



Universidad del Mar
Campus Puerto Escondido

Efecto del fármaco IFC-305 sobre la morfología y complejos mitocondriales
hepáticos en un modelo de síndrome metabólico

TESIS

Que para obtener el Título Profesional
de Licenciado en Biología

Presenta:

Alberto García López

Directora:

Dra. Victoria Chagoya y Hazas

Codirector:

M. en B.E. Jesús Vladimir Hernández Rosado

Puerto Escondido, Oaxaca 2024

Dedicatoria

A mi querida madre, Elizabeth López Hernández, por su incondicional apoyo y amor. Gracias por creer en mí en todo momento y por enseñarme que, con esfuerzo y determinación, todo es posible.

A mi querido hermano, aunque ya no estás físicamente conmigo, tu recuerdo vive en mi corazón. Fuiste y seguirás siendo una parte esencial en mi vida, sé que tu influencia perdurará en cada sonrisa que comparta y en cada paso que dé.

Agradecimientos académicos

A la Universidad del Mar, Campus Puerto Escondido, Oaxaca, por la educación de calidad que recibí, la cual ha sido fundamental en mi desarrollo personal y profesional.

Al Instituto de Fisiología Celular, UNAM, por recibirme con las puertas abiertas en la realización de mi proyecto de tesis.

A la Dra. Victoria Chagoya y Hazas, Investigadora Emérita, por su dirección en este proyecto de tesis y brindarme un lugar de colaboración en su línea de investigación de Síndrome metabólico.

Al Dr. Enrique Chávez Jiménez por su valiosa ayuda en técnicas de determinación de la actividad de los complejos mitocondriales por métodos colorimétricos y en ensayos de Western blot.

A la Dra. Nora Gabriela Velazco Loyden, por su orientación en técnicas de aislamiento mitocondrial y densitometría.

A la Dra. Mariana por su valioso asesoramiento en el análisis de micrografías electrónicas.

A la Dra. Bibiana Ortega Domínguez por su ayuda en técnicas de Western blot.

A la Dra. María Concepción José Núñez Por su apoyo en la técnica de geles azules de gradiente y la actividad de la enzima F1F0 ATPasa en los geles azules nativos en los diferentes tratamientos del esquema de síndrome metabólico.

Agradecimientos personales

La realización de este proyecto de tesis no pudo haber sido posible sin el apoyo de mi directora de tesis, la Dra. Victoria Chagoya y Hazas, a la cual quiero expresar mi más sincero agradecimiento, por su invaluable guía, apoyo y dedicación. Su paciencia y conocimientos en el campo han sido fundamentales para el éxito de esta investigación.

Agradezco a los mejores técnicos del laboratorio 305 Sur por su apoyo incondicional a lo largo de este proyecto. Al Dr. Enrique Chávez por ser un gran maestro y amigo, sus valiosos consejos y enseñanzas me han marcado y han sido clave para crecer como estudiante y como persona. A la Dra. Nora Gabriela Velazco Loyden por su amistad, gran disponibilidad y su excelente guía académica, gracias por contagiarme de su pasión por la investigación.

Agradezco a la Dra. Bibiana Ortega Domínguez y a la Dra. Ana María Hernández Jiménez mis amigas de laboratorio, gracias por haber hecho tan amena mi estancia en el laboratorio, gracias también por su disponibilidad en la resolución de dudas y por sus consejos los cuales han sido muy importantes para desarrollar mi

pensamiento crítico de las técnicas de laboratorio que me han ayudado en la resolución de este trabajo.

A las Dras. Mariana Domínguez López y María Concepción José Núñez gracias por su cálida atención y por crear un ambiente académico tan acogedor. Su disposición para aclarar dudas y compartir sus conocimientos me brindó una valiosa perspectiva en cuanto a la metodología de la investigación.

Al Dr. Erick Andrés Muciño Olmos gracias por ser un gran amigo por los buenos momentos en el laboratorio y por inspirarme a incursionar en áreas innovadoras de la ciencia, gracias por toda la motivación.

A Alejandro Cabrera Aguilar y Rosendo García Carrillo gracias, amigos, son las personas más buenas que he conocido y siempre disponibles para las aventuras, con ustedes despejarme del estrés siempre fue muy divertido.

Al laboratorio del Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, les agradezco por ser tan amigables y entusiastas, siempre he podido contar con ustedes, Emmanuel gracias por ser tan buen amigo y por todas las aventuras que compartimos dentro y fuera del laboratorio, a Elías Uriel Ávila García por todo el apoyo, tu amistad tan leal y por siempre ser tan considerado y amable. A Karina Helivier Solis González por siempre estar dispuesta a escuchar y por los excelentes consejos académicos que me brindó.

Agradezco todo el apoyo brindado por el equipo tlacuachero nada de esto hubiera sido posible sin ustedes.

Agradezco a los integrantes del laboratorio 305 Sur por su cálida bienvenida y por el excelente ambiente de trabajo que me brindaron. La hospitalidad y el compañerismo que encontré en cada uno de ustedes fueron fundamentales para mi desarrollo académico. No tengo palabras para expresar mi gratitud por esta experiencia.

Al Dr. Juan Manuel Villa Hernández expreso mi más sincero agradecimiento por motivarme a salir de mi zona de confort y asumir nuevos desafíos, gracias por su gran compromiso como maestro y por brindarme su apoyo, confianza y amistad, sin sus consejos habría acabado habiendo una tesis solo por compromiso.

Al M. en B.E. Jesús Vladimir Hernández Rosado por su excepcional codirección, gracias por la gran disponibilidad y atención, a pesar de la distancia me demostró un gran compromiso en este proyecto siempre estando al pendiente.

Agradezco a la jefa de carrera, la M.C. Rosario García Alavez por siempre estar al pendiente de todos los trámites que requerí a la distancia, y brindarme su apoyo.

Agradezco a los revisores de mi proyecto de tesis, a la Dra. Victoria Chagoya y Hazas, al Dr. Juan Manuel Villa Hernández, al M. en B.E. Jesús Vladimir

Hernández Rosado, al M.C. Isaías Rufino Mendoza Martínez y al M.C.N.P. José Ramírez Palominos por el tiempo, compromiso y dedicación al revisar y sus valiosas aportaciones a mi escrito de tesis.

Agradezco a mis amigos Vanesa Itzel Pérez Romero, Karol Jhosep Pérez García, Carlos Sosa Zarate, Gabriel Tenorio Ziga, Atenas Meneses, Marcos Antonio Ramírez Juárez, gracias por su gran amistad su compañía y apoyo fuera de la academia siempre me motivo para continuar creciendo como persona y académicamente, los quiero mucho.

CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	11
RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN	14
Síndrome metabólico y epidemiología	14
Daño hepático en el síndrome metabólico	16
Funciones de las mitocondrias en el metabolismo energético y la homeostasis celular	17
Función de los complejos de la Cadena de transporte de electrones y ATP sintasa en la función mitocondrial.....	19
Complejo I. NADH: Ubiquinona Oxidorreductasa	19
Complejo II. Succinato Deshidrogenasa.....	20
Complejo III. Citocromo bc1	20
Complejo IV Citocromo C Oxidasa.....	21
Complejo V. ATP sintasa	22
Dinámica mitocondrial.....	23
Disfunción mitocondrial en modelos experimentales de síndrome metabólico	25
ANTECEDENTES	26
IFC-305, un derivado de adenosina y sus propiedades.....	26

Modelo de síndrome metabólico y daño hepático inducidos por una dieta hipercalórica	27
.....
Parámetros inspeccionados del modelo de síndrome metabólico	28
OBJETIVO GENERAL	30
Objetivos particulares	30
HIPÓTESIS	31
MATERIALES Y MÉTODOS	31
Material biológico	31
Extracción de mitocondrias	32
Cuantificación de proteína por método de Bradford	33
Determinación de la actividad del complejo I por reducción de DCPIP	33
Determinación de la actividad del complejo II por reducción de DCPIP	34
Determinación de la actividad del complejo III por reducción de citocromo c	34
Determinación de la actividad de la ATP sintasa en gel azul nativo	35
Determinación del área, circularidad y conteo de mitocondrias	36
Identificación de la presencia de las proteínas DRP1 y MFN2 mediante Western blot	37
.....
Análisis estadístico	37
RESULTADOS	38

Efecto del IFC-305 en la actividad de los complejos mitocondriales en un modelo de síndrome metabólico.....	38
Actividad de Complejo I.....	39
Actividad del complejo II.....	39
Actividad de complejo III.....	40
Actividad de la ATPasa en un modelo de síndrome metabólico.....	40
Actividad de ATPasa monómero.....	41
Actividad de ATPasa dímero.....	42
Actividad de ATPasa total.....	42
Relación entre la circularidad, área y número de mitocondrias y la fisión mitocondrial.	43
Desequilibrio de la dinámica mitocondrial.....	45
Cociente DRP1/MFN2.....	46
DISCUSIÓN.....	47
CONCLUSIONES.....	51
REFERENCIAS.....	53
ANEXO 1.....	65
ANEXO 2.....	65

ABREVIATURAS

HDL = Lipoproteínas de alta densidad

CTE = Cadena de transporte de electrones

LDL = Lipoproteínas de baja densidad

ATP = Adenosín trifosfato

NADH = Nicotinamida adenina dinucleótido forma reducida

FADH₂ = Flavina adenina dinucleótido forma reducida

NAD⁺ = Nicotinamida adenina dinucleótido forma oxidada

FAD = Flavina adenina dinucleótido forma oxidada

MFN1 = Mitofusina 1

MFN2 = Mitofusina 2

mit PLD = Fosfolipasa mitocondrial D

OPA1 = Atrofia óptica tipo 1

DRP1 = Proteína de dinámica mitocondrial 1

Fis1 = Proteína de fisión mitocondrial

MFF = Factor de fisión mitocondrial

MiD49 = Proteína de dinámica mitocondrial 49

MiD51 = Proteína de dinámica mitocondrial 51

MDa = Megadalton

DEN = Dietilnitrosamina

SIRT3 = Sirtuina 3

NASH = Esteatohepatitis no alcohólica

EHGNA = Enfermedad de hígado graso no alcohólico

BSA = Albúmina de suero bovino

EDTA = Ácido etilendiaminotetraacético

KCN = Cianuro de potasio

DCPIP = 2,6 diclorofenolindofenol

H₂O = Agua

CCl₄ = Tetracloruro de carbono

RESUMEN

El síndrome metabólico es una condición clínica que se define por 5 criterios de diagnóstico, de entre ellos principalmente la obesidad abdominal asociada a las dietas hipercalóricas y al sedentarismo que desarrollan NASH, aunado a esto, también se han reportado alteraciones en la función mitocondrial. El fármaco IFC-305 ha demostrado tener efectos favorables en la recuperación de la función hepática en un modelo de síndrome metabólico en ratas Wistar. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto del fármaco IFC-305 sobre la actividad de los complejos y la morfología mitocondrial de células hepáticas en un modelo de síndrome metabólico en ratas Wistar. Para ello, se evaluó la actividad de los complejos mitocondriales I, II y III mediante métodos colorimétricos, se evaluó la actividad de la ATP sintasa por gel azul nativo. Se determinó la morfología mediante el análisis de micrografías electrónicas, además, se analizaron las alteraciones en la dinámica mitocondrial midiendo los niveles de las proteínas DRP1 y MFN2. El fármaco IFC-305 mostró un efecto preventivo de la alteración de la actividad de los complejos mitocondriales, sin embargo, no se alteró la actividad de la ATPasa. La morfología mitocondrial y los niveles DRP1 y MFN2 indicaron un aumento de las mitocondrias con morfología disfuncional en el síndrome metabólico. En conclusión, el fármaco IFC-305 mostró un efecto positivo previniendo la alteración de la actividad de complejos I y II de la CTE, y la alteración de la morfología mitocondrial en el modelo de síndrome metabólico en rata Wistar.

ABSTRACT

Metabolic syndrome is a clinical condition defined by 5 diagnostic criteria, primarily abdominal obesity associated with hypercaloric diets and sedentary lifestyle, which develops non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Additionally, alterations in mitochondrial function have been reported. The drug IFC-305 has shown favorable effects on liver function recovery in a rat model

of metabolic syndrome. The objective of this research was to determine the effect of IFC-305 on the activity of complexes and mitochondrial morphology of liver cells in a rat model of metabolic syndrome. To this end, the activity of mitochondrial complexes I, II, and III was evaluated using colorimetric methods, and ATP synthase activity was evaluated by native blue gel. Morphology was determined by analyzing electron micrographs, and alterations in mitochondrial dynamics were analyzed by measuring the levels of DRP1 and MFN2 proteins. IFC-305 showed a preventive effect on the alteration of the activity of mitochondrial complexes, however, ATPase activity was not altered. Mitochondrial morphology and DRP1 and MFN2 levels indicated an increase in mitochondria with dysfunctional morphology in metabolic syndrome. In conclusion, the drug IFC-305 showed a positive effect by preventing the alteration of the activity of complexes I and II of the electron transport chain (ETC), and the alteration of mitochondrial morphology in the rat model of metabolic syndrome.

INTRODUCCIÓN

Síndrome metabólico y epidemiología

El síndrome metabólico (SM) es una condición clínica caracterizada por un conjunto de alteraciones metabólicas que aumentan de dos a seis veces el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus tipo 2 (1,2). Las principales causas de esta condición clínica son las dietas hipercalóricas y el sedentarismo, el riesgo aumenta cuando hay predisposición genética/epigenética (3). Para diagnosticar el SM, se requiere que el individuo cumpla con al menos tres de los cinco criterios de diagnóstico propuestos a nivel internacional: niveles bajos de colesterol transportado en lipoproteínas de alta densidad (HDL) (< 39.8 mg/dL en hombres y < 49.9 mg/dL en mujeres), hipertrigliceridemia (≥ 150.4 mg/dL), presión arterial elevada (sistólica