



Universidad Nacional Autónoma De México

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno en mitocondrias aisladas de hígado de conejo, con una dieta enriquecida en ácido palmítico.

Que para obtener el título de Biólogo

PRESENTA

Mario Alejandro Pérez Medina

Directora de tesis: Dra. C. Marissa Calderón Torres



Los Reyes Iztacala, Edo. De México 2015



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.

## **Agradecimientos**

A la Dirección General Asuntos del Personal Académico, UNAM proyecto PAPIIT N223113 responsable Dr. Adolfo René Méndez Cruz.

A la Dra. C. Marissa Calderón Torres, por haber compartido juntos conocimientos, experiencias nuevas sobre los conejos, gracias por su paciencia, por su tiempo y por todos los consejos brindados en cada momento.

Al laboratorio de Inmunología de la Unidad De Morfofisiología y Función de la FES Iztacala por el apoyo brindado durante este trabajo de investigación, por demostrarme que se puede hacer investigación de gran calidad a pesar de todas las adversidades.

Un agradecimiento al Dr. José Rafael Jiménez Flores, M. en C. Santiago Cristóbal Sigríst Flores, a la M. en C. Norma Sánchez Sánchez, a la Dra. Itzell Gallardo Ortiz por el tiempo invertido a la revisión de mi trabajo y por sus valiosos comentarios en varios momentos para la mejora de este trabajo.

Gracias a la UNAM, a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, a la carrera de Biología y a todos mis profesores, por brindarme las herramientas para cumplir esta meta.

## **Dedicatoria**

Dedico esta tesis a toda mi familia, en especial a mi madre Sofía Medina y a mi abuela Rosa Flores quienes han sido pilares fundamentales en este proceso de formación. Gracias porque a pesar de ser una tarea difícil para ustedes jamás se rindieron, gracias por enseñarme todo lo que me identifica como persona, principios y valores por enseñarme con ejemplos que, nunca hay tarea imposible si se realiza con esfuerzo y trabajo constante, nunca tendré las palabras suficientes para agradecer todo lo que han hecho para ayudarme a cumplir esta meta y que mi proyecto de vida siga adelante.

A mi hermana Adriana, que a pesar de ser yo el hermano mayor, me has dado lecciones importantes de lo que tiene que ser un hermano, gracias por escucharme y apoyarme en todo momento.

A mis tíos José e Hilda Medina y a mi primo Víctor, gracias por todo el apoyo y consejos brindados, además de que sin ustedes hubiera sido muy complicado cumplir esta meta.

Dedico de manera especial a mi sobrino Alfredo (Q.E.P.D), gracias por cada momento que tuve la oportunidad de compartir contigo, que a pesar de haber sido muy breve, sabes que te quise mucho y siempre estarás presente en mi memoria.

Karen, Gracias enseñarme que la vida se vive “De ahora en adelante”, gracias por cada momento feliz que hemos pasado juntos, pero te agradezco más por los momentos en donde fue difícil para mi mantener la calma y a pesar de todo, tu siempre tuviste muchas sonrisas, muchos abrazos y muchos besos para mí.

Gracias a esa familia que tuve la oportunidad de ir conociendo en el camino, en especial a Edgar Reséndiz, Juan González, Mariella Jiménez, Nadxielli Gil, Mario Tamayo y a todos los demás amigos que compartieron conmigo el conocimiento y las aulas durante esta etapa de mí vida.

Gracias a todas aquellas personas que no vienen a mi memoria en este momento, pero que fueron participes de mi formación personal y profesional.

# Índice

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>6</b>
DEFINICIÓN DE OBESIDAD .....	7
METABOLISMO DE LÍPIDOS.....	11
<i>β-oxidación</i> .....	13
<i>La cadena transportadora de electrones</i> .....	14
LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO) .....	16
ERO EN ENFERMEDADES METABÓLICAS.....	19
PRODUCCIÓN DE ERO EN LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A LA OBESIDAD .....	20
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>21</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
<i>Objetivo general</i> .....	21
<i>Objetivos particulares</i> .....	21
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>22</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
<i>Modelo animal</i> .....	23
<i>Medición de parámetros bioquímicos</i> .....	24
<i>Extracción de mitocondrias</i> .....	24
<i>Medición de la producción de ERO</i> .....	25
<i>Determinación de la función mitocondrial mediante la oxidación de bromuro 1-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-3,5-difeniltetrazolio (MTT)</i> . .....	26
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
<i>Medición de la producción de ERO 6 meses</i> .....	27
<i>Medición de la producción de ERO 12 meses</i> .....	29
<i>Funcionamiento mitocondrial mediante el ensayo del MTT</i> .....	35
<i>Bioquímica Sanguínea de los conejos del control y tratamientos después de 6 meses</i> .....	37
<i>Bioquímica Sanguínea de los conejos del control y tratamientos después de 12 meses</i> .....	39
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>41</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>45</b>
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>46</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

## Abreviaturas

- AINE Antiinflamatorio no esteroideo
- ASA Aspirina
- apoC-II Apolipoproteína C-II
- ATP Trifosfato de adenosina
- CAT Catalasa
- CCCP Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona
- COX Enzima clicooxigenasas
- CTE Cadena trasportadora de electrones mitocondrial
- DM2 Diabetes mellitus tipo 2
- ECV Enfermedades cardiovasculares
- EO Estrés Oxidante
- ERO Especies reactivas de oxígeno
- ETNA Esteatohepatitis no alcohólica
- FADH Flavín adenín dinucleótido reducido
- GPx Glutación Peroxidasa
- HDL Lipoproteínas de Alta densidad
- HGNA Hígado graso no alcohólico
- IMC Índice de Masa Corporal
- INEGI Instituto Nacional de Geografía y Estadística
- LDL Lipoproteínas de baja densidad
- NADH Nicotinamida adenina Dinucleótido reducido
- OMS Organización mundial de la salud
- PGs Prostaglandina
- SM Síndrome metabólico
- SOD: Superóxido dismutasa
- TXs Tromboxanos
- URF Unidades relativas de fluorescencia

## Introducción

Las dietas altas en grasa y el estilo de vida sedentario en la sociedad moderna están asociados con condiciones patológicas en las que se incluye la obesidad. De acuerdo a estadísticas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que en países desarrollados, el 40% o más de los requerimientos de energía diarios son suministrados por los triglicéridos de la dieta, esto a pesar de que en la mayoría de las guías nutricionales recomiendan que el aporte máximo de calorías suministradas por las grasas no debe ser mayor del 30% (Haslam and James, 2005).

La OMS, ha considerado a la obesidad como un problema de salud a nivel mundial, ya que se ha estimado que cada año fallecen alrededor de 3.4 millones de personas adultas por alguna enfermedad relacionada con la obesidad (OMS, 2012). En México, la prevalencia de obesidad y sobrepeso en personas adultas de 20 años o más, es de 48.6 millones de personas (Barquera *et al.*, 2013).

La obesidad es un factor de riesgo conocido, es decir, esta condición genera una predisposición a ciertas enfermedades metabólicas como: enfermedades cardiovasculares (ECV), diabetes mellitus 2 (DM2), dislipidemia, esteatohepatitis no alcohólica (ETNA), etc. (Sikaris, 2004). De acuerdo con datos del Instituto Nacional de Geografía Y Estadística (INEGI) en 2012, las ECV y la DM2, ocupaban los dos primeros lugares como causas de muerte en México (INEGI, 2012).

Estos problemas tienen importantes repercusiones a nivel económico, ya que obligan a que una parte importante del presupuesto nacional, sea destinado a los sistemas de salud pública a la atención de enfermedades asociadas a la obesidad, tan solo para México, las estimaciones de los costos directos e indirectos generados por los pacientes que tienen DM2 entre los años 2003 a 2005 fueron de 317,631,206 millones de dólares (Arredondo and Zúñiga, 2004).

## **Definición de obesidad**

La obesidad es una enfermedad crónica de origen multifactorial que se caracteriza por la presencia de un exceso de grasa corporal, generando un aumento de peso. La causa principal es el almacenamiento de grasa en forma de ácidos grasos ocasionado por una alta ingesta de alimentos hipercalóricos ricos en grasa, sal y azúcares así como la disminución en la actividad física, causando un desequilibrio energético (Haslam and James, 2005).

Este almacenamiento de energía en forma de ácidos grasos es esencialmente la única manera en la cual el peso corporal puede llegar a aumentar, ya que en otra forma de almacenamiento de energía, como el glucógeno, no tiene la capacidad de generar una hiperplasia e hipertrofia en los tejidos donde se almacena (Haslam and James, 2005).

Las organizaciones de salud públicas a nivel mundial han establecido criterios de diagnóstico para definir si una persona es obesa, uno de ellos es el Índice de Masa Corporal (IMC), que se calcula a partir del peso corporal (kg) dividido por la altura al cuadrado ( $m^2$ ) (Etchison et al., 2011; OMS, 2012).

De acuerdo a la OMS, se ha establecido que una persona obesa es aquella que presente un  $IMC > 30.0$  para los hombres y  $> 28.6$  para las mujeres (Tabla 1). Actualmente, se han tomado diferentes características que ayudan a establecer de mejor manera este parámetro como edad, género, etnia, etc. (Etchison et al., 2011; Samuelson, 1997).



**Tabla I.** Clasificación del IMC establecido por la OMS (OMS, 2012)

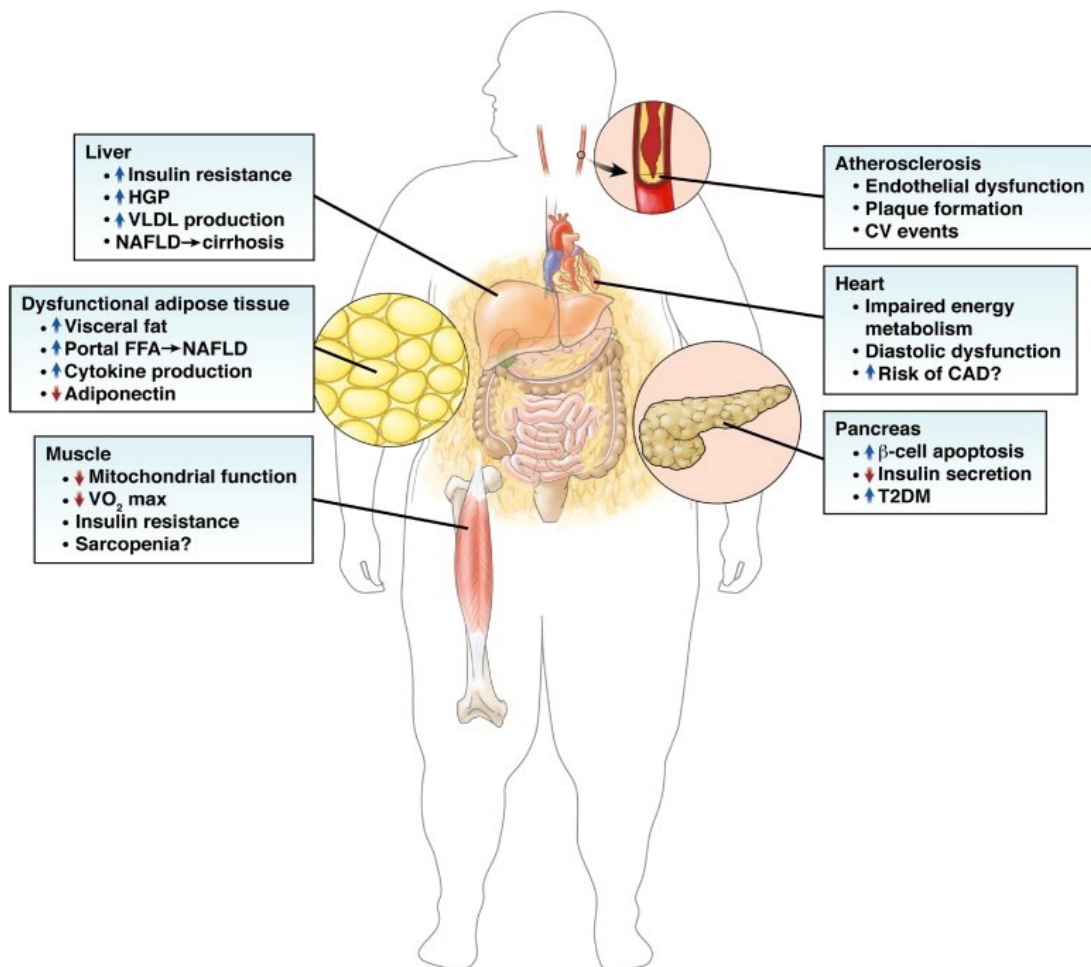
Clasificación	IMC (kg/m <sup>2</sup> )
	Valores
Bajo Peso	<18.50
Delgadez Severa	<16.00
Delgadez moderada	16.00 - 16.99
Delgadez leve	17.00 - 18.49
Normal	18.50 - 24.99
Sobrepeso	≥ 25.00
Pre-obeso	25.00 - 29.99
Obesidad	≥30.00
Obesidad clase I	30.00 - 34.99
Obesidad Clase II	35.00 - 39.99
Obesidad Clase III	≥40.00

Además de estos parámetros antropométricos, existen otras herramientas que ayudan a establecer si existe algún mal funcionamiento en diferentes sistemas. Una de las más utilizadas es la bioquímica sanguínea, debido a que a pesar de ser un procedimiento invasivo, los riesgos son mínimos en comparación a otras técnicas como por ejemplo las biopsias, y se puede obtener una gran cantidad de datos que ayuden a la identificación de alteraciones en diferentes sistemas.

En el caso de la obesidad, los parámetros bioquímicos que han sido utilizados para evidenciar cambios metabólicos causados por el alto consumo de grasa, son: la concentración de glucosa, insulina, la concentración de lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), colesterol total, triglicéridos circulantes, entre otros (Akiyama et al., 1996).

En el organismo, los efectos de la obesidad se extienden a diferentes órganos causando múltiples enfermedades por ejemplo, en la figura1 podemos visualizar algunos de los efectos negativos de los ácidos grasos sobre las estructuras celulares (Cusi, 2012).

Uno de los factores que promueven el desarrollo las enfermedades relacionadas con el metabolismo, es el aumento de los niveles de ácidos grasos libres en suero, lo cual altera el metabolismo de la glucosa favoreciendo la acumulación de grasa a nivel hepático, muscular y adiposo principalmente (Marseglia et al., 2014).



**Figura 1. Efecto de la acumulación de la grasa en diferentes tejidos.** Las complicaciones de la obesidad se dan en diferentes tejidos causando diferentes patologías, la mayoría de estas enfermedades están vinculadas sin lograr describir cada uno de los procesos (Cusi, 2012).

En especial cuando los ácidos grasos se acumulan en exceso en el hígado, se genera una condición denominada hígado graso no alcohólico (HGNA), esta es una complicación hepática primaria de la obesidad. En esta condición, se ha reportado que en los hepatocitos se presentan cambios en las mitocondrias, en particular se deteriora su capacidad oxidante y aumenta el estado reducido de complejos de la cadena de transporte de electrones (Marseglia et al., 2014; Nunnari and Suomalainen, 2012).

La función anormal de la mitocondria genera una mayor síntesis de radicales libres, en particular las denominadas Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), las cuales pueden generar daños a biomoléculas como proteínas, lípidos y ADN, esto puede conducir a la disminución de síntesis de trifosfato de adenosina (ATP) y por lo tanto alterar la bioenergética del hígado (Marseglia et al., 2014).

Con estos antecedentes, actualmente existen diferentes estudios que se han enfocado a determinar si la presencia de ácidos grasos libres en tejidos no adiposos y la disfunción mitocondrial, son factores que contribuyen en el daño celular y tisular en diferentes patologías relacionadas con el síndrome metabólico (SM) ya que éstas, se caracterizan por alteraciones en el metabolismo de ácidos grasos traduciéndose en un aumento en la  $\beta$ -oxidación y aumento de la producción de ERO (Mitchell and Darley-Usmar, 2012).

## **Metabolismo de lípidos**

La célula obtiene energía a partir de diferentes biomoléculas, las cuales son procesadas en diversas rutas metabólicas teniendo como objetivo final la formación de ATP el cual es necesario para realizar todos los procesos celulares (Nelson and Cox, 2013).

La principal ruta por la cual se obtiene ATP para los procesos biológicos es la glucólisis debido a que es la forma más rápida en la cual una célula puede conseguir ATP; ésta es una ruta compuesta por 10 reacciones enzimáticas consecutivas, que oxidan a la glucosa teniendo como resultado 2 moléculas de ATP y dos moléculas de piruvato, que puede servir de sustrato para diferentes vías metabólicas (en los organismos aerobios el ciclo de Krebs y la Cadena Transportadora de electrones) y así continuar con la generación de ATP para el organismo (Mitchell and Darley-Usmar, 2012).

Otra de las biomoléculas que se utilizan para la obtención de ATP y que además proporcionan más de la mitad de las necesidades energéticas de algunos órganos (particularmente el hígado, el corazón y el músculo esquelético en reposo) son los ácidos grasos (Sikaris, 2004).

Estos ácidos grasos son biomoléculas de naturaleza lipídica, están formados por una larga cadena hidrocarbonada lineal, de diferente longitud, en cuyo extremo hay un grupo carboxilo. Cada átomo de carbono se une al siguiente y al precedente por medio de un enlace covalente sencillo o doble (Nelson and Cox, 2013)

La entrada de los ácidos grasos a la célula es mediante la hidrolización de los triglicéridos presentes en la dieta. El órgano encargado de absorber los triglicéridos es el intestino delgado en donde, por su naturaleza hidrofóbica, deben ser solubilizados por las sales provenientes de la vesícula biliar, formando micelas y facilitando la acción de las lipasas presentes en el intestino delgado (Sikaris, 2004).

La función principal de estas lipasas, es convertir a los triacilgliceroles a monoacilgliceroles y diacilgliceroles, ácidos grasos libres y glicerol, los productos obtenidos por la acción de la lipasa, difunden a través de las células epiteliales intestinales donde son nuevamente convertidas a triacilgliceroles y empaquetados junto con el colesterol y proteínas específicas en agregados de lipoproteínas llamadas quilomicrones, que son grandes partículas esféricas que ayudan en la distribución hacia los tejidos a través del sistema linfático (Voet et al., 2013).

Los quilomicrones presentan diferentes receptores de superficie llamados apolipoproteínas que ayudan a establecer el destino final de éstos, por ejemplo aquéllos que contienen apolipoproteína C-II (apoC-II) son dirigidos al músculo y tejido adiposo, el resto de quilomicrones viajan hacia el hígado, donde son captados por endocitosis (Nelson and Cox, 2013).

Los triacilgliceroles que entran al hígado por esta ruta, pueden ser oxidados para proporcionar energía o para proporcionar precursores para la síntesis de cuerpos cetónicos, los cuales son compuestos que ayudan a suministrar energía al corazón y al cerebro en ciertas situaciones excepcionales (Nelson and Cox, 2013).

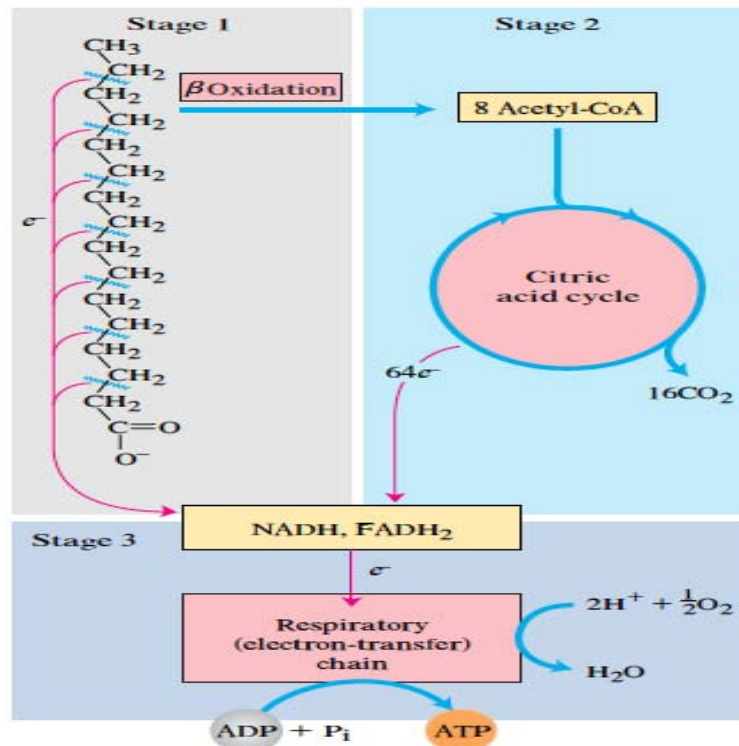
Una vez que han llegado al tejido blanco, dentro de la célula son procesados por diferentes organelos, el más importante es la mitocondria, donde ocurre la oxidación de ácidos grasos saturados, este proceso es llamado  $\beta$ -oxidación (Kunau et al., 1995).

## $\beta$ -oxidación

La  $\beta$ -oxidación es una ruta catabólica en la que se repite una secuencia de cuatro reacciones químicas (oxidación, hidratación, oxidación y tiólisis) para que a partir de una cadena de ácido graso se forme una moléculas de acetil-coA (Voet et al., 2013)

Esta ruta catabólica presente en los organismos aerobios, recibe su nombre debido a que, al llevarse a cabo cada ciclo un átomo de oxígeno se irá introduciendo en el ácido graso, dicha adición se realiza en el carbono  $\beta$  del ácido graso (Voet et al., 2013).

En la primera etapa de la  $\beta$ - oxidación, los ácidos grasos se someten a la eliminación oxidativa de dos carbonos sucesivos en forma de acetil-CoA, a partir del extremo carboxilo de la cadena de acilo graso (Figura 2); en la segunda etapa, los grupos acetilo de la acetil-CoA se oxidan a  $\text{CO}_2$  en el ciclo del ácido cítrico, que también tiene lugar en la matriz mitocondrial (Nelson and Cox, 2013).



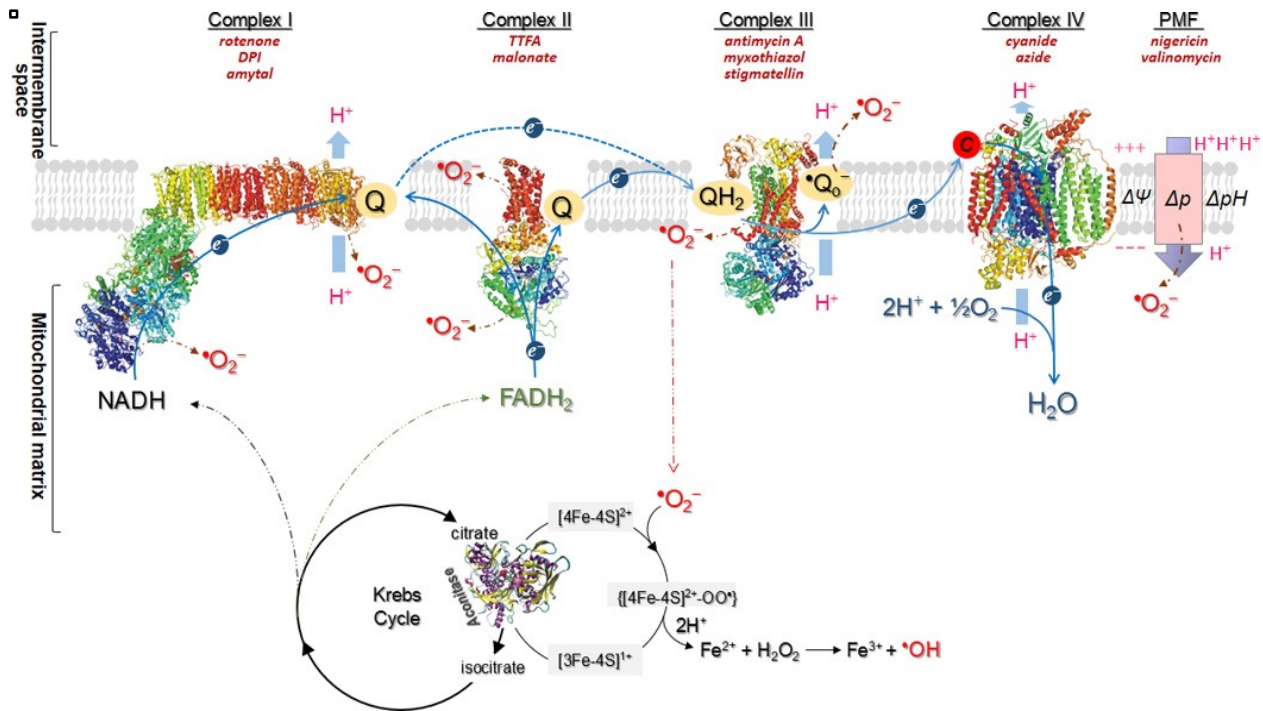
**Figura 2. Esquema simplificado de la oxidación de un ácido graso saturado de cadena larga**, incluye las reacciones que ocurren para que a partir de un ácido graso de cadena larga se obtenga una molécula de ATP (Nelson and Cox, 2013).

Las dos primeras etapas de la oxidación de ácidos grasos producen dos compuestos importantes: los aceptores de electrones  $\text{NAD}^+$  y  $\text{FAD}^+$ . La función principal de estas moléculas es el acarreo de electrones, indispensables en la función de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (CTE) (Turrens, 2003).

### **La cadena transportadora de electrones**

La CTE está formada por cuatro complejos proteicos (I-IV) que, a través de las reacciones redox secuenciales, transportan electrones de un complejo a otro hasta llegar al oxígeno. En dicho transporte, los complejos presentan cambios conformacionales para bombear protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranal de la mitocondria (complejos I, III, IV), generando un gradiente electroquímico. Este gradiente electroquímico es esencial para el funcionamiento de la ATP sintasa o complejo V, el cual, al girar, impulsa la fosforilación del  $\text{ADP} + \text{P}$  a ATP (Szewczyk and Wojtczak, 2002).

Durante el transporte de electrones en la CTE puede ocurrir la pérdida de un electrón y este puede reaccionar con otros compuestos para formar subproductos principalmente ERO, éstas son generadas principalmente por los Complejos I y III principalmente (Figura 3) y han tomado importancia ya que se han descrito que tienen participación en diferentes rutas celulares (diferenciación celular, apoptosis, envejecimiento, etc.) y cuando existe una sobreproducción de estas moléculas contribuyen a la patogenicidad de diferentes enfermedades (Hamanaka and Chandel, 2010).



**Figura 3. Esquema de la CTE y la formación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) durante el transporte de electrones en la mitocondria.** Las flechas azules indican la trayectoria de transporte de electrones desde el NADH o el FADH<sub>2</sub> al O<sub>2</sub>, o revertir el flujo de electrones desde el succinato FADH<sub>2</sub> ligado a complejo I. Las flechas rojas discontinuas indican los sitios de generación de •O<sub>2</sub><sup>-</sup> en las mitocondrias. Cuando los electrones pasan a través de la cadena, los protones son bombeados desde la matriz mitocondrial al espacio entre la membrana, estableciendo así un gradiente de potencial o fuerza motriz de protones llamada ( $\Delta p$ ) electroquímico a través de la membrana interna. Las cargas positivas y negativas en la membrana indican el potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ). Un gradiente de protones se denota por  $\Delta pH$  para la diferencia de pH a través de la membrana (Chen and Zweier, 2014).



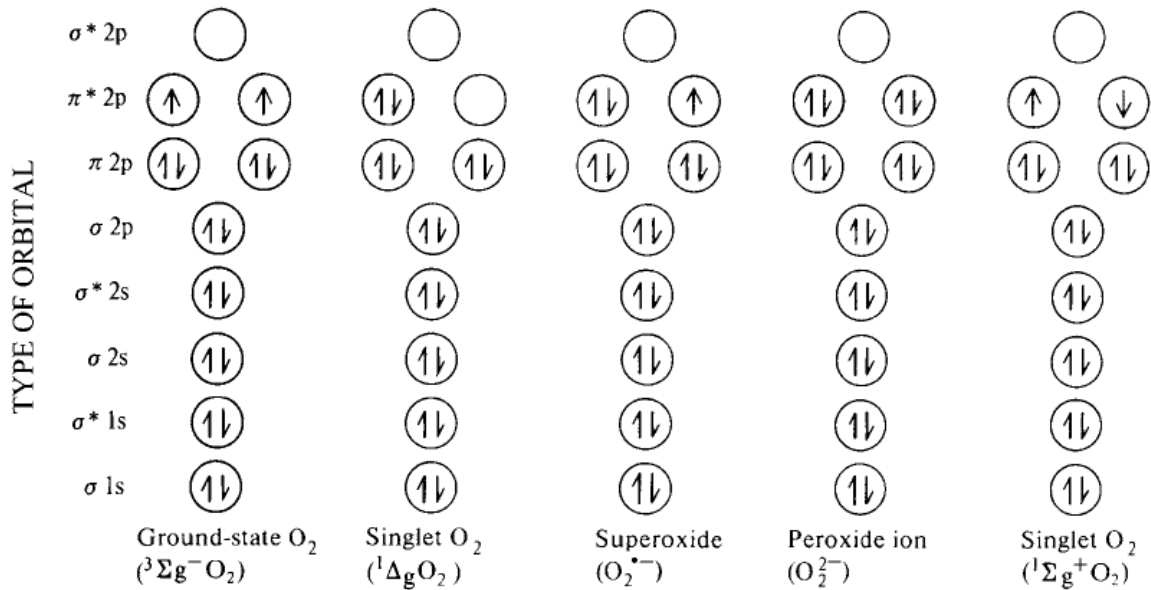
## Las especies reactivas de oxígeno (ERO)

Por definición, la molécula de  $O_2$  es un bi-radical libre ya que tiene dos electrones desapareados, estos dos electrones en la configuración electrónica del  $O_2$ , están en espines paralelos, y es la forma en la que encontramos el oxígeno en el aire que nos rodea (Okuno et al., 2011).

El oxígeno es, termodinámicamente, un potente agente oxidante. Sin embargo, si el  $O_2$  intenta oxidar a un no radical puede aceptar 2 electrones con la condición de que deben tener el mismo spin para llenar los espacios vacantes en los orbitales  $p^*$  (Figura 4 ). Un par de electrones, en un orbital atómico o molecular, no puede cumplir con este criterio, ya que tienen espines opuestos. Esta restricción de giro hace que el  $O_2$  prefiera aceptar electrones uno a la vez, y ayuda a explicar por qué  $O_2$  reacciona lentamente con la mayoría de los no radicales (Halliwell and Gutteridge, 2007).

En resumen las ERO son una variedad de moléculas y radicales libres (especies químicas con un electrón desapareado en su último orbital) derivados del oxígeno molecular que tienen la característica de ser más reactivas que el oxígeno molecular (Halliwell and Gutteridge, 2007; Turrens, 2003).

Podemos clasificar a las ERO de la siguiente forma, radicales libres como el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el anión peróxido ( $O_2^{2-}$ ) el radical perhidroxilo ( $HO_2^{\bullet}$ ), el radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) y compuestos no radicales como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el oxígeno singulete ( $^1O_2$ ), el ozono ( $O_3$ ) y el ácido hipocloroso (HClO) (Halliwell, 2006).



**Figura 4. Representación esquemática del ordenamiento de los electrones del oxígeno en los orbitales moleculares y su reacomodo electrónico en la formación de las ERO (Halliwell and Gutteridge, 2007).**

Como describimos en el apartado anterior la CTE es una fuente importante de ERO, de hecho, se ha reconocido que ésta vía es la mayor fuente de formación de ERO no enzimática en la mayoría de tipos de células eucariotas; para contender con estas condiciones adversas, dentro de la célula están presentes enzimas o moléculas que ayudan a la regulación de las concentraciones de ERO en el ambiente celular por ejemplo: la superóxido dismutasa (SOD) 1, 2 y 3, la catalasa, la glutatión peroxidasa, la peroxidasa, etc. (Halliwell and Gutteridge, 2007; Kowaltowski et al., 2009; Murphy, 2009).

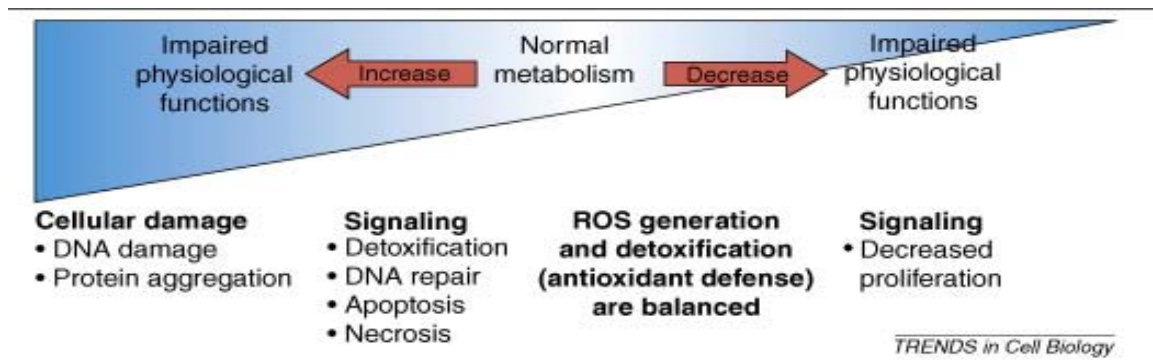
Estas enzimas antioxidantes están presentes en diferentes puntos de la célula y tienen diferente función, por ejemplo:

- SOD 1: esta enzima es un dímero, está presente en el espacio intermembranal mitocondrial y ayuda a la eliminación del superóxido convirtiéndolo en peróxido de hidrógeno.
- SOD 2 y SOD 3: son tetrámeros que se encuentran dentro de la matriz mitocondrial y en el citosol respectivamente, ambas tienen la misma función que la SOD 1.

- Catalasa: esta enzima cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua.
- Glutación Peroxidasa: cataliza la reacción de oxidación de la glutación a glutación disulfuro, utilizando para ello peróxido de hidrógeno.

A pesar de que la célula cuenta con sistemas antioxidantes, existen diferentes circunstancias que provocan una sobreproducción de ERO sobrepasando las defensas antioxidantes de la célula. Este desbalance en la célula, ocasiona descontrolados procesos de óxido-reducción no deseados, dañando principalmente a las biomoléculas generando alteraciones en su función (Halliwell, 2006).

Algunos daños a biomoléculas son: la peroxidación de lípidos de las membranas biológicas, el daño oxidativo a proteínas y al ADN, lo que conduce al daño celular, tisular y la insuficiencia de órganos (Figura 5), el conjunto de los daños ocasionados por el desbalance de compuestos pro-oxidantes y antioxidantes dentro de la célula es denominado Estrés Oxidante (EO) (Halliwell and Gutteridge, 2007).



**Figura 5. Equilibrio en la producción de ERO.** El mantenimiento en el equilibrio de la producción de ERO establecido por las defensas antioxidantes, ayuda a que la célula pueda llevar a cabo sus funciones correctamente, la pérdida de este equilibrio genera alteraciones en el funcionamiento de la célula (Halliwell and Gutteridge, 2007).

## **ERO en enfermedades metabólicas**

Las ERO han tomado mucha importancia ya que se ha descrito su participación en diferentes procesos importantes para la célula, principalmente su participación en diferentes enfermedades. Debido a la relación que existe entre la producción de ERO y el metabolismo energético, en las enfermedades relacionadas con la obesidad, se han descrito que las condiciones de EO y disfunción mitocondrial, desempeñan un papel crítico en el inicio y progresión de diferentes enfermedades relacionadas con el SM (Gyamfi et al., 2012; Kojima et al., 2007; Mitchell and Darley-Usmar, 2012; Raffaella et al., 2008).

En estudios clínicos se ha demostrado que, la susceptibilidad al daño por ERO es aún mayor en los sujetos obesos debido a que las respuestas antioxidantes son insuficientes, incluyendo la SOD, GPx y la CAT, la vitamina A, vitamina E, vitamina C, y  $\beta$ -caroteno. En comparación con los pacientes de peso normal, la actividad de SOD en los individuos obesos es significativamente más baja (Marseglia et al., 2014).

En el hígado, el aumento en la cantidad de ácidos grasos, la deficiencia en la  $\beta$ -oxidación en los hepatocitos y la elevación en la concentración de las ERO, inducen a la disfunción de las proteínas mitocondriales y generan modificaciones que conducen a la ETNA, una patología común que se ha asociado con el síndrome metabólico y con la obesidad (Mitchell and Darley-Usmar, 2012).

## **Producción de ERO en la inflamación asociada a la obesidad**

Un proceso importante que se desarrolla en la obesidad, es la inflamación de bajo grado generada en respuesta por el exceso de nutrientes presentes en el organismo, caracterizada por la producción de diferentes citocinas, reclutamiento celular, etc. y se ha propuesto que las ERO provenientes de la mitocondria tienen una participación importante en la progresión de este fenómeno inflamatorio (Jabaut and Ckless, 2012).

Estudios preclínicos han demostrado un beneficio metabólico relacionado con los efectos antiinflamatorios que incluye la disminución del EO; por lo que se han buscado nuevos enfoques potenciales hacia el desarrollo de fármacos que ayuden a romper los vínculos entre la obesidad y las enfermedades relacionadas con la inflamación. Uno de los fármacos que se han empezado a emplear es la Aspirina® (ASA), el cual ha demostrado mejorar el control glucémico en pacientes con diabetes tipo 2 (H. Hammadi, 2012; Lumeng and Saltiel, 2011).

La ASA representa el prototipo de los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) porque inactiva permanentemente a las isoenzimas ciclo-oxigenasas (COX), conduciendo a la inhibición de la biosíntesis de prostanoideos (prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (TXs)), estos forman parte de una familia de lípidos que interactúan con sus receptores de la membrana celular, los cuales desempeñan papeles importantes en respuestas celulares y procesos fisiopatológicos, como la modulación de la reacción inflamatoria, la angiogénesis, la hemostasia y trombosis, la hemodinámica renal y la progresión de la enfermedad renal, cardioprotección y la progresión de la aterosclerosis) (Vane and Botting, 2003).

A pesar de contar con algunos antecedentes sobre el efecto beneficio que tiene el asa en condiciones fisiológicas, aún no está claro cuál es su función en procesos inflamatorios debidos a la obesidad ya que al ser un AINE podría modificar el estado oxidante causado por un desbalance energético, al respecto se ha reportado que algunas veces, actúa como oxidante y en otros casos como antioxidante (Mahmood et al., 2009).

## **Justificación**

Se ha demostrado que la ingesta de altas porciones de grasa en los alimentos, puede generar daños a nivel celular, tisular y sistémico, teniendo como consecuencia estrés oxidante crónico e inflamación moderada crónica, sin embargo, en la literatura no existen reportes que evalúen el daño producido por la ingesta de una dieta adicionada con bajo porcentaje de grasa durante un tiempo prolongado, así como el de la administración de un AINE (ASA) y la combinación de ambos tratamientos en la funcionalidad mitocondrial y en la producción de ERO en un modelo animal.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto que tiene la ingesta de una dieta adicionada moderadamente de grasa saturada, la administración de un antiinflamatorio (Aspirina®) y la combinación de ambos durante 6 y 12 meses en la producción de ERO mitocondrial de hepatocitos de conejo.

### **Objetivos particulares**

- Evaluar la producción de ERO y la función mitocondrial en mitocondrias aisladas de hígado de conejos a los que se les administró durante 6 y 12 meses, una dieta adicionada con grasa saturada (ácido palmítico 3%), un AINES (ASA 25.8mg/kg) y la combinación de ambas condiciones; mediante los ensayos de reacción con diclorofluoresceína y de reducción de MTT respectivamente.
- Evaluar la correlación de los parámetros bioquímicos (glucosa, insulina, HDL, LDL, colesterol total y triglicéridos) con la producción de ERO en conejos controles y tratados con grasa y/o ASA.

## **Hipótesis**

La ingesta de una dieta enriquecida con un porcentaje bajo de grasa durante un periodo prolongado generará alteraciones en la concentración de glucosa, la concentración de insulina, la concentración de HDL, LDL, triglicéridos y colesterol total, además de un aumento en la producción de ERO provocada por la disfunción de la cadena transportadora de electrones.

La administración de un AINES (Aspirina) durante la ingesta de grasa prevendrá el efecto inflamatorio de bajo grado, disminuyendo la producción de ERO.

## **Materiales y métodos.**

### **Modelo animal.**

Se utilizaron 24 conejos macho de la cepa Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) de 30 días nacidos con un peso de 300 gr provenientes de la granja de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la FES Cuautitlán, UNAM.

Los animales se mantuvieron a  $23 \pm 5^{\circ}$  C en un ciclo de 12 h de oscuridad y 12 h de luz en el bioterio de la FES Iztacala distribuyéndose en 8 grupos experimentales:

- Grupo Control 6 meses: Conejos con libre acceso a agua y alimento (n=3).
- Grupo Grasa 6 meses: Conejos con libre acceso a agua y alimento enriquecido con 3% ácido palmítico a partir del primer mes de vida (n=3).
- Grupo Grasa/Asp 6 meses: Conejos con libre acceso a alimento adicionado con grasa 3% y la administración diaria por vía oral de aspirina (28.5mg/kg) a partir del primer mes de vida (n=3).
- Grupo Asp 6 meses: Conejos con libre acceso a alimento y la administración diaria por vía oral de aspirina (28.5mg/kg) a partir del primer mes de vida (n=3).
- Grupo Control 12 meses: Conejos con libre acceso a agua y alimento (n=3).
- Grupo Grasa 12 meses: Conejos con libre acceso a agua y alimento adicionado con 3% ácido palmítico a partir del primer mes de vida (n=3).
- Grupo Grasa/Asp 12 meses: Conejos con libre acceso a alimento adicionado con grasa 3% y la administración diaria por vía oral de aspirina (28.5mg/kg) a partir del primer mes de vida (n=3).
- Grupo Asp 12 meses: Conejos con libre acceso a alimento y la administración diaria por vía oral de aspirina (28.5mg/kg) a partir del primer mes de vida (n=3).

Transcurridos los diferentes tiempos, se realizó el sacrificio de los animales con una sobredosis de pentobarbital sódico (63 mg/ 2.5 kg de peso, i.p).



## **Medición de parámetros bioquímicos**

Durante el sacrificio, se obtuvieron muestras sanguíneas para determinar algunos parámetros bioquímicos como concentraciones plasmáticas de glucosa, insulina, HDL, LDL, colesterol total y triglicéridos. Las muestras fueron analizadas en el laboratorio de referencia internacional Carpermor™.

## **Extracción de mitocondrias**

Después de 20 minutos de la sedación de cada conejo, se verificó la ausencia de reflejos palpebral y corneal y se procedió a abrir la cavidad abdominal para la extracción de un fragmento de hígado de 9 gramos. El aislamiento de las mitocondrias se realizó por el método de centrifugación diferencial descrito en (Freyre-Fonseca et al., 2011). El fragmento de hígado se colocó en un matraz a 4° C con 25 ml de amortiguador de lavado 1 (Manitol 220mM, Sacarosa 70mM, MOPS 2mM, EGTA 1mM ajustado con KOH a pH: 7.4), después de 3 lavados, el tejido se disgregó con un homogeneizador de tejidos tipo Potter y se colocó en tubos cónicos para centrifuga de 50 ml centrifugando a 478 g durante 10 min a 4° C en un rotor SS-34 (Sorvall). La fracción del sobrenadante se recuperó en tubos limpios, y se centrifugaron a 7649 g durante 10 min a 4° C, el precipitado, se re-suspendió cuidadosamente con un pincel de cerdas naturales, en 2 ml de amortiguador de lavado 2 (Manitol 220mM, Sacarosa 70mM, MOPS 2mM ajustado con KOH a pH: 7.4). Por último se centrifugó a 9681g durante 10 min a 4° C. La concentración de proteína mitocondrial se determinó en un espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 280 nm, utilizando BSA como estándar.

## **Medición de la producción de ERO**

Para determinar la producción de ERO se utilizó la técnica de (Hempel et al., 1999). Se utilizó una micro placa de 96 pozos, en cada pozo se añadió una alícuota de la suspensión de mitocondrias con una concentración de proteínas totales de 1.5 a 3 mg/ml y 5  $\mu$ l de 2 '7'-diacetato de diclorofluoresceína 500  $\mu$ M (DCDHF-DA) y amortiguador de lavado 2 hasta tener un volumen de 250  $\mu$ l por pozo, después de agitar por pipeteo cada pozo, la placa se leyó en un espectrofotómetro de fluorescencia (Bio-Tek FXL 800™) a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 520 nm cada 10 minutos hasta completar 80 minutos.

Al mismo tiempo, se realizó la determinación de la producción de ERO al adicionar sustratos e inhibidores mitocondriales específicos, al minuto 10 se añadió glutamato 10mM / malato 5mM (concentración final), al minuto 20 se añadió Adenosín difosfato 1mM (ADP) al minuto 50 antimicina 2  $\mu$ M y al minuto 70 se añadió carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona 50  $\mu$ M (CCCP).

De las mediciones se obtuvieron gráficas en unidades relativas de fluorescencia (URF) contra tiempo en minutos, el error estándar de la media se calculó con el programa GraphPad Prism versión 5.00.

## **Determinación de la función mitocondrial mediante la oxidación de bromuro 1-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-3,5-difeniltetrazolio (MTT).**

La evaluación de la función mitocondrial se implementó y modificó de acuerdo al método de reducción del compuesto MTT descrito por Liu et al. (1997) para valorar la funcionalidad de la cadena de transporte de electrones así como del complejo III y del desacoplamiento de la síntesis de ATP.

Las mitocondrias que se utilizaron para esta medición se colocaron en medio 2, los sustratos que se usaron fueron Glutamato 10mM Malato 5mM, ADP 1mM, y los inhibidores específicos fueron antimicina 2 uM, además un desacoplante de la fosforilación oxidativa como el CCCP 50µM.

Después de añadir los sustratos o los inhibidores a cada muestra de manera independiente, se añadió el MTT 25 µM y se incubaron a 37 °C por 30 min, posteriormente una alícuota de 250 ul se transfirió a una placa de 96 pozos y en un espectrofotómetro UV-VIS con lector de micro placas (Bio-Tek Exl800™), se midió la absorbancia a una longitud de onda de 490nm. Con los valores de absorbancia se realizaron gráficos de columnas, ello con el fin de comparar el aumento o disminución de la absorbancia con respecto al blanco.

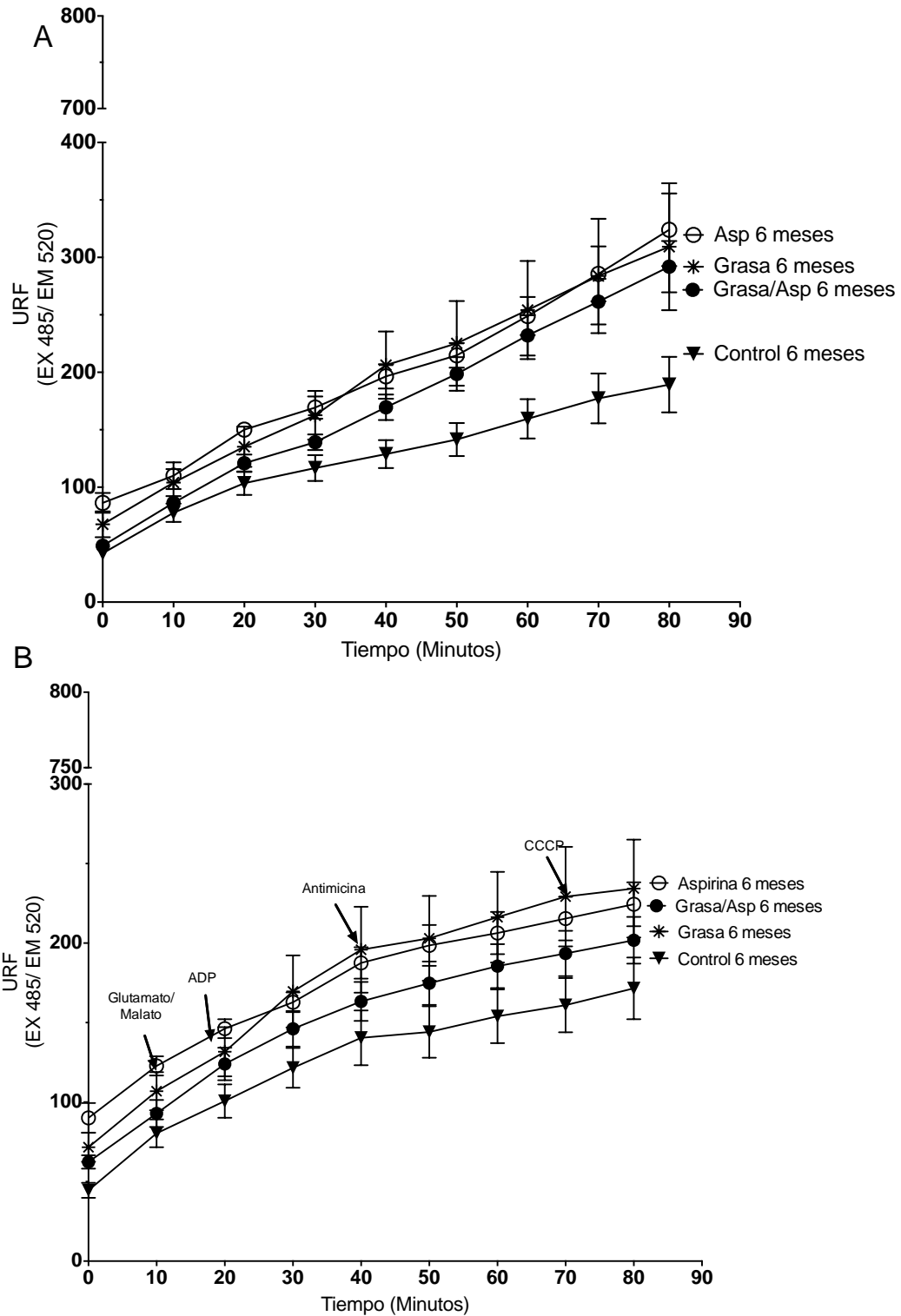
## Resultados

### Medición de la producción de ERO 6 meses

Para evaluar el efecto de la ingesta de alimento enriquecido con ácido palmítico 3% en hepatocitos en la producción de ERO, en todos los grupos experimentales, se determinó la producción de ERO de la mitocondria en dos condiciones: La primera condición fue con los sustratos endógenos de la mitocondria y la segunda después de añadir los sustratos e inhibidores específicos de diferentes complejos mitocondriales en diferentes momentos.

La producción de ERO en los hígados de conejos con tratamientos por 6 meses, se observó que en los grupos experimentales Grasa, Asp y Grasa/Asp, aumentó la producción de ERO con respecto al Control (Figura 6A). Además se observó una diferencia significativa entre los tratamientos y el control. \* $P < 0.05$  vs control.

En la segunda condición, con sustratos e inhibidores mitocondriales, se observó la misma tendencia, es decir, que al momento de añadir los sustratos e inhibidores mitocondriales, aumentó la producción de ERO (Figura 9B), esta producción de ERO indicó diferencias de los grupos experimentales y el grupo control, pero no entre los tratamientos.

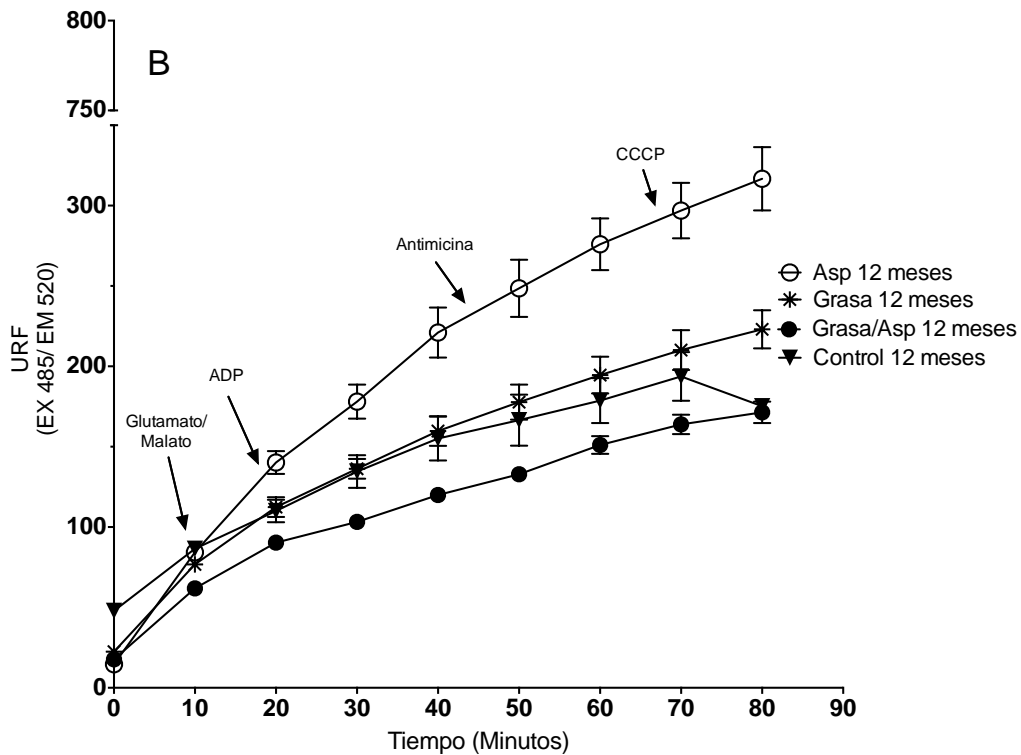
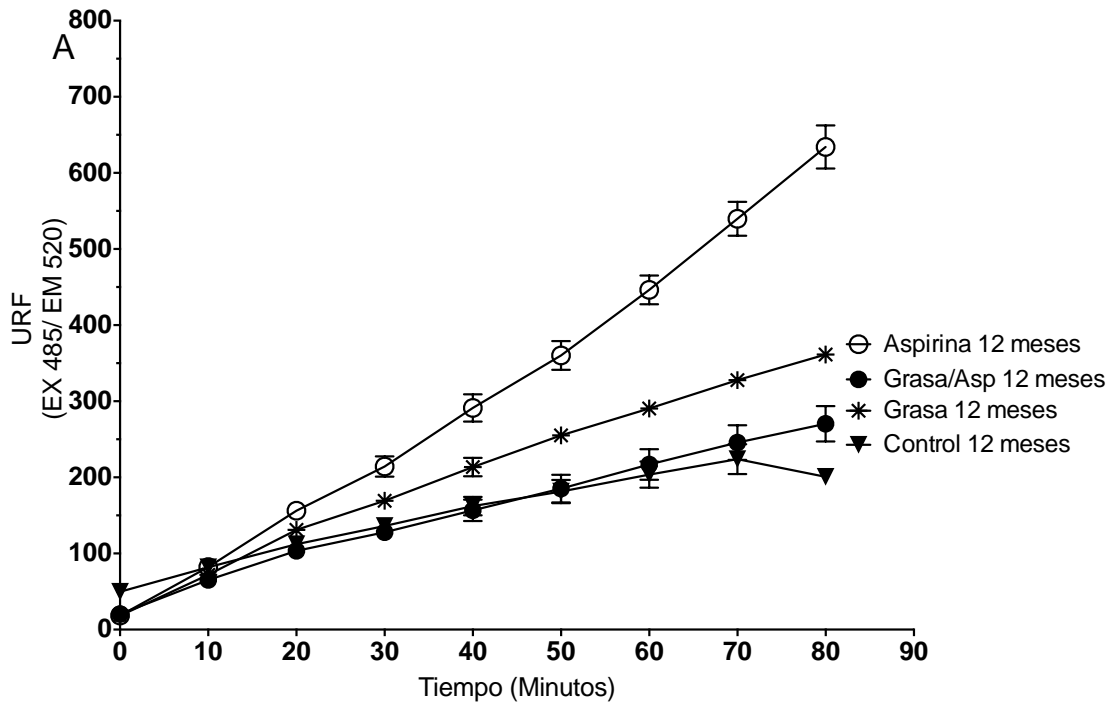


**Figura 6. Curso temporal en la producción de ERO de mitocondrias aisladas de hígado de 3 conejos tratados durante 6 meses; (A) Con los sustratos endógenos (B) Al añadir sustratos e inhibidores mitocondriales. Los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar**

## **Medición de la producción de ERO 12 meses**

La producción de ERO por sustratos endógenos en mitocondrias aisladas del hígado de los conejos que fueron mantenidos por 12 meses con los diferentes tratamientos, se observó que el grupo Asp presentó la mayor producción ERO, seguido por el grupo Grasa y el grupo Grasa/Asp en comparación al grupo Control, el cual presentó valores muy similares al control de 6 meses (Figura 7A.). El aumento en la producción de ERO en todos los tratamientos de 12 meses con respecto al control fue significativamente diferente al grupo control ( $P < 0.05$ ).

En la evaluación de la producción de ERO, al adicionar sustratos e inhibidores mitocondriales, apreciamos la misma tendencia que en la Figura 6B, observando una mayor producción en el grupo Asp, seguido por el grupo Grasa. El grupo de Grasa/Asp tuvo valores de ERO similares a los del grupo control (Figura 7B).



**Figura 7. Curso temporal en la producción de ERO de mitocondrias aisladas de hígado de 3 conejos tratados durante 12 meses; (A) Con los sustratos endógenos (B) Al añadir sustratos e inhibidores mitocondriales. Los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar. \* $P < 0.05$  vs control; ANOVA de 1 vía.**

Para analizar las diferencias en la producción de ERO, se consideraron los valores de URF al minuto 70, ya que a ese tiempo se observó la producción máxima de ERO antes del desacoplamiento de las mitocondrias. Para evaluar si había una diferencia en la producción de ERO entre el control y los tratamientos, se hizo el análisis de ANOVA de 1 vía; seguida por una prueba de Tukey, los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar.\* $P < 0.05$  vs control (Tabla II).

Al evaluar la producción de ERO en los grupos de 6 meses, con sustratos endógenos y al adicionar sustratos e inhibidores mitocondriales, se observó que existen un aumento significativo de los diferentes tratamientos contra el grupo control ( $P < 0.05$ ), sin embargo, no existen diferencias entre los tratamientos.

Los promedios de la producción de ERO al minuto 70, en los grupos experimentales de 12 meses se observó que, el grupo Asp es el que presenta la mayor producción de ERO de todos los grupos, seguido por el grupo de Grasa mientras que el grupo Grasas/Asp no tiene diferencias con respecto al control.

Al comparar la producción de ERO entre animales tratados por 6 meses y 12 meses, sin sustratos externos se observó que dicha producción aumenta en la mayoría de los tratamientos, excepto en grupo Grasa/Aspirina en donde no existe diferencias entre la producción a los 6 y 12 meses.

Al comparar los experimentos a los que se adicionaron sustratos externos a los 6 y 12 meses también hubo un incremento en la producción de ERO en la mayoría de los tratamientos excepto en el grupo Grasa, en donde no existen diferencias entre los 6 y 12 meses de tratamiento.



**Tabla II. Comparación de la producción de ERO en conejos de 6 y 12 meses al minuto 70.**

Condición	Control		Grasa		Grasa/Asp		Asp	
	promedio	EEM	promedio	EEM	promedio	EEM	promedio	EEM
6 meses	177.22+	21.71	260.22*+	49.84	267.22*	17.57	265.89*+	23.13
12 meses	223.89+	19.67	341.67*#+	9.34	276.67#	21.14	539.67*#+	22.26
6 meses con sustratos	161.00+	17.08	229.22	31.32	193.44+	14.27	215.44+	13.70
12 meses con sustratos	193.78+	15.23	210.00#	12.33	164.00#+	6.00	297.00*#+	17.33

**\*Diferencias significativas comparadas con el control (P<0.05).**

**# Diferencias significativas comparadas entre los tratamientos (P<0.05).**

**+ Diferencias entre 6 y 12 meses (P<0.05).**

Para estimar la formación de ERO asociada al transporte de electrones de la mitocondria al momento de añadir sustratos e inhibidores de la CTE, se calculó la velocidad de formación de ERO mediante la fórmula matemática  $(y_2 - y_1) / (x_2 - x_1)$ , el valor obtenido indica el cambio de las  $URF_{min}^{-1}$ .

A los 6 meses se observó que, al agregar malato/glutamato la producción de ERO en Grasa/Asp fue de  $3.14 URF_{min}^{-1}$ , mientras que en los grupos experimentales los valores de velocidad fueron menores, comprendidos en un rango de 2.33 a 2.03  $URF_{min}^{-1}$  (Tabla III).

Al adicionar el ADP en los grupos de 6 meses se observó que el grupo Grasa presentó el valor más alto de velocidad de 3.8 URFmin<sup>-1</sup> y por el contrario en el grupo Aspirina se observó tan solo 1.66 URFmin<sup>-1</sup> siendo este valor el menor de todos los grupos experimentales, el grupo Grasa/Asp y control tuvieron velocidades similares de 2.21 URFmin<sup>-1</sup> y 2.09 URFmin<sup>-1</sup> respectivamente.

En los grupos de 6 meses, en el momento de añadir la antimicina, se observó que la velocidad de producción de ERO disminuía, en especial el grupo Asp presentó el valor más bajo (0.78 URFmin<sup>-1</sup>), en contraste el grupo Grasa tuvo el valor más alto de 1.33 URFmin<sup>-1</sup> y los grupos Control y el grupo Grasa/Asp presentaron valores similares 0.99 y 1.078 URFmin<sup>-1</sup> respectivamente.

En los tratamientos de 12 meses se observó que al agregar malato/glutamato la producción de ERO en Asp fue la mayor con 5.36 URFmin<sup>-1</sup>, seguido por el grupo Asp de 4.81 URFmin<sup>-1</sup>, el grupo Grasa 3.32 URFmin<sup>-1</sup> y el que tuvo la menor velocidad fue el grupo Grasa/Asp con un valor de 0.375 URFmin<sup>-1</sup>.

Al adicionar el ADP en los tratamientos de 12 meses se observó que el grupo Asp tuvo el valor más alto de velocidad 3.78 URFmin<sup>-1</sup> que contrasta con el valor más bajo del grupo Grasa/Asp de 1.28 URFmin<sup>-1</sup>. Al añadir la antimicina también se observó cambios en la producción de ERO, como se esperaba el grupo control tuvo el valor más bajo de velocidad de 1.211 URFmin<sup>-1</sup>; mientras que en el grupo Asp encontramos el valor más alto de velocidad de 2.745 URFmin<sup>-1</sup>, encontramos que el grupo Grasa/Asp tuvo una velocidad de formación mayor al del grupo Grasa de 1.823 URFmin<sup>-1</sup> y 1.678 URFmin<sup>-1</sup> respectivamente.

**Tabla III. Valores de velocidad de formación de ERO en presencia de sustratos e inhibidores mitocondriales.**

	6 MESES				12 MESES			
	Malato/ Glutamato URFmin <sup>-1</sup>	ADP URFmin <sup>-1</sup>	Antimicina URFmin <sup>-1</sup>	CCCP URFmin <sup>-1</sup>	Malato/ glutamato URFmin <sup>-1</sup>	ADP URFmin <sup>-1</sup>	Antimicina URFmin <sup>-1</sup>	CCCP URFmin <sup>-1</sup>
Control	2.033	2.089	0.989	1.055	4.812	2.455	1.211	-1.811
Grasa	2.478	3.8	1.333	0.511	3.323	2.455	1.678	1.289
Asp	2.345	1.655	0.778	0.9	5.367	3.789	2.745	1.878
Grasa/ Asp	3.112	2.211	1.078	0.833	0.375	1.288	1.823	0.756

### **Funcionamiento mitocondrial mediante el ensayo del MTT.**

Con el objetivo de determinar la funcionalidad de las mitocondrias aisladas de cada conejo, se realizó el ensayo del MTT, que se basa en la reducción del compuesto MTT a formazán con los electrones transferidos del complejo II al complejo III de la mitocondria en presencia de sustratos mitocondriales.

En la Tabla IV se observa que los conejos sometidos a 6 meses de grasa, la reducción de MTT al adicionar glutamato/malato en combinación con ADP o antimicina no existen diferencias con respecto al blanco de cada control y tratamiento, es decir a la muestra de mitocondrias sin sustratos e inhibidores de la CTE (Tabla IV), en comparación a nuestro grupo control en donde se observó diferencias en las absorbancias al momento en que adicionamos sustratos y/o inhibidores de la CTE.

**Tabla IV. Experimentos representativos de la funcionalidad mitocondrial mediante MTT 6 meses.** Experimentos representativos del ensayo de MTT realizados a los conejos que se sometieron a 6 meses de tratamiento.

	<b>Control</b>	<b>Grasa</b>	<b>Asp</b>	<b>Grasa/Asp</b>
<b>Blanco (Mitocondrias/MTT)</b>	0.166	0.153	0.205	0.233
<b>Glut/Mal</b>	0.176	0.155	0.234	0.259
<b>Glut/Mal/ADP</b>	0.15	0.152	0.216	0.291
<b>Glut/Mal/ADP/Ant</b>	0.159	0.159	0.208	0.261
<b>Glut/Mal/ADP/CCCP</b>	0.178	0.169	0.214	0.289

En las mitocondrias de los conejos de 12 meses, si se observaron cambios en la reducción del MTT a formazán en los diferentes tratamientos, especialmente, al añadir antimicina, pues disminuyó la producción de formazán en los conejos a los cuales se les administró Grasa y Grasa/Asp. Estos valores fueron opuestos a los de los grupos Control y Asp porque en estos tratamientos se observó aumento en la producción de formazán (Tabla V).

**Tabla V. Experimentos representativos de la funcionalidad mitocondrial** mediante el ensayo de reducción de MTT, a los 12 meses de tratamiento.

	<b>Control</b>	<b>Grasa</b>	<b>Asp</b>	<b>Grasa/Asp</b>
<b>Blanco Mitocondrias/MTT)</b>	0.21	0.201	0.205	0.16
<b>Glut-Malt</b>	0.219	0.208	0.207	0.168
<b>Glut-Malt/Ant</b>	0.243	0.189	0.225	0.187
<b>Glut-Malt/ADP</b>	0.247	0.213	0.219	0.17
<b>Glut-Mal/ADP/CCCP</b>	0.231	0.199	0.238	0.173

En los tratamientos con grasa, la disminución de la producción de formazán en presencia de antimicina, probablemente sea indicativo de que hay daño del complejo III y los electrones se quedan atrapados en dicho complejo o escapan a la matriz mitocondrial para formar ERO, ya que en el control y en el grupo de aspirina la producción de formazán aumentó en presencia de antimicina, porque algunos de los electrones escapan al espacio intermembranal de la mitocondrial, debido a que se ve favorecida la formación de semiubiquinona del complejo III (Q) que puede transferir electrones al oxígeno para formar superóxido (Camello-Almaraz et al., 2006)

La respuesta de la reducción del MTT al adicionar el CCCP fue la esperada, ya que al alterar permeabilidad de la membrana mitocondrial, la CTE se acelera para tratar de restablecer el gradiente electroquímico que genera la formación de ATP, traduciéndose en un aumento en la reducción del MTT.

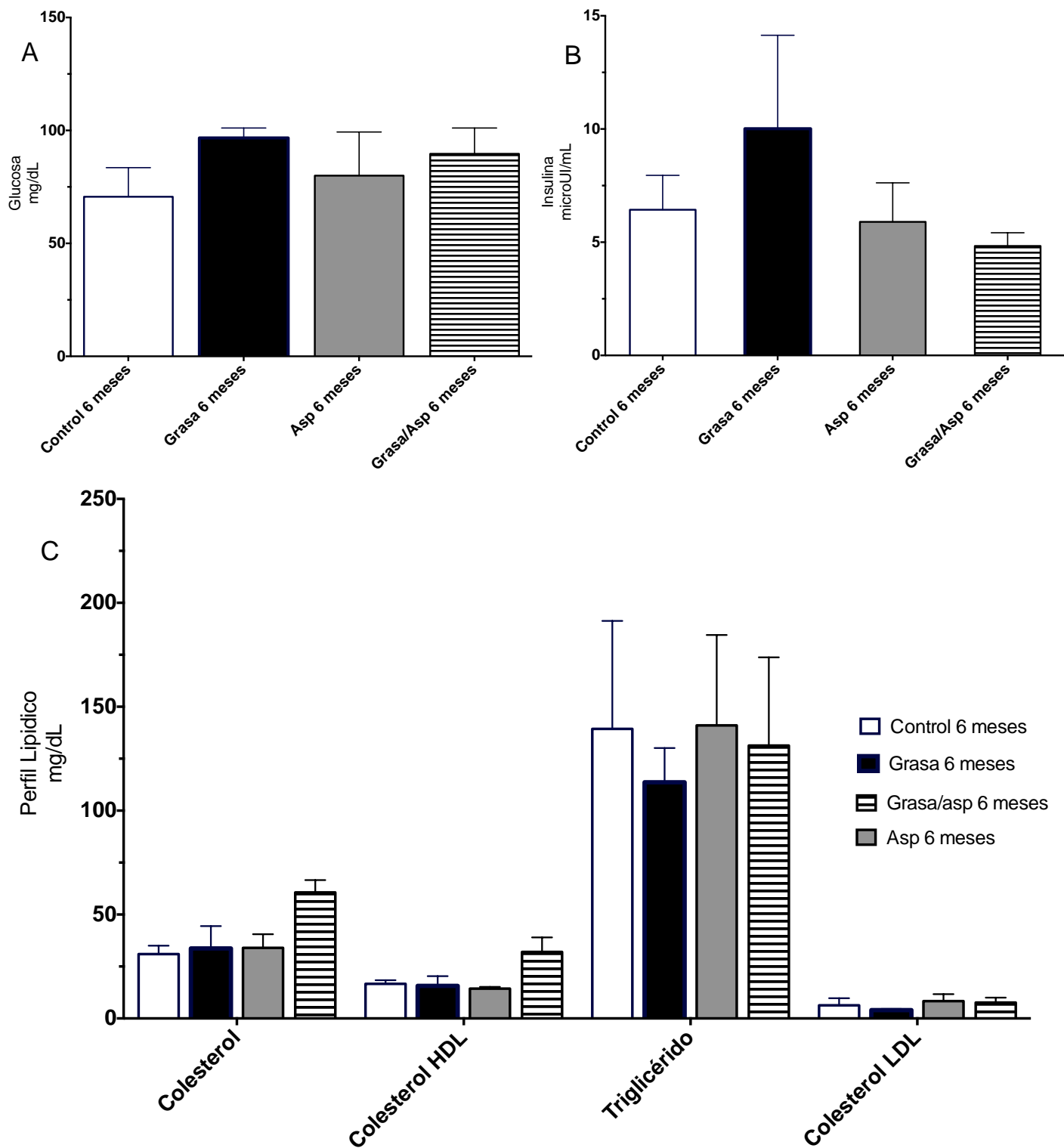
## **Bioquímica Sanguínea de los conejos del control y tratamientos después de 6 meses.**

En este trabajo el objetivo de alimentar conejos con ácido palmítico, fue por una parte evidenciar cambios en la producción de ERO mitocondrial en el hígado y por otra, evaluar la correlación entre los cambios observados en la función mitocondrial y los principales parámetros de un análisis de química sanguínea, como la concentración de glucosa, insulina, colesterol HDL y triglicéridos, ya que los cambios de estos parámetros en el humano comúnmente son indicativos de alteraciones metabólicas.

En los conejos alimentados por 6 meses, se observó que el grupo Grasa presentó la mayor concentración de glucosa (96.6 mg/dl), seguidos por los conejos del grupo Grasa/Asp (89.6 mg/dl) y los conejos del grupo Asp (80 mg/dl), la menor concentración la se observó en el grupo Control (70.66mg/dl) (Figura 8 A).

Respecto a la concentración de insulina, el grupo Grasa presentó la mayor concentración (10.01 microUI/ml) seguido por los grupos Asp (5.9 microUI/ml) y Control (6.43 microUI/ml), el grupo Grasa/Asp (5.9 microUI/ml) fue el que presentó la menor concentración de insulina (Figura 8B).

En el perfil lipídico se observó que el grupo Grasa/Asp tuvo la concentración más alta de colesterol y colesterol HDL de 60 y 30 mg/dL respectivamente, en el grupo Grasa disminuyeron los valores de concentración del colesterol LDL y los triglicéridos de 30 y 110 mg/dl con respecto al control. En relación a los valores de la concentración de colesterol LDL estos fueron muy similares para los cuatro grupos, 5 a 8 mg/dl (Figura 8C).



**Figura 8. Concentraciones séricas de los parámetros bioquímicos, medidos en la sangre en los conejos con después de 6 meses de tratamiento. A) Glucosa, B) Insulina; y C): HDL, LDL, triglicéridos y colesterol total. Los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 3 conejos. \* $P < 0.05$  vs control; ANOVA de 1 vía.**

## **Bioquímica Sanguínea de los conejos del control y tratamientos después de 12 meses.**

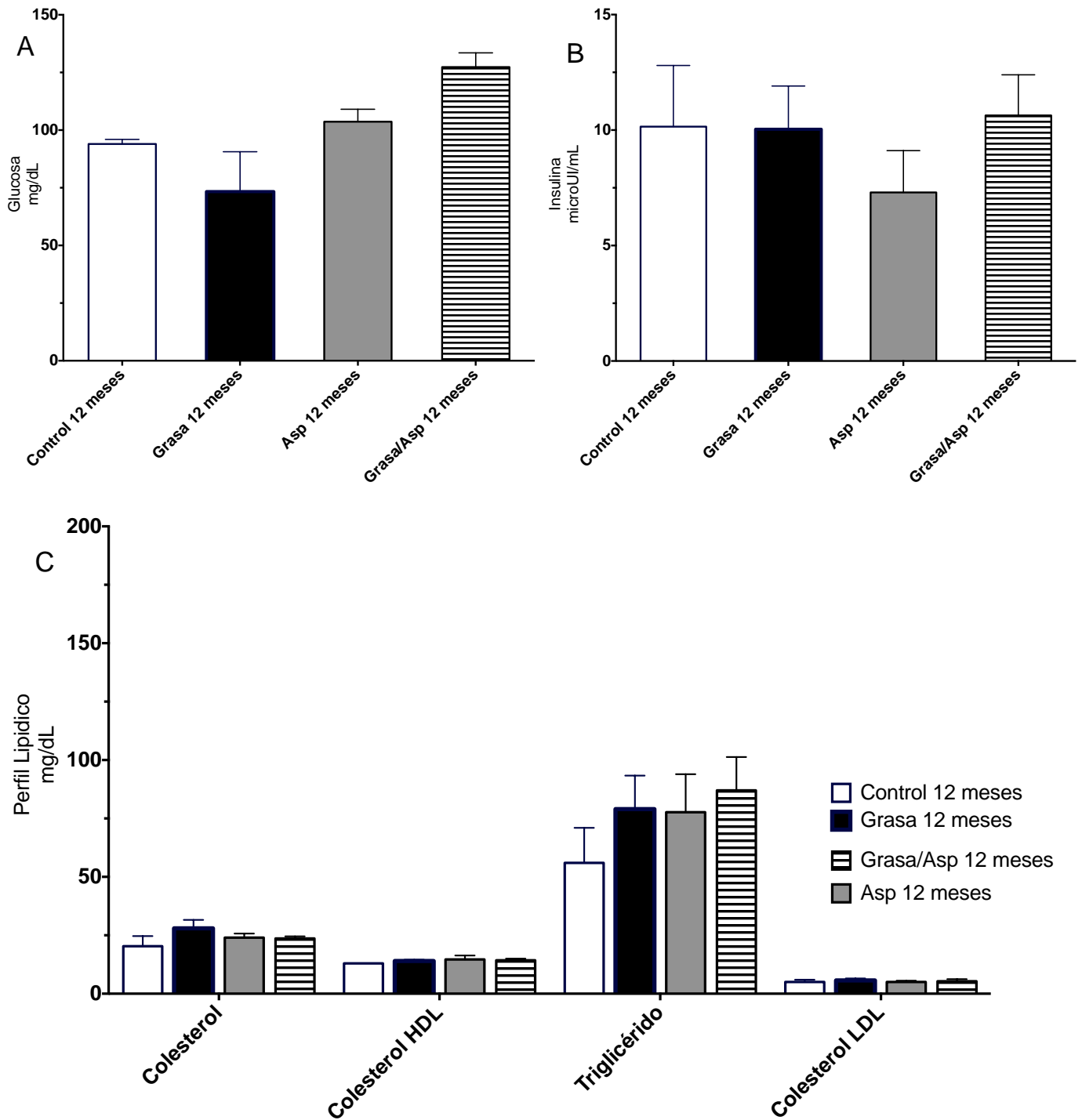
En los grupos de 12 meses de tratamiento, encontramos que, los valores de glucosa son diferentes entre los 4 grupos (Figura 9), siendo el grupo Grasa/Asp el que presentó el valor más alto (115.50 mg/dl), seguido por el grupo Asp (95.00 mg/dl), mientras que en el grupo Grasa (64.50 mg/dl) se observó una disminución en la concentración con respecto al Control (84.25 mg/dl).

En los valores de insulina se observó cambios en la concentración, siendo el grupo de Grasa/Asp (10.63 microUI/ml) el que presentó el valor más alto, seguido por el grupo Grasa (10.03 microUI/ml), el grupo Asp presentó la concentración más baja de insulina (7.3 microUI/ml).

En el perfil lipídico, se observó que en el grupo Grasa/Asp aumentaron los valores de Colesterol y Colesterol HDL, mientras que en el grupo Grasa 6 meses disminuyeron los niveles del colesterol LDL y los triglicéridos. En los otros grupos no existen diferencias significativas en las concentraciones de ninguno de los analitos.

Al comparar los valores de los parámetros bioquímicos en los dos períodos de tratamiento, se observó diferencias en: *i)* La concentración de glucosa en sangre de los grupos control, Grasa/Asp y Asp de 12 meses es mayor que los grupos de 6 meses; pero no en el grupo de Grasa cuyo valor disminuye con respecto a la muestras de 6 meses de tratamiento; *ii)* La concentración de insulina en las muestras de 12 meses es mayor en todos los tratamientos, excepto el grupo Grasa con el mismo valor de concentración tanto en 6 meses como en 12 meses, y *iii)* En los valores de concentración de lípidos, se observó que después de 12 meses de tratamiento la concentración de triglicéridos en todos los tratamientos disminuye en comparación con los valores de 6 meses.





**Figura 9. Concentraciones séricas de los parámetros bioquímicos, en conejos con 12 meses de tratamiento. A) Glucosa, B) Insulina; y C) HDL, LDL, triglicéridos y colesterol total. Los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 3 conejos. \*P<0.05 vs control; ANOVA;**

## Discusión

En los últimos años en la población occidental, se ha registrado un cambio en la dieta, es decir un aumento en el consumo de lípidos y carbohidratos, así como la disminución de la actividad física, ello ha generado una mayor incidencia de la obesidad y el sobrepeso, ocasionando un problema de salud a nivel internacional.

En los estudios sobre el efecto del consumo de altas concentraciones de ácidos grasos en diferentes modelos biológicos, se han observado alteraciones en diferentes niveles, y se han logrado describir diferentes fenómenos que participan dentro de la obesidad .

El hígado es un órgano fundamental en la absorción y distribución de ácidos grasos, su disfunción está asociada a múltiples factores, pero principalmente a la resistencia a la insulina desencadenada por el exceso de ácidos grasos (Patrignani and Patrono, 2015).

Una de las herramientas que ayudan a evidenciar las alteraciones metabólicas que ocurren en estas enfermedades, es la bioquímica sanguínea y ha sido utilizada por años para el diagnóstico y evaluación de el progreso de la obesidad. En nuestro estudio se trató de establecer una correlación de los parámetros bioquímicos que podrían presentar alteraciones y la producción de ERO.

Lo que se obtuvo de estos análisis es que a pesar de existir alteraciones en concentraciones de glucosa e insulina a los 6 meses en los tratamientos Grasa y Aspirina, teniendo una ligera correlación con el aumento en la producción de ERO en estos tratamientos, no existe una evidencia clara en los parámetros bioquímicos de que existan alteraciones generadas por la ingesta del ácido palmítico.

En la literatura también se ha reportado que, al administrar a conejos una dieta obesogénica rica en colesterol, la bioquímica sanguínea no mostró las alteraciones esperadas como concentración de glucosa o de insulina, a pesar de existir un daño tisular hepático importante (Kainuma et al., 2006). Es por eso que la bioquímica sanguínea no ayuda a evidenciar las alteraciones celulares en etapas tempranas, como la elevación de la producción de ERO.

Dentro de la célula el principal organelo encargado de metabolizar a los ácidos grasos es la mitocondria, dentro de ella se llevan a cabo diferentes vías metabólicas que tienen como paso final el acarreo de electrones mediado por proteínas (denominado como Cadena Transportadora de Electrones), esto tiene la finalidad de generar un gradiente electroquímico indispensable para la formación de ATP (Turrens, 2003).

La generación de dicho gradiente electroquímico tiene como consecuencia la formación de ERO, moléculas que en concentraciones adecuadas son importantes en diferentes rutas de señalización celular, y que en altas concentraciones, tienen un papel importante en la etiología de diferentes enfermedades (Vane and Botting, 2003).

En este trabajo se observó que la administración de una dieta enriquecida con el 3% de ácido palmítico por un periodo de seis meses conduce al aumento no significativo con respecto al grupo Control de la producción de ERO, mientras que al año de tratamiento el aumento en la producción de ERO en la mitocondrias del hígado si fue significativo con respecto al Control. De acuerdo a la bibliografía, se ha descrito que cuando existe un aumento en la concentración de ácidos grasos saturados en la dieta el proceso de la  $\beta$ -oxidación y los sustratos respiratorios el NADH y FADH aumentan, ocasionando pérdida de electrones en los complejos I y III, esto se traduce como una generación anormal de superóxido, volviendo menos eficiente la fosforilación oxidativa mitocondrial (Egnatchik et al., 2014).

En otros estudios se ha observado que, la tasa de emisión de  $H_2O_2$  mitocondrial es significativamente mayor cuando la respiración basal es sustentada por ácidos grasos en comparación con sustratos a base de hidratos de carbono (Anderson et al., 2009).

El aumento en la ingesta de nutrientes en la dieta se ha considerado como una situación de estrés dentro de un sistema vivo, y se ha observado que una de las principales consecuencias es una mayor producción de ERO, esto sin saber si el aumento en la concentración de los nutrientes es moderada o excesiva (Patrignani and Patrono, 2015).

Basándonos en el hecho de que la obesidad genera una inflamación crónica de bajo grado, en este trabajo decidimos evaluar si la administración de un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, como la ASA, tenía efecto en la producción de ERO en las mitocondrias. Se encontró que la administración de ASA en conejos alimentados con la dieta enriquecida en grasas saturadas por 12 meses, reduce la producción de ERO. Este resultado es pionero, porque demuestra que el empleo de la ASA disminuye la producción de ERO. La vía probable para esta acción, es la disminución en la producción de TXs por la inhibición de las enzimas COX, debido a su efecto de inhibición de procesos inflamatorios.

Este resultado está de acuerdo a lo que se ha reportado en trabajos similares, en los que se ha observado que el asa en combinación con ácidos grasos (colesterol) puede disminuir la producción de ERO, debido a que los AINES, además de inhibir a las enzimas COX, actúan como antioxidantes, reaccionando directamente con los radicales  $\bullet\text{OH}$  y aumentando las concentraciones de antioxidantes totales en sangre (Mahmood et al., 2009).

Opuesto a lo anterior encontramos que, en condiciones normales de alimentación, la administración de ASA a dosis antiinflamatoria durante 12 meses, produce un aumento en la producción de ERO en las mitocondrias de los hígados de los conejos. Esta sobreproducción puede estar relacionada con cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial que resulte en la pérdida o ganancia de electrones. Algunos estudios han descrito que, al existir altas concentraciones de salicilato (metabolito de la ASA) se induce una condición denominada transición de permeabilidad mitocondrial; este cambio en la permeabilidad mitocondrial genera la entrada de diferentes iones, principalmente calcio, lo cual genera estrés dentro de la mitocondria aumentando la producción de ERO (Battaglia et al., 2005; Raza et al., 2011).

Existen varias evidencias en la literatura que describen que dentro de la CTE la producción de ERO es generada por el complejo I y el Complejo III atribuyendo la mayor proporción al complejo I, aunque se ha reportado que existen diferentes factores que generan que el complejo III aumente la producción de ERO (Turrens, 2003).

En este trabajo al obtener las pendientes (Tabla III) después de añadir Glutamato/Malato y Antimicina, se observó que en ambos complejos aumenta la producción de ERO, aún cuando no se añadió un inhibidor del complejo I como la rotenona, se observó que en el complejo I hay una mayor producción de ERO después de añadir los sustratos Glutamato y Malato en comparación con los valores de ERO en el complejo III, ambos resultados son acordes a lo referenciado en trabajos similares (Kowaltowski et al., 2009; Turrens, 2003)

## Conclusiones

- La administración de una dieta enriquecida con una baja concentración de ácidos grasos saturados durante 6 y 12 meses, generó un aumento en la producción de ERO en mitocondrias aisladas de hígado de conejo.
- La administración de una dieta enriquecida con una baja concentración de ácidos grasos saturados en combinación con la administración de aspirina durante 6 y 12 meses, generó una disminución en la producción de ERO en mitocondrias aisladas de hígado de conejo.
- La administración de aspirina en una dosis antiinflamatoria, generó un aumento en la producción de ERO a los 6 y 12 meses en mitocondrias aisladas de hígado de conejo.
- No hay una clara correlación clara entre la concentración de glucosa e insulina con la producción de ERO en los tratamientos de 6 meses Asp, 6 meses Grasa.

## Perspectivas

- Analizar otros parámetros que nos indiquen cuál es el efecto que tienen los tratamientos, por ejemplo concentración de ATP
- Analizar cuál es el efecto como pro oxidante, antioxidante o antiinflamatorios que tiene la administración de la Aspirina en un modelo animal, ya que en la literatura existen datos contradictorios sobre la participación de los AINEs en el fenómeno del estrés oxidante.

## Referencias

- Akiyama, T., Tachibana, I., Shirohara, H., Watanabe, N., and Otsuki, M. (1996). High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. *Diabetes research and clinical practice* 31, 27-35.
- Anderson, E.J., Lustig, M.E., Boyle, K.E., Woodlief, T.L., Kane, D.A., Lin, C.T., Price, J.W., 3rd, Kang, L., Rabinovitch, P.S., Szeto, H.H., *et al.* (2009). Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J Clin Invest* 119, 573-581.
- Arredondo, A., and Zúñiga, A. (2004). Economic Consequences of Epidemiological Changes in Diabetes in Middle-Income Countries: The Mexican case. *Diabetes Care* 27, 104-109.
- Barquera, S., Campos-Nonato, I., Hernández-Barrera, L., Pedroza, A., and Rivera-Dommarco, J.A. (2013). Prevalencia de obesidad en adultos mexicanos, 2000-2012. *Salud Pública de México* 55, S151-S160.
- Battaglia, V., Salvi, M., and Toninello, A. (2005). Oxidative stress is responsible for mitochondrial permeability transition induction by salicylate in liver mitochondria. *J Biol Chem* 280, 33864-33872.
- Camello-Almaraz, M.C., Pozo, M.J., Murphy, M.P., and Camello, P.J. (2006). Mitochondrial production of oxidants is necessary for physiological calcium oscillations. *Journal of cellular physiology* 206, 487-494.
- Chen, Y.R., and Zweier, J.L. (2014). Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circulation research* 114, 524-537.
- Cusi, K. (2012). Role of Obesity and Lipotoxicity in the Development of Nonalcoholic Steatohepatitis: Pathophysiology and Clinical Implications. *Gastroenterology* 142, 711-725.e716.
- Egnatchik, R.A., Leamy, A.K., Noguchi, Y., Shiota, M., and Young, J.D. (2014). Palmitate-induced Activation of Mitochondrial Metabolism Promotes Oxidative Stress and Apoptosis in H4IIEC3 Rat Hepatocytes. *Metabolism* 63, 283-295.
- Etchison, W.C., Bloodgood, E.A., Minton, C.P., Thompson, N.J., Collins, M.A., Hunter, S.C., and Dai, H. (2011). Body Mass Index and Percentage of Body Fat as Indicators for Obesity in an Adolescent Athletic Population. *Sports Health* 3, 249-252.
- Freyre-Fonseca, V., Delgado-Buenrostro, N.L., Gutierrez-Cirlos, E.B., Calderon-Torres, C.M., Cabellos-Avelar, T., Sanchez-Perez, Y., Pinzon, E., Torres, I., Molina-Jijon, E., Zazueta, C., *et al.* (2011). Titanium dioxide nanoparticles impair lung mitochondrial function. *Toxicol Lett* 202, 111-119.



Gyamfi, D., Everitt, H.E., Tewfik, I., Clemens, D.L., and Patel, V.B. (2012). Hepatic mitochondrial dysfunction induced by fatty acids and ethanol. *Free Radic Biol Med* 53, 2131-2145.

H. Hammadi, S. (2012). Aspirin and Blood Glucose and Insulin Resistance. *Open Journal of Endocrine and Metabolic Diseases* 02, 16-26.

Halliwell, B. (2006). Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology* 141, 312-322.

Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. (2007). Free radicals in biology and medicine, 4th edn (Oxford: Oxford University Press).

Hamanaka, R.B., and Chandel, N.S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in biochemical sciences* 35, 505-513.

Haslam, D.W., and James, W.P.T. (2005). Obesity. *The Lancet* 366, 1197-1209.

Hempel, S.L., Buettner, G.R., O'Malley, Y.Q., Wessels, D.A., and Flaherty, D.M. (1999). Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biology and Medicine* 27, 146-159.

INEGI (2012). Defunciones generales totales por principales causas de mortalidad, 2012.

Jabaut, J., and Ckless, K. (2012). Inflammation, Immunity and Redox Signaling. In *Inflammation, Chronic Diseases and Cancer - Cell and Molecular Biology, Immunology and Clinical Bases*, M. Khatami, ed. (Rijeka, Croatia InTech).

Kainuma, M., Fujimoto, M., Sekiya, N., Tsuneyama, K., Cheng, C., Takano, Y., Terasawa, K., and Shimada, Y. (2006). Cholesterol-fed rabbit as a unique model of nonalcoholic, nonobese, non-insulin-resistant fatty liver disease with characteristic fibrosis. *J Gastroenterol* 41, 971-980.

Kojima, H., Sakurai, S., Uemura, M., Fukui, H., Morimoto, H., and Tamagawa, Y. (2007). Mitochondrial abnormality and oxidative stress in nonalcoholic steatohepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 31, S61-66.

Kowaltowski, A.J., de Souza-Pinto, N.C., Castilho, R.F., and Vercesi, A.E. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 47, 333-343.

Kunau, W.-H., Dommes, V., and Schulz, H. (1995).  $\beta$ -Oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: A century of continued progress. *Progress in Lipid Research* 34, 267-342.

- Liu, Y., Peterson, D.A., Kimura, H., and Schubert, D. (1997). Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of neurochemistry* 69, 581-593.
- Lumeng, C.N., and Saltiel, A.R. (2011). Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *The Journal of Clinical Investigation* 121, 2111-2117.
- Mahmood, K.-A.S., Jawad, H., and Jawad, A.M. (2009). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), free radicals and reactive oxygen species (ros): a review of literature (MJBU).
- Marseglia, L., Manti, S., D'Angelo, G., Nicotera, A., Parisi, E., Di Rosa, G., Gitto, E., and Arrigo, T. (2014). Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 378-400.
- Mitchell, T., and Darley-Usmar, V. (2012). Metabolic syndrome and mitochondrial dysfunction: insights from preclinical studies with a mitochondrially targeted antioxidant. *Free Radic Biol Med* 52, 838-840.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417, 1-13.
- Nelson, D.L., and Cox, M.M. (2013). *Lehninger Principles of Biochemistry* (W.H. Freeman).
- Nunnari, J., and Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 148, 1145-1159.
- Okuno, D., Iino, R., and Noji, H. (2011). Rotation and structure of FoF1-ATP synthase. *J Biochem* 149, 655-664.
- OMS (2012). *Temas de salud Obesidad*.
- Patrignani, P., and Patrono, C. (2015). Cyclooxygenase inhibitors: From pharmacology to clinical read-outs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1851, 422-432.
- Raffaella, C., Francesca, B., Italia, F., Marina, P., Giovanna, L., and Susanna, I. (2008). Alterations in hepatic mitochondrial compartment in a model of obesity and insulin resistance. *Obesity (Silver Spring)* 16, 958-964.
- Raza, H., John, A., and Benedict, S. (2011). Acetylsalicylic acid-induced oxidative stress, cell cycle arrest, apoptosis and mitochondrial dysfunction in human hepatoma HepG2 cells. *Eur J Pharmacol* 668, 15-24.
- Samuelson, G. (1997). *Physical Status: The Use and Interpretation of Anthropometry*. WHO Technical Report Series. *Acta Pædiatrica* 86, 280-280.

Sikaris, K.A. (2004). The Clinical Biochemistry of Obesity. *The Clinical Biochemist Reviews* 25, 165-181.

Szewczyk, A., and Wojtczak, L. (2002). Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev* 54, 101-127.

Turrens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552, 335-344.

Vane, J.R., and Botting, R.M. (2003). The mechanism of action of aspirin. *Thrombosis Research* 110, 255-258.

Voet, D., Voet, J.G., and Pratt, C.W. (2013). *Principles of biochemistry*, 4th edn (Hoboken, N.J.: John Wiley).