

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**EFFECTO DE LA OBESIDAD PRODUCIDA POR UNA DIETA ALTA EN
GRASA SOBRE EL BALANCE ÓXIDO-REDUCCIÓN CELULAR EN EL
CORAZÓN**

ISIDORA ANDREA MUJICA VALENZUELA

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGÍSTER EN FISIOPATOLOGÍA**

Directora de Tesis

Dra. Gina Sánchez V.

Dra. Paulina Donoso L.

Universidad de Chile

SANTIAGO – CHILE

2020



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CHILE

ESCUELA DE POSTGRADO

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

**PROGRAMA CONDUCENTE AL GRADO DE
MAGÍSTER EN FISIOPATOLOGÍA
D.E. Nº 005328 / 2012**

La Comisión de Examen de Grado certifica que:

D. ISIDORA ANDREA MUJICA VALENZUELA

ha rendido su examen con fecha 18 de marzo de 2020

obteniendo una calificación de 6.8 (escala de 1,0 a 7,0)

COMISIÓN:

1.- Prof. Ramón Rodrigo Salinas
Presidente Comisión

2.- Prof. Zully Pedrozo Cibils

3.- Prof. Paola Llanos Vidal

4.- Prof. Gladys Tapia Opazo

5.- Prof. Gina Sánchez Vergara
Coordinadora Comité del Programa

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las doctoras Gina Sánchez y Paulina Donoso por su tiempo, dedicación y disposición durante toda la realización de esta tesis; sin ellas no hubiese sido posible la realización de este trabajo.

ÍNDICE

ABREVIACIONES.....	3
1.-RESUMEN	5
2.-MARCO TEÓRICO.....	7
2.1.-Estrés oxidativo.....	8
2.2.-Principales fuentes de ROS en obesidad.....	9
2.3.-Balance óxido-reducción y antioxidantes	10
2.4.-Estrés reductivo.....	13
2.5.-Balance óxido-reducción en obesidad.....	14
3.-HIPÓTESIS	17
3.1.-OBJETIVO GENERAL.....	17
3.2.-OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
4.-MATERIALES Y MÉTODOS	18
4.1.-Grupos experimentales.....	18
4.2.-Tamaño muestral.....	18
4.4.-Cuantificación de proteínas.....	19
4.5.-Cuantificación de Glutación	20
4.6.-Cuantificación de NADH/NAD ⁺	20
4.7.-Cuantificación de NADPH/NADP ⁺	21
4.8.-Capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP).....	21
4.9.-Cuantificación de malondialdehído (MDA)	22
4.10.-Carbonilación de Proteínas	22
4.11.-Actividades enzimáticas.....	23
4.11.1.-Catalasa.....	23

4.11.2.-Superóxido dismutasa	23
4.11.3.-Glutación peroxidasa	23
4.11.4.-Glutación reductasa	24
5.-Análisis estadístico.....	24
6.-RESULTADOS.....	25
6.1.-Contenido de Glutación	27
6.2.-Contenido de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH+NAD ⁺)	28
6.3.-Contenido de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH+NADP ⁺)	29
6.4.-Cuantificación de la capacidad antioxidante total de homogenizado de tejido cardiaco y hepático y plasma (FRAP)	30
6.5.-Cuantificación de las especies que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) expresadas como MDA	31
6.6.-Carbonilación de proteínas	31
6.7.-Cuantificación de la actividad enzimática	32
6.7.1.-Catalasa	32
6.7.2.-Superóxido Dismutasa	33
6.7.3.-Glutación Peroxidasa	33
6.7.4.-Glutación Reductasa	34
7.-DISCUSIÓN	35
8.-CONCLUSIONES	39
9.-ANEXOS	40
10.-REFERENCIAS.....	41

ABREVIACIONES

ROS: *reactive oxygen species*, especies reactivas de oxígeno.

RNS: *reactive nitrogen species*, especies reactivas de nitrógeno.

$\cdot\text{O}_2^-$: superóxido.

$\text{OH}\cdot$: radical hidroxilo.

H_2O_2 : peróxido de hidrógeno.

NO: óxido nítrico.

ONOO^- : peroxinitrito.

NOX: NADPH oxidasa.

CYP: citocromo p450.

LOX: lipoxigenasa.

COX: ciclooxigenasa.

XO: xantina oxidasa.

mtNOS: enzimas óxido nítrico sintasa mitocondrial.

nNOS: enzima óxido nítrico sintasa neuronal.

eNOS: enzima óxido nítrico sintasa endotelial.

iNOS: enzima óxido nítrico sintasa inducible.

HFD: *high fat diet*, dieta alta en grasa.

GSH: glutatión.

GSSG: glutatión oxidado.

GSH/GSSG: razón glutatión reducido glutatión oxidado.

$\cdot\text{NO}$: monóxido de nitrógeno.

NADH/NAD⁺: razón NADH/NAD⁺.

NADPH/NADP⁺: razón NADPH/NADP⁺.

Nrf2: factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2.

NAD⁺: nicotinamida adenina nucleótido forma oxidada.

NADH: nicotinamida adenina nucleótido forma reducida.

GR: enzima glutatión reductasa.

FAD: flavina adenina dinucleótido.

GPx: enzima glutatión peroxidasa.

CAT: enzima catalasa.

ATP: adenosin trifosfato.

SOD: enzima superóxido dismutasa.

NFkB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

MDA: malondialdehído.

FRAP: *Ferric Reducing/Antioxidant Power*.

BCA: ensayo de ácido bicinconínico.

TBARS: *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*.

ARE: *antioxidant response element*.

1.-RESUMEN

Introducción: ratones macho C57BL/6 alimentados con dieta alta en grasa por 12 semanas no presentan signos de estrés oxidativo en el corazón, a pesar de que desarrollan cambios metabólicos, como aumento de peso, resistencia a insulina e hipertrofia cardiaca. Asimismo, se ha visto que en estos ratones aumenta la concentración de glutatión y la razón GSH/GSSG en homogenizado de tejido cardiaco. Estos resultados se contraponen a los observados en hígado y sugieren que la dieta alta en grasa gatilla mecanismos antioxidantes diferentes en el corazón. Por lo tanto, el propósito de este estudio es investigar los cambios en el estado óxido-reducción del corazón en ratones alimentados con dieta alta en grasa, por 12 semanas, para establecer si existen diferencias en la actividad de las principales enzimas antioxidantes y en las relaciones de los principales pares óxido-reducción (GSH/GSSG; NADH/NAD⁺; NADPH/NADP⁺).

Hipótesis: “La obesidad inducida en ratones C57BL/6 por dieta alta en grasa desencadena una respuesta antioxidante en el corazón que deriva en estrés reductivo”.

Objetivo: investigar el efecto de una dieta alta en grasa en el balance óxido-reducción en el tejido cardiaco.

Método: se utilizaron muestras de tejido cardiaco, obtenidas de dos grupos experimentales de ratones cepa C57BL/6. El grupo control fue alimentado con una dieta control y el grupo experimental con una dieta alta en grasa por 12 semanas. En homogenizados de corazón se determinó la concentración total de glutatión, y de nucleótidos de adenina, las razones de GSH/GSSG, NADH/NAD⁺ y NADPH/NADP⁺, la concentración de MDA, la capacidad antioxidante del plasma, la carbonilación de proteínas y la actividad de las enzimas glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa.

Resultados: para los ratones alimentados con dieta alta en grasa se observó que en el corazón se encuentran aumentados los siguientes parámetros: GSH total, razón GSHred/GSSG, NADH+NAD⁺ y aumento de la actividad de la enzima glutatión reductasa. Para el hígado, se observó un aumento en las razones GSHred/GSSG y NADPH/NADP⁺, un aumento en la carbonilación de proteínas, un aumento de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa, y una disminución de la actividad enzimática de la glutatión reductasa. Por último, en el plasma de estos ratones se observó una disminución de la capacidad antioxidante y una disminución de la actividad enzimática de la catalasa.

Conclusiones: en conjunto, los resultados anteriores muestran que se encuentran activadas las vías antioxidantes a nivel celular y que no existe un estado de estrés oxidativo en los ratones alimentados con dieta alta en grasa; sin embargo, tampoco es posible aseverar que estos se encuentran en un estado de estrés reductivo.

2.-MARCO TEÓRICO

El daño por estrés oxidativo se ha relacionado con la patogenia de enfermedades crónicas no transmisibles, como enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, obesidad y diabetes (1,2). En particular, la obesidad es actualmente un importante problema de salud pública, debido a la reducción de la calidad y la expectativa de vida, aumentando al mismo tiempo el riesgo de padecer otras enfermedades como diabetes, enfermedad cardiovascular, cáncer, asma, infertilidad, trastornos del sueño, disfunción hepática y disfunción renal (3).

El tejido adiposo se compone de grasa blanca, grasa parda y grasa *beige*. La grasa blanca está formada por adipocitos que en condiciones fisiológicas almacenan el exceso de nutrientes en gotas lipídicas de triglicéridos y se ubica en la región glúteo-femoral, en el tejido subcutáneo y en regiones viscerales, rodeando los órganos internos (4). La grasa parda se deposita con mayor frecuencia en la infancia que en la vida adulta, sin embargo, en los adultos persisten depósitos perirrenales, paravertebrales, supraclaviculares y algunas áreas alrededor de los vasos (5). Finalmente, la grasa *beige* se localiza principalmente en regiones inguinales y cervicales (6).

Estudios clínicos señalan que los depósitos de grasa blanca se correlacionan con un aumento de la incidencia de diabetes mellitus, dislipidemia aterogénica e hipertensión (7,8). Además, se ha demostrado que la grasa blanca es un marcador de resistencia a la insulina, que se asocia con el síndrome metabólico (9). Ante un balance de energía positivo crónico, los adipocitos de la grasa blanca en el tejido adiposo visceral acumulan triglicéridos, expandiendo el tejido adiposo visceral, aumentando la expresión de adipocinas proinflamatorias y de marcadores de estrés oxidativo, activando el sistema renina-angiotensina-aldosterona, y provocando también desregulación de vías de apoptosis y autofagia en los adipocitos (10,11).

2.1.-Estrés oxidativo

Cuando se produce un desbalance entre la producción de ROS (*reactive oxygen species*, ROS) o RNS (*nitrogen reactive species*, RNS) y sus mecanismos de eliminación, se produce el estrés oxidativo. Las ROS y las RNS participan de la mantención de la homeostasis celular (12,13). Las ROS incluyen radicales libres como el superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) y el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), y derivados no radicales del oxígeno como peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las RNS incluyen radicales libres como el óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) y derivados no radicales como el peroxinitrito (ONOO^-) (14). En particular, los radicales libres tienen un electrón desapareado que es altamente reactivo y, por lo tanto, se unen a otras moléculas para estabilizarse. Los derivados no radicales son menos reactivos y tienen una mayor vida media (14–16).

En las células existen distintas enzimas que producen ROS para el funcionamiento óptimo del metabolismo celular, como (12,17,18):

- NADPH oxidasa (NOX).
- Citocromo p450 (CYP).
- Lipoxigenasa (LOX).
- Ciclooxygenasa (COX).
- Xantina oxidasa (XO).
- Cadena transportadora de electrones.
- Betaoxidación de ácidos grasos en peroxisomas.

Las reacciones entre especies reactivas pueden dar origen a otras más reactivas, por ejemplo, mediante la reacción de Fenton puede producirse radical ($\text{OH}\cdot$) a partir de H_2O_2 utilizando hierro como donante de electrones (12,17,18).

Las RNS se producen a partir de NO, el cual es generado por las enzimas óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS), neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e inducible (iNOS). El (NO) puede reaccionar con ($\cdot\text{O}_2^-$) para generar especies reactivas como (ONOO^-) (19).

2.2.-Principales fuentes de ROS en obesidad

Se ha propuesto que la obesidad se asocia a un estado crónico de inflamación sistémica de bajo grado, el que está mantenido por la activación de la inmunidad innata en el tejido adiposo, provocando un aumento en los niveles de mediadores proinflamatorios circulantes y de marcadores de estrés oxidativo (20). Se describe que la dieta occidental, o dieta alta en grasa y en ácidos grasos saturados (HFD, por sus siglas en inglés), se asocia con un aumento del estrés oxidativo y puede modificar el nivel sérico de especies oxidantes (21). Se ha propuesto que el alto consumo de carbohidratos en la dieta contribuye a elevar la producción de ROS, debido a la saturación de la cadena transportadora de electrones (22). Así, es aceptado que la obesidad se caracteriza por un incremento en los niveles de ROS (1,22).

En la obesidad, las ROS derivan principalmente de la cadena transportadora de electrones mitocondrial y de la NOX. Al aumentar la ingesta calórica aumenta la producción de ($\cdot\text{O}_2^-$), por ejemplo, se ha comprobado que los ácidos grasos libres tienen este efecto en ratones (22,23). Además, la producción de ($\cdot\text{O}_2^-$) desde la cadena transportadora de electrones aumenta la producción de (H_2O_2) en la mitocondria (24–26). Finalmente, se ha comprobado que la producción de (H_2O_2) mitocondrial aumenta en una dieta alta en grasa, contribuyendo a un mayor aumento en el estrés oxidativo celular, cuya persistencia deriva en el desarrollo de resistencia a la insulina (27). Estas ROS interactúan con proteínas y lípidos alterando su estructura y función (24–26). Los mecanismos de eliminación de las ROS y de las moléculas oxidadas utilizan glutatión (GSH) como molécula antioxidante, que se oxida a GSSG (24–26). La razón GSH/GSSG se considera un marcador de estrés oxidativo celular y de la función mitocondrial (24–26).

Otra fuente importante de ROS en obesidad es la NOX, que en condiciones de una dieta alta en grasa, aumenta su expresión en respuesta a mediadores proinflamatorios de adipocitos y macrófagos (23).

Además, se ha propuesto que las ROS están aumentadas en la grasa blanca como resultado de disfunción mitocondrial y estrés de retículo de los adipocitos (28). Por ejemplo, en ratones obesos se ha observado que está aumentada la producción de $\cdot\text{O}_2^-$ citosólico en comparación con los controles (28). El aumento de ROS provoca lipoperoxidación, favoreciendo la disfunción endotelial y el desarrollo de aterosclerosis, aumentando el riesgo de infarto agudo al miocardio. Asimismo, el aumento del estrés oxidativo provoca daños en el DNA, que afectan la transcripción y la proliferación celular, interrumpiendo vías de señalización sensibles a estrés oxidativo (10,29).

2.3.-Balance óxido-reducción y antioxidantes

Para mantener la homeostasis, las células han desarrollado mecanismos antioxidantes que controlan los niveles de ROS/RNS (balance óxido-reducción). La producción de ROS moderada y controlada es necesaria para mantener los efectos mediados por segundos mensajeros; por ejemplo, el (NO) y el monóxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}$) participan en la vasodilatación, en la proliferación celular, en vías de apoptosis y en necrosis, mientras que el (H_2O_2) modula transducción de señales por oxidación reversible de residuos de cisteína y grupos tioles en enzimas tirosinas quinasas (30–33). Cuando existe un desequilibrio en el balance óxido-reducción, se fomenta el acúmulo de ROS/RNS, produciéndose el estado de estrés oxidativo en las células o en los tejidos, manifestando como consecuencia daños a nivel molecular (30–33). De esta manera, el estrés oxidativo puede afectar directamente a los ácidos nucleicos, carbohidratos, proteínas y lípidos (lipoperoxidación) (30–33). Así, en el organismo el balance óxido-reducción depende de la eliminación de ROS/RNS por acción de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, que reducen los compuestos oxidantes (30–33). Los tampones óxido-reducción corresponden a un grupo de moléculas que actúan como transportadoras de electrones, conduciendo equivalentes de reducción entre las reacciones óxido-reducción celulares, entre ellos se encuentran los pares óxido-reducción GSH/GSSG, NADH/NAD⁺ y NADPH/NADP⁺, que se describen a continuación junto a los antioxidantes enzimáticos más relevantes (34).

2.3.1.-Tampones óxido-reducción celulares

En todas las células del organismo existen moléculas que modifican o mantienen el estado óxido-reducción, con el objetivo de mantener la homeostasis de las células y de los tejidos. Entre ellas encontramos al GSH y a moléculas derivadas de NAD (32–36).

GSH/GSSG: el glutatión (γ -l-glutamil-l-cisteínil-glicina, GSH) es una molécula antioxidante que se encuentra en todas las células de los mamíferos. Es sintetizada en el citosol por las enzimas γ glutamil cisteína ligasa y glutatión sintetasa, desde donde es transportado hacia el núcleo, el retículo endoplásmico y la mitocondria. Al oxidarse produce GSSG, que es reconvertido a GSH por la glutatión reductasa (GR). La expresión de las enzimas que sintetizan GSH está regulada por Nrf2 (factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2) (32,35). En la mitocondria se concentra entre el 10% a 15% del GSH intracelular (5-10 mM). El GSH se encuentra dentro de las células en su forma reducida (GSH) y en su forma oxidada (GSSG) (32,35). El GSH es utilizado como sustrato por la enzima glutatión peroxidasa (GPx) para reducir lipohidroperóxidos a alcoholes y H_2O_2 a H_2O , formando un enlace disulfuro entre dos moléculas de GSH, que genera GSSG (32,35). La función antioxidante del GSH está dada por un grupo tiol que se oxida cuando el GSH reduce a la molécula blanco (35). El GSSG se acumula en el medio intracelular, por lo tanto, la razón GSH/GSSG es un marcador de estrés oxidativo (35). Así, la disminución de los niveles plasmáticos de GSH indica estrés oxidativo, mientras que niveles excesivos de GSH podrían disminuir el tono oxidativo basal contribuyendo a la generación de estrés reductivo (35).

NADH/NAD⁺: la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es una coenzima indispensable en el metabolismo intermediario que actúa como un transportador de electrones en reacciones óxido-reducción. NAD⁺ actúa principalmente como un aceptor de electrones de vías catabólicas y, por lo tanto, la razón NADH/NAD⁺ se mantiene baja en condiciones normales. La razón NADH/NAD⁺ en la mitocondria es aproximadamente 0,12 y alrededor de 0,01 en el citoplasma. En condiciones de estrés oxidativo, aumenta la

concentración de NADH y disminuye la concentración de NAD^+ , de tal manera que aumenta la razón NADH/NAD^+ (36,37).

NADPH/NADP⁺: la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP^+) es una coenzima del metabolismo intermediario que actúa principalmente como donante de electrones en las vías anabólicas, por lo tanto, la razón $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ se mantiene elevada en condiciones normales (36). En condiciones de estrés oxidativo, la concentración de NADPH disminuye, mientras que la de NADP^+ aumenta de tal manera que disminuye la razón $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ (38).

2.3.2.-Antioxidantes enzimáticos

Al igual que las moléculas tampones óxido-reducción, existen también antioxidantes enzimáticos, que regulan la producción de ROS y de GSH.

Glutación reductasa (GR): es un homodímero que tiene un sitio que une flavina adenina dinucleótido (FAD) y NADPH, está presente en el citoplasma, núcleo y mitocondrias de las células, y su función es catalizar la reducción de GSSG a GSH utilizando NADPH como aceptor de electrones (39).

Glutación peroxidasa (GPx): la familia de la glutación peroxidasa (GPx) incluye 4 isoformas que contienen seleniocisteína (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4). La isoforma GPx1 es la más abundante y está presente en todas las células en los dominios citosólico, mitocondrial y peroxisomal. Su función es la remoción de peróxidos intracelulares y es más efectiva que la CAT (catalasa) en la reducción de lipohidroperóxidos y de la lipoperoxidación total (40).

En condiciones fisiológicas, en la célula se requieren ROS (principalmente mitocondriales) para la estabilización de proteínas mediante la formación de enlaces disulfuros. Una sobreexpresión de GPx1 puede reducir la formación de estos enlaces, lo cual se relaciona a

nivel mitocondrial con una disminución del potencial de membranas y disminución de la producción de ATP (disfunción mitocondrial) y a nivel celular con una reducción de la señalización de factores de crecimiento (32).

Superóxido dismutasa (SOD): dismuta el anión superóxido produciendo H_2O_2 . En mamíferos, el H_2O_2 es una molécula importante en la señalización celular y puede activar la transcripción de numerosos genes. Una reducción en los niveles de H_2O_2 podría promover apoptosis celular (16). En modelos experimentales de obesidad inducida por dieta alta en grasa, se ha detectado que los adipocitos secretan mayores niveles de mediadores proinflamatorios (lipoquinas), generando un incremento en la producción de ROS/RNS, lo que perpetúa la producción de citoquinas proinflamatorias. Este proceso genera alteraciones en el balance óxido-reducción de los adipocitos, disminuyendo la actividad de SOD, aumentando la muerte celular y por lo tanto, generando mayor acúmulo de ROS/RNS (41).

Catalasa (CAT): cataliza la transformación de H_2O_2 en H_2O y O_2 . Cuando está sobreexpresada, la CAT promueve la muerte celular por apoptosis y cuando está disminuida, disminuye la activación de la vía de supervivencia de NF κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), necesaria para contrarrestar la apoptosis (42). Así, la CAT reduce la concentración de H_2O_2 celular producido por la reducción del superóxido, y en condiciones proinflamatorias este balance se desregula, favoreciendo la acumulación de H_2O_2 y superóxido. A bajas concentraciones de H_2O_2 disminuye su actividad catalítica y a alta concentración estimula la actividad de la peroxidasa.

2.4.-Estrés reductivo

El estrés oxidativo participa en la patogénesis de la obesidad, sin embargo, el tratamiento con antioxidantes no siempre ha sido positivo. Esto sugiere que un descenso excesivo de las ROS es perjudicial para las células y, de esta manera, los daños celulares estarían mediados tanto por un exceso de ROS (estrés oxidativo) como por un descenso en los niveles de ROS

(estrés reductivo). El estrés reductivo se define como un “aumento anormal en los equivalentes reductores en presencia de sistemas intactos de oxidación y reducción”, es decir, cambios en las razones NADH/NAD^+ , NADPH/NADP^+ y GSH/GSSG (32,43).

El exceso de equivalentes reductores altera la formación de puentes disulfuro en proteínas, modificando el metabolismo celular y alterando la actividad transcripcional (32). Aunque todavía no es un fenómeno bien comprendido, recientemente se ha descrito que el estrés reductivo participaría en el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas, como cardiomiopatía hipertrófica, distrofia muscular, hipertensión pulmonar, artritis reumatoidea, cáncer, Enfermedad de Alzheimer y síndrome metabólico (32).

2.5.-Balance óxido-reducción en obesidad

Lipoperoxidación. La lipoperoxidación es el daño directo por ROS a los lípidos. En pacientes obesos se ha demostrado que su enfermedad es un factor de riesgo independiente para la lipoperoxidación plasmática y que los niveles de lipoperoxidación plasmática son mayores en ellos en comparación con individuos sanos (44,45).

La lipoperoxidación es un proceso en el que las ROS oxidan a lípidos que contienen dobles enlaces, especialmente ácidos grasos poliinsaturados, aunque también ocurre con el colesterol, fosfolípidos y glicolípidos; originando radicales lipoperóxidos e hidroperóxidos (12,13,46–49). Los lípidos también pueden ser oxidados por enzimas como las lipoxigenasas, ciclooxigenasas y la citocromo P450 (12,13,46–49). En condiciones fisiológicas, tasas de lipoperoxidación bajas son necesarias para mantener la homeostasis celular, ya que activan vías constitutivas que aumentan la producción de antioxidantes (12,13,46–49). Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo, tasas de lipoperoxidación altas inducen a muerte celular por apoptosis (50).

La detección de productos de la lipoperoxidación permite determinar el nivel del estrés oxidativo, entre ellos se encuentran el malondialdehído (MDA) y las sustancias reactivas del ácido barbitúrico tales como lipohidroxi-peróxidos, dienos conjugados, 4-hidroxinonenal y F2 isoprostano (51).

2.6.-Estrés reductivo y obesidad

En ratones alimentados con dieta alta en grasa (10-16 semanas) se ha observado que aumentan la expresión y la actividad enzimática de SOD, CAT y GPx hepáticas, aumentando también los niveles de MDA y de GSSG, incrementando la razón GSH/GSSG. No obstante la dieta alta en grasa aumenta el daño hepático mediado por estrés oxidativo (52), no todos los autores coinciden con esta observación. Recientemente, en un modelo de ratones obesos alimentados con dieta alta en grasa, se detectó que mientras en el hígado no variaban los niveles de GSH y disminuía la razón GSH/GSSG, en el riñón disminuía la concentración total de GSSG y aumentaba la expresión de GPx. Estos cambios no fueron observados en todas las cepas de ratones utilizadas, lo que sugiere que el efecto de la dieta alta en grasa sobre el sistema GSH está regulado genéticamente y su variación depende del tejido (53).

En este contexto, en pacientes con falla cardíaca se ha observado un estado hiperreductivo, en vez de un estado de estrés oxidativo (54) y en modelos animales, un aumento de NADPH en el corazón (55). En conjunto, estos datos permiten concluir que el estrés reductivo es capaz de incrementar el daño tisular en el miocardio. Aunque los mecanismos subyacentes aún se desconocen, es importante conocer si estos están también alterados en la obesidad.

Recientemente, nuestro grupo de investigación observó que ratones C57BL/6 alimentados con dieta alta en grasa por 12 semanas incrementan de peso, se hacen resistentes a la insulina, y presentan signos que indican el comienzo de hipertrofia cardíaca. Sin embargo, estos ratones no presentan signos de estrés oxidativo en el corazón, tales como aumento de

carbonilación de proteínas o disminución del número de tioles libres. Además, se ha observado en un estudio piloto que mientras aumenta la concentración de glutatión y la razón GSH/GSSG, no existen diferencias en las concentraciones de MDA, un indicador de peroxidación (datos no publicados). Estos resultados observados son distintos a los que se observan en hígado (56–61) y sugieren que la dieta alta en grasa desencadena mecanismos antioxidantes en el corazón.

En términos generales, la obesidad podría estar asociada tanto a estrés oxidativo como a estrés reductivo, teniendo distintos efectos en diferentes tejidos. Así, el balance óxido-reducción puede asociarse a distintas patologías, por lo que resulta relevante determinar la actividad de las principales enzimas antioxidantes y las relaciones de los principales pares óxido-reducción (GSH/GSSG; NADH/NAD⁺; NADPH/NADP⁺), para establecer si efectivamente el corazón responde de una forma distinta al hígado en un modelo de ratón con ingesta alta en grasa. En este contexto, estos hallazgos serían de gran utilidad para prevenir futuras patologías cardíacas o hepáticas en pacientes obesos o en riesgo de obesidad, a través de la dieta, induciendo mayor o menor actividad de enzimas asociadas al balance óxido-reductivo.

3.-HIPÓTESIS

“La obesidad inducida en ratones C57BL/6 por dieta alta en grasa desencadena una respuesta antioxidante en el corazón que deriva en estrés reductivo”.

3.1.-OBJETIVO GENERAL

Investigar el efecto de una dieta alta en grasa en el balance óxido-reducción en el tejido cardiaco.

3.2.-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.-Evaluar el efecto de la dieta alta en grasa sobre el estado óxido-reducción en el tejido cardiaco.

Para desarrollar este objetivo se cuantificó la razón GSH/GSSG, NADH/NAD⁺ y NADPH/NADP⁺.

2.-Evaluar el efecto de la dieta alta en grasa en los marcadores de daño oxidativo en el tejido cardiaco.

Para desarrollar este objetivo se cuantificó la capacidad antioxidante total del tejido (FRAP), la concentración de MDA y las proteínas carboniladas.

3.-Evaluar el efecto de la dieta alta en grasa en los mecanismos antioxidantes en el tejido cardiaco.

Para desarrollar este objetivo se cuantificó la actividad de las enzimas SOD, CAT, GPx y GR.

4.-MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.-Grupos experimentales

Los ratones macho cepa C57BL/6 fueron adquiridos del Instituto de Salud Pública (ISP), Santiago, Chile. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile con la resolución N° CBA0819 asociada al proyecto Fondecyt Regular N° 1160704. Los ratones fueron mantenidos en condiciones de humedad y temperatura controlada con ciclo luz/noche 12:12 con alimentación y agua *ad libitum*, y mantenidos hasta las 12 semanas, según los protocolos establecidos por la *American Veterinary Medical Association (AVMA)*.

A partir de 12 ratones, 6 se alimentaron con dieta alta en grasa, compuesta por 60% de calorías provenientes de grasa, 20% de carbohidratos y 10% de proteínas (ResearchDiets, Inc. NJ, USA), y 6 ratones se alimentaron con una dieta control compuesta por 10% de calorías provenientes de grasa (Champion®, Santiago, Chile).

Luego de 12 semanas, cada animal se pesó y se cuantificó en el plasma la glucosa, insulina, triglicéridos y colesterol. Inmediatamente después de la eutanasia los corazones e hígados fueron obtenidos y se mantuvieron a -80°C bajo atmosfera de argón, hasta su procesamiento.

4.2.-Tamaño muestral

Considerando como variable el peso, para tener un poder de un 90%, un error alfa de un 5% y una diferencia entre las medias de un 20%, se requiere de un n de 6 por grupo experimental.

4.3.-Homogeneizado de tejido

Se utilizó tejido cardíaco y hepático de ratones pulverizado previamente bajo nitrógeno líquido. A 0,2 gramos de tejido en polvo se le agregaron 600 μL de tampón compuesto por 20 mM de ácido 3-(n-morfolino)-propanosulfónico (MOPS)-Tris pH 7. Luego se homogeneizaron con homogeneizador eléctrico TissueTearer (BioSpec, modelo 985370), 3 veces por 30 segundos cada ciclo, a velocidad media. Las muestras homogenizadas se trasladaron a un tubo Eppendorf y se centrifugaron a 1000 g por 20 minutos a 4°C (rotor 220-87, centrífuga Hermle, modelo Z236K). El sobrenadante se aisló y se separó en alícuotas, aplicando argón a cada una, y se almacenó a -80°C. Para cada muestra de homogenizado, se separó una fracción de homogenizado para realizar la cuantificación de proteínas con el método de BCA.

4.4.-Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el ensayo de ácido bicinconínico (*bicinchoninic acid*, BCA), con el kit *Pierce™ BCA Protein Assay* (Thermo Scientific™, Rockford, USA) (62). Este método permite cuantificar la cantidad total de proteínas de una muestra y se basa en la capacidad de las proteínas de reducir Cu^{+2} a Cu^{+1} en una solución alcalina, donde cada ion Cu^{+1} se une a 2 moléculas de BCA, generando un compuesto de color morado, cuya absorbancia es detectable a 562 nm. En breve, se preparó un estándar de albúmina de suero bovino (BSA) y con éste se prepararon 8 diluciones seriadas en el rango de 20-2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$. Luego, se preparó el reactivo de trabajo, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. A continuación, se agregaron 25 μL de cada dilución del estándar, de los homogenizados de tejido cardíaco y de los homogenizados de tejido hepático en una placa de 96 pocillos. Inmediatamente se agregaron 200 μL de la solución de trabajo a cada pocillo. La placa se puso en un *shaker* por 30 segundos y luego se incubó a 37°C por 30 minutos. Al cabo de los 30 minutos, se leyó la absorbancia a 562 nm.

4.5.-Cuantificación de Glutación

La determinación del contenido de glutación (GSH) se realizó con el método espectrofotométrico de Griffith (63), utilizando el kit *Glutathione Assay* (Cayman Chemical®, Michigan, USA). El ensayo utiliza la enzima glutación reductasa (GR) para la cuantificación de GSH. En el ensayo, el GSH reacciona con el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB, o reactivo de Ellman) y produce ácido tio-2-nitrobenzoico (TNB), que es de color amarillo. El GSTNB (GSH y TNB) que se produce es reducido por la GR para reciclar GSH y producir más TNB. La concentración de TNB producido es directamente proporcional a la concentración de GSH en la muestra, por lo tanto, la medición de absorbancia de TNB a 412 nm permite estimar la concentración de GSH en la muestra. En resumen, el ensayo indica la concentración de GSH total y para calcular la concentración de GSSG se realizó la derivatización de GSH con 2-vinilpiridino. Éste alquila el GSH en la muestra, dejando sólo el GSSG, el que puede ser cuantificado por DTNB. Por último, antes de realizar el ensayo, los homogenizados de tejido cardiaco y hepático utilizados fueron desproteinizados.

4.6.-Cuantificación de NADH/NAD⁺

Para determinar la proporción de NADH/NAD⁺ se utilizó el kit *NAD/NADH Assay Kit (Colorimetric)* (ABCAM®, USA – ab65348) (64). El ensayo utiliza una enzima que reduce NAD⁺ a NADH. El NADH reacciona con una sonda colorimétrica y se mide su absorbancia a 450 nm, por lo tanto, el ensayo mide la concentración de NADH total en las muestras. Para determinar la concentración de NADH se descompuso NAD⁺ antes de la reacción (se calentaron las muestras a 60°C por 30 minutos, de tal manera que sólo queda NADH). Luego, en una placa de 96 pocillos se agregaron las diluciones estándar de NADH y las muestras de homogenizado de tejido cardiaco y hepático; a cada pocillo de agregó el “mix de reacción” y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Transcurridos los 5 minutos, se agregó el “revelador de NADH” a cada pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente por 60 minutos. Finalmente, se leyó la absorbancia a 450

nm. La velocidad de la reacción se determinó en base al cambio (aumento o disminución) de absorbancia a 450 nm.

4.7.-Cuantificación de NADPH/NADP⁺

Para determinar la proporción de NADPH/NADP⁺ se utilizó el kit *NADP/NADPH Assay Kit (Colorimetric)* (ABCAM[®], USA –ab65349) (65). El ensayo utiliza una enzima que reduce NADP⁺ a NADPH. El NADPH reacciona con una sonda colorimétrica y se mide su absorbancia a 450 nm, por lo tanto, el ensayo mide la concentración de NADPH total en las muestras. De esta manera, para medir la concentración de NADPH total no fue necesario tratar los homogenizados de tejido cardíaco y hepático previo al ensayo. Para determinar la concentración de NADPH se descompuso NADP⁺ antes de la reacción (calentando las muestras a 60°C por 30 minutos, de tal manera que sólo queda NADPH). Luego, en una placa de 96 pocillos se agregaron las diluciones estándar de NADPH y las muestras de homogenizado de tejido cardíaco y hepático; a cada pocillo se agregó el “mix de reacción” y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Transcurridos los 5 minutos, se agregó el “revelador de NADPH” a cada pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente por 60 minutos. Finalmente, se leyó la absorbancia a 450 nm. La velocidad de la reacción se determinó en base al cambio (aumento o disminución) de absorbancia a 450 nm.

4.8.-Capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP)

Para determinar la capacidad antioxidante del tejido cardíaco, se realizó el ensayo de la capacidad de reducción férrica del plasma (del inglés *ferric reducing ability of plasma*, FRAP), de acuerdo con el protocolo de Benzi y Strain (66). Se utilizó el kit Este ensayo se fundamenta en que cuando un complejo férrico es reducido en condiciones ácidas a su forma ferrosa (Fe⁺²), emite un color azul, cuya absorbancia se puede medir a 593 nm. Para realizar el ensayo, primero se diluyeron los homogenizados de tejido cardíaco y hepático para alcanzar una absorbancia correspondiente al estándar de 500-600 µM (previamente

preparado). El plasma no requiere ser diluido. Luego, se agregaron 10 μL de muestra diluida (corazón e hígado) o de plasma en pocillos de una placa de 96 pocillos. A continuación, se agregaron 220 μL a cada pocillo de la “solución de trabajo FRAP”, previamente preparada. La placa se mezcló en un *shaker* por 4 minutos y se leyó la absorbancia a 593 nm.

4.9.-Cuantificación de malondialdehído (MDA)

Para determinar la lipoperoxidación, se cuantificó el malondialdehído (MDA) en homogeneizado de tejido cardíaco por método colorimétrico (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (65). Como control se usó homogeneizado de tejido hepático. Brevemente, 50 μL de cada muestra, se incubaron con ácido tiobarbitúrico en presencia de SDS a 90°C por 60 min. Se detuvo la reacción en hielo, se centrifugó a 1000 g por 15 min, y se determinó la densidad óptica del sobrenadante a 532 nm. Se usó una curva de calibración que utiliza MDA como estándar de calibración (OxiSelect™ TBARS Assay Kit, MDA Quantitation Catalog number STA-330, Cell Biolabs, INC).

4.10.-Carbonilación de Proteínas

Para determinar el contenido de proteínas carboniladas de las muestras, se utilizó el kit *OxiSelect AOPP* (STA-318, Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) (67). El ensayo se basa en que los grupos carbonilados de las proteínas oxidadas pueden ser marcados con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNHP). La DNHP reacciona con los grupos carbonilos, formando 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP), que es estable y puede ser detectada y cuantificada por espectrometría (365-375 nm). Para realizar el ensayo se prepararon alícuotas de los homogenizados de tejido cardíaco y hepático conteniendo 250 $\mu\text{g/mL}$ de proteínas. De éstas, se agregaron 200 μL por pocillo en una placa de 96 pocillos y luego se les agregó un iniciador de la reacción, seguido de una solución de *stop*. Finalmente, se midió la absorbancia a 340 nm.

4.11.-Actividades enzimáticas

4.11.1.-Catalasa

Se determinó la actividad de la catalasa utilizando el kit *Catalase Specific Activity Kit* (ABCAM[®], USA - ab118184) (68). El ensayo se basa en que la CAT presente en las muestras reacciona con H₂O₂ para producir H₂O y O₂. El H₂O₂ no convertido reacciona con una sonda colorimétrica que se puede medir a 570 nm. La actividad de la CAT presente en la muestra es inversamente proporcional a la señal obtenida.

4.11.2.-Superóxido dismutasa

Se determinó la actividad de la enzima superóxido dismutasa utilizando el kit *Superoxide Dismutase Assay Kit* (Cayman Chemical[®], USA -706002) (69). El ensayo utiliza una sal de tetrazolio para determinar la concentración de ion superóxido producido por la xantina oxidasa (XO) Una unidad de SOD se define como la necesaria para reducir en un 50% el superóxido. El ensayo mide la actividad enzimática de 3 tipos de SOD (Cu/Zn, Mn y FeSOD). Brevemente, se agregó XO a las muestras, se incubó por 30 min y se leyó la absorbancia a 460 nm. La actividad se determinó utilizando una curva estándar de SOD (SOD U/mL).

4.11.3.-Glutación peroxidasa

Se determinó la actividad de la enzima glutación peroxidasa utilizando el kit *Glutathione Peroxidase Assay Kit (Colorimetric)* (ABCAM[®], USA – ab102530) (70). Este ensayo se basa en que la GPx oxida el GSH para producir GSSG, como parte de una reacción donde reduce hidroperóxido de cumeno. La GR reduce el GSSG para producir GSH, y en la misma reacción, consume NADPH. De esta manera, la disminución de NADPH (medida a 340 nm) es proporcional a la actividad de GPx.

4.11.4.-Glutación reductasa

Se determinó la actividad de la enzima glutación reductasa utilizando el kit *Glutathione Reductase Assay Kit* (ABCAM®, USA – ab83461) (71). Este ensayo se basa en la reducción de GSSG a GSH por acción de la enzima GR. El GSH producido reacciona con ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) para generar TNB2, que es de color amarillo y cuya absorbancia puede medirse a 405 nm. De esta manera, el ensayo detecta la actividad de GR según la producción de TNB.

5.-Análisis estadístico

Los datos se expresaron como promedio \pm EMS. La normalidad de la distribución de los datos se determinó usando la prueba de Shapiro-Wilk. Las diferencias entre los grupos experimentales se analizaron utilizando la prueba de Mann Whitney. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

6.-RESULTADOS

Los ratones fueron alimentados *ad libitum* desde el día 21 de su nacimiento durante 12 semanas con una dieta control (grupo control, 10% de las calorías en grasas) o con una dieta alta en grasa (grupo HFD, 60% de las calorías en grasas). Respecto a los parámetros físicos, se registró el peso corporal, el peso del tejido adiposo y el peso del corazón (para el detalle de los parámetros físicos examinados individualizados para cada n, véase Anexo 1). El grupo HFD registró un aumento de 52% de peso corporal total respecto al control, cerca de un 500% de aumento de peso del tejido adiposo visceral y un 19% de aumento de peso del corazón (figura 1A, B y C).

Adicionalmente, se midió el largo de la tibia como índice de crecimiento de los animales, sin encontrarse diferencias entre ambos grupos (ver Figura 1D). También se registró la razón $((\text{peso tejido adiposo}/\text{peso corporal}) \times 100)$, y la razón $(\text{peso corazón}/\text{largo de la tibia})$ para determinar la presencia de hipertrofia cardíaca. La razón $((\text{peso tejido adiposo}/\text{peso corporal}) \times 100)$ aumentó en cerca del 250% en el grupo HFD y la razón $(\text{peso corazón}/\text{largo de la tibia})$ en un 18% en el grupo HFD (figura 1E y F).

Por último, se cuantificó en una muestra de plasma sanguíneo (tomada con 6 horas de ayuno) el colesterol, los triglicéridos, el contenido de glucosa, el contenido de insulina, y se calculó el índice HOMA $(\text{insulinemia } (\mu\text{U/ml}) \times \text{glicemia (mmol/l)} / 22,56)$ para ambos grupos. Al comparar el grupo HFD con el control, se observó que la colesterolemia aumentó en un 60%, la trigliceridemia en un 24%, la glicemia en un 23%, la insulina en alrededor de 300% y el índice HOMA en casi un 500% (figura 1G, H, I, J y K).

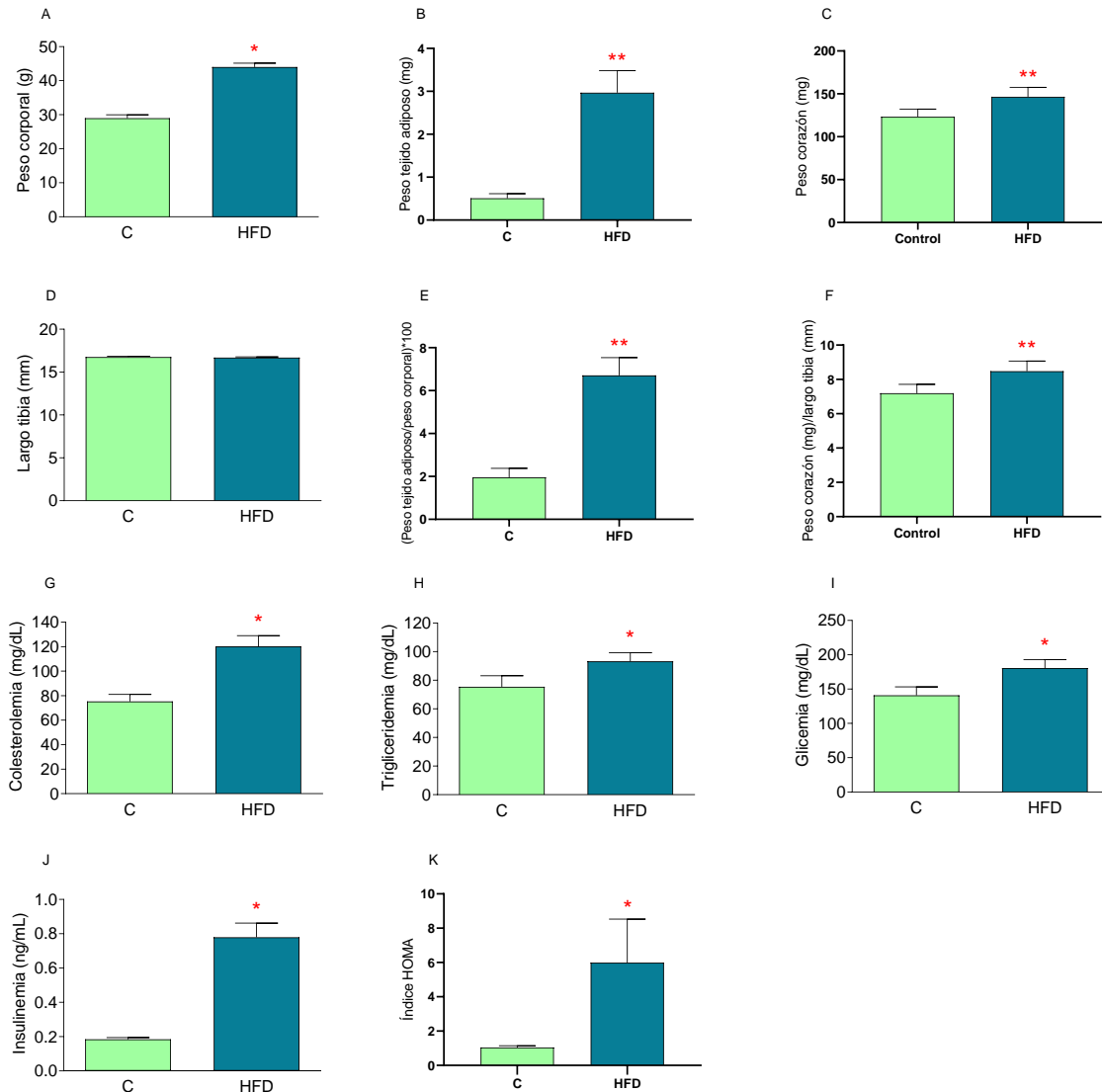


Figura 1. Caracterización del modelo experimental. A) Peso corporal. B) Peso tejido adiposo visceral. C) Peso corazón. D) Largo tibia. E) (Peso tejido adiposo/peso corporal) *100. F) Peso corazón/largo de tibia. G). Colesterolemia. H) Trigliceridemia. I) Glicemia. J) Insulinemia. K) Índice HOMA. Las barras representan el promedio \pm error medio estándar de 6 experimentos independientes para cada condición. C: Control, HFD: Grupo alimentado con dieta alta en grasa. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

6.1.-Contenido de Glutación

El contenido total de glutación (GSH total, GSHred+GSSG) y el contenido de glutación reducido (GSHred) se encontraron aumentados en los homogenizados de corazón de los animales alimentados con dieta alta en grasa por 12 semanas (HFD), no se encontraron diferencias en el contenido de glutación oxidado (GSSG), y la razón GSHred/GSSG aumentó en un 41% en los animales HFD comparados con el grupo alimentado con dieta control (figura 2). Encontramos en el tejido hepático que el contenido total de glutación es más alto que en tejido cardiaco, y no encontramos diferencias en el contenido de GSHred, GSSG, por lo tanto, tampoco encontramos diferencias en la razón GSH/GSSG entre controles y HFD (figura 3).

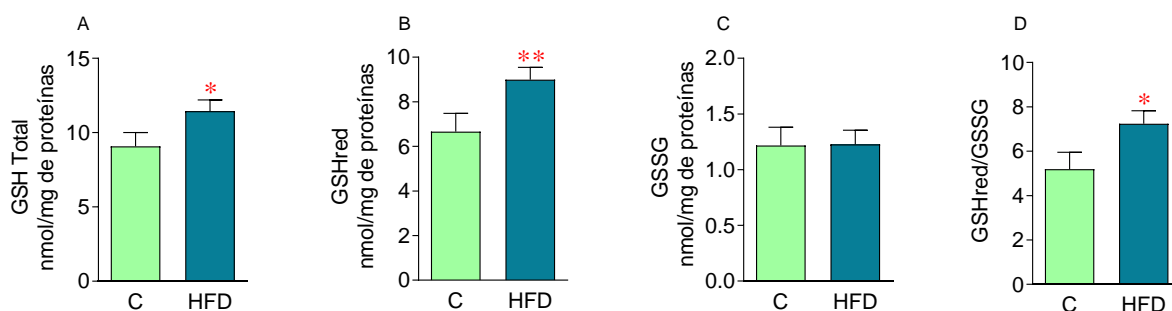


Figura 2. Cuantificación de glutación en homogenizado de tejido de corazón. A). GSH total (GSHred+GSSG). B). GSHred. C). GSSG. D). Razón GSH/GSSG. Las barras representan el promedio \pm error medio estándar de 6 experimentos independientes para cada condición. GSH: glutación, GSHred: glutación reducido, GSSG: glutación oxidado, C: Control, HFD: Grupo alimentado con dieta alta en grasa. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

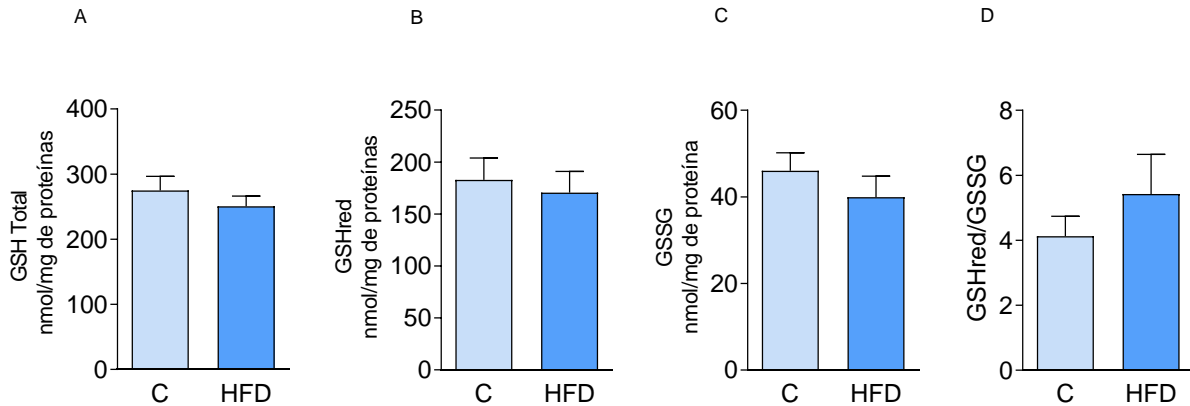


Figura 3. Cuantificación de glutatión en homogenizado de tejido de hígado. A). GSH total (GSHred+GSSG). B). GSHred. C). GSSG. D). Razón GSH/GSSG. Las barras representan el promedio \pm error medio estándar de 6 experimentos independientes para cada condición. GSH: glutatión, GSHred: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado, C: Control, HFD: Grupo alimentado con dieta alta en grasa.

6.2.-Contenido de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH+NAD⁺)

En homogenizados de corazones del grupo HFD, el contenido total de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH+NAD⁺) y la fracción oxidada (NAD⁺) están aumentadas en un 45% y 52%, respectivamente (figura 4A y 4C). La razón NADH/NAD⁺ está disminuida en un 60%, (figuras 4D). En el homogenizado del tejido hepático no se encontraron diferencias entre el grupo control y el HFD (figura 5 A-D).

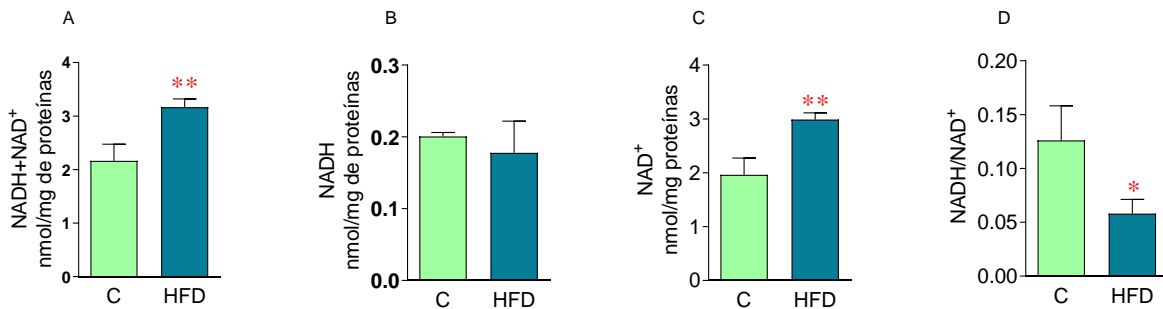


Figura 4. Cuantificación del contenido de NADH, NAD⁺ en homogenizado de tejido cardiaco. A) NADH+NAD⁺. B) NADH. C)NAD⁺. D) Razón de NADH/NAD⁺. Las barras representan el promedio \pm error medio estándar de 6 experimentos independientes para cada condición. NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido reducido, NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado, C: Control, HFD: Grupo alimentado con dieta alta en grasa. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

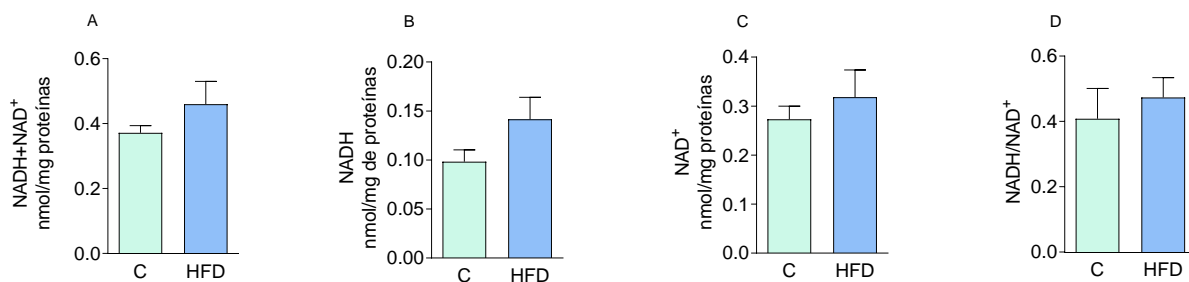


Figura 5. Cuantificación del contenido de nicotinamida adenina dinucleótido en homogenizado de tejido hepático. A) NADH+NAD⁺. B) NADH. C) NAD⁺. D) Razón de NADH/NAD⁺. Las barras representan el promedio \pm error medio estándar de 6 experimentos independientes para cada condición. NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido reducido, NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado, C: Control, HFD: Grupo alimentado con dieta alta en grasa.

6.3.-Contenido de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH+NADP⁺)

El contenido total de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH+NADP⁺) es un 15% mayor en el grupo HFD comparado con el grupo control (figura 6A). En forma similar, la fracción reducida (NADPH) está aumentada en un 50%, (figura 6B), sin mostrar diferencias en el contenido de NADP⁺ (forma oxidada) ni en la razón NADPH/NADP⁺ (figura 6C y 6D). En cambio, en homogenizado de hígado, no se detectó un incremento en los contenidos total del fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH+NADP⁺) ni de la forma oxidada (NADP⁺), sólo se encontró aumentada en un 76% la forma reducida (NADPH) y en un 100% la razón NADPH/NADP⁺ en muestras de grupo HFD comparación con los controles (figuras 7B, 7D).

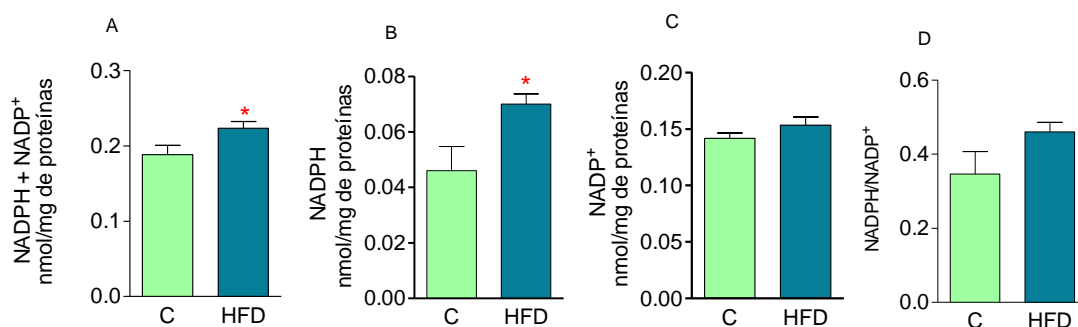


Figura 6. Contenido de fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido en homogenizado de tejido cardíaco. A) NADPH+NADP⁺. B) NADPH. C) NADP⁺. D) Razón de NADPH/NADP⁺. NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido, NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado, C: Control, HFD: Grupo alimentado con dieta alta en grasa. Las barras representan el promedio \pm error medio estándar de 6 experimentos independientes para cada condición. * $p < 0,05$.

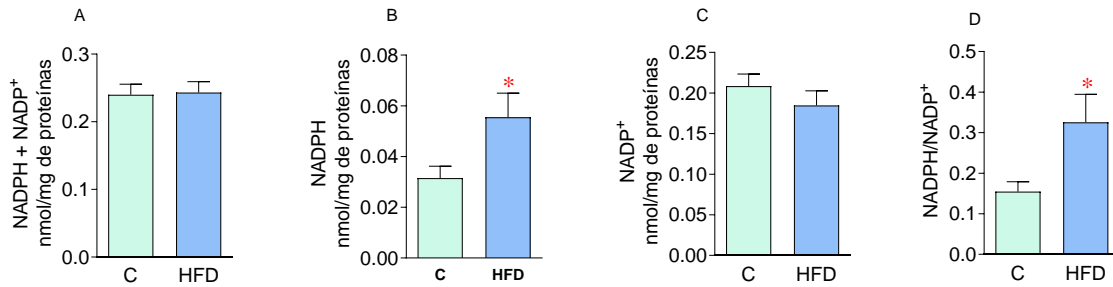


Figura 7. Contenido de fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido en homogenizado de tejido hepático. A) NADPH+NADP⁺. B) NADPH. C) NADP⁺. D) Razón de NADPH/NADP⁺. NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido, NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado, C: Control, HFD: Grupo alimentado con dieta alta en grasa. Las barras representan el promedio \pm error medio estándar de 6 experimentos independientes para cada condición * $p < 0,05$.

6.4.-Cuantificación de la capacidad antioxidante total de homogenizado de tejido cardíaco y hepático y plasma (FRAP)

Se cuantificó Potencial Reductor Férrico de los homogenizados de tejidos y del plasma. Al evaluar los niveles de FRAP en homogenizados de corazón e hígado, no se detectaron diferencias entre los ratones controles y HFD (figura 8A y 8B). Sin embargo, en muestras de plasma del grupo HFD se detectó una disminución de la capacidad antioxidante en un 36% en comparación con el grupo control (figura 8C).

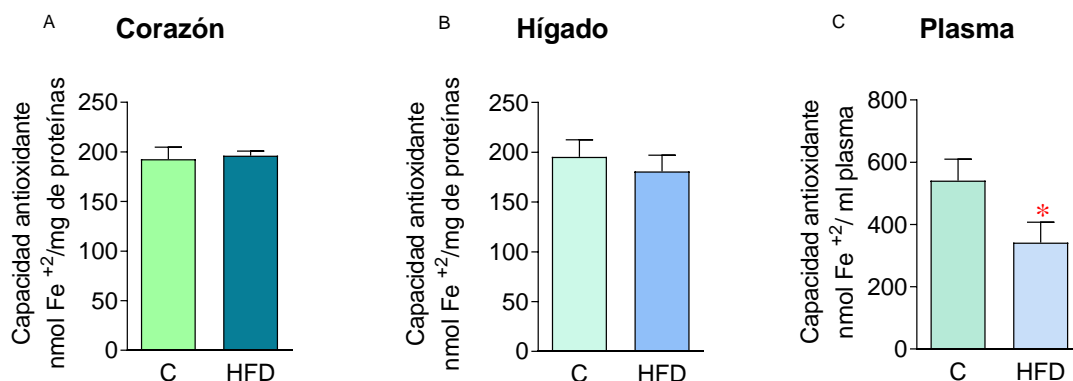


Figura 8. Cuantificación de la capacidad antioxidante total de homogenizado de tejido cardíaco, hepático y del plasma y (FRAP). A) homogenizado de tejido cardíaco. B) homogenizados de hígado. C) Plasma. Las barras representan el promedio \pm error medio estándar de 6 experimentos independientes para cada condición, C: Control, HFD: Grupo alimentado con dieta alta en grasa. * $p < 0,05$

6.5.-Cuantificación de las especies que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) expresadas como MDA

Con el objetivo de evaluar la oxidación de los lípidos de membrana se cuantificó la concentración especies reactivas que reaccionan con el ácido barbitúrico, que es una medida de la oxidación de los lípidos, en homogenizados de corazón, hígado y plasma (figura 9). Se observa que el MDA, un producto de la oxidación lipídica, está ligeramente disminuido en el tejido cardiaco. Para tejido hepático y plasma no se observaron diferencias.

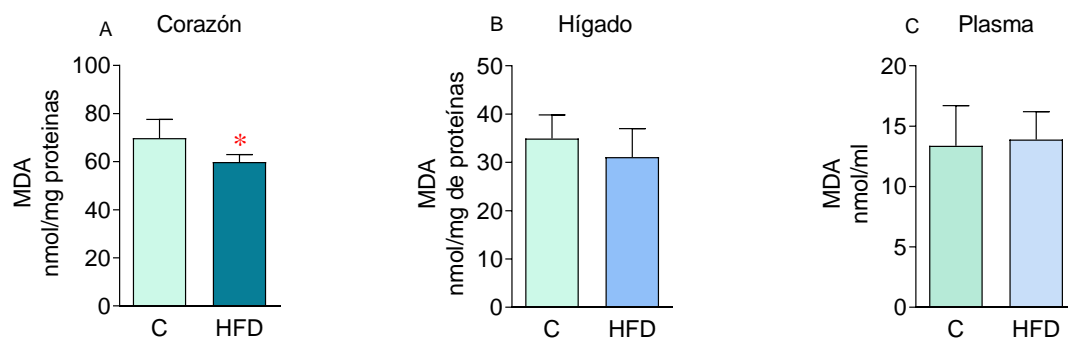


Figura 9. Cuantificación de TBARS (especies que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico). A). Homogenizados de corazón. B) Homogenizados de hígado. C) Plasma. Las barras representan el promedio \pm error medio estándar de 6 experimentos independientes para cada condición, C: Control, HFD: Grupo alimentado con dieta alta en grasa. * $p < 0,05$

6.6.-Carbonilación de proteínas

La carbonilación es uno de los muchos tipos de modificaciones post-traduccionales que puede sufrir una proteína, ya sea por reacción directa con especies reactivas de oxígeno o por reacción con productos de la peroxidación lipídica. Encontramos que en los homogenizados de hígado, el grupo HFD tiene un 22% más de proteínas carboniladas que el grupo control, sin embargo, esta diferencia no se observa en el tejido cardiaco (figura 10).

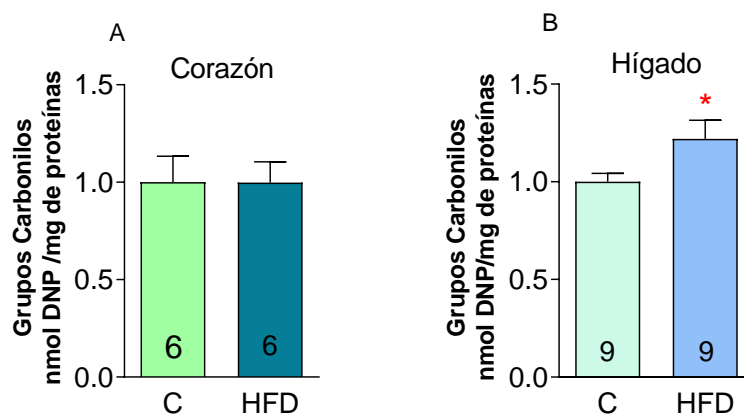


Figura 10. Cuantificación de proteínas carboniladas (normalizadas por el grupo control). A) homogenizados de corazón B) homogenizados de hígado. Las barras representan el promedio \pm error medio estándar, el número en el interior de la barra indica el N experimental, C: Control, HFD: Grupo alimentado con dieta alta en grasa. * $p < 0,05$

6.7.-Cuantificación de la actividad enzimática

Se cuantificaron las actividades enzimáticas de Catalasa (CAT), Superóxido Dismutasa (SOD), Glutación Peroxidasa (GPx) y Glutación Reductasa (GR) en homogenizados de corazón, hígado y plasma.

6.7.1.-Catalasa

Al cuantificar la actividad enzimática de Catalasa (CAT) en homogenizados de corazón e hígado, no se detectaron diferencias entre el grupo control y el grupo HFD (figura 11A y 11B). Al contrario, sí se detectó una disminución de CAT en el plasma del grupo HFD, en comparación a los ratones control (figura 11C).

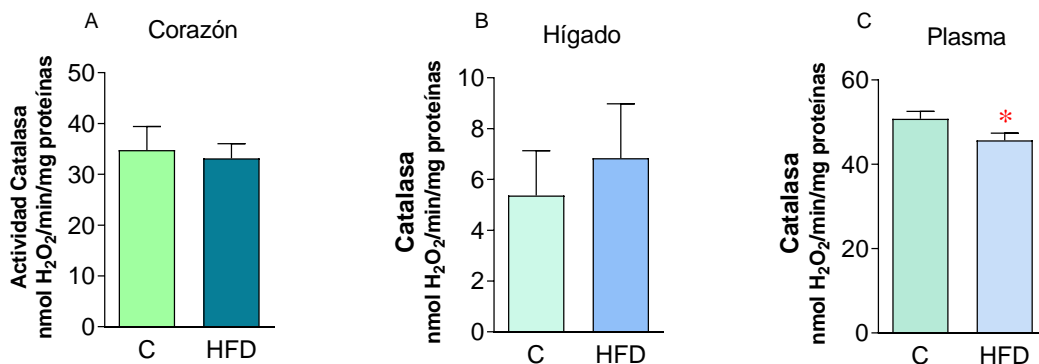


Figura 11. Cuantificación de la actividad enzimática de Catalasa. A) Homogenizados de corazón. B) Homogenizados de hígado. C) Plasma. Las barras representan el promedio \pm error medio estándar de 6 experimentos independientes para cada condición. Catalasa, C: Control, HFD: Grupo alimentado con dieta alta en grasa. * $p < 0,05$.

6.7.2.-Superóxido Dismutasa

La actividad de la Superóxido Dismutasa (SOD) no mostró diferencias en los homogenizados de tejido cardíaco (figura 12A) a diferencia del tejido hepático, donde en el grupo HFD la actividad SOD es un 100% mayor que el grupo control (figura 12B).

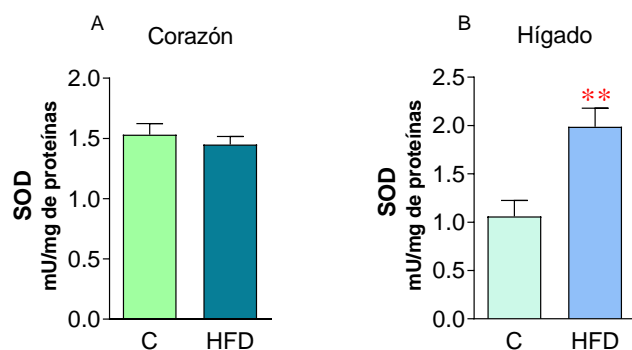


Figura 12. Cuantificación de la actividad enzimática de Superóxido Dismutasa. A) Homogenizados de corazón. B) homogenizados de hígado. Las barras representan el promedio \pm error medio estándar de 6 experimentos independientes para cada condición. SOD: Superóxido dismutasa, C: Control, HFD: Grupo alimentado con dieta alta en grasa. $**p < 0,001$.

6.7.3.-Glutación Peroxidasa

La actividad enzimática de la Glutación Peroxidasa (GPx), no mostró diferencias en los homogenizados de corazón e hígado entre el grupo HFD y el grupo control (figura 13A y 13B).

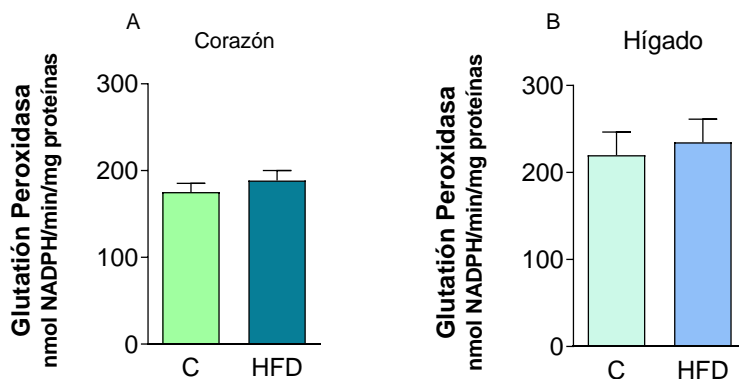


Figura 13. Cuantificación de la actividad Glutación Peroxidasa. A) Homogenizados de corazón. B) Homogenizados de hígado. Las barras representan el promedio \pm error medio estándar de 6 experimentos independientes para cada condición. GP: Glutación Peroxidasa, C: Control, HFD: Grupo alimentado con dieta alta en grasa.

6.7.4.-Glutación Reductasa

La actividad de la Glutación Reductasa en homogenizados de corazón en el grupo HFD es un 20% (figura 14A) mayor que en el grupo control. En contraste, en el tejido hepático la enzima disminuyó en un 60% en el grupo HFD (figura 14B). En el plasma no se detectaron diferencias en los grupos en estudio (figura 14C).

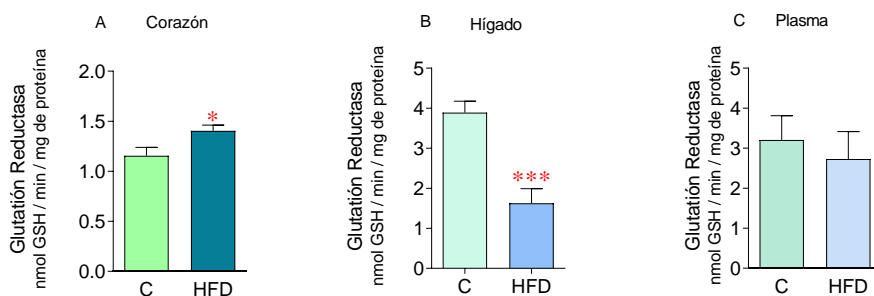


Figura 14. Cuantificación de la actividad Glutación Reductasa. A) Homogenizados de corazón B) Homogenizados de hígado C) Plasma. Las barras representan el promedio \pm error medio estándar de 6 experimentos independientes para cada condición. GR: Glutación reductasa, C: Control, HFD: Grupo alimentado con dieta alta en grasa. * $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$

7.-DISCUSIÓN

El objetivo principal de este estudio es determinar si una dieta alta en grasa provoca un estado reductivo en el corazón de ratones obesos.

Se ha observado que los efectos de la dieta alta en grasa en ratones se asimilan a los efectos que ésta tiene en humanos (72). Se ha demostrado que el estrés oxidativo participa en la patogénesis de la obesidad, disminuyendo la acción de los sistemas antioxidantes en órganos como el corazón, relacionándose con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (73). De esta manera, esperábamos encontrar signos marcados de estrés oxidativo en estos animales. Sin embargo, nuestros resultados indican que no hay un estado de estrés oxidativo, a pesar de que observamos aumento de marcadores de estrés oxidativo, como el aumento de NAD^+ . Asimismo, resultados previos del Laboratorio muestran que los marcadores de inflamación son bajos en este modelo animal, y que presentan signos tempranos de hipertrofia cardiaca a pesar de no mostrar parámetros de estrés oxidativo. En conjunto, nuestros resultados indican que no existe un estado de estrés oxidativo en los ratones alimentados con una dieta alta en grasa por 12 semanas, a pesar de que desarrollan obesidad.

Ahora bien, hay parámetros que aparentemente no coinciden con la aseveración anterior, como el aumento del NAD^+ . Cabe entonces preguntarse cuál es la razón del aumento del NAD^+ . Al respecto, es importante mencionar que la enzima NNT supe las altas concentraciones de NADPH que se necesitan para los sistemas antioxidantes celulares (GPx1, tioredoxina). Se ha reportado que ratones C57BL/6 tienen una delección en el gen *Nnt* que genera un *knockout* de la enzima NNT (74). La ausencia de la enzima NNT impide la liberación de insulina en las células beta del páncreas, lo que se traduce en hiperglicemia (75). Nuestros resultados muestran hiperglicemia e hiperinsulinemia, por lo tanto, es probable que nuestros ratones no tengan la delección de *Nnt* (se ha descrito que esta delección sólo se presenta en las cepas más puras del Laboratorio Jackson (75)). Esto

explicaría que el NAD^+ aumenta al tiempo que aumenta la reducción de NADPH para ser usado en la reacción de la Glutación Reductasa a nivel mitocondrial. Por otro lado, resulta interesante considerar que se ha reportado que AcetilCoA inhibe la acción de NNT (76). La AcetilCoA participa en metabolismo de los ácidos grasos libres y, por lo tanto, la oxidación de estos aumenta la AcetilCoA mitocondrial (77). En nuestros ratones no observamos aumento de lipoperoxidación (MDA), por lo tanto, no se estaría inhibiendo NNT por medio de AcilCoA. Finalmente, esto explicaría el aumento de NAD^+ en ausencia de un estado de estrés oxidativo.

Dado lo anterior, resta explicar la ausencia de estrés oxidativo en el corazón de ratones alimentados con una dieta alta en grasa por 12 semanas, esto podría deberse a:

1. **Características propias del modelo utilizado.** Se ha demostrado que los ratones C57BL/6J aumentan la capacidad de acumular grasa recién a las 8 semanas, la que está regulada por los genes *Mest*, *Sfrp5* y *Bmp3*, en respuesta a un balance positivo de energía más que a una dieta alta en grasa. (78) Así, es probable que 12 semanas sea un tiempo insuficiente para observar un aumento de los marcadores de estrés oxidativo. Para futuros estudios, se sugiere aumentar el tiempo de intervención más allá de las 12 semanas.

La expresión del gen *Mest* se relaciona con la expansión del tejido adiposo. Se ha observado que éste no se expresa durante el periodo neonatal en ratones C57BL/6J alimentados con una dieta alta en grasa (78). Este aspecto refuerza la idea de que 12 semanas de dieta alta en grasa pueden ser insuficientes para observar altos niveles de estrés oxidativo en este modelo de obesidad, por lo tanto, no se excluye la posibilidad de que estos pudiesen hacerse evidentes con un mayor tiempo de observación.

Por otro lado, un estudio de Norris y cols. analiza el comportamiento de los niveles de GSHtotal, GSHred y GSHred/GSSG en 3 cepas distintas de ratones utilizados como modelos de obesidad (C57BL/6J, DBA/2J y AKR/J), confirmando que el comportamiento varía entre ellas. Así, observaron que la concentración hepática de GSSG disminuye en los ratones C57BL/6J en relación con los controles, mientras que aumenta en las cepas DBA/2J y AKR/J. Por el contrario, observaron que la concentración renal de GSSG aumenta en los ratones C57BL/6J y DBA/2J en relación con los controles, mientras que disminuye en la cepa AKR/J (53).

2. **Disminución de la actividad enzimática de GPx y CAT.** Un trabajo de Kim et al. (79), publicado recientemente, mostró que ratones C57BL/6J con deficiencia de GPx1 y CAT tenían menos desórdenes metabólicos asociados a obesidad que los controles. En este estudio, se utilizaron ratones C57BT WT como controles y ratones con deficiencia de GPX1 y CAT (GPx-1^{-/-} × Cat^{-/-}), alimentados con una dieta alta en grasa por 16 semanas. Se observó que los ratones GPx-1^{-/-} × Cat^{-/-} tenían niveles de insulina, glicemia y esteatosis hepática, menores a los ratones *wild type*. Se plantea que la deficiencia de estas enzimas induciría un estado antiinflamatorio, ya que se vio que los niveles de IL-17A y STAT3 estaban disminuidos en los ratones GPx-1^{-/-} × Cat^{-/-} en comparación con los controles, lo cual reduciría los efectos metabólicos derivados del aumento del tejido adiposo visceral.

En nuestro trabajo, se observó que la actividad de GPx y de CAT no varía significativamente ni en corazón ni en hígado de los ratones alimentados con dieta alta en grasa, respecto a los controles. En condiciones de estrés oxidativo, se esperaría encontrar un aumento de la actividad de estas enzimas; ahora bien, de acuerdo con los resultados de Kim et al. (79), la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes tendría un rol protector frente al daño metabólico en condiciones de obesidad.

Estos resultados no coinciden con los de Gramlich et al. (80), quienes midieron los niveles de enzimas antioxidantes (aldehído deshidrogenasa mitocondrial, hemooxigenasa-1, eNOS) en el tejido cardíaco de pacientes obesos que fueron sometidos a *bypass* coronario; concluyendo que los pacientes obesos se encuentran en un estado de estrés oxidativo, en comparación con los controles. Determinaron que la elevación de los niveles de ROS en obesos podría deberse a un aumento de la producción a una de ROS (activación de fuentes productoras) o disminución de los mecanismos antioxidantes.

8.-CONCLUSIONES

Si bien se observó que los ratones alimentados con una dieta alta en grasa generan una respuesta antioxidante en el corazón, no es posible aseverar que ésta produzca un estado de estrés reductivo en el órgano de manera permanente. Por otro lado, a pesar de que se observan marcadores sugerentes de un estado de reducción más que de oxidación, los resultados y el diseño de este estudio no permiten predecir si estos marcadores se mantienen en el tiempo o si corresponden a un estado de adaptación previo a un estado de oxidación asociado con los cambios metabólicos de la obesidad. Para futuros estudios, se sugiere aumentar el tiempo de seguimiento de los ratones alimentados con dieta alta en grasa, y medir marcadores de estrés oxidativo a lo largo del periodo de tiempo.

9.-ANEXOS

I. **Anexo 1.** Parámetros físicos de los grupos control y HFD, datos individualizados para cada n.

Muestra	Fecha	Peso (g)	Peso corazón (mg)	Largo tibia (mm)	Corazón/tibia	Peso tejido adiposo (g)	(Peso tejido adiposo/peso corporal)*100
C1	22/03/17	28,50	139,00	17,34	8,02	0,51	1,79
C2	22/03/17	25,90	113,00	17,23	6,56	0,50	1,93
C3	22/03/17	26,60	122,00	17,63	6,92	0,60	2,26
c4	23/03/17	24,70	117,00	17,00	6,88	0,62	2,51
C5	23/03/17	25,00	127,00	17,00	7,47	0,32	1,28
C6	23/03/17	25,20	121,00	16,54	7,32	0,50	1,98
Promedio		26,0	123,2	17,1	7,2	0,5	2,0
DS		1,41	9,09	0,37	0,52	0,11	0,42
HFD1	22/03/17	37,90	167,00	17,32	9,64	2,60	6,86
HFD2	22/03/17	50,00	148,00	17,63	8,39	3,70	7,40
HFD3	22/03/17	42,70	148,00	17,49	8,46	3,11	7,28
HFD4	23/03/17	45,00	139,00	16,85	8,25	2,62	5,82
HFD5	23/03/17	43,20	137,00	17,01	8,05	2,39	5,53
HFD6	23/03/17	46,00	140,00	17,30	8,09	3,39	7,37
Promedio		44,1	146,5	17,3	8,5	3,0	6,7
DS		4,01	11,08	0,29	0,59	0,51	0,83

*DS: desviación estándar.

10.-REFERENCIAS

1. Keaney JF, Larson MG, Vasan RS, Wilson PWF, Lipinska I, Corey D, et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(3):434-9.
2. Karam BS, Chavez-Moreno A, Koh W, Akar JG, Akar FG. Oxidative stress and inflammation as central mediators of atrial fibrillation in obesity and diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 2017;16(1):120.
3. Zhang Z, Wang M. Obesity, a health burden of a global nature. *Acta Pharmacol Sin.* 2012;33(2):145-7.
4. Bjørndal B, Burri L, Staalesen V, Skorve J, Berge RK. Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. *J Obes.* 2011;2011:490650.
5. Cannon CM, Trembley JH, Kren BT, Unger GM, O'Sullivan MG, Cornax I, et al. Therapeutic Targeting of Protein Kinase CK2 Gene Expression in Feline Oral Squamous Cell Carcinoma: A Naturally Occurring Large-Animal Model of Head and Neck Cancer. *Hum Gene Ther Clin Dev.* 2017;28(2):80-6.
6. Lee M-J, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med.* 2013;34(1):1-11.
7. Skårn SN, Eggesbø HB, Flaa A, Kjeldsen SE, Rostrup M, Brunborg C, et al. Predictors of abdominal adipose tissue compartments: 18-year follow-up of young men with and without family history of diabetes. *Eur J Intern Med.* 2016;29:26-31.
8. Lalia AZ, Dasari S, Johnson ML, Robinson MM, Konopka AR, Distelmaier K, et al. Predictors of Whole-Body Insulin Sensitivity Across Ages and Adiposity in Adult Humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(2):626-34.
9. Goldani H, Adami FS, Antunes MT, Rosa LH, Fassina P, Quevedo Grave MT, et al. Applicability of the visceral adiposity index (VAI) in the prediction of the components of the metabolic syndrome in elderly. *Nutr Hosp.* 2015;32(4):1609-15.
10. Jia G, Jia Y, Sowers JR. Contribution of Maladaptive Adipose Tissue Expansion to Development of Cardiovascular Disease. *Compr Physiol.* 2016;7(1):253-62.
11. Kim JI, Huh JY, Sohn JH, Choe SS, Lee YS, Lim CY, et al. Lipid-overloaded enlarged adipocytes provoke insulin resistance independent of inflammation. *Mol Cell Biol.* 2015;35(10):1686-99.
12. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa R-DV, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(8):1343-74.

13. Georgieva E, Ivanova D, Zhelev Z, Bakalova R, Gulubova M, Aoki I. Mitochondrial Dysfunction and Redox Imbalance as a Diagnostic Marker of «Free Radical Diseases». *Anticancer Res.* 2017;37(10):5373-81.
14. Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care.* 2008;31 Suppl 2:S170-180.
15. Fridovich I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem.* 1997;272(30):18515-7.
16. Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med.* 2005;26(4-5):340-52.
17. Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology.* 2000;149(1):43-50.
18. Le Bras M, Clément M-V, Pervaiz S, Brenner C. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol Histopathol.* 2005;20(1):205-19.
19. Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(8):662-80.
20. Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, Parisi E, Di Rosa G, et al. Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. *Int J Mol Sci.* 2014;16(1):378-400.
21. Barba I, Miró-Casas E, Torrecilla JL, Pladevall E, Tejedor S, Sebastián-Pérez R, et al. High-fat diet induces metabolic changes and reduces oxidative stress in female mouse hearts. *J Nutr Biochem.* 2017;40:187-93.
22. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004;114(12):1752-61.
23. Maciejczyk M, Żebrowska E, Zalewska A, Chabowski A. Redox Balance, Antioxidant Defense, and Oxidative Damage in the Hypothalamus and Cerebral Cortex of Rats with High Fat Diet-Induced Insulin Resistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 6;2018:6940515.
24. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 2001;30(11):1191-212.
25. Stone JR, Yang S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(3-4):243-70.
26. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem.* 2002;277(47):44784-90.

27. Anderson EJ, Lustig ME, Boyle KE, Woodlief TL, Kane DA, Lin C-T, et al. Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J Clin Invest*. 2009;119(3):573-81.
28. Boyer F, Diotel N, Girard D, Rondeau P, Essop MF, Bourdon E. Enhanced oxidative stress in adipose tissue from diabetic mice, possible contribution of glycated albumin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;473(1):154-60.
29. Chatterjee S, Ganini D, Tokar EJ, Kumar A, Das S, Corbett J, et al. Leptin is key to peroxynitrite-mediated oxidative stress and Kupffer cell activation in experimental non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2013;58(4):778-84.
30. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000;86(5):494-501.
31. Singh F, Charles A-L, Schlagowski A-I, Bouitbir J, Bonifacio A, Piquard F, et al. Reductive stress impairs myoblasts mitochondrial function and triggers mitochondrial hormesis. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1853(7):1574-85.
32. Pérez-Torres I, Guarner-Lans V, Rubio-Ruiz ME. Reductive Stress in Inflammation-Associated Diseases and the Pro-Oxidant Effect of Antioxidant Agents. *Int J Mol Sci*. 5;18(10):2098.
33. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*. 2015;4:180-3.
34. Ghosh D, Levault KR, Brewer GJ. Relative importance of redox buffers GSH and NAD(P)H in age-related neurodegeneration and Alzheimer disease-like mouse neurons. *Aging Cell*. 2014;13(4):631-40.
35. Marí M, Morales A, Colell A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(11):2685-700.
36. Blacker TS, Duchon MR. Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence. *Free Radic Biol Med*. 2016;100:53-65.
37. Wu J, Jin Z, Zheng H, Yan L-J. Sources and implications of NADH/NAD⁺ redox imbalance in diabetes and its complications. *Diabetes Metab Syndr Obes Targets Ther*. 2016;9:145-53.
38. Moreno-Sánchez R, Marín-Hernández Á, Gallardo-Pérez JC, Vázquez C, Rodríguez-Enríquez S, Saavedra E. Control of the NADPH supply and GSH recycling for oxidative stress management in hepatoma and liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg*. 2018;1859(10):1138-50.
39. Couto N, Wood J, Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med*. 2016;95:27-42.
40. Hu Y, Benya RV, Carroll RE, Diamond AM. Allelic loss of the gene for the GPX1 selenium-containing protein is a common event in cancer. *J Nutr*. 2005;135(12 Suppl):3021S-3024S.

41. Pires KM, Ilkun O, Valente M, Boudina S. Treatment with a SOD mimetic reduces visceral adiposity, adipocyte death, and adipose tissue inflammation in high fat-fed mice. *Obes Silver Spring Md.* 2014;22(1):178-87.
42. Pérez-Torres I, Guarner-Lans V, Zúñiga-Muñoz A, Velázquez Espejel R, Cabrera-Orefice A, Uribe-Carvajal S, et al. Effect of Cross-Sex Hormonal Replacement on Antioxidant Enzymes in Rat Retroperitoneal Fat Adipocytes. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1527873.
43. Handy DE, Loscalzo J. Responses to reductive stress in the cardiovascular system. *Free Radic Biol Med.* 2017;109:114-24.
44. Olusi SO. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes.* 2002;26(9):1159-64.
45. Yesilbursa D, Serdar Z, Serdar A, Sarac M, Coskun S, Jale C. Lipid peroxides in obese patients and effects of weight loss with orlistat on lipid peroxides levels. *Int J Obes* 2005. 2005;29(1):142-5.
46. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;482(3):419-25.
47. Casañas-Sánchez V, Pérez JA, Quinto-Aleman D, Díaz M. Sub-toxic Ethanol Exposure Modulates Gene Expression and Enzyme Activity of Antioxidant Systems to Provide Neuroprotection in Hippocampal HT22 Cells. *Front Physiol.* 2016 27;7:312.
48. Casañas-Sánchez V, Pérez JA, Fabelo N, Quinto-Aleman D, Diaz ML. Docosahexaenoic (DHA) modulates phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase (Gpx4) gene expression to ensure self-protection from oxidative damage in hippocampal cells. *Front Physiol.* 2015 22;6:203.
49. Ademowo OS, Dias HKI, Burton DGA, Griffiths HR. Lipid (per) oxidation in mitochondria: an emerging target in the ageing process? *Biogerontology.* 2017;18(6):859-79.
50. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438.
51. McMurray F, Patten DA, Harper M-E. Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in Obesity-Recent Findings and Empirical Approaches. *Obes Silver Spring Md.* 2016;24(11):2301-10.
52. Jarukamjorn K, Jearapong N, Pimson C, Chatuphonprasert W. A High-Fat, High-Fructose Diet Induces Antioxidant Imbalance and Increases the Risk and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *Scientifica.* 2016:5029414.
53. Norris KM, Okie W, Kim WK, Adhikari R, Yoo S, King S, et al. A high-fat diet differentially regulates glutathione phenotypes in the obesity-prone mouse strains DBA/2J, C57BL/6J, and AKR/J. *Nutr Res N Y N.* 2016;36(12):1316-24.

54. Sairam T, Patel AN, Subrahmanian M, Gopalan R, Pogwizd SM, Ramalingam S, et al. Evidence for a hyper-reductive redox in a sub-set of heart failure patients. *J Transl Med.* 2018;16(1):130.
55. Yu Q, Lee CF, Wang W, Karamanlidis G, Kuroda J, Matsushima S, et al. Elimination of NADPH oxidase activity promotes reductive stress and sensitizes the heart to ischemic injury. *J Am Heart Assoc.* 2014;3(1):e000555.
56. Milagro FI, Campión J, Martínez JA. Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. *Obes Silver Spring Md.* 2006;14(7):1118-23.
57. Echeverría F, Valenzuela R, Bustamante A, Álvarez D, Ortiz M, Soto-Alarcon SA, et al. Attenuation of High-Fat Diet-Induced Rat Liver Oxidative Stress and Steatosis by Combined Hydroxytyrosol- (HT-) Eicosapentaenoic Acid Supplementation Mainly Relies on HT. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2;2018:5109503
58. Chung APYS, Gurtu S, Chakravarthi S, Moorthy M, Palanisamy UD. Geraniin Protects High-Fat Diet-Induced Oxidative Stress in Sprague Dawley Rats. *Front Nutr.* 2018 16;5:17.
59. Yu D, Chen G, Pan M, Zhang J, He W, Liu Y, et al. High fat diet-induced oxidative stress blocks hepatocyte nuclear factor 4 α and leads to hepatic steatosis in mice. *J Cell Physiol.* 2018;233(6):4770-82.
60. Rincón-Cervera MA, Valenzuela R, Hernandez-Rodas MC, Marambio M, Espinosa A, Mayer S, et al. Supplementation with antioxidant-rich extra virgin olive oil prevents hepatic oxidative stress and reduction of desaturation capacity in mice fed a high-fat diet: Effects on fatty acid composition in liver and extrahepatic tissues. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* 2016;32(11-12):1254-67.
61. Sena CM, Cipriano MA, Botelho MF, Seica RM. Lipoic Acid Prevents High-Fat Diet-Induced Hepatic Steatosis in Goto Kakizaki Rats by Reducing Oxidative Stress Through Nrf2 Activation. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9):2706.
62. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150(1):76-85.
63. Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem.* 1980;106(1):207-12.
64. Zhang D, Hu X, Li J, Liu J, Baks-Te Bulte L, Wiersma M, et al. DNA damage-induced PARP1 activation confers cardiomyocyte dysfunction through NAD⁺ depletion in experimental atrial fibrillation. *Nat Commun.* 2019;10(1):1307.
65. Chen L, Yang H, Yi Z, Jiang L, Li Y, Han Q, et al. LncRNA GAS5 regulates redox balance and dysregulates the cell cycle and apoptosis in malignant melanoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2019;145(3):637-52.
66. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996;239(1):70-6.

67. Albatayneh EM, Al-Sbou MS, Mahgoub SS, Mwafi NR, Alnawaiseh NA. Serum Oxidative-Antioxidative Status in Patients With Alkaptonuria. *J Clin Med Res.* 2019;11(5):337-44.
68. Tzeng T-F, Liu WY, Liou S-S, Hong T-Y, Liu I-M. Antioxidant-Rich Extract from Plantaginis Semen Ameliorates Diabetic Retinal Injury in a Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Model. *Nutrients.* 2016;8(9).
69. Wiecek M, Szymura J, Maciejczyk M, Kantorowicz M, Szygula Z. Anaerobic Exercise-Induced Activation of Antioxidant Enzymes in the Blood of Women and Men. *Front Physiol.* 2018;9:1006.
70. Kaushal JB, Popli P, Sankhwar P, Shukla V, Dwivedi A. Sonic hedgehog protects endometrial hyperplasia cells against oxidative stress via suppressing mitochondrial fission protein dynamin-like GTPase (Drp1). *Free Radic Biol Med.* 2018;129:582-99.
71. Cao Z, Ding Y, Cao L, Ding G, Wang Z, Xiao W. Isochlorogenic acid C prevents enterovirus 71 infection via modulating redox homeostasis of glutathione. *Sci Rep.* 2017;7(1):16278.
72. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev.* 2010;23(2):270-99.
73. Santilli F, Guagnano MT, Vazzana N, La Barba S, Davi G. Oxidative stress drivers and modulators in obesity and cardiovascular disease: from biomarkers to therapeutic approach. *Curr Med Chem.* 2015;22(5):582-95.
74. Toye AA, et al. A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. *Diabetologia.* 2005;48(4):675-86.
75. Rydström J. Mitochondrial transhydrogenase--a key enzyme in insulin secretion and, potentially, diabetes. *Trends Biochem Sci.* 2006;31(7):355-8.
76. Rydström J. Site-Specific Inhibitors of Mitochondrial Nicotinamide-Nucleotide Transhydrogenase. *Eur J Biochem.* 1972;18;31(3):496-504.
77. Shi L, Tu P. Acetyl-CoA and the Regulation of Metabolism: Mechanisms and Consequences. *Curr Opin Struct Biol.* 2015;33:125-131.
78. Chu D, Malinowska E, Jura M, Kozak LP. C57BL/6J mice as a polygenic developmental model of diet-induced obesity. *Physiol Rep.* 2017;5(7):e13093.
79. Kim H-R, Choi E-J, Kie J-H, Lee J-H, Seoh J-Y. Deficiency of glutathione peroxidase-1 and catalase attenuated diet-induced obesity and associated metabolic disorders. *Acta Diabetol.* 2019; 1432-5233.
80. Gramlich Y, Daiber A, Buschmann K, Oelze M, Vahl C-F, Münzel T, et al. Oxidative Stress in Cardiac Tissue of Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Graft Surgery: The Effects of Overweight and Obesity. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;17:6598326.

