Puyou M (2002) *Mitochondria: una mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos*. Ciudad de México: Editorial Prado.
58. Yang S, Tan TMC, Wee A, Leow CK (2004) *Mitochondrial respiratory function and antioxidant capacity in normal and cirrhotic livers following partial hepatectomy* **Cell Mol Life Sci** **61**: 220-229.
59. Zhou YH, Shi D, Yuan B, Sun QJ, Jiao BH, Sun JJ, Miao MY (2008) *Mitochondrial ultrastructure and release of proteins during liver regeneration*. **Indian J Med Res** **128**: 157-164.

Anexo I. Actividad *in vitro* de las enzimas GDH, OTC, MDH y AST.

Tabla 8.1 Actividad de GDH en la fracción mitocondrial y en el medio extramitocondrial en ensayos de liberación de enzimas mitocondriales *in vitro*, incubadas con diferentes tratamientos

GDH	Botón Mitocondrial				Medio Extramitocondrial				Total			
	actividad		Porcentaje		actividad		porcentaje		actividad		porcentaje	
<b>Intacta</b>	±		±		±		±		±			
1.basal	205.54	61.20	90.19	1.15	22.77	8.24	9.81	1.15	228.31	69.14	100.00	
2.sustratos	169.34	54.22	77.73	0.96	47.49	13.48	22.27	0.96	216.83	67.64	100.00	
3.fosforilantes	221.64	71.61	75.73	1.98	68.33	17.34	24.27	1.98	289.97	88.55	100.00	
4.rotenona	223.12	62.81	73.09	1.89	84.44	28.25	26.91	1.89	307.56	90.73	100.00	
5.cianuro	223.19	54.20	74.02	0.44	78.26	18.79	25.98	0.44	301.45	72.96	100.00	
6.CCCP	224.67	50.29	77.65	1.44	65.51	17.41	22.35	1.44	290.18	67.29	100.00	
7.H2O2	190.47	57.45	78.12	2.42	50.11	9.12	21.88	2.42	240.57	66.18	100.00	
8.manitol	131.27	33.33	74.01	1.69	47.28	15.03	25.99	1.69	178.55	48.12	100.00	
9.BHT	191.18	49.91	81.15	1.94	44.27	12.22	18.85	1.94	235.44	61.51	100.00	
<b>Control</b>	±		±		±		±		±			
1.basal	719.68	55.36	87.84	1.82	99.37	16.88	12.16	1.82	819.05	59.54	100.00	
2.sustratos	663.00	216.62	87.08	1.04	95.53	23.07	12.92	1.04	758.53	239.69	100.00	
3.fosforilantes	966.76	86.57	75.27	0.65	316.67	17.39	24.73	0.65	1283.43	103.96	100.00	
4.rotenona	890.41	99.29	83.04	2.46	191.05	55.88	16.96	2.46	1081.46	155.13	100.00	
5.cianuro	820.77	95.81	86.36	1.15	132.16	26.72	13.64	1.15	952.93	120.95	100.00	
6.CCCP	642.03	181.74	82.55	2.77	129.23	12.56	17.45	2.77	771.26	194.30	100.00	
7.H2O2	611.69	192.56	73.00	12.24	205.02	65.70	27.00	6.12	816.71	126.86	100.00	
8.manitol	669.18	288.50	72.57	13.56	209.28	55.07	27.43	6.78	878.45	233.43	100.00	
9.BHT	1022.32	197.97	81.55	6.79	219.61	58.65	18.45	6.79	1241.93	139.32	100.00	
<b>HP70</b>	±		±		±		±		±			
1.basal	332.17	106.47	78.42	5.22	84.20	1.59	21.58	5.22	416.38	108.07	100.00	
2.sustratos	438.00	30.74	83.21	0.97	89.40	12.34	16.79	0.97	527.41	43.08	100.00	
3.fosforilantes	521.26	248.21	93.42	2.02	42.75	29.71	6.58	2.02	564.01	277.92	100.00	
4.rotenona	726.09	49.57	90.23	1.73	79.93	20.80	9.77	1.73	806.01	70.36	100.00	
5.cianuro	566.51	155.09	80.49	5.96	116.78	23.52	19.51	5.96	683.29	152.97	100.00	
6.CCCP	294.78	80.68	69.41	4.99	123.70	5.44	30.59	4.99	418.49	86.12	100.00	
7.H2O2	319.42	120.00	70.12	12.11	119.64	24.71	29.88	6.06	439.06	95.29	100.00	
8.manitol	264.83	118.94	60.15	18.66	154.49	51.30	39.85	9.33	419.32	67.63	100.00	
9.BHT	545.51	102.22	70.09	8.23	260.99	138.29	29.91	8.23	806.50	240.51	100.00	

**Tabla 8.2 Actividad de OTC en la fracción mitocondrial y en el medio extramitocondrial en ensayos de liberación de enzimas mitocondriales *in vitro*, incubadas con diferentes tratamientos**

OTC	Botón Mitocondrial				Medio Extramitocondrial				Total		
	actividad		porcentaje		actividad		porcentaje		actividad	porcentaje	
<b>Intacta</b>	±		±		±		±		±		
1.basal	287.11	68.17	90.67	0.60	29.87	7.82	9.33	0.60	316.98	75.86	100.00
2.sustratos	227.56	52.97	87.86	1.15	31.20	7.33	12.14	1.15	258.76	59.89	100.00
3.fosforilantes	334.00	166.00	90.90	1.15	31.20	12.00	9.10	1.15	365.20	178.00	100.00
4.rotenona	369.33	141.33	86.85	1.66	59.20	29.60	13.15	1.66	428.53	170.93	100.00
5.cianuro	316.89	90.08	88.76	1.78	39.20	10.89	11.24	1.78	356.09	99.94	100.00
6.CCCP	414.67	122.78	92.44	0.60	33.33	8.57	7.56	0.60	448.00	131.09	100.00
7.H2O2	316.44	70.68	89.52	0.84	37.33	9.13	10.48	0.84	353.78	79.49	100.00
8.manitol	320.89	88.52	87.61	1.01	43.20	7.33	12.39	1.01	364.09	95.82	100.00
9.BHT	412.44	154.85	89.41	1.65	42.93	7.18	10.59	1.65	455.38	161.90	100.00
<b>Control</b>	±		±		±		±		±		
1.basal	747.70	107.32	97.24	0.43	21.79	5.55	2.76	0.43	769.49	112.36	100.00
2.sustratos	899.11	130.22	96.29	1.62	37.20	20.80	3.71	1.62	936.31	151.02	100.00
3.fosforilantes	808.89	107.56	91.21	0.10	77.80	9.40	8.79	0.10	886.69	116.96	100.00
4.rotenona	781.11	129.56	93.95	1.03	48.88	0.72	6.05	1.03	829.99	128.84	100.00
5.cianuro	1002.07	294.34	94.59	1.43	48.67	4.91	5.41	1.43	1050.74	291.21	100.00
6.CCCP	1290.89	486.44	97.76	0.29	31.00	15.00	2.24	0.29	1321.89	501.44	100.00
7.H2O2	1174.00	464.67	89.39	4.71	115.48	12.84	10.61	2.87	1289.48	451.83	100.00
8.manitol	1166.67	558.67	87.07	8.20	124.32	38.64	12.93	4.10	1290.99	520.03	100.00
9.BHT	1232.67	664.67	91.94	6.60	62.84	34.76	8.06	3.10	1295.51	629.91	100.00
<b>HP70</b>	±		±		±		±		±		
1.basal	656.44	141.78	94.35	1.34	41.60	18.40	5.65	1.34	698.04	160.18	100.00
2.sustratos	346.37	59.71	84.31	4.31	73.68	35.74	15.69	4.31	420.05	95.13	100.00
3.fosforilantes	495.11	184.97	93.53	1.73	29.20	5.92	6.47	1.73	524.31	187.25	100.00
4.rotenona	504.89	132.05	89.51	1.84	57.20	13.58	10.49	1.84	562.09	140.33	100.00
5.cianuro	719.78	30.44	96.46	0.36	26.52	3.88	3.54	0.36	746.30	34.32	100.00
6.CCCP	630.96	103.56	92.99	2.68	43.07	12.00	7.01	2.68	674.03	98.05	100.00
7.H2O2	581.11	108.22	89.99	5.20	59.80	25.00	10.01	2.60	640.91	83.22	100.00
8.manitol	397.11	20.22	86.73	5.44	61.08	20.93	13.27	2.72	458.19	5.42	100.00
9.BHT	584.00	34.67	85.38	10.71	105.80	80.60	14.62	5.35	689.80	45.93	100.00

**Tabla 8.3 Actividad de MDH en la fracción mitocondrial y en el medio extramitocondrial en ensayos de liberación de enzimas mitocondriales *in vitro*, incubadas con diferentes tratamientos**

MDH	Botón Mitocondrial				Medio Extramitocondrial				Total		
	actividad		Porcentaje		actividad		porcentaje		actividad	porcentaje	
<b>Intacta</b>	±		±		±		±		±		
1.basal	371.47	85.69	88.80	1.05	45.11	6.93	11.20	1.05	416.58	92.42	100.00
2.sustratos	350.04	94.46	86.14	0.53	55.02	12.10	13.86	0.53	405.06	106.56	100.00
3.fosforilantes	423.63	111.48	88.70.	1.79	50.29	6.33	11.30	1.79	473.92	116.08	100.00
4.rotenona	453.55	103.48	84.95	1.25	84.23	28.13	15.05	1.25	537.78	131.60	100.00
5.cianuro	428.37	123.22	83.42	2.62	82.17	23.41	16.58	2.62	510.54	144.32	100.00
6.CCCP	222.22	50.46	80.02	1.45	57.97	18.78	19.98	1.45	280.19	69.24	100.00
7.H2O2	234.55	47.54	76.63	0.59	70.83	12.39	23.37	0.59	305.38	39.87	100.00
8.manitol	234.28	52.28	76.10	1.26	73.78	17.56	23.90	1.26	308.06	69.49	100.00
9.BHT	253.75	38.33	80.15	1.07	64.22	14.21	19.85	1.07	317.97	52.54	100.00
<b>Control</b>	±		±		±		±		±		
1.basal	977.31	75.81	85.78	2.74	158.81	23.16	14.22	2.74	1136.12	54.00	100.00
2.sustratos	787.92	178.59	70.86	2.16	317.39	39.79	29.14	2.16	1105.31	218.38	100.00
3.fosforilantes	1066.99	103.43	85.74	0.66	178.46	26.80	14.26	0.66	1245.44	130.23	100.00
4.rotenona	1116.65	59.08	86.64	3.72	171.58	47.86	13.36	3.72	1288.23	26.36	100.00
5.cianuro	1278.85	101.07	91.75	0.76	113.34	3.66	8.25	0.76	1392.19	98.04	100.00
6.CCCP	1241.51	62.26	88.69	2.20	157.56	30.32	11.31	2.20	1399.07	50.89	100.00
7.H2O2	1239.55	142.55	85.78	2.35	202.04	15.81	14.22	2.35	1441.59	126.74	100.00
8.manitol	1572.75	177.52	90.15	0.70	170.42	5.89	9.85	0.70	1743.17	183.41	100.00
9.BHT	1677.12	244.91	86.79	7.50	245.31	128.75	13.21	3.75	1922.43	116.16	100.00
<b>HP70</b>	±		±		±		±		±		
1.basal	680.20	166.53	89.32	1.38	78.64	8.17	10.68	1.38	758.84	174.71	100.00
2.sustratos	752.01	193.60	85.96	2.27	129.42	54.93	14.04	2.27	881.43	248.53	100.00
3.fosforilantes	630.31	164.96	85.43	2.62	99.14	11.20	14.57	2.62	729.46	170.01	100.00
4.rotenona	717.04	138.80	84.82	0.71	126.47	19.42	15.18	0.71	843.52	157.51	100.00
5.cianuro	640.94	18.76	89.04	0.58	79.05	6.97	10.96	0.58	719.99	25.72	100.00
6.CCCP	767.77	132.37	88.49	0.95	101.91	23.13	11.51	0.95	869.69	154.83	100.00
7.H2O2	678.99	39.66	90.53	2.13	72.48	21.84	9.47	2.13	751.47	61.50	100.00
8.manitol	642.82	40.19	88.18	2.73	85.48	14.00	11.82	2.73	728.30	23.04	100.00
9.BHT	815.25	81.86	76.34	13.70	308.15	226.96	23.66	5.50	1123.39	308.82	100.00

**Tabla 8.4 Actividad de AST en la fracción mitocondrial y en el medio extramitocondrial en ensayos de liberación de enzimas mitocondriales *in vitro*, incubadas con diferentes tratamientos**

AST	Botón Mitocondrial				Medio Extramitocondrial				Total		
	actividad		Porcentaje		actividad		porcentaje		actividad	porcentaje	
<b>Intacta</b>	±		±		±		±		±		
1.basal	489.95	145.31	92.50	0.62	40.82	15.36	7.50	0.62	530.78	160.67	100.00
2.sustratos	545.65	130.75	86.02	0.76	88.95	22.82	13.98	0.76	634.60	153.20	100.00
3.fosforilantes	703.25	251.65	81.93	2.66	146.01	27.94	18.07	2.66	849.26	279.59	100.00
4.rotenona	715.73	142.20	84.15	0.79	137.88	35.86	15.85	0.79	853.61	177.97	100.00
5.cianuro	707.96	140.65	87.34	0.55	103.33	22.72	12.66	0.55	811.29	163.10	100.00
6.CCCP	474.29	117.78	86.96	1.02	73.89	23.88	13.04	1.02	548.18	141.57	100.00
7.H2O2	565.09	133.17	85.23	2.10	98.32	26.63	14.77	2.10	663.41	157.15	100.00
8.manitol	647.63	173.83	85.00	0.30	113.98	30.09	15.00	0.30	761.61	203.87	100.00
9.BHT	473.57	111.55	86.50	0.50	73.47	16.63	13.50	0.50	547.04	128.04	100.00
<b>Control</b>	±		±		±		±		±		
1.basal	1566.13	31.92	87.12	0.59	231.16	7.95	12.88	0.59	1797.29	25.87	100.00
2.sustratos	1175.00	325.97	72.91	3.63	418.28	41.73	27.09	3.63	1593.28	367.70	100.00
3.fosforilantes	1897.06	256.14	82.81	2.38	405.38	110.43	17.19	2.38	2302.44	352.36	100.00
4.rotenona	1657.77	128.34	86.06	1.40	268.98	34.06	13.94	1.40	1926.75	149.27	100.00
5.cianuro	1623.07	32.79	86.20	0.52	260.06	13.10	13.80	0.52	1883.13	41.33	100.00
6.CCCP	1801.20	255.16	89.63	2.79	210.60	59.00	10.37	2.79	2011.80	284.72	100.00
7.H2O2	1513.85	169.23	81.38	2.42	341.94	16.44	18.62	2.42	1855.79	152.80	100.00
8.manitol	1610.74	22.57	84.58	0.69	293.50	11.52	15.42	0.69	1904.24	11.05	100.00
9.BHT	1663.74	41.11	90.21	3.61	181.62	69.45	9.79	3.61	1845.36	28.35	100.00
<b>HP70</b>	±		±		±		±		±		
1.basal	709.58	156.27	91.07	0.28	69.11	12.96	8.93	0.28	778.69	169.23	100.00
2.sustratos	781.35	36.66	78.88	3.25	209.00	30.96	21.12	3.25	990.35	5.69	100.00
3.fosforilantes	755.91	191.30	86.37	1.57	113.21	15.40	13.63	1.57	869.12	205.06	100.00
4.rotenona	1012.17	205.29	85.14	0.55	174.83	30.23	14.86	0.55	1187.00	235.09	100.00
5.cianuro	883.68	31.25	86.10	0.80	143.13	14.64	13.90	0.80	1026.81	45.90	100.00
6.CCCP	744.80	61.67	86.86	0.95	112.55	11.45	13.14	0.95	857.35	69.01	100.00
7.H2O2	789.14	7.25	83.32	1.11	158.01	11.11	16.68	1.11	947.15	3.86	100.00
8.manitol	626.78	19.60	83.62	2.44	122.70	18.06	16.38	2.44	749.48	1.54	100.00
9.BHT	952.05	94.23	85.85	3.21	162.64	57.18	14.15	3.21	1114.69	151.41	100.00

**Tabla 8.5 Actividad de las enzimas GDH, OTC, MDH y AST en la fracción mitocondrial y el medio extramitocondrial en diferentes tiempos de incubación y condiciones basales**

	Botón Mitocondrial				Medio Extramitocondrial				Total		
	actividad		porcentaje		actividad		porcentaje		actividad	Porcentaje	
<b>GDH</b>	±		±		±		±		±		
2	718.78	47.89	91.28	2.00	67.12	11.88	8.72	2.00	785.89	36.20	100.00
5	655.56	93.94	89.29	3.31	71.74	19.52	10.71	3.31	727.29	85.41	100.00
7.5	653.00	69.62	89.53	2.75	73.48	17.68	10.47	2.75	726.47	68.55	100.00
10	609.02	90.83	87.10	2.69	85.73	13.05	12.90	2.69	694.75	83.90	100.00
15	653.86	85.46	89.46	3.30	70.43	18.49	10.54	3.30	724.30	74.48	100.00
20	698.41	59.72	90.77	2.48	69.76	18.53	9.23	2.48	768.16	56.32	100.00
30	683.04	85.31	91.10	2.75	62.13	16.88	8.90	2.75	745.17	77.71	100.00
60	672.40	80.48	89.59	3.84	74.01	26.11	10.41	3.84	746.41	59.46	100.00
<b>OTC</b>											
2	477.56	75.32	88.55	1.36	63.57	15.45	11.45	1.36	541.13	90.01	100.00
5	527.07	118.06	91.09	1.14	56.60	19.74	8.91	1.14	583.67	137.77	100.00
8	562.40	164.59	87.70	0.41	77.20	19.38	12.30	0.41	639.60	183.96	100.00
10	472.07	81.07	89.92	1.23	56.30	17.39	10.08	1.23	528.37	98.14	100.00
15	498.03	59.14	89.72	1.59	60.10	15.69	10.28	1.59	558.13	73.88	100.00
20	521.57	90.95	89.71	1.25	62.42	17.83	10.29	1.25	583.99	107.30	100.00
30	515.47	119.28	90.15	0.38	57.02	14.91	9.85	0.38	572.49	133.94	100.00
60	402.53	90.30	86.11	0.68	64.50	14.51	13.89	0.68	467.03	104.64	100.00
<b>MDH</b>											
2	818.13	173.42	89.05	2.34	106.11	33.48	10.95	2.34	924.24	200.57	100.00
5	751.61	142.67	88.08	1.91	111.80	37.75	11.92	1.91	863.41	179.82	100.00
7.5	816.45	180.63	87.79	1.45	120.38	36.19	12.21	1.45	936.83	215.80	100.00
10	777.69	221.46	86.92	1.32	116.83	31.72	13.08	1.32	894.52	251.58	100.00
15	750.67	136.96	87.67	2.46	111.00	32.99	12.33	2.46	861.67	163.89	100.00
20	799.04	143.64	89.16	2.01	104.64	33.82	10.84	2.01	903.67	174.34	100.00
30	762.46	130.70	89.47	1.98	96.40	31.05	10.53	1.98	858.86	159.03	100.00
60	791.67	113.79	88.23	1.68	112.14	31.35	11.77	1.68	903.80	142.97	100.00
<b>AST</b>											
2	1626.85	378.68	91.74	0.86	157.42	51.91	8.26	0.86	1784.27	430.26	100.00
5	1290.55	254.64	92.61	1.12	105.53	33.23	7.39	1.12	1396.08	284.23	100.00
7.5	1274.79	256.40	91.21	0.79	123.70	30.28	8.79	0.79	1398.49	284.96	100.00
10	1612.67	401.12	90.40	0.88	175.49	51.74	9.60	0.88	1788.15	451.16	100.00
15	1403.60	200.17	89.37	2.36	186.04	64.00	10.63	2.36	1589.64	260.52	100.00

20	1429.52	276.63	88.64	2.26	196.93	64.85	11.36	2.26	1626.45	334.88	100.00
30	1332.58	159.90	88.78	2.43	181.22	54.42	11.22	2.43	1513.79	204.27	100.00
60	1359.16	139.90	87.49	2.76	207.35	61.48	12.51	2.76	1566.51	187.91	100.00

**Tabla 8.6 Actividad de las enzimas GDH, OTC, MDH y AST en la fracción mitocondrial y el medio extramitocondrial en diferentes tiempos de incubación y condiciones fosforilantes**

	Botón Mitocondrial				Medio Extramitocondrial				Total		
	actividad	porcentaje			actividad	porcentaje			actividad	porcentaje	
<b>GDH</b>	±	±			±	±			±		
2	486.28	85.26	83.21	2.16	92.27	8.98	16.79	2.16	578.55	89.71	100.00
5	532.22	76.34	81.35	2.18	116.91	10.67	18.65	2.18	649.13	79.94	100.00
7.5	581.35	69.17	82.71	0.76	119.52	9.65	17.29	0.76	700.87	78.65	100.00
10	575.70	56.96	82.07	0.93	125.56	13.49	17.93	0.93	701.26	67.93	100.00
15	645.73	50.70	85.47	1.69	108.92	10.89	14.53	1.69	754.65	51.56	100.00
20	595.36	51.47	86.12	1.35	94.98	10.41	13.88	1.35	690.34	54.92	100.00
30	632.03	61.73	85.69	1.30	103.14	5.22	14.31	1.30	735.17	64.12	100.00
60	670.92	72.45	84.93	1.78	117.10	14.99	15.07	1.78	788.02	78.77	100.00
<b>OTC</b>											
2	424.27	61.53	90.45	0.76	44.72	7.25	9.55	0.76	468.99	67.88	100.00
5	370.83	63.29	88.55	2.60	53.28	22.83	11.45	2.60	424.11	84.14	100.00
8	458.43	155.38	88.26	1.20	57.66	16.71	11.74	1.20	516.09	171.77	100.00
10	464.70	118.86	88.12	0.67	60.98	13.39	11.88	0.67	525.68	132.03	100.00
15	434.40	57.64	87.77	1.89	62.22	15.09	12.23	1.89	496.62	70.04	100.00
20	460.10	100.06	90.19	1.13	48.76	10.58	9.81	1.13	508.86	109.69	100.00
30	461.53	73.23	88.62	0.75	60.10	11.88	11.38	0.75	521.63	84.69	100.00
60	457.20	62.15	89.06	0.78	56.50	8.98	10.94	0.78	513.70	70.03	100.00
<b>MDH</b>											
2	698.62	92.28	89.27	0.66	85.41	15.10	10.73	0.66	784.03	106.56	100.00
5	755.56	125.60	88.34	1.63	105.37	31.76	11.66	1.63	860.94	155.13	100.00
7.5	817.73	216.42	89.09	1.72	107.72	40.01	10.91	1.72	925.44	254.64	100.00
10	695.14	134.45	87.94	0.87	98.14	24.23	12.06	0.87	793.27	158.14	100.00
15	713.36	120.54	87.67	1.54	107.45	31.98	12.33	1.54	820.81	151.97	100.00
20	763.60	148.74	90.19	1.36	85.48	22.60	9.81	1.36	849.08	168.87	100.00
30	760.32	135.19	90.96	1.45	81.19	25.01	9.04	1.45	841.51	158.40	100.00
60	713.16	111.27	88.75	2.34	97.00	28.05	11.25	2.34	810.16	134.44	100.00
<b>AST</b>											
2	1376.98	281.48	91.22	0.48	133.78	27.91	8.78	0.48	1510.76	308.53	100.00

5	1289.09	269.73	93.77	0.67	87.90	22.80	6.23	0.67	1376.99	291.60	100.00
7.5	1173.89	135.42	88.30	2.91	169.03	60.11	11.70	2.91	1342.92	182.14	100.00
10	1132.00	148.65	90.52	1.32	122.74	29.43	9.48	1.32	1254.74	176.59	100.00
15	1155.88	120.52	87.11	3.00	188.19	60.13	12.89	3.00	1344.07	177.00	100.00
20	1281.74	248.30	91.45	0.56	122.51	29.09	8.55	0.56	1404.24	277.12	100.00
30	1156.21	73.01	87.94	2.96	169.61	51.58	12.06	2.96	1325.82	118.77	100.00
60	1112.10	119.90	86.20	2.55	182.81	41.30	13.80	2.55	1294.91	147.95	100.00

**Tabla 8.7 Actividad de las enzimas GDH, OTC, MDH y AST en la fracción mitocondrial y el medio extramitocondrial en diferentes temperaturas de incubación y condiciones basales**

	Botón Mitocondrial				Medio Extramitocondrial				Total		
	actividad	porcentaje			actividad	porcentaje			actividad	porcentaje	
<b>GDH</b>		±		±		±		±			
1	1218.36	131.59	94.63	1.15	72.53	21.38	5.37	1.15	1290.89	151.76	100.00
5	1235.32	112.09	93.16	1.31	94.56	25.54	6.84	1.31	1329.88	137.37	100.00
10	1204.51	70.71	95.11	1.05	64.11	17.34	4.89	1.05	1268.62	85.72	100.00
15	1158.21	47.07	93.75	1.24	79.52	19.08	6.25	1.24	1237.73	64.46	100.00
20	1160.95	31.06	94.17	0.91	73.00	13.63	5.83	0.91	1233.95	43.69	100.00
25	1118.84	97.45	93.55	0.95	80.29	18.70	6.45	0.95	1199.13	115.27	100.00
30	1200.00	37.09	95.13	2.01	60.72	24.66	4.87	2.01	1260.72	15.54	100.00
37	1059.26	55.82	90.40	2.41	115.41	32.38	9.60	2.41	1174.67	72.63	100.00
45	844.93	98.74	89.28	2.19	95.46	13.51	10.72	2.19	940.39	88.89	100.00
<b>OTC</b>											
1	293.70	57.75	89.10	2.05	35.50	7.68	10.90	2.05	329.20	62.56	100.00
5	346.50	53.59	89.28	1.43	41.74	7.68	10.72	1.43	388.24	59.35	100.00
10	533.16	136.84	91.22	1.19	49.49	9.88	8.78	1.19	582.65	144.30	100.00
15	313.87	30.06	89.80	1.64	37.18	8.82	10.20	1.64	351.05	37.90	100.00
20	341.73	45.96	89.28	1.81	40.60	7.60	10.72	1.81	382.33	49.25	100.00
25	321.64	82.69	86.99	0.82	47.20	10.21	13.01	0.82	368.84	92.43	100.00
30	341.73	59.55	88.87	0.94	44.40	11.19	11.13	0.94	386.13	70.58	100.00
37	366.98	71.47	89.45	1.46	45.79	15.65	10.55	1.46	412.76	86.97	100.00
45	344.40	80.39	84.78	2.01	64.53	22.81	15.22	2.01	408.93	102.17	100.00
<b>MDH</b>											
1	687.17	70.68	91.86	1.26	61.16	12.28	8.14	1.26	748.33	76.84	100.00
5	741.89	72.51	91.72	1.27	69.47	16.37	8.28	1.27	811.36	86.60	100.00

10	738.21	58.00	91.37	1.24	72.21	15.69	8.63	1.24	810.42	72.33	100.00
15	721.33	51.28	72.59	1.49	76.23	17.70	9.26	1.49	797.56	66.62	100.00
20	709.67	65.65	90.96	0.89	70.00	8.37	9.04	0.89	779.68	70.25	100.00
25	722.47	68.94	91.17	1.16	70.74	13.32	8.83	1.16	793.21	77.83	100.00
30	682.41	54.57	89.58	1.74	81.39	17.88	10.42	1.74	763.80	66.14	100.00
37	709.81	54.24	88.38	2.11	95.12	20.82	11.62	2.11	804.93	64.44	100.00
45	711.28	53.74	85.43	2.26	123.31	25.19	14.57	2.26	834.59	66.26	100.00
<b>AST</b>											
1	1547.14	202.27	95.30	0.52	75.36	10.91	4.70	0.52	1622.50	208.04	100.00
5	1654.79	202.02	93.03	1.78	137.86	54.02	6.97	1.78	1792.66	254.41	100.00
10	1613.44	225.17	93.74	0.99	114.92	33.95	6.26	0.99	1728.36	258.32	100.00
15	1408.02	88.18	94.03	1.09	91.83	23.73	5.97	1.09	1499.85	111.42	100.00
20	1393.27	68.77	92.62	0.58	111.94	14.89	7.38	0.58	1505.20	82.80	100.00
25	1428.77	123.62	92.68	0.38	113.56	14.84	7.32	0.38	1542.32	137.61	100.00
30	1592.28	223.57	90.23	1.22	181.50	45.97	9.77	1.22	1773.78	268.69	100.00
37	1544.18	96.82	88.94	1.20	196.44	35.54	11.06	1.20	1740.62	128.93	100.00
45	1426.69	88.29	85.91	2.30	239.64	47.59	14.09	2.30	1666.33	120.37	100.00

**Tabla 8.8 Actividad de las enzimas GDH, OTC, MDH y AST en la fracción mitocondrial y el medio extramitocondrial en diferentes temperaturas de incubación y condiciones fosforilantes**

	Botón Mitocondrial				Medio Extramitocondrial				Total		
	actividad	porcentaje		actividad	porcentaje		actividad	porcentaje			
<b>GDH</b>	±	±	±	±	±	±	±	±			
1	1176.97	31.55	90.49	1.44	125.94	23.40	9.51	1.59	1302.91	51.78	100.00
5	1066.53	27.82	89.01	1.55	133.91	23.19	10.99	1.51	1200.44	48.70	100.00
10	1088.33	70.39	89.88	1.26	125.07	22.69	10.12	1.26	1213.40	89.37	100.00
15	1012.24	26.06	88.45	0.69	132.51	10.11	11.55	0.69	1144.75	32.19	100.00
20	953.67	79.50	87.19	0.81	138.74	8.64	12.81	0.81	1092.42	85.30	100.00
25	1163.43	207.54	87.31	2.45	152.80	13.71	12.69	2.45	1316.23	194.94	100.00
30	1002.17	64.16	86.11	1.39	160.48	15.05	13.89	1.39	1162.66	67.11	100.00
37	1025.85	47.58	86.05	1.47	169.23	26.52	13.95	1.47	1195.07	71.30	100.00
45	704.59	48.74	79.36	2.86	182.27	26.14	20.64	2.86	886.86	49.60	100.00
<b>OTC</b>											
1	371.00	84.42	93.18	3.50	29.12	15.28	6.82	3.50	400.12	94.65	100.00
5	330.97	63.94	89.67	1.60	39.00	10.57	10.33	1.60	369.97	72.52	100.00
10	359.29	84.12	92.29	2.18	33.60	16.28	7.71	2.18	392.89	99.79	100.00

15	356.27	54.67	90.38	2.59	38.74	11.07	9.62	2.59	395.01	61.38	100.00
20	327.10	97.65	87.63	1.76	41.72	7.23	12.37	1.76	368.82	103.94	100.00
25	297.30	98.65	83.03	5.60	48.14	9.58	16.97	5.60	345.44	98.66	100.00
30	361.13	50.38	90.59	1.90	40.96	13.20	9.41	1.90	402.09	63.14	100.00
37	370.30	83.40	89.46	1.76	45.30	14.55	10.54	1.76	415.60	96.65	100.00
45	401.47	86.76	83.50	2.14	83.12	25.40	16.50	2.14	484.59	111.41	100.00
<b>MDH</b>											
1	689.04	55.53	90.02	1.04	78.22	13.95	9.98	1.04	767.26	68.13	100.00
5	705.39	55.84	90.04	1.55	79.72	16.56	9.96	1.55	785.10	67.16	100.00
10	699.49	65.42	90.88	1.32	71.48	15.02	9.12	1.32	770.97	75.16	100.00
15	571.72	113.26	86.91	1.21	84.85	13.81	13.09	1.21	656.57	126.16	100.00
20	707.26	65.43	90.85	0.93	71.34	10.82	9.15	0.93	778.60	72.28	100.00
25	681.67	60.93	89.68	1.21	78.78	13.34	10.32	1.21	760.45	69.43	100.00
30	680.33	65.81	89.95	1.40	77.77	16.07	10.05	1.40	758.11	77.53	100.00
37	696.21	61.92	89.13	0.88	86.08	14.24	10.87	0.88	782.29	74.43	100.00
45	694.33	44.49	85.56	2.27	120.65	25.88	14.44	2.27	814.98	63.65	100.00
<b>AST</b>											
1	1576.01	145.10	94.47	1.04	92.16	19.35	5.53	1.04	1668.17	149.98	100.00
5	1587.97	163.61	94.90	1.41	84.33	25.95	5.10	1.41	1672.30	164.20	100.00
10	1426.80	136.92	93.85	1.05	97.20	26.68	6.15	1.05	1523.99	163.60	100.00
15	1405.36	82.05	92.82	1.25	111.13	26.74	7.18	1.25	1516.48	106.76	100.00
20	1574.98	264.65	90.80	1.75	177.40	69.67	9.20	1.75	1752.38	331.52	100.00
25	1643.79	230.11	90.73	1.32	179.51	56.62	9.27	1.32	1823.30	285.20	100.00
30	1651.83	278.62	91.36	1.00	166.83	51.77	8.64	1.00	1818.67	329.67	100.00
37	1629.13	260.03	88.64	1.39	220.31	58.68	11.36	1.39	1849.44	317.33	100.00
45	1536.02	281.06	88.77	2.05	205.16	71.92	11.23	2.05	1741.17	348.73	100.00

**Tabla 8.9 Actividad de las enzimas GDH, OTC, MDH y AST en la fracción mitocondrial y el medio extramitocondrial en diferentes cantidades de proteína mitocondrial y condiciones basales**

	Botón Mitocondrial				Medio Extramitocondrial				Total			
	actividad		porcentaje		actividad		porcentaje		actividad		porcentaje	
<b>GDH</b>	±		±		±		±		±			
0.5	353.36	58.21	87.03	1.31	52.10	8.72	12.97	1.31	405.46	65.28	100.00	
1	536.89	94.47	81.70	1.12	122.45	22.48	18.24	1.11	658.43	115.95	100.14	
2	911.61	173.92	79.71	2.03	230.93	43.75	20.29	2.03	1142.54	212.25	100.00	
3	2050.13	474.63	88.15	1.00	256.23	45.58	11.85	1.00	2306.36	519.88	100.00	
5	3484.22	989.98	89.02	1.63	381.88	76.32	10.98	1.63	3866.10	1060.12	100.00	
<b>OTC</b>												
0.5	231.47	58.86	78.37	3.12	60.64	16.35	21.63	3.12	292.11	73.10	100.00	
1	672.00	206.33	84.08	0.72	130.20	41.39	15.92	0.72	802.20	247.56	100.00	
2	845.87	256.03	81.54	2.46	212.96	78.12	18.46	2.46	1058.83	332.72	100.00	
3	1494.40	420.08	89.82	1.12	174.88	57.37	10.18	1.12	1669.28	474.48	100.00	
5	2736.67	1100.32	88.46	1.54	301.80	72.85	11.54	1.54	3038.47	1172.89	100.00	
<b>MDH</b>												
0.5	229.61	44.23	78.34	3.38	74.72	27.03	21.66	3.38	304.33	70.98	100.00	
1	498.87	100.71	80.22	2.60	140.76	48.33	19.78	2.60	639.63	148.41	100.00	
2	907.18	214.65	81.38	3.24	234.01	79.70	18.62	3.24	1141.19	290.73	100.00	
3	1568.01	301.65	88.97	1.00	204.20	59.41	11.03	1.00	1772.20	358.53	100.00	
5	2961.88	621.71	89.82	0.54	336.67	73.18	10.18	0.54	3298.55	693.29	100.00	
<b>AST</b>												
0.5	385.75	69.49	82.40	1.01	86.72	21.94	17.60	1.01	472.47	91.25	100.00	
1	767.72	122.90	85.69	0.61	130.75	25.36	14.31	0.61	898.47	148.01	100.00	
2	1661.63	331.27	86.59	2.39	279.68	89.34	13.41	2.39	1941.31	414.79	100.00	
3	2767.78	504.78	92.16	0.77	242.72	62.46	7.84	0.77	3010.50	562.72	100.00	
5	5178.01	994.41	91.96	0.52	438.08	60.78	8.04	0.52	5616.09	1053.57	100.00	

**Tabla 8.10 Actividad de las enzimas GDH, OTC, MDH y AST en la fracción mitocondrial y el medio extramitocondrial en diferentes cantidades de proteína mitocondrial y condiciones fosforilantes**

	Botón Mitocondrial				Medio Extramitocondrial				Total			
	actividad		porcentaje		actividad		porcentaje		actividad		porcentaje	
<b>GDH</b>	±		±		±		±		±			
0.5	294.18	43.37	94.07	2.40	17.66	6.19	5.93	2.40	311.84	43.92	100.00	
1	825.46	184.15	93.96	3.28	41.26	16.54	6.04	3.28	866.72	174.29	100.00	
2	1341.42	308.12	87.16	3.09	158.75	14.04	12.84	3.09	1500.18	305.99	100.00	
3	1979.48	437.65	87.07	1.23	269.71	33.24	12.93	1.23	2249.19	469.81	100.00	
5	3412.14	645.77	86.73	0.95	509.71	90.17	13.27	0.95	3921.85	728.86	100.00	
<b>OTC</b>												
0.5	223.07	59.16	89.96	3.06	22.24	6.13	10.04	3.06	245.31	60.40	100.00	
1	574.40	168.01	92.82	1.93	34.72	6.00	7.18	1.93	609.12	169.18	100.00	
2	1016.53	307.22	91.66	0.90	85.44	20.99	8.34	0.90	1101.97	326.86	100.00	
3	1576.00	419.66	91.91	1.47	144.48	39.38	8.09	1.47	1720.48	454.37	100.00	
5	2925.00	879.61	92.73	0.56	225.40	59.92	7.27	0.56	3150.40	938.14	100.00	
<b>MDH</b>												
0.5	220.44	41.00	89.83	2.12	22.00	3.11	10.17	2.12	242.45	40.06	100.00	
1	556.63	117.28	90.67	1.33	51.48	5.94	9.33	1.33	608.11	123.03	100.00	
2	993.57	220.75	90.64	0.51	101.65	22.26	9.36	0.51	1095.22	242.43	100.00	
3	1448.07	278.18	89.97	0.72	168.33	40.80	10.03	0.72	1616.40	317.80	100.00	
5	2582.40	427.30	91.20	0.12	250.09	43.90	8.80	0.12	2832.49	471.05	100.00	
<b>AST</b>												
0.5	367.05	74.93	88.33	0.55	49.47	12.05	11.67	0.55	416.52	86.85	100.00	
1	922.70	169.59	93.54	0.95	60.75	11.44	6.46	0.95	983.45	177.70	100.00	
2	1858.01	310.73	93.73	0.41	127.15	28.69	6.27	0.41	1985.15	337.46	100.00	
3	2701.43	397.03	93.28	0.76	199.22	41.01	6.72	0.76	2900.64	431.73	100.00	
5	4879.55	479.55	93.47	0.83	346.43	69.64	6.53	0.83	5225.98	528.56	100.00	