



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
Biología Experimental

**Análisis de la composición de ácidos grasos de las membranas asociadas a
mitocondrias (MAMs) durante el desarrollo de la diabetes**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Escutia Martínez Jorge

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Ricardo Mejía Zepeda
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM
COMITÉ TUTOR: Dra. María Margarita Canales Martínez
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM
Dr. Federico Martínez Montes
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
Biología Experimental

**Análisis de la composición de ácidos grasos de las membranas asociadas a
mitocondrias (MAMs) durante el desarrollo de la diabetes**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Escutia Martínez Jorge

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Ricardo Mejía Zepeda
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM
COMITÉ TUTOR: Dra. María Margarita Canales Martínez
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM
Dr. Federico Martínez Montes
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2022

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

OFICIO CPCB/545/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 25 de abril de 2022 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en el campo de conocimiento de (Biología Experimental) del estudiante ESCUTIA MARTÍNEZ JORGE con número de cuenta 310343921 con la tesis titulada "Análisis de la composición de ácidos grasos de las membranas asociadas a mitocondrias (MAMs) durante el desarrollo de la diabetes", realizada bajo la dirección del DR. RICARDO MEJÍA ZEPEDA, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN
Vocal: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
Vocal: DRA. EMMA BERTA GUTIÉRREZ CIRLOS MADRID
Vocal: DRA. CLARA ORTEGA CAMARILLO
Secretario: DRA. MARÍA MARGARITA CANALES MARTÍNEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 07 de junio de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de posgrado, número de apoyo: 760902.

Al apoyo otorgado por el proyecto PAPIIT IN213421 al Dr. Ricardo Mejía Zepeda

A los miembros de mi comité tutorial:

Dra. María Margarita Canales Martínez

Dr. Federico Martínez Montes

Dr. Ricardo Mejía Zepeda

Agradecimientos a título personal

A los miembros del jurado:

Dr. Diego González Halphen

Dr. José Pedraza Chaverri

Dra. Emma Berta Gutiérrez Cirlos Madrid

Dra. Clara Ortega Camarillo

Dra. María Margarita Canales Martínez

Valoro en demasía la paciencia y el tiempo que cada uno de ustedes ha invertido en la revisión de mi trabajo, cada una de sus observaciones me sirvió para mejorar tanto la tesis como mis conocimientos y mis formas. Gracias.

Dedicatorias

A mi familia, de nuevo muchas gracias por confiar en mí, a mi papá José Luis muchas gracias por todo, me gusta mostrarte mis logros y que tú sepas que valió la pena, te amo gracias por forjar carácter en mí, a mi madre Ivonne sabes que te amo, muchas gracias por todo tu apoyo y todas las alegrías que me regalas, espero estar devolviendo un poco de esa felicidad a tu ser, te amo. A mis hermanos David y Fernando, gracias por siempre ser ese momento de relajación que siempre se necesita, esos amigos incondicionales, los quiero mucho chuvis, nunca sabrán cuanto les agradezco.

Rodrigo, Lalito, Lucio, Juanito, Anthony (Chino), muchas gracias es súper divertido ir de fiesta con ustedes, han sido un apoyo muy bueno en momentos de estrés, espero que siempre se conserve un poco de esas salidas.

Morty, Guagua, Chave, nena y Musifus, Arya, muchas gracias en especial a ti Muma que cuando me siento mal vienes y te acuestas conmigo, mis compañeros incondicionales los amo, me llenan de alegría.

A mis amigos, ¡Oh lalá!, Diana Pay muchas gracias por todo, estuviste en una de las etapas más difíciles y siempre me llenaste de tu alegría, me diste todo tu apoyo y confianza, me enseñaste tanto, siempre tendrás un lugar muy especial en mi corazón y espero que nuestra amistad dure una vida. Montaña y Metz son un team que está muy cañón, las quiero mucho, son unas niñas únicas, gracias por ser mis amigas incondicionales. A mis amigos de la carrera no los olvido, aunque estuvimos algo separados por la pandemia sé que siempre conté con ustedes y aunque fuera por fotos o en línea me dio mucha alegría saber de ustedes, Elizabeth, Cynthia, Abril, Kevin, Liz, Lalo, Alan, Tania, Andrea, Mari, Madariaga, Marianita, Cielo... si olvidé a alguien discúlpeme es la edad. Se vienen los pesos pesados, señor Brito muchas gracias por su amistad, por sus pláticas frikis y por sus consejos tan maduros, usted sabe que lo aprecio mucho, aunque coma pizza sin mí y no me invite a sus parrilladas, Ferchi amigo sé que quizá no somos los más cercanos, pero parte de esto fue gracias a ti, neta es inolvidable saber que nos enseñaste evolución antes del examen para entrar al posgrado, te diste tu tiempo y eso fue de gran ayuda, créeme que no lo voy a olvidar, Gino Hvitserk señor en este proceso nos volvimos cercanos y debo decir que disfruto bastante de su amistad, no cambie señor es usted una gran persona. Facio señor Hakaishin Hokage, su amistad es única, gracias por tantos memes, por hacerme sentir esa sensación de admiración entre amigos, siempre seguiremos nuestro camino ninja de veras. Aldo usted es mi hermano de palabra, gracias por todas esas desveladas platicando y viendo vikingos, todos los momentos de relax que tenemos, los casi 8 años que llevamos de conocernos, usted me ha demostrado ser una de esas personas que difícilmente se encuentran en esta vida, gracias de nuevo. Brendi sin importar el poco contacto que hemos tenido, sabes que sigues siendo una

persona muy importante en mi vida, te quiero mucho, me llenó de mucho orgullo cuando te dieron tu grado de maestría, sigue así, eres la mejor compi. Guzman a pesar de la distancia y el tiempo que dejamos de hablarnos, continuamos aquí, siendo amigos incondicionales, dándonos consejos, riéndonos de nuestras tonterías, en fin, sigues siendo Guz Guz, te extraño en el lab, espero que nunca termine esta amistad cachetona. Belemcita, te quiero mucho, no sé cómo empezar a agradecerte, pues siempre estuviste ahí, dándome ánimos, consejos, haciéndome reír, siempre fuiste todo, gracias por apoyarme en los momentos difíciles, sabes que siempre cuentas conmigo y siempre estaré para ti, te convertiste en alguien demasiado importante en mi vida, quiero que lo sigas siendo, siempre quiero que seas feliz, nos falta mucho por conocer, SUERTE.

A mis profesores, muchas gracias, me entregaron conocimiento en tantas maneras, eso me llena de alegría y nunca terminaría de agradecer por todo lo que me han aportado.

A mis compañeros de laboratorio, muchas gracias, son bien chidos, es súper padre platicar de todo con ustedes. Yaz, Iván y David, los admiro mucho, espero que sean todo lo que se propongan. Ramiro nunca pensé que nos llevaríamos tan bien, quizá porque somos un tanto introvertidos, pero es placentero criticar películas y hablar sobre el futuro de algunos universos contigo. Karlita obvio eres la más especial del lab 4 para mí, juntos empezamos y juntos terminamos, así es desde la licenciatura y parece que será igual en el doctorado, ya vamos a poner atención en los tramites amiga jajaja te quiero mucho.

Doctor Ricardo, muchas gracias por brindarme su apoyo para realizar mis estudios de posgrado, usted es un gran ser humano, lo admiro demasiado, gracias por compartir su conocimiento, por su comprensión y su paciencia para guiarme en este proceso.

Agradezco especialmente a la doctora Figueroa por sus observaciones tan puntuales, siempre es necesario tener ayuda de alguien tan imparcial como usted, la admiro mucho doctora.

Geo tú también te ganaste un lugar, ya que siempre nos ayudas con todas nuestras dudas con los tramites y eres muy atenta, muchas gracias eres la mejor.

Finalmente, gracias a todas las personas que ya no están, esta pandemia fue difícil, de verdad muy difícil y verlos partir lo complico más, pero siempre los recordaremos, Ismael me enseñaste mucho, por ti estoy en esto, nunca olvidare como gritaste cuando te dije que pasé el examen a la primera, me gustaría que estuvieras aquí y poder festejar con esa chelita que nunca nos pudimos tomar. Abuelita Leo, tía Silvia, señor Tomas y Héctor, siempre estarán en nuestros corazones.

Gracias

Fuego ardiente dentro de mí, mi mirada está en el horizonte
La decepción murió, llegaré a la meta
Se cumplirá lo sé, el futuro un triunfo me depara
Nada se interpondrá, la debilidad se esfumó
Ardiendo está, la llama en mí, la victoria me pertenece ya
El poder, del fuego habrás de tener con invencible corazón, tuyo será

En tus ojos hay, ese gran poder, resplandece con su gran luz
La frontera tú haz de alcanzar, más allá tú irás
Y mi corazón lejos volará, hacia el horizonte verás
Los conocimientos están en cualquier lugar, se expanden por el mundo
Corre sin descansar, hoy junto a ti puedes verlo
Arde la llama en mí

Índice

| | |
|---|----------|
| Resumen..... | 1 |
| Abstract..... | 3 |
| 1. Introducción..... | 5 |
| 1.2 Composición y síntesis de las membranas biológicas..... | 6 |
| 1.3 Retículo endoplásmico..... | 9 |
| 1.4 Membranas asociadas a las mitocondrias..... | 10 |
| 1.5 Mitocondrias | 10 |
| 1.6 Condición estresante..... | 14 |
| 2. Hipótesis..... | 17 |
| 3. Objetivo..... | 17 |
| 3.1 Objetivos particulares..... | 17 |
| 4. Material y métodos..... | 17 |
| 4.1 Obtención de animales para experimentación..... | 18 |
| 4.2 Inducción de la diabetes experimental tipo 1 con estreptozotocina | 18 |
| 4.3 Sacrificio y obtención de orgánulos. | 19 |
| 4.4 Respiración mitocondrial | 20 |
| 4.5 Composición de ácidos grasos..... | 20 |
| 4.6 Análisis estadístico | 23 |
| 5. Resultados | 24 |
| 5.1 Peso de ratas Wistar control e inducidas a Diabetes Experimental tipo 1 | 24 |
| 5.2 Concentración de glucosa en sangre | 25 |
| 5.3 Control respiratorio | 26 |
| 5.4 Composición de ácidos grasos de tejido hepático, retículo endoplásmico, membranas asociadas a mitocondrias y mitocondrias de ratas Wistar | 27 |
| 5.4.1 Comparación de la relación I/S de tejido hepático, retículo endoplásmico, membranas asociadas a mitocondrias y mitocondrias..... | 28 |
| 5.5 Composición de ácidos grasos de tejido hepático y mitocondrias a 7, 15 y 30 días de la inducción a DE 1 | 29 |
| 5.5.1 Comparación de la relación I/S de tejido hepático y mitocondrias. | 33 |
| 5.6 Composición de ácidos grasos de RE y mitocondrias a 7, 15 y 30 días de la inducción a DE 1. | 33 |
| 5.7 Composición de ácidos grasos de MAMs y mitocondrias a 7, 15 y 30 días de la inducción a DE 1. | 38 |

| | |
|--|----|
| 5.7.1 Comparación de la relación I/S de MAMs y mitocondrias. | 42 |
| 6. Análisis de mitocondrias completas | 43 |
| 7. Discusión | 46 |
| 7.1 Peso y glicemia | 46 |
| 7.2 Control Respiratorio..... | 47 |
| 7.3 Composición de ácidos grasos..... | 48 |
| 7.3.1 Composición de ácidos grasos de tejido hepático y mitocondrias | 49 |
| 7.3.2 Composición de ácidos grasos de RE y mitocondrias | 50 |
| 7.3.3 Composición de ácidos grasos de MAMs y mitocondrias..... | 52 |
| 7.4 Análisis de fracción mitocondrial | 54 |
| 8. Conclusión..... | 57 |
| Referencias Bibliográficas..... | 58 |
| Anexo | 67 |

Abreviaturas

ACC1: acetil-CoA-carboxilasa 1

ADP: adenosín difosfato

ATP: adenosín trifosfato

AGs: ácidos grasos

Acetil CoA: Acetil coenzima A

ANOVA: análisis de varianza

ATP: adenosín trifosfato

BHT: hidroxitoluenobutilado

CAG: composición de ácidos grasos

CLA: ácido linoleico conjugado

CR: control respiratorio

DE 1: diabetes experimental tipo 1

DHA: ácido docosaheptaenoico

DMT 1: diabetes mellitus tipo 1

DMT 2: diabetes mellitus tipo 2

DNA: ácido desoxirribonucleico

E3: estado 3

E4: estado 4

EPA: ácido eicosapentaenoico

FAS: Sintasa de ácidos grasos

FID: detector de ionización de flama

Fig: figura

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

I/S: ácidos grasos insaturados sobre saturados

MAMs: membranas asociadas a mitocondrias

MCS: sitios de contacto entre membranas

n: muestra

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido

ND: no detectado

NI: no identificado

O: oxígeno atómico

p: valor de probabilidad

PC: fosfatidilcolina

PI: fosfatidilinositol

PS: fosfatidilserina

RE: retículo endoplásmico

ROS: especies reactivas de oxígeno

STZ: estreptozotocina

TCA: ciclo del ácido tricarboxílico

Xg: gravedades

Resumen

Introducción. Las membranas biológicas son de vital importancia, ya que aíslan a la célula del medio externo y contienen una asombrosa variedad de componentes, entre ellos los lípidos, que tienen múltiples funciones para la célula. Se ha reportado que las membranas cambian su composición estructural bajo diferentes condiciones de estrés, por ejemplo, la composición de ácidos grasos (CAG), así como la fluidez de la membrana mitocondrial de hígado y placenta de ratas Wistar inducidas a diabetes tipo 2 (DMT 2); se reportó que el índice de fluidez aumentó en mitocondrias, pero disminuyó en el tejido total. Entender los mecanismos que actúan en la regulación de la formación y por lo tanto en la composición de las membranas es de gran importancia para saber si están relacionados con su función. Hasta hace poco se aceptaba que la síntesis de los lípidos tiene lugar en el retículo endoplásmico (RE) y que de ahí se distribuyen a toda la célula sin sufrir modificaciones, pero no se sabe de manera precisa qué ocurre en las membranas de los demás orgánulos, por ejemplo, en las mitocondrias. Recientemente se introdujo la idea de que las membranas asociadas a mitocondrias (MAMs) son las responsables de este transporte. El objetivo de este trabajo es generar información relacionada con la regulación de los lípidos, especialmente de la CAG, de las membranas mitocondriales. Hipótesis. La composición de ácidos grasos de las MAMs resultará más parecida a las mitocondrias que la del RE a estas, durante alguna condición estresante, lo que sugiere que la CAG de la mitocondria está siendo regulada por las MAMs. Objetivo. Mediante una condición estresante, como la diabetes, investigar si la CAG de las mitocondrias es regulada a través de las MAMs. Métodos. Se obtuvieron 21 ratas Wistar, 3 se sacrificaron al inicio del experimento, 9 ratas fueron inducidas a una hiperglicemia severa con una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) y 9 fueron utilizadas como control, se programaron sacrificios cada semana (0, 7, 15 y 30 días). De todos los animales se obtuvo tejido hepático, RE, MAMs y mitocondrias por centrifugaciones diferenciales. La composición de ácidos grasos se determinó por cromatografía de gases y para el análisis estadístico se realizó una prueba de análisis de varianza

(ANOVA) de dos vías. Resultados. Se encontró que el tejido y las mitocondrias de animales con hiperglicemia son diferentes, existiendo una mayor porcentaje de ácidos grasos (AGs) saturados en la mitocondria, algo que no sucedió en organismo control, lo que nos indica que bajo una condición estresante las mitocondrias regulan su CAG de manera distinta a la del tejido del que provienen, además, el cambio en la CAG por la STZ modificó el CR. Comparando RE y MAMs con las mitocondrias se observa que en animales control estas fracciones son distintas a partir de los 15 días, incrementando el índice de fluidez hasta 1.83 en las mitocondrias, mientras que en estos orgánulos se obtuvieron valores para este cociente de 1.24 y 0.89 respectivamente, sin embargo, en animales con hiperglicemia, a pesar de que ocurre un fenómeno similar a los 15 días, a los 30 días no se observan diferencias, lo cual puede deberse al estrés severo y prolongado al que fueron expuestas estas mitocondrias. Esto también podría indicar que la condición estresante provoca que las mitocondrias se diferencien de las MAMs, el fenómeno de igualdad a los 30 días también podría indicar que cuando la condición estresante es severa y prolongada, tanto MAMs como RE toman control de la CAG de las mitocondrias. Conclusión. Las MAMs participan más activamente en la regulación de la CAG de las mitocondrias en momentos específicos tanto por la edad como por alguna condición estresante, lo que sugiere que en mitocondrias podría existir un mecanismo desconocido que participa en la regulación de su CAG de manera alterna a lo que suceda en RE y MAMs en momentos específicos de la edad y de una condición estresante.

Abstract

Introduction. The biological membranes are very important for life; they not only isolate the cell from the external medium, but also contain an amazing variety of components such as the lipids, among them, that have several functions in the cell. It has been reported that the membranes are dynamic entities that changes its structure and composition under different stressful conditions, for example, the fatty acids composition, as well as the membrane fluidity, of mitochondria from liver and placenta of Wistar rats induced to type 2 Diabetes Mellitus (DMT 2); it was reported that the fluidity index increased in these mitochondria, but decreased in the total tissue lipids. It is of great relevance to understand the mechanisms involved in the formation and regulation of membranes composition in order to know their function. Not so far ago, it was accepted that the lipid synthesis takes place in the endoplasmic reticulum (ER) and then lipids were distributed to the whole cell without modifications, but it is not known precisely what happen in the membranes of other cell organelles, such as the mitochondria. Recently it was introduced the idea that the Mitochondria Associated Membranes (MAMs) are the responsible for this transport into mitochondria. In this research we are interested in generating information related with the regulation of mitochondrial membrane lipids, particularly the fatty acids composition (FAC). **Hypothesis.** The fatty acids composition of the MAMs will be more alike to mitochondrial FAC than to ER FAC, especially during a stressful condition, which suggest that the mitochondrial FAC is being mainly regulated by the MAMs. **Objective.** Using a stressful condition such as the diabetes, find out if the FAC of mitochondria is regulated trough the MAMs. **Methods.** 21 Wistar rats were used in this study, 3 were sacrificed at the beginning of the experiment as control, 9 were induced to severe hyperglycaemia by a intraperitoneal injection of streptozotocin, and 9 were used as controls. 3 rats from each group were sacrificed every week (0, 7, 15 and 30 days). From every animal it was obtained a sample of homogenized tissue, and by differential centrifugations endoplasmic reticulum, MAMs, and mitochondria. The fatty acids composition was analyzed by gas chromatography and for the statistical analysis a two-ways

ANOVA was used. **Results.** It was found that the tissue and mitochondria of animals with hyperglycaemia are different, something that did not happen in control organisms, which indicated that under a stressful condition the mitochondria regulate their FAC in a different way from the tissue where they were extracted. Also, the change in the FAC by STZ modified the CR. Comparing ER and MAMs with mitochondria, we can see in control animals that these fractions are different after 15 days of starting the experiment, however, in animals with hyperglycaemia, despite the fact that a similar phenomenon takes place at 15 days, at 30 days there are not differences, which can be due to the severe and prolonged stress that these mitochondria were exposed. This could also indicate that the stressful condition begins differentiating mitochondria from MAMs, the equality phenomenon at 30 days could also indicate that a prolonged and severe stressful condition, drives MAMs and ER to take control of the mitochondria FAC. **Conclusion.** The MAMs participate more actively in the regulation of mitochondrial FAC in specific moments, both by aging and a stressful condition, which suggest that in mitochondria could exist an unknown or undiscovered mechanism that participate in the regulation of its fatty acids composition in an alternative way to what happened in ER and MAMs at specific moments of the age and the stressful condition.

1. Introducción

Las membranas biológicas son de vital importancia, ya que aíslan a la célula del medio externo y contienen una asombrosa variedad de componentes, entre ellos los lípidos, las cuales tienen múltiples funciones para la célula, como en la duplicación y división celular, en la regulación de la actividad de enzimas de membrana como las implicadas en la fosforilación oxidativa, en la actividad de los receptores de membrana plasmática o de los receptores nucleares, en el transporte y la comunicación celular (intracelular y extracelular) (Lowe *et al* 2020). Se ha reportado que las membranas cambian su composición estructural bajo diferentes condiciones de estrés y de maneras diferentes (Gennis, 1989), por ejemplo, en el análisis de la CAG, así como la medición de la fluidez de la membrana mitocondrial de hígado y placenta de ratas Wistar inducidas a una diabetes tipo 2 (DMT 2), se encontró que la fluidez aumentó en las mitocondrias, pero disminuyó en el tejido total, por lo que se propuso que las mitocondrias regulan su CAG de manera diferente a la del tejido del que provienen (Figueroa-García *et al* 2015; Pérez-Hernández *et al* 2017).

Entender los mecanismos que actúan en la regulación de la formación y por lo tanto en la composición de las membranas es de gran importancia para saber si están relacionados con su función. Recientemente se aceptaba que la síntesis de los lípidos tiene lugar en el RE y se asume que de ahí se distribuyen a toda la célula sin sufrir modificaciones. Sin embargo, no se sabe de manera puntual qué ocurre en las membranas de los demás orgánulos, por ejemplo, en las mitocondrias. Recientemente se introdujo la teoría de que las MAMs son las responsables de este transporte (Kornmann *et al* 2009; Szymański *et al* 2017). Se ha reportado que la CAG de RE y mitocondrias de tejido hepático es diferente, bajo condiciones normales y condiciones de estrés (Escutia, 2019), por lo cual, el RE podría no ser completamente responsable de proveer los lípidos necesarios para regular la composición de las membranas mitocondriales. Otros autores señalan que la separación entre RE y mitocondrias por medio de las MAMs es de 10-25 nm, una distancia que aún permite el intercambio de proteínas y lípidos del

RE con los de la membrana mitocondrial externa (Csordas *et al* 2006), lo cual lleva a pensar que las MAMs actúan como mediadoras de estos procesos. Además, por lo encontrado en diversos estudios proteómicos, como el hallazgo de proteínas específicas para la síntesis de lípidos (fosfatidilserina sintasa 1y 2), se propone que las MAMs son responsables mayormente del transporte no vesicular de fosfolípidos (Hayashi *et al* 2009; Zhang *et al* 2011; Poston *et al* 2013).

En este trabajo nos interesa generar información relacionada con la regulación de los lípidos, especialmente de la CAG, de las membranas mitocondriales.

1.2 Composición y síntesis de las membranas biológicas

La membrana plasmática rodea a la célula, definiendo su extensión y manteniendo las diferencias esenciales entre su contenido y su entorno. Dentro de la célula eucariota, las membranas del RE, del complejo de Golgi, de las mitocondrias y de otros orgánulos mantienen las diferencias características de estos orgánulos (Stöckl *et al* 2003). Todas las membranas biológicas tienen una estructura básica común, una bicapa de fosfolípidos y proteínas, que se mantienen unidas por el efecto hidrofóbico. Es importante aclarar que la bicapa lipídica no está compuesta únicamente por fosfolípidos; además contienen colesterol, glicolípidos y proteínas, lo que permite que las membranas celulares sean estructuras dinámicas y fluidas (Lodish, 2016). La fluidez de las membranas celulares es importante, ya que procesos como el transporte o actividades enzimáticas pueden detenerse cuando la viscosidad de la membrana se modifica, además de la composición, la fluidez de una bicapa depende de la temperatura (Alberts *et al* 2016). Los AGs son los principales responsables de la fluidez; se han analizado membranas donde la concentración de colesterol es cambiante, pero no afecta de manera significativa a la fluidez (Pérez-Hernández *et al* 2010). Sin embargo, se debe tomar en cuenta que las balsas lipídicas, a las cuales se les asocia esta contribución del colesterol para participar en la fluidez, son temporales y localizadas (Sonnino y Prinetti, 2013), lo que puede sugerir que el colesterol participa en momentos específicos,

asociados con otros componentes como los esfingolípidos, por lo cual puede que no se haya tomado en cuenta su importancia en los reportes antes mencionados.

Un componente esencial para la síntesis de fosfolípidos son los ácidos grasos, cadenas hidrocarbonadas con un grupo carboxilo terminal, con lo cual obtienen la característica de ser anfipáticos. Estos AGs se pueden clasificar como no esenciales (los que sintetiza el organismo) y esenciales (los que el organismo no puede sintetizar). El hígado es de los principales tejidos donde se lleva a cabo la biosíntesis de los ácidos grasos y los triglicéridos, además, es el órgano central para la interconversión y su metabolismo. La síntesis de ácidos grasos se lleva a cabo en el citosol de las células y el producto activo para la síntesis es el acetil Coenzima A (CoA) proveniente de la glucólisis. A esta ruta también se le conoce como “síntesis de novo” o síntesis completa (Maher *et al* 2018). La acetil-CoA se convierte dentro del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) en citrato y posteriormente se transporta al citoplasma por el transportador de citrato. En el citoplasma, el citrato es escindido por la citrato liasa que regenera la acetil-CoA que luego puede usarse para la síntesis de AGs. El primer paso y limitante de la síntesis de AGs es la carboxilación dependiente de ATP (adenosín trifosfato), se pasa de acetil-CoA a malonil-CoA catalizada por acetil-CoA-carboxilasa 1 (ACC1). Los pasos restantes son catalizados por el complejo FAS por sus siglas en inglés “Fatty Acid Synthase”, que conduce una serie de reacciones hasta que se sintetiza el ácido palmítico, AG de 16 carbonos. Esto puede producir un mayor alargamiento y desaturación en la membrana del RE (Salati y Goodridge, 1996).

Los AGs esenciales obtenidos de la dieta, se suministran en forma de triacilglicéridos, que se deben hidrolizar para dar ácidos grasos y monoacilglicéridos antes de ser absorbidos, los AGs provenientes de la dieta son digeridos en el intestino delgado y transportados al hígado. Los fosfolípidos son hidrolizados por la fosfolipasa A2, y los principales productos son lisofosfolípidos y ácidos grasos libres. Los ácidos grasos libres y los monoglicéridos son absorbidos por los enterocitos de la pared intestinal. En general, los ácidos grasos con longitudes de cadena inferiores a 14 átomos de carbono entran directamente en el

sistema de la vena porta y son transportados hacia el hígado. Los ácidos grasos con 14 o más átomos de carbono se vuelven a esterificar dentro del enterocito y entran en circulación a través de la ruta linfática en forma de quilomicrones. Sin embargo, la ruta de la vena porta también ha sido descrita como una ruta de absorción de los ácidos grasos de cadena larga (Sáyago-Ayerdi *et al* 2008).

Los AG también se pueden clasificar de acuerdo con la longitud de la cadena y al grado de insaturaciones que presenten, esto después de pasar por procesos de elongación y de desaturación por enzimas específicas (elongasas y desaturasas), que se encargan de alargar la cadena previamente formada o de integrar una o más insaturaciones respectivamente. La formación de los omega-6 (derivados del ácido linoleico) y los omega-3 (derivados del ácido alfa-linolénico), depende de desaturasas que sólo se encuentran en organismos vegetales (Martínez *et al* 2013).

La síntesis de fosfolípidos ocurre de la siguiente manera, usando como ejemplo la fosfatidilcolina (PC), que puede formarse en tres etapas a partir de dos ácidos grasos, glicerolfosfato y colina. Cada etapa está catalizada por enzimas de la membrana del RE que tienen sus sitios activos dispuestos hacia el citosol, donde se encuentran los metabolitos necesarios. En la primera etapa, las acil-transferasas añaden dos ácidos grasos al glicerofosfato produciendo ácido fosfatídico, este compuesto ya es suficientemente hidrofóbico para permanecer en la bicapa lipídica, esta etapa es la que hace crecer la bicapa lipídica. Las etapas posteriores determinan el grupo de cabeza de la molécula lipídica y por lo tanto su naturaleza química, pero no suponen un crecimiento neto de la membrana (Stryer *et al* 2013).

La formación de membranas mitocondriales depende de la síntesis de PC, fosfatidilserina (PS) y fosfatidilinositol (PI), los cuales se generan en el RE como se menciona anteriormente, se transportan a la mitocondria por la vía vesicular clásica, (Böttlinger *et al* 2015; Mejía y Hatch, 2015), sin embargo, actualmente se propone que los sitios de contacto entre el RE y las mitocondrias nombrado MAMs por sus siglas en inglés “mitochondria-associated ER membrane”, parecen ser

responsables de la mayor parte del transporte de lípidos entre estos dos orgánulos (Kornmann *et al* 2009).

1.3 Retículo endoplásmico

El retículo endoplásmico es el orgánulo celular con la membrana más extensa de la célula, que cuenta con dos regiones bien definidas, una corresponde al RE rugoso, que se caracteriza por tener una gran cantidad de ribosomas asociados, encargados de la síntesis de proteínas, para su uso en la membrana o para secreción. El RE liso, es el sitio de síntesis de lípidos, por ejemplo, la síntesis de fosfolípidos como se describió anteriormente (Alberts *et al* 2016).

Actualmente, entendemos al RE como estructuras que se comunican con otros orgánulos, permitiendo la transferencia de lípidos e iones, la señalización y el crecimiento de orgánulos mediante sus sitios de contacto de membrana, en inglés Membrane contact site (MCS), que llegan a ser específicos dependiendo del orgánulo. El RE regula una amplia variedad de funciones clave, mediante gran cantidad de procesos celulares a través de sus MCS con varios orgánulos y con la membrana plasmática. Los sitios de contacto del RE regulan la dinámica de otros orgánulos, como la composición de sus membranas (WU *et al* 2018).

El RE es multifuncional y necesita gran coordinación con el medio intracelular y una respuesta rápida a los cambios en el medio. Frente al estrés, el RE mantiene su homeostasis mediante la activación de las vías de respuesta metabólicas, como la vía de señalización llamada respuesta de proteína desplegada (UPR). La activación prolongada de las vías de respuesta al estrés en el RE es habitual en la diabetes (Schwarz y Blower, 2016).

1.4 Membranas asociadas a las mitocondrias

Las membranas asociadas a las mitocondrias, son una prolongación del RE, que resulta en un contacto con las mitocondrias, este enlace consiste en algunas proteínas y una región del RE que contiene enzimas para la síntesis de lípidos (Vance, 2014). Como se indicó anteriormente, este orgánulo podría ser el responsable de la formación y mantenimiento de las membranas mitocondriales, ya que estaría proveyendo o actuando como mediador en el transporte de AGs a las mitocondrias (Kornmann *et al* 2009). Recientemente se han propuesto como las responsables de la mayoría del transporte hacia las mitocondrias por su cercanía, llegando a nombrarlas retículo mitocondrial (Glancy, 2021). Además de ser considerados sitios de contacto, se reconoce como una fracción independiente ya que presenta funciones especializadas, como la síntesis e intercambio de fosfolípidos con la mitocondria (Tatsuta *et al* 2013).

Los sitios de contacto por su regionalización marcada con el RE, se consideran un orgánulo independiente, como sucede en este caso con las MAMs ya que presenta funciones propias (Scorrano *et al* 2019).

1.5 Mitocondrias

Las mitocondrias son orgánulos presentes en las células eucariotas, éstas muestran similitudes con los organismos procariotas, por ejemplo, se parecen a menudo a las bacterias en cuanto a tamaño, en forma, contienen ácido desoxirribonucleico (DNA) circular, fabrican algunas de sus proteínas y se reproducen por fisión, además incrementan su tamaño y productividad por fusión (Voet y Voet, 2006). Las mitocondrias son las responsables de la respiración. Están encargadas de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular, sintetizan ATP a expensas de piruvato, AGs y aminoácidos por medio de la fosforilación oxidativa (Stryer *et al* 2013).

La respiración se lleva a cabo por un del flujo de electrones a través de complejos proteicos embebidos en la membrana interna mitocondrial, que en su conjunto se denomina cadena respiratoria o cadena de transporte de electrones. Tres de los complejos de la cadena de transporte de electrones también bombean protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal. La acumulación de los protones genera un gradiente y un potencial eléctrico transmembranal que crea una fuerza protón- motriz. El ATP se sintetiza cuando los protones vuelven a la matriz mitocondrial mediante el complejo enzimático de la ATP sintetasa (Noji y Yoshida, 2001).

La mitocondria cuenta con un sistema de doble membrana, una externa y una interna, que separan tres espacios bien definidos, un espacio externo denominado citosol, el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial. Las membranas mitocondriales presentan bajas concentraciones de ciertos lípidos (entre el 30 y 40% menos), como el ácido fosfatídico, las esfingomielinas y los glicolípidos, los cuales son característicos de las membranas de células eucariotas. La membrana externa presenta un bajo porcentaje de colesterol (entre el 7%- 11%), en comparación con la membrana de algunas células que pueden llegar a presentar entre 25%-34% (Lodish, 2016). Su contenido peculiar de fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, cardiolipinas y la concentración baja de fosfatidilserina, es una característica de las membranas mitocondriales que las hace semejantes en composición, a las membranas de ciertas bacterias. Además, igual que las membranas plasmáticas, las mitocondriales mantienen una asimetría en la distribución de los lípidos, de modo que una alteración en esta distribución tiene consecuencias en su función (Geydan *et al* 2006).

La membrana interna mitocondrial es muy diferente, ya que ésta posee 80% de proteínas y 20% de lípidos. Se caracteriza por formar pliegues internos denominados crestas, que incrementan el área total de la superficie interna; el número de crestas está relacionado con las necesidades energéticas de la célula (Lodish, 2016). La membrana interna es impermeable a muchos solutos; por lo cual se requiere de proteínas transportadoras, que en su mayoría son

hidrofóbicas. También tiene un bajo contenido de colesterol (entre el 5 y 10%) y un alto contenido de difosfatidilglicerol (cardiolipina), lo cual permite que los lípidos que se encuentran en el medio externo y que sirven para llevar a cabo la β -oxidación, entren a la matriz mitocondrial (Lehninger y Cox, 2002). La matriz mitocondrial se caracteriza por contener altas concentraciones de enzimas del metabolismo oxidante (entre un 50-70 % del total), donde será utilizado el oxígeno como último aceptor de electrones, en una reducción tetravalente que tendrá como resultado la producción de agua, también contiene la maquinaria genética mitocondrial, que expresa 13 proteínas de la membrana mitocondrial interna, como las que participan en la fosforilación oxidativa y algunas otras como el factor de transcripción mitocondrial A, la proteína de unión a ADN mitocondrial de cadena sencilla y la helicasa Twinkle, por mencionar algunas (Stryer *et al* 2013; Mercer *et al* 2011).

Las mitocondrias mantienen una composición lipídica definida, lo cual les permite realizar sus funciones de manera adecuada, este comportamiento dinámico facilita la distribución celular de metabolitos derivados de mitocondrias y contribuye al control de calidad mitocondrial (Chan, 2012). Además, la disfunción mitocondrial está estrechamente relacionada con alteraciones en la composición de sus membranas debido a desórdenes metabólicos (Sorriento *et al* 2014). Desajustes metabólicos como los que se presentan en la diabetes conducen a alteraciones en la composición de membranas, por ejemplo, en la diabetes mellitus tipo 1 (DMT 1), donde la producción de insulina es nula por causa de la destrucción autoinmune de las células β del páncreas (Rivadeneira *et al* 2019).

En resumen, la CAG de las membranas mitocondriales posiblemente está siendo regulada por el RE y las MAMs como se presenta en la figura 1, donde se puede observar cómo después de la síntesis de fosfolípidos, las membranas del RE (fosfolípidos) se desprenden de este, pasan por las MAMs y finalmente llegan a las mitocondrias.

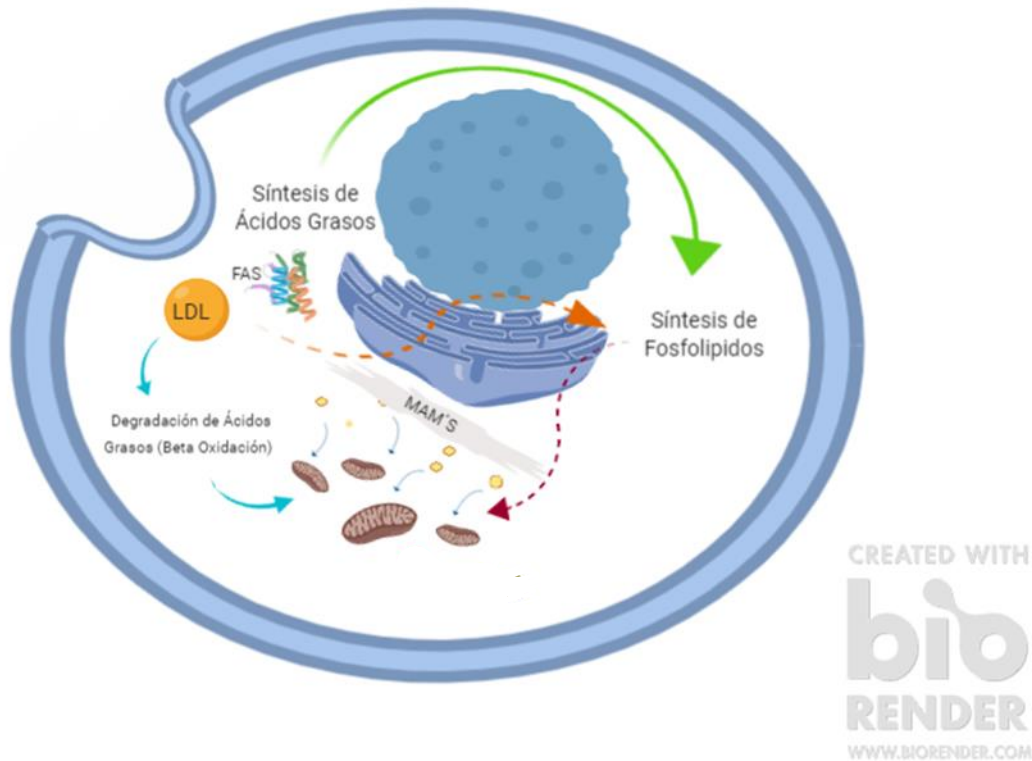


Figura 1. Síntesis y transporte de fosfolípidos vía vesicular. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) entran a la célula y liberan ácidos grasos provenientes de la dieta, los cuales servirán para la obtención de energía mediante la beta oxidación o pasarán a formar parte de los fosfolípidos mediante su síntesis en el RE. La FAS es la encargada de sintetizar ácidos grasos de novo, los cuales de igual manera pasarán a formar parte de los fosfolípidos. Una vez sintetizados los fosfolípidos se integran a las membranas del RE. Según lo descrito anteriormente, fracciones de esta membrana se libera hasta llegar a las mitocondrias como lo indica la flecha punteada color rojo, además se sugiere que los fosfolípidos, pasan por las MAMs y estas regulan su tráfico hasta las mitocondrias como se indica con las flechas pequeñas en color azul.

LDL, lipoproteínas de baja densidad; FAS, sintasa de ácidos grasos; MAMs, membranas asociadas a mitocondrias.

1.6 Condición estresante

En la DMT 1, el hígado produce una cantidad excesiva de glucosa que se libera a la sangre, además se modifica las membranas lipídicas (Gennis, 1989). Estos cambios en la composición de la membrana pueden modificar el control respiratorio (CR) que se explica de la siguiente manera, cuando la concentración de adenosín difosfato (ADP) aumenta, la velocidad de la fosforilación oxidativa se incrementa para cubrir las necesidades de ATP. La regulación de la velocidad de la fosforilación oxidativa por la concentración de ADP se conoce como CR. Cuando la regulación de la velocidad de la fosforilación oxidativa se descontrola, como lo reportado en animales diabéticos, se pierde el CR, lo cual indica que la respiración está desacoplada (Jiménez y Merchant, 2015).

En ratas Wistar hembra se encontró que, al inducir hiperglicemia y con el transcurso del tiempo, la proporción de ácidos grasos saturados aumentaba en la placenta, sin embargo, en las mitocondrias de esa placenta, aumentaba la proporción de ácidos grasos insaturados y con ello aumentaba la fluidez membranal (medida con un monitor fluorescente), además, hubo una disminución en el control respiratorio (CR) y un aumento en la lipoperoxidación de las mitocondrias de la placenta. Como las mitocondrias presentaron una composición de ácidos grasos diferente al tejido del que provenían, se propuso que las mitocondrias pudiesen conservar un mecanismo similar al de las bacterias, para la regulación de su composición de AG (CAG) independiente de los mecanismos conocidos (Figuroa-García *et al* 2015). Por lo tanto, una condición estresante como la hiperglicemia puede modificar la CAG. Un fenómeno similar se encontró con mitocondrias de tejido hepático de ratas de un mes de edad inducidas a desarrollar diabetes mellitus tipo 2 desde las 48 horas de nacidas; es decir la diabetes provocó en el tejido hepático un aumento de los ácidos grasos saturados, pero en la mitocondria indujo un aumento de los ácidos grasos insaturados. La fluidez membranal se evaluó con tres monitores fluorescentes y todos apuntan al mismo resultado, las mitocondrias regularon la CAG de sus membranas de manera diferente a la del tejido del que provienen (Pérez-Hernández *et al* 2017).

Por otro lado, se confirma que las MAMs sirven como mediadoras en el transporte de lípidos entre el RE y las mitocondrias, ya que físicamente intervienen en el intercambio de fosfolípidos entre estas dos fracciones, además de tener enzimas para la síntesis de fosfolípidos, se puede sintetizar en estas colesterol y ceramidas (Szymański *et al* 2017). Entonces de alguna manera, la composición de ácidos grasos de las mitocondrias, hepáticas y de placenta, no sólo son distintas a las de los tejidos de donde proceden, sino que, además, su respuesta ante una condición estresante como es la diabetes, las llevó a tener una composición de ácidos grasos cuyo cociente de fluidez (Insaturados/Saturados [I/S]) indica que su fluidez membranal aumentó, y no disminuyó como se propone para las membranas plasmáticas durante la diabetes (Pilon, 2016).

De acuerdo a lo que se conocía, el RE tendría que ser el responsable de los cambios encontrados en las mitocondrias (Alberts *et al* 2016)., así que, para abordar este problema, en estudios más recientes (Escutia, 2019), se analizó la composición de ácidos grasos de mitocondrias, RE y tejido total de hígado de ratas control e inducidas a diabetes experimental. Se encontró que la CAG del RE y de las mitocondrias es diferente, por lo que se propuso que puede haber una fracción subcelular (muy probablemente las MAMs) participando en este fenómeno. Además, en este equipo de trabajo se plantea la idea de que las mitocondrias podrían conservar un mecanismo independiente, como se indica en la figura 2, esto debido a su origen bacteriano, por el cual podrían estar regulando la CAG de sus membranas de manera diferente a la aceptada actualmente.

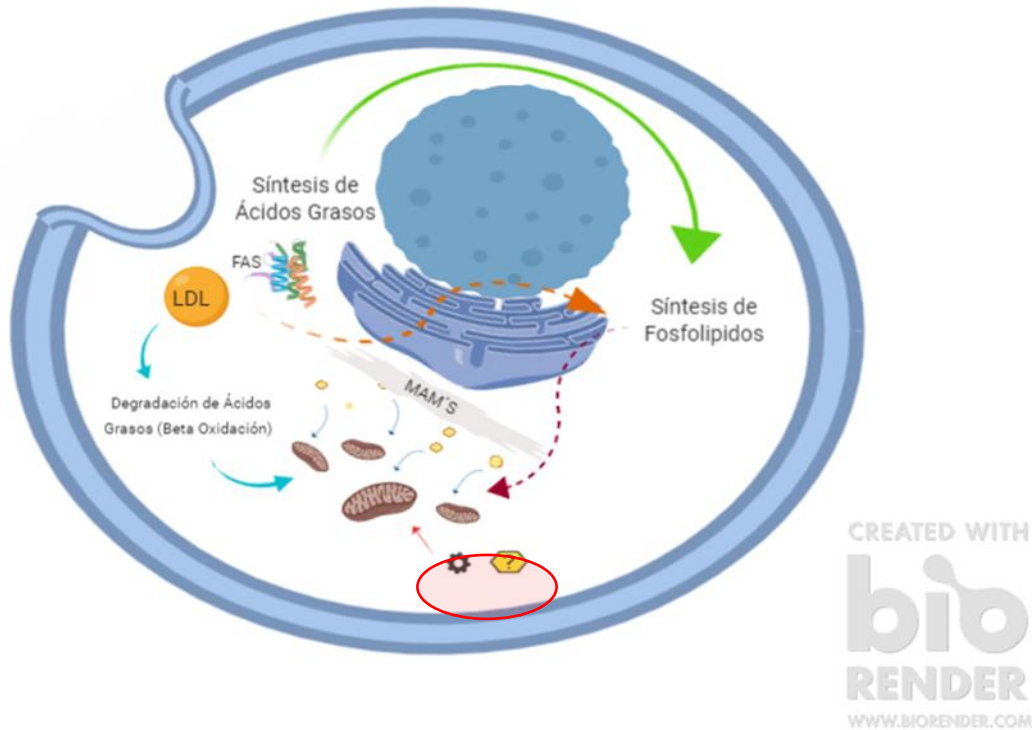


Figura 2. Síntesis y transporte de fosfolípidos por contacto con las MAM's, con la propuesta de que no toda la regulación de AGs de membranas mitocondriales proviene de un mismo sitio (RE) y que puede haber un mecanismo alternativo (Escutia, 2019). Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) entran a la célula y liberan ácidos grasos provenientes de la dieta, los cuales servirán para la obtención de energía mediante la beta oxidación o pasarán a formar parte de los fosfolípidos mediante su síntesis en el RE (flecha punteada color naranja). La FAS es la encargada de sintetizar ácidos grasos de novo, los cuales de igual manera pasarán a formar parte de los fosfolípidos (flecha verde). Una vez sintetizados los fosfolípidos se integran a las membranas del RE. Según lo descrito anteriormente, fracciones de esta membrana se libera hasta llegar a las mitocondrias como lo indica la flecha punteada color rojo, además se sugiere que los fosfolípidos, pasan por las MAMs y estas regulan su tráfico hasta las mitocondrias como se indica con las flechas pequeñas en color azul. El engrane con un signo de interrogación encerrado en un círculo rojo indica que además de estos mecanismos, puede existir un mecanismo desconocido que aporte a la CAG de las mitocondrias.

LDL, lipoproteínas de baja densidad; FAS, sintasa de ácidos grasos; MAMs, membranas asociadas a mitocondrias.

2. Hipótesis

Si la composición de ácidos grasos de las MAMs es más parecida a la de las mitocondrias que la del RE a estas, durante alguna condición estresante como la diabetes. Entonces la CAG de la mitocondria está siendo regulada por las MAMs.

3. Objetivo

- Investigar si la composición de ácidos grasos de las mitocondrias se regula a través de las MAMs en una condición estresante como la diabetes.

3.1 Objetivos particulares

- Analizar la composición de ácidos grasos de RE, MAMs, mitocondrias y tejido completo con el progreso de la DE 1
- Medir el consumo de oxígeno de las mitocondrias de hígado y obtener el CR de las mitocondrias de animales control y diabéticos.

4. Material y métodos

Los reactivos utilizados en el presente trabajo fueron grado reactivo y se adquirieron de J.T Baker, Merck y Sigma. Los solventes para la cromatografía de gases fueron grado HPLC de la marca J.T Baker. La estreptozotocina (STZ), así como los estándares de metil ésteres (Anexo 2), con una pureza mínima de 98%, se adquirieron de Sigma-Aldrich.

4.1 Obtención de animales para experimentación

Se trabajó con ratas Wistar macho, de dos meses de edad. Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas (12 h de luz, 12h de oscuridad, a 22 ° C), con agua y alimento *ad libitum*, siguiendo los lineamientos de bioética marcados en la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999).

Los parámetros como el peso y la glicemia se midieron cada 7 días, con una balanza electrónica y un glucómetro digital de la marca AccuChek® tomando una gota de sangre de la cola de las ratas y colocándola sobre tiras reactivas para su lectura. Como tiempo cero (“día 0”), se sacrificaron 3 animales de aproximadamente dos meses de edad, con un peso promedio de 200 ± 10 g.

4.2 Inducción de la diabetes experimental tipo 1 con estreptozotocina

Las ratas (9) fueron inducidas a diabetes experimental tipo 1 (DE 1), a la edad aproximada de 2 meses, esto se llevó a cabo por medio de una inyección intraperitoneal de STZ a 65 mg/kg de peso corporal disuelta en amortiguador de citratos, pH 4.5. Los animales control (9) fueron inyectados por la misma vía con amortiguador de citratos.

Las glicemias normales fueron tomadas de los animales control (ratas no inducidas) las cuales no sobrepasaban los 120 mg/dL. Los animales inducidos se consideraron con DE 1 cuando la glicemia supera dicha cifra.

4.3 Sacrificio y obtención de orgánulos.

Los animales se sacrificaron en grupos de 3 cada 7 días (control y diabéticas); fueron anestesiadas por una inyección intraperitoneal de pentobarbital (40 mg/kg peso corporal) hasta la pérdida total de sensibilidad; posteriormente se realizó la exanguinación, extrayendo la sangre del corazón con vacutainer, para sacrificar a los animales sin causar dolor. De cada organismo se obtuvo el hígado y se homogeneizó en medio H (sacarosa 0.07 M, manitol 0.21 M, HEPES 20 mM, albúmina bovina 2 mM, pH 7.4) con un homogeneizador de vidrio Potter Elvehjem para la obtención de orgánulos por centrifugaciones diferenciales como se describe adelante.

El retículo endoplásmico y las mitocondrias de hígado fueron obtenidos por centrifugaciones diferenciales (Pérez-Hernandez *et al* 2017), utilizando una centrifuga marca Thermo scientific, SORVALL ST 16R y un rotor FIBERLITE F15-6X100Y, para valores inferiores a 10 000 Xg, para valores superiores a esta cifra se utilizó un rotor 75Ti en una ultracentrífuga Sorvall. Se comenzó con una primera centrifugación a 700 Xg por 10 minutos. Se recupera el sobrenadante para continuar con la siguiente centrifugación a 6 300 Xg por 10 min, el sobrenadante se recupera para llevarlo a una última centrifugación a 90 000 Xg por 90 minutos, para la obtención de RE. Por otra parte, la pastilla resultante de la centrifugación a 6300 Xg se incubó con albúmina por 30 min para después someterla a una centrifugación final de 10 000 Xg por 10 minutos para la obtención de las mitocondrias. Las MAMs se obtuvieron luego de una purificación de las mitocondrias, esta purificación consta de dos centrifugaciones con percoll 30% (v/v,) (Stone *et al* 2008), primero 1ml de mitocondrias se homogeneiza con 4 ml de medio de aislamiento (manitol 250 mM, HEPES 5 mM, EGTA 0.5 mM, BSA 0.1%, pH 7.4) y 20ml del medio con percoll (manitol 225 mM, HEPES 25 mM, EGTA 1 mM, BSA 0.1%, Percoll 30%, pH 7.2), este homogeneizado se centrifugó a 100 000 Xg por 30 minutos, la pastilla obtenida se resuspendió con 15 ml de medio de aislamiento y se sometió a una centrifugación de 6 300 Xg, del resultado de esta centrifugación se obtienen las mitocondrias purificadas y el sobrenadante (el cual

contiene a las MAMs) entro a una última centrifugación a 100 000 Xg por una hora, la fracción mitocondrial fue dispuesta para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (1976) para el posterior análisis de la respiración mitocondrial. Finalmente, a las muestras obtenidas se les agregó 30 μ l de hidroxitolueno butilado (BHT) como antioxidante y fueron almacenadas en congelación -20 °C.

4.4 Respiración mitocondrial

Se midió la velocidad de consumo de oxígeno (O_2) mitocondrial con un oxímetro de la marca YSI 5300 A (Pérez-Hernandez et al 2017), con una cámara de incubación de 1.5 mL que contenía medio de respiración (succinato 10 mM, sacarosa 250 mM, $MgCl_2$ 10 mM, H_3PO_4 5 mM, EGTA 1.1 mM, BSA 0.1%, pH 7.4) y cerrada con una tapa de vidrio esmerilada, acoplada a un electrodo tipo Clark, a una temperatura de 37°C mantenida mediante un baño termostatazador de circulación y con agitación constante.

A esta cámara de incubación con medio de respiración, se le agregó la concentración de mitocondrias calculada previamente a 500 μ g. Se registró el consumo de oxígeno y se calculó la velocidad basal de consumo de oxígeno (estado 4) y la velocidad de consumo de oxígeno o respiración activa, en presencia de exceso de substrato, en este caso 2 μ L ADP (100nM en solución TRIS 10 mM, pH 7.4) (estado 3), para obtener el índice de control respiratorio se calculó la relación estado 3 (E3)/estado 4 (E4), con una n=3 por grupo experimental, repetido por triplicado.

4.5 Composición de ácidos grasos

La transesterificación de ácidos grasos se llevó a cabo por el método de Morrison y Smith (1964). Las fracciones celulares se colocaron en viales de 4 mL, se agregaron 50 μ L de muestra y 1 mL de trifluoruro de boro al 14% en metanol, la

muestra fue sometida a una atmósfera de nitrógeno y posteriormente se colocaron los viales en baño maría a punto de ebullición durante 30 min. Al pasar este tiempo, se dejaron estabilizar a temperatura ambiente y se agregaron 2 mL de hexano HPLC y 1 mL de agua bidestilada, la muestra se centrifugó por 5 minutos a 300 Xg, se colectó la fracción hexánica, la cual contiene los metil ésteres. Finalmente, el hexano fue evaporado con nitrógeno y la muestra se almacenó protegida de la luz a -20°C.

Los metil ésteres de ácidos grasos fueron resuspendidos en 50 µL de hexano HPLC (Pérez-Hernandez et al 2017). Se utilizó un cromatógrafo de gases Clarus 500 (Perkin Elmer) controlado por computadora, equipado con un detector de ionización de flama (FID), una columna capilar omegawax de Supelco de 30 m de largo y un diámetro interno de 0.25 mm. Como gas de arrastre se utilizó nitrógeno de alta pureza, con un flujo de 14 mL/min. El programa que se utilizó fue diseñado de la siguiente forma: inicio a 180° C por 5 min, con una rampa de 5° C/min hasta 240° C, temperatura que se mantiene durante 18 minutos, para un tiempo total de 35 min. La identidad de los ácidos grasos se obtuvo por comparación de los tiempos de retención de los metil ésteres estándar. Para la cuantificación de ácidos grasos se hizo una integración del área bajo la curva de cada uno de los picos detectados. Las abundancias relativas cuantificadas se calcularon a partir del 100% de la muestra y se asignó el porcentaje calculado a cada AG detectado, estos porcentajes fueron utilizados para obtener el I/S, el cual se determinó por la concentración de AGs insaturados sobre AGs saturados, con una n=3 por grupo experimental cada proceso se realizó por triplicado.

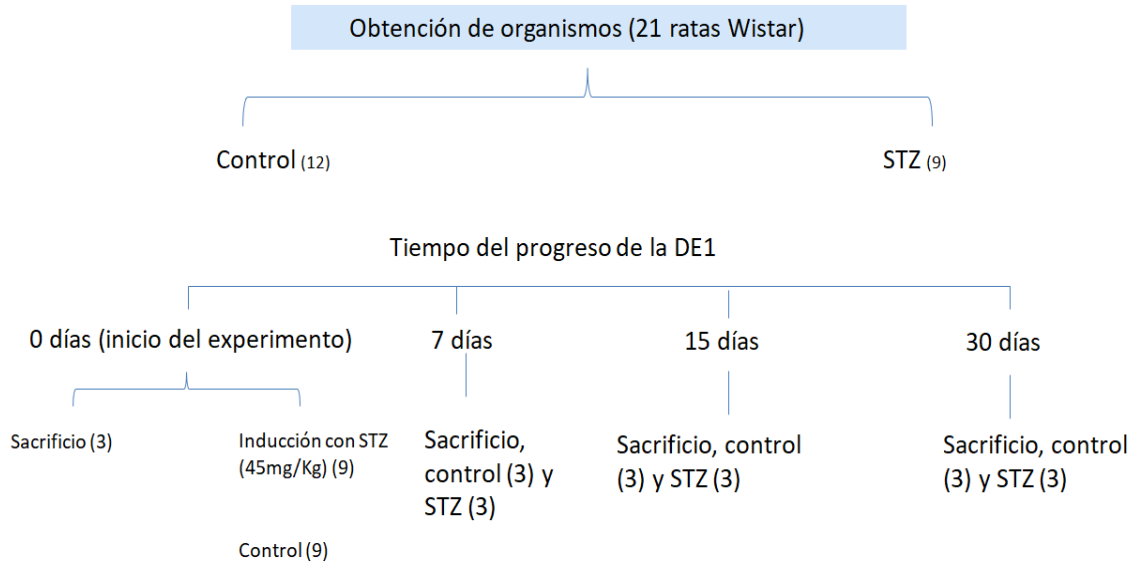


Figura 3. Diseño experimental.

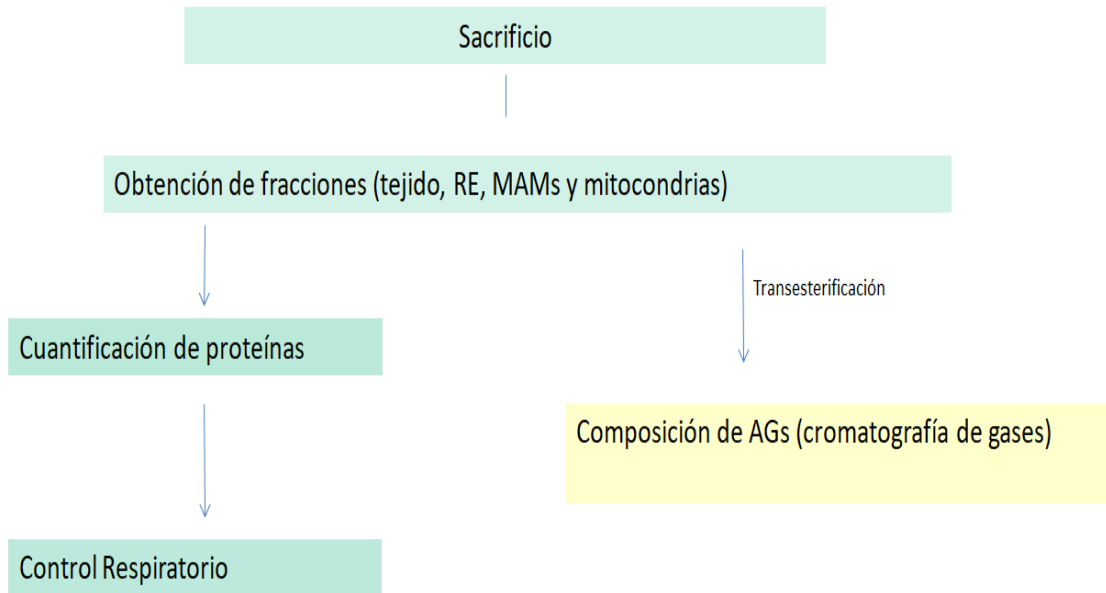


Figura 4. Diseño experimental para el procesamiento de las muestras obtenidas.

4.6 Análisis estadístico

Se realizó el análisis de las medidas de tendencia central: Promedio y desviación estándar de los datos obtenidos. Para probar la normalidad de los datos se realizó la prueba Shapiro-Wilk. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Tukey con un intervalo de confianza de 0.95 ($p < 0.05$) con el programa SigmaPlot 12.3 (2013) con una $n=3$ por grupo experimental repetido por triplicado.

5. Resultados

5.1 Peso de ratas Wistar control e inducidas a Diabetes Experimental tipo 1

Se hizo un seguimiento del peso corporal de los animales. Se conoce que el desarrollo de diabetes (DE 1 en este trabajo) afecta el metabolismo de proteínas, carbohidratos y lípidos y por consecuencia, el peso corporal.

El grupo control tuvo una mayor ganancia de peso que el grupo STZ, esto se puede observar a los 30 días, en donde los animales control alcanzaron un peso de 350g, lo que contrasta con los animales que fueron inducidos a diabetes, que alcanzaron un peso promedio de 250 g (Fig. 5). Lo anterior indica que se generó una alteración en el metabolismo debido a la inducción a DE 1, lo cual se puede deberse a un desbalance de señales lipolíticas y lipogénicas, como se menciona en los reportes anteriormente revisados.

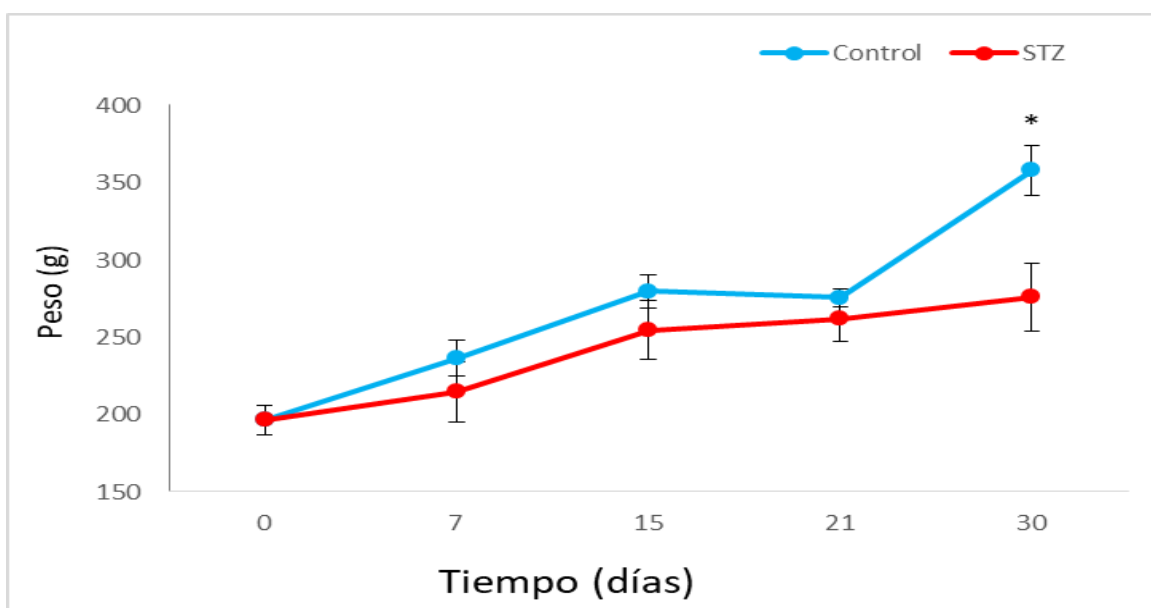


Figura 5. Ganancia de peso de animales control e inducidos a DE 1 (STZ) posterior a la inducción. * $p < 0.05$, $n = 3$.

5.2 Concentración de glucosa en sangre

Se obtuvo el parámetro de glicemia para comprobar que la STZ tuviera el efecto esperado y que estrictamente se generó el modelo de DE 1.

Se puede observar que existe un incremento de la glicemia en el grupo STZ desde el día posterior a la inducción (día 1) y se mantuvo esta tendencia hasta los 30 días, donde se alcanzó aproximadamente los 600 mg/dL de glucosa en sangre. En contraparte, el grupo control al que sólo se le administró el vehículo de citratos, no presenta diferencias en este parámetro (Fig. 6). Tanto la ganancia menor de peso como la concentración elevada de glucosa en sangre indican que los animales tienen diabetes.

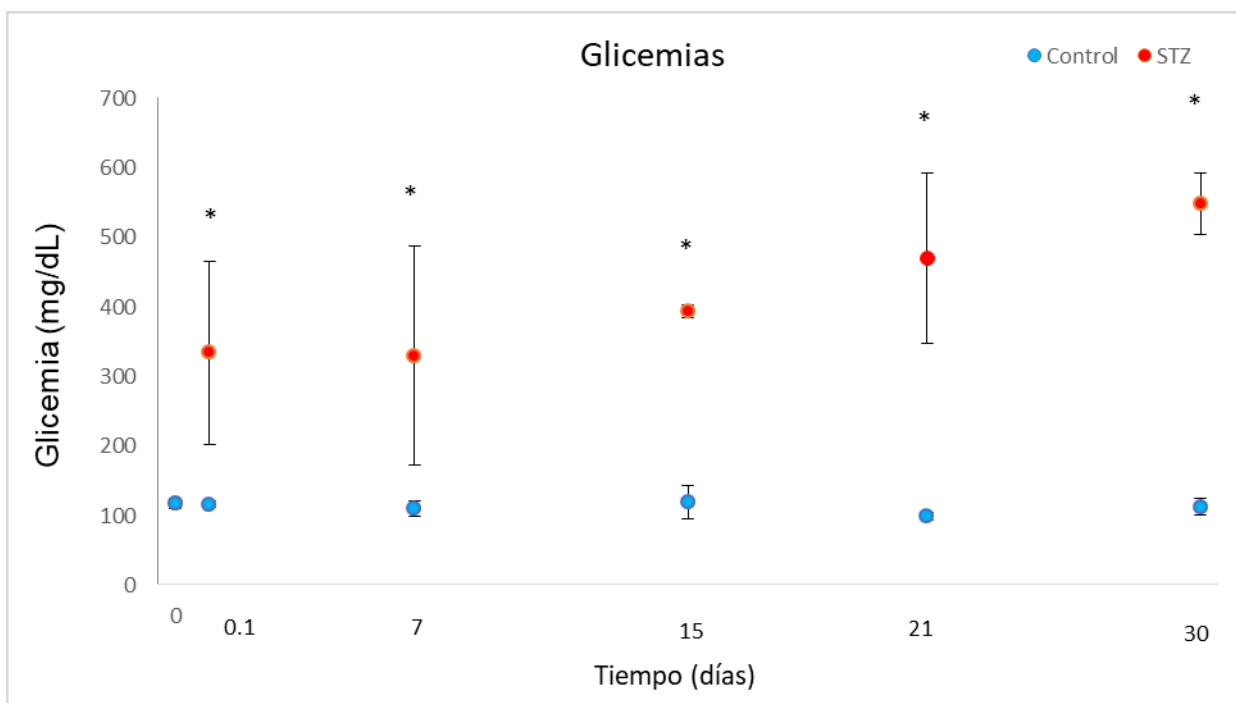


Figura 6. Concentración de glucosa en sangre (mg/dL) de animales control e inducidos a DE 1. * $p < 0.05$, $n = 3$.

5.3 Control respiratorio

En la figura 7 se puede observar los valores del control respiratorio de las mitocondrias a los 0, 7, 15, y 30 días. Primero, se puede notar que la tendencia de animales control es a incrementar el CR con el paso del tiempo, incrementando hasta en un 80% este parámetro con respecto al inicio del experimento. Sin embargo, en los animales STZ, podemos observar que este CR no existe dicho incremento, por lo tanto, revela diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, esto nos indica que se generó una condición estresante que afecta la función mitocondrial de consumo de oxígeno, lo cual, entre otros factores, podría ser el resultado de los cambios en la CAG. Se procedió a analizar la CAG de las fracciones obtenidas para saber si pudiera relacionarse con los cambios encontrados en el CR, como se muestra más adelante.

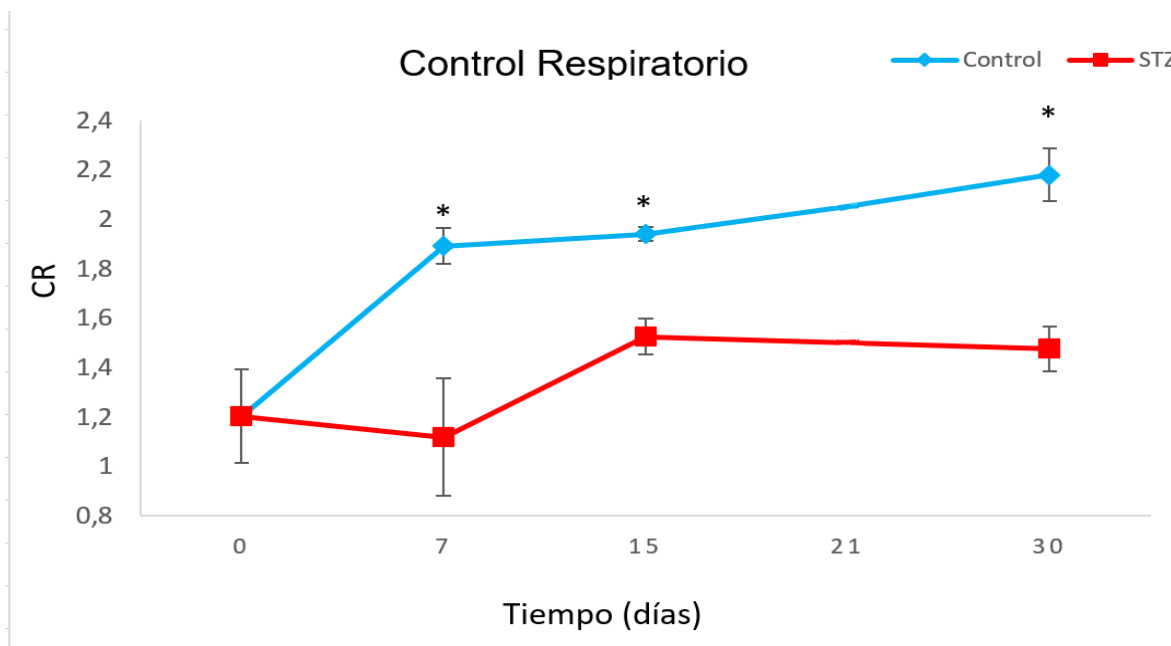


Figura 7. Comparación del control respiratorio a distintos tiempos.

CR control respiratorio, STZ animales inducidos. * $p < 0.05$, $n = 3$.

5.4 Composición de ácidos grasos de tejido hepático, retículo endoplásmico, membranas asociadas a mitocondrias y mitocondrias de ratas Wistar

Para saber si hay diferencias entre el tejido hepático y sus fracciones subcelulares, específicamente el RE, las MAMs y las mitocondrias, tanto de animales normoglucémicos como inducidos a diabetes, se analizó la composición de ácidos grasos de cada fracción celular. Dichos análisis se realizaron a 0, 7, 15 y 30 días de haber realizado la inducción a DE 1 con STZ.

El tiempo cero se tomó como una referencia del estado de las membranas de tejido hepático, RE, MAMs y mitocondrias al comienzo del experimento, lo cual será de utilidad para dilucidar los cambios que pudieran existir.

En la tabla 1, se muestra el perfil de AGs de animales normales, con una edad aproximada de dos meses. Primeramente, resalta la homogeneidad de los datos ya que se presentan perfiles muy similares en concentración de AGs. Destaca que el AG palmítico se encontró en mayor porcentaje (17 %) en las mitocondrias con respecto al tejido, un fenómeno parecido se muestra con el ácido esteárico ya que su abundancia relativa es mayor hasta en un 11% en las mitocondrias en comparación con las MAMs, el AG linoleico se encontró en una mayor concentración en mitocondrias, hasta un 4% más de la composición en el tejido y de las MAMs. Finalmente, el AG araquidónico se encontró en mayor proporción de la composición total en el tejido (17.87%) que en las mitocondrias (12.77%).

Tabla 1. Composición de ácidos grasos (mol %) de tejido hepático y tres fracciones celulares (retículo endoplásmico, membranas asociadas a mitocondrias y mitocondrias) de ratas Wistar, al inicio del experimento (día cero).

| Ácido graso | Tiempo (día 0) | | | |
|----------------|----------------|---------------|---------------|----------------|
| | Tejido | RE | MAMs | Mitocondrias |
| Mirístico | 1.12 ±0,73 | 0.43 ±0,03 A | 0.47 ±0,03 | 0.51 ±0,19 A |
| Pentadecanoico | 0.32 ±0,23 | 0.43 ±0,06 | 0.48 ±0,03 | 0.45 ±0,03 |
| Palmitico | 20.19 ±1,51 | 18.36 ±1,40 | 19.34 ±0,34 | 16.72 ±2,47 A |
| Palmitoleico | ND | 0.97 ±0,11 | 0.96 ±0,38 | 0.92 ±0,40 |
| Heptadecanoico | 0.63 ±0,33 | 0.78 ±0,23 | 0.99 ±0,03 | 0.65 ±0,32 |
| Esteárico | 17.15 ±0,69 | 18.49 ±0,68 | 20.14 ±0,35 A | 18.04 ±1,39 C |
| Oleico | 10.75 ±2,36 | 10.19 ±1,26 | 11.16 ±0,58 | 8.98 ±1,70 AC |
| Linoleico | 15.81 ±3,89 | 17.42 ±0,69 | 15.12 ±0,29 | 21.05 ±2,52 AC |
| Gamma | 0.25 ±0,01 | 0.34 ±0,04 A | ND | ND |
| Linolenico | ND | 0.28 ±0,05 | ND | ND |
| Araquídico | 1.07 ±0,99 | ND | ND | ND |
| Araquidónico | 12.77 ±2,62 | 20.57 ±1,95 A | 17.46 ±0,98 | 17.87 ±3,02 A |
| EPA | 0.84 ±0,48 | 1.54 ±0,32 A | 0.96 ±0,06 | 0.79 ±0,21 B |
| Lignocérico | 1.45 ±1,43 | 0.90 ±0,40 | 1.15 ±0,15 | 0.60 ±0,23 |
| DHA | 5.20 ±2,32 | 7.64 ±0,51 A | 7.28 ±0,56 | 7.24 ±0,62 |
| NI | 1.84 ±0,31 | 1.83 ±0,47 | 4.49 ±0,64 | 3.84 ±0,58 |
| I/S | 1.38 ±0,12 | 1.49 ±0,11 | 1.24 ±0,01 B | 1.44 ±0,11 |

RE, retículo endoplásmico; EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico; NI, no identificado; I/S, cociente de ácidos grasos insaturados sobre saturados; ND, no detectado

A p<0.05 diferencia con Tejido, B p<0.05 diferencia con RE, C p<0.05 diferencia con MAMs. n=3

5.4.1 Comparación de la relación I/S de tejido hepático, retículo endoplásmico, membranas asociadas a mitocondrias y mitocondrias

En la figura 8 se presenta el cociente I/S de tejido hepático, RE, MAMs y mitocondrias al tiempo 0; el valor de I/S es similar entre el tejido y las fracciones subcelulares, aunque resalta el hecho de que el I/S de las MAMs presenta diferencia estadística con respecto al RE.

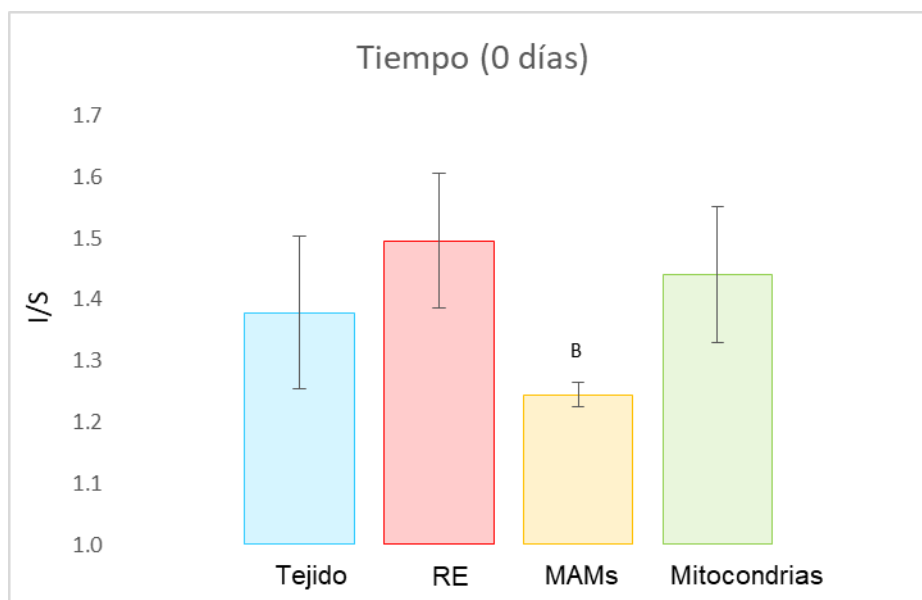


Figura 8. Comparación de cociente I/S de tejido, retículo endoplásmico, membranas asociadas a mitocondrias y mitocondrias, al tiempo 0.

I/S, índice de fluidez, RE, retículo endoplásmico, MAMs, membranas asociadas a mitocondrias

A $p < 0.05$ diferencia con Tejido, B $p < 0.05$ diferencia con RE, C $p < 0.05$ diferencia con MAMs. n=3

5.5 Composición de ácidos grasos de tejido hepático y mitocondrias a 7, 15 y 30 días de la inducción a DE 1

Se determinaron los perfiles de AGs de tejido hepático y mitocondrias, para esto se analizó y comparó la CAG de ambas durante el progreso de la DE 1.

En la tabla 2 se muestra el perfil de AGs de tejido hepático y mitocondrias de animales control e inducidos, 7 días posteriores de la inducción a DE 1. Podemos observar que las mitocondrias presentan diferencias en comparación con el tiempo 0, por ejemplo, la concentración de esteárico fue mayor hasta en un 34%, en mitocondrias STZ con respecto al tejido, lo cual concuerda con que el índice I/S sea menor en este orgánulo.

Tabla 2. Composición de ácidos grasos (mol %) de tejido hepático y mitocondrias de ratas Wistar, a los 7 días.

| Ácido graso | Tiempo (7 días) | | | |
|----------------|-----------------|--------------|----------------|------------------|
| | Tejido C | Tejido STZ | Mitocondrias C | Mitocondrias STZ |
| Mirístico | 0.27 ±0,01 | 0.29 ±0,11 | 0.27 ±0,09 | 0.15 ±0,04 |
| Pentadecanoico | 0.24 ±0,04 | 0.19 ±0,01 | 0.29 ±0,08 a | 0.14 ±0,01 A |
| Palmitico | 17.09 ±1,61 | 18.57 ±1,71 | 19.10 ±2,99 | 15.82 ±1,09 |
| Palmitoleico | 0.80 ±0,34 | 0.79 ±0,49 | 0.42 ±0,07 a | 0.18 ±0,02 A |
| Heptadecanoico | 0.48 ±0,01 | 0.38 ±0,02 | 0.52 ±0,08 | 0.51 ±0,22 |
| Esteárico | 16.73 ±2,51 | 16.65 ±1,43 | 18.75 ±2,51 | 21.67 ±0,29 AaB |
| Oleico | 10.34 ±1,20 | 9.70 ±0,96 | 8.91 ±3,15 | 6.64 ±0,74 Aa |
| Linoleico | 21.39 ±0,85 | 21.46 ±1,10 | 16.33 ±7,52 | 19.54 ±1,28 |
| Gamma | 0.09 ±0,01 | 0.36 ±0,10 A | 0.10 ±0,01 a | 0.31 ±0,04 A |
| Linolenico | 0.55 ±0,07 | 0.55 ±0,02 | 0.24 ±0,03 Aa | 0.16 ±0,04 Aa |
| CLA 1 | ND | 0.09 ±0,02 | ND | 0.09 ±0,01 |
| CLA2 | 0.10 ±0,02 | 0.14 ±0,06 | ND | 0.09 ±0,01 |
| CLA3 | 0.07 ±0,01 | 0.24 ±0,12 | ND | 0.07 ±0,02 |
| Araquídico | 0.63 ±0,08 | 1.67 ±0,63 | 1.25 ±1,42 | 1.93 ±0,87 |
| Araquidónico | 22.17 ±0,89 | 20.90 ±0,76 | 25.85 ±4,08 | 23.58 ±0,81 |
| EPA | 0.17 ±0,02 | 0.43 ±0,16 A | ND | 0.15 ±0,01 a |
| Behénico | 0.16 ±0,05 | 0.12 ±0,01 | ND | 0.16 ±0,03 |
| Lignocérico | 1.10 ±0,20 | 0.87 ±0,41 | 1.04 ±0,29 | 0.86 ±0,19 |
| DHA | 6.25 ±0,26 | 5.23 ±1,14 | 6.12 ±2,34 | 6.94 ±1,13 |
| NI | 1.36 ±0,30 | 1.48 ±0,32 | 1.29 ±0,45 | 1.42 ±0,36 |
| I/S | 1.69 ±0,05 | 1.55 ±0,06 A | 1.44 ±0,24 A | 1.40 ±0,06 Aa |

EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico; NI, no identificado; I/S, cociente de ácidos grasos insaturados sobre saturados; ND, no detectado

A p<0.05 diferencia con tejido control, a p<0.05 diferencia con tejido STZ, B p<0.05 diferencia con mitocondrias control. n=3

En la tabla 3, podemos observar que las mitocondrias en este perfil tuvieron una abundancia relativa del ácido linoleico incrementado, este se encontró hasta un 47% más en mitocondrias STZ, con respecto al tejido STZ. Además, resalta el hecho de que la concentración de AG araquidónico presentó una proporción incrementada (de hasta un 38%) en las mitocondrias, lo cual nos indicaría que los AG esenciales pudieran estar siendo repartidos de manera diferente entre los orgánulos. Finalmente, el hecho de que el I/S no sea diferente entre tejido y mitocondrias control, pero sí sea diferente entre tejido y mitocondrias de animales STZ, nos sugiere que las mitocondrias bajo una condición estresante modifican la

composición de sus membranas de manera distinta a la del tejido del que provienen.

Tabla 3. Composición de ácidos grasos (mol %) de tejido hepático y mitocondrias de ratas Wistar, a los 15 días.

| Ácido graso | Tiempo (15 días) | | | |
|----------------|------------------|---------------|----------------|------------------|
| | Tejido C | Tejido STZ | Mitocondrias C | Mitocondrias STZ |
| Láurico | ND | ND | ND | 2.42 ±0,29 |
| Mirístico | 0.99 ±0,01 | 0.99 ±0,87 | 0.63 ±0,24 | 0.91 ±0,33 |
| Miristoleico | ND | 0.26 ±0,10 | 0.31 ±0,10 | ND |
| Pentadecanoico | 0.25 ±0,01 | 0.16 ±0,06 | 0.35 ±0,13 | 0.84 ±0,39 Aa |
| Palmitico | 19.77 ±0,28 | 19.20 ±1,27 | 14.97 ±0,16 | 15.16 ±1,31 |
| Palmitoleico | 0.81 ±0,73 | 9.97 ±10,71 | 0.79 ±0,11 | 0.71 ±0,22 |
| Heptadecanoico | 0.53 ±0,05 | 0.37 ±0,05 | 0.38 ±0,16 | 0.31 ±0,04 |
| Esteárico | 17.67 ±0,72 | 18.64 ±1,80 | 15.87 ±1,73 | 16.51 ±2,80 |
| Oleico | 16.43 ±0,71 | 11.05 ±2,70 A | 8.34 ±0,79 A | 8.08 ±1,52 A |
| Linoleico | 18.23 ±2,01 | 15.76 ±3,84 | 21.04 ±0,71 | 21.20 ±2,68 a |
| Gamma | 0.15 ±0,03 | 0.18 ±0,02 | ND | ND |
| Linolenico | 0.28 ±0,03 | 0.23 ±0,05 | ND | ND |
| Araquídico | 0.30 ±0,03 | 1.19 ±1,02 | ND | ND |
| Araquidónico | 14.90 ±1,47 | 13.23 ±2,94 | 22.55 ±4,15 a | 21.30 ±5,17 a |
| EPA | 0.74 ±0,10 | 0.72 ±0,36 | 1.10 ±0,49 | 0.67 ±0,18 |
| Lignocérico | 0.67 ±0,31 | 0.81 ±0,39 | 0.48 ±0,06 | 0.41 ±0,08 |
| DHA | 6.36 ±0,27 | 5.50 ±1,61 | 6.92 ±0,58 | 6.70 ±0,58 |
| NI | 2.61 ±1,26 | 1.97 ±0,32 | 5.05 ±2,04 | 5.75 ±2,37 |
| I/S | 1.47 ±0,10 | 1.37 ±0,09 | 1.80 ±0,32 a | 1.69 ±0,23 a |

EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico; NI, no identificado; I/S, cociente de ácidos grasos insaturados sobre saturados; ND, no detectado

A p<0.05 diferencia con tejido control, a p<0.05 diferencia con tejido STZ, B p<0.05 diferencia con mitocondrias control. n=3

En la tabla 4 se observa un fenómeno interesante, ya que divergen estos perfiles de AGs incluso entre animales control, el rompimiento de esta tendencia de homogeneidad que se podía apreciar en las tablas anteriores, nos podría indicar que el paso del tiempo es un agravante de la DE 1 que condiciona la composición de las membranas.

Las diferencias más importantes serán señaladas a continuación; primeramente, la abundancia relativa del ácido araquidónico reveló una tendencia a disminuir en ambas fracciones en respuesta a la condición estresante. El ácido docosahexaenoico (DHA) incrementó en tejido STZ hasta en un 48%, un fenómeno que no se observa en mitocondrias, esto es un indicador de la ruta que

siguen los AGs esenciales. En mitocondrias STZ incrementaron los AGs saturados como el palmítico y el esteárico, además este incremento en el AG palmítico da lugar a un incremento de casi 10 veces el % del AG palmitoleico, el cual podría ser un indicador del funcionamiento de la delta 9 desaturasa. Una vez más observamos que el tejido y mitocondrias control no presentaron grandes modificaciones en el I/S, pero las mitocondrias STZ si, ya que tuvieron un I/S de 1.23 siendo menor al son del tejido control (1.94), tejido STZ (1.67) y de las mitocondrias control (1.83), lo cual estaría aportando información a la idea de que las mitocondrias, bajo una condición estresante, modifican su composición de manera distinta a la del tejido del que provienen.

Tabla 4. Composición de ácidos grasos (mol %) de tejido hepático y mitocondrias de ratas Wistar, a los 30 días.

| Ácido graso | Tiempo (30 días) | | | |
|----------------|------------------|--------------|----------------|-----------------|
| | Tejido C | Tejido STZ | Mit C1 | Mit STZ |
| Mirístico | 0.49 ±0,06 | 0.18 ±0,08 A | 0.70 ±0,02 a | 0.28 ±0,07 |
| Miristoleico | ND | 0.12 ±0,04 | ND | 0.19 ±0,02 |
| Pentadecanoico | 1.11 ±0,02 | 0.65 ±0,82 | 0.91 ±0,11 a | 0.23 ±0,07 |
| Palmítico | 19.14 ±0,70 | 18.17 ±2,28 | 14.46 ±1,19 Aa | 20.75 ±1,20 B |
| Palmitoleico | 0.61 ±0,11 | 0.40 ±0,28 | 1.30 ±0,32 | 12.36 ±8,13 AaB |
| Heptadecanoico | 0.49 ±0,33 | 0.26 ±0,05 | 0.38 ±0,05 Aa | 0.35 ±0,11 B |
| Esteárico | 12.57 ±0,82 | 14.99 ±2,84 | 14.90 ±0,96 | 24.33 ±3,99 Aa |
| Oleico | 12.81 ±1,10 | 8.45 ±1,26 A | 10.14 ±2,27 A | 5.59 ±1,96 |
| Linoleico | 23.71 ±0,64 | 21.63 ±7,28 | 16.41 ±1,00 Aa | 16.35 ±6,66 |
| Gamma | ND | 0.18 ±0,04 | ND | ND |
| Linolénico | ND | 0.34 ±0,07 | ND | ND |
| CLA1 | ND | 3.47 ±0,14 | ND | ND |
| CLA 2 | ND | ND | 2.71 ±0,19 | 0.37 ±0,23 |
| Araquídico | ND | ND | ND | 2.79 ±0,15 |
| Araquidónico | 23.50 ±2,31 | 16.34 ±1,87 | 23.64 ±3,54 a | 15.24 ±4,68 |
| Erúcico | ND | ND | ND | 0.45 ±0,10 |
| EPA | ND | 0.88 ±0,48 | 1.11 ±0,84 | 1.49 ±2,52 |
| Behénico | ND | ND | 1.64 ±0,73 | ND |
| Lignocérico | ND | 0.72 ±0,32 | ND | 0.50 ±0,27 |
| DHA | 4.98 ±1,13 | 9.36 ±1,81 A | 4.92 ±1,52 a | 5.50 ±2,80 |
| NI | 0.80 ±0,06 | 6.73 ±4,24 | 6.76 ±1,48 | 3.62 ±2,38 |
| I/S | 1.94 ±0,15 | 1.67 ±0,25 | 1.83 ±0,11 a | 1.23 ±0,07 AaB |

EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico; NI, no identificado; I/S, cociente de ácidos grasos insaturados sobre saturados; ND, no detectado

A p<0.05 diferencia con tejido control, a p<0.05 diferencia con tejido STZ, B p<0.05 diferencia con mitocondrias control. n=3

5.5.1 Comparación de la relación I/S de tejido hepático y mitocondrias.

En la figura 9 se presenta el cociente I/S de tejido y mitocondrias de animales inducidos, a los 0, 7, 15 y 30 días. Primeramente, resalta la homogeneidad aparente de este cociente en animales control. Además, en el valor de I/S del tejido parece existir una tendencia de disminuir como respuesta a la condición estresante, podemos observar que el I/S de las mitocondrias STZ es diferente al del tejido STZ del que provienen, lo que se puede observar en los días 7, 15 y 30, en este último el valor del I/S llego hasta 1.23 comparado con el 1.67 del tejido STZ.

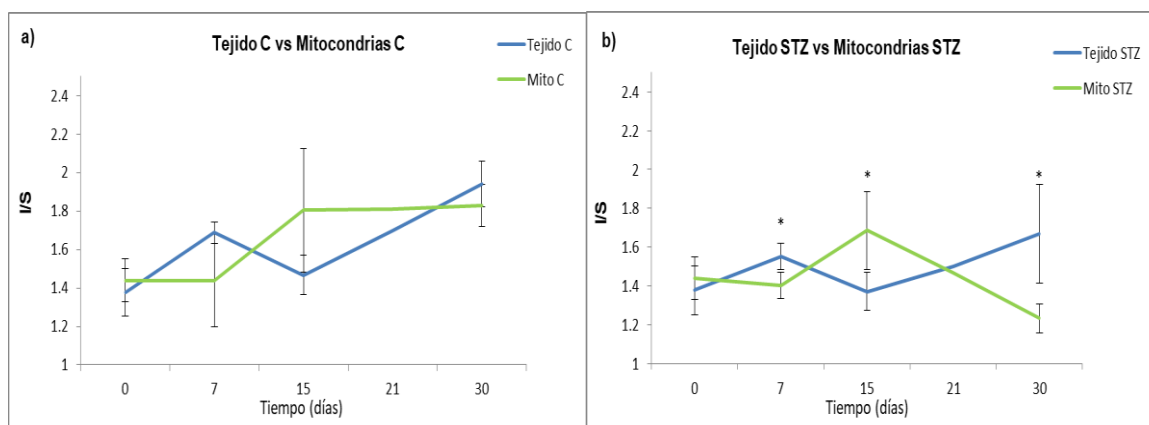


Figura 9. Comparación de cociente I/S de tejido y mitocondrias, la línea azul representa el valor del I/S en tejido C y STZ, la línea verde representa el valor del I/S en mitocondrias C y STZ.

I/S, índice de fluidez; T C, tejido control; T STZ, tejido inducido; Mito C, mitocondrias control; Mito STZ, mitocondrias inducidas. * $p < 0.05$ diferencia entre Tejido y Mitocondrias. $n=3$

5.6 Composición de ácidos grasos de RE y mitocondrias a 7, 15 y 30 días de la inducción a DE 1.

Se analizó y se comparó la CAG de RE y mitocondrias con el progreso de la DE 1. En la tabla 5, a los 7 días del progreso de la DE 1, se puede observar que las diferencias principales entre estas dos fracciones son en ácidos grasos con los que no cuenta el RE (no detectados), lo cual no afecta el cociente I/S ya que estos no mostraron diferencias entre las fracciones, por lo anterior se puede proponer

que la exposición de 7 días al estrés producido por la DE 1 no es suficiente para que las membranas de estos orgánulos muestren diferencias significativas.

Tabla 5. Composición de ácidos grasos (mol %) de RE y mitocondrias de ratas Wistar, a los 7 días.

| Ácido graso | Tiempo (7 días) | | | |
|----------------|-----------------|--------------|----------------|------------------|
| | RE C | RE STZ | Mitocondrias C | Mitocondrias STZ |
| Mirístico | 0.27 ±0,01 | 0.21 ±0,10 | 0.27 ±0,09 | 0.15 ±0,04 |
| Pentadecanoico | 0.23 ±0,02 | 0.17 ±0,02 | 0.29 ±0,08 a | 0.14 ±0,01 |
| Palmitico | 17.26 ±0,94 | 17.56 ±1,06 | 19.10 ±2,99 | 15.82 ±1,09 |
| Palmitoleico | 0.55 ±0,21 | 0.51 ±0,31 | 0.42 ±0,07 | 0.18 ±0,02 |
| Heptadecanoico | 0.52 ±0,01 | 0.44 ±0,02 | 0.52 ±0,08 | 0.51 ±0,22 |
| Esteárico | 20.72 ±1,03 | 21.88 ±1,13 | 18.75 ±2,5 a | 21.67 ±0,29 |
| Oleico | 8.99 ±0,59 | 7.31 ±1,03 | 8.91 ±3,15 | 6.64 ±0,74 |
| Linoleico | 16.81 ±0,81 | 15.32 ±0,56 | 16.33 ±7,52 | 19.54 ±1,28 a |
| Gamma | 0.11 ±0,01 | 0.31 ±0,07 | 0.10 ±0,01 | 0.31 ±0,04 |
| Linolenico | 0.35 ±0,02 | 0.27 ±0,03 | 0.24 ±0,03 A | 0.16 ±0,04 Aa |
| CLA 1 | ND | 0.10 ±0,06 | ND | 0.09 ±0,01 |
| CLA2 | 0.11 ±0,03 | 0.13 ±0,03 | ND | 0.09 ±0,01 |
| CLA3 | 0.07 ±0,03 | 0.27 ±0,21 | ND | 0.07 ±0,02 |
| Araquídico | 0.63 ±0,09 | 1.26 ±0,69 | ND | 1.93 ±0,87 |
| Araquidónico | 24.93 ±1,66 | 25.19 ±0,83 | 25.85 ±4,08 | 23.58 ±0,81 |
| EPA | 0.09 ±0,02 | 0.30 ±0,13 A | ND | 0.15 ±0,01 |
| Behénico | 0.21 ±0,07 | 0.15 ±0,02 | ND | 0.16 ±0,03 |
| Lignocérico | 1.02 ±0,04 | 0.96 ±0,16 | 1.04 ±0,29 | 0.86 ±0,19 |
| DHA | 6.24 ±0,54 | 6.13 ±1,53 | 6.12 ±2,34 | 6.94 ±1,13 |
| NI | 1.11 ±0,14 | 1.58 ±0,37 | 1.29 ±0,45 | 1.42 ±0,36 |
| I/S | 1.43 ±0,01 | 1.32 ±0,04 | 1.44 ±0,24 | 1.40 ±0,06 |

RE, retículo endoplásmico; EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico; NI, no identificado; I/S, cociente de ácidos grasos insaturados sobre saturados; ND, no detectado

A p<0.05 diferencia con RE control, a p<0.05 diferencia con RE STZ, B p<0.05 diferencia con mitocondrias control. n=3

El retículo endoplásmico parece ser una zona de transición de AGs entre tejido y mitocondrias ya que en su composición no se observan grandes diferencias, como se puede notar en la tabla 6, primeramente, parece que el RE STZ almacena AG láurico, como se revisara más adelante, bajo una condición estresante el RE almacena AGs saturados y después estos AGs son compartidos con las mitocondrias, además los AGs palmítico y esteárico están incrementados en hasta un 5% de la composición total con respecto a las mitocondrias control y STZ. Los AGs que son de carácter esencial deberían tener proporciones similares entre

ambos orgánulos, pero el AG linoleico es distinto ya que en mitocondrias STZ se encuentra con una abundancia relativa mayor de hasta el 30 %, el carácter esencial de este AG podría ser un indicador de que el suministro de AGs a las mitocondrias se puede dar por diferentes vías.

Aunque los fenómenos descritos anteriormente indican que no existen grandes diferencias entre estas fracciones, el I/S nos indica nuevamente que bajo condiciones normales y de estrés las mitocondrias poseen una composición diferente a la del RE, por lo que quizá el RE no sea el responsable de regular la CAG de la mitocondria o puede que su participación en el fenómeno no sea tan activa como se pensaba.

Tabla 6. Composición de ácidos grasos (mol %) de RE y mitocondrias de ratas Wistar, a los 15 días.

| Ácido graso | Tiempo (15 días) | | | |
|----------------|------------------|-------------|----------------|------------------|
| | RE C | RE STZ | Mitocondrias C | Mitocondrias STZ |
| Láurico | ND | 5.01 ±0,39 | ND | 2.42 ±0,29 |
| Mirístico | 0.32 ±0,03 | 0.29 ±0,10 | 0.63 ±0,24 | 0.91 ±0,33 |
| Miristoleico | ND | ND | 0.31 ±0,10 | ND |
| Pentadecanoico | 0.28 ±0,04 | 0.20 ±0,01 | 0.35 ±0,13 | 0.84 ±0,39 Aa |
| Palmitico | 18.07 ±0,44 | 18.00 ±1,10 | 14.97 ±0,16 | 15.16 ±1,31 |
| Palmitoleico | 0.31 ±0,15 | 0.25 ±0,14 | 0.79 ±0,11 | 0.71 ±0,22 |
| Heptadecanoico | 0.62 ±0,10 | 0.47 ±0,03 | 0.38 ±0,16 | 0.31 ±0,04 |
| Esteárico | 21.97 ±1,11 | 22.66 ±1,23 | 15.87 ±1,73 | 16.51 ±2,80 |
| Oleico | 9.19 ±0,71 | 8.12 ±0,56 | 8.34 ±0,79 | 8.08 ±1,52 |
| Linoleico | 16.38 ±0,58 | 15.94 ±1,23 | 21.04 ±0,71 | 21.20 ±2,68 a |
| Gamma | 0.18 ±0,03 | 0.15 ±0,02 | ND | ND |
| Linolenico | 0.12 ±0,04 | 0.11 ±0,04 | ND | ND |
| Araquídico | 0.31 ±0,02 | 0.14 ±0,05 | ND | ND |
| Araquidónico | 19.11 ±0,52 | 20.64 ±1,87 | 22.55 ±4,15 | 21.30 ±5,17 |
| EPA | 0.80 ±0,14 | 0.75 ±0,15 | 1.10 ±0,49 | 0.67 ±0,18 |
| Lignocérico | 1.28 ±0,12 | 1.00 ±0,43 | 0.48 ±0,06 | 0.41 ±0,08 |
| DHA | 7.87 ±0,75 | 7.23 ±0,95 | 6.92 ±0,58 | 6.70 ±0,58 |
| NI | 2.87 ±0,33 | 2.17 ±0,21 | 5.05 ±2,04 | 5.75 ±2,37 |
| I/S | 1.25 ±0,05 | 1.20 ±0,15 | 1.80 ±0,32 Aa | 1.69 ±0,23 Aa |

RE, retículo endoplásmico; EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico; NI, no identificado; I/S, cociente de ácidos grasos insaturados sobre saturados; ND, no detectado

A p<0.05 diferencia con RE control, a p<0.05 diferencia con RE STZ, B p<0.05 diferencia con mitocondrias control. n=3

En la tabla 7 podemos observar los cambios que se presentan en la CAG al paso de los 30 días con la condición estresante.

Primeramente, se observa que el AG esteárico disminuye en RE con la condición estresante de 23.38% a 15.55%, pero en mitocondrias la concentración de este AG incrementó de 14.90% a 24.33%, uno de los cambios más relevantes se observa en el ácido palmitoleico, ya que en el RE con la condición estresante desaparece, pero en las mitocondrias este AG incrementó su proporción hasta casi 10 veces más, el DHA incrementa su concentración en un 87% con respecto al control, lo cual puede ser un indicador de la diafonía entre esta fracción con las mitocondrias. Además, en mitocondrias con respecto a las demás fracciones se reveló la existencia de ácido linoleico conjugado 2 (CLA2).

En este punto se podría pensar que la CAG está bajo el control del RE, pero las fracciones control muestran que las mitocondrias deberían tener una mayor proporción de AGs insaturados en comparación con el RE, lo que indica que la mitocondria conserva una estrategia de hacer más rígidas las membranas cuando es sometida a una condición estresante.

Tabla 7. Composición de ácidos grasos (mol %) de RE y mitocondrias de ratas Wistar, a los 30 días.

| Ácido graso | Tiempo (30 días) | | | |
|----------------|------------------|---------------|----------------|-----------------|
| | RE | RE STZ | Mit C1 | Mit STZ |
| Decanoico | ND | 1.39 ±1,02 | ND | ND |
| Mirístico | 0.43 ±0,07 | 0.29 ±0,08 | 0.70 ±0,02 | 0.28 ±0,07 |
| Miristoleico | ND | ND | ND | 0.19 ±0,02 |
| Pentadecanoico | 0.26 ±0,04 | 0.25 ±0,18 | 0.91 ±0,11 Aa | 0.23 ±0,07 B |
| Palmitico | 18.11 ±0,98 | 23.36 ±6,10 | 14.46 ±1,19 Aa | 20.75 ±1,20 B |
| Palmitoleico | 0.55 ±0,18 | ND | 1.30 ±0,32 | 12.36 ±8,13 AaB |
| Heptadecanoico | 0.48 ±0,17 | 0.35 ±0,12 | 0.38 ±0,05 Aa | 0.35 ±0,11 |
| Esteárico | 23.38 ±0,87 | 15.55 ±4,84 A | 14.90 ±0,96 Aa | 24.33 ±3,99 aB |
| Oleico | 9.22 ±0,79 | 6.97 ±1,07 A | 10.14 ±2,27 a | 5.59 ±1,96 |
| Linoleico | 15.43 ±0,66 | 21.11 ±2,53 | 16.41 ±1,00 | 16.35 ±6,66 |
| Gamma | ND | ND | ND | ND |
| Linolénico | ND | ND | ND | ND |
| CLA1 | ND | 1.75 ±0,91 | ND | ND |
| CLA 2 | ND | ND | 2.71 ±0,19 | 0.37 ±0,23 |
| CLA 3 | ND | ND | ND | ND |
| Araquídico | ND | ND | ND | 2.79 ±0,15 |
| Araquidónico | 22.98 ±0,90 | 19.85 ±4,90 | 23.64 ±3,54 | 15.24 ±4,68 |
| Erúcido | ND | ND | ND | 0.45 ±0,10 |
| EPA | 0.73 ±0,11 | 0.69 ±0,19 | 1.11 ±0,84 | 1.49 ±2,52 |
| Behénico | ND | ND | 1.64 ±0,73 | ND |
| Lignocérico | 1.34 ±0,15 | 0.82 ±0,18 | ND | 0.50 ±0,27 A |
| DHA | 5.57 ±0,76 | 9.05 ±3,05 | 4.92 ±1,52 a | 5.50 ±2,80 |
| NI | 1.52 ±0,59 | 1.60 ±0,97 | 6.76 ±1,48 | 3.62 ±2,38 |
| I/S | 1.24 ±0,05 | 1.47 ±0,28 | 1.83 ±0,11 Aa | 1.23 ±0,07 |

RE, retículo endoplásmico; EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico; NI, no identificado; I/S, cociente de ácidos grasos insaturados sobre saturados; ND, no detectado

A p<0.05 diferencia con RE control, a p<0.05 diferencia con RE STZ, B p<0.05 diferencia con mitocondrias control. n=3

5.6.1 Comparación de la relación I/S de RE y mitocondrias.

Al analizar el cociente I/S de RE (Fig.10), se puede observar que en animales control existen diferencias entre estas fracciones desde la segunda semana y esta tendencia continúa hasta la cuarta semana, donde presenta un valor de I/S de 1.83, en comparación con el valor del RE que es de 1.24. En animales STZ se presentan diferencias a las 2 semanas, incrementando el valor de I/S hasta 1.69, lo cual indicaría que el RE no está a cargo de la composición de AG de las mitocondrias. Sin embargo, a las 4 semanas se modifica la tendencia que se mantenía en animales control y no se presentan diferencias pudiendo ser un

evento casuístico, pero que nos sugiere que el RE bajo una condición estresante severa y prolongada interfiere con la CAG de las mitocondrias.

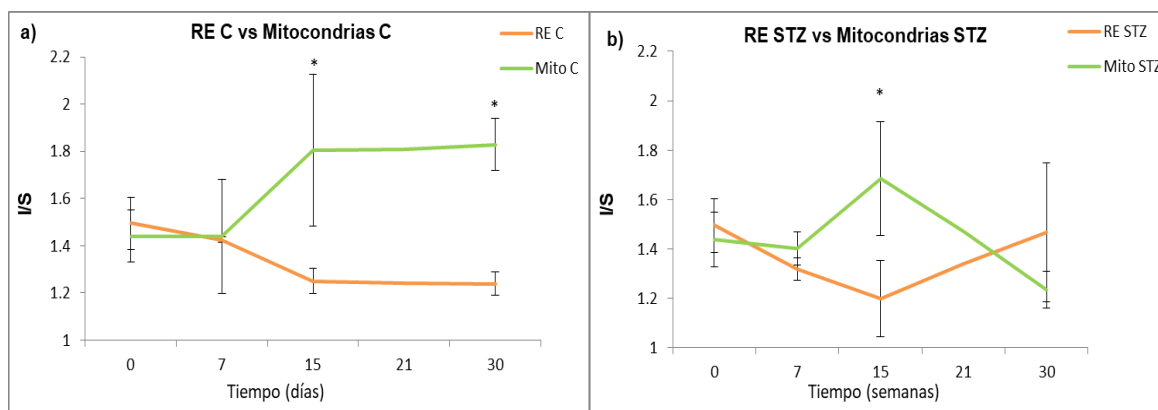


Figura 10. Comparación de cociente I/S de RE y mitocondrias, la línea naranja representa el valor del I/S del RE C y STZ, la línea verde representa el valor del I/S de las mitocondrias C y STZ.

I/S, índice de fluidez; RE C, retículo endoplásmico control; RE STZ, retículo endoplásmico inducido; Mito C, mitocondrias control; Mito STZ, mitocondrias inducidas; RE, retículo endoplásmico. * $p < 0.05$ diferencia entre RE y Mitocondrias. $n = 3$

5.7 Composición de ácidos grasos de MAMs y mitocondrias a 7, 15 y 30 días de la inducción a DE 1.

Se analizó y se comparó la CAG de MAMs y mitocondrias con el progreso de la DE 1. En la tabla 8 se puede observar que al paso de los 7 días con la condición estresante se mostraron diferencias de composición ya que ácidos grasos como el palmitoleico, heptadecanoico, gamma linoleico, linolénico y CLA 1,2 y 3, no están presentes en las MAMs, algo que resalta es la diferencia con el AG linoleico, que se presentó incrementado hasta en un 19% en mitocondrias de animales STZ respecto a las MAMs STZ. Las diferencias en conjunto se pueden observar en el índice I/S ya que en las mitocondrias STZ se tiene un valor mayor estadísticamente significativo con respecto a las MAMs STZ. Esto indica que el estrés provocado al paso de los 7 días con DE 1 es suficiente para observar cambios en las mitocondrias.

Tabla 8. Composición de ácidos grasos (mol %) de MAMs y mitocondrias de ratas Wistar, a los 7 días.

| Ácido graso | Tiempo (7 días) | | | |
|----------------|-----------------|--------------|----------------|------------------|
| | MAMs C | MAMs STZ | Mitocondrias C | Mitocondrias STZ |
| Mirístico | ND | ND | 0.27 ±0,09 | 0.15 ±0,04 |
| Pentadecanoico | 0.57 ±0,02 | ND | 0.29 ±0,08 A | 0.14 ±0,01 AB |
| Palmitico | 17.56 ±0,56 | 18.38 ±1,45 | 19.10 ±2,99 | 15.82 ±1,09 |
| Palmitoleico | ND | 0.49 ±0,05 | 0.42 ±0,07 | 0.18 ±0,02 |
| Heptadecanoico | ND | 0.15 ±0,21 | 0.52 ±0,08 a | 0.51 ±0,22 |
| Esteárico | 21.94 ±1,39 | 22.83 ±0,95 | 18.75 ±2,51 Aa | 21.67 ±0,29 |
| Oleico | 7.91 ±2,30 | 7.12 ±0,35 | 8.91 ±3,15 | 6.64 ±0,74 |
| Linoleico | 19.03 ±5,15 | 15.88 ±0,96 | 16.33 ±7,52 a | 19.54 ±1,28 a |
| Gamma | ND | ND | 0.10 ±0,01 | 0.31 ±0,04 |
| Linolenico | ND | ND | 0.24 ±0,03 | 0.16 ±0,04 |
| CLA1 | ND | ND | ND | 0.09 ±0,01 |
| CLA2 | ND | ND | ND | 0.09 ±0,01 |
| CLA3 | ND | ND | ND | 0.07 ±0,01 |
| Araquídico | ND | ND | ND | 1.93 ±0,87 |
| Araquidónico | 23.00 ±2,28 | 25.39 ±1,31 | 25.85 ±4,08 | 23.58 ±0,81 |
| EPA | ND | ND | ND | 0.15 ±0,01 |
| Behénico | 0.77 ±0,16 | ND | ND | 0.16 ±0,03 A |
| Lignocérico | 1.54 ±0,49 | 0.83 ±0,20 A | 1.04 ±0,29 | 0.86 ±0,19 A |
| DHA | 4.29 ±0,62 | 5.96 ±2,55 | 6.12 ±2,34 | 6.94 ±1,13 |
| NI | 3.40 ±0,29 | 3.04 ±1,12 | 1.29 ±0,45 | 1.42 ±0,36 |
| I/S | 1.28 ±0,12 | 1.29 ±0,05 | 1.44 ±0,24 | 1.40 ±0,06 a |

EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico; NI, no identificado; I/S, cociente de ácidos grasos insaturados sobre saturados; ND, no detectado

A p<0.05 diferencia con MAMs control, a p<0.05 diferencia con MAMs STZ, B p<0.05 diferencia con mitocondrias control. n=3

Las diferencias más importantes encontradas en la tabla 9, entre MAMs y mitocondrias se señalan a continuación, en las MAMs el AG láurico apareció en una proporción que se puede incluso considerar mayoritaria, ya que se encuentra hasta en un 26% del total, este se debería encontrar en baja proporción en las membranas al ser un AGs de transición, en mitocondrias STZ este AG apareció con una abundancia relativa casi 10 veces menor en comparación con las MAMs STZ. Además, las MAMs carecen de AGs de cadena impar, que en mitocondrias se encuentran presentes tanto pentadecanoico como el AG heptadecanoico. El AG esteárico incrementó hasta un 20 % en MAMs con la condición estresante, pero disminuye en las mitocondrias bajo el mismo fenómeno, otra diferencia muy marcada que presentaron las mitocondrias en este perfil es la abundancia relativa del ácido linoleico, este se encontró hasta un 47% más tanto en mitocondrias

control como en STZ. Además, el AGs araquidónico se encontró incrementado hasta en un 23% en las mitocondrias tanto control como STZ en comparación con las MAMs, esto podría ser un indicador de que si bien las MAMs podrían estar involucradas en el aporte de AGs a la mitocondria no son las únicas que estén regulando esta composición.

Tabla 9. Composición de ácidos grasos (mol %) de MAMs y mitocondrias de ratas Wistar, a los 15 días.

| Ácido graso | Tiempo (15 días) | | | |
|----------------|------------------|---------------|----------------|------------------|
| | MAMs C | MAMs STZ | Mitocondrias C | Mitocondrias STZ |
| Láurico | 13.82 ±3,45 | 26.34 ±1,69 A | ND | 2.42 ±0,29 Aa |
| Mirístico | 0.35 ±0,08 | 2.28 ±2,21 | 0.63 ±0,24 | 0.91 ±0,33 |
| Miristoleico | ND | ND | 0.31 ±0,10 | ND |
| Pentadecanoico | 0.26 ±0,02 | ND | 0.35 ±0,13 | 0.84 ±0,39 A |
| Palmitico | 14.08 ±1,99 | 13.38 ±7,74 | 14.97 ±0,16 | 15.16 ±1,31 |
| Palmitoleico | 0.53 ±0,30 | 1.57 ±1,15 | 0.79 ±0,11 | 0.71 ±0,22 |
| Heptadecanoico | ND | ND | 0.38 ±0,16 | 0.31 ±0,04 |
| Esteárico | 18.99 ±2,87 | 23.91 ±12,05 | 15.87 ±1,73 | 16.51 ±2,80 |
| Oleico | 7.82 ±1,71 | 6.46 ±3,17 | 8.34 ±0,79 | 8.08 ±1,52 |
| Linoleico | 15.03 ±2,41 | 13.50 ±2,55 | 21.04 ±0,71 a | 21.20 ±2,68 Aa |
| Gamma | ND | ND | ND | ND |
| Linolenico | ND | ND | ND | ND |
| Araquidónico | 0.31 ±0,05 | 1.14 ±0,38 | ND | ND |
| Araquidónico | 16.05 ±1,76 | 15.92 ±2,57 | 22.55 ±4,15 | 21.30 ±5,17 |
| EPA | ND | 0.32 ±0,01 | 1.10 ±0,49 | 0.67 ±0,18 |
| Lignocérico | 0.82 ±0,15 | 1.00 ±0,43 | 0.48 ±0,06 | 0.41 ±0,08 |
| DHA | 6.53 ±0,37 | 6.16 ±0,70 | 6.92 ±0,58 | 6.70 ±0,58 |
| NI | 2.17 ±1,55 | 2.12 ±1,29 | 5.05 ±2,04 | 5.75 ±2,37 |
| I/S | 0.89 ±0,12 | 0.79 ±0,08 | 1.80 ±0,32 Aa | 1.69 ±0,23 Aa |

EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico; NI, no identificado; I/S, cociente de ácidos grasos insaturados sobre saturados; ND, no detectado

A p<0.05 diferencia con MAMs control, a p<0.05 diferencia con MAMs STZ, B p<0.05 diferencia con mitocondrias control. n=3

Después de 30 días con la DE 1, se presentan distintos perfiles como se muestra en la tabla 10. Primero, se puede observar que los AGs palmítico y esteárico disminuyeron en las MAMs pero incrementaron en las mitocondrias comparando cada fracción control con la condición estresante, de nuevo, uno de los cambios más relevantes se observa en el ácido palmitoleico, ya que en el MAMs no es detectado, pero en las mitocondrias este AG incrementó su proporción hasta casi 10 veces más. El AG linoleico incrementó en las MAMs STZ un 20% pero esto no ocurrió en mitocondrias, nuevamente podría indicar que existen selectividad con

ciertos AGs dependiendo de la membrana, además, el AG araquidónico incrementó su abundancia en MAMs, en mitocondria disminuyó con la condición estresante. Finalmente, el I/S indicó que las mitocondrias control son diferentes a las MAMs control, ya que las mitocondrias tuvieron un I/S mayor por más del doble.

Tabla 10. Composición de ácidos grasos (mol %) de MAMs y mitocondrias de ratas Wistar, a los 30 días.

| Ácido graso | Tiempo (30 días) | | | |
|----------------|------------------|---------------|----------------|-----------------|
| | MAMs C 1 | MAMs STZ | Mit C1 | Mit STZ |
| Decanoico | ND | ND | ND | ND |
| Mirístico | ND | 1.27 ±0,08 | 0.70 ±0,02 a | 0.28 ±0,07 a |
| Miristoleico | ND | ND | ND | 0.19 ±0,02 |
| Pentadecanoico | 3.07 ±0,17 | ND | 0.91 ±0,11 | 0.23 ±0,07A |
| Palmitico | 25.46 ±0,60 | 23.10 ±2,05 | 14.46 ±1,19 Aa | 20.75 ±1,20 B |
| Palmitoleico | ND | ND | 1.30 ±0,32 | 12.36 ±8,13 AaB |
| Heptadecanoico | ND | ND | 0.38 ±0,05 | 0.35 ±0,11 |
| Esteárico | 28.31 ±0,54 | 16.69 ±2,52 A | 14.90 ±0,96 Aa | 24.33 ±3,99 A |
| Oleico | 4.57 ±0,31 | 5.93 ±2,57 | 10.14 ±2,27 Aa | 5.59 ±1,96 B |
| Linoleico | 16.67 ±1,63 | 20.93 ±2,63 | 16.41 ±1,00 a | 16.35 ±6,66 |
| Gamma | ND | ND | ND | ND |
| Linolénico | ND | ND | ND | ND |
| CLA1 | ND | ND | ND | ND |
| CLA 2 | ND | ND | 2.71 ±0,19 | 0.37 ±0,23 |
| CLA 3 | ND | ND | ND | ND |
| Araquídico | ND | ND | ND | 2.79 ±0,15 |
| Araquidónico | 17.31 ±1,21 | 20.31 ±5,22 A | 23.64 ±3,54 | 15.24 ±4,68 |
| Erúxico | ND | ND | ND | 0.45 ±0,10 |
| EPA | ND | ND | 1.11 ±0,84 | 1.49 ±2,52 |
| Behénico | ND | ND | 1.64 ±0,73 | ND |
| Lignocérico | ND | ND | ND | 0.50 ±0,27 |
| DHA | 4.61 ±1,23 | 6.61 ±4,04 | 4.92 ±1,52 | 5.50 ±2,80 |
| NI | ND | 7.99 ±5,04 | 6.76 ±1,48 | 3.62 ±2,38 |
| I/S | 0.76 ±0,01 | 1.35 ±0,08 A | 1.83 ±0,11 Aa | 1.23 ±0,07 AB |

EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico; NI, no identificado; I/S, cociente de ácidos grasos insaturados sobre saturados; ND, no detectado

A p<0.05 diferencia con MAMs control, a p<0.05 diferencia con MAMs STZ, B p<0.05 diferencia con mitocondrias control. n=3

Lo anterior en conjunto es un indicador de que las modificaciones en la composición de AG en las membranas de fracciones subcelulares y del tejido, no solo provienen del RE o de las MAMs, provocado por el paso del tiempo y/o una condición estresante, en este caso la DE 1.

5.7.1 Comparación de la relación I/S de MAMs y mitocondrias.

La comparación de la relación I/S de MAMs y mitocondrias al paso del tiempo se presenta en la figura 11, se puede observar que las MAMs son similares a las mitocondrias en condiciones control, sin embargo, a los 15 días el I/S es diferente y se mantiene así hasta las cuatro semanas, lo que nos podría indicar que para que las mitocondrias realicen sus funciones de manera adecuada es necesario mantener una CAG distinta a la de los demás orgánulos. En los animales STZ se observa algo similar, estas fracciones se diferencian a los 15 días, pero a diferencia de lo sucedido en animales control, el I/S reduce su valor en mitocondrias, asimilando su composición a la de las MAMs, esto podría deberse a una influencia de las MAMs en la CAG de las mitocondrias debido a la exposición prolongada a una condición estresante severa, esto podría estar indicando que la CAG de las mitocondrias no está completamente a cargo de las MAMs, ni en animales control, ni STZ.

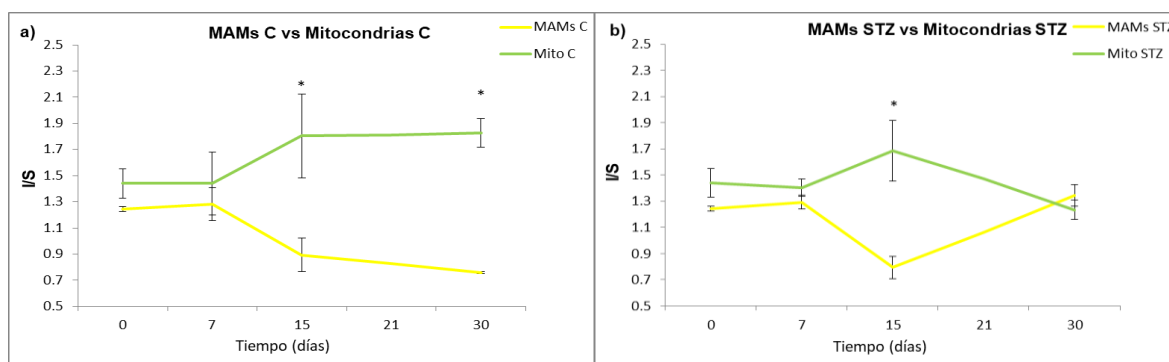


Figura 11. Comparación de cociente I/S de MAMs y mitocondrias, la línea amarilla representa el valor del I/S de las MAMs C y STZ, la línea verde representa el valor del I/S de las mitocondrias C y STZ.

I/S, índice de fluidez; MAMs C, membranas asociadas a mitocondrias control; MAMs STZ, membranas asociadas a mitocondrias inducidas; Mito C, mitocondrias control; Mito STZ, mitocondrias inducidas; MAMs, membranas asociadas a mitocondrias. * $p < 0.05$ diferencia entre MAMs y Mitocondrias. $n = 3$

Estos datos en conjunto abren varias posibilidades, tanto la posibilidad de una regulación inversamente proporcional entre MAMs y mitocondrias, interacción entre las distintas fracciones subcelulares o incluso que cada fracción subcelular

se regule hasta cierto punto de manera independiente, incluyendo las mitocondrias.

6. Análisis de mitocondrias completas

Para comprender los cambios y diferencias observadas en mitocondrias y MAMs, se analizó la fracción mitocondrial completa (sin purificar), en la figura 12 se presenta, en el inciso a) los valores del índice I/S en mitocondrias completas, el cual parece ser un promedio del índice I/S de mitocondrias aisladas y MAMs, en el inciso b y c se observa mitocondrias completas vs mitocondrias aisladas de animales control y STZ, se puede notar que en animales control las mitocondrias completas son muy parecidas a las mitocondrias aisladas, sin embargo a los 30 días muestran una diferencia, la cual podría deberse a una interferencia de las MAMs en cuanto a la CAG, en condiciones STZ no se muestran diferencias, lo cual parece indicar que las MAMs podrían no estar participando en la CAG de las mitocondrias bajo la condición estresante.

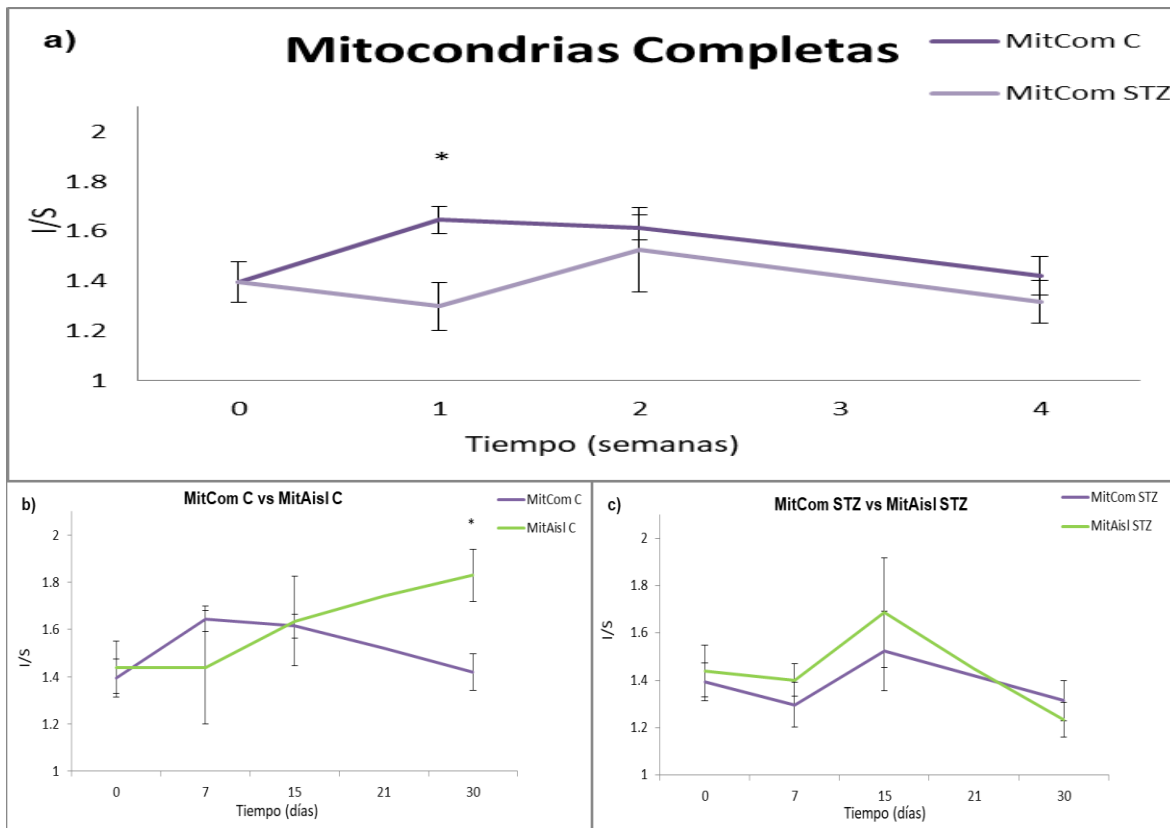


Figura 12. Comparación del índice I/S de mitocondrias completas (MitCom) y mitocondrias aisladas (MitAisl) control y STZ al paso del tiempo

Significado * $p < 0.05$ diferencia con su respectivo control. $n=3$

Finalmente, en la tabla 11 se puede observar a manera de resumen las fracciones que mostraron diferencias con respecto a las mitocondrias, los puntos a resaltar son los siguientes, el tejido STZ y las mitocondrias STZ son diferentes, algo que no sucedió en organismo control, lo que indica que las mitocondrias regulan su CAG de manera distinta a la del tejido del que provienen bajo una condición estresante. Comparando RE y mitocondrias se puede observar que en animales control estas fracciones son distintas a partir de los 15 días, sin embargo, en animales STZ a pesar de que ocurre un fenómeno similar a los 15 días, a los 30 días no se observan diferencias, lo cual puede deberse al estrés severo y prolongado al que fueron expuestas estas mitocondrias. En la comparación con MAMs control ocurre lo mismo, a partir de los 15 días estas se muestran diferentes de las mitocondrias y se mantienen así hasta los 30 días, por otra parte en la

comparación con MAMs STZ se revelan diferencias desde los 7 días, los cual nos podría indicar que la condición estresante comienza diferenciando las mitocondrias de las MAMs, los cambios se mantienen a los 15 días, pero a los 30 días se vuelve a presentar este fenómeno de igualdad, lo cual podría indicar que cuando la condición estresante es severa y prolongada, tanto MAMs como RE toman control de la CAG de las mitocondrias

Tabla 11. Resumen de diferencias entre las fracciones obtenidas y mitocondrias a distintos tiempos.

| a) Control | Mit ais 0 | Mit ais 7d | Mit ais 15d | Mit ais 30d |
|-------------------|-----------|------------|-------------|-------------|
| Tejido | No | Si | No | No |
| RE | No | No | Si | Si |
| MAMs | No | No | Si | Si |
| Mit Com | No | No | No | Si |
| b) STZ | Mit ais 0 | Mit ais 7d | Mit ais 15d | Mit ais 30d |
| Tejido | No | Si | Si | Si |
| RE | No | No | Si | No |
| MAMs | No | Si | Si | No |
| Mit Com | No | No | No | No |

Mit ais, mitocondrias aisladas; RE, retículo endoplásmico; Mit Com, mitocondrias completas; STZ, estreptozotocina; d, días. No sin diferencias, Si diferentes. Si $p < 0.05$. n=3

7. Discusión

En el presente trabajo se encontró que la CAG de las MAMs es similar a la CAG de las membranas mitocondriales a los 0 y 7 días en animales control y STZ, lo cual nos indica que en etapas iniciales las MAMs regulan la CAG de las membranas mitocondriales como se había hipotetizado, sin embargo, a los 15 días en animales control y STZ ocurre un fenómeno interesante, ya que se presentan diferencias estadísticamente significativas tanto en la CAG de las mitocondrias como en el valor del I/S, este fenómeno indica que en tiempos específicos la CAG de las mitocondrias no son reguladas por las MAMs. Finalmente, a los 30 días en animales control se mantienen las diferencias en la CAG de ambos orgánulos, pero en animales STZ la CAG es similar, lo que lleva a proponer que en tiempos y condiciones específicas las MAMs son las encargadas de regular la CAG de las mitocondrias. Estos datos se discuten a continuación.

7.1 Peso y glicemia

Los animales STZ ganaron menos peso, lo cual concuerda con lo reportado por Kordonouri y colaboradores (2009), que la Diabetes Mellitus (DM) tipo 1 es un síndrome metabólico que puede afectar al crecimiento y desarrollo de los individuos que la padecen. Además, estos autores mencionan que se han descrito situaciones de disminución de la velocidad de crecimiento, retraso de la pubertad y menor talla definitiva en pacientes mal controlados. En nuestro modelo los animales se podrían considerar similares a pacientes mal controlados, ya que nunca se intentó el control de la hiperglicemia. Además, la glicemia que se obtuvo para este modelo según la Asociación Americana de Diabetes (2008) y de la Organización Mundial de la Salud, es válida y característica de un paciente con DMT 1, lo cual apoya que se utilizó una condición estresante en este proyecto.

7.2 Control Respiratorio

El papel de los ácidos grasos es muy importante ya que dicta la estructura y función de la membrana; estos tienen la cualidad de modular las propiedades, como la fluidez y la permeabilidad, además de la actividad de algunas enzimas (Sanhuesa *et al* 2015), por consecuencia también algunos parámetros fisiológicos como el CR. Como se presenta en este estudio y coincidiendo con lo reportado por diversos como Okamoto y colaboradores en 1989, se puede observar que la composición de ácidos grasos tanto de tejido, como de RE, MAMs y mitocondrias, se modificó durante un modelo de diabetes. Además, se ha reportado que cuando existe una hiperglicemia, se incrementa la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), este incremento en la concentración de ROS viene acompañado de disfunción en la cadena de transporte de electrones que a su vez afecta al CR (Guzmán *et al* 2009).

Los datos obtenidos en el presente estudio demuestran la existencia de un desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones en condiciones de hiperglicemia, derivado de una disminución en el cociente respiratorio, alteración que ha sido señalada como resultado de la peroxidación de los lípidos de las membranas en distintas patologías, incluyendo la diabetes (Vamecq *et al* 2012, Santos *et al* 2003; Rolo y Palmeira, 2006; Dey y Swaminathan, 2010; Escutia, 2019).

Pérez-Hernández y colaboradores (2017), propusieron que el CR podría estar condicionado por la fluidez membranal, lo que concuerda con lo observado a los 7 días, donde a mayor fluidez mayor CR, como se observó en las mitocondrias control. Perseghin y colaboradores (2003) reportaron que el control respiratorio depende de la concentración de glucosa en sangre, entonces una hiperglicemia severa modifica la CAG de las membranas mitocondriales, como se puede observar en las tablas de composición (Tabla 2,3 y 4), lo cual modifica el control respiratorio. También, el cambio en la fluidez está relacionado con un incremento en la concentración de ácidos grasos libres, que a su vez estimula el desacoplamiento mitocondrial a través de proteínas desacoplaentes reduciendo la

actividad de la cadena respiratoria (Hagen y Vidal, 2002). Todo lo anterior en conjunto concuerda con lo observado durante el paso del tiempo bajo la condición estresante.

7.3 Composición de ácidos grasos

Los datos obtenidos muestran que una condición estresante severa como lo es la DE 1 desarrollada en este proyecto modifica la CAG de todas las membranas analizadas. La importancia de los ácidos grasos radica en que la estructura y el funcionamiento de la membrana depende de esta composición, por lo tanto, serán responsables de la modulación de las características fisicoquímicas de las membranas celulares, como el caso de la fluidez (Mejía-Zepeda y Pérez-Hernández, 2020). Al inicio del experimento (0 días) prácticamente no se presentaron diferencias entre las fracciones, lo cual podría explicarse por lo reportado por Escutia (2019), donde ya se había observado similitudes entre las membranas de animales control a los dos meses de edad, en donde se mantiene cierto grado de similitud en la composición de estos orgánulos llevada a cabo por el RE, como lo indican Kormman y colaboradores en 2009. Además, se puede considerar que los animales aun no alcanzaban la madurez sexual ya que esta se considera una etapa de estrés para los animales, en ratas Wistar esta etapa se alcanza aproximadamente a los dos meses (Cossio-Bolanos *et al* 2013). La única diferencia encontrada fue entre RE y MAMs, este fenómeno nos indicaría que la contaminación cruzada reportada por Stone y colaboradores en 2008 sería mínima, ya que incluso la fracción mitocondrial purificada está contaminada hasta en un 20 % de MAMs, por lo cual al existir pocas diferencias entre estas fracciones nos podría dar un efecto de similitud en la CAG de dichas membranas, pero al paso del tiempo es evidente que la CAG se modificó al punto en el que dicha similitud no se ve reflejada.

7.3.1 Composición de ácidos grasos de tejido hepático y mitocondrias

Primeramente, se puede observar cómo se modifica la composición con el progreso de la DE 1, en este caso al tratarse de tejido hepático, se confirma lo reportado por Pérez Hernández en 2017, ya que las membranas mitocondriales modifican su CAG incrementando o disminuyendo la cantidad de AG insaturados o saturados de manera diferente a la del tejido del que provienen. Algo curioso fue que el I/S no aumentó como en el reporte anterior, pero se podría explicar ya que si comparamos los resultados de este proyecto con lo reportado por Mejía-Zepeda y Pérez-Hernández en 2020 podemos observar que se presentan cambios similares cuando comparamos animales que fueron inducidos a DMT 2 por 6 meses con los animales de este proyecto que fueron inducidos a una hiperglicemia severa por un mes. Lo anterior nos podría indicar que una hiperglicemia severa acelera los cambios que se presentan en la DMT 2 a largo plazo. Esto también se puede evidenciar comparando la tendencia que muestran los AGs esteárico y oleico, lo que podría indicar la actividad de la $\Delta 9$ desaturasa, además de que el índice de fluidez también es muy parecido entre estos dos grupos. El ácido eicosapentaenoico (EPA) incrementa su disponibilidad en mitocondrias de manera más contundente a comparación del tejido, lo que concuerda con lo reportado por Sullivan y colaboradores en 2018 donde mencionan que los ácidos grasos omega 3 participan en la remodelación de las membranas, otorgándoles propiedades particulares (Sullivan *et al* 2018).

En la actualidad los efectos de la diabetes sobre la fluidez de membrana son múltiples, algunos investigadores reportan que las membranas biológicas muestran una disminución en la fluidez al ser expuestas a la condición estresante (Pérez-Hernández *et al* 2010; Bakan *et al* 2006, Nanetti *et al* 2008), pero otras investigaciones revelan un aumento de la fluidez de la membrana (Figuroa García *et al* 2015; Pérez-Hernández *et al* 2017; Waczulikova *et al* 2007). En esta investigación se encuentra una disminución en la fluidez, relacionada con la diabetes; parece que el descenso se da cuando la diabetes es severa y la

enfermedad prolongada. Llegando a este punto podemos confirmar que la hiperglicemia en nuestro modelo modificó la CAG de las membranas mitocondriales de manera diferente a la del tejido del que provienen, para tratar de comprender este fenómeno procedemos a discutir lo encontrado con el RE.

7.3.2 Composición de ácidos grasos de RE y mitocondrias

Como se mencionó anteriormente parece que en los 0 y 7 días el RE se encuentra regulando la composición de ácidos grasos de tejido y mitocondrias (Kornmann *et al* 2009). English y colaboradores (2009) señalan que el RE pierde su membrana de manera constante, debido a la formación de vacuolas, por lo que necesitan regenerarse constantemente. La CAG del RE depende de la alimentación, además es el sitio de síntesis de AGs y fosfolípidos, por lo tanto, se hipotetiza que el resto de las membranas celulares debería tener una composición similar (Escutia, 2019; Maher *et al* 2018 y Stryer *et al* 2013).

En este proyecto se encuentra que en animales normoglicémicos el RE y las mitocondrias presentan una composición distinta a partir de los 15 días, sin embargo, en animales que fueron expuestos a una hiperglicemia severa se observa que existe una diferenciación a los 15 días. Sin embargo, a los 30 días ocurre una disminución en la fluidez de las membranas mitocondriales, lo cual vuelve similar la CAG de membranas mitocondriales a la del RE. Esto es un evento curioso, ya que, debido al origen evolutivo del RE, explicado como una evaginación de la membrana plasmática, este debería tener una composición similar al tejido y por lo tanto mantener las mismas diferencias con las mitocondrias (Mironov *et al* 2007). Sin embargo, esto no ocurre, lo que nos lleva a pensar que el RE al encontrarse bastante diferenciado puede regular su CAG de manera independiente. La similitud que aquí observamos a los 30 días entre las composiciones del RE y las mitocondrias, podría deberse a que el RE cuenta con una vía de señalización llamada UPR, cuya función es mantener la homeostasis del RE y que se activa bajo condiciones de estrés (Oakes y Papa, 2015). Una condición estresante prolongada podría estar involucrando al RE con las

mitocondrias para mantener este control. Además, esta ruta provoca que se liberen ácidos grasos del tejido adiposo y el RE tiende a almacenarlos (Díaz, 2017), los cuales podrían estar siendo enviados a la mitocondria para mantener la homeostasis celular, pero sólo bajo un estrés prolongado como se observa a los 30 días. Algo a resaltar es que no se encontraron las mismas diferencias que lo reportado por Escutia en 2019, como se indicó anteriormente, la hiperglicemia severa modifica la velocidad en la que se presentan los cambios, por lo cual estos cambios mencionados se podrían observar en diferentes periodos de tiempo con el progreso de la condición estresante.

Para el caso de los insaturados, el ácido araquidónico disminuye sólo en mitocondrias, lo que concuerda con lo reportado por Delachambre *et al* (1998). El ácido araquidónico es un producto de la elongación y desaturación del AG linoleico, concuerda con que se encuentra en proporciones mayores y el araquídico en una abundancia menor en la membrana del RE. En las mitocondrias el fenómeno anterior no ocurre, lo cual podría ser la evidencia de que existe una afinidad selectiva de la sintasa de ácidos grasos (Reyes-Hernández *et al* 2018). Se puede pensar que quizá en los animales inducidos se modifica la afinidad de la FAS. Además, las enzimas responsables en la regulación de la composición de ácidos grasos de las membranas, como las elongasas, desaturasas, fosfolipasas, y las lisofosfolípido acil-transferasas han sido propuestas como responsables del mantenimiento de la fluidez (Kates *et al* 1984). Como reporta Hulbert y colaboradores (2005) la afinidad de estas enzimas se modifica dependiendo del ambiente lipídico, el cual como se observa en este experimento se está modificando de manera diferente en todas las fracciones, un caso específico es la posible actividad de la delta 9 desaturasa, ya que en mitocondrias STZ de 30 días se observa que el AG linoleico incrementa su abundancia relativa casi 10 veces, en las MAMs este AG no se encuentra y en el RE desaparece con la condición estresante, lo cual indicaría que esta desaturasa tiene mayor afinidad con las mitocondrias y podría ser una parte del mecanismo por el cual estas están reglando su CAG, ya que el AG linoleico es de carácter no esencial, debería presentarse de manera ubicua dentro de la célula. Esto podría indicar que por

simple posición las membranas tengan mayor disponibilidad de ciertos ácidos grasos. Además, Cester y colaboradores en 1996 reportan que en la diabetes las membranas de RE sufren una remodelación al igual que las mitocondrias, por lo cual estarían sometidas ambas membranas a procesos de remodelación similares y no sería extraño que en cierto punto de la condición estresante sean similares sus composiciones. Finalmente, el fenómeno en donde el índice I/S de mitocondrias se encontrara con el del RE a los 30 días puede ser un evento casuístico ya que la tendencia de ambos orgánulos es muy marcada, en donde el I/S de RE tiende a incrementar y el I/S de mitocondrias tiende a disminuir, lo que indica que el RE no tendría totalmente el control de las mitocondrias. Por lo anterior a continuación se discute lo encontrado en la comparación de MAMs y mitocondrias.

7.3.3 Composición de ácidos grasos de MAMs y mitocondrias

Como lo hemos mencionado se ha reportado recientemente que en las MAMs es donde se da la mayor parte del transporte de lípidos (Kornmann *et al* 2009, Fagone y Jackoski, 2009, Szymański *et al* 2017); también se propone que las MAMs en condiciones homeostáticas, son cruciales para la adecuada bioenergética de las mitocondrias, además se cree que son las reguladoras maestras de la forma mitocondrial y de su motilidad (Van Vilet y Agostinis 2018). Estos autores también mencionan que se ha demostrado que las MAM transfieren las señales de estrés de RE a las mitocondrias, por lo que se podría pensar que en efecto las MAMs tienen gran influencia en la respuesta de las mitocondrias al estrés. Lo descrito anteriormente podría ser la razón por la cual las mitocondrias responden al estrés modificando su composición de ácidos grasos antes que el RE. El contacto deteriorado entre MAM y las mitocondrias provoca disfuncionalidad de estas últimas (Vance, 2014), además Díaz (2017) menciona que la integridad de las MAMs se ve afectada por la acumulación de ácidos grasos saturados, por lo cual sería importante saber la composición de las MAMs para saber cómo participan en el proceso de regulación específico de las mitocondrias.

En este trabajo se encuentra el mismo evento que se presentó con el RE, bajo condiciones normales las mitocondrias se diferencian de las MAMs a partir de los 15 días, pero bajo condiciones de estrés esta diferenciación no se mantiene a los 30 días. Lo anterior hace suponer que al mantenerse la condición estresante, las MAMs toman el control de la CAG de las membranas mitocondriales, lo cual no sería extraño, ya que se ha reportado que en mamíferos, las fosfatidilserina sintasas 1 y 2 (PSS-1 y PSS-2) se enriquecen en MAM y se excluyen del RE (Stone y Vance, 2000). Lo anterior se relaciona con una transferencia eficiente de fosfolípidos a las mitocondrias, además, existen enzimas involucradas en la síntesis de fosfolípidos que tienen una localización entre MAM y RE, como la fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa del hígado, que convierte la PE en PC (Vance *et al* 1997). Por lo tanto, que el evento observado a los 30 días sea el mismo entre RE y MAMs con las mitocondrias, parece lógico, ya que por lo dicho anteriormente, parece existir una diafonía entre RE y MAMs la cual estaría afectando a las mitocondrias en momentos específicos en diferentes magnitudes. Lo anterior en conjunto concuerda con lo reportado por Tatsuta y colaboradores (2013), quienes mencionan que el hecho de que algunos lípidos se sintetizan en las MAMs se relaciona con una transferencia eficiente de lípidos sintetizados por RE a las mitocondrias. Básicamente el funcionamiento del RE depende del funcionamiento de las MAMs y a su vez las mitocondrias quedan a la expectativa de esta comunicación. Nadine Camougrand y Stéphen Manon en 2021 mencionan que la existencia de las MAMs sirve como un soporte para la difusión de lípidos entre RE y la membrana externa mitocondrial. Todo lo anterior explicaría por qué las mitocondrias llegan a ser parecidas tanto a RE como a las MAMs, pero no nos explica por qué son diferentes en el control, lo que deja la incógnita si algo más interviene, o si el fenómeno es meramente casuístico. Se propone estudiar las MAMs y analizar qué tanto participan o comparten labores con el RE para regular la CAG de las membranas mitocondriales.

7.4 Análisis de fracción mitocondrial

En este proyecto también se analizó una fracción mitocondrial sin purificar, donde se encontró que la CAG de las mitocondrias sin purificar es diferente en comparación con las mitocondrias aisladas en condiciones control, por lo que cabe destacar que no purificar las membranas mitocondriales puede causar un sesgo. De hecho, puede aportar al debate generado por los investigadores sobre si la DM provoca que incremente la fluidez de las membranas o disminuya. (Kamat y Roy en 2016, Pérez-Hernández y colaboradores en 2017 y Pilon en 2016). Es importante considerar que se presentó un efecto diferente en animales STZ, ya que no se presentan diferencias con las mitocondrias purificadas, lo cual en principio indica que quizá las uniones entre orgánulos sean más débiles en la condición estresante. También podría indicar que las MAMs no participan en la regulación de estas, ya que son extraídas del total, por lo que se esperaría que las mitocondrias purificadas modifiquen su CAG, fenómeno que no sucede. Lo anterior nos lleva a buscar una explicación sobre el comportamiento de las mitocondrias bajo condiciones de estrés prolongado. Klaus y Ost, (2020) reportaron que las mitocondrias liberan moléculas de señalización extracelularmente para regular la respuesta sistemática al estrés, llamada mitohormesis, y se indica que la respuesta a este estrés es incrementar la masa mitocondrial por medio de biogénesis o disminuirla por mitofagia (Sharma *et al* 2019). La mitohormesis por lo tanto, demanda mayor producción de proteínas, además de mayor aportación de fosfolípidos o AGs, lo cual nos indica que la mitocondria es capaz de iniciar cambios en su composición. Nadine Camougrand y Stéphen Manon (2021) reportaron que la coordinación precisa de estos procesos promueve la longevidad y la resistencia al estrés, mientras que su desacoplamiento acelera el envejecimiento, culminando en la muerte celular y del organismo. Esto lleva a proponer que posiblemente a los 30 días de la condición estresante estos procesos de mitohormesis se desacoplaron y por lo tanto tomaron el control de esta homeostasis celular tanto el RE como las MAMs o existió un fenómeno de influencia de estos dos orgánulos sobre las mitocondrias.

Los autores antes mencionados proponen que el deterioro mitocondrial potencia múltiples declives en la red homeostática que mantiene la salud y precipita muchas otras características del envejecimiento.

Para analizar lo anterior más a fondo se encontró que el deterioro de estos mecanismos reguladores asociados a las mitocondrias, ya sea a nivel de la síntesis de proteínas o de orientación mitocondrial, se asocia con una biogénesis mitocondrial reducida y también se vincula con múltiples patologías relacionadas con la edad (Latorre-Pellicer *et al* 2016; Akbari *et al* 2019; Pfanner *et al* 2019). Lo cual tiene sentido, ya que la mitohormesis se refiere al rango de respuestas citoprotectoras provocadas por un estrés mitocondrial leve que aumenta la capacidad de la célula para combatir un estrés similar en perturbaciones posteriores. Al verse interrumpida la mitohormesis por un estrés prolongado como el que se indujo en este proyecto, se dieron respuestas citoprotectoras por parte del RE y de las MAMs.

Algo que se puede resaltar es que el sentido en que las mitocondrias regularon la CAG fue distinta a la del tejido del que provienen, incluso distinta de las fracciones celulares que se reportan como las encargadas de regular dicha CAG, lo cual podría ser explicado con ayuda de la teoría de la endosimbiosis, la cual indica que las mitocondrias tienen un origen bacteriano (Margulis, 1967; Rigoulet *et al* 2021). Como lo sugieren algunos reportes recientes, las mitocondrias al ser sometidas a una condición estresante, modifican la composición de sus membranas de manera parecida a como responderían las bacterias, modificando su CAG incrementando la concentración de distintos AGs, demostrando así su origen bacteriano (Figuroa-García *et al* 2015, Pérez-Hernández *et al* 2017). Un indicador sobre la posibilidad de este mecanismo pueden ser los cambios que se presentan las bacterias bajo condiciones estresantes de temperatura, modificando la concentración de los ácidos grasos de cadena impar (15 y 17 C), conservando o reduciendo la concentración del ácido pentadecanoico y aumentando la del AG heptadecanoico. Algo similar ocurrió en este proyecto con las mitocondrias, por lo que podría ayudar a proponer que parte de los cambios encontrados en

mitocondrias están influenciados de cierta manera por su origen bacteriano (Pucci y Pucci, 2006). Además, otro fenómeno relevante observado en este proyecto es que los cambios que se presentaron en el modelo de DE 1 (un mes de exposición) concuerdan con el sentido de las modificaciones reportadas en animales con hiperglicemia ligera luego de 6 meses, esto podría indicar que un modelo de estrés severo acelera los cambios que podrían llegar a resultar con el paso del tiempo o con una condición estresante moderada (Mejía-Zepeda y Pérez-Hernández, 2020). Winocour y colaboradores (1990) reportaron que al paso del tiempo ocurren cambios en la fluidez de las membranas (Winocour *et al* 1990), además se ha reportado que la hiperglicemia ligera es un acelerador de los cambios que ocurren al paso del tiempo (Escutia, 2019). Sánchez-Ceinos (2015) reportaron que las MAMs es la zona de transición de 44% de lípidos entre RE y mitocondrias, lo cual concuerda con algunas de las etapas del crecimiento de los animales (0 y 7 días) tanto en grupos control como expuestos a DE 1, sin embargo, esta aseveración no puede aplicar durante toda la vida de un organismo, por lo que se propone que las MAMs son parte esencial de la regulación de la composición de AG de mitocondrias en momentos específicos y las mitocondrias de alguna manera mantienen dicho control sin depender completamente del RE no de las MAMs, aunque cabe aclarar que estos orgánulos siguen influyendo sobre las mitocondrias.

Se hace hincapié en la importancia de buscar el mecanismo por el cual las mitocondrias regulan su CAG, además puede ayudar a reproducir modelos más eficientes y regulados de estrés para observar dichos cambios. Lo anterior ayudaría a comprender que existe una diafonía entre todos los componentes celulares y que los eventos por más aislados que parezcan pueden deberse a un conjunto de respuestas.

8. Conclusión

Primeramente, en este proyecto se confirma que con la DE 1, las mitocondrias presentan una CAG distinta a la del tejido del que provienen y además presentan un I/S diferente al de las MAMs bajo condiciones control y de estrés en momentos específicos. Esto hace suponer que las MAMs podrían estar participando poco en la regulación de la composición de AG de la mitocondria. La composición de ácidos grasos de las MAMs resultó peculiar al tener AGs de transición como el láurico, así como la casi nula presencia de AGs de cadena impar, los cuales son de importancia para la fluidez de las membranas bacterianas y mitocondriales. Algo que resulta muy interesante es que las MAMs no modifican el I/S de mitocondrias sin purificar, lo cual abre el panorama para investigar más sobre estas interacciones. Por lo anterior, podemos mencionar dos puntos importantes, el primero es que las MAMs se involucran en la regulación de AGs de mitocondrias en momentos específicos tanto de la edad como de una condición estresante, el segundo nos indica que en las mitocondrias se podría estar regulando su CAG por algún mecanismo no descrito, en momentos específicos de la edad y de una condición estresante que estaría funcionando en conjunto con el RE y las MAMs.

Referencias Bibliográficas

- Akbari M, Kirkwood T B L, Bohr V A. Mitochondria in the signaling pathways that control longevity and health span. *Ageing Res. Rev.* 2019; 54, 100940.
- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2008; 31 (Suppl 1): S55-6.
- Alberts B, Dennis B, Julian L, Martin R, Keith R, James W. *Molecular biology of the cell.* España: Omega. 2016; 767-769.
- Bakan E, Yildirim A, Kurtul N, Polat M F, Dursun H, Cayir K. Effects of type 2 diabetes mellitus on plasma fatty acid composition and cholesterol content of erythrocyte and leukocyte membranes. *Acta Diabetol.* 2006; 43:109–113.
- Böttinger L, Ellenrieder L, Becker T. How lipids modulate mitochondrial protein import. *J Bioenerg Biomembr.* 2015; 48:125–135.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248–254.
- Camougrand N, Manon S. Mitochondria-associated membranes in the maintenance of cell homeostasis. *Mitochondrial Physiology and Vegetal Molecules.* France: Elsevier. 2021; 6 151:169
- Cester N, Rabini R A, Salvolini E, Staffolani R, Curatola A, Pugnali A, Brunelli M A, Biagini G, Mazzanti L. Activacion of endotelial cells during insulin dependent diabetes Mellitus: a biochemical and morphological study. *Eur J Clin Invest.* 1996; 26(7): 569-573.
- Chan D C. Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu. Rev. Genet.* 2012; 46, 265–287.
- Cossio-Bolaños M, Gómez C R, Vargas V R, Hochmuller F, Rosalvo T, Arruda M. Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas macho Wistar. *Nutr. Hosp.* 2013; 28 (6): 2151-2156. doi.org/10.3305/nh.2013.28.6.6659.

- Csordas A, Wick G, Bernhard D. Hydrogen peroxide-mediated necrosis induction in HUVECs is associated with an atypical pattern of caspase-3 cleavage. *Exp Cell Res.* 2006; 10: 1753-64.
- Delachambre M, Narce M, Asdrúbal P, Poisson. Changes in Tissue Polyunsaturated Fatty Acids with Age, in Spontaneously Hypertensive rats. *Lipids.* 1998; 33: 795-801.
- Dey A, Swaminathan K. Hyperglycemia-induced mitochondrial alterations in liver. *Life Sci.* 2010; 87(7–8):197–214.
- Díaz Salinas B E. Papel de las membranas asociadas a la mitocondria en la sensibilidad a la insulina cerebral en un modelo de obesidad en roedores. Tesis Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. 2017.
- English A R, Zurek N, Voeltz G K. Peripheral ER structure and function. *Current opinion in cell biology.* 2009; 21:506-602.
- Escutia M J. Composición de ácidos grasos de mitocondria y retículo endoplásmico extraídos de tejido hepático de ratas diabéticas. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 2019.
- Fagone P, Jackowski S. Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *J Lipid Res.* 2009; 50(Suppl):311– 316.
- Figuroa-García M C, Espinosa-García M T, Martínez-Montes F, Palomar-Morales M, Mejía-Zepeda R. Even a chronic mild hyperglycemia affects membrane fluidity and lipoperoxidation in placental mitochondria in Wistar rats. *PLoS One.* 2015; 10(12):1–15.
- Gennis R B. *Biomembranes; Molecular Structure and Function.* New York: Springer-Verlag. 1989.
- Geydan G, Giraldo G, Jaramillo M, McEwen M, Ossa P, Patiño R, Vásquez Y. *Biología de la célula.* Colombia: Fondo Editorial. 2006.

- Glancy B, Balaban R S. Energy Metabolism Design of the Striated Muscle Cell. *journals.physiology.org/journal/physrev*. 2021; (189.187.038.143).
- Guzmán J R, Lyra R, Cavalcanti N. DIABETES MELLITUS Visión Latinoamericana. *AC FARMACEUTICA, Brasil*. 2009; 530:539.
- Hagen T, Vidal-Puig A. Mitochondrial uncoupling proteins in human physiology and disease. *Minerva Med*. 2002; 93(1):41-57.
- Hayashi T, Rizzuto R, Hajnoczky G, Su TP. MAM. More than just a housekeeper. *Trends Cell Biol*. 2009; 19: 81-8.
- Hulbert A, Turner N, Storlien L, Else P. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biol Rev*. 2005; 80: 155-169.
- Jiménez L F, Merchant H. *Biología celular y molecular*. Mexico: PEARSON EDUCATION. 2015; 411-439.
- Kamat S G, Roy R. Evaluation of the effect of n-3 PUFA-rich dietary fish oils on lipid profile and membrane fluidity in alloxan-induced diabetic mice (*Mus musculus*). *Mol Cell Biochem*. 2016; 416:117–129.
- Kates M, Pugh E, Ferrante G. Regulation of membrane fluidity by lipid desaturases. *Biomembranes membrane fluidity*. 1984; 12: 379-395.
- Klaus S, Ost M. Mitochondrial uncoupling and longevity- a role for mitokines?. *Exp Gerontol*. 2020; 130, 110796.
- Kordonouri O, Maguire A M, Knip M, Schober E, Lorini R, Holl R W, Donaghue K C. Other complications and associated conditions with diabetes in children and adolescents. *ISPAD Compendium. Pediatric Diabetes*. 2009; 10(12): 204-210.
- Kornmann B, Currie E, Collins S R, Schuldiner M, Nunnari J, Weissman J S, Walter P. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science*. 2009; 325:477-481.
- Latorre-Pellicer A, Moreno-Loshuertos R, Lechuga-Vieco A V, Sánchez-Cabo F, Torroja C, Acín-Pérez R, Calvo E, Aix E, González-Guerra A, Logan A.

Mitochondrial and nuclear DNA matching shapes metabolism and healthy ageing. *Nature*. 2016; 535, 561-565.

-Lehninger D, Cox, M N. *Principles of Biochemistry*. Fourth Edition. 2002; 659-670.

-Lodish H. *Biología celular y molecular*. Madrid: Medica Panamericana. 2016; 513-634.

-Lowe S J, Anderson P G, Anderson S I. *HISTOLOGIA HUMANA*. España: Elsevier. 2020; 12-18.

-Margulis L."On origen of mitosing cells", *Journal of theoretical biology*. 1967; 14 (3): 225.

-Martínez M A, Yago T M D, Martínez de Victoria M E. *Lípidos de los alimentos*. Blanco de los Omega-3. España: Panamericana. 2013; 3-32.

-Maher M, Diesch J, Casquero R, Buschbeck M. Epigenetic-Transcriptional Regulation of Fatty Acid Metabolism and Its Alterations in Leukaemia. *Front. Genet*. 2018; 9:405. doi: 10.3389/fgene.2018.00405.

-Mejía E M, Hatch G. Mitochondrial phospholipids: role in mitochondrial function. *J Bioenerg Biomembr*. 2015; 48(2):99–112.

-Mejía-Zepeda R, Pérez-Hernández I H. Effect of alpha linolenic acid on membrane fluidity and respiration of liver mitochondria in normoglycemic and diabetic Wistar rats. *J Bioenerg Biomembr*. 2020; 52:421–430. <https://doi.org/10.1007/s10863-020-09859-z>.

-Mercer TR, Neph S, Dinger ME, Crawford J, Smith MA, Shearwood A.-MJ, Haugen E, Bracken CP, Rackham O, Stamatoyannopoulos JA. transcriptoma mitochondrial humano. *Celda*. 2011; 146, 645–658.

-Mironov A, Banin V, Irina S, Dolgikh V, Luini A, Beznoussenko G. *Evolution of the Endoplasmic Reticulum and the Golgi Complex Eukaryotic Membranes and Cytoskeleton: Origins and Evolution*. Landes Bioscience and Springer. 2007; 5:75-86.

- Morrison W R, Smith L M. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res.* 1964; 5:600–608.
- Nanetti L, Vignini A, Raffaelli F, Moroni C, Silvestrini M, Provinciali L. Platelet membrane fluidity and Na⁺/K⁺ ATPase activity in acute stroke. *Brain Res.* 2008; 1205:21–26.
- Noji H, Yoshida M. The rotary machine in the cell, ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 2001; 276 (3): 1665-8. PMID 11080505. doi:10.1074/jbc.R000021200.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Diario oficial. Miercoles 22 Agosto de 2001.
- Oakes A S y Papa R F. The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology. *Annu Rev Pathol.* 2015; 10: 173–194.
- Okamoto H, Kawaguchi H, Minami M, Saito H, Yasuda H. Lipid alterations in renal membrane of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1989; 13: 456-62.
- Pérez-Hernández I H, Avendaño-Flores Y S, Mejía-Zepeda R. Analysis of the membrane fluidity of erythrocyte ghosts in diabetic, spontaneously hypertensive rats. *Acta Diabetol.* 2010; 47(Suppl 1):S47–S55. <https://doi.org/10.1007/s00592-009-0120-9>.
- Pérez-Hernández I H, Domínguez-Fuentes J M, Palomar-Morales M, Zazueta-Mendizabal A C, Baiza-Gutman A, Mejía-Zepeda R. Liver mitochondrial membrane fluidity at early development of diabetes and its correlation with the respiration. *J. Bioenerg Biomembr.* 2017.
- Perseghin G, Petersen K, Shulman G I. Cellular mechanism of insulin resistance: potencial links with inflammation. *J Obes Relat Metab Disord.* 2003; 27(3): S6-11.
- Pfanter N, Warscheid B, Wiedemann N. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nat Rev. Mol. Cell Biol.* 2019; 20, 267-284.

-Pilon M. Revisiting the membrane-centric view of diabetes. *Lipids Health Dis.* 2016; 15(1):167.

-Poston C N, Krishnan S C, Bazemore-Walker C R. In-depth proteomic analysis of mammalian mitochondria-associated membranes (MAM) J. *Proteom.* 2013; 79:219–230. doi: 10.1016/j.jprot.2012.12.018.

-Pucci G N, Pucci C. Cambios en los ácidos grasos de membrana de *Microbacterium esteraromaticum* GNP-5 con diferentes temperaturas y osmolaridades. *Acta Biológica Colombiana.* 2006; 11:61-73.

-Reyes-Hernández C G, Cortijo D R, Rodríguez-Rodríguez P, Giambelluca S, Simonato M, González M, López A L, López-Giménez M R, Cogo P, Sáenz M, Carnielli V, and Arribas M. Effects of Arachidonic and Docosohexaenoic Acid Supplementation during Gestation in Rats. Implication of Placental Oxidative Stress. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19: 3863.

-Rigoulet M, Bouchez C L, Molinié T, Cuvelier S, Mazat JP, Ransac S. Mitocondrias: ultraestructura, dinámica, biogénesis y funciones principales. *Fisiología Mitocondrial y Moléculas Vegetales.* Francia. Elsevier Inc. 2021; 1:3-31.

S. Duvezin-Caubet, P. Paumard y Anne Devin

-Rivadeneira, P S. Sereno, J E. Caicedo, M A. Nuevas Estrategias de Control Glucémico en Pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 1. *Revista Iberoamericana de Automática e Informática.* 2019; 16(2):238-248. <https://doi.org/10.4995/riai.2018.9728>.

-Rolo A P, Palmeira C M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006; 212:167–178.

-Salati L M, Goodridge A G. Síntesis de ácidos grasos en eucariotas, en *New Comprehensive Biochemistry.* Amsterdam: Elsevier. 1996; 4:101-127.

-Sánchez-Ceinos J. Caracterización de Rab18 en el metabolismo lipídico de adipocitos. Tesis Maestría. Universidad de Córdoba. España. 2015.

- Sanhueza C J, Durán A S, Torres G J. Los ácidos grasos dietarios y su relación con la salud. *Nutr. Hosp.* 2015; 32(3): 1362-1375. doi.org/10.3305/nh.2015.32.3.9276.
- Santos D L, Palmeira C M, Seíça R, Dias J, Mesquita J, Moreno A J, Santos M S. Diabetes and mitochondrial oxidative stress: a study using heart mitochondria from the diabetic Goto-Kakizaki rat. *Mol Cell Biochem.* 2003; 246(1–2):163–170.
- Sáyago-Ayerdi S G, Vaquero M P, Schultz-Moreira A, Bastida F, Sánchez-Muniz F J. Utilidad y controversias del consumo de ácidos grasos de cadena media sobre el metabolismo lipoproteico y obesidad. *Nutr Hosp.* 2008; 23(3):191-202.
- Schwarz S D, Blower M D. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2016; 73: 79-94.
- Scorrano, L, De Matteis M A, Emr S, Giordano F, Hajnóczky G, Kornmann B, Lackner L L, Levine T P, Pellegrini L, Reinisch K, Rizzuto R, Simmen T, Stenmark H, Ungermann C, Schuldiner M. Coming together to define membrane contact sites. *Nat Commun.* 2019; 10 (1287).
- Sharma A, Smith H J, Yao P, Mair W B. Causak roles of mitochondrial dynamics in longevity and healthy aging. *EMBO Rep.* 2019; 20, e48395.
- Sonnino S, Prinetti A. Membrane Domains and the “Lipid Raft” Concept. *Current Medicinal Chem.* 2013; 20: 1, 4-21(18)
- Sorriento D, Pascale A, Finelli R, Carillo AL, Annunziata R, Trimarco B, Iaccarino G. Targeting mitochondria as therapeutic strategy for metabolic disorders. *ScientificWorldJournal.* 2014;13: 1-9.
- Stone S J, Vance J E. Mitochondria-associated membranes in the maintenance of cell homeostasis. *J. Biol. Chem.* 2000; 275 (44), 34534-34540.
- Stone S J, Levin M C, Zhou P, Han J, Whalter T C, Farese Jr R V. The Endoplasmic Reticulum Enzyme DGAT2 Is Founding Mitochondria-associated-

Membranes and Hasa Mitochondrial Targeting Signal That Promotes Its Association with Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 2008; 284 (8):5352–5361.

-Stöckl M T, Hwang I K, Rosenthal M J, Harris D M, Yamaguchi D T, Yip I, Go V L. Antidiabetic actions of arachidonic acid and zinc in genetically diabetic GotoKakizaki rats. *Metabolism.* 2003; 52(1):7-12.

-Stryer L, Berg J M, Tymoczko J L. *BIOQUÍMICA CON APLICACIONES CLÍNICAS.* 7ma Ed. España: Reverté. 2013; 639-672.

-Sullivan E M, Pennington E R, Green W D, Brown D A, Shaikh S R. Mechanisms by which dietary fatty acids regulate mitochondrial structure-function in health and disease. *Adv Nutr.* 2018; 9:247–262.

-Szymański J, Janikiewicz J, Michalska B, Patalas-Krawczyk P, Perrone M, Ziółkowski W, Duszynski J, Pinton P, Dobrzyn A, R. Wieckowski M. Interaction of Mitochondria with the Endoplasmic Reticulum and Plasma Membrane in Calcium Homeostasis, Lipid Trafficking and Mitochondrial Structure. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(7), 1576.

-Tatsuta T, Scharwey M, Langer T. Mitochondrial lipid trafficking. *Trends Cell Biol.* 2013; (1):44-52. doi:10.1016/j.tcb.2013.07.011.

-Vamecq J, Dessein A F, Fontaine M, Briand G, Porchet N, Latruffe N, Andreolotti P, Cherkaoui-Malki M. Mitochondrial Dysfunction and Lipid Homeostasis. *Current Drug Metabolism.* 2012; 13 (10): 1388-1400.

-Van Vliet A R, Agostinis P. Mitochondria-Associated Membranes and ER Stress. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2018; 414:73-102.

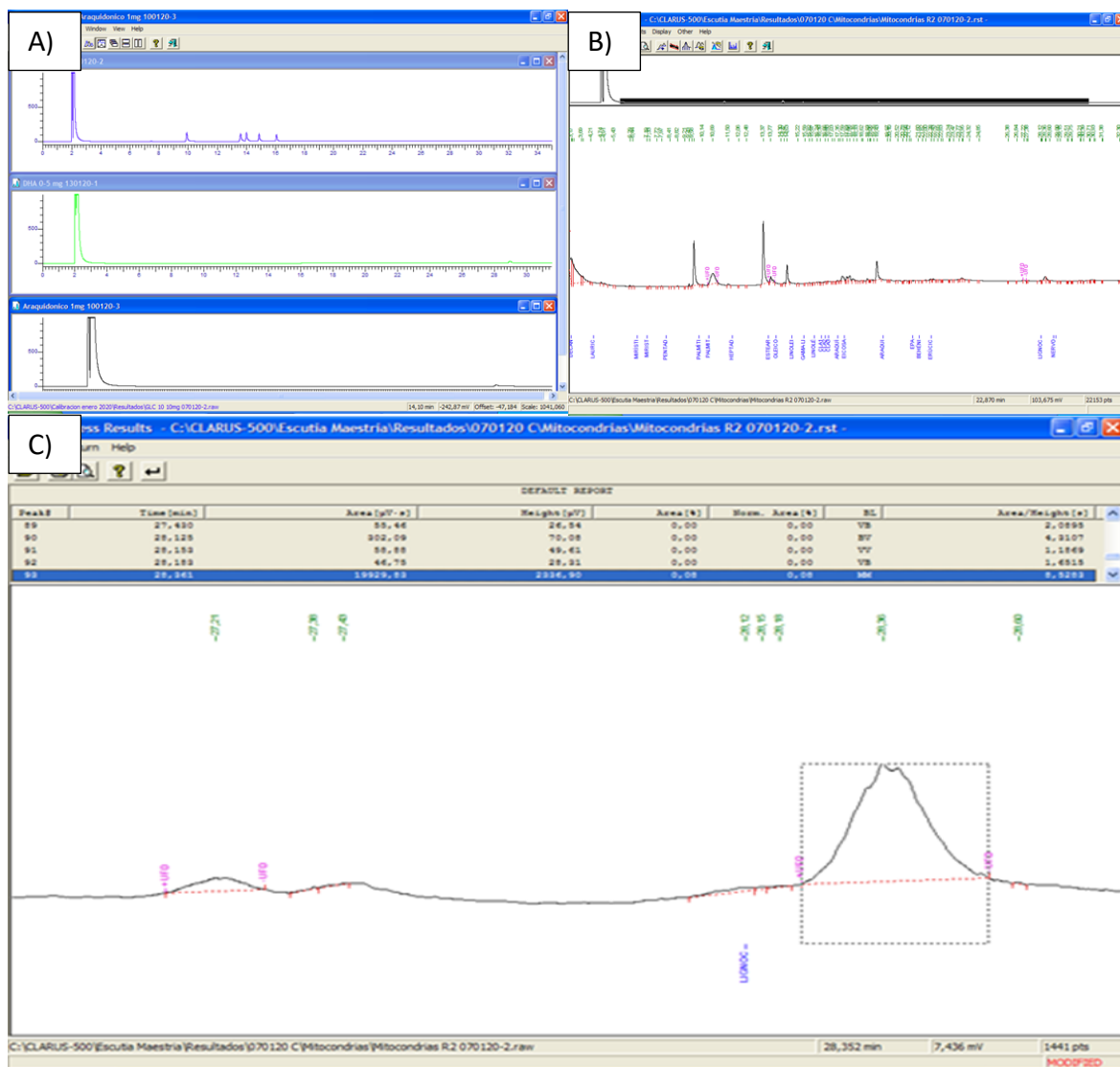
-Vance D E, Walkey C J, Cui Z. Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase from liver. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism.* 1997; 1348 (1-2): 142-150.

-Vance D E. MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: Lipids and beyond. *BBA-Molecular and Cell Biology of Lipids.* 2014; 1841(4): 595-609.

- Voet D, Voet J. *Bioquimica*. Buenos Aires: Medica Panamericana. 2006; 830-833.
- Waczulikova I, Habodaszova D, Cagalinec M, Ferko M, Ulicna O, Mateasik A. Mitochondrial membrane fluidity, potential, and calcium transients in the myocardium from acute diabetic rats. *J Physiol Pharmacol*. 2007; 85:372–381.
- Winocour P D, Bryszewska C, Watala M L, Rand R M, Epand R L, Kinlough-Rathbone M A, Packham and Mustad J F. Reduced membrane fluidity in platelets from diabetic patients. *Diabetes*. 1990; 39:241-4.
- Wu H, Carvalho P, Voeltz G K. Here, there, and everywhere: The importance of ER membrane contact sites. *Science*. 2018; 361 (6401): eaan5835.
- Zhang A, et al. Quantitative proteomic analyses of human cytomegalovirus-induced restructuring of endoplasmic reticulum-mitochondrial contacts at late times of infection. *Mol. Cell. Proteom.* 2011; 10:M111.009936. doi: 10.1074/mcp.M111.009936.

Anexo

Anexo 1. Cromatogramas (estándares, muestra de mitocondrias y AG DHA)



A) Cromatograma de algunos estándares al azar, B) cromatograma de muestra completa y C) acercamiento al AG DHA donde se observa el área bajo la curva integrada y su valor indicado en color azul por el programa.

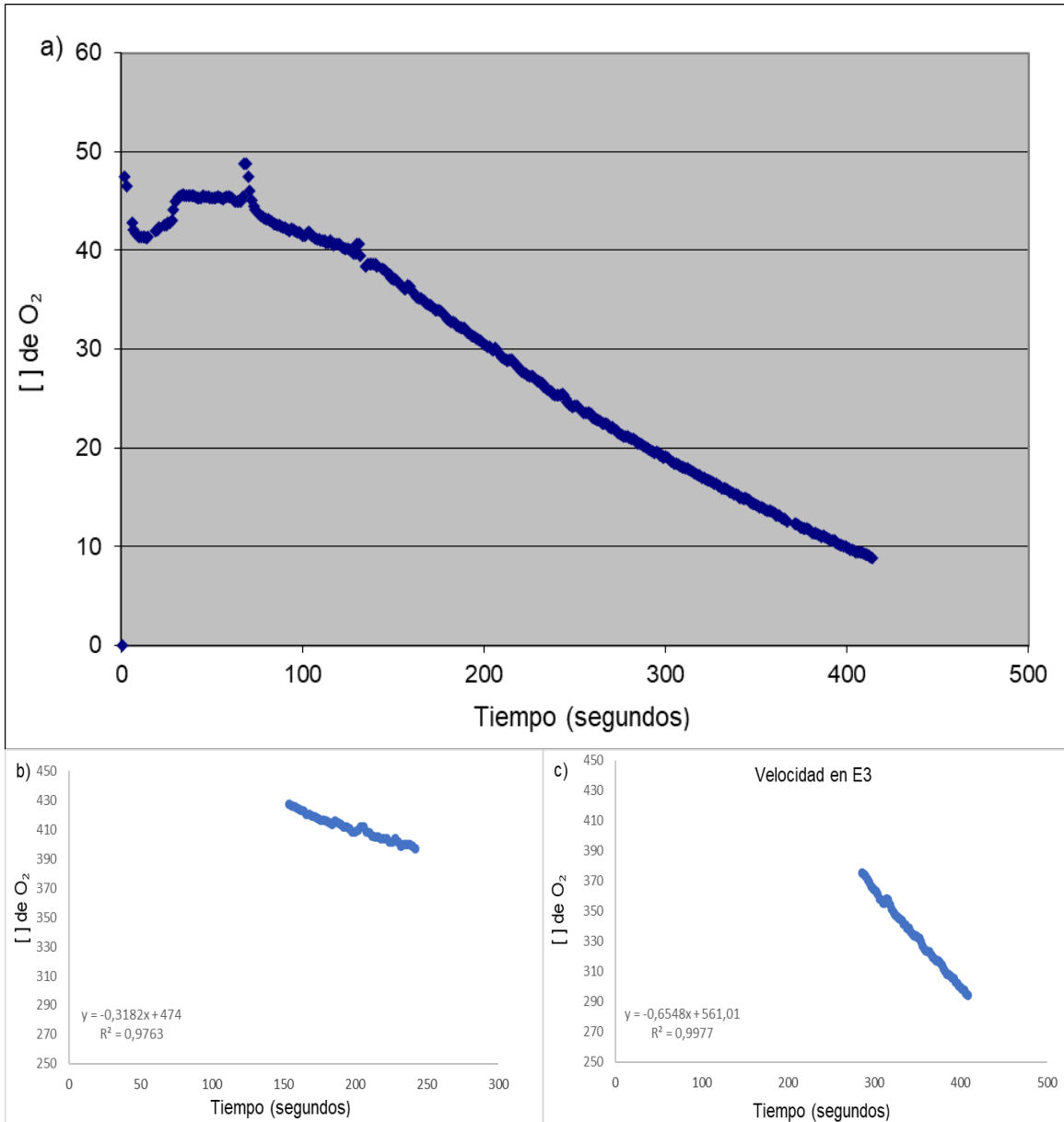
Anexo2. Tiempos de retención de estándares AGs en minutos

| | N° de Carbonos | Nombre | Promedio |
|----|-----------------|------------------|----------|
| 1 | C8:0 | Octanoico | 2.587 |
| 2 | C10:0 | Decanoico | 3.152 |
| 3 | C12:0 | Laurico | 4.341 |
| 4 | C14:0 | Mirístico | 6.662 |
| 5 | C14:1 | Miristoleico | 7.191 |
| 6 | C15:0 | Pentadecanoico | 8.196 |
| 7 | C16:0 | Palmitico | 9.961 |
| 8 | C16:1 | Palmitoleico | 10.471 |
| 9 | C17:0 | Heptadecanoico | 11.716 |
| 10 | C18:0 | Esteárico | 13.645 |
| 11 | C18:1 | Oleico | 14.045 |
| 12 | C18:1 Trans | Elaidico | 13.970 |
| 13 | C18:2 | Linoleico | 14.893 |
| 14 | C18:3 | Linolénico | 16.076 |
| 15 | γ C18:3 | Gamma Linolénico | 15.520 |
| 16 | C18:2 conjugado | CLA1 | 16.448 |
| 17 | C18:2 conjugado | CLA2 | 16.653 |
| 18 | C:20 | Araquídico | 17.323 |
| 19 | C20:4 | Araquidónico | 19.734 |
| 20 | C20:6 | EPA | 21.316 |
| 21 | C22:0 | Behenico | 21.659 |
| 22 | C22:1 | Erucico | 22.286 |
| 23 | C22:6 | DHA | 28.901 |
| 24 | C24:0 | Lignocérico | 28.124 |
| 25 | C24:1 | Nervonico | 28.808 |

Promedio en minutos de tres inyecciones de cada estándar de AG, para calibración del cromatógrafo de gases.

Anexo 3. Consumo de oxígeno y velocidad de respiración en estado 3 y 4 de mitocondrias control y STZ a los 30 días.

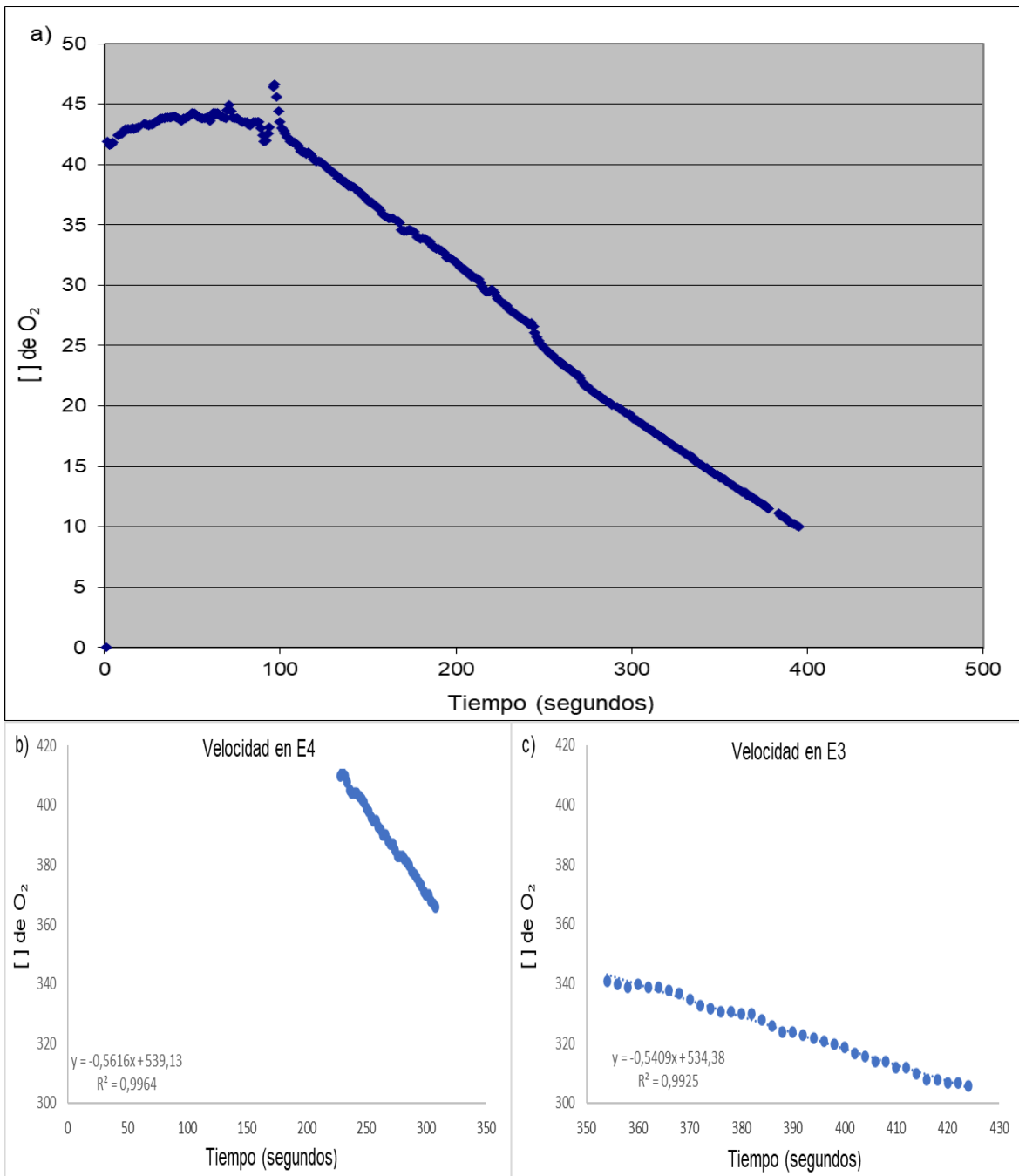
Anexo 3.1 Animales control



| C 30 días | Velocidad | CR |
|-----------|-----------|------------|
| E4 | 0,3182 | 2,05782527 |
| E3 | 0,6548 | |

a) Grafica obtenida del consumo de oxígeno en tiempo real, b) grafica de la velocidad de consumo de oxígeno en estado 4, c) grafica de la velocidad de consumo de oxígeno en estado 3 con la adición de ADP. Tabla anexa indica el cálculo E3/E4 para obtener el CR, cada experimento se realizó por triplicado

Anexo 3.2 Animales STZ



| STZ 30 días | Velocidad | CR |
|-------------|-----------|------------|
| E4 | 0,5616 | 0,96314103 |
| E3 | 0,5409 | |

a) Grafica obtenida del consumo de oxígeno en tiempo real, b) grafica de la velocidad de consumo de oxígeno en estado 4, c) grafica de la velocidad de consumo de oxígeno en estado 3 con la adición de ADP. Tabla anexa indica el cálculo E3/E4 para obtener el CR, cada experimento se realizó por triplicado

