

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**EFFECTOS DE LA MELATONINA SOBRE LAS
ALTERACIONES DE LA
CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL EN UN
MODELO MURINO DE ENFERMEDAD GRASA DEL
HÍGADO NO ALCOHÓLICA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Pablo Solís Muñoz

Directores:

**José Antonio Solís Herruzo
María Teresa Muñoz Yagüe**

Madrid, 2010

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE, MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



**EFFECTOS DE LA MELATONINA SOBRE LAS
ALTERACIONES DE LA
CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL EN UN
MODELO MURINO DE ENFERMEDAD GRASA DEL
HÍGADO NO ALCOHÓLICA.**

TESIS DOCTORAL

Pablo Solís Muñoz

Directores:

José Antonio Solís Herruzo

María Teresa Muñoz Yagüe

Madrid, 2010

Dedicado a mis padres

AGRADECIMIENTOS:

A los directores de la tesis, los Doctores José Antonio Solís Herruzo y María Teresa Muñoz Yagüe por su estímulo constante, su ayuda y su apoyo incondicional para realizar esta tesis. Su estímulo incluye tanto el interés por la investigación -la duda constante- y por la medicina -desde los aspectos más clínicos a los más básicos-. Su ayuda en la realización de todas y cada una de las partes de la tesis, desde la estructura de los experimentos hasta la corrección de los últimos detalles, ya que sin sus consejos no habría sido posible finalizarla. Finalmente, su apoyo en los peores momentos, en los que los experimentos no salían de la manera adecuada o aquellos en los que la hubiera abandonado por las dificultades que encontraba. Ellos constituyen, en mi entorno, de las pocas personas que se dedican simultáneamente a la clínica y a la investigación por lo que comprendían mis fases de desánimo y el esfuerzo que ha representado el continuar trabajando en el laboratorio tras finalizar el trabajo clínico, terminando muy tarde en ocasiones, y sobre todo, los fines de semana para intentar avanzar en su realización. Ellos constituyen para mí un modelo a seguir tanto a nivel profesional como a nivel personal.

Al Dr. Enríquez de Salamanca, Catedrático de Medicina de la UCM, Jefe de Servicio y Director del Laboratorio de Investigación del Hospital Universitario "12 de Octubre" y al Dr. Fernández Crespo, Director de Docencia e Investigación del mismo Hospital que me han permitido tener acceso y poder trabajar en dichas instalaciones.

A las distintas personas que integran el laboratorio de Gastroenterología dirigido por el Dr. Solís Herruzo: Cristina Rodríguez Juan, la Dra. Inmaculada García Ruiz y Teresa Diez Sanjuán, por enseñarme lo que sé sobre técnicas de Western blot, inmunofluorescencia, cultivos celulares, acción del peroxinitrito, actividad "in gel" de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, entre otras muchas. Al Dr. Solís Herruzo por enseñarme la técnica de Blue Native en una y dos dimensiones. A la Dra. María José Morán, por enseñarme los conceptos básicos de PCR-RT y secuenciación.

Al Dr. Colina por su interés en el estudio de las muestras de los hígados de los ratones sometidos a distintas condiciones experimentales y por las brillantes fotos obtenidas. También por sus orientaciones y consejos desde que inicié esta apasionante carrera.

A Elsa Solís Muñoz por su apoyo constante y por ayudarme en la fase final de corrección, maquetación e impresión del texto.

A todas las personas que han creído y confiado en mí ya que esta tesis supone para mí la finalización de una etapa de mi carrera profesional.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

Abreviaturas	6
Introducción	7
<hr/>	
Enfermedad Grasa del hígado no alcohólica	
<hr/>	
1. Concepto	8
2. Diagnóstico	9
3. Epidemiología	12
4. Etiología	14
5. Patogenia	17
5.1.- Acciones de la Insulina	17
5.2.- Acumulación de triglicéridos. Hígado graso	19
5.3.- Consumo mitocondrial de ác. grasos	21
5.4.- Beta-oxidación	23
5.5.- Cadena respiratoria mitocondrial	25
6. Tratamiento	30
6.1.- Sensibilizantes a la Insulina	31
6.2.- Combatir la obesidad visceral	33
6.3.- Antioxidantes	35
6.4.- Anti-estrés nitrogenado (melatonina)	36
Hipótesis de trabajo	39
<hr/>	
Objetivos	40
<hr/>	
Material y Métodos	42
<hr/>	
1.- Grupos experimentales	44
2.- Concentración de triglicéridos en hígado	45
3.- Aislamiento de proteínas mitocondriales	45
4.- Determinación de peroxidación de lípidos	46
5.- Determinación de actividad del Complejo I “ <i>in Gel</i> ”	46
6.- Determinación de la actividad de la CRM	47
7.- Determinación del consumo mitocondrial de oxígeno	48
8.- Valoración del ensamblaje de los complejos	49
9.- Electroforesis en segunda dimensión	50
10.- Determinación de la 8-hidroxi-2-desoxiguanosina	51
11.- PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR)	52
12.- Modificación de las proteínas mitocd. “ <i>in vitro</i> ” por peroxinitrito	53
13.- Estadística	53
Resultados	54
<hr/>	
1.- Los ratones <i>ob/ob</i> desarrollan EGHNA y alteraciones de la CRM	55
1.1.- Histología hepática en ratones <i>ob/ob</i>	55
1.2.- Actividad de los complejos de la CRM en ratones <i>ob/ob</i>	56

1.3.- Respiración mitocondrial en ratones <i>ob/ob</i>	58
2.- Disminución de complejos totalmente ensamblados en ratones <i>ob/ob</i>	58
2.1.- Los complejos ensamblados están disminuidos	58
2.2.- Las subunidades de los complejos están disminuidas	59
2.3.- La expresión de genes mitocondriales está disminuida	61
2.4.- El ADNmt está alterado por estrés oxidativo	62
3.- En el hígado de los ratones <i>ob/ob</i> hay estrés oxidativo y nitrogenado	63
3.1.- Estrés oxidativo	63
3.2.- Los antioxidantes mejoran las alteraciones	63
3.2.1.- Efectos sobre la CRM	64
3.2.2.- Efectos sobre el ensamblaje de los complejos	65
3.2.3.- Efectos sobre las subunidades de los complejos	66
3.2.4.- Efecto sobre la expresión genética	66
3.3.- En el hígado de los ratones <i>ob/ob</i> hay estrés nitrogenado	67
3.4.- El ácido úrico disminuye la nitración de las proteínas	69
3.4.1.- Efectos sobre la CRM	71
3.4.2.- Efectos sobre la estructura de los complejos	71
3.5.- Los niveles de prohibitina están disminuidos en ratones <i>ob/ob</i>	74
4.- El peroxinitrito reproduce “<i>in vitro</i>” las alteraciones de la CRM de los ratones <i>ob/ob</i>	75
5.- La melatonina previene los efectos del peroxinitrito “<i>in vitro</i>”	79
5.1.- Efectos sobre la actividad de la CRM	80
5.2.- Efectos sobre la respiración mitocondrial	81
5.3.- Efectos sobre el ensamblaje de los complejos	82
6.- El tratamiento de los ratones <i>ob/ob</i> con melatonina previene las alteraciones mitocondriales y las lesiones de EGHNA	85
6.1.- Efectos sobre el estrés nitrogenado	85
6.2.- Efectos sobre el estrés oxidativo	86
6.3.- Efectos sobre la actividad de la CRM	87
6.4.- Efectos sobre el ensamblaje de los complejos	87
6.5.- Efectos sobre las subunidades de los complejos	88
6.6.- Efectos sobre la expresión genética de las subunidades	89
6.7.- Efectos sobre las lesiones de EGHNA	90
6.8.- Efectos sobre los triglicéridos hepáticos y transaminasas	91
Discusión	93
Referencias	109
Conclusiones	129

Abreviaturas

ADNmt, ADN mitocondrial

ADNn, ADN nuclear o genómico

ARNm, ARN mensajero

BN-PAGE, *Blue Native-polyacrilamide gel electrophoresis*

CPT-I, carnitin-palmitoil transferasa I

CRM, cadena respiratoria mitocondrial

EGHNA, enfermedad grasa del hígado no alcohólica

EHNA, esteatohepatitis no alcohólica

ICR, índice de control respiratorio

iNOS, oxido-nítrico sintetasa inducible

i.p., intraperitoneal

LPL, Lipoproteín lipasa

MnTBAP, ácido 5,10,15,20-benzoico manganeso tetrakis porfirina

MTP, *microsomal triglyceride transfer protein*

3NT, 3-nitrotirosina

O₂⁻, anión superóxido

8-OHdG, 8-hidroxi-2-desoxiguanosina

ON, óxido nítrico

RNS, sustancia reactiva derivadas del nitrógeno

ROS, sustancias reactivas derivadas del oxígeno

RT-PCR, *Real Time-Polymerase Chain Reaction*.

TBARS, sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico

INTRODUCCIÓN

ENFERMEDAD GRASA DEL HÍGADO NO ALCOHÓLICA.

1. Concepto:

Desde la década de los cincuenta se conoce la existencia de lesiones histopatológicas hepáticas similares a las que se encuentran en sujetos alcohólicos pero que se presentan en personas que no consumen alcohol en exceso. Por ejemplo, Zelman (1), en 1952, y Werswater y Fainer (2), en 1958, publicaron series de pacientes obesos no bebedores con esteatosis hepática significativa y cambios necroinflamatorios asociados a fibrosis. Thaler, a lo largo de los años 60 y comienzo de los 70, comunicó en diversas ocasiones el hallazgo de lesiones aparentemente alcohólicas en sujetos no bebedores. Por esta razón, propuso sustituir el término de hepatitis alcohólica por el de “*hepatitis grasa*”, “*Fettleberhepatitis*” o “*esteatohepatitis*” (3 – 5). También Leevy publicó otra serie mucho más extensa, de 270 pacientes, con esteatosis hepática de los que 64 no eran bebedores (6). Casos aislados y observaciones similares se siguieron publicando durante los años sesenta y setenta en obesos (7 – 9), en diabéticos (10 – 12) y en sujetos sometidos a derivación quirúrgica yeyuno-ileal por obesidad mórbida (13, 14). Estas lesiones recibieron multitud de nombres a lo largo de esos años, entre los que destacan los de *hepatitis grasa*, *hepatopatía de la obesidad*, *cirrosis nutricional*, *cirrosis diabética no alcohólica*, *hepatitis diabética*, *esteatohepatitis idiopática*, *esteatofibrosis*, *esteatonecrosis* o *hepatopatía pseudoalcohólica*, entre otras. A pesar de todas estas descripciones, por aquellos años, se dudaba de la existencia real de esas lesiones con independencia del alcohol y se creía que realmente se trataba de sujetos bebedores que negaban el consumo de etanol. En 1980, Jürgen Ludwig, patólogo de la Clínica Mayo, describió 20 pacientes obesos, diabéticos y no bebedores que presentaban alteraciones histológicas en la biopsia hepática idénticas a las de la hepatopatía alcohólica y acuñó para ellas el término de ***esteatohepatitis no alcohólica*** (EHNA) (15). En este estudio inicial, el 90% de los casos eran obesos, el 60%, mujeres, el 25% tenían hiperlipidemias y el 25% padecían una diabetes mellitus tipo 2. Este trabajo inicial, sin embargo, se basaba en un número reducido de pacientes e incluía algunos que podrían haber tenido otras causas para sus

alteraciones histológicas. Por ejemplo, dos eran portadores del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, 4 podían padecer una cirrosis biliar primaria ya que en ellos eran positivos los anticuerpos antimitocondriales y el virus de la hepatitis C, que puede producir algunos de esos cambios, aún no podía ser detectado en el momento en el que se realizó el estudio. No obstante, la intención de estos autores fue la de cambiar la idea existente en ese momento de que esas alteraciones histológicas las producía exclusivamente el abuso alcohólico.

La EHNA se puede **definir** como una enfermedad hepática caracterizada por la presencia de *esteatosis, degeneración hidrópica de los hepatocitos, infiltrados portales o lobulares* y, en ocasiones, *hialina de Mallory* y *fibrosis*, es decir, las mismas lesiones que se encuentran en la hepatitis alcohólica, pero que en este caso se presentan en sujetos que no consumen etanol o que si lo consumen lo hacen en poca cantidad (9, 15 - 17). Es una lesión que forma parte de un espectro de lesiones más amplio conocido como **enfermedad grasa del hígado no alcohólica** (EGHNA) (18, 19) y que incluye también al *hígado graso no alcohólico*, al *hígado graso e inflamación*, a la EHNA, a la *cirrosis grasa no alcohólica* y a algunos *hepatocarcinomas* (20). Es muy probable que también muchas *cirrosis criptogenéticas* tengan su origen en una EHNA (19, 21), pero que con el paso del tiempo hayan perdido los signos de esteatohepatitis (22 – 24). Son lesiones que habitualmente se presentan asociadas al síndrome metabólico, a la resistencia a la insulina y a otros procesos patológicos (25, 26).

A pesar de que las lesiones de la EHNA se consideran indiferenciables de las que se encuentran en la hepatitis alcohólica (27), en los últimos años se han detectados entre ambas hepatopatías diferencias significativas cuantitativas y cualitativas (28) y se ha reconocido que hay algunos cambios frecuentes en la hepatopatía alcohólica que aún no se han descrito en la EGHNA. Entre éstas destaca la necrosis hialina esclerosante, la colestasis aguda, la enfermedad veno-oclusiva, la proliferación ductulillar y la colangiolitis (29). Otros autores han encontrado que los cambios necroinflamatorios son más intensos y que la hialina de Mallory es más frecuente en los alcohólicos (16, 17, 30). A pesar de esas diferencias, en muchas ocasiones, el diagnóstico histopatológico se ha de basar más en una constelación de cambios que en la

existencia de unos pocos cambios concretos (31).

El hígado graso simple y el hígado graso asociado a inflamación mínima son considerados lesiones hepáticas benignas, que rara vez (3%) progresan a fases más avanzadas de la enfermedad. Por el contrario, la EHNA con o sin fibrosis asociada evoluciona frecuentemente y puede llegar a la cirrosis en el 15 al 25% de las ocasiones (19, 32). Es un hecho demostrado que el hígado graso, aún en ausencia de inflamación o de fibrosis, es más sensible a la agresión por otros factores, incluida la infección por los virus de la hepatitis B o C (33 – 35), el estrés oxidativo y la isquemia y su presencia incrementa el riesgo quirúrgico y empeora los resultados del trasplante hepático si se utiliza como hígado donante.

2.- Criterios Diagnósticos:

El diagnóstico de EHNA (36) se basa en: (a) criterios histológicos compatibles con esteatohepatitis y (b) evidencia clínica contrastada de que el paciente no ingiere cantidades hepatotóxicas de alcohol. Entre los primeros criterios, los histológicos, figuran los cambios hepatocitarios, los inflamatorios y la fibrosis. Las alteraciones hepatocelulares incluyen la presencia de, al menos, el 5% de los hepatocitos con *degeneración grasa macrovacuolar*, la existencia de *degeneración balonzante* de los hepatocitos, de *megamitocondrias* y de *hialina de Mallory*. Aunque esta última es muy sugerente de esteatohepatitis, su presencia no es obligada. Consiste en un material amorfo, hialino y perinuclear que se debe a la condensación de moléculas del citoesqueleto. Es un cambio típico de la hepatitis alcohólica y de la EHNA pero no es específica de ellas ya que está presente también en otras hepatopatías. Los *cuerpos acidófilos*, que representan a células que se encuentran en proceso de muerte por apoptosis, son también cambios que se pueden encontrar en las biopsias de pacientes con EHNA. La presencia de *infiltrados inflamatorios mixtos* es otro criterio histológico de EHNA. Estos infiltrados están formados tanto por células mononucleares como por polimorfonucleares, si bien, la presencia de neutrófilos no es necesaria para el diagnóstico. Es frecuente que exista *fibrosis pericelular* (“*Chicken wire*”) en la zona 3 del lobulillo, es decir, en la cercanía a la vena centrolobulillar. Algunos

autores han propuesto un *sistema de puntos* para valorar las diversas lesiones hepáticas de la EGHNA y poder así establecer el diagnóstico histológico de EHNA (21, 37).

El segundo criterio diagnóstico exige que esas alteraciones histológicas no sean ocasionadas por el etanol. Han existido muchas discrepancias sobre la cantidad máxima de etanol que se puede permitir para que un determinado paciente sea aceptado en el grupo de EGHNA y no en el de hepatopatía alcohólica. Los primeros autores que escribieron sobre ello exigían la *abstinencia alcohólica absoluta*. Esto era lógico, ya que en aquellos tiempos la enfermedad no era conocida y había una tendencia a atribuir esas lesiones al consumo oculto, no confesado de alcohol (15). Posteriormente, otros autores han considerado que este diagnóstico es compatible con un consumo diario bajo de alcohol, variable entre 10 y 20 g. Esta tolerancia se ha basado en el hecho de que estos pequeños consumos de alcohol no parecen empeorar el curso de la hepatitis C. Por otro lado, en la actualidad se cuenta con evidencias que indican que el consumo de esas cantidades de etanol no sólo no es perjudicial, sino que reduce el riesgo coronario, aumenta la sensibilidad a la insulina y, por ello, mejora el síndrome metabólico (38). Basados en estas razones, se ha llegado al acuerdo de que el diagnóstico de EGHNA es compatible con un consumo de etanol de 140 g/semana en los hombres y de 70 g/semana en las mujeres. Es decir, 20 g/día en los primeros y 10 g/día en las últimas (39).

Inicialmente, el diagnóstico de EGHNA exigía descartar otras enfermedades causantes de hepatopatía; sin embargo, en la actualidad está reconocido que la EHNA puede coexistir con otras enfermedades hepáticas incluida la hepatopatía alcohólica (40). Los pacientes obesos y alcohólicos pueden tener daño hepático originado por ambas causas, pero en la actualidad es muy difícil diferenciar el daño ocasionado por cada uno de ellos.

Tabla 1. Criterios diagnósticos de EHNA (28)

<p>Criterios histopatológicos:</p>	<p>A) Cambios hepatocelulares</p> <p>Esteatosis hepatocelular.</p> <p>Degeneración bolonizante.</p> <p>Hialina de Mallory.</p> <p>Cuerpos acidófilos.</p> <p>B) Cambios necroinflamatorios</p> <p>Células inflamatorias.</p> <p>C) Fibrosis</p>
<p>Criterios clínicos:</p>	<p>Ingesta de etanol menor de:</p> <p>- 20 g/día en el hombre.</p> <p>- 10 g/día en la mujer</p>

3. Epidemiología de la EHNA primaria.

No se conoce con exactitud cuál es la prevalencia real de la EGHNA. Ello se debe a que la inmensa mayoría de pacientes con estas lesiones se encuentran asintomáticos y los métodos diagnósticos más fiables –biopsia hepática y resonancia nuclear magnética– no pueden emplearse de forma rutinaria. Además, en otras enfermedades se pueden presentar lesiones que se asemejan a la EGHNA, como es el caso de la hepatitis por el VHC, principalmente la originada por el genotipo 3. A pesar de ello, se estima que la EGHNA es una lesión frecuente en la población occidental y que en el futuro se hará aún más habitual debido a que se asocia a la resistencia a la insulina, a la diabetes y a la obesidad, tres trastornos cada vez más frecuentes entre nosotros. En la actualidad representa, tras las infecciones virales y el abuso alcohólico, la tercera causa de hipertransaminasemia.

La mayoría de los estudios poblacionales se han basado en la determinación de las transaminasas séricas o en el empleo de la ultrasonografía abdominal, cuya sensibilidad y especificidad son bajas y no discriminan entre los diferentes estadios de este espectro de lesiones. Los estudios basados en los resultados de la biopsia hepática se han realizado en grupos muy concretos de individuos (obesos, diabéticos, etc.) que no son representativos de la población general. En el estudio NHANES III, basado en el hallazgo de *hipertransaminasemia* sin otras causas que lo expliquen, se concluyó que la EGHNA existía en el 3-24% de la población (41). En otro estudio norteamericano que incluyó a 15.676 individuos, se encontró que el 5,4% tenía tasas elevadas de transaminasas (> 40 UI/l en hombres; > 31 UI/l en mujeres) sin que ello pudiera ser justificado por otras causas de hepatopatía. Cuando otros autores emplearon en esa misma población tasas más bajas de transaminasas como criterio para sospechar la existencia de una EGHNA, la frecuencia de esta enfermedad se elevó al 13-24% (42). Sin embargo, es muy probable que estos estudios no proporcionen una visión real de la magnitud del problema, ya que la inmensa mayoría de los pacientes con EGHNA tienen tasas normales de transaminasas. El estudio Dionysos, realizado en Italia, descubrió que el 10% de todos los sujetos incluidos en él (6.917) presentaban muy probablemente una EGHNA. Un segundo estudio realizado en un subgrupo de esa misma población encontró que el 16,4% presentaba esteatosis en la *ultrasonografía*, pero este porcentaje se elevaba al 75,8% cuando se realizaba entre obesos no bebedores (43). El análisis del espectro de la *resonancia magnética de protones* mostró que el 30% de la población americana presenta un aumento de los triglicéridos en el hígado y que esta alteración compromete preferentemente a la comunidad hispana (45%) y a los blancos (42%) (44). En Japón, entre trabajadores y sus familiares no bebedores se halló que entre el 12,8% y el 29% de la población general presentaba esteatosis ecográfica (45).

Cuando la prevalencia de la EGHNA se ha investigado en poblaciones concretas, los resultados han sido diferentes. En efecto, en los chequeos médicos realizados a *sujetos aparentemente sanos*, la EGHNA se ha encontrado en el 15% al 22% de ellos (46) y en los *donantes vivos de hígado*, entre el 33% y el 88% (47). Cuando el estudio fue realizado en *obesos*

mórbidos que requieren cirugía bariátrica, la frecuencia ascendió al 85-95% (48). Estudios realizados en *autopsias* de adultos mostraron que el 2,7% de los delgados y el 18,5% de los obesos tenían esteatosis, (49). En otro estudio realizado en necropsias de personas fallecidas por accidente de tráfico se observaron grados diversos de hígado graso en el 24% de los casos. Sin embargo, en este estudio, es posible que se incluyeran personas bebedoras de cantidades abusivas de etanol y que ello contribuyera a que la frecuencia de hígado graso fuera mayor que en otros estudios (50). Además de la *obesidad*, la *diabetes mellitus del tipo 2* es también un factor de riesgo independiente (51). En los pacientes con diabetes, el grado de inflamación y el estadio de fibrosis son mayores, por lo que su *curso evolutivo es mucho más agresivo*. Esta epidemia, que se acompaña de los restantes componentes del síndrome metabólico (52,53), está estrechamente relacionada con los nuevos hábitos de vida en el mundo occidental, con la vida sedentaria, el alto consumo de hidratos de carbono, de almíbares ricos en fructosa y de grasas sobresaturadas (54).

4.- Etiología de la EGHNA

Se han diferenciado dos grandes grupos fisiopatológicos de EGHNA, el *primario*, estrechamente relacionado con la resistencia a la insulina y el *secundario*, que incluye lesiones de EGHNA en el curso de enfermedades muy diversas.

4.1.- EGHNA primaria. En este primer grupo, *EGHNA primaria*, se incluyen todos los casos ligados a la obesidad y al síndrome metabólico en general. Es la forma de EGHNA que está adquiriendo proporciones epidémicas a escala mundial y que es especialmente preocupante en los países occidentales (55, 56). Este síndrome viene definido por la presencia de al menos tres de las siguientes alteraciones (57, 58): (a) *Obesidad central* con una circunferencia abdominal mayor de 102 cm en los hombres y de 88 cm en las mujeres. (b) Tasa de *triglicéridos* en sangre igual o mayor a 150 mg/dl. (c) *HLD-colesterol* menor de 40 mg/dl en los hombres y de 50 mg/dl en las mujeres. (d) *Tensión arterial* igual o superior a 130/85 mmHg. (e) *Glucemia basal* en ayunas igual o mayor de 110 mg/dl. Es de destacar que este síndrome se asocia no con la obesidad general, sino con la obesidad central o

visceral. Por ello, el síndrome metabólico no se define por el índice de masa corporal, sino por el diámetro de la cintura. La alteración fisiopatológica común a este síndrome es la **resistencia a la insulina** (59 – 61). Ésta une fisiopatológicamente la *obesidad* con el tipo 2 de *diabetes mellitus*, la *hipertensión arterial*, la *disfunción endotelial*, la *hipertrigliceridemia*, las *tasas bajas de HLD-colesterol*, el *mayor riesgo cardiovascular* y la *EGHNA*. En esta última, la resistencia a la insulina, es un hecho prácticamente constante y la gravedad de esta resistencia se asocia independientemente con la EGHNA y con las lesiones más avanzadas. Por esta razón, se considera que la EGHNA representa el componente hepático del síndrome metabólico (62, 63).

4.2.- EGHNA secundaria: En este grupo se incluyen las EGHNA que aparecen en sujetos con problemas muy concretos, tales como la anastomosis yeyuno-ileal, la derivación biliopancreática, la resección extensa del intestino delgado, la lipodistrofia, el síndrome de Weber-Christian o de Mauriac, la enfermedad de Wilson, la abetalipoproteinemia, la nutrición parenteral total, determinados fármacos (perhexilina, glucocorticoides, amiodarona, tamoxifeno, quimioterapia) o agentes químicos (disolventes orgánicos, trabajadores en la industria del petróleo, dimetilformamida), entre otros muchos. (Tabla 2)

Tabla 2. Etiología de la EGHNA

EGHNA primaria: Resistencia a la Insulina	Obesidad central (>102 cm en el hombre y >88 cm en la mujer); hipertensión arterial (>130/80); hiperglucemia (>110); hipertrigliceridemia (>150); descenso de HDL (<40 mg/dl; <50 mg/dl) = 3/5 Síndrome Metabólico
--	---

secundarias	<p><u>Fármacos:</u> Naproxeno, Oxalacina, Metotrexato, Diltiacem, Nifedipino, Glucocorticoides, Estrógenos, Estilbestrol, Tamoxifeno, Hicantona, Sulfasalacina, Amiodarona, Maleato de perhexilina, 4,4 Dietil-amino-etoxi-hexestrol,</p> <p><u>Infecciones:</u> Hepatitis crónica por VHC (principalmente por el genotipo 3); SIDA.</p> <p><u>Agentes químicos:</u> industria del petróleo, disolventes orgánicos, dimetilformamida</p> <p>Lipodistrofias (congénitas; HIV), Enfermedad de Wilson.</p>
--------------------	---

La EGHNA que nos interesa en este estudio es la primaria, la que está relacionada con la resistencia a la insulina y con el síndrome metabólico.

4.3.- Factores genéticos.

Por lo dicho más arriba, nadie puede dudar de que los factores ambientales, la forma de vida y la alimentación desempeñan un papel decisivo en el origen de la EGHNA, pero es muy probable que factores individuales, quizá genéticos, puedan también intervenir y determinar que sólo una minoría de personas con esteatosis hepática evolucionen a EHNA y desarrollen fibrosis o cirrosis hepática o hepatocarcinoma. El hecho de que la EGHNA sea más frecuente entre los hispanos, nativos americanos y asiáticos, todos ellos

nativos americanos y asiáticos, todos ellos con una raíz étnica común, apoya el papel de la carga genética en la etiología de la EGHNA. Además, hay referencias a la coincidencia de varios casos de EHNA en una misma familia.

No se conocen aún cuáles son los genes responsables de esta supuesta predisposición, aunque han sido propuestos numerosos candidatos: (a) genes que condicionan al tipo 2 de *diabetes mellitus*; (b) genes relacionados con el desarrollo de la obesidad abdominal, que favorece la llegada de ácidos grasos al hígado; (c) genes relacionados con una menor salida de VLDL de los hepatocitos [polimorfismo 493G/T de la MTP (*microsomal triglyceride transfer protein*) (64), polimorfismo V175M de la *phosphatidyl-ethanolamine-N-methyltransferase* que participa en la formación de fosfatidilcolina y ésta en la de VLDL (65)]; (d) mutaciones o polimorfismos condicionantes de estrés oxidativo [(polimorfismos C677T y A1298C del gen de la MTHFR (*methylenetetrahydrofolate reductase*) responsable de la homocisteína, factor inductor de estrés oxidativo (66); Mutación C282Y del gen HFE responsable de la acumulación de hierro en el organismo]; (e) mutaciones del gen de la *superóxido dismutasa*, enzima defensiva frente al estrés oxidativo (64); (f) genes reguladores de la *respuesta inflamatoria y fibrosa* [factor PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*) represor de las citoquinas proinflamatorias; polimorfismos en el gen de la IL1 β , del receptor de la endotoxina CD14, del TGF β , del angiotensinógeno (67)].

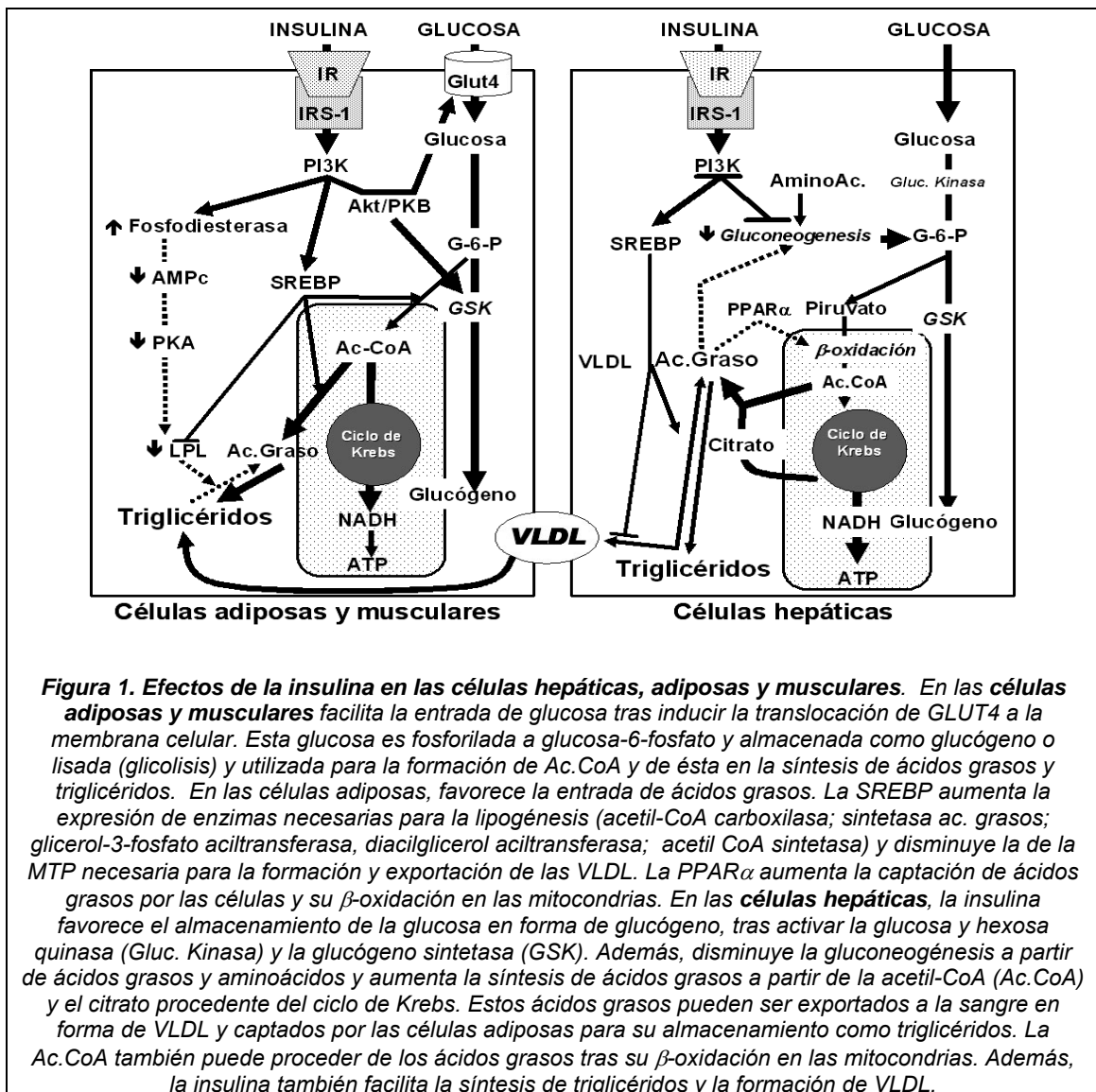
5. Patogenia:

Por lo expuesto más arriba, la EGHNA está estrechamente relacionada con la **resistencia a la insulina** y es este trastorno metabólico el que liga esta enfermedad hepática con el síndrome metabólico.

5.1.- Acciones de la insulina (Fig. 1).

La *insulina* es la principal hormona anabolizante del organismo, ya que estimula la síntesis de proteínas, lípidos y glucógeno y favorece la entrada de

glucosa en las células, a la vez que reduce la lipólisis y gluconeogénesis. En las células adiposas y en el músculo, la insulina se une a su receptor específico, activa la tirosina-quinasa de éste por autofosforilación así como la fosforilación en tirosina del IRS-1 (*Insulin-receptor Substrate*). A ello sigue la activación sucesiva de PI3K (*Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase*) y Akt/PKB, para finalmente determinar el desplazamiento del transportador de glucosa, GLUT-4 —que normalmente se encuentra en vesículas del citoplasma— a la membrana plasmática, donde facilita el paso de glucosa a las células (60, 68, 69). Cuando existe resistencia a la insulina (Fig. 2), la entrada de glucosa en las células adiposas y musculares no tiene lugar, permanece en el espacio extracelular, se produce hiperglucemia y se estimula la producción pancreática de insulina (70). Cuando el páncreas agota su capacidad para compensar la hiperglucemia, surge la diabetes mellitus tipo 2.



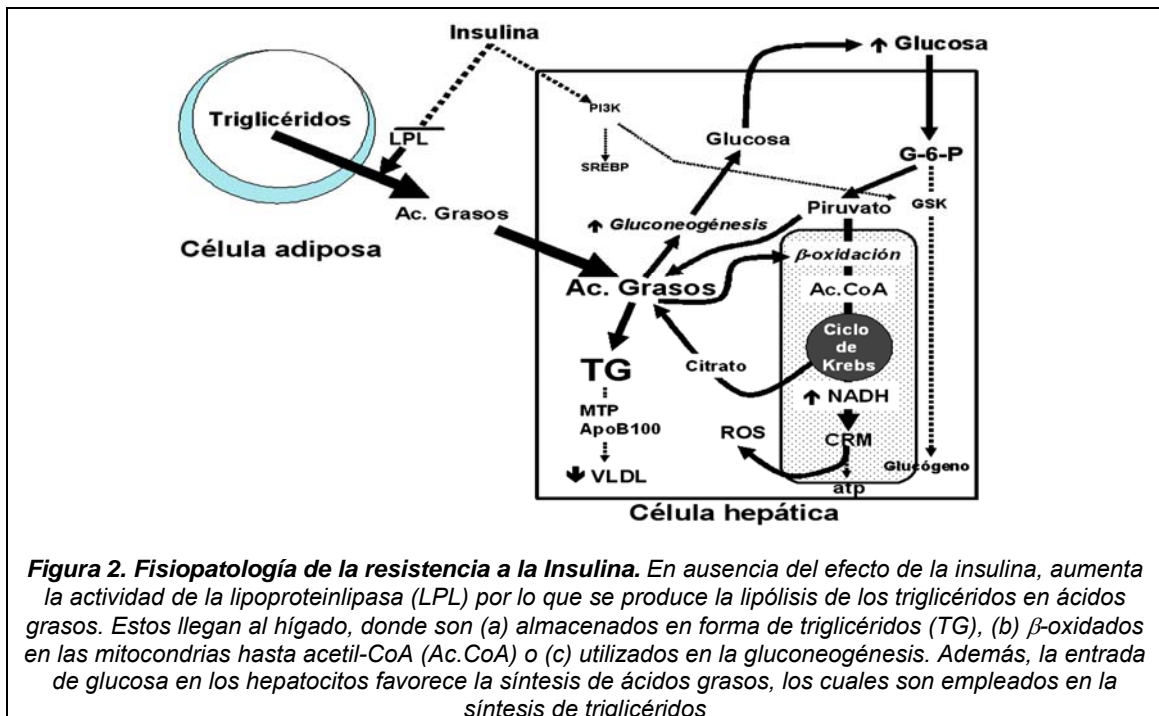
Los efectos celulares de la insulina son, evidentemente, más amplios, ya que la activación de la PI3K se sigue de otros muchos efectos. Entre los que aquí nos interesan figura la activación de la *fosfodiesterasa*, lo que lleva a la degradación del AMPc y ello a que la PKA (*Protein kinase A*) permanezca inactiva y, en consecuencia, a que la *lipoproteín lipasa* (LPL) no se active (71). Es decir, no se produce la hidrólisis de los triglicéridos ni la liberación de los ácidos grasos libres por el *tejido adiposo* (72). Por ello, otra consecuencia de la *resistencia a la insulina* es que los niveles de AMPc permanecen altos en las células adiposas, que la PKA y la LPL se mantengan activadas y que, por ello, se produzca la *hidrólisis de los triglicéridos* y la liberación a la sangre de *ácidos grasos libres*, los cuales pueden llegar al hígado. Los efectos de la insulina sobre el metabolismo lipídico están coordinados por el SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*), un factor de transcripción que juega un papel esencial en la activación de diversos genes implicados en la lipogénesis (73) y en la excreción de la VLDL. Por ello, cuando la *acción de la insulina falta*, todos estos genes permanecen reprimidos y se interrumpe la lipogénesis (57).

En el *hígado*, la insulina, tras unirse a su receptor, fosforila al IRS-2 (74), el cual, también a través de la PI3K y de la Akt/PKB, fosforila y activa a la GSK3 (*Glucogen-Synthase Kinase-3*), por lo que aumenta la formación de glucógeno (75). La glucosa pasa libremente a los hepatocitos, donde es fosforilada por la glucosa quinasa a glucosa-6-fosfato. De esta manera, la glucosa tiene que permanecer en los hepatocitos. Cuando existe *resistencia a la insulina*, cesa la síntesis de glucógeno, aumenta la glicólisis, la gluconeogénesis y la liberación a la sangre de glucosa.

Por todo lo dicho anteriormente, una de las consecuencias principales de la resistencia a la insulina es la *lipólisis* de la grasa y la liberación a la sangre de grandes cantidades de *ácidos grasos libres*. De especial importancia para el hígado y en la patogenia de la EGHNA es la *lipólisis de la grasa abdominal* (76), ya que el hígado ocupa un lugar estratégico en el curso de la circulación portal y recibe directamente los ácidos grasos liberados por esa grasa. La EGHNA se relaciona con el tejido adiposo visceral y no con el periférico (77). En efecto, la mayor parte (60%) de los ácidos grasos que se acumulan en el hígado proceden del abdomen (78). Si el tratamiento elimina

exclusivamente la grasa periférica, por ejemplo, mediante liposucción, los trastornos asociados a la EGHNA persisten (79), lo contrario de lo que ocurre cuando el tratamiento consigue disminuir la grasa visceral (80).

En los hepatocitos, los *ácidos grasos* activan al *receptor nuclear PPAR α* , el cual forma un heterodímero con el RXR (*Retinoid X Receptor*) que induce la transcripción de genes implicados en la *síntesis de triglicéridos* y *fosfolípidos*, en la *gluconeogénesis* o en la *oxidación de los ácidos grasos* en las mitocondrias, en los peroxisomas y en los microsomas (81 – 83). Estos efectos sobre el receptor PPAR α contribuirían a la *esteatosis*, a la *hiperglucemia* y al *estrés oxidativo*. Mientras la oxidación de los ácidos grasos en las mitocondrias (84) y en los microsomas puede conducir a la formación de *anión superóxido* (O_2^-), la oxidación en los peroxisomas da lugar a la formación de peróxido de hidrógeno. Estos radicales formados en el curso de estas oxidaciones contribuyen al estrés oxidativo. Este último es de gran importancia en la evolución de la EGHNA, ya que si la resistencia a la insulina contribuye a la esteatosis, el estrés oxidativo determina su evolución a EHNA y a lesiones más avanzadas de la EGHNA primaria.



5.2. Acumulación de triglicéridos en los hepatocitos: Hígado Graso

Cuando la cuantía de ácidos grasos que llegan al hígado es superior a la que puede ser utilizada o exportada a la sangre en forma de lipoproteínas

VLDL, los excedentes se acumulan en los hepatocitos en forma de *triglicéridos*. Además, el hígado es capaz de *sintetizar ácidos grasos* a partir de la glucosa circulante no empleada en la producción de energía. Aproximadamente, el 25% de los ácidos grasos hepáticos tienen este origen. Una fracción menor (15%) de los ácidos grasos acumulados en forma de triglicéridos procede de los alimentos absorbidos por el *intestino* delgado. Menos importancia en la acumulación de triglicéridos en el hígado tiene la *endocitosis* de restos de lipoproteínas (VLDL, quilomicrones). En los pacientes con EGHNA, la incorporación de los ácidos grasos a los triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de colesterol es normal (85). Por el contrario, la activación del PPAR α favorece la formación de triglicéridos.

Los ácidos grasos presentes en el hígado tienen *dos destinos principales*: (a) su *esterificación* en *triglicéridos* para formar VLDL y ser exportadas de los hepatocitos a la sangre y (b) su entrada en las *mitocondrias* para ser utilizados en la generación de energía. Una vía catabólica menor de los ácidos grasos dicarboxílicos o de cadena muy larga es su oxidación en los *peroxisomas*.

Los triglicéridos son conducidos al retículo endoplásmico celular donde la MTP los incorpora a la apolipoproteína B₁₀₀ (apoB₁₀₀) para formar la lipoproteína VLDL (86 – 89). De esta forma, los triglicéridos pueden ser exportados a la sangre. Un defecto en la formación de VLDL puede determinar su acumulación en los hepatocitos y la aparición de una EGHNA, en especial cuando la llegada de ácidos grasos está aumentada. Algunos estudios han mostrado que en los pacientes con EGHNA está reducida la exportación de triglicéridos a la sangre en forma de VLDL, ya que en ellos la incorporación de los triglicéridos a la apoB₁₀₀ está disminuida (90, 91). En estos enfermos se han descrito polimorfismos en el promotor de la MTP que pueden limitar la exportación de lípidos (64, 92). En las deficiencias de la MTP, como ocurre en la abetalipoproteinemia, es habitual el hallazgo de una EGHNA secundaria (93). En las infecciones por el VHC, principalmente por el genotipo 3, en las que frecuentemente existe esteatosis hepática, la actividad de la MTP está muy descendida (94). Por todo lo anterior, la esteatosis que se encuentra en los pacientes con EGHNA se debe, por un lado, a la abundante llegada de

ácidos grasos al hígado y, por otro, a la exportación defectuosa de triglicéridos a la sangre en forma de VLDL.

5.3.- Consumo mitocondrial de ácidos grasos.

Si como hemos visto más arriba, la *resistencia a la insulina* juega un papel primordial en la patogenia del *hígado graso*, el *estrés oxidativo* probablemente es fundamental para que la esteatosis evolucione a EHNA y a otras lesiones más avanzadas de EGHNA. Se ha postulado que la EHNA sería la consecuencia de *dos agresiones*. La *primera* estaría representada por el hígado graso; la *segunda* por el *estrés oxidativo* (95, 96). Contamos con numerosas evidencias que indican que en la EHNA existe un estrés oxidativo. En el hígado de enfermos y animales con esta lesión se detectan tasas elevadas de aldehído malónico (97, 98), de 4-hidroxinonanal (99), de proteínas nitradas en 3-tirosina (97, 98) y de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) (99, 100), marcadores de lesión oxidativa de lípidos, proteínas y ADN, respectivamente. Al mismo tiempo, en el hígado de esos enfermos o animales con EHNA es habitual encontrar que los factores antioxidantes (*Glutathion S Transferasa*) están disminuidos (98, 101 – 103).

En el hígado, hay muchos lugares y factores que pueden participar en la generación del estrés oxidativo (oxidación de los ácidos grasos, citocromos microsomales, siderosis, citoquinas, células de Kupffer, etc.), pero sin duda las mitocondrias es uno de los principales. Estas organelas están implicadas en la *β-oxidación* de los ácidos grasos y en la *fosforilación oxidativa* y pueden dar lugar a la generación de *sustancias reactivas derivadas del oxígeno* (ROS) (84, 104 – 107).

Las **mitocondrias** son organelas intracelulares que han sido fundamentales para la evolución de los organismos pluricelulares. Si no fuese por las mitocondrias, las células tendrían que obtener su energía a partir de la glucólisis anaerobia, cuyo rendimiento es muy bajo. Sin embargo, en las mitocondrias la producción de energía es más eficiente, ya que el piruvato y los ácidos grasos entran en ellas y se oxidan a CO₂ y H₂O. De esta manera se obtienen unas quince veces más energía en forma de moléculas de ATP de la se consigue por la glucólisis anaeróbica.

Los hepatocitos son células muy ricas en mitocondrias, ya que cada uno de estos tiene entre 1000 y 2000 mitocondrias, lo que significa que aproximadamente la quinta parte del volumen hepatocitario corresponde a las mitocondrias. Estas organelas tienen *dos membranas altamente especializadas* que son fundamentales para su correcto funcionamiento y que delimitan dos espacios independientes, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial. La **membrana externa** posee una proteína llamada *porina* que permite el paso de las moléculas menores de 5000 Daltons. Por esta razón las moléculas de pequeño tamaño pueden pasar fácilmente al espacio intermembrana. En ella también se sitúan enzimas necesarias para la síntesis de lípidos. Sin embargo, la **membrana mitocondrial interna** es casi impermeable, lo que determina que la matriz mitocondrial posea una composición altamente seleccionada. Esta membrana está formada por fosfolípidos, entre los que figura la *cardiolipina*, que contribuye a que la membrana interna sea especialmente impermeable a los iones y permita la creación de un gradiente electroquímico de iones. También posee diversas *proteínas transportadoras* que hacen que la membrana sea permeable solamente a las moléculas que van a ser utilizadas por la matriz mitocondrial. En esta membrana se encuentra también la llamada **cadena respiratoria mitocondrial** (CRM). Dicha cadena, sobre la que nos ocuparemos más adelante con más detenimiento, es la responsable de la *fosforilación oxidativa mitocondrial*, que es la que genera la mayor parte del ATP de la célula animal. Con el fin de aumentar la superficie funcional, la membrana mitocondrial interna se encuentra plegada formando las denominadas *crestas mitocondriales*.

Recubierta por ambas membranas se encuentra la *matriz mitocondrial*. En ésta se encuentran enzimas que transforman el piruvato y los ácidos grasos en *acetil CoA* y las que oxidan la acetil CoA en el *ciclo del ácido cítrico* o de *Krebs*. Los productos finales de este ciclo son el CO₂, el cual es eliminado por la célula, y el NADH y FADH₂, que constituyen la principal fuente de electrones para la CRM. Además, la matriz mitocondrial contiene varias copias de ADN, ribosomas especializados, tARN y diversas enzimas necesarias para la expresión de los genes mitocondriales.

Diversos estudios han mostrado que las mitocondrias de los pacientes con EHNA son grandes, están hinchadas, presentan escasas crestas y, frecuentemente, contienen inclusiones paracrystalinas (85, 108). Se trata de cambios muy parecidos a los que se encuentran en las miopatías mitocondriales (109) lo que sugiere que la función de las mitocondrias, además de su morfología, debe de estar alterada en los pacientes con EHNA.

5.4.- Beta oxidación de los ácidos grasos.

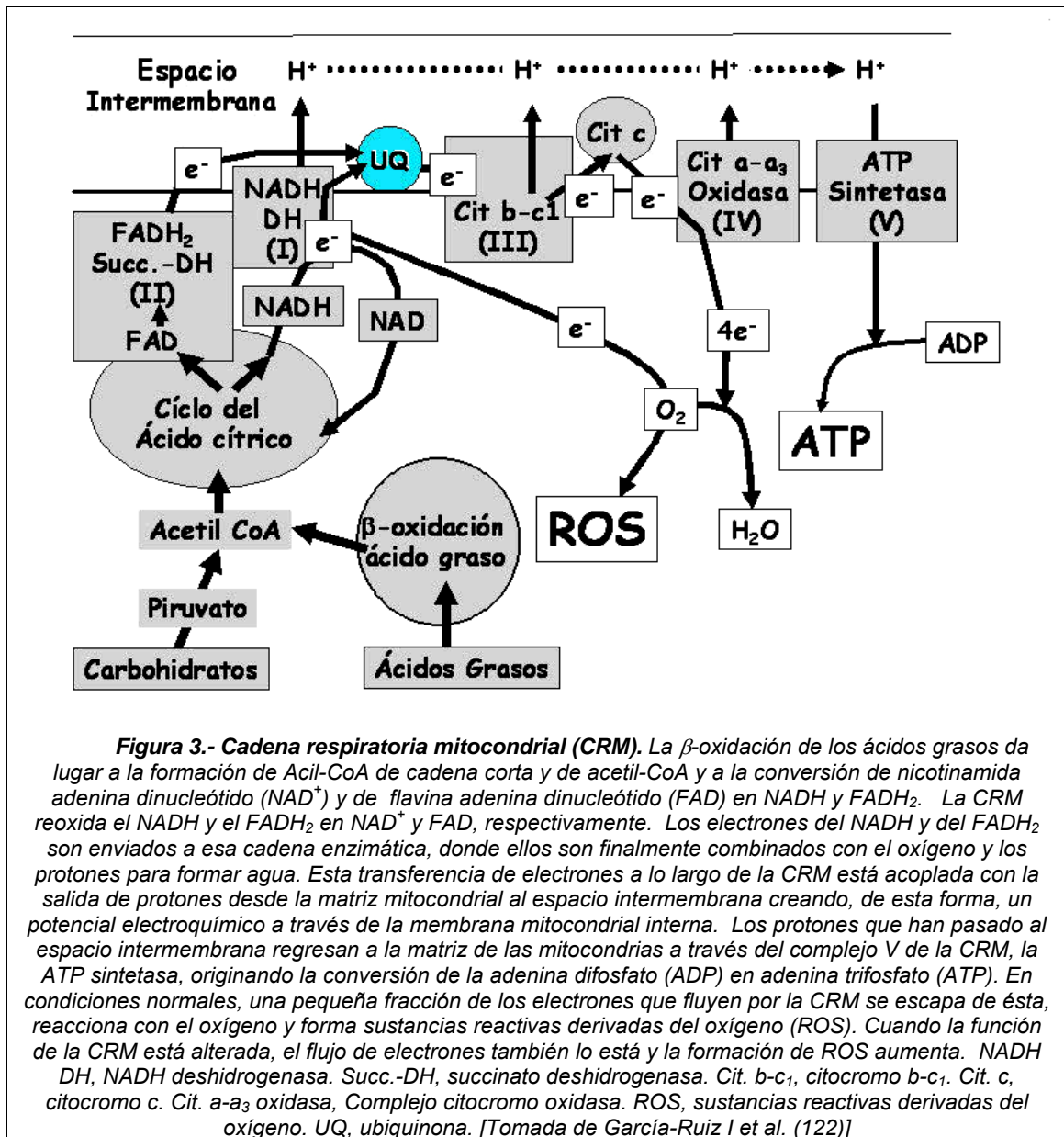
Los ácidos grasos que no son secretados por los hepatocitos en forma de VLDL son oxidados en las mitocondrias o en los peroxisomas (110) en un proceso conocido como *β -oxidación*. Para que ésta pueda tener lugar en las mitocondrias, es necesario que los ácidos grasos entren en ellas y, para esto se necesita de la ayuda de la enzima CPT-I (*carnitin-palmitoil transferase I*), situada en la membrana mitocondrial, de una *traslocasa* y, si los ácidos grasos son de cadena larga, de la *carnitina*. Un defecto en cualquiera de estos elementos puede determinar la acumulación de ácidos grasos y de triglicéridos en el citoplasma celular y la aparición de esteatosis hepática. Este es el caso de las deficiencias de carnitina que pueden dar lugar a esteatosis y a EHNA (111 – 114). En un estudio previo, nuestro grupo pudo demostrar que en los *pacientes* con EHNA la cuantía de *carnitina* y la *actividad de la CPT-I* en el hígado eran normales, por lo que la EGHNA primaria no podía ser atribuida a defectos a este nivel (115).

Una vez que los ácidos grasos se encuentran en la matriz de las mitocondrias son β -oxidados. Es un proceso por el cual la longitud de la cadena grasa se va acortando progresivamente de dos en dos carbonos y liberando moléculas sucesivas de *acetil CoA* y NADH (116). Defectos en esta β -oxidación también pueden dar lugar a esteatosis, en general microvesicular y ser causa de insuficiencia hepatocelular grave. Hay muy pocos estudios sobre la β -oxidación en los pacientes con EGHNA. Algunos autores sugirieron que la β -oxidación se encuentra alterada en los pacientes con EHNA, lo que pudiera explicar que en ellos sea frecuente el hallazgo de esteatosis microvesicular (95, 117, 118). Otros autores, por el contrario, aportaron algunas evidencias indirectas que sugerían que la β -oxidación de los ácidos

grasos se encuentra aumentada (85, 119) y esta alteración la atribuían a la resistencia a la insulina (85). Ésta, como sabemos, se sigue de una mayor llegada de ácidos grasos al hígado que, tras activar el PPAR α , aumentaría la expresión de los genes implicados en la β -oxidación de los ácidos grasos (120, 121) lo que se seguiría de una mayor β -oxidación. Nuestro grupo pudo mostrar, en un modelo de EGHNA en ratones obesos, *ob/ob*, que la β -oxidación tanto mitocondrial como peroxisomal se encontraba significativamente aumentada (122) por lo que la causa de la EGHNA tampoco podía ser atribuida a defectos de esta fase. Estos resultados eran coincidentes con los que otros grupos habían obtenido de forma indirecta en ratones *ob/ob* y en pacientes con EHNA (85, 119).

El *piruvato*, resultante de la glicólisis citoplásmica, es oxidado también a acetil CoA en el complejo de la *piruvato deshidrogenasa* con liberación de CO₂ y NADH. La acetil CoA, producida por el complejo de la piruvato deshidrogenasa y durante la β -oxidación de los ácidos grasos, alimenta el *ciclo del ácido cítrico* donde da lugar a la formación de CO₂, ATP, NADH y FADH₂. El H de estas dos últimas moléculas se descompone en un protón (H⁺) y un electrón de alta energía (e⁻). El primero es bombeado al espacio existente entre ambas membranas mitocondriales y el segundo entra en la CRM. Aún en condiciones normales, algunos electrones pueden escapar de la cadena y dar lugar a la formación de ROS, en especial de O₂⁻ (123, 124). Cuando la función de la CRM es deficiente, la cuantía de electrones que escapan de ésta es mayor y, en consecuencia, aumenta la formación de ROS (116) y contribuye al estrés oxidativo. Cuando la formación de NADH está aumentada como consecuencia de que la β -oxidación también lo está, tal y como ocurre en la EHNA, la formación de ROS aumenta aún más y el estrés oxidativo es mayor.

5.5.- Cadena respiratoria mitocondrial (Fig. 3)



La CRM es un conjunto de cinco complejos enzimáticos y de dos transportadores móviles de electrones, la *ubiquinona* y el *citocromo c*, que se sitúan en la membrana mitocondrial interna. Los cuatro primeros complejos están implicados en la transferencia de electrones desde el $NADH$ y $FADH_2$ hasta el O_2 . El último complejo, el de la ATP sintetasa o complejo V, interviene en la formación de ATP a partir del ADP (84, 125, 126).

El **complejo I (NADH ubiquinona (CoQ) oxidorreductasa o NADH deshidrogenasa)** es el complejo más grande de toda la CRM. Cataliza la transferencia de electrones desde el $NADH$ a la *ubiquinona* (Coenzima Q o CoQ). Está formado por al menos 46 polipéptidos, de los que 7 (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6) están codificados por el ADN mitocondrial

(ADNmt). Las subunidades que forman este complejo se disponen en L, de manera que uno de sus brazos, el *membranoso*, se encuentra incrustado en la membrana mitocondrial interna mientras que el otro, el *periférico*, permanece colgando en la matriz. Este último brazo, que incluye un mononucleótido de flavina y al menos 4 núcleos Fe-S, representa la fracción “*NADH deshidrogenasa*”. El *brazo membranoso* constituye la fracción “*ubiquinona reductasa*” y contiene las 7 subunidades codificadas por el ADNmt y un núcleo de Fe-S. Los átomos de hierro de estos complejos Fe-S pueden existir como Fe^{2+} (forma reducida) o bien como Fe^{3+} (forma oxidada) y ello es lo que les permite aceptar o ceder electrones. Cada centro Fe-S totalmente oxidado puede aceptar hasta 4 electrones. Los electrones son posteriormente transferidos a la ubiquinona o coenzima Q, que se reduce a QH_2 (ubiquinol). Simultáneamente al flujo de electrones desde el NADH hasta el QH_2 , a través del *complejo I*, se produce el bombeo de cuatro H^+ desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana mitocondrial.

El **Complejo II** o de la **Succinato deshidrogenasa** está integrado por 4 polipéptidos, todos ellos codificados por el ADN nuclear o genómico (ADNn). Cataliza la oxidación del succinato en fumarato. El *complejo II* posee dos fracciones: una soluble, formada por la succinato deshidrogenasa que es la enzima que oxida el succinato a fumarato en el ciclo del ácido cítrico, y otra que sirve para fijarse a la membrana. El flujo de electrones desde el succinato hasta la ubiquinona tiene lugar por la vía del FADH_2 producido en el curso de la oxidación del succinato a fumarato. Aunque este complejo es capaz de aportar electrones a la CRM, no lo es de bombear protones a través de la membrana mitocondrial.

El **Complejo III (ubiquinona-citocromo c óxido-reductasa, complejo bc_1)** está formado por 11 subunidades, de las cuales una, el citocromo *b*, está codificado por el ADNmt y los restantes por el ADNn. Las 5 subunidades mayores contienen 4 centros de oxidación-reducción (citocromo c_1 , proteína Fe-S de Rieske, y los citocromos b_{562} y b_{566}). Hay otras subunidades cuya función no es conocida. Los electrones siguen en este complejo una ruta bastante complicada, pero su resultado final es que el ubiquinol (QH_2) se oxida a ubiquinona, el citocromo *c* se reduce al recibir los electrones y dos protones son bombeados al espacio intermembrana.

El **Complejo IV (Citocromo c oxidasa)** cede cuatro electrones procedentes del citocromo *c* al O₂ para reducirlo completamente a H₂O a la vez que bombea protones desde la matriz al espacio intermembrana (127). Es el último de los complejos capaces de bombear protones al espacio intermembrana. Este complejo está formado por 13 subunidades, de las cuales, las tres más grandes (llamadas subunidades COX I - III) están codificadas por el propio ADNmt (128). La citocromo oxidasa contiene dos grupos *hemo A* (*hemo a* y *hemo a₃*) y dos *iones cobre* (Cu_A y Cu_B). La subunidad I contiene el grupo *Hemo a* y el centro *Hemo a₃/Cu_B* que fijan el oxígeno. La subunidad II posee el centro Cu_A con dos átomos de cobre y sirve como punto de fijación para el citocromo *c*. Las funciones de estas enzimas son las de: (a) transferir electrones desde el citocromo *c* al oxígeno, acompañado de la captación de protones para formar H₂O; (b) traslocación de 4 protones para generar el gradiente electroquímico entre el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial.

El *citocromo c* cede su electrón al complejo *hemo a/Cu_A* de donde pasa al complejo *hemo a₃/Cu_B*, y, desde éste, al O₂. Tras esto, a través de una serie de pasos intermedios, se originan dos moléculas de H₂O. La reducción del O₂ no está exenta de riesgos, ya que cuando es parcial puede generar sustancias reactivas derivadas del oxígeno (ROS), en especial el anión superóxido (O₂⁻) [O₂ + e⁻ → O₂⁻].

El **complejo V (F₀-F₁ ATP sintetasa)** cataliza la producción de ATP a partir del ADP y del fósforo activo Pi mediante la reacción: ADP + P_i + [H⁺] → ATP + H₂O + [H⁺]. De esta forma, este complejo transforma el gradiente de protones transmembrana en energía química (ATP) utilizable por las células (129 – 131). El mecanismo por el que este complejo da lugar a la síntesis de ATP ha sido elucidado recientemente y consiste en un movimiento rotacional de varias subunidades de la ATP sintetasa que determinan el acoplamiento del flujo de protones con la síntesis de ATP (132). El complejo V está formado por 12-13 polipéptidos, de los que sólo dos están codificados por el ADNmt (ATPasa 6 y ATPasa 8). Está constituido por dos fracciones, la F₀ y la F₁. La primera es hidrofóbica, por lo que se dispone a través de la membrana mitocondrial y actúa como canal que permite el paso de protones desde el espacio intermembrana a la matriz mitocondrial. Es sensible a la oligomicina

(F₀) y está formada por cuatro tipos de cadenas polipeptídicas y por la cadena 8 Kd, de la cual hay 6 copias por cada unidad F. La *unidad F₁* es la porción catalítica del complejo y está formada por 3 subunidades α , 3 subunidades β y las subunidades γ , δ y ϵ . La región F₁ penetra en la matriz y se encuentra conectada a la porción F₀ por una estructura similar a un pequeño tallo.

Contamos con muy pocos estudios que se hayan realizado para conocer cómo se encuentra la CRM en los pacientes con EGHNA. Caldwell et al. hallaron que la actividad de los complejos I y IV era normal en las mitocondrias de las plaquetas de pacientes con EHNA (108). Igualmente, Sanyal et al. (85) tampoco pudieron detectar alteraciones en la CRM del músculo de pacientes con EHNA. Nuestro grupo fue el primero en demostrar que la actividad de la CRM se encuentra muy alterada en los pacientes con EHNA (115). En este caso, la actividad de la CRM fue determinada en las biopsias hepáticas de 43 pacientes con EHNA y 16 controles. El complejo I estaba descendido al $63\pm 20\%$ de la actividad normal; el complejo II, al $58,5\pm 16,7\%$; el complejo III, al $70,6\pm 10,3\%$; el complejo IV, al $62,5\pm 13\%$ y el complejo V, al $42,4\pm 9,1\%$. Aunque la causa de ese defecto no pudo ser determinado en ese estudio, ya que se disponía de una cantidad de material muy limitada, este descenso se correlacionaba de forma negativa con el índice de masa corporal, con las tasas en sangre de TNF α y con el índice de resistencia a la insulina HOMA (115). La relación del TNF α con la EHNA se podía explicar por la capacidad de esta citoquina para alterar la función mitocondrial e interferir con el flujo de electrones por los complejos I y III de la CRM (133, 134) y para aumentar la resistencia a la insulina (135 – 137). Además, las tasas de TNF α -ARN mensajero (ARNm) están elevadas en el hígado de ratones obesos (119), y las células de Kupffer y los hepatocitos, además del tejido adiposo, son fuentes importantes de TNF α (138, 139). Esta citoquina es un potente inductor de NF κ B, el cual se encuentra muy aumentado en los ratones obesos y el gen de la iNOS figura entre los que responden al NF κ B (140).

En un estudio posterior de nuestro grupo, se pretendió profundizar en los mecanismos por los que la actividad de la CRM mitocondrial se encuentra disminuida en la EHNA. Para ello se eligió un modelo animal de EGHNA, en

concreto los ratones *ob/ob*, que por carecer de *leptina* presentan una serie de alteraciones metabólicas similares a las que presentan los pacientes con EGHNA. Son animales que no pueden controlar la ingesta de alimentos lo que les conduce a la obesidad, a la resistencia a la insulina, a la hiperlipidemia, a la hipertrigliceridemia y al hígado graso (141). Se trata de un modelo animal que ha sido empleado en numerosos estudios sobre la patogenia de la EGHNA (142). Esta misma ausencia de leptina determina que estos animales no desarrollen fibrosis.

En este modelo animal quisimos probar la *hipótesis* de que los aumentos de $TNF\alpha$ en el tejido hepático determinan una inducción de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), lo cual daría lugar a la formación de óxido nítrico, primero, y de peroxinitrito y radicales reactivos del peroxinitrito, después (143). El peroxinitrito y sus radicales derivados son capaces de nitrar en tirosina a multitud de proteínas. Por ello, si fueran capaces de nitrar a las proteínas de los complejos de la CRM podrían determinar que estos complejos perdieran su actividad. Estudios de otros grupos demostraron que el óxido nítrico y otras sustancias reactivas derivadas del nitrógeno podían alterar la CRM (144). Por ejemplo, el óxido nítrico inhibe transitoriamente al complejo IV (145), mientras que el peroxinitrito puede disminuir la actividad de varios complejos de la CRM (144, 146 – 148), puede fragmentar el ADN (149) y nitrar en 3-tirosina a multitud de proteínas y, tras ello, modificar su función (150, 151). Por ello, en ese modelo animal, nuestro grupo quiso primero comprobar que la actividad de la CRM está disminuida en esos animales y, tras ello, demostrar que el $TNF\alpha$ y el peroxinitrito están implicados en el descenso de esa actividad y en la patogenia de las lesiones hepáticas que ocurren en esos ratones.

En ese estudio (122), nuestro grupo demostró que la actividad de todos los complejos de la CRM estaba muy disminuida en los ratones *ob/ob*, por lo que parecía un buen modelo para estudiar en profundidad los motivos por los que en esos animales y, eventualmente, también en el hombre, la actividad de esos complejos era deficiente. A favor de la hipótesis de trabajo que nuestro grupo se había planteado, se halló (a) que la expresión de la iNOS se estaba aumentada en el tejido hepático; (b) que las proteínas hepáticas, incluidas las mitocondriales y las de la CRM, se encontraban intensamente nitradas en 3-

tirosina y (c) que el tratamiento con el ácido úrico, un agente capaz de eliminar al peroxinitrito, mejoraba sensiblemente la actividad de todos los complejos o incluso que la normalizaba. En el hígado de los ratones obesos se encontraron también tasas elevadas de $TNF\alpha$ y evidencias de peroxidación lipídica. Estos cambios, explican que el tratamiento de los ratones *ob/ob* con anti- $TNF\alpha$ o con un antioxidante mitocondrial, la manganeso tetrakis ácido 5,10,15,20-benzoico porfirina (MnTBAP), un análogo de la superóxido dismutasa, se siguiera también de una mejoría de la disfunción de la CRM. A favor de que esta disfunción juega un papel decisivo en la patogenia de la EGHNA está el que todos esos tratamientos se seguían de una marcada regresión de las lesiones hepáticas existentes en los ratones *ob/ob* no tratados.

6.- Tratamiento de la EGHNA.

A pesar de que se han realizado numerosos ensayos clínicos para valorar la eficacia de diversas medidas para controlar a la EGHNA, en la actualidad aún *no disponemos de ningún tratamiento que se pueda recomendar* basado en los resultados obtenidos en estudios válidos. Algunos fármacos han mostrado efectos prometedores cuando su utilidad fue analizada en ensayos clínicos piloto preliminares. Sin embargo, escasean los estudios que hayan valorado la eficacia de las medidas terapéuticas mediante estudios rigurosos, controlados y aleatorizados. Además, la lenta evolución de la enfermedad ha impedido que en esos estudios se haya valorado la eficacia de los tratamientos sobre la *morbilidad y mortalidad*. Los criterios de eficacia utilizados son habitualmente su repercusión sobre los cambios bioquímicos y, eventualmente, histológicos. Por otro lado, la comparación de las medidas terapéuticas concretas con los *placebos* tiene también algunos problemas, ya que pueden producirse mejorías transitorias o persistentes relacionadas con la evolución natural de la enfermedad o como resultados de medidas de estilo de vida tomadas individualmente por los pacientes.

Basados en la hipótesis patogénica formulada por nuestro grupo, el tratamiento fisiopatológico debería ir dirigido a combatir: (6.1) la resistencia a la insulina; (6.2) la obesidad, principalmente la abdominal; (6.3) el estrés oxidativo y (6.4) el estrés nitrogenado.

6.1.- Tratamientos sensibilizantes frente a la insulina:

Al representar la resistencia a la insulina un factor esencial en la patogenia de la EGHNA, las medidas que aumenten la sensibilidad de las células a la insulina deben contribuir a mejorar la enfermedad hepática, ya que con ello se conseguirá que disminuya la lipólisis, que lleguen menos ácidos grasos al hígado, que aumente la oxidación de los ácidos grasos y que disminuya la formación de triglicéridos. Además de la dieta y el ejercicio físico, que aumentan esa sensibilidad, se han empleado con ese fin las biguanidas (metformina) y las tiazolidinedionas (pioglitazona, troglitazona y rosiglitazona).

6.1.1.- Biguanidas. Son fármacos que mejoran la sensibilidad a la insulina, por lo que disminuyen la hiperinsulinemia, la gluconeogénesis hepática, la liberación hepática de glucosa y reducen la formación de triglicéridos, pero potencian la entrada de glucosa en las células y la β -oxidación de los ácidos grasos (152). Su administración a ratones obesos, *ob/ob*, disminuye la hepatomegalia, el grado de esteatosis y las tasas en sangre de $\text{TNF}\alpha$ (153). En varios estudios de corta duración se pudo observar que con 1 a 1,5 g/día de metformina descendían las transaminasas séricas (154) y en algunos pacientes también la esteatosis y la actividad necroinflamatoria (155 – 158). Otro estudio piloto mostró que la mejoría bioquímica se acompañó de una mejoría en el grado de esteatosis, valorada ésta por espectroscopia de resonancia magnética (159). Un meta-análisis realizado por la Cochrane concluyó que la metformina normaliza las transaminasas séricas y mejora la esteatosis, pero no modifica significativamente otras lesiones histológicas (160). El NIH ha iniciado un estudio controlado para conocer definitivamente la utilidad de estos fármacos (Estudio TONIC) comparando los efectos de su uso con el logrado con vitamina E o placebo. Mientras tanto, algunos autores recomiendan su uso debido a que son bien tolerados y a que pueden retrasar la aparición de diabetes (161). La acidosis láctica, que es un efecto secundario de la metformina, hasta el momento no ha sido descrita en estos pacientes, si bien la experiencia que se tiene sobre su uso en enfermos con cirrosis hepática es muy limitada.

6.1.2.- Tiazolidinedionas. Estos fármacos son *agonistas* de la PPAR γ , un receptor nuclear presente en diversos tejidos, entre otros en el tejido adiposo, músculo estriado e hígado, en los que aumentan la sensibilidad a la insulina. El PPAR γ activa una serie de genes que también lo son por la insulina y de esta manera facilitan la acción de ésta. En el *tejido adiposo* favorecen la diferenciación celular e inhiben la lipólisis y la liberación de ácidos grasos libres. En el *músculo estriado* estimulan el consumo de glucosa y la actividad de la glucógeno sintetasa y en el *hígado* disminuyen la gluconeogénesis, inhiben la síntesis de ácidos grasos y estimulan su β -oxidación (162). Además, se comportan también como antiinflamatorios y una de ellas, la pioglitazona, ha sido capaz de evitar la activación de las células estrelladas del hígado y, por tanto, es capaz de detener la fibrogénesis hepática (163). La primera tiazolidinediona comercializada, la **troglitazona**, logró mejorar la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia y se logró la mejoría bioquímica e histológica de la esteatohepatitis (164); sin embargo, tuvo que ser retirada del mercado por provocar en algunos casos hepatotoxicidad idiosincrásica muy grave (165).

Otras tiazolidinedionas que parecen ser bien toleradas y rara vez hepatotóxicas son la **rosiglitazona** o la **pioglitazona**. Son fármacos que mejoran la sensibilidad a la insulina pero que provocan un aumento considerable del peso y de la grasa corporal total, ya que desplazan la grasa desde el hígado y músculo al tejido adiposo (166). Su eficacia en el tratamiento de la EHNA ha sido evaluada en siete estudios, cuatro de ellos controlados y aleatorizados. En general se puede concluir que con estos fármacos se obtiene una mejoría de la analítica hepática y del grado de esteatosis, pero que sus efectos sobre otros cambios histológicos hepáticos no son tan seguros. No obstante, en los estudios realizados con la pioglitazona se observó una mejoría de la inflamación, de la degeneración hidrópica y de la fibrosis (167 – 172). Debido a que la suspensión del tratamiento se sigue automáticamente de la desaparición de los beneficios obtenidos, sería necesario mantener estos fármacos a largo plazo. Sin embargo, la seguridad de estos no está garantizada, en especial de la rosiglitazona, ya que con ellos se ha observado un aumento del riesgo de infarto de miocardio (173). Son aún muchas las preguntas abiertas en relación con estos fármacos, por ello, el NIH ha iniciado un estudio controlado, multicéntrico que pretende determinar si

realmente estos fármacos benefician a los enfermos con EHNA (Estudio PIVENS).

6.2.- Combatir la obesidad visceral.

Con este fin es fundamental modificar el estilo de vida ya que con ello se puede conseguir: (a) disminuir la masa de tejido adiposo; (b) aumentar la sensibilidad a la insulina y (c) aumentar la masa muscular y el consumo de glucosa (174). Pérdidas de peso moderadas, así como el ejercicio físico, se asocian con un aumento de la sensibilidad a la insulina. La pérdida de peso se puede conseguir de muchas formas, principalmente *reduciendo la ingesta calórica, aumentando el ejercicio físico* y el empleo de algunos *agentes farmacológicos*. Además, los pacientes que presentan obesidad mórbida son subsidiarios de *cirugía bariática*.

Actualmente se recomienda una ***dieta pobre en calorías y en grasas***, con la que se puede lograr que descendan las tasas de transaminasas séricas, si bien los efectos de estas medidas sobre las lesiones de EHNA no han sido suficientemente evaluados. Parece recomendable comenzar el tratamiento con *consejos nutricionales* y un programa de *ejercicios físicos*. A pesar de la lógica de estas medidas, en la actualidad contamos con muy pocos estudios que hayan confirmado sus efectos beneficiosos, ya que en la mayoría de los casos se trataba de estudios no aleatorizados, que incluyeron a un número muy reducido de pacientes y eran de corta duración.

Cuando la pérdida de peso es alta y rápida, existe el riesgo de que las lesiones empeoren, en especial las necroinflamatorias (175, 176). Se ha comprobado que las pérdidas de más de 1,5 Kg de peso por semana pueden producir lesiones de EGHNA en personas que previamente no las tenían e, incluso, pueden ser causa de fracaso hepático (177). Cuando con la dieta y el ejercicio físico se logran descensos moderados de peso (7 % al 10%), parece que los resultados son muy diferentes, ya que mejora la resistencia a la insulina, así como la analítica y la histología hepática (178 – 180). En un estudio realizado en niños italianos concluyeron que lo más apropiado era conseguir una pérdida de peso de 500 g a la semana (181). Por todo ello, en la actualidad se tiende a *reducir la ingesta calórica a 25 a 30 Kcal/Kg/día* con el

fin de conseguir una pérdida de peso moderada, del 5% al 10% a lo largo de seis meses.

Una de las principales limitaciones que tiene el tratamiento de la obesidad mediante el cambio de régimen de vida es el cumplimiento de las medidas recomendadas. Por ello, en la mayoría de las ocasiones es necesario recurrir a medidas farmacológicas que ayuden a controlar el apetito y a reducir el peso. Entre los fármacos que se han empleado en la obesidad figura el **Orlistat**, un inhibidor reversible de las lipasas gástricas y pancreáticas, que disminuye la absorción intestinal de grasas. Con este fármaco, empleado en un pequeño número de pacientes se logró que perdieran peso y que mejorara la función hepática y la fibrosis a costa de molestias abdominales, diarrea y esteatorrea. Recientemente, en un estudio realizado en 50 pacientes obesos con EHNA tratados con *Orlistat* se pudo comprobar que si el descenso de peso era del 5% a lo largo de nueve meses mejoraba la sensibilidad a la insulina y la esteatosis hepática, pero si el descenso de peso superaba el 9% también mejoraban los cambios histológicos de EHNA (182, 183). También con el fin de reducir el apetito se ha comenzado a considerar a los antagonistas de los receptores cannabinoides en el tratamiento de la EGHNA. Los endocannabinoides aumentan el apetito actuando a nivel de receptores CB1 y CB2 del sistema nervioso central. El bloqueo con antagonistas de estos receptores se sigue de una disminución del apetito. El **rimonabant** se une con gran afinidad al CB1 y antagoniza los efectos de los cannabinoides, de forma que reduce la sensación de hambre y la lipogénesis, aumenta la secreción de adiponectina y la maduración de los adipocitos y con él se consiguen perder 4-5 Kg de peso, reducir el diámetro de la cintura (184, 185) y aumentar el colesterol HDL. Sin embargo, provoca con frecuencia trastornos en el estado de ánimo (186). Su empleo está aprobado en Europa, pero aún se carece de información sobre su eficacia en la EGHNA.

En los enfermos con *obesidad mórbida*, los obesos que padecen otras enfermedades que dificultan el tratamiento (hipertensión, diabetes tipo 2, apnea del sueño o insuficiencia cardiaca) o cuando fracasan las restantes medidas para perder peso puede ser necesario recurrir a la **cirugía bariática** (187). Estas intervenciones quirúrgicas incluyen el *bypass gástrico con Y de Roux*, el *bypass bilio-intestinal* y las *bandas gástricas ajustables*. En estos

enfermos, esta cirugía les hace perder peso (188 – 192), disminuye el riesgo cardiovascular (193 – 195) y, por ello, aumenta la supervivencia si los pacientes son capaces de mantener su peso durante más de diez años (196, 197). También las lesiones hepáticas mejoran a corto plazo con estos tratamientos quirúrgicos (198 – 203). En ese tiempo se puede observar un descenso de las citoquinas responsables de la inflamación (202, 204) y una mejoría de la inflamación y de la fibrosis (200). No se sabía muy bien si esa mejoría se mantendría a largo plazo y si la fibrosis hepática podría progresar con el tiempo. En un estudio reciente, en el que los autores hicieron biopsias sucesivas a lo largo de cinco años pudieron demostrar que la cirugía bariátrica mejoraba la esteatosis y la degeneración hidrópica de los hepatocitos y que estos cambios se correlacionaban estrechamente con la evolución de la resistencia a la insulina. Por el contrario, la fibrosis hepática empeoraba en algunos pacientes, precisamente aquellos que eran más resistentes a la insulina (205). Finalmente, un meta-análisis que llegó a incluir hasta 766 biopsias antes y después de la cirugía mostró que todos los cambios relacionados con la EGHNA mejoraron, incluida la EHNA y la fibrosis (206).

6.3.- Antioxidantes

Basados en el papel que se atribuye al *estrés oxidativo* en la patogenia de la EHNA y en su progresión, se pudiera esperar que los agentes antioxidantes pudieran ser beneficiosos en el tratamiento de la EGHNA y en su evolución a EHNA. Entre los fármacos antioxidantes que se han empleado en esta enfermedad figura la vitamina E, la betaína y la N-acetil-cisteína. La **vitamina E**, un antioxidante barato pero potente, se ha empleado en el tratamiento de pequeños grupos de pacientes, pero los resultados no han sido convincentes. En algunos de ellos se produjo un descenso de las transaminasas, pero las lesiones histológicas, cuando se hizo biopsia hepática, permanecieron iguales (207, 208). En la actualidad no se recomienda su empleo fuera de los estudios controlados, no sólo por su dudosa eficacia, sino por existir la sospecha de que pudiera aumentar el riesgo cardíaco (209). La **betaína**, un donante de metilos que interviene en la metilación de la homocisteína, que aumenta las concentraciones de S-adenosil-metionina y disminuye el daño oxidativo celular, mostró efectos prometedores en algunos

estudios iniciales (210); sin embargo, un estudio reciente realizado en 35 pacientes mostró que disminuía el grado de esteatosis, pero no la inflamación, la fibrosis, las citoquinas proinflamatorias ni las tasas de insulina o de glucosa (211). La **N-acetil cisteína** aumenta los niveles de glutatión intracelular y neutraliza las ROS, por lo que se comporta como un potente antioxidante. En diversos modelos animales de EGHNA, este agente ha mostrado que puede aportar cierta mejoría en las lesiones histológicas hepáticas, incluida la degeneración hidrópica de los hepatocitos (212, 213), pero disponemos de pocos datos sobre sus efectos en la EGHNA humana. En un estudio realizado combinando este antioxidante con la metformina parece que mejora la histología hepática, pero fueron muy pocos los enfermos tratados (214) por lo que carecemos de información fiable sobre su eficacia.

6.4. Agentes anti-estrés nitrogenado.

La hipótesis patogénica propuesta por nuestro grupo atribuye al peroxinitrito un papel importante en la patogenia de las alteraciones funcionales mitocondriales que se observan en la EGHNA, en su patogenia y en su progresión (122). Según ello, las medidas terapéuticas que sean capaces de disminuir el estrés provocado por las sustancias reactivas derivadas del nitrógeno (RNS), entre ellas, el peroxinitrito, deben corregir esas alteraciones funcionales, prevenir el desarrollo de EGHNA y evitar su empeoramiento. El **ácido úrico**, un agente capaz de unirse al peroxinitrito y anular sus efectos, ha demostrado que es capaz, al menos en el animal de experimentación, de evitar el desarrollo de lesiones neurológicas (151, 215 – 218) y hepáticas atribuidas al peroxinitrito (122). Es posible que la hiperuricemia que acompaña al síndrome metabólico tenga en el hombre un papel defensivo frente al estrés nitrogenado (219,220). A pesar de ello, el ácido úrico no parece ser un agente cuyo uso pueda aconsejarse en el hombre.

De entre los agentes con actividad antiperoxinitrito de uso humano destaca la **melatonina**. En los Estados Unidos, la melatonina está disponible libremente en el mercado como suplemento dietético desde 1993; sin embargo, en muchos otros países no está comercializada. Se trata de un

derivado de la serotonina producido por la glándula pineal de los vertebrados (221) y en menor cuantía, por la retina, el tracto gastrointestinal (222) y la médula ósea (223). Inicialmente se pensó que intervenía sólo en la regulación del sueño y de los ciclos circadianos (224), pero posteriormente se vio que también influye sobre el sistema inmunológico (225) y que es oncostático (226,227), antiinflamatorio (228) y un potente antioxidante, capaz de eliminar tanto a las ROS como a las RNS (229 – 232). En efecto, la administración de dosis farmacológicas de melatonina disminuye la formación de radicales libres, permite la recuperación de las enzimas antioxidantes y disminuye el daño oxidativo hepático (233). La potencia antioxidante de la melatonina es muy superior a la que tienen la vitamina E o C (234 – 239) y es 5 a 15 veces mayor que la del glutatión. Esta gran potencia se puede explicar porque no sólo actúa sobre los ROS (H_2O_2 , 1O_2 , $\cdot OH$) sino sobretodo sobre los RNS y sus derivados (240 – 244), en especial sobre el potente peroxinitrito. Tras reaccionar con éste, se forma la 1-nitromelatonina (245). Muchos de los efectos beneficiosos de la melatonina en diferentes condiciones patológicas en las que se supone que el estrés oxidativo juega un papel importante (246, 247) muy probablemente se deben a su capacidad para neutralizar al peroxinitrito.

Igualmente, la melatonina protege al ADN nuclear o mitocondrial de su degradación por su exposición a radiaciones ionizantes o a carcinógenos (229, 248). Así lo indica el que la preexposición a la melatonina disminuya la formación de 8-OHdG, un marcador de la degradación oxidativa del ADN. Además, al evitar la lesión de este último, también previene el gran consumo energético que supone la reparación del ADN por las PARP [*Poly-(ADP-ribose) polymerase*] (249 – 251) y el riesgo de muerte por necrosis.

Además, la melatonina potencia los mecanismos defensivos celulares; en concreto, aumenta la síntesis de glutatión (242, 252 – 254) y la actividad de las enzimas antioxidantes y reduce la de las oxidantes (255, 256). En efecto, la melatonina aumenta el ARN mensajero de la superóxido dismutasa y de la gamma-glutamil-cisteina sintetasa (234, 253), con lo que aumenta la formación de glutatión y de glutatión peroxidasa (253, 254).

Los efectos de la melatonina aventajan en muchos aspectos a los de otros antioxidantes. Ya hemos comentado que sus efectos no se limitan a contrarrestar las consecuencias de las ROS, sino que se extienden sobre los

efectos de las RNS. Este potencial frente al estrés nitrogenado no es compartido por la mayoría de los restantes antioxidantes. Es el único agente capaz de eliminar todos los componentes del llamado “*triángulo diabólico*” (anión superóxido, NO, ONOO⁻). Puede inhibir a la iNOS (257 – 260) y reducir la formación de NO y de peroxinitrito. Además, no existen barreras anatómicas que impidan su difusión (261), por lo que prácticamente todos los órganos, tejidos y células quedan bajo la protección de esta hormona (262). Otros antioxidantes frecuentemente encuentran barreras que les son infranqueables. Este es el caso del α -tocoferol que no puede superar la barrera placentaria y hematoencefálica. La capacidad de penetración de la melatonina no se limita a los órganos o tejidos sino que también se refiere a los diferentes compartimientos celulares, incluido el núcleo y las mitocondrias. Por esta razón, la melatonina protege a las membranas, a las proteínas celulares y al ADN genómico y mitocondrial (248). Esta gran difusibilidad se debe a su carácter anfifílico, es decir, a su capacidad para disolverse tanto en los lípidos como en el agua. El α -tocoferol, por ejemplo, es un buen antioxidante liposoluble, por lo que sus efectos protectores se limitan a las membranas celulares. La N-acetil-cisteína y el ascorbato son solubles en el agua y, en consecuencia, no pueden proteger a las membranas celulares y, en muchas ocasiones, no pueden atravesarlas ni penetrar en las células.

La mayoría de los antioxidantes, entre ellos las vitamina E y C, cuando se enfrentan a un radical libre o a un ROS, captan el electrón sobrante y neutralizan así su efecto oxidante. Consecuencia de esta acción es que el propio antioxidante, al ser ahora el portador de ese electrón, se transforma en oxidante y puede, en consecuencia, oxidar a otras moléculas (263). La melatonina, por el contrario nunca se comporta como oxidante, ya que cada vez que se encuentra con una molécula de peroxinitrito se sacrifica para neutralizarla y desaparece con él. Además, la melatonina no consume glutatión, por el contrario, aumenta su expresión genética a nivel transcripcional y por ello preserva o incluso aumenta el glutatión celular. (264).

La melatonina se ha empleado, en algunos casos con éxito, en el tratamiento de algunas enfermedades crónicas, por ejemplo, en el de la hipertensión arterial en ancianos (265), la infertilidad en mujeres jóvenes (266), la artritis reumatoide (267), el insomnio (268, 269), la depresión (27), las

Introducción

alteraciones del tránsito intestinal (271) y en la prevención de la toxicidad por quimioterapia (272), entre otros. Sus efectos secundarios, tanto en animales como en el hombre, son mínimos (273 – 275) y su precio es bastante asequible. Se carece de experiencia sobre sus efectos en la EGHNA, no sólo humana sino también experimental.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

En estudios previos, nuestro grupo aportó pruebas de que la *actividad de la cadena respiratoria mitocondrial* (CRM) está muy alterada en los pacientes con EGHNA y que esos cambios se asociaban con el índice de masa corporal, las tasas en sangre de $\text{TNF}\alpha$ y la resistencia a la insulina. También este grupo demostró en ratones obesos que en la EGHNA, además de *estrés oxidativo*, hay *estrés nitrogenado* y que el *peroxinitrito* parece jugar un papel importante en la patogenia de estas alteraciones y de las lesiones hepáticas. El $\text{TNF}\alpha$ puede provocar estrés oxidativo y nitrogenado, ya que interfiere con la actividad de la CRM, dando lugar a la formación de *anión superóxido*, e induce la expresión y la actividad de la *óxido-nítrico sintetasa inducible* (iNOS), lo que se traduce en aumento de óxido nítrico. Éste, junto con el anión superóxido, forma *peroxinitrito* responsable del estrés nitrogenado y puede ocasionar una mayor disfunción de la CRM. La administración de anti- $\text{TNF}\alpha$, de ácido úrico o de MnTBAP, un antioxidante mitocondrial análogo de la superóxido sintetasa, evita que en los ratones obesos se altere la función mitocondrial y que los animales desarrollen lesiones de EGHNA. Por ello, se formuló la hipótesis de que la obesidad visceral pudiera favorecer la liberación a la sangre portal de ácidos grasos libres y de $\text{TNF}\alpha$, los cuales provocarían resistencia a la insulina, esteatosis hepática, inducción de la iNOS, disfunción de la CRM, hiperproducción de anión superóxido y óxido nítrico y formación de peroxinitrito. Éste alteraría aún más la actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial y cerraría un círculo vicioso que aumentaría la formación de anión superóxido y entorpecería el consumo de ácidos grasos y la formación de ATP. Según esta hipótesis, el *tratamiento* de la EGHNA debería ir dirigido no sólo a controlar el estrés oxidativo sino también a eliminar el peroxinitrito responsable de la disfunción mitocondrial y de las lesiones hepáticas. Entre los agentes capaces de neutralizar al peroxinitrito, además del ácido úrico, figura la *melatonina*. Por ello, el tratamiento de los ratones obesos con melatonina debe *mejorar la disfunción mitocondrial* y *las lesiones hepáticas de la EGHNA*.

OBJETIVOS

Los objetivos de este estudio fueron:

- (1)** Comprobar que los ratones obesos, *ob/ob*, presentan lesiones hepáticas de EGHNA y que la actividad de la Cadena Respiratoria Mitocondrial (CRM) está alterada.
- (2)** Determinar las causas por las que la actividad de la CRM está alterada en este modelo murino de EGHNA.
- (3)** Conocer el papel que juega el estrés oxidativo y el estrés nitrogenado en la patogenia de esta alteración.
- (4)** Estudiar los efectos del peroxinitrito "*in vitro*" sobre la CRM.
- (5)** Probar que la melatonina protege "*in vitro*" a la CRM de los efectos del peroxinitrito y
- (6)** Demostrar que la melatonina evita que los ratones *ob/ob* desarrollen lesiones de EGHNA y las alteraciones de la CRM que existen en esos ratones obesos no tratados.

MATERIAL Y MÉTODOS.

1.- Grupos experimentales de ratones.

En todos los estudios realizados en animales hemos seguido las normas establecidas por la “*Guía Española para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio*”. En estos estudios utilizamos ratones macho de seis semanas C57BL/6J y ratones macho obesos de la misma edad C57BL/6J Lep^(-/-) (*ob/ob*) obtenidos de Charles River Laboratory (Charles River Laboratorios España, SA. Santa Perpetua de la Mogada. Barcelona). Estos animales fueron mantenidos durante 12 semanas en un ambiente estable a 23° C (3 ratones por jaula), con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas y libre acceso al agua y al pienso estándar para ratones.

Cincuenta y cuatro ratones fueron distribuidos en cinco grupos:

El **grupo I** (control, delgados) estaba formado por 10 ratones C57BL/6J.

El **grupo II** (obesos, *ob/ob*) incluía a 10 ratones C57BL/6J Lep^(-/-) tratados con 500 µL de 0,8% de solución salina administrada diariamente por vía peritoneal.

El **grupo III** lo componían 6 ratones *ob/ob* tratados con 10 mg/Kg/día de manganeso [III] tetrakis (ácido 5,10,15,20 benzoico) porfirina (MnTBAP) (Calbiochem. San Diego. CA), un antioxidante mitocondrial análogo a la superóxido dismutasa.

El **grupo IV** (ácido úrico) estaba formado por otros 6 ratones tratados con 20 mg/día de ácido úrico (Sigma-Aldrich Química SA. Tres Cantos. Spain).

El **grupo V** (melatonina) estaba también formado por 6 ratones *ob/ob* tratados 10 mg/Kg/día de melatonina (Sigma-Aldrich Química SA. Tres Cantos. Spain).

El ácido úrico fue administrado en forma de suspensión de 20 mg en 200 µL de suero fisiológico. La melatonina se preparó disolviendo 50 mg de melatonina en 500 µL de etanol y esta solución en 50 mL de suero fisiológico (1 mg/mL). Tanto esta solución como la de MnTBAP fueron administradas de forma intraperitoneal (i.p.) durante 12 semanas.

Al finalizar el tratamiento, los animales fueron pesados, anestesiados y se extrajo sangre por punción del ventrículo derecho. El hígado fue perfundido con

suero fisiológico a través del ventrículo izquierdo. Tras ello, el hígado fue rápidamente extraído, pesado, colocado sobre hielo, fragmentado y recogido en partes separadas para los diferentes análisis: (a) en fresco para medir la respiración mitocondrial (aislamiento inmediato de mitocondrias); (b) en formaldehído al 10% para ser procesado para estudio histológico. Se realizaron tinciones en hematoxilina-eosina y tricómico de Masson. También, estos cortes histológicos fueron empleados para estudios de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos frente a 3-nitrotirosina (3NT) (*Upstate Cell Signaling Solutions. Lake Placid, NY, USA*) siguiendo las especificaciones del fabricante; (c) en glutaraldehído para microscopía electrónica; (d) en nitrógeno líquido para medir la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial, triglicéridos, lipoperóxidos, glutatión citosólico y mitocondrial y estudios proteómicos y (e) recogidos en RNAlater para estudios de PCR cuantitativa.

2.- Concentración de triglicéridos en el hígado.

Fue determinada utilizando un “kit” específico para esta medición y siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich Química SA. Tres Cantos. Spain). Las tasas séricas de transaminasas se determinaron mediante autoanalizador (Hitachi 747 Roche Diagnostic Corp. Indianapolis. IN).

3.- Aislamiento de las proteínas mitocondriales del tejido hepático.

Las proteínas aisladas de tejido hepático fresco (50-70 mg) fueron homogenizadas en 500 μ L de buffer de sucrosa (440 mM sucrosa, 20 mM MOPS, 1 mM EDTA, pH 7,2) y 10 μ L de 0,2 mM de PMSF (*phenylmethyl-sulfonyl fluoride*) preparado justo antes de empezar la homogenización a partir de 0.5 M DMSO (*dimethyl sulfóxido*). El homogeneizado fue centrifugado, a 10.700 rpm durante 15 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y al sedimento se le añadieron 500 μ l de 500 mM NaCl, 10 mM Na⁺/MOPS, pH 7,2. Tras ello, homogeneizado fue de nuevo centrifugado a 15.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Finalizada esta centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 150 μ L de un buffer que contenía 1 M de ácido aminocaproico/50 mM de Bis-Tris-ClH,

pH 7,0 y 20 μL de 10% del detergente Brij 35. La suspensión se centrifugó a 17.000 rpm durante 15 minutos. Al sedimento se le añadieron 80-120 μL de 1M ácido aminocaproico/50 mM Bis-Tris HCl, pH 7,0, se homogenizó con una pequeña espátula y se añadieron 40-60 μL de 10% ácido dodecilmaltósido (cuando fue necesario por haber mucho sedimento, se aumentó la cuantía de ác. aminocaproico y de ác. dodecilsulfato, manteniendo las proporciones 2:1]. Tras ello, se centrifugó de nuevo a 17.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante. En este extracto se midió la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (276).

4.- Determinación de la peroxidación de los lípidos y el contenido mitocondrial de glutatión.

La peroxidación de los lípidos fue determinada midiendo la concentración de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) en 100 μL de homogeneizado de tejido hepático siguiendo el procedimiento descrito por Ohkawa et al. (277). El glutatión mitocondrial se midió siguiendo el procedimiento descrito por Tietze y modificado por Eady et al. (278).

5.- Determinación semicuantitativa de la actividad del complejo I “in gel” de acrilamida.

Para determinar semicuantitativamente la actividad en gel del complejo I, seguimos la técnica descrita por Schägger (279), modificada por Nijtmans y col. (280) y conocida por el nombre de Blue Native electroforesis. Con ese fin separamos los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial mediante electroforesis unidimensional en un gel de poliacrilamida con el colorante Serva Blue G (Serva Biochemicals, Heidelberg, Alemania) o Coomassie Blue G250 (Blue Native-polyacrilamide gel electrophoresis, BN-PAGE). Este colorante es crucial, ya que impide la disociación de los componentes de los complejos y permite que la actividad de los mismos se mantenga íntegra. Debido a que estos complejos son de muy alto peso molecular, el gel empleado para su separación tenía un gradiente de 3-12% de acrilamida (NativePAGE 3-12% Bis-Tris Gel. Invitrogen. Carlsbad. CA).

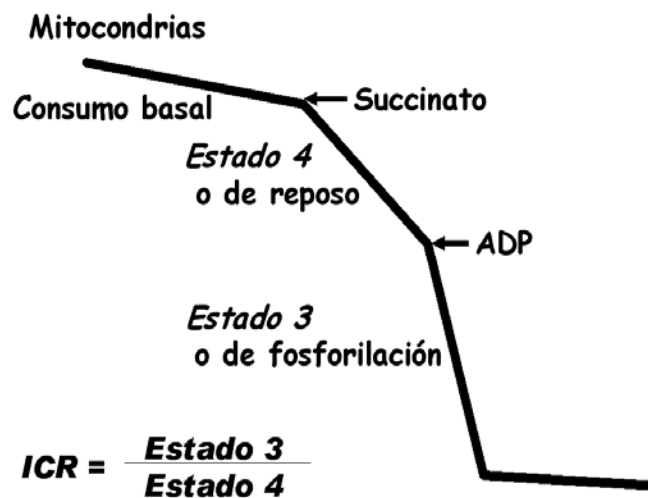
6.- Determinación cuantitativa de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial.

La actividad de la citrato sintetasa y de los complejos de la CRM la medimos en 10-30 μ l de homogenizado hepático empleando un DU-650 espectrofotómetro (Beckman Instruments. Palo Alto. CA) según lo descrito por Martínez et al. (281). La actividad del complejo I (reductasa de la NADH coenzima Q1 sensible a la rotenona) la determinamos por la oxidación del NADH a 340 nm en 20 mM de fosfato potásico, pH 8,0: 200 μ M NADH, 1 mM NaN_3 , 0.1% BSA-EDTA y 100 μ M ubiquinona-1 en ausencia y en presencia de 5 μ M de rotenona. De esta manera se puede calcular la tasa de oxidación del NADH sensible a la rotenona. La actividad de la succinato deshidrogenasa (componente del complejo II) la medimos por la reducción del 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) a 600 nm en 50 mM Tris-fosfato potásico, pH 7,0; 1,5 mM KCN; 100 μ M DCPIP y 32 mM de succinato. El complejo III (citocromo c reductasa) lo determinamos a 550 nm por la reducción del citocromo c en 50 mM de fosfato potásico, pH 7,5; 2 mM NaN_3 , 0,1% BSA-EDTA, 50 μ M citocromo c, 50 μ M ubiquinol-2 en ausencia de antimicina A y, después en presencia de 0,01 mg/mL de antimicina A, de forma que podemos calcular la tasa de reducción del citocromo c que es sensible a la antimicina A. El complejo IV (citocromo c oxidasa) lo medimos a 550 nm por la oxidación del citocromo c reducido en 10 nM de fosfato potásico, pH 7,0 y 80 μ M citocromo reducido (recién preparado por la adición de ditionito sódico). Por último, la actividad del complejo V la medimos a 340 nm por el ATP que desaparece en presencia de 50 mM Hepes-Mg, pH 8,0; 0,2 mM NADH, 2,5 mM fosfoenolpiruvato, 5 μ L piruvato kinasa (10 mg/ml), 10 μ L LDH (5 mg/ml), 10 μ L antimicina (0.2 mg/ml); 2,5 mM ATP, pH 7,0 y 10 μ L oligomicina (0,2 mg/mL). La citrato sintetasa la medimos a 420 nm en 75 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 μ M 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico), 350 μ g/mL acetil-CoA, 0,5 mM oxalacetato y 0,1% Triton X-100. Las actividades fueron expresadas en nmol de sustratos utilizados por minuto. Para corregir el volumen de mitocondrias utilizado en cada medición, normalizamos la actividad obtenida por la actividad de la citrato sintetasa. Los complejos I, II, III, V y la citrato sintetasa los medimos a una temperatura de

incubación de 30°C y el complejo IV a 38°C. Todas estas actividades las medimos por triplicado.

7.- Medición del consumo mitocondrial de oxígeno.

La respiración mitocondrial la determinamos por polarografía a 37°C con un *electrodo de oxígeno tipo Clark* conectado a un ordenador con el software apropiado (Oxygraph, Hansatech Instruments Ltd. Norfolk. UK) según lo descrito por Radi et al. (146). Para ello preparamos primero el *buffer de respiración* que consta de: 145 mM KCl; 3 mM MgCl₂; 30 mM Hepes; 0,1 mM EGTA; 5 mM KH₂PO₄ y 0,1% albúmina sin ácidos grasos, a pH 7,4 y 37°C. En estas condiciones, el electrodo se encuentra estable y su lectura indica el oxígeno diluido en el medio.



La medición se inicia al colocar en la cámara 0,5 mL de una suspensión de mitocondrias equivalente a 0,25 mg/mL de proteínas mitocondriales (125 µg). En ese momento, la línea que indica la cuantía de oxígeno en la cámara comienza a descender. La pendiente de esta caída indica el **consumo basal de oxígeno** por las mitocondrias. Tras 1 a 2 minutos, se añade a la suspensión mitocondrial 5 mM de succinato como sustrato. Tras ello, se observa que la pendiente de la gráfica aumenta, lo que indica que los niveles de oxígeno en la cámara disminuyen por ser consumido por las mitocondrias. La medición obtenida en

estas condiciones corresponde al consumo mitocondrial de oxígeno en **estado 4** o de reposo. Pasados unos minutos, se añade a la mezcla 500 μM de ADP, lo que provoca un nuevo descenso de los niveles de oxígeno al entrar las mitocondrias en el **estado 3** o de fosforilación. En esta fase, se sintetiza ATP. Se finaliza la medición con la adición de oligomicina que frena la respiración mitocondrial, como se refleja en la gráfica, cuyo curso se horizontaliza. El comportamiento de las mitocondrias en el estado 4 y estado 3 informa sobre el estado de las mitocondrias tras su aislamiento. Un estado 4 bajo y un estado 3 alto indica que las mitocondrias se encuentran en buen estado. El **índice de control respiratorio (ICR)** se calcula dividiendo el consumo de oxígeno en estado 3 entre el consumo de oxígeno en el estado 4.

Tras la adición sucesiva de los diferentes sustratos se obtiene una gráfica similar a la siguiente:

8.- Valoración del grado de ensamblaje de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.

Las proteínas mitocondriales fueron aisladas por electroforesis unidimensional en un gel de poliacrilamida (BN-PAGE) de forma similar a como fueron separadas para realizar el análisis de la actividad del complejo I en gel de acrilamida (280). Con este fin, empleamos un gel de gradiente de 3-12% de acrilamida (NativePAGE 3-12% Bis-Tris Gel. Invitrogen. Carlsbad. CA). Una vez concluida la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de difloruro de polivinilo (poros de 0,45 μm) (membrana de transferencia Immobilon-P. Millipore Co. Bedford. MA) según el método descrito por Triepels (282). Las proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial fueron identificadas mediante "Western Blot" exponiendo la membrana con las proteínas transferidas durante dos horas a 10 μL de anticuerpos frente a la subunidad 39 (NDUFA9) del complejo I, la subunidad 70 del complejo II, la subunidad Core 2 del complejo III y la subunidad COX1 del complejo IV disueltos en buffer bloqueante. Tras el lavado de las membranas con PBS-Tween 0,05%, éstas fueron incubadas durante 1 hora con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa en solución 1:5000 (Molecular Probes. Prat de Llobregat, Barcelona). El material inmunoreactivo fue visualizado por quimioluminiscencia (ECL, Western Blotting

Detection. GE Healthcare. Madrid) siguiendo las instrucciones del fabricante. La membrana, finalmente, fue expuesta a Hyperfilm MP (Amersham, GE Healthcare. Madrid). Por último, la intensidad de las señales obtenidas fue cuantificada mediante el programa de análisis de imagen IMAGEJ (283).

9.- Electroforesis de segunda dimensión para evaluar las subunidades del complejo I.

Para realizar esta electroforesis de segunda dimensión, se cortó la banda que contenía los complejos mitocondriales en el gel de una dimensión y se colocó sobre una placa de cristal (280) rotándola 90°, de forma que la zona de menor peso molecular quedara hacia la derecha. Esta banda de gel se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución disociante que contenía *1% SDS y 1% 2-mercapto-etanol*. Durante esta incubación, todas las subunidades que forman los complejos mitocondriales se separan unas de otras. Tras eliminar la solución disociante, se colocó una segunda placa de cristal, de forma que la banda del gel quedara en la parte superior, entre los dos cristales. Tras ello se procedía al sellado de los bordes laterales e inferior con agarosa caliente. Para asegurarnos de que el sellado de los bordes era correcto, añadíamos agua entre ambos cristales –conteniendo la banda de acrilamida cortada–. Cuando observábamos que había fugas de agua, seguíamos añadiendo agarosa por los bordes hasta que el cierre era hermético y seguro. El espacio que quedaba entre ambos cristales y por debajo de la banda de gel lo rellenábamos con el gel de acrilamida. Éste lo preparamos con la mezcla de *3,75 mL 40% acrilamida, 4,48 mL Buffer II/SDS [90,8 g TRIS Base; 7,5 mL 10% SDS; 250 mL agua; pH 8,45], 1,57 mL glicerol y 4,68 mL agua*. Para iniciar la polimerización añadimos *93,75 µL 10% APS y 7,5 µL TEMED*. Esta combinación de acrilamida líquida la vertíamos entre ambos cristales procurando que el nivel superior quedara por debajo de la banda de la primera dimensión cortada y colocada entre ambos cristales. Procurábamos que no se formaran burbujas que pudieran interferir posteriormente el desarrollo de la electroforesis. Para que el nivel superior de este gel quedara horizontal, añadíamos etanol y esperábamos a que polimerizara la acrilamida. De forma simultánea, en paralelo, en las mismas condiciones, preparábamos un gel similar que contenía los complejos mitocondriales del animal que utilizamos como

control (ratón delgado vs. *ob/ob*; ratón *ob/ob* no tratado vs. ratón *ob/ob* tratado). Una vez había polimerizado la acrilamida vertida entre los cristales, eliminábamos el etanol. Posteriormente, vertíamos entre los dos cristales, sobre el nivel del gel de 40% acrilamida y rodeando a la banda de acrilamida de la primera dimensión, el nuevo gel “*staging*”. Éste lo preparábamos con 1,5 mL 40% acrilamida, 3,7 mL Buffer II/SDS y 9 mL agua, a lo que añadíamos 15 µL 10% APS y 15 µL TEMED. También en este caso cuidábamos que no se formaran burbujas. Una vez polimerizado este gel, los dos sistemas (control y problema) eran colocados en una cubeta de electroforesis y entre ellos vertíamos el *buffer cátodo* de electroforesis [12,1 g TRIS Base, 17,9 g tricine, 10 mL 10% SDS, hasta 1000 mL agua; pH 8,2]. Por fuera vertíamos el *buffer ánodo* [24,25 g TRIS Base, 1000 mL agua, pH 8.9]. Para que corrieran las subunidades de los complejos, cerrábamos el circuito inicialmente a 42 V y más adelante, una vez que las proteínas habían pasado el gel “*staging*”, a 80 V durante 2-4 horas a temperatura ambiente. Tras finalizar la electroforesis, transferíamos en seco esas proteínas a una membrana de difluoruro de polivinilo a 15 V durante hora y media. El reconocimiento de las diferentes subunidades del complejo I lo hacíamos empleando anticuerpos específicos contra las subunidades 39 kDa (NDUFA9), ND4, ND2, 30 kDa (NDUFS3), ND1, 20 kDa (MTND6), 17 kDa (NDUFB6), 15 kDa (NDUFA6), 8 kDa y ND4L. Tras lavar las membranas, éstas las tratábamos como se ha indicado más arriba para la visualización de las respectivas subunidades.

10.- Determinación de la 8-hidroxi-2-deoxiguanosina en el ADN nuclear y mitocondrial.

Aislamos el ADN nuclear (nADN) y mitocondrial (mtADN) de 100 mg de tejido hepático. Para ello utilizamos un “kit” comercial para el aislamiento de estos ADNs (BioVision Research Products. Mountain View. CA) y seguimos las instrucciones de uso del fabricante. El daño oxidativo lo valoramos determinando la 8-OHdG mediante un análisis inmunoenzimático competitivo siguiendo las recomendaciones del fabricante (8-Hydroxy-2-deoxy-guanosine EIA Kit. Cayman Chemical Co. Ann Arbor. MI).

11.- PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR).

El ARN total fue extraído del hígado de los ratones delgados y *ob/ob* utilizando el “TRI-reagent (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN fue tratado con DNasa I con el fin de eliminar los restos contaminantes de ADN (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). De 1 µg de ARN se generó el cADN mediante el “kit” comercial “First Strand cDNA Síntesis (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) para RT-PCR a 25°C, 5 minutos; 42°C, 60 minutos; 95°C, 5 minutos y 4°C, 5 minutos. La RT-PCR cuantitativa la realizamos mediante un “Light Cycler 1.0” (Roche Applied Science) en 20 µl con 50 ng cADN, 0,5 µM primer y 2 µl FastStart DNA Master SYBR Green 1 (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Los datos obtenidos de la PCR cuantitativa fueron analizados siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ descrito por Livak et al. (284). Las secuencia de los “cebadores” empleados en estos experimentos figuran en la tabla 1. La expresión de las subunidades del complejo I analizadas fue normalizada con la correspondiente a la β-actina. Las condiciones de amplificación fueron 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 10 segundos, acoplamiento (annealing) a 57°C durante 5 segundos y extensión a 72°C durante 20 segundos (285). La pureza y la autenticidad del tamaño de los productos ampliados fueron verificadas mediante electroforesis en gel de agarosa.

Tabla 1. Cebadores empleados en la PCR cuantitativa a tiempo real

NDUFA9	Sentido: Antisentido:	5'-CAT TAC TGC AGA GCC ACT-3' 5'-ATC AGA CGA AGG TGC ATG AT-3'
NDUFB6	Sentido: Antisentido:	5'-ATA ACT TTT TGC GGG ACG GG-3' 5'-CAG GAA AAT CTC TCA TTG GTG-3'
NDUFS3	Sentido: Antisentido:	5'-AGG AAC ATG GCG GCG GCT GC-3' 5'-ATT TCA GCC ACA TAC TCT CC-3'
ND1	Sentido: Antisentido:	5'- TGC ACC TAC CCT ATC ACT C-3'

		ACT C-3' 5'- ATT GTT TGG GCT ACG GCT C-3'
ND2	Sentido: Antisentido:	5'- ATG AGT AGG CCT GGA ATT C-3' 5'-ATC AGA AGT GGA ATG GGG C-3'
ND4	Sentido: Antisentido:	5'-ATA ATT ATA ACT AGC TCA ATC TGC-3' 5'-TCG TAG TTG GAG TTT GCT AG-3'
ND4L	Sentido: Antisentido:	5'-CTC ACC ATA GCC TTC TCA C-3' 5'-CGT AAT CTG TTC CGT ACG TG-3'
β -Actin	Sentido: Antisentido:	5'-ATG GAT GAC GAT ATC GCT G-3' 5'- GTT GGT AAC AAT GCC ATG TTC-3'

12.- Modificación de las proteínas mitocondriales “in vitro” por el peroxinitrito.

Para modificar las proteínas mitocondriales con el peroxinitrito, seguimos el procedimiento descrito por Murray et al. (286). En concreto, preparamos una solución de 30 mM de peroxinitrito disolviendo este anión o el peroxinitrito degradado (Upstate Biotechnology, Lake Placid. NY. USA) en 0,3 M de hidróxido sódico. La concentración de peroxinitrito fue confirmada midiendo su absorbancia a 301 nm (coeficiente de extinción $1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Veinte microgramos de proteínas mitocondriales disueltas en el buffer de extracción especificado más arriba las expusimos a 10 μM de peroxinitrito. Con este fin, el peroxinitrito se depositó sobre un lado del tubo de Eppendorf y mediante vórtex se permitió la mezcla con la solución proteica. Tras unos segundos, el pH del peroxinitrito, alcalino, desciende al pH neutro del buffer en el que están disueltas las proteínas. Este procedimiento lo repetimos todas las veces que fueron necesarias para

lograr que las proteínas quedaran expuestas a la cantidad de peroxinitrito que deseemos (entre 10 y 2800 μM). La nitración en 3-tirosina de las proteínas mitocondriales la comprobamos mediante Western blot empleando como anticuerpos primarios anti-3-nitrotirosina.

13.- Estadística.

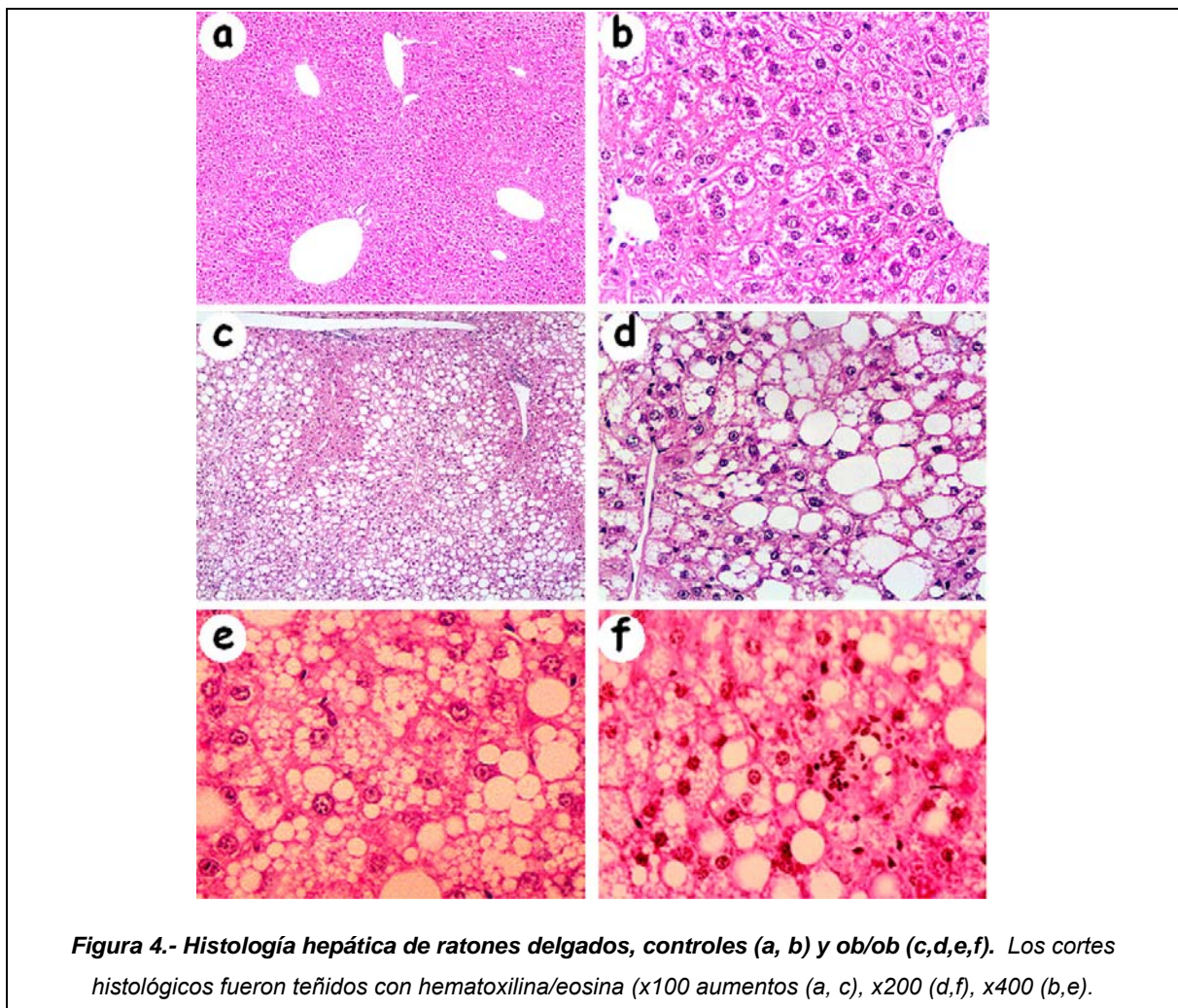
El **análisis estadístico** de los resultados lo realizamos utilizando el programa *SPSS Statistical Software* para *Windows*, versión 9 (SPSS Inc. Chicago, IL). En general, los resultados los hemos expuesto en forma de media \pm SD. Empleamos el coeficiente de correlación de Spearman para analizar la correlación existente entre variables. Consideramos significativos los valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS.

1.- Los ratones *ob/ob* desarrollan lesiones de EGHNA y alteraciones de la CRM.

1.1.- Cambios histológicos hepáticos en los ratones *ob/ob*.

El parénquima hepático de los ratones *ob/ob*, en contra de lo que ocurría en los ratones delgados, controles (Fig. 4a y 4b) presentaba una intensa esteatosis que comprometía al 75% de los hepatocitos. En el 30% de las células hepáticas, la grasa se encontraba en forma de gotas macrovacuolares y en el 40% restante la esteatosis era microvacuolar (Figs. 4c, 4d y 4e). Dispersos por el parénquima y en los espacios porta existían algunos focos de células mononucleares (Fig. 4f) y algún hepatocito con hialina de Mallory.



Concordantes con estos resultados fueron los obtenidos cuando determinamos las concentraciones de triglicéridos en el tejido hepático y las tasas de transaminasas en sangre. La figura 5 muestra que las tasas de triglicéridos en

Resultados

el hígado estaban elevadas desde $8,94 \pm 6,4$ mg/g de tejido hepático hasta $79,4 \pm 13,4$ mg/g de hígado ($p < 0,001$). A su vez, las transaminasas séricas estaban también significativamente elevadas (AST control, $33,2 \pm 9$ UI/L; *ob/ob*, 839 ± 118 UI/L; $p < 0,001$. ALT control, 28 ± 9 UI/L; *ob/ob*, 624 ± 67 UI/L, $p < 0,001$).

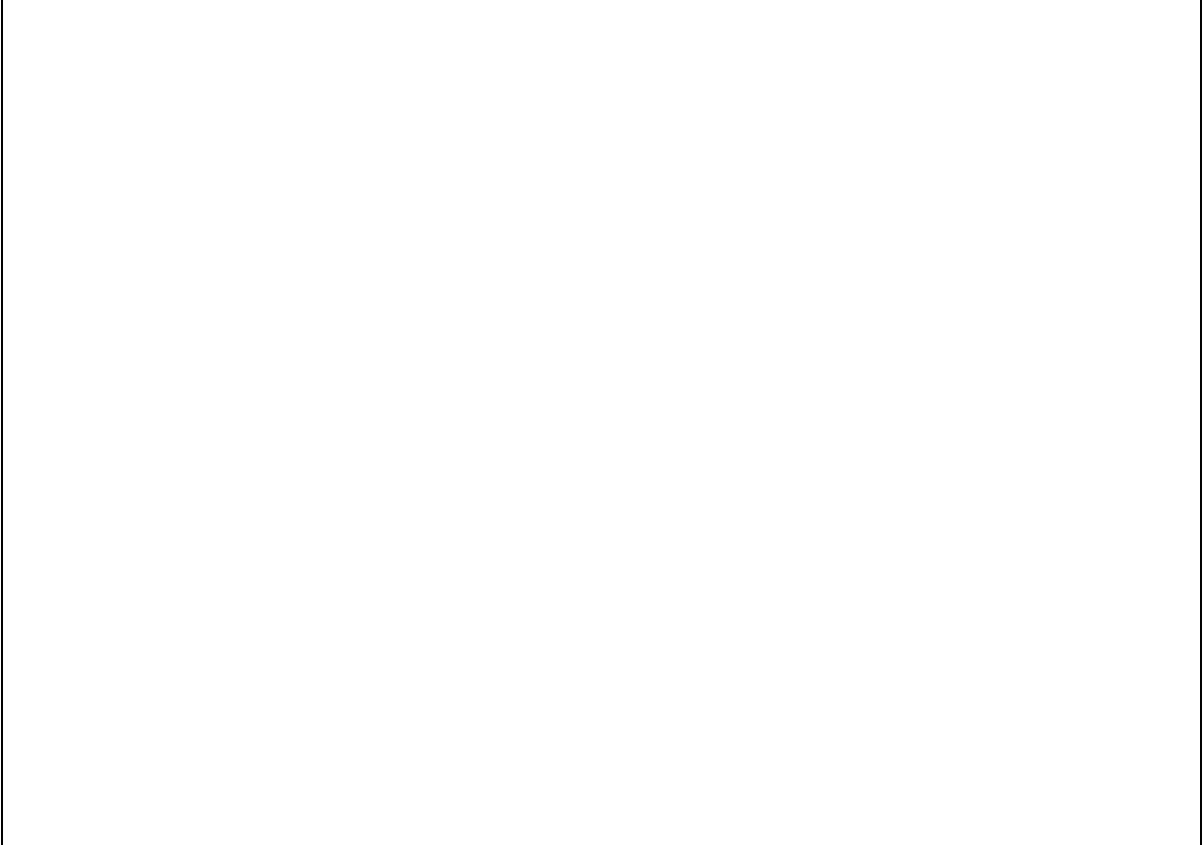


Figura 4.- Histología hepática de ratones delgados, controles (a, b) y ob/ob (c,d,e,f). Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina/eosina (x100 aumentos (a, c), x200 (d,f), x400 (b,e)).

Concordantes con estos resultados fueron los obtenidos cuando determinamos las concentraciones de triglicéridos en el tejido hepático y las tasas de transaminasas en sangre. La figura 5 muestra que las tasas de triglicéridos en el hígado estaban elevadas desde $8,94 \pm 6,4$ mg/g de tejido hepático hasta $79,4 \pm 13,4$ mg/g de hígado ($p < 0,001$). A su vez, las transaminasas séricas estaban también significativamente elevadas (AST control, $33,2 \pm 9$ UI/L; *ob/ob*, 839 ± 118 UI/L; $p < 0,001$. ALT control, 28 ± 9 UI/L; *ob/ob*, 624 ± 67 UI/L, $p < 0,001$).

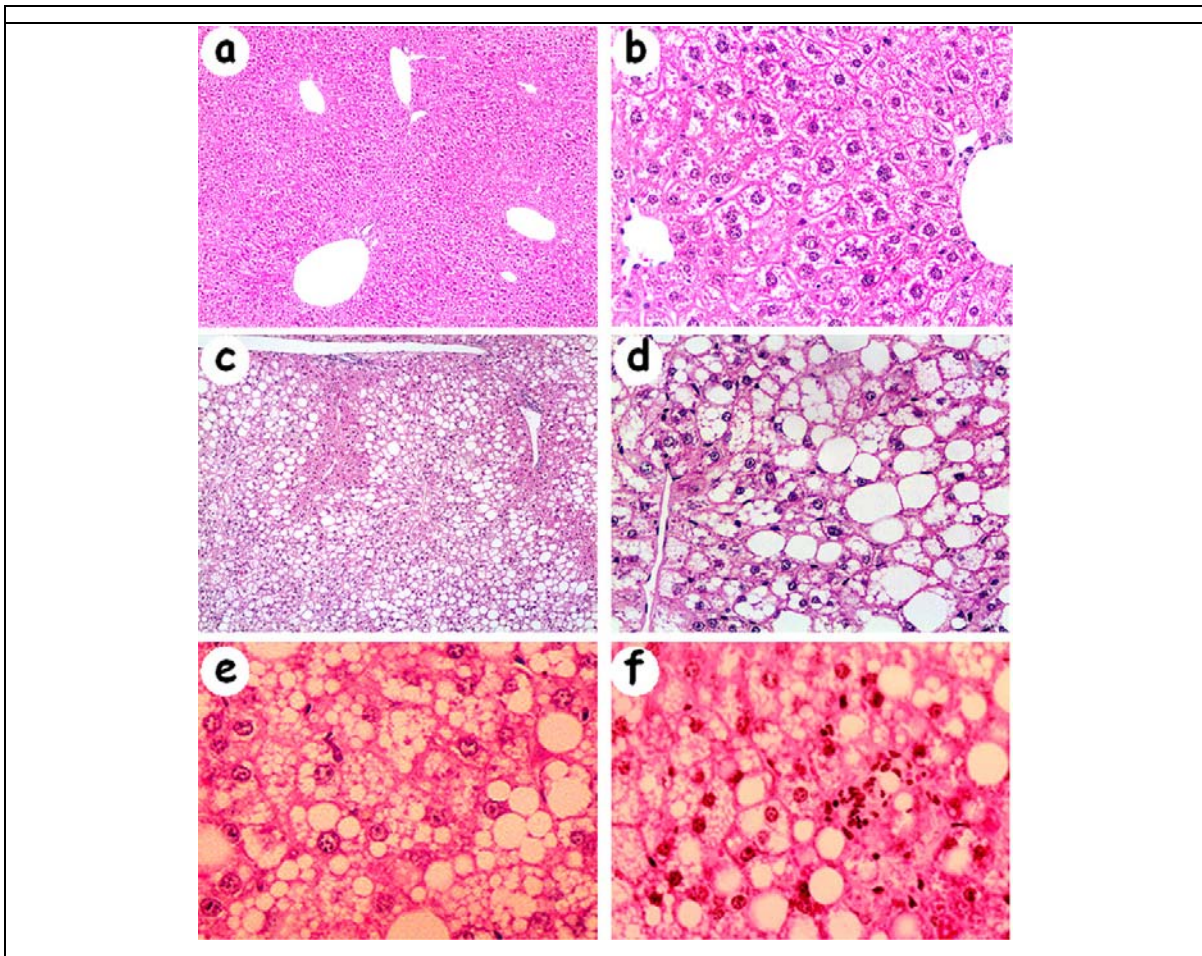


Figura 4.- Histología hepática de ratones delgados, controles (a, b) y ob/ob (c,d,e,f). Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina/eosina (x100 aumentos (a, c), x200 (d,f), x400 (b,e)).

Concordantes con estos resultados fueron los obtenidos cuando determinamos las concentraciones de triglicéridos en el tejido hepático y las tasas de transaminasas en sangre. La figura 5 muestra que las tasas de triglicéridos en el hígado estaban elevadas desde $8,94 \pm 6,4$ mg/g de tejido hepático hasta $79,4 \pm 13,4$ mg/g de hígado ($p < 0,001$). A su vez, las transaminasas séricas estaban también significativamente elevadas (AST control, $33,2 \pm 9$ UI/L; *ob/ob*, 839 ± 118

UI/L; $p < 0,001$. ALT control, 28 ± 9 UI/L; *ob/ob*, 624 ± 67 UI/L, $p < 0,001$).

UI/L; $p < 0,001$. ALT control, 28 ± 9 UI/L; *ob/ob*, 624 ± 67 UI/L, $p < 0,001$).

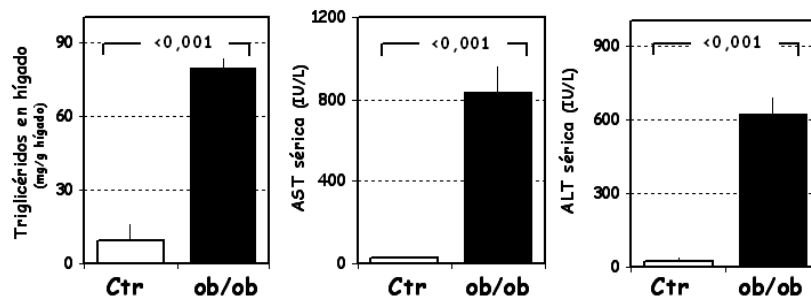


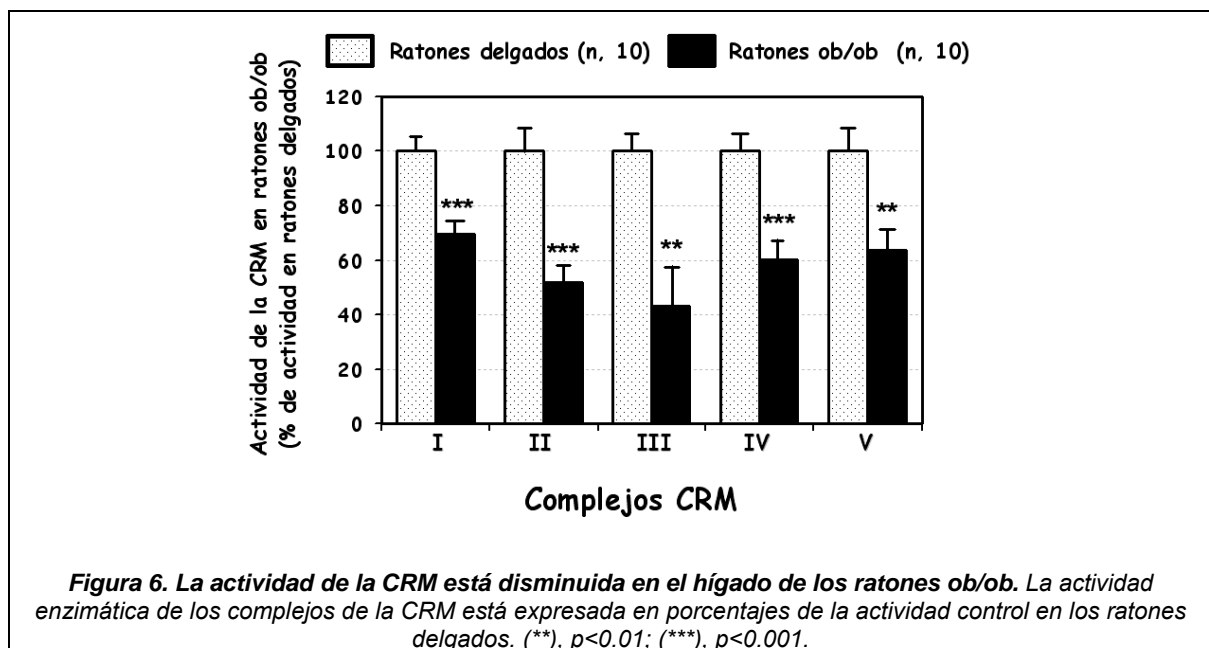
Figura 5. Tasas séricas de transaminasas y contenido hepático en triglicéridos. Las AST y ALT séricas fueron determinados mediante autoanalizador. El contenido hepático en triglicéridos fue determinado siguiendo el procedimiento descrito en "Material y Métodos".

1.2.- La actividad de los complejos de la CRM está disminuida en los ratones *ob/ob*.

ob/ob.

El **complejo I (NADH deshidrogenasa)** de la CRM acepta electrones del NADH y se los envía a la ubiquinona (Fig. 3). Como muestra la figura 6, la actividad del complejo I en las mitocondrias del tejido hepático estaba descendida desde $51,3 \pm 2,0$ [(nmol x min⁻¹ x mg proteína⁻¹/nmol x min⁻¹ x mg proteína⁻¹ CS) x 100] (complejo I/CS), en los ratones delgados, a $36,0 \pm 2,8$ complejo I/CS ($p < 0,001$) ($70,3 \pm 5,5\%$) en los ratones *ob/ob*.

En los ratones *ob/ob*, la actividad del **complejo II (succinato deshidrogenasa)**, que pasa electrones directamente a la ubiquinona (Fig. 3), estuvo descendida significativamente al $52,1 \pm 5,3\%$ de la actividad existente en los ratones controles (controles, $51,4 \pm 6,0$ complejo II/CS; ratones *ob/ob* $25,7 \pm 4,1$ complejo II/CS; $p < 0,001$). (Fig. 6).



La **ubiquinona** pasa los electrones desde el complejo I y II al complejo b-c₁ (complejo III), el cual los envía al citocromo c (Fig. 3). En los ratones *ob/ob*, la actividad de este complejo III era tan sólo del $43,2 \pm 15,7\%$ de la actividad existente en los ratones normales (Controles, $73,8 \pm 2,3$ complejo III/CS; ratones *ob/ob*, $31,9 \pm 11,6$ complejo III/CS; $p < 0,01$) (Fig. 6).

El **citocromo c** está implicado en el transporte de electrones desde el complejo b-c₁ al **complejo IV (citocromo c oxidasa)**, el cual, finalmente, los transfiere al oxígeno (Fig. 3). La medición de la actividad de este complejo enzimático en el hígado de los ratones *ob/ob* mostró que ésta estaba descendida

al $60,1 \pm 7,1\%$ de la actividad control (Controles, 56.5 ± 5 complejo IV/CS; ratones *ob/ob*, 34.0 ± 4.0 complejo IV/CS; $p < 0.001$) (Fig. 6).

El transporte de electrones a través de la CRM está acoplado al bombeo de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana de la pared mitocondrial. El **complejo V (ATP sintetasa)** de la CRM convierte la adenosina difosfato (ADP) en adenosina trifosfato (ATP) cuando los protones regresan a la matriz mitocondrial desde el espacio intermembrana. La actividad de este último complejo estuvo también significativamente disminuida en los ratones *ob/ob* al $63,9 \pm 8,4\%$ de la actividad en los ratones delgados. En efecto, mientras que la actividad normal de este complejo fue de $272,1 \pm 27,3$ complejo V/CS, en los ratones *ob/ob* era tan sólo de $185,2 \pm 22,7$ complejo V/CS ($p < 0,01$). (Fig. 6).

La actividad de la CS fue 1240 ± 271 nmol/min/mg de proteína en los ratones delgados y de 1138 ± 249 nmol/min/mg de proteína en los obesos, lo que indica que no existía proliferación mitocondrial en los ratones *ob/ob*. Las diferencias en actividad CS entre ambos grupos de ratones no es significativa.

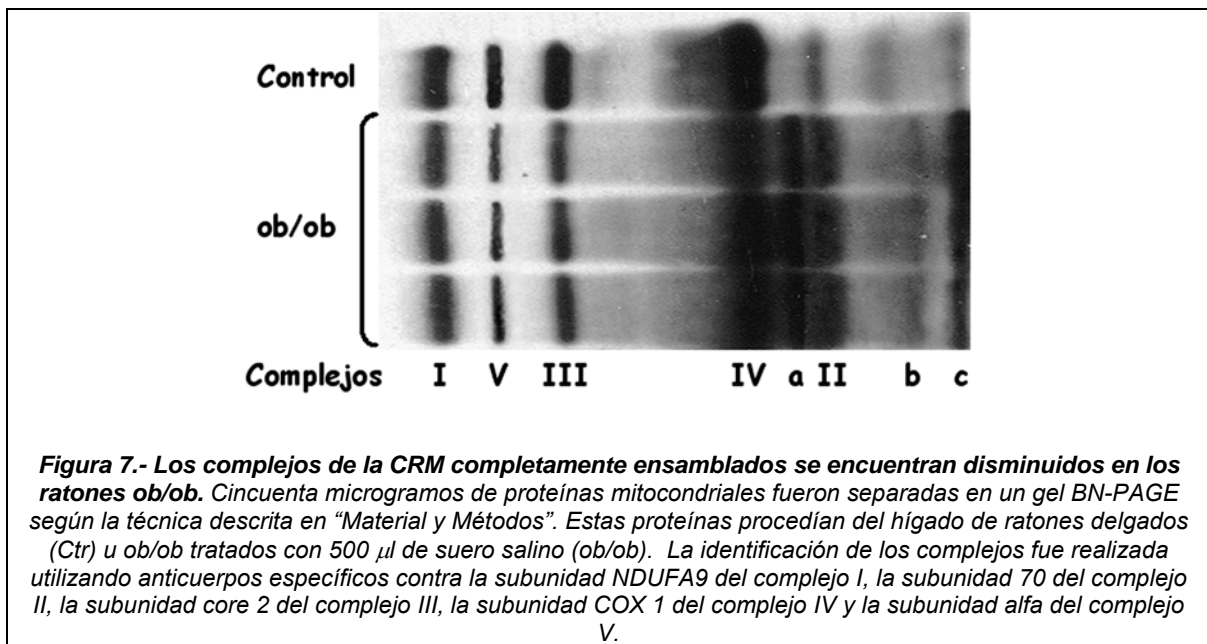
1.3.- La respiración mitocondrial está significativamente disminuida en el hígado de los ratones *ob/ob*.

La respiración mitocondrial fue determinada siguiendo el procedimiento descrito en “métodos” mediante un electrodo de oxígeno tipo Clark en tejido hepático obtenido inmediatamente tras el sacrificio de los ratones. Calculamos el índice de control respiratorio por el cociente del consumo de oxígeno en estado 3 (tras la adición a la cámara de $500 \mu\text{M}$ de ADP) dividido por el consumo de oxígeno en la fase 4 (tras la adición de 5 mM de succinato). Este estudio mostró que el consumo de oxígeno en los ratones *ob/ob* estaba significativamente descendido desde $2,90 \pm 0,42$, que es consumo de oxígeno en los ratones normales, hasta $1,65 \pm 0,35$, $p < 0,001$. Estos resultados son concordantes con los obtenidos al determinar la actividad de la CRM.

2.- La hipoactividad de la CRM se debe a la disminución de los complejos completamente ensamblados.

2.1.- Los complejos de la CRM completamente ensamblados están disminuidos en los ratones *ob/ob*.

Con el fin de conocer los motivos por los que los complejos de la CRM tienen baja actividad enzimática en el hígado de los ratones *ob/ob*, determinamos el grado de ensamblaje de estos complejos. Este estudio lo realizamos mediante BN-PAGE en primera dimensión según el procedimiento descrito en la sección de “Métodos”. De esta forma comprobamos que la cuantía de todos los complejos de la CRM completamente ensamblados se encuentra marcadamente reducida en los ratones *ob/ob*, lo cual justifica que la actividad de estos complejos estuviera muy disminuida en esos animales (Fig. 7, bandas *ob/ob*). Igualmente, esta figura muestra que existen algunas bandas de bajo peso molecular (bandas a, b y c) que corresponden probablemente a subcomplejos no completamente ensamblados o a proteínas de esos complejos que han sido degradadas. Esto último es particularmente probable para el caso de las bandas de menor peso molecular (banda c).



2.2.- La cuantía de las subunidades de los complejos de la CRM está también muy reducida en los ratones *ob/ob*.

Con el fin de profundizar en el conocimiento de las causas que determinan la baja actividad enzimática de los complejos de la CRM y su reducido

ensamblaje, analizamos algunas subunidades de los complejos de la CRM, principalmente del complejo I (*NADH:ubiquinona oxidoreductasa*). Elegimos este complejo entre los cinco de la CRM por ser el primero, de mayor tamaño y el más complicado de todos ellos (287, 288, 289). Se trata de una multiproteína formada por al menos 46 subunidades de las que siete están codificadas por el genoma mitocondrial y las 39 restantes por el genoma nuclear (288, 290, 291).

Para ello, las subunidades de los complejos fueron separadas en un SDS-PAGE de segunda dimensión según como lo describimos en la sección de "Material". En concreto, analizamos las subunidades 39, 30, 20, 17, 15 y 8 kDa codificadas por el ADN nuclear y las subunidades ND1, ND2, ND4 y ND4L codificadas por el ADNmt. Para ello empleamos anticuerpos específicos contra cada una de estas subunidades. De esta forma comprobamos que todas las subunidades estudiadas de este complejo estaban muy disminuidas en los ratones obesos (Fig. 8). Este descenso era especialmente marcado en las subunidades codificadas por el ADNmt. En efecto, mientras que las subunidades codificadas por el ADN nuclear estaban descendidas al $54\pm 10\%$ de la cuantía existente en los ratones controles, las subunidades codificadas por el ADNmt lo estaban al $17\pm 1\%$ ($p < 0,01$). En los ratones *ob/ob*, además, encontramos la aparición de subcomplejos de menor peso molecular indicando que el proceso de ensamblaje del complejo I se encontraba alterado. Por ejemplo, la subunidad 39 kDa estaba repartida en tres subcomplejos. Uno de ellos situado en los 980 kDa, que es el peso molecular correspondiente al complejo I completamente ensamblado, pero había otro a unos 500 kDa, que es el peso molecular del complejo III y un tercero situado aproximadamente a los 140 kDa que se prolongaba hacia la derecha en forma de una estela de menor peso molecular. Algo similar se observaba con la subunidad 17, que se detectaba a la altura del complejo I completamente ensamblado, pero también en subcomplejos de 500 y 200 kDa de peso molecular. La subunidad FeS del complejo III estaba disminuida de tamaño en los ratones obesos, pero además, aparecía una estela de menor peso molecular que se prolongaba hasta el frente de electroforesis, donde formaba un subcomplejo. Lo mismo ocurría con la subunidad core 2, que se seguía de una cola hacia la derecha. Las subunidades estudiadas de los complejos II y IV estaban también muy disminuidas y la subunidad α del complejo era de reducido tamaño y se prolongaba hacia la izquierda.

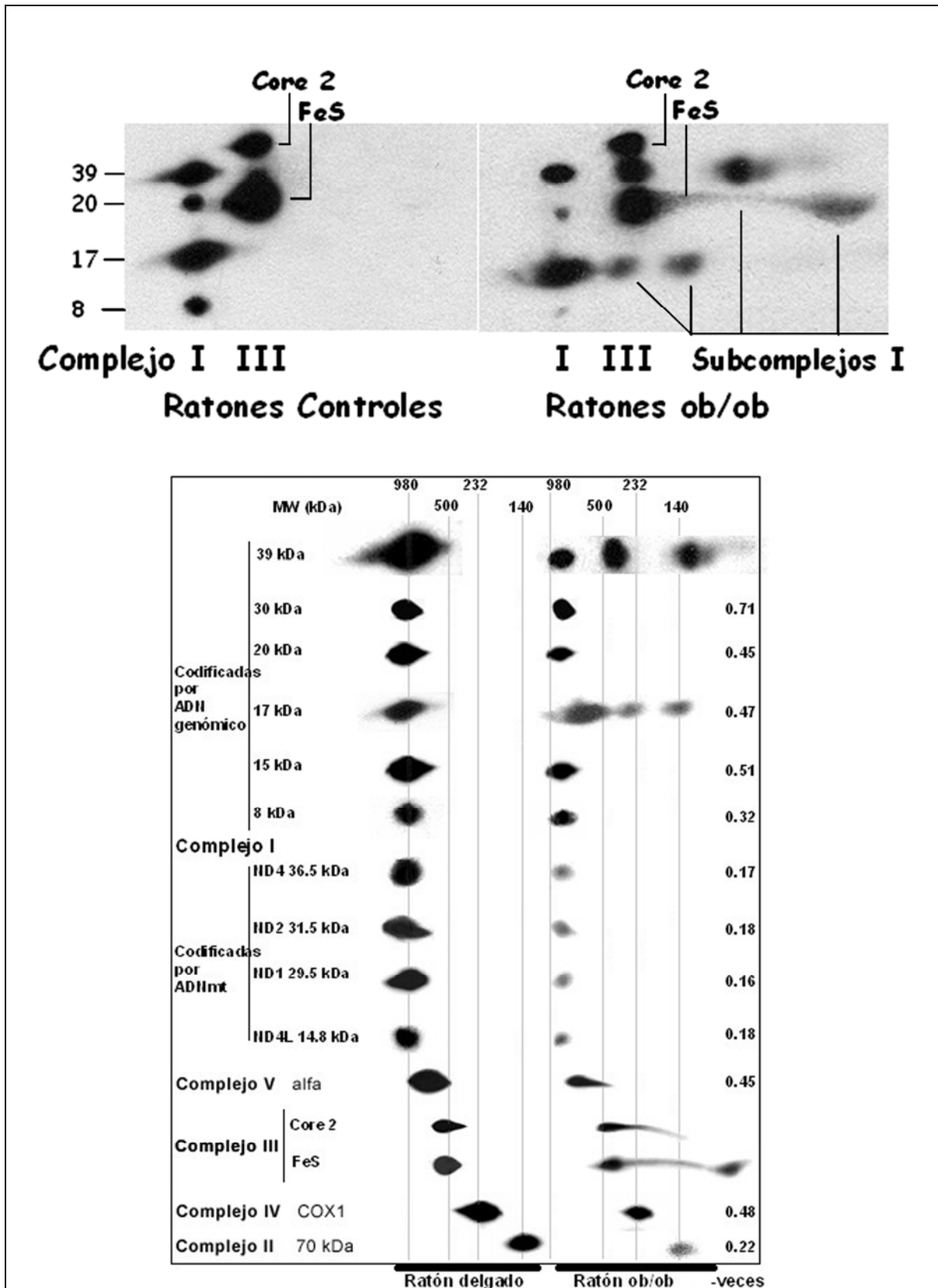


Figura 8.- Identificación de subunidades de los complejos de la CRM de ratones delgados y ob/ob tratados con suero salino. Cincuenta microgramos de proteínas mitocondriales extraídas de ratones delgados (Ctr) u obesos tratados con suero salino (ob) fueron separados en un gel de BN-PAGE y a continuación, tras la desnaturalización de los complejos, en una SDS-PAGE de segunda dimensión. Los gels procedentes de los ratones controles y de los ratones ob/ob se desarrollaron en paralelo y en las mismas condiciones. Las diferentes subunidades del complejo I fueron identificadas mediante anticuerpos específicos

contra la subunidad 39 kDa (NDUFA9), 30-kDa (NDUFS3), 20 kDa (MTND6), 17 kDa (NDUFB6), 15 kDa (NDUFA6), 36.5 kDa (ND4), 31.5 kDa (ND2), 29.5 kDa (ND1) y 14.8 kDa (ND4L). Las subunidades 39, 30, 20, 17 y 15 kDa son representativas de proteínas codificadas por el ADN nuclear y las subunidades ND1, ND2, ND4 y ND4L como codificadas por el ADNmt. Las subunidades del complejo III fueron identificadas con anticuerpos anti-core 2 y anti-FeS, las del complejo IV con anti-COX 1, las del complejo II con anti-unidad 70 y las del complejo V con anti-unidad alfa. Las líneas verticales indican la posición del complejo I migrado en la primera dimensión (980 kDa). –veces, indica la cuantía de subunidad en los ratones *ob/ob* tratados en relación con los controles delgados.

2.3.- La expresión de los genes mitocondriales está disminuida en el hígado de los ratones *ob/ob*.

Con el fin de conocer si el descenso de las subunidades del complejo I pudiera deberse a una disminución de su síntesis, determinamos la expresión genética de varias subunidades codificadas por el ADNn (NDUFA9, NDUFB6, NDUFS3) o por el ADNmt (ND1, ND2, ND4, ND4L) en el hígado de ratones controles, delgados y *ob/ob*. Para ello medimos los niveles de RNA mensajero de esas subunidades mediante RT-PCR cuantitativa. Este estudio muestra que la expresión genética de las subunidades codificadas por el ADN nuclear era similar en los ratones *ob/ob* que en los delgados (Fig. 9A). Por el contrario, la expresión genética de las subunidades codificadas por el ADNmt estaba reducida en los ratones *ob/ob* al 30,00±9,63% de la existente en los controles delgados (Fig. 9B).

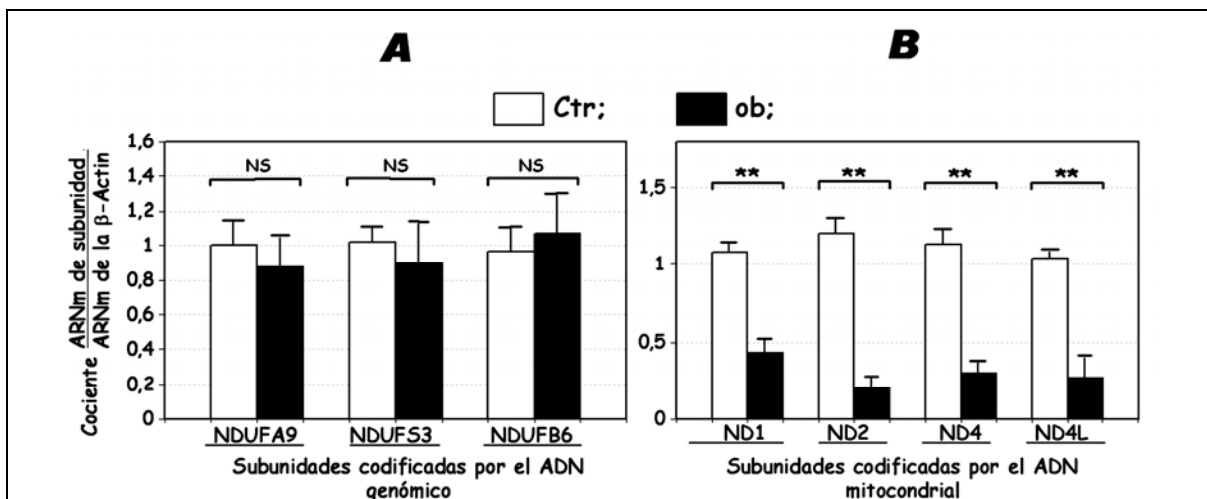
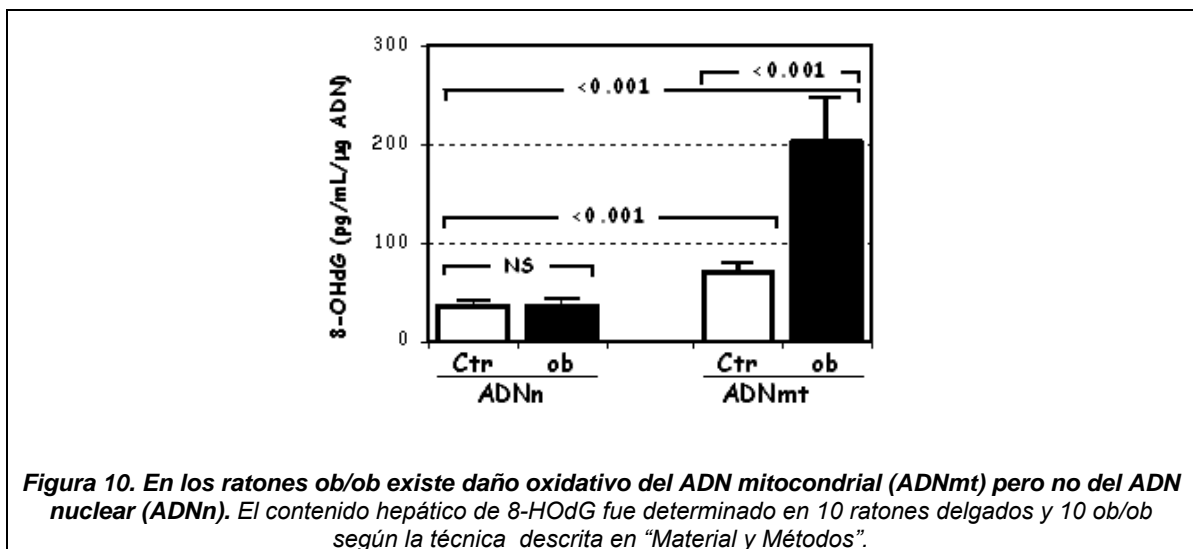


Figura 9. La expresión de los genes mitocondriales está disminuida en los ratones *ob/ob*. Tasas de expresión genética de proteínas mitocondriales representativas de las codificadas por genes nucleares (A) o mitocondriales (B) en el hígado de ratones delgados y *ob/ob* tratados durante 12 semanas con suero salino (*ob*). El ARN mensajero de las subunidades del complejo I fue analizado mediante PCR cuantitativa a tiempo real según la técnica descrita en "Material y Métodos". NS, diferencias no significativa. **, $p < 0.01$.

2.4.- En los ratones *ob/ob*, el ADNmt, pero no el genómico, está alterado por estrés oxidativo.

Resultados

Debido a que la expresión genética de las subunidades codificadas por el ADNmt estaba descendida en los ratones *ob/ob*, quisimos saber si ese descenso pudiera deberse a la existencia de un daño oxidativo en el ADN genómico o mitocondrial. Para ello aislamos ambos ADNs de 100 mg de tejido hepático siguiendo el procedimiento descrito en “Material y Métodos”. En ambos ADNs determinamos la 8-OHdG mediante un análisis inmunoenzimático competitivo. La 8-OHdG es considerada como un marcador de daño oxidativo del ADN. Este estudio mostró que la 8-OHdG en el ADNn de los ratones *ob/ob* no se diferenciaba de forma significativa de la hallada en el ADN extraído del hígado de los ratones delgados (36.32 ± 1.1 vs. 36.2 ± 1.2 pg/mL/ μ g ADN) (Fig. 10). Por el contrario, la 8-OHdG estaba significativamente elevada en el ADNmt de los ratones controles y obesos, aunque era especialmente alta en estos últimos (control, 71.0 ± 4.1 ; *ob/ob*, 204.0 ± 45.0 pg/mL/ μ g ADN, $p < 0.001$). Estos cambios en el ADNmt justifican el descenso de la expresión genética de las subunidades codificadas por este ADN, pero no justifican los descensos en la cuantía de las subunidades codificadas por el ADNn.

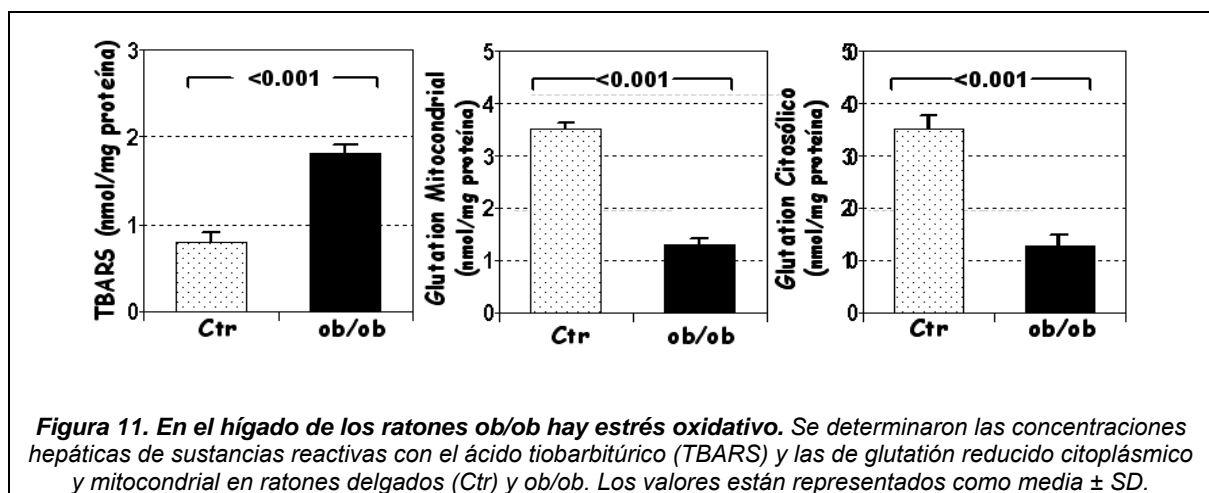


3.- En los ratones *ob/ob* existe estrés oxidativo y estrés nitrogenado.

3.1.- En el hígado de los ratones obesos hay estrés oxidativo.

Resultados

Se cree que el estrés oxidativo juega un papel decisivo en la patogenia de la EHNA (105, 292). Considerando que la disfunción de la CRM es una fuente muy importante de ROS (105), se podría esperar que en el hígado de los ratones *ob/ob* existirían evidencias de la presencia de un estrés oxidativo. Este estrés puede justificar el daño observado en el ADNmt y en consecuencia el descenso de la cuantía de las subunidades codificadas por el ADN de las mitocondrias. Por ello determinamos la concentración de TBARS, un marcador de peroxidación lipídica y de estrés oxidativo, en el tejido hepático de ratones controles y obesos. Como muestra la figura 11, en el hígado de los ratones *ob/ob*, las concentraciones de TBARS estaban significativamente elevadas (controles, $0,8 \pm 0,08$ nmol/mg proteína; *ob/ob*, $1,82 \pm 0,07$ nmol/mg proteína; $p < 0,001$). Por el contrario, el glutatión mitocondrial, que desciende por consumo cuando hay estrés oxidativo, estaba significativamente disminuido en los ratones obesos (controles, $3,49 \pm 0,03$ nmol/mg proteína; *ob/ob*, $1,76 \pm 0,07$ nmol/mg proteína; $p < 0,001$). Los mismos cambios observamos cuando determinamos las concentraciones de glutatión reducido en el citoplasma hepático. Mientras que en los ratones controles, este contenido era de $35,34 \pm 2,1$ nmol/mg proteína en los ratones controles, en los *ob/ob* era de $12,8 \pm 1,9$ nmol/mg proteína ($p < 0,001$).

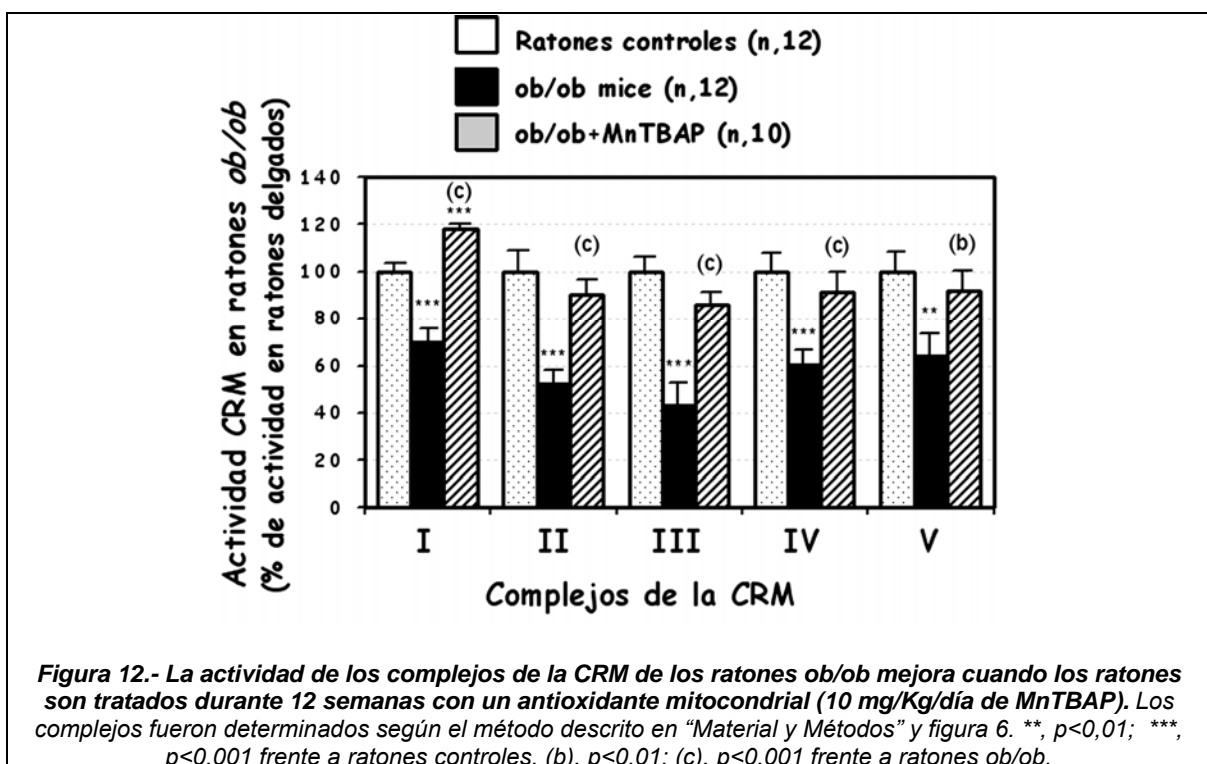


3.2.- Los antioxidantes mitocondriales mejoran gran parte de las alteraciones encontradas en las mitocondrias de los ratones *ob/ob*.

Con el fin de conocer si el estrés oxidativo juega algún papel en la patogenia de las alteraciones funcionales y estructurales de la CRM, 6 ratones *ob/ob* fueron tratados durante 12 semanas por vía intraperitoneal con 10 mg/Kg/día de MnTBAP. Esta sustancia es un análogo de la superóxido dismutasa que tiene un gran poder antioxidante mitocondrial.

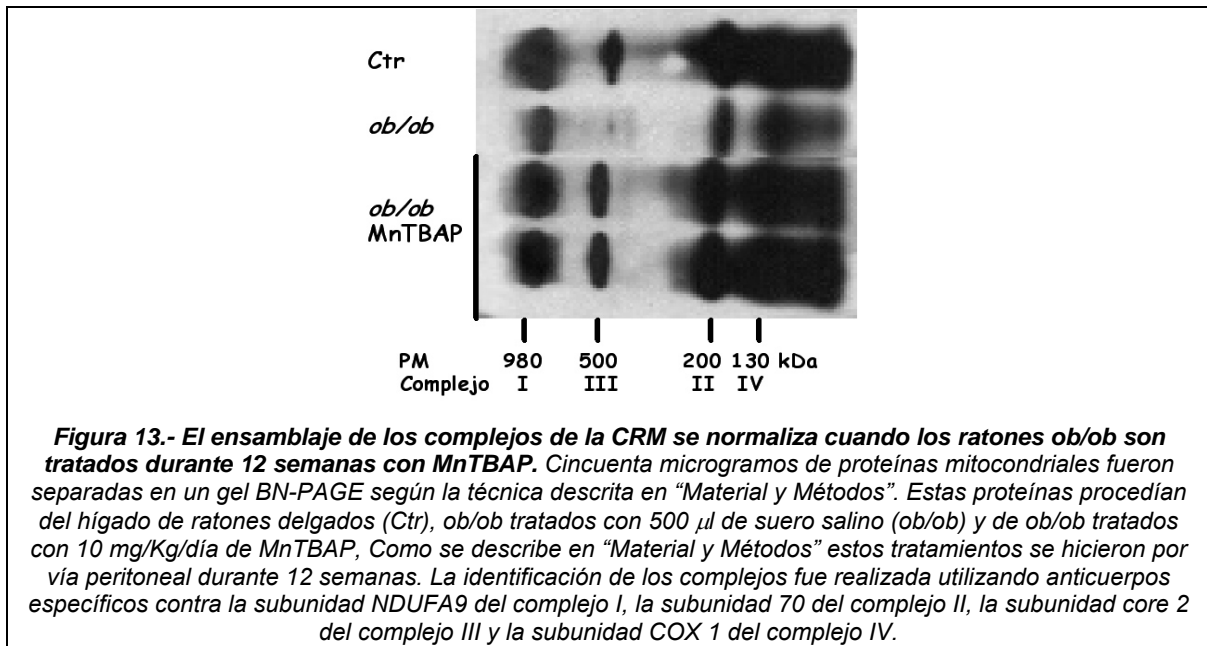
3.2.1.- Actividad de la CRM.

La figura 12 muestra que en los ratones *ob/ob* tratados con MnTBAP, la actividad enzimática de todos los complejos de la CRM mejoraba de forma significativa y se aproximaba o superaba la normalidad.



3.2.2.- Ensamblaje de los complejos.

En los ratones *ob/ob* tratados con el antioxidante MnTBAP, el ensamblaje de todos los complejos se normalizó y no se diferenció de cómo se encontraba en los ratones controles (Fig. 13).



3.2.3.- Cuantía de las subunidades del complejo I.

En los ratones *ob/ob* que fueron tratados con el análogo de la superóxido dismutasa, la cuantía de todas las subunidades estudiadas fue normal o estuvo aumentada y las subunidades que aparecían en varios subcomplejos, en este caso, aparecían formando parte de un único complejo. Las diferencias con la cuantía existente de estas subunidades en los ratones controles y tratados con MnTBAP no fueron significativas (Fig. 14).

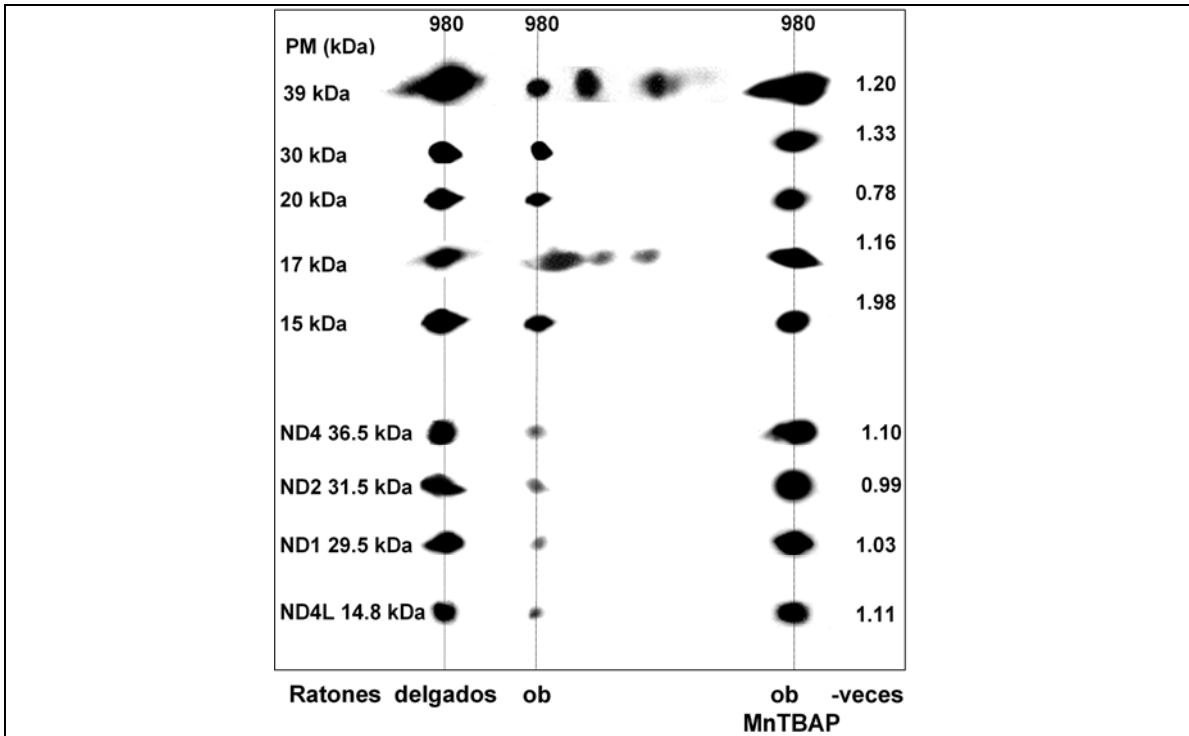
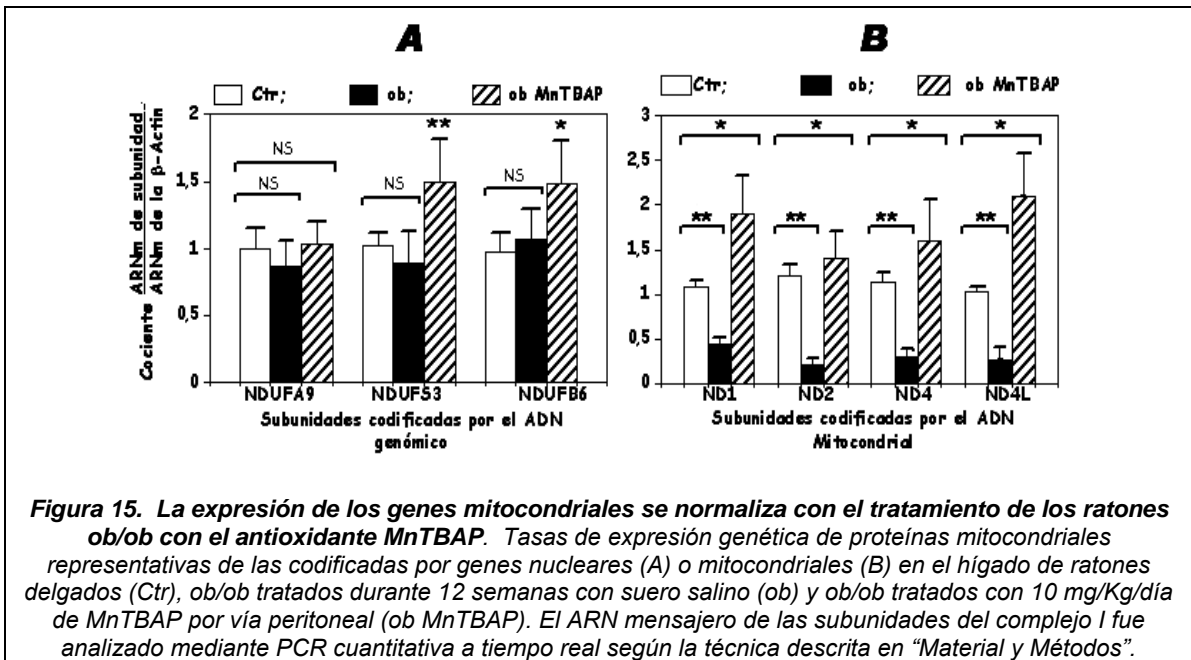


Figura 14.- El tratamiento de los ratones ob/ob con MnTBAP normaliza la cuantía de las subunidades del complejo I. Cincuenta microgramos de proteínas mitocondriales extraídas de ratones delgados u obesos tratados con 500 μ L de suero salino (ob) o con 10 mg/Kg/día de MnTBAP (ob MnTBAP) durante 12 semanas por vía intraperitoneal fueron separados en un gel BN-PAGE y a continuación, tras la desnaturalización de los complejos, en una segunda dimensión en una SDS-PAGE. Los geles procedentes de los ratones controles, ob/ob y ob/ob tratados se desarrollaron en paralelo y en las mismas condiciones. Las diferentes subunidades del complejo I fueron identificadas mediante anticuerpos específicos contra la subunidad 39 kDa (NDUFA9), 30 kDa (NDUFS3), 20 kDa (MTND6), 17 kDa (NDUFB6), 15 kDa (NDUFA6), 36.5 kDa (ND4), 31.5 kDa (ND2), 29.5 kDa (ND1) y 14.8 kDa (ND4L). Las subunidades 39, 30, 20, 17 y 15 kDa son representativas de proteínas codificadas por el ADN nuclear y las subunidades ND1, ND2, ND4 y ND4L como codificadas por el ADNmt. Las líneas verticales indican la posición del complejo I migrado en la primera dimensión (980 kDa).

3.2.4.- Expresión genética de las subunidades del complejo I.

Como recoge la figura 15, el tratamiento de los ratones ob/ob con 10 mg/Kg/día de MnTBAP aumentó la expresión genética de todas las subunidades estudiadas del complejo I. En la mayoría de los casos este aumento superó el existente en los ratones delgados. (Fig. 15).





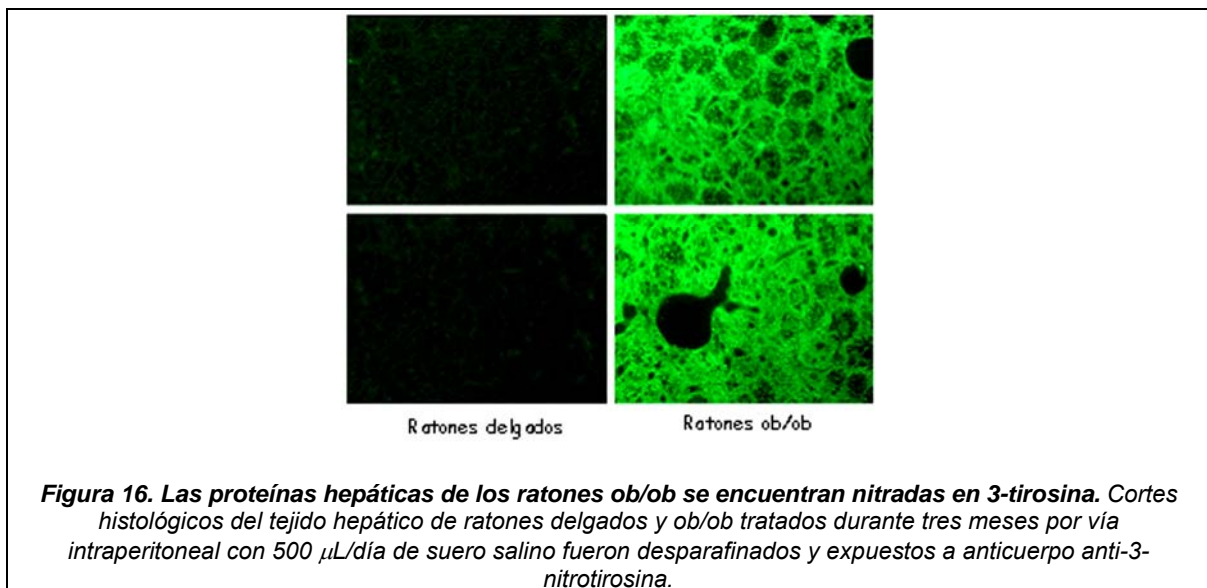
3.3.- En el hígado de los ratones ob/ob hay estrés nitrogenado.

Por lo que hemos visto en los apartados anteriores, el estrés oxidativo justifica los cambios encontrados en las subunidades codificadas por el ADNmt pero no las codificadas por el ADN genómico. La expresión genética de estas últimas subunidades era normal y el ADN nuclear no presentaba cambios relacionados con su oxidación. A pesar de ello, la cuantía de esas subunidades estaba muy disminuida en los ratones ob/ob. Todo ello indica que en el descenso de las subunidades de codificación genómica y, eventualmente, también en las codificadas por el ADNmt debe de intervenir algún otro factor. Estos descensos no pueden ser explicados por un defecto en el ensamblaje de las subunidades para formar el complejo activo, ya que la SDS-PAGE permite analizar la cuantía de cada subunidad, con independencia de que esté o no acoplada a las restantes para formar el complejo ensamblado. Por ello, la única causa posible de esa escasa cuantía de subunidades es su degradación. En otro estudio de nuestro grupo (122) se demostró que el anión peroxinitrito puede intervenir y podría ser el responsable de muchas de las alteraciones existentes en la función mitocondrial y en la patología de la EHNA.

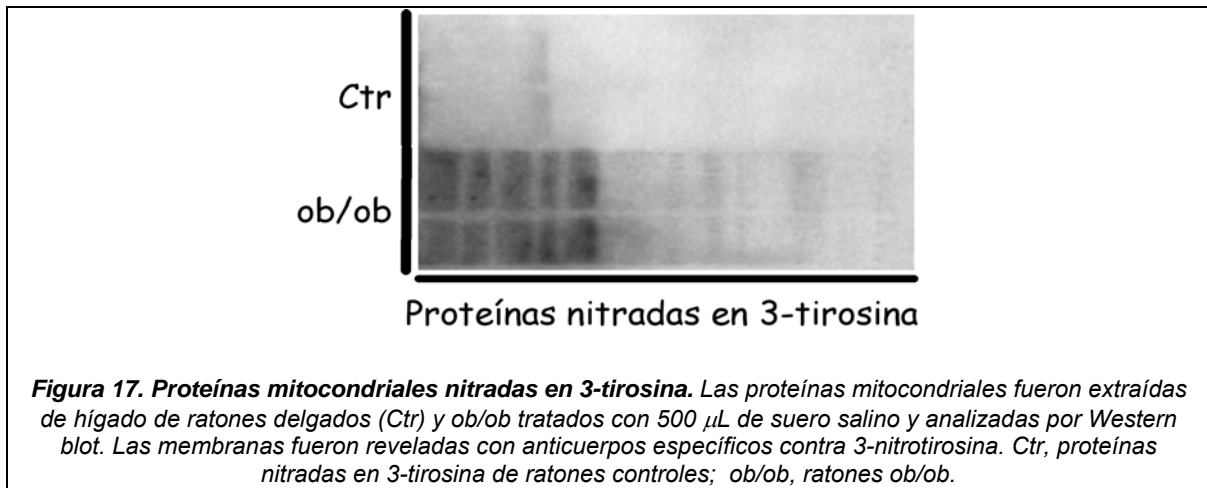
El anión peroxinitrito se forma rápidamente por la reacción del óxido nítrico (ON), producido endógenamente por la iNOS, con el anión superóxido. El peroxinitrito puede reaccionar con los complejos I, II, III, V y citocromo c de la

Resultados

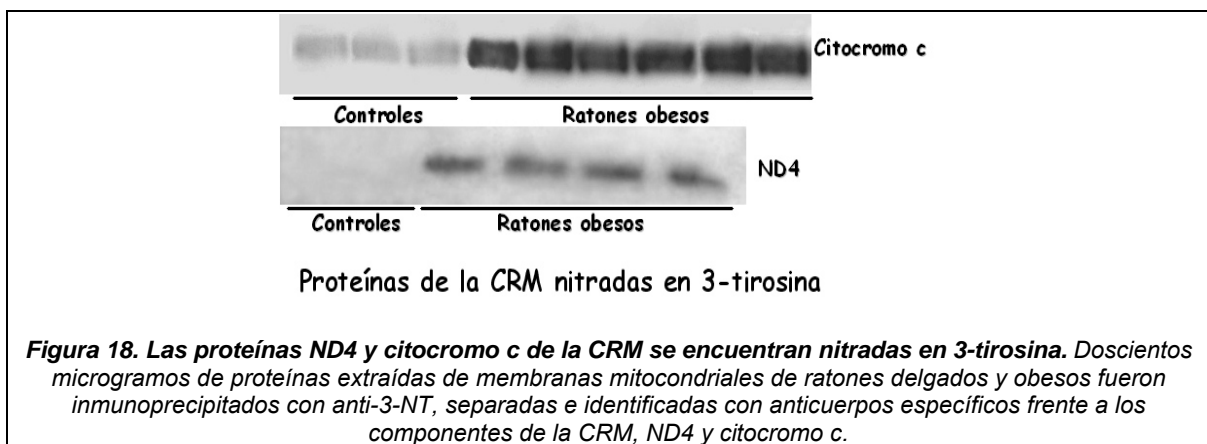
CRM e inactivarlos (145, 146). No se conocen bien los mecanismos de esta inhibición, pero la nitración de determinados residuos de tirosina puede degradar a esas proteínas y, en consecuencia, puede hacerles perder actividad enzimática. Por ello, quisimos saber si las proteínas hepáticas de los ratones *ob/ob* se encontraban nitradas en 3-tirosina. Si esto fuera así, el descenso de la actividad de la CRM pudiera deberse, además de por disminuir la síntesis de las subunidades codificadas por el ADNmt, también por la degradación de esas proteínas, tanto las de codificación nuclear como las de codificación mitocondrial. Este estudio lo realizamos mediante la tinción inmunohistoquímica de cortes histológicos, empleando como anticuerpos primarios anti-3-nitrotirosina (3NT) según lo descrito en “Material y Métodos”. La figura 16 muestra que mientras el tejido hepático de los ratones delgados apenas presentaba fluorescencia para proteínas nitradas en 3-tirosina, el hígado de los ratones *ob/ob* era intensamente fluorescente, indicando ello que sus proteínas estaban intensamente nitradas en 3-tirosina.



Con el fin de determinar si, además de las proteínas hepáticas en general, también las mitocondriales estaban nitradas en 3-tirosina, analizamos 50 μ g de proteínas de la membrana mitocondrial por Western blot utilizando anticuerpos específicos anti-3-NT. Este análisis mostró bandas proteicas nitradas en 3-tirosina, cuya intensidad estaba claramente aumentada en los ratones *ob/ob* (Fig. 17).



Finalmente, con el fin de identificar si entre las proteínas de la membrana mitocondrial nitradas en 3-tirosina figuraban las de la CRM, inmunoprecipitamos 200 μ g de proteínas de la membrana mitocondrial con anticuerpos anti-3NT e identificamos las proteínas precipitadas mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos frente a la subunidad ND4 del complejo I, codificada por el ADNmt, de la CRM y el citocromo c. Este análisis confirmó que estos dos componentes de la CRM se encontraban nitrados en 3-NT (Fig. 18).

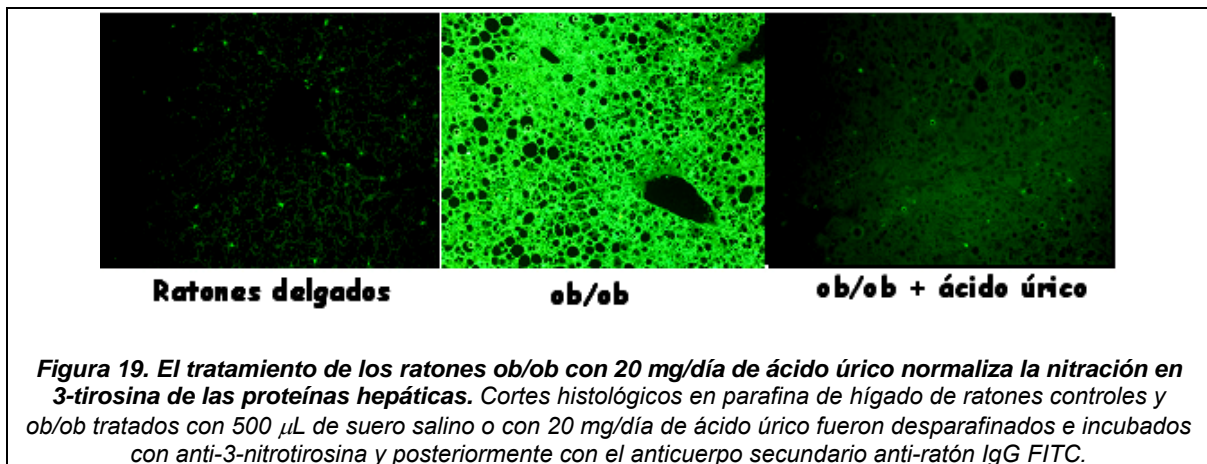


3.4.- El tratamiento de los ratones obesos con ácido úrico disminuye la nitración en 3-tirosina de las proteínas hepáticas y mejora las alteraciones mitocondriales.

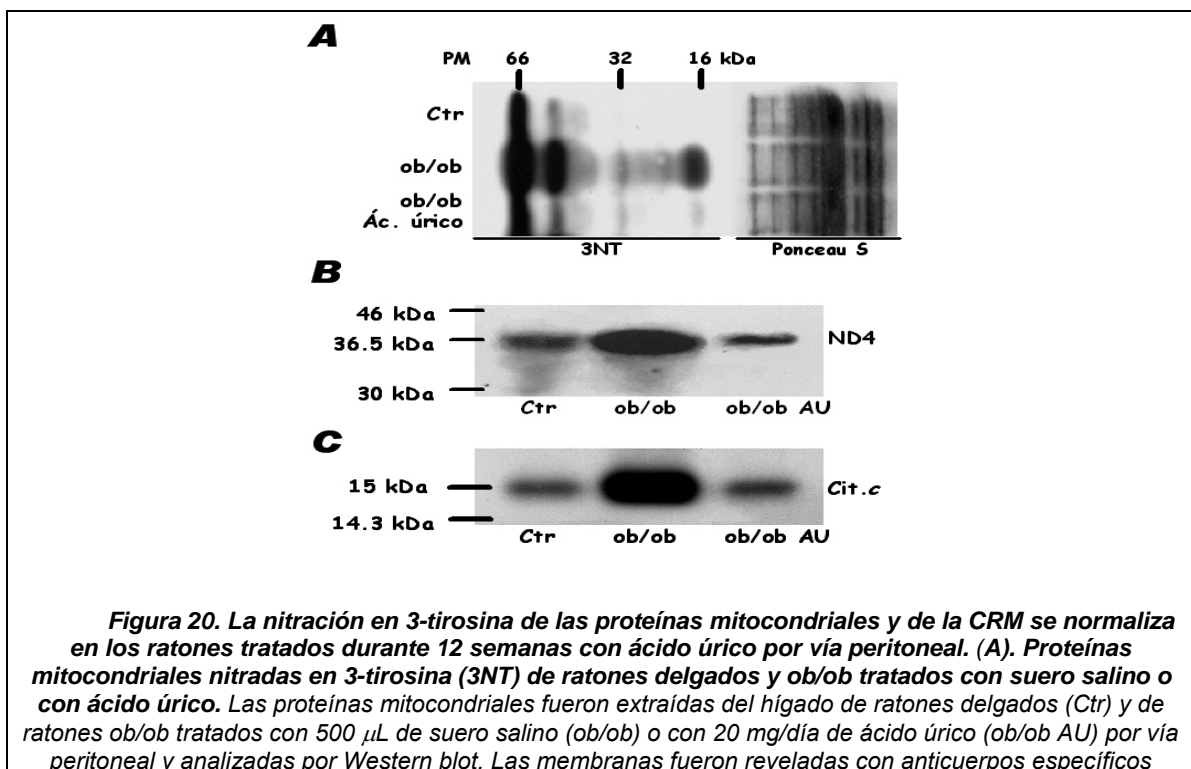
Con el fin de conocer si la nitración de las proteínas mitocondriales interviene en la pérdida de actividad de la CRM, medimos la actividad de esos complejos en las mitocondrias de ratones ob/ob tratados durante 12 semanas con un “limpiador” del anión peroxinitrito, el ácido úrico. Este ácido reacciona rápidamente con el peroxinitrito dando lugar a la formación de uratos nitrados y ha

Resultados

sido propuesto como un limpiador natural del anión peroxinitrito y de sus derivados reactivos (217, 218). De hecho, como muestra la figura 19, en los animales tratados con 20 mg/día de ácido úrico, la inmunofluorescencia del tejido hepático provocado por la nitración en 3-tirosina disminuyó de una forma muy llamativa hasta niveles equiparables a los existentes en el hígado de los animales controles.



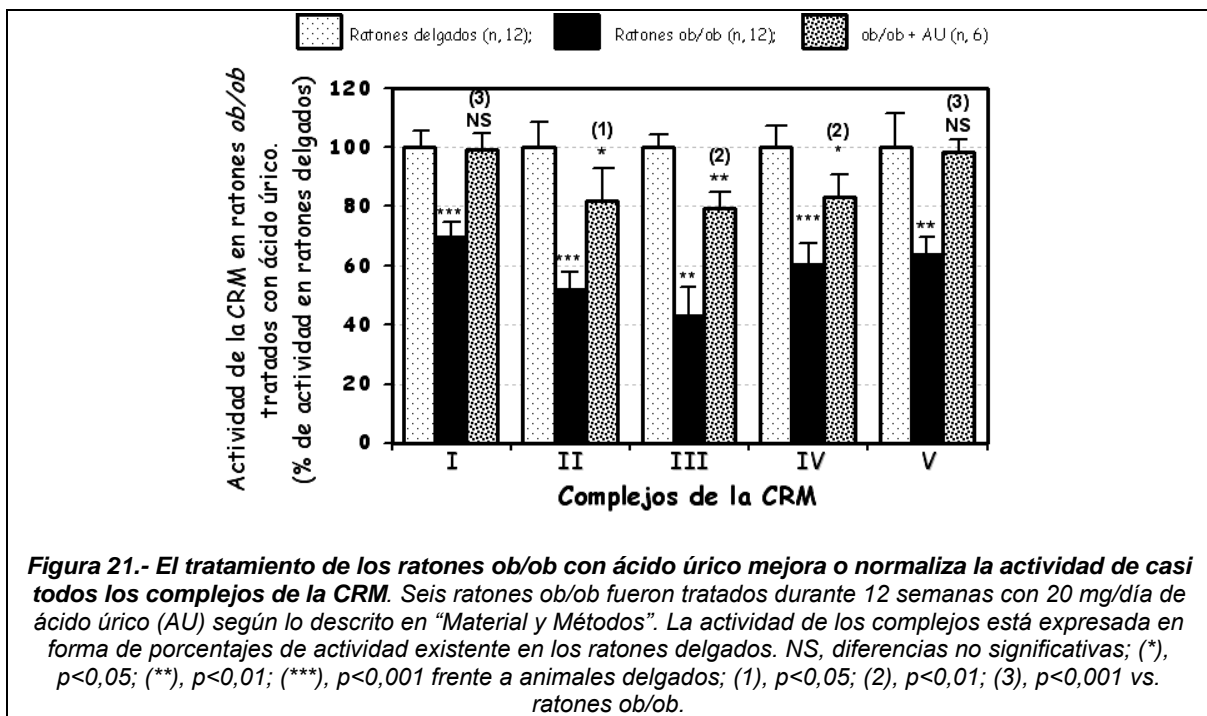
La misma normalización se observó en el grado de nitración en 3-tirosina de las proteínas mitocondriales y de la CRM, subunidades ND4 y citocromo c (Fig. 20). Estos datos confirman que, en efecto, el ácido úrico neutraliza los efectos del anión peroxinitrito sobre la nitración de 3-tirosina de las proteínas hepáticas en general y de las de la CRM en particular.



contra 3-nitrotirosina. Se incluye la misma membrana teñida con Ponceau S mostrando que la carga de proteínas fue similar en todas las bandas. **(B y C). Proteínas de la CRM de ratones controles y ob/ob tratados con suero o con ácido úrico.** Doscientos microgramos de proteínas extraídas de membrana mitocondrial de ratones delgados (Ctr) y obesos tratados con 500 μ L suero salino (ob/ob) o 20 mg/día de ácido úrico (ob/ob AU) fueron inmunoprecipitados con anti-3-NT y separadas e identificadas con anticuerpos específicos frente a los componentes de la CRM, ND4 y citocromo c (Cit.c).

3.4.1.- El tratamiento con ácido úrico mejora la actividad de la CRM.

Los efectos funcionales del peroxinitrito sobre la CRM fueron confirmados al determinar la actividad de los complejos de esta cadena tras el tratamiento de los ratones *ob/ob* con 20 mg/día de ácido úrico durante 12 semanas. En la figura 21 se puede observar que tras este tratamiento la actividad de los complejos I y V era completamente normal y que la de los complejos II, III y IV mejoró de forma significativa, aunque no alcanzó la normalidad funcional.



3.4.2.- El tratamiento con el ácido úrico corrige las alteraciones estructurales encontradas en los complejos de la CRM.

La mejoría observada con el ácido úrico en la actividad de los complejos de la CRM se puede justificar por el aumento que encontramos en el grado de ensamblaje de esos complejos. En efecto, en los ratones *ob/ob* tratados con 20 mg/día de ácido úrico durante 12 semanas, hallamos que los complejos enzimáticos de la CRM se encontraban ensamblados en un grado similar al que se hallaba en los ratones delgados (Fig. 22).

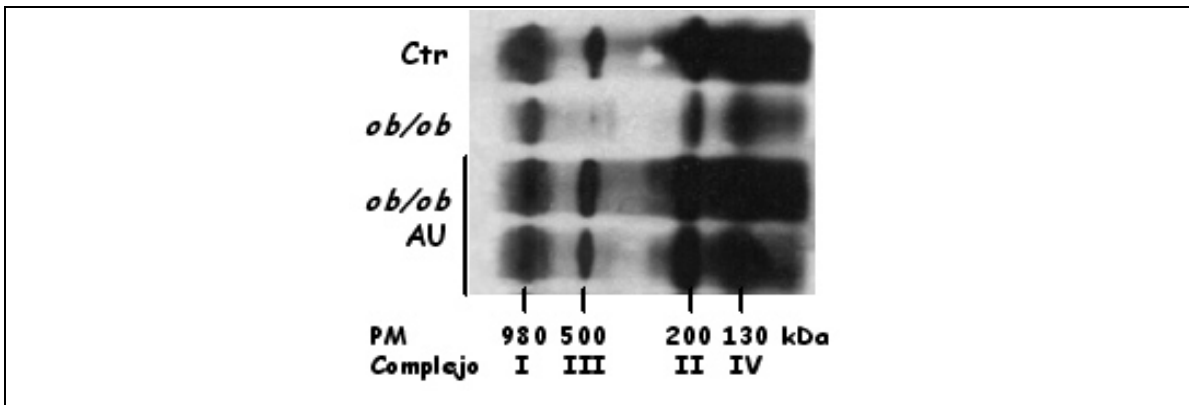


Figura 22.- El ensamblaje de los complejos de la CRM se normaliza cuando los ratones ob/ob son tratados durante 12 semanas con ácido úrico. Cincuenta microgramos de proteínas mitocondriales fueron separadas en un gel BN-PAGE según la técnica descrita en “Métodos”. Estas proteínas procedían del hígado de ratones delgados (Ctr), ob/ob tratados con 500 μ l de suero salino (ob/ob) y de ob/ob tratados con 20 mg/día de ácido úrico (ob/ob AU). Como se describe en “Material y Métodos” estos tratamientos se hicieron por vía peritoneal durante 12 semanas. La identificación de los complejos fue realizada utilizando anticuerpos específicos contra la subunidad NDUFA9 del complejo I, la subunidad 70 del complejo II, la subunidad core 2 del complejo III y la subunidad COX 1 del complejo IV.

Igualmente este tratamiento normalizó la cuantía de todas las subunidades estudiadas del complejo I (Fig. 23).

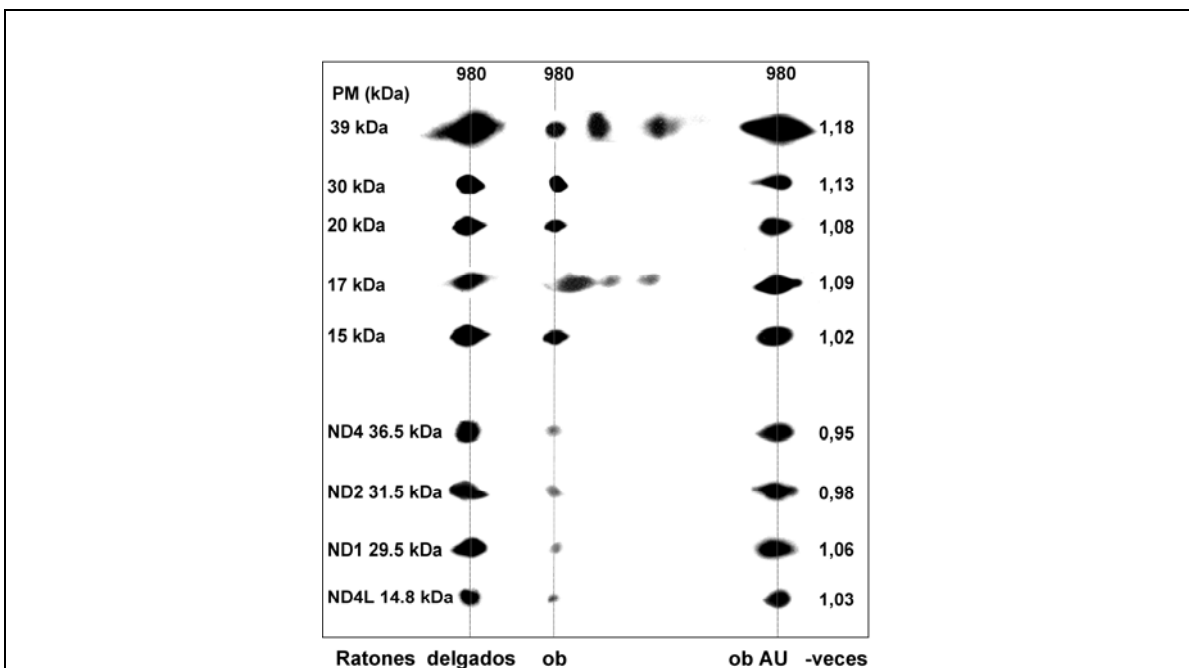
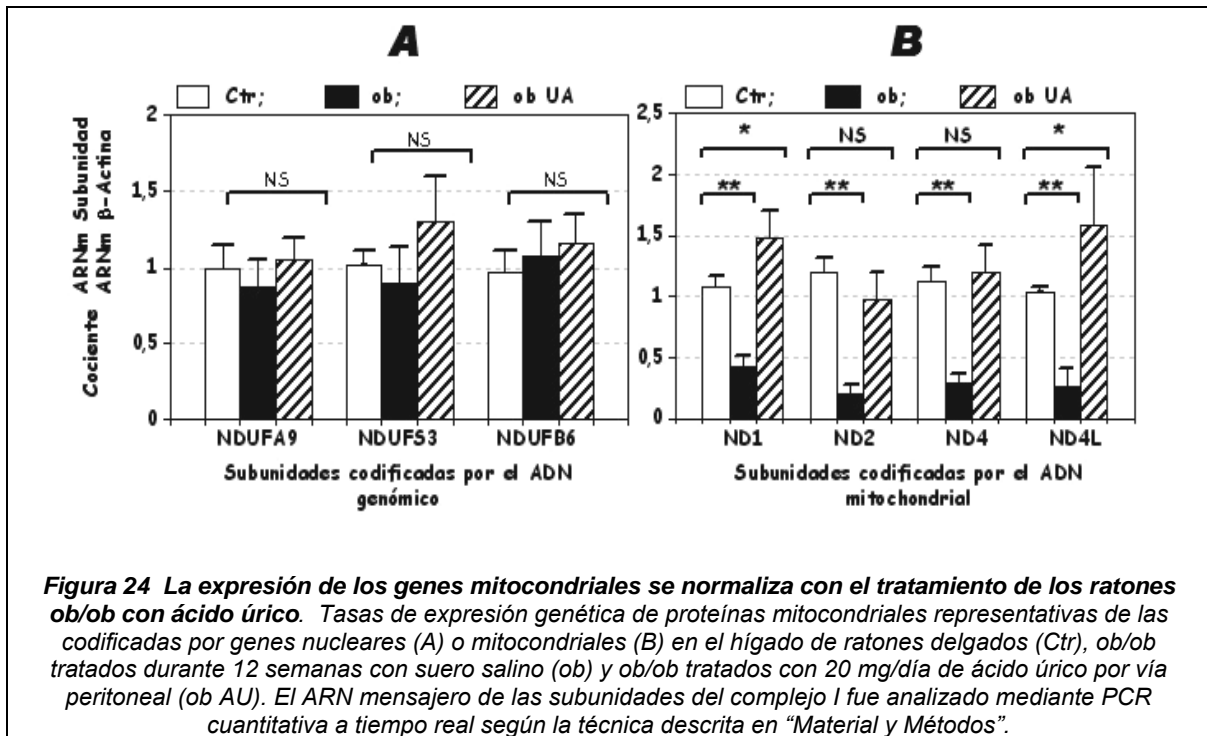


Figura 23.- El tratamiento de los ratones ob/ob con ácido úrico normaliza la cuantía de las subunidades del complejo I. Cincuenta microgramos de proteínas mitocondriales extraídas de ratones delgados (Ctr) u obesos tratados con 500 μ L de suero salino (ob) o con 20 mg/día de ácido úrico (ob AU) durante 12 semanas por vía intraperitoneal fueron separados en una primera dimensión en un gel BN-PAGE y a continuación en una segunda dimensión en SDS-PAGE como se describe en la figura 14. -veces, indica la cuantía de subunidad en los ratones ob/ob tratados en relación con los controles delgados.

Finalmente, la administración de ácido úrico a los ratones ob/ob normalizó la expresión genética de todas las subunidades estudiadas, particularmente las de codificación mitocondrial (Fig. 24).



Por los resultados de estos estudios podemos concluir que el anión peroxinitrito es responsable de la pérdida de las subunidades proteicas que componen los diferentes complejos de la CRM. Este efecto del peroxinitrito afecta tanto a las subunidades codificadas por el ADN nuclear como por el mitocondrial. No obstante, en el descenso de la cuantía de las subunidades de codificación mitocondrial, como hemos visto más arriba, interviene, además, un segundo factor, el dependiente de su deficiente síntesis, al estar reducida la expresión de los genes mitocondriales, consecuencia de la agresión oxidativa mitocondrial. Según esto, en el descenso de las subunidades de codificación genómica intervendría la agresión que el peroxinitrito ejerce sobre esas proteínas. En la desaparición de las subunidades de codificación mitocondrial intervendría la degradación por el peroxinitrito y el descenso de su síntesis. Esta asociación de dos efectos es concordante con el hecho de que las subunidades codificadas por el ADN mitocondrial estén mucho más disminuidas (al $17\pm 1\%$) que las codificadas por el ADN genómico ($54\pm 10\%$) (Fig. 8).

3.5.- Los niveles de prohibitina están descendidos en las proteínas mitocondriales de los ratones *ob/ob*.

Resultados

Debido a que la prohibitina es un complejo proteico que protege a los complejos de la CRM de su degradación, investigamos cómo se encuentra este complejo proteico en las mitocondrias de los ratones *ob/ob*. Como muestra la figura 25, la prohibitina inmunoreactiva estaba claramente disminuida en los extractos proteicos obtenidos de los ratones *ob/ob*. Sin embargo, las tasas de esta proteína se mantuvieron en los márgenes de la normalidad en los ratones obesos tratados con ácido úrico o MnTBAP. Con el fin de saber si esta proteína se encontraba nitrada en 3-tirosina, tratamos la misma membrana con anticuerpos anti-3-nitrotirosina. De esta forma mostramos que la prohibitina se encontraba nitrada en todos los grupos de ratones, tanto sanos como obesos, pero el grado de nitración en 3-tirosina fue muy superior en los ratones *ob/ob*. Además, en estos últimos ratones se observaba que por debajo de la marca dejada por la prohibitina nitrada existía una larga estela de menor peso molecular altamente nitrada (Fig. 25).

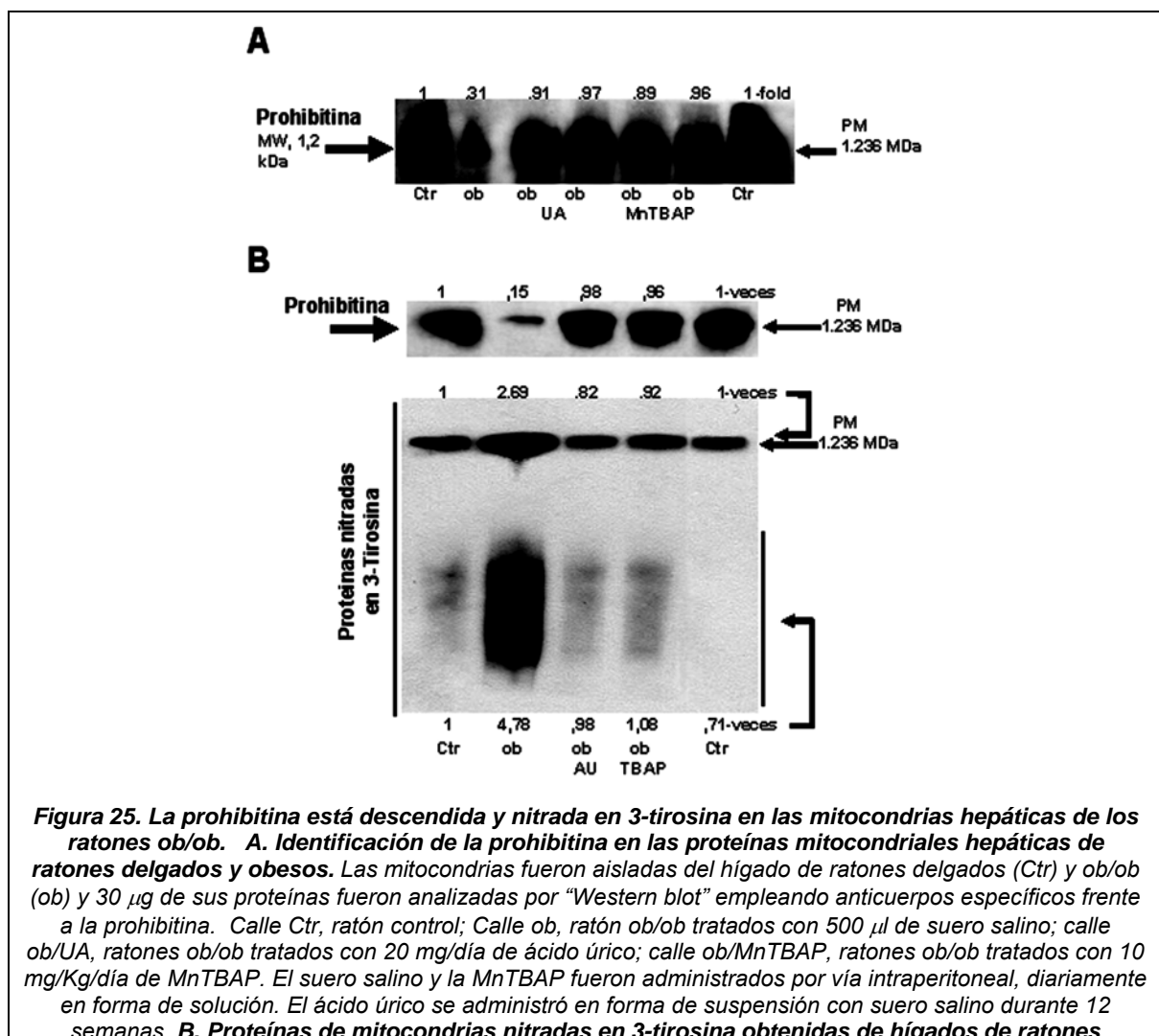


Figura 25. La prohibitina está descendida y nitrada en 3-tirosina en las mitocondrias hepáticas de los ratones *ob/ob*. A. Identificación de la prohibitina en las proteínas mitocondriales hepáticas de ratones delgados y obesos. Las mitocondrias fueron aisladas del hígado de ratones delgados (Ctrl) y *ob/ob* (*ob*) y 30 μ g de sus proteínas fueron analizadas por "Western blot" empleando anticuerpos específicos frente a la prohibitina. Calle Ctrl, ratón control; Calle *ob*, ratón *ob/ob* tratados con 500 μ l de suero salino; calle *ob/UA*, ratones *ob/ob* tratados con 20 mg/día de ácido úrico; calle *ob/MnTBAP*, ratones *ob/ob* tratados con 10 mg/Kg/día de MnTBAP. El suero salino y la MnTBAP fueron administrados por vía intraperitoneal, diariamente en forma de solución. El ácido úrico se administró en forma de suspensión con suero salino durante 12 semanas. B. Proteínas de mitocondrias nitradas en 3-tirosina obtenidas de hígados de ratones

delgados y obesos. Las membranas de transferencia de difluoruro de polivinilo fueron tratadas primero con antiprohibitina y luego con anti 3-nitrotirosina. El significado de las calles es el mismo que en A.

4.- El peroxinitrito reproduce “*in vitro*” las alteraciones de la CRM que existen en los ratones *ob/ob*.

Para confirmar que el peroxinitrito tiene capacidad para degradar a las subunidades de los complejos de la CRM, expusimos proteínas mitocondriales hepáticas de ratones normales, delgados, a diversas concentraciones de peroxinitrito y analizamos en ellas las consecuencias funcionales y estructurales de su efecto. La incubación “*in vitro*” de 20 μg de proteínas mitocondriales de ratones normales, delgados, con 0 a 2800 μM de peroxinitrito provocó la nitración de esas proteínas en 3-tirosina (Fig. 26) y disminuyó la actividad enzimática de la citrato sintetasa (Fig. 27A) y del complejo I (Fig. 27B). Todos estos efectos fueron dependientes de la dosis de peroxinitrito.

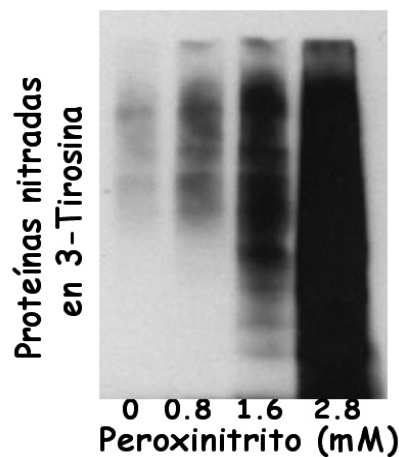


Figura 26. El peroxinitrito provoca la nitración en 3-tirosina de las proteínas mitocondriales hepáticas de forma dependiente de la dosis. Proteínas mitocondriales (20 μg) extraídas del hígado de un ratón delgado fueron expuestas a 800 a 2800 μM de peroxinitrito siguiendo el procedimiento descrito en “Material Métodos”. La presencia de proteínas nitradas en 3-tirosina se analizó mediante Western blot empleando para ello anticuerpos anti-3-nitrotirosina.

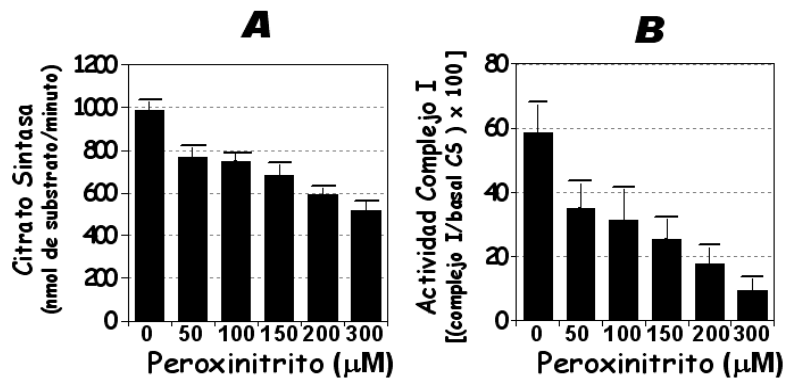


Figura 27A y 27B. El peroxinitrito provoca el descenso de la actividad de la citrato-sintetasa y del complejo I de la CRM. Proteínas mitocondriales de hígado de ratón normal fueron tratadas con 50 a 300 μM de peroxinitrito, tras lo cual determinamos la actividad de la citrato sintetasa (CS) (panel A) y del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (panel B) mediante espectrofotometría. La actividad del complejo I fue normalizada con la actividad de la CS en la preparación mitocondrial antes de su exposición al peroxinitrito.

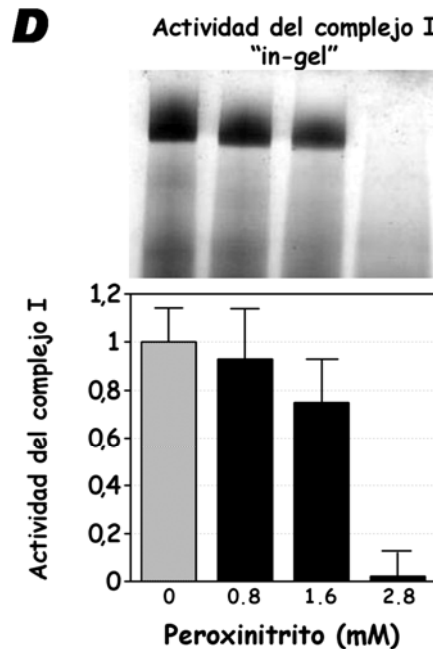


Figura 27C. El peroxinitrito disminuye "in vitro" la actividad in-gel del complejo I de forma dependiente de la dosis. Efecto de 800 μM a 2800 μM de peroxinitrito sobre la actividad del complejo I en el gel.

Debido a que este anión inhibía la actividad de la citrato sintetasa, normalizamos la actividad del complejo I con la actividad de la citrato sintetasa antes de añadir el peroxinitrito. Igualmente, la actividad del complejo I en el gel descendió al 93%, 75% y 5% del nivel basal cuando las proteínas mitocondriales fueron expuestas a 800 μM , 1600 μM o 2800 μM de peroxinitrito, respectivamente. (Fig. 27C).

Por ultimo, como muestra la figura 28, a medida que aumentaba la dosis de peroxinitrito disminuía el consumo mitocondrial de oxígeno.

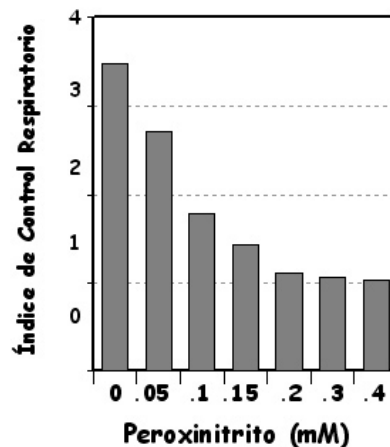
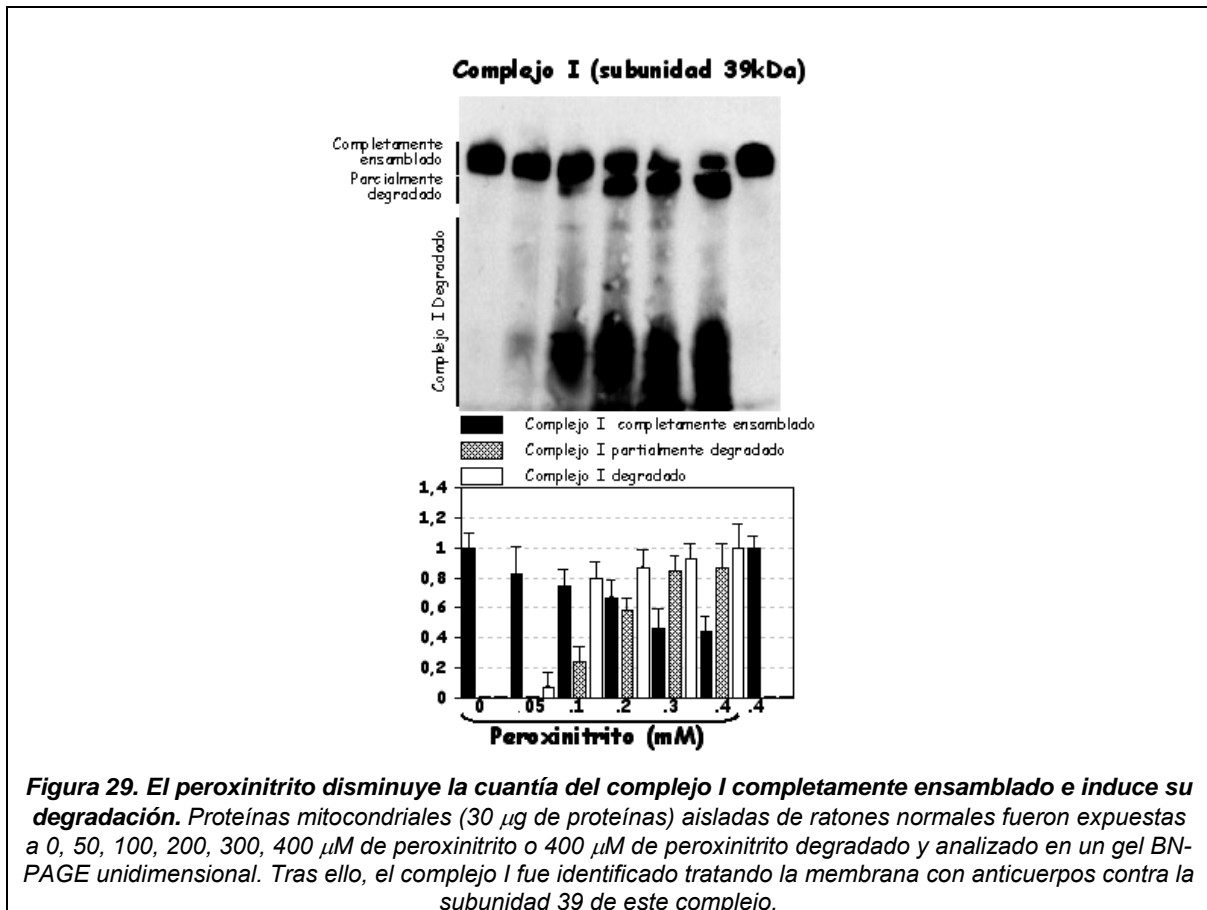
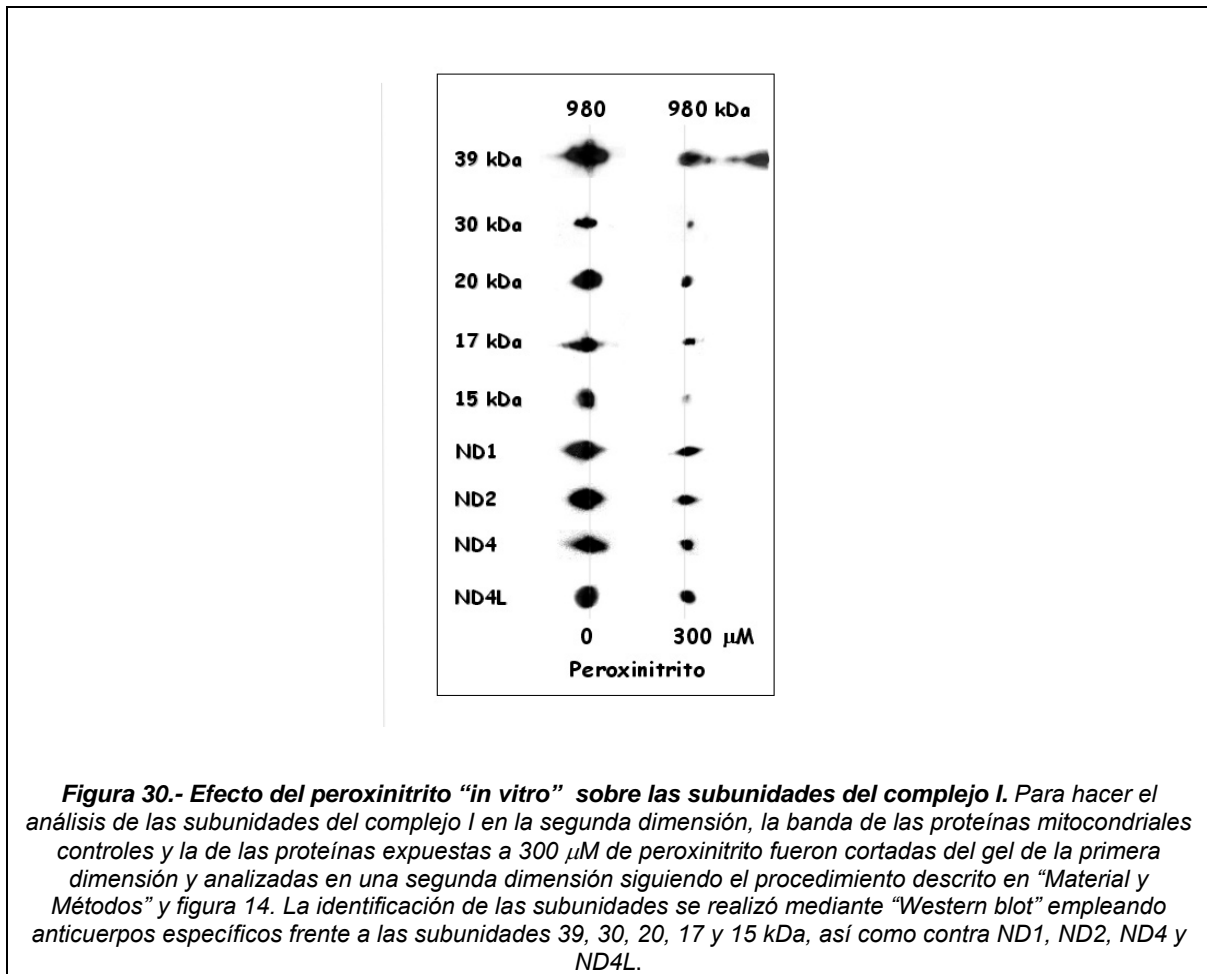


Figura 28. El peroxinitrito reduce “in vitro” el consumo de oxígeno por las mitocondrias hepáticas de ratones normales. Mitocondrias aisladas de ratones normales fueron tratadas con 50 μ M a 400 μ M de peroxinitrito. El consumo mitocondrial de oxígeno fue medido en un oxígrafo tipo cámara de Clark según el procedimiento descrito en “Material y Métodos”. El Índice de Control Respiratorio fue calculado mediante el cociente de este consumo en el estado 3/estado 4.

Con el fin de analizar el efecto del peroxinitrito sobre el grado de ensamblaje de los complejos mitocondriales, tratamos 30 μ g de proteínas mitocondriales de ratones normales con 0 a 400 μ M de peroxinitrito y, tras ello, las proteínas fueron separadas por electroforesis BN-PAGE. Como muestra la figura 29, la exposición de las proteínas mitocondriales a este anión se siguió de una disminución de los complejos completamente ensamblados que era dependiente de la dosis de peroxinitrito empleada. Este descenso se acompañaba de la aparición de una segunda banda, próxima a la principal pero de menor peso molecular, cuya intensidad fue creciendo a medida que se aumentaba la dosis de peroxinitrito. Estas bandas fueron seguidas de un rastro proteico de menor peso molecular que se prolongó hasta el frente de electroforesis. Mientras que la banda superior, de mayor peso molecular (980 kDa), corresponde al complejo I completamente ensamblado, la segunda banda, inmediatamente por debajo de la primera, de menor peso molecular, corresponde a este mismo complejo parcialmente degradado. El rastro que sigue es determinado por fragmentos de degradación de diferentes pesos moleculares.



Con el fin de determinar el efecto del peroxinitrito sobre las diferentes subunidades que componen el complejo I, analizamos las subunidades 39, 30, 20, 17, 15 kDa, ND1, ND2, ND4 y ND4L de este complejo antes y tras la exposición de 30 μ g de proteínas mitocondriales a 300 μ M de peroxinitrito. La separación de las subunidades mencionadas la realizamos mediante electroforesis BN/SDS-PAGE bidimensional. De esta manera confirmamos que el peroxinitrito disminuye la cantidad de todas las subunidades estudiadas del complejo I. En algunos casos, su cuantía quedó reducida a una mancha casi indetectable (subunidad 15 kDa). En el caso de la subunidad 39 kDa, la mancha de 980 kDa fue seguida de una cola de menor peso molecular que se extendió hasta el frente de la línea de electroforesis (Fig. 30). Esta cola hacia la derecha es el resultado de la degradación de esta subunidad y de la aparición de fragmentos de la misma.

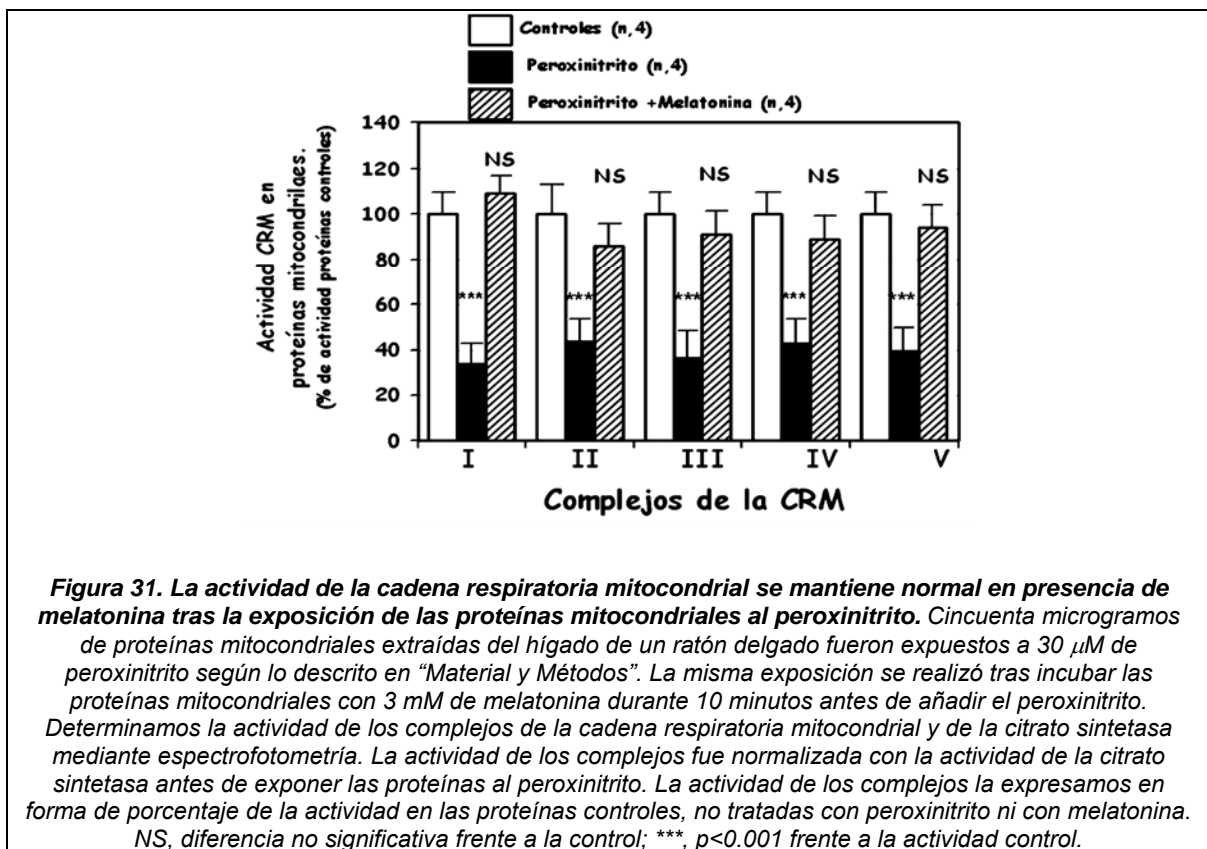


5.- La melatonina previene las alteraciones mitocondriales provocadas por el peroxinitrito “in vitro”.

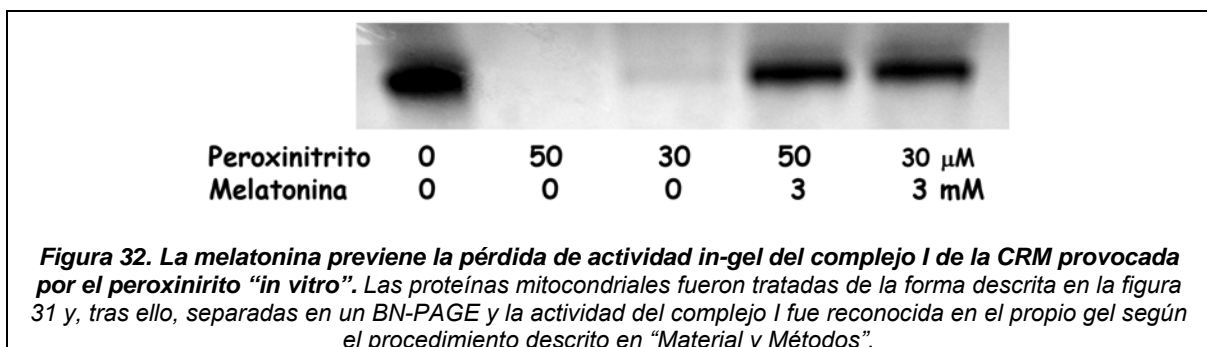
Aunque los experimentos anteriormente expuestos muestran que las alteraciones funcionales de las mitocondrias e incluso las lesiones histológicas de EHNA halladas en los ratones *ob/ob* pueden revertir mediante la administración prolongada de ácido úrico o de MnTBAP, ninguno de estos dos agentes pueden ser empleados en el hombre y, por tanto, no pueden ser utilizados en el tratamiento de los pacientes con EHNA. Por esta razón, buscamos agentes antioxidantes que fuesen capaces de neutralizar al anión peroxinitrito y al mismo tiempo pudiesen ser empleados en el hombre. Estas propiedades las reúne la **melatonina** (N-acetil-5-metoxitriptamina). Se trata de un potente antioxidante capaz de neutralizar al anión peroxinitrito y a sus derivados (229, 230, 231, 240, 241, 242), Por esta razón, quisimos saber si el pretratamiento de las proteínas mitocondriales con melatonina era capaz de prevenir las alteraciones que el peroxinitrito provoca “in vitro” en los complejos respiratorios mitocondriales.

5.1.- La melatonina previene las alteraciones provocadas por el peroxinitrito “*in vitro*” sobre la actividad de la CRM.

Como muestra la figura 31, la exposición de las proteínas mitocondriales a 30 μ M de peroxinitrito provocó un descenso muy significativo de la actividad de todos los complejos. Esta actividad osciló entre el 33,7% del complejo I y el 43,8% del complejo II. Cuando las proteínas mitocondriales habían sido tratadas previamente con 3 mM de melatonina, la actividad de los complejos se mantuvo en los niveles normales a pesar de ser expuestas posteriormente al peroxinitrito.

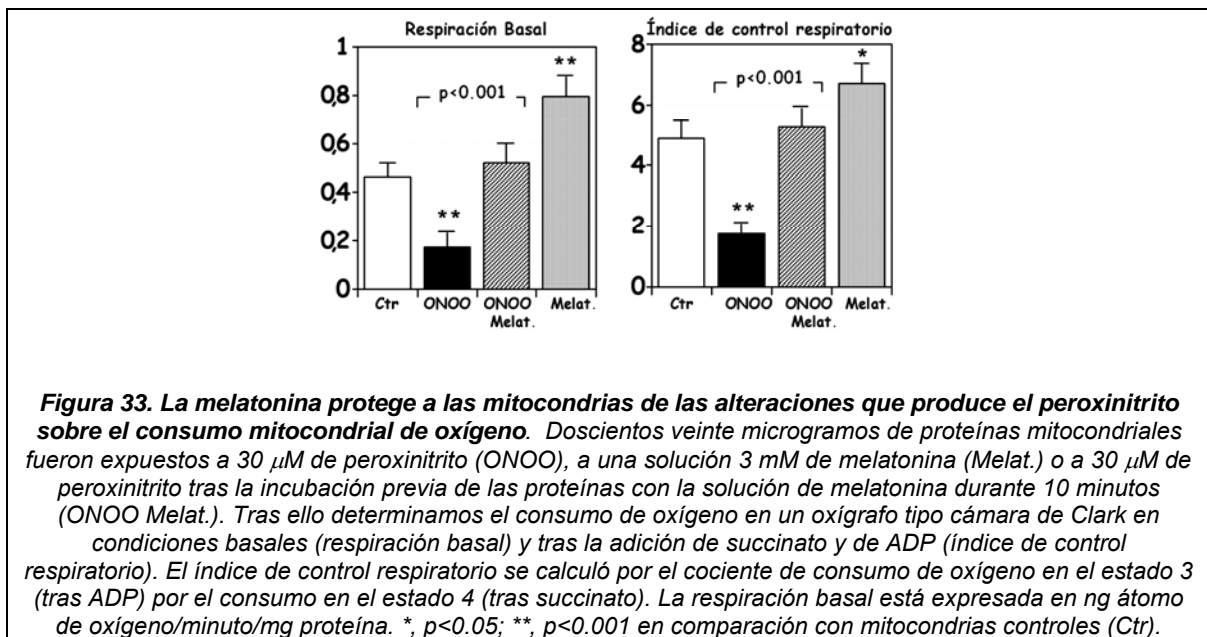


Este mismo efecto protector sobre la CRM de la melatonina frente al peroxinitrito lo comprobamos cuando determinamos la actividad del complejo I *in-gel* (Fig. 32).



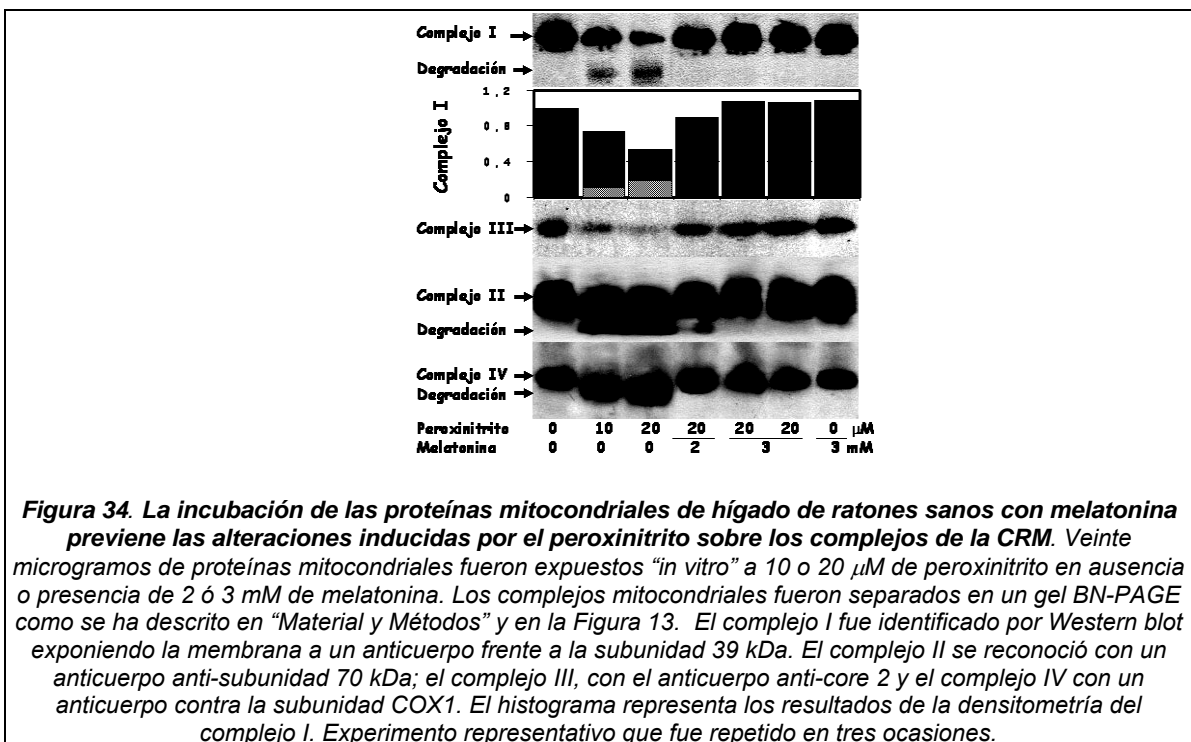
5.2.- La melatonina previene las alteraciones provocadas por el peroxinitrito “*in vitro*” sobre la respiración mitocondrial.

Como era de esperar, la incubación durante 10 minutos de las mitocondrias aisladas de ratones normales con 3 mM de melatonina evitó los cambios que el peroxinitrito provoca en la respiración de las mitocondrias. La respiración de las mitocondrias la estudiamos mediante el consumo de oxígeno basal, es decir, cuando las mitocondrias se encontraban suspendidas en el buffer, y tras la adición de succinato (estado 4 o de reposo) y de ADP (estado 3 o de fosforilación). Mediante el cociente de estos dos últimos, calculamos el Índice de Control Respiratorio. En la figura 33, que recoge estos cambios, vemos que la exposición de las mitocondrias a 30 μ M de peroxinitrito provoca un descenso muy marcado, significativo, tanto en la respiración basal como en el índice de control respiratorio. Si previamente a la exposición al peroxinitrito, las mitocondrias eran incubadas durante 10 minutos con 3 mM de melatonina, estos descensos en el consumo de oxígeno no se produjeron y quedaron al mismo nivel que las mitocondrias controles. Cuando las mitocondrias fueron incubadas con melatonina, sin la agresión del peroxinitrito, la respiración mitocondrial fue superior a la existente en las mitocondrias controles.



5.3.- La melatonina previene las alteraciones provocadas por el peroxinitrito “*in vitro*” sobre los complejos de la CRM completamente ensamblados y sus subunidades.

La figura 34 muestra que la incubación de las proteínas mitocondriales hepáticas de ratones delgados con solución 2 o 3 mM de melatonina anuló los efectos del peroxinitrito (10 o 20 μ M) sobre esas proteínas. Al igual que en experimentos previos, la exposición de esas proteínas a tan sólo 10 o 20 μ M de peroxinitrito provocó un descenso en la cuantía de los complejos I, II, III y IV así como la aparición de bandas de menor peso molecular que eran originadas por productos de degradación de esos complejos. La preincubación de esas proteínas con 2 o 3 mM de melatonina evitó la disminución de la cuantía de los complejos totalmente ensamblados y la aparición de los fragmentos de su degradación.



Con el fin de analizar esos cambios con más detalle, separamos las diferentes subunidades de los complejos en una segunda dimensión e identificamos los cambios que se producían en algunas subunidades representativas de cada complejo. En concreto, analizamos las subunidades 39, 30, 20, 17, 15 y 8 kDa, codificadas por el ADN genómico, y las subunidades ND1, ND2, ND4 y ND4L, codificadas por el ADNmt, así como las subunidades Core 2 y FeS del complejo III y la COX1 del complejo IV. Los resultados de este análisis

están recogidos en la figura 35. En ella se puede apreciar que la señal originada por la subunidad 39 kDa al ser expuesta a 20 μ M de peroxinitrito se desintegraba en una señal larga que se situaba preferentemente a 500 kDa, pero que se extendía hacia la derecha hasta el frente del recorrido de la electroforesis. Sólo un pequeño rastro se prolongaba hacia la izquierda aproximándose al que debería ser su peso molecular de 980 kDa. La morfología de la señal originada por la subunidad 39 kDa corresponde a la que es generada por la degradación de esa proteína en fragmentos de menor peso molecular. Cuando las proteínas mitocondriales habían sido incubadas previamente a la adición del peroxinitrito durante 10 minutos con 3 mM de melatonina, la morfología de la señal de esta subunidad era totalmente diferente, ya que su peso molecular se situaba correctamente en los 980 kDa y su extensión era hacia la izquierda, como es lo habitual. En este caso, no se observaba prolongación hacia la derecha, indicando que tras la incubación de las proteínas mitocondriales con melatonina no se habían formado fragmentos de menor peso molecular y, en consecuencia, que esta subunidad no había sufrido degradación a pesar de haber sido expuesta al peroxinitrito. Su extensión hacia la izquierda se debe a que en condiciones normales el complejo I forma supercomplejos con el complejo III. Esta unión del complejo I con el III tiene significación funcional ya que es necesaria para el correcto desplazamiento de los electrones a lo largo de la CRM. De las subunidades 30, 20, 17, 15 y 8 kDa del complejo I expuesto al peroxinitrito, sólo la subunidad 17 kDa presentaba una pequeña prolongación hacia la derecha. Esta prolongación de la señal es expresión de su degradación. Las señales originadas por estas cinco subunidades cuando habían sido pretratadas con 3 mM de melatonina mostraban, en comparación con las no tratadas, 1) que eran claramente más grandes, indicando que la cuantía de estas subunidades era mayor, 2) que se prolongaban hacia la izquierda, es decir, formando parte de supercomplejos y 3) que las subunidades 39 y 17 kDa carecían de prolongación hacia la derecha, es decir, no se encontraban fragmentadas. La morfología de la subunidad ND4L presentaba los mismos cambios descritos para la 39 kDa tras ser expuesta al peroxinitrito y, al igual que éste, la melatonina previno su degradación.

Los cambios que apreciamos en las dos subunidades analizadas del complejo III son similares a los descritos para las subunidades 39 kDa y ND4L, es

decir, la señal de estas subunidades se extendía, como una estela, hacia la derecha, hasta llegar al frente del recorrido de la electroforesis. Estos cambios, nuevamente, indican que la exposición de esas proteínas al peroxinitrito causa su degradación en fragmentos de menor peso molecular. Nada de esto ocurrió en las señales de estas subunidades cuando las proteínas mitocondriales habían sido incubadas previamente con 3 mM de melatonina durante 10 minutos. En este caso, la señal se situaba en los 500 kDa, que es el peso molecular del complejo III, y se extendía hacia la izquierda como corresponde a la formación de un supercomplejo con el complejo I.

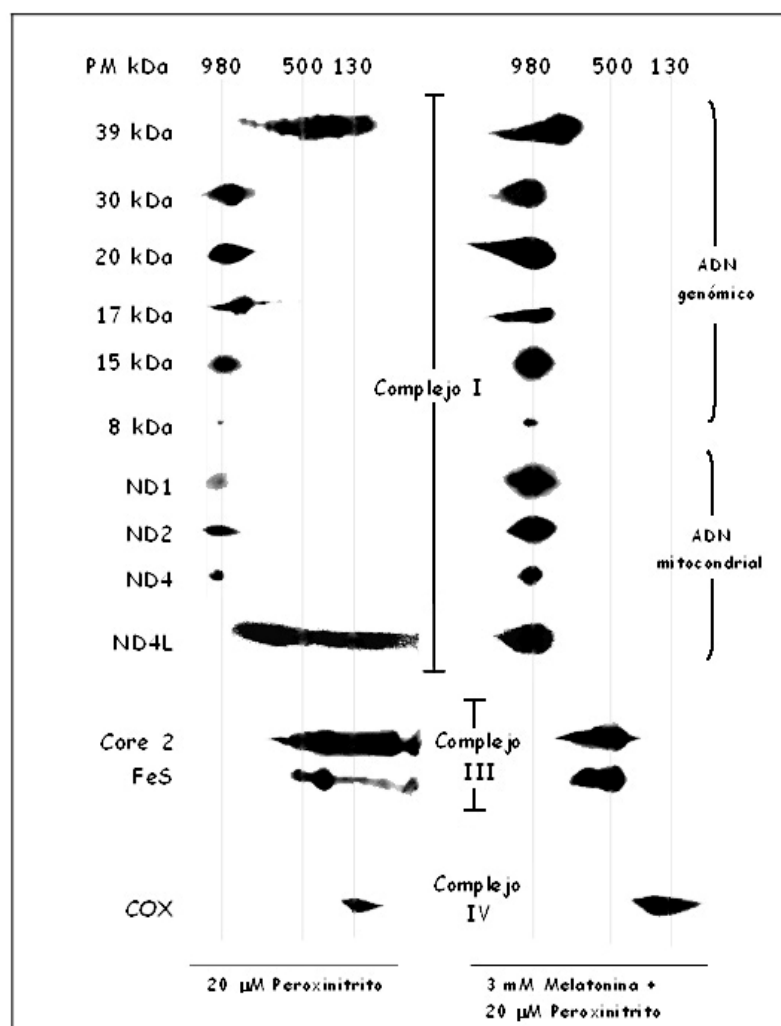
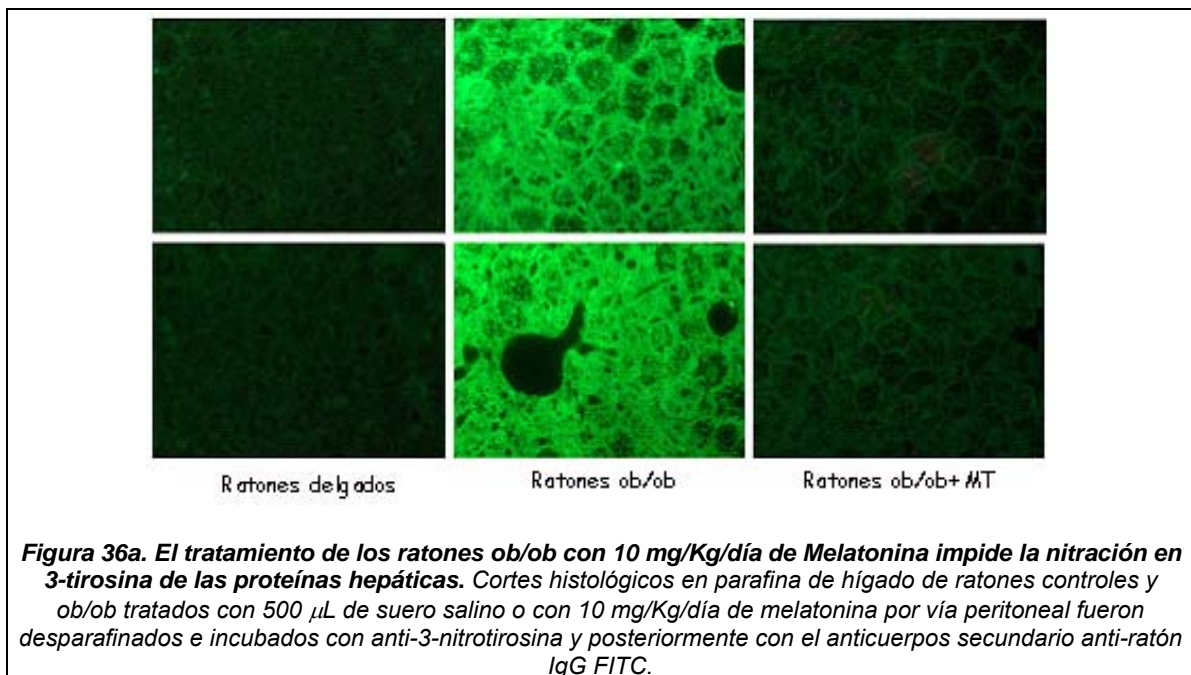


Figura 35. El pretratamiento de las proteínas mitocondriales con 3 mM de melatonina previene la degradación de las subunidades de los complejos respiratorios. Cincuenta microgramos de proteínas mitocondriales fueron expuestos "in vitro" a 20 μ M de peroxinitrito en ausencia o tras la incubación previa con 3 mM de melatonina durante 10 minutos. Los complejos mitocondriales fueron separados por electroforesis como se ha descrito en "Métodos" y en figura 14. Las subunidades de los complejos I, III y IV fueron identificadas por Western blot exponiendo la membrana a anticuerpos específicos frente a las subunidades 39, 30, 20, 17, 15 y 8 kDa, así como frente a las subunidades ND1, ND2, ND4 y ND4L del complejo I, a las subunidades Core 2 y FeS del complejo III y a la subunidad COX1 del complejo IV. Experimento representativo que fue repetido en tres ocasiones.

6.- El tratamiento de los ratones *ob/ob* con melatonina previene la aparición de lesiones hepáticas de esteatohepatitis y las alteraciones funcionales mitocondriales.

6.1.- El tratamiento de los ratones *ob/ob* con melatonina previene la nitración en 3-tirosina de las proteínas hepáticas.

Como muestra la figura 36a, el tratamiento de los ratones *ob/ob* con 10 mg/Kg/día de melatonina por vía peritoneal durante 12 semanas impide que las proteínas hepáticas y mitocondriales sufran la nitración en 3-tirosina. Como se puede reconocer en esta figura, la inmunofluorescencia del hígado de estos animales *ob/ob* así tratados se situaba en niveles similares a los de los animales delgados. Igualmente, la nitración de las proteínas mitocondriales era llamativamente menor en los ratones tratados con melatonina que en los *ob/ob* no tratados (Fig. 36b).



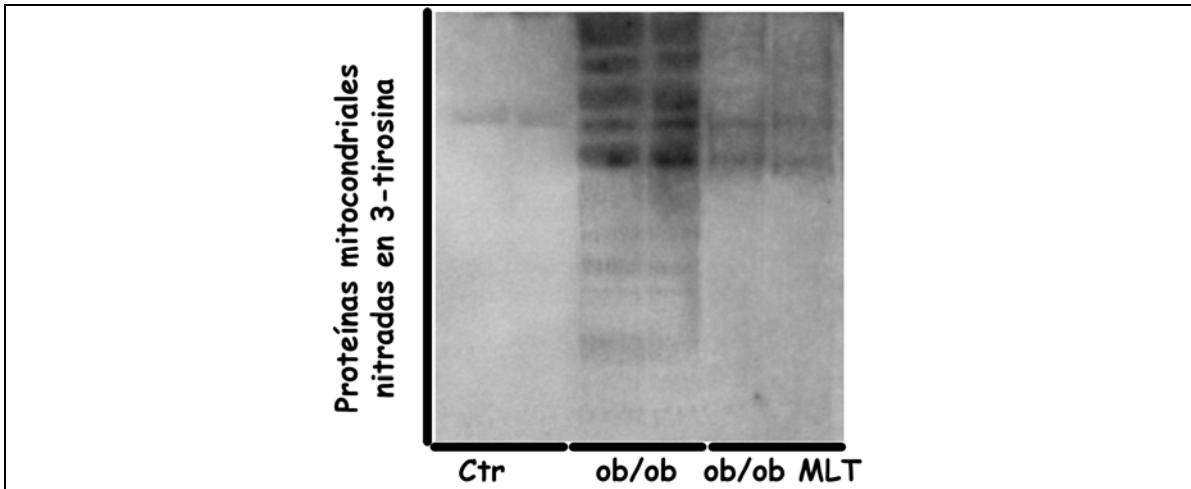


Figura 36b. El tratamiento de los ratones *ob/ob* con 10 mg/Kg/día de melatonina disminuye la nitración en 3-tirosina de las proteínas mitocondriales. Cincuenta microgramos de proteínas mitocondriales fueron separadas en un gel BN-PAGE según la técnica descrita en "Métodos". Estas proteínas procedían del hígado de ratones delgados (Ctr), *ob/ob* tratados con 500 μ l de suero salino y de *ob/ob* tratados con 10 mg/Kg/día de melatonina, Como se describe en "Material y Métodos" estos tratamientos se hicieron por vía peritoneal durante 12 semanas. La identificación de las proteínas mitocondriales nitradas en 3-tirosina se hizo exponiendo la membrana de difluoruro de polivinilo a anti-3-nitrotirosina.

6.2.- El tratamiento de los ratones *ob/ob* con melatonina disminuye el estrés oxidativo del hígado.

El tratamiento de los ratones *ob/ob* con 10 mg diarios de melatonina/Kg de peso durante 12 semanas por vía peritoneal normalizó tanto las concentraciones de TBARS como las de glutatión reducido mitocondrial y citoplásmico (Fig. 37).

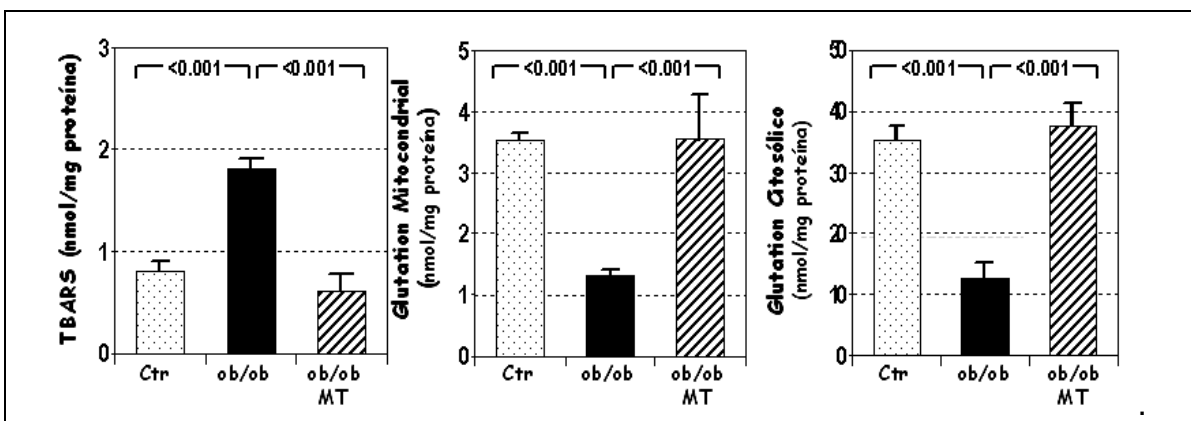
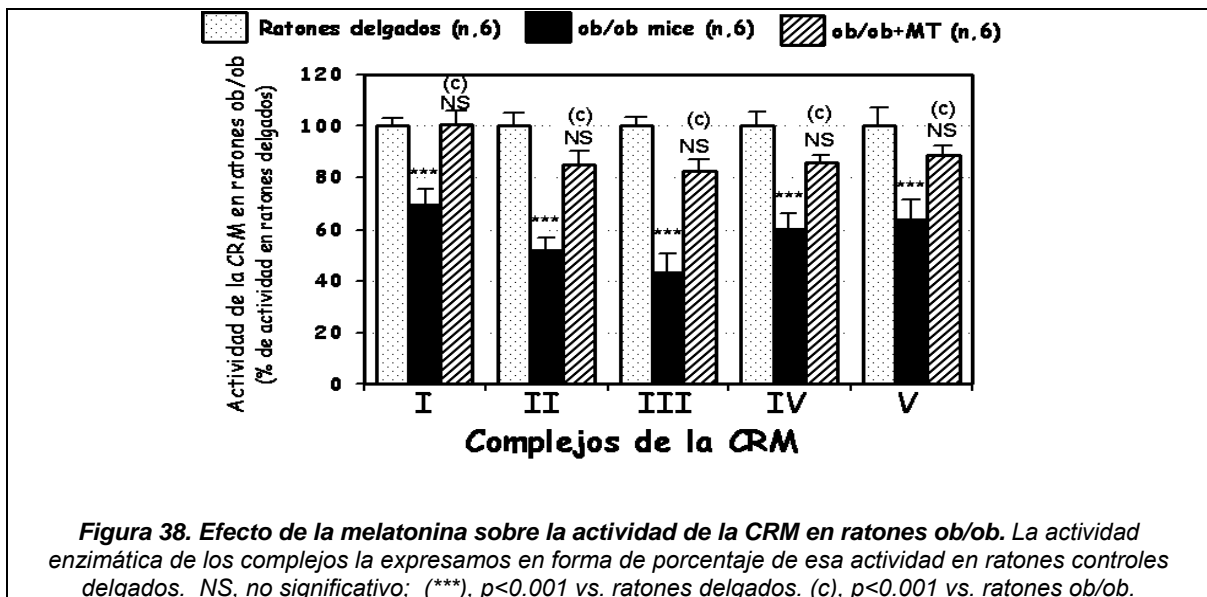


Figura 37. El tratamiento de los ratones *ob/ob* con melatonina evita el estrés oxidativo existente en el hígado de esos ratones. Se determinaron las concentraciones hepáticas de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) y las de glutatión reducido, citoplásmico y mitocondrial, en los ratones delgados (Ctr) y *ob/ob* tratados con 500 μ L de suero salino (*ob/ob*) o con 10 mg/Kg/día de Melatonina. Los valores están representados como media \pm SD.

6.3.- El tratamiento con melatonina de los ratones *ob/ob* evita la pérdida de actividad de los complejos de la CRM.

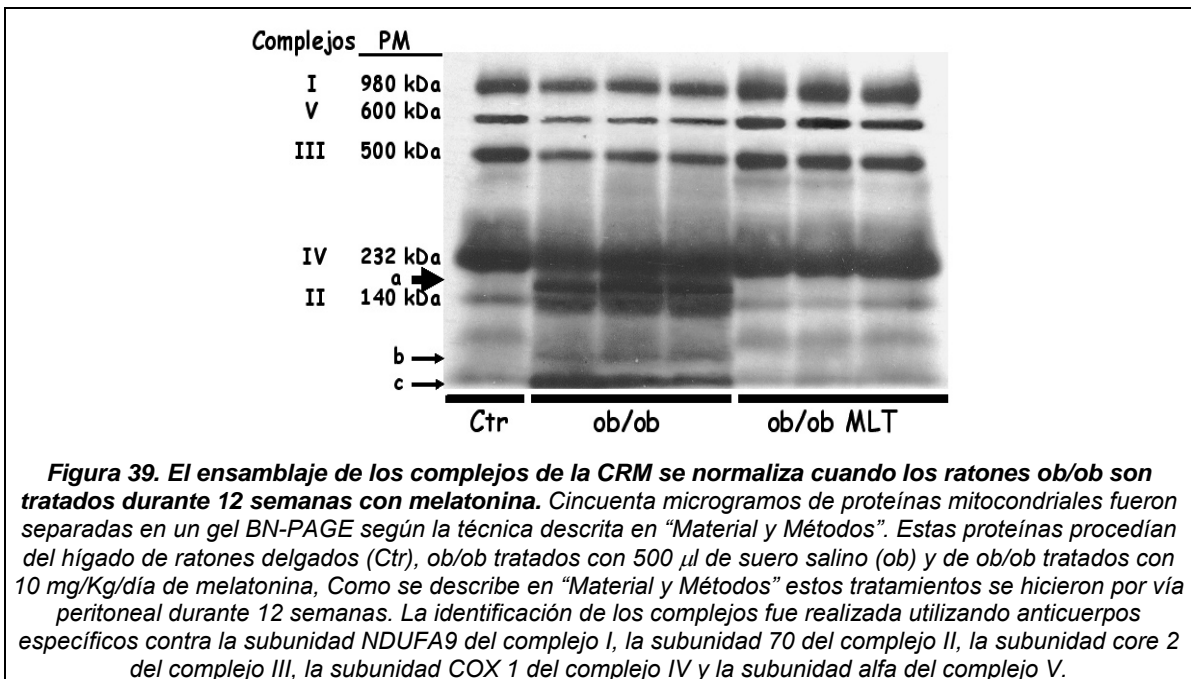
En los ratones *ob/ob* tratados durante 12 semanas con 10 mg/Kg/día de melatonina, la actividad enzimática de los complejos de la CRM se mantuvo en niveles no diferentes significativamente de los hallados en los ratones delgados. En la figura 38 se puede comprobar que la actividad de todos los complejos era significativamente superior en los ratones *ob/ob* tratados con melatonina que en los *ob/ob* tratados con suero salino. La actividad del complejo I en los ratones tratados con melatonina fue idéntica a la actividad de ese complejo en los ratones delgados. La actividad de los restantes complejos ascendió significativamente y aunque no alcanzó la actividad existente en los ratones delgados las diferencias entre ellos no era significativa.



6.4.- El tratamiento de los ratones *ob/ob* con melatonina aumenta la cuantía de los complejos de la CRM completamente ensamblados.

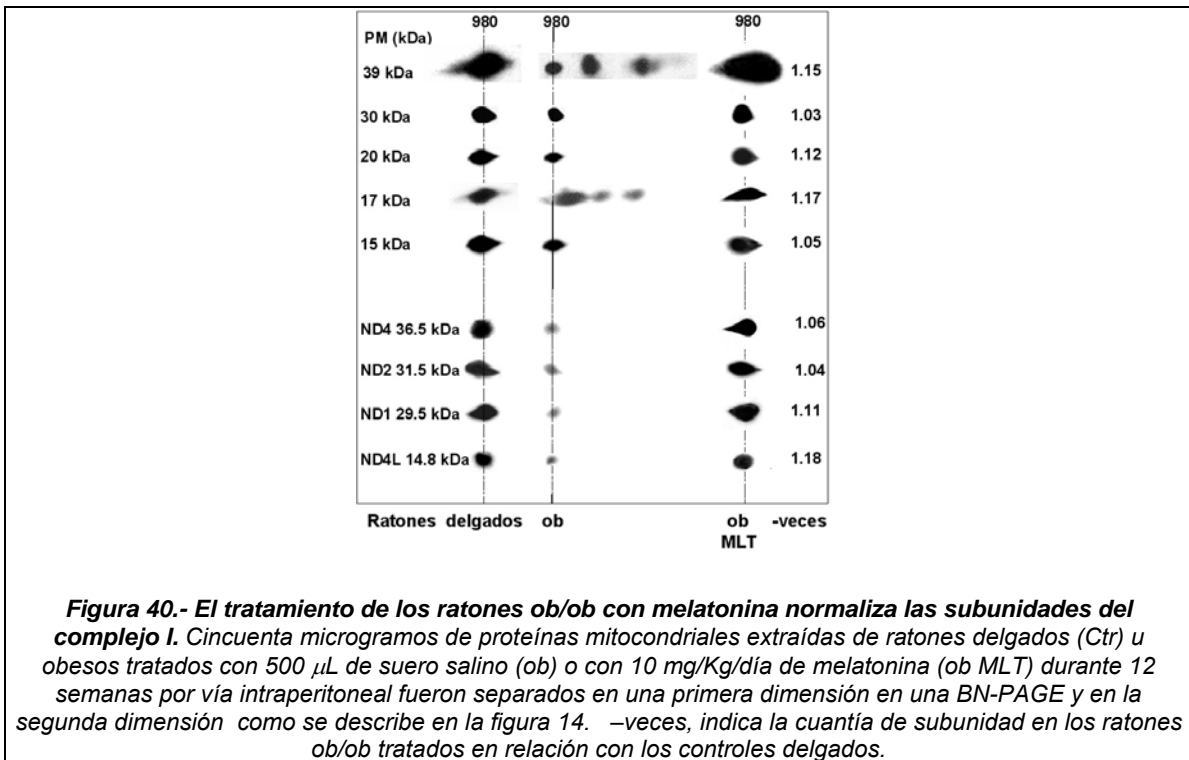
El estudio del grado de ensamblaje de los complejos tras el tratamiento de los ratones *ob/ob* durante 12 semanas con 10 mg/Kg/día de melatonina mostró que los cambios existentes en los ratones *ob/ob* no tratados habían desaparecido. La intensidad de las bandas originadas por los complejos I, III y IV era idéntica a la existente en los ratones delgados. No se reconocía la presencia de los subcomplejos situados entre los complejos II y IV (a) y por debajo del complejo II

(b), el complejo II volvía a tener el espesor del mismo complejo en los ratones delgados y, por último, tampoco se reconocía la señal que en los ratones *ob/ob* no tratados aparecía en el frente del recorrido de la electroforesis de muy bajo peso molecular (c).



6.5.- El tratamiento de los ratones *ob/ob* con melatonina normaliza las subunidades de los complejos de la CRM.

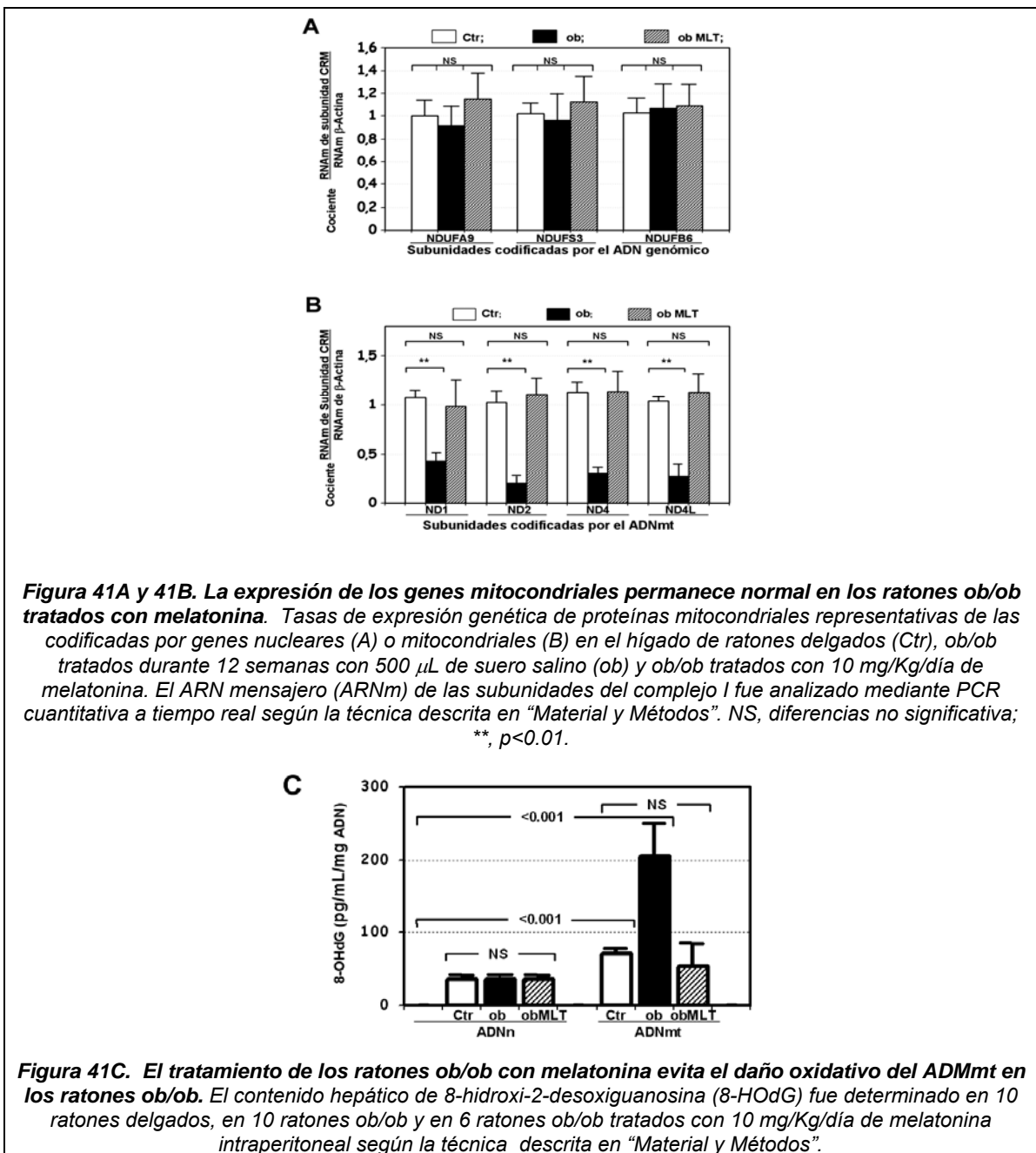
Cuando separamos las diferentes subunidades del complejo I en un gel SDS-PAGE de segunda dimensión comprobamos también que todos los cambios existentes en los ratones *ob/ob* habían desaparecido. En efecto, la intensidad de la señal formada por las subunidades del complejo I estudiadas era similar a la existente en los ratones delgados que tomamos como controles, muy superiores a las señales formadas por esas mismas subunidades en los ratones *ob/ob* no tratados. Además, en estos ratones no encontramos cambios sugerentes de un defecto en el ensamblaje de este complejo o de su degradación. Las subunidades 39 y 17 kDa, que en los ratones obesos no tratados aparecían en tres subcomplejos diferentes, en los tratados aparecían formando un solo complejo perfectamente ensamblado (Fig. 40).



6.6.- En los ratones ob/ob tratados con melatonina la expresión genética de las subunidades de codificación nuclear y mitocondrial es normal.

Con el fin de conocer si el tratamiento con melatonina mejora la expresión genética de las subunidades codificadas por el ADNmt, que como hemos visto más arriba está muy alterada en los ratones obesos, tratamos a ratones ob/ob con 10 mg/Kg/día de melatonina inyectada por vía intraperitoneal y en el tejido hepático determinamos la expresión genética de dos grupos de genes, unos codificados por el ADN nuclear (*NDUFA9*, *NDUFB6*, *NDUFS3*) y otros por el ADNmt (*ND1*, *ND2*, *ND4*, *ND4L*). Para ello, como describimos en el apartado de “Métodos”, determinamos los niveles de ARNm en el tejido hepático de tres grupos de ratones, controles, ob/ob y ob/ob tratados con melatonina. Este estudio revela que la expresión genética de las subunidades de codificación nuclear, que es normal en los ratones ob/ob, se modifica poco con el tratamiento (Fig. 41A). Por el contrario, la expresión genética de las subunidades codificadas por el ADNmt, que está muy baja en los ratones obesos, se normaliza en los ratones tratados (Fig. 41B). Esta normalización de la expresión genética de las subunidades codificadas por el ADNmt se acompañó de una mejoría significativa

del daño oxidativo al ADNmt. En efecto, las concentraciones del 8OHdG en el ADNmt descendieron de forma significativa a niveles que no se diferenciaban de forma significativa de las existentes en los ratones delgados (Fig. 41C).



6.7. La melatonina previene la aparición de lesiones de esteatohepatitis en los ratones ob/ob.

Como se describió más arriba, el parénquima hepático de los ratones ob/ob presentaba una intensa esteatosis que comprometía al 75% de los hepatocitos y que predominantemente (40%) era de tipo microvesicular (Fig. 4 y

42). Junto a ello, se observaba algún foco de células mononucleares dispersas por el parénquima y en los espacios porta (Fig. 4f), así como ocasional hialina de Mallory.

En los ratones *ob/ob* tratados con 10 mg/Kg/día de melatonina por vía peritoneal durante 12 semanas, el estudio histológico del hígado mostró cambios mínimos. En tres de los seis ratones la histología hepática era completamente normal, en dos existía ligera degeneración hidrópica en la zona 3 y en uno existía una mínima esteatosis microvesicular difusa y algún fenómeno apoptótico aislado sin preferencia por una zona concreta del lobulillo. No existían fenómenos inflamatorios, esteatosis ni fibrosis (Fig. 42).

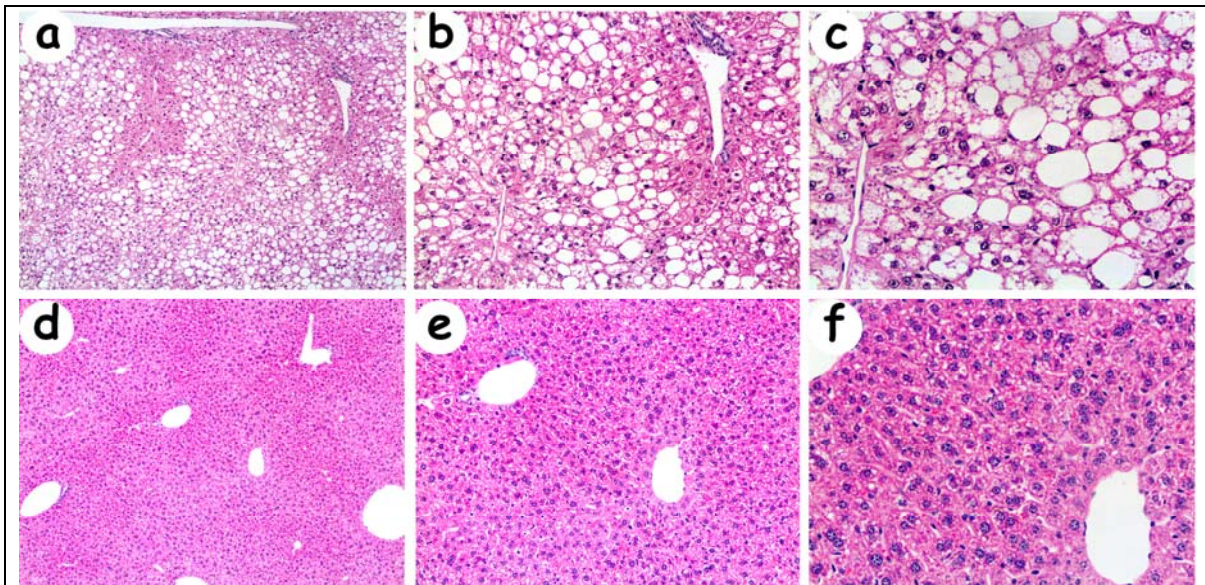


Figura 42. Efecto del tratamiento de los ratones *ob/ob* con 10 mg/g/día de melatonina i.p. durante tres meses. a – c, ratones *ob/ob* tratados con 500 µL de suero salino por vía peritoneal durante 12 semanas; d – f, ratones *ob/ob* tratados con 10 mg/Kg/día de melatonina por vía peritoneal durante el mismo tiempo. H&E X100 (a,d); x200 (b,e), x400 (c,f).

6.8.- El tratamiento de los ratones *ob/ob* con melatonina disminuye el contenido hepático en triglicéridos y las tasas séricas de transaminasas.

El efecto beneficioso observado con la melatonina sobre la histología hepática fue ratificado por los estudios de la concentración de triglicéridos en el hígado y por las tasas de transaminasas séricas. Como muestra la figura 43, la concentración de triglicéridos en el hígado descendió de forma significativa en los

Resultados

ratones sometidos al tratamiento con melatonina desde $66,6 \pm 11,6$ mg/g de tejido hepático en los ratones *ob/ob* hasta $22,19 \pm 4,3$ mg/g en los *ob/ob* tratados con melatonina ($p < 0.001$). Igualmente, las transaminasas séricas descendieron muy significativamente y se aproximaron a las existentes en los ratones delgados, controles.

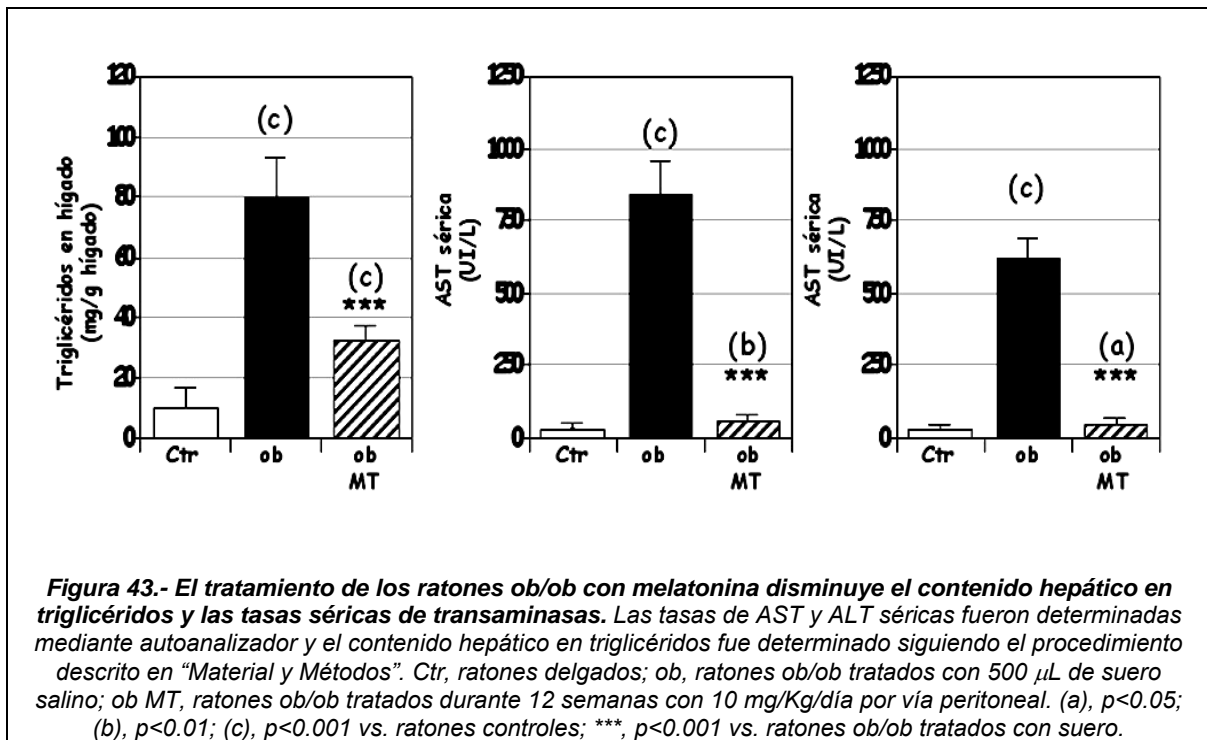


Figura 43.- El tratamiento de los ratones *ob/ob* con melatonina disminuye el contenido hepático en triglicéridos y las tasas séricas de transaminasas. Las tasas de AST y ALT séricas fueron determinadas mediante autoanализador y el contenido hepático en triglicéridos fue determinado siguiendo el procedimiento descrito en "Material y Métodos". Ctr, ratones delgados; ob, ratones *ob/ob* tratados con 500 μ L de suero salino; ob MT, ratones *ob/ob* tratados durante 12 semanas con 10 mg/Kg/día por vía peritoneal. (a), $p < 0.05$; (b), $p < 0.01$; (c), $p < 0.001$ vs. ratones controles; ***, $p < 0.001$ vs. ratones *ob/ob* tratados con suero.

DISCUSIÓN.

El presente estudio confirma que el hígado de los ratones *ob/ob* empleados en esta investigación presentaban lesiones de EGHNA y que la actividad enzimática de los complejos de la CRM y el consumo mitocondrial de oxígeno se encontraban muy reducidos. Como muestra la figura 6, la actividad de la CRM oscilaba entre el 70% de la actividad en los ratones delgados del complejo I y el 43% de la actividad del III. Igualmente, el consumo de oxígeno estaba reducido al 57%. Estos resultados son concordantes con los que García-Ruiz et al. hallaron en otro grupo de ratones *ob/ob* (122) y con lo que Pérez-Carreras et al. encontraron en pacientes diagnosticados de EHNA (115).

Con el fin de profundizar en el conocimiento de los mecanismos por los que en los pacientes con EHNA y en ratones *ob/ob* la actividad de la CRM está disminuida, estudiamos el grado de ensamblaje de los complejos mitocondriales recurriendo a técnicas proteómicas, en concreto, a la electroforesis en gel de gradiente de acrilamida en condiciones en las que los complejos no han sido disociados en sus múltiples péptidos. Es lo que Schägger y von Jagow denominaron “*Blue Native Electrophoresis*” (BN-PAGE) (293). De esta forma, mostramos que la cuantía de todos los complejos de la CRM de los ratones *ob/ob* se encontraba llamativamente disminuida (Fig. 7), lo cual es suficiente para justificar que la actividad de esas enzimas se encuentre reducida en estos animales y, presumiblemente, también en los pacientes con EHNA.

Para conocer cómo se encontraban las subunidades que componen cada uno de los cinco complejos de la CRM, expusimos el gel de acrilamida en el que habíamos separado los complejos a una solución de 1% SDS/1% β -mercaptoetanol (SDS/ β ME) durante una hora. En ese tiempo y por efecto del SDS/ β ME, las subunidades de los complejos se separan unas de otras y pueden ser analizadas individualmente. Para lograrlo, cada cinta del gel conteniendo los complejos ya desnaturalizados por el SDS/ β ME se sometió a una nueva electroforesis en segunda dimensión. De esta forma, todas las subunidades de todos los complejos quedan separadas y se pueden analizar por “*Western blot*” utilizando anticuerpos específicos para cada subunidad. Mediante esta electroforesis de segunda dimensión pudimos comprobar que la cuantía de todas las subunidades analizadas estaba también marcadamente disminuida en los

ratones obesos. Este descenso fue particularmente marcado en las subunidades codificadas por el ADNmt (Fig. 8). En efecto, mientras las subunidades codificadas por el ADN genómico estaban descendidas a aproximadamente el 50% de la cuantía existente en los ratones delgados que tomamos como controles, las codificadas por el ADNmt lo estaban a aproximadamente el 17% de los controles. Este mayor descenso de las subunidades de codificación mitocondrial pudiera indicar que en su disminución participan mecanismos adicionales a los que intervienen en el descenso de las subunidades codificadas por el ADN genómico.

La baja cuantía de los complejos de la CRM y de sus subunidades puede ser ocasionada por un **descenso en la síntesis de sus componentes**, por un **defecto en el ensamblaje** de esas subunidades para formar los complejos, por una **menor estabilidad de los complejos** o de sus subunidades y en consecuencia por su degradación y, finalmente, por una **combinación de los mecanismos anteriores**.

Un **descenso de la síntesis de las proteínas y péptidos** que componen los complejos de la CRM pudiera justificar que la cuantía de los complejos y de sus componentes esté disminuida. El complejo I de la CRM, el primero y más complicado de todos ellos, está constituido por 46 péptidos diferentes, 39 de ellos están codificados por el ADN genómico y los siete restantes (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6) por el ADNmt. El ADNmt consiste en una doble cadena de ADN de unos 16,500 pares de bases que son traducidos por los ribosomas mitocondriales. La expresión de estos genes está determinada por el número de copias de ADNmt (294). Por ello, cuando el número de estas copias disminuye, también lo hace el número de las correspondientes proteínas. Con el fin de conocer si el descenso de esos complejos en los ratones obesos se debe a una disminución en la síntesis de las subunidades que los componen, determinamos la expresión genética de algunos componentes representativos del complejo I mediante RT-PCR. Este estudio mostró claramente que la expresión genética de las subunidades codificadas por el ADNmt (ND1, ND2, ND4, ND4L) estaba en los ratones *ob/ob* disminuida al 30% del nivel existente en los ratones delgados (Fig. 9B). Por el contrario, la expresión genética de las subunidades codificadas por el ADNn (NDUFA9, NDUFB6, NDUFS3) se encontraba normal, no diferente a la existente en los ratones delgados (Fig. 9A). Estos resultados pueden explicar que

la cuantía de las subunidades de codificación mitocondrial esté disminuida pero no que también lo esté la de las subunidades codificadas por el ADNn. Esto indica que algún otro factor, además de la síntesis reducida, debe estar interviniendo para justificar el descenso de las subunidades de los complejos mitocondriales. El hecho de que las subunidades codificadas por el ADNmt estén mucho más descendidas que las de codificación nuclear permite suponer que en el descenso de las últimas interviene un factor mientras que en el descenso de las primeras probablemente se suman más de un factor. No existen estudios previos que hayan analizado la expresión genética de las proteínas mitocondriales en los pacientes con EHNA o en ratones *ob/ob*. Tan sólo contamos con un breve estudio de Haque et al., publicado en forma de resumen, en el que mostraban que la expresión de la subunidad COX-II del complejo IV, codificada por el ADNmt, estaba disminuida en los pacientes con EHNA, mientras que la expresión de la subunidad COX-IV, de codificación nuclear, era normal (295).

El estrés oxidativo a través de las ROS puede justificar que la síntesis proteica esté disminuida, ya que esas sustancias pueden fragmentar al ADN y oxidar a sus bases lo que causa depleción de ADN, preferentemente mitocondrial (296, 297), y, con ello, detener o interferir con la síntesis de polipéptidos de la CRM codificados por el ADNmt, tales como el ND1 o las COX-I, COX-II y COX-III y provocar esteatosis hepática (298). Con el fin de comprobar si realmente el ADN de los ratones obesos está sufriendo daño oxidativo, determinamos las concentraciones de 8-OHdG, un marcador de daño oxidativo del ADN (299) en los núcleos y mitocondrias de esos animales. Este estudio mostró que el 8-OHdG estaba significativamente aumentado en el ADNmt pero no en el ADNn (Fig. 10). El ADNmt está localizado en la matriz mitocondrial, próximo a la CRM donde se genera la mayoría de los ROS. Por ello, el ADNmt está más expuesto a las ROS que el ADNn (300). Además, el ADNmt carece de histonas protectoras frente a las ROS y los sistemas de reparación mitocondrial del ADN son menos eficaces que los existentes en el ADN genómico (301). Consecuencia de esta agresión oxidativa, en el ADNmt se van acumulando lesiones que pueden reducir la síntesis de los péptidos de la CRM codificados por este ADN (302). Nuestro estudio muestra que en el hígado de los ratones *ob/ob* existe estrés oxidativo y que éste es responsable del descenso de las subunidades de codificación mitocondrial, ya que al tratar durante tres meses a los ratones obesos con dosis

antioxidantes de MnTBAP, no sólo se normaliza la cuantía de los complejos (Fig. 13) y de sus componentes (Fig. 14), sino también de todas las subunidades estudiadas, principalmente de las codificadas por el ADNmt (Fig. 15). El MnTBAP es un análogo de la superóxido dismutasa mitocondrial que transforma al radical hidroxilo (OH^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). García-Ruiz et al. (122) mostraron que este análogo de la superóxido dismutasa no sólo mejoraba la actividad de la CRM sino que también reducía la gravedad de las lesiones hepáticas de EHNA, lo que apoya el papel decisivo que tiene la disfunción mitocondrial en la patogenia de la EHNA.

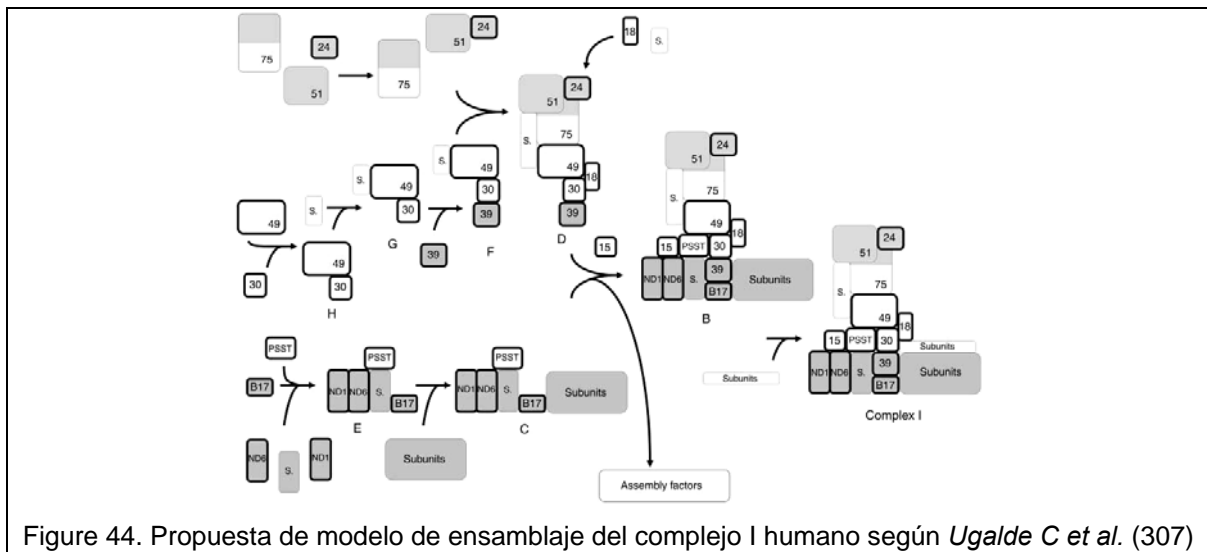
Con independencia del papel que puedan jugar las ROS, también las RNS parecen participar en la lesión del ADN, ya que en los ratones *ob/ob* tratados con ácido úrico la expresión genética de las proteínas de la CRM se normaliza (Fig. 24). A favor del papel que puedan jugar las RNS, algunos autores han mostrado que la exposición de las células al peroxinitrito da lugar a un descenso del ARN mitocondrial (303, 304). De hecho, el peroxinitrito puede lesionar al ADN mediante la desaminación y nitración de la guanina (305, 306).

Otro mecanismo por el que puede estar disminuida la cuantía de los complejos de la CRM es por un **defecto en el proceso de ensamblaje de sus componentes**. No se conoce bien cómo se produce el ensamblaje de los diferentes componentes de los complejos. La mayoría de los datos de que disponemos proceden de estudios realizados en el hongo *Neurospora crassa*, cuyo complejo I consta de 35 subunidades (307). Por ello sabemos que antes de producirse el ensamblaje del complejo I, se forman diversos intermediarios por la sucesiva unión de las diferentes subunidades que forman la porción membranosa y periférica de este complejo (308) (Fig. 44). En el hombre, es probable que el proceso no sea igual. Así, el estudio de este proceso en células humanas ha mostrado que el ensamblaje del complejo I se inicia con la formación de varios subcomplejos independientes tras la agregación de diferentes subunidades. Uno de estos subcomplejos, correspondiente a la rama periférica del complejo I, se forma por la unión de la subunidad 30 kDa con la 45 kDa y a continuación con la 39 kDa, 18 kDa y 24 kDa. El segundo subcomplejo intermedio de la porción membranosa del complejo I contiene la subunidad B17 a la que se agregan las subunidades ND1, ND6 y PSST. Estos dos subcomplejos, membranoso y periférico, terminan por unirse y al resultante siguen fijándose otras subunidades

hasta formar el complejo de 950 kDa que migra en la electroforesis muy próximo al complejo I completamente ensamblado. La diferencia entre este último y su precursor de 950 kDa se debe probablemente a cambios en su conformación molecular (309, 310). Cuando este proceso de ensamblaje falla, junto a la marca originada por el complejo totalmente ensamblado aparecen otras de menor peso molecular que corresponden a los subcomplejos que no han terminado por unirse. Este patrón de subcomplejos de menor peso molecular lo reconocemos en los ratones *ob/ob* cuando las proteínas de la CRM las separamos en una primera dimensión (Fig. 7), pero, sobre todo, en la electroforesis de segunda dimensión (Fig. 8). En efecto, en la electroforesis de primera dimensión encontramos que las bandas correspondientes a los complejos I, III, IV y V están disminuidas de intensidad, pero por debajo de ellas se aprecian otras bandas anchas de menor peso molecular que deben corresponder a subcomplejos no ensamblados con la porción principal. Esto es particularmente evidente en el caso de la banda situada entre los complejos IV y II, no existente en los ratones delgados. El complejo II de los ratones *ob/ob* tiene una anchura superior a la homóloga en ratones controles, lo que probablemente se debe a que existen subcomplejos que tienen un peso molecular similar al del complejo II. El análisis de las subunidades de los complejos I y III demuestra cambios debidos al defecto en el ensamblaje de estos complejos (Fig. 8). Así, la subunidad 39 la vemos repartida entre tres subcomplejos; uno situado a 980 kDa, otro a unos 500 kDa y un tercero a unos 140 kDa. La subunidad 17 kDa la vemos también en tres subcomplejos de 980, 500 y 200 kDa. La subunidad FeS del complejo III muestra también su presencia en dos subcomplejos principales, a 500 y 50 kDa, pero entre ambos aparece una estela mal definida que no llega a formar complejos. Por ello, podemos concluir que, además de la menor síntesis de los péptidos de codificación por el ADNmt, en la disminución de los complejos observados en la electroforesis de primera dimensión participa también un defecto en el ensamblaje de los subcomplejos para formar el complejo final totalmente ensamblado y funcional.

El porqué de este defecto en el ensamblaje de los complejos es difícil de explicar, ya que es poco lo que se sabe sobre los factores que participan en este proceso. No obstante, se sabe que algunas de las subunidades codificadas por el ADNmt, las subunidades ND, son necesarias para que el ensamblaje se produzca correctamente. Por ejemplo, se sabe que la ausencia de las subunidades ND1 y

ND6 se sigue de una disminución del complejo I completamente ensamblado y de la aparición de subcomplejos de 160-210 kDa. Lo mismo ocurre cuando faltan otras subunidades ND, por ejemplo, las subunidades ND2, ND3, ND4 o ND4/ND6 (309, 311 – 314). Por ello, es posible que en los ratones *ob/ob*, en los que la síntesis de las subunidades de codificación por el ADNmt está disminuida por la alteración del ADNmt inducido por el estrés oxidativo, la carencia de estas subunidades sea la responsable de que el ensamblaje de los complejos no se realice correctamente y, en consecuencia, que la actividad enzimática esté disminuida.



La tercera opción por la que los complejos de la CRM pudieran estar disminuidos es porque **su degradación esté aumentada**. Este mecanismo puede justificar, no sólo que estén bajas las subunidades codificadas por el ADNmt sino también la reducción en las subunidades codificadas por el ADN genómico, cuya síntesis es normal. El hecho de que las subunidades codificadas por el ADNmt estén descendidas significativamente más que las codificadas por el ADN genómico pudiera explicarse porque mientras en el descenso de estas últimas interviene sólo un mecanismo –degradación– en el descenso de las primeras intervendrían más de uno –degradación y baja síntesis–. El análisis de las subunidades de los complejos muestra algunos cambios que sugieren la degradación de las proteínas de la CRM. Por ejemplo, la morfología de las subunidades del complejo III, core 2 y FeS, así lo sugiere. En los ratones *ob/ob*, el núcleo principal de la subunidad core 2 va seguida de una cola hacia la derecha, de menor peso molecular, que no llega a formar ningún subcomplejo y que está formada por escasas cuantías de fragmentos del complejo III reactivo con el

anticuerpo anti-Core 2. Lo mismo ocurre con la subunidad FeS que se reparte en dos fracciones, una situada donde lo hace el complejo III, 500 kDa, y otra casi en el frente del recorrido de la electroforesis. Entre ambas se sitúa una estela de fragmentos reactivos con el anticuerpo anti-FeS que no llegan a formar subcomplejos. También la subunidad 39 kDa del complejo I muestra, además de los tres núcleos principales ya descritos, una estela que prolonga el subcomplejo de menor tamaño hacia la derecha. Esta estela debe ser originada por los pequeños fragmentos que siguen a la degradación del complejo.

Se han reconocidos varios factores que están implicados en la estabilización del complejo I. Entre estos figura la prohibitina (315), el complejo III (310, 316) y las proteínas NDUFAF1 (317) y B17.2 (318). La **prohibitina** es un miembro de una familia de proteínas altamente conservadas que se encuentra anclada a la membrana interna de las mitocondrias, donde se une directamente a proteínas mitocondriales recién sintetizadas, incluidas las subunidades de los complejos (315, 319, 320), a las que estabiliza contra la degradación por las metaloproteasas AAA de las membranas (321 – 324). La delección de los genes que codifican a la prohibitina se sigue de la degradación acelerada de las proteínas de membrana por las proteasas AAA (322), mientras que la sobreexpresión de prohibitina provoca lo contrario, es decir, estabiliza a los péptidos contra su degradación (323). Considerando el papel protector que tiene la prohibitina contra la degradación de los complejos, medimos los niveles de prohibitina existentes en el hígado de los ratones *ob/ob* y comprobamos que la prohibitina está marcadamente disminuida en esos ratones en relación con la existente en los ratones delgados. Estos resultados son concordantes con los publicados por otros autores (325, 326). Por ello, el descenso de los niveles de prohibitina en los ratones *ob/ob* pudiera favorecer la degradación de los componentes de los complejos y, en consecuencia, la disminución de la cuantía de las subunidades que forman los complejos de la CRM. No conocemos la causa de ese descenso de los niveles de prohibitina en el hígado de los ratones *ob/ob*; sin embargo, considerando que sus niveles se recuperan en los ratones sometidos a tratamiento con ácido úrico o MnTBAP, es muy probable que ese defecto esté relacionado también con el estrés oxidativo y con el aumento de formación de anión peroxinitrito en los ratones obesos. De hecho, la prohibitina es una proteína que puede ser también nitrada y sufrir las consecuencias de su

nitricación, incluida su degradación (327). Nuestro estudio muestra que la prohibitina de las mitocondrias de los ratones *ob/ob* está nitrada y degradada en moléculas de bajo peso molecular. También la proteína B17.2, protectora de los complejos mitocondriales, puede ser modificada por el peroxinitrito (286).

Otro factor que protege a los complejos de su degradación, en especial al complejo I, es el complejo III (310, 316). Nuestro estudio muestra que la señal electroforética originada por el complejo III estaba también reducida de espesor y el análisis de sus subunidades mostraba signos de un acoplamiento incompleto y de degradación. El tratamiento de los ratones *ob/ob* con ácido úrico o con MnTBAP normalizó la cuantía del complejo III (Fig. 22) lo que sugiere que en el descenso de este complejo también interviene el estrés oxidativo y el peroxinitrito.

En un estudio previo de nuestro grupo, se sugirió que la disfunción de la CRM y las lesiones hepáticas que existían en los pacientes con EHNA y en los ratones obesos, *ob/ob*, probablemente se debían a los efectos del peroxinitrito o de algún radical derivado de él sobre las proteínas mitocondriales. El peroxinitrito es un agente oxidante y nitrante que reacciona con gran número de moléculas, incluidos lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ADN (240). Sobre las proteínas reaccionan con los grupos fenólicos, en especial con la tirosina para formar 3-nitrotirosina (328). Por este medio, multitud de enzimas y proteínas celulares estructurales son alteradas y pierden total o parcialmente su actividad. Por ello, se considera que el peroxinitrito juega un papel importante en multitud de procesos patológicos. De hecho, proteínas nitradas en 3-tirosina se encuentran en al menos 80 enfermedades diferentes, incluidas lesiones arterioescleróticas, inflamatorias, neurológicas y, como vemos en este estudio, también en la EHNA (143, 329 – 331). La sospecha del papel del peroxinitrito en la hipoactividad de la CRM se basó en una serie de observaciones que quedaron recogidas en el artículo de García-Ruiz I et al. (122). En él se mostró que el hígado de los ratones obesos, *ob/ob*, presentaba una intensa nitricación en 3-tirosina de las proteínas hepáticas, incluidas las mitocondriales y las de la CRM. Además, el tratamiento de los ratones *ob/ob* con 20 mg/día de ácido úrico durante 12 semanas mejoraba la actividad de la CRM, principalmente la de los complejos I y V, que se normalizaban, y la de los complejos II y III, pero no la del complejo IV. Se considera que el ácido úrico es un potente eliminador natural del peroxinitrito y de otros derivados reactivos del peroxinitrito (217, 218). Este ácido se une al

peroxinitrito dando lugar a uratos nitrados inactivos (332). Se ha demostrado que el ácido úrico inhibe la formación de proteínas nitradas en 3-tirosina y previene la aparición y progresión de las lesiones neurológicas que surgen en el curso de modelos experimentales de encefalitis en los que se ha demostrado que el peroxinitrito juega un papel patogénico decisivo (151, 215, 333).

Las mitocondrias son diana del peroxinitrito. Éste puede difundir desde el citoplasma o se puede formar dentro de ellas (334, 335). Se ha comprobado que numerosas enzimas mitocondriales pueden ser nitradas en 3-tirosina y posteriormente inactivadas. Por ejemplo, la Mn-superóxido dismutasa, una enzima con un potente efecto antioxidante, es nitrada en Tyr³⁴ e inactivada (336, 337). Lo mismo ocurre con la aconitasa, el canal de aniones dependiente del voltaje, la ATPasa, la succinil-CoA oxoácido-CoA transferasa (338, 339) y los complejos de la CRM (146, 340 – 345).

En el presente estudio confirmamos que las proteínas hepáticas de los ratones *ob/ob* están intensamente nitradas en 3-tirosina (Figs. 16 y 17) y comprobamos que entre las proteína nitradas se encuentran algunas de la CRM (Fig. 18). Esta nitración parece poseer significación funcional ya que si se evita la nitración de las proteínas hepáticas (Figs. 19, 20), administrando ácido úrico a los ratones *ob/ob* durante 12 semanas, la actividad de los complejos de la CRM se mantiene en los niveles normales (Fig. 21). Además, como hemos dicho más arriba, el ácido úrico normalizó la cuantía de todos los complejos identificados en la BN-PAGE de primera dimensión y la de todas las subunidades del complejo I analizadas en la SDS-PAGE de segunda dimensión (Figs. 22 y 23). Todos estos hallazgos apoyan el papel que el peroxinitrito puede jugar en la patogenia de las alteraciones mitocondriales de los ratones *ob/ob*.

Con el fin de reforzar el apoyo al papel del peroxinitrito en la patogenia de las alteraciones de la cadena respiratoria mitocondrial, expusimos “*in vitro*” proteínas mitocondriales extraídas de hígado de ratones delgados, normales, a los efectos de dosis crecientes de peroxinitrito. Como muestra la figura 25, el peroxinitrito provoca un aumento de la nitración de las proteínas cuya intensidad se relaciona con la dosis de peroxinitrito. Al determinar sus efectos sobre la actividad del complejo I de la CRM y sobre la respiración mitocondrial, vemos cómo estas actividades disminuyen a medida que aumenta la dosis de peroxinitrito (Figs. 26 y 27). Además, el peroxinitrito disminuye la cuantía del

complejo I en el BN-PAGE y determina la formación de subcomplejos y la aparición de una estela proteica reactiva con los anticuerpos frente a las proteínas del complejo I (Fig. 28). Finalmente, el peroxinitrito determinó que la cuantía de todas las subunidades analizadas disminuyera y que algunas de ellas se prolongaran hacia la derecha en forma de una estela de menor peso molecular correspondiente a productos de su degradación. Es decir, la exposición de las proteínas mitocondriales al peroxinitrito provoca en la CRM unos cambios funcionales y estructurales similares a los que se encuentran en los ratones *ob/ob*.

Según la hipótesis formulada por nuestro grupo, el proceso que daría lugar a la formación del peroxinitrito se iniciaría con el aumento de $TNF\alpha$ en el hígado lo que determinaría el aumento en éste de la expresión de la iNOS y ello, la formación de peroxinitrito por la reacción del óxido nítrico con el anión superóxido (122). Es bien sabido que el $TNF\alpha$ es un potente inductor de $NF\kappa B$, que la actividad de este factor de transcripción está muy aumentada en los ratones *ob/ob* (119) y que el gen de la iNOS figura entre los que responden al $NF\kappa B$ (140). Además, el $TNF\alpha$ interfiere con la función de la CRM, dificultando el flujo de electrones a través de los complejos I y III (133, 134) por lo que aumenta la formación de anión superóxido. En el estudio previamente mencionado, nuestro grupo demostró que las tasas de $TNF\alpha$ en el hígado estaban aumentadas más de 8 veces y que cuando los ratones eran tratados durante tres meses con anti- $TNF\alpha$, la actividad de la iNOS disminuía, la nitración de las proteínas hepáticas se normalizaba, la actividad de los complejos aumentaba de forma llamativa y las lesiones histológicas de EHNA desaparecían. Concordantes con estos resultados están los de Li et al. quienes encontraron que las tasas de $TNF\alpha$ -mRNA están muy aumentadas en el hígado de los ratones *ob/ob* (119). Igualmente, las tasas séricas de $TNF\alpha$ se encuentran muy elevadas en los pacientes con EHNA (115, 346) y se correlacionan de forma negativa con la actividad de la CRM (115). Igualmente concordante con esta hipótesis son los resultados del estudio de Laurent et al. (98) quienes mostraron que en el hígado de los ratones *ob/ob* las concentraciones de nitratos y nitritos estaban muy elevadas. El origen del $TNF\alpha$ en el hígado de esos ratones no la hemos investigado en estos estudios, si bien se acepta que el tejido adiposo abdominal, los hepatocitos y las células de Kupffer son fuentes importantes de $TNF\alpha$ (138, 139). Diversos estudios han demostrado que los ácidos grasos libres, cuyas tasas en sangre e hígado están muy elevadas en los pacientes con

hígado graso, son capaces de aumentar la expresión del TNF α en los hepatocitos (347) y en las células adiposas (348). Por todo ello, es probable que la obesidad abdominal sea una de las fuentes de TNF α y de ácidos grasos que llegan al hígado por la porta y provocan en él sus efectos.

Se conoce muy poco sobre los mecanismos por los que el peroxinitrito provoca las alteraciones moleculares que hemos mencionado, pero es muy probable que esas alteraciones se produzcan por oxidación y nitración de esas moléculas. En efecto, el peroxinitrito puede oxidar a los ácidos grasos insaturados dando lugar a la formación de TBARS y dienos conjugados (349). Igualmente, puede oxidar a diversos antioxidantes y, con ello, eliminar algunos de los mecanismos defensivos que las células disponen frente al estrés oxidativo. Entre estos antioxidantes que pueden ser oxidados por el peroxinitrito figuran el glutatión, el ácido ascórbico y el α -tocoferol (350 – 352). Las proteínas, además de ser nitradas en los residuos de tirosina, pueden ser oxidadas por el peroxinitrito en los residuos de triptófano (286), metionina (353) y fenil-alanina (354) y sufrir su fragmentación (328). Estos efectos moleculares, además de la nitración de los residuos 3-tirosina, justifican que el peroxinitrito pueda inactivar la CRM. Por ejemplo, algunos han sugerido que el complejo I se inactiva, al menos en parte, por la oxidación de grupos tiónicos y la formación de derivados S-nitrotiólicos (341, 344, 355). Murray et al. analizaron los efectos del peroxinitrito sobre este complejo y comprobaron que provoca la nitración de 3-tirosina de las subunidades 49 kDa, 17.2 kDa, B15 y B14, así como la oxidación de residuos de triptófano en las subunidades B17.2, 75 kDa, 51 kDa, 39 kDa, 30 kDa, 18 kDa, entre otras, del complejo I con la formación de N-formilkinurenina (286, 356). El complejo II se inactivaría también por la oxidación de grupos tiólicos esenciales de la succinato deshidrogenasa (357). Varias de las subunidades del complejo III también pueden ser nitradas en 3-tirosina por el peroxinitrito y con ello llegar a perder el 60% de su actividad enzimática (358). El complejo V, la ATPasa, posee también una tirosina esencial (Tyr³⁶⁸) para la función de este complejo que puede ser nitrada por el peroxinitrito y responsable de la pérdida de su función (338, 342). El citocromo c, enzima también perteneciente a la CRM, contiene cuatro residuos de tirosina, dos de ellos muy próximos al grupo heme, que participan en la actividad redox del citocromo. El peroxinitrito provoca la nitración de una de esas tirosinas esenciales (Tyr⁶⁷) y modifica sus propiedades fisiológicas y de transmisión de señal (359). No

hay unanimidad sobre los efectos del peroxinitrito sobre la citocromo *c* oxidasa (complejo IV), ya que si bien algunos autores encuentran que este anión puede inactivar a este complejo (360), otros creen que se trata de un complejo muy resistente a la oxidación y que, por el contrario, es capaz de descomponer el peroxinitrito a nitrito (361, 362). En cualquier caso, el óxido nítrico sí es capaz de unirse al complejo IV y bloquear el flujo de electrones y la respiración celular, lo que se traduce en una depleción celular de ATP (363). Además, el malondialdehído y el 4-hidroxinonenal, dos derivados de las peroxidaciones lipídicas, pueden inhibir el complejo IV mediante la formación de conjugados con este complejo enzimático (364, 365). Tanto las ROS como los aldehídos formados en el curso de las lipoperoxidaciones pueden dañar al ADNmt. Sin embargo, mientras que las lesiones provocadas por las ROS son fácilmente reparables, no ocurre lo mismo con las provocadas por los aldehídos, ya que estos forman conjugados (“*adducts*”) con el ADN que favorecen el establecimiento de uniones cruzadas entre las cadenas de ADNmt que difícilmente pueden ser reparadas (366). La depleción del ADNmt inducido por las ROS puede afectar gravemente a la función mitocondrial y provocar esteatosis hepática (299). Esta depleción puede interferir con la síntesis de los complejos I, III, IV y V de la CRM, ya que el ADNmt codifica 13 polipéptidos de estos complejos. Además, el 4-hidroxinonenal tiene especial tendencia a formar conjugados con la COX-IV del complejo IV de la CRM (365), lo cual aumenta su degeneración y puede contribuir a reducir los niveles de este complejo que hallamos en los ratones *ob/ob*.

Por todo lo expuesto, podemos resumir que la actividad de la CRM está disminuida en los ratones *ob/ob* por estar reducida la cuantía de estos complejos enzimáticos. Este descenso tiene varios orígenes: a) **la síntesis de las proteínas y péptidos** de codificación mitocondrial está disminuida por lesión oxidativa y nitrogenada del ADNmt. El tratamiento de los ratones con el antioxidante MnTBAP y con el antiperoxinitrito ácido úrico normaliza la expresión genética de las proteínas codificadas por el ADNmt. b) Existe también un **defecto en el ensamblaje de los complejos** reconocible por la presencia de subcomplejos en los geles BN-PAGE de primera dimensión y SDS-PAGE de segunda dimensión. Este defecto también se corrige tratando a los ratones *ob/ob* con MnTBAP o ácido úrico. Por último, c) la **degradación** de las proteínas de los complejos está aumentada. Esto es reconocible por la presencia de estelas de bajo peso

molecular que prolongan hacia la derecha la marca formada por algunas subunidades de los complejos. Esta degradación se debe probablemente al efecto del peroxinitrito, ya que la exposición “*in vitro*” de las proteínas mitocondriales normales al peroxinitrito reproduce los cambios observados en las proteínas de los ratones *ob/ob*. En estos estudios “*in vitro*”, se pueden excluir los defectos en la síntesis de las subunidades y en el ensamblaje de los complejos.

Ya hemos visto que el empleo de ácido úrico previene en los ratones obesos, las lesiones hepáticas que se encuentran en estos ratones. A pesar de que el ácido úrico es capaz de evitar las alteraciones funcionales y estructurales de la CRM que se encuentran en los ratones *ob/ob* y también de prevenir la aparición de lesiones hepáticas de EHNA, su administración al hombre la vemos problemática. Es obvio, que no podemos estar administrando al hombre continuamente ácido úrico o dietas que eleven sus niveles en sangre, ya que ello puede provocar otros efectos no deseados. Por esta razón, es necesario encontrar otras sustancias que posean capacidad antioxidante y neutralizante del anión peroxinitrito. Entre ellas destaca la **melatonina**. Como se ha comentado en la introducción a este trabajo, se trata de una molécula que tiene las dos propiedades que hemos mencionado y, además, es un agente que puede ser empleado en el hombre y está ya siendo utilizado en diversas situaciones patológicas, en especial en el insomnio y en la depresión. Por todo lo referido nos encontramos ante una sustancia natural con múltiples efectos beneficiosos para el organismo. Por ello, quisimos saber si la melatonina era capaz también de evitar las alteraciones funcionales y estructurales existentes en la CRM de los ratones *ob/ob*. Para ello realizamos dos grupos de experimentos, los primeros “*in vitro*” destinados a comprobar que, en efecto, la melatonina previene las alteraciones que el peroxinitrito provoca sobre las proteínas de la membrana mitocondrial y de la CRM. Los últimos los realizamos “*in vivo*” administrando a ratones *ob/ob* la melatonina por vía intraperitoneal con la esperanza de que esos animales no desarrollaran las alteraciones mitocondriales y las lesiones hepáticas que encontramos en los animales obesos no tratados.

Los experimentos “*in vitro*” nos confirmaron que la incubación de proteínas mitocondriales aisladas de ratones delgados con 2 o 3 mM, como concentración final, de melatonina evitaba que la posterior exposición de esas proteínas a una solución 10 o 20 μ M de peroxinitrito se siguiera de una disminución del consumo

mitocondrial de oxígeno (Fig. 33), de un descenso de la actividad de la CRM (Figs. 31 y 32), de una interferencia con el ensamblaje de los complejos (Fig. 35) o de la degradación de sus subunidades (Fig. 35). Es decir, estos experimentos “*in vitro*” demostraron el efecto protector de la melatonina sobre los efectos destructivos del peroxinitrito sobre los complejos de la CRM.

El segundo grupo de experimentos los realizamos en tres grupos de ratones; el primero incluía 10 ratones delgados normales que tomamos como controles, el segundo a otros 10 ratones *ob/ob* que fueron tratados durante 12 semanas con 500 μ L de suero salino intraperitoneal y el tercero, a seis ratones *ob/ob* que fueron tratados durante el mismo tiempo por vía intraperitoneal con 10 mg/Kg/día de melatonina. Los resultados obtenidos demuestran claramente que el tratamiento con melatonina previene las alteraciones hepáticas que se encuentran en los ratones *ob/ob*. En efecto, mediante técnicas de inmunofluorescencia mostramos que la gran fluorescencia provocada por las proteínas nitradas en 3-tirosina que tiene el tejido hepático de los ratones *ob/ob* desaparecía por completo en los mismos ratones cuando eran tratados con melatonina (Fig. 38a) y que esto mismo se comprobaba en la nitración de las proteínas mitocondriales separadas por “Western blot” en los tres grupos de animales (Fig. 38b). Estos estudios nos confirmaron que la dosis de 10 mg/Kg/día de melatonina era efectiva para neutralizar el estrés nitrosante existente en los ratones *ob/ob*. Simultáneamente, la melatonina neutralizó por completo el estrés oxidativo de esos animales (Fig. 37) y mejoró significativamente la actividad de la CRM (Fig. 38). Esta mejoría funcional se justificaba por favorecer el ensamblaje de los complejos de esa cadena (Fig. 39), por evitar la degradación de sus subunidades (Fig. 40) y por favorecer la síntesis de las subunidades de codificación mitocondrial (Fig. 41B) al disminuir el daño oxidativo del ADNmt (Fig. 41C). Todas estas mejorías funcionales y moleculares estuvieron asociadas a la existencia de una histología hepática que era prácticamente normal. Únicamente en algún ratón aislado se encontró una mínima degeneración hidrópica o leve esteatosis.

Por todo lo expuesto, la melatonina es un fármaco que debería ser considerado en el tratamiento de los pacientes con EHNA. Esta hormona se ha empleado eficazmente en el tratamiento de enfermedades y en modelos animales de enfermedades en las que se supone que el estrés oxidativo/nitrogenado juega un papel importante en su patogenia (248, 265, 267, 367). Por el contrario, la

extirpación de la pineal, es decir, la eliminación de la fuente natural de melatonina, empeora las lesiones en esos modelos experimentales (368).

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Zelman S. *The liver in obesity*. *AMA Arch Intern Med*. 1952;90:141-56
- 2.- Werswater JD, Fainer D. *Liver impairment in the obese*. *Gastroenterology* 1958;34:686-93
- 3.- Thaler H. *Die Fettleber und ihre pathogenetische Beziehung zur Lebercirrhosis*. *Virchows Arch Path Anat* 1962;335:180-210
- 4.- Thaler H. *Leber Biopsie*. Springer-Verlag. Berlin. 1969:176
- 5 Thaler H. *Die Fettleber, ihre Ursachen und Begleitkrankheiten*. *Dtsch med Wschr* 1962;87:1049-55
- 6.- Leevy CM. *Fatty liver: a study of 270 patients with biopsy proven fatty liver and review of the literature*. *Medicine (Baltimore)*. 1962;41:249-76
- 7.- Kern WH, Heder AH, Payne JH, DeWind LT. *Fatty metaborphosis of the liver in morbid obesity*. *Arch Pathol* 1973;96:342-6
- 8.- Galambos JT, Wills CE. *Relationship between 505 paired liver tests and biopsies in 242 obese patients*. *Gastroenterology* 1978;74:1191-5
- 9.- Adler M, Schaffner F. *Fatty liver hepatitis and cirrhosis in obese patients*. *Am J Med*. 1979;67:811-6. *Am J Med* 1979;67:811-6
- 10.- Creutzfeldt W, Frerichs H, Sickinger K. *Liver diseases and diabetes mellitus*. En: Popper H, Schaffner F (eds.) "Progress in liver diseases". Vol. III. William Heinemann Med Books Ltd. London. 1970:371-407
- 11.- Falchuk KR, Fiske SC, Haggitt RC, Federman M, Trey C. *Pericellular hepatic fibrosis and intracellular hyalin in diabetic mellitus*. *Gastroenterology* 1980;78:535-41
- 12.- Itoh S, Tsukada Y, Motomure Y, Ichinoe A. *Five patients with nonalcoholic diabetic cirrhosis*. *Acta Hepatogastroenterol* 1979;26:90-7
- 13.- DeWind LT, Payne JH. *Intestinal bypass surgery for morbid obesity. Long-term results*. *JAMA* 1978;236:2298-301.
- 14.- Campbell JM, Hung TK, Karam JH, Forsham PH. *Jejunioileal bypass as a treatment of morbid obesity*. *Arch Intern Med* 1977;137:602-10
- 15.- Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. *Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease*. *Mayo Clin Proc*. 1980; 55: 434-8
- 16.- Burt AD, Mutton A, Day CP. *Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis*. *Semin Diagn Pathol*. 1998;15:246-58
- 17.- Ludwig J, McGill DB, Lindor KD. *Review: nonalcoholic steatohepatitis*. *J Gastroenterol Hepatol*. 1997;12:398-403.
- 18.- Sanyal AJ. *AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease*. *Gastroenterology*. 2002;123:1705-25.
- 19.- Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. *Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity*. *Gastroenterology*. 1999;116:1413-9
- 20.- Ratziu V, Bonyhay L, Di Martino V, Charlotte F, Cavallaro L, Sayegh-Tainturier MH, et al. *Survival, liver failure, and hepatocellular carcinoma in obesity-related cryptogenic cirrhosis*. *Hepatology* 2002;35:1485-93
- 21.- Brunt EM, Janney CG, Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. *Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions*. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2467-74
- 22.- Poonawala A, Nair SP, Thuluvath PJ. *Prevalence of obesity and diabetes in patients with cryptogenic cirrhosis: a case study*. *Hepatology* 2000;32:689-92
- 23.- Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Battle EH, Driscoll CJ. *Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease*. *Hepatology* 1999;29:664-9

Bibliografía

- 24.- Ioannou GN, Weiss N, Kowdley KV, Dominitz JA. Is obesity a risk factor for cirrhosis-related death or hospitalization? A population-based cohort study. *Gastroenterology* 2003;125:1053-9
- 25.- Mofrad P, Contos MJ, Haque M, Sargeant C, Fisher RA, Luketic VA, et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology*. 2003;37:1286-92
- 26.- Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA, Oliver D, Wehmeier KR, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: histologic features and clinical correlations with 30 blinded biopsy specimens. *Hum Pathol*. 2004;35:1070-82
- 27.- Vargas-Castrillón J, Colina-Ruiz-Delgado F, Moreno-Sánchez D, Solís-Herruzo JA. Esteatohepatitis no alcohólica. Estudio histopatológico de 40 casos. *Med Clin (Barc)* 1988;90:563-8
- 28.- Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis*. 2001;21:3-16
- 29.- Itoh S, Yougel T, Kawagoe K. Comparison between nonalcoholic steatohepatitis and alcoholic hepatitis. *Am J Gastroenterol*. 1987;82:650-4
- 30.- Pinto HC, Baptista A, Camilo ME, Valente A, Saragoça A, de Moura MC. Nonalcoholic steatohepatitis. Clinicopathological comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients. *Dig Dis Sci*. 1996;41:172-9
- 31.- Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis.. *Semin Liver Dis*. 2004;24:3-20
- 32.- Caldwell SH, Hylton AI. The clinical outcome of NAFLD including cryptogenic cirrhosis. En: Farrell GC, George J, Hall PM, McCullough AJ (Eds.). "Fatty liver disease. NASH and related disorders. Blackwell Publ. Ltd. Malden. 2005:168-80
- 33.- Poynard T, Ratzu V, McHutchison J, Manns M, Goodman Z, Zeuzem S, Younossi Z, Albrecht J. Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa-2b and ribavirin on steatosis in patients infected with hepatitis C. *Hepatology*. 2003; 38:75-85
- 34.- Lonardo A, Adinolfi LE, Loria P, Carulli N, Ruggiero G, Day CP. Steatosis and hepatitis C virus: mechanisms and significance for hepatic and extrahepatic disease. *Gastroenterology*. 2004;126:586-97.
- 35.- Gordon A, McLean CA, Pedersen JS, Bailey MJ, Roberts SK. Hepatic steatosis in chronic hepatitis B and C: predictors, distribution and effect on fibrosis. *J Hepatol*. 2005;43:38-44
- 36.- Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology*. 1990;11:74-80
- 37.- Kleiner DE, Brunt EM, Natta MV, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Disign and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313-21
- 38.- Farrell GC. Okuda Lecture. Non-alcoholic steatohepatitis: what is it, and why is it important in the Asia-Pacific region. *J Gastroenterol Hepatol*. 2003;18:124-38
- 39.- Farrell GC, George J, De la M Hall P, McCullough AJ (eds.). *Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders*. Malden, MA: Blackwell Publishing. 2005. p. 1-319
- 40.- Brunt EM, Ramrakhiani S, Cordes BG, Neuschwander-Tetri BA, Janney CG, Bacon BR, et al. Concurrence of histologic features of steatohepatitis with other forms of chronic liver disease. *Mod Pathol*. 2003;16:49-56
- 41.- McCullough AJ. The epidemiology and risk factors of NASH. In: Farrell GC, George J, De la M Hall P, McCullough AJ (eds). *Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders*. Malden, MA: Blackwell Publishing; 2005. p. 23-37
- 42.- Ruhl CE, Everhart JE. Determinants of the association of overweight with elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. *Gastroenterology*. 2003;124:71-9
- 43.- Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, et al. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Ann Intern Med*. 2000;132:112-7
- 44.- Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban

- population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004;40:1387-95
- 45.- Jimba S, Nakagami T, Takahashi M, et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with impaired glucose metabolism in Japanese adults. *Diabet Med*. 2005;22:1141-5
 - 46.- Patt CH, Yoo HY, Dibadj K, Flynn J, Thuluvath PJ. Prevalence of transaminase abnormalities in asymptomatic, healthy subjects participating in an executive health-screening program. *Dig Dis Sci*. 2003;48:797-801
 - 47.- Ryan CK, Johnson LA, Germin BI, Marcos A. One hundred consecutive hepatic biopsies in the workup of living donors for right lobe liver transplantation. *Liver Transpl*. 2002;8:1114-22
 - 48.- Crespo J, Fernández-Gil P, Hernández-Guerra M, et al. Are there predictive factors of severe liver fibrosis in morbidly obese patients with non-alcoholic steatohepatitis? *Obes Surg*. 2001;11:254-7
 - 49.- Wanless IR, Lentz JS. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology*. 1990;12:1106-10
 - 50.- Hilden M, Christoffersen P, Juhl E, Dalgaard JB. Liver histology in a 'normal' population-examinations of 503 consecutive fatal traffic casualties. *Scand J Gastroenterol*. 1977;12:593-7
 - 51.- Gastaldelli A, Cusi K, Pettiti M, Hardies J, Miyazaki Y, Berria R, et al. Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Gastroenterology*. 2007;133:496-506
 - 52.- Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: Findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA*. 2002;287:356-9.
 - 53.- Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1999;30:1356-62
 - 54.- Cave M, Deaciuc I, Méndez C, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2007;18:184-95
 - 55.- Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology*. 1994;107:1103-9
 - 56.- Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, et al. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2002;123:134-40
 - 57.- DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*. 1991;14:173-94
 - 58.- Ford ES, Giles WH, Mokdad AH. Increasing prevalence of the metabolic syndrome among U.S. adults. *Diabetes Care* 2004;27:2444-9
 - 59.- Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi G, McCullough AJ, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 1999;107:450-5
 - 60.- Samuel VT, Shulman GI. Insulin resistance in NAFLD: potential mechanisms and therapies. En: Farrell GC, George J, de la M Hall P, McCullough AJ (Eds.) *Fatty liver disease. NASH and related disorders*. Blackwell Publ. Ltd. Malden. 2005:38-54
 - 61.- Marchesini G, Bugianesi E. NASH as part of the metabolic (insulin resistance) syndrome. En: Farrell GC, George J, de la M Hall P, McCullough AJ (Eds.) *Fatty liver disease. NASH and related disorders*. Blackwell Publ. Ltd. Malden. 2005:55-65
 - 62.- Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Renzi M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2001;50:1844-50
 - 63.- Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*. 2003;37:917-23

- 64.- Namikawa C, Shu-Ping Z, Vysellar JR, Nozaki Y, Nemoto Y, Ono M, et al. Polymorphisms of microsomal triglyceride transfer protein gene and manganese superoxide dismutase gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* 2004;40:781-6
- 65.- Dong H, Wang J, Li C, Hirose A, Nozaki Y, Takahashi M. The phosphatidylethanolamine N-methyltransferase gene V175M single nucleotide polymorphism confers the susceptibility to NASH in Japanese population. *J Hepatology.* 2007;46:915-20
- 66.- Sazci A, Ergul E, Aygun C, Akpinar G, Senturk O, Hulagu S. Methylene tetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Cell Biochem Funct.* 2008;26:291-6
- 67.- Dixon JB, Bhathal PS, Jonsson JR, Dixon AF, Powell EE, O'Brien PE. Pro-fibrotic polymorphisms predictive of advanced liver fibrosis in the severely obese. *J Hepatol.* 2003;39:967-70
- 68.- Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 1999;103:931-43
- 69.- Saltier AR, Kahn CR. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001;414:799-806
- 70.- Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, et al. NASH and insulin resistance: insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance. *Hepatology* 2002;35:373-9
- 71.- Kitamura T, Kitamura Y, Kuroda S, Hino Y, Ando M, Kotani H, et al. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol Cell Biol* 1999;19:6286-96
- 72.- Anthonson MW, Ronnstrand L, Wernstedt C, Degerman E, Holm C. Identification of novel phosphorylation sites in hormone sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. *J Biol Chem.* 1998;273:215-21
- 73.- Sanyal AJ. Insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. En: Arroyo V, Navasa M, Foros X, Bataller R, Sánchez-Fueyo A, Rodés J (eds). *Update in treatment of liver disease.* Ars Medica. Barcelona. 2005:279-96
- 74.- Previs SF, Withers DJ, Ren J-M, White MF, Shulman GI. Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo. *J Biol Chem* 2000;275:38990-4
- 75.- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthetase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995;378:785-9
- 76.- Nielsen S, Guo Z, Johnson CM, Hersrud DD, Jensen MD. Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest* 2004;113:1582-8
- 77.- Kelley DE, McKolanis TM, Hegazi RAF, Kuller LH, Calan SC. Fatty liver in type 2 diabetes mellitus: Relation to regional adiposity, fatty acids, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* 2003;285 E906-16
- 78.- Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boidt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with non alcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005;115:1343-51
- 79.- Klein S, Fontana L, Young L, Coggan AR, Kilo C, Patterson BW, et al. Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary artery disease. *N Engl J Med* 2004;350:2549-57
- 80.- Uusitupa M, Lindi V, Louheranta A, Salopuro T, Lindstrom J, Tuomilehto J. Long-term improvement in insulin sensitivity by changing lifestyles of people with impaired glucose tolerance: 4-year results from the Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetes* 2003;52:2532-8
- 81.- Landier JF, Thomas C, Grober J, Duez H, Percevault F, Souidi M, et al. Statin induction of liver fatty acid-binding protein (L-FABP) gene expression is peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent. *J Biol Chem* 2004;279:45512-8
- 82.- Ameen C, Edvardsson U, Ljungberg A, Asp L, Akerblad P, Tuneld A, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha increases the expression and activity of microsomal triglyceride transfer protein in the liver. *J Biol Chem* 2005;280:1224-9

Bibliografía

- 83.- Linden D, Lindberg K, Oscarsson J, Claesson C, Asp L, Li L, et al. Influence of peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists on the intracellular turnover and secretion of apolipoprotein (Apo)B-100 and ApoB-48. *J Biol Chem* 2002;277:23044-53
- 84.- Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B. Non-alcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:G193-9
- 85.- Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183-92
- 86.- Ohashi K, Ishibashi S, Osuga J, Tozawa R, Harada K, Yahagi N, et al. Novel mutations in the microsomal triglyceride transfer protein gene causing abetalipoproteinemia. *J Lipid Res* 2000;41:1199-204
- 87.- Tran K, Thorne-Tjomslund G, DeLong CJ, Cui Z, Shan J, Burton L, et al. Intracellular assembly of very low density lipoproteins containing apolipoprotein B100 in rat hematoma McA-RH777. *J Biol Chem* 2002;277:31187-200
- 88.- Hussain MM, Iqbal J, Anwar K, Rava P, Day K. Microsomal triglyceride transfer protein: a multifunctional protein. *Front Biosci* 2003;8:S500-6
- 89.- Fisher EA, Ginsberg HN. Complexity in the secretory pathway: the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *J Biol Chem*. 2002;277:17377-80
- 90.- Charlton M, Sreekumar R, Rasmussen D, Lindor K, Nair KS. Apolipoprotein synthesis in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2002;35:898-904
- 91.- Sreekumar R, Rosado B, Rasmussen D, Charlton M. Hepatic gene expression in histologically progressive nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003;38:244-51
- 92.- Bernard S, Touzet S, Personne I, Lapras V, Bondon PJ, Berthezane F, et al. Association between microsomal triglyceride transfer protein gene polymorphism and the biological features of liver steatosis in patients with type II diabetes. *Diabetologia* 2000;43:995-9
- 93.- Watterau JR, Aggerbeck LP, Bouma ME, Eisenberg C, Munck A, Hermier M, et al. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science* 1992 258:999-1001
- 94.- Mirandola S, Realdon S, Iqbal J, Gerotto M, Dal Pero F, Bortoletto G, et al. Liver microsomal triglyceride transfer protein is involved in hepatitis C liver steatosis. *Gastroenterology* 2006;130:1661-89
- 95.- Chittury S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis*. 2001;21:27-41
- 96.- James O, Day C. Non-alcoholic steatohepatitis: another disease of affluence. *Lancet* 1999;353:1634-6
- 97.- Solís-Herruzo JA, García-Ruiz I, Díaz-Sanjuan T, Del Hoyo P, Colina F, Muñoz-Yagüe T. Uric acid and anti-TNF α antibody improve mitochondrial respiratory chain dysfunction in ob/ob mice. *Hepatology* 2005;42:634
- 98.- Laurent A, Nicco C, van Nhieu JT, Borderie D, Chéreau C, Conti F, et al. Pivotal role of superoxide anion and beneficial effect of antioxidant molecules in murine steatohepatitis. *Hepatology* 2004;39:1277-85
- 99.- Seki S, Kitada T, Sakaguchi H. Clinicopathological significance of oxidative cellular damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *Hepatol Res* 2005;33:132-4
- 100.- Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2002;37:56-62
- 101.- Yesilova Z, Yaman H, Oktenli C, Ozcan A, Uygun A, Fakir E, et al. Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2005;100:850-5.

- 102.- Nobili V, Pastore A, Gaeta LM, Tozzi G, Comparcola D, Sartorelli MR, et al. Glutathione metabolism and antioxidant enzymes in patients affected by nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta* 2005;355:105-11
- 103.- Younossi ZM, Baranova A, Ziegler K, Giacco L, Schlauch K, Born TL, et al. A genomic and proteomic study of the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;42:665-74
- 104.- Esposito LA, Melov S, Panov A, Cottrell BA, Wallace DC. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:4820-25
- 105.- Fromenty B, Robin MA, Igoudjil A, Mansouri A, Pessayre D. The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab* 2004;30:121-38.
- 106.- Berson A, De Beco V, Lettéron P, Robin MA, Moreau C, Kahwaji J, et al. Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1998;114:764-74
- 107.- Fromenty B, Berson A, Pessayre D. Microvesicular steatosis and steatohepatitis: Role of mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. *J Hepatol* 1997;26:13-22
- 108.- Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, Iezzoni JC, Hespeneheide EE, Parks JK, et al. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 430-4
- 109.- Zeviani M, Tiranti V, Piantadosi C. Mitochondrial disorders. *Medicine* 1998;77:59-72
- 110.- Watkins PA, Ferrell EV, Jr, Pedersen JI, Hoefler G. Peroxisomal fatty acid β -oxidation in HepG2 Cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 1991;289:329-36
- 111.- Bowyer BA, Miles JM, Haymond MW, Fleming CR. L-Carnitine therapy in home parenteral nutrition patients with abnormal liver tests and low plasma carnitine concentration. *Gastroenterology* 1988; 94: 434-8
- 112.- Krähenbühl S, Mang G, Kupferschmidt H, Meier PJ, Krause M. Plasma and hepatic carnitine and coenzyme A pools in a patient with fatal, valproate induced hepatotoxicity. *Gut* 1995; 37: 140-3
- 113.- Harper P, Wadström C, Backman L, Cederblad G. Increased liver carnitine content in obese women. *Am J Clin Nutr* 1995; 61: 18-25
- 114.- Yamamoto S, Abe H, Kohgo T, Ogawa A, Ohtake A, Hayashibe H, et al. Two novel gene mutations (Glu 74Lys, Phe 383Tyr) causing the "hepatic" form of carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Hum Genet* 1996; 98: 116-8
- 115.- Perez Carreras M, del Hoyo P, Martín MA, Rubio JC, Martín A, Castellano C, Colina F, Arenas J, José A. Solis-Herruzo JA. Defective Hepatic Mitochondrial Respiratory Chain in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* 2003;38:999-1007
- 116.- Fromenty B, Pessayre D. Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 1995; 67: 101-54
- 117.- Fréneaux E, Labbe G, Lettéron P, Le Dinh T, Deggot C, Genève J, Larey D, et al. Inhibition of the mitochondrial oxidation of fatty acids by tetracycline in mice and in man: possible role in microvesicular steatosis induced by this antibiotic. *Hepatology* 1988; 8: 1056-62
- 118.- Deschamps D, De Beco V, Fisch C, Fromenty B, Guillouzo A, Pessayre D. Inhibition by perhexiline of oxidative phosphorylation and the β -oxidation of fatty acids: possible role in pseudoalcoholic liver lesions. *Hepatology* 1994; 19: 948-61
- 119.- Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, et al. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2003;37:343-50
- 120.- Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1302: 93-109
- 121.- Kersten S, Seydoux J, Peters JM, González FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor- α mediates the adoptive response to fasting. *J Clin Invest* 1999; 103: 1489-98

- 122.- García Ruiz I, Rodríguez-Juan C, Díaz-Sanjuan T, del Hoyo P, Colina F, Muñoz-Yagüe T, Solís-Herruzo JA. Uric acid and anti-TNF antibody improve mitochondrial dysfunction in ob/ob mice. *Hepatology* 2006;44:581-91
- 123.- Wallace DC. Mitochondrial disease in man and mouse. *Science* 1999; 283: 1482-8.
- 124.- Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994; 344: 721-4
- 125.- Morris A. Mitochondrial respiratory chain disorders and the liver. *Liver* 1999; 19: 357-68
- 126.- Fromenty B, Pessayre D. Mitochondrial injury and NASH. In: Farrell GC, George J, de la M. Hall P, McCullough AJ. Eds *Fatty Liver Disease. NASH and related disorders*. Blackwell Publ Ltd Malden 132-42
- 127.- Kadenbach B, Arnold S, Lee I, Hüttermann M. The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 2004;1655:400-8
- 128.- Grossman LI, Lomax MI. Nuclear genes for cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1997;1352:174-92
- 129.- Rigoulet M. Control process in oxidative phosphorylation: kinetic constraints and stoichiometry. *Biochim Biophys Acta* 1990;1018:185-9
- 130.- Harris DA, Das AM. Control of the mitochondrial ATP synthesis in the heart. *Biochem J* 1991;280:561-73
- 131.- Das AM. Regulation of the mitochondrial ATP-synthase in health and disease. *Mol Gen Met* 2003;79:71-82
- 132.- Abrahams JP, Leslie R, Lutter R, Walker JE,. Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 1994;370:621-8
- 133.- Sánchez-Alcázar JA, Schneider E, Martínez MA, Carmona P, Hernández-Muñoz I, Siles E, et al. Tumor necrosis factor- α increases the steady state reduction of cytochrome b of the mitochondrial respiratory chain in metabolically inhibited L929 cells. *J. Biol. Chem.* 2000;275:13353-61
- 134.- Higuchi M, Proske RJ, Yeh ET. Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome c release, membrane permeability transition, and apoptosis. *Oncogene* 1998;17:2515-24
- 135.- Aytug S, Reich D, Sapiro LE, Bernstein D, Begum N. Impaired IRS-1/PI3-kinase signalling in patients with HCV: a mechanism for increased prevalence of type 2 diabetes. *Hepatology* 2003;38:1384-92
- 136.- Peraldi P, Spiegelman B. TNF-alpha and insulin resistance: summary and future prospects. *Mol Cell Biochem* 199, 182:169-75
- 137.- Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 1994;43:1271-8
- 138.- Kern PA, Saghizadeh M, Org JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo, R.B. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J. Clin. Invest.* 1995;95:2111-9
- 139.- Crespo J, Cayon A, Fernández-Gil P, Hernández-Guerra M, Mayorga M, Domínguez-Diez A, et al. Gene expression of tumor necrosis factor- α and TNF-receptors, p55 and p75, in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2001;34:1158-63
- 140.- Hatano E, Bennett BL, Manning AM, Qian T, Lemasters JJ, Brenner DA. NF- κ B stimulates inducible nitric oxide synthase to protect mouse hepatocytes from TNF α - and Fas-mediated apoptosis. *Gastroenterology* 2001;120:1251-62
- 141.- Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatosis. *Semin. Liver Dis.* 2001;21:89-104
- 142.- Farrell GC. Animal models of steatohepatitis. In *Fatty Liver Disease. NASH and related disorders*. GC Farrell, J George, P de la M Hall, AJ McCullough. Editors. Blackwell Publ Ltd. Malden 2005;91-108
- 143.- Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996;271:C1424-37

- 144.- Radi R, Cassina A, Hodara R, Castro L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radi. Biol. Med.* 2002;33:1451-64
- 145.- Brown GC, Cooper CE. Nanomolar concentrations of NO reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS. Lett.* 1994;356:295-8
- 146.- Radi R, Cassina A, Hodara R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol. Chem.* 2002;383:401-9
- 147.- Guidarelli A, Fiorani M, Cantoni O. Enhancing effects of intracellular ascorbic acid on peroxynitrite-induced U937 cell death are mediated by mitochondrial events resulting in enhanced sensitivity to peroxynitrite-dependent inhibition of complex III and formation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 2004;378:959-66
- 148.- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 1991;266:4244-50
- 149.- Szabó C. DNA strand breakage and activation of poly-ADP ribosyltransferase: a cytotoxic pathway triggered by ONOO. *Free Rad. Biol. Med.* 1996;21:855-69
- 150.- Viner RI, Williams TD, Schoneich C. Peroxynitrite modification of protein thiols: oxidation, nitrosylation, and S-glutathiolation of functionally important cysteine residue(s) in the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. *Biochemistry* 1999;38:12408-15
- 151.- Hooper DC, Scott GS, Zborek A, Mikheeva T, Kean RB, Koprowski H, et al. Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. *FASEB. J.* 2000;14:691-8
- 152.- Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR. Metformin: an update. *Ann Intern Med.* 2002;137:25-33
- 153.- Lin HZ, Yang SQ, Chuckaree C, Kuhajda F, Ronnet G, Diehl AM. Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. *Nat Med.* 2000;6:998-1003
- 154.- Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Zoli M, Melchionda N. Metformin in non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet.* 2001;358:893-4
- 155.- Nair S, Diehl AM, Wiseman M, Farr GH Jr, Perrillo RP. Metformin in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a pilot open label trial. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;20:23-8
- 156.- Bugianesi E, Gentilcore E, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, et al. A randomized controlled trial of metformin versus vitamin E or prescriptive diet in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol.* 2005;100:1082-90
- 157.- Uygun A, Kadayifci A, Isik AT, Ozgurtas T, Devenci S, Tuzun A, Metformin in the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;19:537-44
- 158.- Loomba R, Lutchman G, Kleiner DE, Ricks M, Feld JJ, Borg BB, et al. Clinical trial: Pilot study of metformin for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009;29:603-604
- 159.- Schwimmer JB, Middleton MS, Deutsch R, Lavine JE. A phase 2 clinical trial of metformin as a treatment for non-diabetic paediatric non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;21:871-9
- 160.- Angelico F, Burattin M, Alessandri C, Del Ben M, Lirussi F. Drugs improving insulin resistance for non-alcoholic fatty liver disease and/or non-alcoholic steatohepatitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007;CD005166
- 161.- Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med.* 2002;346:393-403
- 162.- Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Mahankali S, Hardies J, Cusi K, et al. Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:2784-91
- 163.- Kawaguchi K, Sakaida I, Tsuchiya M, Omori K, Takami T, Okita K. Pioglitazone prevents hepatic steatosis, fibrosis, and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;315:187-95

- 164.- Caldwell SH, Hespeneide EE, Redick JA, Iezzoni JC, Battle EH, Sheppard BL. A pilot study of a thiazolidinedione, troglitazone, in nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol.* 2001;96:519-25
- 165.- Watkins PB. Insight into hepatotoxicity: The troglitazone experience. *Hepatology.* 2005;41:229-30
- 166.- Yki-Järvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med.* 2004;351:1106-18
- 167.- Sanyal AJ, Mofrad PS, Contos MJ, Sargeant C, Luketic VA, Sterling RK, et al. A pilot study of vitamin E versus vitamin E and pioglitazone for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2004;2:1107-15
- 168.- Neuschwander-Tetri BA, Brunt EM, Wehmeier KR, Sponseller CA, Hampton K, Bacon BR. Interim results of a pilot study demonstrating the early effects of the PPAR-gamma ligand rosiglitazone on insulin sensitivity, aminotransferases, hepatic steatosis and body weight in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* 2003;38:434-40
- 169.- Neuschwander-Tetri BA, Brunt EM, Wehmeier KR, Oliver D, Bacon BR. Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR-gamma ligand rosiglitazone. *Hepatology.* 2003;38:1008-17
- 170.- Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C, Finch J, Hardies J, et al. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med.* 2006;355:2297-307
- 171.- Ratziu V, Giral P, Jacqueminet S, Charlotte F, Hartemann-Heurtier A, Serfaty L, et al. Rosiglitazone for nonalcoholic steatohepatitis: one-year results of the randomized placebo-controlled Fatty Liver Improvement with Rosiglitazone Therapy (FLIRT) Trial. *Gastroenterology.* 2008;135:100-10
- 172.- Aithal GP, Thomas JA, Kaye PV, Lawson A, Ryder SD, Spendlove I, et al. Randomized, placebo-controlled trial of pioglitazone in nondiabetic subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology.* 2008;135:1176-84
- 173.- Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med.* 2007;356:2457-71
- 174.- Wagh A, Stone NJ. Treatment of metabolic syndrome. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2004;2:213-28
- 175.- Andersen T, Gluud C, Franzmann MB, Christoffersen P. Hepatic effects of dietary weight loss in morbidly obese subjects. *J Hepatol* 1991;12:224-9
- 176.- Colles SL, Dixon JB, Marks P, Strauss BJ, O'Brien PE. Preoperative weight loss with a very low energy diet: quantification of changes in liver and abdominal fat by serial imaging. *Am J Clin Nutr* 2006;84:304-11
- 177.- Solga S, Alkhuraishe AR, Clark JM, Torbenson M, Greenwald A, Diehl AM, et al. Dietary composition and nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci.* 2004;49:1578-83
- 178.- Huang MA, Greenson JK, Chao C, Anderson L, Peterman D, Jacobson J, et al. One year intense nutritional counseling results in histologic improvement in patient with NASH: A pilot study. *Am J Gastroenterol* 2005; 100:1072-81
- 179.- Hickman IJ, Jonsson JR, Prins JB, Ash S, Purdie DM, Clouston AD, et al. Modest weight loss and physical activity in overweight patients with chronic liver disease results in sustained improvements in alanine aminotransferase, fasting insulin, and quality of life. *Gut.* 2004;53:413-9
- 180.- Torres DM, Harrison SA. Diagnosis and therapy of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology.* 2008;134:1682-98
- 181.- Nobili V, Marcellini M, Devito R, Ciampalini P, Piemonte F, Comparcola D, et al. NAFLD in children: a prospective clinical-pathological study and effect of lifestyle advice. *Hepatology.* 2006;44:458-65
- 182.- Harrison SA, Fecht W, Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA. Orlistat for overweight subjects with nonalcoholic steatohepatitis: A randomized, prospective trial. *Hepatology.* 2009;49:80-6

- 183.- Harrison SA, Ramrakhiani S, Brunt EM, Anbari MA, Cortese C, Bacon BR. Orlistat in the treatment of NASH: a case series. *Am J Gastroenterol*. 2003;98:926-30
- 184.- Poon T, Nelson P, Shen L, Mihm M, Taylor K, Fineman M, et al. Exenatide improves glycemic control and reduces body weight in subjects with type 2 diabetes: a dose-ranging study. *Diabetes Technol Ther*. 2005;7:467-77
- 185.- Vemuri VK, Janero DR, Makriyannis A. Pharmacotherapeutic targeting of the endocannabinoid signaling system: drugs for obesity and the metabolic syndrome. *Physiol Behav*. 2008;93:671-86
- 186.- Padwal RS, Majumdar SR. Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant. *Lancet*. 2007;369:71-7
- 187.- Kral JG, Thung SN, Biron S, Hould FS, Lebel S, Marceau S, et al. Effects of surgical treatment of the metabolic syndrome on liver fibrosis and cirrhosis. *Surgery*. 2004;135:48-58
- 188.- Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2004;292:1724-37
- 189.- Maggard MA, Shugarman LR, Suttorp M, Maglione M, Sugerman HJ, Livingston EH, et al. Meta-analysis: surgical treatment of obesity. *Ann Intern Med* 2005;142:547-59
- 190.- O'Brien PE, Dixon JB, Brown W, et al. The laparoscopic adjustable gastric band (Lap-Band): a prospective study of medium-term effects on weight, health and quality of life. *Obes Surg* 2002;12:652-60
- 191.- Torgerson JS. The "Swedish Obese Subjects" (SOS) Study. What does weight loss really accomplish? *Fortschr Med* 2002;144:24-6
- 192.- Angrisani L, Furbetta F, Doldi SB, et al. Lap Band adjustable gastric banding system: the Italian experience with 1863 patients operated on 6 years. *Surg Endosc* 2003;17:409-12
- 193.- Dixon JB, O'Brien PE, Playfair J, et al. Adjustable gastric banding and conventional therapy for type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *JAMA* 2008;299:316-23
- 194.- Ingelsson E, Sundstrom J, Arnlov J, Zethelius B, Lind L. Insulin resistance and risk of congestive heart failure. *JAMA* 2005;294: 334-41
- 195.- Sjostrom L, Lindroos AK, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carlsson B, et al. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N Engl J Med* 2004;351:2683-93
- 196.- Adams TD, Gress RE, Smith SC, et al. Long-term mortality after gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 2007;357:753-61
- 197.- Sjostrom L, Narbro K, Sjostrom CD, et al. Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects. *N Engl J Med* 2007;357:741-52
- 198.- Angulo P. NAFLD, obesity, and bariatric surgery. *Gastroenterology* 2006;130:1848-52
- 199.- Dixon JB, Bhatal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* 2001;121:91-100
- 200.- Dixon JB, Bhathal PS, Hughes NR, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: Improvement in liver histological analysis with weight loss. *Hepatology*. 2004;39:1647-54
- 201.- Mathurin P, Gonzalez F, Kerdraon O, et al. The evolution of severe steatosis after bariatric surgery is related to insulin resistance. *Gastroenterology* 2006;130:1617-24
- 202.- Klein S, Mittendorfer B, Eagon JC, et al. Gastric bypass surgery improves metabolic and hepatic abnormalities associated with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2006;130:1564-72
- 203.- Chapman AE, Kiroff G, Game P, Foster B, O'Brien P, Ham J, et al. Laparoscopic adjustable gastric banding in the treatment of obesity: a systematic literature review. *Surgery* 2004;135:326-51
- 204.- Moschen AR, Molnar C, Wolf AM, Weiss H, Graziadei I, Kaser S, et al. Effects of weight loss induced by bariatric surgery on hepatic adipocytokine expression. *J Hepatology* 2009;51:765-77

- 205.- Mathurin P, Hollebecque A, Arnalsteen L, Buob D, Leteurtre E, Caiazzo R, Pigeyre M, Verkindt H, Dharancy S, Louvet A, Romon M, Pattou F. Prospective study of the long-term effects of bariatric surgery on liver injury in patients without advanced disease. *Gastroenterology*. 2009;137:532-40
- 206.- Mummadi RR, Kasturi KS, Chennareddygar S, Sood GK. Effect of bariatric surgery on nonalcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008;6:1396-402
- 207.- Harrison SA, Torgerson S, Hayashi P, Ward J, Schenker S. Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*. 2003;98:2485-90
- 208.- Vajro P, Mandato C, Franzese A, Ciccimarra E, Lucariello S, Savoia M, et al. Vitamin E treatment in pediatric obesity-related liver disease: a randomized study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004;38:48-55
- 209.- Guallar E, Hanley DF, Miller ER 3rd. An editorial update: Annus horribilis for vitamin E. *Ann Intern Med*. 2005;143:143-5
- 210.- Miglio F, Rovati LC, Santoro A, Setnikar I. Efficacy and safety of oral betaine glucuronate in non-alcoholic steatohepatitis. A double-blind, randomized, parallel-group, placebo-controlled prospective clinical study. *Arzneimittelforschung*. 2000;50:722-7
- 211.- Abdelmalek MF, Sanderson SO, Angulo P, Soldevila-Pico C, Liu C, Peter J, et al. Betaine for nonalcoholic fatty liver disease: Results of a randomized placebo-controlled trial. *Hepatology*. 2009;50:1818-26
- 212.- Thong-Ngam D, Samuhasaneeto S, Kulaputana O, Klaikeaw N. N-acetylcysteine attenuates oxidative stress and liver pathology in rats with non-alcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*. 2007;13:5127-32
- 213.- Baumgardner JN, Shankar K, Hennings L, Albano E, Badger TM, et al. N-acetylcysteine attenuates progression of liver pathology in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Nutr*. 2008;138:1872-9
- 214.- de Oliveira CP, Stefano JT, de Siqueira ER, Silva LS, de Campos Mazo DF, Lima VM, et al. Combination of N-acetylcysteine and metformin improves histological steatosis and fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res*. 2008;38:159-65
- 215.- Hooper DC, Spitsin S, Kean RB, Champion JM, Dickson GM, Chaudhry I. Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:675-80
- 216.- Hooper DC, Bagasra O, Marini JC, Zborek A, Ohnishi ST, Kean R, et al. Prevention of experimental allergic encephalomyelitis by targeting nitric oxide and peroxynitrite: implications for the treatment of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:2528-33
- 217.- Whiteman M, Ketsawatsakul U, Halliwell B. A reassessment of the peroxynitrite scavenging activity of uric acid. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2002;242-59
- 218.- Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite with uric acid in the presence of ascorbate and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric oxide synthase. *Biochem. Pharm.* 2005;70:343-54
- 219.- Andreadou E, Nikolaou C, Gournaras F, Rentzos M, Boufidou F, Tsoutsou A, et al. Serum uric acid levels in patients with Parkinson's disease: their relationship to treatment and disease duration. *Clin Neurol Neurosurg*. 2009;111:724-8
- 220.- Kanabrocki EL, Third JL, Ryan MD, Nemchausky BA, Shirazi P, Scheving LE, et al. Circadian relationship of serum uric acid and nitric oxide. *JAMA*. 2000;283:2240-1
- 221.- Reiter RJ. Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991;12:151-80
- 222.- Huether G, Poeggeler B, Reimer A, George A. Effect of tryptophan on circulating melatonin levels in chicks and rats: Evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci* 1993;51:945-53
- 223.- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi L, Zhang M, Weintraub ST, et al. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: Its origin and significance. *Biochem. Biophys. Acta* 1999;1472:206-14
- 224.- Reiter RJ. The melatonin rhythm: Both a clock and a calendar. *Experientia* 1993;49:654-664

- 225.- Maestroni GJM. T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. *J Pineal Res* 1995;18:84–9
- 226.- Shiu SYW, Li L, Xu JN, Pang CS, Wong JTY, Pang SF. Melatonin induced inhibition of proliferation and G1:S cell cycle transition delay of human choriocarcinoma JAr cells: Possible involvement of MT2 (MEL1B) receptor. *J Pineal Res* 1999;27:183–92
- 227.- Maestroni G. Therapeutic potential of melatonin in immunodeficiency states, viral diseases, and cancer. *Adv Exp Med Biol* 1999;467: 217-26
- 228.- Cuzzocrea S, Zingarelli B, Gilad E, Hake P, Salzman AL, Szabo C. Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: Relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. *J Pineal Res* 1997; 23:106-16
- 229.- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Hardies LJ, Weintraub ST, et al. A Novel Melatonin Metabolite, Cyclic 3-Hydroxymelatonin: A Biomarker of In Vivo, Hydroxyl Radical Generation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998;253:614–70
- 230.- Stascia P, Ulanski P, Rosiak JM. Melatonin as a hydroxyl radical scavenger. *J Pineal Res* 1998;25:65–6
- 231.- Lee MC, Chung YT, Lee JH, Jung JJ, Kim HS, Kim SU. Antioxidant effect of melatonin in human retinal neuron cultures. *Exp Neurol* 2001;172:407–15
- 232.- Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 2005;27:119-30
- 233.- Baron V, Muriel P. Role of glutathione, lipid peroxidation and antioxidants on acute bile-duct obstruction in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1999;1472:173-80
- 234.- Winiarska K, Fraczyk T, Malinska D, Drozak J, Bryla J. Melatonin attenuates diabetes-induced oxidative stress in rabbits. *J Pineal Res.* 2006;40:168–76
- 235.- Baydas G, Canatan H, Turkoglu A. Comparative analysis of the protective effects of melatonin and vitamin E on streptozocin-induced diabetes mellitus. *J Pineal Res.* 2002;32:225–30
- 236.- Wahab MH, Akoul ES, Abdel-Aziz AA. Modulatory effects of melatonin and vitamin E on doxorubicin-induced cardiotoxicity in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. *Tumori.* 2000;86:157–62
- 237.- Hsu C, Han B, Liu M, Yeh C, Casida JE. Phosphine-induced oxidative damage in rats: attenuation by melatonin. *Free Radic Biol Med.* 2000;28:636–42
- 238.- Gultekin F, Delibas N, Yasar S, Kilinc I. In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. *Arch Toxicol.* 2001;75:88–96
- 239.- Anwar MM, Meki AR. Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2003;135:539–47
- 240.- Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol.* 1995;268:L699-722
- 241.- Peyrot F, Houee-Levin C, Ducrocq C. Melatonin nitrosation promoted by NO²; comparison with the peroxynitrite reaction. *Free Radic. Res.* 2006;40:910–20
- 242.- Soung DY, Choi HR, Kim JY, No JK, Lee JH, Kim MS, et al. Peroxynitrite scavenging activity of indole derivatives: interaction of indoles with peroxynitrite. *J. Med. Food* 2004;7:84
- 243.- Reiter RJ, Tan DX, Burkhardt S. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. *Mech Ageing Dev.* 2002;123:1007–1
- 244.- Reiter RJ, Tan DX, Allegra M. Melatonin: reducing molecular pathology and dysfunction due to free radicals and associated reactants. *Neuro Endocrinol Lett.* 2002;23(Suppl 1):3–8
- 245.- Blanchard B, Denis Pompon D, Ducrocq C. Nitrosation of melatonin by nitric oxide and peroxynitrite. *J. Pineal Res.* 2000;29:184–92
- 246.- Wang JZ, Wang ZF. Role of melatonin in Alzheimer-like neurodegeneration. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27:41–9

Bibliografía

- 247.- Ucar M, Korkmaz A, Reiter RJ, Yaren H, Oter S, Kurt B, et al. Melatonin alleviates lung damage induced by the chemical warfare agent nitrogen mustard. *Toxicol. Lett.* 2007;173:124–31
- 248.- Reiter RJ, Tang L, García JJ, Muñoz-Hoyos A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci* 1997;60:2255–71
- 249.- Dugo L, Serraino I, Fulia F, De Sarro A, Caputi AP, Cuzzocrea S. Effect of melatonin on cellular energy depletion mediated by peroxynitrite and poly (ADP-ribose) synthetase activation in an acute model of inflammation. *J Pineal Res* 2001;31:76–84
- 250.- Tan DX, Manchester LC, Sainz RM, Mayo JC, Leon J, Hardeland R, et al. Interactions between melatonin and nicotinamide nucleotide: NADH preservation in cells and in cell-free systems by melatonin. *J Pineal Res* 2005;39:185–94
- 251.- Lopez LC, Escames G, Ortiz F, Ros E, Acuna-Castroviejo D. Melatonin restores the mitochondrial production of ATP in septic mice. *Neuro Endocrinol Lett* 2006;27:623–30
- 252.- Zhang H, Squadrito GL, Uppu R, Pryor WA. Reaction of peroxynitrite with melatonin: a mechanistic study. *Chem Res Toxicol.* 1999;12:526–34
- 253.- Rodríguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin.* *J Pineal Res.* 2004;36:1–9
- 254.- Reiter RJ, Tan DX, Maldonado MD. Melatonin as an antioxidant: physiology versus pharmacology. *J Pineal Res.* 2005;39:215–6
- 255.- Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen LD, et al. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int.* 1995;26:497-502
- 256.- Bettahi I, Pozo D, Osuna C, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D, Guerrero JM. Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *J Pineal Res.* 1996;20:205-10
- 257.- Dong WG, Mei Q, Yu JP, Xu JM, Xiang L, Xu Y. et al. Effects of melatonin on the expression of iNOS and COX-2 in rat models of colitis. *World J. Gastroenterol.* 2003; 9:1307–11.
- 258.- Dedon PC, Tannenbaum SR. Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. *Arch Biochem Biophys.* 2004;423:12–22
- 259.- Rodríguez MI, Carretero M, Escames G, López LC, Maldonado MD, Tan DX, et al. Chronic melatonin treatment prevents age-dependent cardiac mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice. *Free Radic. Res.* 2007;41:15–24.
- 260.- Lopez LC, Escames G, Tapias V, Utrilla P, León J, Acuña-Castroviejo D. et al. Identification of an inducible nitric oxide synthase in diaphragm mitochondria from septic mice: its relation with mitochondrial dysfunction and prevention by melatonin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2006;38:267–78
- 261.- Okatani Y, Okamoto K, Hayashi K, Wakatsuki A, Sagara Y. Maternal-fetal transfer of melatonin in human pregnancy near term. *J Pineal Res* 1998;25:129–34
- 262.- Reiter RJ. Melatonin: Lowering the High Price of Free Radicals. *News Physiol. Sci.* 2000;15:246-50
- 263.- Regoli F, Winston GW. Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxynitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999;156:96–105
- 264.- Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem.* 2002;2:181–97
- 265.- Kedziora-Kornatowska K, Szewczyk-Golec K, Czuczejko J, Pawluk H, van Marke de Lumen K, Kozakiewicz M, et al. Antioxidative effects of melatonin administration in elderly primary essential hypertension patients. *J Pineal Res.* 2008;45:312–7
- 266.- Tamura H, Takasaki A, Miwa I, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, et al. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res.* 2008;44:280–7

- 267.- Forrest CM, Mackay GM, Stoy N, Stone TW, Darlington LG. Inflammatory status and kynurenine metabolism in rheumatoid arthritis treated with melatonin. *Br J Clin Pharmacol.* 2007;64:517–26
- 268.- Garzón C, Guerrero JM, Aramburu O, Guzmán T. Effect of melatonin administration on sleep, behavioral disorders and hypnotic drug discontinuation in the elderly: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Aging Clin Exp Res.* 2009;21:38-42
- 269.- Nunes DM, Mota RM, Machado MO, Pereira ED, Bruin VM, Bruin PF. Effect of melatonin administration on subjective sleep quality in chronic obstructive pulmonary disease. *Braz J Med Biol Res.* 2008;41:926-31
- 270.- Peles E, Hetzroni T, Bar-Hamburger R, Adelson M, Schreiber S. Melatonin for perceived sleep disturbances associated with benzodiazepine withdrawal among patients in methadone maintenance treatment: a double-blind randomized clinical trial. *Addiction.* 2007;102:1947-53
- 271.- Lu WZ, Song GH, Gwee KA, Ho KY. The effects of melatonin on colonic transit time in normal controls and IBS patients. *Dig Dis Sci.* 2009;54:1087-93
- 272.- Block KI, Koch AC, Mead MN, Tothy PK, Newman RA, Gyllenhaal C. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic toxicity: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials. *Int J Cancer.* 2008;123:1227-39
- 273.- Seabra ML, Bignotto M, Pinto LR, Jr, Tufik S. Randomized, double-blind clinical trial, controlled with placebo, of the toxicology of chronic melatonin treatment. *J Pineal Res.* 2000;29:193–200
- 274.- Jahnke G, Marr M, Myers C, Wilson R, Travlos G, Price C. Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin administered orally to pregnant Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci.* 1999;50:271–9;
- 275.- Reiter R, Gultekin F, Flores LJ, Terron MP, Tan DX. Melatonin: potential utility for improving public health. *TAF Prev Med Bull.* 2006;5:131–58
- 276.- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72: 248–54.
- 277.- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 1979;95:351-8
- 278.- Eady JJ, Osta T, Dennis MF, Stratford MR, Peacock JH. Glutathione determination in the Tietze enzymatic recycling assay and its relationship to cellular radiation response. *Br J Cancer* 1995;72:1089-95
- 279.- Schägger H. Electrophoretic techniques for isolation and quantification of oxidative phosphorylation complexes from human tissues. *Methods Enzymology* 1996;264:555-66.
- 280.- Nijmans LGJ, Henderson NS, Holt IJ. (2002) Blue native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. *Methods* 26: 327-34.
- 281.- Martinez B, Del Hoyos P, Martin MA, Arenas J, Perez-Castillo A, Santos A. Thyroid hormone regulates oxidative phosphorylation in the cerebral cortex and striatum of neonatal rats. *J Neurochemistry* 2001;78:1054-63
- 282.- Triepels RH, Hanson BJ, van den Heuve LP, Sundell L, Marusich MF, et al. (2001). Human complex I defects can be resolved by monoclonal antibody analysis into distinct subunit assembly patterns. *J Biol Chem* 276: 8892–7
- 283.- Rasband WS. ImageJ. US National Institute of Health. Bethesda. Maryland. <http://rsb.info.nih.gov/ij/> 1997-2007
- 284.- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25:402-8.
- 285.- Bustin, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay. *J Mol Endocrinol* 2000;25:169-93
- 286.- Murray, J., Taylor, S.W., Zhang, B., Ghosh SS, and Capaldi RA. (2003). Oxidative damage to mitochondrial complex I due to peroxynitrite. Identification of reactive tyrosines by mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 278: 37223–30.

- 287.- Lenaz G, Fato R, Genova ML, Bergamini C, Bianchi C, Biondi A. Mitochondrial complex I: structural and functional aspects. *Biochim. Biophys. Acta* 2006;1757:1406-20.
- 288.- Grigorieff N. Structure of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Curr Opin Struct Biol* 1999;9:476-83.
- 289.- Djafarzadeh R, Kerscher S, Zwicker K, Radermacher M, Lindahl M, Schägger H, Brandt U. Biophysical and structural characterization of proton-translocating NADH-dehydrogenase (complex I) from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim. Biophys. Acta* 2000;1459:230-8
- 290.- Carroll J, Fearnley IM, Shannon RJ, Hirst J, Walker JE. Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol. Cell. Proteomics* 2003;2:117-26.
- 291.- Hirst J, Carroll J, Fearnley IM, Shannon RJ, Walker JE. The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 2003;1604:135-50.
- 292.- Sanyal AJ. The pathogenesis of NASH: human studies. In *Fatty Liver Disease. NASH and related disorders*. GC Farrell, J George, P de la M. Hall, AJ McCullough. Editors. Blackwell Publ Ltd. Malden. 2005:76-90
- 293.- Schägger H, von Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem.* 1991;199:223-31
- 294.- Clayton DA. Transcription of the mammalian mitochondrial genome. *Annu Rev Biochem* 1984;53:573-94
- 295.- Haque M, Mirshahi F, Campbell-Sargent C, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman M, et al. Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is associated with hepatocytes mitochondrial DNA depletion. *Hepatology* 2002;36(Suppl):403A.
- 296.- Mansouri A, Fromenty B, Berson A, Robin MA, Grimbert S, Beaugrand M, Erlinger S, Pessayre D. Multiple hepatic mitochondrial DNA deletions suggest premature oxidative aging in alcoholic patients. *J Hepatol.* 1997;27:96-102
- 297.- Tsuchishima M, Tsutsumi M, Shiroeda H, Yano H, Ueshima Y, Shimanaka K, Takase S. Study of mitochondrial DNA deletion in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res.* 2000;24(4 Suppl):12S-5S
- 298.- Demeilliers C, Maisonneuve C, Grodet A, Mansouri A, Nguyen R, Tinel M, et al. Impaired adaptive resynthesis and prolonged depletion of hepatic mitochondrial DNA after repeated alcohol binges in mice. *Gastroenterology* 2002;123:1278-90
- 299.- Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* 1997;387:147-63
- 300.- Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1997;94:514-9.
- 301.- Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:6465-7.
- 302.- Gao D, Wei C, Chen L, Huang J, Yang S, Diehl AM. Oxidative DNA damage and DNA repair enzyme expression are inversely related in murine models of fatty liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G1070-7
- 303.- Ballinger SW, Patterson C, Yan CN, Doan R, Burow DL, Young CG, et al. Hydrogen Peroxide- and Peroxynitrite-Induced Mitochondrial DNA Damage and Dysfunction in Vascular Endothelial and Smooth Muscle Cells. *Circ Res* 2000;86:960-6.
- 304.- Cover C, Mansouri A, Knight TR, Bajt ML, Lemasters JJ, Pessayre D, et al. Peroxynitrite-Induced Mitochondrial and Endonuclease-Mediated Nuclear DNA Damage in Acetaminophen Hepatotoxicity. *J Pharmacol Exper Ther* 2005;315:879-87
- 305.- Beckman JS, Chen J, Ischiropoulos H, Crow JP. Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol* 1994;233:229-40.
- 306.- Yermilov V, Rubio J, Becchi M, Friesen MD, Pignatelli B, Ohshima H. Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxynitrite in vitro. *Carcinogenesis* 1995;16:2045-50

- 307.- Videira A, Duarte M. On complex I and other NADH: ubiquinone reductases of *Neurospora crassa* mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 2001;33:197–203.
- 308.- Antonicka H, Ogilvie I, Taivassalo T, Anitori RP, Haller RG, Vissing J, Kennaway NG, Shoubridge EA. Identification and characterization of a common set of complex I assembly intermediates in mitochondria from patients with complex I deficiency. *J Biol Chem* 2003;278:43081–8.
- 309.- Ugalde C, Vogel R, Huijbens R, van den Heuvel B, Smeitink J, Nijtmans L. Human mitochondrial complex I assembles through the combination of evolutionary conserved modules: a framework to interpret complex I deficiencies. *Human Molecular Genetics*, 2004;13:2461–72
- 310.- Acin-Perez, R., Bayona-Bafaluy, M.P., Fernandez-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Perez-Martos, A., Bruno, C., Moraes, C.T. and Enriquez, J.A. Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol. Cell*, 2004;13,805–15.
- 311.- Cardol, P., Matagne, R.F. and Remacle, C. Impact of mutations affecting ND mitochondria-encoded subunits on the activity and assembly of complex I in *Chlamydomonas*. Implication for the structural organization of the enzyme. *J. Mol. Biol.*, 2002;319:1211–21.
- 312.- Hofhaus G, Attardi G. Lack of assembly of mitochondrial DNA-encoded subunits of respiratory NADH dehydrogenase and loss of enzyme activity in a human cell mutant lacking the mitochondrial ND4 gene product. *EMBO J* 1993;12: 3043–8,
- 313.- Alves PC, Videira A. The membrane domain of complex I is not assembled in the stopper mutant E35 of *Neurospora*. *Biochem Cell Biol*. 1998;76:139-43,
- 314.- Bai Y, Attardi G. The mtDNA-encoded ND6 subunit of mitochondrial NADH dehydrogenase is essential for the assembly of the membrane arm and the respiratory function of the enzyme. *EMBO J*. 1998;1:4848-58.
- 315.- Bourges I, Ramus C, Mousson de Camaret B, Beugnot R, Remacle C, Cardol P, et al. Structural organization of mitochondrial human complex I: role of the ND4 and ND5 mitochondria-encoded subunits and interaction with prohibitin. *Biochem J* 2004;383:491–9
- 316.- D'Aurelio M, Gajewski CD, Lenaz G, Manfredi G. Respiratory chain supercomplexes set the threshold for respiration defects in human mtDNA mutant cybrids. *Human Mol Genetics* 2006;15:2157-69.
- 317.- Vogel RO, Janssen RJ, Ugalde C, Grovenstein M, Huijbens RJ, Visch HJ, et al. Human mitochondrial complex I assembly is mediated by NDUFAF1. *FEBS J* 2005;272:5317-26.
- 318.- Ogilvie I, Kennaway NG, Shoubridge EA. A molecular chaperone for mitochondrial complex I assembly is mutated in a progressive encephalopathy. *J Clin Invest* 2005;115:2784-92
- 319.- Mishra S, Murphy LC, Murphy LJ. The Prohibitins: emerging roles in diverse functions. *J. Cell. Mol. Med*. 2006;10:353-63
- 320.- Anja Winter,1 Outi Ka"ma"ra" inen,1 and Andreas Hofmann. Molecular Modeling of Prohibitin Domains. *Proteins* 2007;68:353–62
- 321.- Nijtmans LG, Artal SM, Grivell LA, Coates PJ. The mitochondrial PHB complex: roles in mitochondrial respiratory complex assembly, ageing and degenerative disease. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:143-55.
- 322.- Steglich G, Neupert W, Langer T. Prohibitins regulate membrane protein degradation by the m-AAA protease in mitochondria. *Mol Cell Biol* 1999;19:3435–42.
- 323.- Nijtmans LGJ, de Jong L, Artal Sanz M, Coates PJ, Berden JA, Back JW, et al. Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilisation of mitochondrial proteins. *EMBO J* 2000;19:2444–51
- 324.- Arnold I, Langer T. Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002;1592:89–96
- 325.- Santamaría E, Avila MA, Latasa MU, Rubio A, Martin-Duce A, Lu SC, et al. Functional proteomics of nonalcoholic steatohepatitis: Mitochondrial proteins as targets of S-adenosylmethionine. *PNAS*. 2003;100:3065–70

- 326.- García-Ruiz I, Fernández-Moreira D, Rodríguez-Juan C, Díaz-Sanjuán T, Muñoz-Yagüe MT, Solís-Muñoz P, Solís-Herruzo JA. Peroxynitrite inhibits mitochondrial respiratory chain (MRC) and reproduces functional and proteomic alterations found in mitochondria from ob/ob mice. *Hepatology* 2008;48 (Suppl):843A.
- 327.- Aulak KS, Koeck T, Crabb JW, Stuehr DJ. Dynamics of protein nitration in cells and mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:30-38
- 328.- Ischiropoulos H, al-Mehdi AB. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett.* 1995 15;364:279-82
- 329.- Shigenaga MK, Lee HH, Blount BC, Christen S, Shigeno ET, Yip H, Ames BN. Inflammation and NO(X)-induced nitration: assay for 3-nitrotyrosine by HPLC with electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:3211-6.
- 330.- Haddad IY, Pataki G, Hu P, Galliani C, Beckman JS, Matalon S. Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J Clin Invest* 1994;94:2407-13
- 331.- Ischiropoulos H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 1998;356:1-11
- 332.- Whiteman M, Halliwell B. Protection against peroxynitrite-dependent tyrosine nitration and alpha 1-antiproteinase inactivation by ascorbic acid. A comparison with other biological antioxidants. *Free Radic Res.* 1996;25:275-83.
- 333.- Scott GS, Cuzzocrea S, Genovese T, Koprowski H, Hooper DC. Uric acid protects against secondary damage after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:3483-8.
- 334.- Cadenas E, Boveris A. Enhancement of hydrogen peroxide formation by photophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria. *Biochem J.* 1980;188:31-7.
- 335.- Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem.* 2001;276:38388-93
- 336.- Quijano C, Hernandez-Saavedra D, Castro L, McCord JM, Freeman BA, Radi R. Reaction of peroxynitrite with Mn-superoxide dismutase. Role of the metal center in decomposition kinetics and nitration. *J Biol Chem.* 2001;276:11631-8.
- 337.- Yamakura F, Taka H, Fujimura T, Murayama K. Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *J Biol Chem.* 1998;273:14085-9.
- 338.- Aulak KS, Miyagi M, Yan L, West KA, Massillon D, Crabb JW, Stuehr DJ. Proteomic method identifies proteins nitrated in vivo during inflammatory challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:12056-61.
- 339.- MacMillan-Crow LA, Cruthirds DL, Ahki KM, Sanders PW, Thompson JA. Mitochondrial tyrosine nitration precedes chronic allograft nephropathy. *Free Radic Biol Med.* 2001;31:1603-8
- 340.- Radi R, Rodriguez M, Castro L, Telleri R. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys.* 1994;308:89-95.
- 341.- Riobó NA, Clementi E, Melani M, Boveris A, Cadenas E, Moncada S, Poderoso JJ. Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. *Biochem J.* 200;359(Pt 1):139-45.
- 342.- Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys.* 1996;328:309-16.
- 343.- Bolaños JP, Heales SJ, Land JM, Clark JB. Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary culture. *J Neurochem.* 1995 May;64(5):1965-72
- 344.- Borutaite V, Budriunaite A, Brown GC. Reversal of nitric oxide-, peroxynitrite- and S-nitrosothiol-induced inhibition of mitochondrial respiration or complex I activity by light and thiols. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1459:405-12.

- 345.- Pearce LL, Epperly MW, Greenberger JS, Pitt BR, Peterson J. Identification of respiratory complexes I and III as mitochondrial sites of damage following exposure to ionizing radiation and nitric oxide. *Nitric Oxide*. 2001;5:128-36
- 346.- Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF α or adiponectin?. *Hepatology* 2004;40:46-54.
- 347.- Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, et al. Free fatty acids promotes hepatic lipotoxicity by stimulating TNF α expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 2004;40:185-94
- 348.- Nguyen MTA, Satoh H, Favelyukis S, Babendure JL, Imamura T, Sbodio JI, et al. JNK and tumor necrosis factor- α mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 2005;280:35361-71
- 349.- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 1991;288:481-7
- 350.- Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol.* 1992;5:834-42
- 351.- Bartlett D, Church DF, Bounds PL, Koppenol WH. The kinetics of the oxidation of L-ascorbic acid by peroxynitrite. *Free Radic Biol Med.* 1995;18:85-92.
- 352.- Hogg N, Joseph J, Kalyanaraman B. The oxidation of alpha-tocopherol and trolox by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys.* 1994;314:153-8.
- 353.- Moreno JJ, Pryor WA. Inactivation of alpha 1-proteinase inhibitor by peroxynitrite. *Chem Res Toxicol.* 1992;5:425-31
- 354.- van der Vliet A, O'Neill CA, Halliwell B, Cross CE, Kaur H. Aromatic hydroxylation and nitration of phenylalanine and tyrosine by peroxynitrite. Evidence for hydroxyl radical production from peroxynitrite. *FEBS Lett.* 1994;339:89-92.
- 355.- Clementi E, Brown GC, Feelisch M, Moncada S. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jun 23;95(13):7631-6.
- 356.- Taylor SW, Fahy E, Zhang B, Glenn GM, Warnock DE, Wiley S, et al. Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat Biotechnol.* 2003;21:281-6
- 357.- Rubbo H, Denicola A, Radi R. Peroxynitrite inactivates thiol-containing enzymes of *Trypanosoma cruzi* energetic metabolism and inhibits cell respiration. *Arch Biochem Biophys.* 1994;308:96-102.
- 358.- Pearce LL, Kanai AJ, Epperly MW, Peterson J, Nitrosative stress results in irreversible inhibition of purified mitochondrial complexes I and III without modification of cofactors, *Nitric Oxide* 2005;13:254-63
- 359.- Cassina AM, Hodara R, Souza JM, Thomson L, Castro L, Ischiropoulos H, Freeman BA, Radi R. Cytochrome c nitration by peroxynitrite. *J Biol Chem.* 2000;275:21409-15
- 360.- Sharpe MA, Cooper CE. Interaction of peroxynitrite with mitochondrial cytochrome oxidase. Catalytic production of nitric oxide and irreversible inhibition of enzyme activity. *J Biol Chem.* 1998;273:30961-72
- 361.- Pearce LL, Pitt BR, Peterson J. The peroxynitrite reductase activity of cytochrome c oxidase involves a two-electron redox reaction at the heme a(3)-Cu(B) site. *J Biol Chem.* 1999;274:35763-7
- 362.- Zhang Y, Marcillat O, Giulivi C, Ernster L, Davies KJ. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J Biol Chem.* 1990;265:16330-6.
- 363.- Brown GC. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Mar 1;1504(1):46-57.
- 364.- Chen J, Petersen DR, Schenker S, Henderson GI. Formation of malondialdehyde adducts in livers of rats exposed to ethanol: role in ethanol-mediated inhibition of cytochrome c oxidase. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2000;24:544-52

Bibliografía

- 365.- Chen J, Robinson NC, Schenker S, Frosto TA, Henderson GI. Formation of 4-hydroxynonenal adducts with cytochrome c oxidase in rats following short-term ethanol intake. *Hepatology*. 1999;29:1792-8
- 366.- Croteau DL, Stierum RH, Bohr VA. Mitochondrial DNA repair pathways. *Mutat Res*. 1999;434:137-48
- 367.- Pappolla MA, Sos M, Omar RA, Bick RJ, Hickson-Bick DL, Reiter RJ, Efthimiopoulos S, Robakis NK. Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the Alzheimer amyloid peptide. *J Neurosci*. 1997;17:1683-90
- 368.- Antolín I, Rodríguez C, Sainz RM, Mayo JC, Uría H, Kotler ML, et al. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J* 1996; 10: 882-90.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1.- Confirmamos que los ratones *ob/ob* presentan lesiones hepáticas de EGHNA y que la actividad de todos los complejos de la CRM y la respiración mitocondrial están significativamente disminuidas.

2.- La hipofunción de la CRM está justificada por existir en esos animales un descenso de la cuantía de los complejos completamente ensamblados que forman esa cadena, así como también de las subunidades que componen esos complejos.

3.- Nuestro estudio muestra que el descenso de los complejos completamente ensamblados tiene origen múltiple, ya que existe: (a) un defecto en el ensamblado; (b) una menor síntesis de las subunidades codificadas por el ADNmt que componen los complejos; ello es ocasionado por la lesión oxidativa del ADNmt; (c) degradación de las subunidades de los complejos, muy probablemente provocada por el anión peroxinitrito.

4.- En los ratones *ob/ob* existe estrés oxidativo que es responsable de las alteraciones encontradas en la CRM, ya que el tratamiento de estos animales con un antioxidante mitocondrial, la MnTBAP, impide que en ellos aparezcan todas las alteraciones que se encuentran en esa cadena (descenso de la actividad de la CRM, disminución de los complejos y de sus subunidades y de la expresión genética de las subunidades codificadas por el ADNmt).

5.- En estos ratones obesos existe nitración en 3-tirosina de las proteínas hepáticas, mitocondriales y de la CRM, lo cual juega también un papel en la patogenia de las alteraciones funcionales y moleculares de la CRM. El tratamiento con ácido úrico, un “limpiador” de peroxinitrito, impide que los ratones *ob/ob* desarrollen las alteraciones mitocondriales que hemos encontrado en los ratones *ob/ob* no tratados.

6.- El peroxinitrito añadido a proteínas mitocondriales normales reproduce “*in vitro*” todas las alteraciones funcionales y moleculares que hemos encontrado en los ratones *ob/ob*. Estos efectos son originados por la degradación de las proteínas de la CRM y pueden ser evitados mediante la adición de melatonina “*in vitro*” a las proteínas mitocondriales antes de exponerlas al peroxinitrito.

7.- La administración de melatonina a los ratones *ob/ob* entre las semanas 6 y 18 previene que en esos animales aparezcan las alteraciones mitocondriales que hemos visto que desarrollan los animales no tratados y que en ellos aparezcan las lesiones de EGHNA.